

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

**FARE MEME KANSERİ MODELİ PRİMER TÜMÖR VE  
METASTAZLARINDA CCM1, CCM2, CCM3  
EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mansur CİCİ

YÜKSEK LİSANS

2017-ANTALYA

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

**FARE MEME KANSERİ MODELİ PRİMER TÜMÖR VE  
METASTAZLARINDA CCM1, CCM2, CCM3  
EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mansur CİCİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Gamze TANRIÖVER**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2015-1036 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu alışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı:	Doç. Dr. Gamze TANRIÖVER Akdeniz Üniversitesi	.....
Üye	:Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN Akdeniz Üniversitesi	.....
Üye	:Prof. Dr. Necdet DEMİR Akdeniz Üniversitesi	.....
Üye	:Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL Akdeniz Üniversitesi	.....
Üye	:Prof. Dr. Sevinç İNAN İzmir Ekonomi Üniversitesi	.....

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

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Narin DERİN

## ETİK BEYAN

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

Mansur CİCİ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Gamze TANRIÖVER

## TEŐEKKÜR

Tez alıŐmamn planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gamze TANRIÖVER'e,

alıŐmalarında ihtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına, asistan arkadaşlarıma ve çalıŐanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Son olarak, beni yalnız bırakmayan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olan güzel insanlara; ailemin tüm üyelerine en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

## ÖZET

**Amaç:** CCM1, CCM2 ve CCM3 genlerinde tanımlanan mutasyonlar sporadik ya da kalıtsal olup santral sinir sisteminde görülen serebral kavernoza malformasyonların (SKM) sebebidir. Bu genlerin fonksiyonları hala tam olarak anlaşılamamasına rağmen; hücre-hücre bağlantılarında, migrasyonda, hücrenin oryantasyonunda ve apoptozunda önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir. SKM proteinleri hücre içerisinde üçlü özel bir yapı oluşturmakta ve adezyon molekülleri ile hücre iskeleti arasında bağlantı kurmaktadır. Bu bilgilere göre; çalışmamızda, serebral kavernoza malformasyonda tanımlanmış ve daha önce primer tümör ve metastazlardaki etkisi araştırılmamış CCM1, CCM2 ve CCM3 proteinlerinin hem primer tümörlerde hem de akciğer ve karaciğer gibi metastatik dokulardaki ekspresyonlarını değerlendirmeyi amaçladık.

**Materyal ve Yöntem:** Çalışmamızda; 4T1 (metastatik meme kanseri hücre hattı) hücrelerinin karaciğer ve kalp dokularına metastazları sonrasında elde edilen 4TLM ve 4THM hücreleri kullanıldı. Hücreler 500.000 hücre/fare olacak şekilde 8-10 haftalık Balb/C dişi farelerin meme dokularına ortotopik olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan 26 gün sonra fareler sakrifiye edilerek primer tümörleri, akciğer ve karaciğer dokuları çıkartıldı, parafin bloklar hazırlandı. CCM1, CCM2 ve CCM3 proteinlerinin ekspresyonları immünohistokimya ve western-blot tekniği ile değerlendirildi. Tüm bulgular tümör enjeksiyonu yapılmamış kontrol hayvanları ile kıyaslanarak yorumlandı.

**Bulgular:** Primer tümör dokularında üç proteinin ekspresyonu da gözlemlendi. Tümör enjekte edilen farelerin akciğer ve karaciğerlerinde CCM1 ve CCM2 benzer şiddette ekspresyon patternine sahipken; CCM3 daha yoğun bir immunoreaksiyon sergiledi. Metastatik dokuların özellikle metastaz alanlarında CCM proteinlerinin reaksiyonuna rastlanmadı. Bu alanlarda gözlenen nadir immunreaksiyonların kupfer hücrelere ait olduğu görüldü.

**Sonuç:** CCM proteinlerinin primer tümörlere kıyasla metastatik dokulardaki ekspresyon farkları ve metastatik alanlarda ekspresyonlarının görülmeyişi; bu proteinlerin metastaz da rol oynayabileceğini ve invaze olan tümör hücrelerinin adeziv bağlantı yapılarını değiştirerek kendi mikroçevrelerini yaratabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** CCM1, CCM2, CCM3, meme kanseri, metastaz

## ABSTRACT

**Objective:** Sporadic or familial mutations in at least three genes, CCM1, CCM2, CCM3, cause Cerebral cavernous malformations (CCMs) which mostly occurs in the central nervous system. The precise functions of these genes are not fully understood. Studies show that the proteins are thought to have important roles on cell-cell junctions, migration, and apoptosis. All three proteins can be found in a same complex within the cell and they maintain stabilization of cell junctions. However; the role of CCM proteins on tumor development and metastasis has not been explained yet. Therefore, the aim of the study was to evaluate the expressions of CCM1, CCM2, CCM3 proteins in primary breast cancer tumor and highly metastatic organs lung and liver.

**Method:** In our study; 4TLM, 4THM cell lines obtained from the metastasis of 4T1 (metastatic breast cancer cells) cells to liver, heart tissues were used. 4TLM, 4THM (500.000 cell/mouse) cells were injected to breast tissues of Balb/C female mice (8-10 weeks old) orthotopically. After 26 days, the primary tumors, liver and lung tissues were obtained and paraffin blocks were prepared. CCM1, CCM2 and CCM3 immunoreactions were evaluated by immunohistochemistry. All the findings were interpreted by comparing control animals that were not injected with tumor cells.

**Results:** It was observed three CCM protein expressions in primary tumor tissues of all tumor injected animals. The expressions of CCM1 and CCM2 in lung and liver tissues were similar to the other. CCM2 expressions were vulnerable but, CCM3 had higher immunoreactivity in both groups. Interestingly, CCM proteins were not seen in metastatic tumor mass in liver tissues. But, CCM proteins were mainly observed in Kupffer cells and macrophages.

**Conclusion:** The loss of CCM expressions in metastatic tissues and metastatic tumor mass which may change adherent junctions' stability, create it's own microenvironment and facilitate metastasis to distant organs. Therefore; CCM proteins might have a role new perspective of carcinogenesis.

**Keywords:** CCM1, CCM2, CCM3, breast cancer, metastasis

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iii
<b>ŞEKİLLER</b>	v
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	vi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. Amaç	2
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Tümör	3
2.2. Tümörde Dormansi	4
2.2.1 Hücreyel Dormansi	4
2.2.2 Anjiyogenik Dormansi	4
2.2.3 İmmünolojik Dormansi	5
2.3 Meme Kanseri	5
2.4 Metastaz	6
2.5 Vasküler Malformasyonlar	9
2.5.1 Serebral Vasküler Malformasyonlar	9
2.5.2 Serebral Kavernöz Malformasyonlar	9
2.6 Serebral Kavernöz Malformasyonlardan Sorumlu Genler	10
2.6.1 Ccm1 (KRIT 1)	11
Ccm1'in Endotelial Bariyerin Korunmasındaki Görevleri	12
Ccm1'in Anjiyogenezdeki Rolü	13
Ccm1'in Hücre Organizasyonu Ve Migrasyonu Etkileri	14
Ccm1'in Endotelial Mezenşimal Geçişteki Olası Roller	15
2.6.2 Ccm2 (Malcavernin)	15
Ccm2'nin Apoptoz Üzerine Etkileri	16
2.6.3 Ccm3 (PDCD10)	17
Ccm3'ün Hücre Oryantasyonuna Ve Apoptoza Etkileri	18
Ccm3'ün Migrasyona Etkileri	18



<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	20
3.1. Deney Grupları	20
3.2 Hücre Kültürü	20
3.3 Deney Modeli	21
3.4 Tümör Büyüklüğü Ve Ağırlığının Analizi	21
3.5 Periferik Yayma Analizi	21
3.6 Metastaz Analizi	22
3.6.1 Makro Metastaz Analizleri	22
3.6.2 Mikro Metastaz Analizleri	22
3.7 Doku Takibi Ve Kesit Alma	23
3.8 Hematoksilen & Eozin Boyama Protokolü	24
3.9 İmmünohistokimya Yöntemi	24
3.10 Image –J Analizi	26
3.11 Western Blot Yöntemi	26
3.11.1 Dokulardan Lizat Hazırlanması	26
3.11.2 Western Blot Protokolü	27
<b>4. BULGULAR</b>	29
4.1. Tümör Büyüklüğü Ve Ağırlığının Analizi	29
4.2 Periferik Yayma Analizi	30
4.3 Metastaz Analizi	31
4.3.1 Makro Metastaz Analizleri	31
4.3.1 Mikro Metastaz Analizleri	31
4.4 İmmünohistokimya Yöntemi	32
4.4.1 Primer Tümör Dokularında İmmünohistokimya Bulguları	32
4.4.2 Akciğer Dokularında İmmünohistokimya Bulguları	34
4.4.2 Karaciğer Dokularında İmmünohistokimya Bulguları	37
4.5 Western Blot Yöntemi	39
<b>5. TARTIŞMA</b>	41
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	48
<b>KAYNAKLAR</b>	50
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	61

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1:</b>	Tümörögenizde metastaz ve basamakları	7
<b>Şekil 2.2:</b>	CCM1, CCM2, CCM3 moleküllerinin birlikte hücre içinde oluşturdukları kompleks yapı ve görevlerini gösteren şekil	11
<b>Şekil 2.3:</b>	KRIT1 (CCM1) moleküler yapısı	11
<b>Şekil 2.4:</b>	KRIT1'in $\beta$ -1 Integrin ile ilişkisi	12
<b>Şekil 2.5:</b>	Malcavernin (CCM2) moleküler yapısı	15
<b>Şekil 2.6:</b>	CCM2 ile TrkA etkileşimi	17
<b>Şekil 2.7:</b>	PDCD10 (CCM3) moleküler yapısı	17
<b>Şekil 3.1:</b>	4TLM ve 4THM grubuna ait periferik kan yayma görüntüsü	22
<b>Şekil 3.2:</b>	Karaciğer dokusuna ait mikro metastaz görüntüsü	23
<b>Şekil 4.1:</b>	Tümör büyüklük ölçümlerini gösteren şekil	29
<b>Şekil 4.2:</b>	Tümör büyüklük ölçümlerinin grafik gösterimi	29
<b>Şekil 4.3:</b>	Tümör ağırlıklarını gösteren grafik	30
<b>Şekil 4.4:</b>	Periferik kan yayma analizlerini, gösteren grafik	30
<b>Şekil 4.5:</b>	Akciğer makro metastaz analizlerini gösteren grafik	31
<b>Şekil 4.6:</b>	Karaciğer mikro metastaz analizlerini gösteren grafik	31
<b>Şekil 4.7:</b>	Primer tümörlerde CCM1, CCM2, CCM3 ekspresyonlarını gösteren panel grafik	33
<b>Şekil 4.8:</b>	Primer tümörlerde CCM1, CCM2, CCM3 ekspresyonu analizlerini gösteren grafik	34
<b>Şekil 4.9:</b>	Akciğer dokularında CCM1, CCM2, CCM3 ekspresyonlarını gösteren panel grafik	35
<b>Şekil 4.10:</b>	Akciğer dokularında CCM1 ekspresyonu analizlerini gösteren grafik	36
<b>Şekil 4.11:</b>	Karaciğer dokularında CCM1, CCM2, CCM3 ekspresyonlarını gösteren panel grafik	38
<b>Şekil 4.12:</b>	Karaciğer dokularında CCM1 ekspresyonunu gösteren grafik	39
<b>Şekil 4.13:</b>	Western Blot analizleri ve sonucu	40
<b>Şekil 4.14:</b>	Western Blot analizleri sonuçlarının grafik gösterimi	40

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>4T1</b>	:	Metastatik 4T1 meme tümörü hücre hattı
<b>4THM</b>	:	Kalbe metastaz yapmış ve buradan elde edilmiş tümör hücre hattı
<b>4TLM :</b>	:	Karaciğere metastaz yapmış ve buradan elde edilmiş tümör hücre hattı
<b>CAF</b>	:	Kanser ile ilişkili fibroblast
<b>CCM</b>	:	Cerebral cavernous malformation
<b>DAB</b>	:	Diaminobenzidin substrat
<b>DMEM-F12</b>	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	:	Deoksiribo nükleik asit
<b>EndMT</b>	:	Endotelial mezenkimal dönüşüm
<b>ERK</b>	:	Ekstra sellüler sinyal düzenleyici kinaz
<b>ESM</b>	:	Ekstra sellüler matriks
<b>FBS</b>	:	Fetal sığır serumu
<b>FERM</b>	:	Four Ezrin Radixin Moezin
<b>GBM</b>	:	Glioblastoma
<b>GCK-III</b>	:	Germ Center Kinase-III
<b>GM-130</b>	:	Golgi proteini
<b>HBSS</b>	:	Hanks' Balanced Salt Solution
<b>HHD</b>	:	Harmonin homology domain
<b>ICAP1-<math>\alpha</math></b>	:	$\beta$ 1 Integrin Cytoplasmic Domain–Associated Protein
<b>IL</b>	:	İnterlökin
<b>KLF4</b>	:	Kruppel Like Factor 4
<b>KRIT1</b>	:	Krev Interaction Trapped Protein 1
<b>LIM</b>	:	LIM domain kinase
<b>MSS</b>	:	Merkezi sinir sistemi
<b>NaCl</b>	:	Sodyum klorür
<b>OSM</b>	:	Osmo-sensing scaffold for MEKK3
<b>PBS</b>	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
<b>PDCD10</b>	:	Programlı hücre ölümü geni
<b>PECAM</b>	:	Platelet endothelial hücre adezyon molekülü

<b>PIK</b>	:	Proteaz inhibitör kokteyli
<b>PTB</b>	:	Fosfo-tirozin bağlayıcı bölge
<b>RAP1A</b>	:	Ras ilişkili protein 1
<b>RAS</b>	:	Ras protein süper ailesi
<b>RHO</b>	:	Küçük GTPaz protein ailesi
<b>ROCK</b>	:	Rho ilişkili protein kinaz
<b>SDS</b>	:	Sodyum dodesil sülfat
<b>SKM</b>	:	Serebral kavernöz malformasyon
<b>STK 25</b>	:	Serine/threonine-protein kinaz
<b>SVM</b>	:	Serebral vasküler malformasyon
<b>SVZ</b>	:	Sub-ventriküler zon
<b>TBS</b>	:	Tris buffered saline
<b>TBS-T</b>	:	Tris buffered saline Tween20 ile birlikte
<b>TRIS</b>	:	Tris (hidroksimetil) aminometan
<b>TrkA</b>	:	Tirozin reseptör kinaz A
<b>VEGFR2</b>	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>VE-kaderin</b>	:	Vasküler endotelyal kaderin

## 1. GİRİŞ

Kavernöz Malformasyonlar sporadik, ya da kalıtsal olarak hastalıkla ilgili genlerin fonksiyonlarını yitirmesi sonucunda ortaya çıkan vasküler lezyonlardır (Gunel ve ark. 1996). Damarlarda endotel hücreleri arasındaki bağlantılarda kopmalara, dolayısıyla da damar yapılarında bozulmalara sebep oldukları bilinmektedir (Baxter ve ark. 2014). Vasküler sistemde meydana gelen bu sorunlar, sızıntılara sebep olmaktadır. Bu alanda kan akımının dışarı sızmasına bağlı olarak ciddi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu sorunun merkezi sinir sisteminde görülmesi de serebral kaverno malformasyon (SKM; CCM; Cerebral Cavernous Malformations) olarak tanımlanmaktadır. SKM sonucunda merkezi sinir sisteminde kanamalar, inme ve felç gibi sorunlar ortaya çıkmakta ve hayati tehlikeye sebep olmaktadır (Cavalcanti ve ark. 2012, Baxter ve ark. 2014).

Serebral kaverno malformasyonlara sebep olan gen bölgeleri insanlarda belirlenmiş ve 3 adet lokus tanımlanmıştır; CCM1 (KRIT 1), CCM2 (OSM veya MALCAVERNIN), CCM3 (PDCD10)'dür (Cavalcanti ve ark. 2012). Bu 3 genin ürünü olan proteinler birlikte üçlü özel bir yapı sergilemektedirler. Oluşan bu özel yapı adezyon molekülleri ile tutunarak damar endotellerinin birbirine sıkıca bağlanmalarında önemli rol oynamaktadırlar.

Bu 3 proteinin birlikte oluşturdukları kompleksteki görevlerinden farklı olarak bireysel başka görevleri de bulunmaktadır (Denier ve ark. 2006, Zhu ve ark. 2010). Çalışmamızda, normal hücrelerde bu adezyonun kurulmasında etken rol olan CCM proteinleri tümör hücrelerinde ve metastaz gözlenen dokularda aynı ekspresyon düzeyine sahip midir fikrinden yola çıkarak hipotezimizi kurguladık.

Hipotezimiz doğrultusunda; metastatik karakterleri farklı meme tümör hücrelerini kullanarak meme kanseri modeli oluşturup, bu modelde CCM proteinlerinin ekspresyonlarını immünohistokimyasal olarak değerlendirmeyi amaçladık. Planladığımız çalışmada, primer tümör ve uzak metastaz yanıtını değerlendirmek için, akciğer ve karaciğer dokularını değerlendirmeyi seçtik.

CCM proteinlerinin literatürde açıklanan rolleri dikkate alındığında, normal hücrelerde migrasyon ve hücre oryantasyonundaki etkinliği dikkate alınca, malign ve metastaz yeteneği yüksek tümör hücrelerinde ve *in vivo* modelde tümör gelişimi ve metastazlardaki ekspresyonunu ve olası rollerini gösteren herhangi bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Literatürde var olan tek çalışma; CCM3'ün benign prostat kanserindeki ekspresyonuna ek olarak malign Glioblastomadaki (GBM) ekspresyonunun açıklanması üzerine kuruludur (Lambertz ve ark. 2015). CCM3'ün *in vivo* GBM primer tümörü (Lambertz ve ark. 2015) ve *in vitro* malign T hücre hattında ekspresyonu literatürde gösterilmiştir (Lauenborg ve ark. 2010). CCM3 proteini ile ilgili var olan bu bilgiler dışında karsinogenez ile ilgili başka bir çalışmaya rastlanılmamaktadır. Bu çalışmayla; CCM3'ün diğer CCM proteinleri ile birlikte oluşturdukları kompleksten yola çıkarak; maligniteleri farklı primer tümörler ve metastazlarındaki ekspresyonları da birbirlerine paralel seyredebilir düşüncesiyle yola çıkarak; malign karakterli meme kanserleri ve metastatik organlardaki ekspresyonlarının değerlendirilmesi planlanmıştır.

## 1.1 AMAÇ

SKM'a ait CCM1, CCM2 ve CCM3 genlerinin vasküler endoteldeki rolleri ve etkinliği literatürde tanımlanmış ancak bu üç proteinin meme kanseri ve metastatik organlardaki ekspresyonları *in vitro* ve *in vivo* olarak açıklanmamıştır. Bu nedenle, bu proteinlerin özellikle tümörögenezdeki rolleri konuyu araştırmaya değer kılmaktadır. Her üç proteinin, primer tümör ile akciğer ve karaciğer gibi metastatik dokulardaki ekspresyonları; hem birbirlerine hem de farklı hücre hatlarına göre reaksiyonları, tümör hücrelerinin metastatik nişlerine göre değişebileceği fikrini akla getirmektedir. Bu düşünceden yola çıkarak; farklı malignitelere sahip hücre hatları kullanarak oluşturulan ortotopik meme kanseri modelinde; primer tümör ve metastatik organlarda bu üç proteinin ekspresyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Tümör

Dokudaki herhangi bir hücre veya hücre topluluğunun organizmanın kontrolü dışına çıkarak çoğalması, büyüyerek kitleler oluşturması tümör oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Bu kontrolsüz çoğalan hücrelerin normal hücrelere göre proliferasyon, apoptoz ve anjiyogenez süreçleri de farklılıklar göstermektedir (Cooper 1992). Tümörler benign ya da malign yapıda olabilirler. Benign karakterdeki tümörler buldukları ortamda gelişen, herhangi bir invazyon ya da metastaz yapma eğiliminde olmayan tümörlerdir. Malign tümörlere göre daha yavaş büyüme gösterirler. Malign tümörler ise daha çabuk gelişirler, geliştikleri dokunun etrafına invazyon ve yayılma eğilimi gösterirler. Tümör hücreleri yaşamları boyunca, proliferatif sinyallere sahip olmak, büyümesini baskılayacak etkenlerden kaçınmak, metastaz ve invazyonunu destekleyecek molekülleri salgılayarak mikroçevrelerini yaratmak, yeterli besin ve oksijen için anjiyogenezi uyarmak ve tüm bunların yanında da hücre ölümünden kaçınma eğilimi göstermektedirler (Hanahan and Weinberg 2011).

Tümör, normal hücrelerde oluşan DNA hasarı sonucunda ortaya çıkacak genetik bozukluklara bağlı olarak hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve anormal bir şekilde büyümesi ile ortaya çıkmaktadır. Bu DNA hasarları, hücre bölünmeleri esnasında çıkabileceği gibi bakteriler, virüsler, güneş ışınları gibi dış mutajenik etkenlere bağlı olarak da görülebilmektedirler. Günlük yaşam koşullarında DNA'mızda binlerce mutasyon olmasına rağmen immün sistem tarafından bu mutant hücreler kontrol altına alınır ve yok edilirler. Bu durum mutasyona uğrayan her hücrenin kanserleşmeyeceğinin bir kanıtıdır. Ancak temel olarak, tümör hücrelerinin ortaya çıkışında;

1. İmmün hücrelerin yetersiz kalması ve tümör hücrelerini yok edememesi,
  2. Hücrelerin proliferasyonunu kontrol altında tutan kontrol noktalarının (tümör baskılayıcı genler ve hücre siklusundaki kontrol noktaları) çalışmaması,
- Sebepleriyle ölümden kaçan tümör hücreleri 6 temel özellik gösterirler. Bunlar;
1. Normal hücre büyümesi ve bölünme sinyallerinin eksik olması

2. Kontrol kaybı ve sürekli büyüme ve bölünme yeteneği
3. Programlı hücre ölümünden (apoptoz) kaçınma
4. Sınırsız hücre bölünmesi
5. Yeni damar oluşumunu teşvik etme (anjiyogenez)
6. Oluşan bu yeni kan damarları vasıtası ile olduğu dokudan farklı dokulara göç edip yerleşme (metastaz) (Hanahan and Weinberg 2011).

## **2.2 Tümörde Dormansi**

Dormansi uyku hali demektir. Hücrelerin etki göstermediği, sessiz kaldıkları safhaya “dormansi evresi” denir. Tümör dormansisi; tümör hücrelerinin uzun bir dönem boyunca asemptomatik, tespit edilemez ve gizli şekilde kalması olarak tanımlanmaktadır. Bu dönem, hastalığın aslında var olduğu fakat klinik olarak görünür olmadığı bir evre olarak da tanımlanmaktadır. Dormansi halindeki hücreler büyüme gösterirler ancak bu büyüme çok daha yavaş gerçekleşmektedir. Tedaviden ve konağın immün sisteminden kaçma ve kendini yenileyebilme yeteneğine sahiptirler. Cerrahi işlemle tümör dokusu alınsa da dormansi halinde kalan hücreler olabilir ve bu hücreler bir süre sonra büyüyüp çoğalarak kanserin yeniden kendini göstermesine neden olabilirler. Tümörde dormansiden sorumlu olduğu düşünülen hücresel dormansi, anjiyogenik dormansi ve immünolojik dormansi olarak 3 farklı yol çizilmektedir (Paez ve ark. 2012, Giacotti 2013, Wang and Lin 2013).

### **2.2.1 Hücresel Dormansi**

Hücrelerin sessiz ve hücre siklusunun G0 fazında durduğu bir dönem olarak nitelendirilmektedir. Bu hücreler normal hücre siklusuna girmezler; büyümenin duraklaması, büyüme faktörleri, sitokinler, nütrientler veya kimyasal ajanlar tarafından indüklenen bazı etkiler altında geri dönebilmektedir (Wang and Lin 2013).

### **2.2.2 Anjiyogenik Dormansi**

Tümör kitlesinin proliferere olması ve kitlesel olarak büyümesi için; ortamın daha fazla oksijen ve besine ihtiyacı olacağından yeni kan damarlarının oluşumu tetiklenir. Fakat bazı tümör hücreleri anjiyogenik büyüme kapasiteleri bakımından zayıftırlar. Dolayısıyla tümörlerin proliferasyon kapasiteleri artmasına rağmen, anjiyogenik



yanıtları başlatma yeteneği “anjyogenik dormansi” olarak adlandırılmaktadır ve tümör mikroçevresinde apoptotik sinyallerin artmasıyla dengelenmektedir (Wang and Lin 2013).

### **2.2.3 İmmünolojik Dormansi**

İmmün sistem ve dormant tümör hücreleri arasındaki dengenin sağlanmasında ek bir mekanizmanın varlığından söz edilmektedir. İmmün sistem hücreleri ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimler yok etme, denge ve kaçış olarak sınıflandırılmaktadır. İmmün hücrelerin, tümör hücrelerini yakalamaları ve yok etmeleri sonucunda hücreler etkisiz hale getirilmektedir. Bazı hücreler tamamen ortadan kaldırılamaz ancak büyümeleri ve gelişmeleri belli bir süre baskılanır. İşte bu baskılanma hali; denge durumunu göstermekte ve tümörün immünolojik dormanside kalmasıyla ilişkilendirilmektedir (Wang and Lin 2013).

### **2.3 Meme Kanseri**

2012 yılı verilerine göre; Dünya’da 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm ortaya çıkmıştır. Önceki verilere göre tüm değerlerin arttığı dikkati çekmektedir. Meme kanseri en çok tanı konulan ve akciğer kanserinden (%14) sonra en sık görülen kanser tipidir (%12) (McGuire ve ark. 2015). Uluslararası Kanser Ajansı özellikle meme kanserindeki artışa dikkat çekmektedir. Meme kanseri; meme dokusunun herhangi bir yerinden kaynaklanabilmekte ve sıklıkla da meme kanallarından kaynaklanan “duktal” kanserlere rastlanılmaktadır (McGuire ve ark. 2015).

Meme, epitel dokuya eşlik eden fibröz ve destek dokuların birlikteliğinin yanında, salgı bezleri ve değişken miktarda yağ dokusundan oluşmuş; yoğun kan ve lenf damarı ile beslenen yapıya sahip bir dokudur. İçerdiği hücreler ve gelişimsel olarak farklı evrelerden geçmesi, hücresel değişimin yoğun görünmesi gibi etkenlere de bağlı olarak hücresel alanda önemli bir araştırma konusu olmuştur. Gelişim sürecinde, östrojen ve progesteron hormonlarının kontrolü altında olup; embriyonal, puberte, laktasyon ve laktasyon sonrası dönemlerden geçmektedir. Her hamilelik ve beraberindeki laktasyon aşamalarında hücreler proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz aşamalarını geçirmektedirler. Hücrelerin sürekli proliferasyon ve farklılaşma potansiyeline sahip olması genetik

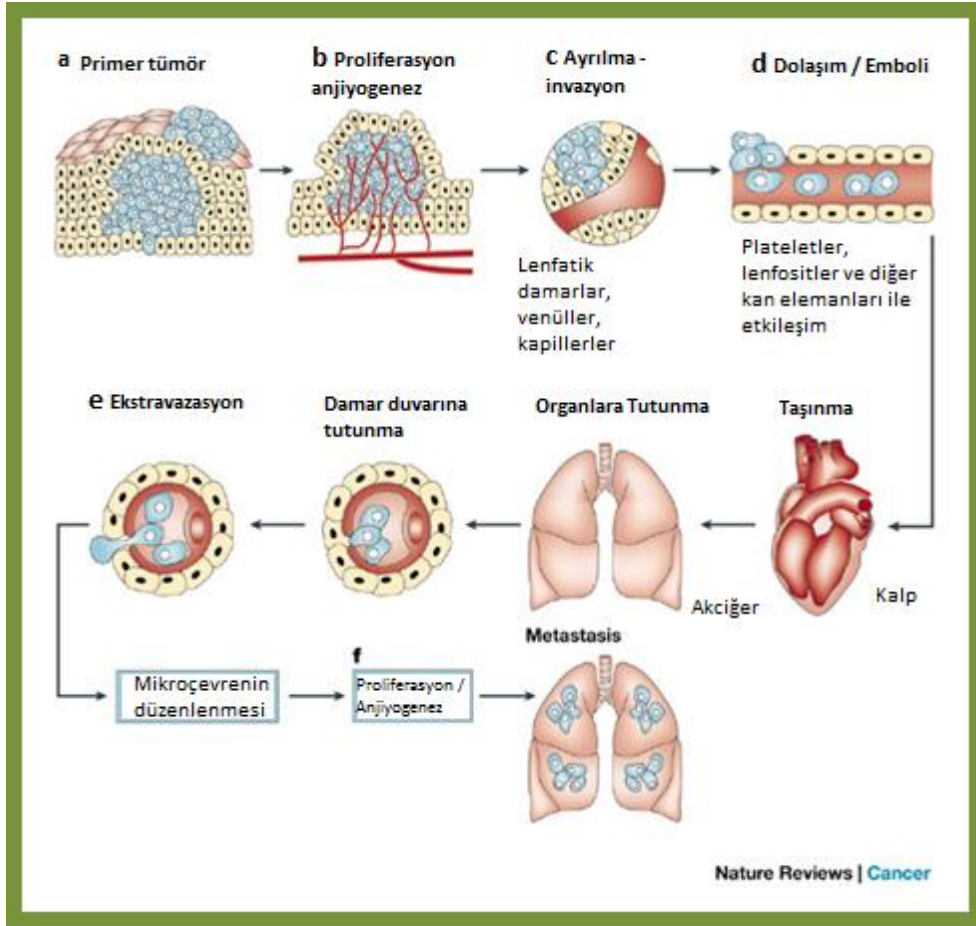
kodlanma sırasında hataların ortaya çıkabilmesine sebep olacağından tümöre yatkınlık açısından önemli bir yere sahiptir (McGee ve ark. 2006).

Meme kanseri genel olarak malign karakterli ve metastaz yapma yeteneği yüksek bir kanser türüdür. Metastaz ile birçok dokuya yayılan tümör hücreleri yerleştikleri dokulara zarar vererek meme kanserine bağlı ölüm oranını artırmaktadır.

#### **2.4 Metastaz**

Primer tümör dokusundan ayrılmış hücrelerin farklı yollarla vücutta başka bölgelerde yeni tümör odakları oluşturmasına metastaz denir (Guan 2015). Metastaz yapmış bir tümör, ayrıldığı primer tümör dokusundan bağını tamamen kopartmakta ve yeni yerleştiği dokuda, dokunun da mikro çevresine bağlı olarak yeni karakterler kazanmaktadır. Birkaç malign tümör dışında bütün malign tümörler metastaz yapma eğilimindedirler (Chaowalit ve ark. 2004, Bonaros ve ark. 2007). Malign tümörler zaman içerisinde dormant pozisyonlarından kurtulup birçok dokuya metastaz yapma yeteneği kazanırlar. Metastaza başlayan tümör hücreleri artık kan ve lenf yolunu kullanmaya başladığından hızla başka dokulara yayılma eğilimindedir (şekil 2.1).

Meme kanserinde metastaz genellikle kemik, akciğer, karaciğer, beyin gibi organlara yöneliktir. Tümör hücreleri metastatik özellik kazanma ve başka dokulara yerleşebilmek için bazı basamakları takip etmek zorundadırlar.



**Şekil 2.1:** Tümörogenizde metastaz ve basamaklarını açıklamaktadır (Fidler 2003).

Primer meme tümörü hücreleri proliferasyon ile hücre sayılarını çoğaltırlar ve ortamın besin ve oksijeni artan hücre sayısına yetersiz hale gelene kadar da bu çoğalma eylemi devam etmektedir. Çünkü, dokunun mikro çevresi tümör hücrelerinin çoğalmasında ve yer edinmeleri için uygundur. Ancak besin ve oksijen yetmez hale gelince; tümör hücresi ve tümörün bulunduğu mikro çevreden birçok faktör salınmaya başlar. CXCL1, CXCL2, CXCL3 ve CXCR4 gibi kemokinler ve reseptörlerin tümör büyümesi ve apoptozda önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca salınan IL-2, IL-6, IL-8 ve IL-34 gibi interlökinler de tümörogenizde etkilidirler (Shariat ve ark. , Luca ve ark. 1997, Zhang and Adachi 1999).

Salgılanan bu faktörler anjiyogenezi, tümör gelişimini ve metastazı tetikleyerek tümörün içinde bulunduğu hipoksik ortamdan kurtulup yeni damar oluşumuyla daha çok oksijen ve besinle karşılaşmasına olanak tanımaktadır. Anjiyogenik etkiyle tümör çevresinde

çok sayıda yeni damar oluşumu gözlenmekte ve beslenen tümör daha çok prolifer olma yeteneği kazanmaktadır. Ancak bir süre sonra ortam koşulları primer tümöre yeterli gelemeyen ve tümör bu kez kendi içerdiği ligandlarına uygun reseptörlerin bulunduğu ikincil organlara gitme eğilimi kazanırlar. Primer tümör dokusundan ayrılan hücreler; stromal dokuyu invaze ederek vasküler endoteli yıkacak invaziv özellikleri sayesinde intravazasyonu gerçekleştirmektedirler. H. Yamaguchi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; tümör hücreleri proteazlar, hücre adezyon molekülleri ve hücre membranını yeniden şekillendiren proteinlerce zengin olan ve intravazasyonda önemli bir rolü olan invadopod denilen hücresel çıkıntı yapılarına sahiptirler (Yamaguchi ve ark. 2005). Bu yapılar sayesinde intravazasyon daha kolay gerçekleşmektedir. Dokudan damar içerisine geçmenin ardından damar içerisinde ilerleyerek ikincil odak alanlarına göç ederken damar içerisinde karşılaşacakları immün sistem hücrelerinden de kaçınmak zorundadırlar (Aguirre-Ghisso 2007, Paez ve ark. 2012, Sosa ve ark. 2013, Sosa ve ark. 2014).

Kanser ve tümör hücrelerinin metastazıyla ilgili ilk bilgiler Stephen Paget tarafından “seed and soil; tohum ve toprak” hipoteziyle ortaya atılmıştır. Tohum ile tümör hücresinden, toprak ile de tümör hücresinin metastazı sonrasında yerleştiği ya da yerleşeceği dokudan bahsedilmektedir. Bu teori; metastaz yapan hücrenin her organda yerleşip, gelişemeyeceğini ifade etmektedir. Bu teoriyle metastaz yapan tümör hücreleri primer tümörlerine uygun dokuları seçer ve burada çoğalma potansiyeli kazanırlar yani üreyeceği ortam konusunda seçici oldukları belirtilmektedir. Bu seçicilikte, büyüme faktörleri ve ortama salınan sitokinlerin etken olduğu söylenmektedir (Paget 1889). Fakat Hamilla S. ve ark.’ları bu durumun gerekli olmadığını göstermiştir. Bu çalışmada, tümör hücrelerinin metastaz yaparken, gidecekleri doku ve organlardaki endotel bariyer seçiciliği, dokunun matriks sertliği gibi seçeneklerin uygun olmasına bakmaksızın metastaz yapabildikleri ve her zaman “tohum–toprak” hipotezindeki prensibe göre hareket etmedikleri son yıllarda yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (Hamilla ve ark. 2014).

Tümör hücreleri metastaz yapacakları ikincil dokuya damar yoluyla geldikten sonra; hücreler damar duvarına invaze olur. Metastaza başlayan bu tümör hücreleri damar

duvarının epitel hücrelerin arasındaki bağlantıları yıkarak epitelyal duvarı aşar ve ekstrasvazyonla dokuya geçerler. Ulaştıkları yeni dokularda hızla proliferasyon olarak primer tümörlerine benzer şekilde kitleler oluşturmaya başlamaktadırlar. Bu şekilde metastazlardan da zaman içerisinde ikincil, üçüncül metastaz alanları gelişerek tüm vücuda yayılım hızla gerçekleşmektedir.

## **2.5 Vasküler Malformasyonlar**

Vasküler malformasyonlar vücudun belli bölgelerinde görülen anjiyogenik gelişim sorunlarının neden olduğu damar bozukluklarıdır. Akciğer, karaciğer ve gastrointestinal sistem gibi birçok organda görülmesine rağmen sıklıkla beyinde karşımıza çıkmaktadırlar. Oluştukları organlar nedeniyle; vasküler malformasyonlar, tıkanma, kanama ve kalp yetmezliği gibi sorunlara yol açtıkları için hayati tehlikesi yüksek sorunlardandır. Vasküler malformasyonların bir kısmı kalıtsal olarak ortaya çıkabildiği gibi büyük çoğunluğu da sporadik olarak gelişmektedir (Vikkula ve ark. 2001).

### **2.5.1 Serebral Vasküler Malformasyonlar**

Vasküler malformasyonların farklı tipleri bulunmaktadır. Bunlar hemanjiyomlar, kapiller malformasyonlar, lenfatik malformasyonlar, venöz malformasyonlar ve arteriyovenöz malformasyonlardır. Bu rahatsızlıklar genellikle boyun ve baş bölgesinde görülmektedirler (Greene 2011).

Serebral vasküler malformasyonlar (SVM), merkezi sinir sisteminde (MSS) ve özellikle de beyinde görülen, serebral dolaşımı etkileyen vasküler lezyonlar olarak tanımlanmaktadır (McCormick 1966). SVM'ların bir kısmı embriyonik dönemdeki duraksamaya bağlı olarak ortaya çıktığı için, patolojinin tipine ve oluş evresine göre farklı histolojik ve klinik bulgularla seyretmektedirler (Stein ve ark. 1983).

### **2.5.2 Serebral Kavernöz Malformasyonlar**

Serebral vasküler malformasyonlardan biri; serebral kavernoma olarak isimlendirilen serebral kavernöz malformasyonlardır (SKM). SKM'lar vücudun birçok yerinde özellikle deri ve retinada görülebilir fakat genellikle en ciddi semptomlar MSS'nde görüldüğü için bu adı almışlardır (Labauge ve ark. 2007). SKM'lar, kapillerlerin var

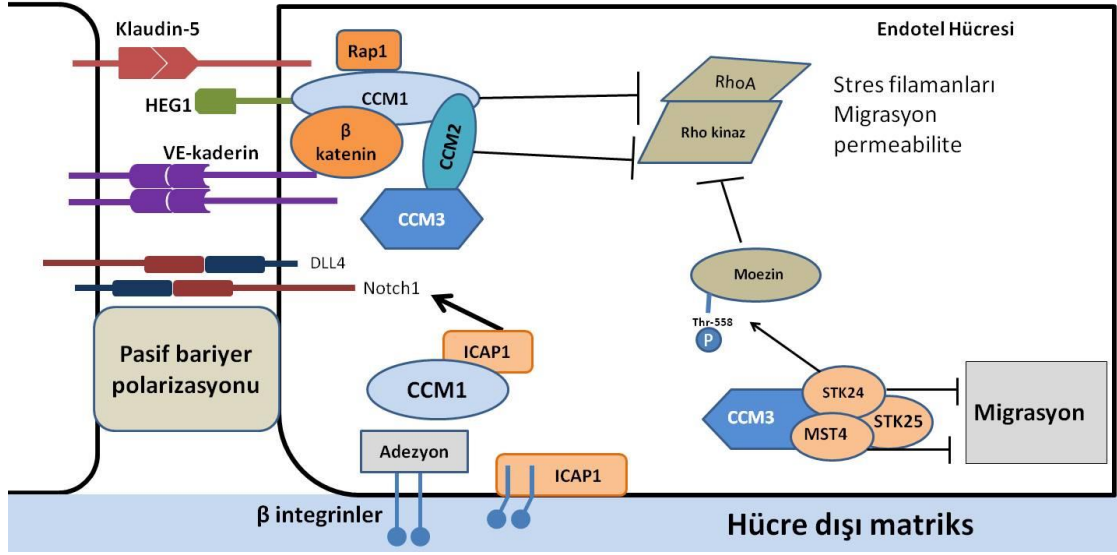
olan damar elemanlarını kaybetmesi dolayısıyla kapiller düzenin bozulması ve bunun sonucunda anormal vasküler yapıların ortaya çıkmasıyla kendini gösteren bir hastalıktır (Uranishi ve ark. 2001). Kavernomların etrafında normal beyin parankim dokusunun olmayışı, bu alanı besleyen ana arterin yokluğu nedeniyle lezyon içindeki kan akımı düşmektedir (Clatterbuck ve ark. 2001). Işık mikroskopik incelemelerde, kan ile dolu kanallar ya da kavernlerden oluşan lezyonlar anormal vasküler yapılar sergilemektedirler (Tanriover ve ark. 2013). Lezyon içindeki esas hasarın damar endotelinde, altındaki bazal lamina ve perisitlerde olduğu elektron mikroskopik incelemelerde gösterilmiştir. Endotelial hücrelerin altındaki bazal laminanın ince membranöz bir yapı sergilediği hatta yer yer kaybolduğu, eritrositlerin endotel hücreleri arasından geçişini kolaylaştırarak kavern içerisine kanın girişiyle hemorajinin gözlenmesi lezyonların önemli oluşumlarıdır. Beyin parankimasına kan hücrelerinin kolaylıkla çıkması bu alanlarda hemosiderin depozitlerinin oluşmasına sebep olmaktadır ve endotelial hücre bağlantılarının kaybolmasıyla hem kan beyin bariyerinin bozulmasını hem de hemoraji riskini arttırmaktadırlar (Tanriover ve ark. 2013).

SKM'lar %0,5–1 oranında özellikle Hispanik-Amerikalılarda (İspanyol kökenli Amerikalılar) ve Kafkaslarda (%40) görülmektedir. Bu vakaların %80'i sporadik, %20'si ise genetik olarak ortaya çıkmaktadır (Labauge ve ark. 2007).

## **2.6 Serebral Kavernöz Malformasyonlardan Sorumlu Genler**

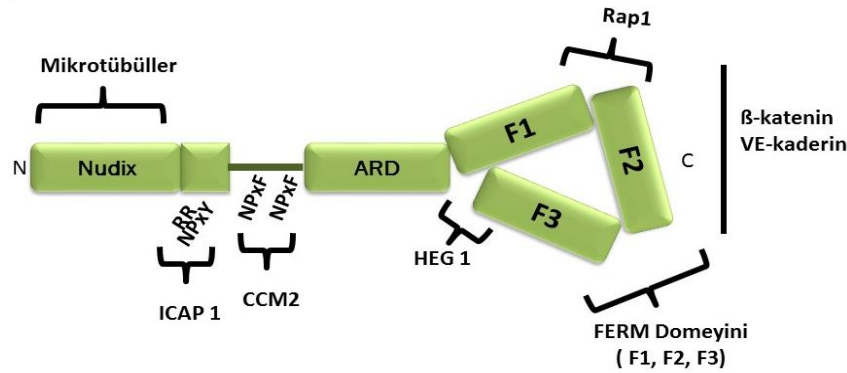
Genetik çalışmalar lezyonun oluşumundan sorumlu 3 gen bölgesinin varlığı üzerine yoğunlaşmıştır. Bunlar; KRIT1 (KREV1-RAP1A interaction trapped-1 veya CCM1) kromozom 7q, CCM2 (OSM veya Osmo-sensing scaffold for MEKK3) kromozom 7p ve PDCD10 (Programmed cell death 10 veya CCM3) kromozom 3q genleridir. Yapılan bağlantı (linkaj) analizleri bu genlerden en çok CCM1'in etkin rol oynadığını ancak diğer iki genin de buna eşlik ederek hareket ettiğini vurgulamaktadır (Şekil 2.2) (Craig ve ark. 1998). CCM1 ve CCM2 membran bağlantılarının kontrolü için birçok farklı şekilde işlev gören mutlak moleküllerdir. RhoA–Rho kinaz aktivitesini inhibe eder, ara bağlantı ve sıkı bağlantıları dengeli bir yapıda tutar. CCM3; CCM2 ile etkileşimde bulunur, GCKIII kinazlar (Mst4, STK24, STK25) ile kompleks bir yapı oluşturur. Üç CCM proteinlerinin hepsi de anjiyogenezi kontrol etmek ve endotel hücrelerinin

fonksiyonel, sorunsuz işlev görmelerinde önemli görevlere sahiptirler. Bu görevleri; endotel hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve anjiyogenezin inhibisyonu; yani vasküler çeperin fonksiyon ve bütünlüğünü koruyarak sağlarlar. Ayrıca CCM1 etkileşimde olduğu ICAP1 ile beraber hücre adezyonu ve hücre dışı matriksin yeniden yapılanması işlevlerinde etkilidirler (Fischer ve ark. 2013).



Şekil 2.2: CCM1, CCM2, CCM3 moleküllerinin birlikte hücre içinde oluşturdukları kompleks yapı ve görevleri.

### 2.6.1 Ccm1(KRIT1)



Şekil 2.3: KRIT1 (CCM1) Moleküler yapısı

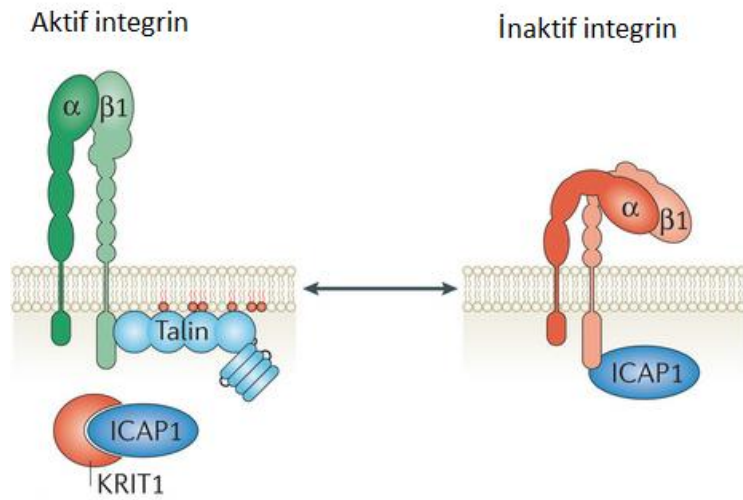
7. Kromozomun q11–q22 lokusunda yer alan ve SKM'nun ailesel formlarında ilk bulunan gen dir (Craig ve ark. 1998). CCM1'in ürünü olan KRIT1; RAS protein ailesine

ait bir GTPaz olan RAP1A ile etkileşen ve ankirin tekrarlı yapı barındıran bir proteindir (Serebriiskii ve ark. 1997, Laberge-le Couteulx ve ark. 1999). KRIT1 geni, 20 ekzona sahip, 736 aminoasitlik proteini kodlamaktadır. Bu genin 16 ekzonu; üretilen proteinin 3 adet NPxY/F motifi ve ankirin tekrarlı bir yapıya sahip N-terminalini, 14-20 eksonları da 4.1 ezrin, radixin, moesin (FERM) domainini barındıran C-terminalini kodlamaktadır (Şekil 2.3) (Marchuk ve ark. 2003, Labauge ve ark. 2007).

CCM1 üzerinde yapılan çalışmalar, bu genin kavernoza malformasyonda etken olmasının yanında birçok fizyolojik olayda da önemli görevleri üstlendiğini göstermektedir. Özellikle arteriyel damar endotelindeki ekspresyonu SKM'da vurgulanmış ancak yıllar içerisinde yapılan araştırmalarda endoteldeki rolleri tanımlanmaya çalışılmıştır.

### CCM1'in endotel bariyerinin korunmasındaki görevleri

CCM1'in NPxY/F motiflerinden ilki  $\beta 1$ -integrin regülatörü olan integrin sitoplazmik adaptör proteini 1 alfa (ICAP1 $\alpha$ ) ile etkileşime girerek  $\beta 1$ -integrine talin ve kindlin proteinlerinin bağlanmasına engel olur (Şekil 2.4). Talin ve kindlin;  $\beta 1$ -integrine bağlanarak hücrel integrin aracılı sinyal iletiminde görevli moleküllerdir (Bouvard ve ark. 2003, Moser ve ark. 2009). ICAP1 $\alpha$ ,  $\beta 1$ -integrine bağlanınca; integrin aktif halini kaybeder ve bu durum endotel hücrelerinin arasındaki bağlantı komplekslerinde bozulmalara ve açılmalara sebep olur.



**Şekil 2.4:** KRIT1'in  $\beta 1$ -integrin ile ilişkisi. KRIT1 ICAP1 $\alpha$  molekülüne bağlanır ve bu molekülün  $\beta 1$ -integrin ile etkileşimine engel olur (Bouvard ve ark. 2013).



SKM lezyonlarında endotelial bariyerin bozulduğunun gözlenmesi dolayısıyla bu bariyerin güçlenmesi için; hücrede Rho (Ras homolog genleri proteinleri) süper ailesine ait proteinlerin miktarında azalmaya ek olarak Rac (Ras ilişkili C3 botulinum toksin substrat) proteinlerinin de artması gerekmektedir. Borikova ve ark.'nın yaptıkları çalışmayla, KRIT1'in Rho sinyalizasyonunda inhibitör role sahip olduğunu ve bu inhibisyonun da endotelial bariyer oluşumu ve devamlılığının sağlanmasını güçlendirdiğini göstermişlerdir (Borikova ve ark. 2010). Rho'nun aktivasyonu ise; aktin sitoskeletoninde miyozin hafif zinciri ve LIM kinazların (LIM domain içeren cofilin protein ailesine ait kinazlar) ROCK (Rho ilişkili protein kinaz) aracılığıyla fosforillenmesini sağlamaktadır Bu yolağın aktivasyonu, beyindeki damar endotelinde yer alan okludin ve kludin-5'i fosforilleyerek yapılarında konformasyonel bir değişime sebep olmakta ve görevlerini yapamaz hale getirmektedir (Borikova ve ark. 2010). Okludin ve kludin-5'in hücreler arası sıkı bağlantı kompleksleri olduğundan, endotelial hücreler arasındaki bu bağlantıların bozulması lezyona kan akımının girişini kolaylaştırmaktadır (Şekil 2.2)(Yamamoto ve ark. 2008). Bu nedenle de; KRIT1 geninin kaybı, SKM lezyonlarının ortaya çıkışında oldukça önemli olup; hücre morfolojinin belirlenmesinde dinamik bir yapı sergilemektedir (Schuyler and Pellman 2001).

Gunel M. ve ark. KRIT1'in mikrotübül ile ilişkili bir protein olduğunu ve mitoz sonunda mikrotübüllerin artı uçlarında bulunduğunu göstererek bu proteinin mikrotübüllerin hedef tayininde muhtemel bir role sahip olduğuna işaret etmişlerdir. Yapılan immünopresipitasyon deneylerinde KRIT1 ve tubulin proteinlerinin birlikte aynı kompleks yapıda yer aldıkları, fakat birbirleriyle özellikle direk etkileşimde olmalarının gerekmediği öngörülmüştür (Gunel ve ark. 2002).

### **CCM1'in Anjiyogenezdeki Rolü**

Anjiyogenezin başlamasında ilk adım, endotel hücrelerinin tüp şeklini alması, endotel hücrelerinin birbirleri ve hücre dışı matris ile etkileşimleriyle gerçekleşmektedir. Hücreler arası adezyon molekülü olan PECAM1 (Platelet endotelial hücre adezyon molekülü 1), endotelial tübül şekillenmesinde rol alan (Albelda ve ark. 1991, Reedquist ve ark. 2000) ve KRIT1'in etkileşim içerisinde olduğu partneri Krev1'in GTPaz aktivitesini destekleyen bir moleküldür (Serebriiskii ve ark. 1997). PECAM1

mikrotübüler hücre iskeletine Krev1 ve KRIT1 ile bağlanarak potansiyel bir sinyal yolağının çalışmasına olanak tanımaktadır.

ICAP1 $\alpha$ , KRIT1 bağlayan protein  $\beta$ 1-integrinin C terminaline bağlanmakta ve hücre ve matriks etkileşimleri hakkında hücre içerisine bilgi taşımaktadır (Zhang ve ark. 2001, Zawistowski ve ark. 2002). Sonuç olarak, bir yandan KRIT1 ve mikrotübüller arasındaki bağlantı, diğer yandan da KRIT1 ile Krev1'in ICAP1 $\alpha$  ile olan ilişkisi hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantıları arasında potansiyel bir sinyal yolağı görevini üstlenmektedir. Bu bağlantıların bozulması ya da fonksiyonunu kaybetmesi, hücrelerde mikrotübül yönlendirmesinin bozulmasına ve anormal kapiller gelişimi görülmesine sebep olmaktadır. Bu durum da tübülogenezin bozulması ile sonuçlanır (Günel ve ark. 2002). SKM hastalarında tübülogenezin bozulduğu ve anormal kavern yapılarının ortaya çıktığı bilinmektedir (Hogan ve ark. 2008).

Hücrede VE-kaderinlerin (vasküler endotelial kaderin) yokluğu, hücre-hücre bağlantılarında zayıflamaya yol açmaktadır. Bağlantıların zayıflaması, sinyal iletiminde sorunlara ve damarlarda anjiyogenezin tetiklenmesine sebep olmaktadır. Hücrede KRIT1'in yokluğu,  $\beta$ -kateninlerin VE-kaderinlerden ayrılıp serbest kalmasına ve sitoplazmadan nükleusa translokasyona yönelmesine neden olur. Nükleusa geçişle transkripsiyonel bir aktivasyon görülür ve hücre döngüsü yeniden aktive olur. Bu durum, hücrenin bölünme ve proliferasyonunu tetiklerken anjiyogenez de beraberinde etkilemektedir (Limbourg ve ark. 2005, Vestweber ve ark. 2009).

### **CCM1'in Hücre Organizasyonu ve Migrasyonuna Etkileri**

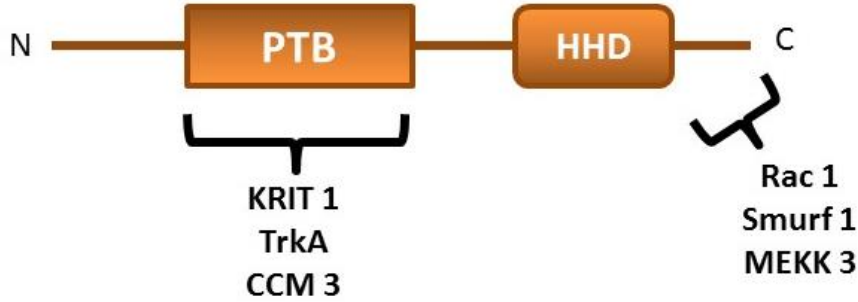
Hücre içi iskeletinin organizasyonu, kontrolü ve hücrenin hücre dışı matriks (ESM) ile bağlantılarının kurulması ve düzenlenmesinde  $\beta$ -1 integrin önemli bir role sahiptir. Sitolozde bulunan talin ve kindlin molekülleri integrinlerin  $\beta$ -1 koluna bağlanarak, hücre içi mikrotübüller aracılığıyla ilişki kurup ESM'e sıkı tutunmayı desteklemektedir. KRIT1, hücre içinde serbest halde olan ICAP1 $\alpha$  molekülü ile bağlanarak ICAP1 $\alpha$ 'nın integrinlere tutunmasını engeller ve bu durum da hücre-ESM bağlantısının korunmasını desteklemektedir. CCM1 geninde ortaya çıkabilecek bir mutasyon, hücrede KRIT1 eksikliği veya hatalı ekspresyonuna sebep olacağından; ICAP1 $\alpha$  molekülünün serbest

kalmasına ve integrinlere bağlanarak talin ve kindlin proteinlerinin bağlantısının engellenmesine neden olur. Böylelikle hücre-ESM bağlantısı bozulur ve hücre bu durum da başka sinyal mekanizmalarını tetikleyerek migrasyon eğilimi kazanır (van den Berg and Burgering 2014).

### CCM1'in Endotelial Mezenşimal Geçişteki Olası Roller

Hücrede apikal-bazal kutuplaşmasının ve hücre-hücre bağlantılarının kaybolması endotelial mezenşimal dönüşüm ile ilişkilidir. Kavernomların oluşmasındaki önemli etken, endotel hücrelerinin endotelial mezenşimal geçişe uğramaları ve yeni bir kimlik kazanmalarıdır (Cuttano ve ark. 2016). Kavernomların oluşmasında önemli bir etken KLF4 (Kruppel-like faktör 4) molekülüdür. Hücrelerde CCM1 eksikliği, KLF4 artışına neden olmakta ve bu artış da MEKK3-MEK5-ERK5-MEF2 sinyal yolğunun aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu yolak endotel hücrelerinin mezenşimal geçişinde etken bir yolaktır (Cuttano ve ark. 2016).

#### 2.6.2 CCM2



Şekil 2.5: Malcavernin (CCM2) Moleküler yapısı

CCM2/OSM/Malcavernin/MGC4607; 7p22'de yer alan 444 aminoasitlik bir proteini kodlayan 10 ekzondan oluşmuş bir gendir. PTB (fosfo tirozin bağlayan) ve HDD (Harmonin Homology Domain - hücre ölüm yolları ile bağlantılı) olmak üzere iki domeyine sahiptir ve PTB domeyini yapı olarak ICAP1 $\alpha$ 'ya benzemektedir. CCM2, PTB domeyini sayesinde KRIT1'e bağlanmaktadır. Bu ilişki sayesinde CCM2, KRIT1'i sitoplazmada tutmakta, KRIT1'in nukleusa translokasyonunu engellenmektedir (Revenu and Vikkula 2006). CCM2 hücre-hücre bağlantılarında CCM1 ve CCM3 ile

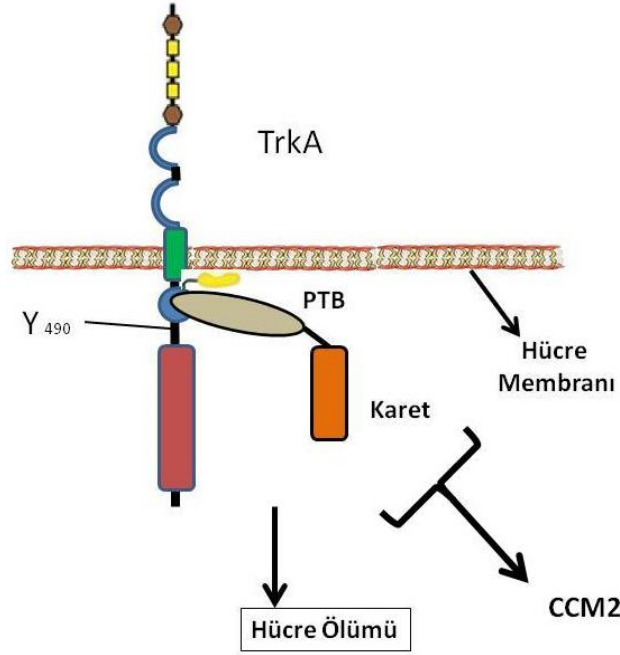
birlikte üçlü kompleks bir yapı oluşturmaktadır ve bu bağlantıyı PTB domeyini aracılığıyla yapmaktadır (Hilder ve ark. 2007).

CCM2'nin vasküler endoteldeki ekspresyonu, bu proteinin prenatal dönemdeki ekspresyonuna dikkat çekmiş ve CCM2 delesyonunda, vasküler gelişimde ortaya çıkan problemlere ilaveten, erken embriyonik dönemde embriyonun yaşayamadığı görülmüştür (Tanriover ve ark. 2011).

### **CCM2'nin Apoptoz Üzerine Etkileri**

CCM2; hücrede TrkA (Tirozin reseptör kinaz A), kaspaz aktivitesi ve hücre ölümü arasında moleküler bir bağlantı görevi üstlenmektedir. TrkA; sinir hücrelerinde bulunan, sinaptik esnekliği ve sağlamlığı sağlayan tirozin kinaz ailesine ait bir reseptördür (Huang and Reichardt 2003). CCM2, PTB "domeyini ile TrkA'nın hücre membranına yakın kısmına bağlanmaktadır.

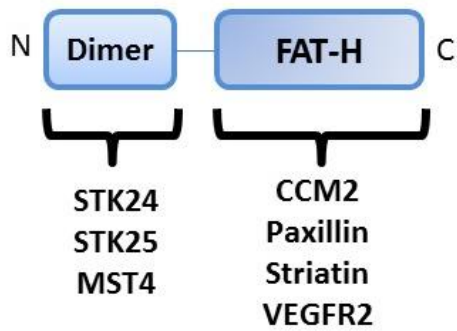
TrkA'nın hücrede bazı sinyal yollarını aktive ettiği ve hücreyi ölüm yollarına götürdüğü bilinmekte ve hücrede Bcl-2, kaspaz-3 ve p53 ekspresyonlarını etkilemektedir. TrkA'nın hücreyi ölüme götürmesi Bcl-2 ekspresyonunun baskılanması ve p53 seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Ayrıca, TrkA kaspaz-3 aktivasyonunu artırarak, hücrede Bcl-2'nin seviyesini azaltabilir ve bu durum da apoptozu başlatır (Lavoie ve ark. 2005)



**Şekil 2.6:** CCM2 hücre içerisinde TrkA ile etkileşime girerek hücrenin apoptotik bir yola girmesini sağlar.

Medulloblastoma ve nöroblastoma hücrelerinde CCM2 ekspresyonunun oldukça düşük olması, bu kanserlerde TrkA bağımlı ölümlere yönelimi hızlandırmakta ve dolayısıyla tümörün büyümesi ve yayılması da bu şekilde desteklenmektedir. Bunun üzerine, CCM2 ve TrkA'nın kombine yüksek miktardaki ekspresyonuna dayanan çalışmalarda nöroblastoma hücrelerini ölüme götürdüğü ve hastalarda sağ kalım süresini uzattığı görülmektedir. Bu bulgular, CCM2-TrkA sinyalizasyonunun tümör gerilemesinde fonksiyonel bir rolü olabileceğini akıllara getirmektedir (Harel ve ark. 2009).

### 2.6.3 CCM3



**Şekil 2.7:** PDCD10 (CCM3) moleküler yapısı

CCM3; PDCD10 (programlı hücre ölümü proteini 10) geni, 3. kromozomda q25.2–q27 lokusunda yer almaktadır. 212 amino asitlik proteini kodlayan gen, 7 ekzondan oluşmaktadır, N terminalinde dimerizasyon domeyini ve C terminalinde de fokal adezyon hedefli bir homoloji domeyini bulunmaktadır (Li ve ark. 2010).

### **CCM3'ün Hücre Oryantasyonuna ve Apoptoza Etkileri**

PDCD10'un N-terminalinde Serin/Threonine Kinazları bağlayan ve fosforilleyen aynı zamanda da PDCD10'in Germ Center Kinase III (GCK- III) ailesi ile bağlantı kurmasını sağlayan bir domeyin yer alır (Labauge ve ark. 2007, Fidalgo ve ark. 2010). Bu domeyin ve golgi proteini olan GM130 proteini ile kompleks oluşturan CCM3 proteini birlikte golgi aygıtının "cis" tarafında yerleşmiştir. PDCD10 geninde oluşan fonksiyon kaybı mutasyonunda GM130 proteininin de golgi üzerindeki konumunu koruyamadığı, golgi yapısında bozulmalara yola açtığı ve hücre içindeki bozulmaların da özellikle migrasyonda hatalara sebep olduğu söylenmektedir (Fidalgo ve ark. 2010). CCM3 ve birlikte çalıştığı ön görülen STK25 proteinlerinin, oksidatif stres altında ekspresyonunun arttığı ve apoptozu indüklediği, bu durumun da ERK kinaz aktivitesini azalttığı ile ilgili bilgiler literatürde yer almaktadır (Zhang ve ark. 2012). CCM3'ün STK25 proteinleri dışında, hücrede FAP-1 (Fas ilişkili fosfataz-1) ile birlikte bulunduğu ve CCM3'ün defosforilasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (Voss ve ark. 2007).

### **CCM3'ün Migrasyona Etkileri**

Louvi ve ark. nöronal migrasyonda, özellikle ön beyinde subventriküler zondan (SVZ) kortikal zona (KZ) göç eden progenitör hücrelerde, ventriküler ve SVZ'da yer alan postmitotik hücrelerde; CCM3'ün etkin bir rolü olduğunu vurgulamışlardır. CCM3 mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesine dayalı çalışmada, migrasyondaki etkisine rağmen nöral progenitör hücrelerin proliferasyonunda aynı derecede etkin role sahip olmadığı da belirtilmektedir (Louvi ve ark. 2014). Bunun yanında; CCM3 geninin ortadan kaldırılmasına (knock-out) dayanan çalışmalarda, kortikal tabakalanmalarda incelmelerin olduğu ve bu durumun yetişkin farelerde de devam ettiği belirlenmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmaların sonuçları, günümüzde CCM3'ün nöronal morfolojiyi etkileyebileceğini göstermektedir (Louvi ve ark. 2014). CCM3'ün knock out edildiği fare modelinde embriyonik 8,5. günde embriyoların öldüğü ve canlı doğumun

gerçekleşmediği görülmüştür (He ve ark. 2010). Yapılan detaylı incelemelerle, CCM3'ün VEGFR2 (Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü) ile etkileşimde bulunduğu ve bu sayede damar oluşumu ve anjiyogenezi kontrol ettiği ve CCM3 eksikliğinde de VEGFR2'nin CCM3 ile etkileşime girememesine bağlı olarak embriyoda ilk hematopoetik oluşumların gözlemlendiği ancak yolk kesesine bakıldığında da damarlanma yapısında bozulmaların olduğu dikkati çekmektedir (He ve ark. 2010).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Deney Grupları

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 13/07/2015 tarihli B.30.AKD.0.05.07.00/67 sayı numaralı onayı ile gerçekleştirildi.

Çalışmamızda; 2 aylık dişi Balb/c fareler kullanılmış olup deney grupları metastaz yapma potansiyelleri birbirinden farklı 2 hücre hattı üzerinden gerçekleştirildi. Buna göre; deney grupları:

- 4THM: 4T1 hücrelerinin kalbe metastaz yapmaları sonucunda elde edilen metastatik hücrelere 4THM (4T1- heart metastatic) adı verilmiş ve bu hücrelerin diğer gruba göre daha az agresif oldukları literatürde yer alan önceki çalışmalarda tanımlanmıştır (Erin ve ark. 2013).

- 4TLM: 4T1 hücrelerinin karaciğere metastaz yapmaları sonucunda elde edilen hücrelere 4TLM (4T1-liver metastatic) adı verilmiştir. Bu hücreler en agresif ve en migratif karaktere sahip hücrelerdir (Erin ve ark. 2013).

- Kontrol Grubu: Tümör enjeksiyonu yapılmayan normal dişi Balb/c ırkı farelerden oluşmaktadır.

Her grupta 10 fare olacak şekilde hayvanlar gruplandırıldı.

#### 3.2 Hücre Kültürü:

##### Kullanılan Solüsyonlar

1. HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

2. DMEM-F12

3. FBS (Fetal Bovine Serum)

4THM (kalp metastatik tümör hücreleri) ve 4TLM (Karaciğer metastatik tümör hücreleri) metastatik tümör hücreleri, içerisinde %5 FBS (fetal bovine serum), 2 mM L-glutamin, 1 mM sodyum pirüvat ve 0.02 mM non-esansiyel amino asit barındıran



DMEM-F12 (Invitrogen #11320033) solüsyonunda çoğaltıldı. Hücreler %80-90 konfluensiye ulaşınca enjeksiyona hazır hale geldiler.

### **3.3 Deney Modeli:**

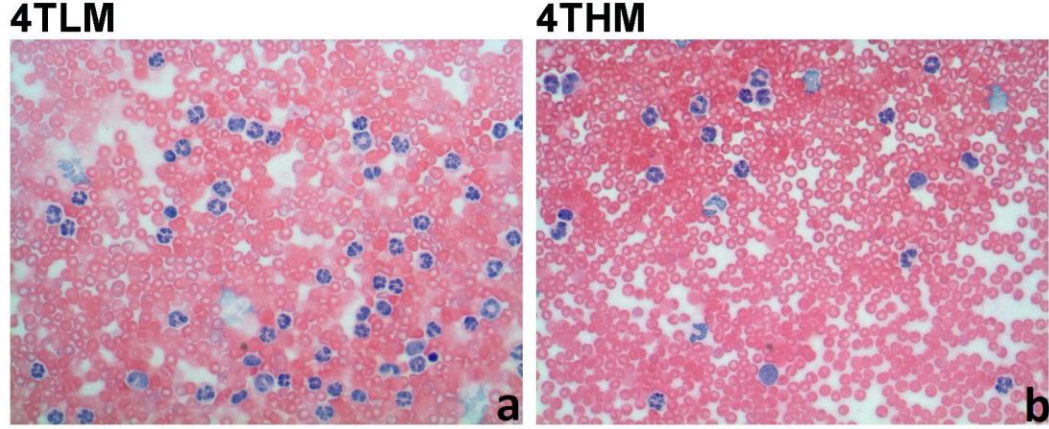
4THM ve 4TLM hücre hatları 1 ml'de  $5 \times 10^6$  hücre olacak şekilde HBSS'de (Hank's Balanced Salt Solution Thermo Fisher #14185052) çözüldü. Pipetaj yapıp tekrardan sulandırılarak her hayvana 0,1 ml olacak şekilde  $5 \times 10^5$  hücre sağ meme dokusuna ortotopik olarak enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası fareler takibe alındı ve 26. günün sonunda sakrifiye edildi. Deney süresince, tümör büyüklükleri iki günde bir kumpas ile ölçüldü ve 26. günün sonunda tümörün büyüme eğrisi hazırlandı. Bu yöntemle her iki hücre hattının birbirlerine göre primer tümör büyüklükleri değerlendirildi.

### **3.4 Tümör büyüklüğü ve ağırlığının analizi:**

Hayvanlara tümör enjeksiyonu yapıldıktan 2 hafta sonra 2 gün arayla kumpas yardımıyla hayvanların tümör büyüklükleri milimetre cinsinden ölçüldü ve not edildi. Böylece tümörlerin büyüme eğrileri ve hacimleri elde edildi. Tümör boyutları X ve Y ekseninde ölçüldü. Elde edilen ölçüler kullanılarak tümör hacmi hesaplandı. Böylece her bir hayvan için tümör büyüklükleri bulunmuş oldu. Her ölçümün ortalaması alınarak yapılan toplam 5 tümör ölçümü ile tümör hacim ilerleme grafiği elde edildi. Ayrıca sakrifikasyon sonrasında tümörlerin son ağırlıkları tartıldı ve elde edilen bulgular grafiğe aktarıldı.

### **3.5 Periferik Yayma Analizi:**

Fareler sakrifiye edilmeden hemen önce periferik yayma analizleri için heparinsiz hematokrit kapiler tüp (Isolab #401005158) ile gözlerinden birkaç damla kan alınarak hemen lam üzerine yayılıp her hayvandan 2 preparat hazırlandı. Alınan kan örnekleri hücre sayımının yapılabilmesi için önce bir süre kurutuldu ve sonrasında hematoxilen&eosin boyası ile boyandı. Kan yayma yapılan her preparattan 10'ar fotoğraf çekildi ve her fotoğrafta lenfosit, nötrofil, monosit sayımları yapıldı. Bu yöntemle, tümör enjeksiyonuna bağlı gelişen inflamatuvar yanıt değerlendirildi (Şekil 3.1-a, 3.1-b).



**Şekil 3.1:** a) 4TLM grubuna ait periferik kan yayma görüntüsü. b) 4THM grubuna ait periferik kan yayma görüntüsü. Büyütme 40X

### **3.6 Metastaz Analizi:**

Oluşturduğumuz ortotopik meme kanseri modelinde 26. günün sonunda alınan akciğer ve karaciğer dokularında oluşan metastazların analizleri yapıldı. Sakrifikasyon sırasında akciğer dokularında yoğun metastazlar gözle görülebilir boyutlardadır. Bu nedenle, akciğer dokuları için sadece makro metastaz analizleri yapıldı. Karaciğer dokuları için de mikro metastaz analizi yapıldı.

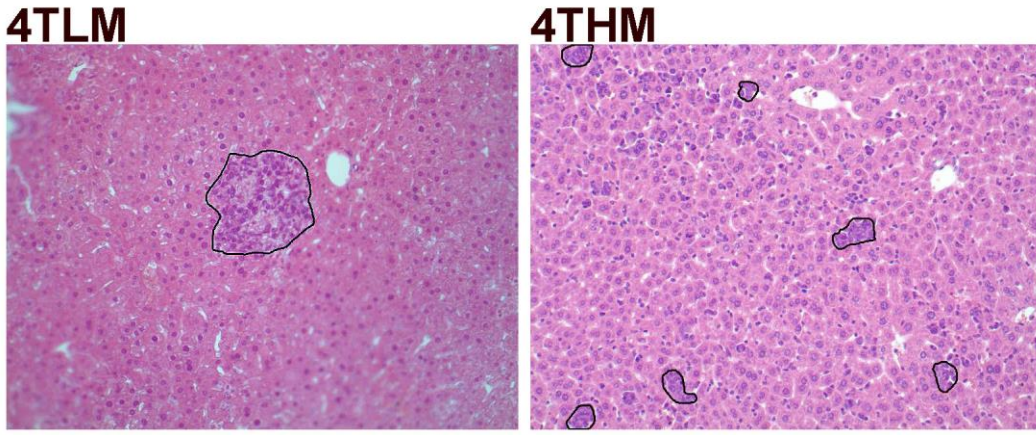
#### **3.6.1 Makro Metastaz Analizleri:**

Alınan akciğer dokuları, total olarak Bouin's fiksatifine alındı. 1 gün Bouin's fiksatifinde bekleyen dokuların gözle görülebilen metastatik alanları sayılıp not edildi. Daha sonra dokular %70 alkole alınarak fiksatif tamamen uzaklaşana kadar yıkandı. Sonrasında normal doku takip prosedürü izlenerek %70, %80, %90 ve %100'lük alkollerden geçirildi. Ksilol ile şeffaflaştırma yapıldı ve takibe devam edilerek parafine gömüldü.

#### **3.6.2 Mikro Metastaz Analizleri:**

26. günün sonunda sakrifiye edilen farelerin akciğer dokularına ek olarak karaciğer dokuları da çıkartıldı. Ancak karaciğer dokularında yüzeysel görünen metastazlar belirgin olmadığı için; doku içerisinde saklanabilecek küçük metastazların olabileceği düşüncesiyle mikro metastaz analizleri yapıldı.

Mikro metastaz analizleri için; karaciğer dokusu parafin takibe alındı. Total karaciğer dokusu birkaç parçaya ayrıldı ve aynı blok içerisine gömüldü. Poly-L-lizinli lamlara 5 µm'lik kesitler alınarak tüm karaciğer dokusu kesit atlamadan alındı. 10 slayt arayla seçilen her kesit hematoksil-eozin ile boyandı. Boyanan slaytlardan 10 farklı alan rastgele fotoğraflandı. Bu fotoğraflarda Spot Advanced 4.6 (SPOT Imaging, a division of Diagnostic Instruments, USA) programı kullanılarak mikrometre kare (µm<sup>2</sup>) cinsinden alan ölçümü yapıldı ve bu alan total doku alanına oranlanarak metastatik kitlenin alan oranı hesaplandı.



**Şekil 3.2:** Karaciğer dokusunda mikro metastaz analizi görüntüsü. İşaretlenmiş alanın toplam doku alanına oranı alınarak metastaz analizleri elde edildi.

### 3.7 Doku Takibi ve Kesit Alma

#### Kullanılan Solüsyonlar

- Formalin
- Bouin fiksatif
- Alkol
- Ksilol

26. gün sonunda sakrifiye edilen hayvanlardan meme tümörleri, akciğer ve karaciğer dokuları çıkartıldı. Primer tümör ve karaciğer dokuları %10'luk formalin (Merck Millipore #1.040.032.500) ile 24 saat oda ısısında fikse edildi. Fiksasyondan sonra dokuları fiksatiften arındırmak için akar su altında yıkandı ve 1 gün suda bekletildi. Daha sonra dokulardan suyun uzaklaştırılması için 1'er gün artan alkol serilerinde (%70,

%80 %90) bekletildi. %100 alkolde 3 saat bekletilerek sonrasında ksilole alındı. Dokulardaki alkolün uzaklaştırılması için her ksilolde 5 dk.'lık bekletme basamaklarından sonra; parafin etüvüne alınarak sıvı parafinlerde 1 saat süreyle ve 3 kez değiştirerek takip sonlandırıldı. Parafine gömülen dokular bloklar halinde hazırlanarak kesit alma işlemi için hazırlandı.

Akciğer dokuları makro metastaz analizleri için 1 gün Bouin's fiksatifinde bekletilip sonrasında parafin takibe alındı.

Doku takip işlemleri sonrasında hazırlanan parafin bloklardan 5µm. kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü (Poly-L-Lizin'li Thermo Fisher #10143265) lamlara alındı. Alınan kesitler gece boyu 37°C etüvde bekletilerek iyice lama yapışması sağlandı.

### **3.8 Hematoksilen & eozin boyama protokolü**

Karaciğer dokularından alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için ksilolde 2 kez 10 dakika bekletildi. Daha sonra deparafinize edilmiş dokular sırasıyla %100 alkol, %90'lık alkol, %80'lik alkol ve %70'lik alkollerden 5'er dakika süreyle geçirildi ve suda 5 dakika bekletildi. Suya kadar getirilen dokular hematoksilen boyasına daldırılarak 3 dakika boyanması beklendi. Böylece hücrelerin nukleuslarının mavi-mor renk alması gözlendi ve ardından slaytlar suyla yıkandı ve birkaç saniye eozin boyasında bekletildi. Stoplazmalarının pembe renk almasıyla suya alınan slaytlar sırasıyla %70, %80, %90, %100 artan alkol serilerinden geçirildi. Alkolden sonra slaytlar ksilole alınarak alkolün uzaklaşması sağlandı ve Entellan (Merck Millipore # 1.079.600.500) ile kapatıldı.

### **3.9 İmmünohistokimya Yöntemi**

#### **Kullanılan Solüsyonlar**

1. Sitrik asit (pH:6.0; 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit)
2. PBS (phosphate buffered saline)
3. %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
4. Alkol serileri
5. Ksilol

## 6. Entellan

Primer tümör ve metastaz değerlendirmesi için seçilen akciğer ve karaciğer dokularında CCM1, CCM2, CCM3 proteinlerinin varlığını ve birbirlerine kıyasla ekspresyonlarını değerlendirmek amacıyla yapıldı.

Deneklere ait doku bloklarından alınan 5 m<sup>2</sup> kalınlığındaki kesitler superfrost plus (manyetik olarak statik) lamalar üzerine alınarak 1 gece boyunca 60°C'lik etüvde bekletildi. Deparafinizasyon aşaması için, parafin kesitler 2 defa 10'er dakika ksilolden geçirildi. Kesitler daha sonra azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletildi. Distile su ile 5 dakika muamele edildi. Dokudaki antijenik epitoplara ortaya çıkması için kesitler, sitrik asit tamponu (pH:6,0; 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit) içine alınarak 1 defa 7 dakika mikrodalga fırında 750 watta tutuldu. Mikrodalga uygulamasından sonra kesitler sitrik asit içerisinde 20 dakika boyunca oda ısısında soğutuldu. Kesitler fosfat tamponuna (PBS) alınıp 3 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için metanolla hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dakika bekletildi. Ardından, kesitler 3 defa 5'er dakika PBS'ten geçirildi. Dokuların çevresi hidrofobik kalemle çizildi ve özgül olmayan antikor bağlanmasını önlemek amacıyla, bloklama solüsyonu (Ultra V Block, LabVision Corporation, #TA-125UB) ile 7 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Serum kesitler üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlarla CCM1 (BIOSS bs-8546R), CCM2 (bs-11817R), CCM3 (bs-6847R) +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah tekrar PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı, biyotinli sekonder antikor ile (Vector Lab. # BA-1000) inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 3 defa 5 dakika PBS ile yıkandı ve streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 40 dakika inkübe edildi. İnkübasyonu takiben PBS ile yıkama sonrasında da DAB (SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine #D4168-50SET) substratı damlatılarak enzim substrat ilişkisi sonucunda reaksiyon bölgelerinin kahverengi olması beklendi. Bu basamak slaytları suya almak kaydıyla durduruldu. Kesitlere Mayer'in hematoksileni (DDK Italia Mayer's Hematoxylin #09-168) zıt boyama yapıldı ardından entellan ile kapatıldı. Işık mikroskobu düzeyinde meme tümörü, akciğer ve karaciğer dokularında CCM1, CCM2 ve CCM3 proteinlerinin dağılımları ve immünoreaktivite dereceleri tespit edilip fotoğraflandırdı.

İmmunohistokimyasal reaksiyonları değerlendirmek ve her antikorun ekspresyon derecesini bir diğeri ile kıyaslamak ve kantitatif bir değer belirlemek gerektiğinden; tüm boyanma reaksiyonları dokulara göre Image-J (Image Processing and analysis in Java – NIH) analizleri yapılarak değerlendirildi.

### **3.10 Image –J analizi:**

Image-J programı kullanılarak dokularda ekspresyon görülen yerler işaretlendi ve bu alan program ile hesaplandı. Daha sonra total doku alanı seçilerek bu alan ölçümü ile ekspresyon görülen alanlar birbirine oranlandı. İmmünohistokimyasal boyanmaların her birinin sonuçları Image-J programı yardımıyla bulunarak birbirleri ile kıyaslandı.

### **3.11 Western Blot Yöntemi**

Deneklerden aldığımız primer tümör dokularında aradığımız CCM1, CCM2 ve CCM3 proteinlerinin varlığını ve miktarını belirlemek için Western Blot yöntemini ile sonuçlar değerlendirildi.

#### **3.11.1 Dokulardan Lizat Hazırlanması**

##### **Kullanılan Solüsyonlar**

##### **Lizis Buffer:**

- 10ml 0,1M Tris (pH 7.4), (Bio-Rad, #161-0719)
- 90ml distile su, 1ml 100X Na-orthovanadate (Sigma, #S6508)
- 1gr SDS (Sigma,# L4390)
- Proteaz inhibitör kokteyli (PIK) (Protease inhibitor coctail tablet, Roche, #1169749800120)

Doku temini esnasında alınan ve sıvı nitrojende -196°C’de saklanan dokulardan lizatlar hazırlandı. Primer tümör doku örnekleri, bıçakla iyice parçalanıp ezildi ve ependorf tüplerine alınarak ağırlıkları tartıldı. 0,2 gr doku başına 600 mikrolitre lizis buffer ve 25 mikrolitre PIK olacak şekilde hesaplama yapılarak eppendorflara lizis buffer ve proteaz inhibitör kokteyli eklendi. Örneklerin lizis buffer ile iyice karışmaları sağlandıktan sonra 20 dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra sonikasyon ile daha iyi parçalanmaları ve

homojenizasyonları sağlandı. 30 dakika daha buz üzerinde bekletilerek toplam 50 dakika lizis buffer ile inkübasyonu sağlandı. Örnekler +4°C'de 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp yeni ependorf tüplere konuldu, pelet kısmı atılarak lizatlar hazırlandı. Hazırlanan lizatlar -20°C de muhafaza edildi.

### **3.11.2 Western Blot Protokolü**

#### **Kullanılan Solüsyonlar**

##### **5X Yürütme Tamponu:**

- 9 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- 43.2 gr Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
- 3gr SDS (Sigma,# L4390)
- 600 ml Distile Su

Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı

##### **Transfer Tamponu:**

- 14.3 gr Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
- 3 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)

Karışım 700 ml distile su içerisinde çözüldü. Çözülen solüsyona 200 ml Metanol (Merck,#1.06.008.2500) eklendi ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

##### **Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):**

5gr süt tozu (Bio-Rad) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü ve +4°C'de en fazla 24 saat kalacak şekilde muhafaza edildi.

##### **10X TBS Tamponu:**

- 60.55 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- 87.66 gr NaCl
- 800 ml distile suda çözdürüldü. pH'ı 7,4'e ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

### **TBS-T Solüsyonu:**

Hazırlanan 10X TBS'ten alınan 100ml solüsyon distile su ile 1 litreye tamamlandı ve böylece 1X TBS elde edilmiş oldu. Elde edilen 1 litre 1X TBS içerisine 1000µl Tween-20 (Sigma, P9416) eklendi ve oda ısısında saklandı.

- Thick Blot Paper (Bio-Rad,#165-0921)
- Blotting-Grade Blocker nonfat dry milk (Süt tozu) (Bio-Rad, # 170-6404)
- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, #34080)
- Nitroselülöz Membran (Amersham,#RPN203D)
- PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific,# 26619)
- CL- Xposure film 18x24 cm (Thermo Scientific,# 34089)
- PQ Universal Developer 5L (ILFORD,#1757314)
- Hypam Fixer 5L (ILFORD,#1758285)

Çalışılacak proteinlerin ağırlıkları (kDa) göz önüne alınarak uygun jeller hazırlandı (%12'lik bis-akrilamid jel). Her kuyucuğa 20 µl örnek yüklendi ve 100V elektrik ile 2 saat süreyle elektroforezi yapıldı. Elektroforez aşamasından sonra blotlama işlemi yapılarak jeldeki proteinlerin membranlara aktarılması sağlandı. Proteinlerin aktarıldığı nitroselülöz membranlarda istenmeyen bağlanmaları engellemek için TBS-T ile hazırlanmış %5'lik süt tozu karışımı ile 1 saat süreyle bloklandı. Bloklanmış olan membranlara herhangi bir yıkama işlemi yapılmadan uygun sıcaklık ve koşullarda (+4°C'de gece boyu) primer antikorlar uygulandı ve karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Primer antikor uygulamasından sonra 3 kez 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Yıkama aşamasından sonra sekonder antikor ile uygun sıcaklık ve koşullarda (1 saat oda ısısı) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tekrar 3 kez 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Membranlar kemilüminesan ile uygun sürede geliştirilip, membrandaki protein bantları karanlık odada filme aktarıldı.



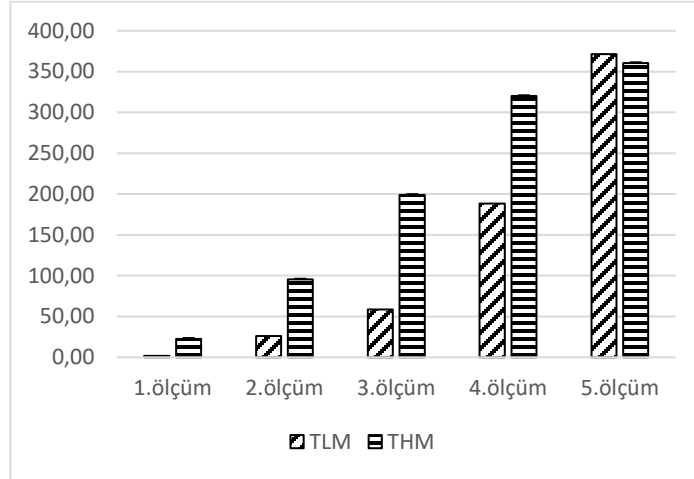
## 4. BULGULAR

### 4.1 Tümör büyüklüğü ve ağırlığının analizi

Tümör büyüklükleri kumpas kullanılarak ölçüldü ve her hayvan için not edildi. Her ölçümde aynı gruptaki hayvanların değerleri toplanıp ortalaması alınarak her bir grubun ayrı ayrı her ölçüm için ortalama değerleri bulundu. Tümör büyüklüklerinin bir önceki ölçüme göre artış gösterdiği görüldü (Şekil 4.1). 4THM hücrelerinin inokulasyonundan kısa bir süre sonra hızla büyüdüğü, 4TLM hücrelerinin ise biraz daha geç proliferasyon için hızlandıkları dikkat çekmektedir. Sonuçta her iki hücre hattı da birbirine yakın büyüklüklerde primer tümör oluşturmuştur fakat büyüme hızları fark yaratmışlardır.

mm <sup>3</sup>	4TLM	4THM
1.ölçüm	1,54	22,54
2.ölçüm	26,08	95,24
3.ölçüm	58,71	198,88
4.ölçüm	188,29	319,96
5.ölçüm	371,33	360,39

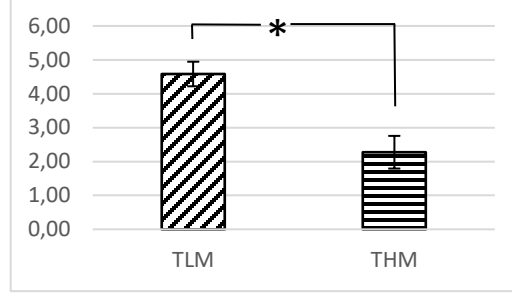
Şekil 4.1: Tümör büyüklük ölçümleri. Ölçümler hacim olarak hesaplandı ve mm<sup>3</sup> cinsinden yazıldı.



Şekil 4.2: Tümör büyüklüklerinin ölçümlerini gösteren grafik. Her ölçüm 2 gün arayla yapıldı.

Hayvanların sakrifiye edildiği 26. gün primer tümörleri çıkartıldı ve bu tümörlerin ağırlıkları hassas terazi yardımıyla tartılarak gruplar arasındaki değişim değerlendirildi. Her grupta 10 hayvan olduğundan, ortalama değerler alındı ve istatistiksel olarak gruplar arasında P = 0,005 değerinde anlamlılık saptandı. 4TLM grubunun tümörlerinin 4THM grubuna göre çok daha fazla büyüdüğü dikkati çekmekteydi. 4TLM hücrelerinin içeride

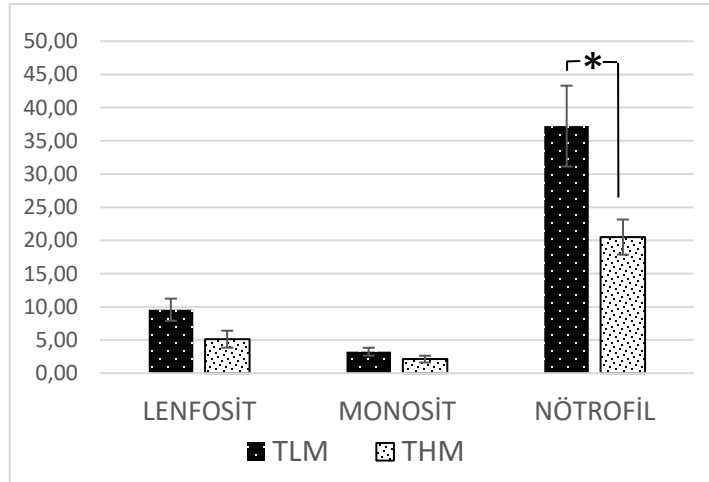
kalan kısımlarının daha da büyük olduğu ağırlıklarının kıyaslayınca fark edildi. Aynı sayıda hücre enjekte edilmesine rağmen 4TLM hücrelerinin daha ağır tümörler oluşturdukları görüldü.



**Şekil 4.3:** Tümör ağırlıkları arasındaki farkı gösteren grafik. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark görüldü ( $P = 0,005$ )

#### 4.2 Periferik Yayma Analizi

Yapılan periferik kan yayma preparatlarının incelenmesi sonucunda elde edilen veriler toplandı ve her bir grup için verilerin ortalaması alındı. Sayılan hücreler her iki grup için de farklı bulundu. THM grubu örneklerinde görülen lenfosit ve monosit hücre sayıları TLM grubunda sayılan lenfosit ve monositlere göre daha az görüldü. Fakat bu fark istatistiksel analizler sonucu anlamlı bulunmadı ( $P_{\text{lenfosit}}=0,060$ ,  $P_{\text{monosit}}=0,182$ ). Gruplar arasında karşılaştırılan nötrofil sayıları ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdi ( $P = 0,025$ ). Elde edilen ortalama veriler aşağıdaki Şekil 4.4'te gösterilmektedir.

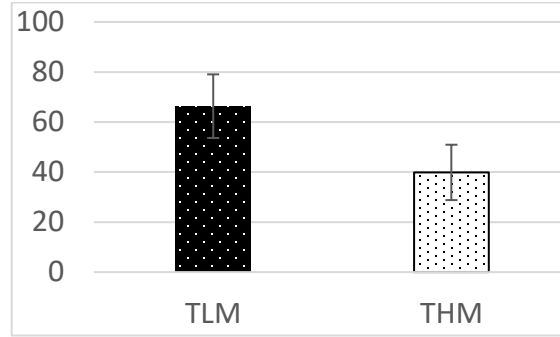


**Şekil 4.4:** Her iki gruba ait hayvanlardan alınan kan örneklerinin lam üzerine yayılması ile elde edilen preparatlarda sayılan immün hücrelerin sayımını gösteren grafik. Her gruba ait sayılan hücrelerin ortalama verileri istatistiksel olarak değerlendirildi.

### 4.3 Metastaz Analizi

#### 4.3.1 Makro Metastaz analizleri

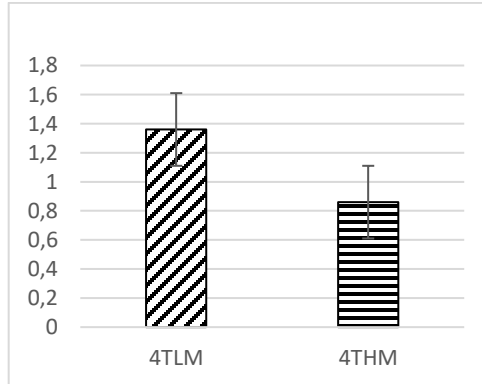
Akciğer dokularında gözle görülebilir olan bütün metastatik alanlar tek tek sayıldı. Her grupta hayvanların sayılan değerlerinin ortalaması alındı (Şekil 4.5). 4TLM hücre hattı enjekte edilen hayvanların akciğerlerinde görülen metastaz sayısının 4THM hücre hattı enjekte edilen gruba göre daha fazla olması; 4TLM hücrelerinin daha agresif ve metastatik özelliğe sahip olduklarını vurgulamaktadır.



**Şekil 4.5:** Her iki gruba ait örneklerden alınan akciğer dokularında gözle görülebilir olan metastatik alanların sayılarını ve bu sayıların istatistiksel olarak değerlendirilmesini gösteren grafik. İki grup için gözlenen metastaz sayısı farklı bulundu. 4TLM grubu akciğer dokularına ait metastatik alan sayısı 4THM grubuna göre daha fazla görünse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $P = 0,143$ ).

#### 4.3.2 Mikro Metastaz Analizleri

Mikro metastaz analizlerinde; karaciğer kesitlerinde metastatik alanlar tek tek seçildi ve işaretlendi. Seçilen alanların ölçümleri, total kesit alanına oranları değerlendirildi (Şekil 4.6).

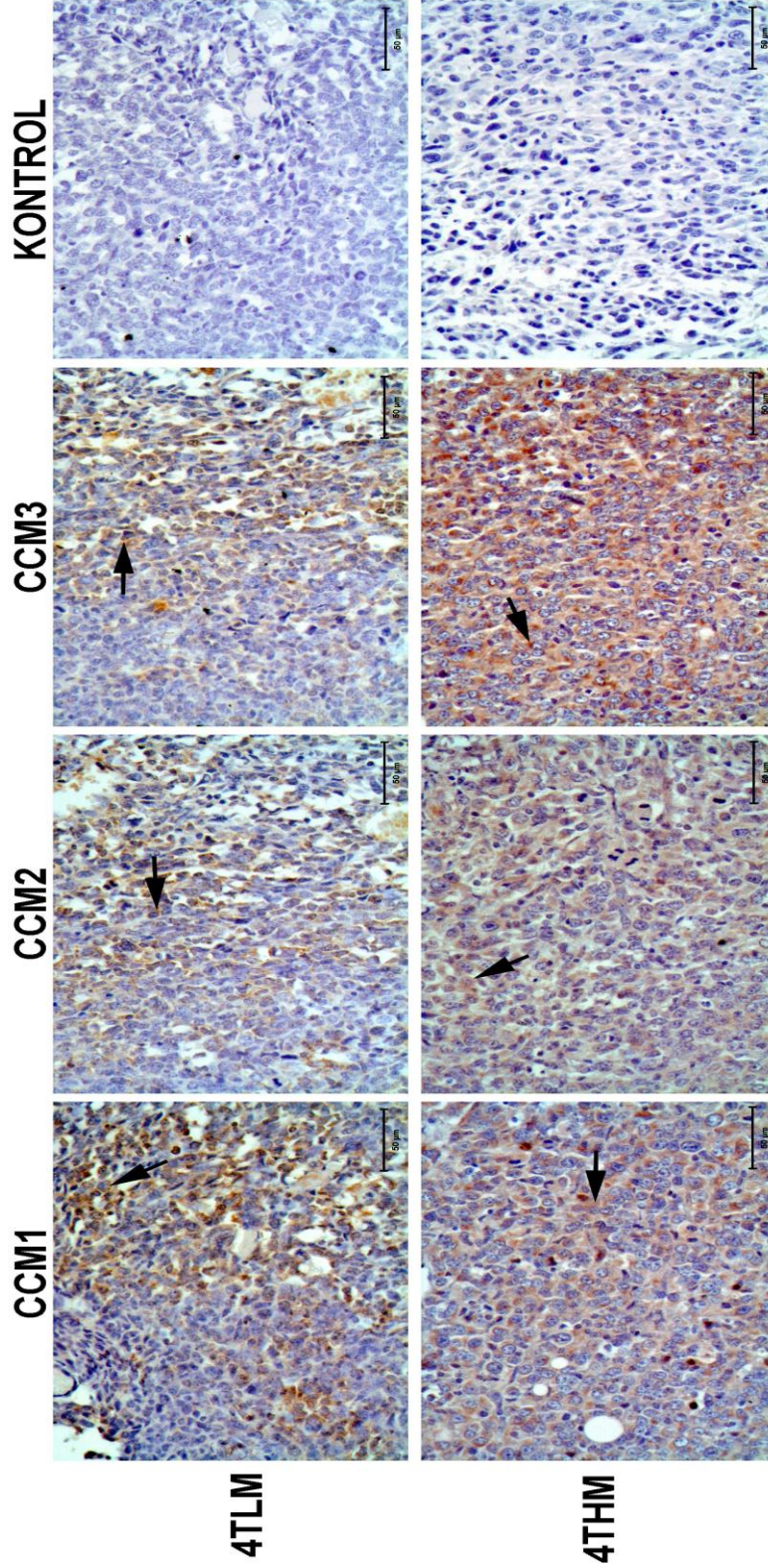


**Şekil 4.6:** Hayvanlardan alınan karaciğer dokularındaki metastatik alanların ölçüm sonuçları. Ölçümler  $\mu\text{m}^2$  olarak hesaplandı. TLM grubu karaciğer dokularında görülen metastatik alanların toplam alana oranı, THM grubu metastatik alanlarına göre daha fazla gözlemlendi. Fakat iki gruba ait veriler arasında anlamlı bir fark bulunamadı ( $P=0,582$ )

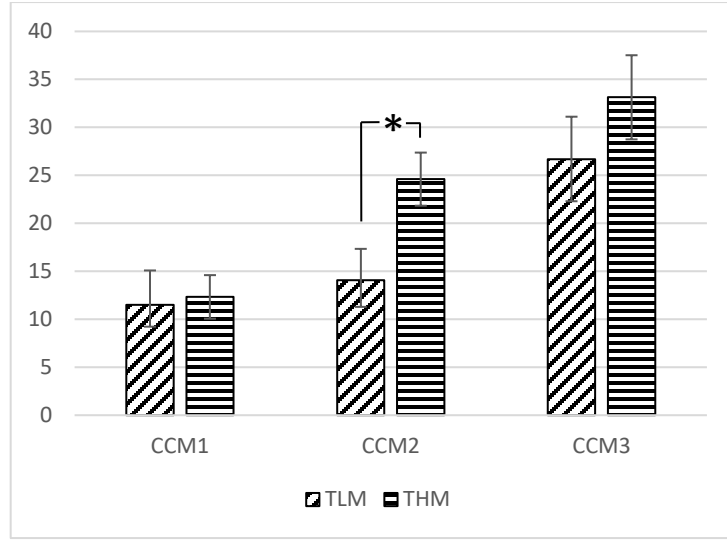
## **4.4 İmmünohistokimya Yöntemi**

### **4.4.1 Primer tümör dokularında;**

Primer tümör kesitlerinde CCM1, CCM2 ve CCM3 immünoaktivitesi DAB kromojeni ile kahverengi boyanmasına göre değerlendirildi. 4TLM ve 4THM hücreleri enjekte edilen farelerin tümör dokularında her üç proteinin ekspresyonu da sitoplazmik olarak gözlemlendi. Yapılan negatif kontrol boyanmaları da antikorun spesifitesini göstermekte ve herhangi bir reaksiyon görülmemektedir (Şekil 4.7). Ekspresyon paterninin Image-J analizi ve istatistiksel değerlendirmesi sonuçları ile elde edilen değerlere ait grafik şekil 4.8'de görülmektedir.



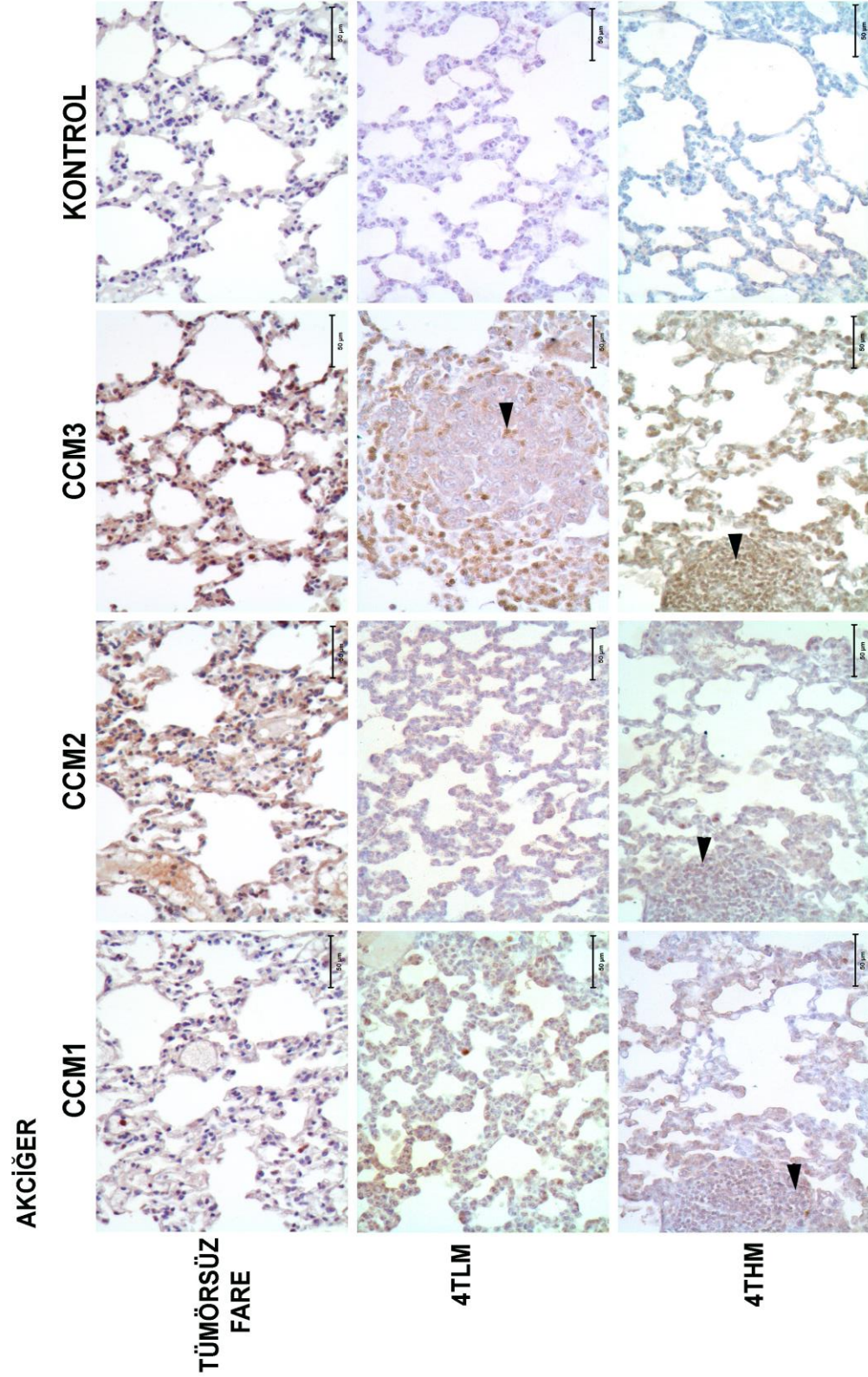
**Şekil 4.7:** Primer tümör dokularında yapılan immünohistokimya sonucu protein ekspresyonları görülmektedir. CCM1, CCM2 ve CCM3 ekspresyonları stoplazmik olarak (oklar) görülmektedir. Nadiren görülen nükleer ekspresyonlar immun sisteme ait hücrelerdir. Skala bar 50mµ



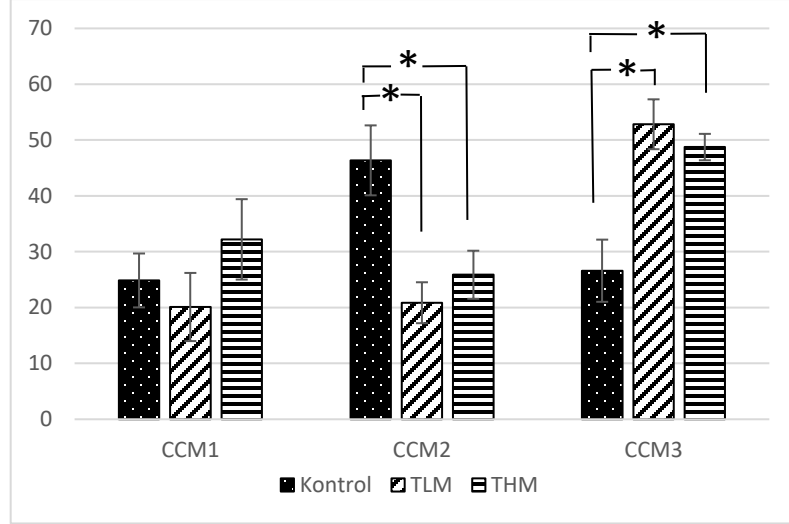
**Şekil 4.8:** Ölçülen ekspresyon miktarlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu primer tümörlerde CCM1 ekspresyon yüzdesini gösteren grafik. TLM enjekte edilen grupta daha az ekspresyon görüldü. İki grubun ekspresyon paterni arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ( $P = 0,842$ ). CCM2 proteini hakkında; TLM enjekte edilen grupta görülen ekspresyon THM grubuna göre daha az görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda; iki grubun ekspresyon paternleri arasında anlamlı bir fark görüldü ( $P = 0,022$ ). TLM dokusunda görülen CCM3 ekspresyon miktarı THM grubuna göre daha az ölçüldü. İstatistiksel değerlendirmeler sonucu iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $P = 0,317$ ).

#### 4.4.2 Akciğer dokularında;

4THM hücreleri enjekte edilen farelerin akciğer dokularında yapılan immun boyanmalarda, CCM1 ve CCM2 birbirine benzer ekspresyon paternine sahipken; CCM3 proteininin pnömositlerde daha yoğun boyandığı dikkati çekmekteydi. 4TLM hücreleri enjekte edilen farelerin akciğer dokularında da CCM1 ve CCM2 ekspresyonunun pnömositlerde daha az iken CCM3 ekspresyonunun çok daha fazla olduğu görüldü. Akciğer dokularında görülen ekspresyonların sitoplazmik ve peri-nükleer olarak gözlenmesi normal dokuya has bir ekspresyon paternidir. Ancak, her iki hücre hattı için özellikle metastaz alanlarında yapılan incelemelerde; tümör hücrelerinin CCM proteinlerini içermediği ancak bazı immun sistem hücrelerinin yoğun olarak boyandığı dikkati çekti. Kontrol hayvanlarında yapılan immun boyanmalarda pnömositlerin tümörlü dokuya nazaran daha az ekspresyon sergilediği görüldü (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9:** Akciğer dokularında yapılan immünohistokimya sonucu protein ekspresyonları görülmektedir. Metastaz yapmış tümör hücreleri arasında gözlenen nükleer ekspresyonlar immun hücrelere işaret etmektedir (ok başları). Skala bar 50 µm



**Şekil 4.10** Akciğer dokularında yapılan immünohistokimya sonucu görülen CCM1, CCM2, CCM3 ekspresyonlarının istatistiksel olarak analizlerinin grafiksel gösterimi. CCM1 ekspresyonu için gruplar arasında ve deney grupları ile kontrol grubu arasında ekspresyonel olarak farklar görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (CCM1  $P = 0,437$ ). CCM2 ekspresyonu için TLM ve THM grubuna ait dokularda kontrol grubuna kıyasla çok daha az ekspresyon görüldü. Ekspresyonlarındaki bu azalma istatistiksel olarak anlam göstermektedir (Kontrole kıyasla;  $P_{TLM}=0,016$ ,  $P_{THM}= 0,033$ ). Fakat birbirlerine göre istatistiksel olarak kıyaslandıklarında TLM grubunda daha az ekspresyon gözlenmesine rağmen, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ( $P=1,000$ ). CCM3 ekspresyonu için; TLM ve THM grubuna ait dokularda kontrol grubuna kıyasla çok daha fazla ekspresyon görüldü. Ekspresyonlarındaki bu artış istatistiksel olarak anlam göstermektedir (Kontrole kıyasla;  $P_{TLM}= 0,003$ ,  $P_{THM}= 0,006$ ). Fakat birbirlerine göre istatistiksel olarak kıyaslandıklarında TLM grubunda az da olsa daha fazla ekspresyon gözlenmesine rağmen, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ( $P=1,000$ ).

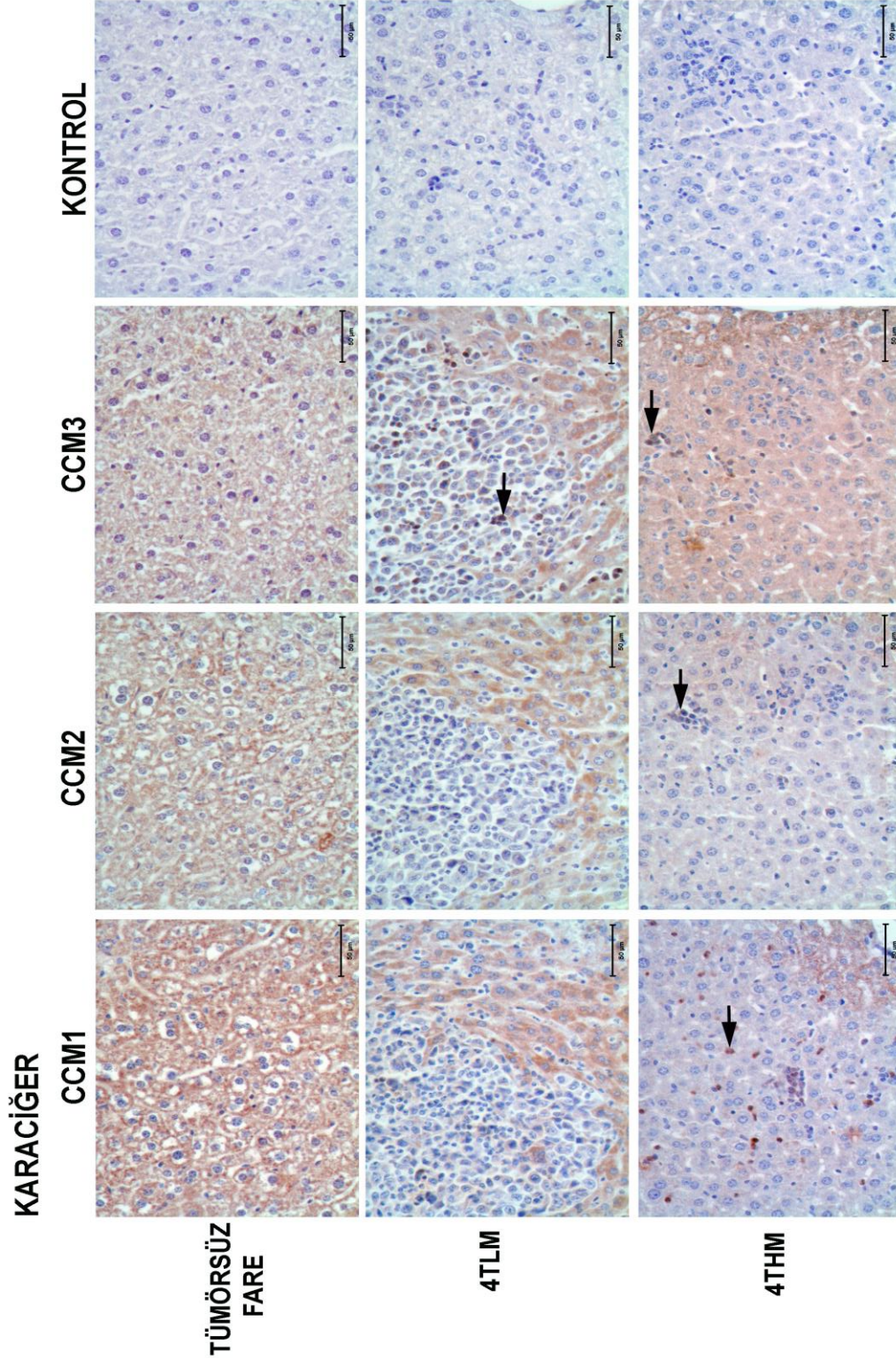


#### **4.4.3 Karaciğer dokularında;**

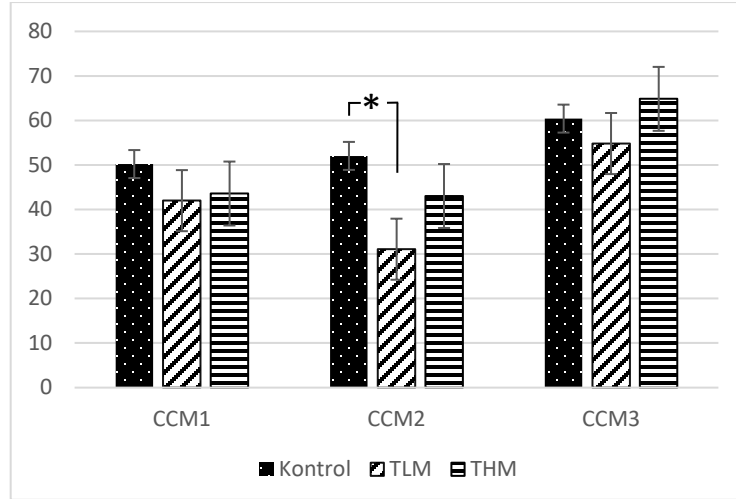
4THM hücreleri enjekte edilen farelerin karaciğer dokularında yapılan immun boyanmalarda hepatositlerin CCM proteinlerini farklı düzeyde ekspre ettikleri görülmekteydi. En yoğun ekspresyonun CCM3'e ait olduğu; CCM1 ve CCM2'nin daha düşük bir ekspresyon paterni sergilediği izlendi. 4THM grubuna ait karaciğer dokularında görülen metastatik alanlar değerlendirildiğinde; CCM proteinlerinin tümör hücreleri tarafından ekspre edilmediği ancak karaciğerin immun hücreleri olarak bildiğimiz Kupfer hücrelerinin CCM proteinlerini ekspre ettikleri dikkati çekmekteydi.

4TLM hücreleri enjekte edilen farelerin karaciğer dokularında ise her üç proteinin ekspresyonu hepatositlerde oldukça belirgindi ve metastatik alanlarda da reaksiyon görülmemekteydi. Sadece metastatik alanlarda kupfer hücrelerinde reaksiyonun varlığı görülmekteydi.

Kontrol dokularında görülen immünoreaktivitenin karaciğerin hepatositlerinde her bir CCM proteini için farkedilir düzeyde olduğu görülmekteydi. Negatif kontrollerde de herhangi bir reaksiyona rastlanmadı (Şekil 4.11).



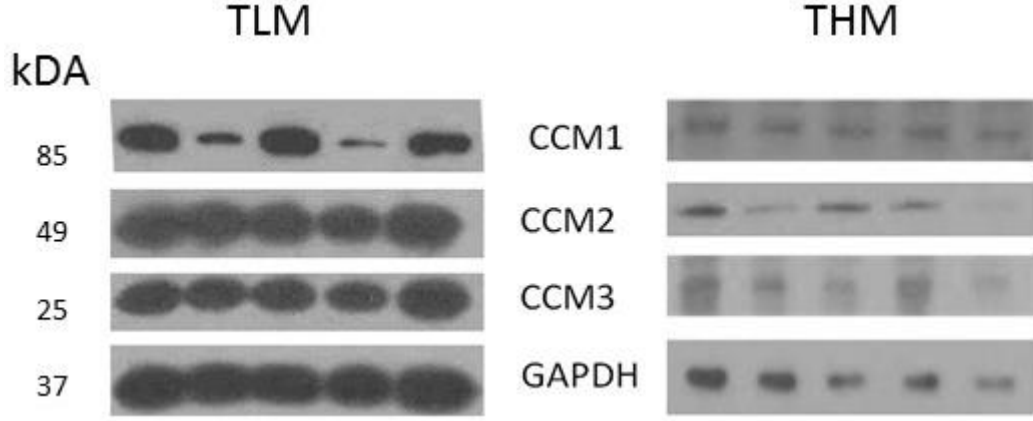
**Şekil 4.11:** Karaciğer dokularında yapılan immünohistokimya sonucu CCM proteinlerinin ekspresyonları. Kontrol dokusuna göre tümör enjekte edilen her iki gruba ait kesitlerde CCM1, CCM2 ekspresyonları daha az gözlenirken, CCM3 immünoaktivitesi daha yoğun gözlemlendi. Metastatik alanlarda ise birkaç hücrede görülen CCM3 reaktivitesi dışında CCM1 ve CCM2 ekspresyonu bazı immün hücrelerde gözlemlendi. Skala bar 50µm



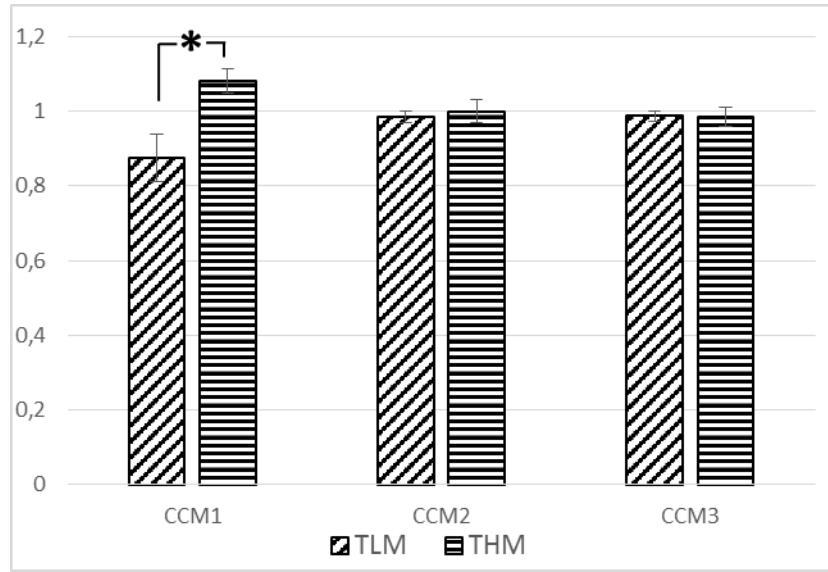
**Şekil 4.12:** Karaciğer dokularında yapılan immünohistokimya sonucu görülen CCM1, CCM2, CCM3 ekspresyonlarının istatistiksel olarak analizlerinin grafiksel gösterimi. Her iki deney grubu arasında ve deney grupları ile kontrol grubu arasında az da olsa görülen ekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $P= 0,462$ ). CCM2 için; TLM ve THM grubuna ait dokularda kontrol grubuna kıyasla daha az ekspresyon görüldü. TLM grubunda görülen ekspresyon paterni kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermektedir ( $P = 0,038$ ). THM grubuna ait ekspresyon değerleri kontrol grubuna göre daha az görülse de istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemektedir. Birbirlerine göre istatistiksel olarak kıyaslandıklarında TLM grubunda daha az ekspresyon gözlenmesine rağmen, TLM ve THM grupları arasında görülen ekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamsız bulundu. TLM ve THM grupları kıyaslandığında TLM grubunun CCM3 ekspresyon paterni istatistiksel olarak bir anlam belirtmese de THM grubuna göre daha az gözlemlendi. Her iki grup da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında az da olsa görülen ekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. İstatistiksel olarak bir anlam ifade etmese de en az ekspresyon TLM grubunda gözlemlendi ( $P = 0,238$ ).

#### 4.6 Western Blot Bulguları

Primer tümör dokularından elde edilen doku lizatlarına uygulanan Western Blot analizleri sonucu görülen protein bantları filme aktarıldı ve bantların kalınlıkları image J analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilip grafiğe yansıtıldı (Şekil 4.13; Şekil 4.14). Ölçülen protein miktarları kontrol yüklemesi olan GAPDH proteini ile kıyaslandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Her iki grubun protein miktarlarına bakıldığında; CCM2 protein miktarı, CCM1 ve CCM3 proteinlerine göre daha az bulundu. İki gruba ait protein miktarları kıyaslandığında ise CCM1 protein miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülürken; CCM2 ve CCM3 proteinleri arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı.



**Şekil 4.13:** 4TLM ve 4THM grubuna ait primer tümör örneklerinde Western Blot analizleri görülmektedir.



**Şekil 4.14:** 4TLM grubuna ait primer tümör örneklerinde Western Blot analizlerinin grafiksel gösterimi. Her iki gruba ait proteinlerin analizinde CCM1 proteini ekspresyonları arasında anlamlı bir fark görülürken; CCM2 ve CCM3 ekspresyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. ( $P_{CCM1} = 0,020$ ,  $P_{CCM2} = 0,421$ ,  $P_{CCM3} = 0,971$ )

## 5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda ölüme en çok sebebiyet veren kanser tipidir. Elde edilen verilere göre; on kadından birinin bu hastalığa yakalanma riskinin olduğu ve yakalananların da en az üçte birinin yaşamlarını bu hastalığa bağlı olarak kaybettikleri bildirilmektedir (Fidler 2002, Castano ve ark. 2011). Meme kanserinden ölümlerin esas ve en yaygın sebebi primer tümörün büyüklüğünden çok tümörün agresivitesine bağlı olarak gerçekleşen uzak metastazlardır. Meme kanseri için ortalama 5 yıllık yaşam süresi tümör sadece primer alanında ve bölgesel ise %99 civarındayken; metastaz durumunda bu oranın %25'lere düştüğü görülmektedir (Society 2015). Bu veriler, meme kanserinden ölümlerin metastaz kaynaklı olduğuna dikkati çekmektedir(Pantel ve ark. 2008, Jemal ve ark. 2010).

Meme kanserinde, primer tümörün büyümesi, proliferasyonu, invazyonu ve metastazını tetiklediği bilinen birçok faktör literatürde yer almaktadır. Ancak, çalışmamız sadece *in vitro* hücre kültürlerinde çok az sayıda çalışmada tanımlanmış serebral kaverno malformasyon proteinleri CCM1, CCM2 ve CCM3'ün ekspresyonlarını meme kanseri modelinde *in vivo* primer tümörlerde göstermek üzerine kuruludur. Ancak, çalışmamızın en özgün kısmı, bu proteinlerin daha önce herhangi bir primer tümörün oluşturduğu metastazlarda tanımlanmamış olmasıdır. Özellikle meme kanserinin oluşturduğu metastazlar sonrası akciğer ve karaciğer dokularında, ortamın mikroçevresine de bağlı olarak şekillenebileceğini ve yeni yerleşim alanlardaki ekspresyonlarının değişimini değerlendirmek esas amacımızdır.

Serebral kaverno malformasyon; özellikle merkezi sinir sisteminde görülürse ciddi sorunlar yaratan, sadece basit bir endotel ve altında ince bir bağ dokusundan oluşan, kapiller benzeri damarların oluşturduğu vasküler lezyonlardır. Damar duvarlarının oldukça ince ve basit bir yapıda olması, endoteller arası bağlantı komplekslerinin yapısının bozulmasından dolayı kolay kanama özelliğindedirler (Wojnowski ve ark. 1997, Wong ve ark. 2000, Clatterbuck ve ark. 2001). SKM için tanımlanan bu genler (Reich ve ark. 2003, Voss ve ark. 2007) başka hastalıklar ve anjiyogenez sürecinde de tanımlanmış ve görevleri literatürde açıklanmaya çalışılmıştır (Tanriover ve ark. 2009,

Tanriover ve ark. 2010, Tanriover ve ark. 2011). Özellikle, damarsal sorunlara yol açması nedeniyle anjiyogenezdeki etkisi vurgulanmaya çalışılmıştır (Tanriover ve ark. 2009).

Çalışmamızda metastaz indeksi yüksek ve agresif karakterli 2 hücre hattı seçmemizin sebebi, primer tümörün yapacağı metastaz sonrasında metastatik dokularda CCM proteinlerinin ekspresyonlarını göstermektir. Daha önceki çalışmalarımızda elde ettiğimiz bilgileri göre de; 4TLM hücrelerinin daha agresif karaktere sahip olmasından, bu gruba ait primer tümör büyüklükleri tümörün büyüme hızı ve periferik yayma sonucunda hayvanların kanında nötrofil oranının 4THM grubuna oranla yüksek olması deneyimizin beklendiği gibi kurgulandığına işaret eden şahit parametrelerdir (Erin ve ark. 2013). Ancak önceki çalışmalarımız  $1 \times 10^5$  hücre ile yapılmıştır. Bu çalışmada ilk defa  $5 \times 10^5$  hücre denenmiştir. Uygulanan hücre sayısının artması 4TLM grubunun agresivitesini ve inflamatuvar yanıtını değiştirmemiştir. Tümör ağırlıklarını değerlendirince 4TLM'nin daha büyük bir tümör oluşturması da bu durumu destekler niteliktedir.

Tüm agresivite özellikleri 4TLM grubunda daha yüksek olmasına rağmen primer tümörlerdeki CCM ekspresyonları değerlendirildiğinde, 4THM grubunda ekspresyonların daha fazla olduğu dikkati çekmekteydi. Bunun nedeni; tümör hücrelerinin CCM proteinlerini yeterince ekspre edememesi bu hücrelerin daha metastatik ve invazif karaktere sahip olduğunu düşündürmektedir (Borikova ve ark. 2010, Stockton ve ark. 2010). CCM proteinlerinin ekspresyonlarının azlığı durumunda tıpkı SKM hastalığında olduğu gibi hücrelerin adeziv bağlantılarını kopararak daha migratif bir yapı sergilemeleri (Fidalgo ve ark. 2010), primer tümörde de benzer etkiye sahip olduğunun bir göstergesi olabilir.

CCM1'in mikrotübül ile ilişkili bir protein olduğu, ICAP-1 ile ilişkisinin de integrin bağlantı kompleksleri ile birlikte birçok bağlantı kompleksini de aktive ettiği ve hücreler arası ilişkiyi güçlendirdiği bilinmektedir (Gunel ve ark. 2002). CCM1 geninin kaybı durumunda endotel hücre arası bağlantı komplekslerinde açılmaların görülmesi beyinde serebral kavernoza malformasyon oluşumunu tetikleyerek lezyon içerisine kan dolmasına sebep olmaktadır (Craig ve ark. 1998, Fischer ve ark. 2013). Benzer şekilde, CCM1

kaybında diğer dokularında bağlantı komplekslerinde sorunlar ortaya çıkacağından hücre-ESM bağlantısı bozulacaktır. Bağlantıların zayıflaması, sinyal iletiminde sorunlara ve damarlarda da anjiyogenezin tetiklenmesine sebep olacaktır (Vestweber ve ark. 2009). Bizim sonuçlarımızda primer tümörlerde gördüğümüz benzer CCM1 ekspresyonu malign tümörlerde benzer şekilde etkiye sahip olduğunun bir göstergesi olabilir.

Glading, A. ve ark. tarafından yapılan CCM1'in susturulmasına dayanan *in vitro* çalışmada;  $\beta$ -kateninler VE-kaderinlerden ayrılarak serbestlenmekte ve kolaylıkla nükleusa transloke olabilmektedir. Nükleusa geçişle birlikte transkripsiyonel bir aktivasyon ortaya çıktığından hücre siklusunun da yeniden aktive olarak bölünme ve proliferasyonu tetikleyeceği düşünülmektedir (Glading ve ark. 2007, Glading and Ginsberg 2010). SKM'da bağlantı komplekslerinde bozulmalara ilaveten, anjiyogenez ve proliferasyonun da tetiklenmesi, bir nevi tümör oluşumu basamaklarındaki etkiyi çağrıştırmaktadır. Tümör hücresinin de benzer şekilde migrasyon eğilimi kazanması; salgıladıkları faktörlerle birlikte metastazi tetikleyerek tümörün agresivitesini arttıracaktır. Bu nedenle; CCM1 kaybının özellikle tümör hücrelerinde karsinogenezi tetikleyeceği ve hücrenin onkogenik karakterler kazanarak daha agresif yanıtlar ortaya çıkartabileceği düşünülebilir. Meme tümörlerinde CCM2 ve CCM3'e kıyasla daha düşük gördüğümüz CCM1 ekspresyonu; tümörün daha onkogenik karakter kazanmasıyla ilişkilendirilebilir.

Nöroblastoma ve medullablastoma gibi malign tümör hücrelerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda CCM2 ekspresyonunun TrkA bağımlı yolağı kullandığı ve bu yolak üzerinden tümör hücrelerinin apoptoza gitmesine sebep olduğu bildirilmiştir (Harel ve ark. 2009). CCM2'yi çok düşük oranda ekspre eden PC12 hücrelerinde vektör aracılı CCM2 ekspresyonunun arttırılmasında hücre ölümünün arttığı ve bunun TrkA ile birlikte dizayn edildiğinde bu artışın daha da yoğun olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla hücrede CCM2 ekspresyonunun baskılanması ya da azaltılması durumunda; tümör hücrelerinin apoptozdan kaçacağı ve aktivitesini arttırma yolunda ilerleyerek karsinogenezi de tetikleyebileceği akla gelmektedir. Bizim bulgularımızda da metastatik dokularda CCM2 proteininin ekspresyonunun kontrol karaciğer ve akciğer göre düşük

olması, yeni mikroçevrenin tümöre yardımcı olarak daha agresif ve invazif bir karakter kazanması ile ilişkilendirilebilir.

CCM2'nin vasküler endoteldeki ekspresyonu ve prenatal dönemdeki varlığı da oldukça dikkat çekicidir. *In vivo* hayvan modellerinde CCM2 delesyonuyla, vasküler gelişimde sorunların görülmesi ve erken embriyonik dönemde embriyonun hayatını kaybetmesi de CCM2'nin vasküler yapıdaki etkinliğini kanıtlamaktadır (Coffin and Poole 1988). Metastatik dokularda, özellikle metastaz alanlarında CCM2 ekspresyonunun kaybı, bu alanda anjiyogenezin tetiklenmesine ve tümörün sekonder odaklarda kolaylıkla proliferasyon olup agresif bir karakter kazanmasına sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Karsinogenezde tümörün agresivitesini belirleyen en önemli basamaklardan biri tümör hücrelerinin proliferasyonla belirli bir büyüklüğe ulaşması sonrasında migrasyon ile damar duvarına yaklaşp, ardında intravazasyon ile damara geçip başka dokulara taşınarak metastaz yapmalarıdır (Reshetnyak ve ark. 2011, Nouri ve ark. 2014). Tümör hücrelerinde, bağlantı komplekslerinin kaybolması, apikal-bazal kutuplaşmanın bozulmasına ve ilerleyen aşamalarda da epitelyal karakterin mezenşimal yapıya dönüşmesiyle bu basamaklar başlamaktadır. Kavernomların oluşması sırasında da endotelyal hücrelerinin mezenşimal geçişe uğradıkları bilinmektedir (Cuttano ve ark. 2016). Benzer durum, metastatik potansiyele sahip tümör hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçiş olarak görülmekte ve kavernomlarda gözlenen endotelyal mezenkimal geçişe benzemektedir (Fidler 2002). Bu düzenlenmede hücreler arası bağlantı molekülleri ve hücre dışı matriks elemanlarının formasyonu değişir ya da kaybı görülür (Ota ve ark. 2009, Bonnomet ve ark. 2010, Yao ve ark. 2011). Bu bilgiler doğrultusunda CCM moleküllerinin de aynı tümör hücrelerinden salınan birçok faktörün yaptığı etkiyi yapabileceğini düşünerek karsinogenezde rol oynayabilecekleri değerlendirilmiştir.

Epitelyal mezenşimal dönüşüm sonrası, mezenşimal karakter kazanan hücrelerin yönelmiş migrasyonunda ön-arka polaritenin kurulması önemlidir (Etienne-Manneville 2008). Sitoiskeletin bu asimetric organizasyonu proteinlerin de lokal olarak toplanmasını sağlayarak (Mardakheh ve ark. 2015), hücrelerin yeniden oryantasyonuna yardımcı olmaktadır. ESM komponentleri, hücre yüzey reseptörleri, ilave membran içerikleri ve Golgiden orijinlenen bazı ekzositotik kargolar sekresyon trafiğiyle birlikte



migrasyon yönündedir (Mellor 2004, Yadav ve ark. 2009). Migrasyon sırasında, mikrotübül ağının da yeniden organizasyonu Golginin yeni pozisyonu için önemlidir (Yadav and Linstedt 2011). Rho ailesinin küçük GTPaz'ları sitoskeletonin asıl düzenleyicileri olarak bilinmekte ve özellikle de bu ailenin bir üyesi olan Cdc42'nin de polaritenin düzenlenmesinde rol oynadığı söylenmektedir (Etienne-Manneville 2004, Sadok and Marshall 2014). Golginin sitoplazmada yeniden lokalizasyonunda sadece Rho ailesi değil CCM3'de önemli bir rol oynamaktadır. Mardakheh ve ark.'nın HeLa hücrelerinde CCM3'ü susturarak yaptıkları çalışmada, Rho'nun da inaktif durumda kaldığını ve hücrenin polarize olamayıp konumunu değiştiremediğini gözlemişlerdir (Mardakheh ve ark. 2016). Buna karşın, CCM3 üzerindeki etki kaldırılınca Rho-CCM3 ilişkisine bağlı olarak golginin yeniden oryante olduğu ve hücreyi migrasyon yönünde tetiklediği ifade edilmiştir. Bizim bulgularımızda da hem primer tümörlerde CCM3 ekspresyonunun yoğun olması hücrenin bu migratif özelliği ile ilişkilendirilebilir.

Kültür hücrelerinde yapılan knock down ve knock out çalışmaları; vasküler hücre polaritesi, endotelial permeabilite ve sitoskeleton organizasyonunu düzenlenmesini içeren her basamakta CCM2 ve CCM3'ün önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Draheim ve ark. 2014). CCM genlerinden herhangi birinin kaybı kavernom mutasyonlarına yol açabilirken CCM3 kaybının olduğu durumlarda çok daha ciddi mutasyonlarla karşılaşıldığı görülmüştür. Bu nedenle CCM3'ün her iki proteinden bağımsız fonksiyon gösterdiği bir yolunun olduğu kanıtlanmıştır. Bu yol plazma membran stabilitesi ve vasküler tüp gelişimini destekleyen RhoA ve Cdc42 boyunca düzenlenmektedir (Lant ve ark. 2015). Ayrıca, Louvi ve ark. CCM3'ün nöronal migrasyondaki önemini vurgulayarak, CCM3'ün knock-out edildiği çalışmalarında kortikal tabakalanmanın bozulduğunu göstermişlerdir (Louvi ve ark. 2014). Dolayısıyla, sonuçlarımızda metastatik alanda yer alan tümör hücrelerinde CCM3 proteininin kaybı, hem Mardakheh ve ark.'nın yaptıkları çalışmayla uyumluluk göstermekte ve hücrenin migratif karaktere sahip olmasıyla ilişkilendirilebilmektedir (Mardakheh ve ark. 2016). Bu nedenle, CCM proteinlerinin metastaz alanında ekspre olmayışı bu alanda bağlantı komplekslerinin de yıkılarak tümör hücrelerinin kendilerine yeni bir mikroçevre yaratmaları, plazma membran stabilitesini değiştirerek vasküler yapıların gelişimini tetiklemeleri ile ilgili olabilir. Akciğer dokularında yapılan immünohistokimya analizlerinde; kontrol grubuna

kıyasla CCM2 ekspresyonunun metastatik alanlarda azaldığı görüldü ve bu azalış CCM2'nin üçlü protein yapısında merkezi rol oynamasına da dayanarak yapının bozulduğunu düşündürmektedir. Yapının bozulması aktin hücre-iskeleti yapısına bağlanmayı da bozmaktadır (Fidalgo ve ark. 2012). Dolayısıyla CCM1 ve CCM3'ün CCM2'den bağımsız işlev gösterdiğini ve ekspresyonlarındaki farkın da buradan kaynaklandığını düşündürmektedir (Hilder ve ark. 2007).

CCM3 proteininin kontrol dokusuna göre her iki grupta da anlamlı derecede bir artış göstermesi; CCM3 proteininin GCK (germ center kinase) ailesine ait mitokondri membranında bulunan proteinlere bağlandığını, ve bu bağlanmalar sonucunda hücre invazyonunu etkilemek üzere indüklenebileceğini akla getirmektedir (Fidalgo ve ark. 2010, Kean ve ark. 2011).

Karaciğer dokularında kontrol grubuna kıyasla, CCM1 ve CCM2'nin azalırken CCM3'ün ekspresyonunda anlamlı bir farkın gözlenmemesi tümör ile ilgili yanıtların CCM1 ve CCM2 üzerinden şekilleneceğinin bir göstergesi olabilir. CCM1 ve CCM2 ekspresyonunu kaybeden hepatositlerde adeziv bağlantılarının bozulacağı ve metastatik hücrelerin yerleşmelerine yardımcı olabilecek mikroçevrenin temellerinin atılabileceğini düşündürmektedir. Bu sayede karaciğer dokusuna gelen tümör hücrelerinin burada tutunma ve yerleşme olasılığının artacağı söylenebilir.

Sonuç olarak; metastatik karaciğer ve akciğer dokusunda özellikle metastaz alanlarında CCM proteinlerinin ekspresyonlarının görülmemesi bu proteinlerin tümörün yarattığı yeni mikroçevrenin özelliğine bağlı olabilir. Ekspresyonun kaybolması tümörü daha invazif bir yapıya sokabileceğinden; CCM proteinleri özellikle metastatik dokularda evre kimliklendirilmesinde kullanılabilecek belirteçler olarak sunulabilir. Bu durum ileride yapılması planlanan fonksiyonel çalışmalarla anlamlılık kazanabileceği ve belki de yeni terapötik ajanların şekillenmesine yardımcı olabileceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda; CCM proteinleri CCM1, CCM2 ve CCM3'ün metastatik tümör hücre hatlarının enjeksiyonu sonrası elde edilen meme tümörlerinde, ekspresyonlarının yoğun olduğu ancak, tümörün metastaz yaptığı akciğer ve karaciğer dokularında özellikle metastatik hücre alanlarında hiç ekspresyona rastlanmadığı görülmüştür. Bu çalışmayla;

hem malign karakterli primer meme tümöründe hem de metastatik organlardan akciğer ve karaciğer dokusunda metastaz alanlarında CCM proteinlerinin ekspresyonları ifade edilmeye çalışılmıştır. Metastatik dokularda daha önce ekspresyonları tanımlanmadığından çalışmamız bu yönüyle literatürdeki ilk çalışma olmaktadır.

*In vitro* tümörlerdeki ekspresyonları literatürde tanımlanan CCM proteinlerinin *in vivo* meme kanserindeki ekspresyonları tanımlanmış ve metastazdaki ekspresyonel farkı sayesinde tümör tedavisinde yeni bir bakış açısı ortaya çıkarabileceği vurgulanmaya çalışılmıştır. Elde edilecek yeni bilgiler özellikle meme kanserinin metastazında etkin olabileceği gibi başka kanser ve tümör hücrelerinde de araştırılmasına ışık tutacaktır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hazırlanan Yüksek Lisans tez çalışmasında, 4T1 meme kanseri hücre hattının karaciğer ve kalbe metastaz yapmış hücrelerinin toplanması ve yeniden kültür tabağında üretilmesiyle elde edilen; invazyon ve metastaz yetenekleri birbirinden farklı iki hücre hattı (4TLM ve 4THM) kullanılmıştır. Bu hücrelerin primer tümör olarak ortotopik enjeksiyonu sonrası oluşturulan *in vivo* modelde, primer tümör ve uzak metastatik organlar olarak da akciğer ve karaciğer değerlendirme için seçilmiştir. Ortaya konan meme kanseri modelinde, *in vivo* primer tümör ve organ metastazlarında CCM proteinlerinin ekspresyonu ilk defa gösterilmiş, literatürde var olan *in vitro* birkaç çalışmayı da doğrulayacak nitelikte yeni bilgiler elde edilmiştir. Metastatik organlardaki ekspresyon sonuçları da literatüre ilk defa kazandırılmış bir bilgi olduğundan sonuçların yorumlanması yeni proje ve kliniğe yansiyabilecek yeni çalışmalara ışık tutabilecek niteliktedir. Elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Meme kanseri modeli oluşturularak elde edilen primer tümörlerde, tümör hücrelerinin CCM proteinleri sitoplazmik olarak ekspre ettiği gözlemlendi. Ancak, yer yer bazı hücrelerde gözlenen nükleer reaksiyonların tümör içerisinde yer alan immun hücrelere ait olduğu görüldü. İki hücre hattı açısından ekspresyonlar değerlendirilince; CCM1 ekspresyonunun iki hücre hattında pek de değişmediği, ancak CCM2 ve CCM3 ekspresyonlarının 4THM hücre hattına ait primer tümörlerde daha yoğun ekspre olduğu dikkati çekmekteydi. CCM1'in özellikle hücre arası bağlantıların kurulmasındaki görevi dikkate alınınca tümör hücrelerinin birbirlerine sıkı tutunmasında etkin rolleri burada ön plana çıkmaktaydı. Ancak CCM2 ve CCM3'ün CCM1'den bağımsız olarak endotel hücrelerindeki anjiyogenez, proliferasyon ve migrasyon üzerine etkisi bilindiğinden; primer tümörlerde farklı ekspre olmaktadır. CCM2 ve CCM3 immun işaretlenmeleri, 4THM hücre hattına ait primer tümörlerde daha yoğun ekspre olmaktadır.

2. Tümör hücrelerinin metastaz yaptıkları organlarda kendilerine has bir mikroçevre yarattıkları bilinmektedir. Akciğer dokusunda yapılan immun boyanmalarda ise; kontrol dokusuna ait pinömositlere kıyasla tümörlü gruplarda daha yoğun CCM ekspresyonunun olması tümör hücrelerinin bu alanda kendilerine yer edinmek adına hazırladıkları

mikroçevre ile ilişkili olabilir. Benzer şekilde, metastatik dokularda özellikle metastaz alanlarında CCM proteinlerinin ekspresyonunun görülmemesi de; yeni bir alana yerleşen tümör hücrelerinin kendilerini korumak adına attıkları bir adım olabilir. Hücreler arasındaki bağlantı komplekslerini kopararak doku içerisinde yer edinmeleri ve proliferasyon adına birçok faktörü salgılamaya başlamaları, CCM proteinlerinin kaybına neden olmuş olabilir. Sadece tümör hücreleri arasında yer alan bazı immun hücrelerin CCM proteinlerini ekspre etmesi savunma mekanizmasıyla ilgili görevleri olabileceğini de düşündürmektedir.

3. Karaciğerin hepatositlerinde stoplazmik olarak gözlenen CCM reaksiyonlarının; farklı tümör gruplarında tıpkı primer tümörlerde olduğu gibi CCM1 açısından farklılık göstermediği gözlendi. CCM2 ve CCM3 reaksiyonlarının da 4THM hücre hattının enjekte edildiği gruplarda daha yoğun ekspre olduğu dikkati çekmekteydi. Ancak, kontrol karaciğer dokuları ile kıyaslanan her üç CCM proteininin immun reaksiyonlarının 4TLM grubunda çok daha azalması dikkat çekiciydi. En agresif ve metastatik hücre hattımızda CCM proteinlerinin kontrole göre azalması, var olan profilin değiştiğinin, tıpkı kavernomalarda olduğu gibi anjiyogenezin indüklenerek daha agresif karakterler kazanma yoluna girdiğinin bir ifadesi olabilir.

4. İmmunohistokimyasal analizler sonucunda elde edilen verilerin, Western blot analizleri ile primer tümör dokularında doğrulandığı ve protein miktarının immunohistokimyasal analizlerle aynı sonuçları verdiği görüldü.

5. Bu çalışma CCM proteinlerinin, metastatik meme kanseri hücre hatlarından elde edilen primer tümör dokusu ve metastatik organlarda ekspresyon şiddetinin değiştiğini ancak metastaz alanlarında bu üç proteinin de ekspre olmadığını gösteren ilk orijinal çalışmadır.

## KAYNAKLAR

Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). "Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy." *Nat Rev Cancer* **7**(11): 834-846.

Albelda, S. M., W. A. Muller, C. A. Buck and P. J. Newman (1991). "Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule." *J Cell Biol* **114**(5): 1059-1068.

Baxter, S. S., C. F. Dibble, W. C. Byrd, J. Carlson, C. R. Mack, I. Saldarriaga and S. Bencharit (2014). "Role of cytoskeletal proteins in cerebral cavernous malformation signaling pathways: a proteomic analysis." *Mol Biosyst* **10**(7): 1881-1889.

Bonaros, N., S. Müller, J. Bonatti, R. Kafka, A. Tzankov, R. Bale and T. Bartel (2007). "Primary Ovarian Carcinoid Heart Disease Curatively Treated with a Two-Stage Procedure." *Thorac cardiovasc Surg* **55**(07): 467-469.

Bonnomet, A., A. Brysse, A. Tachsidis, M. Waltham, E. W. Thompson, M. Polette and C. Gilles (2010). "Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**(2): 261-273.

Borikova, A. L., C. F. Dibble, N. Sciaky, C. M. Welch, A. N. Abell, S. Bencharit and G. L. Johnson (2010). "Rho kinase inhibition rescues the endothelial cell cerebral cavernous malformation phenotype." *J Biol Chem* **285**(16): 11760-11764.

Bouvard, D., J. Pouwels, N. De Franceschi and J. Ivaska (2013). "Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(7): 430-442.

Bouvard, D., L. Vignoud, S. Dupe-Manet, N. Abed, H. N. Fournier, C. Vincent-Monegat, S. F. Retta, R. Fassler and M. R. Block (2003). "Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha." *J Biol Chem* **278**(8): 6567-6574.

Castano, Z., K. Tracy and S. S. McAllister (2011). "The tumor macroenvironment and systemic regulation of breast cancer progression." *Int J Dev Biol* **55**(7-9): 889-897.

Cavalcanti, D. D., M. Y. Kalani, N. L. Martirosyan, J. Eales, R. F. Spetzler and M. C. Preul (2012). "Cerebral cavernous malformations: from genes to proteins to disease." *J Neurosurg* **116**(1): 122-132.

Chaowalit, N., H. M. Connolly, H. V. Schaff, M. J. Webb and P. A. Pellikka (2004). "Carcinoid heart disease associated with primary ovarian carcinoid tumor." *Am J Cardiol* **93**(10): 1314-1315.

Clatterbuck, R. E., C. G. Eberhart, B. J. Crain and D. Rigamonti (2001). "Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **71**(2): 188-192.

Coffin, J. D. and T. J. Poole (1988). "Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos." *Development* **102**(4): 735-748.

Cooper, G. M. (1992). *Elements of Human Cancer*, Jones and Bartlett.

Craig, H. D., M. Gunel, O. Cepeda, E. W. Johnson, L. Ptacek, G. K. Steinberg, C. S. Ogilvy, M. J. Berg, S. C. Crawford, R. M. Scott, E. Steichen-Gersdorf, R. Sabroe, C. T. Kennedy, G. Mettler, M. J. Beis, A. Fryer, I. A. Awad and R. P. Lifton (1998). "Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27." *Hum Mol Genet* **7**(12): 1851-1858.

Cuttano, R., N. Rudini, L. Bravi, M. Corada, C. Giampietro, E. Papa, M. F. Morini, L. Maddaluno, N. Baeyens, R. H. Adams, M. K. Jain, G. K. Owens, M. Schwartz, M. G. Lampugnani and E. Dejana (2016). "KLF4 is a key determinant in the development and progression of cerebral cavernous malformations." *EMBO Mol Med* **8**(1): 6-24.

Denier, C., P. Labauge, F. Bergametti, F. Marchelli, F. Riant, M. Arnoult, J. Maciazek, E. Vicaut, L. Brunereau and E. Tournier-Lasserre (2006). "Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients." *Ann Neurol* **60**(5): 550-556.

Draheim, K. M., O. S. Fisher, T. J. Boggon and D. A. Calderwood (2014). "Cerebral cavernous malformation proteins at a glance." *J Cell Sci* **127**(Pt 4): 701-707.

Erin, N., S. Kale, G. Tanriover, S. Koksoy, O. Duymus and A. F. Korcum (2013). "Differential characteristics of heart, liver, and brain metastatic subsets of murine breast carcinoma." *Breast Cancer Res Treat* **139**(3): 677-689.

Etienne-Manneville, S. (2004). "Cdc42--the centre of polarity." *J Cell Sci* **117**(Pt 8): 1291-1300.

Etienne-Manneville, S. (2008). "Polarity proteins in migration and invasion." *Oncogene* **27**(55): 6970-6980.

Fidalgo, M., M. Fraile, A. Pires, T. Force, C. Pombo and J. Zalvide (2010). "CCM3/PDCD10 stabilizes GCKIII proteins to promote Golgi assembly and cell orientation." *J Cell Sci* **123**(Pt 8): 1274-1284.

Fidalgo, M., A. Guerrero, M. Fraile, C. Iglesias, C. M. Pombo and J. Zalvide (2012). "Adaptor protein cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) mediates phosphorylation of the cytoskeletal proteins ezrin/radixin/moesin by mammalian Ste20-4 to protect cells from oxidative stress." *J Biol Chem* **287**(14): 11556-11565.

Fidler, I. J. (2002). "Critical determinants of metastasis." *Semin Cancer Biol* **12**(2): 89-96.

Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 453-458.

Fischer, A., J. Zalvide, E. Faurobert, C. Albiges-Rizo and E. Tournier-Lasserre (2013). "Cerebral cavernous malformations: from CCM genes to endothelial cell homeostasis." *Trends Mol Med* **19**(5): 302-308.

Giancotti, F. G. (2013). "Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation." *Cell* **155**(4): 750-764.



Glading, A., J. Han, R. A. Stockton and M. H. Ginsberg (2007). "KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions." *J Cell Biol* **179**(2): 247-254.

Glading, A. J. and M. H. Ginsberg (2010). "Rap1 and its effector KRIT1/CCM1 regulate beta-catenin signaling." *Dis Model Mech* **3**(1-2): 73-83.

Greene, A. K. (2011). "Vascular anomalies: current overview of the field." *Clin Plast Surg* **38**(1): 1-5.

Guan, X. (2015). "Cancer metastases: challenges and opportunities." *Acta Pharm Sin B* **5**(5): 402-418.

Gunel, M., I. A. Awad, K. Finberg, J. A. Anson, G. K. Steinberg, H. H. Batjer, T. A. Kopitnik, L. Morrison, S. L. Giannotta, C. Nelson-Williams and R. P. Lifton (1996). "A founder mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans." *N Engl J Med* **334**(15): 946-951.

Gunel, M., M. S. Laurans, D. Shin, M. L. DiLuna, J. Voorhees, K. Choate, C. Nelson-Williams and R. P. Lifton (2002). "KRIT1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10677-10682.

Hamilla, S. M., K. M. Stroka and H. Aranda-Espinoza (2014). "VE-Cadherin-Independent Cancer Cell Incorporation into the Vascular Endothelium Precedes Transmigration." *PLoS ONE* **9**(10): e109748.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

Harel, L., B. Costa, M. Tcherpakov, M. Zapatka, A. Oberthuer, L. M. Hansford, M. Vojvodic, Z. Levy, Z. Y. Chen, F. S. Lee, S. Avigad, I. Yaniv, L. Shi, R. Eils, M. Fischer, B. Brors, D. R. Kaplan and M. Fainzilber (2009). "CCM2 mediates death signaling by the TrkA receptor tyrosine kinase." *Neuron* **63**(5): 585-591.

He, Y., H. Zhang, L. Yu, M. Gunel, T. J. Boggon, H. Chen and W. Min (2010). "Stabilization of VEGFR2 signaling by cerebral cavernous malformation 3 is critical for vascular development." *Sci Signal* **3**(116): ra26.

Hilder, T. L., M. H. Malone, S. Bencharit, J. Colicelli, T. A. Haystead, G. L. Johnson and C. C. Wu (2007). "Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex." *J Proteome Res* **6**(11): 4343-4355.

Hogan, B. M., J. Bussmann, H. Wolburg and S. Schulte-Merker (2008). "cml cell autonomously regulates endothelial cellular morphogenesis and vascular tubulogenesis in zebrafish." *Hum Mol Genet* **17**(16): 2424-2432.

Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2003). "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction." *Annu Rev Biochem* **72**: 609-642.

Jemal, A., R. Siegel, J. Xu and E. Ward (2010). "Cancer statistics, 2010." *CA Cancer J Clin* **60**(5): 277-300.

Kean, M. J., D. F. Ceccarelli, M. Goudreault, M. Sanches, S. Tate, B. Larsen, L. C. Gibson, W. B. Derry, I. C. Scott, L. Pelletier, G. S. Baillie, F. Sicheri and A. C. Gingras (2011). "Structure-function analysis of core STRIPAK Proteins: a signaling complex implicated in Golgi polarization." *J Biol Chem* **286**(28): 25065-25075.

Labauge, P., C. Denier, F. Bergametti and E. Tournier-Lasserre (2007). "Genetics of cavernous angiomas." *Lancet Neurol* **6**(3): 237-244.

Laberge-le Couteulx, S., H. H. Jung, P. Labauge, J. P. Houtteville, C. Lescoat, M. Cecillon, E. Marechal, A. Joutel, J. F. Bach and E. Tournier-Lasserre (1999). "Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas." *Nat Genet* **23**(2): 189-193.

Lambertz, N., N. El Hindy, I. Kreitschmann-Andermahr, K. P. Stein, P. Dammann, N. Oezkan, O. Mueller, U. Sure and Y. Zhu (2015). "Downregulation of programmed cell death 10 is associated with tumor cell proliferation, hyperangiogenesis and peritumoral edema in human glioblastoma." *BMC Cancer* **15**: 759.

Lant, B., B. Yu, M. Goudreault, D. Holmyard, J. D. Knight, P. Xu, L. Zhao, K. Chin, E. Wallace, M. Zhen, A. C. Gingras and W. B. Derry (2015). "CCM-3/STRIPAK promotes seamless tube extension through endocytic recycling." *Nat Commun* **6**: 6449.

Lauenborg, B., K. Kopp, T. Krejsgaard, K. W. Eriksen, C. Geisler, S. Dabelsteen, R. Gniadecki, Q. Zhang, M. A. Wasik, A. Woetmann and N. Odum (2010). "Programmed cell death-10 enhances proliferation and protects malignant T cells from apoptosis." *APMIS* **118**(10): 719-728.

Lavoie, J. F., L. Lesauteur, J. Kohn, J. Wong, O. Furtoss, C. J. Thiele, F. D. Miller and D. R. Kaplan (2005). "TrkA induces apoptosis of neuroblastoma cells and does so via a p53-dependent mechanism." *J Biol Chem* **280**(32): 29199-29207.

Li, X., R. Zhang, H. Zhang, Y. He, W. Ji, W. Min and T. J. Boggon (2010). "Crystal structure of CCM3, a cerebral cavernous malformation protein critical for vascular integrity." *J Biol Chem* **285**(31): 24099-24107.

Limbourg, F. P., K. Takeshita, F. Radtke, R. T. Bronson, M. T. Chin and J. K. Liao (2005). "Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis." *Circulation* **111**(14): 1826-1832.

Louvi, A., S. Nishimura and M. Gunel (2014). "Ccm3, a gene associated with cerebral cavernous malformations, is required for neuronal migration." *Development* **141**(6): 1404-1415.

Luca, M., S. Huang, J. E. Gershenwald, R. K. Singh, R. Reich and M. Bar-Eli (1997). "Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis." *Am J Pathol* **151**(4): 1105-1113.

Marchuk, D. A., S. Srinivasan, T. L. Squire and J. S. Zawistowski (2003). "Vascular morphogenesis: tales of two syndromes." *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**: R97-112.

Mardakheh, F. K., A. Paul, S. Kumper, A. Sadok, H. Paterson, A. McCarthy, Y. Yuan and C. J. Marshall (2015). "Global Analysis of mRNA, Translation, and Protein

Localization: Local Translation Is a Key Regulator of Cell Protrusions." *Dev Cell* **35**(3): 344-357.

Mardakheh, F. K., A. Self and C. J. Marshall (2016). "RHO binding to FAM65A regulates Golgi reorientation during cell migration." *J Cell Sci*.

McCormick, W. F. (1966). "The pathology of vascular ("arteriovenous") malformations." *J Neurosurg* **24**(4): 807-816.

McGee, S. F., F. Lanigan, E. Gilligan and B. Groner (2006). "Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression." *EMBO Rep* **7**(11): 1084-1088.

McGuire, A., J. A. Brown and M. J. Kerin (2015). "Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring." *Cancer Metastasis Rev* **34**(1): 145-155.

Mellor, H. (2004). "Cell motility: Golgi signalling shapes up to ship out." *Curr Biol* **14**(11): R434-435.

Moser, M., K. R. Legate, R. Zent and R. Fassler (2009). "The tail of integrins, talin, and kindlins." *Science* **324**(5929): 895-899.

Nouri, M., E. Ratther, N. Stylianou, C. C. Nelson, B. G. Hollier and E. D. Williams (2014). "Androgen-targeted therapy-induced epithelial mesenchymal plasticity and neuroendocrine transdifferentiation in prostate cancer: an opportunity for intervention." *Front Oncol* **4**: 370.

Ota, I., X. Y. Li, Y. Hu and S. J. Weiss (2009). "Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48): 20318-20323.

Paez, D., M. J. Labonte, P. Bohanes, W. Zhang, L. Benhanim, Y. Ning, T. Wakatsuki, F. Loupakis and H. J. Lenz (2012). "Cancer dormancy: a model of early dissemination and late cancer recurrence." *Clin Cancer Res* **18**(3): 645-653.

Paget, S. (1889). Seed and soil theory.

Pantel, K., R. H. Brakenhoff and B. Brandt (2008). "Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells." *Nat Rev Cancer* **8**(5): 329-340.

Reedquist, K. A., E. Ross, E. A. Koop, R. M. Wolthuis, F. J. Zwartkruis, Y. van Kooyk, M. Salmon, C. D. Buckley and J. L. Bos (2000). "The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion." *J Cell Biol* **148**(6): 1151-1158.

Reich, P., J. Winkler, A. Straube, H. J. Steiger and A. Peraud (2003). "Molecular genetic investigations in the CCM1 gene in sporadic cerebral cavernomas." *Neurology* **60**(7): 1135-1138.

Reshetnyak, Y. K., L. Yao, S. Zheng, S. Kuznetsov, D. M. Engelman and O. A. Andreev (2011). "Measuring tumor aggressiveness and targeting metastatic lesions with fluorescent pHLIP." *Mol Imaging Biol* **13**(6): 1146-1156.

Revencu, N. and M. Vikkula (2006). "Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights." *J Med Genet* **43**(9): 716-721.

Sadok, A. and C. J. Marshall (2014). "Rho GTPases: masters of cell migration." *Small GTPases* **5**: e29710.

Schuyler, S. C. and D. Pellman (2001). "Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning." *Cell* **105**(4): 421-424.

Serebriiskii, I., J. Estojak, G. Sonoda, J. R. Testa and E. A. Golemis (1997). "Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22." *Oncogene* **15**(9): 1043-1049.

Shariat, S. F., B. Andrews, M. W. Kattan, J. Kim, T. M. Wheeler and K. M. Slawin "Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis." *Urology* **58**(6): 1008-1015.

Society, A. C. (2015). "Cancer Facts & Figures."

Sosa, M. S., P. Bragado and J. A. Aguirre-Ghiso (2014). "Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field." *Nat Rev Cancer* **14**(9): 611-622.

Sosa, M. S., P. Bragado, J. Debnath and J. A. Aguirre-Ghiso (2013). "Regulation of tumor cell dormancy by tissue microenvironments and autophagy." *Adv Exp Med Biol* **734**: 73-89.

Stein, J. P., R. P. Munjaal, L. Lagace, E. C. Lai, B. W. O'Malley and A. R. Means (1983). "Tissue-specific expression of a chicken calmodulin pseudogene lacking intervening sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(21): 6485-6489.

Stockton, R. A., R. Shenkar, I. A. Awad and M. H. Ginsberg (2010). "Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity." *J Exp Med* **207**(4): 881-896.

Tanriover, G., L. Sati, M. Tekcan, N. Demir, M. Gunel and C. Celik-Ozenci (2010). "Presence of the brain proteins cerebral cavernous malformation-2 and cerebral cavernous malformation-3 in rat testes and their potential role in experimental varicocele." *Fertil Steril* **93**(8): 2716-2722.

Tanriover, G., Y. Seval, L. Sati, M. Gunel and N. Demir (2009). "CCM2 and CCM3 proteins contribute to vasculogenesis and angiogenesis in human placenta." *Histol Histopathol* **24**(10): 1287-1294.

Tanriover, G., B. Sozen, M. Gunel and N. Demir (2011). "CCM2 expression during prenatal development and adult human neocortex." *Int J Dev Neurosci* **29**(5): 509-514.

Tanriover, G., B. Sozen, A. Seker, T. Kilic, M. Gunel and N. Demir (2013). "Ultrastructural analysis of vascular features in cerebral cavernous malformations." *Clin Neurol Neurosurg* **115**(4): 438-444.

Uranishi, R., N. I. Baev, P. Y. Ng, J. H. Kim and I. A. Awad (2001). "Expression of endothelial cell angiogenesis receptors in human cerebrovascular malformations." *Neurosurgery* **48**(2): 359-367; discussion 367-358.

van den Berg, M. C. and B. M. Burgering (2014). "CCM1 and the second life of proteins in adhesion complexes." *Cell Adh Migr* **8**(2): 146-157.

Vestweber, D., M. Winderlich, G. Cagna and A. F. Nottebaum (2009). "Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player." *Trends Cell Biol* **19**(1): 8-15.

Vikkula, M., L. M. Boon and J. B. Mulliken (2001). "Molecular genetics of vascular malformations." *Matrix Biol* **20**(5-6): 327-335.

Voss, K., S. Stahl, E. Schleider, S. Ullrich, J. Nickel, T. D. Mueller and U. Felbor (2007). "CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations." *Neurogenetics* **8**(4): 249-256.

Wang, S. H. and S. Y. Lin (2013). "Tumor dormancy: potential therapeutic target in tumor recurrence and metastasis prevention." *Exp Hematol Oncol* **2**(1): 29.

Wojnowski, L., A. M. Zimmer, T. W. Beck, H. Hahn, R. Bernal, U. R. Rapp and A. Zimmer (1997). "Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice." *Nat Genet* **16**(3): 293-297.

Wong, J. H., I. A. Awad and J. H. Kim (2000). "Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations: a preliminary report." *Neurosurgery* **46**(6): 1454-1459.

Yadav, S. and A. D. Linstedt (2011). "Golgi positioning." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(5).

Yadav, S., S. Puri and A. D. Linstedt (2009). "A primary role for Golgi positioning in directed secretion, cell polarity, and wound healing." *Mol Biol Cell* **20**(6): 1728-1736.

Yamaguchi, H., M. Lorenz, S. Kempiak, C. Sarmiento, S. Coniglio, M. Symons, J. Segall, R. Eddy, H. Miki, T. Takenawa and J. Condeelis (2005). "Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin." *J Cell Biol* **168**(3): 441-452.

Yamamoto, M., S. H. Ramirez, S. Sato, T. Kiyota, R. L. Cerny, K. Kaibuchi, Y. Persidsky and T. Ikezu (2008). "Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells." *Am J Pathol* **172**(2): 521-533.

Yao, D., C. Dai and S. Peng (2011). "Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation." *Mol Cancer Res* **9**(12): 1608-1620.

Zawistowski, J. S., I. G. Serebriiskii, M. F. Lee, E. A. Golemis and D. A. Marchuk (2002). "KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis." *Hum Mol Genet* **11**(4): 389-396.

Zhang, G. J. and I. Adachi (1999). "Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma." *Anticancer Res* **19**(2B): 1427-1432.

Zhang, H., X. Ma, X. Deng, Y. Chen, X. Mo, Y. Zhang, H. Zhao and D. Ma (2012). "PDCD10 interacts with STK25 to accelerate cell apoptosis under oxidative stress." *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**: 2295-2305.

Zhang, J., R. E. Clatterbuck, D. Rigamonti, D. D. Chang and H. C. Dietz (2001). "Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation." *Hum Mol Genet* **10**(25): 2953-2960.

Zhu, Y., Q. Wu, J. F. Xu, D. Miller, I. E. Sandalcioglu, J. M. Zhang and U. Sure (2010). "Differential angiogenesis function of CCM2 and CCM3 in cerebral cavernous malformations." *Neurosurg Focus* **29**(3): E1.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Mansur	Uyruğu	TC
Soyadı	CİCİ	Tel no	+90 554 6800078
Doğum tarihi	25.09.1986	e-posta	cicimansur@gmail.com

### Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	İstanbul Kağıthane Anadolu Lisesi	2004
Lisans	Akdeniz Üniversitesi – Biyoloji	2014
Yüksek Lisans		
Doktora		

### İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	56

### Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

### Burslar-Ödüller:

1. Poster Sunum 3. Ödülü. 30 Nisan – 03 Mayıs 2016 XIII. Uluslararası katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi “Metastatik ve non-metastatik fare meme kanseri modelinde serebral kavernoza malformasyon proteinlerinin (CCM1, CCM2 ve CCM3) ekspresyonlarının değerlendirilmesi’

### Yayınlar ve Bildiriler:

1. Poster Sunum. 2-4 Eylül 2015 22. Elektron Mikroskopi Kongresi (EMK 2015) “Fare Meme Kanseri Modeli Organ Metastazlarında CCM3 Ekspresyonunun

Değerlendirilmesi”

2. Poster Sunum 30 Nisan – 03 Mayıs 2016 XIII. Uluslararası katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi “Metastatik ve non-metastatik fare meme kanseri modelinde serebral kavernoza malformasyon proteinlerinin (CCM1, CCM2 ve CCM3) ekspresyonlarının değerlendirilmesi”
3. “Serebral Kavernoza Malformasyonların Moleküler ve Genetik Temelleri” Türkçe derleme