

Meme Kanseri Metastazında Serbest DNA'ların Rolü

Aylin Dal

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Ağustos 2016

The Role of Cell-Free DNAs in Breast Cancer Metastasis

Aylin Dal

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

August 2016

Meme Kanseri Metastazında Serbest DNA'ların Rolü

Aylin Dal

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN

Bu tez ESOĞÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birim' leri tarafından 2014-575 nolu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Ağustos 2016

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Aylin DAL'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Meme Kanseri Metastazında Serbest DNA'ların Rolü" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye : Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Üye : Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fulya DOĞANER

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Meme Kanseri Metastazında Serbest DNA' ların Rolü ” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 11/07/2016

Aylin DAL

İmza

ÖZET

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Hayati önem taşıyan organlarda gelişen sekonder tümörler, meme kanserinden kaynaklı ölümün en önemli nedenini oluşturmaktadır. Bu yüzden, metastaz gelişiminin önlenmesinin ölüm oranını büyük ölçüde düşüreceği düşünülmektedir. Günümüzde meme kanseri tanısında ve takibinde biyobelirteçler kullanılmasına karşın, metastaz gelişiminin belirlenmesinde yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu belirteç, invaziv olmayan yollardan kolaylıkla elde edilmeli, hastanın prognozu hakkında bilgi vermesinin yanında, tümör dokusuna spesifik mutasyonlar hakkında yorum yapılmasına olanak sağlamalıdır.

Serbest DNA'lar, plazma ve serumda bulunan tümör hücrelerine ait DNA fragmentleridir. Yapılan çalışmalar serbest DNA'ların kanser hastalarında prognostik ve diagnostik açıdan değere sahip olduğunu göstermektedir. Serbest DNA'ların, hassas hücreleri etkileyerek, metastaza neden olabileceği çeşitli hayvan modeli çalışmalarında gösterilmiştir. Gen transferi ile gerçekleştiği düşünülen bu olay, daha sonra "Horizontal Gen Transferi" olarak adlandırılmış olup "Genometastaz Hipotezi" olarak terminolojiye geçirilmiştir

Yapılan bu çalışmada, ko-kültür sisteminde MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ile sağlıklı osteoblast hFOB 1.19 hücrelerindeki *APC*, *RASSF1A* ve *p53* genleri için horizontal gen transferi MSP/PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Ayrıca DNaz I'in gen transfeksiyonu üzerine olan etkileri de incelenmiştir. Muhtemel gen transferi ile hücrelerin canlılık, proliferasyon ve adezyon özellikleri üzerine etkisi Tripa blue ve XTT yöntemleri esas alınarak belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda, metile *APC1A*, *APC1B* ve *p53* ekson 8 horizontal gen transfeksiyonunun hFOB 1.19 hücrelerine gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu transfeksiyon sonucunda, hFOB 1.19 hücrelerinin adeziv özelliklerinde değişim olduğu gözlenmiştir. DNaz I' in hücrelerde transfeksiyonu hızlandırdığı analiz edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: serbest DNA, meme kanseri, metastaz, kemik, genometastaz, DNaz I

SUMMARY

Breast cancer is the most common and deadly cancer type in women. The main cause of death the secondary tumor developing to vital organ that appear at the end of the process of metastasis. Therefore, its believed that prevention of metastasis development also significantly reduce the mortality. Today however there are biomarkers for breast cancer diagnosis, there are also need to develop new biomarkers for metastasis detection for early period. The biomarker must be readily obtained from non-invasive ways and it should allow to comment on specific mutations in the tumor tissue and provide information about the patient's prognosis. Cell free DNA's are tumour cell derived DNA fragments which are present in plasma and serum. It has been shown in many studies that cell free DNA may have diagnostic and prognostic value for cancer patients. It has been shown in animal studies that tumour cell derived-cell free DNA may affect sensitive cell and can cause metastasis. This event is thought to occur by gene transfer that named as "Genometastasis Hypothesis" and this gene transfer termed as " Horizontal Gene Transfer". In this study, we cultured with MDA-MB-231 breast cancer cell line and hFOB 1.19 osteoblast cell line in co-culture system and then investigated APC, RASSF1 and p53 gene horizontal gene transfer with MSP/PCR that investigated DNase I affect on gene transfection in the co-culture system. And the determined the cell proliferation, adhesion and viability values with Tripan blue and XTT. As a result of the study, we identified methylated APC1A, APC1B and p53 exon 8 horizontal gene transfer MDA-MB-231 cells to hFOB 1.19 cells. Result of the transfection, we demonstrated that result of the horizontal gene transfection hFOB 1.19 cells gained malignant cell adhesive properties and the transfection was increased by DNase I.

Keywords: cell-free DNA, breast cancer, metastasis, bone, genometastasis, DNase I

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi' ne geldiğim günden bu yana yanımda olan ve bundan sonra da olacağına emin olduğum, karşılaştığım her sorunda kimi zaman bir danışman, hoca; kimi zaman da bir sırdaş, arkadaş olan ama ne olursa olsun benden gülen yüzünü ve yol göstericiliğini esirgemeyen, bana hep bir 'anne' gibi yaklaşan danışmanım Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN' a,

Şimdi çok uzaklarda olsa da, hep varlığını hissedeceğim, yüksek lisans dönemimde bana deneyimleri ile yardımcı olan ve hep olacağını bildiğim İstanbul Aydın Üniversitesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Ahu SOYOCAK'a,

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ'e, öğretim üyelerine, asistanlarına ve yardımcı personellerine,

Bugün burada olmamda büyük önemi olan, Melis'in ve Çınar' ın babası İstanbul Aydın Üniversitesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Devrim AKGÜNDÜZ'e,

Hayatları boyunca benim için hiçbir özveriden kaçınmadan sadece mutluluğumu isteyen ve her kararında yanımda olan, bu günlere gelmemde maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen annem Aysen DAL ve babam Salih DAL'a, aynı zamanda küçük kardeşim Ayşin DAL'a,

Tezimin yazım aşamasında yanımda olan ve bundan sonrada yanımda olacağına emin olduğum Moleküler Biyolog Volkan ULUTAŞ'a,

Desteğinden dolayı ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne,

Sonsuz Teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1.Meme Kanseri.....	5
2.1.1. Meme kanseri epidemiyolojisi.....	5
2.1.2. Meme kanseri etiyolojisi.....	6
2.1.3. Meme kanseri biyolojisi.....	8
2.1.4. <i>p53</i> geni.....	9
2.2.Epigenetik Değişimler.....	11
2.2.1. DNA metilasyonu.....	12
2.2.1.1. <u><i>RASSF1A</i> geni</u>	14
2.2.1.2. <u><i>APC</i> geni</u>	15
2.3.Metastaz.....	18
2.3.1. Meme kanseri metastazı.....	21
2.3.2. Meme kanseri kemik metastazı.....	23
2.4.Kemik.....	25
2.4.1. Kemik hücreleri.....	27
2.4.2. Meme kanseri kemik metastazı patogenezi.....	32
2.5.Serbest Nükleik Asitler.....	34
2.5.1. Meme kanseri ve serbest DNA.....	38
2.6.Genometastaz Hipotezi.....	41

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>SAYFA</u>
2.7.DNaz I.....	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	45
3.1. Hücre Kültürü	45
3.1.1. Sterilizasyon.....	45
3.1.2. Besiyeri hazırlanması ve hücre yetiştirilmesi.....	45
3.1.3. Standart eğrilerin oluşturulması.....	46
3.1.4. DNaz I hazırlanması ve letal doz belirlenmesi.....	46
3.1.5. Ko-kültür sisteminin oluşturulması.....	47
3.1.6. Proliferasyon, adezyon ve canlılık belirlenmesi.....	48
3.1.6.1. <u>Proliferasyon belirlenmesi</u>	49
3.1.6.2. <u>Adezyon belirlenmesi</u>	49
3.1.6.3. <u>Canlılık belirlenmesi</u>	49
3.2. DNA İzolasyonu	50
3.2.1. Hücrelerden DNA izolasyonu	50
3.2.2. Besiyerinden DNA izolasyonu	50
3.2.3. Bi-sülfid dönüşümü	51
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (<i>Polymerase Chain Reaction-PCR</i>) ve Metilasyon Spesifik PCR (<i>Methylation Specific PCR-MSP</i>)	52
3.3.1. <i>p53</i> PCR.....	52
3.3.2. <i>APCIA</i> ve <i>APCIB</i> MSP.....	53
3.3.3. <i>RASSF1A</i> MSP	54
3.4. Jel Elektrophorez Sistemlerinin Hazırlanması	55
3.4.1. Poliakrilamid jel elektrophorezi ve gümüş boyama yöntemi.....	55
3.4.2. %2' lik agaroz jel elektrophorezi	56
3.5. İstatistiksel Değerlendirme.....	57
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	58
4.1. Bulgular	58
4.1.1. Gruplandırma sistemi	58
4.1.2. Hücre dizileri standart eğrilerinin belirlenmesi.....	58

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>SAYFA</u>
4.1.3. DNaz I konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	60
4.1.4. Proliferasyon, adezyon ve canlılık verilerinin değerlendirilmesi.....	61
4.1.4.1. <u>Hücrelerde proliferasyon verilerinin değerlendirilmesi</u>	61
4.1.4.2. <u>Hücrelerde adezyon verilerinin değerlendirilmesi</u>	63
4.1.4.3. <u>Hücrelerin canlılık verilerinin değerlendirilmesi</u>	65
4.1.5. MSP agaroz jel elektroforez analizi	67
4.1.5.1. <u>APCIA agaroz jel elektroforez analizi</u>	67
4.1.5.2. <u>APCIB agaroz jel elektroforezi analizi</u>	67
4.1.5.3. <u>RASSFIA agaroz jel elektroforezi analizi</u>	68
4.1.6. p53 poliakrilamid jel elektroforez analizi.....	69
4.1.6.1. <u>p53 ekson 5-7 poliakrilamid jel elektroforez analizi</u>	69
4.1.6.2. <u>p53 ekson 8 poliakrilamid jel elektroforez analizi</u>	70
4.2. Tartışma	71
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR DİZİNİ	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
2.1. Kanser Gelişiminde DNA Metilasyonunun Rolü.....	13
2.2. Wnt Sinyal Yolağı Regülasyonu.....	17
2.3. N-Kaderin ve β -Katenin Aracılı Osteoblast Fonksiyonu ve Kemik Yapımı.....	17
2.4. Metastatik Kaskad.....	19
2.5. Metastaz Modelleri.....	22
2.6. Meme Kanseri Metastatik Tropizması.....	23
2.7. Kemik Hücreleri ve Kökenlendikleri Hücre Tipleri.....	27
2.8. Metastaz Sonucunda Kemik Dokusunda Ortaya Çıkan Kısır Döngü.....	33
2.9. Tümör Hücreleri ve Serbest DNA' lar.....	37
3.1. hFOB 1.19 Hücre Dizisi.....	46
3.2. MDA-MB-231 Hücre Dizisi.....	46
3.3. Ko-kültür Sistemi.....	47
3.4. Deney Sırasında Tasarlanan 24 Kuyucuklu Well Plate Düzeni.....	48
4.1. hFOB 1.19 Hücre Dizisi Standart Eğrisi.....	59
4.2. MDA-MB-231 Hücre Dizisi Standart Eğrisi.....	59
4.3. 72 Saat Sonunda DNaz I Uygulanan hFOB 1.19 Hücrelerinin Proliferasyonu.....	60
4.4. 72 Saat Sonunda DNaz I Uygulanan MDA-MB-231 Hücrelerinin Proliferasyonu.....	61
4.5. Proliferasyon Verilerinin Değerlendirilmesi.....	62
4.6. Adezyon Verilerinin Değerlendirilmesi.....	64
4.7. Canlılık Verilerinin Değerlendirilmesi.....	66
4.8. APC ve RASSF1A MSP Analizi.....	69
4.9. p53 PCR Analizi.....	70
5.1. CAT-Tranfeksiyon Deneyinin Şematik Gösterimi.....	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>SAYFA</u>
2.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	7
2.2. <i>p53</i> ' ün Metastatik Kaskad İçerisinde Direkt Veya Dolaylı Olarak Etkilediği Genler Ve Görevler.....	11
2.3. Meme Kanserinde Gelişiminde Rol Oynayan Hipermethile Genler Ve Fonksiyonları.....	14
3.1. Bi-sülfit Dönüşümü Protokülü.....	51
3.2. <i>p53</i> primer dizileri.....	52
3.3. <i>p53</i> PCR Koşulları.....	53
3.4. <i>APC</i> Gen Bölgesi Primer Dizileri.....	53
3.5. <i>APC</i> Gen Bölgeleri MSP Koşulları.....	54
3.6. <i>RASSF1A</i> Gen Bölgesi Primer Dizileri.....	54
3.7. <i>RASSF1A</i> MSP koşulları.....	55
3.8. %15' lik Poliakrilamid Jel Hazırlanması.....	55
3.9. Gümüş Boyama Solusyonlarının Hazırlanması.....	56
4.1. Analizler Sırasında Kullanılan Gruplandırma Sistemi.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
mg	Miligram

Açıklama**Kısaltma**

APC	Adenomatous poliposis koli
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Ekstraselüler matriks
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
hFOB 1.19	Osteoblast hücre dizisi
MDA-MB-231	Meme kanseri hücre dizisi
OPG	Osteoprotegerin
PTHrP	Paratiroid Hormon İlişkili Protein
RANK	Reseptör Aktivator Nükleer Kappa B
RANKL	Reseptör Aktivator Nükleer Kappa B Ligand
RASSF1A	Ras ilişkili domain-içeren protein 1A

Açıklama

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, dünya çapında ölümlerle sonuçlanan ikinci; kadınlar arasında ise birinci sıradaki kanser türüdür. Oldukça heterojen ve kompleks moleküler özelliğe sahip bu hastalığın çeşitli alt tipleri bulunmaktadır. İnvaziv karaktere sahip meme kanseri tipleri, yüksek metastatik kapasiteleri sebebiyle genellikle sekonder tümörlerin oluşmasına ve ölüme neden olmaktadır. Tümör hücrelerine ait moleküler özelliklerin belirlenebilmesi, metastaz potansiyelinin erken safhada tanımlanmasına, kişiye özgü tedavi uygulanabilmesine ve sekonder oluşumların önlenmesine imkan verebilmektedir.

Serbest DNA'lar, hücrenin apoptozu, nekrozu veya canlı hücrelerin aktif serbestleşmesi sonucunda kan dolaşımına salınan DNA fragmentleridir. İlk olarak 1948 yılında belirlenen bu fragmentlerin seviyeleri düşük olmasına rağmen malignansi gelişiminde yükselmektedir. Tümör hücrelerinden kana salınan serbest DNA'ların, hassas hücrelerin genomuna entegre olmasıyla metastaz oluşturabileceği çeşitli çalışmalarda bildirilmiş olup, genomastaz hipotezi olarak isimlendirilmiştir. Meydana gelen horizontal gen transferi çeşitli *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir.

Meme kanseri en fazla akciğer, beyin ya da kemik dokusuna metastaz yaptığı için, bu çalışmada, invaziv karaktere sahip meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 ile hFOB 1.19 normal osteoblast hücreleri ko-kültür sisteminde aynı ortama alınarak, meme kanseri gelişiminde rol oynayan ve sağlıklı kemik hücrelerinde bulunmayan gen bölgeleri metilasyon spesifik PCR (MSP) yöntemi ve klasik PCR ile taranarak hücreler üzerindeki çeşitli etkileri belirlenmiştir.

DNaz I, çift zincirli DNA' nın pirimidin bazları arasındaki fosfodiester bağlarını parçalayan endonükleaz bir enzimdir. Geniş bir aile olan DNaz I' in bazı türleri apoptoz sırasında DNA fragmentasyonunda rol oynamaktadır. Serbest DNA parçalanmasındaki rolünün yanında, metastaz gelişiminde de DNaz I' in etkili olabileceği ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Hazırlanan ko-kültür ortamına DNaz I uygulanarak da sonuçlar farklı bir bakış açısıyla değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

İnsan vücudunda yaklaşık 37.2 trilyon hücre bulunmaktadır ve her bir hücre kendini yönetebilmesini sağlayan DNA molekülüne sahiptir. DNA molekülü “gen” olarak adlandırılan küçük bölümlere ayrılmıştır ve her bir gen hücre içerisinde spesifik sinyal yollarını aktive eden proteinleri oluşturur.

Genetik koda meydana gelen değişiklikler “mutasyon” olarak adlandırılır. Mutasyonlar orijinal koda baz/bazlar eklenerek veya çıkarılarak gerçekleşir. Aynı zamanda, kromozomal yapı, sayı ve genetik değişimlere neden olan ve mutajen olarak adlandırılan mutasyon indükleyici faktörler bulunmaktadır. Oluşan mutasyonlar sağlıklı hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi için onarılmaktadır; onarılmayan hücreler ölüm mekanizmalarının aktivitesiyle yok edilmektedir. Buna karşın kimi zaman DNA onarımı gerçekleşmeyen hücreler sağ kalımını devam ettirmektedir ve çoğalmaya devam ederek iki yeni yavru (*daughter*) hücre mutant DNA’ya sahip bir şekilde çoğalmaya devam etmektedir. Hücrede mutasyonlar proto-onkogen veya tümör süpresör gibi hücrenin metabolizma, sağ kalım ve bölünmesini etkileyen genlerde meydana gelirse malign fenotip kazanabilmektedir.

19. yüzyılın ortalarında, günümüzde bildiğimiz fertilize yumurtadan doku ve kompleks organizmaların nasıl oluştuğu anlaşılmıştır. Tüm dokuların hücre ile hücre ürünlerinden oluştuğu ve bu hücrelerin bölünerek çoğaldığı elde edilen bilgilerden en önemlisidir. Bu bilgiler ışığında, fertilize yumurtanın büyümesi ve bölünmesi aracılığıyla tüm vücut hücrelerini meydana getirdiği ortaya konmuştur (Weinberg v.d., 2013).

İlerleyen zamanlarda gelişen teknoloji ile birlikte tümör gelişimi ve bireysel tümör gelişim farklılıkları ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Normal dokularda olduğu gibi, tümör doku kesitleri de mikroskop altında histolojik olarak incelenmeye başlamıştır. Tümör çeşitleri ile ilgili veriler birikmeye başladığında, tümör hücresinin vücuda dışarıdan gelmesinden ziyade genellikle normal hücreden dönüştüğü bulunmuştur. Tümör hücrelerinin vücut içerisinde hareket edebilme yeteneğinin olduğu belirlenmiştir. Birçok hastada başlangıcından farklı bölgelerde de tümör gelişimi gözlenmiştir. Yeni yerleşim “metastaz” olarak adlandırılırken, başlangıçtaki ilk gelişimi “primer tümör” olarak isimlendirilmiştir (Weinberg v.d., 2013).

Tümör hücreleri çevre dokulara yayılma özelliklerine göre benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Benign tümörlerde, tümör hücreleri yerel dokulara yayılmamakta veya vücuttaki diğer dokulara invaze olmamaktadır. Kapsül oluşturarak bireyin yaşamını çok fazla tehlikeye sokmayan benign tümörler, sinir sistemi, damarlar ve kanallara basınç yaparak hastalık belirtilerini göstererek ve genellikle cerrahi müdahale gerektirirler. Kapsül oluşturmayan malign tümörler ise meydana geldikleri doku veya organdan ayrılarak vücut içinde başka bir bölgeye giderek sekonder tümör oluşumuna neden olabilmektedir (Yılmaz v.d., 2011).

“Kanser” terimi ilk olarak Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) canlıda iyileşmeyen, şifa bulmayan yeni yapılanmaları ifade etmek için kullanıldığı bildirilmektedir. Hipokrat vücut yüzeyinde gelişen, diğerlerinden farklı karakterde olan, kırmızı renkli ve daha yavaş büyüyen şişliklere “*Carcinos*” ya da “*Carcinoma*” demiş; Galen (M.S.2. y.y.) ise bu tip oluşumlara yengece benzeyen görünümüleri dolayısıyla “*Cancer*” adını vermiştir. Bu dönemde, sadece epitelyal kökenli tümörlere kanser denildiği ve hastalık nedeninin de vücut sıvıları arasındaki dengesizliğe bağlandığı görülmektedir. Türk tıp tarihinde ise kanser ilk defa Tarsuslu Osman Hayri Efendi'nin “*Kenzüs Sıhhatül-ebdaniyye*” (1298) isimli eserinde küçük yumru büyüklüğünde, sancılı, damarlı bir yapıyı anlatmak için seratan ifadesi ile tanımlanmıştır (Atıcı, 2007).

Kanser, basit bir şekilde anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize edilmektedir. Temelde sağlıklı hücrelerde malign transformasyonu tetikleyen iki etmen bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi sigara, alkol, sağlıksız beslenme, yaşam tarzı, maruz kalınan kimyasal karsinojenler ve viral vektörler, hava kirliliği, UV veya iyonize radyasyon gibi dış (eksternal) faktörlerdir. Diğerleri ise çeşitli mutasyonlar, immun sistem yetersizliği, hormonlar gibi iç (intrinsik) faktörlerdir. Bu faktörler birlikte veya tek başlarına hareket ederek kansere neden olabilirler. Bununla birlikte sigaradan uzak kalınması, dengeli beslenme veya düzenli sporun gündelik yaşamın bir parçası olması kanser riskini düşürebilmektedir. Kanser çok aşamalı ve kompleks bir hastalık olmasından dolayı, dış faktörlere dikkat edilmesi kanserden korunmaya yeterli olmamaktadır (Siegel v.d., 2015).

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokusunda bulunan normal epitelyal hücrelerin seri halde genetik ve/veya epigenetik malign transformasyon geçirmesi sonucunda ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Genetik mutasyonlar (spesifik nükleotid çiftlerinde meydana gelen değişimler veya kayıplar) fonksiyon kaybına veya azalmasına neden olduğundan dolayı genellikle meme kanseri gelişiminin temelini oluşturmaktadır.

Meme kanseri ile ilgili ilk kayıtlara M.Ö. 2500-3000 yıllarında Eski Mısır'da İmhotep tarafından yazıldığı düşünülen tıbbi papiruslarda ulaşılmıştır. Bu kayıtlarda 9 meme kanseri hastası tarif edilmiştir. İmhotep tarafından tanımlanan meme lezyonlarından birinde, meme dokusunda bir kitleden ve göğüs duvarını da içerisine alan soğuk bir lezyondan bahsedilmiştir. Uygulanan tedaviden herhangi bir cevap alınmadığı ve dokunulmaması gerektiği vurgulanmıştır. Hipokrat ise kanlı meme başı akıntısına sahip bir olguyu tanımlamış ve menapoz ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi belirlemeye çalışmıştır (Donegan, 2006).

2.1.1. Meme kanseri epidemiyolojisi

GLOBOCAN 2012 verilerine göre, Dünya'da 17 milyon kadına kanser tanısı konmuş olup, 521.900 kişide meme kanserinden dolayı ölüm gerçekleşmiştir. Meme kanseri, gelişmiş ülkelerde en çok ölüme neden olan ikinci kanser türü olarak listeye girmiştir. Gelişmiş ülkelerde meme kanseri insidansı 74.1, mortalite oranı ise 14.9 iken; gelişmekte olan ülkelerde 31.3, mortalite oranı ise 11.5 olarak belirlenmiştir (Torre v.d., 2015).

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2014 yılında yayınladığı Türkiye Kanseri İstatistikleri Raporuna göre meme kanseri, 2014 yılında Türkiye'de kadınlar arasında en sık rastlanan kanser tipidir. 35 yaşından sonra kadınlarda meme kanserine yakalanma oranı artmakla birlikte en yüksek risk grubu 60-64 yaş olarak belirtilmiştir. Erkeklerde bu oran oldukça düşüktür. En yüksek oranda 70-74 yaş olarak bildirilmiştir (Gültekin v.d., 2014).

2.1.2. Meme kanseri etiyolojisi

Meme kanseri gelişiminde bazı risk faktörlerinin etkili olduğu bilinmektedir. Bu risk faktörleri hastalığın görülme ihtimalini arttırmaktadır. Fakat bu faktörlerin olması mutlaka meme kanserinin görüleceği anlamına gelmemektedir. Risk faktörüne maruz kalmayan kişilerde de kanser görülmektedir (Çizelge 2.1).

1. Genetik Yatkınlık: Meme kanserinin büyük çoğunluğu sporadik vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10'unda genetik yatkınlık söz konusudur. Ailesel yatkınlığa neden olan genler *BRCA-1* (*Breast cancer susceptibility gene 1*) ve *BRCA-2* (*Breast cancer susceptibility gene 2*)'dir. Bu iki gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar ailesel meme kanserlerinin 2/3'ünde, tüm vakaların ise yaklaşık %5'inde belirlenmiştir (Osborne v.d., 2004; Ponder, 1994). *BRCA-1* geni, ovaryum ve meme kanserine yatkınlığı arttıran, kromozom 17q12-21 lokalize bir genidir. Meme kanseri hastalarının %4'ünde *BRCA-1* mutasyonu görülmektedir. 40 yaş altında ortaya çıkan meme kanserlerinin %25'i *BRCA-1* mutasyonu ile ilgilidir. *BRCA-1* genini taşıyanların 50 yaşına ulaşınca dek meme ve/veya ovaryum kanserine yakalanma olasılığı %60, 70 yaşına gelinceye kadar %85'tir. 13. kromozomda lokalize olan *BRCA-2* geni, meme kanserlerinin %70'inden sorumludur ve aynı zamanda erkeklerde de meme kanseri riskini arttırmaktadır (McKinley v.d., 1995).
2. Yaş: Meme kanseri insidansı, yaş ile birlikte artmaktadır. Menapozu kadar bu risk her 10 yılda bir ikiye katlanmaktadır. Meme kanseri gelişme riski 25 yaşında 1/19608, 55 yaşında 1/33, 75 yaşında 1/11, 80 yaşında 1/8'dir (Phipps v.d., 2010).
3. Doğurganlık, emzirme ve hormonlar: Östrojen ve progesteron meme kanseri gelişiminde rol oynayan önemli hormonlar olarak görülmektedir. Normal epitelyum hücrelerinde östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PGR) bulunmaktadır. Hormon düzeylerinin değişmesi, normal epitelyal aktivitenin değişmesine neden olabilmektedir. 30 yaşından sonra tek doğum yapan kadınlarda meme kanseri riski, 18 yaşından önce doğum yapan kadınlara göre 2-5 kat fazladır ve geç adetten kesilme (>55 yaş) meme kanseri riskini artıran faktörlerdir. Uzun süreli emzirmeler riski azaltabilir (Cancer, 2002). Oral gebelikten korunma yöntemleri, meme kanseri gelişim riskini 1.24 kat arttırmaktadır (Cancer, 1997).

4. Ailesel Öykü: Birinci derece akrabasında meme kanseri olan bireylerin meme kanserine yakalanma riski 2 kat artmaktadır. Birinci dereceden akrabalarından iki kişide meme kanseri olan kişilerde ise 4-6 kat artmaktadır (Phipps v.d., 2010).
5. Coğrafi farklılıklar: Kanser görülme sıklığı, ülkeler arasında şaşırtıcı farklılıklar göstermektedir. Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da meme kanseri görülme riski çok daha fazladır. Amerika'da meme kanserinden ölüm oranı, Japonya'ya göre 5 kat daha fazladır. Bu farklılığın sebebi çevresel faktörlere bağlanmaktadır. Çünkü riskli bölgeye göç eden kişilerde, o bölgenin kanser oranlarına adaptasyon görülmektedir. Ayrıca diyet ve beslenme alışkanlığının da etkili olduğu düşünülmektedir (Torre v.d., 2015).

Çizelge 2.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri (McPherson v.d., 2000)

Faktör	Relatif Risk	Riskli Grup
Yaş	>10	Yaşlı bireyler
Coğrafi lokasyon	5	Gelişmiş ülkeler
Ergenlik yaşı	3	11 yaşından önce ergenliğe giren bireyler
Menapoz yaşı	2	54 yaşından sonra menapoza giren bireyler
İlk hamilelik yaşı	3	40 yaşlarında ilk doğumunu yapan bireyler
Aile hikayesi	≥ 2	Genellikle genç yaşlarda hastalık görülen bireylerde
Benign hastalık geçmişi	4-5	Atipik hiperplazi
Farklı kanser geçmişi	>4	
Sosyoekonomik durum	2	Ekonomik seviyesi I ve II
Diyet	1,5	Yüksek miktarda doymuş yağ tüketmek
Vücut ağırlığı		
Premenapozal	0,7	BMI >35
Postmenapozal	2	BMI >35
Alkol tüketimi	1,3	Fazla miktarda tüketimi
İyonize radyasyon maruziyeti	3	Küçük yaşta fazla miktarda maruz kalmak
Ekzojen hormon alımı		
Oral Korunma Yöntemleri	1,24	Devamlı kullanımı
Hormon terapileri	1,35	10 yıldan fazla kullanımı
Dietilstilbestrol	2	Hamilelik döneminde kullanımı

2.1.3. Meme kanseri biyolojisi

Meme kanseri gelişiminde genetik/epigenetik değişimler oldukça önemli rol oynar. Meydana gelen genetik değişimler onkogen aktivasyonu veya tümör süpresör inaktivasyonudur. Daha sonra tümör hücreleri, invaziv ve vasküler özellik kazanarak proliferasyon kapasitelerini artırır.

Tümör süpresör genler, hücre çoğalmasında negatif yönde rol oynayan genlerdir. Proliferasyonu doğrudan baskılayan tümör süpresör genlere “gardiyan” (*guardian*) tipi genler, hücre çoğalmasını dolaylı yoldan baskılayan genler ise “bakıcı” (*caretaker*) genler olarak adlandırılmaktadır. Normal koşullar altında, bu genlerden kodlanan proteinlerin hücre içerisinde birçok görevi bulunmaktadır;

1. Hücre siklusunda mitoz sırasında meydana gelen anomalileri önlemek (*RB-Retinoblastoma*),
2. Hücre içerisinde sinyal iletilmesi (*APC- Adenomatous Polyposis Coli*),
3. Transkripsiyon faktörü (*WT-1-Wilms tumor 1*),
4. DNA tamir mekanizmasında ve hasarın belirlenmesi (*hMSH2- mutS homolog 2*) (Van Es v.d., 2001),
5. Apoptotik sinyal yolağını aktive ederek eğer DNA’da geri dönüşsüz bir hasar meydana gelmişse apoptoza neden olurlar (*p53*).

Tümör süpresörlerde meydana gelen mutasyonlar, genom boyunca yayılmaya sebep olarak genomik instabiliteye neden olabilir. Genomik instabilite bekçi tipi tümör süpresör genleri ve proto-onkogenlerin mutasyona uğramasıyla sonuçlanabilir.

Meme kanseri gelişiminde önemli rol oynayan tümör süpresör genler; *p53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* ve *ATM*’dir.

Onkogenler, proto-onkogenlerin mutasyonu veya değişimi sonucunda oluşan genlerdir. Direkt olarak kontrolsüz büyüme gibi malign fenotipin ortaya çıkmasına neden olurlar (T. Hunter, 1997). Onkogenik proteinlerin hücre içerisinde fazla veya az olması sonucunda, hücre büyümesi stimülasyonu, apoptoz inhibisyonu ve/veya farklılaşma gerçekleşir. Hücre içerisinde proto-onkogenlerin birçok görevi bulunmaktadır. Örneğin; RAS proteini sitoplazmik mesajcı, MYC transkripsiyon faktörü ve Wnt büyüme faktörü gibi (Van Es v.d., 2001). Meme kanseri gelişiminde etkili proto-onkogen olarak *HER28neu*, *EGFR*, *Ras*, *Myc* ve β -*katenin* örnek verilebilir.

Meme kanseri karakterizasyon çalışmalarında, mutasyon, yapısal değişimler, kopya sayısal değişimleri, transkripsiyonel değişimler ve epigenetik değişimler gibi birçok somatik değişimler belirlenmiştir (Curtis, 2015). Elde edilen genomik ve transkripsiyonel veriler entegre edilerek, klinik sonuçları farklı, moleküler meme kanseri taksonomisi elde edilmiştir.

2.1.4. p53 Geni

TP53 geni retinoblastoma geninden sonra keşfedilen ikinci tümör baskılayıcı genidir. İlk olarak 1979 yılında 53 kD ağırlığında bir protein olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı hücrelerde düşük seviyelerde bulunurken, SV40-transforme hücrelerde ekspresyonunun arttığı gösterilmesi, ilk başta hatalı şekilde onkogen olarak sınıflandırılmasına neden olmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise sağlıklı p53 proteininin transformasyonu durdurduğu; tümör baskılayıcı bir gen olduğu belirlenmiştir (Soussi, 2010). Anormal hücre gelişimini engelleyerek, neoplastik gelişimden korunmayı sağlayan p53 sinyal yolağı, normal hücresel koşullar altında, hücrenin “bekleme” modudur ve “gardiyanı” (*guardian*) olarak görev yapar. Hücre içerisinde oldukça önemli görevleri vardır;

1. Hücre siklusunun inhibisyonu: Siklin B1-CDK1 kompleksinin sitoplazmada inaktive olmasını sağlayan siklin bağımlı kinaz inhibitörleri olan p21^{waf1} ve 14-3-3 sigma, p53 tarafından indüklenerek, G1 fazında hücre siklusunun durmasını sağlar.
2. Apoptoz regülasyonu: Bax, Apaf, PUMA, p53AIP1, PIDD ve NOXA gibi pro-apoptotik proteinler direkt olarak p53 tarafından indüklenir.
3. DNA onarımı: *Wild-type p53* geni DNA onarımını sağlayan *ribonükleotid redüktaz* geni, *p53R2* gibi birçok geni aktive eder.
4. Anjiyogenez ve metastaz inhibisyonu: p53 tarafından indüklenen maspin (*mammary serine protease inhibitor*), anjiyogenez, invazyon, metastaz inhibisyonunda rol oynayan serin proteaz inhibitördür. Aynı zamanda metastaz süpresör protein olan KAI1’nde p53 tarafında regüle edildiği bildirilmiştir (Gascov.d, 2002).

İnsan *p53* geni, kromozom 17p13’de lokalizedir ve ailesel meme kanserinin ortaya çıkmasında önemli bir faktördür. p53 protein yokluğu, hücrenin apoptozdan kaçmasına, hasarlı DNA ile çoğalmasına ve sonuç olarak genomik instabilitenin bozulmasına neden olur (Malkin v.d., 1990).

Normal dokularda p53 protein yarı ömrü oldukça kısadır (4-20 dakika) ve immünohistokimyasal boyama yöntemlerle tespit edilmesi oldukça zordur (Ashcroft v.d., 1999). Ancak, meydana gelen stres ve DNA hasarına bağlı olarak p53 proteinin dokularda kalma süresi uzamaktadır (Hall v.d., 1993). p53 proteininin dokularda daha uzun süre kalması, p53 fosforilasyonu, Mdm2 fosforilasyonu, p53 sitoplazmik sekresyonu, p14^{ARF} aktivasyonu gibi mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bu mekanizmaların tümü, p53 degradasyonuna neden olan, düzenleyici proteini olarak görev yapan Mdm2'nin p53'e bağlanmasını engelleyerek, p53'ün sitoplazmadan nükleusa ulaşmasına olanak sağlamaktadır (S. L. Harris v.d., 2005). *p53* geninde mutasyon meydana geldiğinde, hücrelerde kalma süresi uzar ve mutant p53 proteini hem tümör baskılayıcı özelliğini kaybeder hem de Mdm2 tarafından degradasyona uğrayamaz ve birikmeye başlar.

p53 mutasyonu insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında belirlenmiştir. Meme kanserinde ise, *p53* heterozigotluk kaybı (LOH) veya nokta mutasyonları yaklaşık %60 oranla meydana gelmektedir. Genel olarak sebebinin kimyasal karsinojenler olduğu düşünülmektedir (Norberg v.d., 1996). Meme kanserinde, yüksek miktarda p53 proteininin belirlenmesi, kötü prognoz indikatörü olarak görülmektedir. Aynı zamanda, yapılan çalışmalarda, p53 ekspresyonunun yüksek olması, yüksek tümör derecesi, yüksek proliferasyon indeksi, anöploidi, ER- ve PR- ile histolojisi ile ilişkilendirilmiştir (Sirvent v.d., 2001). Li-Fraumeni sendromuna sahip ailelerde *p53* germ-line mutasyonuna rastlanmıştır. Bu bireylerin normal meme dokularında *p53* mutasyonu saptandığı takdirde meme karsinogenezi olgusu olarak kabul edilmektedir (Masciari v.d., 2012).

p53 proteini, hücre adezyonu, motilitesi, invazyonu, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), ekstraselüler (ECM) interaksyonu, anoikis ve kanonikal metastaz sinyal yolağında etkili olan proteinlerin transkripsiyonel regülasyonunu sağladığından dolayı, metastazın en önemli regülatör proteini olarak da kabul edilmektedir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. *p53*'ün metastatik kaskad içerisinde direkt veya dolaylı olarak etkilediği genler ve görevler (Powell v.d., 2014).

Gen	Fonksiyon	p53	p53 ile İlişkisi
KAI-1/CD82	Hücre migrasyonunu baskılar	Aktive eder	Direkt
XEDAR	Hücre adezyonunu ve migrasyonunu baskılar	Aktive eder	Direkt
miR-200c	EMT'yi baskılar	Aktive eder	Direkt
MMP-2	ECM interaksyonu	Aktive eder	Direkt
DDR-1	ECM interaksyonu	Aktive eder	Direkt
miR34	Hücre migrasyonunu baskılar	Aktive eder	Direkt
Maspin	ECM interaksyonu	Aktive eder	Direkt
PCDH7	Hücre migrasyonu	Baskılar	Direkt
Vimentin	Mezenşimal belirteç	Baskılar	Direkt
CXCR4	Kemotaksis, hücre migrasyonu	Baskılar	Direkt
FAK	Adezyon, motilite, metastaz, sağ kalım sinyalleri	Baskılar	Direkt
E-kaderin	Epitelyal integrite	Aktive eder	Dolaylı
CTGF	ECM ile hücre migrasyonu ve adezyonu	Aktive eder	Dolaylı
Trombospondin	ECM interaksyonu	Aktive eder	Dolaylı
Kaldesmon	ECM ile interaksyon	Aktive eder	Dolaylı
Snai1	EMT	Baskılar	Dolaylı
Snai2/Slug	EMT	Degrede eder	Dolaylı
MMP-9	ECM interaksyonu	Baskılar	Dolaylı
MMP-1	ECM interaksyonu	Baskılar	Dolaylı
SPARC	Hücre migrasyonu (negatif regülatör)	Baskılar	Dolaylı
Fibronektin	ECM interaksyonu	Baskılar	Dolaylı

2.2. Epigenetik Değişimler

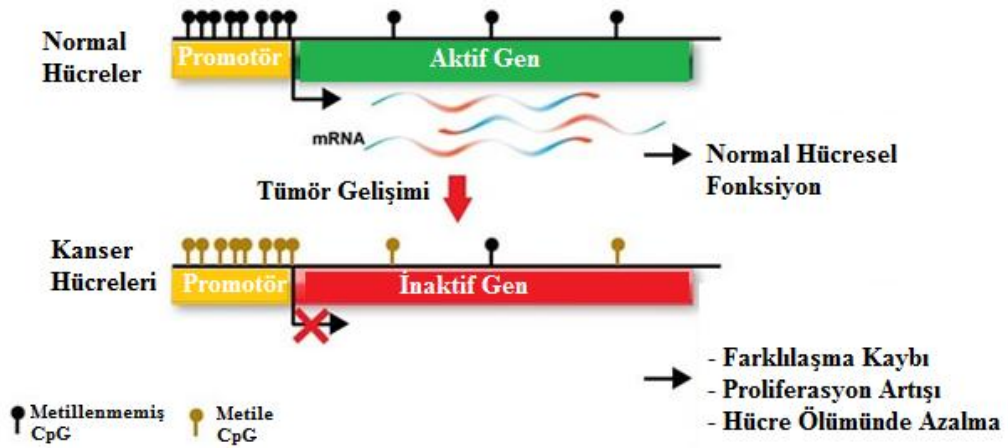
“Epigenetik” terimi ilk kez Conard Waddington tarafından 1942 yılında çevrenin fenotipik modifikasyona neden olan durumları tanımlamak için kullanılmıştır. Yaptığı çalışmada, *wild-type Drosophila melanogaster* pupalarına ısı şok tedavisi uygulandığında, kanat damar paternlerinin değiştiği gözlemiştir (Waddington, 1952). Memeli hücrelerinde

bulunan DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlamayan RNA'lar epigenetik sistemi oluşturmaktadır.

Daha sonraki yıllarda, epigenetik kontrolün en önemli mekanizmalarından olan gen sessizleşmesinin biyolojik bir biyobelirteç olabileceği önerilmiştir (Jaenisch v.d., 2003). Örneğin, gen promotör bölgesinde bulunan CpG dinükleotidlerinde meydana gelen metilasyon sonucunda, gen sessizleşmesi ve devamında transkripsiyonel aktivite kaybı meydana gelmektedir.

2.2.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA'da meydana gelen kimyasal bir değişimdir ve en iyi karakterize edilmiş epigenetik değişimdir. Normal hücrel gelişimde etkili olan DNA metilasyonu, doku-spesifik gen ekspresyon paternlerinin gerçekleşmesini sağlar. Metilasyon sürecinde herhangi bir sorun meydana geldiğinde, gen fonksiyonu değişerek malign hücrel transformasyon gelişebilir. DNA metilasyonu, memelilerde DNA zincirindeki sitozin bazının 5. karbonuna kovalent olarak metil grubunun bağlanması ile gerçekleşir (Szyf, 2008). Bu bağlanma, DNA üzerinde bulunan her sitozin bazında meydana gelmez ya da rastlantısal değildir. Metil grupları sadece guanin bazına komşu olan sitozin bazlarına, metil transferaz enzimleri tarafından bağlanır. Bu bölgeler "CpG adaları" olarak adlandırılır (Fuks, 2005). İnsan genomunun neredeyse yarısı CpG dinükleotidleri bakımından zengin promotör bölgeleri içerir. Tüm genom analizleri sonucunda, CpG dinükleotidlerinin %80'nin, promotör CpG adalarıyla ilişkili olmadığı ve hipermetile durumda olduğu belirlenmiştir (Robertson v.d., 2000). Aksine, CpG adaları genellikle metillenmemiş durumdadır. Promotör bölgelerinde metillenmiş CpG adaları gen sessizleşmesine; metillenmemiş CpG adaları ise aktif transkripsiyonun gerçekleşmesine neden olur.



Şekil 2.1. Kanser Gelişiminde DNA Metilasyonunun Rolü. (Celgene, 2016)

Normal hücrelerde, CpG adaları içeren gen promotörleri genellikle metillenmemiş durumdadır ve ökromatin yapıdadır. Bu yapı gen ekspresyonuna izin veren, transkripsiyonel olarak aktif bir konformasyonun oluşmasına olanak sağlar. Fakat kanser gelişimi sırasında, CpG adalarının büyük çoğunluğu hipermetile durumdadır (Costa, 2010). Tümör gelişimi sırasında meydana gelen seçici hipermetilasyonun sebebi, bazı genlerin kanser oluşumunun önlenmesinde rol oynamasından kaynaklanmaktadır (Şekil 2.1).

Yapılan çalışmalarda, meme karsinogenezinin ortaya çıkmasında spesifik gen amplifikasyonlarının, delesyonların, nokta mutasyonların, kromozom yeniden düzenlenmelerinin ve anöploidilerin etkili olduğu belirlenmiştir. Kromozom perisentrik bölgesindeki satelit DNA dizisinde bulunan tekrar eden dizilerin metilasyonunun azalmasının kromozom yeniden düzenlenmesine, mitotik rekombinasyonuna ve anöploidinin artmasına neden olduğu belirlenmiştir (Eden v.d., 2003). Son zamanlarda, epigenetik alandaki ilerlemeler ve mutasyon karakterizasyon tekniklerinin ilerlemesi ile birlikte, epigenetik değişimler sonucunda meme kanserinin ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Mirza v.d., 2007). Meme kanseri dokusu ile sağlıklı doku karşılaştırıldığında birçok genin hipermetile olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2.3).

Tümör süpresör promotör bölgesinde bulunan CpG adalarının DNA metilasyon paternlerinde herhangi bir aberasyon meydana gelirse, hücre siklusu, DNA onarım mekanizması, toksik katabolizma, hücre aderasyonu ve anjiyogenez gibi birçok hücresel mekanizma etkilenmektedir. Epigenetik mekanizma aberasyonu, kanser gelişiminin birçok aşamasında rol oynamaktadır (Berdasco v.d., 2010).

Çizelge 2.3. Meme kanserinde gelişiminde rol oynayan hipermetile genler ve fonksiyonları (Han v.d., 2007; Szyf v.d., 2004; Yan v.d., 2006)

Fonksiyon	Gen
Hücre siklus regülasyonu	<i>P16INK4a, p14ARF, 14-3-3σ, siklin D2, p53KIP2</i>
Apoptoz	<i>APC, DAPK1, HIC1, HOXA5, TWIST, TMS1</i>
DNA onarımı	<i>GSTP1, MGMT, BRCA1</i>
Hormon regülasyonu	<i>Era, PR</i>
Hücre adezyonu ve invazyonu	<i>CDH1, APC, TIMP3</i>
Anjiyogenez	<i>Maspin, THBS1</i>
Hücre sel büyüme inhibitör sinyali	<i>RARβ, RASSF1A, SYK, TGFβRII, HIN1, NES1, SOCS1, SFRP1, WIF1</i>

2.2.1.1. RASSF1A geni

Meme kanserinde kromozom 3p21.3 bölgesinde bulunan *RASSF1* allelik kaybı meme kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde belirlenmiştir. *RASSF1*, 8 eksondan oluşur. Farklı promotör bölgelerinden *RASSF1A-G* olmak üzere 8 farklı gen kodlanır.

RASSF1A, insan kanserlerinde en sık hipermetile olan gen bölgesidir. Meme kanseri hastalarında *RASSF1A* CpG adaları %60-77 oranında hipermetiledir (Lewis v.d., 2005). Hücre içerisinde çeşitli fonksiyonları bulunur. Ras efektör molekülü olarak görev yapar ve pro-apoptotik kinaz MST-1'e bağlanarak apoptozu indükler. Aynı zamanda, büyüme regülasyonunda ve mitoz sırasında mikrotübül dinamiğinin düzenlenmesinde de rol oynar (Pfeifer v.d., 2005). *RASSF1A* gibi tümör süpresör genlerin inaktive olabilmesi için genetik değişimlerin (kromozom delesyonları, gen kodlayan bölgede fonksiyon kaybı gibi) her iki allelde meydana gelmesi gerekmektedir (Dammann v.d., 2001).

Lewis ve ark. meme kanseri hastalarında *RASSF1A*, *APC*, *H-kaderin*, *RARβ* ve *siklin D2* metilasyon analizi yapmıştır. Yaptıkları çalışma sonucunda, kontrollere göre meme kanseri hastalarında *RASSF1A* ve *APC* metilasyonunun oldukça yüksek olduğunu belirlemiştir. Çalışma sonunda, bu genlerin promotör hipermetilasyonunun meme kanseri riski taşıyan bireylerde epidemiyolojik bir biyobelirteç olabileceği önerilmiştir (Lewis v.d., 2005). Müller ve ark. primer veya metastatik meme kanseri hastaları ile sağlıklı

kontrollerin serumlarında belirledikleri 39 genin analizini yapmışlardır ve *RASSF1A* ile *APC*'nin metile olduğunu, aynı zamanda hastaların sonuçları ile ilişkili olduğunu belirlemiştir (Müller v.d., 2003).

RASSF1A metilasyonunun meme kanseri hastalarında iyi bir biyobelirteç olarak düşünülmesinin iki önemli sebebi vardır. İlk olarak, normal dokularda çok nadir olarak gerçekleşmesinden dolayı oldukça yüksek özgüllüğe sahiptir. İkincisi, metilasyon sıklığı %60-77 arasında değişiklik göstermektedir ve bu oranın tanı aşamasında oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (Campan v.d., 2006; Müller v.d., 2003). Ayrıca meme tümörlerinde, *RASSF1A* hipermetilasyonu malign olmayan meme hücrelerinde ve hasta serumunda belirlenebilir; fakat bu oran oldukça düşüktür (Pfeifer v.d., 2005). Meme kanseri gelişme riski yüksek olan kadın hastaların %70'inde, düşük riske sahip kadınların %29'unda *RASSF1A* metilasyonu belirlenmiştir (Lewis v.d., 2005). Bundan dolayı, *RASSF1A* hipermetilasyonunun meme kanseri erken dönem tanısında kullanılabileceği önerilmiştir (Dworkin v.d., 2009).

2.2.1.2. APC geni

Meme kanseri gelişiminde hipermetile olan diğer bir gen bölgesi *APC* (*Adenomatous polyposis coli*)'dir. *APC*, ilk olarak 1987 yılında, transkribe olan 16 eksona sahip ve kromozom 5q21-q22 arasında lokalize bir gen bölgesi olarak bulunmuştur (Bodmer v.d., 1987). *APC* farklı hücre tiplerinde, farklı biyomoleküllerle etkileşim halinde olduğundan dolayı "multidomain" bir proteindir. Wnt sinyal yolağında ise, β -katenin yıkıcı kompleksinde rol almaktadır.

Fetal ve erişkin birçok epitelyal dokuda eksprese olmaktadır. Normal hücrelerde *APC*, hücre adezyonunda, mitoz, apoptoz, kromozomal stabilitesinde, iskelet ve mikrotübül organizasyonunda rol oynayan multifonksiyonel bir proteindir (Aoki v.d., 2007).

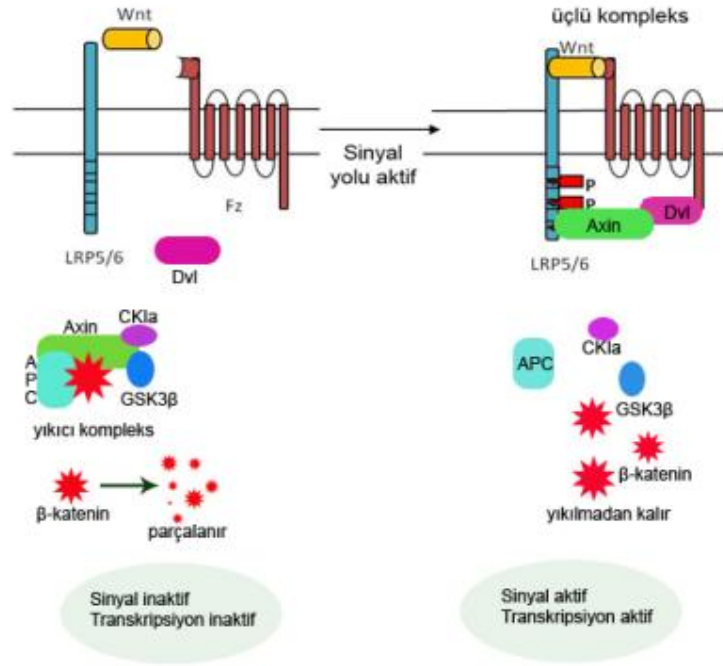
Kanonikal Wnt sinyal yolağında *APC*, Axin ile kompleks oluşturarak sitoplazmik β -katenine bağlanır ve serin-treonin kinaz GSK3 β (Glikojen sentaz kinaz 3 β - *glycogen synthase kinase 3 β*) fosforilasyonunda rol oynar. *APC*-Axin- β -katenin kompleksi, Wnt sinyal yolağı aktivasyonu için oldukça önemlidir.

Wnt sinyal yolağı, Wnt proteinlerinin hedef hücrede bulunan reseptörlerine (FZ ve LRP5/6) bağlanması ile aktive olur. Sinyalin sitozole aktarılması ise iki basamakta

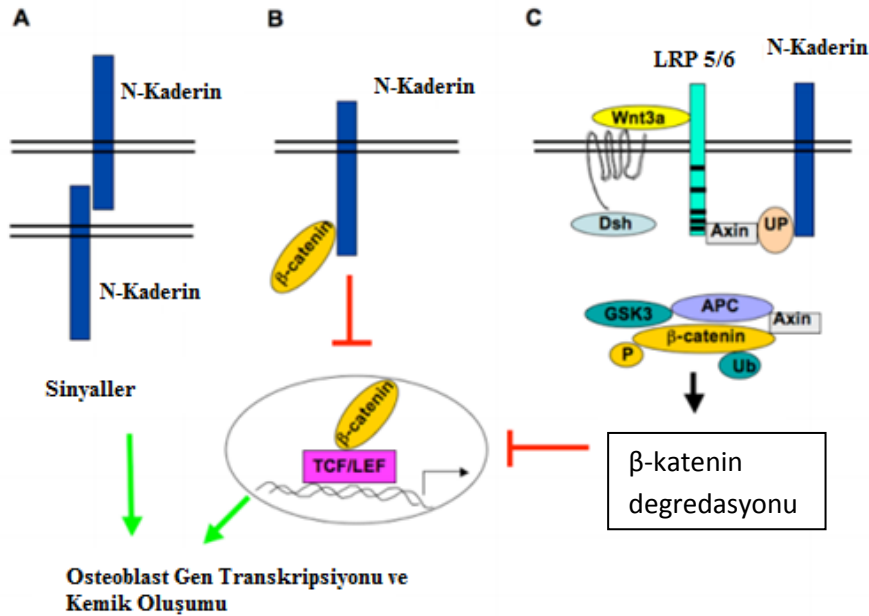
gerçekleşir. Bunlar Dvl fosforilasyonu ve LRP5/6 reseptörünün sitozolik kısmının fosforilasyonudur (Zeng v.d., 2005). β -katenin kompleksinin yıkımını kontrol eden APC-Axin-GSK3 β kompleksi sinyal başlamasıyla birlikte dağılır. Aynı zamanda, β -katenin fosforlanması da önlenir. Böylece aktif β -katenin proteininin bir kısmı hücre zarında hücre bağlantılarında görev alırken; diğer kısmı nükleusa gider (Brembeck v.d., 2006) (Şekil 2.2).

APC geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda, β -katenin yıkımı gerçekleşmez. Böylece sinyal yolu inaktif durumda olmasına rağmen β -katenin'in sitoplazmadaki miktarında artış meydana gelir. Sitoplazmada miktarı artan β -katenin, nükleusa girerek hedef genlerin kontrolsüz transkripsiyonunu gerçekleştirir (Verheyen v.d., 2010; Willert v.d., 2006).

Kaderinler, hücre adezyonundan görevli Ca-bağımlı proteinlerdir ve embriyonik gelişim, morfogenez ve doku oluşumunda oldukça önemli rol oynar (Gumbiner, 1996). İskelet gelişimi sırasında, N-kaderinler mezenşimal yoğunlaşma ve kondrogenez süreçlerinde oldukça önemli komponentlerdir. Kemik dokusunda, osteoblastlarda N-kaderin ekspresyonu gerçekleşir ve osteogenez sırasında oldukça önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Cheng v.d., 1998). Yapılan çalışmalarda N-kaderinin osteoblast farklılaşması ve osteogenez mekanizmalarında oldukça önemli regülatörler olduğu belirlenmiştir (Marie, 2002; Mbalaviele v.d., 2006). Kaderin molekülleri, α , β , ve γ - katenin molekülleri aracılığıyla hücre içerisine sinyallerin iletilmesinde rol oynar. Benzer şekilde, N-kaderin, β -katenin ile bağlantı kurarak osteoblast hücrelerinde APC aracılı fonksiyon kontrolünü ve kemik oluşumunun gerçekleştirir (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Wnt Sinyal Yolağı Regülasyonu (Dönmez v.d., 2011)



Şekil 2.3. N-Kaderin ve β-Katenin Aracılı Osteoblast Fonksiyonu ve Kemik Yapımı. A) Homofilik N-kaderin interaksiyonu hücre-hücre adezyonunu başlatarak, osteoblast farklılaşmasına neden olur, B) N-kaderin-β-katenin interaksiyonu sonucunda sitozolik bölgede β-katenin miktarı azalır ve Wnt sinyali azalır, C) N-kaderin ve Wnt ko-reseptör LRP5/6 interaksiyonu sonucunda β-katenin degradasyonu gerçekleşir ve Wnt sinyal yolağı inhibe olur, osteoblast fonksiyonunda ve kemik oluşumunda azalma meydana gelir (UP : Bilinmeyen Protein; UB: Ubikuitin) (Marie, 2009)

Yapılan çalışmalarda, β -katenin bağımlı veya bağımsız mekanizmalarla çeşitli malignant hastalıklarda proliferasyonu inhibe ettiği belirlenmiştir (Carson v.d., 2004; Faux v.d., 2004). Böylece APC'nin hücre proliferasyonunda oldukça önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır (Schneikert v.d., 2006)

2.3. Metastaz

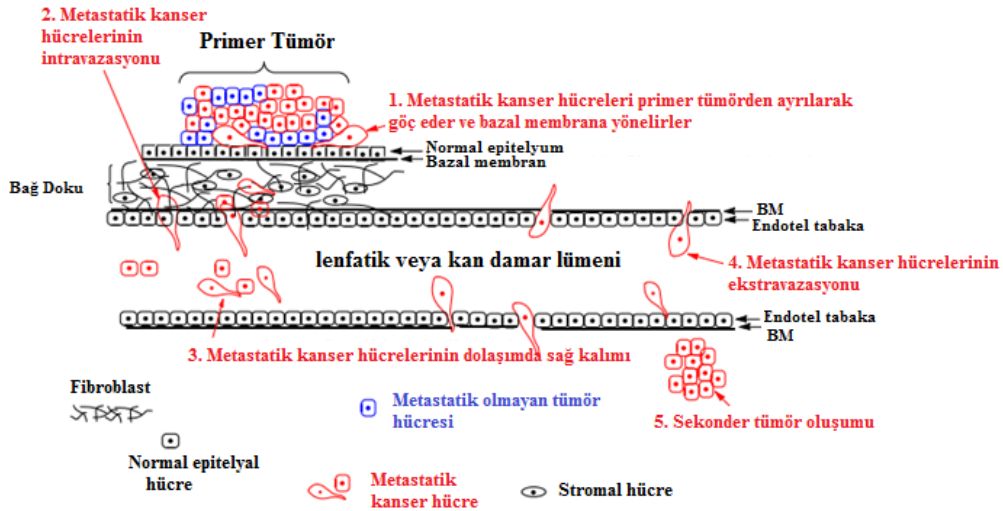
Tümör hücrelerinin genomunda çeşitli bölgelerde nokta mutasyonları veya kromozom bütünlük değişimleri meydana gelir. Bu değişimler onkogenleri, tümör supresör genleri ve kaderinleri, lamininleri, proteaz inhibitörleri ve HIF-1'i (Hipoksi Uyarılabilir Faktör - *Hypoxia-Inducible Factor-1*) gibi metastaz ilişkili genleri etkileyebilir (Lujambio v.d., 2009). Ayrıca, bu genlerde oluşan regülasyon bozuklukları her zaman mutasyon ile sonuçlanmaz. CpG adalarında meydana gelen hipermetilasyon-ilişkili gen sessizleştirme hataları ve kromatin yeniden modelleme gibi epigenetik değişim sorunları da metastaz gelişimine katkıda bulunmaktadır (Esteller, 2008). Kanseri hücrelerini etkileyen genetik ve epigenetik modifikasyonlar, kanser özelliğinin ortaya çıkmasına neden olan 6 önemli fenotipik özelliğin ortaya çıkmasına neden olur;

1. Kanseri hücreleri mutasyonlar ve epigenetik değişimler sonucunda aktifleşen proto-onkogenler oluştururlar ve kendi kendilerine büyüme faktörleri (TGF- α gibi) sekresyonunu gerçekleştirirler. Böylece, dışarıdan herhangi bir sinyale ihtiyaç duymadan, büyümeye devam edebilirler.
2. Kanseri hücreleri anti-büyüme sinyallerine duyarsızdır.
3. Kanseri hücreleri apoptozdan kaçabilme yeteneğine sahiptir. Bu özelliğe genellikle p53 gibi tümör supresör genlerin veya IGF1/2 (İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü - *Insulin-Like Growth Factor-1/2*) gibi sağkalım sinyal yollarının mutasyonu sonucunda sahip olurlar.
4. Kanseri hücrelerinde, hücre çoğalmasını sınırlayan hücre-otonom sistemi kaybolmuştur. Telomeraz aktivitesi oldukça yüksektir ve hücre ölümünde ve yaşlanma mekanizmasında azalma meydana gelir.
5. Neoplazma büyümesi ile birlikte oksijen ve besin ihtiyacı artacağından dolayı anjiyogenez başlar.

- Primer tümör hücreleri ayrılarak, farklı bir bölgeye göç ederler ve sekonder tümör oluştururlar. Bu süreç metastaz olarak adlandırılır. Son zamanlarda, yedinci kanser belirteci olarak inflamasyon önerilmektedir (Solinas v.d., 2010).

Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları primer tümör bölgesinden ayrılarak kan veya lenf dolaşımı ile farklı doku veya organlara ulaşması, ulaştığı bölgede sekonder kanser gelişimine neden olması durumudur. Birçok kanserin ölüm nedeni, primer tümörden çok metastaz gelişimidir. Kanser metastazı morbidite ve mortalite oranı %90'dır (Seyfried v.d., 2013). Metastaz, birçok basamaktan oluşmaktadır;

- Yeni damar oluşumu (anjiyogenez)
- Metastatik hücrelerin primer tümörden ayrılması (ayrılma ve migrasyon)
- Tümör ECM ve bazal membranı aracılığıyla invazyon
- Bölgesel kan ve lenfatik damar endoteliumuna intravazyon
- Kan veya lenf damarları aracılığıyla metastatik hücrenin hedef organa ulaşması
- Hedef organın endotelial hücrelerine ekstravazyon
- Mikrometastaz
- Makrometastaz (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. Metastatik Kaskad (Guan, 2015)

Primer tümör, gelişme sürecinde daha fazla oksijen ve besine ihtiyaç duyar. Daha sonra, birtakım anjiyogenik faktörler sentezleyerek yeni damar oluşumunu uyarır.

Devamında ise komşu hücrelerle olan bağlarını kopararak hücreler primer tümörden ayrılmaya başlar. ECM'den geçen tümör hücreleri bu bölgede ilerlemeye başlar ve dolaşım sistemine (kan veya lenf dolaşımına) katılır (Guan, 2015). Dolaşıma geçiş yapan tümör hücreleri, tropizmalarına göre hedef organlarının bazal membranlarını aşarak endotelial hücrelerine ulaşırlar. Ulaştıkları organda çeşitli sinyal yolları ile anjiyogenezi başlatırlar (Şekil 2.4).

Kanser hücresi ve konakçı arasındaki etkileşim sonucunda ortaya çıkan metastaz gelişim sürecinde önemli iki temel durum söz konusudur. Bunlardan bir tanesi; tümör hücrelerinin genotipik ve fenotipik özelliklerini değiştirerek farklı hücre popülasyonları oluşturması; diğeri ise tümör hücresi özellikleri ve metastatik kaskad arasındaki ilişkidir. Metastatik süreç boyunca hücre adezyon molekülleri, anjiyogenik faktörler, hücre döngüsü kontrol molekülleri, matriks metalloproteinazlar, büyüme faktörleri, integrinler ve integrin reseptörleri gibi birçok molekül rol almaktadır.

Sekonder organda kolonizasyon meydana gelmeye başladığında tümör hücreleri öncelikle basit difüzyonla besin ve oksijen elde etmeye başlar. Daha sonra proliferasyonlarını arttırarak anjiyogenik faktörler salgılamaya başlar ve yeni kan damarları oluşmaya başlar. Metastatik hücreler, penetrasyonu daha kolay olmasından dolayı, kan damarlarından çok lenfatik sistemi tercih ederler. Dolaşımda sürecini tamamlayan ve hedef organa ulaşan metastatik hücreler öncelikle mikrometastatik yapılar oluştururlar. Mikrometastaz hedef organ tarafından yok edilemezse makrometastaz yapıları ve daha sonra sekonder tümör yapılarını oluştururlar.

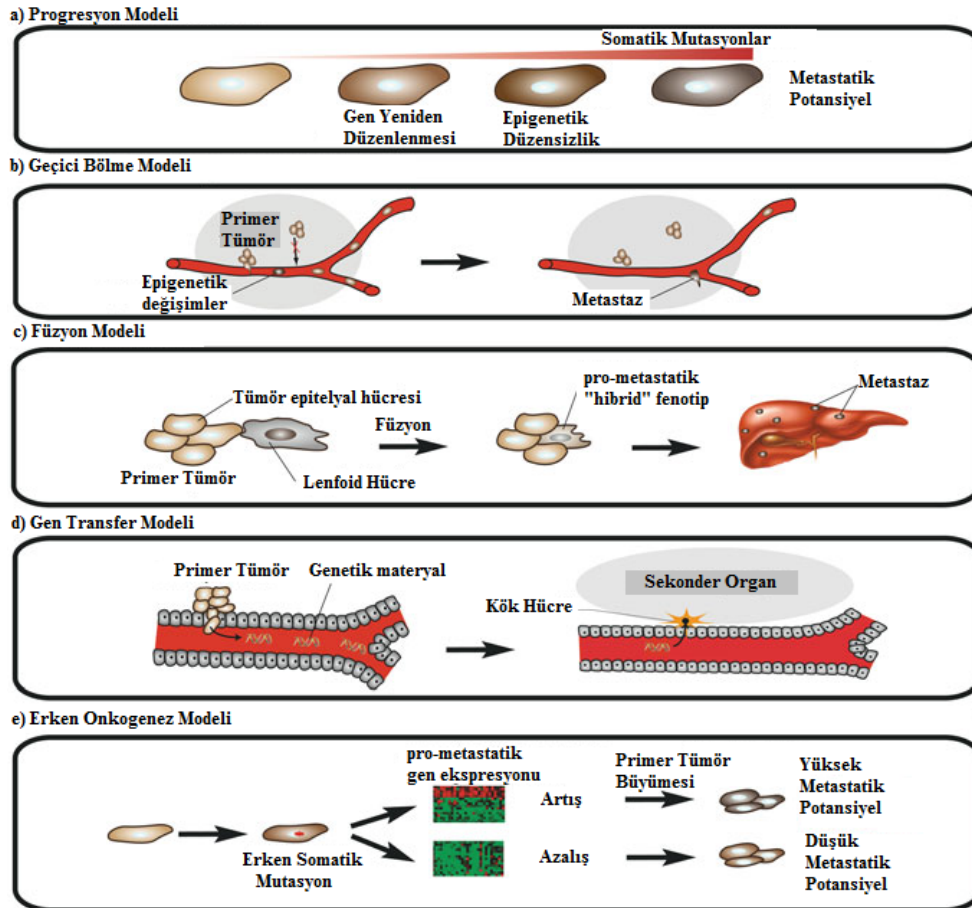
Metastaz gelişimi ile ilgili günümüze kadar çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır (Şekil 2.5).

- 1. Progresyon Modeli (*Progression Model*):** Genel olarak kabul gören metastaz modelidir. İlk olarak Nowell tarafından tanımlanan bu modele göre, primer tümör alt popülasyonlarında veya ayrılan hücrelerde ard arda birçok mutasyon meydana gelerek metastatik potansiyel ortaya çıkar (Nowell, 1976). Hücrelerin metastatik kaskadı başarılı bir şekilde tamamlayarak sekonder bölgede kolonizasyon oluşturabilmeleri için çok basamaklı metastaz sürecine uygun olan tüm mutasyonlara maruz kalması gerekmektedir.
- 2. Geçici Bölme Modeli (*The Transient Compartment Model*):** Dinamik heterojeniteye sahip bu model ilk olarak Weiss tarafından önerilmiştir (J. F. Harris, v.d., 1982; Weiss, 1990). Yaptıkları çalışmada, sekonder tümör hücrelerinin

primerden tümörden farklı olarak artması beklenen metastatik kapasitesinin, sekonder tümörde eksikliğinin olduğu önerilmiştir. Eğer hücrede meydana gelen kalıtsal mutasyonlar metastaz gelişim kapasitesini oluşturuyorsa, sekonder bölgede kolonizasyonu sağlayan hücrelerin metastatik kapasitesinin primer tümörden daha yüksek olması ve tekrar bir metastaz gerçekleşmesi beklenir. Geçici metastatik bölme modelinde, tümör dokusundaki tüm canlı hücrelerin metastatik kapasiteye sahip olduğu; fakat pozisyonel ve/veya rastlantısal epigenetik olaylar gerçekleştiği takdirde hücreler metastaz kaskadını tam olarak tamamlayabileceği öngörülmüştür (Weiss, 1990). Sekonder tümör, metastatik süreci başarıyla tamamlamış ve kolonize olmuş tümör hücrelerden oluşmasına rağmen, hücrelerin tekrar metastaz gerçekleştirmesini indükleyebilecek epigenetik olaylar veya vaskularizasyon yetersizdir.

3. **Füzyon Modeli (*The Fusion Model*):** Metastatik kanser hücrelerinin parental hücrelerden ayrılabilmesi için lenfoidik gibi bazı fenotipik özellikleri kazanması gerekmektedir. Bu bakış açısından yola çıkarak, füzyon modeli ortaya atılmıştır. Bu modele göre, metastatik fenotipin ortaya çıkabilmesinde sağlıklı lökositlerin primer tümör hücreleri ile füzyon olması gerekmektedir. Lökosit ile hibride olan ve kontrolsüz çoğalabilen kanser hücreleri, metastaz gerçekleştirir (Pawelek v.d., 2008). Bu modelin, klinik olarak değerlendirilmesi oldukça zordur. Bazı kanser tiplerinde çok nükleuslu hücrelerin var olması bu modeli desteklemektedir (Atkin, 1979)
4. **Gen transfer Modeli (*Gene Transfer Models*):** 19 y.y.'da araştırmacılar tarafından primer tümörden bilinmeyen metabolitlerin serbestlendiği ve bu metabolitlerin sekonder bölgedeki normal hücrelerde neoplastik dönüşüme neden olup olamayacağı merak konusu olmuştur. Daha sonraki dönemlerde yapılan çalışmalarda, hayvan tümör modellerinden ve kanser hastalarının tümör hücrelerinden, tümör serbest DNA'sının sirküler sistemde bulunduğu belirlenmiştir (Bendich v.d., 1965; S. Leon v.d., 1977). Geçtiğimiz yıllarda bu hipotez, genomastaz hipotezi olarak tekrar ortaya atılmıştır (Garcia-Olmo v.d., 2001).
5. **Erken Onkogenez Modeli (*Early Oncogenesis Models*):** Mikroarray teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, metastatik ve metastatik olmayan dokular arasındaki genetik farklılıklar ortaya konmaya başlanmıştır (Ramaswamy v.d., 2003; Van't Veer v.d., 2002). Yapılan çalışmalar sonucunda, primer tümör metastaz eğiliminin belirli gen

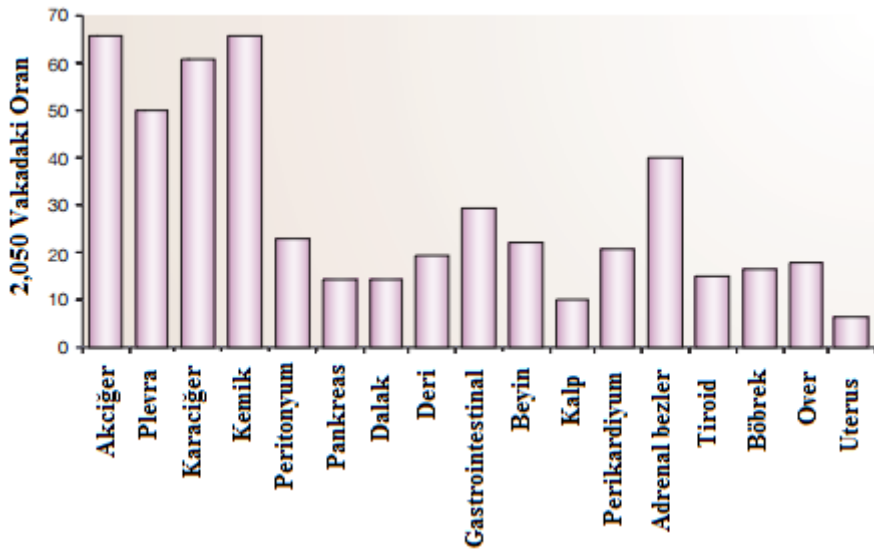
setlerinin aktivasyonu/inaktivasyonu sonucunda gerçekleştiği öne sürülmüştür (Bernards v.d., 2002; Ramaswamy v.d., 2003).



Şekil 2.5. Metastaz Modelleri (Porquet v.d., 2010)

2.3.1. Meme kanseri metastazı

Meme kanseri metastazı en sık kemik, akciğer, karaciğer, beyin ve lenf nodlarına gerçekleşme eğilimindedir. Gelişen teknoloji beraberinde yeni erken tarama yöntemlerini de getirirse de tanı anında %1-5, ilerleyen dönemlerde ise %1-30 metastatik bölgenin tespiti yapılabilmektedir (Şekil 2.6) (Group, 2005).



Şekil 2.6. Meme Kanseri Metastatik Tropizması (Weigelt v.d., 2005).

2.3.2. Meme kanseri kemik metastazı

Kemik, hücreler ve bu hücreler arasında yerleşen ekstraselüler organik matriksin kombinasyonundan oluşan canlı bir dokudur ve meme kanseri metastazının en sık gerçekleştiği dokulardan biridir. 2010 yılında *American Cancer Society* verilerine göre yaklaşık 65,000 kadın ve erkeğe prostat ve meme kanseri tanısı konmuş, bunların %80-90'ında kemik metastazından dolayı ölüm gerçekleşmiştir (Society, 2008). Kanser hücrelerinin kemik dokusuna ulaşması sonucunda osteolitik veya osteogenik lezyonlar oluşur fakat genel olarak bu lezyonlar kemik metastazı olarak isimlendirilmektedir.

Kemik metastazları, malign hastalıkların en sık rastlanan komplikasyonu olup, iskelet sistemi dışındaki primer malignitelerin %20-35'inde görülmektedir. Kemik metastazları görülme sıklığı, primer kemik kanseri gelişimi sıklığından 25 kat daha fazladır (Sterling v.d, 2011).

Klinik olarak kemik metastazı, şiddetli ağrı, spinal kord basısı, patolojik kırıklar, epidural kompresyon, kemik iliği yetmezliği veya hiperkalsemiye neden olan; morbidite ve mortaliteye neden olarak yaşam kalitesini önemli ölçüde düşüren bir hastalık olarak görülmektedir (R. Coleman, 2001; Traill v.d., 1999). İskelet sistemi metastazlarının yaklaşık %80'i vertebralara, pelvis, kafatası, femur ve humerus proksimalini içeren aksiyal iskelet sisteminde meydana gelir (Traill v.d., 1999). Primer tümörden birden fazla hücre

ayrıldığı için, metastatik hücrelerin iskelet sistemine ulaşmasında en sık izledikleri yol hematogen yayılımdır. Bu yüzden kemik dokusunda meydana gelen metastatik lezyonların sayısı birden fazladır. İskelet sisteminde hematopoetik dokuların yoğun olması ve bu dokuların beslenmesi için damar ağının fazla olması, neden kanser hastalarının yaklaşık 1/3'ünde kemik metastazı geliştiğini açıklar. Kemik kapillerinde bulunan sinüzoidal yataklar ve endotelial hücreler arasındaki geniş boşluklar tümör hücreleri için oldukça uygun ortam sağlamaktadır. Bu yüzden metastatik lezyonlar genellikle kas, tendon, ligaman ve yağ gibi yumuşak dokulardan çok, kemik gibi sert dokularda daha sık görülmektedir.

Kemik metastazı, 1889'da Stephen Paget tarafından ortaya atılan "*seed and soil*" teorisine uygun olarak gerçekleşmektedir. Yaptıkları çalışmada, 650 meme kanseri hastasının büyük çoğunluğunun kemik dokusunda, özellikle femur ve kafatasında, ikinci bir kanser geliştiğini belirlemişlerdir (Paget, 1889). Kanser hücrelerini tohum (*seed*), metastazın gerçekleştiği dokuyu ise toprak (*soil*) olarak adlandırmıştır. Meme dokusunda bulunan kanserin kemikte de görülmesinin sadece embolizm teorisi ile açıklanamayacağı, bazı kemikler bu durumdan fazlasıyla etkilenirken bazılarının stabilitesini koruduğunu belirlemişlerdir. Kanser gelişiminin görüldüğü ikincil organ ise "bitki ekildiği zaman, tohumları tüm kontrolü taşımaktadır; fakat onlara uygun ortam sağlanırsa, onlar sadece yaşar ve büyür" açıklamasında bulunmuştur. Günümüzde "*seed and soil*" hipotezi metastaz olarak tanımlanmaktadır ve yapılan çalışmalarda birçok basamaktan etkilendiği gösterilmiştir.

Meme kanseri olgularında genellikle osteolitik (%80-85) metastaz görülmekle birlikte az miktarda da olsa osteoblastik metastazlar (%15-20) da meydana gelebilmektedir (Coleman v.d., 2001). Sağlıklı kemik ve kanser hücre sinyalleri arasında osteolitik metastazla (kemiği rezorbe eden) "kısır döngü" (*vicious cycle*) oluşur. Bu sürecin, osteoblastları da etkilediği düşünülmektedir (Wood v.d., 2014). Başlangıçta kanser hücresi kemotaksisini, invazyonunu bloke etmek için veya kısır döngüyü kırmak için hedeflenen tedavilerin tümü, kemik metastaz sürecinin tam olarak anlaşılmasına bağlıdır (Coleman, 2006). Gelişmiş meme kanseri metastazlarının %75'i genellikle kemik dokusuna gerçekleşir (Wood v.d., 2014).

Meme kanseri metastazı, iskelette vaskularizasyonu yüksek uzun kemiklerin kırmızı kemik iliği, sternum, pelvis, kaburgalar ve omurga gibi dokulara metastaz gerçekleştirme eğilimindedir (Chen v.d., 2010). Bu süreçte sadece kemik fizyolojisi değil,

hematopoez ve immun sistemde etkilidir. Uzun kemikler kompleks kemik hücreleri, hematopoetik hücreler ve stromal hücreler içerir. Meme kanseri hücreleri kemik iliğine ulaştığında osteoblast ve osteoklast arasında var olan interaksiyonu bozar. Gelişmiş kemiklerde her iki hücre tipi yavaş ve devamlı bir dönüşümden sorumludur (Rosen v.d., 2009). Metastatik meme hücresi kemik mikroçevresinde invaze olduğunda, bu denge bozulur ve kemik kaybı gerçekleşmeye başlar. Meme kanseri hücreleri kemik dokusunda genellikle kemik matriks degradasyonuna ve dolayısıyla osteoklast aktivasyonuna neden olduklarından dolayı, osteolitik lezyona neden olurlar. Ayrıca, matriksten salınan büyüme faktörleri kanser hücrelerinin büyümesine katkıda bulunur ve kemik dokusunda kısır döngü olarak adlandırılan bir döngünün başlamasına neden olur (Krishnan v.d., 2014).

2.4. Kemik

İskelet sistemi, kıkırdak ve kemik olmak üzere iki tip dokudan oluşmaktadır. Erişkin bireyde apendiküler iskelette 126, aksiyal iskelette 74, işitsel kemikçikler 6 olmak üzere toplamda 206 tane kemik bulunmaktadır. Her bir kemik yaşam boyu karşılaşılan çeşitli biyomekanik değişikliklere uygun olarak değişiklik geçirir (yeniden modellenme – *remodelling*) ve hasar görmüş eski hücrelerin yerine yenileri hızlı bir şekilde oluşturulur. Böylece yaşam boyunca kemik dokusu korunmuş olur.

Kemik dokusu, iskelet sisteminin önemli bir yapıtaşı olmakla birlikte özelleşmiş bir bağ dokudur. Yapısında, farklı tip hücreler ve ara maddelerin üzerinde organik ve inorganik tuzlar çözünerek yapıya fiziksel olarak sağlamlık ve esneklik kazandırır (Clarke, 2008; Sikavitsas v.d., 2001). Çeşitli fonksiyonlara sahip olan kemik, vücut iskelet yapısını oluşturarak dokulara destek olan; kas dokusuyla birlikte hareketliliği sağlayan; beyin, omurilik gibi birçok hayati organı koruyan; başlıca kan yapım yeri olan kemik iliğini barındıran; kalsiyum, fosfor, sodyum, magnezyum gibi inorganik molekülleri depolayan sert bir dokudur (Kini v.d., 2012). Kemik dokusunun en önemli özelliği, dış ortamdan gelen mekanik uyarılar doğrultusunda şeklini, hacmini ve içeriğini değiştirebilen, yapısal olarak da kendini yenileyebilen bir doku olmasıdır (Ezirganli v.d., 2013).

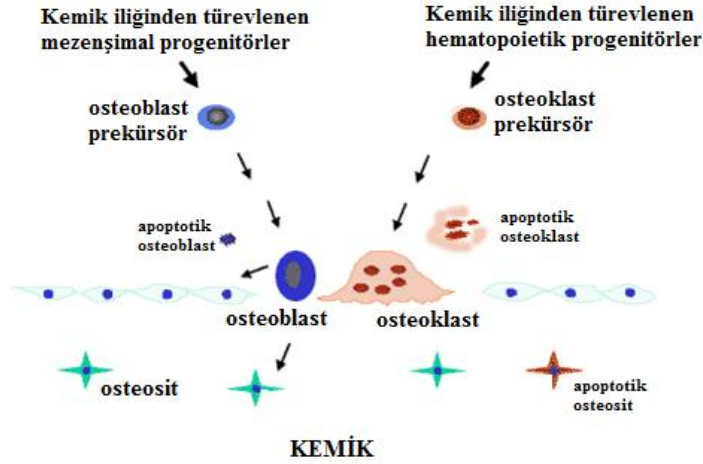
Erişkin kemik dokusu, kortikal kemik (%80) ve trabeküler kemik (%20)'den oluşmaktadır. İskelet sisteminin farklı bölgelerinde kortikal ve trabeküler kemik oranları değişiklik göstermektedir. Yapısal ve fonksiyonel farklılıkları olmasına rağmen, her iki kemik de osteonlardan oluşmuştur.

Kortikal kemik yoğun, solid ve iliğin çevresindedir. Kortikal osteonları, 400 nm uzunluğunda, 200 nm çapında Havers kanal sistemlerinden oluşmaktadır. Horizontal olarak yerleşmiş olan Volkman kanalları ise yan yana olan osteonları birleştirir. Mekanik darbelere karşı kortikal kemik gücü osteon sıkı dizilmesine bağlıdır (Clarke, 2008; Kini v.d., 2012). Kortikal kemik oldukça serttir ve dış kuvvetlere dayanıklıdır. Dış yüzeylerinde periostal yüzeye, içlerinde ise endosteal yüzeye sahiptirler (Clarke, 2008). Periostal yüzey, kortikal kemik dışında bulunan fibröz bağ dokudur. Kan damarları, sinir ağları, osteoblastlar ve osteoklastlar içerdiğinden dolayı kemik onarımında ve yapımında önemli rol oynar. Kortikal yüzeyin iç kısmını kaplayan endosteal yüzeyde, Volkman kanalları bulunur (Kini v.d., 2012).

Trabeküler kemik, kortikal kemik yüzeylerinin arasını dolduran bal peteği görünümlü yapıdır ve hematopoetik elemanları bulunduran kemik iliğini içerir. Kortikal kemiğe göre, daha yumuşak olmasına karşın stres ve gerilimlere karşı kortikal kemiğe göre daha dayanıklıdır (Tanaka v.d., 2000). Kemiğin gözenekli yapısının yanında mineral içeriği ve yapısında bulunan kollajen yapının mekanik olarak dirençli olmasını sağlar. Kemik dokusunun %70 inorganik komponent (hidroksiapatit, kalsiyum, fosfat, bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum) ve %30 organik komponent (%90 Tip I kollajen, %10 proteoglikan, glikozaminglikan gibi kollajen olmayan) içermektedir (Kini v.d., 2012).

Bütün kemiklerin iç (endosteum) ve dış (periyosteum) yüzeylerinde, kemik yapımında ve onarımında görevli olan hücreleri içeren tabakalar bulunmaktadır (Knight v.d., 2013). Periyosteum, eklemlerin yüzeyleri hariç kemiği dıştan saran sıkı bağ dokusudur. Dışta fibröz, içte gevşek ve kambiyum tabakasından oluşmaktadır (Lin v.d., 2014). Endosteum ise kemik iliğini barındıran, iç kemik boşluklarının yüzeyini örten ince retiküler bağ dokudur. Kemik ve kan hücreleri oluşturabilme potansiyeline sahiptir (Knight v.d., 2013) Kemik hücresel elemanları ise osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve mezenkimal osteoprogenitör hücreler olarak sınıflandırılır (Şekil 2.7.).

2.4.1. Kemik hücreleri



Şekil 2.7. Kemik Hücreleri ve Kökenlendikleri Hücre Tipleri (Smith, 2010)

a) Osteoblastlar

Embriyogenik mezenkimden kökenlenen osteoprogenitör hücreleri, Havers kanallarında ve endosteumda, periyotsun iç tabakasında bulunan mitozla çoğalabilen kemik yapıcı öncü hücrelerdir. Endoplazmik retikulumları oldukça gelişmiştir, Golgi kompleksi az miktarda bulunmasına karşın çok sayıda serbest ribozoma sahiptir. İğ şeklinde ve oval çekirdekli osteoprogenitör hücreleri, osteoblastlara veya düşük oksijen konsantrasyonunda kondrojenik hücelere farklılaşabilirler. Bu hücreler kemik büyümesi sırasında oldukça önemli rol oynarlar (Datta v.d., 2008).

Osteoblastlar, kondrosit, miyoblast, fibroblast ve adipositler gibi kemik iliği stromasında bulunan mezenşimal kök hücrelerden (osteoprogenitör hücreler) türevlenmiş, kemik matriks sentezinde ve mineralizasyondan sorumlu hücrelerdir (Logan v.d., 2004). Kemik oluşumunda rol alan, olgunlaşmış, metabolik olarak aktif hücrelerdir. Osteoblastlar, osteoid üretimini artırarak ve osteoklast aktivitesini inhibe edip kemiksi dokunun yıkımını durdurabilirler (Kini v.d., 2012). Dormant halde kemik yüzeyinde astar hücreleri olarak görülürken, aktifleşen osteoblastlar yüzeyde yeni osteoid salgıladıklarında tek sıra halinde kübik halde görülmektedir (Arai v.d., 2007). Gelişmekte olan kemiklerin periyost bölgelerinin kemiğe temas eden yüzeylerinde bol miktarda bulunurlar. Osteoblast farklılaşma proteinleri Runx2 ve BMP (Kemik Morfogenik Proteini; *Bone Morphogenic Protein*), osteoblastogenez ve kemik matriks oluşumunda oldukça önemli rol

oynamaktadır. Son yıllarda, Wnt sinyal yolağının osteoblast sinyalinde önemli olduğu belirlenmiştir (Frey v.d., 2015).

Kanonikal Wnt sinyal yolağı, BMP sinyal yolağı ile birlikte osteoblast farklılaşmasını, olgunlaşmasını ve mineralizasyonu başlatmaktadır (Lian v.d., 2006). *in vitro* koşullarda, BMP'nin Wnt ekspresyonunu indüklediği (Chen v.d., 2007; Rawadi v.d., 2003); buna karşın kimi çalışmalarda Wnt sinyalinin BMP ekspresyonunu indüklediği bildirilmektedir (Bain v.d., 2003). Elde edilen verilerin sonucunda, Wnt ve BMP sinyallerinin osteoblast hücrelerinde birbirlerini regüle edebileceği önerilmiştir (Miclea v.d., 2011).

Kemik oluşumu sırasında aktifleşen osteoblastlar şekil değiştirerek kübik bir hal alırlar ve bu esnada bazofilik bir sitoplazmaya sahiptirler. Kemik yeniden modellenmesi ve yapımı tamamlandığında, bazı osteoblastlarda apoptoz gerçekleşir, bazıları astar hücreleri olarak dormant halde kalırken bazıları osteositlere farklılaşır.

Alt popülasyonları, farklı hormon, mekanik veya sitokin sinyallerine farklı cevap oluştururlar (Clarke, 2008). Bu yüzden farklı iskelet bölgelerinde trabeküler mikromimarisinin, hastalık anatomilerinin, tedavi sonucunda osteoblastların verdiği cevabın osteoblast gen profilinin farklı olabileceğinden dolayı farklılık gösterebileceği söylenebilir.

Aynı zamanda, yüksek miktarda alkalin fosfat aktivitesi göstermeleri nedeniyle kemik matriksinde kalsiyum depolanmasını osteoblastların düzenlediği düşünülmektedir (Sikavitsas v.d., 2001). Osteoblastlar, kemik matriksinin organik komponentlerinden Tip I kollajen, proteoglikan ve glikoprotein sentezinden sorumludur. Osteoblast tarafından üretilen matriks ise eski matriks tabakasıyla temas geçerek arada yeni matriks tabakası oluşturur. Bu olay kemik apozisyonu olarak adlandırılır ve zaman içerisinde kalsiyum tuzlarının çökmesi ile tanımlanır (Ezirganli v.d., 2013).

b) Osteoklastlar

Osteoklastlar, normal kemik yeniden modellenmesi sırasında azalan, kemik rezorpsiyonu gibi patolojik durumlarda ise artan ve kemik rezorpsiyonunda görevli tek kemik hücre türüdür (Boyce v.d., 2009). Geniş hücre gövdesi, aktif çok çekirdekli osteoklastlar (5-50 çekirdek), monosit-makrofaj kökenli mononükleer prekürsör hücrelerinden türevlenmiştir (Boyle v.d., 2003; Kikuta v.d., 2012). Mononükleer monosit-

makrofaj prekürsör hücreleri birçok dokuda tanımlanmıştır fakat kemik iliğinde osteoklast oluşumuna öncülük etmektedirler (Kikuta v.d., 2012).

Osteoklast sitoplazmasında asit fosfataz granülleri bulunur. Aktifleşmiş osteoklastlarda, kemik matriksine bakan yüzey düzensizce katlanmış, fırça benzeri bir kenar oluşturur. Bu kenar çevresinde aktin filamentçe zengin, organel içermeyen sitoplazmik bir bölge oluşur. Bu bölge, osteoklastın kemik matriksine tutunduğu bölgedir ve rezorbsiyon için mikroçevre oluşturur (Boyle v.d., 2003; Roodman, 1999; Vaananen v.d., 2000).

RANKL (Reseptör Aktivatör Nükleer Kapa B (NF- κ B) Ligand - *Receptor Activator Of Nuclear Factor κ B*) ve M-CSF (Makrofaj Koloni-Uyarıcı Faktör - *Macrophage Colony-Stimulating Factor*) osteoklast oluşumunda önemli rol oynayan iki önemli sitokindir. Kemik iliği hücrelerinden, membrana bağlı veya serbest haldeki osteoklastlardan üretilir. Osteoklastogenez için kemik iliğinde stromal hücrelerin ve osteoblastlarında varlığı oldukça önemlidir (Teitelbaum v.d., 2003). RANKL, osteoklast oluşumunda önemli rol oynayan TNF ailesinden bir proteindir. M-CSF, osteoklast prekürsör hücrelerin proliferasyon, sağ kalım ve farklılaşma aşamalarında etkin olmasının yanında osteoklast sağ kalımı ve kemik rezorbsiyonu sırasında da rol oynamaktadır. Osteoblastlardan salgılanan OPG (Osteoprotegrin), RANK reseptörü ve RANKL bağlanmasını önleyerek aktivitesini inhibe eder (Asagiri v.d., 2007; Cohen Jr, 2006). OCIF (Osteoklast İnhibisyon Faktörü - *Osteoclast Inhibiting Factor*) veya OBF (Osteoklast Bağlayıcı Faktör - *Osteoclast Binding Factor*) olarak da bilinen OPG, osteoklast farklılaşmasını ve aktivasyonunu inhibe eder. Aynı zamanda kemik rezorbsiyonu için oldukça önemli bir proteindir. RANKL/RANK/OPG sisteminin dengesinde meydana gelen anomaliler, kemik rezorbsiyonunun artmasına ve beraberinde postmenapozal osteoporoz, Paget's hastalığı, metastatik kanserlerde kemik kayıpları gibi birçok hastalığa neden olur. Kemik rezorbsiyonu, osteoklastlardan H iyonu, katepsin K ve MMP (Matriks Metalloproteinaz - *Matrix Metalloproteinase*) enzimi sekresyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir. H iyonları rezorbsiyon kompartmanlarının asidifiye olarak çözülmesini sağlar ve böylece kemik matriksinin mineral komponentlerinde çözünme gerçekleşirken; katepsin K matriks protein bileşenlerini (tip I kollajen gibi) parçalar (Boyle v.d., 2003). Osteoklastlar, β 1 ailesi integrin reseptörü, kollajen, fibronektin ve laminin gibi yüzey proteinleri aracılığıyla kemik matriksine bağlanır (Ross v.d., 2005).

Aktif kemik rezorbsiyonu, kemik yüzeyindeki Howship lakünalarında osteoklast varlığı ile tanımlanır. Osteoid içermeyen kemik yüzeyi düzensiz görünümündedir. Ayrıca osteoklastlar, lokal kollajen sindirimini ve kalsiyum tuz kristallerinin eritilerek emilmesini başlatan kollajenaz gibi enzimleri salgılar ve protonların hücre altındaki bölgeye geçmesini sağlar.

Osteoklast işlevi, sitokin ve hormonlar (kalsitonin) aracılığıyla kontrol edilir. Osteoklastlar paratiroid hormonu reseptörüne sahip olmamasına rağmen, paratiroid hormonun osteoblastları uarması sonucunda osteoklastlardan sitokin salgılanır (Blair v.d., 2004). Hücresel yapı, kemiğin esas yapısal bütünlüğünü sağlayan matriksin üretilmesini, dönüşümünü ve yenilenmesini sağlamaktadır (Ishii v.d., 2008) Osteoklastlar mineralize kemik matriksini rezorbe ederken, osteoblastlar kemik üretimini yapar ve hayat boyu bu işlevlerini devam ettirerek dengeli bir bütün oluşturmaktadırlar (Manolagas, 2000; Ishii v.d., 2008).

c) Osteositler

Kemik dokunun yaklaşık %90'ını osteositlerden oluşmaktadır. Kemik matriksinde lakünaya gömülü halde bulunan osteoblastlardan son olarak osteositler farklılaşan hücrelerdir. Hücre yapısını ve metabolizmasını destekler. Kemik matriksi içerisinde bulunan laküna olarak adlandırılan küçük boşluklar içerisine yerleşmiş olan osteositler, birbirleriyle kanalikuli olarak adlandırılan küçük kanalcıklar ile bağlantı kurarlar. Aynı zamanda, *gap junction* olarak adlandırılan hücresel bağlantıları ile metabolik aktivitelerini devam ettirirler. Lokal çevre faktörlerinden etkilenirler. Kemik metabolizmasını etkileyen faktörler karşısında cAMP (Siklik Adenosin Monofosfat), osteokalsin ve IGF salgırlar. Bu faktörlerin salgılanması beraberinde öncül osteoblastların artışı sağlayarak kemikte yeniden modelleme ve kemik apozisyonuna neden olur. Ayrıca, osteositler ekstraselüler kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun homeostazında önemli rol oynar (Guo v.d., 2009).

Kemikte gelişim mikrohasara ve mekanik uyarı durumunda osteositler fibroblast büyüme faktörleri salgılayarak fosfat metabolizmasının düzenlenmesini sağlar. Kemikte mikrohasar gerçekleştiğinde, bölgesel osteositlerde apoptoz gerçekleşir ve kemik rezorbsiyonu siklusu başlar. Eğer ortamda yeterli miktarda canlı osteosit yoksa genellikle osteoklast aktivitesi artar (Walsh, 2015). Osteositler aynı zamanda hormonlara cevap oluşturulmasına olanak sağlar. Östrojen eksikliği veya glukokortikoid tedavisi sonucunda

osteosit apoptozu, dolayısıyla kemik yapısında hasar meydana gelir. Östrojen ve bifosfonat terapisi veya kemiğe fizyolojik olarak yüklenmesi, osteoblast ve osteosit apoptozundan korunmayı sağlayabilir (Plotkin v.d., 2005; Xing v.d., 2005).

d) Kemik Matriksi

Kemik, %50-70 mineral, %20-40 organik matriks, %5-10 su ve <%3 lipidden oluşmuştur. En sık bulunan minerali, oldukça küçük moleküler yapıya sahip (200 \AA) hidroksipatit kristallerdir ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Bununla birlikte küçük miktarda karbonat, magnezyum ve asit fosfatta bulunmaktadır. Kemik mineralleri mekanik sertlik ve kemiğe destek; organik matriks elastiklik ve esneklik sağlar. Kemik matriksi organik komponentini, osteoblastlar tarafından salgılanan mineralize olmamış osteoidler oluşturur ve inorganik tuzların depolanarak kristalleşmesi için kemiğe uygun formunu verir (Clarke, 2008).

Matriks olgunlaşması alkalın fosfataz ve birçok kollajenöz olmayan proteinlerin ekspresyonu (osteokalsin, osteopontin ve kemik sialoprotein) ile ilişkilidir. Sonuç olarak, kalsiyum ve fosfat bağımlı proteinlerin hidroksipatit kristallerinin miktar ve boyutlarını düzenleyerek mineral birikimine yardımcı olduğu söylenebilir (Roach, 1994).

Kemik matriks içeriğinde, tip I kollajen fibrilleri ile glikoproteinler, proteoglikanlar, γ - karboksil proteinler ve su bulunmaktadır. Ayrıca, birçok non-kollajen protein kemik hücrelerinin aktivitesinin veya mineralizasyonun düzenlenmesinde fizyolojik rol oynamaktadır. Kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum, sodyum gibi maddeler kemik matriksinin inorganik komponentlerini oluşturur. Hidroksipatit kristalleri, osteoid mineralizasyonu sayesinde, Tip I kollajenlerle birlikte kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlar (Bussard v.d., 2010). Kemik zarlarından periyost, kollajen liflerinden ve fibroblastlardan oluşan dış tabakaya sahiptir. Sharpey lifleri olarak adlandırılan bu lifler, matriks içine girerek periyostu kemiğe bağlar. Periyostun iç kısmı ise, bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturan osteoprogenitör hücreler bakımından oldukça zengindir. Endosteum, kemik içerisinde bütün boşlukları kaplayan, tek tabaka halinde yassılaştırmış osteoprogenitör hücreler ile az miktarda bağ dokudan meydana gelmiştir. Periyostun ve endosteumun ana işlevi kemiksi dokunun beslenmesi ve devamlı olarak yeni osteoblastlar sağlayıp, kemik büyüme ve onarımı için önlemler almasıdır (Blair v.d., 2004).

2.4.2. Meme kanseri kemik metastazı patogenezi

Metastaz, birçok adımdan meydana gelen biyolojik bir süreçtir. Kanser hücreleri primer tümörden ayrılır ve bölgesel kan/lenf damarlarına invaze olurlar. Hedef organlarına ulaştıklarında spesifik bağlantılarıyla mikrometastaz ve makrometastaz yapıları oluşturarak kolonize olurlar. İskelet sisteminde ise meme kanseri hücreleri endotel yüzeylerden adere olurlar. Kemik mikroçevresi, tümör hücresinin büyüebilmesi için osteoblast, osteoklast, mineralize kemik matriksi ve diğer tip hücreler gibi uygun yapılardan kompozite olmaktadır; Daha sonra tümör hücresi ve mikroçevre arasında başlayan kısır döngü sonucunda tümör hücresi büyümeye, kemik dokusu hasar görmeye başlar (Zheng v.d., 2013).

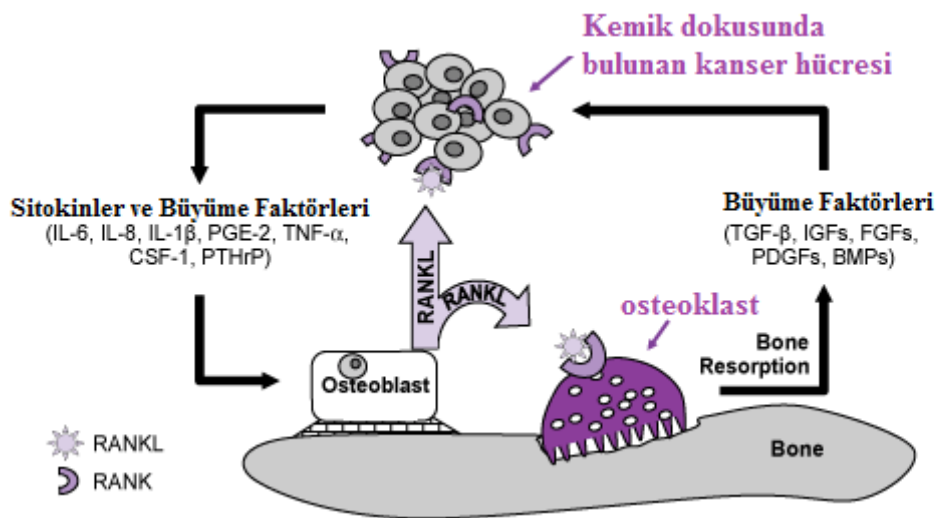
Kemik dokusunda tümör gelişimi başladığında osteoklast-ilişkili kemik yıkımını başlatan çeşitli faktörlerin salınımı gerçekleşir. Kemik yıkımına kemik metastazı eşlik eder. Kemik matriksinden tümör hücrelerini uyaran büyüme faktörleri salgılanır. Salgılanan büyüme faktörlerinden tümör hücreleri etkilenir. Bu mekanizma tümör hücrelerinde sürekli olarak devam eder ve kısır döngü (*vicious cycle*) olarak adlandırılır (Krishnan v.d., 2014).

Metastaz sırasında gerçekleşen kısır döngünün anlaşılması, tümör hücresinin kemik mikroçevresindeki farklı hücre tipleri ilişkileri ve tümör hücreleri ile kemik, stroma arasında meydana gelen kompleks interaksiyonun ortaya konmasında oldukça önemlidir.

Kısır döngü ilk kez 1997 yılında, metastatik hücrelerin kemik dokusunda büyümesini destekleyen bir döngü olarak Mundy ve Guise tarafından tanımlanmıştır (Mundy v.d., 1997). Tanımlanan modelde, kemik hücrelerinin metastatik hücreleriyle etkileşimi ve kemik mikroçevresinde kanser hücrelerinin nasıl ölümsüzlüğünü sürdürebildiği başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Esas itibariyle, kısır döngü modelinde tümör hücrelerinin osteoblastlarla olan etkileşimi ve bunun sonucunda osteoklast aktivasyonuna, kemik hasarına olan etkisi tanımlanmıştır. Kemik dokusu yalnızca kanser hücrelerinin büyüebileceği oda görevinde değildir; aynı zamanda kanser hücreleri gömülü olduğu kemik matriksinden birçok büyüme faktörün salınmasını tetikler. Bu sayede sınırsız büyüme kapasitesine sahip olur (Şekil 2.8).

PTHrP (Paratiroid Hormon-İlişkili Protein - *Parathyroid Hormone-Related Protein*), osteoblast türevli hücrelerde (osteoblast prekürsörleri, osteoblastlar ve osteositler), RANKL ekspresyonunun up-regüle olmasını sağlar. Daha sonra RANKL,

osteoklast ve osteoklast prekürsör hücrelerinde bulunan reseptörü RANK'a bağlanarak osteoklast oluşumunu ve kemik rezorpsiyonunu aktive eder. Kemik rezorpsiyonunun hızlanması, kemik matrisine gömülü olan büyüme faktörlerinin salınmasını tetikler ve bu büyüme faktörleri metastatik kanser hücrelerinin büyümesini sağlar. "Kısır döngü" modelinin tanımlanmasıyla birlikte, metastatik meme kanseri hücrelerinin yeterli sayıya ulaşmadan, erken dönemde nasıl kolonizasyon oluşturduğu ve sağ kalım sürelerinin nasıl uzun olduğu tanımlanmıştır.



Şekil 2.8. Metastaz Sonucunda Kemik Dokusunda Ortaya Çıkan Kısır Döngü (Smith, 2010)

Metastatik meme kanseri hücrelerinden salınan, stimülasyon faktörleri metastaz sürecinde oldukça önemli rol oynamaktadır. PTHrP, İnterlökin -11 (*Interleukin-11* - IL-11), IL-8, IL-6 ve RANKL ve VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (*Vascular Endothelial Growth Factor*)) normal kemik dokusunun yeniden modellenmesini sağlayan ve kısır döngüde etkili oldukça önemli moleküllerdir (Krishnan v.d., 2014; Weilbaeher v.d., 2011). Bu moleküllerden en çok, paratiroid hormon ile aynı reseptöre bağlanan PTHrP çalışılmıştır (Abou-Samra v.d., 1992). Tümör türevli PTHrP, osteoblast ve stromal hücrelerden RANKL ekspresyonunu arttırarak ve OPG ekspresyonunu baskılayarak, dolaylı bir mekanizmayla osteoklastogenezi aktive edebilir (Guise, 1997). Meme kanseri kemik metastazı fare modellerinde PTHrP'nin oldukça önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Yin v.d., 1999). MDA-MB-231 kullanılarak meme kanseri oluşturulan fare modellerinde, nötralize antikor kullanılarak PTHrP bloke edildiğinde ise osteolitik lezyonlar azalmıştır

(Thomas v.d., 1999). Bununla birlikte ilginç bir biçimde, PTHrP pozitif primer meme tümörlerine sahip hastalarda kemik metastazı gerçekleşme riskinin oldukça düşük olduğu ve PTHrP ekspresyonu gerçekleşmeyen veya çok az gerçekleşen hastalara göre bu bireylerin daha iyi prognoza sahip olduğu belirlenmiştir (Henderson v.d., 2001; Li v.d., 2011). İnsan ve hayvan çalışmalarında elde edilen bu ilginç sonuçlar değerlendirildiğinde, PTHrP ekspresyonunun artması meme kanserinin daha düşük invaziv fenotip kazanması ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda, PTHrP'nin tümör hücresinin karakteristik özellik kazanmasında etkisinin olabileceği önerilmiştir (Li v.d., 2011; Siclari v.d., 2006).

Diğer moleküller; IL-6, IL-11, IL-8 TNF- α , M-CSF ve VEGF, osteoklast oluşumunu ve daha sonra osteolitik aktiviteyi stimüle etmektedir (Guise v.d., 2006). IL-6, IL-11 ve VEGF, RANKL sinyal yolağı aracılığıyla osteoklast oluşumunu artırırken; M-CSF ve IL-8 direkt olarak insan osteoklast oluşumunda rol olmaktadır (Lynch, 2011). RANKL'nin osteoblast veya osteoblast kökenli hücrelerde up-regülasyonu, osteoklast aktivasyonuna ve kemik rezorpsiyonuna neden olur. Bu durumun kemik için iki etkisi vardır. İlk olarak, kemikten uzaklaşır ve tümör gelişimi için önemli bir engel ortadan kalkar. İkincisi, kemik mikrometastatik meme kanseri hücreleri için oldukça verimli bir çevredir. Çünkü kemik rezorpsiyonu esnasında kemik matriksinde meydana gelen hasarlar sonucunda serbestlenen büyüme faktörleri tümör büyümesini stimüle eder. Bu faktörlerden TGF- β , meme kanseri hücrelerinin kemik metastazında oldukça önemlidir. Aynı zamanda TGF- β tümör hücresine ulaşan TGF- β , PTHrP ekspresyonunu uyararak tümör hücresinin invazyonunu artırır. PTHrP ve TGF- β arasındaki ilişkinin kemik geri emiliminde önemli olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda belirlenmiştir (Yin v.d., 1999).

2.5.Serbest Nükleik Asit

Birçok kanser tipinin tedavisinde başarılı sonuç elde edilmesi, tümör genetik yapısına uygun kemoterapatik ilaçların veya tedavi yollarının (cerrahi yöntem, radyolojik tedavi gibi) seçilmesine bağlıdır. Kişiden invaziv olmayan ve kolaylıkla ulaşılacak biyobelirteç ile tümör genetik bilgilerine ulaşılabilmesi, kişiye özgü tedavi geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Serbest nükleik asitlerin bu konuda oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

Geçtiğimiz yıllarda, nükleer (nDNA) ve mitokondriyal DNA (mtDNA), RNA ve mikro RNA (miRNA)'lar gibi sirküler serbest nükleik asitler bilim dünyasında ilgi

çekmiştir ve kanser biyobelirteci olabileceği konusunda birçok çalışma yapılmıştır (Chan v.d., 2013; Jung v.d., 2010). Tanı aşamasında, “likit biyopsi” olarak görülen serbest DNA’lar oldukça çekici özelliklere sahiptir. Venipunktür olarak hızlı, kolay ve invaziv olmayan yollarla, ihtiyaç duyulduğunda birçok kez elde edilebilir (Diehl v.d., 2008). Bireysel kanserde yer alan genetik değişiklikleri takip etmek için tümör hücrelerinden türevlenmiş serbest DNA’ların oldukça yararlı olabileceği düşünülmektedir. Tüm serbest DNA’lar içerisinde, tümör hücresinden kökenlenmiş serbest DNA’lar olarak laboratuvar koşullarında kolaylıkla çalışılabilir (Chan v.d., 2013).

Serbest nükleik asitler ilk kez serum ve plazmada Mandel ve Metais tarafından belirlenmiştir (Mandel v.d., 1948). Yapılan çalışma sonucunda, hasta ve hamile bireylerde bulunan serbest nükleik asitlerin, sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma uzun yıllar göz ardı edilmiştir; bunun iki sebebi vardır. İlk olarak yeterince analitik metodun kullanılmamasından dolayı ilk verilerden şüphe duyulmuştur (Stroun v.d., 1977). İkinci sebebi ise, DNA’nın yapısının ve içeriğinin henüz bilinmemesidir. 1953 yılında Watson ve Crick tarafından DNA’nın helikal yapısı ve içeriğinde hücrenin karakteristik özelliklerini belirleyen genlerin varlığı belirlenene denk serbest DNA varlığı unutulmuştur. 1966 yılında sirküler sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalarında, oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Tan v.d., 1966). 1973 yılında geniş hasta grubuyla yapılan bir çalışmada ise, romatoid artrit, glomerular nefrit, pankreatit, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında ve hepatitte artan serbest DNA seviyesi gösterilmiştir (Koffler v.d., 1973). Devam eden süreçte kanser hastalarının serum ve plazma örneklerinde bulunan serbest DNA miktarı sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmıştır ve oldukça yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Leon v.d., 1977). Metastatik hastalığa sahip bireylerin serum ve plazmalarında, lokalize hastalardan daha yüksek seviyede serbest DNA olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, radyoterapi uygulamasının serbest DNA seviyesinin %90’dan fazla azaldığı gözlenmiştir (Stroun v.d., 1989). 1989 yılında ilk kez Stroun ve Anker serbest DNA karakterizasyonu yapmıştır ve tümör DNA’sının genotipik özelliklerini yansıttığını belirlemişlerdir (Stroun v.d., 1989). 1996 yılında, primer tümör ile eşleşen onkogen mutasyonları, heterozigosite kaybı (LOH) ve mikrosatelit değişimleri plazma ve serumda bulunan serbest DNA’larda belirlenmiştir (Nawroz v.d., 1996). Serbest nükleik asitler ile yapılan en geniş çaplı çalışma, Lo ve ark. 1989 yılında maternal kanda serbest fetal DNA ile cinsiyet belirlemesi sonucu başlamıştır (Lo v.d., 1989). İnvaziv olmayan yollarla maternal kandan elde edilebilen serbest fetal DNA ile anöploidi, Down

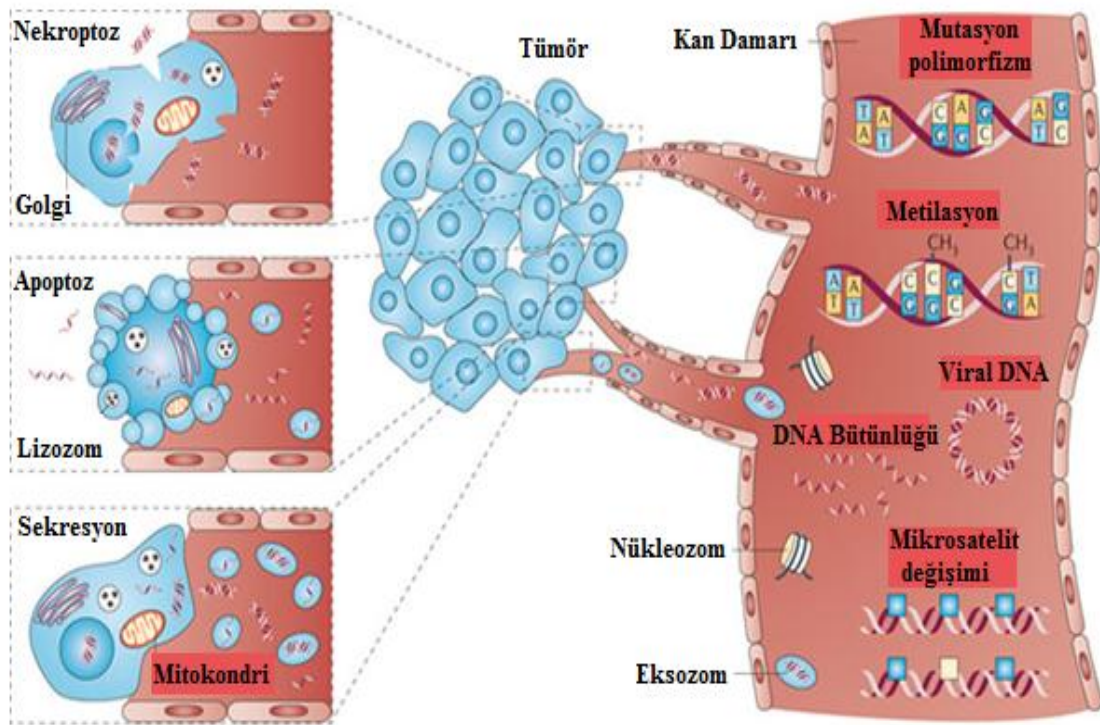
sendromu, Rh durumu, β -talasemi ile birçok hamilelik ile ilişkili komplikasyonlar (ilk trimestırda pre-ekspansiyon gibi) erken dönemde belirlenebilmektedir (Gahan v.d., 2010). Ayrıca yapılan çalışmalarda, serbest DNA'ların diğer bir önemli fonksiyonlarının, organizmada dokular ve hücreler arasında mesaj iletici rolü olabileceği önerilmiştir (Swaminathan v.d., 2006).

Serbest DNA'lar hem plazma hem de serumda bulunmaktadır. Sağlıklı bireylerde miktarı 0-100 ng/ml iken kanser hastalarında 1000 ng/ml'den daha yüksektir (Alix-Panabières v.d., 2012; Jahr v.d., 2001; Jung v.d., 2010; Park v.d., 2012; Sozzi v.d., 2001). Yapılan bir çalışmada, 3×10^{10} neoplastik hücreye sahip 100 gram tümörden günde %3,3 tümör DNA'sının sirküler sisteme serbestlendiği belirlenmiştir (Emlen v.d., 1984). Bununla birlikte, serbest DNA miktarı birçok fizyolojik mekanizmadan etkilenmektedir ve yarı ömrü birkaç dakika ile birkaç saat arasında değişiklik göstermektedir (Emlen v.d., 1984; Dennis Lo v.d., 1999).

Serbest DNA'ların salınma mekanizmalarıyla ilgili çeşitli mekanizmalar önerilmiştir (Şekil 2.9). Örneğin; hematopoetik hücrelerin lizisi (Lui v.d., 2002), çeşitli hücrelerden aktif salınma ile gerçekleştiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Peters v.d., 2011; Rak, 2013). Ayrıca, agresif tümör büyümesi dokuda hipoksik koşulların ortaya çıkmasına neden olur. Meydana gelen hipoksi koşullarında malignant hücrelerde ve çevre doku hücrelerinde nekroz ve/veya apoptoz önemli ölçüde artar. Ölen hücrelerin artıkları, normal koşullar altında makrofajlar tarafından fagosite edilerek uzaklaştırılır. Bu basamakların kanserli dokularda meydana gelme mekanizması ve makrofajlar tarafından fagosite edilen nekrotik/apoptotik DNA'ların sirkülasyona katılması tam olarak açıklanamamıştır (Diehl v.d., 2008; Jahr v.d., 2001). Serbest DNA'lar enzimatik degradasyondan korunmak için ekstrasellüler veziküller veya histon gibi çeşitli moleküllerle etkileşim halinde bulunabileceği önerilmektedir (Peters v.d., 2011).

Parçalanmış lökositlerden kana karışan serbest DNA miktarı oldukça azdır (1.8-36 ng/ml) (Anker v.d., 1975; Chang v.d., 2003; Tamkovich v.d., 2006). Birçok bakteri normal koşullar altında kanda bulunur ve DNA seviyeleri tam olarak belirlenemez. Nazofarenks kanserine neden olan EBV (*Epstein Barr virus*) (Lo v.d., 2004), servikal kanser hastalarının bir kısmında görülen insan papilloma virüsleri ve hepatit hastalarının periferel kanlarında viral DNA'ları belirlenmiştir (Chan v.d., 2003; Yang v.d., 2004). HHV-6 (*Human herpes virus-6*) DNA'sı plazma ve serumda belirlenmiş olup kapsülsüz bir bakteri olmasından dolayı DNaz'lar tarafından kolayca saldırıya uğramaktadır (Achour v.d., 2007)

Plazma ve serumda bulunan serbest DNA'ların en önemli kaynaklarından birini dokulardaki nekroz oluşturmaktadır. Nekroz sırasında DNA, spesifik olmayan, eksik kesime uğrar ve jel yükleme işleminin ardından elektroforez uygulaması yapıldığında DNA bant görünümünden ziyade silik bir görünüm kazanır (Nagata v.d., 2003; Van der Vaart v.d., 2007; Wang v.d., 2003)



Şekil 2.9. Tümör Hücreleri ve Serbest DNA'lar. Kanda mutasyonlar, metilasyon, DNA bütünlüğü, mikrosatelit değişimleri ve viral DNA, serbest DNA'lar aracılığıyla kanda belirlenebilir (Schwarzenbach v.d., 2011).

Nekrotik hücrelerden salınan DNA fragmentleri oldukça büyüktür ve 10.000 bp uzunluğa ulaşabilmektedir elektroforez ve sükröz-gradient sedimentasyon çalışmalarında plazmada DNA fragmentlerinin 21 kb (Stroun v.d., 1987) ile 80 kb arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Giacona v.d., 1998; Kessenbrock v.d., 2009).

Nekrozun yanında serbest DNA'ların en önemli kaynağı olarak apoptotik hücreler düşünülmektedir. Hidroksipatit kromatografi veya yoğunluk gradient santrifüjü kullanılarak kanda bulunan DNA'nın çift zincirli olduğu belirlenmiştir (Anker v.d., 1975;

Stroun v.d., 1977). Agaroz jel elektroforezinde apoptotik DNA fragmentleri bant görünümündedir (Holdenrieder v.d., 2004; Nagata v.d., 2005; Nagata v.d., 2003) ve fragment uzunlukları 180-1000 bp arasında değişiklik göstermektedir. Fragment uçları şapkalanmış durumdadır ve nükleozom veya apoptotik fragment formunda bulunabilirler. Tümör hücrelerinin apoptoza uğraması sonucunda serbest DNA havuzuna tümör ilişkili serbest DNA katılmaktadır. Apoptotik hücrelerin elektroforetik DNA fragmentleri 50-300 bp arasında iken; nükleozomal fragmentler kırılmalara uğrar ve 180-200 bp arasındadır (Holdenrieder v.d., 2004; Nagata v.d., 2005; Nagata v.d., 2003). Bununla birlikte, normal apoptotik hücreler makrofajlar ve dentritik hücreler tarafından fagosite edilir. Solid tümör apoptotik hücrelerinden serbest DNA salınmasının, fagositik hücrelerin parçalanması veya DNA'yı salması sonucunda gerçekleştiği önerilmiştir (Atamaniuk v.d., 2006; Jahr v.d., 2001; Viorritto v.d., 2007). Aynı zamanda, apoptotik serbest DNA fragmentlerinin mitokondriyal DNA olabileceğine dair çalışmalarda literatürde mevcuttur (Viorritto v.d., 2007).

Yeni sentezlenen DNA'dan spontane olarak serbestlenen DNA'lar plazma ve serumda bulunan serbest DNA'ların, özellikle sağlıklı bireylerde, en önemli kaynaklarından biridir. Aynı zamanda tümör hücrelerinin de dışarıdan herhangi bir uyarın ile DNA serbestleyebildiği *in vitro* koşullarda gösterilmiştir (Adams v.d., 1997). Yapılan çalışmalarda, tüm tümörlerin kan sirkülasyonuna DNA serbestlediği gösterilmiştir (Garcia-Olmo v.d., 2010).

2.5.1. Meme kanseri ve serbest DNA

Yapılan çalışmalarda, çeşitli malignan ve benign meme tümörlerine sahip bireyler ile sağlıklı kontrollerdeki serbest DNA seviyesi kantitatif ve kalitatif karşılaştırıldığında farklılık olduğu belirlenmiştir (Bruhn v.d., 2000; Catarino v.d., 2008; Dawson v.d., 2013; Hibi v.d., 1998; Kamat v.d., 2010; Kohler v.d., 2009; Kopeski v.d., 1997).

Meme kanseri çalışmalarında genellikle plazma ve serum örnekleri kullanılmaktadır. Meme kanseri hastalarının plazma serbest DNA seviyesi 115-462 ng/ml; serum serbest DNA seviyesi 153-549 ng/ml olarak belirlenmiştir (Fleischhacker v.d., 2007). Serbest DNA'ların prognostik ve diagnostik özelliği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Catarino v.d., 2008; Gal v.d., 2004). Meme kanseri hastalarında, primer tümör ve kan arasındaki tümör spesifik DNA değişimlerinin uyumunu belirleyen

çalışmalarda onkogen ve tümör süpresör gen mutasyonlarına, metilasyon durumlarına ve mikrosatelit değişimlerine odaklanılmıştır. Primer tümörde çoğunlukla *p53* geni ekson 5-8 mutasyonları gerçekleşmektedir ve birçok olguda tümör dokusuna paralel olarak plazmada da aynı mutasyonlar tanımlanmıştır (Garcia-Olmo v.d., 2006; Silva v.d., 1999; Silva v.d., 2002). Shao ve ark. yaptıkları çalışmada, primer tümör ve plazma DNA *p53* mutasyonlarının relapsız ve genel sağ kalım durumlarının değerlendirilmesinde önemli bir prognostik belirteç olabileceğini önermiştir (Shao v.d., 2001). Meme kanseri dokusundaki çeşitli genlerin metilasyon durumları, plazma ve serum örneklerinde birçok çalışmada karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda en çok analiz edilen genler *P16INK4A*, *RASSF1A*, *APC* ve *BRCA1* genleridir (Dulaimi v.d., 2004; Rykova v.d., 2004; Sharma v.d., 2010). Fiegl ve ark., *RASSF1A* DNA metilasyonunun adjuvant sistemik meme kanseri tedavisinin etkinliğinin görüntülenmesinde kullanılabileceğini belirlenmişlerdir. Tamoksifen tedavisine cevap olarak serumda *RASSF1A* DNA metilasyonunun oranının azalmasına karşın tedaviye direnç ortaya çıktığında metilasyon seviyesinin azalmadığı belirlenmiştir (Fiegl v.d., 2005). Müller ve ark., *ESR1*, *APC*, *HSD17B4*, *HIC1* ve *RASSF1A* gen setlerinin metilasyon durumlarının prognostik özellikleri üzerine yaptıkları çalışma sonucunda, serumda metile durumdaki *RASSF1A* ve/veya *APC* bulunmasının kötü prognozla ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (Müller v.d., 2003).

Allellik oransızlığı ve LOH gibi durumları içeren mikrosatelit değişimleri de serbest DNA'lar aracılığıyla analiz etmek mümkündür. Birçok araştırmada tümör dokusunda ve sirkülasyonda bu belirteçler belirlenmiştir (Qi Chen v.d., 1999; Taback v.d., 2001). 147 meme kanseri hastasının tümör ve plazma DNA'sında altı polimorfik belirteç (D17S855, D17S654, D16S421, TH(2), D10S197 ve D9S161) ve *p53* gen mutasyonları taranarak önemli biyobelirteçler olabileceği kanıtlanmıştır (Silva v.d., 2002). Yapılan prospektif analizlerde plazma tümör serbest DNA'sının prognostik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Garcia-Olmo v.d., 2006; Silva v.d., 2002).

Sirküler hipermetile *RASSF1A*, meme kanseri hastalarında birçok çalışmada bulunmuştur (Fackler v.d., 2014; Matuschek v.d., 2010; Tan v.d., 2007; Van der Auwera v.d., 2009). Apoptoz veya nekroz ile hücre dönüşümü ve/veya hücre ölümü ile ortaya çıktığı düşünülmektedir (Kristiansen v.d., 2013). Tan ve ark. sodyum-bisülfid dönüşümü yapılmış metastatik meme kanseri serum örneklerinin %42'sinde *RASSF1A* belirlemiştir (Tan v.d., 2007). Matuschek ve ark. *RASSF1A* hipermetile durumda serum örneklerinde %43 oranında belirlerken (Matuschek v.d., 2010), Van der Auwera ve ark. ise %35

oranında var olduğunu göstermiştir (Fackler v.d., 2014). Tüm bu yapılan çalışmalarda, bisülfid dönüşümü yapılmış DNA duyarlılığı %35-70 arasında değişiklik göstermektedir (Fackler v.d., 2014; Matuschek v.d., 2010; Tan v.d., 2007; Van der Auwera v.d., 2009). 29 metastatik meme kanseri hastası ve 18 sağlıklı kontrol ile yapılan bir çalışmada, serumda *RASSF1A* hipermetilasyon taraması yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, sirküler hipermetile *RASSF1A*'nın metastaz prognostik biyobelirteci olabileceği önerilmiştir (Fackler v.d., 2014; Matuschek v.d., 2010). 2016 yılında Kristiansen ve ark. 24 metastatik meme kanseri hastalarının serum örneklerinde *RASSF1A* metilasyon analizlerinin sonucunda, sirküler hipermetile *RASSF1A*'nın metastatik meme kanseri hastalar için oldukça önemli bir biyobelirteç olduğunu belirtmişlerdir (Kristiansen v.d., 2016). *RASSF1A* metilasyonun erken dönem meme kanseri tanısında serum veya plazmada metile DNA'nın kullanılabilirliği birçok çalışmada önerilmiştir.

Yapılan çalışmalarda sağlıklı bireylerin plazma veya serumlarında *RASSF1A* metilasyon seviyesi %0-10 arasında iken, meme kanseri hastalarında %23-55 arasında bulunmuştur (Dulaimi v.d., 2004; Hoque v.d., 2006; Hu v.d., 2003; Müller v.d., 2003; Papadopoulou v.d., 2006; Silva v.d., 1999; Skvortsova v.d., 2006; Yazici v.d., 2009). Swellam v. yaptıkları çalışmada, metastatik meme kanseri hastalarında (%93.4) metile *APC*'nin, benign meme kanseri (%7,8) hastalarından daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Aynı zamanda çalışmada sağlıklı kontrollerde hipermetile *APC* belirlenmemiştir (%0). Çalışma sonucunda serum-bazlı moleküler belirteçlerin arasında *APC*'nin meme kanseri erken tanısında oldukça önemli olduğu belirtilmiştir (Swellam v.d., 2015).

85 meme kanseri hastası ile birlikte 22 sağlıklı kontrolün serum örneklerinde metilasyon spesifik PCR (MSP) yöntemi ile *APC*, *RASSF1A*, *ESR1*, *p16* ve *GSTP1* metilasyon analizi yapılmıştır. Çalışma sonucunda, meme kanseri hastalarında *APC* (%29), *RASSF1A* (%26), *GSTP1* (%18) ve *ESR1* (%38) metile olarak bulunmuştur. Aynı zamanda çalışma sonucunda, meme kanseri hastalarının serumlarında metile *APC* seviyelerinin sirküler tümör hücre seviyesi ve daha agresif tümör gelişimi ile korele olabileceği önerilmiştir (Matuschek v.d., 2010).

2.6. Genometastaz Hipotezi

20. yy'da tümör gelişim basamakları tanımlanmıştır. Tümör gelişim sürecinde primer tümörün invaziv kapasitesi artmakta, hücreler ayrılmaya başlamakta ve ardından metastaz gerçekleşmektedir. Kansere ilişkili ölümlerin büyük çoğunluğu bu sebepten meydana gelmektedir. Schmidt-Kittler ve ark. insan meme kanseri hücrelerinin, beklenen tümör gelişiminden daha erken ayrılarak metastaza neden olduğunu belirlemişlerdir (Schmidt-Kittler v.d., 2003). Elde ettikleri veriler, sadece gelişmiş tümörlerin metastatik karaktere sahip olacağı ve metastaz gerçekleştireceği düşüncesini desteklemediğinden dolayı uzun yıllar kabul görmemiştir.

Genetik haritalama çalışmaları ile birlikte, metastaz etkinliğinin genler tarafından modifiye edildiği ortaya çıkmıştır. Somatik mutasyonlara ek olarak, metastatik süreçte katkıda bulunan birçok fonksiyon varyasyonları tanımlanmaya başlamıştır. En önemlisi ise, tümör dokusunun alternatif gen ekspresyon profillemesi yapılarak tümör ayrılmasının prognostik tahmininin yapılabilmesi üzerine geliştirilen stratejilerdir (Ramaswamy v.d., 2003). Tümör dokusunun gen ekspresyon profilinin belirlenerek, kanser tanısının erken dönemde konması veya uygun tedavi stratejilerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Fakat bu aşamada çeşitli tehlikeler bulunmaktadır. İlk olarak, gen ekspresyon profillemesi için metastatik dokuya cerrahi müdahale olmadan veya ince-iğne aspirasyonları ile ulaşılmalıdır. Geliştirilecek olan metastatik gen profillemesi analizinin, non-invaziv olması ve kolay, sürekli ulaşılabilir örnekler olması (tükürük, idrar, kan gibi) analizlerin sürekli tekrarlanması açısından oldukça önemlidir. İkincisi ise, mikroarray analizinin oldukça pahalı bir yöntem olmasından dolayı, kliniğe uygulanacak olan gen profillemesi analizlerinde maliyetin düşürülmesinin gerekliliğidir. Devam eden süreç içerisinde birçok araştırmacı metastaz süreci ile ilgili çalışma yapmış ve çeşitli teoriler ortaya atmıştır (K. W. Hunter v.d., 2008; Weigelt v.d., 2005).

Kanser hastalarının serum ve plazmalarında tümör ilişkili serbest DNA'ların belirlenmesi araştırmacıların dikkatini çekmiş ve metastatik süreçteki etkileri araştırılmaya başlandığında "Genometastaz hipotezi" ortaya atılmıştır.

"Genometastaz hipotezi" ilk defa García-Olmo ve ark. tarafından 1999 yılında yapılan çalışmada ortaya atılmıştır. Kloramfenikol asetil transferaz (*chloramphenicol acetyl transferase* - CAT) geni içeren DHD (DHD/K12/TRb sıçan kolon kanseri hücre dizileri) hücreleri kullanılarak kolon kanseri geliştirilen sıçan modellerinin plazmalarında

CAT genine rastlamışlardır. (García-Olmo v.d., 2000; García-Olmo v.d., 2001; García-Olmo v.d. 1999). Sıçan kolon kanseri model plazmalarında *K-ras* onkogen mutasyon taramasında PCR yöntemi kullanılmıştır (García-Olmo v.d., 1999). Fakat yapılan çalışmalarda, plazmada bulunan mutant *K-ras* onkogeninin nekrotik veya apoptotik hücrelerden mi salındığı; yoksa sirküler kanser hücrelerinin lizisi sonucunda mı kana karıştığı belirlenememiştir. Mutant *K-ras* DNA'sı, kanın hücrel fraksiyonu tespit edilemediğinde dahi plazmada varlığını göstermektedir. Bu da, serbest DNA'ların kaynağının sirküler kanser hücre lizisi olmadığını göstermektedir (Kopreski v.d., 1997). Hücrel apoptoz veya nekroz ekstrasellüler DNA kaynağı olarak görülmektedir. Bununla birlikte, belirlenen ekstrasellüler DNA muhtemelen canlı tümör hücreler tarafından serbestlenmektedir (Leon v.d., 1977).

García-Olmo ve ark. sıçan modelleri kullanarak DHD/K12-PROb hücreleri ile kolon kanseri modeli oluşturmuşlardır. Kullandıkları hücreleri pCDNA3.1*CAT* ile transfekte etmişlerdir. Kullanılan plazmid bakteriyel gen olan *CAT* ekspresyonunu içermesinin yanında antibiyotik olan neomisin direnç geni de içermektedir (García-Olmo v.d., 1999). Yaptıkları çalışmalar sonucunda, sıçanlara enjeksiyonun birkaç hafta sonrasında kolon kanseri geliştiğini belirlemişlerdir. Daha sonra kolon kanseri gelişen sıçanların plazmaları sağlıklı sıçanlara intraperitoneal olarak uygulandığında, sıçanların akciğer doku ekstraktlarında *CAT* işaret genine rastlanmıştır. Aynı zamanda, kolon kanseri sıçan plazması DHD hücre supernatant ile inoküle edildiğinde işaret geni *CAT*'in hücreleri transfekte ettiği ve neomisin direnç geni varlığı belirlenmiştir (García-Olmo v.d., 1999). Elde edilen veriler, 1982 yılında Pulciani ve ark. ortaya atmış olduğu, normal hücreleri, tümör hücrelerinde var olan dominant onkogenlerin transfekte edebileceği düşüncesini kanıtlamaktadır (Pulciani v.d., 1982). Yaptıkları çalışmalar sonucunda, "Metastaz, hedef organda lokalize olan hassas hücrelerin, primer tümörden türevlenmiş dominant gen içeren serbest DNA ile transfeksiyonu aracılığıyla gerçekleşebilir." açıklamasında bulunmuşlardır (García-Olmo v.d., 2000).

Holmgren ve ark. apoptotik cisimciklerdeki genomik DNA'ların nükleer kompartman içeren fagositik hücreler aracılığıyla transfer edildiği ve bu sayede uzun süre stabil kalabildiğini belirlemiştir. Elde ettikleri veriler, kültür hücrelerinin sirküler plazma DNA'sı tarafından transfekte edilmesini açıklamaktadır (Holmgren v.d., 2002).

2.7. DNaz I

DNaz I ailesi DNaz I, DNaz X, DNaz γ ve DNAS1L2 olmak üzere 4 üye içermektedir. DNaz γ nötral endonükleaz aktivite göstermektedir ve maksimum aktivitesini pH 6.8-7.2 arasında gösterirken asidik endonükleaz olan DNAS1L2 ise pH 5.6'da aktivite göstermektedir. DNaz γ ve DNaz X intraselüler olarak bulunmasına rağmen, DNaz I ve DNaz X etkin bir şekilde hücrelerden salınarak ekstraselüler olarak aktivite gösterebilmektedir (Shiokawa v.d., 2001). Kimyasal yapılarına göre ise tüm DNaz I aile üyeleri glikoprotein yapıdadır (Kreuder v.d., 1984).

Farklı doku yapılarına göre, memelilerde 3 tip DNaz I bulunmaktadır. İlk tip DNaz I insan ve domuzlarda pankreasta yüksek aktivite göstermesinden dolayı pankreas tipi olarak adlandırılan, diğer tiplere göre daha düşük pH'da aktivite gösterir. İkincisi, sıçan ve fare kulak altı tükrük bezlerin lokalizedir ve yüksek pH'larda aktivite gösteren DNaz I türüdür. Üçüncüsü ise, sığır ve tavşanlarda pankreas-tükrük veya karışık tip bezlerde bulunan yüksek pH'da aktivite gösteren DNaz I sınıfıdır (Kolarevic v.d., 2014). Buna ek olarak DNaz I, böbrek, karaciğer, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak, dalak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik gibi birçok organda bulunmasına rağmen bu organlarda aktivitesi oldukça düşüktür (Takeshita v.d., 2000).

DNaz I ailesi üyelerinden sadece DNaz γ , memeli hücrelerinde apoptotik DNA fragmentasyonuna olanak sağlamaktadır. Canlı hücrelerin perinükleolar bölgelerinde lokalize olan DNaz γ , apoptoz sırasında nükleus içerisinde lokalize olur (Shiokawa v.d., 2001). DNaz γ aktivitesi DNA yapısı ve protein kofaktörler gibi birçok faktöre bağlıdır.

DNaz I enzimi, Ca^{+2}/Mg^{+2} -bağımlı endonükleaz olarak görev almaktadır. Çift zincirli B formundaki DNA'nın küçük oluğunda fosfodiester bağa bağlanarak aktivite gösterir (Drew v.d., 1984; Lahm v.d., 1991). DNaz I aktivitesi için DNA'nın esnekliği ve sertliği oldukça önemlidir (Lahm v.d., 1991). DNaz I DNA kalıbına 6 nükleotid uzunluğunda bir bölgeye bağlandıktan sonra küçük olukta dışa doğru bir kıvrılma ve açılma meydana gelir (Lazarovici v.d., 2013).

Plazma DNaz I miktarı sağlıklı kadınlarda 21 ± 21 ng/ml, erkeklerde 41 ± 30 ng/ml iken; aktivitesi ise kadınlarda 0.405 ± 0.509 U/ml, erkeklerde 0.307 ± 0.249 U/ml'dir. Genellikle, sağlıklı bireylerin plazmasında bulunan serbest DNA'ların DNaz'lar tarafından kesime uğradığı düşünülmektedir. Kanser hastalarının plazmalarında, sağlıklı bireylerden daha yüksek seviyede serbest DNA olmasının sebebinin ise, bazı kaynaklarda sirküler

DNaz inhibitörleri (Leon v.d., 1981), bazı kaynaklarda ise düşük DNaz seviyesi olabileceği önerilmektedir (Gahan v.d., 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

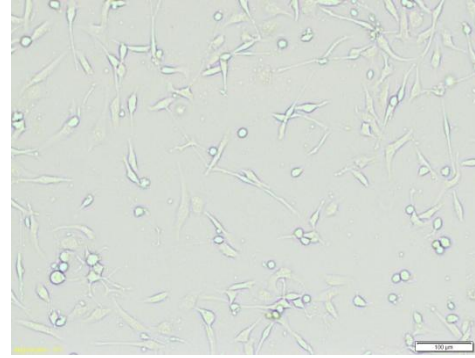
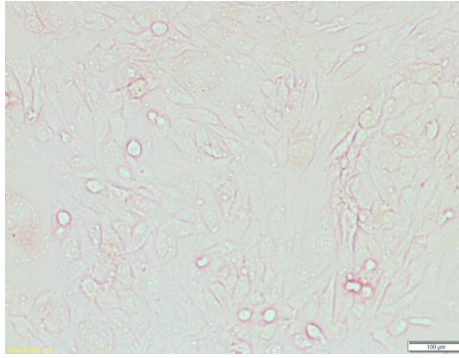
3.1.1. Sterilizasyon

Hücre kültüründe kullanılan tüm malzeme ve ajanlar sterilize edilerek kullanıldı. Kullanılan tüm plastik malzemeler steril olarak temin edildi. Steril edilmesi gereken cam malzemeler ise 160°C’de 60-90 dakika otoklavlandı. Sıvı ajanlar por büyüklüğü 0,22 µm olan filtrelerden geçirilerek partiküllerden temizlendi. Pipet uçları steril olarak kullanıldı. Kabin ortamında yapılan çalışmalarda, çalışmaya başlamadan önce ve sonra %70 alkol ile sterilizasyon sağlandı. Tüm işlemler sırasında steril eldiven kullanıldı. Kullanılan inkübatörlerin sterilizasyonu, cihaz sterilizasyon protokollerine uygun olarak düzenli bir şekilde sağlandı. Kullanılan sıvı ajanlar (besiyeri, Tripsin, XTT solüsyonları gibi) 37°C su banyosunda gerektiği kadar bekletilerek kullanıldı.

3.1.2. Besiyeri hazırlanması ve hücre yetiştirilmesi

Kullanılan hücre tiplerine uygun olarak besiyerleri hazırlandı ve 0,22 µm olan filtreden geçilerek sterilize edildi. Ardından 50 ml’lik steril şişelere porsiyonlandı. Kullanılmadan önce 37°C su banyosunda bekletildi.

İnsan osteoblast hücre dizisi hFOB 1.19 (Şekil 3.1) ve insan meme kanseri hücre dizisi MDA-MB-231 (Şekil 3.2) (ATCC-Washington D.C., USA) laboratuvarımızda belirlenmiş uygun kültür koşullarında 34,5⁰C, %5 CO₂’ li inkübatörde 25 ve 75 cm²’lik flasklar (Greiner, Cellstar, Germany) içerisinde, %10 Fetal Bovin Serum (FBS; Gibco, UK), %1 Penisilin/Streptomisin içeren Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium-F12, HEPES (DMEM/F12, HEPES) (Gibco, UK) besiyeri kullanılarak çoğaltılıp, 5-10 pasaj arasında deneylerde kullanılmaya başlandı.



Şekil 3.1. hFOB 1.19 Hücre Dizisi **Şekil 3.2.** MDA-MB-231 Hücre Dizisi

3.1.3. Standart eğrilerin oluşturulması

hFOB 1.19 ve MDA-MB-231 hücreleri yeterli sayıya ulaştıktan sonra Tripsin (Gibco, UK) kullanılarak tutundukları yüzeyden kaldırıldı. Neubauer lamında (Marienfeld, Germany) sayılarak her kuyucukta 48×10^3 , 24×10^3 , 12×10^3 , 6×10^3 , 3×10^3 , $1,5 \times 10^3$, $0,75 \times 10^3$ ve 0 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu platelere (Orange Scientific, Brainel'Alleud, Belgium) her biri 6 tekrarlı olacak şekilde dağıtıldı. Total hacim 100 ml olacak şekilde besiyerleri dağıtıldıktan sonra $34,5^\circ\text{C}$ ' de %5 CO_2 'de inkübasyona bırakıldı. 8 saat sonunda 50 μl aktivatör eklenmiş XTT (Biological Industries, Israel) testi uygulanarak 450 nm'de Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazında absorbansı belirlendi. Elde edilen sonuçlar kullanılarak standart eğriler çizilip absorbansa göre hücre sayısını belirten denklemler oluşturuldu.

3.1.4. DNaz I hazırlanması ve letal doz belirlenmesi

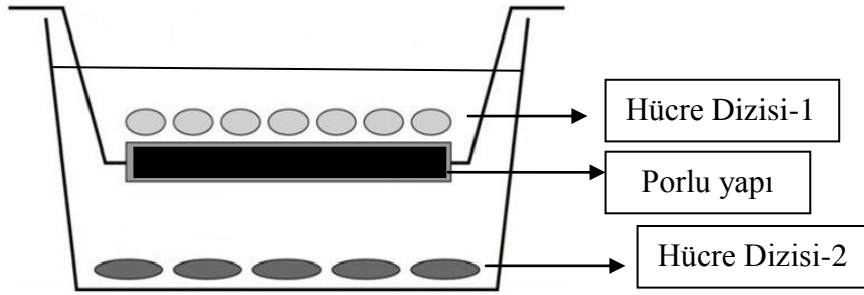
10 mg toz haldeki DNaz I (AppliChem; US) üzerine 1 ml DMEM/F12 besiyeri eklenerek 10mg/ml stok solüsyonu hazırlandı. 50 μl porsiyonlanarak -20°C 'de saklandı.

Tripsin ile kaldırılan hFOB 1.19 ve MDA-MB-231 hücreleri Neubauer lamında sayılmasının ardından 7×10^3 hücre 96 kuyucuklu plate içerisinde 6 tekrarlı ekim yapıldı. Hücre dizi besiyerlerine 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,0125 mg/ml ve 0 konsantrasyonlarında DNaz I uygulanarak 72 saat $34,5^\circ\text{C}$ ve %5 CO_2 'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 50 μl aktivatör XTT solüsyonu eklendi ve 2 saat inkübasyona devam edildi. Daha sonra 450 nm'de Multiskan™ GO Microplate

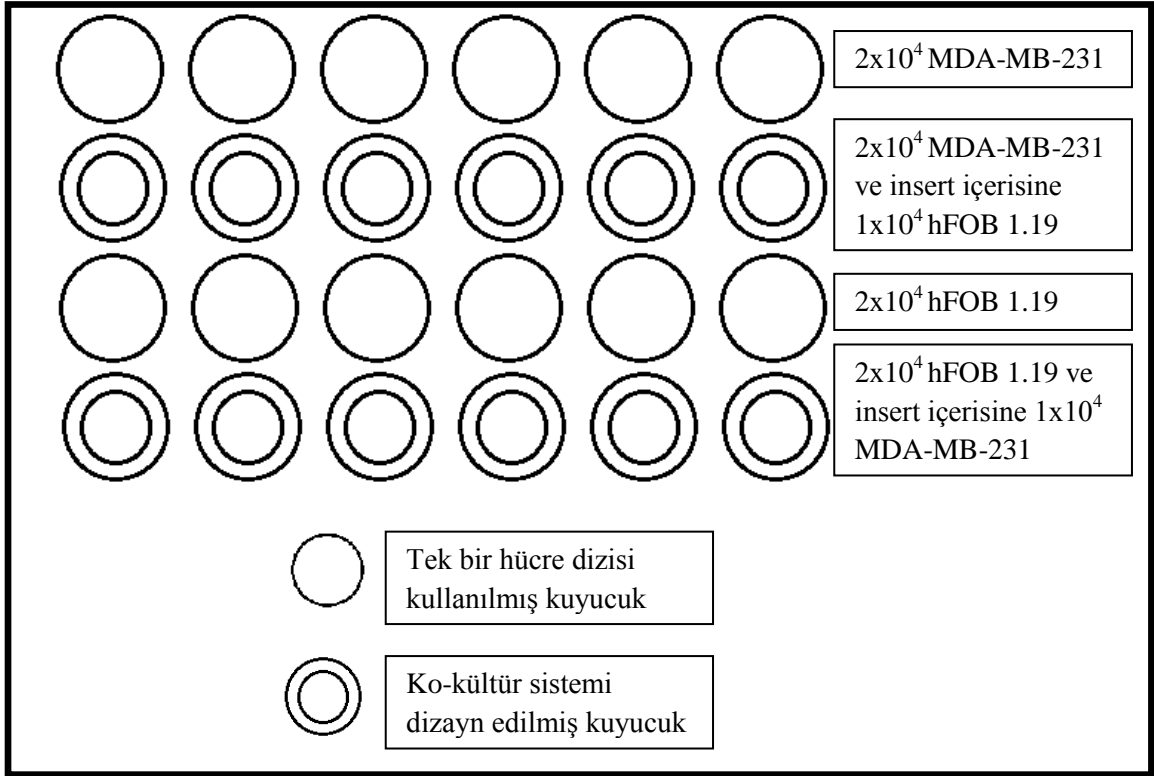
Spectrophotometer cihazında absorbans değerleri belirlenerek her iki hücre tipi için uygun olan konsantrasyonlar belirlendi.

3.1.5. Ko-kültür Sisteminin Oluşturulması

Ko-kültür, farklı hücre tiplerinin aynı ortamda bulunarak, besiyeri aracılığıyla birbirlerinin karakteristik ve moleküler yapılarını etkilemelerine olanak sağlayan hücre kültürü sistemidir. Bu sistemde hücre metabolitleri, salgılanan hücresel bileşenler oldukça önemli rol oynar (Şekil 3.3). Yapılan çalışmada 0,4 µm por büyüklüğüne sahip 6,5 mm çapında steril insertler (Corning, USA) kullanılmıştır. 24 kuyucuklu well plate içerisinde MDA-MB-231 ve hFOB 1.19 hücreleri 1×10^4 ve 2×10^4 olmak üzere ko-kültür sistemi tasarlanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Ko-kültür Sistemi. Seçilen hücre dizilerinden ortak besiyerine salınan metabolitler veya sinyal molekülleri porlu yapı aracılığıyla hücreleri etkilemektedir. Bu yapı hücrelerin geçişine izin vermez. İstenilen por büyüklüğüne sahip insertler mevcuttur.



Şekil 3.4. Deney Sırasında Tasarlanan 24 Kuyucuklu Well Plate Düzeni

25 ve 75 cm²'lik flasklar içerisinde 5-10 pasaj arasında yeterli sayıya ulaştırılan hücreler Tripsin enzimi ile kaldırılarak Neubauer lamında sayıldı. Deney tasarısına uygun olarak 1×10^4 ve 2×10^4 hücre kuyucuklar ve insertlere ekim yapılarak 72 saat 34,5°C ve %5 CO₂'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besiyerlerinden serbest DNA izolasyonu yapılmak üzere steril tüplere aktarıldı. Plate ve insertler 3 kez besiyeri ile yıkandıktan sonra, hücreler insertlerden ve kuyucuklardan Tripsin ile kaldırıldı. Hücrelerden DNA izolasyonu yapıldı. Proliferasyon, adezyon, canlılık deneyi için sayıma hazırlandı.

3.1.6. Proliferasyon, adezyon ve canlılık belirlemesi

Plate tabanından ve insertlerden Tripsin ile kaldırılan hücreler Neubauer lamında sayılarak her bir kuyucukta 7×10^3 hücre olacak şekilde dağıtıldı. Daha sonra total hacim 100 ml olacak şekilde besiyeri eklendi ve 48 saat 34,5°C ve %5 CO₂'de inkübe edildi. 48 saat inkübasyonun ardından proliferasyon, adezyon ve canlılık için ayrı ayrı aşağıdaki basamaklar izlendi.

3.1.6.1. Proliferasyon belirlemesi

Hücrelerde meydana gelen proliferasyon değişimini belirlemek amacıyla XTT solüsyonu kullanıldı. Bu deneyde, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondri enzimlerinin hücre ölümünden kısa bir süre sonra inaktive olma etkinliği üzerine kuruludur. Tetrazolium tuzuna dayalı bir kolorometrik yöntem olan XTT yöntemi, hücrelerin canlılığının kantitatif ölçülmesi ve değerlendirmesini kolaylaştıran bir yöntemdir. XTT ölçümü için 100 µl aktivasyon solüsyonu içeren 5 ml reaksiyon solüsyonu içerisine eklendi. Daha sonra kuyucuklar içerisine 50 µl eklendi. 2 saat 34,5°C ve %5 CO₂'de inkübasyonun ardından 450 nm'de Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazında absorbans değerleri belirlendi.

3.1.6.2. Adezyon belirlemesi

Adezyon deneyinde kuyucuklar 3 kez besiyeri ile yıkandı. 100 µl taze besiyeri eklenen hücrelere 50 µl XTT solüsyonu eklendi. 2 saat 34,5°C ve %5 CO₂'de inkübasyonun ardından 450 nm'de Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazında absorbans değerleri belirlendi.

3.1.6.3. Canlılık belirlemesi

Canlılık deneyinde kuyucuktan hücreler Tripsin ile kaldırılarak Neubauer lamında Tripan Blue (Gibco, UK) uygulandı. 10 dakika beklendikten sonra Thoma lamında sayılarak belirlendi.

3.2. DNA İzolasyonu

3.2.1. Hücrelerden DNA izolasyonu

Tripsin ile kaldırılan hücreler Thermo Scientific Phusion Human Specimen Direct PCR kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak izole edildi. Hücrelerin üzerine 20 µl Dilution Buffer ve 0,5 µl DNARelease Additive eklendi. Vorteks aşamasının ardından 2-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 2 dakika 98°C'de inkübasyona devam

edildi. Supernatanttan 0,5 µl alınarak 20 µl'lik PCR karışımı oluşturuldu. Kit protokolüne uygun olarak, 10 µl 2X Phusion Human Specimen PCR Buffer, 0,4 µl Universal Control Primer, 0,4 µl Phusion Human Specimen DNA Polymerase, 0,5 µl örnek ve yeteri miktarda distile su eklenerek total hacim 20 µl'ye tamamlandı. *Universal* primer koşullarına uygun olarak PCR gerçekleştirildi: 98°C 5 dakika 1 siklus, 35 siklus 98°C 1 saniye ve 72°C 15 saniye, 72°C 1 dakika ve 4°C ile PCR işlemi sonlandırıldı. Elde edilen DNA konsantrasyonları Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazında belirlendi. Ardından örnekler -20°C'de saklandı. Tüm PCR aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi.

3.2.2. Besiyerinden DNA izolasyonu

Toplanan besiyerlerinden DNA izolasyonu için Thermo Scientific Phusion Human Specimen Direct PCR kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Hücreler maksimum g'de (>10.000) santrifüj edildi. Her işlem sonrasında üst sıvı alınarak tekrar santrifüj edildi, bu işlem üç kez tekrar edildi. Son santrifüj işleminden sonra üst sıvıdan 4µl alınarak PCR işlemine kullanıldı. Kit protokolüne uygun olarak 10 µl 2X Phusion Human Specimen PCR Buffer, 0,4 µl Universal Control Primer, 0,4 µl Phusion Human Specimen DNA Polymerase, 4 µl örnek ve yeterli hacimde distile su eklenerek 20 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. 35 siklus 98°C 1 saniye ve 72°C 15 saniye, 72°C 1 dakika ve 4°C ile PCR işlemi sonlandırıldı. Elde edilen DNA konsantrasyonları Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazında belirlendi. Ardından örnekler -20°C'de saklandı. Tüm PCR aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi.

3.2.3. Bi-sülfit dönüşümü

Metilasyon analizi yapılması için örneklerde, öncelikle bisülfit dönüşümü yapıldı. Ökaryot ve prokaryotlarda meydana gelen DNA metilasyonu, DNA'nın endonükleazlar tarafından kesimine engel olan bir mekanizmadır. Aynı zamanda, DNA metilasyonu aracılığıyla yüksek ökaryotik organizmalar gen ekspresyon profillerini organize ederler. Onkogenez gelişiminde genellikle DNA metilasyon aberasyonları meydana gelir. İlgili genin promotör bölgesinde bulunan CpG adalarında meydana gelen metilasyonda, sitozin

bazına metil eklenmesi gerçekleşir ve bunun sonucunda gen sessizleşmesi ortaya çıkar (Frommer v.d., 1992).

DNA metilasyonunun belirlenmesi ve niceliksel olarak analizi için yüksek performanslı kapiler elektroforez (Fraga v.d., 2000) gibi birçok yöntem geliştirilmiştir. 1992 yılından bu yana en sık kullanılan yöntem ise bisülfüt dönüşüm yöntemidir (Frommer v.d., 1992). Bu teknikte, metile olan DNA'ya bisülfüt uygulandığında, metillenmemiş sitozinler tek bir zincirde urasile dönüşür. Uygulama sırasında metile sitozinler değişmeden kalır. Daha PCR amplifikasyonu uygulanır ve metillenmiş/metillenmemiş DNA profilleri belirlenir.

Bu uygulama için EZ DNA Methylation-Gold™ Kit kullanıldı. Kit protokolüne uygun olarak 900 µl su, 300 µl M-Dilution Buffer ve 50 µl Dissolving Buffer CT Conversion Buffer üzerine eklenerek hazırlandı. Vorteksleme işleminin ardından 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Aynı zamanda, kullanmadan önce, 6 ml M-Wash Buffer üzerine 24 ml %100 etanol eklendi. Daha sonra 130 µl CT Conversion Reagent üzerine 200 ng DNA örneği eklendi. DNA hacmini 20 µl'ye tamamlamak için distile su kullanıldı. Pipetleme işleminin ardından Çizelge 3.1'de gösterilen protokol uygulandı.

Çizelge 3.1. Bi-sülfüt Dönüşümü Protokolü

1. Aşama	98°C , 10 dakika
2. Aşama	64°C, 2 saat 30 dakika
3. Aşama	+4°C'de 20 saatten fazla bekletildi.

Daha sonra Collection Tube içerisine Zymo-Spin™ IC Column yerleştirildi ve üzerine 600 µl of M-Binding Buffer eklendikten sonra, 20 saat boyunca +4°C'de bekletilen PCR ürünleri eklenerek pipetlendi. Maksimum hızda (>10,000 x g) 30 saniye santrifüj uygulandıktan sonra alt sıvı uzaklaştırıldı. Kolonlara 100 µl M-Wash Buffer eklendi ve maksimum hızda (>10,000 x g) 30 saniye santrifüj işlemi tekrarlandı. 200 µl M-Desulphonation Buffer eklendikten sonra 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından maksimum hızda (>10,000 x g) 30 saniye santrifüj uygulandı. 200 µl M-Wash Buffer eklendi ve tekrar 30 saniye santrifüj uygulandı. Bu basamak tekrar edildi. Daha sonra, kolonlar 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi ve üzerine 10 µl M-Elution Buffer eklendi. Maksimum hızda (>10,000 x g) 30 saniye santrifüj uygulandıktan sonra DNA elde edildi.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (*Polymerase Chain Reaction-PCR*) ve Metilasyon Spesifik PCR (*Methylation Specific PCR-MSP*)

PCR, DNA içerisinde yer alan bilinen iki segmentin primer diziler kullanılarak enzimatik olarak çoğaltılması işlemidir.

MSP, CpG adalarında yer alan DNA metilasyon paternlerini değerlendirmek amacıyla kullanılan PCR yöntemidir.

3.3.1. *p53* PCR

p53 ekson 5-8 amplifikasyonları için uygun primer dizileri seçildi (Silva v.d., 2002) (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. *p53* primer dizileri

p53	Forward Primer Dizisi	Reverse Primer Dizisi
E-5	5'- TCCTTCCTCTTCCTACAG-3'	5'-ACCCTGGGCAACCAGCCCTGT-3'
E-6	5'-ACAGGGCTGGTTGCCAGGGT-3'	5'-AGTTGCAAACCAGACCTCAGGCG-3'
E-7	5'-TCCTAGGTTGGCTCTGACTGT-3'	5'-AGTGGCCCTGACCTGGAGTCT-3'
E-8	5'-GGGACAGGTAGGACCTGATTCCTT-3'	5'-ATCTGAAGGCATAACTGCACCCTTGG-3'

E-5: Ekson 5; E-6: Ekson6; E-7: Ekson 7; E-8: Ekson 8

12,5 µl One Taq ® Quick-Load 2x Master Mix (BioLabs, UK), 2 µl forward primer, 2 µl reverse primer, 2 µl DNA örneği ve yeterli miktarda distile su kullanılarak 25 µl PCR karışımı hazırlandı. Her primer bölgesi için farklı koşullarda PCR gerçekleştirildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. p53 PCR Koşulları

Gen Bölgesi	PCR Koşulu
<i>p53</i>	95°C 5 dakika
Ekson 5 →	94°C 1 dakika
Ekson 6 →	65°C 1 dakika
Ekson 7 →	67°C 1 dakika
Ekson 8 →	62°C 1 dakika
	68°C 1 dakika
	70°C 1 dakika
	40 siklus
	Örnekler üzerine %95 formamid eklendi ve 80°C' de 10 dakika bekletildi. Ardından buzda bekletildi.

PCR işleminin ardından %15'lik homojen poliakrilamid jel hazırlanarak +4°C' de elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

3.3.2. APC1A ve APC1B MSP

Metilasyon analizi için uygun olan metile ve metile olmayan primer dizileri seçildi (Esteller v.d., 2000)(Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. APC Gen Bölgesi Primer Dizileri

APC	Forward Primer Dizisi	Reverse Primer Dizisi
<i>IAM</i>	5'-TATTGCGGAGTGC GGGTC-3'	5'-TCGACGAACTCCCGACGA-3'
<i>IAU</i>	5'-GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT-3'	5'-CCAATCAACAACTCCCAACAA-3'
<i>IBM</i>	5'-TAGAATAGCGAACGAGTGTTTC-3'	5'-TCCGACGACCACACCCCG-3'
<i>IBU</i>	5'-GATAGAATAGTGAATGAGTGTTT-3'	5'-CTTCCAACAACCACACCCCA-3'

APC1A Metillenmiş Gen bölgesi; APC1AUM: APC1A Metillenmemiş Gen bölgesi; IBM: APC1B Metillenmiş Gen bölgesi; APC1BUM: APC1B Metillenmemiş Gen bölgesi

Uygun primerler kullanılarak 12,5 µl One Taq® Quick-Load 2x Master Mix, 2 µl forward primer, 2 µl reverse primer, 2 µl bi-sülfid dönüşümü yapılmış DNA örneği ve

yeterli miktarda su kullanılarak 25 µl MSP karışımı hazırlandı. *APC1A* ve *APC1B* gen bölgelerine uygun olarak MSP gerçekleştirildi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. APC Gen Bölgeleri MSP Koşulları

Gen Bölgesi	MSP Koşulu
<i>APC1A</i> <i>APC1B</i>	95°C 15 dakika 95°C 15 saniye 60°C 45 saniye 72°C 30 saniye 72°C 10 dakika 4°C ∞

Elde edilen PCR ürünleri %2 agaroz jel elektroforez yöntemi ile analiz edildi.

3.3.2. *RASSF1A* MSP

MSP analizi için metile ve metile olmayan gel bölgelerine uygun primer dizileri seçildi (Li v.d., 2008) (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. *RASSF1A* Primer Dizileri

<i>RASSF1</i>	Forward Primer Dizisi	Reverse Primer Dizisi
<i>AM</i>	5'-CGAGAGCGCGTTTAGTTTCGTT-3'	5'-CGATTAAACCCGTACTIONTCGCTAA-3'
<i>AU</i>	5'-GGGGGTTTTGTGAGAGTGTGTTT-3'	5'-CCCAATTAAACCCATACTIONTCACTAA-3'

AM: *RASSF1A* Metillenmiş Gen bölgesi; AU: *RASSF1A* Metillenmemiş Gen bölgesi

Uygun primer dizileri kullanılarak 12,5 µl One Taq® Quick-Load 2x Master Mix, 2 µl forward primer, 2 µl reverse primer, 2 µl bi-sülfid dönüşümü yapılmış DNA örneği ve yeterli miktarda su kullanılarak 25 µl MSP karışımı hazırlandı. Daha sonra primerlere uygun olarak MSP işlemi gerçekleştirildi (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. RASSF1A Gen Bölgeleri MSP Koşulları

Gen Bölgesi	MSP Koşulu
<i>RASSF1A</i>	95°C 5 dakika 95°C 1 dakika 56°C 1 dakika 72°C 1 dakika 72°C 1 dakika 4°C ∞

3.4. Jel Elektroforez Sistemlerinin Hazırlanması

3.4.1. Poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş boyama yöntemi

Çizelge 3.8’de belirtilen miktarlarda kimyasal karıştırılarak jel hazırlandı.

Çizelge 3.8. %15’lik Poliakrilamid Jel Hazırlanması

Kimyasal	Miktar
29:1 Acrilamid/Bisacrilamid (Sigma-Aldrich; Germany)	10 ml
Distile su	12,35 ml
10X TBE (Tris-Borat Tamponu)	2,5 ml
%25’lik Amonyum persülfat	175 µl
TEMED	8,5 µl

Hazırlanan poliakrilamid jel çözeltisi, dikey elektroforez düzeneğine dökülerek 12 dişli tarak yerleştirildi. Jel donduktan sonra içerisine 1X TBE tamponu bulunan dikey elektroforez tankına yerleştirildi. 10 µl PCR ürünü ve 2 µl loading buffer karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektrot sistemi yerleştirilerek 120V’da 4 saat boyunca +4°C’de yürütme işlemi gerçekleştirildi. Elektroforez işleminin ardından gümüş boyama yöntemi ile bantlar görünür hale getirildi.

3.4.1.1. Gümüş boyama yöntemi

Solüsyonlar Çizelge 3.9’da belirtilen miktarlarda hazırlandı.

Çizelge 3.9. Gümüş Boyama Solusyonlarının Hazırlanması

Kimyasal	Miktar
Etanol	% 10
Asetik asit	% 5
AgNO ₃	% 0,1
NaOH	% 1,5
Stok formaldehit	150 µl
Na ₂ CO ₃	% 0.75

Poliakrilamid jel elektroforezi tamamlandıktan sonra jel aşağıdaki solüsyon serilerinden geçirilerek boyandı:

- | | |
|---|--------------------------|
| 1. % 10 etanol+% 5 asetik asit (v/v) | 6 dakika |
| 2. % 0,1 AgNO ₃ | 15 dakika |
| 3. % 1,5 NaOH | 30 dakika |
| 4. % 1,5 NaOH+formaldehit | Bantlar oluşuncaya kadar |
| 5. % 0,75 Na ₂ CO ₃ | Yıkama işlemi yapıldı |

Yıkama işleminin ardından jel görüntüleri Canon EOS 450D fotoğraf makinası ile fotoğraflandı.

3.4.2. %2’lik agaroz jel elektroforezi

2 g agaroz hassas su terazisi kullanılarak tartıldı. Üzerine 100 ml 1X TBE eklenerek mikrodalga fırında ısıtılarak homojen hale gelmesi sağlandı. Üzerine 5µl RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology; US) eklenerek 20 taraklı yatay elektroforez sisteminde karanlıkta donması sağlandı. 10 µl örnekler kuyucuklara yüklenerek 120V da 30 dakika boyunca yürütme işlemi gerçekleştirildi. SynGene UV görüntüleme cihazında SynGene Tool veritabanında jel görüntülendi.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Sürekli değişkenlerin normal dağılma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak yapıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplar arasındaki karşılaştırmaları tek yönlü varyans analizi (OneWay ANOVA) ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırmalar, Tukey HSD Testi ile gerçekleştirildi. Normal dağılıma uygunluk göstermeyen değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Dunn test kullanılarak değerlendirildi. Çizelgelerde, $p < 0,05$ önemlilik düzeyi * ile, $p < 0,01$ önemlilik düzeyi ** ile ve $p < 0,001$ önemlilik düzeyi ise *** ile belirtildi. Tüm istatistiksel analizlerde IBM SPSS Statistics 21.0 paket programı kullanıldı.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Gruplandırma Sistemi

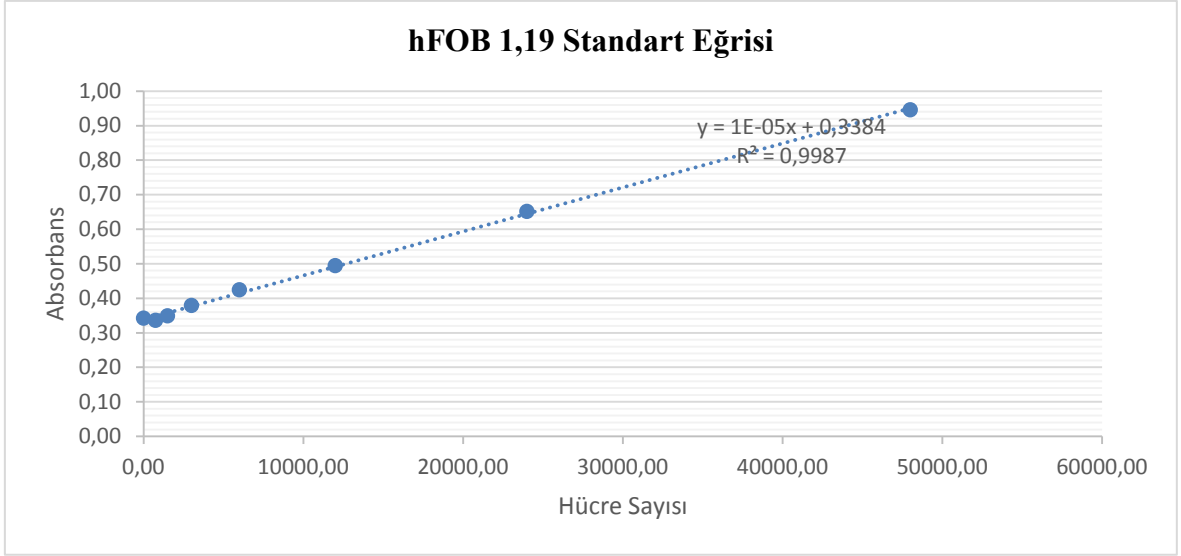
Deney grupları ve uygulanan işlemler Çizelge 4.1.'de gösterildi.

Çizelge 4.1. Analizler Sırasında Kullanılan Gruplandırma Sistemi

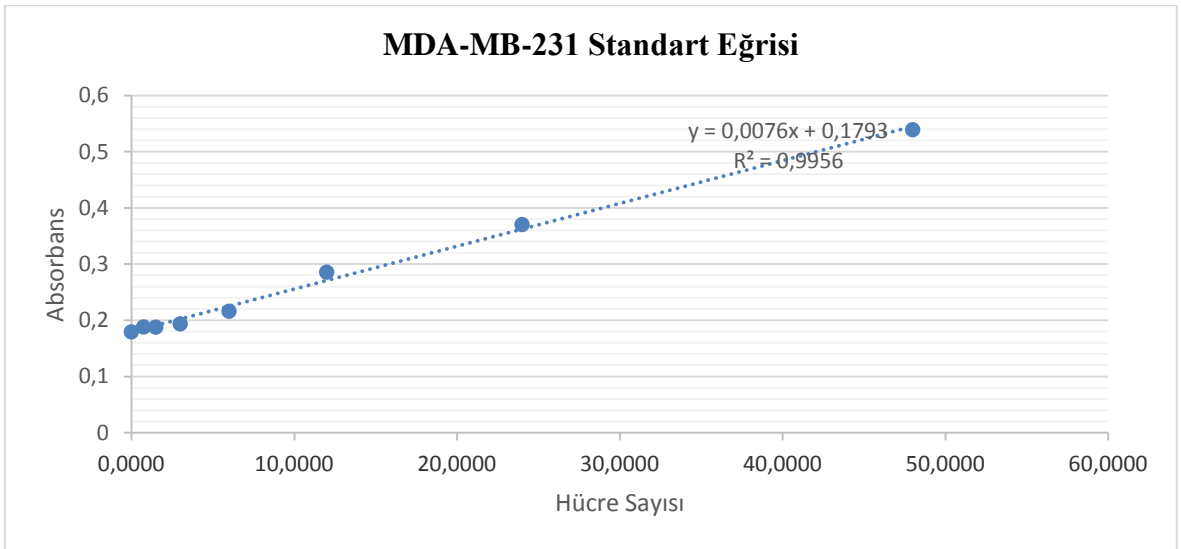
Normal Besiyeri		DNaz I İçeren Besiyeri	
1. Grup	hFOB 1.19 Hücreleri	8. Grup	hFOB 1.19 Hücreleri
2. Grup	hFOB 1.19 Besiyeri	9. Grup	hFOB 1.19 Besiyeri
3. Grup	MDA-MB-231 Hücreleri	10. Grup	MDA-MB-231 Hücreleri
4. Grup	MDA-MB-231 Besiyeri	11. Grup	MDA-MB-231 Besiyeri
5. Grup	hFOB 1.19 + MDA-MB-231 Hücreleri	12. Grup	hFOB 1.19 + MDA-MB-231 Hücreleri
6. Grup	hFOB 1.19 + MDA-MB-231 Hücreleri	13. Grup	hFOB 1.19 + MDA-MB-231 Hücreleri
7. Grup	hFOB 1.19 + MDA-MB-231 Hücreleri Besiyeri	14. Grup	hFOB 1.19 + MDA-MB-231 Hücreleri Besiyeri

4.1.2. Hücre dizileri standart eğrilerinin belirlenmesi

Araştırmanın ilk aşaması olarak, hücrelerde standart eğriler oluşturuldu. Bunun için gerekli olan ölçümler 3 kez tekrar edildi. Her ölçüm için 6 kuyucuk kullanıldı (n=3x6). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hFOB 1.19 (Şekil 4.1) ve MDA-MB-231 (Şekil 4.2) hücrelerinin, %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM/F12, HEPES besiyerindeki standart eğrileri belirlendi.



Şekil 4.1. hFOB 1.19 Hücre Dizisi Standart Eğrisi



Şekil 4.2. MDA-MB-231 Hücre Dizisi Standart Eğrisi

Her bir kuyucukta 48×10^3 , 24×10^3 , 12×10^3 , 6×10^3 , 3×10^3 , $1,5 \times 10^3$, $0,75 \times 10^3$ ve 0 hücre bulunan örneklerde kolorimetrik ölçüm yapılarak absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen absorbans değerleri her hücre dizisinin kendi standart eğri grafiğinden oluşturulan formülde yerine konularak proliferasyon ve adezyon deneylerinde örneklerin absorbansa karşılık gelen hücre sayısı hesaplandı. Hesaplamalarda;

- hFOB 1.19 hücreleri için;

$$\text{Hücre sayısı} = (\text{Belirlenen absorbans} - 0,3384) / 1 \times 10^{-5}$$

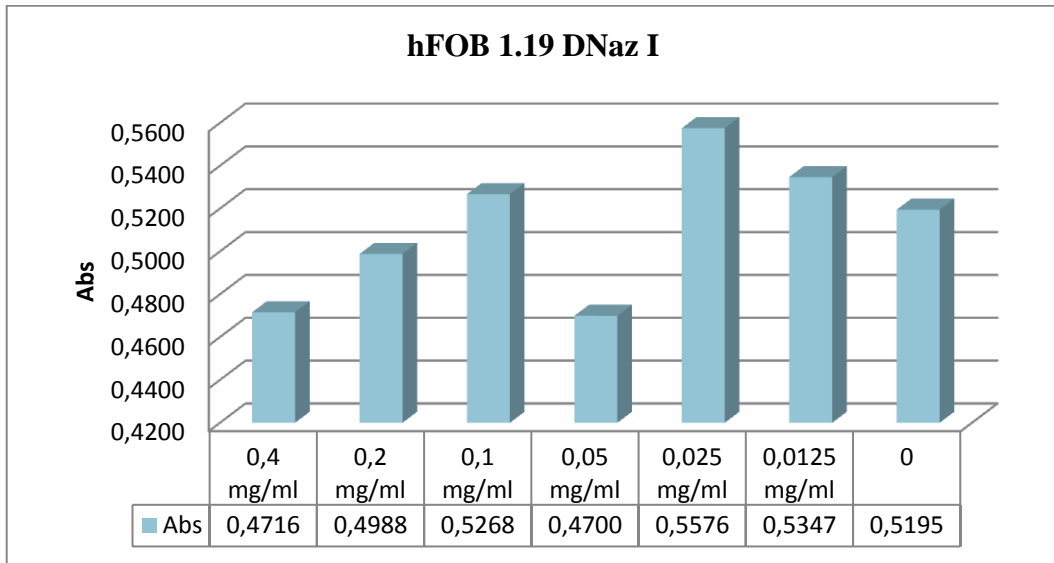
- MDA-MB-231 hücreleri için;

Hücre sayısı= (Belirlenen absorbans-0,1793)/0,0076

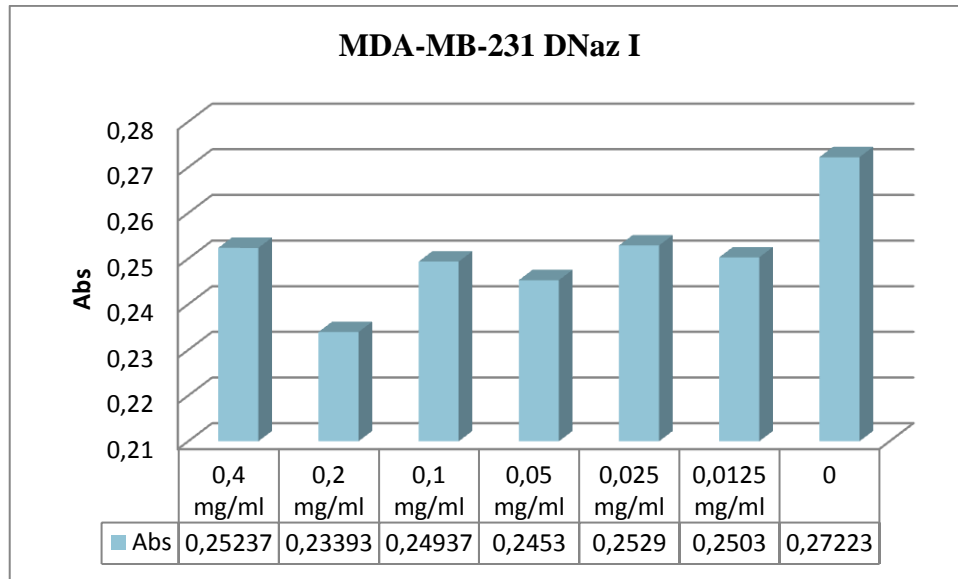
Formülleri kullanılarak hücre sayıları belirlendi.

4.1.3. DNaz I Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Hücelere uygulanacak olan DNaz I konsantrasyonunu belirlemek için hücelere çeşitli DNaz I konsantrasyonları uygulandı. hFOB 1.19 (Şekil 4.3) ve MDA-MB-231 (Şekil 4.4) hücre dizilerine 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,0125 mg/ml ve 0 konsantrasyonlarında 72 saat boyunca DNaz I uygulanarak güvenli doz aralıkları analiz edildi. Her iki hücre dizisi için hücre proliferasyonunu benzer şekilde etkileyen ortak konsantrasyonlar belirlenerek hücelere uygulandı.



Şekil 4.3 72 Saat Sonunda DNaz I Uygulanan hFOB 1.19 Hücrelerinin Proliferasyonu



Şekil 4.4. 72 Saat Sonunda DNaz I Uygulanan MDA-MB-231 Hücrelerinin Proliferasyonu

Osteoblast ve meme kanseri hücreleri ile ko-kültür sistemi kullanılacağından dolayı, her iki hücre dizisi içinde hücre proliferasyonlarını benzer şekilde etkileyen 0,1 mg/ml'lik konsantrasyon seçilerek hücrelere 72 saat uygulandı.

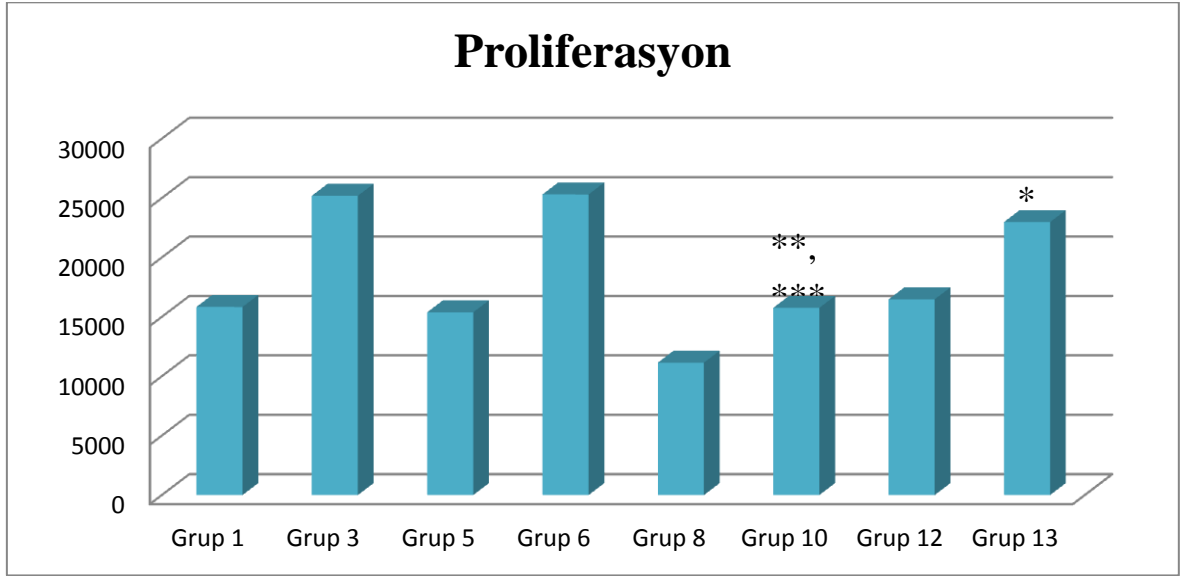
4.1.4. Proliferasyon, adezyon ve canlılık verilerinin değerlendirilmesi

4.1.4.1. Hücrelerde proliferasyon verilerinin değerlendirilmesi

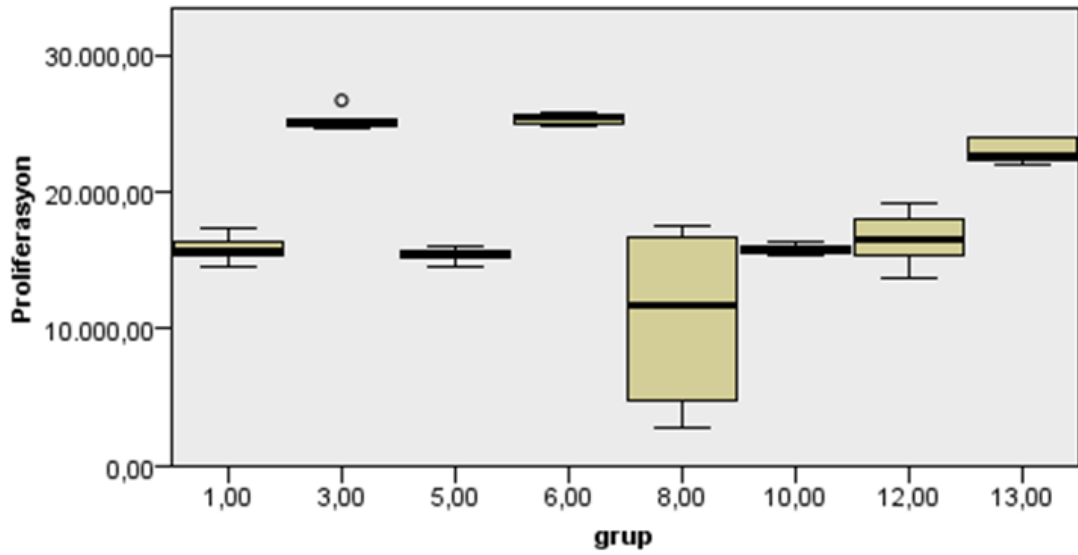
Hücrelerin proliferasyon analizlerinin istatistiksel değerlendirmesinde normal dağılım gerçekleşmediği belirlendi ve Kruskal-Wallis testi uygulanarak grup içerisinde fark olduğu tespit edildi. Ko-kültür sisteminde 72 saat inkübe edilen hFOB 1.19 (Grup 5) ve MDA-MB-231 (Grup 6) hücre dizilerinin proliferasyonlarında ayrı ayrı kültüre edildikleri duruma göre (Grup 1, Grup 3) herhangi bir değişim meydana gelmediği belirlenmiştir. DNaz I içeren besiyerinde, hFOB 1.19 (Grup 8) ve MDA-MB-231 (Grup 10) hücrelerinin proliferasyonları ko-kültür sisteminde yer alan hFOB 1.19 (Grup 12) ve MDA-MB-231 (Grup 13) hücrelerine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$).

DNaz I içeren besiyerinde ko-kültür sisteminde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin (Grup 13), tek başına kültüre edilen hücrelere göre (Grup 10) proliferasyon artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). DNaz I içeren besiyerindeki MDA-MB-231 hücrelerinin (Grup 10), normal besiyerindekilere (Grup 3)

göre azalması istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$). Aynı zamanda, DNaz I içeren ortamdaki MDA-MB-231 hücrelerinin (Grup 10), ko-kültür sisteminde normal besiyerinde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerine göre (Grup 6) proliferasyonlarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.5).



A



B

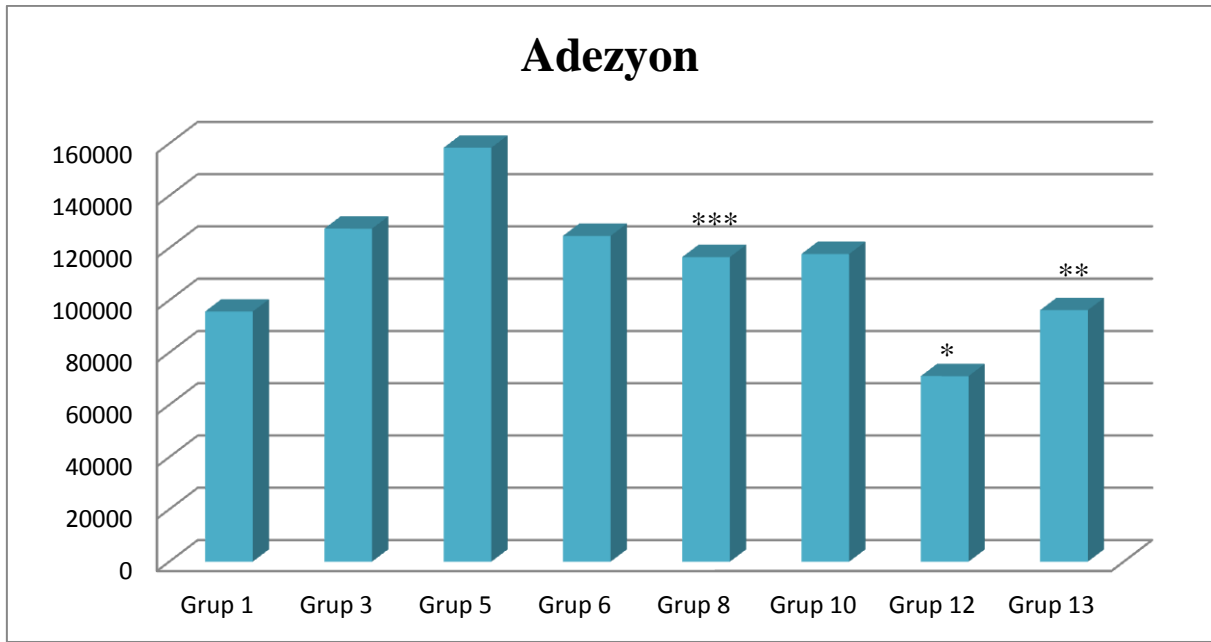
Şekil 4.5. Proliferasyon Verileri (A) ve İstatistiksel Değerlendirilmesi (B)

4.1.4.2. Hücrelerde adezyon verilerinin değerlendirilmesi

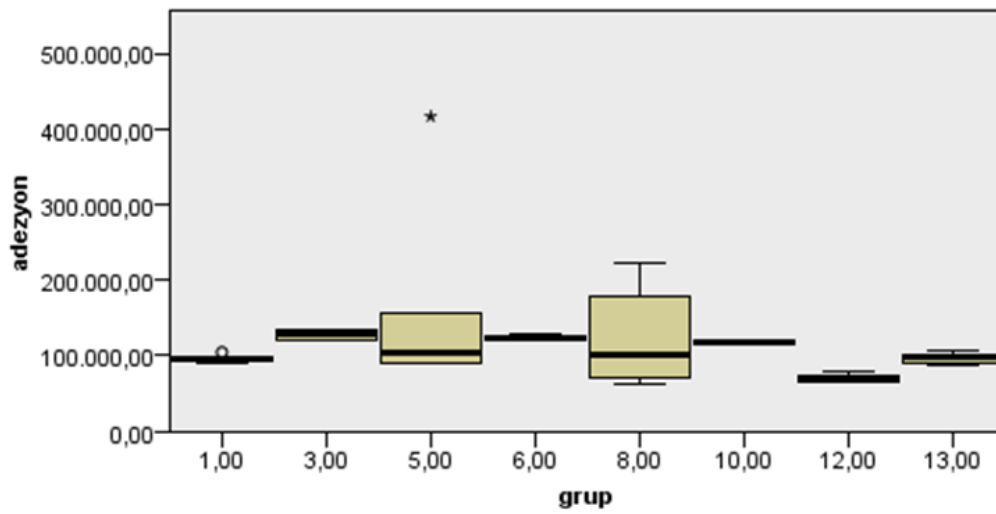
Hücrelerin adezyon analizlerinin istatistiksel değerlendirmesinde normal dağılım gerçekleşmediği belirlendi ve Kruskal-Wallis testi uygulanarak grup içerisinde fark olduğu gözlemlendi. Normal besiyerinde ko-kültür sistemi içerisinde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinin (Grup 5) adezyonlarında artış meydana geldiği belirlendi ($p>0,05$). MDA-MB-231 hücrelerinin ise adeziv özelliklerinde önemli bir değişim olmadığı analiz edildi ($p>0,05$).

DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen ko-kültür sisteminde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinin (Grup 12), DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 hücrelerine göre (Grup 8) adezyonlarında meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu analiz edilmiştir ($p<0,05$). Aynı zamanda DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 hücrelerinin (Grup 8), normal besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 hücrelerine (Grup 1) göre adezyonlarının arttığı belirlenmiştir ($p<0,001$).

DNaz I içeren besiyerinde ko-kültür sisteminde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin (Grup 13) adezyonlarında, normal besiyerinde inkübe edilen ko-kültür sisteminde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerine (Grup 6) adeziv özelliklerinin azaldığı analiz edilmiştir ($p<0,01$). Aynı zamanda, DNaz I içeren besiyerinde ko-kültür sisteminde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin (Grup 13), normal besiyerinde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerine (Grup 3) göre adeziv özelliklerinin değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$). DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin (Grup 10), ko-kültür sisteminde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerine (Grup 13) göre daha adeziv özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.6)



A



B

Şekil 4.6. Adezyon Verileri (A) ve İstatistiksel Değerlendirilmesi (B)

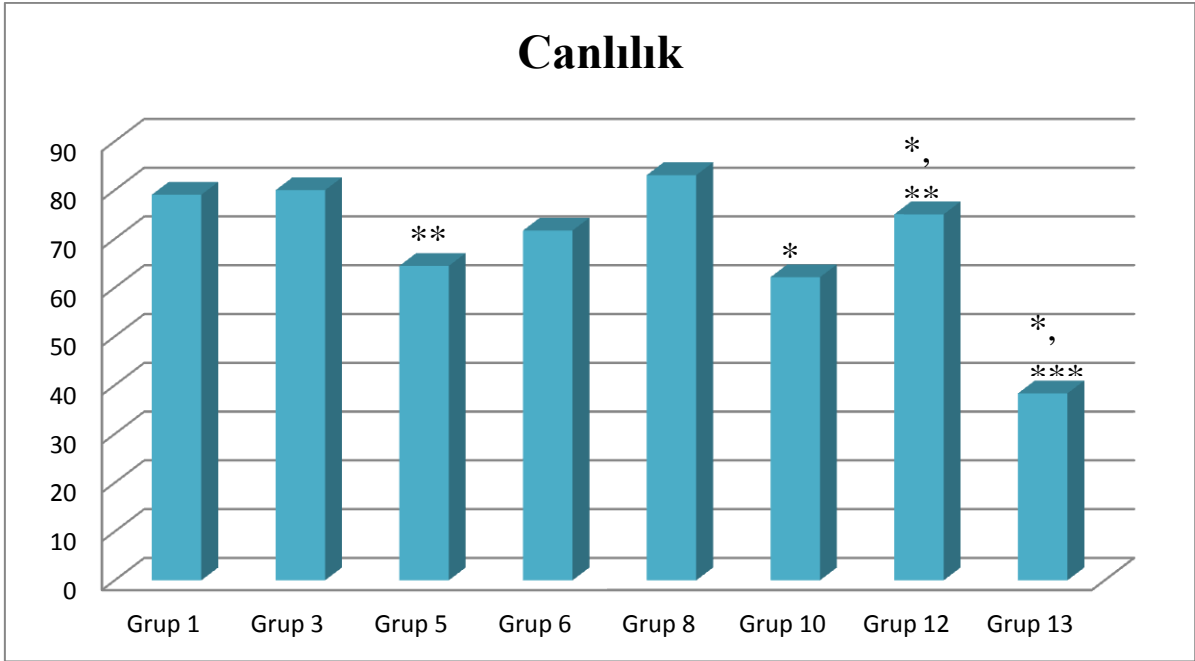
4.1.4.3. Hücrelerin canlılık verilerinin değerlendirilmesi

Hücrelerin canlılık analizlerinin istatistiksel değerlendirmesinde normal dağılım gerçekleşmediği belirlendi ve Kruskal-Wallis testi uygulandı. Normal besiyerinde hFOB 1.19 hücrelerinin (Grup 1), ko-kültür sisteminde bulunan hFOB 1.19 hücrelerinden (Grup 5) daha yüksek canlılığa sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). Normal besiyerinde ko-kültür sisteminde bulunan MDA-MB-231 hücrelerinin (Grup 6), sistem dışında inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerine göre (Grup 3) daha düşük canlılığa sahip olduğu; fakat bunun istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$).

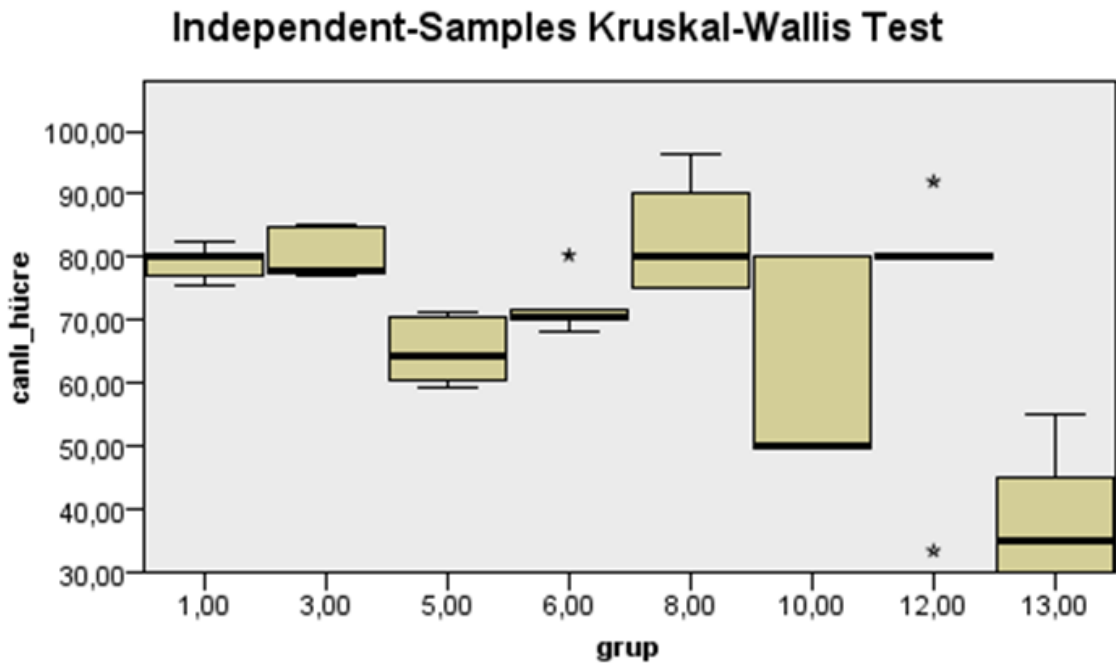
DNaz I içeren besiyerinde ko-kültür sisteminde inkübe edilen hFOB 1.19 (Grup 12) ve MDA-MB-231 (Grup 13) hücrelerinin, DNaz I besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 (Grup 8) ve MDA-MB-231 (Grup 10) hücrelerine göre canlılığının azaldığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

DNaz I içeren ko-kültür sistemde yer alan MDA-MB-231 hücrelerinin (Grup 13) canlılığının, normal besiyeri ko-kültür sistemde yer alan MDA-MB-231 hücrelerinden (Grup 6) daha düşük olduğu ve elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Benzer şekilde, DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin (Grup 10) canlılığının, normal besiyerinde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinden (Grup 3) daha düşük canlılığa sahip olduğu ve bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). DNaz I içeren ko-kültür sistemde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinin (Grup 12), normal besiyeri ko-kültür sistemde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinden (Grup 5) daha yüksek canlılığa sahip olduğu analiz edildi ($p<0,05$).

DNaz I içeren besiyerinde ko-kültür sistemde yer alan MDA-MB-231 hücreleri (Grup 13) ile normal besiyerinde inkübe edilen MDA-MB-231 hücreleri (Grup 3) arasında meydana gelen canlılık farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Benzer şekilde, DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 hücrelerinin (Grup 12), normal besiyerinde ko-kültür sistemi içerisinde yer alan hFOB 1.19 hücrelerine (Grup 1) göre canlılığında meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$) (Şekil 4.7).



A



B

Şekil 4.7. Canlılık Verileri (A) ve İstatistiksel Değerlendirilmesi (B)

4.1.5. MSP Agaroz Jel Elektroforez Analizi

4.1.5.1. APCIA agaroz jel elektroforez analizi

APCIA agaroz jel elektroforez analizinde 50 bp'lik ladder (BioLabs; New England) kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, metilasyon bölgelerine uygun primerler kullanılarak DNaz I içeren örneklerde transfeksiyonun gerçekleştiği belirlenmiştir. 8 numaralı kuyucukta DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 örnekleri bulunmaktadır ve istenilen bantlar görülememiştir. Aynı şekilde besiyerinde (10 numaralı kuyucuk) *APCIA* bantları analiz edilememiştir. Fakat 13 numaralı kuyucukta DNaz I içeren besiyerinde ko-kültür sisteminde yer alan MDA-MB-231 hücrelerinde zayıf da olsa beklenen bant görülmektedir. Transfeksiyonun gerçekleştiğini ise, 12 numaralı kuyucukta yer alan DNaz I içeren besiyerinde ko-kültür sisteminde bulunan hFOB 1.19 hücrelerinde görülen *APCIA* metilasyon bantlarından belirlenmektedir (Şekil 4.8.A)

APCIA metillenmemiş bölgelerde yapılan analizlerde, normal besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 (2 numaralı kuyucuk) ve ko-kültür sisteminde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinde (5 numaralı kuyucuk) zayıf bantlar görülmektedir. 6 numaralı kuyucukta yer alan normal besiyerinde ko-kültür sistemde yer alan MDA-MB-231 hücrelerinde ise *APCIA* bantları görülmektedir. DNaz uygulanan besiyerinde hFOB 1.19 hücrelerinde (8 numaralı kuyucuk) herhangi bir bant oluşumu görülmemektedir. Fakat MDA-MB-231 hücrelerinde bantlaşma görülmektedir. DNaz içeren besiyerinde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin besiyerinde ise (11 numaralı kuyucuk) bantlar fragmente halde görülmektedir. DNaz içeren ko-kültür sistemde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinde ince bir bant oluşumu görülmektedir. Bu bant oluşumunun 8 numaralı kuyucukta olmaması transfeksiyonun gerçekleşme ihtimalini yükseltmektedir. DNaz içeren ko-kültür sisteminde yer alan MDA-MB-231 hücrelerinde oluşan bantların fragmente halde olduğu görülmektedir (Şekil 4.8.B).

4.1.5.2. APCIB agaroz jel elektroforezi analizi

APCIB agaroz jel elektroforez analizinde 50 bp'lik ladder kullanılmıştır. Normal besiyerinde inkübe edilen MDA-MB-231 (3 numaralı kuyucuk) hücrelerinde zayıf bant oluşumu belirlendi. 5 numaralı kuyucukta yer alan ko-kültür sistemdeki hFOB 1.19

hücrelerinde zayıf bir bant görülürken MDA-MB-231 hücrelerinde ise daha güçlü bir bant görülmektedir (Şekil 4.8.C)

DNaz I içeren besiyerinde yapılan analizlerde, hFOB 1.19 hücrelerinde (8 numaralı kuyucuk) herhangi bir bant yapısının olmadığı; MDA-MB-231 hücrelerinde (10 numaralı kuyucuk) ise zayıf bir bant oluşumu belirlendi. Ko-kültür sisteminde yer alan MDA-MB-231 hücrelerinde (13 numaralı kuyucuk) görülen bant yapısının, ortak sistem besiyeri aracılığıyla (14 numaralı kuyucuk) hFOB 1.19 hücrelerinde (12 numaralı kuyucuk) görülmesine olanak sağladığı düşünülmektedir (Şekil 4.8.D).

APCIB metillenmemiş bölgelerde yapılan PCR analizlerinde, normal besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 (1 numaralı kuyucuk), MDA-MB-231 (3 numaralı kuyucuk) hücrelerinde ve ko-kültür sistemde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinde (5 numaralı kuyucuk) herhangi bir bant oluşumunun gerçekleşmediği belirlendi. 6 numaralı kuyucukta yer alan ko-kültür sistem MDA-MB-231 hücresinde ise 2 fragment halinde bantlar görülmektedir.

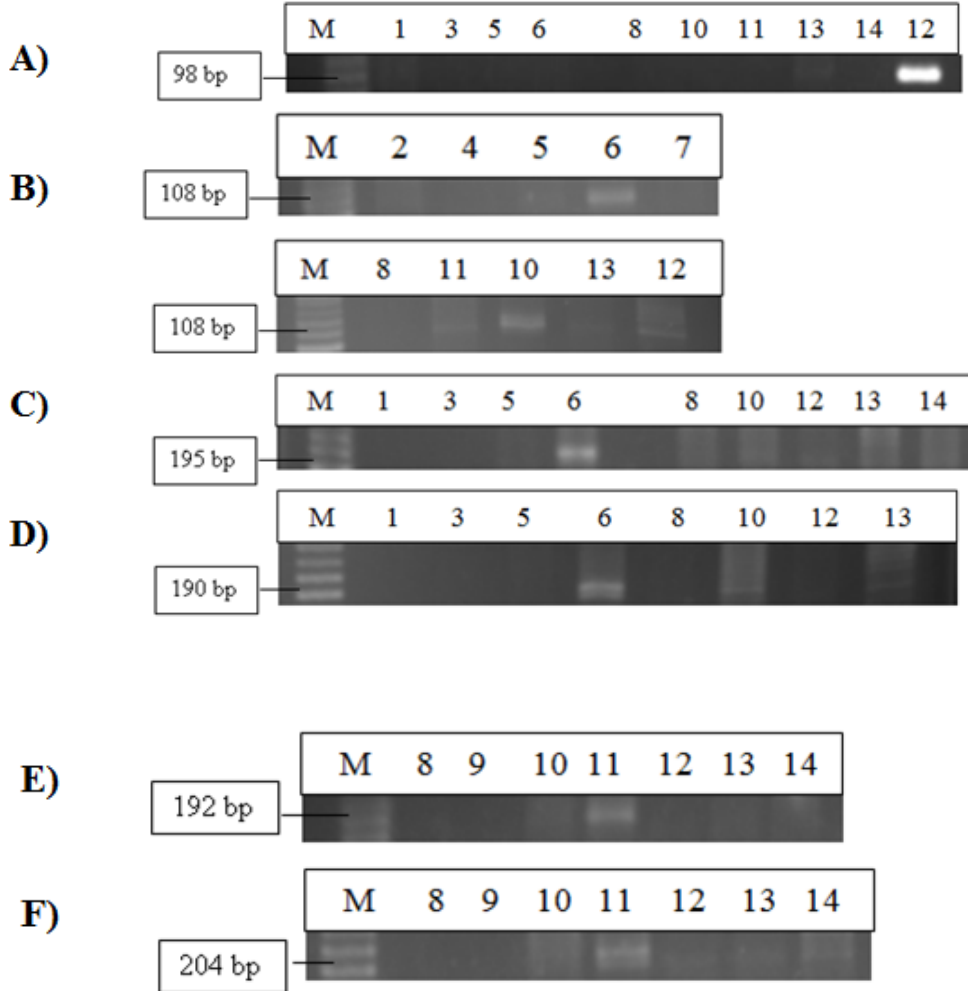
DNaz I içeren besiyerinde 10 numaralı kuyucukta yer alan MDA-MB-231 hücrelerinin fragmentler halinde bantlar oluşturduğu görülmektedir. Benzer bant yapısı ko-kültür sistemde yer alan MDA-MB-231 hücrelerinde de görülmektedir (13 numaralı kuyucuk). Ko-kültür sistemde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinde ise zayıf bir bant oluşumu gözlenmektedir.

4.1.5.3. *RASSF1A* agaroz jel elektroforezi analizi

RASSF1A agaroz jel elektroforez analizinde 50 bp'lik ladder kullanılmıştır. DNaz I içeren besiyerinde yapılan analizlerde, MDA-MB-231 hücrelerinde (11 numaralı kuyucuk) zayıf bant oluşumu belirlenmiştir. MDA-MB-231 besiyerinde ise (10 numaralı kuyucuk) fragmentler halinde bantların olduğu görülmektedir. Ko-kültür sisteminde yer alan hücrelerde ise herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.8.E).

RASSF1A metillenmemiş bölgelerde yapılan analizler, DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 (8 numaralı kuyucuk) ve hFOB 1.19 besiyerinde (9 numaralı kuyucuk) hücrelerinde herhangi bir bant oluşumu belirlenmemiştir (Şekil 4.8.F). MDA-MB-231 hücrelerinde (11 numaralı kuyucuk) fragmentler belirlenmiştir. MDA-MB-231 besiyerinde ise 2 bant görülmektedir. 14 numaralı kuyucukta yer alan ko-kültür sistemde yer alan MDA-MB-231 besiyerinde görülen bant yapısının, 13 numaralı kuyucukta görülen ko-kültür sistemde yer alan MDA-MB-231 hücrelerinden kökenlendiği ve 12 numaralı

kuyucukta yer alan ko-kültür hFOB 1.19 hücrelerin transfeksiyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (Şekil 4.1.F).



Şekil 4.8. *APC* ve *RASSF1A* MSP Analizi. A) *APC1A* metile gen bölgesi, B) *APC1A* metillenmemiş gen bölgesi, C) *APC1B* metile gen bölgesi, D) *APC1B* metillenmemiş gen bölgesi, E) *RASSF1A* metile gen bölgesi, F) *RASSF1A* metillenmemiş gen bölgesi

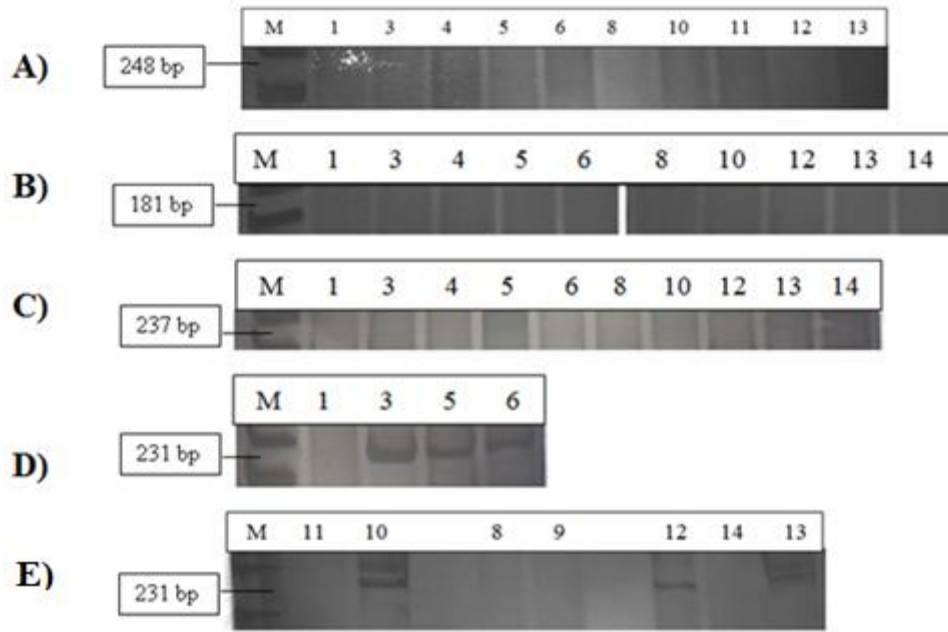
4.1.6. *p53* poliakrilamid jel elektroforez analizi

4.1.6.1. *p53* ekson 5-7 poliakrilamid jel elektroforez analizi

p53 ekson 5-7 mutasyon analizi sonucunda, herhangi bir bant oluşumu ve gen transferi gelişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.9. A-C).

4.1.6.2. p53 ekson 8 poliakrilamid jel elektroforez analizi

Ekson 8 DNaz I içeren besiyerinde yapılan analizler sonucunda, 8 numaralı kuyucukta bulunan ve DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 hücrelerinde ekspresyon gerçekleşmediği gözlenmesine rağmen, ko-kültür sisteminde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinde (12 numaralı kuyucuk) ekspresyonun gerçekleştiği belirlenmiştir. MDA-MB 231 hücrelerinde (10 numaralı kuyucuk) herhangi bir bant belirlenmemesine rağmen besiyerinde (11 numaralı kuyucuk) fragmentler halinde bantlar tespit edilmiştir. Benzer şekilde, ko-kültür sisteminde yer alan MDA-MB-231 hücrelerinde (13 numaralı kuyucuk) herhangi bir bant oluşmamasına rağmen ko-kültür ortak besiyerinde (14 numaralı kuyucuk) bant oluşumu belirlenmiştir (Şekil 4.9. D-E).

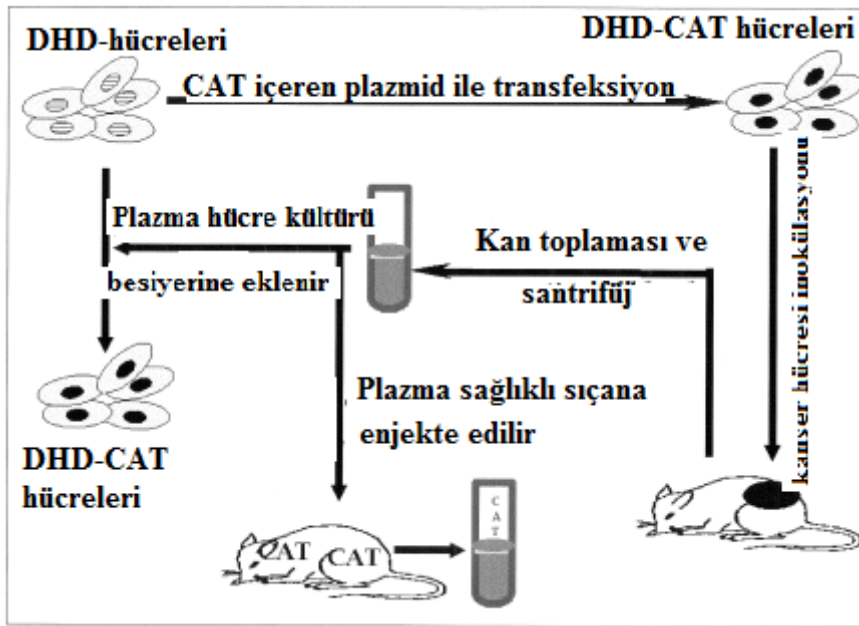


Şekil 4.9. p53 PCR Analizi. A) p53 ekson 5, B) p53 ekson 6, C) p53 ekson 7, D) p53 ekson 8 normal besiyeri, E) p53 ekson 8 DNaz I içeren besiyeri poliakrilamid jel elektroforez görüntüleri

5.1. Tartışma

Kanserin tanı ve teşhisinde kullanılan hormon değerleri ve görüntüleme teknikleri gibi klasik faktörlerin yanında, erken dönemde metastaz veya primer tümör oluşumu hakkında bilgi verebilecek moleküler tanı belirteçlerinin olması hastalığın ilerlemesi ya da ilk oluşumunun önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bazı kanser tiplerinin tedavisinden başarılı sonuç elde edilmesi, tümör genetik yapısına uygun kemoterapötik ilaçların veya tedavi yollarının (cerrahi yöntem, radyolojik tedavi gibi) seçilmesine bağlıdır. Kişiden invaziv olmayan bir yöntemle elde edilebilecek biyobelirteç ile tümör genetik bilgilerine ulaşılabilmesi kişiye özgü tedavi geliştirilebilmesi açısından oldukça önemlidir. Serbest DNA'ların kanserde invaziv ve prognostik özelliklerini yansıtabileceğinin keşfedilmesiyle birlikte, klinikte uygulanabilirliği ile ilgili laboratuvar çalışmaları başlamıştır. Bu çalışmalardan bazıları kanser ve metastaz oluşumunda serbest DNA'ların önemini ortaya koymaktadır.

García-Olmo ve ark. sıçan modelleri kullanarak DHD/K12-PROb hücreleri ile kolon kanseri modeli oluşturmuşlardır. Bu hücreleri, bakteriyel gen olan *CAT* ekspresyonunu ve antibiyotik olan neomisin direnç genini de içeren pCDNA3.1*CAT* plazmidini ile transfekte etmişlerdir (García-Olmo v.d., 1999; García-Olmo v.d., 1999). Araştırmacılar plazmid ile transfekte edilen DHD/K12-PROb hücrelerini sıçanlara enjekte ettikten birkaç hafta sonra, kolon kanseri gelişimini gözlemişlerdir. Kolon kanseri gelişen bu sıçanların plazmaları sağlıklı sıçanlara intraperitoneal olarak uygulandığında, hayvanların akciğer doku ekstraktlarında *CAT* işaret genine rastlanmıştır. Aynı zamanda, kolon kanseri sıçan plazması DHD hücre supernatant ile inoküle edildiğinde işaret geni *CAT*'ın hücreleri transfekte ettiği ve neomisin direnç geninin hücrelere geçiş yaptığı belirlenmiştir (García-Olmo v.d., 1999) (Şekil 5.1). Elde edilen veriler, 1982 yılında Pulciani ve ark. ortaya atmış olduğu, tümör hücrelerinde var olan dominant onkogenlerin normal hücrelere transfer olabileceği görüşünü kanıtlar niteliktedir (Pulciani v.d., 1982). Bu çalışmalar “metastaz, hedef organda lokalize olan hassas hücrelerin, primer tümöre ait dominant gen içeren serbest DNA ile transfeksiyonu aracılığıyla gerçekleştirilebilir.” hipotezinin ortaya atılmasına neden olmuştur (García-Olmo v.d., 2000).



Şekil 5.1. CAT-Tranfeksiyon Deneyinin Şematik Gösterimi. (García-Olmo & García-Olmo, 2001).

Sunulan bu araştırmada, MDA-MB-231 tümör hücrelerine ait onkogenik serbest DNA fragmentlerinin, hFOB 1.19 hücrelerine horizontal gen transfeksiyonunun incelenmesi amaçlanmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinden onkogenik serbest DNA salınımına etkisini arttırabileceğini düşünüldüğü için DNaz I kullanılmıştır.

Serbest DNA'ların *in vitro* koşullarda metastaza olan etkileri ve DNaz I'in rolü çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Onkogenik serbest DNA'ların belirlenmesi ile kanda nükleik asit metabolizmasında önemli rol oynayan DNaz I'in rolü merak konusu olmuştur. DNaz I'in anti-tümöral etkisi hakkında yapılan çalışmalar 1960 yıllarından itibaren başlamış olup, günümüze kadar devam etmektedir. Fakat elde edilen sonuçlar eksik ve güvenilir değildir (De Lamirande, 1961).

Bu çalışmada DNaz I'in metile ve metile olmayan serbest DNA fragmentlerinin geçişine olan etkileri incelenmiştir. Son yıllarda en sık çalışılan DNA modifikasyonu, DNA metilasyonudur. Stefan ve ark.'larının DNaz I-metilasyon ilişkisi ile ilgili yaptıkları çalışma, büyük olukta meydana gelen metilasyonun DNaz I aktivitesini etkileyebileceğini belirlemiştir göstermiştir. Böylece metilasyonun DNA yapısında değişikliğe neden olabileceği tespit edilmiştir (Kochanek v.d., 1993). Kovalent olarak meydana gelen modifikasyon sonucunda CpG dinükleotidleri meydana gelir ve bu dinükleotidler omurgalı DNA'sının %70'inden fazlasını oluşturmaktadır. Meydana gelen bu metilasyon paternleri

dinamik olabilir (Kangaspeska v.d., 2008). Hücre dizileri arasında ve gelişim süreci boyunca primer DNA sekans seviyesinde değişiklikler meydana gelmektedir (Pennings v.d., 2005). DNA metilasyonunun biyolojik önemi oldukça kompleks olmakla birlikte önemlidir. İlk olarak gen sessizleşmesine neden olmaktadır ve transkripsiyonel seviyede genin inaktive olmasına neden olur. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanamaması sonucunda meydana gelen bu inaktivasyonun mekanizması tam olarak açıklanamasa da, DNA'nın 3 boyutlu yapısında meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Rishi v.d., 2010; Rozenberg v.d., 2008).

Franca ve ark. yaptıkları çalışmada, MDA-MB-231 hücrelerinin DNaz I'e duyarlı olduğunu ve bu duyarlılığın sebebinin de IL-6 varlığı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Armenante v.d., 1999). Sunulan bu tez çalışmasında, DNaz I duyarlı MDA-MB-231 hücreleri seçilmiştir. Yapılan deneyler ile en uygun konsantrasyonlarda uygulanan DNaz I'in MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığında gözle görülebilir bir azalmaya neden olduğu belirlendi. Tez çalışması öncesinde yine bir meme kanser hücre dizisi olan MCF-7 hücrelerine aynı dozlarda DNaz I uygulandığında ise canlılık oranlarında bir değişim olmadığı belirlendi. Bu bulgu Franca ve ark. çalışmalarına da benzer şekildedir. DNaz I uygulanan ortamda hücre ölümlerinin artması ile ortamda serbest DNA miktarının artacağı ve DNaz I endonükleaz enziminin, oluşan fragmentleri ne kadar parçalayabileceği sorusundan yola çıkılarak tez şekillendirildi. Deneyde kullanılan normal osteoblast olan hFOB 1.19 hücrelerinde MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan DNaz I konsantrasyonu aynı olmasına rağmen hücrelerin canlılık oranında düşüş gözlemlenmedi.

APC1A gen bölgesi, MDA-MB-231 hücrelerinde, normal kemik hücresi olan hFOB 1.19 hücrelerine göre hipermetile haldedir. Ko-kültür ortamına DNaz I içeren besiyeri eklendiğinde, MDA-MB-231 hücrelerinde mevcut hipermetilenmiş *APC1A* gen bölgesinin hFOB 1.19 hücrelerinde de bulunduğu gözlemlendi. Bu sonuç horizontal gen geçişi olduğu hipotezini *APC1A* gen bölgesi için doğrular niteliktedir. Bu durumda DNaz I'e duyarlı MDA-MB-231 hücreleri DNaz I'in anti-tümöral aktivitesi ile parçalanmış ve ortama salınan serbest DNA fragmentleri hFOB 1.19 hücrelerine transfer olmuştur. DNaz I'in bilinen bir diğer etkisi de Allan ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışma ile gösterilmiştir. DNaz I kesimi için DNA şeklinin önemli olduğunun bildirildiği bu çalışmada sitozin bazına 5' konumunda metil grubu eklenmesinin, DNaz I kesim aktivitesini değiştirebileceği önerilmiştir. Aynı zamanda, metile ve metile olmayan gen bölgelerindeki DNaz I aktivitesinin de değerlendirildiği çalışmada ard arda metilasyonun gerçekleştiği

bölgelerde DNaz I kesiminin daha fazla görüldüğü belirlenmiştir (Lazarovici v.d., 2013). Bu durumda çalışmamızdan elde edilen veriler değerlendirildiğinde, hFOB 1.19 hücrelerindeki *APC1A* genine ait banttaki sinyalin MDA-MB-231 hücrelerindeki göre benzer şekilde olması metillenmiş *APC1A* DNA fragmentlerini, besiyerine eklenen DNaz I'in endonükleaz aktivite göstererek kesmediği sonucuna ulaşılabilir. Bu durum DNaz I nedeniyle MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen ölüm nedeniyle ortama salınan serbest DNA miktarının fazla olması ve bunun sonucunda DNaz I miktarının yeterli aktiviteyi gösterememesi ile açıklanabilir. Bir diğer ihtimal ise, oluşan fragmentleri DNaz I'in aktivitesini gösterebileceği oluk yapısına sahip olmadığından kaynaklanmış olabilir. Çünkü endonükleaz aktivite gösteren DNaz I, B formundaki DNA'nın küçük oluğundaki yaklaşık 6 baz çiftini tanıyarak buradaki fosfodiester bağlar ile interaksiyon kurar (Weston v.d., 1992). DNaz I'in DNA'ya ulaşabilirliği büyük ölçüde, DNA küçük oluğun genişliği ve DNA'nın esnekliği veya sertliği ile ilişkilidir (Drew v.d., 1984; Lahm v.d., 1991). DNA kalıbının küçük oluğuna DNaz I bağlandığı takdirde, DNA'da yapısal değişimler meydana gelir ve küçük olukta açılma oluşur (Lahm v.d., 1991).

Metile ve metile olmayan *APC1B* gen bölgeleri incelendiğinde, DNaz I içermeyen ko-kültür ortamında özellikle hFOB 1.19 hücreleri ile birlikte tutulan MDA-MB-231 hücrelerinde zayıf bantlar tespit edildi. Sadece MDA-MB-231 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında tespit edilmeyen ve hFOB 1.19 hücrelerinin de bulunduğu ko-kültür ortamında tespit edilen bantlar iki hücrenin etkileşimi ile açıklanabilir. Kemik matriksinden tümör hücrelerini uyaran büyüme faktörleri salgılanır. Salgılanan büyüme faktörlerinden tümör hücreleri etkilenir. Bu mekanizma tümör hücrelerinde sürekli olarak devam eder ve kısır döngü (*vicious cycle*) olarak adlandırılır (Krishnan v.d., 2014). Böylece tümör hücresi büyümeye, kemik dokusu hasar görmeye başlar (Zheng v.d., 2013). Bu süreç ko-kültür ortamındaki iki hücre tipi arasında da gerçekleşmiş ve ortamdaki MDA-MB-231 hücrelerinin *APC1B* gen bölgelerinin ekspresyonunu artırmış olabilir. DNaz I içeren besiyerinde ise metile *APC1B* gen geçişi gözlenmiştir. Bu noktada bahsedilmesi gereken bir diğer konu, DNaz I besiyeri içeren ko-kültür sisteminde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinin adezyonlarında meydana gelen azalmadır. *APC* gen ürünleri, β -katenin degradasyonunu hedeflediği için osteoblast hücrelerinde Wnt sinyal yolağının aktivitesinin düzenlenmesinde önemlidir (Rubinfeld v.d., 1993; Su v.d., 1993). Yapılan çalışmalar sonucunda, kaderinlerin plazma membranında bulunan β -katenin aracılığıyla Wnt sinyal yolağında etkili olduğu belirlenmiştir (Conacci-Sorrell v.d., 2002; Erez v.d., 2005; Linask

v.d., 1997). İntrasellüler kaderin molekülleri, aktin hücre iskelet molekülleri ile katenin (β , γ ve α -katenin) molekülleri aracılığıyla bağlantı kurarak hücrel çeşitli sinyal yollarının aktive olmasını sağlar (Nelson v.d., 2004; Wheelock v.d., 2003). Yapılan çalışmalar sonucunda, kaderinlerin plazma membranında bulunan β -katenin aracılığıyla Wnt sinyal yolağında etkili olduğu belirlenmiştir (Conacci-Sorrell v.d., 2002; Erez v.d., 2005; Linask v.d., 1997). Kaderinler, hücrelerin adezyonundan sorumlu Ca^{+2} bağımlı transmembran proteinlerdir. Her ne kadar bu çalışmanın hedefi bu proteinler üzerinden belirlenmemiş olsa da DNaz I uygulanan hücrelerin davranışlarından biri olan adezyon üzerine etkileri de incelendiği için, hFOB 1.19 hücrelerinin adezyonlarında meydana gelen azalma, *APC* geninin geçişi ile açıklanabilir.

Bu çalışmada incelenen bir diğer gen bölgesi *RASSF1A*, *APC1A* ve *APC1B* metillenmemiş gen bölgelerinin DNaz I içeren ortamdaki hücrelerdeki benzer şekilde MDA-MB-231 hücrelerinde de bant yapılarının oluştuğu görülmektedir. DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen hFOB 1.19 hücrelerinde beklendiği üzere herhangi bir bant oluşumu görülmezken, ko-kültür sistemde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinde MDA-MB-231 hücrelerinde olduğu gibi bant oluşumları gözlemlendi. Fackler ve ark. invaziv karsinoma hastalarının tümör dokularında ve çevrelerinde bulunan sağlıklı dokularda *RASSF1A*, *CCND2*, *TWIST*, *HIN1* promotör metilasyon analizi yapmıştır. Çalışma sonucunda, tümör dokusunda sağlıklı dokudan daha yüksek metilasyon gen paternlerine sahip olduğu; fakat tümör çevresinde bulunan normal dokuda da metile genlerin bulunduğu raporlanmıştır (Fackler v.d., 2004). Jeronimo ve ark.'larının yaptıkları çalışmada ise primer tümör dokusunda 23 gen bölgesinin metilasyon analizi yapılmıştır. Çalışma sonucunda, normal dokuda bu gen bölgelerinin olmaması ile invaziv karsinoma ve fibroadenomadan ayrılabilceği önerilmiştir (Jeronimo v.d., 2008). Daha birçok çalışmada, meme kanseri gelişiminde gen metilasyonunun oldukça önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Plazma veya serumda serbest DNA analizleri ile ilgili birçok bilgiye ulaşılmıştır. Aynı zamanda, *APC* ve *RASSF1A* gen bölgelerinde meydana gelen metilasyon analizleri meme kanseri hastalarının plazma ve serumlarında birçok hastada belirlenmiştir. Oldukça etkili bir biyobelirteç olan metilasyon gen paterni çalışmalarında genellikle kanser hücrelerinde metile, normal dokularda metile olamayan gen bölgeleri kullanılmaktadır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre hipermetile gen geçişinin olmasını da beklediğimiz çalışmamızda sadece metile olmayan *RASSF1A* gen bölgesinde geçiş olduğu gözlemlendi. Hücrelerde, metillenmemiş *RASSF1A* gen bölgesinde transfeksiyonun gerçekleşmesi, ekspresyonun

yüksek olduğu anlamına gelmektedir. *RASSF1A* ekspresyonunun yüksek olması, hücre siklusunun durmasına, hücre adezyonunda, migrasyonunda ve apoptozunda değişikliklere neden olmaktadır (Hesson v.d., 2007).

Çalışmada incelenen bir diğer gen bölgesi ise *p53*'tür. Yapılan literatür taramaları sonucunda, DNaz I aktivitesini ve gen mutasyonları arasında etkileşim olup olmadığını gösteren bir araştırma mevcut değildir. *p53* meme kanseri gelişiminde genellikle mutant durumdadır (Gasco, 2002). Mutant *p53* kanser gelişiminde oldukça önemli bir onkogen olup metastaz gelişiminin birçok basamağında önemli rol oynamaktadır. Meme kanseri gelişiminde *p53* mutasyonu genetik veya spotane olarak gelişebilir. *p53* onkoproteini downstream hedef genlerini aktive ederek veya hücre proliferasyonunu bloke ederek, hücrelerde DNA hasarı ve çeşitli onkogen aktivasyonlarına neden olur. Genel olarak düşünüldüğü takdirde, *p53* transkripsiyonel aktivitesi sonucunda, normal hücre büyüme ve anormal hücre eliminasyon mekanizmaları etkilenecek potansiyel malign hücreler ortaya çıkar. IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı - *International Agency for Research on Cancer*) verilerine göre *p53* missense mutasyonların %70'i meme kanseri gelişimine neden olmaktadır (Petitjean v.d., 2007). Çalışmamızda kullanılan MDA-MB-231 hücrelerinin ekson 8 AGA->AAA (Arg (R)-Lys (K)) missense mutasyonuna sahip olduğu literatür taramaları sonucunda belirlenmiştir. Aynı zamanda, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında bu hücre dizisinin yaklaşık %80 mutant olduğu belirtilmiştir (Lacroix v.d., 2006). Literatür taramaları sonucunda, meme kanseri gelişiminde *p53* ekson 5-8 mutasyonunun oldukça önemli olduğu görülmüştür (Bukholm v.d., 1997; Hartmann v.d., 1995; Lacroix v.d., 2006; Runnebaum v.d., 1991; Van Slooten v.d., 1999; Walerych v.d., 2012). Ayrıca, *p53* kemik metastazı dahil olmak üzere metastaz gelişiminde oldukça önemli rol oynamaktadır (Powell v.d., 2014; P. Yang v.d., 2013). Çalışmamızda meme kanserinde *p53* mutasyonun en fazla görüldüğü bilinen ekson 5-8 üzerinde araştırma yapılmıştır. DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen hücrelerde oluşan bantlar fragmentler halinde görülmektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde mevcut ekson 8 mutasyonun ko-kültür ortamında DNaz I içeren ve içermeyen besiyerlerinde tutulan hFOB 1.19 hücrelerine geçtiği tespit edilmiştir. *p53* onkoproteini downstream hedef genlerini aktive ederek veya hücre proliferasyonunu bloke ederek, hücrelerde DNA hasarı ve çeşitli onkogen aktivasyonlarına neden olur. Genel olarak düşünüldüğü takdirde, *p53* transkripsiyonel aktivitesi sonucunda, normal hücre büyüme ve anormal hücre eliminasyon mekanizmaları etkilenecek potansiyel malign

hücreler ortaya çıkar. Osteoblast farklılaşması p53 sinyal yolağı tarafından düzenlenmektedir (Lengner v.d., 2006).

Çalışmamızda tümör hücrelerinden türevlenen serbest DNA transfeksiyonu sonucunda osteoblast hücrelerinde canlılık, adezyon ve proliferasyon değişimleri analiz edildi. Proliferasyon verilerine göre, ko-kültür sisteminde yer alan normal besiyerinde MDA-MB-231 ve hFOB 1.19 hücrelerinin proliferasyon değerlerinde önemli değişimlerin meydana gelmediği belirlendi. DNaz I içeren besiyerinde inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin, ko-kültür sisteminde yer alan hücrelerle karşılaştırıldığında düşük canlılık oranlarına rağmen proliferasyonlarında artış olduğu gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık oranındaki bu düşüş DNaz I duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir. hFOB 1.19 hücrelerinin canlılığının her iki besiyeri ortamında da ko-kültür sisteminde azaldığı belirlenmiştir. Osteoblast hücrelerinden salınan büyüme faktörleri MDA-MB-231 hücrelerinin sağ kalımını desteklerken, osteoblast hücrelerinin canlılığını düşürmüştür (Krishnan v.d., 2014; Lynch, 2011). Bu durum kısır döngü ile açıklanabilir. Yapılan bu çalışma sonucunda, metastatik meme kanser hücrelerinin osteoblast hücreleri ile moleküler etkileşim halinde oldukları belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz veriler sonucunda, ko-kültür sisteminde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinin canlılığının azaldığı tespit edildi. Meme kanseri hücreleri osteoblast hücrelerinin aktivitelerini sınırlayarak apoptozunu indükleyebilmektedir. *In vitro* sistemlerde metastatik meme kanseri hücrelerinin kemik metastazı gerçekleştirdiği takdirde osteoblast apoptozunun arttığı belirlenmiştir (Mastro v.d., 2004). Osteoblast ve meme kanseri hücre arasında meydana gelen etkileşim sonucunda, osteoblast hücrelerinin apoptozu ile ilgili birçok mekanizma önerilmesine rağmen henüz tam olarak açıklanamamıştır. Meme kanser hücrelerinin osteoblastları etkileme yolları ile ilgili literatürde sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bunlardan biri, Michelle ve ark.'larının yaptıkları çalışma olup, osteoblast hücrelerinden salınan IL-6, IL-8 ve MCP-1 gibi mediyatörlerin metastatik hücelere inflamatuvar cevap olarak üretebildiği önerilmiştir. Fakat oluşan bu inflamatuvar sitokinler osteoklast prekürsör hücreleri hedefleyerek, osteoklastlar aracılığıyla kemik matriks yıkımına neden olabilmektedir. Sonuç olarak, osteoblastlar ya kemik birikimini baskılayarak ya da sitokin üretimini artırarak osteolitik fenotipin ortaya çıkmasına neden olabilir (Kinder v.d., 2008).

hFOB 1.19 hücrelerinin ko-kültür ortamında adeziv özelliklerinin artarken DNaz I içeren besiyerinde azaldığı belirlenmiştir. Adeziv karakter kazanmak, kanser hücrelerinin

önemli özelliklerinden bir tanesidir. Aynı ortamda ancak DNaz I içeren besiyerinde hFOB 1.19 hücrelerinin proliferasyonunun kanser hücrelerine benzer şekilde artmış olması bu hücrelerin arasında bir etkileşim olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda hücre kültürü sisteminde meydana gelen tüm bu etkileşimler üzerine serbest DNA'ların ve DNaz I'in rolü hakkında çeşitli veriler elde edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çeşitli tanı ve tedavi türleri geliştirilmiş olmasına rağmen batılı gelişmiş ülkelerde meme kanseri kadınlar arasındaki en yaygın kanser türüdür. Hastalığın nüks etmesi, dormant halde kalması, sekonder karakterizasyon kazanması ve mikrometastaz gibi özelliklerinden dolayı uzun süreli tanı ve tedavi süreci, buna ek olarak da bu etmenlerin tam olarak henüz anlaşılammış olması bu yaygınlığın temel nedenleridir. Bunun yanında her geçen gün daha etkili tedavi yöntemleri ve gen amplifikasyonları gibi biyobelirteçlerin geliştirilmesi bu sürecin daha etkili değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

Meme kanseri ve kemik metastazı hakkında yapılmış birçok araştırmaya rağmen henüz çözülmeyen birçok sır bulunmaktadır.

Yapılan deneyler sonucunda;

1. DNaz I besiyeri içeren ko-kültür sisteminde yer alan hFOB 1.19 hücrelerinin adezyonlarında malign transformasyonun göstergesi olabileceği düşünülen azalmanın meydana geldiği tespit edildi.
2. DNaz I içeren ko-kültür sisteminde MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığının azaldığı ve dolayısıyla besiyerinde serbest DNA miktarının arttığı belirlendi.
3. Besiyerinde MDA-MB-231 hücrelerinden köken alan DNA'ların varlığı gözlemlendi.
4. DNaz I içeren besiyerinde, DNA fragmentleri tespit edildi.
5. MDA-MB-231 hücre dizilerinde var olduğu bilinen *p53* ekson 8 mutasyonunun, horizontal gen transfeksiyonunun, hFOB 1.19 hücrelerine gerçekleştiği belirlendi.
6. MDA-MB-231 hücrelerinden *APC1A* ve *APC1B* metile gen bölgesinin transfeksiyonu gösterildi.

Deney hayvanları üzerinde önceden yapılan çalışmalarda gösterilen “Genometastaz Hipotezi” ile ilgili deney sonuçları göz önünde tutularak, bu çalışmada *in vitro* koşullarda hücrelerde benzer bir deneysel model oluşturulmuştur. Oluşturulan bu model ile, meme kanseri hücrelerinde bulunan *p53* ekson 8 mutasyonu, *APC1A* ve *APC1B* hipermetilasyonunun normal osteoblast hücrelerine geçişi tespit edilmiştir. Ayrıca,

genometastaz hipotezinde öngörülen horizontal gen transferini sağlayan serbest DNA'ların aktivitesinde DNaz I'in etkiliolabileceği gösterilmiştir.

Çalışmadan elde edilen tüm bulgular, yorumlar ve değerlendirmeler ışığında, bu etkileşimlerin daha detaylı çalışmalarla aydınlatılmasının, kanser ve metastazı konusunda farklı bakış açılarının oluşturulmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abou-Samra, A.-B., Jüppner, H., Force, T., Freeman, M. W., Kong, X.-F., Schipani, E., Potts, J. T. (1992). Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), 2732-2736.
- Achour, A., Boutolleau, D., Slim, A., Agut, H., Gautheret-Dejean, A. (2007). Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA in plasma reflects the presence of infected blood cells rather than circulating viral particles. *Journal of clinical virology*, 38(4), 280-285.
- Adams, D., Diaz, N., Gahan, P. (1997). In vitro stimulation by tumour cell media of [3H]-thymidine incorporation by mouse spleen lymphocytes. *Cell biochemistry and function*, 15(2), 119-126.
- Alix-Panabières, C., Schwarzenbach, H., Pantel, K. (2012). Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annual review of medicine*, 63, 199-215.
- Anker, P., Stroun, M., Maurice, P. A. (1975). Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer research*, 35(9), 2375-2382.
- Aoki, K., Taketo, M. M. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of cell science*, 120(19), 3327-3335.
- Arai, F., Suda, T. (2007). Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1106(1), 41-53.
- Armenante, F., Merola, M., Furia, A., Tovey, M., Palmieri, M. (1999). Interleukin-6 repression is associated with a distinctive chromatin structure of the gene. *Nucleic acids research*, 27(22), 4483-4490.
- Asagiri, M., Takayanagi, H. (2007). The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*, 40(2), 251-264.
- Ashcroft, M., Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene*, 18(53).
- Atamaniuk, J., Ruzicka, K., Stuhlmeier, K. M., Karimi, A., Eigner, M., & Mueller, M. M. (2006). Cell-free plasma DNA: a marker for apoptosis during hemodialysis. *Clinical chemistry*, 52(3), 523-526.
- Atıcı, E. (2007). Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 22(4), 197-204.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Atkin, N. (1979). Premature chromosome condensation in carcinoma of the bladder: presumptive evidence for fusion of normal and malignant cells. *Cytogenetic and Genome Research*, 23(3), 217-219.
- Bain, G., Müller, T., Wang, X., Papkoff, J. (2003). Activated β -catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 301(1), 84-91.
- Bendich, A., Wilczok, T., Borenfreund, E. (1965). Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science*, 148(3668), 374-376.
- Berdasco, M., Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Developmental cell*, 19(5), 698-711.
- Bernards, R., Weinberg, R. A. (2002). Metastasis genes: a progression puzzle. *Nature*, 418(6900), 823-823.
- Blair, H., Athanasou, N. (2004). Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histol Histopathol* 19: 189-199.
- Bodmer, W., Bailey, C., Bodmer, J., Bussey, H., Ellis, A., Gorman, P., Scambler, P. (1987). Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, 328 (13), 614-615.
- Boyce, B., Yao, Z., Xing, L. (2009). Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 19(3), 171-180.
- Boyle, W.J., Simonet, W. S., Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342.
- Bruhn, N., Beinert, T., Oehm, C., Jandrig, B., Petersen, I., Chen, X., Fleischhacker, M. (2000). Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 906(1), 72-82.
- Bukholm, I., Nesland, J., Karesen, R., Jacobsen, U., Børresen, A. (1997). Relationship between abnormal p53 protein and failure to express p21 protein in human breast carcinomas. *The Journal of pathology*, 181(2), 140-145.
- Bussard, K. M., Venzon, D. J., Mastro, A. M. (2010). Osteoblasts are a major source of inflammatory cytokines in the tumor microenvironment of bone metastatic breast cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 111(5), 1138-1148.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Campan, M., Weisenberger, D., Laird, P. (2006). DNA methylation profiles of female steroid hormone-driven human malignancies DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer; Springer, 310 p, 141-178.
- Cancer, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *The Lancet*, 350(9084), 1047-1059.
- Cancer, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The Lancet*, 360(9328), 187-195.
- Carson, D. J., Santoro, I. M., Groden, J. (2004). Isoforms of the APC tumor suppressor and their ability to inhibit cell growth and tumorigenicity. *Oncogene*, 23(42), 7144-7148.
- Catarino, R., Ferreira, M. M., Rodrigues, H., Coelho, A., Nogal, A., Sousa, A., Medeiros, R. (2008). Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA and cell biology*, 27(8), 415-421.
- Celgene. (2016). DNA Methylation. <http://www.researchoncology.com/areas-of-research/breast-cancer/science/key-disease-mechanisms/dna-methylation/>
- Chan, K. A., Jiang, P., Zheng, Y. W., Liao, G. J., Sun, H., Wong, J., Chan, A. T. (2013). Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clinical chemistry*, 59(1), 211-224.
- Chan, K. A., Zhang, J., Chan, A. T., Lei, K. I., Leung, S.-F., Chan, L. Y., Lo, Y. D. (2003). Molecular characterization of circulating EBV DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients. *Cancer research*, 63(9), 2028-2032.
- Chang, C. P.-Y., Chia, R.-H., Wu, T.-L., Tsao, K.-C., Sun, C.-F., Wu, J. T. (2003). Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta*, 327(1), 95-101.
- Chen, Y.-C., Sosnoski, D. M., Mastro, A. M. (2010). Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss. *Breast Cancer Res*, 12(6), 215.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Chen, Y., Whetstone, H. C., Youn, A., Nadesan, P., Chow, E. C., Lin, A. C., Alman, B. A. (2007). β -catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 526-533.
- Cheng, S. L., Lecanda, F., Davidson, M. K., Warlow, P. M., Zhang, S. F., Zhang, L., Civitelli, R. (1998). Human Osteoblasts Express a Repertoire of Cadherins, Which Are Critical for BMP-2-Induced Osteogenic Differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(4), 633-644.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), 131-139.
- Cohen Jr, M. M. (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *American journal of medical genetics part A*, 140(23), 2646-2706.
- Coleman, R. (2001). Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer treatment reviews*, 27(3), 165-176.
- Coleman, R. E. (2006). Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clinical cancer research*, 12(20), 6243-6249.
- Coleman, R. E., Seaman, J. J. (2001). The role of zoledronic acid in cancer: clinical studies in the treatment and prevention of bone metastases. *Seminars in oncology*, 28, (6), 11-16.
- Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., Ben-Ze'ev, A. (2002). The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 109(8), 987-991.
- Costa, F. F. (2010). Epigenomics in cancer management. *Cancer Manag Res*, 2, 255-265.
- Curtis, C. (2015). Genomic profiling of breast cancers. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 27(1), 34-39.
- Dammann, R., Yang, G., Pfeifer, G. P. (2001). Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21. 3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Research*, 61(7), 3105-3109.
- Datta, H., Ng, W., Walker, J., Tuck, S., Varanasi, S. (2008). The cell biology of bone metabolism. *Journal of clinical pathology*, 61(5), 577-587.
- Dawson, S.-J., Tsui, D. W., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O. M., Chin, S.-F., Mahler-Araujo, B. (2013). Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(13), 1199-1209.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- De Lamirande, G. (1961). Action of deoxyribonuclease and ribonuclease on the growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Nature*, 192, 52-54.
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Szabo, S. A. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine*, 14(9), 985-990.
- Donegan, W. L. (2006). History of breast cancer. *Breast Cancer*. hamilton, on: bc decker, 1-14.
- Dönmez, H. G., Demirezen, Ş., Beksaç, M. S. (2011). WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri. *Deü Tıp Fakültesi Dergisi*, 25 (3), 189-199.
- Drew, H. R., Travers, A. A. (1984). DNA structural variations in the E. coli tyrT promoter. *Cell*, 37(2), 491-502.
- Dulaimi, E., Hillinck, J., de Caceres, I. I., Al-Saleem, T., Cairns, P. (2004). Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clinical cancer research*, 10(18), 6189-6193.
- Dworkin, A. M., Huang, T. H.-M., Toland, A. E. (2009). Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Seminars in cancer biology*, 19 (3), 165-171.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 300(5618), 455-455.
- Emlen, W., Mannik, M. (1984). Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA. *Clinical and experimental immunology*, 56(1), 185.
- Erez, N., Bershadsky, A., Geiger, B. (2005). Signaling from adherens-type junctions. *European journal of cell biology*, 84(2/3), 235.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148-1159.
- Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., Meltzer, S. J. (2000). Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer research*, 60(16), 4366-4371.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ezirganli, Ş., Polat, S., Barış, E., Tatar, İ., Çelik, H. H. (2013). Comparative investigation of the effects of different materials used with a titanium barrier on new bone formation. *Clinical Oral Implants Research*, 24(3), 312-319.
- Fackler, M. J., Bujanda, Z. L., Umbricht, C., Teo, W. W., Cho, S., Zhang, Z., Wang, C. (2014). Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Cancer Res*, 74(8), 2160-2170.
- Fackler, M. J., McVeigh, M., Mehrotra, J., Blum, M. A., Lange, J., Lapidus, A., Sukumar, S. (2004). Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer research*, 64(13), 4442-4452.
- Faux, M. C., Ross, J. L., Meeker, C., Johns, T., Ji, H., Simpson, R. J., Burgess, A. W. (2004). Restoration of full-length adenomatous polyposis coli (APC) protein in a colon cancer cell line enhances cell adhesion. *Journal of cell science*, 117(3), 427-439.
- Fiegl, H., Millinger, S., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Ensinger, C., Berger, A., Widschwendter, M. (2005). Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res*, 65(4), 1141-1145.
- Fleischhacker, M., Schmidt, B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1775(1), 181-232.
- Fraga, M. F., Rodríguez, R., Cañal, M. J. (2000). Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 21(14), 2990-2994.
- Frey, J. L., Li, Z., Ellis, J. M., Zhang, Q., Farber, C. R., Aja, S., Riddle, R. C. (2015). Wnt-Lrp5 signaling regulates fatty acid metabolism in the osteoblast. *Molecular and cellular biology*, 35(11), 1979-1991.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1827-1831.
- Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Current opinion in genetics & development*, 15(5), 490-495.
- Gahan, P., Stroun, M. (2010). The biology of circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) *Extracellular Nucleic Acids: Springer* (pp. 167-189).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Gal, S., Fidler, C., Lo, Y., Taylor, M., Han, C., Moore, J., Wainscoat, J. (2004). Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *British journal of cancer*, 90(6), 1211-1215.
- Garcia-Olmo, D., García-Olmo, D. C., Ontañón, J., Martínez, E. (2000). Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis". *Blood*, 95(2), 724-725.
- Garcia-Olmo, D., Ontanon, J., García-Olmo, D., Atienzar, M., Vallejo, M. (1999). Detection of genomically-tagged cancer cells in different tissues at different stages of tumor development: lack of correlation with the formation of metastasis. *Cancer letters*, 140(1), 11-20.
- Garcia-Olmo, D. C., Domínguez, C., García-Arranz, M., Anker, P., Stroun, M., García-Verdugo, J. M., García-Olmo, D. (2010). Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer research*, 70(2), 560-567.
- Garcia-Olmo, D., Garcia-Olmo, D. C. Ontanon, J., Martínez, E., Vallejo, M. (1999). Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis. *Histology and histopathology*, 14(4), 1159-1164.
- Garcia-Olmo, D., Garcia-Olmo, D. C. (2001). Functionality of Circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945(1), 265-275.
- Garcia, J. M., Garcia, V., Silva, J., Peña, C., Dominguez, G., Sanchez, A., Chaparro, D. (2006). Extracellular tumor DNA in plasma and overall survival in breast cancer patients. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 45(7), 692-701.
- Gasco, M., Shami, S., Crook, T. (2002). The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 4(2), 70.
- Giacona, M. B., Ruben, G. C., Iczkowski, K. A., Roos, T. B., Porter, D. M., Sorenson, G. D. (1998). Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, 17(1), 89-97.
- Group, E. B. C. T. C. (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, 365(9472), 1687-1717.
- Guan, X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 402-418.
- Guise, T. A. (1997). Parathyroid hormone-related protein and bone metastases. *Cancer*, 80(S8), 1572-1580.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Guise, T. A., Mohammad, K. S., Clines, G., Stebbins, E. G., Wong, D. H., Higgins, L. S., Suva, L. (2006). Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clinical cancer research*, 12(20), 6213-6216.
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84(3), 345-357.
- Guo, D., Bonewald, L. F. (2009). Advancing our understanding of osteocyte cell biology. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 1(2), 87-96.
- Gültekin, M., Boztaş, G. (2014). Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 43.
- Hall, P., McKee, P., Menage, H., Dover, R., Lane, D. (1993). High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene*, 8(1), 203-207.
- Han, J., Kim, D., Morris, K. V. (2007). Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(30), 12422-12427.
- Harris, J. F., Chambers, A. F., Hill, R. P., Ling, V. (1982). Metastatic variants are generated spontaneously at a high rate in mouse KHT tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(18), 5547-5551.
- Harris, S. L., Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17), 2899-2908.
- Hartmann, A., Blaszyk, H., McGovern, R., Schroeder, J., Cunningham, J., De Vries, E., Sommer, S. (1995). p53 gene mutations inside and outside of exons 5-8: the patterns differ in breast and other cancers. *Oncogene*, 10(4), 681-688.
- Henderson, M. A., Danks, J. A., Moseley, J. M., Slavin, J. L., Harris, T. L., McKinlay, M. R., Martin, T. J. (2001). Parathyroid hormone-related protein production by breast cancers, improved survival, and reduced bone metastases. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(3), 234-237.
- Hesson L., Copper W., Latif F., The role of RASSF1A methylation in cancer. *Disease Markers*, 23, 2007, 73-87
- Hibi, K., Robinson, C. R., Booker, S., Wu, L., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Jen, J. (1998). Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res*, 58(7), 1405-1407.
- Holdenrieder, S., Stieber, P. (2004). Apoptotic markers in cancer. *Clinical biochemistry*, 37(7), 605-617.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Holmgren, L., Bergsmedh, A., Spetz, A. L. (2002). Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Vox sanguinis*, 83(1), 305-306.
- Hoque, M. O., Feng, Q., Toure, P., Dem, A., Critchlow, C. W., Hawes, S. E., Stern, J. (2006). Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(26), 4262-4269.
- Hu, X.-C., Wong, I. H., Chow, L. W. (2003). Tumor-derived aberrant methylation in plasma of invasive ductal breast cancer patients: clinical implications. *Oncology reports*, 10(6), 1811-1815.
- Hunter, K. W., Crawford, N., Alsarraj, J. (2008). Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res*, 10(1), S2.
- Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell*, 88(3), 333-346.
- Ishii, M., Saeki, Y. (2008). Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Modern rheumatology*, 18(3), 220-227.
- Jaenisch, R., Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*, 33, 245-254.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R.-D., Knippers, R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*, 61(4), 1659-1665.
- Jeronimo, C., Monteiro, P., Henrique, R., Dinis-Ribeiro, M., Costa, I., Costa, V. L., Pais, I. (2008). Quantitative hypermethylation of a small panel of genes augments the diagnostic accuracy in fine-needle aspirate washings of breast lesions. *Breast cancer research and treatment*, 109(1), 27-34.
- Jung, K., Fleischhacker, M., Rabien, A. (2010). Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clinica chimica acta*, 411(21), 1611-1624.
- Kamat, A. A., Baldwin, M., Urbauer, D., Dang, D., Han, L. Y., Godwin, A., Coleman, R. L. (2010). Plasma cell-free DNA in ovarian cancer. *Cancer*, 116(8), 1918-1925.
- Kangaspeska, S., Stride, B., Métivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R. P., Reid, G. (2008). Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature*, 452(7183), 112-115.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönemärck, U., Back, W., Gross, W. L., Werb, Z., Jenne, D. E. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature medicine*, 15(6), 623-625.
- Kikuta, J., Ishii, M. (2012). Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology*, kes259.
- Kinder, M., Chislock, E., Bussard, K. M., Shuman, L., Mastro, A. M. (2008). Metastatic breast cancer induces an osteoblast inflammatory response. *Experimental cell research*, 314(1), 173-183.
- Kini, U., Nandeesh, B. (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism Radionuclide and hybrid bone imaging: Springer, 29-57.
- Knight, M. N., Hankenson, K. D. (2013). Mesenchymal stem cells in bone regeneration. *Advances in wound care*, 2(6), 306-316.
- Kochanek, S., Renz, D., Doerfler, W. (1993). Differences in the accessibility of methylated and unmethylated DNA to DNase I. *Nucleic acids research*, 21(25), 5843-5845.
- Koffler, D., Agnello, V., Winchester, R., Kunkel, H. G. (1973). The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 52(1), 198.
- Kohler, C., Radpour, R., Barekati, Z., Asadollahi, R., Bitzer, J., Wight, E., Zhong, X. Y. (2009). Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Molecular cancer*, 8(1), 1.
- Kolarevic, A., Yancheva, D., Kocic, G., Smelcerovic, A. (2014). Deoxyribonuclease inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 88, 101-111.
- Kopreski, M., Benko, F., Kwee, C., Leitzel, K., Eskander, E., Lipton, A., Gocke, C. (1997). Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *British journal of cancer*, 76(10), 1293.
- Kreuder, V., Dieckhoff, J., Sittig, M., Mannherz, H. G. (1984). Isolation, characterisation and crystallization of deoxyribonuclease I from bovine and rat parotid gland and its interaction with rabbit skeletal muscle actin. *European Journal of Biochemistry*, 139(2), 389-400.
- Krishnan, V., Vogler, E. A., Sosnoski, D. M., Mastro, A. M. (2014). In vitro mimics of bone remodeling and the vicious cycle of cancer in bone. *Journal of cellular physiology*, 229(4), 453-462.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kristiansen, S., Jorgensen, L. M., Guldberg, P., Soletormos, G. (2013). Aberrantly methylated DNA as a biomarker in breast cancer. *Int J Biol Markers*, 28(2), 141-150.
- Kristiansen, S., Nielsen, D., Sölétormos, G. (2016). Detection and monitoring of hypermethylated RASSF1A in serum from patients with metastatic breast cancer. *Clinical epigenetics*, 8(1), 1.
- Lacroix, M., Toillon, R.-A., Leclercq, G. (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-related cancer*, 13(2), 293-325.
- Lahm, A., Suck, D. (1991). DNase I-induced DNA conformation: 2 Å structure of a DNase I-octamer complex. *Journal of molecular biology*, 222(3), 645-667.
- Lazarovici, A., Zhou, T., Shafer, A., Machado, A. C. D., Riley, T. R., Sandstrom, R., Stamatoyannopoulos, J. A. (2013). Probing DNA shape and methylation state on a genomic scale with DNase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6376-6381.
- Lengner, C. J., Steinman, H. A., Gagnon, J., Smith, T. W., Henderson, J. E., Kream, B. E., Jones, S. N. (2006). Osteoblast differentiation and skeletal development are regulated by Mdm2-p53 signaling. *The Journal of cell biology*, 172(6), 909-921.
- Leon, S., Shapiro, B., Sklaroff, D., Yaros, M. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*, 37(3), 646-650.
- Leon, S. A., Shapiro, B., Servi, P., Parsons, R. G. (1981). A comparison of DNA and DNA-binding protein levels in malignant disease. *European Journal of Cancer*, 17(5), 533-538.
- Lewis, C. M., Cler, L. R., Bu, D.-W., Zöchbauer-Müller, S., Milchgrub, S., Naftalis, E. Z., Euhus, D. M. (2005). Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk. *Clinical cancer research*, 11(1), 166-172.
- Li, J., Karaplis, A. C., Huang, D. C., Siegel, P. M., Camirand, A., Yang, X. F., Kremer, R. (2011). PTHrP drives breast tumor initiation, progression, and metastasis in mice and is a potential therapy target. *The Journal of clinical investigation*, 121(12), 4655-4669.
- Li, Y., Wei Q., Cao F., Cao X., Expression and Promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancer in Chinese women. *Oncology Reports* 19; 1149-1153, 2008.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Lian, J. B., Stein, G. S., Javed, A., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Young, D. W. (2006). Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 7(1-2), 1-16.
- Lin, Z., Fateh, A., Salem, D., Intini, G. (2014). Periosteum Biology and Applications in Craniofacial Bone Regeneration. *Journal of dental research*, 93(2), 109-116.
- Linask, K. K., Knudsen, K. A., Gui, Y.-H. (1997). N-cadherin–catenin interaction: necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development. *Developmental biology*, 185(2), 148-164.
- Lo, Y. D., Wainscoat, J. S., Gillmer, M., Patel, P., Sampietro, M., Fleming, K. (1989). Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *The Lancet*, 334(8676), 1363-1365.
- Lo, Y. D., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M., Hjelm, N. M. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *The American Journal of Human Genetics*, 64(1), 218-224.
- Lo, Y. M. D., Chan, W. Y., Ng, K. W. (2004). Circulating epstein-barr virus DNA in the serum of patients with gastric carcinoma: Google Patents.
- Logan, C. Y., Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 781-810.
- Lui, Y. Y., Chik, K.-W., Chiu, R. W., Ho, C.-Y., Lam, C. W., Lo, Y. D. (2002). Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clinical chemistry*, 48(3), 421-427.
- Lujambio, A., Esteller, M. (2009). How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs. *Cell Cycle*, 8(3), 377-382.
- Lynch, C. C. (2011). Matrix metalloproteinases as master regulators of the vicious cycle of bone metastasis. *Bone*, 48(1), 44-53.
- Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J., Nelson, C. E., Kim, D. H., Tainsky, M. A. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250(4985), 1233-1238.
- Mandel, P., Metais, P. (1948). Nucleic acids of human blood plasma. *CR Acad Sci Paris*, 142, 241-243.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis 1. *Endocrine reviews*, 21(2), 115-137.
- Marie, P. J. (2002). Role of N-cadherin in bone formation. *Journal of cellular physiology*, 190(3), 297-305.
- Marie, P. J. (2009). N-Cadherin-Wnt connections and the control of bone formation. *IBMS BoneKEy*, 6(4), 150-156.
- Marie, P. J., Hay, E., Modrowski, D., Revollo, L., Mbalaviele, G., Civitelli, R. (2014). Cadherin-mediated cell–cell adhesion and signaling in the skeleton. *Calcified tissue international*, 94(1), 46-54.
- Masciari, S., Dillon, D. A., Rath, M., Robson, M., Weitzel, J. N., Balmana, J., Lebensohn, A. (2012). Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast cancer research and treatment*, 133(3), 1125-1130.
- Mastro, A. M., Gay, C. V., Welch, D. R., Donahue, H. J., Jewell, J., Mercer, R., Guttridge, K. (2004). Breast cancer cells induce osteoblast apoptosis: a possible contributor to bone degradation. *Journal of cellular biochemistry*, 91(2), 265-276.
- Matuschek, C., Bölke, E., Lammering, G., Gerber, P., Peiper, M., Budach, W., Orth, K. (2010). Methylated APC and GSTP1 genes in serum DNA correlate with the presence of circulating blood tumor cells and are associated with a more aggressive and advanced breast cancer disease. *European journal of medical research*, 15(7), 277-286.
- Mbalaviele, G., Shin, C. S., Civitelli, R. (2006). Perspective: cell–cell adhesion and signaling through cadherins: connecting bone cells in their microenvironment. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(12), 1821-1827.
- McKinley, A., Russell, S., Spence, R., Odling-Smee, W., Nevin, N. (1995). Hereditary breast cancer and linkage analysis to BRCA1. *British journal of surgery*, 82(8), 1086-1088.
- McPherson, K., Steel, C., Dixon, J. (2000). Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj*, 321(7261), 624-628.
- Miclea, R. L., van der Horst, G., Robanus-Maandag, E. C., Löwik, C. W., Oostdijk, W., Wit, J. M., Karperien, M. (2011). Apc bridges Wnt/ β -catenin and BMP signaling during osteoblast differentiation of KS483 cells. *Experimental cell research*, 317(10), 1411-1421.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Mirza, S., Sharma, G., Prasad, C. P., Parshad, R., Srivastava, A., Gupta, S. D., Ralhan, R. (2007). Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ER α and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life sciences*, 81(4), 280-287.
- Mundy, G. R., Guise, T. A. (1997). Hypercalcemia of malignancy. *The American journal of medicine*, 103(2), 134-145.
- Müller, H. M., Widschwendter, A., Fiegl, H., Ivarsson, L., Goebel, G., Perkmann, E., Widschwendter, M. (2003). DNA methylation in serum of breast cancer patients an independent prognostic marker. *Cancer Res*, 63(22), 7641-7645.
- Nagata, S. (2005). DNA degradation in development and programmed cell death. *Immunology*, 23.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., Fukuyama, H. (2003). Apoptosis at a glance: death or life. *Cell Death Differ*, 10, 108-116.
- Nawroz, H., Koch, W., Anker, P., Stroun, M., Sidransky, D. (1996). Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature medicine*, 2(9), 1035-1037.
- Nelson, W. J., Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science*, 303(5663), 1483-1487.
- Norberg, T., Jansson, T., Sjögren, S., Mårtensson, C., Andreasson, I., Fjällskog, M., Holmberg, L. (1996). Overview on human breast cancer with focus on prognostic and predictive factors with special attention on the tumour suppressor gene p53. *Acta Oncologica*, 35 (5), 96-102.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194 (4260), 23-28.
- Osborne, C., Wilson, P., Tripathy, D. (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist*, 9(4), 361-377.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, 133(3421), 571-573.
- Papadopoulou, E., Davilas, E., Sotiriou, V., Georgakopoulos, E., Georgakopoulou, S., Koliopoulos, A., Karydas, I. (2006). Cell-free DNA and RNA in Plasma as a New Molecular Marker for Prostate and Breast Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075(1), 235-243.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Park, J.-L., Kim, H. J., Choi, B. Y., Lee, H.-C., Jang, H.-R., Song, K. S., Kim, Y. S. (2012). Quantitative analysis of cell-free DNA in the plasma of gastric cancer patients. *Oncology letters*, 3(4), 921-926.
- Pawelek, J. M., Chakraborty, A. K. (2008). The cancer cell–leukocyte fusion theory of metastasis. *Advances in cancer research*, 101, 397-444.
- Pennings, S., Allan, J., Davey, C. S. (2005). DNA methylation, nucleosome formation and positioning. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 3(4), 351-361.
- Peters, D. L., Pretorius, P. J. (2011). Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA—a new paradigm in genetic behaviour. *Clinica chimica acta*, 412(11), 806-811.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P., Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation*, 28(6), 622-629.
- Pfeifer, G., Dammann, R. (2005). Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Moscow)*, 70(5), 576-583.
- Phipps, A. I., & Li, C. I. (2010). Breast cancer biology and clinical characteristics *Breast Cancer Epidemiology* (pp. 21-46): Springer.
- Plotkin, L. I., Aguirre, J. I., Kousteni, S., Manolagas, S. C., Bellido, T. (2005). Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 7317-7325.
- Ponder, B. (1994). Searches begin and end. *Nature: International weekly journal of science*, 371(6495), 279.
- Porquet, N., Gout, S., Huot, J. (2010). The metastatic process: an overview *Metastasis of Colorectal Cancer: Springer* , 1-31.
- Powell, E., Piwnica-Worms, D., Piwnica-Worms, H. (2014). Contribution of p53 to metastasis. *Cancer discovery*, 4(4), 405-414.
- Pulciani, S., Santos, E., Lauver, A. V., Long, L. K., Aaronson, S. A., Barbacid, M. (1982). Oncogenes in solid human tumours. *Nature*, 300, 539 - 542.
- Qi Chen, X., Bonnefoi, H., Diebold-Berger, S., Lyautey, J., Lederrey, C., Faltin-Traub, E., Anker, P. (1999). Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clinical cancer research*, 5(9), 2297-2303.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Rak, J. (2013). Extracellular vesicles-biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer. *Front Pharmacol*, 4, 21.
- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S., Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature genetics*, 33(1), 49-54.
- Rawadi, G., Vayssière, B., Dunn, F., Baron, R., Roman-Roman, S. (2003). BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(10), 1842-1853.
- Rishi, V., Bhattacharya, P., Chatterjee, R., Rozenberg, J., Zhao, J., Glass, K., Vinson, C. (2010). CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBP α binding sites that activate some tissue-specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(47), 20311-20316.
- Roach, H. (1994). Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell biology international*, 18(6), 617-628.
- Robertson, K. D., Jones, P. A. (2000). DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21(3), 461-467.
- Roodman, G. D. (1999). Cell biology of the osteoclast. *Experimental hematology*, 27(8), 1229-1241.
- Rosen, C. J., Compston, J. E., Lian, J. B. (2009). *ASBMR Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*: John Wiley & Sons.
- Ross, F. P., Teitelbaum, S. L. (2005). $\alpha\beta3$ and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunological reviews*, 208(1), 88-105.
- Rozenberg, J. M., Shlyakhtenko, A., Glass, K., Rishi, V., Myakishev, M. V., FitzGerald, P. C., Vinson, C. (2008). All and only CpG containing sequences are enriched in promoters abundantly bound by RNA polymerase II in multiple tissues. *BMC genomics*, 9(1), 1.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S. H., Masiarz, F. R., Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science*, 262 (5140), 1731-1734.
- Runnebaum, I. B., Nagarajan, M., Bowman, M., Soto, D., Sukumar, S. (1991). Mutations in p53 as potential molecular markers for human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), 10657-10661.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Rykova, E. Y., Skvortsova, T. E., Laktionov, P. P., Tamkovich, S. N., Bryzgunova, O. E., Starikov, A. V., Vlassov, V. V. (2004). Investigation of tumor-derived extracellular DNA in blood of cancer patients by methylation-specific PCR. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 23(6-7), 855-859.
- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T. J., Müller, P. (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7737-7742.
- Schneikert, J., Behrens, J. (2006). Truncated APC is required for cell proliferation and DNA replication. *International Journal of Cancer*, 119(1), 74-79.
- Schwarzenbach, H., Hoon, D. S., Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 426-437.
- Seyfried, T. N., Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical reviews in oncogenesis*, 18(1-2), 43.
- Shao, Z.-M., Wu, J., Shen, Z.-Z., Nguyen, M. (2001). p53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients. *Clinical cancer research*, 7(8), 2222-2227.
- Sharma, G., Mirza, S., Parshad, R., Srivastava, A., Gupta, S. D., Pandya, P., Ralhan, R. (2010). Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients. *Life sciences*, 87(3), 83-91.
- Shiokawa, D., Tanuma, S.-i. (2001). Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase γ during apoptosis. *Biochemistry*, 40(1), 143-152.
- Siclari, V., Guise, T., Chirgwin, J. (2006). Molecular interactions between breast cancer cells and the bone microenvironment drive skeletal metastases. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(4), 621-633.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. (2015). *Cancer statistics, 2015*. CA: a cancer journal for clinicians, 65(1), 5-29.
- Sikavitsas, V. I., Temenoff, J. S., Mikos, A. G. (2001). Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, 22(19), 2581-2593.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Silva, J. M., Dominguez, G., Garcia, J. M., Gonzalez, R., Villanueva, M. J., Navarro, F., Bonilla, F. (1999). Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients clinicopathological correlations. *Cancer research*, 59(13), 3251-3256.
- Silva, J. M., Garcia, J. M., Dominguez, G., Silva, J., Miralles, C., Cantos, B., Bonilla, F. (2002). Persistence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients after mastectomy. *Annals of surgical oncology*, 9(1), 71-76.
- Silva, J. M., Silva, J., Sanchez, A., Garcia, J. M., Dominguez, G., Provencio, M., España, P. (2002). Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clinical cancer research*, 8(12), 3761-3766.
- Sirvent, J. J., Mar, A. F., Olona, M., Orti, A. (2001). Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. *Histology and histopathology*, 16(1), 99-106.
- Skvortsova, T., Rykova, E., Tamkovich, S., Bryzgunova, O., Starikov, A., Kuznetsova, N., Laktionov, P. (2006). Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *British journal of cancer*, 94(10), 1492-1495.
- Smith, M. R. (2010). 2003 from http://www.clinicaloptions.com/Oncology/Treatment%20Updates/Bone%20Health%20Oncology/Modules/BC_Bone_Health/Pages/Page%203.aspx
- Society, A. C. (2008). *Cancer facts & figures: The Society.*
- Solinas, G., Marchesi, F., Garlanda, C., Mantovani, A., Allavena, P. (2010). Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 243-248.
- Soussi, T. (2010). The history of p53. *EMBO reports*, 11(11), 822-826.
- Sozzi, G., Conte, D., Mariani, L., Vullo, S. L., Roz, L., Lombardo, C., Tavecchio, L. (2001). Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer research*, 61(12), 4675-4678.
- Sterling, J. A., Edwards, J. R., Martin, T. J., Mundy, G. R. (2011). Advances in the biology of bone metastasis: how the skeleton affects tumor behavior. *Bone*, 48(1), 6-15.
- Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C., Maurice, P. A. (1987). Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 23(6), 707-712.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Gahan, P. B. (1977). Circulating nucleic acids in higher organisms. *International review of cytology*, 51, 1.
- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C., Beljanski, M. (1989). Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 46(5), 318-322.
- Su, L.-K., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information*, 262(5140), 1734-1736.
- Swaminathan, R., Butt, A. N. (2006). Circulating nucleic acids in plasma and serum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075(1), 1-9.
- Swellam, M., Abdelmaksoud, M. D., Sayed Mahmoud, M., Ramadan, A., Abdel-Moneem, W., Hefny, M. M. (2015). Aberrant methylation of APC and RAR β 2 genes in breast cancer patients. *IUBMB life*, 67(1), 61-68.
- Szyf, M. (2008). The role of DNA hypermethylation and demethylation in cancer and cancer therapy. *Current Oncology*, 15(2), 2-5.
- Szyf, M., Pakneshan, P., Rabbani, S. A. (2004). DNA methylation and breast cancer. *Biochemical pharmacology*, 68(6), 1187-1197.
- Taback, B., Giuliano, A. E., Hansen, N. M., Hoon, D. S. (2001). Microsatellite alterations detected in the serum of early stage breast cancer patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945(1), 22-30.
- Takeshita, H., Mogi, K., Yasuda, T., Nakajima, T., Nakashima, Y., Mori, S., Kishi, K. (2000). Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: pancreas, parotid, and pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(2), 481-484.
- Tamkovich, S. N., Cherepanova, A. V., Kolesnikova, E. V., Rykova, E. Y., Pyshnyi, D. V., Vlassov, V. V., Laktionov, P. P. (2006). Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075(1), 191-196.
- Tan, E., Schur, P., Carr, R., Kunkel, H. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*, 45(11), 1732.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Tan, S.-H., Ida, H., Lau, Q.-C., Goh, B.-C., Chieng, W.-S., Loh, M., Ito, Y. (2007). Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncology reports*, 18(5), 1225-1230.
- Tanaka, E., Miyawaki, Y., Del Pozo, R., Tanne, K. (2000). Changes in the biomechanical properties of the rat interparietal suture incident to continuous tensile force application. *Archives of oral biology*, 45(12), 1059-1064.
- Teitelbaum, S. L., Ross, F. P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews Genetics*, 4(8), 638-649.
- Thomas, R. J., Guise, T. A., Yin, J. J., Elliott, J., Horwood, N. J., Martin, T. J., Gillespie, M. T. (1999). Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation 1. *Endocrinology*, 140(10), 4451-4458.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- Traill, Z., Talbot, D., Golding, S., Gleeson, F. V. (1999). Magnetic resonance imaging versus radionuclide scintigraphy in screening for bone metastases. *Clinical radiology*, 54(7), 448-451.
- Vaananen, H., Zhao, H., Mulari, M., Halleen, J. M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *Journal of cell science*, 113(3), 377-381.
- Van't Veer, L. J., Dai, H., Van De Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Witteveen, A. T. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), 530-536.
- Van der Auwera, I., Elst, H., Van Laere, S., Maes, H., Huget, P., Van Dam, P., Dirix, L. (2009). The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, 100(8), 1277-1286.
- Van der Vaart, M., Pretorius, P. J. (2007). The origin of circulating free DNA. *Clinical chemistry*, 53(12), 2215-2215.
- Van Es, J. H., Giles, R. H., Clevers, H. C. (2001). The many faces of the tumor suppressor gene APC. *Experimental cell research*, 264(1), 126-134.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Van Slooten, H. J., van de Vijver, M. J., Børresen, A. L., Eyfjörd, J. E., Valgardsdóttir, R., Scherneck, S., van Dierendonck, J. H. (1999). Mutations in exons 5–8 of the p53 gene, independent of their type and location, are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. *The Journal of pathology*, 189(4), 504-513.
- Verheyen, E. M., Gottardi, C. J. (2010). Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by protein kinases. *Developmental dynamics*, 239(1), 34-44.
- Viorritto, I. C., Nikolov, N. P., Siegel, R. M. (2007). Autoimmunity versus tolerance: can dying cells tip the balance? *Clinical Immunology*, 122(2), 125-134.
- Waddington, C. H. (1952). Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature*, 169, 625-626.
- Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L., Del Sal, G. (2012). The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*, 33(11), 2007-2017.
- Walsh, J. S. (2015). Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery (Oxford)*, 33(1), 1-6.
- Wang, B. G., Huang, H.-Y., Chen, Y.-C., Bristow, R. E., Kassaei, K., Cheng, C.-C., Shih, I.-M. (2003). Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer research*, 63(14), 3966-3968.
- Weigelt, B., Peterse, J. L., Van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews Cancer*, 5(8), 591-602.
- Weilbaecher, K. N., Guise, T. A., McCauley, L. K. (2011). Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 411-425.
- Weinberg, R. (2013). *The biology of cancer: Garland science. Second Edition.*
- Weiss, L. (1990). Metastatic inefficiency. *Advances in cancer research*, 54, 159-211.
- Weston, S., Lahm, A., Suck, D. (1992). X-ray structure of the DNase I (GGTATAACC) 2 complex at 2.3 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 226(4), 1237-1256.
- Wheelock, M. J., Johnson, K. R. (2003). Cadherin-mediated cellular signaling. *Current opinion in cell biology*, 15(5), 509-514.
- Willert, K., Jones, K. A. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & development*, 20(11), 1394-1404.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Wood, S. L., Westbrook, J. A., Brown, J. E. (2014). Omic-profiling in breast cancer metastasis to bone: implications for mechanisms, biomarkers and treatment. *Cancer treatment reviews*, 40(1), 139-152.
- Xing, L., Boyce, B. F. (2005). Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 328(3), 709-720.
- Yan, P. S., Venkataramu, C., Ibrahim, A., Liu, J. C., Shen, R. Z., Diaz, N. M., Shapiro, C. L. (2006). Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clinical cancer research*, 12(22), 6626-6636.
- Yang, H., Liu, V., Tsang, P., Yip, A., Tam, K., Wong, L., Ngan, H. (2004). Quantification of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 14(5), 903-910.
- Yang, P., Du, C., Kwan, M., Liang, S., Zhang, G. (2013). The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis. *Scientific reports*, 3, 1-6.
- Yazici, H., Terry, M. B., Cho, Y. H., Senie, R. T., Liao, Y., Andrulis, I., Santella, R. M. (2009). Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA before breast cancer diagnosis in the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(10), 2723-2725.
- Yılmaz, E., Altunok, V. (2011). Kanser ve p53 Geni. *Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1, 19-23.
- Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Guise, T. A. (1999). TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *The Journal of clinical investigation*, 103(2), 197-206.
- Zheng, Y., Zhou, H., Dunstan, C. R., Sutherland, R. L., Seibel, M. J. (2013). The role of the bone microenvironment in skeletal metastasis. *Journal of Bone Oncology*, 2(1), 47-57.