

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER  
KANSERLERİNDE HGF/C-MET SİNYAL İLETİ  
YOLAĞININ ROLÜ**

MUKADDES GÜMÜŞTEKİN

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2008

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER  
KANSERLERİNDE HGF/C-MET SİNYAL İLETİ  
YOLAĞININ ROLÜ**

**ONKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**MUKADDES GÜMÜŞTEKİN**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYELERİ**

**Prof.Dr.AYDANUR KARGI**

**Prof.Dr.NEŞE ATABEY**

DEÜ BAP Proje No: 04.KB-SAĞ.085

## İÇİNDEKİLER

<b>Tablo Listesi</b>	iii
<b>Şekil Listesi</b>	iv
<b>Kısaltmalar</b>	v
<b>Teşekkür</b>	vi
<b>1. TÜRKÇE ÖZET</b>	1
<b>2. İNGİLİZCE ÖZET</b>	3
<b>3. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	5
<b>4. GENEL BİLGİLER</b>	7
4.1 Akciğer Kanserleri	7
4.2 Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)	15
4.3 Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü: c-Met	18
4.4 HGF/c-Met Yolağı ve Karsinogenezis, İnvazyon ve Metastaz	21
4.5 HGF/c-Met Yolağı ve Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserleri	26
4.6. Kanser Tedavisinde Farmakolojik Hedef Olarak c-Met ve Diğer Tirozin Kinaz Reseptörlerinin Yeri ve Önemi	27
<b>5.GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	28
5.1 İmmunhistokimyasal Boyama	28
5.2 İmmunreaktivitenin Değerlendirilmesi	30
5.3 Total Genomik DNA İzolasyonu	31
5.4.Total Genomik DNA İzolasyonu Sonrası Örneklerin Spektrofotometrik Analizi	32
5.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( PCR)	33
5.6 PCR Sonrası DNA Dizi Analizi	36
5.7 DNA Dizi Verilerinin Blast Analizi	36
5.8 İstatistiksel Analiz	36

<b>6. BULGULAR</b>	37
6.1 Hastaların Demografik Bilgileri	37
6.2 IHK Sonuçları	37
6.3 c-Met Reseptörünün Tirozin Kinaz Bölgesinde Saptanan Mutasyonlar	46
6.4 c-Met' de Saptanan Mutasyonların ve HGF, c-Met, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA Ekspresyonlarının Sağkalıma Etkisi	51
<b>7.TARTIŞMA</b>	59
<b>8.SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	67
<b>9.KAYNAKLAR</b>	69

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1</b> Akciğer kanserlerinin histolojik tipleri ve görülme yüzdeleri.....	13
<b>Tablo 2</b> KHDAK’de patolojik TNM (pTNM) Evrelendirmesi.....	14
<b>Tablo 3</b> MMP enzimlerin sinonimleri ve sınıflandırılması.....	23
<b>Tablo 4</b> IHK sırasında kullanılan antikorlar ve kaynatma metodları.....	30
<b>Tablo 5</b> Genomik DNA eldesinde kullanılan kit ve içerikleri .....	32
<b>Tablo 6</b> c-Met’in PCR ile amplifiye edilen ekzonlarına ait primer sekansları, PCR koşulları and PCR ürünlerinin büyüklükleri.....	35
<b>Tablo 7</b> Olguların demografik özellikleri.....	40
<b>Tablo 8</b> Olguların immun boyanma sonuçları.....	41
<b>Tablo 9</b> Güçlü pozitif immun boyanmaların histolojik alt tiplere göre dağılımı.....	41
<b>Tablo 10</b> Güçlü pozitif immun boyanmaların evrelerine göre dağılımı.....	43
<b>Tablo 11</b> Ekzon 20-21 (1)’ de nükleotid değişimi C/T transisyonu.....	47
<b>Tablo 12</b> Ekzon 20-21 (2)’ de nükleotid değişimi G/A transisyonu.....	49

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 HGF/c-Met sinyal iletide yer alan hücre içi sinyal ileti yolları.....	16
Şekil 2: HGF/c-Met yolağının apoptotik ve antiapoptotik etkisine aracılık eden hücre içi sinyal ileti molekülleri .....	17
Şekil 3 c-Met reseptör proteini bölgeleri ve fosforilasyon yerleri.....	19
Şekil 4 c-Met'in mutasyon bildirilen Sema, jukstamembranal ve tirozin kinaz bölgeleri.....	20
Şekil 5 c-Met reseptörünün fosforile tirozin rezidülerine bağlanan hücre içi moleküller.....	21
Şekil 6 c-Met için güçlü pozitif immün boyanma.....	42
Şekil 7 HGF için güçlü pozitif immün boyanma.....	42
Şekil 8 MMP-2 için güçlü pozitif immün boyanma.....	43
Şekil 9 MMP-9 için zayıf pozitif immün boyanma.....	44
Şekil 10 TIMP-1 için güçlü pozitif immün boyanma.....	44
Şekil 11 TIMP-3 için güçlü pozitif immün boyanma.....	45
Şekil 12 RhoA için güçlü pozitif immün boyanma .....	45
Şekil 13 Ekzon 20-21(1)'de nükleotid değişimi C/T transisyonu gösteren olguların kromatogramlarına ( iki yönlü) örnekler.....	48
Şekil 14 Ekzon 20-21(2)'de nükleotid değişimi G/A transisyonu gösteren olguların kromatogramlarına ( iki yönlü) örnekler.....	50
Şekil 15 Tüm grubun genel sağkalım oranları.....	52
Şekil 16 c-Met ekspresyonlarının sağkalıma etkisi.....	53
Şekil 17 HGF ekspresyonlarının sağkalıma etkisi.....	53
Şekil 18 HGF/c-Met koekspresyonlarının sağkalıma etkisi .....	54
Şekil 19 MMP-2 ekspresyonlarının sağkalıma etkisi .....	54
Şekil 20 MMP-9 ekspresyonlarının sağkalıma etkisi.....	55
Şekil 21 TIMP-1 ekspresyonlarının sağkalıma etkisi .....	55
Şekil 22 TIMP-3 ekspresyonlarının sağkalıma etkisi .....	56
Şekil 23 RhoA ekspresyonlarının sağkalıma etkisi.....	56
Şekil 24 D1254D mutasyonunun sağkalıma etkisi .....	57
Şekil 25 A1339A mutasyonunun sağkalıma etkisi .....	57
Şekil 26 D1254D ve A1339A mutasyonlarının birlikteliğinin sağkalıma etkisi.....	58

## KISALTMALAR

KHDAK	Küçük hücreli olmayan (dışı) akciğer kanseri
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
AK	Adenokanser
SHK	Skvamöz hücreli kanser
BHK	Büyük hücreli kanser
ECM	Ekstrasellüler matriks
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
c-Met	Hepatosit büyüme faktörü reseptörü
MMP-2	Matriks metalloproteinaz-2
MMP-9	Matriks metalloproteinaz-9
TIMP-1	Metalloproteinaz doku inhibitörü-1
TIMP-3	Metalloproteinaz doku inhibitörü-3
RTK	Reseptör tirozin kinaz

## TEŞEKKÜR

Bu projenin tüm aşamalarında benden bilgilerini, desteklerini ve zamanlarını esirgemeyen tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Aydanur Kargı ve Sayın Prof. Dr. Neşe Atabey başta olmak üzere, destekleri ve yardımları için tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Nur Olgun ve Sayın Doç. Dr. İlhan Öztop'a, projenin önemli bir kısmında laboratuvarlarını kullanmama izin veren Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Başkanı Sayın Prof. Dr. Meral Sakızlı'ya ve deneysel yöntemleri öğrenmeme ve optimize etmeme yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Yard. Doç. Dr. Esra Erdal, PhD. Gülay Bulut ve MD PhD. Aslı Toylu'ya, verilerin istatistiksel analizlerinin yapılması ve değerlendirilmesinde yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Doç. Dr. Belgin Ünal'a, doku kesitlerini büyük bir özenle yapan Birsan Alptekin ve diğer patoloji teknisyenlerine ve doktora yapmamı destekleyen Farmakoloji AD. öğretim üyelerine ve özellikle hocam Prof. Dr. Hülya Güven'e sonsuz teşekkürlerimle.....

Dr. Mukaddes Gümüştekin

İzmir, Temmuz 2008



## 1.TÜRKÇE ÖZET

### **Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde HGF/c-Met Sinyal İleti Yolağının Rolü**

Mukaddes Gümüştekin Güneli

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Balçova, İzmir

**Amaç:** HGF ve c-Met'in, küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde (küçük hücreli dışı akciğer kanserleri-KHDAK) ekspresyonları sıklıkla artmıştır, ancak tümör progresyonundaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı, HGF/ c-Met yolağının KHDAK'deki rolünün araştırılmasıdır.

**Gereç ve Yöntem:** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji arşivinden sağlanan 63 KHDAK olgusuna ait doku örneklerinde, HGF ve c-Met ekspresyonu immünohistokimyasal olarak belirlendi. Aynı dokulardan alınan kesitlerden elde edilen DNA' lar, c-Met reseptörünün transmembranal (ekzon 13), jukstamembranal (ekzon 14) ve sitoplazmik bölgelerini (15–21.ekzonlar) kodlayan tüm ekzonlara özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile amplifiye edildi ve bu bölgelerin DNA dizi analizi gerçekleştirildi. HGF/c-Met yolağı aktivasyonunun KHDAK progresyonundaki rolünü araştırmak amacıyla HGF/c-Met tarafından uyarıldığı ve invazyon ve metastazda rol oynadığı düşünülen matris metalloproteinaz proteinleri (MMP–2 ve MMP–9) ile metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP–1 ve TIMP–3) ve RhoA' nın ekspresyonları immünohistokimyasal (IHK) olarak belirlendi ve HGF ve c-Met ekspresyonları ile ilişkileri araştırıldı. Ayrıca çalışılan tüm parametrelerin hastaların sağkalımı ve diğer klinik parametreleri ile ilişkisi araştırıldı.

**Bulgular:** IHK analizler sonucunda KHDAK dokularının %81'inde c-Met, % 48'inde ise HGF ekspresyonunun arttığı belirlendi. c-Met ekspresyonundaki artış, skuamöz hücreli kanserde, adenokansere göre daha fazlaydı. Dizi analizleri sonrasında c-Met reseptörünün 13 - 19 ekzonlarında mutasyon saptanmaz iken tirozin kinaz aktivitesi gösteren bölgeleri kodlayan 20 ve 21. ekzonlarda c1254 T-->C transisyonu (D1254D) ve g1339 A-->G transisyonu (A1339A) şeklinde iki adet amino asit değişikliğine yol açmayan sessiz mutasyon saptandı.

IHK analizleri sonrasında MMP-2 %69, TIMP-1 %49, TIMP-3 %32 ve RhoA'da %8 oranında ekspresyon artışı bulunurken, MMP-9 ekspresyonunun da artış bulunmadı. TIMP-3 ve RhoA ekspresyonları, HGF güçlü ekspresyonu ve HGF/c-Met koekspresyonu olan olgularda anlamlı olarak artmış bulundu. HGF, c-Met, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA ekspresyonları ile, yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, tümör boyutu, lenfatik metastaz ve nüks oranı arasında korelasyon gözlenmedi. HGF/c-Met ile lenf nodu metastazı, TIMP-3 güçlü ekspresyonu ile ileri evre, RhoA güçlü ekspresyonu ve c-Met'te iki mutasyonun birlikte bulunması ile sağkalım süreleri arasında korelasyon saptandı.

**Sonuç:** IHK ve mutasyon analizleri, HGF/c-Met yolağı aktivasyonunun KHDAK gelişiminde ve/veya progresyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir. Verilerimiz, HGF/c-Met güçlü ekspresyonunun, RhoA ve TIMP-3 aracılığıyla invazyon ve metastazı arttırabileceği, c-Met ekspresyonundaki artışın HGF'den bağımsız olabileceği görüşünü desteklemektedir. Bulgularımız, KHDAK tedavisinde, HGF/c-Met yolağının tek başına veya TIMP-3 ve RhoA'nın inhibisyonu ile birlikte blokajının yeni moleküler tedavi hedefleri olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: **HGF, c-Met, mutasyon, metastaz, RhoA, TIMP-3, KHDAK**

## **2. İNGİLİZCE ÖZET-ABSTRACT**

### **The Role of HGF/c-Met Signal Transduction Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer**

Mukaddes Gümüştekin Güneli

Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Balçova, İzmir

**Objective:** HGF and c-Met are often overexpressed in non-small-cell lung cancer (NSCLC). However, their role in tumor progression is not clearly defined. The aim of this study is to investigate the role of HGF/c-Met pathway in NSCLC.

**Methods:** The expression of HGF and c-Met were determined immunohistochemically in parafin-embedded tissue samples of 63 NSCLC patients, which were provided from Dokuz Eylül University School of Medicine pathology archive. DNAs obtained from sections of the same tissues were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using exons specific primers that encode transmembranal domain (exon 13), juxtamembranal domain (exon 14) and cytoplasmic domain (exons 15-21) ( include tyrosine kinase activity (exons 20-21)) of the c-Met receptor. DNA sequence analysis was conducted in these PCR products. We also investigated the expressions of RhoA and MMPs (MMP-2 and MMP-9) along with their tissue inhibitors (TIMP-1 and TIMP-3) and their association with HGF and c-Met expressions. In addition, the relationship between all the parameters examined by either IHC or PCR and clinical parameters including survival and stage were investigated.

**Results:** Immunohistochemically, strong c-Met and HGF expressions were found in 81 % and 48 % of NSCLC tissues, respectively. c-Met overexpression in squamous cell cancers was significantly higher than in adenocarcinomas. We identified two novel silent mutations, c1254 T-->C transition (D1254D) in exon 20-21 (1) and g1339 A-->G transition (A1339A) in exon 20-21 (2). The positive immunostaining rates for MMP-2, TIMP-1, TIMP-3 and RhoA were 69%, 49%, 32% and 8%, respectively. MMP-9 overexpression was not encountered in any of the cases. We determined that TIMP- 3 and RhoA overexpression was statistically higher in cases, in which HGF overexpression (p=0.002 and p=0.045) or HGF/c-

Met coexpression ( $p=0.010$  and  $p=0.011$ ) were present. In addition, c-Met overexpression/mutations and all the studied immunostaining parameters were not correlated with tumor size, tumor stage, lymph node metastasis and relapse rate. However, the incidence of lymph node involvement was higher in the cases which had HGF/c-Met coexpression. The cases with RhoA overexpression or double mutation in c-Met were found to have significantly lower survival time.

**Conclusion:** Present study shows that HGF/c-Met pathway may play a role in NSCLC development and/or progression. Our data support the opinion that c-Met overexpression may be independent of HGF. Our data suggest that HGF/c-Met overexpression increases invasion and metastasis via RhoA and TIMP-3 in NSCLC, especially in adenocarcinoma. The blockade of the HGF/c-Met pathway with RhoA and/or TIMP-3 inhibitors may be an effective therapeutic target for NSCLC treatment.

**Keywords:** HGF, c-Met, mutation, metastasis, RhoA, TIMP-3, NSCLC

### **3. GİRİŞ VE AMAC**

Akciğer kanseri, tüm dünyada kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir. Akciğer kanseri, histolojik olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) şeklinde iki gruba ayrılmaktadır. KHDAK, tüm akciğer kanserlerinin % 80 kadarını oluştururlar ve prognozları oldukça kötüdür. Beş yıllık yaşam yaklaşık % 10' dur ve genellikle bu grupta yer alan hastalar erken dönemde opere edilmiş olanlardır. Hastaların çoğu kemoterapi ve radyoterapi uygulanmasına rağmen uzun süre yaşayamamakta ve metastatik hastalığa bağlı nedenlerle yaşamlarını kaybetmektedirler (1). Son yıllarda akciğer kanseri tedavisinde anjiogenezi ve büyüme faktörü reseptörlerini hedefleyen küçük moleküllerin ve/veya monoklonal antikorların kullanımı önemli bir açılım sağlamıştır (2-4). Bu büyüme faktörü reseptörlerinden birisi de Hepatosit Büyüme faktörü (HGF) reseptörü olan c-Met'tir (5).

HGF; mitogenez, motogenez, morfogenez ve anjiogenezi stimüle ederek embriyogenez, gelişim, homeostaz ve doku rejenerasyonu gibi pekçok biyolojik süreçte rol oynayan multifonksiyonel bir sitokindir (6). HGF'nin reseptörü c-Met, bir transmembranal protein tirozin kinazdır. 190 kD ağırlığında heterodimerik bir reseptördür. HGF'nin c-Met'e bağlanması, c-Met'in hücre içi sitoplazmik bölgesindeki tirozin rezidülerinin fosforillenmesine neden olur. Hücre içi sinyal iletinin daha sonraki basamakları fosfoinozimid 3 kinaz (PI3K) nin p85 subüniti, fosfolipaz C, Shc, Gab1 ve Grb2 sinyal proteinlerinin fosforillenmesi ile devam eder (6-8).

HGF ve reseptörü olan c-Met'in ekspresyonu, kolon, meme, akciğer, tiroid ve renal karsinoma, melanoma ve çeşitli sarkomlarda artmıştır (6-11). HGF'nin birçok kanser hücresinde invazyon kapasitelerini arttırdığı gösterilmiştir. Bu yolağın bloklanması tümör hücrelerinin invazyon ve metastazını engellediği, bu nedenle kanser tedavisinde önemli bir moleküler hedef olduğu bildirilmiştir (12).

Ekstrasellüler matriksin (ECM) yıkılması, lokal invazyon ve uzak metastaz için anahtar rol oynayan bir süreçtir. Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstrasellüler matriks proteinlerini degrade ederek tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz yapmalarına olanak sağlayan enzimlerdir. HGF'nin invazyonu arttırıcı etkileri; kanser hücrelerinin migrasyonunu direk olarak veya RhoA aracılığıyla arttırması, matriks ve endotele adezyonunu arttırması ve MMP-2, MMP-7, MMP-9 ve uPA gibi proteolitik enzimlerin kanser hücrelerinden sekresyonunu/ekspresyonunu arttırması yoluyla gerçekleşmektedir (13-19 ). KHDAK'lerinde MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11 ve MMP-14 ekspresyonlarının arttığı

bildirilmiştir (20-22). MMP ekspresyonlarının, KHDAK'lerinde histopatolojik ve klinik bulgularla korele oldukları bildirilmektedir (20-22). Bu bilgiler KHDAK gelişimi ve ilerleyişindeki MMP ekspresyon artışlarında, HGF/c-Met yolağının rolü olabileceğini düşündürmektedir.

ECM homeostazı, MMP'ler ile bunların spesifik inhibitörleri olan MMP doku inhibitörleri (TIMP) arasındaki denge ile sağlanmaktadır. TIMP'ler, MMP'lerin proteolitik aktivitelerini inhibe ederek, tümör invazyon ve metastazında aksi yönde rol oynarlar. Ancak TIMP'ler, olasılıkla apoptozisi önleyerek hücre proliferasyonunu stimüle edebilirler. Kolorektal, meme, özefagus ve KHDAK'lerin bazı alt tiplerinde (AK'de), TIMP-1 ekspresyonundaki artış ile tümörün daha agresif yapı kazanması arasındaki ilişki gösterilmiştir (23-27). Kolon, özefagus, meme, prostat ve akciğer kanserlerinde TIMP-3 ekspresyonunun klinik önemi bildirilmiştir (28-30). HGF/c-Met yolağının en önemli moleküler hedeflerinden birisi de TIMP-3'dür (16,31). Ancak, KHDAK'lerinde HGF/c-Met yolağının RhoA, MMP ve TIMP'ler ile ilişkisini araştıran çalışma sayısı çok azdır.

Her iki histolojik gruptaki akciğer kanserinde c-Met'in ekspresyonunun artmış olduğu bildirilmektedir (32-35). Bu kanserlerin invazyon ve metastaz süreçlerinde HGF/c-Met sinyal ileti yolağının yapısal aktivasyonunun rolü olduğu düşünülmektedir. İnsan renal papiller karsinomasında, HGF/ c-Met sinyal ileti yolağının yapısal aktivasyonu ile sonuçlanan, c-Met'in kalıtsal mutasyonları saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda akciğer kanserlerinde c-Met reseptörünün sema, jukstamembranal ve tirozin kinaz bölgelerinde somatik mutasyonlar saptanmıştır (33,36,37). Ancak bu mutasyonların tümörün progresyonu ve invazyon kapasitesi ile ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır. Bu projenin amacı; 1) HGF ve c-Met'in akciğer kanserli olgularımızda ekspresyon derecelerini araştırmak, 2) c-Met reseptörünün transmembranal, jukstamembranal ve tirozin kinaz bölgelerinde mutasyon varlığını araştırmak, 3) KHDAK'lerinde HGF/c-Met yolağının RhoA, MMP ve TIMP'ler ile ilişkisini araştırmak, 4) Bu verilerle tümörün progresyon derecesi arasında bir korelasyon olup olmadığını saptamaktır. Buradan elde edilecek bilgiler ışığında, bu süreçleri etkileyebilecek yeni tedavi hedef molekülleri belirlenebilecektir.

## **4. GENEL BİLGİLER**

### **4.1 Akciğer Kanseri**

Akciğer kanseri, bütün dünyada kanserle ilişkili ölümlerin en başta gelen nedenidir. Dünyada her yıl 1.2 milyon yeni akciğer kanseri olgusu bildirilmektedir (38). Histolojik olarak 4 alt grupta sınıflandırılırlar: küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), skuamöz hücreli karsinoma (SHK), adenokarsinoma (AK) ve büyük hücreli karsinoma (BHK). Bunlardan son üçü, klinik olarak küçük hücreli dışı akciğer kanserleri (KHDAK) olarak kabul edilirler. KHDAK, primer akciğer kanseri olgularının % 80' ini oluşturmaktadır (38,39) Hastaların yarısından fazlası tanı konulduğunda ileri evrededir ve kür olasılığı yoktur. Beş yıllık yaşam yaklaşık % 10' dur ve genellikle bu grupta yer alan hastalar erken dönemde opere edilmiş olanlardır. Hastaların çoğu kemoterapi ve radyoterapi uygulanmasına rağmen uzun süre yaşayamamakta ve metastatik hastalığa bağlı nedenlerle yaşamlarını kaybetmektedirler (1).

#### ***Etiyopatogenez:***

Akciğer kanseri, sigara içme, asbestoz ve diğer potansiyel karsinojen aerosollere maruziyet ile ilişkilidir (40). Akciğer kanseri olgularının % 80-90' ın da sigara içme öyküsü bulunmakla birlikte, sigara içenlerin sadece %10-15'inde akciğer kanseri gelişmektedir. Bu farklılığın genetik yatkınlık ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (41). Akciğer kanseri genlerinin yüksek penetrans ve düşük frekanslı geçişle ilişkili olduğu ve nadiren ailesel akciğer kanserinin görülebildiği bildirilmektedir. Karsinojenlerin metabolizmasından veya DNA tamirinden sorumlu olan ve düşük penetranslı ve yüksek frekanslı geçiş gösteren genler ( CYP1A1, GSTM1, MPO, NQO1 gibi) bir potansiyel duyarlılaştırıcı faktör gibi rol oynayan polimorfizm gösterirler. Bu polimorfizmlerin çok sık görülmemesi ve allel sıklığındaki etnik farklılıklar, akciğer kanserinin histolojisindeki heterojenite gibi nedenlerle genetik yatkınlığa neden olabilecek bu genler ile risk faktörleri arasındaki ilişkiyi gösterebilmek güçtür (41,42).

Pek çok çalışmada kadınların sigara içindeki karsinojenlere, erkeklerden daha duyarlı oldukları gösterilmiştir. Akciğer kanseri olan kadınlar genellikle, ortalamadan daha az sigara içen, daha genç ve çoğu zaman da sıklıkla hiç sigara içmemiş kişilerdir (43-45). Sigara içme ile akciğer kanserlerinin tüm histolojik tipleri arasında bir doz-yanıt ilişkisi vardır. Bu ilişki özellikle SHK ve KHAK' de daha belirgin iken, AK' da daha zayıftır. AK, erkeklerden daha çok kadınlarda ve özellikle de sigara içmeyen genç kadınlarda görülmektedir (43, 46). Bu durum, bu histolojik gruptaki akciğer kanserlerinde hormonal etkilerin lehinde belirtilerden biridir. Yakın zamanda bildirilen bir çalışmada, X kromozomunda lokalize bulunan 'Gastrin

salıverici peptid reseptörü (GRPR)’ nün, bronşiyal hücrelerde proliferatif yanıtı aracılık ettiği bildirilmektedir (43). Bununla birlikte cinsiyetler arasındaki hormonal, genetik ve metabolik farklılıkları tanımlayabilmek için daha çok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Yaş, kanser riskleri arasında majör belirleyicilerden biridir. Akciğer kanserli hastalarla ilgili bir kohort çalışmasında 60-69 yaşları arasında insidansın arttığı bildirilmektedir (43). Sigara içme öyküsü, SHK ‘li kadın ve erkeklerde daha fazladır. Ancak ABD’ de sigaraya karşı yürütülen kampanyalar ve sigara içme sıklığının azalması ile birlikte, erkeklerde de SHK ve KHAK insidansının azalmaya başladığı ve erkek/kadın SHK oranınının 1980’lerde 20 iken, son yıllarda 2.4 ‘e düştüğü bildirilmektedir. Kadın ve erkekler arasındaki histolojik tip arasındaki farklılıklar özellikle genç yaşlarda ( 55 yaşın altında) daha belirgindir.

Erken evrede tanı konmuş ve sigara içmeyen olguların sağkalım süresinin, sigara içenlerden daha uzun olduğu bildirilmektedir. 20 paket/yıl veya daha fazla sigara içenlerde sağkalımın daha düşük olduğu ve sigaranın sadece kanser gelişimine değil, kanserin prognozuna da etkili olduğu bildirilmektedir (44). Sigaraya başlama yaşı, sigara içme yoğunluğu ve süresi riski artıran faktörlerdir. Ancak, sigara miktarından ziyade sigara içme süresinin önemli olduğunu bildiren ve sigara ile sağkalım arasında ilişki olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (47-49). Akciğer kanseri gelişen erkeklerin %10’u, kadınların da %20’sinin hiç sigara içmedikleri tahmin edilmektedir.

Sigara içindeki tütünün tipi ve kimyasal bileşenleri coğrafik olarak ve zaman içinde değişiklikler göstermektedir. Filtreli sigaralara geçiş, sigaranın inhalasyonunun derinliğini değiştirmiştir. Filtresiz sigaraların inhale edilirken daha yüzeysel inhale edildiği ve tütün içindeki kimyasal bileşiklerin santral olarak bronşlarda tutulduğu ve daha çok SHK’e neden olduğu bilinmektedir. Filtreli sigaralar ise daha derine inhale edilerek kimyasal karsinogenlerin daha periferde depolanmasına ve daha çok AK’e neden olmaktadır(46, 50). Nikotin miktarının düşürülmesi de inhalasyon derinliğini artırarak, kimyasal karsinogenlerin birikmesini arttırabilmektedir. Sigara içindeki kimyasalların oranı da önemlidir. Sigara içindeki polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH, skuamöz hücreli karsinomayı indüklerler) azaltılırken, karsinogenik N-nitrozaminlerin ( carsinogenic tobacco-specific N-nitrosamines, TSNA, adenokanserini indüklerler) arttırılması adenokanser için riskin artmasına neden olmaktadır(46, 51).

Sigaranın bırakılması ile akciğer kanseri riski ve buna bağlı ölüm riski azalmaktadır. Ancak gün içinde içilen sigara miktarı ve sigara kullanma süresi yine de önemlidir. Riskteki azalma özellikle sigarayı bıraktıktan 5 yıl sonra ve genç yaşlarda sigarayı bırakanlarda belirgindir. Kırk yıldan fazla sigara içen kişilerde sigaranın bırakılması sonrası akciğer



kanseri gelişme riski, hiç sigara içmeyenler ile karşılaştırıldığında yine de yüksek bulunmuştur (40). Puro ve pipo içenlerde de akciğer kanseri riski artmaktadır, ancak bu risk sigara içenlerden daha azdır. Bu durum, gün içinde içilen puro veya pipo sıklığının ve inhale edilen dumanın derinliğinin, sigara ile karşılaştırıldığında daha düşük olması ile açıklanmaktadır (40).

Pasif sigara içiciliği ya da çevresel tütün dumanı (environmental tobacco smoke, ETS) ilk olarak 1982’ de Japon araştırmacı Hirayama tarafından rapor edilmiştir. 1992 yılında ETS, ABD’de sınıf A karsinojen olarak kabul edilmiştir ( US Environmental Protection Agency). ABD’de pasif içiciliğe bağlı akciğer kanserinden ölümlerin yılda 3000 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Sigara içmediği halde çevresel sigara dumanına maruz kalan kişilerde, akciğer kanseri gelişme riski, çevresel sigara dumanına maruz kalmayan diğer sigara içmeyenlere göre % 30 daha fazladır (40).

Çevresel faktörlerden radon gazı ile uzun süre temas ve radon gazı ile sigara birlikteliğinde kanser riski artmaktadır. Özellikle kazı yapan metro ve tünel işçilerinde radon gazı önemli bir risk faktörüdür ve akciğer kanserlerinin % 10 ‘undan sorumludur. Diğer çevresel ve mesleki risk faktörleri, arsenik ( Maden eritme ve pestisid yapımında çalışan işçiler), asbestoz, krom, nikel, klorometil eter, vinil klorid ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar ( gaz, çelik, kömür ve asfalt işçileri) dir (40).

Akciğer kanserinin gelişiminde; etnik farklılıklar, coğrafik özellikler, beslenme alışkanlıkları, diyet, yüksek doz radyasyon, X ışınları ve genetik özellikler diğer risk faktörleridir ve bunların özellikle sigara içenlerde riski sinerjistik olarak daha da arttırdığı bilinmektedir (40).

### ***Moleküler Patogenez***

#### ***Erken moleküler değişiklikler***

Akciğer kanserinde en erken ve sıklıkla görülen anormallik, 3. kromozomun kısa kolunda (3p) genetik materyalin inaktivasyonu veya kaybıdır. Akciğer kanserinde, normal bronşiyal epitelyum % 30 oranında 3p değişiklikleri içerebilmesine rağmen, tümör dokusunda çok daha fazla oranda 3p değişiklikleri saptanır (41, 52, 53). 3p delesyonlarının boyutu ve bunların görülme sıklığı, bazal hücre hiperplazisi ve skuamöz metaplazide %42, skuamöz displazide %81, karsinoma in situ ve skuamöz hücreli karsinomda % 100 olarak bildirilmektedir (53). Görüldüğü gibi 3p delesyon sıklığı, hiperplazi, metaplaziden karsinoma kadar ilerleyen spektrumda giderek artmaktadır.

*RARβ* (retinoik asid reseptör beta, 3p24), *RASSF1A* (Ras association domain family I, 3p21.3), and *FHIT* (fragile histidine triad gene, 3p14.2) gibi birçok tümör supresör genleri, 3. kromozomun kısa kolunda lokalizedir. Üçüncü kromozomun kısa kolunda (3p) genetik materyalin büyük bir kısmının kaybı tek başına bu tümör supresör genleri inaktive edemeyeceğinden, olasılıkla bu genlerin promoter bölgelerinin hipermetilasyonu gibi epigenetik değişiklikler de eşlik etmektedir (53).

Erken epigenetik ve somatik değişikliklerin sigara içme ile ilişkisi gösterilmiştir. *RARβ* metilasyonu sigara içenlerde, içmeyenlere göre daha sık görülmektedir. *RASSF1A* metilasyonu daha çok sigara içme süresi ile ilişkilidir ve özellikle buluş çağı gibi erken yaşlarda sigara içmeye başlayanlarda daha sık görüldüğü bildirilmektedir. 3p delesyonlarının da sigara ile ilişkisi gösterilmiştir.

Akciğer kanserinde epigenetik değişiklikler veya delesyonlar ile inaktif hale gelen diğer bir tümör supresör gen *p16* 'dır (33,35,46-48). *p16*, siklin D kinaz 2, 4 ve 6'nın inhibitörüdür ve bu genin kaybında retinoblastoma (RB) proteini kontrolsüz fosforile olur ve kontrolsüz hücre proliferasyonu gerçekleşir. *p16*'da delesyonlar veya epigenetik değişiklikler, skuamöz hücreli kanserin prekürsör lezyonlarından başlayarak artan oranda gözlenmektedir (bazal hücre hiperplazisi (%17), skuamöz metaplazi (%24) ve karsinoma in situ (%50)).

#### *Diğer moleküler değişiklikler*

*H-*, *K-*, and *N-ras* onkogen ailesindeki mutasyonlar, özellikle akciğer kanseri olmak üzere pek çok kanserde yaygın olarak görülmektedir. Bunlar içinde özellikle *K-ras* geninde çoğunlukla 12. kodonda daha az olarak da 13 ve 61. kodonlarda nokta mutasyonları sıklıkla gözlenmektedir. Bu mutasyonlar sonucunda yapısal olarak aktif hale gelen *K-ras* kontrolsüz hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. *K-ras* mutasyonları sigara içenlerde sıklıkla gözlenen mutasyonlardır, AK' de sigara içen kişilerde *K-ras* mutasyon prevalansı % 30 iken sigara içmeyenlerde % 5'tir. Sigara dumanındaki karsinojenlerden biri olan benzo[a]piren, *K-ras* geninin 12. kodonunda G→T transisyonunu indüklemektedir (41,52,53, 55).

*p53* mutasyonu pek çok kanserde sıklıkla görülür. KHDAK'lerinin % 50'sinde, küçük hücreli akciğer kanserlerinin % 90'ında *p53* mutasyonu bulunur. *p53* geni, 53 kD ağırlığında nükleer bir fosfoproteini kodlar ve bu protein DNA hasarlandığında hücre siklusunu G1/S veya G2/mitoz fazları arasındaki geçişlerde durdurur ve DNA'nın tamirine olanak verir. Eğer bu imkansızsa apoptozisi indükler. *p53* mutant hücreler bu kontrolden kurtuldukları için malign transformasyona daha eğilimlidirler. KHDAK'de *p53* mutasyonlarının çoğu G→A

transversiyonu, KHAK 'de ise G→T transisyonu ile ilişkilidir. Sigara dumanındaki benzo[a]piren, *p53* mutasyonuna da neden olur. Sigara dumanı, doz-yanıt ilişkisi ile akciğer kanserinde *p53* mutasyonunu artırır (41, 52, 53, 55).

Genetik değişiklikler, sigara içmeyen hastalarda dahi tedavi yanıtını etkilemektedir. Bir tirozin kinaz inhibitörü olan gefitinib ile yapılan klinik çalışmalarda, Asyalı sigara içmeyen kadınlarda tedavi yanıtının, Avrupalı sigara içmeyen KHDAK' li hastalardan daha iyi olduğu bildirilmektedir. Bu da Asyalı kadınlarda epidermal büyüme faktörü reseptöründe aktive edici mutasyonların daha yüksek prevalansta görülmesi ile açıklanmaktadır (53).

#### *Bireysel farklılıklar*

Genellikle sigara içme öyküsü ve çevresel etkenlere maruziyeti saptamak kolayken, kişisel duyarlılığın saptanması kolay değildir. Tütünün-indüklediği akciğer kanserine duyarlılığı göstermek için; hem olgu-kontrol hem de kohort çalışmaları, bireyler arasındaki genetik değişikliklerin genotipik ve/veya fenotipik belirteçlerini bulmaya odaklanmıştır (41,53). Özellikle de karsinojenlerin detoksifikasyonu veya aktivasyonunu sağlayan metabolik yollar ve DNA tamir mekanizmaları üzerinde durulmaktadır. Karsinojenler dahil olmak üzere toksik bileşiklerin metabolizması, faz I ve faz II reaksiyonları ile gerçekleşmektedir. Faz I reaksiyonları ile inaktif ve nonpolar bileşikler genellikle oksidasyon reaksiyonları ile oldukça reaktif ara bileşiklere dönüşmektedirler. Bu bileşikler daha sonra faz II reaksiyonları ile konjugasyona uğrayarak genellikle daha az reaktif ve daha kolayca vücuttan atılabilecek moleküller haline dönüştürülürler. Ancak reaktif ara metabolitler, konjugasyondan önce DNA gibi birçok hücrenel komponent ile reaksiyona girebilirler. Bu metabolitlerin DNA'ya bağlanması, karsinogenezisin ilk basamağını oluşturabilmektedir.

Tütün dumanı içindeki ( polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi) birçok karsinojen, faz I enzimleri olan CYP450 enzim sistemi aracılığıyla reaktif ara metabolitlere dönüşür ve DNA'ya bağlanarak genetik hasara neden olur. Bu nedenle CYP450 sistemi enzimleri, özellikle de CYP1A1 ve CYP2D6, akciğer kanserleri riski açısından incelenmektedir. *CYP1A1* geninde MspI polimorfizmi ve ekzon 7' de polimorfizm olmak üzere iki spesifik polimorfizmin, akciğer kanseri riskini arttırdığı ileri sürülmektedir (41,43,56,57).

CYP2D6 için hem metabolik hem de genotipik değişiklikler incelenmiştir. Bu enzim debrizokin metabolizması için fenotipiktir ve akciğer kanseri ile ilişkisi geniş ölçüde incelenmiştir. Olgu-kontrol çalışmalarında bu enzim açısından hızlı metabolize edicilerin akciğer kanseri açısından yüksek risk taşıdığı bildirilse de, daha sonra yapılan kapsamlı bir çalışmada ilişki bulunamamıştır (43, 58).

Glutasyon *S*-transferaz, polisiklik aromatik hidrokarbonların reaktif metabolitlerini detoksifiye eden bir faz II enzimidir. Bu enzimin,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\pi$ , ve  $\theta$  şeklinde en az dört genetik tipi vardır. Bir metaanalizde *GSTM1* null genotipi olan kişilerin akciğer kanseri açısından yüksek risk taşıdığı bildirilmiştir, ancak farklı sonuçlar da bildirilmektedir. Sigara içmeyenlerde *CYP1A1* Ile462Val and *GSTM1* null polimorfizmlerinin birlikteliğinin, bu polimorfizmleri taşımayan kişilerdeki akciğer kanseri riskinden dört kat fazla olduğu bildirilmektedir (41,43,59).

Akciğer kanserlerinde DNA tamir mekanizmaları ve akciğer kanserine duyarlılık ile ilgili çalışmalarda yapılmaktadır. Hipotez olarak, sigara içen kişilerde DNA hasarı oluşturan birçok kimyasal komponentlere maruz kalındığı ve DNA tamir mekanizmalarının kapasitesinin yetmediği ve akciğer kanseri riskinin arttığı varsayılmıştır. DNA tamir genleri ile ilgili çalışmalarda, *XPA*, *XPD*, x-ray repair complementation group 1 and 3 (*XRCC1* and *XRCC3*), excision repair cross complementation group 1 (*ERCC1*), ve *hOGG1* genleri incelenmiş, ancak bugüne kadar spesifik bir polimorfizm tanımlanamamıştır (41,43,60,61).

## **Patoloji**

Görüntüleme teknikleri ve moleküler çalışmaların ilerlemesine rağmen, akciğer kanserlerinde tanı ve tedavide histopatolojinin önemi halen devam etmektedir. Görüntüleme yöntemleri ve moleküler tekniklerin yorumlanması histopatolojik bulgular ile birlikte yapılmaktadır. Akciğer kanserlerinin Dünya Sağlık Örgütü morfolojik sınıflandırılması en son 2004 yılında revize edilmiştir ve morfolojik özellikler kadar moleküler verileri de göz önüne alınmıştır.

Primer akciğer karsinomlarının büyük bir kısmı bronş epitelinden daha az oranda küçük hava yolları ve alveolü döşeyen epitelden kaynaklanmaktadır. Dört ana tip akciğer kanseri tanımlanmıştır: Küçük hücreli akciğer kanserleri (KHAK), küçük hücreli dışı akciğer kanserleri (KHDAK) olarak bilinen, adenokanser (AK), skuamöz hücreli kanser (SHK) ve büyük hücreli kanser (BHK) (Tablo 2). Ayrıca bu sınıflandırmada, adenoskuamöz hücreli kanser, karsinoid tümör ve atipik karsinoid tümör gibi daha az sıklıkla görülen karsinomlar

yer alır. Genel olarak akciğer kanserleri histolojik olarak en iyi ayrımlaşmanın olduğu alana göre tiplendirilirler ve ayrımlaşmanın en az olduğu alana göre derecelendirilirler. Tablo 2’de KHDAK’lerinde patolojik TNM (pTNM) evrelendirmesi ve derecelendirme gösterilmiştir.

Adenokanser, akciğer kanserinin en sık görülen tipidir ve sıklıkla periferik yerleşimlidir. Skuamöz hücreli kanserler ise santral yerleşimlidir, hiler ve mediastinal yayılım gösterirler. Büyük hücreli kanserler, sıklıkla periferik yerleşimlidir. Küçük hücreli kanserler, santral yerleşimlidir, hiler ve mediastinal yayılımları siktir.

**Tablo 1.** Akciğer kanserlerinin histolojik tipleri ve görülme yüzdeleri

<b>Histolojik tip</b>	<b>%</b>
Skuamöz hücreli kanser	29
Adenokanser	32
Bronkoalveolar	3
Büyük hücreli kanser	9
Küçük hücreli akciğer kanserleri	20
Diğerleri	14

**Tablo 2.** KHDAK’de patolojik TNM (pTNM) Evrelendirmesi

<b>Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde patolojik TNM (pTNM) Evrelendirmesi</b>		
<b>Tümör boyutu</b>	<b>T0</b>	Tümör yok
	<b>TX</b>	Sitoloji pozitif, görünürde tümör yok
	<b>TIS</b>	Karsinoma in situ
	<b>T1</b>	Tümör <3 cm, visseral plevra veya lobar bronşial ilişki yok
	<b>T2</b>	Tümör >3 cm, visseral plevrayla ilişkili ve karinadan $\geq 2$ cm
	<b>T3</b>	Mediastene veya parietal plevraya veya perikardiyum ya da göğüs duvarına doğru büyüme veya karinadan <2 cm
	<b>T4</b>	Kalp, büyük damarlar, özefagus, trakea, karina, vertebraya invazyon veya malign plevral efüzyon
<b>Lenf nodu</b>	<b>NX</b>	Değerlendirilemedi
	<b>N0</b>	Nodal tutulum yok
	<b>N1</b>	Peribronşiyal veya ipsilateral hiler lenf nodu tutulumu
	<b>N2</b>	İpsilateral mediastinal veya subkarinal lenf nodu tutulumu
	<b>N3</b>	Kontrateral mediastinal veya hiler lenf nodu tutulumu, supraklavikular veya skalen lenf nodu tutulumu
<b>Metastaz</b>	<b>MX</b>	Değerlendirilemedi
	<b>M0</b>	Metastaz yok
	<b>M1</b>	Uzak metastaz var
<b>Derece</b>	<b>GX</b>	Değerlendirilemedi
	<b>G1</b>	İyi diferansiye
	<b>G2</b>	Orta diferansiye
	<b>G3</b>	Kötü diferansiye
	<b>G4</b>	Andiferansiye
<b>Lenfatik invazyon</b>	<b>LX</b>	Değerlendirilemedi
	<b>L0</b>	Lenfatik invazyon yok
	<b>L1</b>	Lenfatik invazyon var
<b>Vasküler invazyon</b>	<b>VX</b>	Değerlendirilemedi
	<b>V0</b>	Vasküler invazyon yok
	<b>V1</b>	Vasküler invazyon var

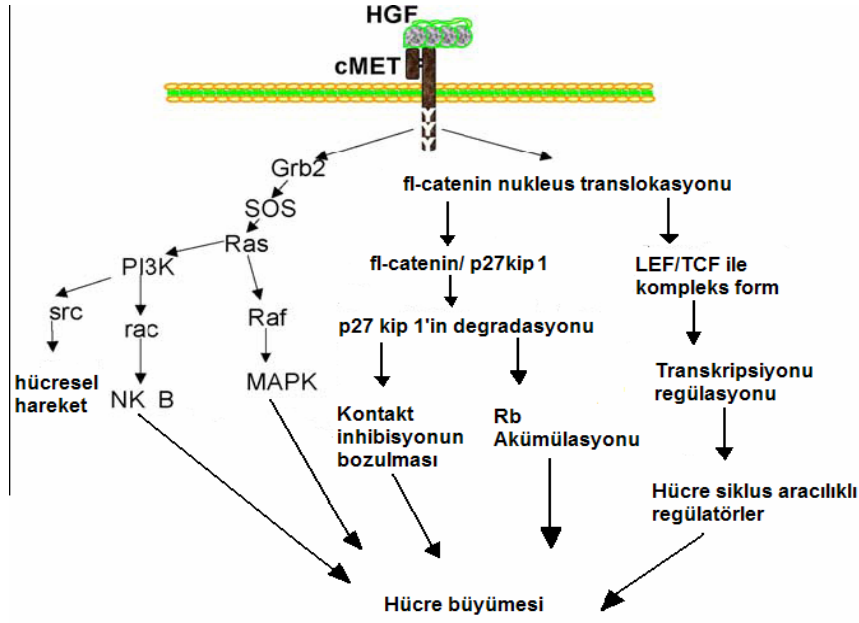
## 4.2 Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF/SF)

Hepatosit büyüme faktörü (HGF), karaciğer ve plasentanın normal gelişiminde, nöral gelişimde, morfogenezde çeşitli organların ayrılaşmasında, ayrıca böbrek ve akciğer rejenerasyonunda rolü olan bir sitokindir. HGF, embriyogenik gelişimde rol oynadığı gibi, kanser hücrelerinin migrasyon, invazyon ve anjiogenezinde anahtar rol oynayan heterodimerik bir moleküldür. HGF/SF molekülü, N-ucunda hairpin domain ve 4 tane kringle domain içeren bir  $\alpha$  zinciri (69 kD) ile serin-proteaz aktivitesi gösteren bir  $\beta$  zincirinden (34 kD) oluşmaktadır. HGF/SF, mezokimal hücrelerden biyolojik aktivitesi olmayan ve tek zincirli 728 aminoasidlik bir prekürsör polipeptid (pro-HGF) olarak salgılanır ve daha sonra serin proteazlar ve HGF/SF dönüştürücü enzim aracılığıyla HGF'ye dönüştürülür (6, 8, 9,32).

HGF, disülfid bağlı sitokinlerin en büyüğüdür, plazminojen ile ilişkili büyüme faktörleri ( PRGFs- plasminogen-related growth factors) ailesinin bir üyesidir ve aynı zamanda PRGF-1 olarak da adlandırılmaktadır. HGF'yi kodlayan gen, 70 kb büyüklüğünde ve yedinci kromozomda ( 7q21.1) yerleşmiştir (6).

HGF/SF, mezenşimal hücrelerden salgılandıktan sonra, c-Met eksprese eden epitelyal hücreleri endokrin ve/ veya parakrin yollarla etkilemektedir. HGF, c-Met reseptörüne yüksek afinite ile bağlanır. Hepatositler için bir büyüme faktörü olduğu gibi, fibroblast-kökenli hücrelerde motilite faktörü veya yayılma/saçılım faktörü (scatter factor) olarak etki gösterdiği tanımlanmıştır. HGF/ c-Met sinyal ileti yolağının aktivasyonunun; proliferasyon, yaşam süresi, anjiogenezis, yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu, yayılım, motilite, invazyon, morfogenezde dallanma gibi pek çok hücrel yanıtı neden olabileceği gösterilmiştir (6-8).

Kanser hücrelerinin HGF ile stimülasyonu, hücre büyümesini ve çoğalmasını, hücre hareketini artırır. HGF ile stimüle edilen hücre büyümesi ve motilitesi, HGF' nin reseptörü olan c-Met 'in hücre içinde pek çok sinyal ileti yolağını aktive etmesi ile gerçekleşmektedir (Şekil 1).



**Şekil 1.** HGF/c-Met sinyal iletide yer alan hücre içi sinyal iletme yolları (6)

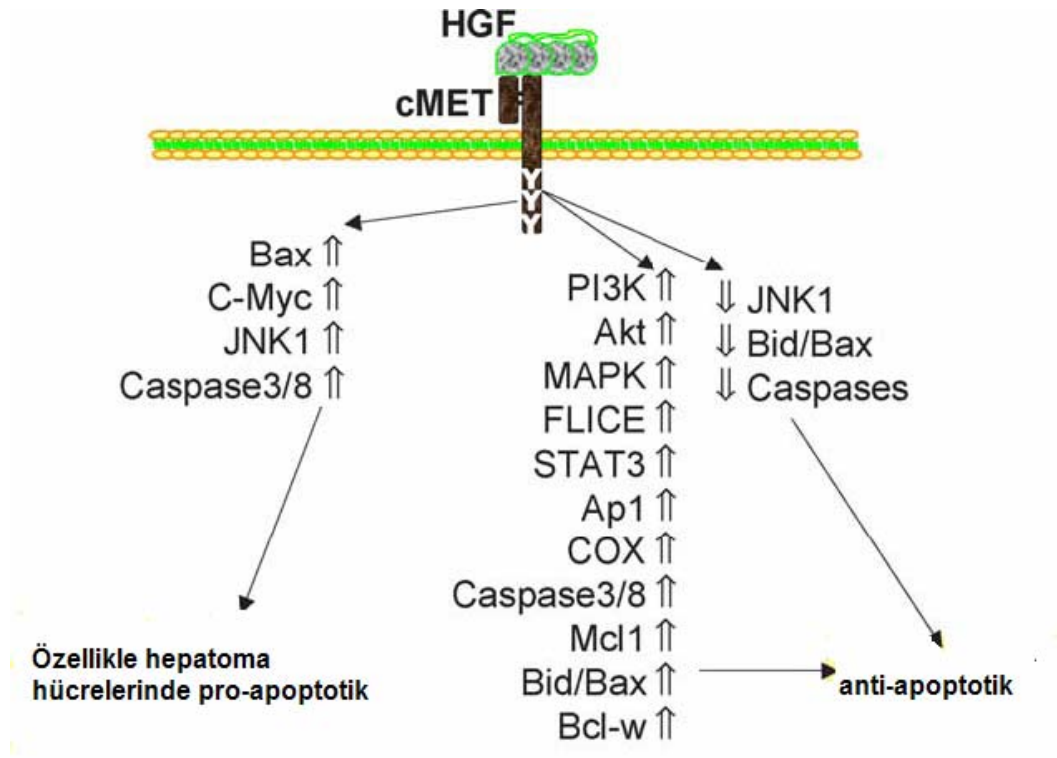
HGF ile indüklenen hücre motilitesi ve migrasyonunda; rho/rac sinyal iletme yolağı, PI3K yolağı, FAK-paksillin yolağı, Ezrin/radixin/moesin (ezrin/radixin/moesin, ERM) ailesinin üyeleri, RanBPM gibi pek çok sinyal iletme yolağının ve molekülünün ilişkisi gösterilmiştir (6)

HGF ile düzenlenen hücre büyümesi, komplike bir olaydır. Sadece hücrenin türüne göre değil, aynı hücrenin normal veya transforme hücre halinde olması bile, HGF'ye verilen büyüme yanıtını etkilemektedir. Buna en tipik örnek hepatositlerdir: transformasyon göstermeyen hepatositlerde HGF, mitojen gibi etki gösterirken; hepatoma hücrelerinde büyüme inhibitörü gibi etki göstermektedir. Gallego ve arkadaşları, yakın zamanda farelerde yaptıkları bir çalışmada, HGF ekspresyonunun indükleyerek, karsinogenezisi stimüle edebildiklerini bildirmişlerdir. HGF'nin hücre büyümesi ve proliferasyonu etkisine aracılık eden moleküller ve yollar; GATA-4, MEK/ERK yolağı, PI3 kinaz yolağı, STAT-3 olarak bildirilmektedir (6).

HGF'nin indüklediği morfogenezis de Pax3, STAT-3 ve PLC $\gamma$  'nin sorumlu olduğu gösterilmiştir. HGF, morfogenez ve anjiogenez etkileri ile karaciğer, böbrek ve akciğer gibi organların rejenerasyonunda rol oynamaktadır (6).



HGF'nin aktivator protein-1 (AP-1)'e bağımlı COX-2 'yi aktive ederek, apoptozisi inhibe ettiği bilinmektedir. Hepatositlerde, HGF ile c-Met'in aktivasyonu, ölüm reseptörü Fas'ın c-Met ile sekestre olmasına neden olarak, Fas'ın kendisi ile sekestre olamamasına ve böylece ligandı ile bağlanamamasına neden olmaktadır. Bu durum, HGF ile indüklenen hücre yaşamı/ antiapoptotik etkisi için yeni bir mekanizmadır. HGF ile indüklenen tutunmadan bağımsız (anchorage-independent) büyüme ve tümörigenez için önemli sinyal moleküllerinden biri de STAT-3'tür. Genel olarak, HGF'nin, renal epitelyal hücrelerde, mide epitelyal hücrelerinde, podositlerde, miyosit, serebellar nöronlar, saç folikülleri, plazma hücreleri, endotelyal hücreler ve hepatositlerde antiapoptotik etkili olduğu bildirilmektedir. Akciğer kanseri, glioblastoma hücrelerinde MAPK/Akt yolağı ile, kolon kanserinde Bcl-W'yi aktive ederek, meme kanserinde (Bcl-X1 aktivasyonu ile), baş ve boyun skuamöz kanserlerinde ve miyeloma hücreleri gibi kanser hücrelerinde HGF'nin antiapoptotik etkili olduğu bildirilmektedir (6). Bununla birlikte HGF, overlerin yüzey epiteli hücrelerinde apoptozu artırır (Şekil 2).

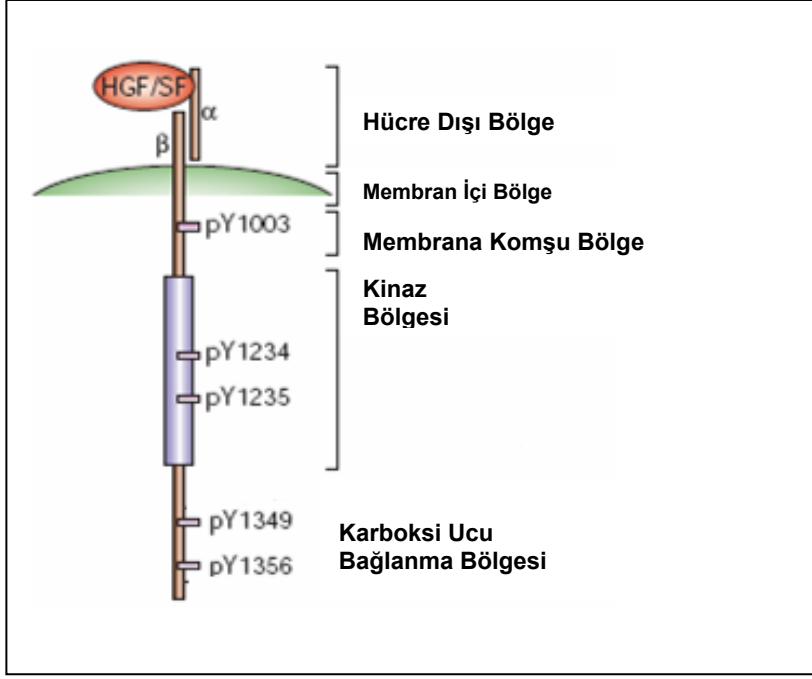


**Şekil 2.** HGF/c-Met yolağının apoptotik ve antiapoptotik etkisine aracılık eden hücre içi sinyal ileti molekülleri (6)

### 4.3 Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü: c-Met

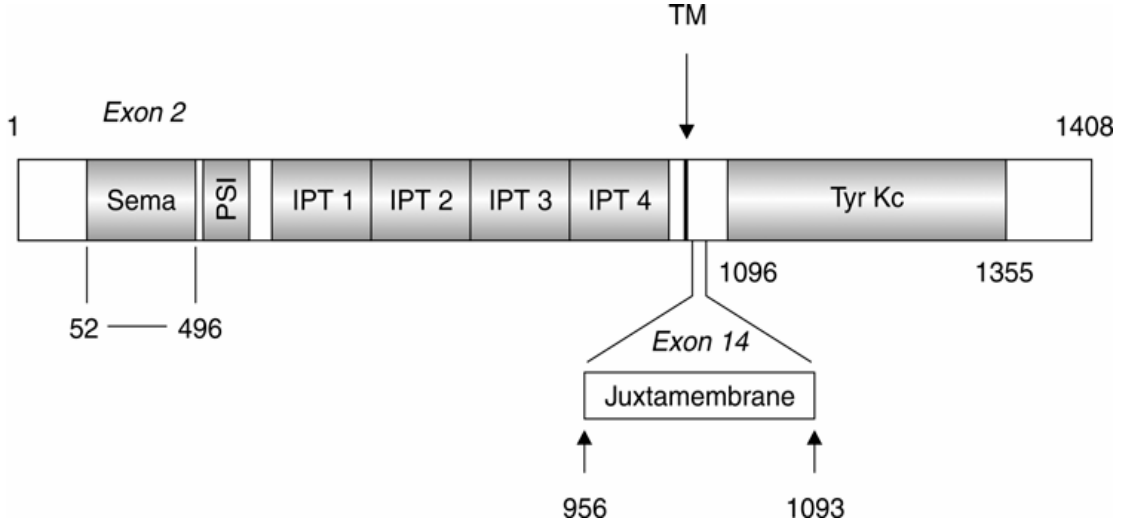
HGF'nin reseptörü c-Met, bir transmembranal protein tirozin kinazdır. Bugüne kadar 75' den fazla tirozin kinaz reseptörü (RTK) saptanmıştır ve bunların çoğu onkogenez ile ilişkilidir. RTK'lar, N-terminali içeren bir ekstrasellüler alan, bir adet transmembranal  $\alpha$  heliks ve tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir adet sitozolik C ucundan oluşur. Bazı RTK'lar protoonkogendir ve reaktif oksijen radikalleri (ROS)' nde değişiklikler, sinyal ileti moleküllerinin aktivasyonu, hücresel proliferasyon, migrasyon ve hücrenin yaşam süresi gibi parametrelerde değişiklikler yaparak, hücrenin çoğalmasına ve metastaza neden olurlar. Bu nedenle RTK'lar, antikanser tedavide, hedef moleküllerden biridir. Protoonkogenik özellik gösteren bazı RTK'lar: c-Kit, Eph, PDGF, Flt3 ve c-Met'tir. c-Met, ilk olarak kimyasal karsinojen (N-metil N'-nitro-N nitrozoguanidin)' e maruz bırakılmış insan ostosarkom hücre hattında (HOS-human osteogenic sarcoma cell line) oluşan kromozomal translokasyonlardan bir füzyon proteini ( Tpr/Met) olarak bulunmuştur. HOS hücre hattında saptanan c-Met protoonkogeni, birinci kromozomda bulunan TPR ( translocated promoter region) lokusunun, 7. kromozomda bulunan c-Met geninin yukarı bölgesine ( up-stream) transloke olması ile ilişkilidir. Tpr/Met füzyon proteini aktif Met kinaz aktivitesine sahiptir ve yapısal olarak fosforillenmiş haldedir. Tpr/Met cDNA'sının izolasyonu sonrasında, c-Met reseptörünün tamamı tanımlanmıştır (6,8).

c-Met, epitelyal hücreler, endotelial hücreler, miyoblastlar, spinal motor nöronlar ve hematopoetik hücreler gibi pek çok hücre türünde eksprese edilmektedir. Disülfid bağıyla bağlı  $\alpha$ - $\beta$  heterodimerik bir RTK'dır. İnsan *Met* (HGF reseptör) geni, 7. kromozomda ( 7q21-q31) lokalize ve 120 kb' dan daha büyük bir genidir. Wild-type hücrelerde, primer Met transkriptleri 150 kDa' luk bir polipeptid yaparlar ve bu ürün kısmen glikozillenerek 170 kDa' luk bir prekürsör proteine dönüştürülür. Bu öncül protein, tekrar glikozillenir ve sonrasında birbirine disülfid bağı ile bağlı, 50 kDa' luk  $\alpha$  zinciri ve 140 kDa' luk  $\beta$  zincirine ayrılır. Matür Met heterodimeri, glikozillenmiş ve tamamı hücre dışında yer alan  $\alpha$  alt-birimi ile büyükçe bir bölümü hücre dışında yer alan ve ayrıca membran ve hücre içi (tirozin kinaz aktivitesi olan) bölümleri de olan  $\beta$  alt-birimlerinden oluşmaktadır ( Şekil 3).



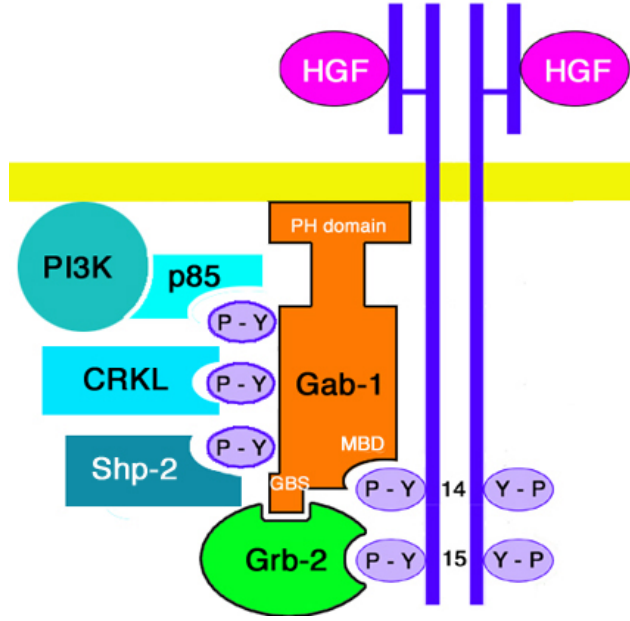
**Şekil 3.** c-Met reseptör proteini bölgeleri ve fosforilasyon yerleri (62).

Normal hücre fonksiyonlarının regülasyonuna ek olarak, c-Met'in pek çok tümörün gelişimi ve progresyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (6-11, 32-35, 63). Özellikle c-Met'in yapısal aktivasyonuna neden olan mutasyonlar üzerinde durulmaktadır. c-Met'i aktive eden mutasyonların çoğu tirozin kinaz bölgesinde bulunmaktadır ve birçok solid tümörde, tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz kapasitelerini arttırdığı bildirilmektedir (8, 33,36). Son yıllarda yapılan çalışmalarda KHDAK 'lerinde jukstamembranal bölgede ve c-Met'in endojen ligandı olan HGF'nin bağlanma yeri olan Sema domaininde somatik mutasyonlar bildirilmiştir (Şekil 4) (37). Bu aktive edici mutasyonların yanı sıra, HGF ve c-Met'in ekspresyonlarındaki artışlar ve gen amplifikasyonları da HGF/ c-Met sinyal ileti yolağının aktivasyonuna ve dolayısıyla, yayılma, angiogenesis, proliferasyon, motilitede artma, invazyon ve metastaza neden olabilmektedir.



**Şekil 4.** c-Met'in mutasyon bildirilen Sema, jukstamembranal ve tirozin kinaz bölgeleri (37)

HGF'nin c-Met'e bağlanması, c-Met'in intrasellüler domainindeki tirozin rezidülerinin fosforillenmesine neden olur. Hücre içi sinyal iletinin daha sonraki basamakları fosfoinozidid 3 kinaz (PI3K) nin p85 subüniti, fosfolipaz C, Shc, Gab1 ve Grb2 sinyal proteinlerinin fosforillenmesi ile devam eder (6-8, 32). c-Met'in intrasellüler bölümünde, Grb-2, SH-IC, Crk/CRKL, CrkII ve Gab-1 gibi pek çok molekül için yanaşma yeri ( Multi-docking site) bulunması, HGF'nin etkilerine aracılık eder (Şekil 5). c-ABL ve ST 1571'in, tirozin kinazı inhibe ederek, HGF/c-Met sinyal ileti yolağını negatif olarak regüle edebileceği ve HGF ile indüklenen motiliteyi engelleyebildiği bildirilmektedir. Bu kinazların stimüle edilmesinin, HGF etkilerinin engellenmesi için önemli rol oynayabileceği bildirilmektedir.



**Şekil 5.** c-Met reseptörünün fosforile tirozin rezidülerine bağlanan hücre içi moleküller (6)

#### 4.4 HGF/c-Met yolu ve Karsinogenezis, İnvazyon ve Metastaz

HGF ve onun reseptörü c-Met'in ekspresyonlarının, akciğer, kolon, meme, akciğer, tiroid, renal karsinoma, melanoma ve çeşitli sarkomlarda arttığı bildirilmiştir (6,8). Genel olarak, HGF, reseptörü c-Met aracılığı ile pek çok kanserin gelişiminde ve ilerlemesinde çeşitli basamaklara katılmaktadır. HGF/SF transgenik farelerde, hem mezenşimal hem de epitelyal orjinli histolojik olarak birbirinden farklı çok sayıda tümörün gelişebildiği bildirilmektedir. Kanser erken basamaklarında rolü olabileceği bildirilmekle birlikte bu konuda güvenilir ve sağlam kanıtlar için halen araştırmalar devam etmektedir. Bununla birlikte bu yolak, daha çok kanserin geç fazlarında özellikle yayılma ve progresyonla ilişkilidir, invazyon ve metastaz süreçlerini direk ve/veya indirek olarak stimüle etmektedir. HGF/SF in tümör progresyonunda rolü olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir. c-Met ekspresyonunun artmış olduğu mide adenokarsinomu, kolorektal kanserler ve pankreatik kanserler gibi pek çok tümör türünde, stromal hücreler tarafından salgılanan HGF/SF'in lokal invazyonu arttırdığı bildirilmektedir (9,10,19,33,35,36).

İnsan sporadik kanserlerinde, metastazlarında ve tümör hücre hatlarında c-Met reseptörünün başta tirozin kinaz domaini olmak üzere pek çok bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır. Herediter papiller renal kanserde gösterilen germ-line c-Met mutasyonu ise, c-

Met'in insanlarda onkogenezis ile ilişkisini gösteren ilk direk kanıt olmuştur (8). Meme kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada HGF/SF'in bazı hücre hatlarında kanser hücrelerinin lokomotif hareketlerini arttırdığını ve bu yanıtların c-Met ekspresyon düzeylerine, hücrelerin diferansiasyon derecelerine ve reseptör sonrası sinyal ileti yollarına bağlı olduğu bildirilmiştir (10).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, metastatik kanserlerde 4 adet Met mutasyonu saptanmıştır. Bunlardan ikisi germ-line mutasyon (H1112R ve Y1248C) dur ve renal hücreli kansere yatkınlık yaratır. Diğer iki mutasyondan biri (N1118Y) glisinden zengin ATP bağlayıcı bölgedeki ( bu bölge tüm kinazlarda oldukça korunmuş bir bölgedir) asparajin de değişiklik sonucu oluşur. Diğerinde ( Y1253D) ise Met kinaz aktivitesini regüle eden kritik bir tirozin de değişiklik vardır. Bu son 2 mutasyondan birini taşıyan Met reseptörü, yapısal olarak aktif ve motil-invazif bir fenotipe sahiptir. Bu bulguların ışığında Met'in primer kanserlerin metastaza ilerlemesini kontrol eden onkogenlerden biri olabileceği bildirilmektedir (36).

#### *İnvazyon ve metastaz*

Tümör hücrelerinin çevresindeki dokulara invazyonu, metastatik progresyonun anahtar olayıdır. Ekstrasellüler matriks (ECM), doku organizasyonun devamlılığın sağlanmasında ve hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonunun baskılanmasında önemli bir yapıdır. Ateroskleroz, romatoid artrit ve kanser gibi pek çok patolojik olayda ECM'in yıkımında artma vardır. Matriks yıkımının, tümör progresyonunda hem lokal invazyon hem de uzak metastazların gelişiminde anahtar rol oynadığı ve bu proseslerin inhibe edilmesinin kanser tedavisinde yararlı olabileceği bildirilmektedir ( 30).

MMP enzim ailesi; 23 den fazla üyesi olan ve pro-domainlerinde konsensus sekansları bulunan ve benzer karakteristiklere sahip bir enzim ailesidir. Kollagenazlar, gelatinazlar, stromelizinler ve membran-tip MMP'ler olarak dört sınıfa ayrılırlar (Tablo 3). MMP'ler inaktif proenzimler olarak salınırlar, daha sonra bir propeptidin koparılması ile  $Zn^{2+}$ -bağlı aktif katalitik domain açığa çıkar. Bu enzimler nötral pH' da aktiftirler.

MMP'lerin, embriyogenezis, doku remodellingi gibi birçok fizyolojik olayda rolü olduğu gibi artrit, kanser, osteoporoz gibi doku yıkımı ile ilişkili patolojik süreçlerde de rolü vardır. Tümör hücre hatlarında, MMP ekspresyonunda artma ile tümör hücrelerinin invazyon kapasitesinde artma arasındaki korelasyon kapsamlı olarak tanımlanmıştır. Birçok in vivo çalışmada malign tümör dokusunda, MMP ekspresyonunun normal dokudakine oranla artmış olduğu bildirilmiştir (20-22, 25, 64).

**Tablo 3.** MMP enzimlerin sinonimleri ve sınıflandırılması

<b>MMP</b>	<b>Enzim adları</b>
MMP-1	İnterstisyel kollagenaz, fibroblast kollagenaz tip I
MMP-2	Gelatinaz A, 72 kD gelatinaz, kollagenaz tip IV
MMP-3	Stromelizin-I, transin
MMP-7	Matrilizin, pump-1
MMP-8	Nötrofil kollagenaz
MMP-9	Gelatinaz B, 92 kD gelatinaz
MMP-10	Stromelizin-2, transin-2
MMP-11	Stromelizin-3
MMP-13	Kollagenaz-3
MMP-14	MTI-MMP, membran tip I MMP

Tümör hücrelerin metastaz süreçlerinde birçok basamak yer almaktadır. Ancak, ECM komponenti olan bazal membranın tümör hücreleri tarafından penetrasyonu ve yıkımı ilk kritik fazdır. MMP'ler içinde özellikle iki tanesi 72 kD luk tip IV kollagenaz (MMP-2) ve 92 kD luk tip IV kollagenaz (MMP-9), bazal membranın başlıca komponenti olan tip IV kollajeni yıkarlar. Fizyolojik olarak fibroblastlar MMP-2, nötrofil ve makrofajlar MMP-9 üretirler. Tümör stroma dokusunun, MMP üretimi için başlıca kaynak olduğu saptanmıştır ve sadece metastatik tümör hücreleri MMP üretebilme yeteneğine sahiptir. MMP-2, MMP-9 ve MT1-MMP'nin özellikle bazal membranı yıkabilme yetenekleri nedeniyle, tümör invazyonu ile ilişkili başlıca MMP'ler oldukları belirlenmiştir (21,22, 27, 65,66). MT1-MMP'in, MMP-2 nin başlıca aktivatörü olduğu ve MT1-MMP de ki artışın, MMP-2 artışına ve dolayısıyla invazif fenotipe neden olduğu bildirilmektedir. Bunun yanısıra, MT1-MMP'in kendisinin intrinsik olarak bazal membranı yıkabilme yeteneği olduğu bildirilmektedir.

Bu enzimler, akciğer, kolon, meme ve prostat gibi pek çok kanserde eksprese edilirler. KHDAK de hem tümör dokusunda hem de stroma da eksprese edilirler, birçok çalışmada tümör dokusundaki MMP-9 ekspresyonlarının, MMP-2' den daha düşük olduğu bildirilmektedir (65,66). Bu proteinlerin tümör dokusunda belirlenmesi kadar serum düzeylerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır. Özellikle serum düzeylerinin, kanserin erken tanısında kullanılabileceği hipotezleri kurulmaktadır. MMP-2 ve/veya MMP-9 serum düzeylerinin mide, kolon, meme ve prostat kanserlerinde arttığı bildirilmektedir.

Akciğer kanserli hastalarda serum MMP düzeyleri ile ilgili olarak farklı sonuçlar bulunmaktadır.

KHDAK'lerinde MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11 ve MMP14 ekspresyonları bildirilmiştir (20-22). Bunların KHDAK lerinde histopatolojik ve klinik bulgularla korele oldukları bildirilmektedir. MMP-2 nin ekspresyon artışının nodal invazyon, MMP-11 'in tümör boyutu ve nodal metastaz, MMP-14 ün ileri evre ile ilişkili oldukları bildiren çalışmalar bulunmaktadır (21,22). Bu MMP'lerin klinikopatolojik bulgular ile korelasyonu olmadığını bildiren veya klinikopatolojik bulgular ile farklı MMP'ler arasında ilişki saptayan çalışmalar da literatürde yer almaktadır (20, 66-68). Thomas ve ark, KHDAK'lerinde bütün MMP' lerin eksprese edildiklerini ancak bunların ekspresyon ve güçlü ekspresyonlarının birbirinden farklı olduğunu bildirmişlerdir (20).

ECM homeostazı, MMP' ler ile bunların spesifik inhibitörleri olan MMP doku inhibitörleri (TIMP) arasındaki denge ile sağlanmaktadır. TIMP'ler, MMP lerin proteolitik aktivitelerini inhibe eden ve tümör invazyon ve metastazında rolü olan bir enzim ailesidir. Ayrıca TIMP' ler, olasılıkla apoptozisi önleyerek hücre proliferasyonunu stimüle edebilirler. Bu enzim ailesi dört üyeden oluşmaktadır: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4.

TIMP'ler, MMP'lere 1:1 molar oranda bağlanırlar ve onları spesifik olarak inhibe ederler. TIMP-1, 28.5 kD ağırlığında bir glikoproteindir ve birçok hücre tarafından üretilir, doku ekstraktlarında ve vücut sıvılarında bulunur. İn vitro ve in vivo deneysel çalışmalarda TIMP-1 ekspresyonu ile metastatik potansiyel arasında ters ilişki gösterilmiştir. Ancak son zamanlarda TIMP'lerin multifonksiyonel oldukları ve paradoksik olarak tümör progresyonunu arttırdıkları bildirilmektedir. TIMP-1 ve TIMP-2'nin MMP inhibitör etkilerinden ayrı olarak büyüme faktörü benzeri etkileri yapı-fonksiyon çalışmaları ile gösterilmiştir. TIMP-1'in ayrıca antiapoptotik etkisi de gösterilmiştir. Kolorektal, meme kanseri ve KHDAK lerin bazı alt tiplerinde TIMP-1 ekspresyonundaki artış ile tümörün daha agresif yapı kazanması arasındaki ilişki gösterilmiştir (23,24,26,27). Mori ve arkadaşları (2000), özefagus skuamöz hücreli kanserlerinde, TIMP-1'in mRNA ve protein ekspresyonlarına bakmışlar ve TIMP-1 ekspresyonunun yüksek dereceli malignite ile korele ve bağımsız bir prognostik faktör olduğunu bildirmişlerdir (25).

TIMP-3, 24 kD ağırlığında ve ECM'in komponenti olan bir enzimdir. Kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği, tümörün büyümesini ve anjiogenezi baskıladığı bildirilmektedir. Kolon, özefagus, meme, prostat ve akciğer kanserlerinde TIMP-3 ekspresyonu ve klinik önemi bildirilmiştir. Kolon kanserinde TIMP-3 ekspresyonundaki bölgesel kaybın, tümörün invazyonu arttırdığı özefagus kanserinde TIMP-3 ekspresyonundaki



azalmanın invazyon, evre ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (28-30). Ayrıca yüksek TIMP-3 ekspresyonu olan meme kanserli olguların, düşük ekspresyon gösteren olgulardan hastalıksız sağkalım sürelerinin daha uzun olduğu bildirilmektedir. Azalmış TIMP-3 ekspresyonlarının malign tümörlerde daha agresif davranışa neden olduğu deneysel çalışmalar ile de gösterilmiştir (69, 70).

TIMP-3 ekspresyonunda artmanın sağlanmasının yeni bir kanser tedavi modelini oluşturulabileceği bildirilmektedir. MMP inhibitörlerinin geliştirildiği ve bunların yeni araştırma ilacı olarak denendiği (71), ancak MMP inhibitörlerinin tek başına kullanılmasından ziyade MMP inhibitörlerinin TIMP-3 artışına neden olacak ajanlar ile kombinasyonunun daha etkili olabileceğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (30). Bachman ve ark (1999), birçok insan kanser hücre hattında TIMP-3 geninin 5'CpG adacıklarında yoğun bir şekilde metilasyon olduğunu ve bunun da TIMP-3 ekspresyonunun da kayba neden olduğunu saptamışlardır. TIMP-3'ün hipermetilasyonu, böbrek, beyin, kolon, meme ve akciğer kanseri gibi kanserlerde gösterilmiştir (28). Hücre kültürü modellerinde HGF uyarımının TIMP-3 ekspresyonunu artırdığı, TIMP-3 overeksprese edilen hücrelerde hücre proliferasyonunun azaldığı, hücrelerin epitelyal bir fenotip kazandığı gösterilmiştir. TIMP-3 bloklanması ise hücre proliferasyonunu, tutunmadan bağımsız büyümeyi ve hücre invazyonunu artırmaktadır (31).

Hücre yüzeyi ile ilişkili proteinazlar ve bunların inhibitörleri arasındaki dengenin bozulması (artmış MMP düzeyleri ve azalmış TIMP düzeyleri gibi) nın tümörün yayılmasını arttırması beklenmektedir. Ancak, bazı TIMP lerin büyüme faktörü gibi hareket ettiği de görülmektedir. TIMP-1 ve TIMP-2, eritroid hücrelerin proliferasyonunu potansiyalize eder ve hücrelerin çoğunda büyümeyi hızlandırıcı etkileri vardır. TIMP-3'ün ise tümör büyümesi ve angiogenezisi suprese ettiği bildirilmektedir.

### **RhoA**

Rho GTPazlar, hücre iskeletinin farklı komponentlerini etkileyerek hücre migrasyonunu regüle eden küçük molekül ras onkogenik proteinlerindedir. Hücrelerin migrasyonunu, olasılıkla hücre-substrat adezyonu ve matriksin remodelling'i gibi hücre iskeletinin çeşitli komponentlerini etkileyerek düzenlerler (72,73). Rho'ların bazı kanserlerde ekspresyonunun anormal biçimde arttığı ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (74,75). Rho'lar ve onların efektör molekülü raf'in, HGF ile indüklenen hücre migrasyonunda rol oynayan sinyal ileti molekülleri olduğu bildirilmektedir (10,76, 77).

Rho alt familyası, Cdc42, Rac ve RhoA' dan oluşan küçük GTPaz'lardır. Aktin hücre iskeletinin organizasyonunu, hücre motilitesini ve sonrasında da kanser hücrelerinin

invazyonunu modüle ederler. Cdc42'nin aktivasyonu ile birlikte RhoA'nın inaktivasyonu filodopia ile sonuçlanırken, Rac'ın aktivasyonu lamellipodia ile, RhoA'nın aktivasyonu fokal adezyon ve stres fiberleri ile sonuçlanır ve ECM'e güçlü adezyon ve hücre-hücre temasının sürekliliğini sağlar. Bu nedenle, RhoA'nın Cdc42 ve Rac ile uyumlu regülasyonu, hücre migrasyonunda çok önemli bir olaydır. Migrasyon için RhoA'nın aktivasyonu gereklidir ancak artmış RhoA aktivasyonu migrasyonu inhibe edebilir. Rho'lar sadece aktin hücre iskeletinin kontrolünde değil, sitokinezis ( mitoz sonrası hücrenin bölünmesi), SSS'de nöronların gelişimi ve düz kas kasılmasında da rol oynarlar (10,76,77). Rho ailesi üyeleri, MAPK sinyal ileti yolağını aktive ederek, gen ekspresyonlarını da regüle edebilirler. Rho'ların efektör molekülü bir serin-threonin kinaz olan Rho kinaz (ROCK) dir. ROCK'ın aktivasyonu, birçok hücre iskeleti proteinlerinin fosforilasyonuna neden olarak, stres fiberleri oluşumunu ve ECM'e adezyonu stimüle eder (73-75).

#### **4.5 HGF/c-Met yolağı ve KHDAK**

Akciğer kanserlerinde, c-Met ekspresyonlarının arttığı bildirilmektedir. Bu kanserlerin invazyon ve metastaz süreçlerinde HGF/c-Met sinyal ileti yolağının yapısal aktivasyonunun ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda akciğer kanserlerinde c-Met reseptörünün tirozin kinaz domaininde, sema domainde ve jukstamembranal domainde somatik mutasyonlar saptanmıştır (13,39,42,43). Ancak bu mutasyonların tümörün progresyonu ve invazyon kapasitesi ile ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır.

To ve arkadaşları(78), KHDAK hücre hatlarında yaptıkları bir çalışmada, Met reseptörünün adenokanser ve skuamöz hücreli kanser subtiplerinde farklı eksprese edildiğini saptamışlardır. Primer adenokanserlerin 2/3' ünde ve adenokanser hücre hatlarının çoğunda c-Met ekspresyonunun artmış olduğu ve AK dışı subtiplerde ekspresyon artışının daha az gözlendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca NCI-H1264 akciğer kanseri hücre hatlarında, Met reseptör ekspresyonundaki artmanın AK'de onkogenik etkisi olduğu, diğer subtiplerde özellikle SHK' de ise tümör supresif etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bunun da sinyal ileti yolakları ile açıklanabileceğini bildirmişlerdir (78).

HGF ve c-Met 'in KHDAK dahil pek çok kanserde ekspresyonunun arttığı ve tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz kapasitelerini arttırdığı bildirilmektedir (10,32,33). HGF ve c-Met' in overekspresyonunun tümörün histolojik tipi ile korele olduğu ve daha çok AK'de görüldüğü bildirilmektedir (34,78, 79).

#### **4.6 Kanser tedavisinde farmakolojik hedef olarak c-Met ve diğer tirozin kinaz reseptörlerinin yeri ve önemi**

Bugüne kadar 75' den fazla tirozin kinaz reseptörü (RTK) saptanmıştır ve bunların çoğu onkogenezis ile ilişkilidir. Bazı RTK'lar protoonkogendir ve reaktif oksijen radikalleri (ROS) nde değişiklikler, sinyal ileti moleküllerinin aktivasyonu, hücresel proliferasyon, migrasyon ve hücrenin yaşam süresi gibi parametrelerde değişiklikler yaparak, hücrenin çoğalmasına ve metastaza neden olurlar. Bu nedenle RTK'lar, antikanser tedavide, hedef moleküllerden biridir. Protoonkogenik özellik gösteren bazı RTK'lar: c-Kit, Eph, PDGF, Flt3 ve c-Met'tir. Bir c-Met inhibitörü olan PHA-665752'nin, K-ras mutasyonu olan farelerde, akciğerlerdeki tümörigenezisi inhibe ettiği bildirilmiştir (80). c-Met' e hedeflenmiş ajanların pek çoğu halen prelinik çalışmalarda denenmekte, bir kısmı da Faz I klinik çalışmalara geçmiştir. İleride pek çok kanserde, sitotoksik yanıt elde etmek için, HGF/c-Met inhibitörleri ile kombine edilmiş tedavi modalitelerinin kullanılabilirliği bildirilmektedir.

Her2 ekspresyonu artmış meme kanseri hücrelerinde, c-Met'in sıklıkla eksprese olduğu ve trastuzumab (Her 2- monoklonal antikor) a karşı gelişen dirence katkıda bulunduğu bildirilmektedir (77). Bu hastalarda Her2 ve c-Met antikorların birlikte kombine kullanılmasının tedaviye direnci önleyebileceği bildirilmektedir (77).

NK1, HGF/SF'in N terminal ucunu (N) ve birinci kringle domainini (K1) içeren bir alternatif splice varyantıdır ve parsiyel agonisttir. Bazı NK1 varyantlarının gerçek bir antagonist gibi davrandığı ve hücre migrasyonunu ve hedef hücrelerdeki DNA sentezini inhibe ettikleri ve kanser tedavisinde olasılıkla terapötik değerlerinin olabileceği bildirilmektedir (81).

Kolorektal kanserlerde RTK aktivitesinin tümör büyümesi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Ek olarak, COX-2 ekspresyonunun tümör büyümesi ve invazyona katkısı olduğu ve c-Met inhibitörleri ile birlikte, COX-2 inhibitörü selekoksibin birlikte kullanılmasının kolorektal kanserli hastalarda kullanılabilirliği bildirilmektedir (12).

c-Met sinyal yolağını bloklayan inhibitörlerin kullanımının özellikle tümör anjiogenezinin, tümör invazyon ve metastazının bloklanmasında önemli olduğunu , bazı moleküllerin faz 2 ve 3 çalışmalarının sürmekte olduğu bildirilmiştir (12). Bu da farklı kanserlerde HGF/c-Met yolağının ve bu yolda rol alan moleküllerin belirlenmesini daha da önemli hale getirmektedir.

## **5. GEREK VE YÖNTEMLER**

Bu çalışmada; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji arşivinden sağlanan 63 NSCLC olgusuna ait doku örneklerinde, HGF ve c-Met ekspresyonu immünohistokimyasal olarak araştırıldı. Aynı dokulardan alınan kesitlerden elde edilen genomik DNA' lar, c-Met reseptörünün transmembranal (ekzon 13), jukstamembranal (ekzon 14) ve sitoplazmik bölgelerini (15-21.ekzonlar) kodlayan tüm ekzonlara özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile amplifiye edildi ve bu bölgelerin DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Ayrıca HGF/c-Met yolağı aktivasyonu ile düzenlendiği düşünülen matriks metalloproteinaz proteinleri ( MMP-2 ve MMP-9) ile metalloproteinaz doku inhibitörleri ( TIMP-1 ve TIMP- 3) ve RhoA' nın ekspresyonları immünohistokimyasal olarak araştırıldı.

Olgulara ait Hematoksilen-Eosin boyalı preparatlar tekrar değerlendirilerek, histolojik sınıflandırılmaları Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, evrelendirilmeleri (veya TNM sınıflandırılmaları ) Uluslararası Kanser Birliği'nin (UICC) beşinci düzenlemesine göre yapıldı. Hastalara ait klinik bulgular, Onkoloji Anabilim Dalı'nın hasta dosyalarından elde edildi.

Her olgu için tümörü en iyi örnekleyen dokuya ait; % 10'luk formalinde fikse, parafine gömülü bloklar seçildi. Secilen bloklardan hazırlanan, 5 mikron kalınlıkta kesitler poly-L-lysin ile kaplı lamlara alınarak immünohistokimyasal boyama için oda ısısında bekletildi.

### **5.1 İmmünohistokimyasal Boyama**

İmmünoboyama; peroksidaz ile işaretlenmiş, streptavidin-biotin yöntemi kullanılarak yapıldı. Uygulamada şu aşamalar izlendi:

1. Polilizinli kesitler ksilolde 20 dk. bekletilerek deparafinize edildi.
2. Daha sonra % 96'luk alkolden başlayarak %70'lik alkole dek alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi.
3. Kesitlerin çevresi sınırlayıcı kalem ile çerçeve içine alındı ve kesitler önceden hazırlanan, pH'sı 7.2 olan Tris solüsyonunda 5 dk. yıkandı.
4. Kesitlere; %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılarak 15 dk bekletildi. Bu uygulama ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi.
5. Kesitler 5 dk. tris solüsyonu ile yıkandıktan sonra; tris solüsyonu dolu özel kaplara yerleştirildi. Daha sonra lamlar, mikrodalga fırında üç kez 5'er dk süre ile kaynatıldı\*. Böylece antijenin açığa çıkarılması sağlandı (c-Met IHK'da ise bu basamakta

kaynatma işlemi yerine proteinaz K kullanıldı. Bu amaçla, her bir lamın üzerine 100 µL proteinaz K konup etüvde (37 °C de) 20 dk beklendi. (Tablo 3).

6. Kaynatmadan sonra kesitler, oda ısısında soğumaya bırakıldı.
7. Kesitler tris solüsyonu ile yıkandıktan sonra; primer antikorlar ile 30-40 dk süre ile inkübe edildi.
8. Tris solüsyonu ile 5 dk yıkanarak bağlanmamış antikorların uzaklaşması sağlandı.
9. Kesitlere biyotine bağlı sekonder antikordan damlatılarak 10 dk bekletildi.
10. Kesitler 5 dk tris solüsyonu ile yıkandı.
11. Kesitlere streptavidin peroksidaz solüsyonu damlatılarak 10 dk bekletildi.
12. Kesitler 5 dk tris solüsyonu ile yıkandı.
13. Antijen-antikor bağlanmasını göstermek için önceden hazırlanan 3, 3' Diaminobenzidin tetrahidroklorür (DAB)/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak, kahverengi renklenme gözlenene dek beklendi (5-7 dk) ve daha sonra çeşme suyunda yıkandı.
14. Kesitlere Mayer's hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
15. Çeşme suyunda yıkanan kesitler, % 70'lik etil alkolden % 96'lık alkole kadar alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra, saydamlaşma sağlamak amacıyla 10 dk ksilolde bekletildi ve entelan ile kapatıldı.

\*IHK sırasında antijen açığa çıkarmak için kullanılan kaynatma metodları ve kullanılan antikorlar tablo 3'de verilmiştir.

**Proteinaz K hazırlanması:** 1/500 dilüsyonda PBS içinde hazırlanıyor. 10 mg/mL' lik stoktan 20 µL alınarak, PBS ile 10 mL' ye tamamlanıyor ve bu solüsyondan 100 µL, her bir lama konuyor.

**Tablo 4. IHK sırasında kullanılan antikorlar ve kaynatma metodları**

	<b>Ticari marka</b>	<b>Katalog no</b>	<b>Primer Antikor</b>	<b>Dilüsyon oranları</b>	<b>Antijen retrieval</b>
<b>HGF-<math>\beta</math></b>	Santa-Cruz	(H-170) sc-13087	Rabbit PAb	1/50	Sitrat (pH 6) kaynatma 98 °C
<b>c-Met</b>	Santa-Cruz	C-28, sc 161	Rabbit PAb	1/300	Proteinaz-K 37 °C
<b>RhoA</b>	Santa-Cruz	Rho A (26C4): sc-418	Mouse MAb	1/100	Sitrat (pH 6) kaynatma 98 °C
<b>MMP-2</b>	Neomarker	MS-806-P	Mouse MAb	predilüe	Sitrat (pH 6) kaynatma 98 °C
<b>MMP-9</b>	Santa-Cruz	Sc-21733	Mouse MAb	1/20	EDTA (pH 8) kaynatma 98 °C
<b>TIMP-1</b>	Neomarker	RB-9204-R7	N-terminal spesifik rabbit Ab	1/80	Sitrat (pH 6) kaynatma 98 °C
<b>TIMP-3</b>	Neomarker	RB-9253-P	Rabbit PAb	1/20	Sitrat (pH 6) kaynatma 98 °C

## 5.2 İmmunreaktivitenin Değerlendirilmesi

İmmunhistokimyasal skorlama için boyanma gösteren alanlar randomize seçilerek değerlendirildi. HGF, c-Met, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA proteinleri için immunreaktivitenin değerlendirilmesi sitoplazmik boyanma üzerinden yapıldı ve boyanmanın dağılımı (D) ve yoğunluğu (Y) semikantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre tümör hücrelerinde; dağılım %0-25 arası sayıda hücresele pozitiflik (1 puan), % 26-50 arası sayıda hücresele pozitiflik (2 puan), % 51-75 arası sayıda hücresele pozitiflik (3 puan), % 76-100 arası sayıda hücresele pozitiflik (4 puan) olarak derecelendirildi. Yoğunluğu da çok zayıf (1 puan), zayıf (2 puan), orta (3 puan) ve yoğun (4 puan) olarak derecelendirildi. YxD formülüne göre 4 ve 4'ün altındaki skora sahip olanlar zayıf boyanma, 4'ün üzerindeki boyanmalar ise güçlü boyanma olarak değerlendirildi. Boyanmanın hiç olmaması 0 (negatif) olarak skorlandı.

### 5.3 Total Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA'lar, parafine gömülü KHDAK tümör dokularının 7+7  $\mu$ 'luk kesitlerinden QIAamp DNA Mini Kit (Tablo 4, Katalog no: 51306, Qiagen, Valencia, CA, USA) kullanılarak izole edildi. Uygulamada şu aşamalar izlendi:

1. Parafin kesitleri içeren 1.5 mL'li mikrosantrifüj tüpleri, su banyosunda 56 °C de homojenize edildi.
2. Su banyosundan çıkarılan tüpler, vortekste spin edildikten sonra, her bir tübün içine 180  $\mu$ L Buffer ATL eklendi.
3. Üzerine 20  $\mu$ L Proteinaz K eklendi ve vortekste karıştırıldı. Su banyosunda 56 °C de, dokuların tamamı lizis olana kadar (arada vorteksleyerek) inkübe edildi.
4. Su banyosundan çıkarılan tüpler, kapaklarda kalan sıvının aşağı inmesi için kısa süreli santrifüje edildi. Üzerine 200  $\mu$ L Buffer AL eklendi ve 15 sn süreyle aralıklı olarak vortekslendi.
5. Su banyosunda 70 °C de, 10 dak. inkübe edildikten sonra kısa süreli santrifüj yapıldı.
6. Örnekler 200  $\mu$ L % 96-100'lük etanolden eklendi ve 15 sn süreyle aralıklı olarak vortekslendi. Kısa süreli santrifüj ile kapaklarda kalan sıvının aşağı inmesi sağlandı.
7. Elde edilen mikstür, 2 mL'lik toplama tüplerinin içine yerleştirilen QIAamp spin kolonlarına dikkatlice aktarıldı. Kapakları kapatılıp, 6000xg (8000 rpm)'de 1 dak. santrifüj edildi.
8. Filtrat içeren toplama tüpleri atılarak, spin kolonları, yeni ve temiz 2 mL'lik toplama tüplerinin içine alındı. Üzerlerine 500  $\mu$ L yıkama tamponu 1 (Buffer AW1) eklendi ve 6000xg (8000rpm)'de 1 dak. santrifüj edildi.
9. Filtrat içeren toplama tüpleri atılarak, spin kolonları, yeni ve temiz 2 mL'lik toplama tüplerinin içine alındı. Üzerlerine 500  $\mu$ L yıkama tamponu 2 (Buffer AW2) eklendi ve 20,000xg (14,000 rpm)'de 3 dak. santrifüj edildi.
10. Filtrat içeren toplama tüpleri atılarak, spin kolonları, yeni ve temiz 2 mL'lik toplama tüplerinin içine alındı ve yıkama tamponu 2 (Buffer AW2)'yi uzaklaştırmak için 20,000xg (14,000 rpm)'de 1 dak. santrifüj edildi.
11. Filtrat içeren toplama tüpleri atılarak, spin kolonları, yeni ve temiz 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerinin içine alındı ve 100  $\mu$ L Buffer AE eklendi ve oda sıcaklığında 1 dak. inkübe edildikten sonra 6000xg (8000rpm)'de 1 dak. santrifüj edildi.
12. Onbirinci basamakta yapılan işlemler bir kez daha tekrarlandı.

**Tablo 4.** Genomik DNA eldesinde kullanılan kit ve içerikleri

<b>QIAamp DNA Mini Kit</b>		
<b>Katalog no</b>	<b>51304</b>	<b>51306</b>
Preparat sayısı	50	250
QIAamp Spin kolonları	50	250
Toplama tüpleri (2 mL)	150	750
Buffer AL	12 mL	54 mL
Buffer ATL	10 mL	50 mL
Buffer AW1 (Konsantre)	19 mL	95 mL
Buffer AW2 (Konsantre)	13 mL	66 mL
Proteinaz K	1.25 mL	6 mL

#### **5.4 Total Genomik DNA İzolasyonu Sonrası Örneklerin Spektrofotometrik Analizi**

İzolasyon sonrası DNA'ların varlığı ve kalitesi % 0.7'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, elde edilen genomik DNA (gDNA) örneklerinden miktar tayini (1) ve saflık derecesi (2) spektrofotometrede ( Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) 260 ve 280 nm absorbans değerlerinde ölçülerek, aşağıdaki formüllerden yararlanılarak saptandı.

$$\mu\text{g/mL gDNA} = A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü} (100) \times 50 \mu\text{g/mL}^* \quad (1)$$

$$\text{gDNA saflık derecesi} = A_{260} / A_{280} \quad (2)$$

Bütün dilüsyonlar ve kalibrasyonlar, steril distile su ile gerçekleştirildi.

\* 260 nm deki bir birim absorbans değeri, yaklaşık olarak 50  $\mu\text{g gDNA /mL}$ ' ye eşittir.



## 5.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

c-Met'in transmembranal (ekzon 13), jukstamembranal (ekzon 14) ve tirozin kinaz bölgelerinde (ekzon15-21), DNA düzeyinde meydana gelen değişimlerin incelenmesinde PCR yöntemi kullanıldı. İleri ve geri primerler internetteki Primer3 programı ile tasarlandı, dizilerin yerleşimi NCBI BLAST programı kullanılarak kontrol edildi. PCR çalışmaları sıcaklık döngü düzenleyicisinde (TC-412, Thermal cyclers) gerçekleştirildi.

**PCR profili 1:** 5 µL 10X PCR Buffer (Sigma P-2192), her bir nükleotidden 10 mM içeren dNTP karışımından 1.25 µL (katalog no: R0192, MBI Fermentas GmbH, St-Leon-Rot, Germany), 3 veya 5 µL 25mM'lık MgCl<sub>2</sub>, ileri ve geri primerlerinden 5'er pmol (her birinden 2.5 µL) içeren karışıma 2 µL gDNA eklendi ve dH<sub>2</sub>O ile 45 µL'ye tamamlandı. Amplifikasyon için reaksiyon karışımı 94<sup>0</sup>C' de 5 dak. ilk denatürasyonun ardından her bir PCR tübünün içine 5 µl dilüe (10XPCR buffer ile 1:10 oranında dilüe edildi) Taq polimeraz (katalog no: EP0281, MBI Fermentas GmbH, St-Leon-Rot, Germany) enzimi eklendi (hot start) ve PCR reaksiyonu son hacim 50 µL üzerinden gerçekleşti. Daha sonra, 94<sup>0</sup>C'de 30 sn, 65-58<sup>0</sup>C'de 30 sn (ilk 14 döngüde, her bir döngüde sıcaklık 0.5 <sup>0</sup>C azalacak şekilde 65 <sup>0</sup>C'den 58<sup>0</sup>C' ye düşürüldü, sonraki döngülerde 58<sup>0</sup>C olarak devam etti) ve 72<sup>0</sup>C'de 45 sn'den oluşan 35 döngü sonrasında 72<sup>0</sup>C'de 7dk son uzamaya tabi tutuldu. Bu PCR profili, 13, 14, 17,18'inci eksonların 20-21' inci eksonun birinci ve ikinci bölümlerinin amplifiye edilmesinde kullanıldı.

**PCR profili 2:** 5 µL 10X PCR Buffer (Sigma P-2192), her bir nükleotidden 10 mM içeren dNTP karışımından 1.25 µL (MBI Fermentas), 3 veya 6 µL 25mM'lık MgCl<sub>2</sub>, ileri ve geri primerlerinden 5'er pmol (her birinden 2.5 µL) içeren karışıma 2 µL gDNA eklendi ve dH<sub>2</sub>O ile 45 µL'ye tamamlandı. Amplifikasyon için reaksiyon karışımı 94<sup>0</sup>C' de 5 dak. ilk denatürasyonun ardından her bir PCR tübünün içine 5 µl dilüe (10XPCR buffer ile 1:10 oranında dilüe edildi) Taq polimeraz (MBI Fermentas) enzimi eklendi (hot start) ve PCR reaksiyonu son hacim 50 µL üzerinden gerçekleşti. Daha sonra, 94<sup>0</sup>C'de 30 sn, 45<sup>0</sup>C'de 30 sn ve 72<sup>0</sup>C'de 45 sn'den oluşan 35 döngü sonrasında 72<sup>0</sup>C'de 7dk son uzamaya tabi tutuldu. Bu PCR profili, 15, 16 ve 19' uncu ekzon bölümlerinin amplifiye edilmesinde kullanıldı.

**PCR profili 3:** 5 µL 10X PCR Buffer (Sigma P-2192), her bir nükleotidden 10 mM içeren dNTP karışımından 1.25 µL (MBI Fermentas), 6 µL 25mM'lık MgCl<sub>2</sub>, ileri ve geri

primerlerlerden 5'er pmol (her birinden 2.5 µL) içeren karışıma 2 µL gDNA eklendi ve dH<sub>2</sub>O ile 45 µL'ye tamamlandı. Amplifikasyon için reaksiyon karışımı 94<sup>0</sup>C' de 5 dak. ilk denatürasyonun ardından her bir PCR tübünün içine 5 µl dilüe (10XPCR buffer ile 1:10 oranında dilüe edildi) Taq polimeraz (MBI Fermentas) enzimi eklendi (hot start) ve PCR reaksiyonu son hacim 50 µL üzerinden gerçekleşti. Daha sonra, 94<sup>0</sup>C'de 30 sn, 43<sup>0</sup>C'de 30 sn ve 72<sup>0</sup>C'de 45 sn'den oluşan 33 döngü sonrasında 72<sup>0</sup>C'de 7dk son uzamaya tabi tutuldu. Bu PCR profili, 20-21' inci ekzonun üçüncü bölümünün amplifiye edilmesinde kullanıldı.

Kullanılan primer sekansları, PCR ürünlerinin büyüklükleri ve PCR profilleri Tablo 5'de tanımlanmaktadır.

**Tablo 6.** c-Met'in PCR ile amplifiye edilen ekzonlarına ait primer sekansları, PCR koşulları and PCR ürünlerinin büyüklükleri

c-Met Ekzonları	Sekans ( 5' → 3')	PCR ürünü Boyut (bç)	PCR profilleri		
			Mg <sup>++</sup> (mM)	Annealing (°C)	Döngü sayısı
Ekzon 13	GGACCCAAAGTGCTACAACC GCACACAAGAATCGACGACA	322	2.5	65-58	35
Ekzon 14	GCCCATGATAGCCGTCTTTA CAACAATGTCACAACCCACTG	256	1.5	65-58	35
Ekzon 15	TTCCTGTTTCAGTCCCCATTA CACTGCTCTGTCAGTTGCTT	375	3.0	45	35
Ekzon 16	TGAAGCTCATAAAGGGTTTGA AGGTTGCAAACCACAAAAGT	214	1.5	45	35
Ekzon17	ATGCTAACTGTGTGGTTTACC ATGGCTGGCTTACAGCTAGTT	269	2.5	65-58	35
Ekzon 18	GGCTTGAGCCATTAAGACCA GCATTGAACAGTGGGAAACA	276	1.5	65-58	35
Ekzon19	TCTATTTTCAGCCACGGGTAAT AGGAGAACTAGAGATAACC	379	3.0	45	35
Ekzon 20-21 (1)	TGCCCAAACAGAAACCGTATTGA GACCCTTTGAAGGCAGGCATT	326	1.5	65-58	35
Ekzon 20-21 (2)	GGGAGAAGACTCCTACAACCCGAATA GTGTGGACTGTTGCTTTGACATAG	405	2.5	65-58	35
Ekzon 20-21 (3)	TCCTTCTCTGTTGTCATCAGAAGAT CTGTGATCAAGAAGCCCTCAAT	423	3.0	43	33

PCR reaksiyonu ile elde edilen ürünler %1,5 agaroz jel elektroforezinde, 80V akım altında, yaklaşık 1 saat yürütüldükten sonra görüntülendi ( Eagle Eye II, Stratagene). Bant kalınlıkları, 100 bç'lik DNA marker (MBI Fermentas, Catalog No. SMO243, 100-bp DNA ladder) ile karşılaştırıldı. Huh7 insan hepatoma hücrelerinden elde edilen DNA'lar veya periferik kan genomik DNA'larından aynı primer çiftleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. PCR reaksiyon tüpleri içine genomik DNA (kalıp) konmadan elde edilen PCR ürünleri negatif kontrol olarak kullanıldı.

### **5.6 PCR Sonrası DNA Dizi Analizi**

Dizi analizleri, Dye Terminator Cycle Sequencing Kit ( Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ile, ABI-377 DNA sequencer (Perkin Elmer Corp., Waltham, MA, USA) cihazında Macrogen firması (Güney Kore) tarafından gerçekleştirilmiştir. Dizi analizleri, her iki yönde yapılmıştır ve bu amaçla PCR amplifikasyonunda kullanılan ileri ve geri primerler kullanılmıştır.

### **5.7 DNA Dizi Verilerinin Blast Analizi**

Sekanslar arasındaki homoloji, National Center for Biotechnology Information (National Institute of Health) BLAST network service kullanılarak değerlendirildi. Sekanslar, referans sekanslar ile Multalin version 5.4.1 software programı kullanılarak karşılaştırıldı (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>).

### **5.8 İstatistiksel Analiz**

Elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizleri, SPSS 10.0 for Windows programında yapıldı. İmmunhistokimya verileri ve moleküler veriler ile klinik ve patolojik veriler arasındaki ilişki analizleri için ki-kare testi uygulandı. İmmunhistokimya verileri ve moleküler veriler ile yaş ve cinsiyet arasındaki ilişki Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Sağkalım analizleri için Kaplan Meier testi uygulandı ve karşılaştırmalar için log rank analizi yapıldı. Sağkalım analizleri için başlangıç olarak hastaların operasyon tarihleri alındı. İstatistiksel anlamlılık için p değerinin 0.05'den küçük olması gözetildi.

## **6.BULGULAR**

### 6.1 Hastaların Demografik Bilgileri

Toplam 63 KHDAK'li olgunun değerlendirildiği çalışmada olguların 56'sı erkek (%88.9), 7'si kadın olup (%11.1), yaş ortalaması 58.2± 9.9 idi. Onbir olgu (%17.5) evre I, 26 olgu (% 41.3) evre II, 16 olgu (%25.4) evre IIIA, 7 olgu (% 11.1) evre IIIB ve 3 olgu (% 4.8) evre IV idi. Olguların % 15.8'i (n=10) ileri evre (evre IIIB + evre IV) idi. Histolojik alt tiplerine göre değerlendirildiğinde; 31olgu (%49.2) skuamöz hücreli, 27 olgu (% 42.9) adenokarsinom, 2 olgu (%3.2) adenoskuamöz ve 3 olgu (% 4.8) büyük hücreli karsinom idi. Hastaların demografik bilgileri, Tablo 7 'de gösterilmiştir.

### 6.2 IHK sonuçları

Tüm olgularda c-Met için pozitif immun boyanma oranı % 100 (62/62 olgu, 1 olgu değerlendirilemedi ) idi. Bu olguların 12 'sinde (19%) zayıf, 50'sinde (81%) güçlü pozitif boyanma saptandı. HGF için pozitif immun boyanma oranı % 95 (58/61) iken, güçlü pozitif boyanma oranı % 48 (29/61) idi (Tablo 8, Şekil 6 ve 7). Histolojik alt tiplere göre dağılımlarına bakıldığında; c-Met ve HGF 'nin SHK'de sırasıyla, % 90 (27/30 olgu) ve % 42 (13/31) oranında güçlü pozitif boyandığı gözlenirken, AK'de bu oranın c-Met için % 78 (21/27), HGF için % 58 (15/26) olduğu gözlemlendi. İki adenoskuamöz ve üç büyük hücreli kanserden oluşan üçüncü grupta ise, bu oranlar c-Met ve HGF için sırasıyla % 40 (2/5) ve % 25(1/4) olarak gözlemlendi. c-Met ekspresyonundaki artışın, SHK'de, AK'e oranla istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu saptandı (p=0.045, Tablo 9). c-Met ve HGF'nin koekspresyonu (her ikisinin de güçlü pozitif boyandığı olgular) olguların % 37'sinde saptandı. AK'de koekspresyon oranı %46 (12/26) iken, SHK'de % 37 (11/30) idi. c-Met ve HGF 'nin pozitif immun boyanma oranları ve histolojik alt tiplere göre dağılımı Tablo 8 ve Tablo 9 'de gösterilmiştir.

İmmunpozitifliğin lokalizasyonuna göre dağılımına bakıldığında, HGF için olguların % 59.6'sında (34/57) sitoplazmik boyanma görülürken, %38.5'inde (22/57) sitoplazmik+membranöz boyanma, bir olguda (%1.7) membranöz boyanma saptandı. HGF için güçlü pozitif boyanan olgularda lokalizasyon dağılımları ise; sitoplazmik % 44.8 (13/29), sitoplazmik+ membranöz % 51.7 (15/29) ve membranöz % 3.4 (1/29) idi. c-Met için pozitif immun boyananların %21'i (13/62) sitoplazmik boyanma gösterirken, %74.2'si (46/62)

sitoplazmik+membranöz boyanma, iki olgu (%3.2) membranöz boyanma gösterdi. c-Met için güçlü pozitif boyanan olgularda lokalizasyon dağılımları ise; sitoplazmik % 22 (11/50), sitoplazmik+ membranöz % 74 (37/50) ve membranöz % 4 (2/50) idi.

HGF ve c-Met ekspresyonları ile lenf nodu tutulumu arasında bir ilişki olup olmadığı değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ( $p=0.508$  ve  $p=0.103$ ). Lenf nodu tutulumu olan olgularda koekspresyon sıklığına bakıldığında; bir lenf nodu tutulumu olan 15 olgunun 5'inde (%33) koekspresyon olduğu gözlenirken, iki lenf nodu tutulumu olan 16 olgunun 10'unda (% 63) koekspresyon gözlemlendi. Lenf nodu tutulumu, HGF ve c-Met' in koekspresyonunun olduğu olgularda, istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla bulundu ( $p=0.040$ ).

HGF ve c-Met ekspresyonlarının evrelere göre dağılımlarına bakıldığında, c-Met için güçlü pozitif boyanma oranı, ileri evre olgularda % 78 (7/9) iken, HGF için % 60 (6/10) idi. İleri evre olgularda koekspresyon oranı %44 (4/9) idi ( Tablo 10). HGF, c-Met ekspresyonları ve HGF/c-Met koekspresyon oranları, ileri evre olgular ile erken evre olgular karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. HGF ve c-Met ekspresyonları ile tümör boyutu ( $p=0.667$  ve  $p=0.914$ ), lenfatik metastaz ( $p=0.508$  ve  $p=0.103$ ), tümör evresi ( $p=0.408$  ve  $p=0.814$ ) ve nüks oranı ( $p=0.537$  ve  $p=0.293$ ) arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. HGF/c-Met koekspresyonu ile tümör boyutu, tümör evresi ve nüks oranı arasında da bir korelasyon yoktu.

IHK analizleri sonrasında güçlü pozitif boyanma oranları; MMP-2, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA için sırasıyla % 69, % 49, % 32 ve % 8 idi. MMP-9 için, 60 olgunun sadece 11'inde zayıf pozitif boyanma saptanırken (% 18.3), güçlü pozitif boyanma hiçbir olguda saptanmadı (Şekil 8-12). Histolojik alt tiplere göre dağılımlarına bakıldığında; AK ve SHK'de güçlü pozitif boyanma oranları sırasıyla: MMP-2 ( %74 vs %67), TIMP-1 (%44 vs %47) ve TIMP-3 (%37 vs %30) idi. Pozitif immun boyanma oranları ve histolojik alt tiplere göre dağılımı Tablo 8 ve Tablo 9'da gösterilmiştir.

HGF ve c-Met ekspresyonları ile, MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 arasında korelasyon bulunmadı. Ancak TIMP-3'ün güçlü pozitif (2+) boyandığı olguların, HGF' nin tek başına ( $p=0.002$ ) veya c-Met ile birlikte (HGF+c-Met) güçlü pozitif (2+) boyandığı olgular ( $p=0.010$ ) olduğu gözlenirken, c-Met'i güçlü pozitif (2+) olan olgularda TIMP-3 boyanmasının istatistiksel anlamlılık göstermediği görüldü ( $p=0.144$ ). Yani, HGF +c-Met 'in 0 veya 1+ pozitif boyandığı olgularda TIMP-3 immunpozitifliğinin güçlü olduğu olgu sayısı, HGF ve/veya c-Met'in 2+ (güçlü) boyandığı gruplardaki TIMP-3 pozitif olgu sayısına göre

istatistiksel olarak daha azdı ( $p=0.010$ , %57 vs %93 ve %95). Ayrıca, RhoA'nın güçlü pozitif (2+) boyandığı 5 olgunun, HGF'nin tek başına ( $p=0.045$ ) veya c-Met ile birlikte (HGF+c-Met) güçlü pozitif (2+) boyandığı olgular ( $p=0.011$ ) olduğu gözlenirken, c-Met'i güçlü pozitif (2+) olan olgularda RhoA boyanmasının istatistiksel anlamlılık göstermediği görüldü ( $p=0.116$ ).

MMP-2, MMP-9 ile TIMP-1 ve TIMP-3 arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı. MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA ile tümör boyutu, lenfatik metastaz ve nüks oranı arasında korelasyon yoktu. İmmunpozitifliğin evreler ile ilişkisine bakıldığında, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve RhoA ile, tümör evresi arasında bir korelasyon yok iken, TIMP-3 güçlü immünpozitifliğinin ileri evrede ( %30 vs %13) istatistiksel olarak daha fazla olduğu bulundu (Tablo 10,  $p=0.021$ ).

**Tablo 7.** Olguların demografik özellikleri

<b>Parametre</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Yaş ortalaması (yıl)</b>	63	58.2± 9.9
<b>Cinsiyet</b>		
Erkek	56	88.9
Kadın	7	11.1
<b>Sigara öyküsü</b>		
İçen	55	87.3
İçmeyen	8	12.7
<b>Evre</b>		
Erken	53	84.1
İleri	10	15.9
<b>Evre (TNM)</b>		
I	11	17.5
II	26	41.3
IIIA	16	25.4
IIIB	7	11.1
IV	3	4.8
<b>Histolojik tip</b>		
Skvamöz hücreli karsinom	31	49.2
Adeno karsinom	27	42.9
Diğer	5	7.9



**Tablo 8.** Olguların immün boyanma sonuçları

	<b>0 negatif</b>	<b>1+ zayıf</b>	<b>2+ güçlü</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
<b>HGF</b>	4.9 (3/61)	47.5 (29/61)	47.5 (29/61)
<b>c-Met</b>	0	19.4 (12/62)	80.6 (50/62)
<b>MMP-2</b>	1.6 (1/61)	29.5 (18/61)	68.8 (42/61)
<b>MMP-9</b>	81.7 (49/60)	18.3 (11/60)	0
<b>TIMP-1</b>	4.9 (3/61)	45.9 (28/61)	49.2 (30/61)
<b>TIMP-3</b>	9.7 (6/62)	58.1 (36/62)	32.2 (20/62)
<b>RhoA</b>	21.3 (13/61)	70.5 (43/61)	8.2 (5/61)

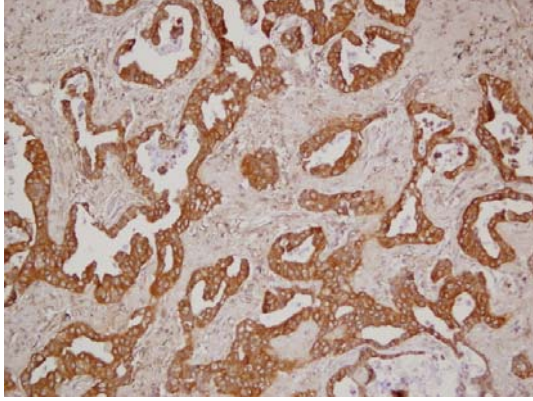
**Tablo 9.** Güçlü pozitif immün boyanmaların histolojik alt tiplere göre dağılımı

	<b>Adenokarsinom</b>	<b>Skvamöz hücreli</b>	<b>Diğer</b>
	<b>(%)</b>	<b>kanser (%)</b>	<b>(%)</b>
<b>HGF</b>	58 (15/26)	42 (13/31)	25 (1/4)
<b>c-Met</b>	78 (21/27)	90 (27/30) **	40 (2/5)
<b>c-Met+ HGF*</b>	46 (12/26)	37 (11/30)	25 (1/4)
<b>MMP-2</b>	74 (20/27)	67 (20/30)	50 (2/4)
<b>MMP-9</b>	0 (0/26)	0 (0/29)	0 (0/5)
<b>TIMP-1</b>	44 (12/27)	47 (14/30)	100 (4/4)
<b>TIMP-3</b>	37 (10/27)	30 (9/30)	20 (1/5)
<b>RhoA</b>	8 (5/26)	0 (0/30)	0 (0/5)

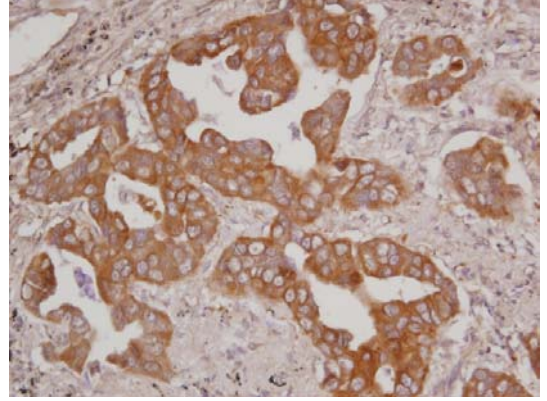
\* Koekspresyon için HGF ve c-Met'in güçlü boyanmalarının (2+) birlikteliği esas alınmıştır.

\*\* p=0.045, skuamöz hücreli kanser vs adenokarsinoma

**A**

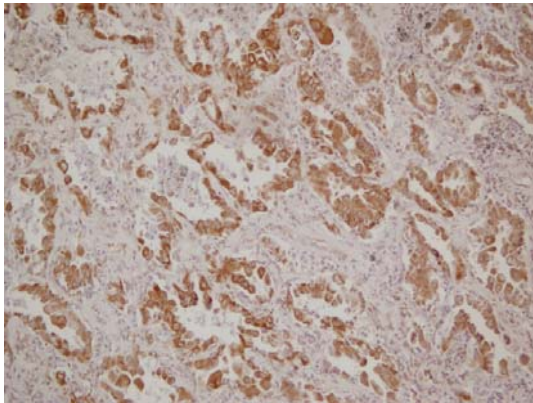


**B**

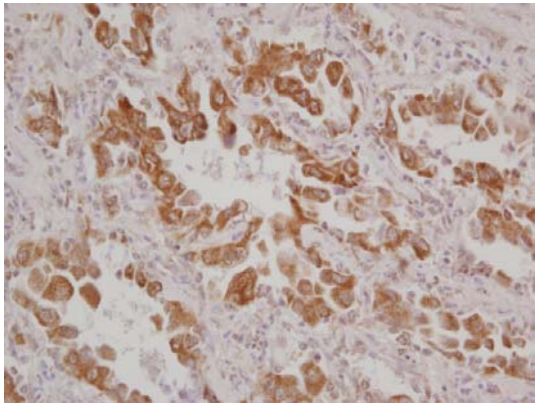


**Şekil 6.** c-Met için güçlü pozitif immun boyanma. **A**, X20 büyütme, **B**, X40 büyütme

**A**



**B**



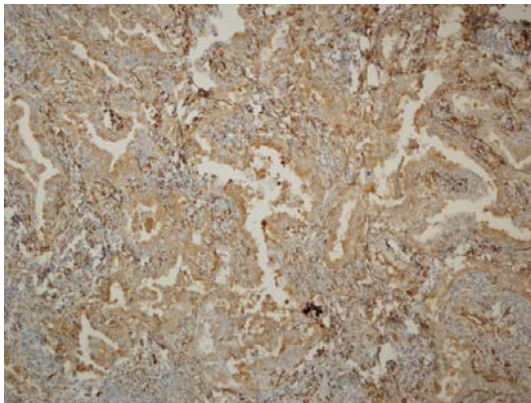
**Şekil 7.** HGF için güçlü pozitif immun boyanma. **A**, X20 büyütme, **B**, X40 büyütme

**Tablo10.** Güçlü pozitif immün boyanmaların evrelerine göre dağılımı

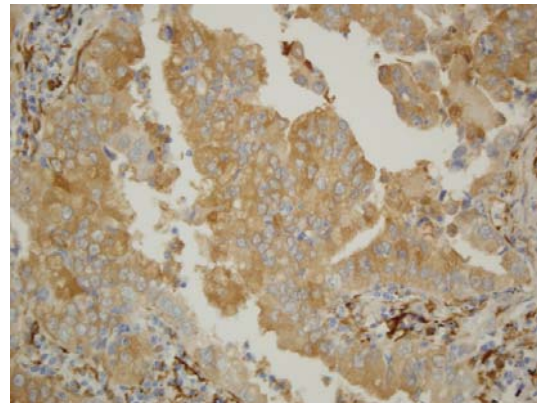
	Erken evre		İleri evre	
<b>HGF</b>	<b>45</b>	<b>(23/51)</b>	<b>60</b>	<b>(6/10)</b>
<b>c-Met</b>	<b>81</b>	<b>(43/53)</b>	<b>78</b>	<b>(7/9)</b>
<b>c-Met+ HGF</b>	<b>42</b>	<b>(21/50)</b>	<b>44</b>	<b>(4/9)</b>
<b>MMP-2</b>	<b>71</b>	<b>(36/51)</b>	<b>60</b>	<b>(6/10)</b>
<b>MMP-9</b>	<b>0</b>		<b>0</b>	
<b>TIMP-1</b>	<b>51</b>	<b>(26/51)</b>	<b>40</b>	<b>(4/10)</b>
<b>TIMP-3</b>	<b>13</b>	<b>(17/52)</b>	<b>30</b>	<b>(3/10)*</b>
<b>RhoA</b>	<b>6</b>	<b>(3/51)</b>	<b>20</b>	<b>(2/10)</b>

\*p=0.021

A

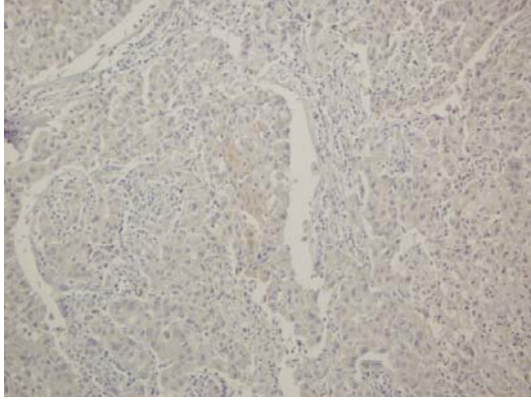


B

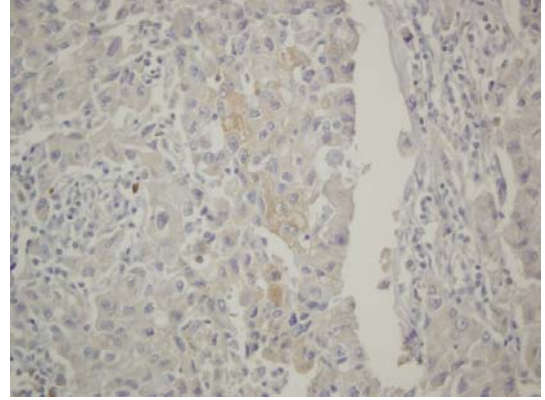


**Şekil 8.** MMP-2 için güçlü pozitif immün boyanma. **A**, X10 büyütme, **B**, X40 büyütme

A

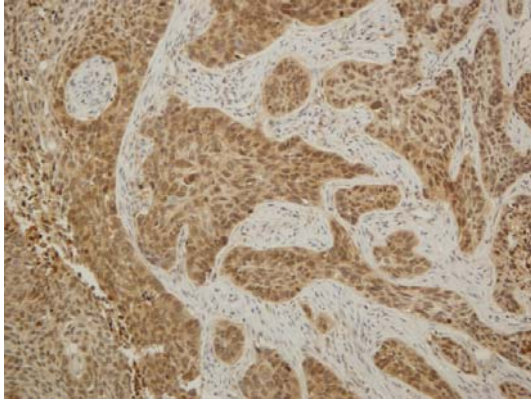


B

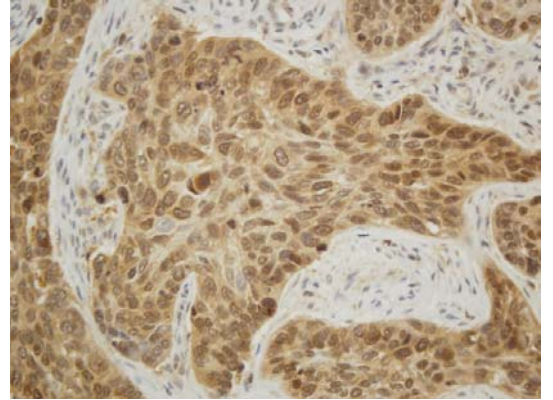


**Şekil 9.** MMP-9 için zayıf pozitif immun boyanma. **A**, X20 büyütme, **B**, X40 büyütme

A

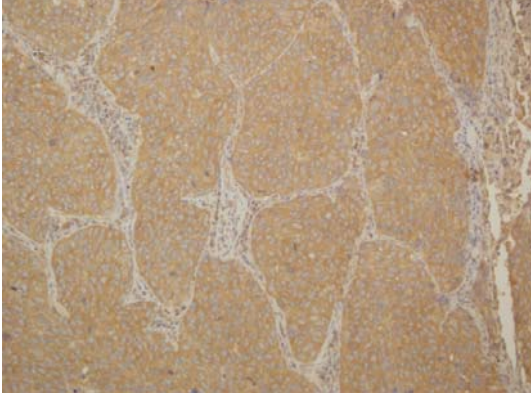


B

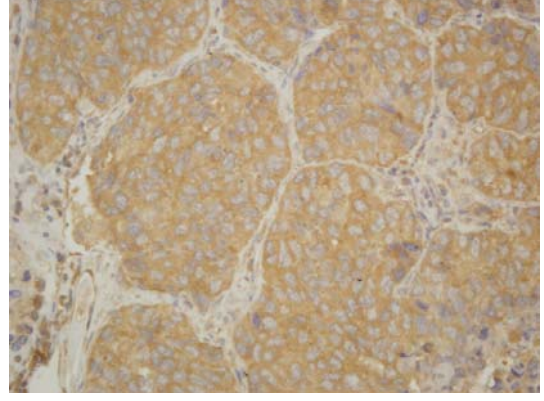


**Şekil 10.** TIMP-1 için güçlü pozitif immun boyanma. **A**, X20 büyütme, **B**, X40 büyütme

A

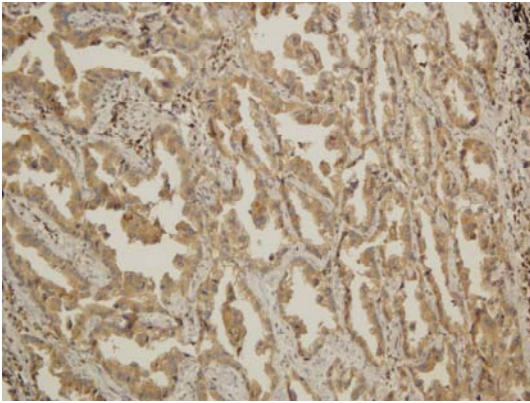


B

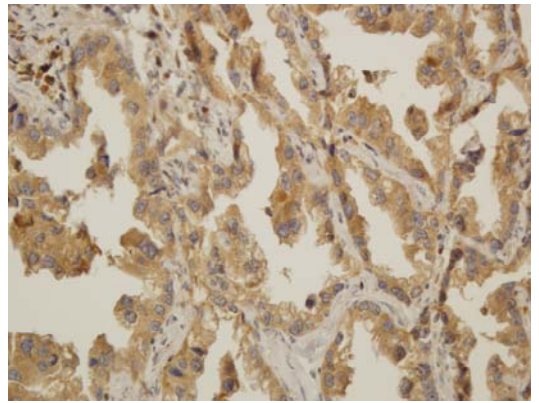


**Şekil 11.** TIMP-3 için güçlü pozitif immun boyanma. **A**, X20 büyütme, **B**, X40 büyütme

A



B



**Şekil 12.** RhoA için güçlü pozitif immun boyanma. **A**, X20 büyütme, **B**, X40 büyütme

### 6.3 c-Met reseptörünün tirozin kinaz bölgesinde saptanan mutasyonlar

Altmış üç KHDAK olgusuna ait doku örneklerinden elde edilen genomik DNA' lar, c-Met reseptörünün transmembranal (ekzon 13), jukstamembranal (ekzon 14) ve sitoplazmik bölgelerini (15-21.ekzonlar) kodlayan tüm ekzonlara özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile amplifiye edildi ve bu bölgelerin iki yönlü DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Dizi analizleri sonrasında c-Met reseptörünün 13 -19 ekzonlarında mutasyon saptanmaz iken tirozin kinaz aktivitesi gösteren bölgeleri kodlayan 20 ve 21. ekzonlarda c1254 T-->C transisyonu (D1254D) ve g1339 A-->G transisyonu (A1339A) şeklinde iki adet amino asit değişikliğine yol açmayan sessiz mutasyon saptandı. D1254D mutasyonu 43 olgunun 11'inde (%26, Tablo 11), A1339A mutasyonu ise 42 olgunun 16'sında (%38, Tablo 12) saptanırken, bunların 6'sında hem D1254D, hem de A1339A mutasyonu saptandı. 'National Center for Biotechnology Information Entrez single nucleotide polymorphism (SNP) database search' veri tabanında yaptığımız taramalara göre, bu DNA dizi değişikliklerinin daha önce SNP veya mutasyon olarak tanımlanmadığı ve ilk defa tanımlanan değişiklikler olduğu belirlendi (Şekil 13 ve Şekil 14).

Bu mutasyonların; HGF, c-Met, HGF/c-Met, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA ile ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlılık gözlenmedi. HGF ve c-Met IHK boyamalarında hem sitoplazmik hem de membranöz boyanma saptanmıştı. Bulunan c-Met mutasyonları ile bu lokalizasyonlar arasında istatistiksel açıdan mutasyon olanlar ile olmayan grup arasında anlamlı bir fark yoktu.

Ayrıca D1254D ve/veya A1339A mutasyonları ile yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, tümörün histolojik tipi, tümör boyutu, evresi, lenf nodu metastazı ve nüks oranı arasında istatistiksel anlamlılık bulunmadı.

**Tablo 11.** Ekzon 20-21 (1)' de nükleotid değişimi C/T transisyonu

**Konsensus dizi** ATCCTGAcGT AAACACCTTT

**KHDAK olgu** ATCCTGATGT AAACACCTTT

<b>Hasta no</b>	<b>Histolojik tip</b>	<b>Evre (TNM)</b>	<b>DNA dizi değişimi</b>	<b>Sonu</b>
9	Adenokanser	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	C→T	
26	Adenokanser	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	C→T	
36	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	C→T	
39	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	C→T	1254. pozisyonadaki transisyon sonucunda
40	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>1</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	C→T	Aspartik asidi kodlayan
43	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	C→T	GAC kodonu GAT kodonuna dönüşüyor.
22	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	C→T	GAC→GAT
30	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	C→T	Asp→Asp
49	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	C→T	
2	Adenokanser	T <sub>x</sub> N <sub>2</sub> M <sub>1</sub>	C→T	
13	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	C→T	

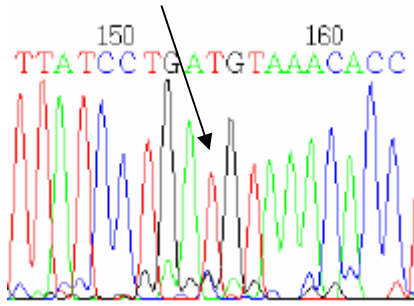
**Şekil 13.** Ekzon 20-21(1)'de nükleotid değişimi C/T transisyonu gösteren olguların kromatogramlarına ( iki yönlü) örnekler

**Consensus** ATCCTGAcGT AAACACCTTT

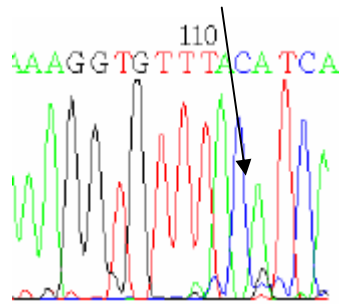
**20-21(1)** ATCCTGATGT AAACACCTtT

**Hasta no:30 (Skumöz hücreli kanser)**

İLERİ

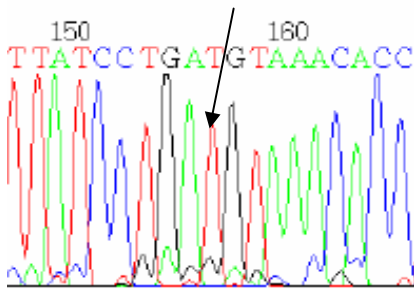


GERİ

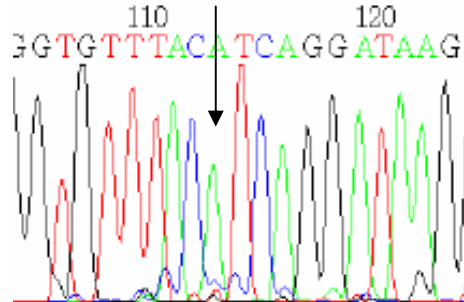


**Hasta no:49 (Skumöz hücreli kanser)**

İLERİ



GERİ





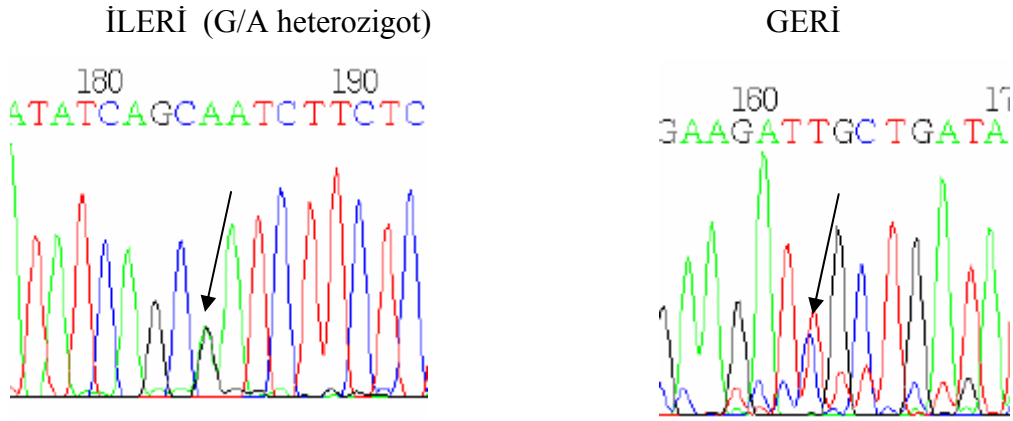
**Tablo 12.** Ekzon 20-21 (2)' de nükleotid değişimi G/A transisyonu**Konsensus dizi** ATATCAGCg-ATCTTCTC**KHDAK olgu** ATATCAGCA-ATCTTCTC

Hasta no	Histolojik tip	Evre (TNM)	DNA değişimi	dizi	Sonuç
2	Adenokanser	T <sub>x</sub> N <sub>2</sub> M <sub>1</sub>	G→A		
6	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G/A heterozigot		
8	Adenokanser	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G/A heterozigot		
9	Adenokanser		G→A		1339. pozisyonadaki transisyon sonucunda
36	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	G/A heterozigot		Alanin'i kodlayan GCG kodonu GCA kodonuna dönüşüyor.
39	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G→A		
26	Adenokanser	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G→A		GCG→GCA
53	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>1</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	G/A heterozigot		Ala→Ala
54	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	G/A heterozigot		
61	Adenokanser	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	G/A heterozigot		
22	Skvamöz hücreli kanser	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	G→A		
5	Adenokarsinom	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G/A heterozigot		
42	Adenokanser	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G→A		
56	Adenoskvamöz kanser	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	G→A		
55	Adenokanser	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G/A heterozigot		
7	Adenokanser	T <sub>1</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	G/A heterozigot		

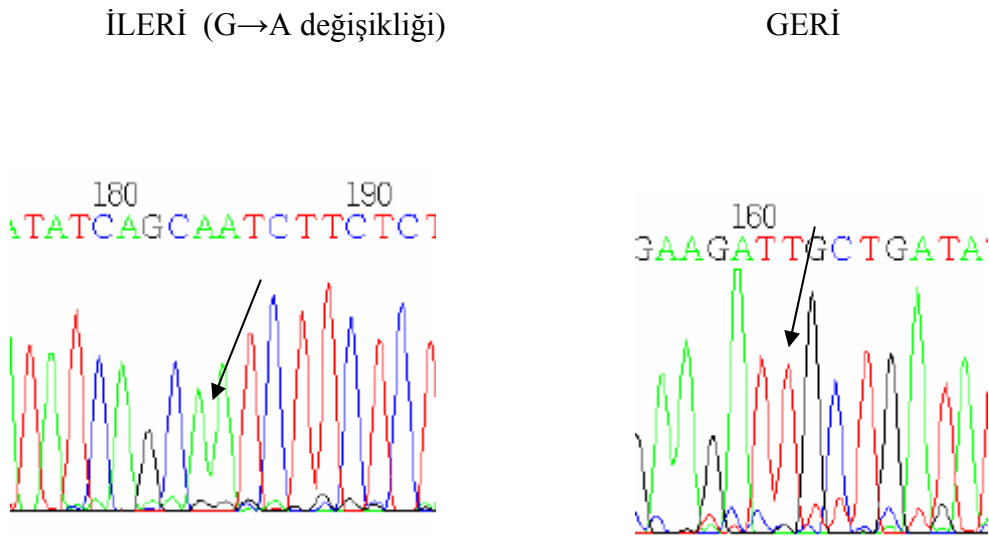
**Şekil 14.** Ekzon 20-21 (2)' de nükleotid değişimi G/A transisyon gösteren olguların kromatogramlarına ( iki yönlü- ileri-geri) örnekler

**Konsensus dizi** ATATCAGCg-ATCTTCTC  
**KHDAK olgu** ATATCAGCA-ATCTTCTC

**Hasta no:61 (Adenokanser)**



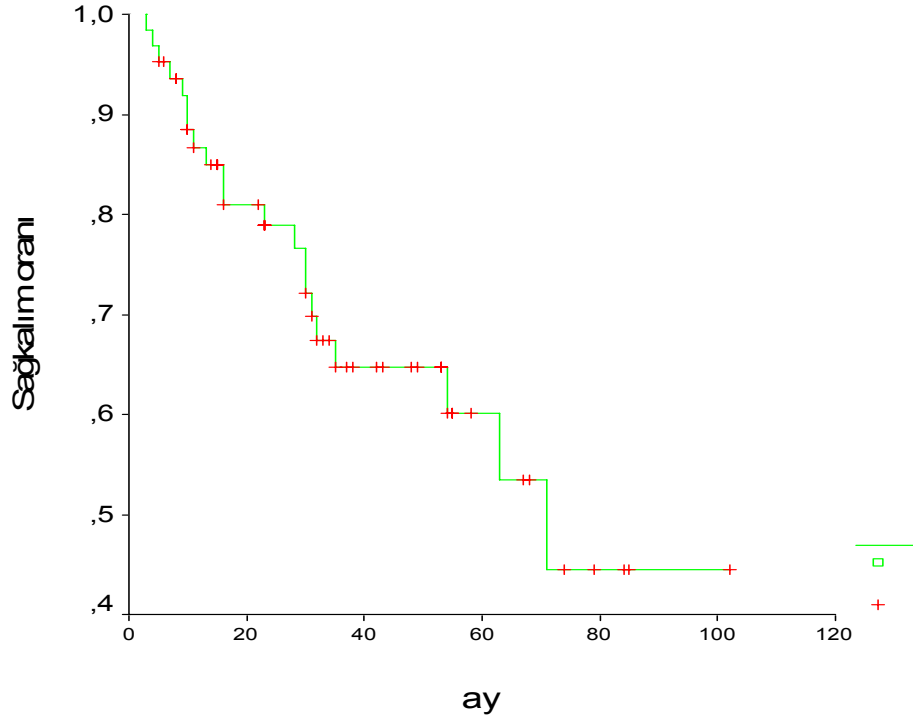
**Hasta no:22 (Skvamöz hücreli kanser)**



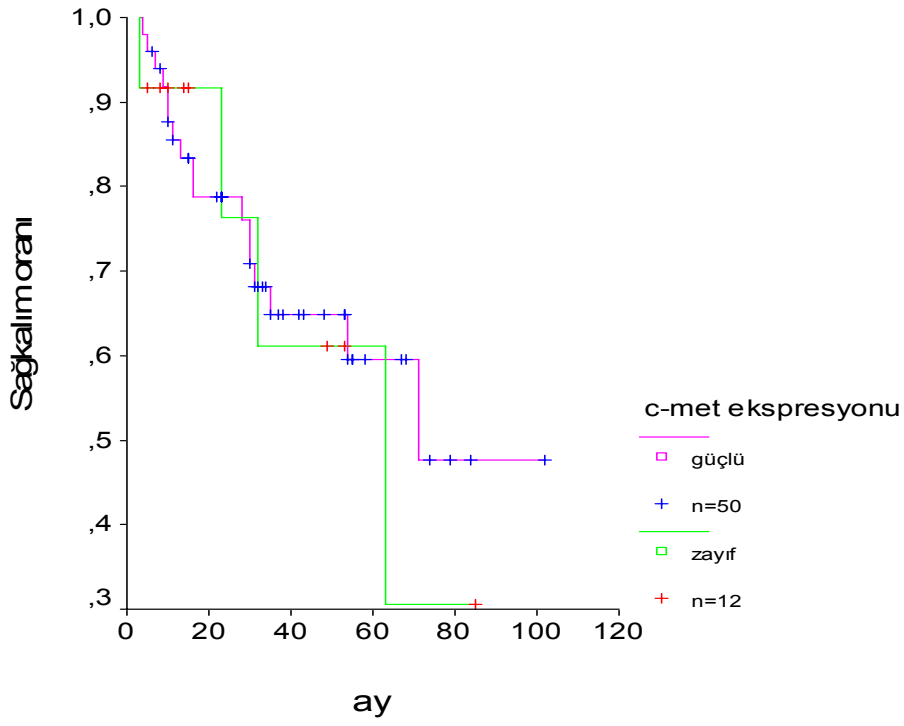
#### **6.4 c-Met' de Saptanan Mutasyonların ve HGF, c-Met, HGF/c-Met, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA Ekspresyonlarının Sağkalıma Etkisi**

Tüm olgular için sağkalım oranı % 67 idi ( 21 olgu ex, 42 olgu sağ). Tüm grupta ortalama sağkalım süresi  $65.17 \pm 6.13$  (SD) ay (95% confidence interval: 53.16–77.18), ortanca sağkalım süresi  $71 \pm 12.3$  ay (95% confidence interval: 46.88–95.12) (3–102 ay) ve ortalama hastalıksız sağkalım süresi  $30.4 \pm 23.2$  ay (95% confidence interval: 52.4–89.5) idi. Bir, 2 ve 3 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %87, %81 ve %70 idi. İmmunhistokimyasal analizler sonucunda HGF, c-Met ve HGF/c-Met ekspresyonlarındaki artışların, sağkalım üzerine etkileri yoktu (Şekil 16-18) . Ayrıca, HGF/c-Met koekspresyonu saptanan olgular ile HGF veya c-Met'in tek başına ekspresyon artışının saptandığı olgular arasında sağkalım süreleri açısından anlamlı bir fark yoktu ( $p=0.5496$ ). c-Met'in 20-21. ekzonlarında saptanan mutasyonların tek başlarına sağkalım üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi yoktu ( $p=0.1736$ , Şekil 24 ve  $p=0.1646$ , Şekil 25). Ancak, her iki mutasyona sahip olguların sağkalım süresi, tek mutasyonu olan veya hiç mutasyonu olmayan olgularla karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşüktü ( $p=0.0058$ , Şekil 26).

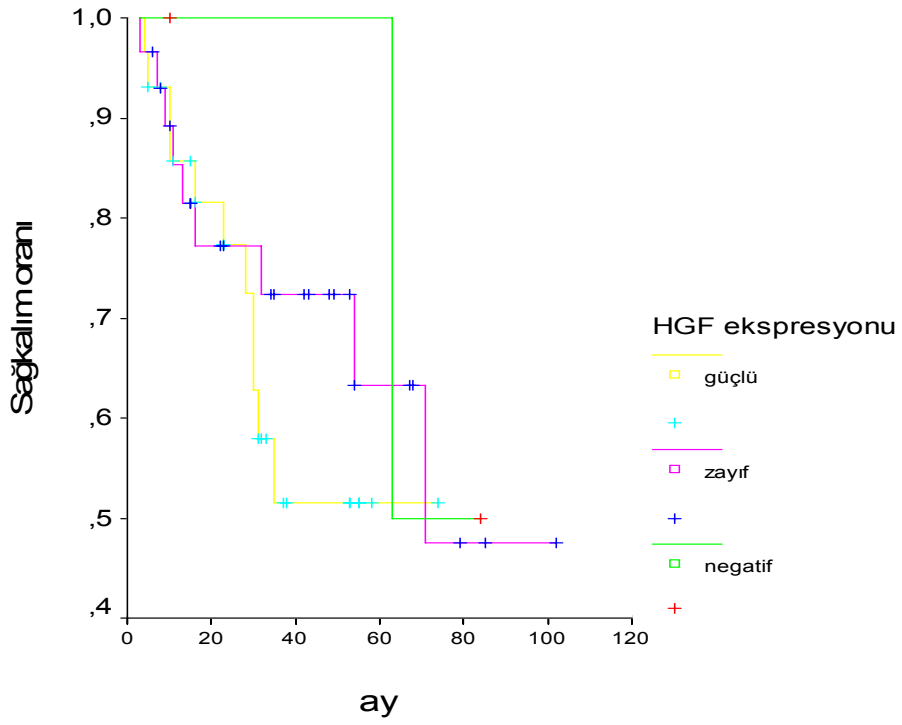
MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-3 'de saptanan ekspresyon değişikliklerinin sağkalım üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( Şekil 19-22). Ancak RhoA ekspresyonu güçlü pozitif (2+) olan olgularda ( $n=5$ ) sağkalım süresi, zayıf pozitif (1+) olan veya hiç ekspresyon olmayan gruba göre istatistiksel olarak daha düşük bulundu ( $p=0.0459$ , Şekil 23).



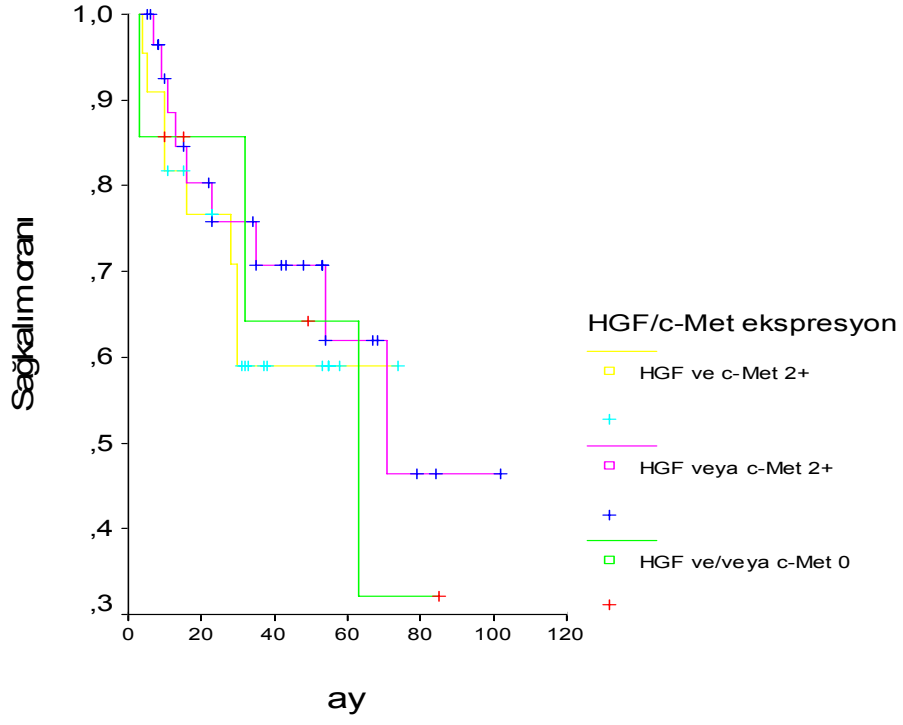
Şekil 15. Tüm grubun genel sağkalım oranları



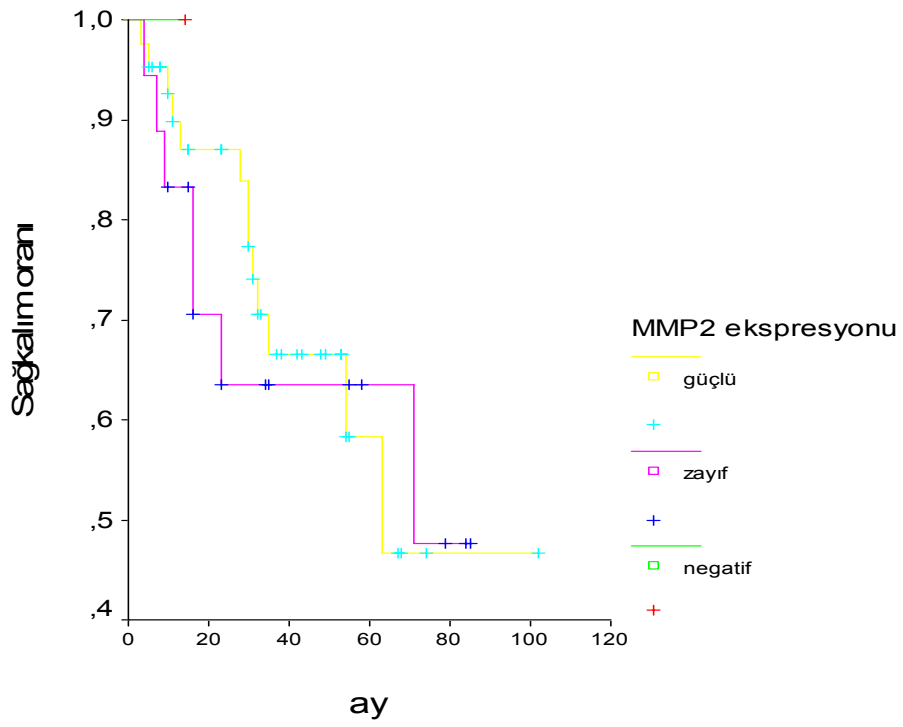
Şekil 16. c-Met ekspresyonlarının sağkalıma etkisi ( $p=0.7565$ )



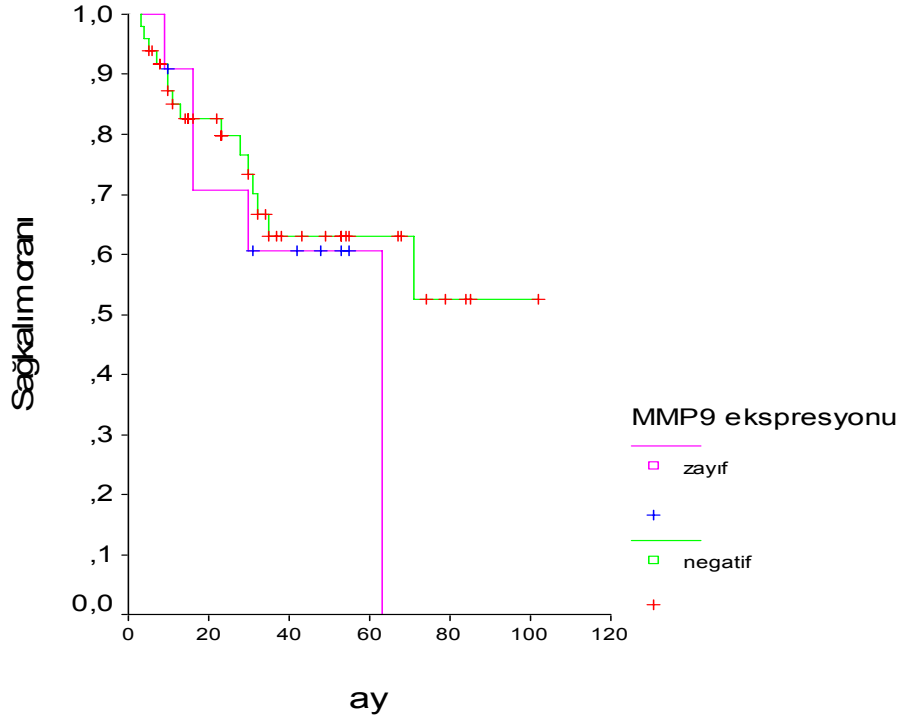
Şekil 17. HGF ekspresyonlarının sağkalıma etkisi ( $p=0.6114$ )



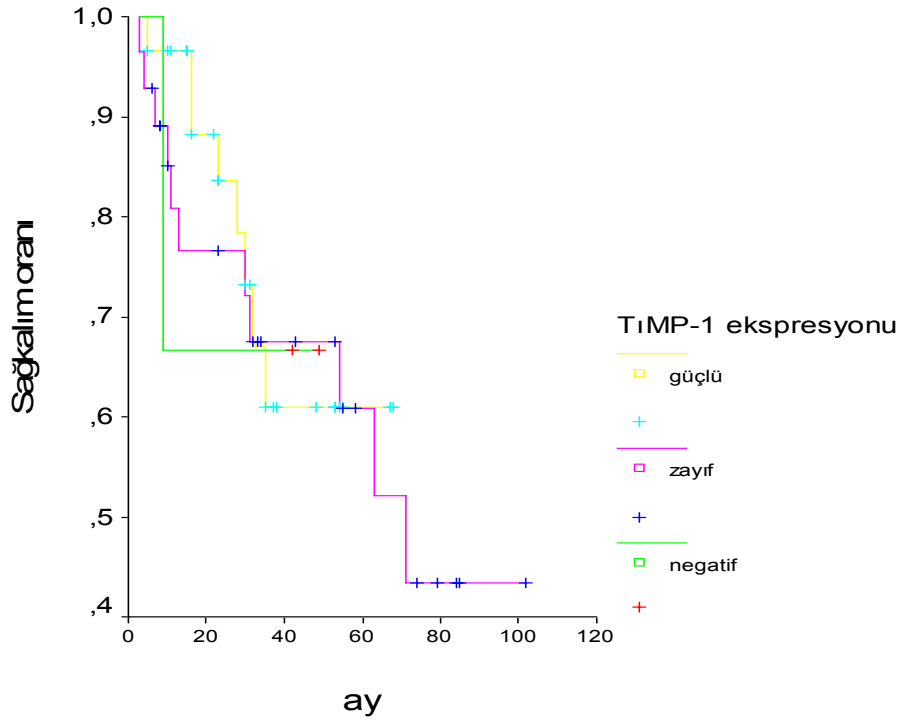
Şekil 18. HGF/c-Met koekspresyonlarının sağkalıma etkisi (p=0.7805)



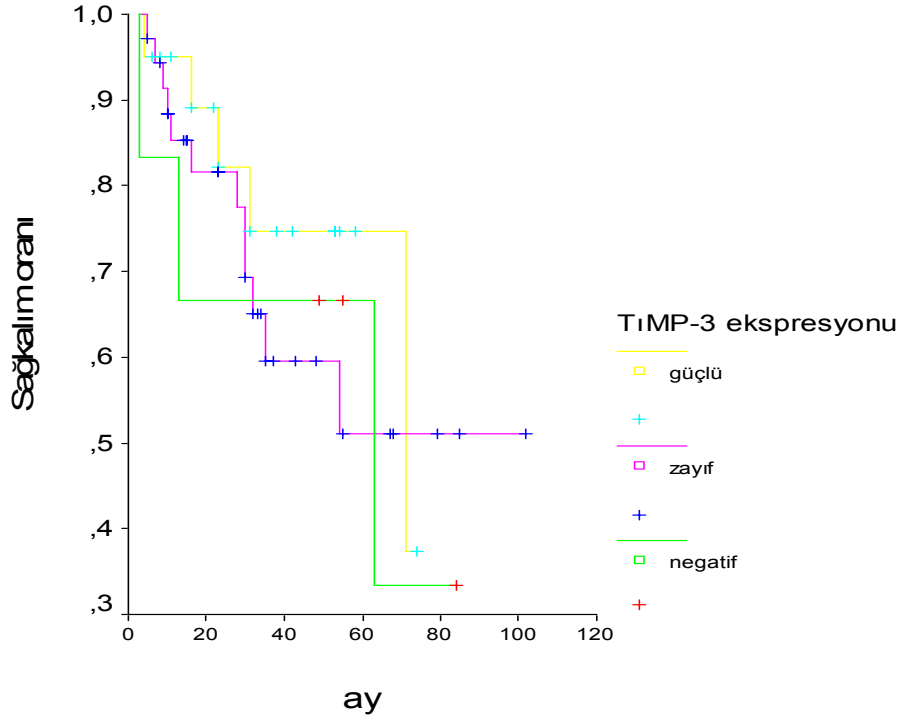
Şekil 19. MMP-2 ekspresyonlarının sağkalıma etkisi (p=0.8785)



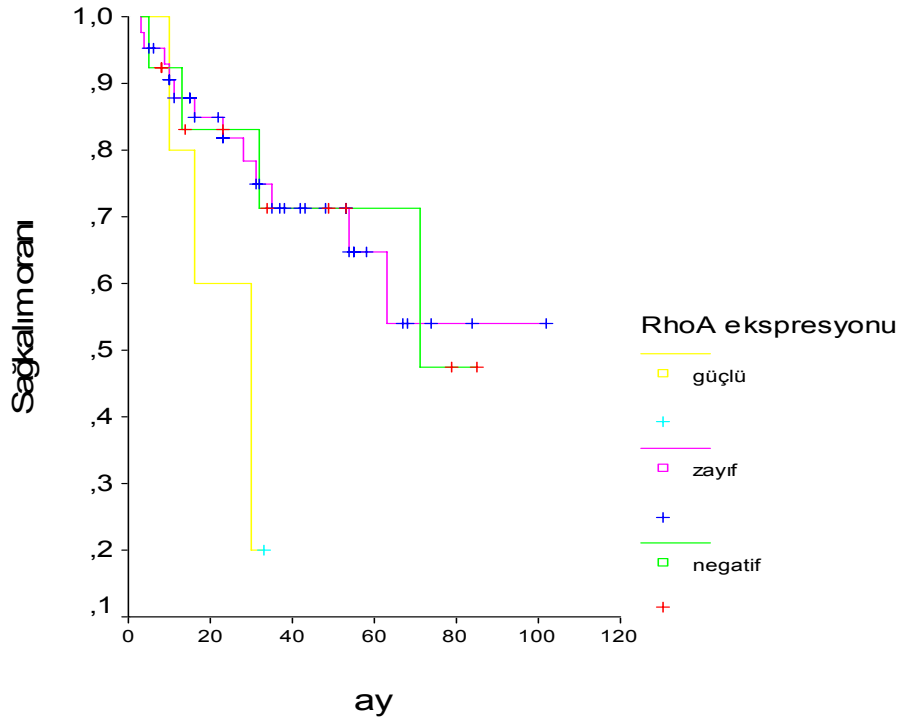
Şekil 20. MMP-9 ekspresyonlarının sağkalıma etkisi (p=0.4903)



Şekil 21. TIMP-1 ekspresyonlarının sağkalıma etkisi (p=0.9241)

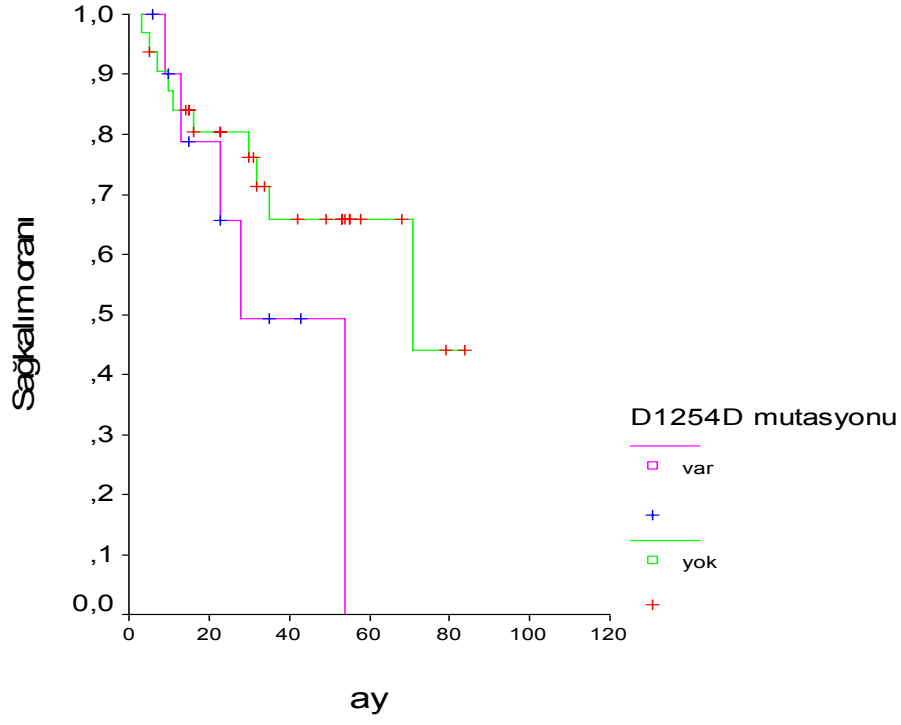


Şekil 22. TIMP-3 ekspresyonlarının sağkalıma etkisi (p=0.7515)

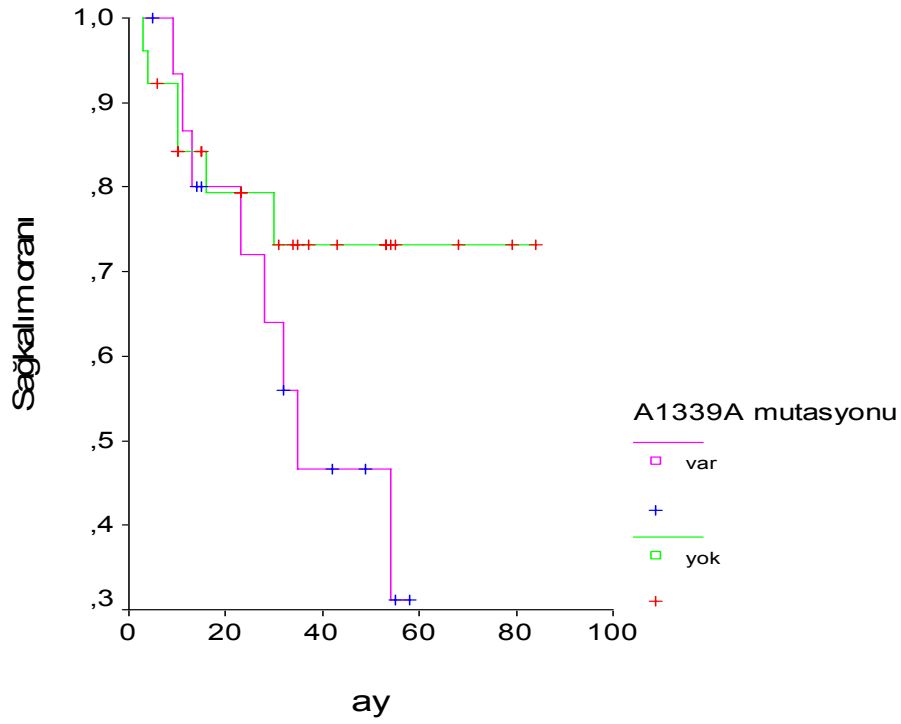


Şekil 23. RhoA ekspresyonlarının sağkalıma etkisi (p=0.0459)\*

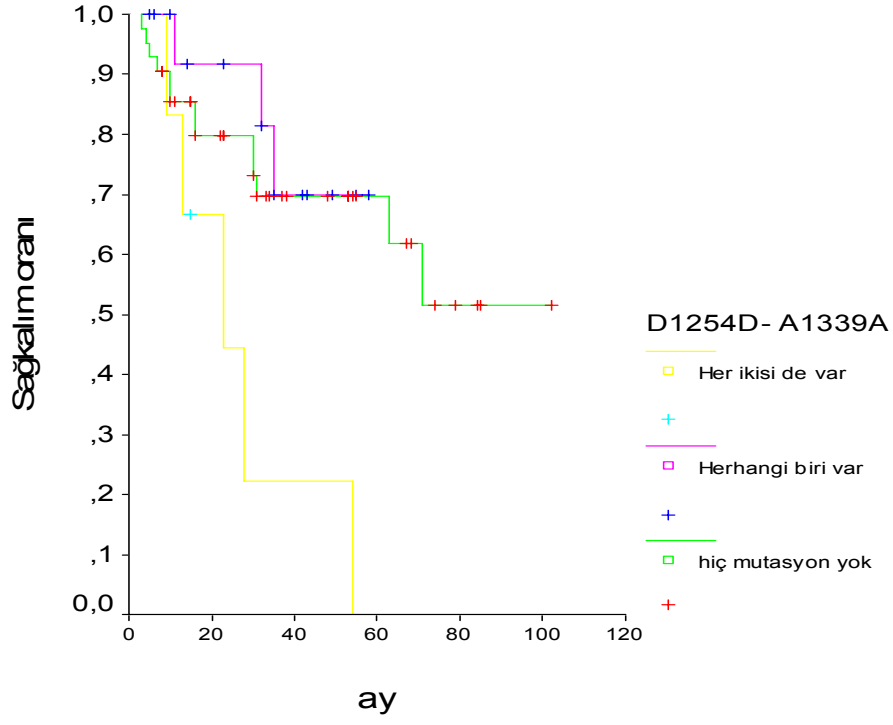




Şekil 24. D1254D mutasyonunun sağkalıma etkisi (p=0.1736)



Şekil 25. A1339A mutasyonunun sağkalıma etkisi (p=0.1646)



Şekil 26 D1254D ve A1339A mutasyonlarının birlikteliğinin sağkalıma etkisi (p=0.0058)\*

## **7. TARTIŞMA**

Tümörün invazyon ve metastaz yapması, kötü prognoz göstergeleri olduğu için özellikle KHDAK gibi kötü prognozlu kanserlerde, erken dönemde tümör hücrelerinin invazyon kapasitesinin saptanabilmesi oldukça önemlidir. Son yıllarda c-Met'in normal yapısal özellikleri ve biyolojik işlevleri hakkında çok sayıda bilgi edinilmiştir. c-Met RTK sinyal iletiminin, onkogeneizde aşırı artması, özellikle invaziv ve metastatik kapasitede artışa neden olması günümüzde oldukça dikkat çeken konulardan biridir. Pek çok malignitede c-Met mutasyonları veya ekspresyonlarındaki artışlar tanımlanmıştır. HGF ve c-Met 'in KHDAK dahil pek çok kanserde ekspresyonunun arttığı ve tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz kapasitelerini arttırdığı bildirilmektedir (10,32,33). Bizim çalışmamızda da olgularının %48' inde HGF, % 81'inde c-Met'in güçlü ekspresyon gösterdiği belirlendi. HGF ve c-Met' in güçlü ekspresyonunun tümörün histolojik tipi ile korele olduğu ve daha çok adenokarsinomda görüldüğü bildirilmektedir (34, 78,79). Bizim olgularımızda ise HGF güçlü ekspresyonu ve HGF/c-Met koekspresyonu daha çok AK'de görülürken, c-Met güçlü ekspresyonu SHK'de gözlemlendi. Bu sonuç AK'lerin daha invaziv ve metastatik fenotip göstermesi ile uyumlu olabilir.

Bilindiği gibi c-Met yolağı aktivasyonu artan proteaz üretimi ile birlikte seyreden hücre yayılımı ve motilitesi ile başlayan, ECM yıkımı yoluyla hücre invazyonu ve anjiogenez artışı ile ilerleyen, in vivo tümör metastazına benzer bir programı tetikler (12, 82). Bu süreçte özellikle MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarındaki artışın önemli olabileceği düşünülmektedir (16). ECM' in başlıca komponenti olan kollagen IV' ü yıkan MMP-2 ve MMP-9'ekspresyonunun birçok tümör tipinde arttığı ve bu artışın kötü prognoz ile korele olduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir (26,83,84). KHDAK'lerinde ise MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11 ve MMP14 ekspresyonlarının arttığı ve bu artışın KHDAK'lerinde histopatolojik ve klinik bulgularla korele oldukları bildirilmektedir (21,22). MMP-2' de ekspresyon artışının nodal invazyon, MMP-11 'in tümör boyutu ve nodal metastaz, MMP-14' ün ileri evre ile ilişkili oldukları bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Farklı sonuçlar bulan çalışmalar da literatürde yer almaktadır (20, 66-68). Thomas ve ark, KHDAK'lerinde bütün MMP' lerin eksprese edildiklerini ancak bunların ekspresyon ve güçlü ekspresyonlarının birbirinden farklı olduğunu bildirmişlerdir (20). HGF'nin birçok kanser hücresinde, kanser hücrelerinin migrasyonunu direk olarak arttırarak, matriks ve endoteline adezyonunu arttırarak, en çok da MMP-2, MMP-7, MMP-9 ve uPA gibi proteolitik enzimlerin kanser

hücrelerinden sekresyonunu/ekspresyonunu arttırarak onların invazyon kapasitelerini arttırdığı bilinmektedir. Biz de çalışmamızda KHDAK'lerinde MMP ekspresyonunda artış ve bu artışın metastaz ve ileri evre ile korelasyonunu göz önüne alarak KHDAK'lerindeki MMP artışında HGF/c-Met yolağının etkisi olabileceği hipotezini incelemek istedik. Bu nedenle çalışmamızda bazal membranının yıkımına aracılık ederek invazyonu arttıran MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarını ve bunların HGF/c-Met ile ilişkisini değerlendirdik. Çalışma sonucunda MMP-2' nin %69 olguda güçlü eksprese olduğunu saptarken, MMP-9'un hiçbir olguda güçlü eksprese olmadığını ve sadece 11 (18%) olguda zayıf boyanma olduğunu gördük. Literatürde MMP-2 ve MMP-9'un KHDAK'de ekspresyonunun arttığını, ve bu artışın kötü prognoz ile korele olduğunu bildiren çalışmalar olduğu gibi ( 26, 83,83), MMP-9 ekspresyonunun olmadığı veya MMP-2' ye oranla çok daha zayıf olduğu ve bu nedenle MMP-2 düzeylerinin daha önemli prognostik bir faktör olduğunu bildirilen çalışmalar da bulunmaktadır (67). Bu çalışmalarda, KHDAK' de MMP-2 için %10 -56 ve MMP-9 için % 3-71 arasında değişen ekspresyon oranları bildirilmektedir (20,21, 26, 64,67). Thomas P ve ark. (2000), MMP ve TIMP'lerin ekspresyon derecelerini inceledikleri çalışmalarında KHDAK'de, MMP-2 nin MMP-9' dan daha fazla oranda güçlü eksprese olduğunu saptamışlardır ( 10% vs 3%). Verilerimiz MMP-9 ekspresyonunu IHK ile % 3 olarak bulan Thomas ve ark ile (20), ve MMP-9 mRNA sının KHDAK' de hiç olmadığını belirten Nawrocki' nin (64) sonuçları ile uyumlu gözükmektedir. Ayrıca KHDAK' de MMP-2' nin MMP-9'dan daha önemli olduğunu bildiren çalışmaları desteklemektedir. MMP- 2 ve MMP-9 'un güçlü ekspresyonu ile tümörün evresi, sağkalım ve nüks oranları arasında korelasyon olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmektedir (21,83). Ancak biz çalışmamızda klinikopatolojik verilerle MMP ekspresyonları arasında bir korelasyon saptayamadık. Ayrıca c-Met veya HGF ekspresyonundaki artış ile MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonları arasında da bir ilişki saptayamadık.

ECM homeostazında, MMP' ler kadar bunların spesifik inhibitörleri olan MMP doku inhibitörleri (TIMP) arasındaki denge ile sağlandığı bilinmektedir. TIMP'ler, MMP' lerin proteolitik aktivitelerini inhibe eden ve tümör invazyon ve metastazında rolü olan bir enzim ailesidir. Bu enzim ailesi dört üyeden oluşmaktadır: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4. TIMP'ler, MMP'lere 1:1 molar oranda bağlanırlar ve onları spesifik olarak inhibe ederler. İn vitro ve in vivo deneysel çalışmalarda TIMP-1 ekspresyonu ile metastatik potansiyel arasında ters ilişki gösterilmiştir. Ancak son zamanlarda TIMP'lerin multifonksiyonel oldukları ve paradoksik olarak tümör progresyonunu arttırdıkları bildirilmektedir. TIMP-1 ve TIMP-2'nin

MMP inhibitör etkilerinden ayrı olarak büyüme faktörü benzeri etkileri yapı-fonksiyon çalışmaları ile gösterilmiştir. Ayrıca TIMP' ler, olasılıkla apoptozu önleyerek hücre proliferasyonunu stimüle edebilirler. TIMP-1'in antiapoptotik etkisi gösterilmiştir. Kolorektal kanserde ve KHDAK' lerin bazı alt tiplerinde TIMP-1 ekspresyonundaki artış ile tümörün daha agresif yapı kazanması arasındaki ilişki gösterilmiştir (26) . Mori ve arkadaşları, (2000) özefagus skuamöz hücreli kanserlerinde (ESCC) TIMP-1'in mRNA ve protein ekspresyonlarına bakmışlar ve TIMP-1 ekspresyonunun yüksek dereceli malignite ile korele ve bağımsız bir prognostik faktör olduğunu bildirmişlerdir (23,25,26). TIMP' lerin regülasyonunda büyüme faktörleri çok önemli role sahiptir, son yıllarda TIMP lerin ekspresyonlarının da büyüme faktörlerinin biyolojik etkilerinin ortaya çıkmasında önemli oldukları gösterilmiştir (85). Biz de çalışmamızda, HGF/cMet yolağı ve MMP-2 ve MMP-9 ile ilişkisi bildirilen TIMP-1 ve TIMP-3 ekspresyonlarını inceledik. İncelenen olguların % 49' unda yüksek TIMP-1 ekspresyonu olduğu saptandı. Aljada ve arkadaşları (2004), KHDAK'de % 27 ( 43/160) oranında TIMP-1 ekspresyonunun arttığını ve bunun hastaların sağkalım süresini düşürdüğünü bildirmişlerdir (26). TIMP-1 ekspresyonlarının, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonları ve tümörün histolojik tipi, tümör evresi ve lenf nodu tutulumu ile uyumlu olmadığını, ancak yüksek TIMP-1 ekspresyonu gösteren olgularda ölüm oranının, düşük TIMP-1 ekspresyonu olanlara göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın, Simi ve ark., TIMP-1' in lenf nodu invazyonu ve evre ile anlamlı korelasyon göstermekle birlikte sağkalım üzerinde etkisi olmadığını bildirmişlerdir (21). Bizim çalışmamızda Aljada'nın bildirdiği gibi MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonları, histolojik tip, tümör evresi ve lenf nodu tutulumu ile TIMP-1 arasında korelasyon yoktu. Ayrıca TIMP-1 düzeyleri ile sağkalım arasında da Simi ve ark.'nın (21) sonuçları ile uyumlu olarak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptayamadık.

TIMP-3 ekspresyonunun olguların %33' ünde arttığını belirledik. Deneysel çalışmalar ile TIMP-3'ekspresyonunun, tümör hücrelerinde apoptozu indüklediği (70), tümörün büyümesini (69, 86) ve anjiogenezi (29,87) baskıladığı ve azalmış TIMP-3 ekspresyonlarının malign tümörlerde daha agresif davranışa neden olduğu gösterilmiştir (69,70). Ayrıca klinik çalışmalarda, kolon (88), özefagus (30, 89), meme (90), prostat (91) ve akciğer (92) kanserlerinde TIMP-3 ekspresyonu ve klinik önemi bildirilmiştir. Kolon (88) ve özefagus kanserlerinde (30, 89) TIMP-3 ekspresyonundaki bölgesel kaybın veya azalmanın, tümörün invazyonunu arttırdığı, ileri evre ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (28,30). Ayrıca meme kanserinde yüksek TIMP-3 ekspresyonu olan hastaların hastalısız sağkalım

sürelerinin, düşük ekspresyon gösteren hastalardan daha uzun olduğu bildirilmektedir (90). TIMP-3 ekspresyonunda artmanın sağlanmasının yeni bir kanser tedavi modelini oluşturulabileceği bildirilmektedir (30). MMP inhibitörlerinin geliştirildiği ve bunların yeni araştırma ilacı olarak denendiği (71) ancak MMP inhibitörlerinin tek başına kullanılmasından ziyade MMP inhibitörlerinin TIMP-3 artışına neden olacak ajanlar ile kombinasyonunun daha etkili olabileceğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (30). Bu çalışmaların sonuçları, TIMP-3 ekspresyonlarının azalması ile tümör hücrelerinin daha agresif bir fenotip kazandığını göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar, MMP'ler ile TIMP'ler arasındaki denge düşünüldüğünde, düşük TIMP değerlerinin MMP'ler lehine dengenin bozulması nedeniyle tümör hücrelerin daha invazif fenotip kazanmasına neden olacağı görüşünü desteklemektedir. Mino ve ark. (2007), KHDAK'de düşük TIMP-3 düzeylerinin patolojik evre ve lenf nodu tutulumu ile korele olduğunu ve TIMP-3 düzeylerinin KHDAK'de bağımsız bir prognostik faktör olduğunu bildirmişlerdir. TIMP-3 ekspresyonunun % 22.4 olguda ( 32/143 olgu) arttığını bildirmişlerdir (92). Ayrıca yüksek TIMP3 ekspresyonu olan grupta MMP-2 ekspresyonlarının düşük olduğunu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. MMP-9 ekspresyonları ile TIMP-3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Ayrıca TIMP-3 ekspresyonunun daha çok SHK'de olduğunu bildirmişlerdir. Bizim olgularımızda yüksek TIMP-3 ekspresyonu olan olguların oranı %32 (20/62)'dir ve sadece 6 olguda TIMP-3 ekspresyonu yoktur. Yüksek TIMP-3 ekspresyon oranı ve TIMP-3 ile MMP-9 ekspresyonları arasında anlamlı bir korelasyon olmaması açısından, sonuçlarımız Mino ve ark.'nın çalışması ile uyumludur. Ancak bizim olgularımızda yüksek TIMP-3 ekspresyonu gösteren olgularda, düşük MMP-2 ekspresyonunun bulunmaması ve TIMP-3 düzeyleri ile lenf nodu tutulumu arasında korelasyon olmaması, Mino ve ark. çalışması ile uyum göstermemektedir. Bizim olgularımızda bu çalışmadaki gibi TIMP-3 ekspresyonları ile evre arasında ilişki vardı. Ancak bu ilişki zıt yönde idi, çünkü Mino ve ark. düşük TIMP-3 ekspresyonu ile ileri evre arasında ilişki bulurken, bizim çalışmamızda yüksek TIMP-3 ekspresyonu ile ileri evre arasında korelasyon vardı.

Literatürde TIMP-3 ekspresyonunda azalma veya kayıp ile tümörün invaziv fenotip kazanması arasındaki ilişkiyi gösteren bu çalışmalar yanısıra farklı sonuçlar bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Yang ve Hawkes (1992), hücre kültüründe civciv embryo fibroblast hücrelerinde, TIMP-3 proteininin hücrelerin onkojenik transformasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir (93). Ayrıca Canovas ve ark (2008), uveal melanomada TIMP-1, TIMP-3 ve TGF- $\beta$  ekspresyonlarının arttığını ve bu durumun uveal melanoma gelişiminde

ve/veya progresyonunda rolü olduğunu bildirmişlerdir (94). Bizde ileri evre olgularda yüksek TIMP-3 ekspresyonunun erken evre olgulara göre anlamlı olarak daha fazla olduğunu saptadık ( %30 vs %13). Bu sonuç Canovas ve ark. 'nın sonuçları ile uyumlu olmakla birlikte literatürde daha önce bildirilen çalışmalar ile uyum göstermemektedir. Ancak TIMP-3 düzeylerinin düşük veya yüksek olması ile tümörün boyutu, histolojik tipi, lenf nodu tutulumu ve sağkalım arasında korelasyon saptayamadık. TIMP-3 düzeyleri ile ilgili bu farklı sonuçların açıklanabilmesi için daha geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

HGF ve c-Met' in MMP ve ürokinaz gibi proteazları arttırdığı bilinmektedir (16-18). HGF ve c-Met' in invazyon ve metastazı artırıcı etkilerinin MMP ve TIMP'ler ile ilişkisini değerlendiren çalışmalar çok azdır (17,18). Biz de bu nedenle MMP ve TIMP' ler ile HGF/c-Met' in ilişkisini değerlendirdik. Bu amaçla dört grup oluşturduk: 1) HGF ve c-Met immunpozitifliği 0 ve/veya 1+ olanlar, 2) HGF ve c-Met, ikisi de 2+ olanlar 3) HGF, 0 veya 1+ olanlar ve c-Met 2+ olanlar 4) c-Met, 1+ olanlar ve HGF 2+ olanlar. Bu 4 grupta MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA' nın ekspresyon oranlarına baktık. HGF ve c-Met ekspresyonları ile, MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 arasında korelasyon bulamadık. Ancak TIMP-3'ün, HGF güçlü ekspresyonu (Grup 4,  $p=0.002$  ) veya HGF/c-Met koekspresyonu (Grup 2,  $p=0.010$ ) olan olgularda istatistiksel olarak daha fazla güçlü ekprese olduğunu saptadık. Bu veri, KHDAK'de, HGF/c-Met yolağının sinyal iletiminde, TIMP-3'ün önemli hedef moleküllerinden birisi olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuyu açıklayıcı ileri evre olgularla gerçekleştirilecek kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kanser hücrelerinin invazyon kapasitelerinde önemli özelliklerinden diğeri, hücrenin motilite kazanmasıdır. HGF'nin VEGF yolağını aktive ederek anjiogenezi arttırdığı ve RhoA aracılığıyla hücre motilitesini arttırdığı bilinmektedir (18, 21, 76). Anjiogenezin artması ve tümör hücrelerinin motilite kazanması, invaziv fenotip özelliklerinden biridir. Rho'ların bazı kanserlerde ekspresyonun anormal biçimde arttığı ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Rho'lar ve onların efektör molekülü raf'in, HGF ile indüklenen hücre migrasyonunda rol oynayan sinyal ileti molekülleri olduğu bildirilmektedir. Hücre motilitesini arttıran Rho GTPaz'ların pek çok kanserde motiliteyi arttırdığı gibi, MMP' leri etkileyerek (75) invazyonu arttırdıkları (73) ve ayrıca onkogenezdeki etkileri bildirilmektedir (74). Bizim çalışmamızda güçlü RhoA ekspresyonu saptanan 5 (%18) olgunun, güçlü HGF ekspresyonu ( $p=0.045$ ) ve HGF/ c-Met koekspresyonu olan olgular olması ( $p=0.011$ ) ve bu olgularının

tamamının AK olması, AK'de HGF ve bununla ilişkili olarak güçlü RhoA ekspresyonunun önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda da olgularının %48' inde HGF, % 81'inde c-Met'in güçlü ekspresyon göstermesi, KHDAK'de HGF/c-Met yolağı aktivasyonunun önemli olduğu görüşünü desteklemektedir. c-Met' in ligand-bağımlı ve ligand- bağımsız aktivasyonu bilinmektedir (6, 34). Bizim çalışmamızda HGF güçlü ekspresyonunun, c-Met'ten daha düşük olması olguların bir kısmında ligand-bağımsız aktivasyon olasılığını desteklemektedir. c-Met'in ligand bağımsız aktive olmasında bilinen en önemli mekanizmalardan birisi de reseptör mutasyonlarıdır. Reseptörün özellikle sinyal iletiminde görevli olan bölgelerindeki mutasyonlar sonucunda kendiliğinden (constitutive) aktivasyonu olabilmektedir. Bu da KHDAK gelişiminde c-Met reseptör mutasyonlarının önemli olabileceğini düşündürmüştür. Farklı tümör tiplerinde c-Met mutasyonlarının sadece tümör progresyonuna değil, tümörün invaziv ve metastatik fenotip kazanmasına da neden olduğu bildirilmektedir (33,36). Ancak KHDAK'de HGF/c-Met yolağı aktivasyonunda c-Met mutasyonlarının rolüne ilişkin veriler çelişkilidir. Bildirilen mutasyonların çoğu, c-Met'in jukstamembranal ve tirozin kinaz bölgesinde yerleşimlidir. Biz de bu nedenle hem jukstamembranal hem de tirozin kinaz bölgelerini içerecek şekilde, c-Met'in transmembranal ve sitoplazmik bölgelerini olası mutasyonlar açısından inceledik. c-Met 'in gDNA'sının çift yönlü dizi analizlerinde 13 - 19'uncu ekzonlar arasında mutasyon saptayamadık. Daha önce literatürde bildirilen somatik mutasyonların da olgularımızda olmadığını saptadık. Ancak, c-Met'in tirozin kinaz aktivitesi gösteren bölgelerini kodlayan 20 ve 21'inci ekzonlarda c1254 T-->C transisyonu (D1254D) ve g1339 A-->G transisyonu (A1339A) şeklinde iki adet amino asit değişikliğine yol açmayan sessiz mutasyon saptadık.

Annalisa Lorenzato ve ark, c-Met'in somatik mutasyonlarının primer tümör dokusundan ziyade metastatik tümör dokularında olduğunu bildirmektedirler (36). Ma ve ark da, c-Met mutasyonlarının KHDAK'de daha çok tümörün invaziv yüzünde olduğunu ve bunun da; c-Met'in tümör invazyonu ve progresyonunda anahtar rol oynayan bir molekül olduğu hipotezini desteklediğini bildirmektedirler (33). Ancak diğer bazı araştırmacılar, c-Met aktivasyonunda reseptör mutasyonlarının önemli olmadığını bildirmektedirler. Ancak biz çalışmamızda c-Met'in mutasyonları ile tümörün histolojik tipi, tümör boyutu, evresi, lenf nodu metastazı ve nüks oranı arasında bir ilişki bulamadık. Ayrıca bu mutasyonların; HGF,



c-Met, HGF/c-Met, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA ile aralarında da anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Elde edilen IHK ve mutasyon sonuçlarının hastaların demografik ve klinikopatolojik bulguları ile korelasyonuna bakıldığında ise, HGF, c-Met, HGF/c-Met, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA ile yaş, cinsiyet, sigara öyküsü, tümör boyutu ve nüks oranı arasında korelasyon bulunmadı. İleri evre ile TIMP-3, ve lenf nodu tutulumu ile HGF/c-Met koekspresyonu arasında anlamlı korelasyon olduğu saptandı. Tümör hücrelerinin invaziv kapasitesini arttırdığı bildirilen MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA'nın güçlü ekspresyonlarının HGF/c-Met koekspresyonu olan olgularda tümörün daha invaziv karakter kazanmasına neden olabileceği ve klinikopatolojik bulguları olumsuz yönde etkileyeceği hipotezi ile RhoA, MMP ve TIMP'lerin güçlü ekspresyonu ile HGF/c-Met koekspresyonlarının birlikteliği olan gruplar ile olmayan gruplar arasında klinikopatolojik bulgular açısından farklılık olup olmadığına baktık. Bu amaçla; 1) HGF ve c-Met immunpozitifliği 0 ve/veya 1+ olanlar, 2) HGF ve c-Met, ikisi de 2+ olanlar 3) HGF, ve /veya c-Met 2+ olanlar ile 1) MMP-2 ekspresyonu 0 ve 1+ olanlar ile 2) MMP-2 ekspresyonu 2+ olanlar, şeklinde 6 grup (3x2) olacak şekilde gruplanmış ve her bir alt grup ile, tümörün boyutu, histolojik tipi, evresi, lenf nodu metastazı, nüks oranı ve sağkalım arasında korelasyon olup olmadığına bakılmıştır. Bu karşılaştırmalar, aynı şekilde TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA için de gerçekleştirilmiştir. MMP-9'un güçlü ekspresyonu saptanamadığı için, MMP-9 ile HGF/c-Met koekspresyonunun birlikteliğinin klinikopatolojik veriler ile ilişkisi değerlendirilmemiştir. Bu değerlendirmeler sonrasında HGF/c-Met koekspresyonuna eşlik eden MMP-2, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA güçlü ekspresyonlarının tümörün boyutu, histolojik tipi, evresi, lenf nodu metastazı ve nüks oranı üzerine anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Bu değerlendirmeler, ayrıca TIMP-1+TIMP-3 güçlü ekspresyonu olan olgular ile HGF/c-Met koekspresyon varlığında da bakılmış ve istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. TIMP-3 ve RhoA güçlü ekspresyonları ile HGF/c-Met koekspresyonu arasında ilişki olmasına karşın, bunların birlikteliğinin olguların klinikopatolojik bulguları üzerinde etkisi bulunmamıştır.

Sağkalım verileri, hastalığın prognozu açısından önemli olduğu kadar, sağkalımı etkileyen moleküllerin yeni tedavi yaklaşımları açısından hedef moleküller olabilmesi nedeniyle önem taşımaktadır. Bizim çalışmamızda HGF, c-Met, HGF/c-Met, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-3 'de saptanan ekspresyon değişikliklerinin sağkalım üzerine etkisi yoktu. Ancak RhoA ekspresyonu güçlü pozitif (2+) olan olgularda (n=5) sağkalım süresi,

zayıf pozitif (1+) olan veya hiç ekspresyon olmayan gruba göre daha düşük bulundu. Bu parametrelerin HGF/c-Met koekspresyonu ile birlikteliğın de sağkalım üzerine etkileri değerlendirildiğinde, yine sadece RhoA'nın 2+ olduğu durumda sağkalım süresinin düştüğünü, MMP-2, TIMP-1 ve TIMP-3 'ün ise HGF/c-Met koekspresyonu olan olgularda sağkalım üzerine etkisi olmadığını gördük. c-Met mutasyonların sağkalım üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise; D1254D ve A1339A mutasyonlarının bir arada olduğu olguların sağkalım sürelerinin, tek mutasyonu olan veya hiç mutasyonu olmayan olgulardan daha düşük olduğu saptandı. Bu da karsinogenez sürecindeki genomik instabilitenin, büyüme faktörü sinyal ileti yollarında mutasyonlara yol açarak onkogen aktivasyonuna neden olabileceğini kanıtlayan bir bulgudur. Her ne kadar burada saptadığımız mutasyonlar reseptör aktivasyonuna yol açmamış olsa da, tek bir reseptörün yalnızca sinyal ileti bölgesinde iki mutasyonun saptanıyor olması KHDAK' nin progresyonunda DNA genomik instabilitenin rol oynayabileceğini ve bu instabilitenin sağ kalımı olumsuz etkilediğini göstermektedir.

## **8. SONUC ve ÖNERİLER**

Sonuç olarak KHDAK'lerinde 1) HGF/c-Met sinyal ileti yolağının rolünü ve bu yolağın olası invazyonu arttırıcı etkileri ile 2) HGF/c-Met'in MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-3 ve RhoA arasındaki ilişkiyi IHK yöntemi ile 63 KHDAK'li olguya ait parafine gömülü arşiv kesitlerinde ve ayrıca 3) c-Met mutasyonlarının bu yolağın aktivasyonu ve 4) diğer parametreler ile ilişkisini ve 5) tüm bu parametrelerin olguların klinikopatolojik bulguları ile ilişkisini incelediğimiz bu çalışmada;

1) HGF ve/veya c-Met güçlü ekspresyonun KHDAK'de sıklıkla gözlenirken, c-Met mutasyonlarının daha az sıklıkta olduğunu, 2) c-Met güçlü ekspresyonunun, olguların bir kısmında HGF'den bağımsız olduğunu, 3) HGF/c-Met koekspresyonunun AK'de daha sık gözlendiğini, 4) HGF/c-Met koekspresyonu olan olgularda lenf nodu metastazının daha fazla olduğunu, 5) KHDAK'de MMP-2 güçlü ekspresyonunun, MMP-9 güçlü ekspresyonundan daha sık görüldüğünü, 6) HGF/c-Met koekspresyonunun, RhoA ve TIMP-3 güçlü ekspresyonları ile ilişkili olduğunu, 7) TIMP-3 güçlü ekspresyonunun, ileri evre olgularda daha fazla olduğunu, 8) RhoA güçlü ekspresyonu veya c-Met'te çift mutasyon olan olgularda sağkalımın anlamlı olarak azaldığını gösterdik.

Sonuç olarak;

KHDAK'lerinde HGF/c-Met yolağının aktive olduğunun ve HGF/c-Met koekspresyonunun lenf nodu metastazı ile korele olduğunun belirlenmesi, KHDAK'lerinde HGF/c-Met yolağının kötü prognostik bir faktör olarak rolü olabileceğini düşündürmektedir. MMP'leri inhibe edici etkisi nedeni ile iyi prognostik faktör olabileceği öne sürülen TIMP-3'ün diğer birçok çalışmada olduğu gibi, bizim çalışmamızda da MMP'ler ile ilişkisi bulunmadı. TIMP-3'ün beklenenin aksine kötü prognostik faktör olabileceğini bildiren çalışmalar ile uyumlu olarak biz de TIMP-3'ün KHDAK'lerinde en önemli prognostik faktör olan evre ile ilişkili olduğunu ve ileri evre olgularda TIMP-3'ün güçlü ekspresyonunun, erken evre olgulara göre anlamlı olarak daha fazla olduğunu gösterdik. Aynı zamanda RhoA ve TIMP-3 ile HGF/c-Met koekspresyonunun korele olması, RhoA ve TIMP-3'ün kötü prognostik etkilerini HGF/c-Met aracılığıyla gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Bulgularımız, KHDAK tedavisinde, HGF/c-Met yolağının tek başına veya TIMP-3 ve RhoA'nın inhibisyonu ile birlikte blokajının yeni moleküler tedavi hedefleri olabileceğini düşündürmektedir.

c-Met’de görülen mutasyonların, c-Met ekspresyonlarından daha az sıklıkla görüldüğünü ve daha sıklıkla tirozin kinaz bölgesinde olduğunu, ancak tek mutasyonun sağkalımı etkilemezken, çift mutasyonun sağkalım süresini düşürmesi, KHDAK’ nin progresyonunda DNA genomik instabilitenin rol oynayabileceğini ve bu instabilitenin sağ kalımı olumsuz etkilediğini göstermektedir.

## **9. KAYNAK LİSTESİ**

1. Jemal A, Siegel R, Ward E ve ark. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2006; 56: 106-30.
2. Cabebe E, Wakelee H. Role of anti-angiogenesis agents in treating NSCLC: focus on bevacizumab and VEGFR tyrosine kinase inhibitors. Curr Treat Options Oncol 2007;8(1):15-27.
3. Ready N. Inhibition of the epidermal growth factor receptor in combined modality treatment for locally advanced non-small cell lung cancer. Semin Oncol. 2005;32(2-3):S35-41.
4. Byers LA, Heymach JV. Dual targeting of the vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor pathways: rationale and clinical applications for non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer. 2007;8 (2):S79-85.
5. Dietrich S, Uppalapati R, Seiwert TY, Ma PC. Role of c-MET in upper aerodigestive malignancies--from biology to novel therapies. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2005;24(3):149-62.
6. Jiang WG, Martin TA, Parr C ve ark. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. Crit Rev Oncol Hematol 2005;53(1):35-69.
7. Atabey N, Gao Y, Yao ZJ, ve ark. Potent blockade of hepatocyte growth factor-stimulated cell motility, matrix invasion and branching morphogenesis by antagonists of Grb2 Src homology 2 domain interactions. J Biol Chem. 2001;276(17):14308-14.
8. Ma PC, Maulik G, Christensen J ve ark. c-Met: Structure, functions and potential for therapeutic inhibition. Cancer Metastasis Rev 2003;22(4):309-325.
9. Parr C, Hiscox S, Nakamura T ve ark. NK4, a new HGF/SF variant, is an antagonist to the influence of HGF/SF on the motility and invasion of colon cancer cells. Int J Cancer 2000; 85: 563-570

10. Beviglia L, Matsumoto K, Lin CS ve ark. Expression of the c-Met/HGF receptor in human breast carcinoma : correlation with tumor progression. *Int J Cancer* 1997; 74: 301-309
11. Jagadeeswaran R, Jagadeeswaran S, Bindokas VP ve ark. Activation of HGF/c-Met pathway contributes to the reactive oxygen species generation and motility of small cell lung cancer cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: 1488–1494.
12. Peruzzi B, Bottaro DP. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Jun 15;12(12):3657-60.
13. Pepper MS, Matsumoto K, Nakamura T ve ark. Hepatocyte growth factor increases urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and u-PA receptor expression in Madin–Darby canine kidney epithelial cells, *J Biol Chem* 1992; 267: 20493–20496.
14. Jeffers M, Rong S, Vande Woude GF. Enhanced tumorigenicity and invasion-metastasis by hepatocyte growth factor/scatter factor-met signalling in human cells concomitant with induction of the urokinase proteolysis network. *Mol Cell Biol.* 1996;16(3):1115-25.
15. Lee KH, Hyun MS, Kim JR. Growth factor-dependent activation of the MAPK pathway in human pancreatic cancer: MEK/ERK and p38 MAP kinase interaction in uPA synthesis. *Clin Exp Metastasis* 2003;20(6):499-505.
16. Mizuno S, Matsumoto K, Li MY, Nakamura T. HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis. *FASEB J* 2005;19(6):580-2.
17. Schweigerer L, Rave-Fränk M, Schmidberger H, Hecht M. Sublethal irradiation promotes invasiveness of neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ;330(3):982-8.
18. Wang SW, Pan SL, Peng CY ve ark. CHM-1 inhibits hepatocyte growth factor-induced invasion of SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells by suppressing matrix metalloproteinase-9 expression. *Cancer Lett* 2007;257(1):87-96.

19. De Wever O, Dé Nguyen Q, Van Hoorde L ve ark. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent proinvasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *The FASEB Journal* 2004; 1-24.
20. Thomas P, Khokha R, Shepherd FA ve ark. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2000; 190: 150-156.
21. Simi L, Andreani M, Davini F ve ark. Simultaneous measurement of MMP9 and TIMP1 mRNA in human non small cell lung cancers by multiplexreal time RT-PCR. *Lung Cancer* 2004; 45: 171—179
22. Suzuki M, Iizasa T, Fujisawa T ve ark. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in non-small-cell lung cancer. *Invasion Metastasis* 1998-99;18(3):134-41.
23. Møller Sørensen N, Vejgaard Sørensen I, Ornbjerg Wurtz S ve ark. Biology and potential clinical implications of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in colorectal cancer treatment. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43(7):774-86.
24. Lipton A, Leitzel K, Chaudri-Ross HA ve ark. Serum TIMP-1 and response to the aromatase inhibitor letrozole versus tamoxifen in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(16):2653-8.
25. Mori M, Mimori K, Sadanaga N ve ark. Prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in esophageal carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 88: 575-578.
26. Aljada IS, Ramnath N, Donohue K ve ark. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein is associated with progression of human non-small- cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22 (16): 3218-3229.
27. Jumper C, Cobos E, Lox C. Determination of the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with either advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer prior to treatment. *Respir Med*

2004;98(2):173-7.

28. Bachman KE, Herman JG, Corn PG ve ark. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase- 3 gene suggests a supressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 798-802.

29. Baker AH, George SJ, Zaltsman AB ve ark. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer* 1999; 79: 1347-1355.

30. Miyazaki T, Kato H, Nakajima M ve ark. An immunohistochemical study of TIMP-3 expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *B J Cancer* 2004; 91: 1556-1560.

31. Castagnino P, Soriano JV, Montesano R, Bottaro DP. Induction of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is a delayed early cellular response to hepatocyte growth factor. *Oncogene* 1998;17(4):481-92. ve Ref11)

32. Maulik G, Kijima T, Ma PC ve ark. Modulation of the c-Met/Hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 620-627

33. Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S ve ark. Functional Expression and Mutations of c-Met and Its Therapeutic Inhibition with SU11274 and Small Interfering RNA in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 2005; 65 (4): 1479-1488.

34. Nakamura Y, Niki T, Goto A ve ark. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: An immunohistochemical analysis. *Cancer Sci* 2007, 98 (7): 1006-1013.

35. Nakamura Y, Matsubara D, Goto A ve ark. Constitutive activation of c-Met is correlated with c-Met overexpression and dependent on cell-matrix adhesion in lung adenocarcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2008, 99 (1): 14-22.

36. Lorenzato A, Olivero M, Patanè S ve ark. Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. *Cancer Res.* 2002;62(23):7025-30.



37. Ma PC, Kijima T, Maulik G ve ark. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res.* 2003;63(19):6272-81.
38. Chan SK, Gullick WJ, Hill ME. Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer –Search and destroy. *European Journal of Cancer* 2006; 42: 17-23.
39. Granville CA, Dennis PA. An overview of lung cancer genomics and proteomics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32(3):169-76.
40. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM; American College of Chest Physicians. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132(3):29S-55S.
41. Kopper L, Timar J. Genomics of lung cancer may change diagnosis, prognosis and therapy. *Pathol Oncol Res* 2005; 11(1): 4-10
42. Schwartz AG. Genetic predisposition to lung cancer. *Chest* 2004;125: 86S-89S.
43. Radzikowska E, Głaz P, Roszkowski K. Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases. *Ann Oncol.* 2002 Jul;13(7):1087-93.
44. Bryant A, Cerfolio RJ. Differences in epidemiology, histology, and survival between cigarette smokers and never-smokers who develop non-small cell lung cancer. *Chest* 2007;132(1):185-92.
45. Pirozynski M. 100 years of lung cancer. *Respir Med* 2006; 100: 2073-84.
46. Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer* 2005;117(2):294-9.

47. Chatkin JM, Abreu CM, Fritscher CC, Wagner MB, Pinto JA. Is there a gender difference in non-small cell lung cancer survival? *Gend Med*. 2004 Aug;1(1):41-7.
48. Zang EA, Wynder EL. Differences in lung cancer risk between men and women: Examination of the evidence. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 183–190.
49. Brownson RC, Loy TS, Ingram E ve ark. Lung cancer in nonsmoking women. Histology and survival patterns. *Cancer* 1995; 75: 29–33.
50. Wynder EL, Hoffmann D. Re: Cigarette smoking and the histopathology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(19):1486-8.
51. Hoffmann D, Djordjevic MV. Chemical composition and carcinogenicity of smokeless tobacco. *Adv Dent Res*. 1997 Sep;11(3):322-9.
52. Dacic S. Molecular profiling of lung carcinoma: identifying clinically useful tumor makers for diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7 (1): 77-85.
53. Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: Looking to the future. *J Clin Oncol* 2005; 14:3175- 83.
54. Jin M, Inoue S, Umemura T ve ark. Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non–small cell lung cancer at stages I and II. *Lung Cancer* 2001; 34: 207–218.
55. Husgafvel-Pursiainen K, Ridanpää M, Anttila S, Vainio H. *p53* and *ras* gene mutations in lung cancer: implications for smoking and occupational exposures. *J Occup Environ Med* 1995; 37: 69–76.
56. Vineis P, Veglia F, Benhamou S ve ark. CYP1A1 T3801 C polymorphism and lung cancer: A pooled analysis of 2451 cases and 3358 controls. *Int J Cancer* 2003; 104:650-7.
57. Le Marchand L, Guo C, Benhamou S ve ark. Pooled analysis of the CYP1A1 exon 7 polymorphism and lung cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2003; 14:339- 46.
58. Shaw GL, Falk RT, Deslauriers J ve ark. Debrisoquine metabolism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 41-8.

59. Hung RJ, Boffetta P, Brockmoller J ve ark. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: A pooled analysis. *Carcinogenesis* 2003; 24:875-82.
60. Berwick M, Vineis P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: An epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:874-97.
61. Spitz MR, Wei Q, Dong Q, et al: Genetic susceptibility to lung cancer: The role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12:689-98.
62. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *Int J Cancer*. 2006;119(3):477-83.
63. Danilkovitch-Miagkova A, Miagkov A, Skeel A ve ark. Oncogenic mutants of RON and Met receptor tyrosine kinases cause activation of the  $\beta$ - katenin pathway. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 5857-68
64. Nawrocki-Raby B, Gilles C, Polette M, Bruyneel E, Laronze JY, Bonnet N, Foidart JM , Mareel M, Birembaut P. Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer* 2003; 105: 790-5.
65. Passlick B, Sienel W, Seen-Hibler R ve ark. Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(10):3944-8.
66. Sienel W, Hellers J, Morresi-Hauf A ve ark. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003;103(5):647-51.
67. Suzuki M, Iizasa T, Fujisawa T ve ark. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in non-small-cell lung cancer. *Invasion Metastasis* 1998-99;18(3):134-41.

68. Gouyer V, Conti M, Devos P ve ark. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. *Cancer* 2005;103(8):1676-84.
69. Anand-Apte B, Bao L, Smith R ve ark. A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol* 1996; 74: 853-62.
70. Ahonene MA, Baker AH, Kaharl VM. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res* 1998; 58: 2310-5.
71. Nozaki S, Sissons S, Chien DS ve ark. Activity of biphenyl matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in a human breast cancer orthotopic model. *Clin Exp Metast* 2003; 20: 407-12.
72. De Wever O, Dé Nguyen Q, Van Hoorde L ve ark. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent proinvasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *The FASEB Journal* 2004: 1-24.
73. del Peso L, Hernandez-Alcoceba R, Embade N ve ark. Rho proteins induce metastatic properties in vivo. *Oncogene* 1997;15(25):3047-57.
74. Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* 1999;81(5):682-7.
75. Ikoma T, Takahashi T, Nagano S ve ark. A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice. *Clin Cancer Res* 2004; 10(3):1192-200.
76. Kitajo H, Shibata T, Nagayasu H ve ark. Rho regulates the hepatocyte growth factor/scatter factor-stimulated cell motility of human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncol Rep* 2003;10(5):1351-6.

77. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL 3rd ve ark. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her-2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68(5): 1471- 4.
78. To C, Seiden I, Liu N ve ark. High expression of Met/ Hepatocyte growth factor receptor supresses tumorigenicity in NCI-H1264 lung carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2002; 273: 45-53.
79. Stabile LP, Lyker JS, Land SR ve ark. Transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor in the airways show increased susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27(8): 1547-55.
80. Yang Y, Wislez M, Fujimoto N ve ark. A selective small molecule inhibitor of c-Met, PHA-665752, reverses lung premalignancy induced by mutant K-ras. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(4): 952-960.
81. Youles M, Holmes O, Pethoukhov MV ve ark. Engineering the NK1 fragment of hepatocyte growth factor/scatter factor as a Met receptor antagonist. *J Mol Biol* 2008; 377(3): 616-22.
82. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherard E , Vande Woude JF. Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003; 4: 915-925.
83. Kim SH, Choi HY, Lee J ve ark. Elevated activities of MMP-2 in the non-tumorous lung tissues of curatively resected stage I NSCLC patients are associated with tumor recurrence and a poor survival. *J Surg Oncol* 2007;95(4):337-46.
84. Toi M, Ishigaki S, Tominaga T. Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):113-24.
85. Stetler-Stevenson WG. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Metastasis Rev.* 2008; 27(1):57-66.
86. Bian J, Wang Y, Smith MR ve ark. Supression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor metalloproteinases-3 (TIMP-3). *Carcinogenesis* 1996; 17: 1805-11.

87. Anand-Apte B, Pepper MS, Voest E ve ark. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 817-23.
88. Powe DG, Brough JL, Carter GI ve ark. TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1997; 75: 1678-83.
89. Darnton SJ, Hardie LJ, Muc RS, ve ark. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) gene is methylated in the development of esophageal adenocarcinoma: loss of expression correlates with poor prognosis. *Int J Cancer* 2005;115(3):351-8.
90. Span PN, Lindberg RL, Manders P ve ark. Tissue inhibitors of metalloproteinase expression in human breast cancer: TIMP-3 is associated with adjuvant endocrine therapy success. *J Pathol* 2004; 202: 395-402.
91. Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ ve ark. Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer* 2005;92(12):2171-80.
92. Mino N, Takenaka K, Sonobe M, Miyahara R, Yanagihara K, Otake Y, Wada H, Tanaka F. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and its prognostic significance in resected non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2007; 95: 250-257.
93. Yang TT, Hawkes SP. TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(22): 10676-80.
94. Canovas D, Rennie IG, Nichols CE, Sisley K. Local environmental influences on uveal melanoma. *Cancer* 2008; 112(8): 1787-94.