

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİDE KANSERİNDE *GLİPİKAN 5* ve *GLİPİKAN 6*'NİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN TANISAL ve PROGNOSTİK ÖNEMİ**

Melike DİNÇCELİK

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Fatma Ajlan TÜKÜN**

ANKARA

2011

MİDE KANSERİNDE *GLİPİKAN 5* ve *GLİPİKAN 6* GENLERİNİN EXPRESYON SEVİYELERİNİN TANISAL ve PROGNOSTİK ÖNEMİ

ÖZET

Mide kanseri dünya çapında en sık görülen malignansilerden biridir ve kanser nedenli ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda mide kanserine özgü kromozomal amplifikasyonlar gösterilmiş ve bu amplifikasyon bölgelerinin bazılarında mide kanseri ile ilişkilendirilmiş genler bildirilmiştir. Gümüş-Akay ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınladıkları çalışmada mide adenokarsinomunda, yüksek çözünürlüklü-karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (HR-CGH) yöntemi ile saptanan DNA kopya sayısı değişimleri arasında 13q artışı lenf nodu tutulumu ile ilişkili olması bakımından dikkat çekmiştir. Minimal çakışma bölgesinde lokalize genler incelendiğinde *glipikan-5* (*GPC5*) ve *glipikan-6* (*GPC6*)'nın mide karsinogenezinde rol oynayabilecek aday genler olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada mide kanserinde *GPC5* ve *GPC6* genlerinin ekspresyon seviyelerinin tanisal ve prognostik öneminin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla intestinal tip mide adenokarsinomlu 35 hastaya (23E, 12K) ait normal ve tümörlü doku olmak üzere toplam 70 mide dokusu örneğinde kantitatif PCR (Real-Time PCR) yöntemi ile ilgili genlerin ekspresyonları kantitatif olarak belirlenmiştir. *GPC5* ve *GPC6* gen ekspresyon seviyeleri normal ve tümörlü dokularda karşılaştırılmıştır. Ayrıca tümörlü dokularda tespit edilen gen ekspresyon seviyeleri tümör invazyonu, lenf nodu tutulumu, histolojik sınıflandırma ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonu gibi klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi açısından değerlendirilmiştir.

GPC5 geninin normal ve tümörlü dokularda eksprese olmadığı tespit edilmiştir. Her iki grupta da ekspresyonu saptanan *GPC6*'nın mRNA düzeyinin tümör dokularında normale göre istatistiksel olarak anlamlı dercede arttığı ($p=0.039$) tespit edilmiştir. Ancak *GPC6* ekspresyonu ve klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu bulgular *GPC6* ekspresyonu artışının mide kanseri gelişiminde etkili olabileceğini, ancak kanserin ilerlemesiyle ilişkisinin bulunmadığını düşündürmektedir.

2011, 75 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mide kanseri, *GPC5*, *GPC6*, Ekspresyon, Prognoz

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF *GLYPICAN 5* AND *GLYPICAN 6* EXPRESSION LEVELS IN GASTRIC CANCER

ABSTRACT

Gastric carcinoma is one of the most common malignancies throughout the world, and takes the second place among the cancer related deaths. Studies have revealed several chromosomal amplifications specific for gastric cancers, and some of these amplification regions were reported to include several gastric cancer related genes. In the study by Gümüş - Akay et al. published in 2009, it was noteworthy that among the DNA copy number changes, which were detected by using high resolution – comparative genomic hybridization (HR-CGH) method, 13q amplification was associated with lymph node involvement of gastric adenocarcinoma. When the genes at the minimal overlapping regions were examined, *glypican-5* (*GPC5*) and *glypican-6* (*GPC6*) genes were thought to be candidate genes that may play a role in gastric carcinogenesis. In this study it was aimed to investigate the diagnostic, and prognostic importance of the expression levels of *GPC5*, and *GPC6* genes in gastric cancer. For this purpose *GPC5* and *GPC6* gene expressions were quantitatively determined by real-time PCR method in total of 70 tumor and normal gastric mucosa samples belonging to 35 patient (23M, 12F) with intestinal type gastric adenocarcinoma. Expression levels of *GPC5* and *GPC6* genes were compared between normal and tumor tissues. Additionally, the association of expression levels in tumoral tissues with several clinicopathological parameters, such as tumoral invasion, lymph node involvement, histopathological classification, and *Helicobacter pylori* infection was evaluated.

It was found that *GPC5* gene had no expression in both normal, and tumoral samples. The mRNA level of *GPC6*, which was detected in both groups, was found to be significantly ($p=0,039$) higher in tumor tissues than that in normal group. However, there was no statistically significant association between *GPC6* expression and any of the clinicopathological parameters that were studied ($p>0.05$). Our findings suggest that an increase in *GPC6* expression levels may play a possible role in gastric cancer development, but not in progression of the cancer.

2011, 75 pages

Key Words: Gastric cancer, *GPC5*, *GPC6*, Expression, Prognosis

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tezi, TUBİTAK 109S250 No.lu projesi kapsamında desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve beni yönlendiren değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. F. Ajlan TÜKÜN'e,

Tezimin tüm aşamalarında bana her konuda yol gösteren ve aktif olarak yardımcı olan Doç. Dr. Güvem GÜMÜŞ-AKAY'a,

Sonuçların değerlendirilmesinde titizlikle emek veren Sayın Doç. Dr. Atilla ELHAN'a

Laboratuvar çalışmalarımnda desteklerini esirgemeyen başta Bio. Efsun EREN olmak üzere tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tezimin bitim aşamasına kadar tüm sıkıntılarımnda beni dinleyen ve rahatlatan, uzakta bile olsa bana yol gösteren Dr. Volkan ASLAN'a

Eğitimimin her aşamasında bana her türlü desteği veren arkadaşım Bio. Nuray VAROL'a

En önemlisi eğitimim ve kişisel gelişimim için çırpınan, haklarını asla ödeyemeyeceğim, her türlü sıkıntım ve üzüntümde beni değerli varlıkları ile beni mutlu eden annem Ersin, babam Mehmet ve kardeşim Metin DİNÇÇELİK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Melike Dinççelik

Ankara, 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	.vii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1. Mide Kanseri.....	2
2.1.1. Mide kanserinin sınıflandırması.....	3
2.1.2. Mide kanserinin moleküler etiyojisi.....	4
2.1.2.1. Genetik değişiklikler	4
2.1.1.2. Epigenetik değişiklikler.....	6
2.1.3. Mikroorganizmalar veya Virüsler ile Enfeksiyon	8
2.1.4. Sinyal İletim Yolaklarının Mide Kanserindeki Etkisi.	9
2.2. Proteoglikanlar	11
2.3. Glipikanlar	13
2.3.1. Glipikan sentezi.....	15
2.3.2. Glipikan döngüsü	17
2.3.3. Gelişim sürecinde glipikanlar.....	18
2.3.4. Glipikanlar ve kanser	20
2.4. Amaç.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Çalışma Grubu	23
3.2. Araç ve Gereçler	23
3.2.1. Kullanılan cihazlar	23
3.2.2. Kullanılan kimyasal sarf malzemeleri.....	24

3.2.3. Kullanılan bileşik ve çözeltiler.....	25
3.3. RNA İzolasyonu	25
3.3.1. Doku hazırlama aşaması.....	26
3.3.2. Faz ayrımı aşaması	26
3.3.3. RNA izolasyonu	26
3.4. RNA'nın Kantitasyonu	27
3.5. cDNA Sentezi	27
3.6. Kantitatif-PCR (Real-Time PCR).....	29
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	33
4.1. <i>GPC5</i> Ekspresyonu ve Mide Kanseri	34
4.2. <i>GPC6</i> Ekspresyonu ve Mide Kanseri	35
4.2.1. <i>GPC6</i> ekspresyonu ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
6. KAYNAKLAR.....	46
EK-1 ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Membran heparan sülfat proteoglikanlarının yapısı.....	12
Şekil 2.2.	Glipikanların şematik gösterimi	14
Şekil 2.3.	Heparan sülfat glikozaminoglikanlarının biyosentezi.....	16
Şekil 2.4.	Glipikan döngüsü	17
Şekil 3.1.	cDNA sentez basamakları	28
Şekil 4.1.	24 nolu hastanın normal (A) ve tümör (B) dokularında elde edilen <i>GPC5</i> ve <i>GAPDH</i> genlerine ait amplifikasyon eğrileri	34
Şekil 4.2.	24 nolu hastanın normal (A) ve tümör (B) dokularında elde edilen <i>GPC6</i> ve <i>GAPDH</i> genlerine ait amplifikasyon eğrileri	35
Şekil 5.1.	İnsanda Wnt sinyal iletiminin ve glipikan ilişkisinin şematik gösterimi.....	40
Şekil 5.2.	(A) İnsanda Hh sinyal iletimi. (B) İnsanda Hh sinyal iletiminde glipikanların görevi	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mide kanseri ile ilişkilendirilmiş genler ve tümör oluşumundaki rolleri.....	6
Çizelge 2.2. İnsanda glipikan ailesi üyelerinin kromozomal lokalizasyonu ve ekspresyon paternleri	20
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan cihazlar	23
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan kimyasal sarf malzemeleri	24
Çizelge 3.3. Araştırmada kullanılan bileşik ve çözeltiler	25
Çizelge 3.4. Master karışım hazırlama prosedürü	29
Çizelge 3.5. Primer, prob dizileri, Tm sıcaklıkları ve katalog numaraları.....	30
Çizelge 3.6. Reaksiyon karışımı hazırlama prosedürü.....	31
Çizelge 3.7. Kantitatif PCR reaksiyon koşulları	31
Çizelge 4.1. Tümör dokuların alınmış olduğu 35 hastaya ait demografik ve klinik bilgiler	33
Çizelge 4.2. Örneklerle ait klinikopatolojik özelliklerin istatistiksel değerlendirmesi.....	37

SİMGELER DİZİNİ

<i>APC</i>	Adenomatöz Polipozis Koli (Adenomatous Polyposis Coli)
<i>Bcl-2</i>	B-hücre KLL/Lenfoma-2 (B-cell CLL/Lymphoma-2)
bç	Baz çifti
BMP	Kemik Morfojenik Protein (Bone Morfogenic Protein)
BMPR	Kemik Morfojenik Protein Reseptör (Bone Morfogenic Protein Receptor)
CCL3	Kemokin (C-C motifi) Ligand 3 (Chemokine (C-C motif) Ligand 3)
COOH-terminal	Karboksi Uç
<i>CDH</i>	Kaderin (Cadherin)
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin Dependent Kinase)
CTSB	Katepsin B
cDNA	Komplementer DNA (Complementary DNA)
<i>c-erb B2</i>	V-Erb-B2 Eritroblastik Lösemi Viral Onkogen Homoloğu 2 (V-Erb-B2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2)
CGH	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (Comparative Genomic Hybridization)
<i>c-Met</i>	Met protoonkogen (Met Proto-oncogene)
<i>c-myc</i>	V-MYC Myelositomatozis Viral Onkogen Homoloğu (V-MYC Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog)
COX	Siklooksijenaz
CpG	Sitozin-Guanin Dinükleotidi
CS	Kondroitin Sülfat
Cu(II)/Cu(I)	Bakır 2/Bakır 1
dH ₂ O	Distile Su
DHH	Desert hedgehog
DNA	Deoksiribonükleik Asit

DNMT	DNA Metil Transferaz
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
DS	Dermatan Sülfat
DTT	Ditiyotreitöl (Dithiothreitöl)
EBV	Epstein-Barr virüsü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)
EPI	Epimerizasyon
ERK	Elk-bağımlı Tirozin Kinaz (Elk-Related Tyrosine Kinase)
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
<i>FHIT</i>	Kırılgan Histidin Üçlü Geni (Fragile Histidine Triad Gene)
GAG	Glikozaminglikan
GalT	Galaktozil Transferaz
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
GlcNAc	N-Asetil Galaktozamin
GlcNH ₂	Glikozamin
GlcNSO ₃	N-Sülfatlanmış Glikozamin
GlcUA	Glukuronik Asit
GlcUA-T	Glukozamin Transferaz
GLI	Gliotaktin
GPC	Glipikan
GPI	Glikozilfosfotidilinisitol
GSK3 β	Glikojen Sintaz Kinaz 3 Beta
GWAS	Genom Boyu Asosiyasyon Çalışmaları (Genome Wide Association Studies)

HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepatocyte Growth Factor)
Hh	Hedgehog
<i>hMLH</i>	İnsan mutL Homoloğu (Human mutL Homolog)
<i>hPMS</i>	İnsan Armış Postmitotik Segregasyon (Human Postmeiotic Segregation Increased)
HR-CGH	Yüksek Çözünürlüklü Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (High Resolution-Comparative Genomic Hybridization)
HS	Heparan Sülfat
HSPG	Heparan Sülfat Proteoglikanlar
IdoUA	İduronik Asit
IHH	Indian Hedgehog
IL8	İnterlökin 8
<i>IQGAP-1</i>	IQ Motif İçeren GTPaz Aktive Edici Protein (IQ Motif Containing GTPase Activating Protein)
ITF2	İmmunoglobulin Transkripsiyon Faktör 2
İκB	Kappa B İnhibitörü
JAK	Janus kinaz
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
<i>KAI-1</i>	Kangai 1
kDa	KiloDalton
<i>K-ras</i>	V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarkoma Viral Onkogen Homoloğu (V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog)
KS	Keratan Sülfat
<i>K-sam</i>	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
LOH	Heterozigosite Kaybı (Loss of Heterozygosity)

MFNG	MFNG O-Fukosilpeptid 3-Beta-N-Asetilglukozaminiltransferaz
MGMT	O-6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
MMP3	Matriks Metalloproteinaz 3
MMP-7	Matriks Metalloproteinaz-7
MSI	Mikrosatellit İnstabilitesi
NDST	N-Deasetilaz/Sülfo Transferaz
NF-κB	Nüklear Faktör Kappa B
NO	Nitrik Oksit
N-terminal	Amino Ucu
OCI-5	Glipikan 3
OST	O-sülfotransferaz
PG	Proteoglikan
PGA5	Pepsinojen 5
PGC	Progastriksin
<i>PTEN</i>	Fosfataz ve Tensin Homoloğu (phosphatase and tensin homolog)
REG4	Regenerating İslet-Derived Family, Member 4
RARβ	Retinoik Asit Reseptör beta
<i>Rho-GTP</i>	Rho-Guanozin Trifosfat
RNA	Ribonükleik Asit
RNASE1	Ribonükleaz 1
<i>RUNX3</i>	Runt- Bağımlı Transkripsiyon Faktör 3 (Runt-related transcription factor 3)
<i>S100A7</i>	S100 Kalsium Bağlanma Proteini A7 (S100 Calcium Binding Protein A7)
sdc	Sindekan
SHH	Sonic Hedgehog

SIX3	SIX homeobox 3
Smad	Mothers Against Decapentaplegic
SMO	Smothered
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
Sp1	Sp1 transkripsiyon faktörü
SST	Somatostatin
<i>SSTR</i>	Somatostatin Reseptör 1
STAT	Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatör (Signal Transducer and Activator of Transcription)
STK36	Serin/Treonin Protein Kinaz 36
SUFU	Suppressor of Fused Homolog
TCF/LEF	Transkripsiyon Faktörü/Lenfoid Enhancer Bağlanma Faktörü (Transcription Factor /Lymphoid Enhancer-Binding Factor)
TGF β	Transforme Edici Büyüme Faktörü β (Transforming Growth Factor β)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
Wnt	Wingless Tip MMTV Entegrasyon Bölge Ailesi (Wingless-Type MMTV Integration Site Family)
XylT	Ksilozil Transferaz
ZNF312b	FEZ ailesi çinko parmak 1 (FEZ Family Zinc Finger 1)
α -Glc-NAc-T	α -N-asetil glukozamin transferaz

1. GİRİŞ

Mide kanseri dünyada gözlenme sıklığına göre ikinci sırada yer alan kanser tipidir ve kanser nedeni ölümünün başında gelmektedir. İnsanda mide kanseri de dahil olmak üzere tüm kanser tiplerinde genomik amplifikasyon sıklıkla gözlenen bir durumdur. Gen amplifikasyonu yoluyla genlerin ekspresyonunun artışı sonucunda hücresel davranış etkilenebilmektedir ve bu bakımdan gen amplifikasyonlarının tespiti tümörojenik sürecin daha detaylı anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Günümüzde kanserin tedavisinde kullanılan diagnostik ve prognostik belirteçlere ek olarak yeni terapötik yaklaşımlar için hedef molekül arayışları hızla devam etmektedir.

Gümüş-Akay ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınladıkları mide adenokarsinomunda DNA kopya sayısı değişimlerinin yüksek çözünürlüklü karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (HR-CGH) yöntemiyle araştırıldığı çalışmada 13q artışının en sık tespit edilen kromozomal değişiklik olduğu bildirilmiş ve bu bulgu artmış lenf nodu tutulumu ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur. Minimal çakışma bölgesi 13q21-q32 bölgesinde lokalize ve karsinogenez sürecinde rol oynadığı gösterilmiş veya rol oynayabileceği düşünülen genler değerlendirildiğinde *glipikan-5 (GPC5)* ve *glipikan-6 (GPC6)* genleri mide kanserinde daha önce bildirilmemeleri nedeniyle ilgi çekmiştir. Bu tez çalışmasında, birçok kanser türünde amplifikasyonu bildirilmiş olan glipikan ailesi üyelerinden *GPC5* ve *GPC6* genlerinin ekspresyonunun mide kanseri tanı ve prognozu ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Mide Kanseri

Dünyada kanser nedenli ölümlerde mide kanseri ikinci sırada yer almaktadır (Daniel vd 2005). 2009 Dünya sağlık örgütü (WHO) verilerine göre dünya çapında her yıl 800,000 kişi mide kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir (WHO 2009). Mide kanseri vakalarının yaklaşık %90'ı sporadik olmakla birlikte geri kalan vakalar kalıtsal faktörlere bağlı olarak gelişir. Kalıtsal faktörlere bağlı olarak gelişen vakaların %1-3'lük kısmını genetik yollarla aydınlatılmış herediter sendromlar oluşturmaktadır. Herediter difüz mide kanseri sendromlarına neden olan *CDH1* (kaderin-1) 'germline' mutasyonları genetik mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir. Mide karsinomlarının sıklıkla gözlemlendiği kalıtsal yatkınlık sendromlarına herediter nonpolipozis kolorektal kanser, Li-Fraumeni ve Peutz-Jeghers sendromları örnek olarak verilebilir (Corso vd 2010).

Her geçen gün mide tümörlerinin tanı ve tedavisi amacıyla, tümörogeneizde rol oynayan biyolojik olayları aydınlatmaya yönelik pek çok çalışma gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmalarda mide kanserinin prognozu, tümörün biyolojik davranışı ve moleküler genetik değişiklikler sonucu ortaya çıkan patolojik özellikler arasında bağlantılar kurulmaya çalışılmaktadır. Fakat genetik değişikliklerin klinik önemi hala aydınlatılmamıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda çok sayıda biyolojik faktör tanımlanmıştır. Tüm bu faktörlerin klinik önemleri tam olarak anlaşılammış olsa da söz konusu faktörler mide kanserinin biyolojik temelini anlamamıza önemli katkılar sağlamış ve her geçen gün bu biyolojik faktörlerin bazılarının prognostik ve prediktif önemleri ortaya çıkmaya başlamıştır. Böylece, aktin, HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), tirozin kinaz gibi faktörlerin mide kanserinin tedavisinde yeni hedefler olarak kullanılmaları gündeme gelmektedir (Scartozzi vd 2004, Compare vd 2010, De Vita vd 2010, Ku ve Ilson 2010, Mlkvy 2010, Ruiz-Tovar vd 2010).

2.1.1. Mide kanserinin sınıflandırması

Tümörlerin doğru bir şekilde sınıflandırılması, kanserlerin klinik takibi, epidemiyolojisi ve patogenezi anlamak açısından son derece önemlidir. Mide kanseri için günümüzde çeşitli sınıflandırmalar mevcuttur. Bu sınıflandırmaların bazıları tamamen tümörlerin klinik ve endoskopik görünümüne dayanmakta bazıları ise yalnızca histopatolojiyi temel almaktadır. Bugün için en yaygın olarak kullanılan ve en başarılı kabul edilen sınıflandırma, 1965 yılında Lauren tarafından ortaya konmuştur (Lauren 1965).

Lauren sınıflandırmasına göre mide kanserleri intestinal ve difüz olmak üzere iki temel histolojik tipe ayrılmaktadır (Lauren 1965). Bu sistem, tümörlerin mikroskobik konfigürasyon ve büyüme özelliklerini temel alır. Difüz tip kanserler midenin stromasına yayılabilen ve mide duvarına genellikle bez oluşturmaksızın derin infiltrasyon yapabilen non-adeziv tümör hücreleri içerir. Bu tip mide kanserleri intestinal metaplaziler ile ilişkili değildir ve çevresel faktörler difüz tip mide kanserinin oluşmasında çok az etkiye sahiptir. Difüz tip mide kanserleri çoğunlukla genç vakalarda görülür ve prognozu kötüdür. İntestinal tip kanserlerde ise dikkate değer ölçüde bez oluşumu söz konusudur ve mikroskobik görünümü kolonik mukozaya benzer. Bu tip mide kanserlerinin kronik atrofik gastrite sekonder olarak geliştiği düşünülmektedir (Dincken vd 2005).

İntestinal tip mide kanseri toplumda daha sık görülmektedir ve çoğunlukla yeme alışkanlığı (tuzlanmış balık ve et, tütsülenmiş yiyecekler vb.), sigara ve alkol tüketimi gibi çevresel faktörlerle yakından ilişkilidir. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu hem intestinal hem de difüz tip mide kanseri ile ilişkili gözükmektedir. Ancak, *H. pylori* ilişkili preneoplastik lezyonlar ve genetik-çevre ilişkilerini etkileyen polimorfizmler daha ziyade intestinal tip mide kanserinin özelliğidir. Difüz tip mide kanserlerinde ise çoğunlukla primer genetik etiyolojiden söz edilmektedir. Ailesel difüz ve intestinal tip mide kanserleri farklı genetik temellere sahip oldukları için risk altındaki ailelerin değerlendirilmesinde etkilenmiş bireylerin patolojik olarak sınıflandırılması oldukça kritik bir basamaktır (Lynch vd 2005, Corso vd 2010).

2.1.2. Mide kanserinin moleküler etiyojisi

Biyolojik araştırmalarda kullanılan yeni teknikler sayesinde günümüzde gen düzensizlikleri daha detaylı çalışılabilmektedir. Bu tekniklerden biri olan karşılaştırılmal genetik hibridizasyon (CGH) yöntemi kromozomal segmentlerin amplifikasyon ve delesyonlarının yüksek rezolüsyonda tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Transkriptom analizlerinde “mikroarray” lerin kullanılması çok sayıda genin ekspresyon profillerinin çok kısa zamanda ortaya konmasını olanaklı kılmaktadır. Yine yakın geçmişte geliştirilen transgenik ve “knock-out” fare modelleri sayesinde genlerin ve ürünlerinin *in vivo* fonksiyonları çalışılabilmektedir (Stock ve Otto 2005). Tüm bu araçlar sayesinde edinilen bilgiler ışığında, günümüzde mide kanserinde değişmiş gen düzenlenmesine neden olan çok sayıda mekanizma ortaya konmuştur. Tüm bu değişiklikler hücre içi proliferasyon ve diferansiyasyon kontrolünde çalışılan yollarda sinyal iletim defektine yol açmaktadır. Gen deregülasyonu değişik mekanizmalarla meydana gelebilmektedir:

1. Genetik
2. Epigenetik

2.1.2.1. Genetik değişiklikler

Polizomiler, kromozomal translokasyonlar, inversiyonlar veya geniş delesyonlar gibi kromozomal değişiklikler mide kanserlerinin büyük bir çoğunluğunda görülmekte ve bu değişiklikler gen ekspresyonlarının artmasına/azalmasına veya kimerik gen ürünlerinin oluşmasına neden olabilmektedir. Ancak bu değişikliklerin malign fenotipin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu tam olarak netlik kazanmamıştır (Stock ve Otto 2005).

İki ve 20 numaralı kromozomların polizomileri mide kanserlerinde en sık rastlanan sayısal anomalilerdir. Rapor edilen mide kanseri örneklerinin %50'sinden fazlasında 1, 3, 7 ve 13 numaralı kromozomları içeren kromozom yeniden düzenlenmeleri bildirilmektedir. 6q'nun parsiyel delesyonları yine sıklıkla gözlenen sitogenetik bulgular arasında yer almaktadır. Mide kanserinde inversiyonlar çoğunlukla 8q ve 17q için bildirilmektedir (Stock ve Otto 2005). Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucu 17q24-qter (%53), 20q13-qter (%48), 1p32-p36 (%42), 22q12-qter (%27), 17p13-pter (%24), 16p13-pter (%21), 6p21-pter

(%19), 20p12-pter (%19), 7q21.3-q22.1 (%57), 13q21-q32 (%26), 3q28-qter (%8), 7p11-p22/7q21-q36 (%80) 13q13-q14 (%8) ve 20q13.12-q13.33 (%41-70) bölgelerindeki artışların; 18q12-qter (%11), 3p12 (%8), 3p25-pter (%8), 5q14-q23 (%8) ve 9p21-p23 (%5) bölgelerindeki kayıpların mide kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wu vd 2002, Gümüş-Akay vd 2009, Yang 2007, Myllykangas vd 2010, Uchida vd 2010). Mide kanserlerinde LOH gözlenen lokuslar çoğunlukla 1p, 3p, 4p, 5q, 7p, 7q, 8p, 9p, 12q, 13q, 17p, 18q, 22q ve Y kromozomlarında yer almaktadır (Schneider vd 1995, Tamura vd 1996, Gleeson vd 1997, Choi vd 1998, Yustein vd 1999, Baffa vd 2000, Koo vd 2000, French vd 2004, Suzuki vd 2004, Xia vd 2006).

Kromozomal değişimler dışında gen ekspresyonlarının değişimine yol açan gen mutasyonları da mide kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Çizelge 2.1). Mide tümörlerinde gen amplifikasyonu ve bunun sonucu olarak aşırı gen ekspresyonu *c-erb B2*, *c-Met*, *K-sam*, *K-ras* ve *c-myc* gibi çeşitli onkogenlerde de gözlenmiştir (Smolen vd 2006, Smith vd 2006, Varis vd 2004, Song vd 2009, Burbano vd 2006). Bu onkogenlerin bazılarındaki ekspresyon artışı kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. *CDH1*, *APC*, *p53*, *PTEN* ve *RUNX3* gibi tümör baskılayıcı genlerde görülen ve işlev kaybına yol açan mutasyonlar da mide kanseri ile sıklıkla ilişkilendirilmiştir (Fenoglio-Preiser vd 2003, Li vd 2005, Sakakura vd 2005, Wang 2006). Bunların dışında CDK (sikline bağımlı protein kinaz) hücre siklusu düzenleyicilerinin baskılanan ekspresyonlarının saptandığı çalışmalar da mevcuttur (Panani 2008). Ayrıca, Rajkumar vd'nin yaptıkları çalışmada (2010) mide kanserinde *IL8*, *SIX3*, *MMP3*, *REG4*, *CCL3*, *CTSB* genlerinin de içinde bulunduğu 32 genin ekspresyonunda artış saptanırken, *PGA5*, *SST*, *RNASE1*, *PGC*, *MFNG* dahil olduğu 18 genin ekspresyonunda azalma saptanmıştır.

Çizelge 2.1. Mide kanseri ile ilişkilendirilmiş genler ve tümör oluşumundaki rolleri

Genler	Fonksiyon	Mutasyon Tipi	Tümörögenез ile İlişkisi
<i>c-met</i>	Onkogen	Aşırı ekspresyon	Tümör invazyonu, lenf nodu tutulumu, kötü prognosis
<i>K-sam</i>	Onkogen	Aşırı ekspresyon	Kötü prognosis
<i>C-erb B2</i>	Onkogen	Aşırı ekspresyon	Tümör invazyonu, lenf nodu tutulumu
<i>K-ras</i>	Onkogen	Nokta Mutasyonu	Tümör ilerlemesi ve metastaz
<i>c-myc</i>	Onkogen	Amplifikasyon	Kötü prognosis
<i>P53</i>	Tümör baskılayıcı	Nokta Mutasyonu	Çoğalma, lenf nodu tutulumu
<i>APC</i>	Tümör baskılayıcı	Nokta Mutasyonu	β -katenin ekspresyonunu artırır
<i>RARβ</i>	Tümör baskılayıcı	Hipermetilasyon sonucu baskılanmış ekspresyon	?
<i>Bcl-2</i>	Onkogen	Aşırı ekspresyon	İnvazyon, lenf nodu tutulumu ile ters ilişki
<i>RUNX3</i>	Tümör baskılayıcı	Delesyon, hipermetilasyon sonucu baskılanmış ekspresyon	?
<i>PTEN</i>	Tümör baskılayıcı	LOH, Nokta Mutasyonu	Metastaz
<i>E-kaderin</i>	Tümör baskılayıcı	LOH, mutasyon, hipermetilasyon sonucu baskılanmış ekspresyon	Metastaz, kötü prognosis
<i>Siklin E</i>	Onkogen	Aşırı ekspresyon	Lenf nodu tutulumu, kötü prognosis
<i>P27</i>	Tümör baskılayıcı	Baskılanmış ekspresyon	Tümör invazyonu, metastaz
<i>P16</i>	Tümör baskılayıcı	Baskılanmış ekspresyon	Lenf nodu tutulumu

2.1.2.2. Epigenetik değişiklikler

Mide kanserlerinde gen inaktivasyonuna sebep olan epigenetik mekanizmaların başında “DNA metilasyonu yoluyla epigenetik susturulma” gelmektedir. Memelilerde DNA metilasyonu çoğunlukla CpG adacıklarında gözlenir. CpG adacıkları genlerin promotör veya diğer cis- etkili düzenleyici dizilerinde gözlenmektedir. DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri bu bölgelerde yer alan sitidinleri 5. pozisyonlarından metiller. Bugüne kadar memelilerde DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b olmak üzere CpG metilasyonundan sorumlu üç enzim tanımlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu değişik tümör tiplerinde karsinogenez ile ilişkili genlerin anormal metilasyonu saptanmıştır. Bu

çalışmalarda artmış DNMT1 ekspresyonu bildirilmiş ve her zaman olmamakla birlikte DNMT1 aşırı ekspresyonunun az diferansiye tümörlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Lynch vd 2005).

Mikrosatellit instabilitesi (MSI), genetik instabilite ile sonuçlanan DNA tamir sistemlerindeki aksaklıkların yol açtığı bir semptomdur. Mide kanserlerinde gözlenen MSI'ne neden olan tamir mekanizması bozuklukları, mutasyonel inaktivasyon ve çoğunlukla *hMLH1*, *hMSH2*, *hPMS1* ve *hPMS2* yanlış eşleşme tamir genlerindeki hipermetilasyon ile susturulma sonucu ortaya çıkmaktadır (Panani 2008). MSI intestinal veya difüz tipli mide kanser tümörlerinin yaklaşık %15-35'inde tanımlanmıştır. MSI varlığı ile mide kanserin diğer klinikopatolojik özellikleri arasında korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Zaky vd 2008, Seo vd 2009)

RARβ (Retinoik asit reseptör beta), *RUNX3* (Runt-bağımlı transkripsiyon faktör 3), *CDH1*, *p53* ve *p16*'nın transkripsiyonel susturulması mide kanserinde sıklıkla gösterilmiştir (Panani 2008, Al-Moundhri vd 2010). Promotor bölgedeki CpG adalarının hipermetilasyonu sonucu bu genlerde fonksiyon kaybı mide karsinomlarının %65'inde görülmüştür. Benzer şekilde *CDH4* (kaderin-4) ve *COX-2* (siklooksijenaz 2) genlerinin promotorundaki hipermetilasyon da mide kanseri vakalarının çoğunda bildirilmektedir. Bugün için genlerin metilasyon durumundaki değişimlerin genel veya gene özgü olup olmadığı ve hipermetilasyonun malign fenotipin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu bilinmemektedir (Stock ve Otto 2005).

Mide kanserinde histon modifikasyon paternini araştıran bir çalışmada H3K9 trimetilasyonu tümör derecesi, rekürensisi ve azalmış sağkalım süresi ile ilişkilendirilmiştir (Park vd 2008). ChIP-chip array ile yapılan bir çalışmada ise 119 gende H3K27 trimetilasyonu saptanmıştır (Zhang vd 2009). Literatürde mide kanserinde histon modifikasyonları ile ilişkili olarak bazı genlerin ekspresyonel değişimlerinin saptandığı çalışmalar da mevcuttur. Örneğin *ZNF312b* ve *Sp1* genlerinin ekspresyonlarındaki artış ile histon asetilasyonu arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Song vd 2010a). İnsan mide kanserlerinde *p16* tümör baskılayıcı geninin ekspresyonu ile H3K9 dimetilasyonu, H3K9 asetilasyonu ve DNA metilasyonu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada, bu modifikasyonların kombine bir şekilde *p16* geninin susturulmasında rol oynadıkları tespit

edilmiştir (Meng vd 2009). Benzer şekilde mide kanserinde H3K9 dimetilasyonu, H3K4 dimetilasyonu, H3K9 asetilasyonu ve DNA metilasyonunun birlikte *MGMT* geninin susturulmasında rol oynadığı rapor edilmiştir (Meng vd 2010).

Yapılan son çalışmalarda mide kanseri ve miRNA aracılı gen düzenlenmesi üzerinde durulmaktadır. Kodlamayan RNA sınıfına ait 22 nükleotid uzunluğunda olan miRNAların mide kanseri dokularında değişmiş ekspresyonları gösterilmiştir. miRNA'ları kodlayan genlerin bir kısmı yeni protoonkogen olarak (miR-516a-3p, miR-192, miR-199a, miR-107 gibi) bir kısmı ise tümör baskılayıcı olarak (miR-43c, miR-126 gibi) karakterize edilmiş ve bu miRNA'ların bazıları malign mide kanser hücrelerinin oluşumunu kontrol ettiği gösterilmiştir (Feng vd 2010, Guo vd 2010, Jin vd 2010, Li vd 2010, Song vd 2010b, Takei vd 2010). miRNA ekspresyonlarındaki değişikliklerin hücre proliferasyonunu, apoptoz direncini, invazyonu ve metastaz yeteneğini arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Li vd 2010, Jin vd 2010, Song vd 2010b, Takei vd 2010). miRNA genlerindeki polimorfizmlerin de mide kanseri ve atrofik gastrit riskini arttırdığı bildirilmiştir (Wu vd 2010).

2.1.3. Mikroorganizmalar veya Virüsler ile Enfeksiyon

Mikroorganizmalar veya virüsler ile enfeksiyon genlerin ekspresyonlarında değişime neden olabilmektedir ve bu durumun tümör gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu yönünde kanıtlar mevcuttur. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun mide kanseri gelişimindeki rolü tamamen bilinmemektedir. *H. pylori* spiral, gram-negatif bir bakteridir ve spesifik olarak gastrik antrumda yer alan epitel hücrelerine tutunur. Bu bakteri enfeksiyonunun anlamlı (kronik gastrit ve mide kanseri riski ile) derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hücre proliferasyonunda rol oynayan peptid hormon gastrin'in de *H.pylori* enfeksiyonundan sonra serumda konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. *H. pylori* enfeksiyonu sonrası ekspresyonunun arttığı bildirilen genler, *Anneksin II*, *S100A7*, *Rho-GTP*, *IQGAP-1* ve *COX-2*'dir. Ayrıca, *SSTR-1* geninin ekspresyonunun *H.pylori* enfeksiyonuna bağlı olarak azaldığı rapor edilmiştir (Stock ve Otto 2005, Vauhkonen vd 2006).

H. pylori enfeksiyonu sonrası *COX-2* ekspresyonunun artması sıklıkla görülmektedir. *COX-2* prostaglandin sentezinde yer alan hız kısıtlayıcı enzimlerden birisidir. *COX-2* artışının mide tümörogenezinin erken evrelerinde meydana gelen bir olay olduğu düşünülmektedir. *COX-2* aşırı ekspresyonu intestinal tip mide kanserlerinde daha sık gözlenmektedir ve tümörün farklılaşma derecesi ile ilişkilidir (Stock ve Otto 2005).

Epstein-Barr virüsü (EBV) ile enfeksiyon da yine mide kanseri ile ilişkili bulunmuştur. Mide kanseri vakalarının yaklaşık %7-20'sinde EBV enfeksiyonu mevcuttur. EBV enfeksiyonu gastrik epitel hücrelerini immortalize etmeksizin bu hücrelerin jenerasyon sayısını arttırmaktadır. Moleküler seviyede bakıldığında *p16* geni hipermetilasyonu ile EBV enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki bildirilmiştir. Bu durumun EBV enfeksiyonu ile ilişkili olarak gösterilen artmış DNMT1 ekspresyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Mide kanserinde EBV ilişkili olarak ekspresyonu baskılanan genler: *p16*, *Smad4*, *FHIT* ve *KAI-1*'dir (Takada 2000).

2.1.4. Sinyal İletim Yolaklarının Mide Kanserindeki Etkisi

Wnt/ β -kateninin sinyal aktivasyonu mide kanserlerin %30'unda gözlenmektedir (Oshima vd 2006). β -katenin'in sürekli stabilizasyonuna neden olan mutasyonlar β -katenin'in nükleusa translokasyon oranının artmasına sebep olmaktadır. Böylece Tcf/Lef-bağımlı olarak gen ekspresyonu arttırarak *c-Myc*, *siklin D1*, *MMP-7*, *fibronektin*, *gastrin* ve *ITF2* gibi hücre proliferasyonu üzerinde pozitif etkili genlerin aşırı ekspresyonuna neden olmaktadır. (Scartozzi vd 2004). APC/ β -katenin sinyal yolağının mide kanseri gelişimi üzerinde etkisini araştıran çalışmalar çelişkili sonuçların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bir çalışmada mide kanseri olgularında β -katenin mutasyonları bildirilirken; başka bir çalışmanın sonuçları bu durumu destekler nitelikte değildir (Maesawa vd 1995, Candidus vd 1996, Woo vd 2001, Li vd 2002, Abraham vd 2003). Benzer şekilde mide kanseri gelişiminde APC geni mutasyonları ile ilgili olarak da tezat sonuçların verildiği çalışmalar bulunmaktadır (Stock ve Otto 2005).

Gelişim sürecinde aktive olan Hegehog (Hh) sinyal yolağı kanser hücrelerinde kontrolsüz bir şekilde aktive olmaktadır. Son yapılan çalışmalarda mide kanseri örneklerinde Hh yolak aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Mide kanseri hücrelerinde *in vitro* çalışmalarda Hh sinyal yolağının baskılanmasına paralel olarak hücre büyümesinin de baskılandığı gösterilmiştir. Ayrıca Hh yolak aktivasyonu mide kanserinde kötü prognoz ve agresif tümörlerle ilişkilendirilmektedir (Fukaya vd 2006, Wang vd 2006, Lee vd 2007, Yanai vd 2007). Hh sinyali TGF- β (Transforme edici büyüme faktörü β) yolağını kullanarak mide kanserinde ölümsüzlüğe ve invazyon fenotipinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Fu vd 2009). TGF- β birçok hücrede çoğalmayı ve farklılaşmayı kontrol eden bir faktördür. TGF- β tip2 reseptöre bağlanarak tip 1 reseptörünün fosforilasyonuna neden olur ve böylece Smad2 ve Smad3 aktive olur. Aktive Smad 2/3, Smad 4 ile heterodimer oluşturmak suretiyle transkriptör faktör olarak fonksiyon görür. Kanserın erken aşamalarında TGF- β sinyali, hücre çoğalmasını baskılamak ve apoptozu uyarmak suretiyle tümörü baskılayıcı olarak fonksiyon görür. Tümörün geç aşamalarında ise TGF- β sinyali tümörün invazyonu ve metastazını artırmak suretiyle anjiyogenezi, hücre ölümsüzlüğünü, immun cevabın baskılanmasını ve tümör hücrelerin ekstraselüler matriks ile etkileşimini arttırmaktadır. TGF- β aşırı ekspresyonu mide kanserinde anjiyogenezin, invazyonun ve metastazın artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Miyazono vd 2003, Mishra vd 2005). Ayrıca TGF- β tarafından uyarılan ERK ve JNK bağımlı sinyal yolları da mide kanseri hücrelerinin invazyon ve metastazında rol oynamaktadır (Yoo vd 2008, Fu vd 2009).

EGFR ve HER2, ErbB reseptör ailesi üyesidir. EGFR'ün reseptöre bağlanmasının mide karsinomlarında mide mukozası büyümesine yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, EGFR aşırı ekspresyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Yoshida vd 1989, Matsubara vd 2008). HER2'nin ise aşırı ekspresyonu mide karsinomlarında %23-%27 oranında tespit edilmiştir (Gravalos vd 2008). Bununla birlikte, EGFR ve HER2'nin reseptör aktivasyonunun hücre çoğalması, apoptoz, adezyon ve göç olaylarında etkili olduğu bildirilmiştir (Roskoski vd 2004).

Mide de BMP (Bone morfogenic protein) sinyal iletiminin, inflamasyon sırasında 'up regüle' olmasına karşın mide kanseri dokularında 'down regüle' olduğu gösterilmiştir. BMP etkisini spesifik tip 1 ve 2 serin-treonin kinaz reseptörü ile göstermektedir. BMP aktivasyonu 'downstream' sinyal proteinleri Smad 1, 5 ve 8'i fosforilasyonunu attırmak

suretiyle proteinlerin etkinliklerini arttırmaktadır. Fosforile olan smadlar bir diğer smad protein olan Smad 4 ile heterodimer oluşturarak, nükleusa geç eder ve ilgili genlerin aktivasyonunu sağlarlar (Bleuming vd 2006, Hardwick vd 2008).

NF-κB (Nükleer faktör kappa B) memelilerde dimer şeklinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörü normalde inhibitör IκB'ye (kappa B inhibitörü) bağlanmakta ve sitoplazmada kesimlemeye uğramaktadır. Hücresel stres ile aktive olan NF-κB yolu özellikle inflamasyon sırasında artmaktadır (Spehlmann vd 2009). Mide kanserinde NF-κB, *H.pylori* enfeksiyonuna verilen cevapta etkili olmaktadır. Anormal NF-κB aktivasyonu hücrelerin apoptozdan kaçmasına ve buna bağlı olarak hücre çoğalmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, genomik instabiliteye, glikolizise ve ilaç direncine neden olduğu bildirilmiştir. (Liu vd 2004, Matsumoto vd 2007, Cho vd 2008, Kang vd 2008, Liu vd 2010).

2.2. Proteoglikanlar

Glikoprotein molekülü temelli olan proteoglikanlar ekstraselüler matrikste hücre membranına yapışık olarak bulunur. Proteoglikanlar, bir kor proteini ve bu kor proteine spesifik bölgelerde kovalan olarak bağlı bir veya daha çok glikozaminglikan (GAG) zincirlerinden oluşmaktadır. Proteoglikanlar doku organizasyonunun yapısal bileşeni olup hücre proliferasyonu, adezyonu, migrasyonu ve değişimi gibi çok sayıda biyolojik süreçte görev almaktadır (Syrokou vd 1999, Kim-Safran vd 2009). Tüm bu fonksiyonlar ekstraselüler ve sitoplazmik ligandların etkileşimi aracılığıyla olmaktadır (Jackson vd 1991).

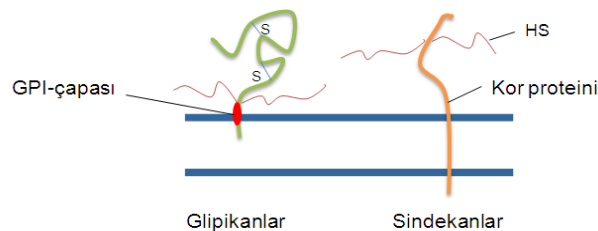
GAG'lar, dallanmamış, yüksek moleküler ağırlıklı polisakkaritler olup amin şekeri ve üronik asit birleşimiyle oluşan disakkarit tekrarlarından oluşan bir iskelete sahiptir (Häcker vd 2005). Proteoglikanlar içerdiği karbonhidrat zincir tipine göre; Kondroitin Sülfat (CS), Dermatan Sülfat (DS), Keratan Sülfat (KS) ve Heparan Sülfat (HS) olarak dört alt gruba ayrılmaktadır (Theocharis vd 2010). N-asetilglikozamin ve glukuronik asit üniteleri HS'ı, N-asetilgalaktozamin ve glukuronik asit üniteleri CS'ı, CS'daki

glukuronik asitlerin iduronik asit ile epimerizasyonu DS'ı, N-asetil glukozamin galaktoz eklenmesi de KS'ı oluşturmaktadır (Häcker vd 2005).

Proteoglikanları yerleşimine göre, matriks proteoglikanları ve membran proteoglikanları olarak iki sınıfa ayırabilmekteyiz. Matriks proteoglikanları büyük çoğunlukta yapısında karbonhidrat zincirini içermesine karşın membran proteoglikanları, glipikan ve sindekan gibi, çoğunlukta yapısında HS zinciri barındırmaktadır. Glipikan ve sindekan protein aileleri sırasıyla ortalama 60-70 kDa ve 20-25 kDa'luk korunmuş kor proteini içermektedir. Bu proteinler gelişim süresince doku ve safha spesifik olarak eksprese edilirler (Häcker vd 2005).

Glipikanlar, HS proteoglikanlar (HSPG) olup hücre membranına glikozilfosfatidilinisitol (GPI çapası) aracılığıyla bağlanırlar (Şekil 2.1). Glipikan ailesinin memelilerde 6, *Drosophila melanogaster*'de 2 ve *Caenorhabditis elegans*'da da en az bir tane üyesi bulunmaktadır (Filmus vd 2008). Farklı aile üyeleri sınırlı dizi homolojisi göstermesine karşın bütün glipikanlarda 14 korunmuş sistein rezidüsü ve membrana yakın -COOH terminal bölgesinde 2-3 GAG bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bu nedenle bütün glipikanlar benzer üçüncül yapıya sahiptir (Veugelers vd 1999).

Sindekanlar ise tip I transmembran proteini olup beş adet GAG bağlanma bölgesi içerir ve bunların bazıları HS, CS veya DS zinciri taşıyabilir. Farklı sindekanların sitoplazmik ve transmembran domainleri benzerlik göstermesine karşın ekstraselüler domainleri farklılık gösterir ve bir tane GAG bağlanma bölgesi içerir. Memelilerde dört *sindekan* (*sd*) geni tanımlanmış olmasına karşın omurgasızlarda yalnızca bir tane bulunmaktadır (Häcker vd 2005).



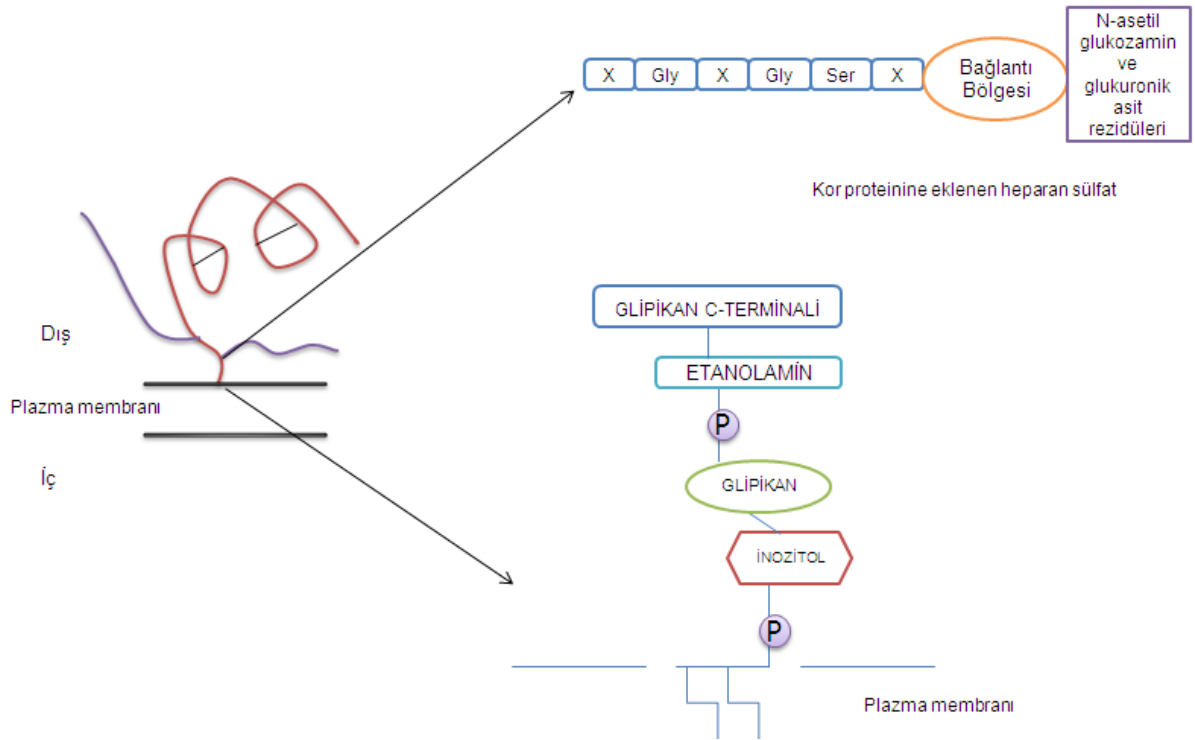
Şekil 2.1. Membran heparan sulfat proteoglikanlarının yapısı.

2.3. Glipikanlar

Proteoglikanların, GPI-çapalanmış heparan sülfat (HS) ailesinin ilk üyesi olan glipikanlar (GPC) yaklaşık 20 yıl önce David vd tarafından tanımlanmıştır (David vd 1990). Glipikanların memelilerde şimdiye kadar tanımlanmış altı; *GPC1*, -2, -3, -4, -5 ve -6, *D.melanogaster*'de iki; *Dally* ve *Dally-like* ve bir tane de *C.elegans*'da; *knypek* üyesi bulunmaktadır. Bütün glipikanlar N-terminal sekansında yaklaşık 60-70 kDa globüler bir domain içerir. Bu domainde iyi korunmuş 14 sistein rezidüsü ve HS bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. -COOH terminal bölgesinde ise plazma membranına bağlanmak için GPI-çapası yer almaktadır. Glipikanların yapısı türler arasında iyi korunmuştur (Bernfield vd 1999, Veugelers vd 1999, Filmus vd 2008).

Glipikanlar göstermiş oldukları homoloji dikkate alındığında iki gruba ayrılmaktadır. Birinci grup içerisinde *GPC1*, *GPC2*, *GPC4* ve *GPC6* yer almaktadır ve %40-60 oranında homoloji göstermektedirler. İkinci grup içerisinde ise *GPC3* ve *GPC5* yer almaktadır ve %40 homoloji göstermelerine karşın birinci gruba benzerlikleri %20'dir. Ayrıca genomik analizler göstermiştir ki; *GPC1*, *GPC2*, *GPC4* ve *GPC6* genleri dokuz ekzon, *GPC3* ve *GPC5* genleri ise yalnızca sekiz ekzon içermektedir (Filmus vd 2008).

Glipikanlar, membranı geçmeksizin membran lipitlerine bağlanırlar (Brown vd 1992) (Şekil 2.2) GPI çapaları aracılığıyla proteinlerin membrana bağlanmasının önemi tam olarak anlaşılmasına rağmen, sitoplazmik domainleri olmaksızın spesifik hücre içi sinyal molekülleri ile etkileşime aracılık ettiği ve GPI çapaları ile fosfolipid fosfolipaz C'nin aktivasyonu ve proteolitik kesimleme aracılığıyla hücre yüzeyinden ekstraselüler ortama salınan proteinlerin düzenlenmesini sağladığı düşünülmektedir (Ishihara vd 1997). Ayrıca çapaların hücre yüzey bileşenlerinin endositoz aracılığıyla geri dönüşümüne aracılık ettiği ifade edilmektedir (Yanagashita vd 1998). Genel olarak glipikanlar gelişim süresince geniş ölçüde eksprese olmaktadır. Ekspresyon düzeyleri safha ve doku spesifik olarak değişmektedir (Pellegrini vd 1998, Saunders vd 1997, De Cat vd 2001). Glipikan kor proteini, sayısız disülfid bağları sayesinde fazlasıyla kompakt globüler bir domain şeklinde organize olmaktadır. HS zincirleri serin rezidülerine kovalen olarak bağlanmakta ve polipeptid zincirindeki Ser-Gly-X-Gly motiflerinin bir kısmını oluşturmaktadır (De Cat ve David 2001).



Şekil 2.2. Glipikanların şematik gösterimi.

Glipikan proteinleri 555-580 aminoasit uzunluğundadır ve bu genlerin uzunlukları 7.7 kb (*GPC2* geni)'dan 1.5Mb (*GPC5* geni)'a kadar değişmektedir. Bu çalışmada ekspresyon seviyesi araştırılan *GPC5* geninin uzunluğu 1,468,556 bp'dir ve 8 ekzondan oluşmaktadır. mRNA'sı 2904 baz uzunluğundadır, 572 amino asitten oluşan bir protein kodlar. Yapılan çalışmalarla, *GPC5*'te 3 adet SNP belirlenmiştir. Ekspresyon seviyesini araştırdığımız *GPC6* geninin uzunluğu ise 1,181,197 bp'dir 10 ekzondan meydana gelmektedir. 555 amino asitten oluşan protein 7144 baz uzunluğundaki mRNA'dan kodlanmaktadır (GenBank).

Glipikan-1 (*GPC1*, UniProtKB/Swiss-Prot girişi P35052), serin 530'dan modifiye edilmektedir. N-bağlı modifikasyonu için 2, gagosilasyon (gagoylation) için 4 potansiyel bölgesi bulunmaktadır. Proteinin -COOH terminal bölgesinde yer alan 27 amino asitlik (531 ile 558 amino asitler arası) bir bölgenin çıkarılmasıyla olgun *GPC1* protein formu oluşur (Kırn-Safran vd 2009). Glipikan-2 (*GPC2*, UniProtKB/Swiss-Prot girişi Q8N158) serebroglipikan olarak da adlandırılır. -COOH terminal bölgesindeki 555-579 amino asitlerin

çıkarılmasından sonra -COOH terminal bölgesinde yer alan 554. amino asitten modifiye olmaktadır (Kirn-Safran vd 2009). Glipikan-3 ise ayrıca (GPC3, UniProtKB/Swiss-Prot girişi P51654) intestinal protein OCI-5 olarak da adlandırılmaktadır. 580 amino asitten oluşan öncü protein, diğer glipikanlar gibi benzer şekilde işleme tabi tutulmaktadır (Kirn-Safran vd 2009). K-glipikan olarak adlandırılan Glipikan-4 (GPC4, UniProtKB/Swiss-Prot girişi O75487) böbrekte bol miktarda bulunmaktadır. 529 amino asitlik bir öncül proteinden oluşmaktadır. -COOH terminal bölgenin kaldırılması ve lipit çapasının eklenmesinden sonra olgun GPC4 proteini oluşmaktadır. Olgun forma HS ve N-bağlı karbonhidrat eklenmektedir (Kirn-Safran vd 2009).

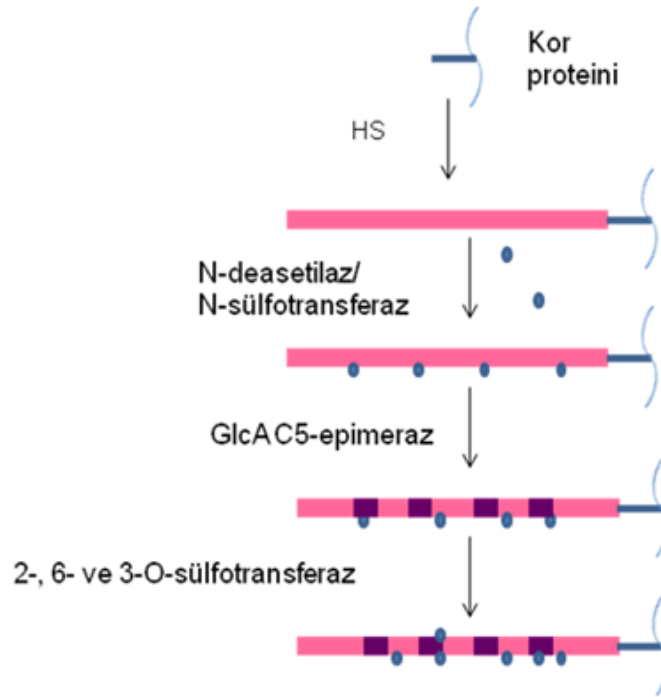
Glipikan-5 (GPC5, UniProtKB/Swiss-Prot girişi P78333) HS'ın eklenmesi ve N-bağlı karbonitrat zincirlerinin modifikasyonu için çoklu bölge içermektedir. GPC5 proteininin 446-509'uncu amino asitleri arasında O-gagosilasyon için 5 bölge mevcuttur. -COOH terminal kısmına yakın bölgede lipitlerin eklenmesi için birçok potansiyel bölge mevcuttur ve hangi bölgenin lipit eklenmesi için kullanılacağı tam olarak bilinmemektedir. Glipikan-6 (GPC6, UniProtKB/Swiss-Prot girişi Q9Y625) proteini ise 555 amino asitlik öncül bir proteinden oluşmaktadır. 529'uncu amino asitinden modifiye edilmesiyle olgun GPC6 proteini oluşur (Kirn-Safran vd 2009).

2.3.1. Glipikan sentezi

Olgunlaşmamış glipikan polipeptidlerinin hem N- ve hem de -COOH terminal bölgelerindeki sinyal dizileri incelenmiştir. N- ucunda endoplazmik retikuluma taşınma sinyali ve C-ucunda ise membrana geçici olarak tutunma ve glipiasyon (glypiation) için gerekli diziler bulunmaktadır (Fransson 2003).

HS'ler ortak bir protein-glikan bağlanma bölgesi olan GlcUA-Gal-Gal-Xyl-Ser üzerinden eklenmektedir ve HS biyosentezi için XylT (ksilozil transferaz), GalT-1 (galaktozil transferaz-1), GalT-2 (galaktozil transferaz-2) ve GlcUA-T (glukozamin transferaz) enzimleri gereklidir. İnsanda XylT için kodlanan gen sayısı oldukça fazladır. Fakat diğer enzimler tek bir gen ile sentezlenmektedir (Esko ve Selleck 2000, Götting vd 2000). Xyl rezidüleri geçici olarak 2-fosforilasyona maruz kalmaktadır (Fransson vd 2000).

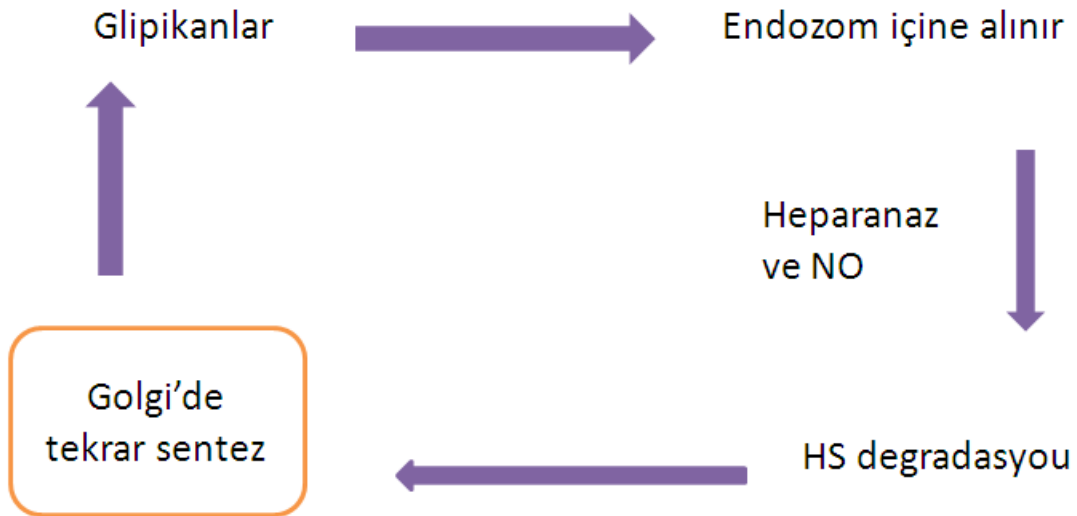
Glipikan sentezi HS zincirinin α -Glc-NAc-T (α -N-asetil glukozamin transferaz) enzimi tarafından katalizlenmesiyle başlamaktadır (Şekil 2.3). (Esko ve Selleck 2000, Chen ve Lander 2001). HS polimerizasyonu için glukuronik asit-glukozamin tekrarlarının, $(-4\text{GlcUA}_1-4\text{GlcNAc}_1-)_n$, omurgasını meydana getirmek üzere üç farklı ko-polimeraz geninin gerekli olduğu düşünülmektedir. Zincirin uzaması ile birlikte veya zincir uzamasının ardından zincir modifikasyonları olmaktadır. Diğer bir enzim ailesi, HS'da N-asetili N-sülfatlarla yer değiştirir. NDST-1 (N-deasetilaz/sülfo transferaz-1) bölgesel olarak zinciri değiştirir buna karşın NDST-2 (N-deasetilaz/sülfo transferaz-2) daha geniş ardışık yer değiştirmeleri sağlar (Fransson 2003). NDST-3 (N-deasetilaz/sülfotransferaz-3) enziminin deasetilaz aktivitesi, sülfotransferaz aktivitesinden 10 kat daha yüksektir ve bu enzim serbest amino gruplu (GlcNH_3^+) glukozaminlerin oluşumundan sorumlu olabilir (Esko ve Selleck 2000). N-sülfatlanma işleminden sonra C-5 epimerizasyonu (EPI) gerçekleşir ve bu aşamada GlcUA (glukuronik asit), IdoUA'e (iduronik asit) çevrilir. Son olarak bazı O-sülfotransferazlar (OST) sayesinde GlcNSO_3 , IdoUA ve bazen de GlcNAc (N-asetil galaktozamin) ve GlcUA moleküllerinin geniş ve değişik sülfatlanmaları meydana gelir. (Esko ve Selleck 2000).



Şekil 2.3. Heparan sülfat glikozaminoglikanlarının biyosentezi.

2.3.2. Glipikan döngüsü

Glipikanların döngüsü HS'in yeniden degrade olması veya yapılması ile olmaktadır. Bu döngü membrandan golgiye ve oradan tekrar membrana doğru bir yol izlemektedir. Glipikanlar, 3 adet HS zinciri üzerinde bulunan aşırı sülfatlı kısımları sayesinde polibazik bileşikler ile bağlanır ve glipikan hücre içine girince bu polibazik bileşikler de içeri girmiş olur (muhtemelen caveolae aracılığı ile). GPC1'deki HS degradasyonu nitrik oksit (NO) tarafından katalizlenmektedir. NO, HS'ı glukozamin bölgesinden deaminatif olarak kesmektedir. Kesilmeye uğrayan bu bölgeler genellikle kor protein kısmına yakın yerlerde bulunmaktadır. GPC1 de, HS'ın NO-katalizli degradasyonu, Cu(II)/Cu(I) redoks döngüsüne bağımlı olarak yapılmaktadır. Bakır redoks döngüsünde NO'dan oluşan nitrozil anyonları, HS zincirindeki GlcNH₃ (glukozamin) rezidülerinden kesimlenir. HS zincirlerin tekrar sentezi sonucunda GPC1 hücre membranına bağlanmaktadır (Fransson 2003, Fransson vd 2004) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Glipikan döngüsü.

2.3.3. Gelişim sürecinde glipikanlar

Glipikan ekspresyonunun embriyogenezin ilerleyen aşamalarında azaldığı gösterilmiştir (embriyonun 13'üncü gününden sonra) (Çizelge 2.2). Genel olarak, glipikanların ekspresyonu gelişen dokularda spesifik spatio-temporal olarak düzenlenmektedir. Bu nedenle morfogenezde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. *GPC1*'in beyin ve iskelet sistemi boyunca yüksek seviyede eksprese edildiği bildirilmiştir (Litwack vd 1998). Beyinde *GPC1* esas olarak ventrikülleri çevreleyen, hem nöron hem de glial hücrelerin çoğalan öncüllerini içeren bir bölge olan gelişim halindeki nöroepitelyumda eksprese olmaktadır. *GPC1* ekspresyonu post-mitotik nöronlarda da görülmektedir (Litwack vd 1998).

GPC1 ilk olarak, neonatal Schwann hücrelerinin *in vitro* kültürlerinde tanımlanmıştır. *In vivo* glial hücrelerinde *GPC1* ekspresyonunun olmadığı veya çok az olduğu gösterilmiştir (Carey ve Stahl 1990, Litwack vd 1998). Ayrıca, iskelet sisteminde, osteoblastlarda kemikleşen intramembranöz ve kıkırdak bölgelerinde yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir. (Brandan vd 1996). İlginç bir şekilde, neonatal ve yetişkin kalpte post-natal olarak tespit edilen güçlü ekspresyonuna rağmen embriyonik kardiyomiyositlerde *GPC1* ekspresyonunun olmadığı veya çok az olduğu gösterilmiştir (Asundi vd 1997, Litwack vd 1998). *GPC1* ekspresyonu deri gelişiminde de tespit edilmiştir. Saç foliküllerinde ve epiderminin tüm tabakalarında post-natal olarak devam etmekte fakat dermis veya stratum corneumda bulunmamaktadır. Böbrekte *GPC1* ekspresyonunun gelişimin sonraki aşamaları sırasında glomerulide lokalize olduğu bulunmuştur (Litwack vd 1998).

GPC2 ekspresyonu beyin, spinal kord, dorsal kök ganglionları ve kranial sinirleri içeren nöronal dokularla sınırlanmıştır (Ivins vd 1997). *GPC1*'den farklı olarak *GPC2* ilgili yetişkin dokularda eksprese olmaktadır. İlginç bir şekilde *GPC2*'nin 'down-regülasyonu' sonucunda nöronların maturasyonu ve migrasyonu gerçekleşmektedir. Bu durum serebellumda belirgin olarak görülmektedir. Serebellum'da *GPC2* ekspresyonu internal granül tabakada olmamasına rağmen nöronların eksternal granül tabakasının derin bölgelerinde lokalize olduğu bulunmuştur (Ivins vd 1997).

Memeli gelişimi boyunca *GPC3*'ün, sinir sistemi hariç birçok dokuda yüksek seviyede eksprese olduğu bulunmuştur (Pellegrini vd 1998). Buna karşın, yetişkin dokularda akciğerler, ovaryum, memeli epitelyumu ve mezotelyumu içeren yalnız birkaç dokuda sınırlandığı tespit edilmiştir. Embriyoda *GPC3* seviyelerinin özellikle epitel veya kemiği çevreleyen mezenşimal hücrelerde yüksek olduğu gösterilmiştir. Bağırsak gelişiminde *GPC3* ekspresyonu ile ilgili detaylı bir çalışmada bu glikoprotein hem endoderm hem de mezenşim kökenli hücrelerde tespit edildiği bildirilmektedir (Li vd 1997).

GPC3 genindeki fonksiyon kaybı mutasyonları insanda Simpson-Golabi-Behmel Sendromu gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Bu sendromda pre- ve post-natal aşırı büyüme, viseral ve kemik anomalileri görülmektedir. Ayrıca Wilms' tümör, nöroblastoma, hepatoblastoma ve gonadal tümörler içeren embriyonik tümör gelişimi için riskin arttığı gösterilmiştir (Behmel vd 1984, Neri vd 1988, Hughes-Benzie vd 1992, Pilia vd 1996, Veugelers vd 2000). Yapılan birçok çalışmaya rağmen moleküler mekanizma halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir. *GPC3* ile aynı bölgede lokalize olan *GPC4*'deki mutasyonların da Simpson-Golabi-Behmel Sendromu üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir (Veugelers vd 2000).

GPC4'ün embriyonik ekspresyon paterni ile sınırlı olduğu gösterilmiştir (Watanabe vd 1995). *GPC4*, böbreğin tübüler epitelyumunda, adrenal bezlerde endotelyum ve bağırsağın düz kaslarında ve mandibular/maksiler bölgede tespit edilmiştir. Beyinde ise nöronal prekürsör hücrelerinden üretilen *GPC4*'ün telensefalik ventriküler zonda yüksek oranda eksprese olduğu tespit edilmiştir (Hagihara vd 2000).

Genel olarak *GPC5*, embriyodaki birkaç farklı organ içindeki sınırlı bir grup hücrede bulunmaktadır (Saunders vd 1997). Gelişimin erken evrelerinde, *GPC5* dorsal root gangliada, kol tomurcuklarında, göz veziküllerinde, maksiler süreçte ve mezonefroзда eksprese olmaktadır. İlginç bir şekilde *GPC5* ekspresyonuna mezenşimal çoğalma ve kondensasyonunun başlangıç aşamasında rastlanmaktadır. Örneğin; kol tomurcuklarının oluşumu sırasında eksprese olmasına rağmen pre-kondrogenik mezenşimin parmak gelişiminin distal kısmında ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. *GPC5* ekspresyonu ayrıca metanefrik mezenşimde böbrek organogenezi sırasında tespit edilmiştir. Böbrekte *GPC5* ekspresyonu mezenşim etrafında pre-tübüler epitelyumda mevcut olmakla birlikte

glomerül ve olgun tübüler yapılarında tespit edilmemiştir. *GPC5* ekspresyonu merkezi sinir sistemi gelişimde sınırlıdır fakat yetişkin merkezi sinir sistemi boyunca yaygın olarak görülmektedir (Saunders vd 1997).

GPC6 ekspresyonunun, *GPC5* gibi bronş, uterik tomurcuk ve metanefrik kısmı çevreleyen mezenşimde yoğunlaştığı bulunmuştur. *GPC6* ekspresyonu en fazla gastrointestinal bölgenin gelişimi sırasında, ventrikülleri çevreleyen nöroektoderimde, aort ve diğer majör kan damarlarının subendotelyal düz kas hücre tabakasında görülmektedir. Fetal böbrek ve fetal akciğerde yüksek oranda eksprese olurken fetal karaciğer ve fetal beyinde düşük oranda eksprese olmaktadır (Veugelers vd 1999).

Çizelge 2.2. İnsanda glipikan ailesi üyelerinin kromozomal lokalizasyonu ve ekspresyon paternleri.

Glipikan Adı	Kromozomal Lokalizasyon	Eksprese olduğu doku/dokular
Glipikan-1 (GPC1)	2q35-37	İskelet sistemi, Saç folikülleri ve Epidermis
Glipikan-2 (GPC2, cerebro-glycan)	7q22.1	Merkezi Sinir Sistemi
Glipikan-3 (GPC3, OCI-5)	Xq26	Sinir sistemi hariç birçok doku
Glipikan-4 (GPC4, K-glypican)	Xq26.1	Böbrek, Nöronlar, Böbreküstü Bezi, Barsak, Mandibular/Maksiler Bölge
Glipikan-5 (GPC5)	13q32	Beyin, Ganglia, Kol tomurcukları, Göz vezikülleri, Böbrek
Glipikan-6 (GPC6)	13q32	Kalp, Karaciğer, Böbrek Over, Barsak

2.3.4. Glipikanlar ve kanser

Glipikanlar, ligand-reseptör komplekslerinin oluşumunu kolaylaştırarak ko-reseptör görevi görmekte ve ihtiyaç duyulan ligand konsantrasyonunu etkin bir biçimde düşürmektedirler. Bu nedenle glipikanların tümör mikroçevresinde eksprese olmaları çok da şaşırtıcı değildir (Fuster ve Esko 2005). *GPC -1, -3, ve -5*'in, daha çok büyüme faktör sinyallerini ve hücre bölünmesini etkilemek suretiyle tümörojenik gelişimde rol oynadıkları düşünülmektedir.

GPC1'in, insan gliomaları ve glioma-kökenli hücre serilerinde ekspresyon artışı saptanmıştır. Bu gen ürünü ayrıca temel FGF (Fibroblast büyüme faktörü) sinyalini ve mitogenezi kolaylaştırarak etki göstermektedir (Su vd 2006). Benzer şekilde pankreas ve meme kanseri hücre serilerinde de *GPC1* aşırı üretimi söz konusu olup, burada temel FGF sinyalini ve heparin bağlayan EGF benzeri büyüme faktör sinyalini düzenleyerek iş yapmaktadır (Kleeff vd 1998). Pankreas kanseri hücrelerinde oluşturulan *GPC1* antisense inhibisyonunun, *in vivo* olarak bu hücrelerin tümör kitlesi oluşturma yeteneklerini azalttığı bildirilmiştir (Kleeff vd 1999).

İlginç bir şekilde, *GPC3*'ün tümöröenez üzerindeki etkisi daha karmaşıktır. Örneğin, hepatoselüler karsinomda *GPC3* artmış ekspresyonu bir yandan temel FGF sinyalini ve BMP-7 işlevini zayıflatarak, diğer yandan Wnt sinyalini uyararak hücre çoğalmasını tetiklediği gösterilmiştir (Midorikawa vd 2003, Capurro vd 2005). HepG2 hepatoma hücre serileriyle yapılan başka bir çalışmada bunun aksine *GPC3* işlevinin 'knock-down' edilmesinin, hücre çoğalmasını uyardığı bildirilmiştir. Benzer şekilde *GPC3* geninin, mezotelyomalarda, over kanserlerinde ve meme kanseri hücre serilerinde sıklıkla susturulduğu görülmüştür (Filmus 2001, Sung vd 2003). *GPC3*'ün hücre çoğalmasını baskılayan bir etken olduğu görüşünü destekleyen bir diğer durum da Simpson-Golabi-Behmel sendromudur. Bu sendromda *GPC3* proteini fonksiyonel değildir. Hastalarda, doğum öncesi ve sonrası aşırı büyüme ve bazı malignensilere yatkınlık gibi birçok anormallik görülmektedir (Jakubovic ve Jothy 2007). Tümör gelişimini tetikleyen bir diğer glipikan kodlayıcı gen de *GPC5*'dir. Bu genin ekspresyon artışı, rabdomiyosarkom gelişimi ve artmış hücre çoğalması ile yüksek oranda ilişkili olarak bildirilmiştir (Williamson vd 2007). Literatürde *GPC6* ekspresyonu ve kanser ilişkisinin değerlendirildiği çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. *GPC6*'nın ekspresyonundaki azalma ise retinoblastoma gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Lau vd 2009).

Kor proteinleri de, HS zincirlerinden bağımsız olarak büyüme faktörleri ile etkileşime girebilmektedir. Bunların dışında, glipikanların salgılanabildiği ve bu durumda zara bağlı formlarından muhtemelen daha farklı mekanizmalarla etki edebildikleri düşünülmektedir (Filmus vd 2001, Bishop vd 2007). Sonuç olarak, büyüme faktör salgılanması ve sinyal düzenlenmesi üzerindeki etkileri sayesinde glipikanlar ve diğer glikanlar, kanser tedavisi için cazip hedefler olarak kabul edilmektedir (Fuster ve Esko 2005).

2.4. Amaç

Bugüne kadar glipikanların aktiviteleri ve gelişimdeki rolünü aydınlatmaya yönelik yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Glipikanların hücre adezyonu ve migrasyonu ile ekstraselüler matriks organizasyonu veya hücre çoğalması gibi çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır. Bu fonksiyonlarından dolayı özellikle morfogenezden sorumludurlar. Glipikan ekspresyonundaki değişiklikler nedeniyle çeşitli patolojik ve dismorfik sonuçları olan sendromların tanımlanması, fonksiyonlarını hangi ligandlara bağlanarak gösterdiğinin öğrenilmesi, glipikanların morfogenezde ve kanserdeki rolünü araştırmaya olanak sağlamıştır.

Birçok kanser türünde glipikanların ekspresyonlarında değişiklikler gözlenmiştir ve etkilerini çeşitli büyüme faktörlerine bağlanarak gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, glipikanlar hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks adezyonunun oluşturulmasına aracılık etmeleri nedeniyle pro-tümörojenik veya anti-tümörojenik etkiye sahiptir. Literatürde glipikanların kanser oluşumu veya ilerlemesi ile ilgili çalışmaların sayısı sınırlı olmakla birlikte bu sayının artması beklenmektedir.

Gümüş-Akay ve arkadaşlarının (2009), Türk toplumunda mide adenokarsinom örnekleriyle HR-CGH yöntemi kullanarak DNA kopya sayılarındaki değişiklikleri araştırdıkları çalışmada, tespit edilen genomik değişiklikler arasında 13q artışı (%26) en sık gözlenen kromozomal değişiklikler arasında belirtilmiştir. Ayrıca bu genomik dengesizlik artmış lenf nodu tutulumu ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuş ve minimal çakışma bölgesi 13q21-q32 olarak belirlenmiştir. Bu bölgede lokalize ve karsinogenez sürecinde rol oynadığı gösterilmiş veya oynayabileceği düşünülen genler değerlendirildiğinde *GPC5* ve *GPC6* genleri mide kanserinde daha önce bildirilmemeleri nedeniyle ilgi çekmiştir. Bu çalışmada *GPC5* ve *GPC6* genlerinin ekspresyonlarının mide kanserinin tanı ve prognozu ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı ve Cerrahi Onkoloji Bilim Dalı tarafından daha önce gerçekleştirilen “Mide Kanserinde Genomik Değişikliklerin Telomeraz Aktivitesi Üzerine Etkisi” başlıklı proje kapsamında çalışılan intestinal tip mide adenokarsinomlu 23 erkek ve 12 kadın hastaya ait toplam 35 hastanın Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında -80°C’de saklanmakta olan tümör ve normal doku örnekleri kullanılmıştır. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul’u tarafından Karar No:152-4798 ile onaylanmıştır.

3.2. Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan cihazlar

DNA izolasyonu, cDNA sentezi ve kantitatif PCR aşamalarında kullanılan cihazlar markaları ve kullanım amaçları Çizelge 3.1’de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan cihazlar

Adı / Model (Marka)	Kullanım Yeri / Amacı
Soğutmalı Mikrosantrifüj (Eppendorf)	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, Kantitatif PCR
Otomatik Mikropipet Seti (Eppendorf)	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, Kantitatif PCR
Isıtıcı (Eppendorf)	RNA İzolasyonu
Termocycler (Eppendorf)	cDNA sentezi
LightCycler 2.0 (Roche)	Kantitatif PCR
Spectramax Plus (Molecular Devices)	Kantitasyon
Hassas Terazi (Sartorius)	Dokuların tartımı
Buzdolabı (+4°C) (Beko)	Solüsyonları saklama
Derin dondurucu (-20 °C) (Arçelik)	cDNA’larını uzun süreli saklama
-80 °C’lik ultra derin dondurucu (Heto)	Doku ve RNA örneklerini saklama

3.2.2. Kullanılan kimyasal sarf malzemeleri

Çalışma süresince kullanılan tüm kimyasal sarf malzemeleri, markaları ve kullanım amaçları Çizelge 3.2’de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan kimyasal sarf malzemeleri

Adı (Marka)	Kullanım Yeri / Amacı
TriPure Isolation Reagent (Roche, Almanya)	RNA izolasyonu
Glikojen (Roche, Almanya)	RNA izolasyonu
Kloroform (AppliChem, Almanya)	RNA izolasyonu
İzopropanol (AppliChem, Almanya)	RNA izolasyonu
Etanol (AppliChem, Almanya)	RNA izolasyonu
Molecular Grade Water (AppliChem, Almanya)	RNA izolasyonu, %75’lik etanol hazırlanması
High Fidelity Transcriptor cDNA sentez kiti (Roche, Almanya)	cDNA sentezi
LightCycler TaqMan Master (Roche, Almanya)	Kantitatif PCR
GPC5 primer sağ (TibMolBiol, Almanya)	Kantitatif PCR
GPC5 primer sol (TibmolBiol, Almanya)	Kantitatif PCR
GPC5 prob (Roche, Almanya)	Kantitatif PCR
GPC6 primer sağ (TibMolBiol, Almanya)	Kantitatif PCR
GPC6 primer sol (TibmolBiol, Almanya)	Kantitatif PCR
GPC6 prob (Roche, Almanya)	Kantitatif PCR
GAPDH primer sağ (TibMolBiol, Almanya)	Kantitatif PCR
GAPDH primer sol (TibmolBiol, Almanya)	Kantitatif PCR
GAPDH prob (Roche, Almanya)	Kantitatif PCR

3.2.3. Kullanılan bileşik ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan bileşik ve çözeltiler ile içerikleri, aşağıdaki Çizelge 3.3’de listelenmiştir.

Çizelge 3.3. Araştırmada kullanılan bileşik ve çözeltiler

Çözeltinin Adı	Çözeltinin İçeriği
TriPure Isolation Reagent	Fenolün monofazik solüsyonu ve guanidin tiyosiyanat
Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz	200mM potasyum fosfat, 2mM ditiyotireyitol, %0.2 Triton X-100 (V/V), %50 gliserol, pH 7.2
Transcriptor High Fidelity Reaksiyon Tamponu (5X)	250mM Tris/HCl, 150mM KCl, 40 mM MgCl ₂ , pH 8.5 25°C’de
Protektör RNaz İnhibitör	20mM Hepes-KOH, 50mM KCl, 8mM ditiyotireyitol, %50 gliserol, pH 7.6 4°C’de
Deoksiribonükleotid Trifosfat Karışımı	Her biri 10mM olan dATP, dCTP, dGTP, dTTP karışımı
Hekzamer Primer	600µM Random Hekzamer Primer
DTT	0.1M Ditiyotireyitol
Kontrol RNA’sı	K562 hücre hatlarından elde edilen total RNA(50ng/µl)
LighCycler Taqman Master vial 1a	Enzim (5X)
LighCycler Taqman Master vial 1b	FastStart Taq DNA Polimeraz, Reaksiyon Tamponu, MgCl ₂ ve dNTP karışımı

3.3. RNA İzolasyonu

Solid dokudan RNA eldesi Roche TriPure Isolation Reagent (Roche, Almanya; Kat. No: 11667157001) kullanılarak üretici firmanın önerdiği ve aşağıda açıklanan protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Doku hazırlama aşaması

1. 50-100 mg doku örneği buz üzerinde ve steril petri kaplarında bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı.
2. Parçalanmış dokular 1.5ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine aktarıldı.
3. 50-100 mg doku örneği üzerine 1 ml TriPure Isolation Reagent ilave edildi. 10 mg'dan küçük dokular için 800µl TriPure Isolation Reagent ile birlikte 5-10µg Glikojen (Roche, Almanya; Kat No:10997920) kullanıldı.

3.3.2. Faz ayrımı aşaması

4. Nükleoprotein kompleksinin ayrımından emin olmak için tüpler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
5. Örnekler üzerine her bir 1ml TriPure Isolation Reagent için 200 µl kloroform (AppliChem, Almanya; Kat No:81010461) eklendikten sonra tüpler 15 saniye kuvvetlice çalkalandı.
6. Tüpler +4°C'de 12,000Xg'de 15 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüjden sonra üç ayrı faza ayrılan solüsyondan RNA örneği içeren üstteki renksiz sıvı faz 1.5ml'lik RNase free steril tüplere aktarıldı.

3.3.3. RNA izolasyonu

8. Örnekler üzerine her bir 1ml TriPure Isolation Reagent için 500 µl izopropanol (AppliChem, Almanya; Kat No:94008601) eklendi.
9. Tüpler sıkıca kapatılıp ve ters çevirerek birkaç defa iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edildi.

10. Tüpler +4°C’de 12,000Xg’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
11. Örnekler üzerine her bir 1ml TriPure Isolation Reagent için 1ml %75’lik etanol (Absolüt etanol, AppliChem, Almanya; Kat No:95008417) eklendi ve tüpler +4°C’de 7500Xg’de 5 dakika santrifüj edildi.
12. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra RNA peleti 5 dakika havada kurumaya bırakıldı.
13. RNA peleti 50µl steril dH₂O ile (Molecular Grade Water, AppliChem, Almanya; Kat No:9M010127) 60°C’de 10 dakika inkübe edilerek çözüldü.
14. Elde edilen RNA örnekleri 3 ayrı steril mikrofüj tüpüne bölüştürülerek -80°C’de saklandı.

3.4. RNA’nın Kantitasyonu

Kantitasyon için Molecular Devices markanın Spectramax Plus model spektrofotometre ve Softmax Plus 4.8 yazılım programı kullanıldı.

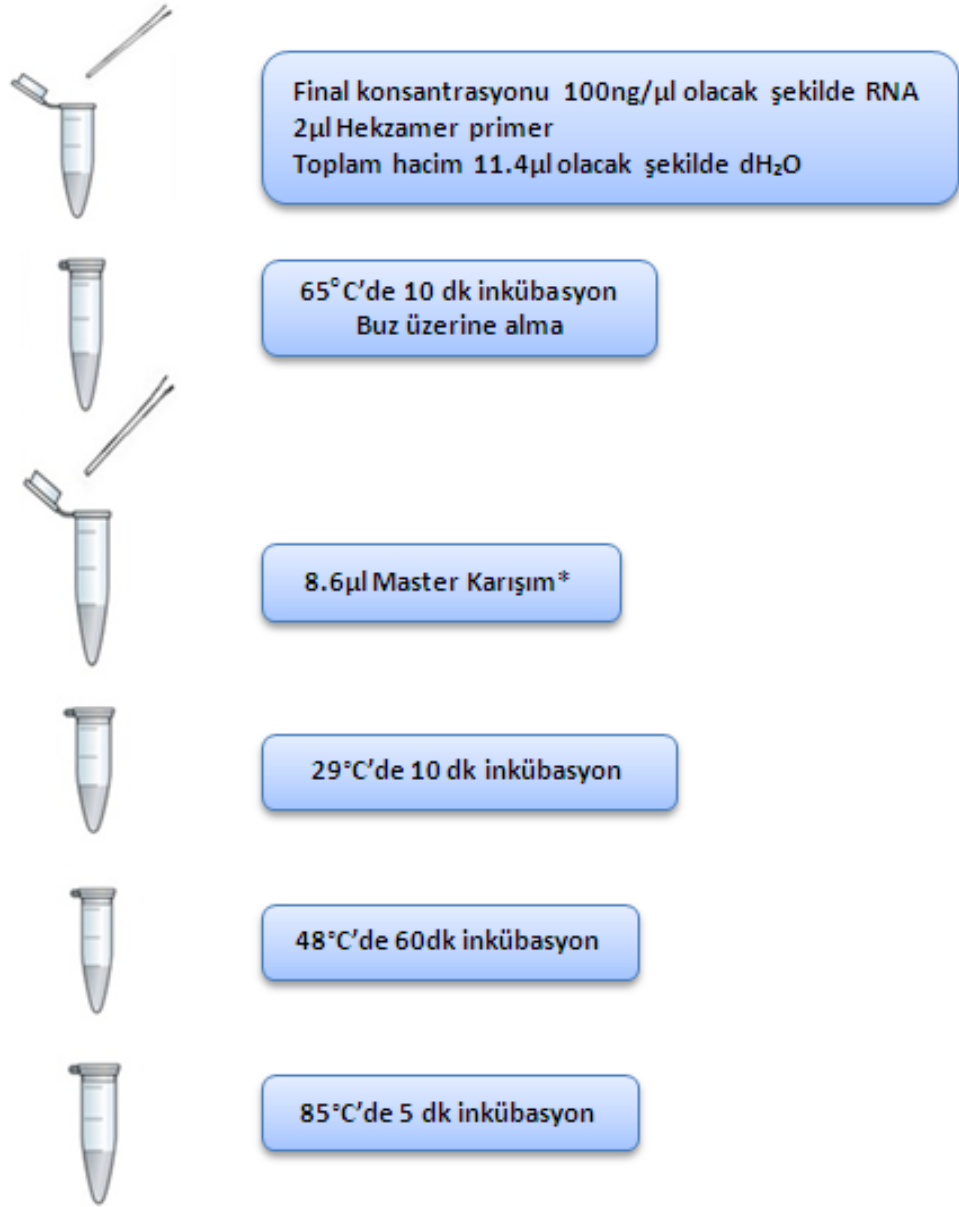
Spektrofotometrik ölçüm yapılacak örnek sayısı kadar kuvarz plate’e 195µl dH₂O koyularak 260 ve 280nm’de ölçüm yapıldı. dH₂O eklenen kuyucuklara ölçülecek her bir RNA örneğinden 5µl eklenerek 260 ve 280nm’de ölçüm yapıldı.

Her bir ölçümün 260/280 oranı hesaplandı. Miktar tayini yapmak için her örneğin 260nm’deki absorban değeri, dilüsyon oranı, kuyucuğun hacmi ile RNA miktarı için standardize edilen 40 ile çarpıldı.

3.5. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, elde edilen tüm RNA örnekleri 100 ng/µl olacak şekilde dilüe edildi. RNA örneklerinden cDNA sentezi, High Fidelity Transcriptor cDNA sentez kiti (Roche Almanya; Kat. No: 0508995001) kullanılarak üretici firmanın önerdiği ve aşağıda

özetlenen protokol doğrultusunda gerçekleştirildi (Şekil 3.1). cDNA sentezi sırasında kit içerisinde sağlanan RNA örneği de kontrol amaçlı kullanıldı.



Şekil 3.1. cDNA sentez basamakları. Master Karışım* çalışılan örnek sayısına göre hesaplanarak Çizelge 3.4'de verildiği gibi hazırlandı.

Çizelge 3.4. Master karışım hazırlama prosedürü

Master Karışım*	1X
Transcriptase Reaction Buffer	4 µL
Protector RNase Inhibitor	0.5 µL
dNTP	2 µL
DTT	1 µL
Reverse Transcriptase	1.1 µL
TOPLAM HACİM	8.6 µL

Elde edilen cDNA'lar kantitatif PCR yapılana kadar -20°C'de saklandı.

3.6. Kantitatif PCR (Real-Time PCR)

Kantitatif PCR yöntemi LightCycler 2.0 cihazında TaqMan prob yöntemi ile gerçekleştirildi. Roche LightCycler TaqMan Master (Roche, Almanya; Kat No: 04735536001) kullanıldı. Sonuçların güvenilir olması açısından her deney iki defa tekrarlandı ve istatistiksel değerlendirme sırasında bu iki deneyin ortalama değeri kullanıldı.

GPC5 (Glipikan 5), GPC6 (Glipican 6) ve GAPDH (Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz) genlerinin ekspresyon analizi için kullanılan primer ve probalar www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/ezhome.html web adresindeki 'Universal Probe Library'den tasarlandı. Primer ve prob dizileri ile Tm sıcaklıkları Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Primer, prob dizileri, Tm sıcaklıkları ve katalog numaraları

		Dizi (5' → 3')	TM	Marka ve Katalog Numaraları
<i>GPC5</i>	Sol	aagttcgaaactttccagtg	56.8°C	TibMolBiol, Almanya; Kat. No: 1162414
	Sağ	ggatatgcaaacctgaagatca	53.8°C	TibMolBiol, Almanya; Kat. No: 1162415
	Prob (FAM işaretli)	ctgctggg		Roche, Almanya; Kat. No: 04685008001
<i>GPC6</i>	Sol	acctcgacacagagtggaatc	55.2°C	TibMolBiol, Almanya; Kat. No: 1162416
	Sağ	gtccatgaccgactcaatgtt	55.5°C	TibMolBiol, Almanya; Kat. No: 1162417
	Prob (FAM işaretli)	tggcagag		Roche, Almanya; Kat. No: 04688503001
<i>GAPDH</i>	Sol	agccacatcgctcagacac	56.5°C	TibMolBiol, Almanya; Kat. No: 1162418
	Sağ	gcccaatacgaccaaattcc	55.9°C	TibMolBiol, Almanya; Kat. No: 1162419
	Prob (FAM işaretli)	tggggaag		Roche, Almanya; Kat. No: 04688589001

Araştırılacak her bölge için reaksiyon karışımı için Roche Taqman Master Miks kullanıldı ve reaksiyon karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Reaksiyon karışımı hazırlama prosedürü

REAKSİYON KARIŞIMI	1X
Master mix	4 µL
Sol Primer	2 µL
Sağ Primer	2 µL
Prob	2 µL
dH ₂ O	5 µL
TOPLAM HACİM	15 µL

Araştırılacak her bir gen için ayrı ayrı reaksiyon karışımı hazırlandı. Her bir örnek için kapillere 15µl reaksiyon karışımı ve 5µl cDNA örneği ilave edildi. Reaksiyon koşulları aşağıdaki çizelgedeki gibi oluşturuldu.

Çizelge 3.7. Kantitatif PCR reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Pre-Inkübasyon	95°C	10 dk	1 döngü
Amplifikasyon	Denatürasyon	95°C	10 sn
	“Annealing”	50°C	30 sn
	Uzama/Sentez	72°C	3 sn
			45 döngü
Soğutma	40°C	30 sn	1 döngü

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Her bir genin ekspresyon seviyesi için $\Delta\Delta Ct$ (Delta delta Ct) yöntemi ile rölatif gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Bir dokuda ilgili genin ekspresyon seviyesi, o dokuda ilgili gen için elde edilen Ct değerinin, aynı dokuda *GAPDH* (housekeeping) için elde edilen Ct değerine oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Hiçbir örnekte *GPC5* geni için Ct değeri elde edilemediği için istatistiksel analiz yapılmamıştır.

Tümör ve normal doku örneklerinde *GPC6* ekspresyonları arasında fark olup olmadığı Wilcoxon Signed Ranks test ile değerlendirilmiştir. *GPC6* ekspresyonlarının cinsiyet, tümör invazyonu, lenf nodu tutulumu, histolojik grade ve *H. pylori* enfeksiyon durumu ile ilişkisi Mann Whitney U test ile araştırılmıştır. *GPC6* ekspresyon seviyesinin yaş ile ilişkisi Nonparametrik Correlations ile test edilmiştir. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

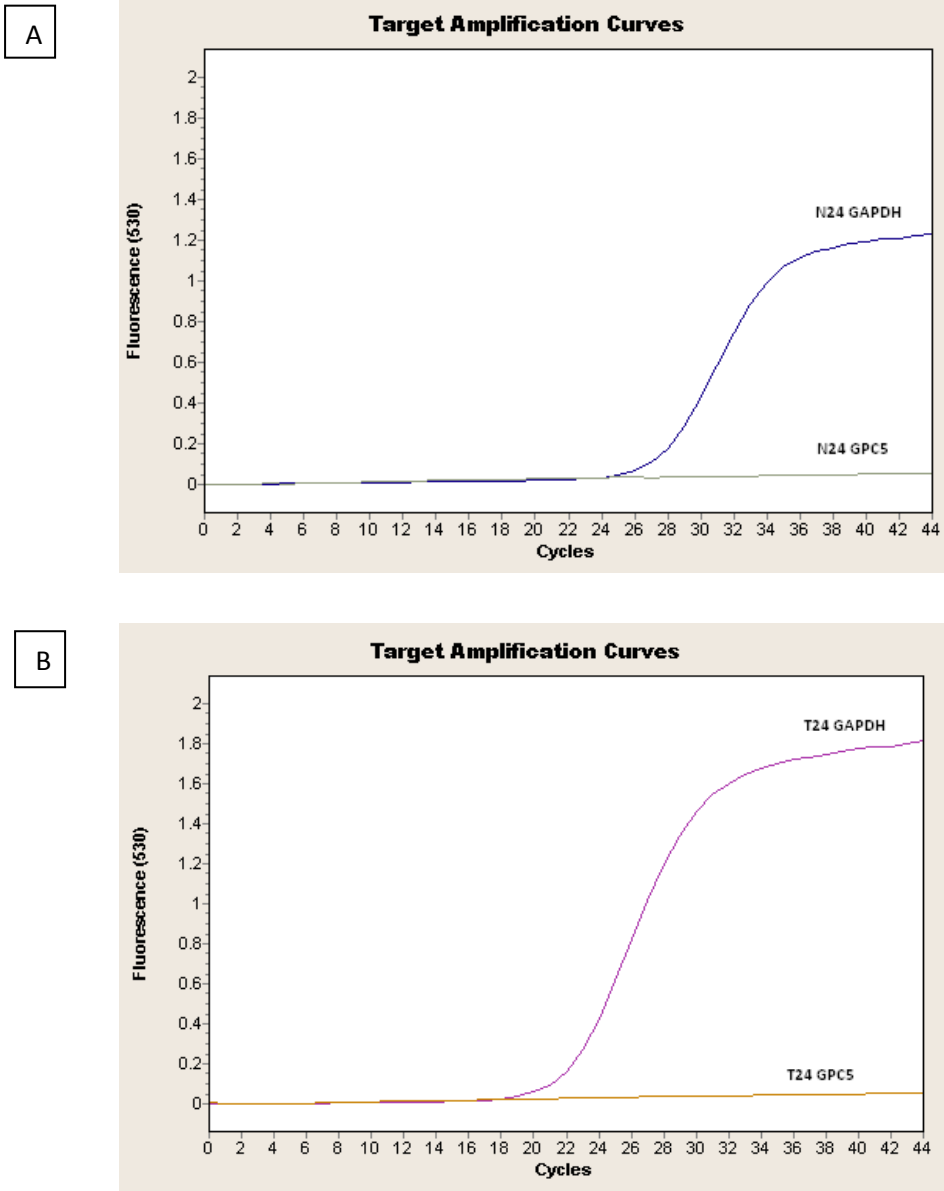
Çizelge 4.1’de hastalara ait bilgiler özetlenmiştir. Çalışmaya 35 (23E, 12K) intestinal tip mide adenokarsinom hastasına ait tümör ve normal mide mukoza dokusu dahil edilmiştir. Erkeklerin yaş ortalaması 59.45 ± 10.89 ve kadınların yaş ortalaması 60.55 ± 14.73 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. Tümör dokuların alınmış olduğu 35 hastaya ait demografik ve klinik bilgiler

Örnek No	Cinsiyet	Yaş	TNM Sınıflaması	Histolojik Grade	H. pylori enfeksiyonu
1	E	54	T3N2M0	G1	-
2	E	48	T3N2M0	G1	+
3	K	78	T3N2M1	G3	+
4	E	53	T3N2M0	G1	+
5	E	73	T3N2M0	G3	-
6	E	45	T3N2M0	G2	Bilgi yok
7	E	72	T3N1M0	G3	Bilgi yok
8	K	72	T3N0M0	G3	Bilgi yok
9	E	Bilgi yok	T2N0M0	G1	-
10	E	60	T3N1M0	G1	Bilgi yok
11	E	79	T3N2M0	G1	Bilgi yok
12	K	67	T3N1M0	G1	+
13	K	66	T3N1M0	G1	-
14	E	38	T3N3M0	G3	+
15	E	65	T3N2M0	G1	+
16	K	72	T1N0M0	G1	-
17	K	49	Bilgi yok	G2	+
18	E	49	T2N0M0	G1	-
19	E	52	T1N0M0	G1	-
20	E	73	T3N2M0	G3	-
21	E	60	T3N3M0	G3	+
22	E	55	T3N2M0	G3	+
23	E	79	T3N1M0	G2	-
24	K	81	T3N1M0	G1	+
25	E	60	T3N0M0	G1	-
26	K	Bilgi yok	T2N0M0	G1	-
27	E	53	T3N1M0	G1	-
28	K	43	T3N1M0	G3	+
29	K	48	T3N3M0	G3	-
30	E	53	T3N1M0	G3	-
31	K	49	T1N0M0	G1	-
32	E	61	T3N0M0	G3	-
33	E	62	T3N3M0	G2	-
34	E	64	T3N0M0	G3	+
35	K	41	T4N0M0	G2	+

4.1. *GPC5* Ekspresyonu ve Mide Kanseri

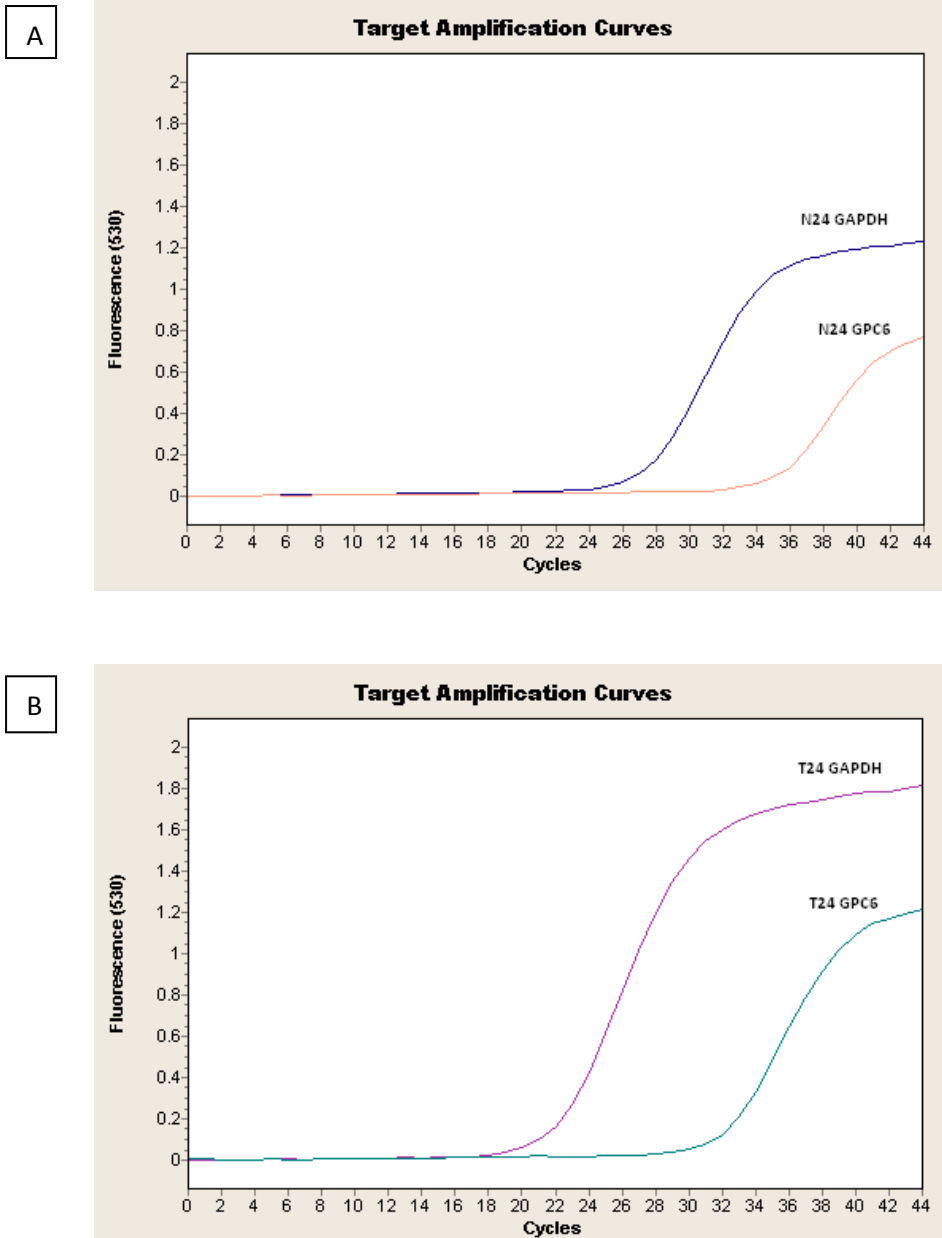
Otuzbeş hastaya ait toplam 70 doku örneğinin tümünde *GAPDH* ekspresyonu tespit edilirken; hiçbir doku örneğinde *GPC5* için Ct değeri elde edilememiştir. Bu nedenle *GPC5*'in erişkin mide dokusunda eksprese olmadığı ve bu durumun karsinogenez sürecinde de değişmediği sonucuna varılmıştır. Şekil 4.1'de 24 nolu hastanın normal ve tümör dokularında elde edilen *GPC5* ve *GAPDH* genlerine ait amplifikasyon eğrileri örnek olarak verilmiştir.



Şekil 4.1. 24 nolu hastanın normal (A) ve tümör (B) dokularında elde edilen *GPC5* ve *GAPDH* genlerine ait amplifikasyon eğrileri.

4.2. *GPC6* Ekspresyonu ve Mide Kanseri

Otuzbeş hastaya ait toplam 70 doku örneğinin tümünde *GAPDH* ve *GPC6* genlerinin ekspresyonlarının her ikisi için de Ct değeri elde edilmiştir. Şekil 4.2’de 24 nolu hastanın normal ve tümör dokularında elde edilen *GPC6* ve *GAPDH* genlerine ait amplifikasyon eğrileri örnek olarak verilmiştir.



Şekil 4.2. 24 nolu hastanın normal (A) ve tümör (B) dokularında elde edilen *GPC6* ve *GAPDH* genlerine ait amplifikasyon eğrileri.

GPC6 ekspresyonunun yaş ve cinsiyete göre anlamlı bir fark göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$). Normal dokularda *GPC6* ekspresyon seviyesi en düşük 1.21 ve en yüksek 1.37 olarak bulunmuş ve ortanca değeri 1.28 olarak hesaplanmıştır. Tümör dokularında *GPC6* ekspresyon seviyesi en düşük 0.69 ve en yüksek 1.46 olarak bulunmuş ve ortanca değeri 1.31 olarak hesaplanmıştır. *GPC6* geninin ortalama ekspresyon seviyesi normal ve tümör doku örneklerinde sırasıyla 1.28 ± 0.04 ve 1.30 ± 0.12 olarak bulunmuş ve bu değerler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, *GPC6* gen ekspresyonunun tümör dokusunda normal dokuya kıyasla anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir ($p=0.039$).

4.2.1. *GPC6* ekspresyonu ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Bu çalışmada tümör dokularında tespit edilen *GPC6* ekspresyon seviyeleri ile TNM sınıflandırması, histolojik grade ve *H. pylori* enfeksiyon durumu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Normal dokularda da bazal seviyede *GPC6* ekspresyonu tespit edildiği için, her bir hastada *GPC6*Tümör/*GPC6*Normal oranı hesaplandıktan sonra istatistiksel değerlendirme yapılmıştır.

GPC6 gen ekspresyon seviyesi erken evre (T1+T2) ve geç evre (T3+T4) tümörlerde karşılaştırıldığında, erken evre tümörlerde ortalama 1.01 ± 0.07 ve geç evre tümörlerde 1.01 ± 0.10 olarak hesaplanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Lenf nodu tutulumu negatif olan (N0) tümör örnekleri ve lenf nodu tutulumu tespit edilen (N1+N2+N3) tümör doku örnekleri, ortalama *GPC6* ekspresyon seviyeleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (1.04 ± 0.74 vs 0.99 ± 0.10 , $p>0.05$). Sadece bir olguda uzak metastaz var olduğu için ve gruplar arasında örnek sayısı bakımından büyük fark gözlemlendiği için, *GPC6* ekspresyon seviyesi ve metastaz arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Histolojik olarak diferansiye (G1) ve az diferansiye (G2+G3) mide tümörü örneklerinde ortalama *GPC6* geni ekspresyon seviyesi sırasıyla 1.02 ± 0.53 ve 1.01 ± 0.13 olarak hesaplanmıştır ve bu iki grup arasında *GPC6* gen ekspresyon seviyesi arasındaki fark

istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0.644$, $p>0.05$). *H.pylori* pozitif tümör dokularında ortalama *GPC6* geni ekspresyon seviyesi 1.01 ± 0.46 ve benzer şekilde *H.pylori* negatif tümör dokularında ortalama *GPC6* geni ekspresyon seviyesi 1.01 ± 0.15 olarak bulunmuştur ($p=0.127$, $p>0.05$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.2. Örneklere ait klinikopatolojik özelliklerin istatistiksel değerlendirmesi

Klinikopatolojik Özellikler	GPC6Tümör/GPC6Normal	
	X±SD	Median(Min-Max)
<i>Tümör invazyonu</i>		
T1/T2(n=6)	1.01±0.07	1.02(0.90-1.10)
T3/T4(n=28)	1.01±0.10	1.02(0.55-1.18)
<i>p</i>	0.912	
<i>Lenf Nodu Tutulumu</i>		
N0(n=11)	1.04±0.74	1.04(0.90-1.18)
N1/N2/N3(n=23)	0.99±0.10	1.00(0.55-1.10)
<i>p</i>	0.08	
<i>Histolojik Grade</i>		
G1(n=17)	1.02±0.53	1.02(0.90-1.10)
G2/G3(n=18)	1.01±0.13	1.03(0.55-1.18)
<i>p</i>	0.644	
<i>H.pylori enfeksiyonu</i>		
Pozitif (n=17)	1.01±0.46	1.01(0.90-1.10)
Negatif (n=13)	1.01±0.15	1.05(0.55-1.18)
<i>p</i>	0.127	

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Mide kanseri tüm dünya genelinde kanser nedenli ölümler arasında ikinci sıradaki yerini korumaktadır. Mide kanserini de içeren solid kanserlerin en önemli belirteçlerinden biri, tüm kromozomlarda veya kromozom parçalarında artışların veya kayıpların olduğu kromozomal düzensizliklerdir (Lengauer vd 1998). Mide kanserlerinde bu düzensiz fenotipe neden olan mekanizma hala anlaşılammıştır. 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 13q, 17q ve 20q 'daki artışlar ve 4q, 5q, 6q, 9p, 17p, 18q, 21p ve 21q'daki kayıplar mide kanseri çalışmalarında sıklıkla gösterilmiştir (Wu vd 1997, Sakakura vd 1999, Grieken vd 2000, Koo vd 2000, Wu vd 2002, Hidaka vd 2003, Weiss vd 2003a, Kimura vd 2004, Takada vd 2005, Panani 2008, Isinger-Ekstrand vd 2010, Kawauchi vd 2010, Zhang vd 2010). Buna ek olarak, 7q, 8q, 9q, 11q, 13q ve 20q'daki artışlar ve 4p, 5q, 6q, 9p, 17p ve 18q'daki kayıplar mide kanserinin doğrudan malign potansiyel taşıyan öncül lezyonlarında bile tespit edilebilmektedir. Bu durum, bu düzensizliklerin mide kanserinin erken dönem patogenezinde yeri olduğunu göstermektedir (Kokkola vd 1998, Kim vd 2001, Van Dekken vd 2001, Weiss vd 2003b, Buffart vd 2007a).

Mide kanserinde 13q'daki artış ve kayıplar çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Mide kanserlerinin %30'undan fazlasında 13q'da kayıplar, %40'ından fazlasında 13q'da artışlar tanımlanmıştır (Kokkola vd 1998, Van Dekken vd 2001, Kim vd 2001, Kimura vd 2004, Weiss vd 2004, Carvalho vd 2006, Buffart vd 2007b).

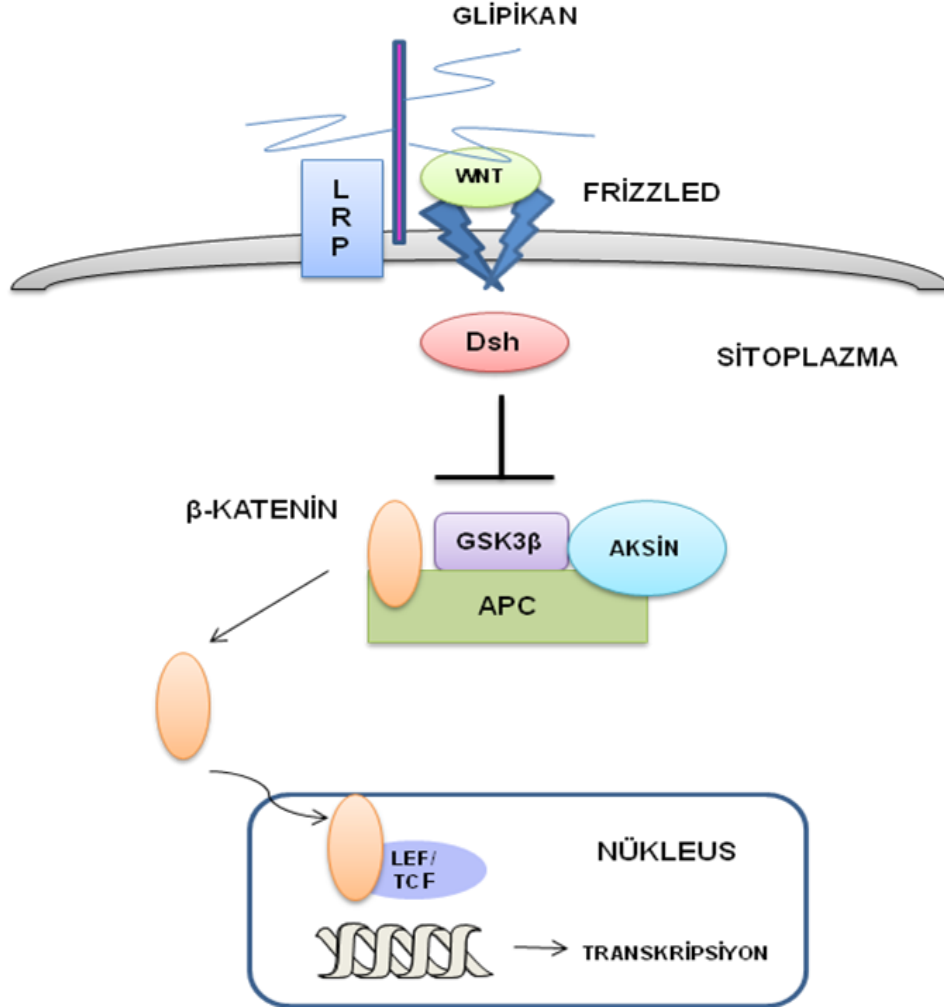
13q'da lokalize olan genlerden *GPC5* ve *GPC6*'nın üyesi olduğu hücre yüzey PG ailesi adezyon ve büyüme faktörü sinyal iletiminde rol alan ve son yıllarda tümör gelişiminde de rolleri yavaş yavaş anlaşılmiş olan çok işlevli moleküllerdir. Şu ana kadar insanlarda 11 adet membrana bağlı PG bulunmuştur. Bunların bir kısmının ya lokal tümör büyümesine ya da metastatik yayılıma katkı sağlayarak tümörögenezi arttırdığı öne sürülmektedir. Hem salgılanan, hem de yüzeye bağlı bulunan PG'ların artmış, ya da sıfırdan indüklenmiş ekspresyonu, birçok tümör için karakteristik bulgudur. Bununla beraber, bu moleküllerin bazen tümör oluşumu ve gelişiminin zıttı yönünde (eksprese olduğu tümör dokusunun tipine bağlı olarak) çalıştıkları da görülmektedir (Nurcombe vd 1993, Cattaruzza vd 2008). Öyle ya da böyle, çeşitli tümör dokularındaki PG aşırı ekspresyonu, hem prognostik hem

de terapötik önem açısından araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Bu makromoleküllerin bazıları prognostik faktör olarak önemli rol oynamaktadır ve klinik kullanıma girmek üzeredir. Yüzey PG'larının hem tümörögenezi kolaylaştırıcı, hem de tümör baskılayıcı şekilde ikili etkilerinin olması, araştırmacıları farklı yüzey PG kombinasyonlarının nasıl çalıştığını aydınlatmaya yönelik çalışmalar yapmalarını teşvik etmektedir. Belirli yüzey PG'larının hangi şekilde tümöröjenik sürece etkide bulunduğu detaylı olarak incelenmiştir (Fico vd 2007, Munusue vd 2007, Williamson vd 2007, Sanderson vd 2008). Bunların bazılarının, farklılaşmada rol alan veya hücre bölünmesini düzenleyen hücre yüzeyi komponentleriyle interferans göstererek antineoplastik potansiyele sahip olduğu bulunmuştur (Lacrima 2005).

HSPG'lar, çođu yapışık hücrelerin yüzeyinde ve hücreleri saran ve onları destekleyen ekstraselüler matrikste bulunurlar. Bu moleküllerin heparin benzeri kısımları negatif yüklerinden dolayı çeşitli matriks komponentlere, büyüme faktörlerine, proteinaz inhibitörlerine, hücre-hücre ve hücre-matriks adezyon moleküllerine bağlanmak suretiyle onları düzenlerler (Hileman vd 1998). Hücre yüzeyi ile ilişkili HSPG'ların, hem embriyonik gelişimde hem de tümörögenez sırasında etkili olan fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), Wnt ve transforme edici büyüme faktörü (TGF-beta) süper ailesi için ko-reseptör olarak fonksiyon görürler. Böylece spesifik sinyal-iletici reseptörler ile bunların ligandlarının etkileşimini kolaylaştırarak ilişkili sinyal yolaklarının düzenlenmesini önemli ölçüde etkilerler (Yayon vd 1991, Higashiyama vd 1993, Cumberledge ve Reichsman 1997, Jackson vd 1997, Godin vd 1998). Bununla birlikte, Janus kinaz (JAK), sinyal transdüser ve transkripsiyon aktivatör (STAT), veya EGF yolaklarının da HSPG'lerden etkilendiğine yönelik bir bulgu henüz bulunmamıştır (Häcker vd 2005).

Bugüne kadar mide kanserinde iletim kusurları en sık bildirilen WNT sinyal yolağı β -katenin aracılığı ile gen ekspresyonunu etkilemektedir. Normal şartlar altında GSK3 β tarafından fosforile olan β -kateninin, ubiquitin-proteazom yolağı aracılığı ile degrade olur. Wnt ligandının Frizzled reseptörüne bağlanması β -katenin degradasyon kompleksinin (APC, Aksin ve GSK3 β) fonksiyonunu inhibe etmekte ve sitoplazmada β -katenin seviyesinin artmasına neden olmaktadır. Stabilize β -kateninin nükleer translokasyonun ardından β -katenin, TCF/LEF ile kompleks oluşturarak Wnt hedef genlerin

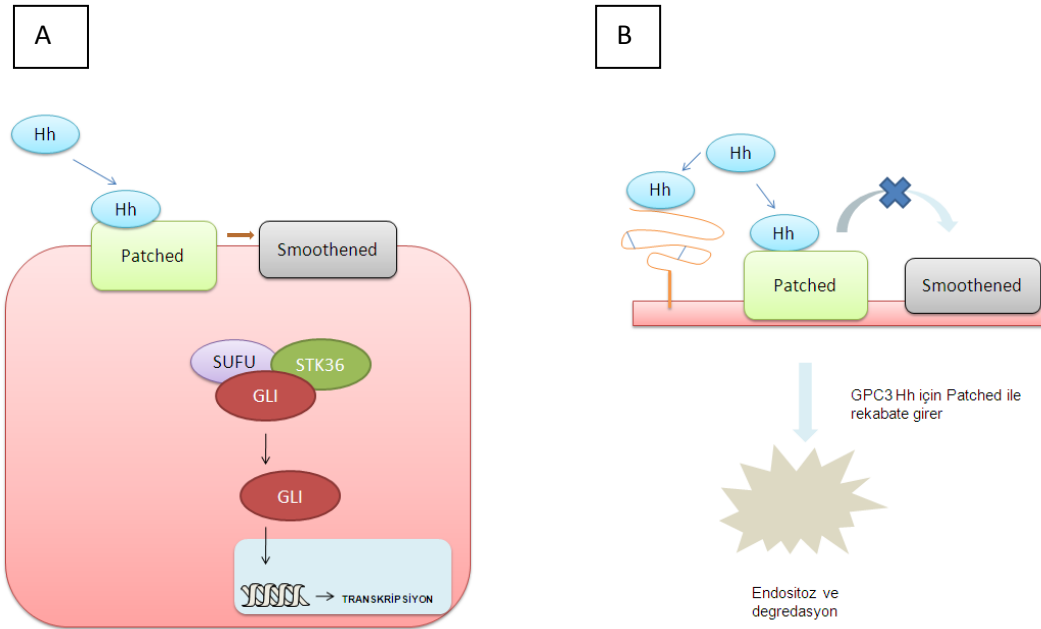
transkripsiyonel aktivasyonuna yol açmaktadır (Şekil 5.1). Glipikanlar bu yolakta, Wnt ligandının reseptörü olan Frizzled'lara bağlanmasını kolaylaştırarak etkileşimin stabilize edilmesinde fonksiyon görmektedir (Capurro vd 2005). β -katenin aracılı Wnt sinyal yolağının aktivasyonu mide kanser olgularını yaklaşık olarak %30'unda görmektedir (Nelson ve Nusse 2004, Seto ve Bellen 2004).



Şekil 5.1. İnsanda Wnt sinyal iletiminin ve glipikan ilişkisinin şematik gösterimi

Glipikanlar Hedgehog (Hh) sinyal iletiminde de rol oynamaktadır. İnsanda Hh homologları; Sonic Hedgehog (SHH), Indian hedgehog (IHH) ve Desert hedgehog (DHH) dur. Hh PTC'ye bağlanır. Bu bağlamda yedi-transmembran protein Smoothened (SMO)

aktivasyonuna yol açar. Aktif SMO, SUFU'nun STK36 tarafından fosforile edilmesini sağlar. GLI ailesi üyelerinin nükleusda alıkonması ve böylece tam uzunluktaki GLI ailesi üyelerinin nükleusda birikimine yol açar. Bu birikim, GLI ailesi üyeleri aracılığıyla Hh hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna neden olur (Şekil 5.2 A). Hh sinyal yolağının normal olmayan aktivasyonu başta mide kanseri olmak üzere çok çeşitli insan tümörlerin patogenezinde rol oynar (Katoh ve Katoh 2005). Hh sinyal yolağında GPC3'ün etkisi incelenmiştir. GPC3 Hh'a bağlanmak için Patched ile rekabete girmektedir. Böylece Hh sinyalini azaltarak baskılayıcı etki göstermektedir. Hh'un GPC3'e bağlanması sonucunda endositoz ve degradasyon yolu tetiklenmektedir (Şekil 5.2 B).



Şekil 5.2. (A) İnsanda Hh sinyal iletimi. (B) İnsanda Hh sinyal iletiminde glipikanların görevi.

Literatürde glipikanların kanser ile ilişkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Kleeff vd 1998 yılında yapmış oldukları çalışmada glipikanlar ve kanser arasındaki bağlantıyı göstermişlerdir. Söz konusu çalışmada *GPC1* ekspresyonunun pankreatik kanserlerin büyük bir oranında arttığı görülmüştür. Ayrıca, *GPC1* antisense transfeksiyonu ile kültüre edilen pankreatik kanser hücrelerinde mitojenik cevabın inhibe edildiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada meme kanserinde hastalığın 2. veya 3. evresinde olan 10 tümörden 8

tanesinde *GPC1*'in ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Buna karşın *GPC3* ve *GPC4*'ün ekspresyonları normal meme dokusu ile karşılaştırıldığında ekspresyonunun azaldığı, *GPC2* ve *GPC5*'in ise ekspresyonlarında bir farklılık olmadığını bildirilmiştir (Matsuda vd 2001).

Su vd'nin (2006) glioma hücre hatları ile yaptıkları çalışmada non-neoplastik gliosisi astrositoma ve oligodendroma ile karşılaştırdıklarında astrositoma ve oligodendroma örneklerinde *GPC1*'in aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Pankreastaki intraductal-papillary-mucinous tümörlerinin incelendiği cDNA microarray çalışmasında 4992 insan geni taranmış ve 62 gen aşırı eksprese olurken 58 tanesinin ekspresyonunda azalma olduğu göze çarpmıştır. Söz konusu çalışmada *GPC1*'in ekspresyon düzeyinin artması tümör ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Terris vd 2002). Başka bir çalışmada ise *GPC1*'in aşırı ekspresyonu ovaryum kanserinin kötü prognozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ricciardelli ve Rodgers 2006).

GPC3 geni için, başta mide kanseri, over kanseri ve mezotelyomayı da içeren çeşitli kanser tiplerinde ekspresyonda azalma bildirilirken; bu genin hepatoselüler karsinom, Wilm's tümörü, kolorektal kanser, skuamöz hücre karsinomunu, hepatoblastoma, foiküler ve papiller tiroid kanserlerinde aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir (Hsu vd 1997, Lin vd 1999, Murthy vd 2000, Toretsky 2001, Zhu vd 2002, Kim vd 2003, Yamanaka vd 2007, Aviel-Ronen vd 2008, Zynger vd 2008). Ayrıca Nakatsura vd (2004) melanomada, Jia vd (2007) hepatoselüler karsinom ve Aviel-Ronen vd (2008) ise skuamöz hücre karsinomunda yaptıkları çalışmalarında *GPC3*'ün tümör belirteci olarak kullanılabilceği ifade etmişlerdir. Benzer şekilde, Kandil vd'nin çalışmasında (2007) metastatik ve benign karaciğer lezyonlarının tanımlanmasında *GPC3*'ün bir belirteç olarak kullanılabilceği bildirmektedir. Kim vd. (2003) akciğer adenokarsinom örneklerinde *GPC3* ekspresyonunun azaldığını göstermiş ve *GPC3*'ün aday tümör baskılayıcı bir gen olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Oxaliplatine dirençli ovaryum karsinom hücre hatları ile yapılan gen ekspresyon profillemesi çalışmasında da *GPC3* ve *GPC4*'ün ekspresyonunun azaldığı göze çarpmıştır (Varma vd 2005). *GPC3* ekspresyonunda genetik mekanizmaların yanı sıra epigenetik mekanizmalar da önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Xiang vd'nin (2001) yaptıkları çalışmada 10 adet göğüs kanseri hücre hattının sekizinde promotor hipermetilasyonu sonucunda *GPC3* ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir.

Şimdiye kadar farklı kanser türlerinde *GPC5* ve *GPC6*'nın araştırıldığı çalışmalar yayınlanmıştır. Yu vd'nin (2003) farklı tipteki lenfoma hücre serileri ile yaptıkları çalışmada 13q31-q32'yi içeren 13q kopya sayısının artışı öne çıkan sonuçlar arasında bildirilmiştir. Araştırmacılar bu bölgede daha detaylı inceleme yaptıklarında *GPC5*'in aşırı eksprese olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde foliküler lenfomalı 42 hastadan 6'sında 13q21-33 bölgesinde artış görülmüş ve bu bölgede *GPC5* ve *GPC6*'nın oluşu dikkat çekmiştir (Neat vd 2001).

Rabdomiyosarkomada yapılan bir çalışmada 13q31-32 bölgesinde genomik amplifikasyon saptanmıştır. Söz konusu çalışmada incelenen örneklerde *GPC5* ekspresyonunun normal kas dokusuna nazaran daha fazla olduğu görülmüş ve genomik kopya sayısı ile ekspresyon seviyesi arasında önemli derecede korelasyon olduğu bildirilmiştir (Williamson vd. 2007). Aynı çalışmada *GPC5*'in aşırı ekspresyonunun *in vitro* etkisi rabdomiyosarkoma hücre hatlarında değerlendirilmiş ve sonuç olarak *GPC5* ekspresyon artışının hücre çoğalmasını tetiklediği bildirilmiştir. Benzer şekilde *GPC5* “knockdown” hücre hatlarında hücre çoğalmasının baskılandığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca *GPC5*'in ekspresyon artışının hücre çoğalmasını tetikleme mekanizması değerlendirilmiş ve *GPC5* aşırı derecede eksprese olması FGF2, HGF ve Wnt1A cevaplarını hücre membranındaki dağılımlarını etkileyerek arttırdığı gösterilmiştir (Williamson vd. 2007).

Hiç sigara içmemiş akciğer kanseri vakalarında kanserin genetik temellerini araştıran bir çalışmada, sigara içmemiş 754 kişide SNP array ile genom boyu asosiyasyon (GWAS) çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada güçlü asosiyasyon gösteren 44 SNP'nin sigara kullanmayan bireylerde akciğer kanseri riskini etkileyebileceği belirtilmiş ve 13q31.3 bölgesinde tanımlanan SNP'ler ile normal akciğer dokusunda *GPC5* geninin transkripsiyon seviyesi arasında güçlü bir ilişki saptanmıştır. Sonuç olarak 13q31.3'deki genetik varyantların *GPC5* ekspresyonunu etkilediği ve bu durumun sigara kullanmayan bireylerde akciğer kanseri yatkınlığı ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (Li vd 2010).

Bu tez çalışmasında, daha önce farklı kanserlerde ekspresyonu gözlenmiş olan *GPC5* geninin mide kanserli hastaların ne normal ne de tümör dokularında eksprese olmadığı saptanmıştır. Saunders vd (1997)'nin farklı embriyonik ve erişkin dokularında *GPC5* ekspresyon seviyelerini değerlendirdikleri çalışmada, *GPC5*'in embriyonik dönemde

neredeşse tüm dokularda eksprese olduğu, erişkin döneme geçildiğinde bu ekspresyon seviyesinin özellikle beyin dokusunda artarak devam ettiği, ancak mide de dahil olmak üzere diğer erişkin dokularında bu genin ekspresyonunun belirgin ölçüde baskılandığı ve eser miktarda tespit edildiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde normal mide mukoza örneklerinin hiçbirisinde *GPC5* ekspresyonu tespit edilmemiştir. Gelişim sürecinde eksprese olan ancak erişkin dönemde baskılanan gelişimsel genlerin ekspresyon değişikliklerinin bazı dismorfik hastalıklar ve kanserler ile ilişkili olduğu bilinen bir gerçektir. Bu çalışmamızın sonuçlarına göre, normal mide mukozasında saptanmayan *GPC5* ekspresyonunun tümör dokularında herhangi bir değişikliğe uğramadan sessiz kalması yukarıda özetlenen diğer kanser örneklerinden farklı olarak bu genin mide karsinogenez sürecindeki potansiyel rolü olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca, bu çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, genomik seviyede kopya sayısında gözlenen artışların her zaman gen ekspresyon seviyesinde artışla sonuçlanmayabileceğini göstermektedir. Epigenetik düzenlenme gibi diğer gen ekspresyonu düzenleme mekanizmaları bu durumu açıklayabilir.

Literatürde *GPC6* geni ve kanser ilişkisinin araştırıldığı çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır. Sporadik retinoblastoma hastalarında 140 mikrosatelit belirteçinin kullanılmasıyla gerçekleştirilen heterozigosite kaybı (LOH) çalışmasında *GPC6* lokusunda da LOH tespit edilmiş ve bu durumun *GPC6* ekspresyonunun azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak retinoblastomada 13q'daki rastgele olmayan allelik kayıp ile ilişkili olarak *GPC6* mRNA seviyesindeki azalma retinoblastoma gelişimi ile ilişkili olarak rapor edilmiştir (Lau vd 2009).

Osteosarkoma hücre serilerinde (143B) yapılan bir çalışmada *GPC6* geninin aşırı ekspresyonu sonucunda hücre göçünde artış gözlenmiş ve bu durumun hücre iskeletinin re-organizasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. MCF 10A hücre serilerinde *GPC6* ekspresyonunun baskılanması sonucunda hücre göçünde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Lacrima 2005).

Bu çalışmada, *GPC6* geninin normal ve tümör doku örneklerinde eksprese olduğu saptanmıştır. Tümörlü dokularda tespit edilen *GPC6* ekspresyon seviyesi normal dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak, tümör

örneklerindeki *GPC6* seviyesinin klinikopatolojik parametreler ile ilişkisinin bulunmaması bu genin mide karsinogenezinin erken dönemlerinde rol oynadığını ve prognozunda herhangi bir role sahip olmadığını düşündürmektedir. *GPC6* ifadesinin mide kanserinin prognozu ile ilişkisini daha net olarak yorumlayabilmek için örnek sayısının artırılmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz. Sonuçlarımız *GPC6*'nın yukarıda özetlenen sinyal yolları (Wnt, Hh, FGF, EGF, HGF ve TGF- β) üzerinden mide karsinogenez sürecinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bulgularımız *GPC5* ekspresyonu baskılanmasının, *GPC6*'nın ekspresyon artışına neden olabileceğini akla getirmektedir.

GPC6'nın tümörlü dokularda normal dokuya oranda daha fazla eksprese olduğunu tespit edilmesi, *GPC6* mRNA ekspresyon seviyesinin mide kanserinin tanısında aday bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu amaçla öncelikle *GPC6* mRNA seviyesi için bir kesim noktası (cut off) değeri hesaplanmalı ve testin spesifite ve sensitivitesi istatistiksel olarak değerlendirilmelidir. Böyle bir değerlendirme yapabilmemiz için *GPC6* mRNA ifade seviyesinin mide kanseri olmayan sağlıklı bireylerden elde edilecek normal mide mukozası örneklerinde de kantitatif olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Glipikanların hücre adezyonu, migrasyonu ile ekstraselüler matriks organizasyonunu değiştirip veya ligand-reseptör komplekslerinin oluşumunu kolaylaştırıp hücrenin ihtiyaç duyduğu büyüme faktörü konsantrasyonunu etkin bir biçimde düşürdüğü ve bu yolla tümörögenizde rol oynadığını destekleyen çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. *GPC6* aracılı mide karsinogenez sürecinin olası moleküler mekanizmasını aydınlatmak için *in vitro* hücre kültürü çalışmalarıyla ve sonrasında *in vivo* hayvan modelleriyle *GPC6* geninin fonksiyon çalışmalarının yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- Abraham, S.C., Park, S.J., Lee, J.H., Mugartegui, L., Wu, T.T., 2003. Genetic alterations in gastric adenomas of intestinal and foveolarphenotypes. *Mod Pathol*, 16; 786-795.
- Al-Moundhri, M.S., Al-Nabhani, M., Tarantini, L., Baccarelli, A., Rusiecki, J.A. 2010. The prognostic significance of whole blood global and specific DNA methylation levels in gastric adenocarcinoma. *PLoS One*, 5(12); e15585.
- Asundi, V.K., Keister, B.F., Stahl, R.C., Carey, D.J. 1997. Developmental and cell-type-specific expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans in the rat heart. *Exp Cell Res*, 230; 145-153.
- Aviel-Ronen, S., Lau, S.K., Pintilie, M., Lau, D., Liu, N., Tsao, M.S., Jothy, S. 2008. Glypican-3 is overexpressed in lung squamous cell carcinoma, but not in adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 21(7); 817-825.
- Baffa, R., Santoro, R., Bullrich, F., Mandes, B., Ishii, H., Croce, C.M. 2000. Definition and refinement of chromosome 8p regions of loss of heterozygosity in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 6; 1372-1377.
- Behmel, A., Plochl, E., Rosenkranz, W. 1984. A new X-linked dysplasia gigantism syndrome: identical with the Simpson dysplasia syndrome? *Hum Genet*, 67; 409-413.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., Zako, M. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 68; 729-777.
- Bishop, J.R., Schuksz, M., Esko, J.D. 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 446(7139); 1030-1037.
- Bleuming, S.A., Kodach, L.L., Garcia Leon, M.J., Richel, D.J., Peppelenbosch, M.P., Reitsma, P.H., Hardwick, J.C., Van Den Brink, G.R. 2006. Altered bone morphogenetic protein signalling in the *Helicobacter pylori*-infected stomach. *J Pathol*, 209;190-197.
- Brandan, E., Carey, D.J., Larraín, J., Melo, F., Campos, A. 1996. Synthesis and processing of glypican during differentiation of skeletal muscle cells. *Eur J Cell Biol*, 71; 170-176.
- Brown, D.A. 1992. Interactions between GPI-anchored proteins and membrane lipids. *Trends Cell Biol*, 11; 338-343.
- Buffart, T.E., Carvalho, B., Mons, T., Reis, R.M., Moutinho, C., Silva, P., Van Grieken, N.C., Vieth, M., Stolte, M., Van de Velde, C.J., Schrock, E., Matthaei, A., Ylstra, B., Carneiro, F., Meijer, G.A. 2007a. DNA copy-number profiles of gastric cancer precursor lesions. *BMC Genomics*, 8; 345.

- Buffart, T.E., Carvalho, B., Hopmans, E., Brehm, V., Kranenbarg, E.K., Schaaij-Visser, T.B., Eijk, P.P., Van Grieken, N.C., Ylstra, B., Van de Velde, C.J., Meijer, G.A. 2007b. Gastric cancers in young and elderly patients show different genomic profiles. *J Pathol*, 211; 45-51.
- Burbano, R.R., Assumpcao, P.P., Leal, M.F., Calcagno, D.Q., Guimaraes, A.C., Khayat, A.S., Takeno, S.S., Chen, E.S., Smith, M.A.C. 2006. C-Myc locus amplification as metastasis predictor in intestinal-type gastric adenocarcinomas: CGH study in Brazil. *Anticancer Res*, 26; 2909-2914.
- Candidus, S., Bischoff, P., Becker, K.F., Hofler, H., 1996. No evidence for mutations in the alpha- and beta-catenin genes in human gastric and breast carcinomas. *Cancer Res*, 56; 49-52.
- Capurro, M.I., Xiang, Y.Y., Lobe, C., Filmus, J. 2005. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res*, 65(14); 6245-6254.
- Carey, D.J., Stahl, R.C. 1990. Identification of a lipid-anchored heparan sulfate proteoglycan in Schwann cells. *J Cell Biol*, 111; 2053-2062.
- Carvalho, B., Buffart, T.E., Reis, R.M., Mons, T., Moutinho, C., Silva, P., Van Grieken, N.C., Grabsch, H., Van de Velde, C.J., Ylstra, B., Meijer, G.A., Carneiro, F. 2006. Mixed gastric carcinomas show similar chromosomal aberrations in both their diffuse and glandular components. *Cell Oncol*, 28; 283-294.
- Cattaruzza, S., Nicolosi, P.A., Perris, R. 2008. Proteoglycans in the control of tumor growth and metastasis formation. *Connect Tissue Res*, 49(3); 225-229.
- Chen, R.L., Lander, A.D. 2001. Mechanisms underlying preferential assembly of heparan sulfate on glypican-1. *J Biol Chem*, 276; 7507-7517.
- Cho, S.J., Park, J.W., Kang, J.S., Kim, W.H., Juhn, Y.S., Lee, J.S., Kim, Y.H., Ko Y.S., Nam, S.Y., Lee, B.L. 2008. Nuclear factor-kappaB dependency of doxorubicin sensitivity in gastric cancer cells is determined by manganese superoxide dismutase expression. *Cancer Sci*, 99; 1117-1124.
- Choi, S.W., Lee, K.Y., Kim, K.M., Chung, Y.J., Rhyu, M.G. 1998. Fractional allelic loss in gastric carcinoma correlates with growth patterns. *Oncogene*, 17; 2655-2659.
- Compare, D., Rocco, A., Nardone, G. 2010. Risk factors in gastric cancer. *Eu Rev Med Pharmacol Sci* 14(4); 302-308.
- Corso, G., Marrelli, D., Roviello, F. 2010. Familial gastric cancer: update for practice management. *Fam Cancer*. [Baskıda].
- Cumberledge, S., Reichsman, F. 1997. Glycosaminoglycans and WNTs: just a spoonful of sugar helps the signal go down. *Trends Genet*, 13; 421-423.

- David, G., Lories, V., Decock, B., Marynen, P., Cassiman, J., Van Den Berghe, H. 1990. Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts. *J Cell Biol*, 111; 3165-3176.
- De Cat, B., David, G. 2001. Developmental roles of the glypicans. *Semin Cell Dev Biol*, 12(2); 117-125.
- De Vita, F., Giuliani, F., Silvestris, N., Catalano, G., Ciardiello, F., Orditura, M. 2010. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in gastric cancer: a new therapeutic target. *Cancer Treat Rev*, 3; S11-S15.
- Dicken, B.J., Bigam, D.L., Cass, C., Mackey, J.R., Joy, A.A., Hamilton, S.M. 2005. Gastric adenocarcinoma: Review and Considerations for future directions. *Ann Surg*, 241; 27-39.
- Esko, J.D., Selleck, S.B. 2000. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem*, 71; 435-471.
- Feng, R., Chen, X., Yu, Y., Su, L., Yu, B., Li, J., Cai, Q., Yan, M., Liu, B., Zhu, Z. 2010. miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer. *Cancer Lett*, 298(1); 50-63.
- Fico, A., Maina, F., Dono, R. 2007. Fine-tuning of cell signalling by glypicans. *Cell Mol Life Sci*, Dec 18 [Baskıda].
- Filmus, J., Selleck, S.B. 2001. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest*, 108; 497-501.
- Filmus, J., Capurro, M., Rast, J. 2008. Glypicans. *Genome Biol*, 9(5); 224.1-224.5.
- Fransson, L.Å., Belting, M., Jönsson, M., Mani, K., Moses, J., Oldberg, Å. 2000. Biosynthesis of decorin and glypican. *Matrix Biol*, 19; 367-376.
- Fransson, L.Å. 2003. Glypicans. *The Int J Biochem Cell Biol*, 35; 125-129.
- Fransson, L.Å., Belting, M., Cheng, F., Jönsson, M., Mani, K., Sandgren, S. 2004. Novel aspects of glypican glycobiochemistry. *Cell Mol Life Sci*, 61(9); 1016-1024.
- French, A.J., Petroni, G., Thibideau, S.N., Smolkin, M., Bissonette, E., Roviello, F., Harper, J.C., Koch, B.R., Anderson, S.A., Hebring, S.J., Powell, S.M. 2004. Allelic imbalance of 8p indicates poor survival in gastric cancer. *J Mol Diagnost*, 6; 243-252.
- Fu, H., Hu, Z., Wen, J., Wang, K., Liu, Y. 2009. TGF-beta promotes invasion and metastasis of gastric cancer cells by increasing fascin expression via ERK and JNK signal pathways. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 41; 648-656.

- Fukaya, M, Isohata, N., Ohta, H., Aoyagi, K., Ochiya, T., Saeki, N., Yanagihara, K., Nakanishi, Y., Taniguchi, H., Sakamoto, H., Shimoda, T., Nimura, Y., Yoshida, T., Sasaki, H. 2006. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse-type gastric cancer. *Gastroenterology*, 131; 14-29.
- Fuster, M.M., Esko, J.D. 2005. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 7; 526-542.
- GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/GenbankSearch.html>)
- Gleeson, C.M., Ioannidis, J.M.S., McGuigan, J.A., Ritchie, A.J., Weber, J.L., Russell, S.H.E. 1997. Allelotype analysis of adenocarcinoma of the gastric cardia. *Br J Cancer*, 76; 1455-1465.
- Godin, R.E., Takaesu, N.T., Robertson, E.J., Dudley, A.T. 1998. Regulation of BMP7 expression during kidney development. *Development*, 125; 3473-3482.
- Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T., Kleesiek, K. 2000. Molecular cloning and expression of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein β -D-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J Mol Biol*, 304; 517-528.
- Gravalos, C, Jimeno, A. 2008. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 19; 1523-1529.
- Guo, X., Jing, C., Li, L., Zhang, L., Shi, Y., Wang, J., Liu, J., Li, C. 2010. Down-regulation of VEZT gene expression in human gastric cancer involves promoter methylation and miR-43c. *Biochem Biophys Res Commun*, Dec 11. [Baskida].
- Gümüş-Akay, G., Ünal, A.E., Elhan, A.H., Bayar, S., Karadayı, K., Sunguroğlu, A., Kadıkıran, A., Tukun, A. 2009. DNA Copy Number Changes in Gastric Adenocarcinomas: HR-CGH Study in Turkey. *Arch Med Res*, 40(7); 551-560.
- Häcker, U., Nybakken, K., Perrimon, N. 2005. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7; 530-541.
- Hagihara, K., Watanabe, K., Chun, J., Yamaguchi, Y. 2000. Glypican-4 is an FGF2-binding heparan sulfate proteoglycan expressed in neural precursor cells. *Dev Dyn*, 219; 353-367.
- Hardwick, J.C., Kodach, L.L., Offerhaus, G.J., Van den Brink, G.R. 2008. Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 8; 806-812.
- Hidaka, S., Yasutake, T., Kondo, M., Takeshita, H., Yano, H., Haseba, M., Tsuji, T., Sawai, T., Nakagoe, T., Tagawa, Y. 2003. Frequent gains of 20q and losses of 18q are associated with lymph node metastasis in intestinal-type gastric cancer. *Anticancer Res*, 23; 3353-3357.

- Higashiyama, S., Abraham, J.A., Klagsbrun, M. 1993. Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. *J Cell Biol*, 122; 933-940.
- Hileman, R.E., Fromm, J.R., Weiler, J.M., Linhardt, R.J. 1998. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *BioEssays*, 20; 156-167.
- Hsu, H.C., Cheng, W., Lai, P.L. 1997. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res*, 57(22); 5179-5184.
- Hughes-Benzie, R.M., Hunter, A.G., Allanson, J.E., Mackenzie, A.E. 1992. Simpson-Golabi-Behmel syndrome associated with renal dysplasia and embryonal tumor: localization of the gene to Xqcen-q21. *Am J Med Genet*, 43(1-2); 428-435.
- Ishihara, M., Kariya, Y., Kikuchi, H., Minamisawa, T., Yoshida, K. 1997. Importance of 2-O-sulfate groups of uronate residues in heparin for activation of FGF-1 and FGF-2. *J Biochem*, 121(2); 345-349.
- Isinger-Ekstrand, A., Johansson, J., Ohlsson, M., Francis, P., Staaf, J., Jönsson, M., Borg, A., Nilbert, M. 2010. Genetic profiles of gastroesophageal cancer: combined analysis using expression array and tiling array--comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 200(2); 120-126.
- Ivins, J.K., Litwack, E.D., Kumbasar, A., Stipp, C.S., Lander, A.D. 1997. Cerebroglycan, a developmentally regulated cell-surface heparan sulfate proteoglycan, is expressed on developing axons and growth cones. *Dev Biol*, 184; 320-332.
- Jackson, R.L., Busch, S.J., Cardin, A.D. 1991. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. *Phys Rev*, 71; 481-538.
- Jackson, S.M., Nakato, H., Sugiura, M., Jannuzi, A., Oakes, R., Kaluza, V., Golden, C., Selleck, S.B. 1997. Dally, a Drosophila glypican, controls cellular responses to the TGF- β related morphogen, Dpp. *Development*, 124; 4113-4120.
- Jakubovic, B.D., Jothy, S. 2007. Glypican-3: from the mutations of Simpson-Golabi-Behmel genetic syndrome to a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol*, 82(2); 184-189.
- Jia, H.L., Ye, Q.H., Qin, L.X., Budhu, A., Forgues, M., Chen, Y., Liu, Y.K., Sun, H.C., Wang, L., Lu, H.Z., Shen, F., Tang, Z.Y., Wang, X.W. 2007. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13(4); 1133-1139.

- Jin, Z., Selaru, F.M., Cheng, Y., Kan, T., Agarwal, R., Mori, Y., Oлару, A.V., Yang, J., David, S., Hamilton, J.P., Abraham, J.M., Harmon, J., Duncan, M., Montgomery, E.A., Meltzer, S.J. 2010 MicroRNA-192 and -215 are upregulated in human gastric cancer in vivo and suppress ALCAM expression in vitro. *Oncogene* Nov 29 [Baskıda].
- Kandil, D., Leiman, G., Allegretta, M., Trotman, W., Pantanowitz, L., Goulart, R., Evans, M. 2007. Glypican-3 immunocytochemistry in liver fine-needle aspirates : a novel stain to assist in the differentiation of benign and malignant liver lesions. *Cancer*, 111(5); 316-322.
- Kang, M.J., Ryu, B.K., Lee, M.G., Han, J., Lee, J.H., Ha, T.K., Byun, D.S., Chae, K.S., Lee, B.H., Chun, H.S., Lee, K.Y., Kim, H.J., Chi, S.G. 2008. NF-kappaB activates transcription of the RNA-binding factor HuR, via PI3K-AKT signaling to promote gastric tumorigenesis. *Gastroenterology*, 135; 2030-2042.
- Katoh, Y., Katoh, M. 2005. Hedgehog Signaling Pathway and Gastric Cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 4(10); 1050-1054.
- Kawauchi, S., Furuay, T., Uchiyama, T., Adachi, A., Okada, T., Nakao, M., Oga, A., Uchida, K., Sasaki, K. 2010. Genomic instability and DNA ploidy are linked to DNA copy number aberrations of 8p23 and 22q11.23 in gastric cancers. *Int J Mol Med* 26(3); 333-339.
- Kim, Y.H., Kim, N.G., Lim, J.G., Park, C., Kim, H. 2001. Chromosomal alterations in paired gastric adenomas and carcinomas. *Am J Pathol*, 158; 655-662.
- Kim, H., Xu, G.L., Borczuk, A.C., Busch, S., Filmus, J., Capurro, M., Brody, J.S., Lange, J., D'Armiento, J.M., Rothman, P.B., Powell, C.A. 2003. The heparan sulfate proteoglycan GPC3 is a potential lung tumor suppressor. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29(6); 694-701.
- Kimura, Y., Noguchi, T., Kawahara, K., Kashima, K., Daa, T., Yokoyama, S. 2004. Genetic alterations in 102 primary gastric cancers by comparative genomic hybridization: gain of 20q and loss of 18q are associated with tumor progression. *Mod Pathol*, 17; 1328-1337.
- Kirn-Safran, C., Farach-Carson, M.C., Carson, D.D. 2009. Multifunctionality of extracellular and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Cell Mol Life Sci*, 66(21); 3421-3434.
- Kleeff, J., Ishiwata, T., Kumbasar, A., Friess, H., Büchler, M.W., Lander, A.D., Korc, M. 1998. The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. *J Clin Invest*, 102(9); 1662-1673.
- Kleeff, J., Wildi, S., Kumbasar, A., Friess, H., Lander, A.D., Korc, M. 1999. Stable transfection of a glypican-1 antisense construct decreases tumorigenicity in PANC-1 pancreatic carcinoma cells. *Pancreas*, 19(3); 281-288.

- Kokkola, A., Monni, O., Puolakkainen, P., Nordling, S., Haapiainen, R., Kivilaakso, E., Knuutila, S. 1998. Presence of high-level DNA copy-number gains in gastric carcinoma and severely dysplastic adenomas but not in moderately dysplastic adenomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 107; 32-36.
- Koo, S.H., Kwon, K.C., Shin, S.Y., Jeon, Y.M., Park, J.W., Kim, S.H., Noh, S.M. 2000. Genetic alterations of gastric cancer: comparative genomic hybridization and fluorescence In situ hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenet*, 117; 97-103.
- Koo, S.H., Jeong, T.E., Kang, J.U., Kwon, K.C., Park, J.W., Noh, S.M. 2004. Prognostic implications for gastric carcinomabased on loss of heterozygosity genotypes correlation withclinicopathologic variables. *Cancer Genet Cytogenet*, 153; 26–31.
- Ku, G.Y., Ilson, D.H. 2010. Esophagogastric cancer: targeted agents. *Cancer Treat Rev*, 36(3); 235-248.
- Lacrima, K. 2005. Role Of Glypican-6 and NG2 as Metastasis Promoting Factors. *Universita' Degli Studi Di Parma, Dottorato di ricerca in Fisiopatologia Sistemica*.
- Lau, C.S., Yu, C.B., Wong, H.K., Fan, D., Mak, H.T., Wong, K.W., Lam, D.S., Pang, C.P., Choy, K.W. 2010. Allelic imbalance at 13q31 is associated with reduced GPC6 in Chinese with sporadic retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*, 94(3); 357-362.
- Lauren, P. 1965. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 64; 31-49.
- Lee, S.Y., Han, H.S., Lee, K.Y., Hwang, T.S., Kim, J.H., Sung, I.K., Park, H.S., Jin, C.J., Choi, K.W. 2007. Sonic hedgehog expression in gastric cancer and gastric adenoma. *Oncol Rep*, 17; 1051–1055.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396; 643-649.
- Li, X., Zhang, Y., Shi, Y., Dong, G., Liang, J., Han, Y., Wang, X., Zhao, Q., Ding, J., Wu, K., Fan, D. 2010. MicroRNA-107, an Oncogene MicroRNA that Regulates Tumor Invasion and Metastasis By Targeting DICER1 in Gastric Cancer: MiR-107 promotes gastric cancer invasion and metastasis. *J Cell Mol Med*, Oct 3 [Baskıda].
- Li, Y.L., Tian, Z., Wu, D.Y., Fu, B.Y., Xin, Y. 2005. Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of tumor suppressor gene PTEN in gastric cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol*, 11;285-288.
- Li, M., Choo, B., Wong, Z.M., Filmus, J., Buick, R.N. 1997. Expression of OCI-5/glypican 3 during intestinal morphogenesis: regulation by cell shape in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res*, 235; 3-12.

- Li, Q.L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X.Z., Lee, K.Y., Nomura, S., Lee, C.W., Han, S.B., Kim, H.M., Kim, W.J., Yamamoto, H., Yamashita, N., Yano, T., Ikeda, T., Itohara, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S.C., Ito, Y. 2002. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*, 109; 113-124.
- Li, Y., Sheu, C.C., Ye, Y., de Andrade, M., Wang, L., Chang, S.C., Aubry, M.C., Aakre, J.A., Allen, M.S., Chen, F., Cunningham, J.M., Deschamps, C., Jiang, R., Lin, J., Marks, R.S., Pankratz, V.S., Su, L., Li, Y., Sun, Z., Tang, H., Vasmatazis, G., Harris, C.C., Spitz, M.R., Jen, J., Wang, R., Zhang, Z.F., Christiani, D.C., Wu, X., Yang, P. 2010. Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: a genome-wide association study. *Lancet Oncol*, 4; 321-330.
- Lin, H., Huber, R., Schlessinger, D., Morin, P.J. 1999. Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, 59(4); 807-810.
- Litwack, E.D., Ivins, J.K., Kumbasar, A., Paine-Saunders, S., Stipp, C.S., Lander, A.D. 1998. Expression of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in the developing rodent. *Dev Dyn*, 211; 72-87.
- Liu, C.A., Wang, M.J., Chi, C.W., Wu, C.W., Chen, J.Y. 2004. Rho/Rhotekin-mediated NF-kappaB activation confers resistance to apoptosis. *Oncogene*, 23; 8731-8742.
- Liu, X., Wang, X., Zhang, J., Lam, E.K., Shin, V.Y., Cheng, A.S., Yu, J., Chan, F.K., Sung, J.J., Jin, H.C. 2010. Warburg effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis. *Oncogene*, 29; 442-450.
- Maesawa, C., Tamura, G., Suzuki, Y., Ogasawara, S., Sakata, K., Kashiwaba, M., Satodate, R. 1995. The sequential accumulation of genetic alterations characteristic of the colorectal adenoma-carcinoma sequence does not occur between gastric adenoma and adenocarcinoma. *J Pathol*, 176; 249-258.
- Matsubara, J., Yamada, Y., Hirashima, Y., Takahari, D., Okita, N.T., Kato, K., Hamaguchi, T., Shirao, K., Shimada, Y., Shimoda, T. 2008. Impact of insulin-like growth factor type 1 receptor, epidermal growth factor receptor and HER2 expressions on outcomes of patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 14; 3022-3029.
- Matsuda, K., Maruyama, H., Guo, F., Kleeff, J., Itakura, J., Matsumoto, Y., Lander, A.D., Korc, M. 2001. Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. *Cancer Res*, 61(14); 5562-5569.
- Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Kou, T., Morisawa, T., Azuma, T., Okazaki, I.M., Honjo, T., Chiba, T. 2007. *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med*, 13; 470-476.

- Meng, C.F., Zhu, X.J., Peng, G., Dai, D.Q. 2009. Promoter histone H3 lysine 9 dimethylation is associated with DNA methylation and aberrant expression of p16 in gastric cancer cells. *Oncol Rep*, 22(5); 1221-1227.
- Meng, C.F., Zhu, X.J., Peng, G., Dai, D.Q. 2010. Role of histone modifications and DNA methylation in the regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in human stomach cancer cells. *Cancer Invest*, 28(4); 331-339.
- Midorikawa, Y., Ishikawa, S., Iwanari, H., Imamura, T., Sakamoto, H., Miyazono, K., Kodama, T., Makuuchi, M., Aburatani, H. 2003. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer* 103(4); 455-465.
- Mishra, L., Derynck, R., Mishra, B. 2005. Transforming growth factor beta signaling in stem cells and cancer. *Science*, 310; 68-71.
- Miyazono, K., Suzuki, H., Imamura, T. 2003. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci*, 94; 230-234.
- Mrkvý P. 2010. Multimodal therapy of gastric cancer. *Dig Dis*, 28(4-5); 615-618.
- Munesue, S., Yoshitomi, Y., Kusano, Y., Koyama, Y., Nishiyama, A., Nakanishi, H., Miyazaki, K., Ishimaru, T., Miyaura, S., Okayama, M., Oguri, K. 2007. A novel function of syndecan-2, suppression of matrix metalloproteinase-2 activation, which causes suppression of metastasis. *J Biol Chem*, 282(38); 28164-28174.
- Murthy, S.S., Shen, T., De Rienzo, A., Lee, W.C., Ferriola, P.C., Jhanwar, S.C., Mossman, B.T., Filmus, J., Testa, J.R. 2000. Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. *Oncogene*, 19(3); 410-416.
- Myllykangas, S., Junnila, S., Kokkola, A., Autio, R., Scheinin, I., Kiviluoto, T., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Hollmén, J., Knuutila, S., Puolakkainen, P., Monni, O. 2008. Integrated gene copy number and expression microarray analysis of gastric cancer highlights potential target genes. *Int J Cancer*, 123(4); 817-25.
- Nakatsura, T., Kageshita, T., Ito, S., Wakamatsu, K., Monji, M., Ikuta, Y., Senju, S., Ono, T., Nishimura, Y. 2004. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res*, 10(19); 6612-6621.
- Neat, M.J., Foot, N., Jenner, M., Goff, L., Ashcroft, K., Burford, D., Dunham, A., Norton, A., Lister, T.A., Fitzgibbon, J. 2001. Localisation of a novel region of recurrent amplification in follicular lymphoma to an approximately 6.8 Mb region of 13q32-33. *Genes Chromosomes Cancer*, 32(3); 236-243.
- Nelson, W.J., Nusse, R. 2004. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science*, 303; 1483-1487.

- Neri, G., Marini, R., Cappa, M., Borrelli, P., Opitz, J.M. 1988. Simpson-Golabi-Behmel syndrome: an X-linked encephalo-tropho-schisis syndrome. *Am J Med Genet*, 30; 287-299.
- Nurcombe, V., Ford, M.D., Wildschut, J.A., Bartlett, P.F. 1993. Developmental regulation of neural response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan. *Science*, 260(5104); 103-106.
- Panani, A.D. 2008. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: Clinical implications. *Cancer Letters*, 266; 99-115.
- Park, Y.S., Jin, M.Y., Kim, Y.J., Yook, J.H., Kim, B.S., Jang, S.J. 2008. The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 15(7); 1968-1976.
- Pellegrini, M., Pilia, G., Pantano, S., Lucchini, F., Uda, M., Fumi, M., Cao, A., Schlessinger, D., Forabosco, A. 1998. Gpc3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Dev Dyn*, 213; 431-439.
- Pilia, G., Hughes-Benzie, R.M., MacKenzie, A., Baybayan, P., Chen, E.Y., Huber, R., Neri, G., Cao, A., Forabosco, A., Schlessinger, D. 1996. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet*, 12; 241-247.
- Rajkumar, T., Vijayalakshmi, N., Gopal, G., Sabitha, K., Shirley, S., Raja, U.M., Ramakrishnan, S.A. 2010. Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis. *Cancer Cell Int*, 10; 45.
- Ricciardelli, C., Rodgers, R.J. 2006. Extracellular matrix of ovarian tumors. *Semin Reprod Med*, 24(4); 270-282.
- Roskoski, R. Jr. 2004. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 319; 1-11.
- Ruiz-Tovar, J., Diez-Tabernilla, M., Housari, G., Martinez-Molina, E., Sanjuanbenito, A. 2010. Gastrointestinal stromal tumors: actin expression, a new prognostic factor? *Am Surg*, 76(11); 1244-1250.
- Sakakura, C., Hagiwara, A., Soga, K., Miyagawa, K., Nakashima, S., Yoshikawa, T., Kin, S., Nakase, Y., Yamaoka, N., Sagara, Y., Yamagishi, H. 2006. Long-term survival of a case with multiple liver metastases from duodenal gastrointestinal stromal tumor drastically reduced by the treatment with imatinib and hepatectomy. *World J Gastroenterol*, 12(17); 2793-2797.
- Sakakura, C., Mori, T., Sakabe, T., Ariyama, Y., Shinomiya, T., Date, K., Hagiwara, A., Yamaguchi, T., Takahashi, T., Nakamura, Y., Abe, T., Inazawa, J. 1999. Gains, losses, and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 24; 299-305.

- Sanderson, R.D., Yang, Y. 2008. Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. *Clin Exp Metastasis*, 25(2); 149-159.
- Saunders, S., Paine-Saunders, S., Lander, A.D. 1997. Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain. *Dev Biol*, 190; 78-93.
- Seo, H. M., Chang, Y. S., Joo, S. H., Kim, Y. W., Park, Y.K., Hong, S. W., Lee S.H. 2009. Clinicopathologic Characteristics and Outcomes of Gastric Cancers With the MSI-H Phenotype. *Journal of Surgical Oncology*, 99; 143–147.
- Scartozzi, M., Galizia, E., Freddari, F., Berardi, R., Cellerino, R., Cascinu, S. 2004. *Cancer Treatment Reviews*, 30; 451-459.
- Schneider, B.G., Pulitzer, D.R., Brown, R.D., Prihoda, T.J., Bostwick, D.G., Saldivar, V., Roriquuez-Martinez, H.A., Gutierrez-Diaz, M.E., O’Connel, P. 1995. Allelic imbalance in gastric cancer: an affected site on chromosome arm 3p. *Genes Chromosomes Cancer* 13; 263-271.
- Seto, E.S., Bellen, H.J. 2004. The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol*, 14; 45-53.
- Smith, M.G., Hold, G.L., Tahara, E., El-Omar, E.M. 2006. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J.Gastroenterol*, 12; 2979-2990.
- Smolen, G.A., Sordella, R., Muir, B., Mohapatra, G., Barmettler, A., Archibald, H., Kim, W.J., Okimoto, R.A., Bell, D.W., Sgroi, D.C., Christensen, J.G., Settleman, J., Haber, D.A. 2006. Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7); 2316-2321.
- Song, I.S., Ha, G.H., Kim, J.M., Jeong, S.Y., Lee, H.C., Kim, Y.S., Kim, Y.J., Kwon, T.K., Kim, N.S. 2010a. Human ZNF312b oncogene is regulated by Sp1 binding to its promoter region through DNA demethylation and histone acetylation in gastric cancer. *Int J Cancer*, Dec 17 [Baskıda].
- Song, G., Zeng, H., Li, J., Xiao, L., He, Y., Tang, Y., Li, Y. 2010b. miR-199a regulates the tumor suppressor mitogen-activated protein kinase kinase 11 in gastric cancer. *Biol Pharm Bull*, 33(11); 1822-1827.
- Song, I.S., Oh, N.S., Kim, H.T., Ha, G.H., Jeong, S.Y., Kim, J.M., Kim, D.I., Yoo, H.S., Kim, C.H., Kim, N.S. 2009. Human ZNF312b promotes the progression of gastric cancer by transcriptional activation of the K-ras gene. *Cancer Res*, 69(7); 3131-3139.
- Spehlmann, M.E., Eckmann, L. 2009. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol*, 25; 92-99.
- Stock, M., Otto, F. 2005. Gene Deregulation in Gastric Cancer. *Gene*, 30; 1-19.

- Su, G., Meyer, K., Nandini, C.D., Qiao, D., Salamat, S., Friedl, A. 2006. Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells. *Am J Pathol*, 168(6); 2014-2026.
- Sung, Y.K., Hwang, S.Y., Farooq, M., Kim, J.C., Kim, M.K. 2003. Growth promotion of HepG2 hepatoma cells by antisense-mediated knockdown of glypican-3 is independent of insulin-like growth factor 2 signaling. *Exp Mol Med*, 35(4); 257-262.
- Suzuki, S., Egami, K., Sasajima, K., Ghazizadeh, M., Shimizu, H., Watanabe, H., Hasegawa, H., Iida, S., Matsuda, T., Okihama, Y., Hosone, M., Shimizu, K., Kawanami, O., Tajiri, T. 2004. Comparative study between DNA copy number aberrations determined by quantitative microsatellite analysis and clinical outcome in patients with stomach cancer. *Clin Cancer Res*, 10; 3013-3019.
- Syrokou, A., Tzanakakis, G., Tsegenidis, T., Hjerpe, A., Karamanos, N.K. 1999. Effects of glycosaminoglycans on proliferation of epithelial and fibroblast human malignant mesothelioma cells: a structure-function relationship. *Cell Prolif*, 32(2-3); 85-99.
- Takada, H., Imoto, I., Tsuda, H., Sonoda, I., Ichikura, T., Mochizuki, H., Okanoue, T., Inazawa, J. 2005. Screening of DNA copy number aberrations in gastric cancer cell lines by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci*, 96; 100-110.
- Takada, K. 2000. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol*, 53(5); 255-261.
- Takei, Y., Takigahira, M., Mihara, K., Tarumi, Y., Yanagihara, K. 2010. The metastasis associated microRNA miR-516a-3p is a novel therapeutic target for inhibiting peritoneal dissemination of human scirrhous gastric cancer. *Cancer Res*, Dec 17 [Baskıda].
- Tamura, G., Sakata, K., Nishizuka, S., Maesawa, C., Suzuki, Y., Terashima, M., Eda, Y., Satodate, R. 1996. Allelotype of adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. *J Pathol*, 180; 371-377.
- Terris, B., Blaveri, E., Crnogorac-Jurcevic, T., Jones, M., Missiaglia, E., Ruzniewski, P., Sauvanet, A., Lemoine, N.R. 2002. Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Am J Pathol*, 160(5); 1745-1754.
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K. 2010. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*, 277(19); 3904-3923.
- Toretzky, J.A., Zitomersky, N.L., Eskenazi, A.E., Voigt, R.W., Strauch, E.D., Sun, C.C., Huber, R., Meltzer, S.J., Schlessinger, D. 2001. Glypican-3 expression in Wilms tumor and hepatoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, 23(8); 496-499.

Uchida, M., Tsukamoto, Y., Uchida, T., Ishikawa, Y., Nagai, T., Hijjiya, N., Nguyen, L.T., Nakada, C., Kuroda, A., Okimoto, T., Kodama, M., Murakami, K., Noguchi, T., Matsuura, K., Tanigawa, M., Seto, M., Ito, H., Fujioka, T., Takeuchi, I., Moriyama, M. 2010. Genomic profiling of gastric carcinoma in situ and adenomas by array-based comparative genomic hybridization. *J Pathol*, 221(1); 96-105.

UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>)

Van Dekken, H., Alers, J.C., Riegman, P.H., Rosenberg, C., Tilanus, H.W., Vissers, K. 2001. Molecular cytogenetic evaluation of gastric cardia adenocarcinoma and precursor lesions. *Am J Pathol*, 158; 1961-1967.

Van Grieken, N.C., Weiss, M.M., Meijer, G.A., Hermsen, M.A., Scholte, G.H., Lindeman, J., Craanen, M.E., Bloermea, E., Meuwissen, S.G., Baak, J.P., Kupers, E.J. 2000. Helicobacter pylori-related and non-related gastric cancers do not differ with respect to chromosomal aberrations. *J Pathol* 192(3); 301-306.

Varis, A., Zaika, A., Puolakkainen, P., Nagy, B., Madrigal, I., Kokkola, A., Väyrynen A, Kärkkäinen, P., Moskaluk, C., El-Rifai, W., Knuutila, S. 2004. Coamplified and overexpressed genes atERBB2 locus in gastric cancer. *Int J Cancer*, 109; 548-553.

Varma, R.R., Hector, S.M., Clark, K., Greco, W.R., Hawthorn, L., Pendyala, L. 2005. Gene expression profiling of a clonal isolate of oxaliplatin-resistant ovarian carcinoma cell line A2780/C10. *Oncol Rep*, 14(4); 925-932.

Veugelers, M., De Cat, B., Ceulemans, H., Bruystens, A.M., Coomans, C., Durr, J., Vermeesch, J., Marynen, P., David, G. 1999. Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface proteoglycans. *J Biol Chem*, 274; 26968-26977.

Veugelers, M., Cat, B.D., Muyltermans, S.Y., Reekmans, G., Delande, N., Frints, S., Legius, E., Fryns, J.P., Schrandt-Stumpel, C., Weidle, B., Magdalena, N., David, G. 2000. Mutational analysis of the GPC3-GPC4 glypican gene cluster on Xq26 in patients with Simpson-Golabi-Behmel syndrome: identification of loss-of-function mutations in the GPC3 gene. *Hum Mol Genet*, 9; 1321-1328.

Wang, L.H., Choi, Y.L., Hua, X.Y., Shin, Y.K., Song, Y.J., Youn, S.J., Yun, H.Y., Park, S.M., Kim, W.J., Kim, H.J., Choi, J.S., Kim, S.H. 2006. Increased expression of sonic hedgehog and altered methylation of its promoter region in gastric cancer and its related lesions. *Mod Pathol*. 19; 675-683.

Weiss, M.M., Kuipers, E.J., Postma, C., Snijders, A.M., Stolte, M., Vieth, M., Pinkel, D., Meuwissen, S.G., Albertson, D., Meijer, G.A. 2003b. Genome wide array comparative genomic hybridisation analysis of premalignant lesions of the stomach. *Mol Pathol*, 56; 293-298.

- Weiss, M.M., Kuipers, E.J., Postma, C., Snijders, A.M., Pinkel, D., Meuwissen, S.G., Albertson, D., Meijer, G.A. 2004. Genomic alterations in primary gastric adenocarcinomas correlate with clinicopathological characteristics and survival. *Cell Oncol*, 26; 307-317.
- Williamson, D., Selfe, J., Gordon, T., Lu, Y.J., Pritchard-Jones, K., Murai, K., Jones, P., Workman, P., Shipley, J. 2007. Role for amplification and expression of glypican-5 in rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*, 67(1); 57-65.
- World Health Organization. February 2009. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Woo, D.K., Kim, H.S., Lee, H.S., Kang, Y.H., Yang, H.K., Kim, W.H., 2001. Altered expression and mutation of beta-catenin gene in gastric carcinomas and cell lines. *Int. J. Cancer* 95, 108–113.
- Wu, C.W., Chen, G.D., Fann, C.S., Lee, A.F., Chi, C.W., Liu, J.M., Weier, U., Chen, J.Y. 2002. Clinical implications of chromosomal abnormalities in gastric adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 35; 219-231.
- Wu, M.S., Shun, C.T., Wang, H.P., Sheu, J.C., Lee, W.J., Wang, T.H., Lin, J.T. 1997. Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes, tumor stage, and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 112; 1457-1465.
- Xia, J.C., Weng, D.S., Li, J.T., Qin, H.D., Mai, S.J., Feng, B.J., Fan, Q., Feng, Q.S., Huang, L.X., Yu, X.J., Pan, Z.Z., Li, Y.Q., Wang, Q.J., Zhan, Y.Q., Chen, S.P., He, J., Huang, W.L., Wu, P.H., Zeng, Y.X. 2006. Loss of heterozygosity analysis of a candidate gastric carcinoma tumor suppressor locus at 7q31. *Cancer Genet Cytogenet*, 166(2); 166-172.
- Xiang, Y.Y., Ladeda, V., Filmus, J. 2001. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. *Oncogene*, 20(50); 7408-7412.
- Yamanaka, K., Ito, Y., Okuyama, N., Noda, K., Matsumoto, H., Yoshida, H., Miyauchi, A., Capurro, M., Filmus, J., Miyoshi, E. 2007. Immunohistochemical study of glypican 3 in thyroid cancer. *Oncology*, 73(5-6); 389-394.
- Yanagishita, M. 1998. Cellular catabolism of heparan sulfate. proteoglycans. *Trends Glycosci Glycotechnol*, 10; 57-63.
- Yanai, K., Nagai, S., Wada, J., Yamanaka, N., Nakamura, M., Torata, N., Noshiro, H., Tsuneyoshi, M., Tanaka, M., Katano, M. 2007. Hedgehog signaling pathway is a possible therapeutic target for gastric cancer. *J Surg Oncol*, 95; 55-62.
- Yang S. 2007. Gene amplifications at chromosome 7 of the human gastric cancer genome. 20(2):225-231

- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., Ornitz, D.M. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, 64; 841-848.
- Yoo, YA, Kang, M.H., Kim, J.S., Oh, S.C. 2008. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-beta-mediated activation of the ALK5-Smad 3 pathway. *Carcinogenesis*, 29;480–490.
- Yoshida, K., Tsuda, T., Matsumura, T., Tsujino, T., Hattori, T., Ito, H., Tahara, E. 1989. Amplification of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and oncogenes in human gastric carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 57; 285-290.
- Yu, W., Inoue, J., Imoto, I., Matsuo, Y., Karpas, A., Inazawa, J. 2003. GPC5 is a possible target for the 13q31-q32 amplification detected in lymphoma cell lines. *J Hum Genet*, 48(6); 331-335.
- Yustein, A.S., Harper, J.C., Pertoni, G.R., Cummings, O.W., Moskaluk, C.A., Powell, S.M. 1999. Allelotyping of gastric adenocarcinomas. *Cancer Res*, 59; 1437-1441.
- Zaky, A.H., Watari, J., Tanabe, H., Sato, R., Moriichi, K., Tanaka, A., Maemoto, A., Fujiya, M., Ashida, T., Kohgo, Y. 2008. Clinicopathologic Implications of Genetic Instability in Intestinal-Type Gastric Cancer and Intestinal Metaplasia as a Precancerous Lesion. *129*: 613-621
- Zhang, L., Zhong, K., Dai, Y., Zhou, H. 2009. Genome-wide analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation by ChIP-chip in gastric cancer patients. *J Gastroenterol*, 44(4); 305-312.
- Zhang, D., Wang, Z., Luo, Y., Xu, Y., Liu, Y., Yang, W., Zhang, X. 2010. Analysis of DNA copy number aberrations by multiple ligation-dependent probe amplification on 50 intestinal type gastric cancers. *J Surg Oncol Dec 22* [Baskıda].
- Zhu, Z., Friess, H., Kleeff, J., Wang, L., Wirtz, M., Zimmermann, A., Korc, M. Büchler, M.W. 2002. Glypican-3 expression is markedly decreased in human gastric cancer but not in esophageal cancer. *Am J Surg*, 184(1); 78-83.
- Zynger, D.L., Gupta, A., Luan, C., Chou, P.M., Yang, G.Y., Yang, X.J. 2008. Expression of glypican 3 in hepatoblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases. *Hum Pathol*, 39(2); 224-230.

EK-1

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Melike DİNÇCELİK

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 14 Mayıs 1985

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Bergama YDA Lisesi, Bergama, İzmir. 1999-2003.

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara. 2003-2007.

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Bölümü, Ankara. 2007-

Çalıştığı Kurum: -

Projeler:

Projenin Adı: Mide kanserinde *Glipikan 5* ve *Glipikan 6*'nın ekspresyon seviyelerinin prognostik önemi.

Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Fatma Ajlan TÜKÜN

Destekleyen Kuruluş: TÜBİTAK 109S250

Destek Miktarı: 25.000,00TL

Projedeki Görevi: Bursiyer

Yayınları (SCI ve diğeri): -

Posterler Bildirileri:

1. Arzu Vicdan, Melike Dincelik, Kanay Yararbas, Faegha Sadeghi, İbrahim Akalın, Burcu Saglam Ada, Hatice Ilgın Ruhi, Halil G. Karabulut, Timur Tuncalı, Nuket Yurur-Kutlay, Ajlan Tukun. Cytogenetic findings in 1493 patients with hematologic disorders. Mediterranean Medical Genetics Meeting 2009 Abstract book pp 25.

2. Arzu Vicdan, Burcu Saglam Ada, Askin Sen, Melike Dincelik, Mustafa Tekin, Alev Hasanoglu, Ajlan Tukun. Partial 4p in boy born to a mother with balanced $t(4;22)(p16;p13)$: a case report. Mediterranean Medical Genetics Meeting 2009 Abstract book pp 45.