

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MİDE KANSERİNDE MMP-9 PROMOTÖR POLİMORFİZMİNİN
(-1562 C/T) İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Zeynep DOĞRU**

**Danışman
Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

İstanbul – 2015

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

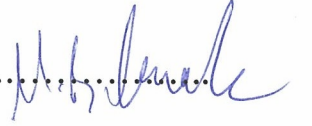
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi **Zeynep DOĞRU** tarafından hazırlanan “**Mide Kanserinde MMP-9 Promotor Polimorfizminin (-1562 C/T) İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 27.01.2015

(Jüri Üyesinin Ünvanı , Adı , Soyadı ve Kurumu) :

İmzası :

Jüri Üyesi: Doç.Dr. Burcu Irmak YAZICIOĞLU
Danışman-HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....


Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Özlem KURNAZ
HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....


Jüri Üyesi : Doç.Dr.Ayça SAYI YAZGAN
İ.T.Ü. Öğr.Üyesi

.....


Jüri Üyesi : Doç.Dr.Veyssel Sabri HANÇER
İstanbul Bilim Üniv. Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

Jüri Üyesi : Prof.Dr.Emel BOZKAYA
HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2013 – 2015 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın tamamlanması süresince büyük bir gayret ve özveriyle çalışmamı takip eden, gösterdiği sabır ve hoşgörüsüyle bana destek olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'na; lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince gösterdiği sabır ile bana destek olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Baki YOKEŞ'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan Arş. Gör. Anıl CEBECİ, Arş. Gör. Deniz KANCA ve Ar. Gör. Ozan TİRYAKİOĞLU'na teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her başım sıkıştığında yanımda olan, beni bu günlere getiren sevgili anneme, babama ve ağabeyime, neşe kaynağım Umut Ege DOĞRU'ya teşekkür ederim.

Son olarak bu zor günlerde en çok kahrımı çeken, her türlü maddi manevi desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Dilara DEVRANOĞLU, Gizem FİDANÖZ DUMAN, Sevilay ŞAHOĞLU GÖKTAŞ ve Yağmur BOZKURT'a teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul, 2015

Zeynep DOĞRU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	
KISALTMALAR	III
ŞEKİLLER.....	VI
TABLolar.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser Biyolojisi.....	1
1.1.1. Kanser Hücrelerinin Temel Özellikleri	2
1.1.2. Kansere Neden Olan Faktörler	3
1.1.3. Türkiye’de Kanser İstatistikleri.....	4
1.2. Mide Kanseri	5
1.2.1. Mide Anatomisi	5
1.2.2. Mide Kanseri Etiyolojisi	6
1.2.3. Mide Kanserinde Evreleme (TNM Sistemi)-WHO 2000.....	8
1.2.4. Mide Kanserine Neden Olan Prognostik Faktörler	11
1.2.4.1. Klasik Faktörler	11
1.2.4.2. Epigenetik Değişiklikler.....	14
1.1.4.3. Genetik Polimorfizm	15
1.3. Matris Metalloproteinazlar (MMP’ler).....	16
1.3.1. Matrisin Ailesi Üyeleri	17
1.3.2. Matrisin Gen İfadesinin Düzenlenmesi	20
1.3.3. Pro-Matrisinlerin Aktivasyonu: Pro-MMP2 Hücre Yüzey Aktivasyonu. 21	
1.3.4. TIMP’ler Çok Fonksiyonlu Proteinlerdir	22
1.4. MMP-9.....	22
1.4.1. MMP-9 Yapısı ve Aktivitesi	23
1.4.2. MMP-9 Hücre Ekspresyonu	27
1.4.3. MMP-9’u Aktive Eden Bazı Regülatörler.....	25
1.4.4. MMP-9 ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	27
2.AMAÇ.....	29
3.MATERYAL.....	31

3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler	31
3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve DNA Polimeraz Enzimi	31
3.3. Primerler	31
3.4. Restriksiyon Enzimi ve Restriksiyon Tamponu	32
3.5. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar	32
3.6 DNA Büyüklük Markörleri	33
3.7 Cihazlar ve Markalar	33
4.METOD	35
4.1. Primer Seçimi	35
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	35
4.3. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	36
4.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	37
4.5. Dizi Analizi	39
4.6. İstatistiksel Veri Analizi	39
5.SONUÇ	40
5.1. Örneklerin Tanımı	40
5.2. MMP-9 Geni Promotör Bölgesi -1562 C/T Polimorfizminin PZR-RFLP Yöntemi ile Moleküler Analizi	41
5.2.1. İlgili Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması	41
5.2.2. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi.....	41
5.3. Dizi Analizi.....	42
5.4. Verilerin İstatistiksel Analizi	43
6. TARTIŞMA	46
7.KAYNAKLAR	49
8.ÖZGEÇMİŞ	60

KISALTMALAR

- (NH₄)₂SO₄** : Amonyum Sülfat
A: Adenin
A: Amper
AP-1: Aktivatör Protein-1
Bç, Bp: Baz çifti
bFGF: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
BPB : Bromofenol Mavisi
C: Sitozin
C-/COOH: Karboksil
CDK: Siklin Bağımlı Kinaz
Chk-1,-2: Kontrol Noktası Kinaz 1,2
CIMP: CpG Adası Metilatör Fenotip
dk: Dakika
DNA: Deoksiribonükleik Asit
dNTPs: Deoksiribonükleotid
EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
ESM: Eksrasellüler Matris
EtBr: Etidyum Bromür
Ets: E-26 Transkripsiyon Faktörleri
g: Gram
G: Guanin
GPI: Glikozilfosfatidilinositol
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
***h.pylori*:** Helikobakter Pylori
HW : Hardy-Weinberg
HLTF: Helikaz-Benzeri Transkripsiyon Faktörleri
ICAM-1: İnterselüler Adezyon Molekülü -1
IL-1,8: İnterlökin-1,8
IL1RN: IL-1 Reseptör Antagonisti

K: Kontrol
Kb: Kilo Baz
LFA-1: Lökosit Fonksiyonu İle İlişkili Antijen -1
M: Metastaz
mA: Miliamper
mg: Miligram
MgCl₂: Magnezyum Klorür
MGMT: O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz
µg: Mikrogram
ml: Mililitre
µl: Mikrolitre
mM: Milimolar
MMP: Matris Metallaproteinaz
MS: Multiple Skleroz
MSI: Genetik Kararsızlık
MSS: Merkezi Sinir Sistemi
MT-MMP: Membran Tip Matris Metallaproteinaz
N.K: Negatif Kontrol
N: Nodal
N:Normal
NaCl: Sodyum Klorür
NAT1: N-asetiltransferaz1
P.K: Pozitif Kontrol
PD-ECGF: Trombosit Türevli Endotel Hücresi Büyüme Faktörü
Pea3: Polyomavirüs Artırıcı A-Bağlama Proteini-3
PLG: Plasminogen
POT1: Telomer 1 Koruyucusu
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAR-beta: Retinoik Asit Reseptör Beta
RASİ: Romatoid Artrit
Rb : Retinoblastoma
RFLP : Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RUNX3: Cücelikle İlişkili Transkripsiyon Faktörü 3

SAF-1: Serum Amiloid-A Aktive Edici Faktör
(SAF)-1(SAPK)/JNK: Stres İle Aktifleşen Protein Kinaz
SNP : Tek Nükleotid Polimorfizmi
sn: Saniye
SOCS-1: Sitokin 1 sinyal susturucu
T: Tümör
TBE : Tris-Borik Asit-EDTA
TE : Tris-EDTA
TGFB: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TIMP: MMP Doku İnhibitörleri
TNF : Tümör Nekroziz Faktör
TSP1: Tümör Baskılayıcı Bölge 1
U : Ünite
UV: Ultraviyole
V: Volt
VCAM-1: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VLA-4: İleri Geç Antijen 4
WHO : Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1. DNA Hasarına Neden Olan Faktörler ve DNA Hasarının Sonuçları.....	1
Şekil 1.2. Kanser Hücrelerinin Temel Özellikleri	3
Şekil 1.3. Midenin Kısımları	6
Şekil 1.4. Erken ve İlerlemiş Mide Kanserinin İnvazyon Derinlikleri Arasındaki Farklar	9
Şekil 1.5. Hematojen Metastazın Moleküler Mekanizması	11
Şekil 1.6. Omurgalı Matrislerinin Domain Düzenlemesi	20
Şekil 1.7. MMP-9'un Domain Yapısı.....	24
Şekil 1.8. İnflamasyon ve MMP-9 Salgılanmasında Nötrofillerin Rolü.....	25
Şekil 1.9. İnflamasyon ve MMP-9 Salgılanmasında Makrofajların Rolü	26
Şekil 4.1. PZR ile Çoğaltılacak Hedef Bölgenin Belirlenmesi	34
Şekil 5.1. MMP-9 -1562 C/T Polimorfik Bölgesinin PZR İle Amplifikasyon Sonuçlarının %2'lik Agaroz Jelde Görünümü	41
Şekil 5.2. Polimorfik Promotör Bölgesi Yapılan Örneklerin RFLP Sonuçlarının %2'lik Agaroz Jelde Görünümü.....	42
Şekil 5.3. Dizi Analizine Gönderilecek PZR Örneklerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntüsü	42
Şekil 5.4. MMP-9 -1562 Promotör Bölgesi C/C Homozigot Kromatogram Görüntüsü	43

TABLULAR

Sayfa No

Tablo 1.1. Virüsler İle İlgili Bazı Kanserler.....	4
Tablo 1.2. Erkeklerde en sık görülen ilk 10 kanser (Birleşik Veri Tabanı, 2009)	4
Tablo 1.3 Kadınlarda en sık görülen ilk 10 kanser (Birleşik Veri Tabanı, 2009)	5
Tablo 1.4. Evre Grupları	10
Tablo 1.5. Matris Metalloproteinazlar	19
Tablo.3.1. MMP-9 Geni -1562C/T Polimorfik Bölgesini Oluşturup Çoğaltmak İçin Kullanılan Primerler	32
Tablo 4.1. PZR Bileşenleri ve Miktarları	36
Tablo 4.2. PZR Koşulları	36
Tablo 4.3. RFLP Reaksiyon Miktarları	37
Tablo 4.4 . Agaroz Jel Konsantrasyonları, Kullanılan Yöntemler ve Yükleme Koşulları	38
Tablo 5.1. Mide Kanseri Hastalarının Belirli Karakteristik Özelliklerine Göre Yüzdeleri	40
Tablo 5.2. Tümör Dokularına Ait MMP-9 -1562 Promotör Bölgesi Allotip Sayısı ve Yüzdeleri	43
Tablo 5.3. Hardy-Weinberg Dengesine Göre Genotip Dağılımı.....	44
Tablo.5.3. Homozigot C/C ve Heterozigot C/T Genotiplerinin Kategorik Değişkenler Açısından Mantel Haenzsel ve Fisher Kesin Olasılık Testleri ile Karşılaştırılması.....	45

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı: Zeynep DOĞRU

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU

Tez Türü ve Tarihi: Yüksek Lisans – Ocak 2015

ÖZET

MİDE KANSERİNDE MMP-9 PROMOTÖR POLİMORFİZMİNİN (-1562 C/T) İNCELENMESİ

Dünyada kanser nedenli ölümlerde 2. sırada yer alan mide kanseri, Japonya, Malezya gibi uzak doğu ülkelerinde daha sık görülür. Sigara, alkol, beslenme, yaş, cinsiyet, *helicobakter pylori* enfeksiyonu vs. mide kanserine neden olan çevresel faktörler arasında; kan grubu ise genetik faktörler arasında sayılabilir. Matris metalloproteinazlar mide kanseri patolojisini etkilemektedir. Matris metalloproteinazlar, ekstrasellüler matrisin bozulmasına neden olan proteindirler. Ekstrasellüler matrisin bozulması tümörlü hücrelerin yayılımını hızlandırır. Matris metalloproteinaz üyeleri olan MMP-2 ve MMP-9, ekstrasellüler matrisin bozulmasında önemli rol oynar. MMP-9 -1562 C/T polimorfizmi çeşitli kanser türlerinde invazyonla ilişkilidir.

Yapılan bu tezde amaç, MMP-9 geni promotör bölgesi 1562. pozisyonunda görülen C/T tek nükleotid polimorfizmi ve mide kanseri arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır. Bu çerçevede 30 hastada polimerik zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi yöntemiyle MMP9 -1562C/T tek nokta polimorfizmi tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mide kanseri, Matris metalloproteinaz, MMP-9, polimorfizm

GENERAL INFORMATION

Name and Surname: Zeynep DOGRU

Department: Molecular Biology and Genetics

Program: Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Associate. Prof. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOGLU

Degree Awarded and Date : Master of Science – January 2015

ABSTRACT

THE -1562C/T POLYMORPHISM ANALYSIS OF MMP-9 PROMOTOR REGIONS IN GASTRIC CANCER

Gastric cancer, which is the second lethal type of cancer in the world, is seen more in far eastern countries such as Japan, Malaysia. Smoking, alcohol, diet, age, sex, *helicobacter pylori* infection, etc. are among the environmental factors and blood type is among the genetic factor, which affecting gastric cancer. Matrix metalloproteinases affect the pathology of gastric cancer. Matrix metalloproteinases are proteinases that participate in ECM degradation. ECM degradation increases the speed of invasion. MMP-2 and MMP-9, which are members of the matrix metalloproteinases, play an important role in the degradation of extracellular matrix. MMP-9 -1562 C / T polymorphism is associated with invasion of various cancer types.

The aim of this thesis is to investigate the relationship between C/T single nucleotide polymorphism observed in MMP-9 gene promoter region 1562th position and gastric cancer.

In this context MMP-9 -1562 C/T single nucleotide polymorphisms were determined with the method of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism in 30 patients.

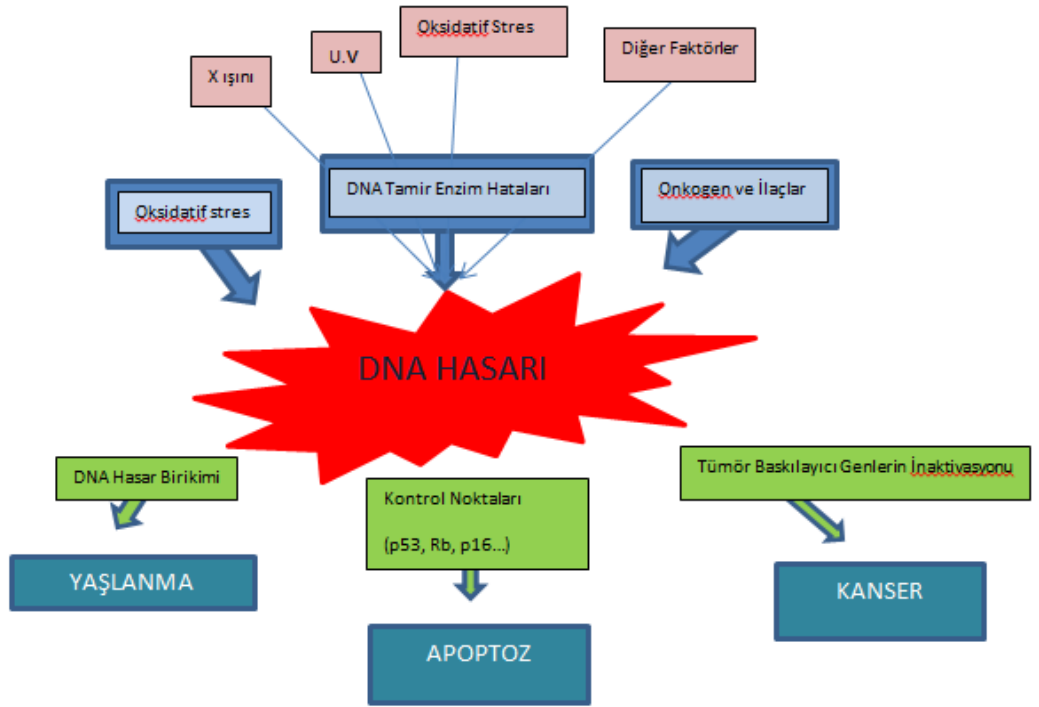
Key words: Gastric Cancer, MMP-9, Polymorphism, Matrix Metalloproteinase

1. GİRİŞ

1.1 . Kanser Biyolojisi

Kanser olgusu; kanser hücrelerinin gelişimi, hızlı bölünme kapasitesi, ölüm sinyallerine duyarsızlık nedeniyle apoptoza girememe, istila ve metastaz yeteneğiyle hücreler için mutasyon ve seleksiyonu içeren çok basamaklı bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Brooks ve diğ., 1998).

Kanserleşmeye neden olan kimyasalların çoğu mutajeniktir. DNA hasarları tamir enzimleriyle onarıldığında ya da onarılmadığında hücre apoptoza gidebilir. Bunu sağlayan tümör baskılayıcı genler ile apoptotik genlerin birlikte çalışmasıdır. Hücre apoptoza giderse tümör başlangıcı gerçekleşmemekte; gitmezse kanser ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.1) (Hanahan ve Weinberg, 2000).



Şekil 1.1: DNA hasarına neden olan faktörler ve DNA hasarının sonuçları (Hanahan ve Weinberg, 2000'den modifiye edilmiştir)

1.1.1. Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri

- **Bölünme Sinyallerinin Üretimi:**

Normal hücreler ortamda bulunan büyüme faktörlerinin belirlediği miktara ulaşıncaya kadar bölünmeye devam ederler. G0 evresine geldiklerinde ise yeni bir sinyal gelene kadar büyüme durur. Kanser hücreleri kendi büyüme hormonlarını sentezleyebilirler. Böylelikle bir kısıtlama olmadan bölünmeye devam ederler (Hanahan ve Weinberg, 2000).

- **Kontakt İnhibisyon Yokluğu:**

Kanser hücrelerinde, hücre yüzey adezyon molekülleri normal hücrelere göre daha az ifade edilir. Hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimi ise daha zayıftır. Etkileşim zayıf olduğu için morfoloji ve hücre iskeleti bozular. Morfolojisi bozulan tümör hücreleri normal hücrelere göre daha yuvarlaktır. Kültürü yapılan normal hücreler komşu hücrelerle temas etliğinde büyümeyi bırakırlar. Tümör hücreleri ise komşu hücrelerin üzerine yayılarak çok tabakalı şekilde çoğalmaya devam ederler (Hanahan ve Weinberg, 2000).

- **Sınırsız Bölünme Potansiyeli:**

Lösemiyle ilgili yapılan çalışmalarda, kanser hücrelerinin çoğunlukla farklılaşmanın erken evrelerinde bloke olarak kendi aktif bölünmelerine kararlı bir şekilde devam ettikleri anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, farklılaşmadaki bozukluk ile kanserleşme ilişkisini gösterir. Farklı türdeki lösemi hücreleri benzer genetik özellikler taşır. Bu da “kanser kök hücresi” tanımını ortaya çıkarmıştır (Hanahan ve Weinberg, 2000).

- **Apoptozdan Kaçış:**

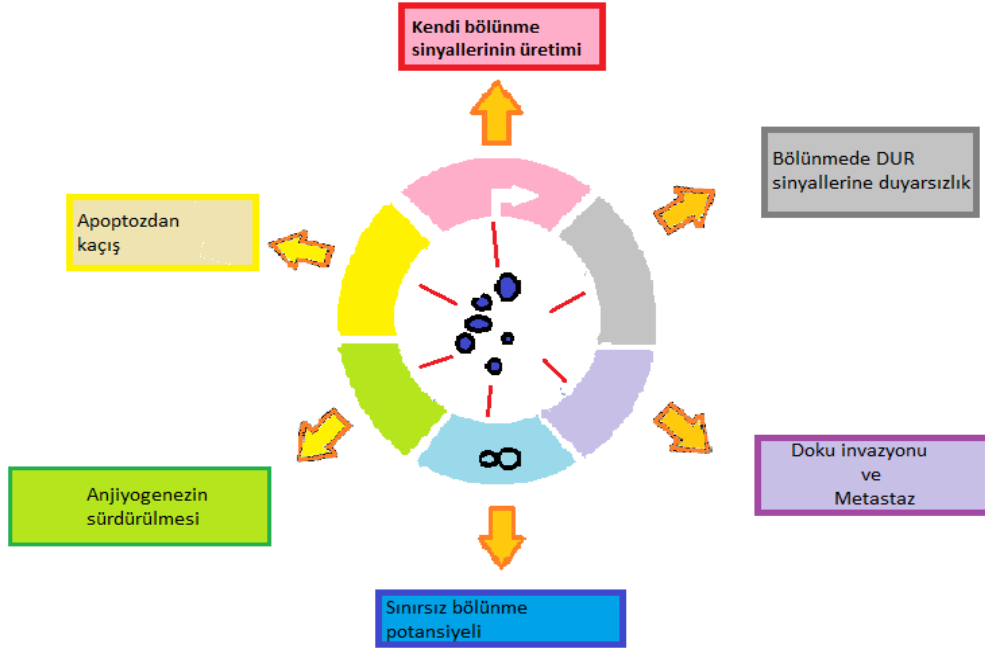
Kanser hücreleri apoptoza karşı dirençlidirler. Normal hücreler; DNA tamir ve tümör baskılayıcı gen özelliklerine sahip oldukları için tamir edilemeyen DNA hasarlarında apoptoza uğrarlar (Şekil 1.2) (Hanahan ve Weinberg, 2000).

1.1.2. Kansere Neden Olan Faktörler:

Kansere neden olan faktörler kalıtsal ya da sonradan kazanılmış olabilir. Çevresel etkenler, kalıtsal yatkınlığı olan bireylerde kanser sürecini hızlandırmaktadır (Jones ve Laird, 1999).

Radyasyon ve kanserojenik maddeler DNA molekülüne zarar verip mutasyon oluşturarak kansere neden olurlar (Jones ve Laird, 1999).

Ultraviyole ışınlar, tütün, alkol, aflatoksindeki kimyasallar ve forbol esterleri (protein kinaz-c üzerinden hücre bölünmesini sürekli uyarır) kansere neden olan başlatıcı ajanlardır (Jones ve Laird, 1999).



Şekil 1.2: Kansere neden olan hücrelerin temel özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2000'den modifiye edilmiştir).

Hormonlar, özellikle östrojen, bazı kanser gelişimlerinde tümör promotörleri olarak önemlidir. Kimyasallara ve radyasyona ek olarak bazı virüsler de kansere neden olmaktadır (Jones ve Laird, 1999). Kansere neden olan virüsler Tablo 1.1'de özetlenmiştir

Tablo 1.1: Virüsler ve ilgili oldukları bazı kanserler (McCance, 1998).

Familya	Kanser
RNA Virüsleri	
Flaviviride - Hepatit C	Hepatosellüler karsinoma
Retroviridae	Hematopoetik kanserler, sarkomalar, karsinomalar
DNA Virüsleri	
Hepadnaviridae	Hepatosellüler karsinoma
Papovaviridae -Papilloma virüsler -Polyomavirüsler	Papilloma ve karsinoma Değişik solid tümörler
Herpesviridae	Lenfoma, karsinoma ve sarkoma

1.1.3. Türkiye’de Kanser İstatistikleri:

2009’da yapılan çalışmalara göre Türkiye’de kadın ve erkek hastalarda en sık görülen kanser türleri Tablo 1.2 ve Tablo 1.3’te özetlenmiştir

Tablo 1.2: Erkeklerde en sık görülen ilk 10 kanser (Birleşik Veri Tabanı, 2009)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009*	2010*	2011*
Trakea, Akciğer ve Bronş	65,1	65,9	68,9	73,0	69,2	74,1	79,3	84,9
Prostat	24,9	28,6	28,9	32,3	37,6	44,0	51,4	60,0
Mesane	19,3	20,6	21,0	22,5	21,7	23,4	25,3	27,3
Kolorektal	16,5	16,2	18,2	19,1	20,8	22,5	24,3	26,3
Mide	14,1	14,9	14,8	17,3	18,0	19,1	20,3	21,6
Non-Hodgkin Lenfoma	6,3	5,9	6,9	7,6	6,9	8,5	10,4	12,7
Larinks	10,0	8,9	9,7	9,3	9,1	9,5	9,9	10,3
Pankreas	4,0	4,4	5,2	6,3	6,1	6,7	7,3	8,0
Böbrek	4,1	4,1	5,5	5,2	5,8	6,3	6,9	7,5
Beyin, Diğer Sinir Sistemi	4,7	5,7	5,4	5,8	6,1	6,2	6,3	6,4

Tablo 1.3: Kadınlarda en sık görülen ilk 10 kanser (Birleşik Veri Tabanı, 2009)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009*	2010*	2011*
Meme	34,7	35,0	37,6	35,9	40,7	42,1	43,6	45,1
Tiroid	7,3	9,6	10,8	14,4	16,2	19,7	24,0	29,8
Kolorektal	11,3	11,1	12,5	12,3	13,2	13,9	14,6	15,3
Uterus Korpusu	7,6	7,1	8,4	8,7	8,6	9,5	10,4	11,4
Trakea, Akciğer ve Bronş	7,4	7,4	7,7	7,8	8,2	8,7	9,3	9,9
Non-Hodgkin Lenfoma	4,4	4,0	4,9	5,2	5,0	6,0	7,2	8,6
Mide	6,4	6,9	7,6	8,4	7,7	8,0	8,3	8,6
Over	5,8	5,6	5,9	6,5	6,9	7,1	7,3	7,5
Uterus Serviksi	4,5	4,4	4,8	4,3	4,1	4,9	5,9	7,1
Beyin, Diğer Sinir Sistemi	3,6	4,0	4,6	4,6	4,4	4,5	4,6	4,7

1.2. Mide Kanseri

1.2.1 Mide Anatomisi ve Midenin Bölümleri

Sindirim sisteminin en geniş yeri olan mide, özofagus ile duodenum arasında bulunur (Arıncı ve Elhan , 2001: 241-245). Mide karın boşluğunun üst kısmında, diyafranın altındadır. Midenin ön üst yüzünün bir kısmı, karaciğer sol lobunun arkasında yer alır (Kuran O, 1983: 388-396).

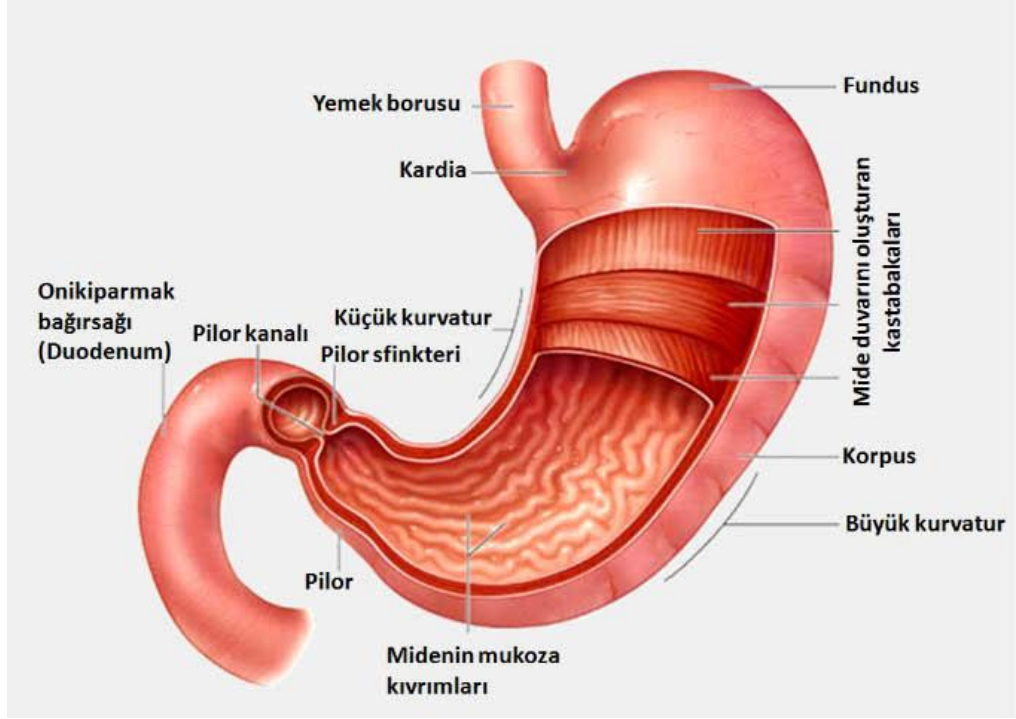
Mide; kardiaka, fundus, korpus ve pilor olmak üzere 4 bölümden oluşur (Şekil 1.5).

Kardia: Yukarıda diyafram, hemen altında ostum kardiaka ile özefagusa açılır. Aşağıda fundus ile birleşir. Bu bölüm diğer kısımlar kadar belirgin değildir (Arıncı ve Elhan, 2001).

Fundus: İncisura kardiakadan geçen horizontal bir çizginin üzerinde kalan kısımdır. Kubbe şeklinde olan bu bölüm diyafram ile komşuluk yapar (Arıncı ve Elhan, 2001).

Korpus: Midenin fundustan sonra gelen kısmıdır (Arıncı ve Elhan, 2001).

Pilor: Midenin duodenuma yakın olan bölümüdür (Arıncı ve Elhan, 2001).



Şekil 1.3: Midenin kısımları (Dobrucalı , 2012)

1.2.2. Mide Kanseri Etiyolojisi

Mide kanseri insidansı orta yaşta ve erkeklerde daha yüksektir. Erkeklerde görülme riski kadınlara göre 2 kat daha fazladır (Whelen ve diğ., 1990).

Çevresel faktörler ve beslenme mide kanseri üzerinde etkilidir. Japonya, Kore, Kolombiya, İrlanda gibi ülkelerde mide kanseri diğer ülkelere göre daha sık görülmektedir. Yüksek risk bölgelerinden düşük risk bölgelerine göç eden ırkların ikinci jenerasyondan itibaren mide kanseri insidansı azalmaktadır. Bu da genç yaşlardan itibaren etiyolojik faktörlere maruz kalan bireylerin kanser olma riskinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni tam bilinmese de beslenmenin önemli olduğu düşünülmektedir (Haenszel ve diğ., 1972; Kinet ve diğ., 1970).

Daha önce yapılan çalışmalarda karbonhidrat, turşular, tuzlanmış et ve balık mide kanseri riskini arttırdığı, süt, taze sebzeler ve vitamin C'nin ise riski azalttığı gösterilmiştir (Qiu ve diğ., 2004). Yemeklerdeki yağ miktarının aşırı düşük ya da yüksek olması da kanser riskini artırır (Graham ve diğ., 1990).

Nitrit ve nitratların mide kanserine neden olduğu düşünülmektedir. Nitratlar kurutulmuş tahıllarda ve gıda koruyucularında bulunur. Nitritler nitratlardan oluşur. Nitritler, amin ve amidler ile birleşerek nitrozamin ve nitrozamidleri meydana getirirler (Haenszel ve diğ., 1972). Bu maddelerle birlikte hipoklorhidrinin de arttığı bildirilmiştir (Keighley ve diğ., 1984). Bu maddelerin hayvanlarda kanserojen olduğu gösterilmiştir.

Kömür, petrol ve nikel rafinerileri çalışanlarında, kauçuk ve asbest ile yakın temas halinde çalışanlarda, kasap ve balıkçılarda mide kanseri insidansı normal popülasyona göre daha fazladır (Kang ve diğ., 1997). Asbestoz, mineral tuzları, metal tozları, gamma ve X ışınları, insektisidler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve kömür tozları mide kanseri için mesleki risk faktörleri arasında sayılabilir (Gürel 1999; Cocco 1996).

Düşük sosyoekonomik koşullar, kötü hijyenik koşullar ve çevre kirliliği mide kanseri riskini artırır (Faggiona ve diğ., 1997).

Sigara içimi mide kanserini olumsuz etkiler. Sigara içimindeki artışla birlikte mide kanseri riskinde de önemli bir artış görülmektedir (Correa, 1992).

Helikobakter pylori (H.pylori) enfeksiyonu ve buna bağlı oluşan intestinal metaplazi ve hipoklorhidri ileri yaşlarda mide kanseri gelişmesi için uygun bir ortam meydana getirmektedir. Kronik inflamasyon sonucunda midede intestinal tip epitel, mide mukozasının yerini alır; midede asit sekresyonu azalır ve diğer bakterilerin kolonize olmasına uygun ortam oluşturur. Bakteriler de nitratları nitrite dönüştürerek kanser oluşumuna neden olur (Viste ve diğ., 1986).

Mide kanserini etkileyen genetik faktörlere bakıldığında ise kan grubu A olanlarda mide kanseri daha sık gözlenmektedir (Aird ve diğ., 1991). Lynch sendromu II'de mide kanseri sık görülür.

1.2.3. Mide Kanserinde Evreleme (TNM Sistemi)- WHO 2000

- **Primer Tümör:** Birincil faktör kanserin mide duvarına penetrasyonunun derecesini göstermektedir.

X: Primer tümör değerlendirilemedi,

T0: Primer tümör mevcut değil.

Tis: İnsitu Karsinom. Lamina propriaya invazyon göstermeyen intraepitelyal tümör.

T1: Tümör lamina propria veya submukozada sınırlı,

T2: Tümör muskularis propria veya subserozada sınırlı,

T3: Tümör komşu dokulara (dalak, transvers kolon, diafragma, pankreas, abdominal duvar, adrenal bez, böbrek, ince barsak) invazyon göstermeden serozayı geçmiştir.

T4: Tümör komşu dokulara invazedir.

- **Nodal Tutulum:** (Regional lenf nodları) perigastrik lenf nodları, çölyak, splenik, hepatik, sol gastrik arter boyunca uzanan lenf nodlarıdır; büyük ve küçük kurvatur boyunca bulunurlar.

NX: Regionallenf nodu tutulumu değerlendirilemedi.

N0: Regional lenfnodu metastazı mevcut değildir.

N1: Metastazlı regional lenf nodu sayısı 1-6 arasındadır.

N2: Metastazlı regional lenf nodu sayısı 7-15 arasındadır.

N3: Metastazlı regional lenf nodu sayısı 15'den fazladır

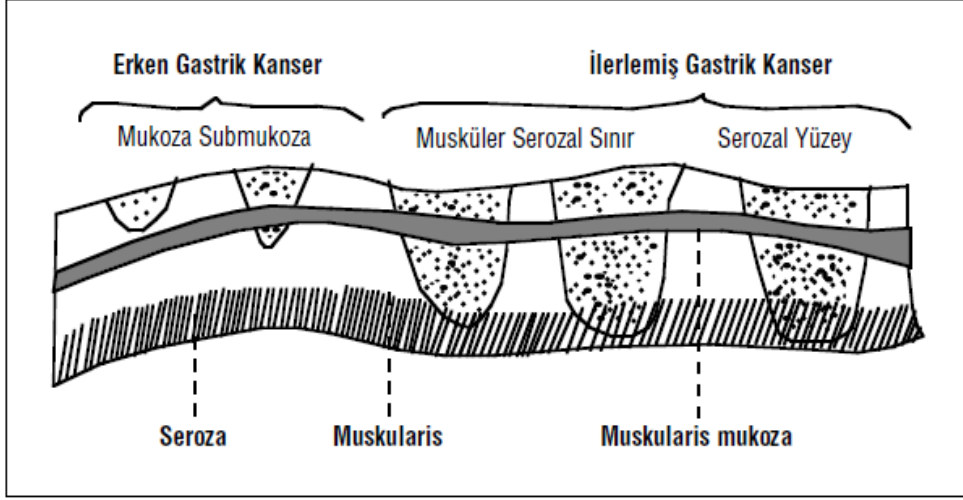
- **Uzak Metastaz:**

MX: Uzak metastaz değerlendirilemedi

M0: Uzak metastaz mevcut değildir.

M1: Uzak metastaz mevcuttur.

Şekil 1.4'te erken ve ilerlemiş mide kanserinin invazyon derinlikleri arasındaki farklar gösterilmiştir.



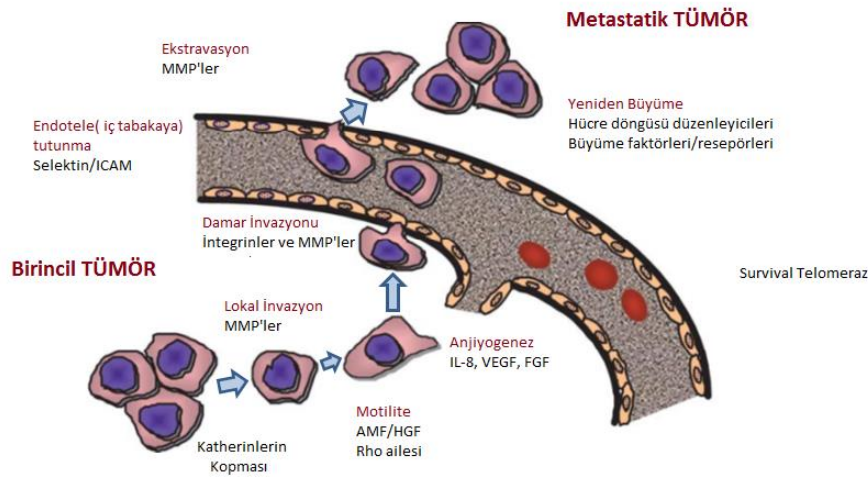
Şekil 1.4: Erken ve ilerlemiş mide kanserinin invazyon derinlikleri arasındaki farklar (Kapan, 2001)

Tablo 1.4: Evre grupları (Kapan, 2001)

Primer Tümör				
Tis	Karsinoma in situ			
T1	Lamina propria veya submukoza invazyonu			
T2	Muskularis propria invazyonu			
T3	Seroza penetrasyonu			
T4	Komflu yapıların invazyonu			
Bölgesel Lenf Nodu Metastazı				
N0	Yok			
N1	Primer tümörün kenarına 3 cm uzaklıktaki perigastrik lenf nodlarına metastaz			
N2	N2 Primer tümör kenarına 3 cm'den daha uzak perigastrik lenf nodları ile beraber gastrik, kommon hepatik, splenik veya çölyak arterlere metastaz			
Evre				
0	I	II	III	VI
Tis	T1	T1	T2	T4
N0	T2	T2	T3	T1-4
M0	N0-1	T3	T4	N2
	N0	N2	N2	N1-2
	M0	N1	N1-2	M0
	M0	N0	N0-1	M1
			M0	M0
			M0	M0
		M0	M0	

1.2.4. Mide Kanserine Neden Olan Prognostik Faktörler

Mide kanserinde erken evrede tanı ve tedavi sağ kalımı artırırken, ileri evrede yetersizdir. Son yıllarda moleküler patolojide yapılan araştırmalar mide kanserinin patolojik invazyon ve metastaz mekanizmalarını ortaya çıkarmıştır (Tahara, 1993; Yasui ve diğ., 2003). Metastatik süreç, tümörlü hücrenin ayrılması, lokal invazyon, motilite, anjiyogenez, damar invazyonu, sirkülasyonda hayatta kalma, endotel hücrelere adezyon, estrasyon ve farklı organlarda yeniden büyümesinden oluşur (Şekil 1.5). Her bir aşamadaki etken faktörler tanımlanmıştır. Bunlar: hücre-adezyon molekülleri, çeşitli büyüme faktörleri, matris degradasyon enzimleri, motilite faktörler ve birçoğu da prognostik faktörlerdir. Son zamanlarda genomik bilim, mide kanserinin ilerlemesindeki moleküler mekanizmanın anlaşılmasında yardımcı olmuştur.



Şekil 1.5: Hematojen metastaz moleküler mekanizması (Yasui ve diğ., 2005'ten modifiye edilmiştir)

1.2.4.1. Klasik Prognostik Faktörler;

Büyüme faktörleri ve onların reseptörleri, hücre-hücre düzenleyicileri, hücre-adezyon molekülleri, matris degrade enzimleri gibi invazyon ve metastaza katılan gen ve moleküller prognostik faktörlere birer örnektir.

- **Büyüme Faktörleri, Sitokinler ve Anjigenik Faktörler**

Mide kanseri hücrelerinde otokrin ve parakrin döngü oluşması için çeşitli büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri ifade edilir (Tahara ve diğ., 1993; Yasui ve diğ., 2001; Yokozaki ve diğ., 2001). Bu faktörler sadece hücre

büyümesini değil, tümörlü hücrelerin invazyonu ve çoğalması için de matriksin degradasyonunda ve anjiyogeneze görev alır. Epidermal büyüme faktörü (EGF) / dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) -alfa ve EGF reseptörü eşzamanlı ifadelenmesi invazyon derinliği, tümör derecesi ve prognoz zayıflığıyla bağlantılıdır.

K-sam ve *HER-2/c-erbB2* genlerinin çoğaltılması ve aşırı ifadelenmesi iyi ve kötü diferansiye veya skleroz tip için prognostik faktör olabilirler (Yasui ve diğ., 2001; Werner ve diğ., 2001).

Tümör büyümesi ve metastaz için bir ön koşul olan anjiyogeneze, ana ve tümörlü hücrelerdeki anjiyogenik faktörlerle bağlantılıdır. Neovaskularizasyon birincil tümörlerin büyümesini artırır ve hematojen metastazına katkıda bulunur. Mide kanseri hücreleri, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), interlökin (IL) -8, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), trombosit türevli endotel hücre büyüme faktörü (PD-ECGF) de dahil olmak üzere çeşitli anjiyogenik faktörler üretirler (Takahashi ve diğ., 1996; Takahashi ve diğ., 1998).

Lenf nodu metastazıyla damarlanmanın artması, hepatik metastaz ve kötü prognoz mide kanserine neden olan prognostik faktörler arasında sayılabilirler.

Prognozlu hastalarda IL-8 ve VEGF'li tümör ifadesi normal tümör ifadesine göre daha düşüktür (Kido ve diğ., 2001).

- **Hücre Döngüsü Regülatörleri**

Hücre döngüsü kontrol noktaları; hücre döngüsü geçişlerini, DNA replikasyonunu ve kromozom segragasyonunu düzenler. Hücre döngüsü düzenleyicilerindeki anormallikler, genomik kararsızlık ve sınırsız hücre çoğalmasına dolayısıyla mide kanseri karsinogeneze neden olur (Yasui ve diğ., 1999).

Siklin-E geninin aşırı ifadesi kanser saldırganlığıyla ilişkilidir. $p27^{Kip1}$ ifadesinin azalması, siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü, genellikle ileri evre mide kanseriyle ilişkilidir, ayrıca $p27^{Kip1}$ ifadesinin azalması lenf nodu metastazı ve derin invazyonla bağlantılıdır. Siklin-E pozitif tümörlü hastalarda, $P27$ ifadesinin azalması olumsuz bir prognostik faktör olarak gösterilmiştir (Xiangming ve diğ., 2000). *P16* geninin anormal ifadesi mide kanserinde sıkça görülmesine rağmen prognozla bir bağlantısı yoktur.

Retinoblastoma (RB) G1/S kontrol noktasının önemli düzenleyicilerinden biridir. RB ifadesi lenf nodu metastazında birincil tümörlere göre daha düşüktür (Feakins ve diğ., 2003). Tek değişkenli ve çok değişkenli sağkalım analizlerine göre, RB ifadesinin azalması kötü prognozla ilgilidir.

Tümör baskılayıcı gen ürünü, *p53* hücre döngüsünde *p21* baskılanmasını düzenler. Yaklaşık 200 makalede, mide kanseri hasta prognozlarındaki *p53* anormallikleri yayınlanmasına rağmen, *p53*'ün prognostik etkisi hala tartışılmaktadır.

Kontrol noktası kinaz 1 ve 2'nin (Chk1-Chk2) aşırı ifadesini, G2/M kontrol noktasında tanımlanan DNA hasar etkileştirici kinazlar, *p53* mutasyonu ile ilişkilidir fakat hiçbir prognostik etkisi yoktur.

- **Genetik Kararsızlık**

Mikrosatellit kararsızlık (MSI), DNA tamir sisteminin fonksiyonsuz hale gelmesinden sorumludur. MSI, genetik değişikliklerin birikimine neden olur. Polip dışı kolorektal kansere ek olarak, sporatik mide kanseri patogeneze katılır (Yokozaki ve diğ., 2001). Mide kanserinde MSI sıklığının yaklaşık %30 olduğu tahmin edilmektedir. Birçok araştırmaya göre MSI frekansı çoklu primer tümörlü kanserlerde daha yüksektir. Bu nedenle, hastalarda MSI seviyesinin belirlenmesi, ikinci bir kanser riskinin belirlenebilmesi için önemlidir (Horii ve diğ., 1994; Takahashi ve diğ., 2002). Mide kanseriyle ilişkisine bakıldığında ise MSI'nın prognostik etkisi olmadığına, yaşama şansının arttığı bulunmuştur.

- **Telomer ve Telomeraz**

Telomeraz aktivasyonu tarafından onarılan telomerler, hücre ölümü baskılayarak karsinogeneze katılırlar (Kim ve diğ., 1994). Güçlü telomeraz aktivitesi, insan telomeraz reverse transkriptaz ile bağlantılıdır. Mide kanseri vakalarının çoğunda güçlü telomeraz etkisi görülür (Yokozaki ve diğ., 2001; Feakins ve diğ., 2003). POT1 (telomer 1 koruyucusu), telomerin ucuna bağlanır ve sadece cap telomerleri değil, aynı zamanda kromozomların uçlarındaki telomerleri de kuvvetlendirir (Kondo ve diğ., 2004). POT1 ifade seviyesi, ileri evre mide kanserinde daha yüksektir. Erken evre mide kanserinde, POT1 baskılanması daha çok gözlemlenir. Bu yüzden de ileri derecede malign tümörün belirlenmesinde 'POT1' belirteç olarak kullanılabilir

(Kondo ve diğ., 2004).

- **Hücre- Adezyon Molekülleri**

Hücre adezyon molekülleri tümör baskılayıcı olarak görev alabilirler. *E-katherinler*, epitel dokuda morfogenezin düzenlenmesinde ve hücre infiltrasyonunun bastırılmasında görevlidir. Yapılan analizler E-katherin ifadesinin azalmasının bağımsız bir prognostik faktör olduğunu göstermiştir (Shimada ve diğ., 2004).

Dysadherin kanserle ilgili hücre-zarı glikoproteinidir ve E-katherin ifadesini baskılayarak metastaza teşvik eder (Shimada ve diğ., 2004). Dysadherin bağımsız bir prognostik faktör olmamasına rağmen, hem dysadherin pozitif hem de E-katherini baskılanmış hastaların kötü prognozlu olduğu bilinmektedir (Shimada ve diğ., 2004) .

CD44 önemli bir hücre-adezyon moleküdür. Alternatif kırılma ile varyantları elde edilebilir. Hücre-hücre etkileşimi, hücrenin hareketini ve son olarak da metastatik potansiyeli düzenlerler.

- **Matris Metaloproteinazlar (MMP'ler)**

Matris-degrade enzimleri ve onların inhibitörleri arasındaki denge, tümör invazyonunun ve metastazın saptanmasında önemlidir.

MMP-7 ifadesi damar invazyonu, lenfatik ve hematojen metastazla bağlantılıdır (Yamashita ve diğ., 1998; Inoue ve diğ., 1999).

MT1-MMP (membran tip), MMP-2'nin aktivatörüdür. MT1-MMP ifadesi hem tümör invazyonunu hem de metastazı etkileyen bağımsız bir faktördür.

MMP doku inhibitörleri (TIMP'ler), MMP'lerin inaktivasyonu yoluyla tümör invazyonunu inhibe ederler (Mimori ve diğ., 1996).

1.2.4.2. Epigenetik Değişiklikler

Çeşitli epigenetik değişiklikler gen ifadesinin değişmesine neden olur, bu değişkenlerden en önemlilerinin histon modifikasyonu tarafından gerçekleştirilen kromatin yeniden şekillenmesi ve DNA metilasyonu olduğuna inanılmaktadır (Yasui ve diğ., 2003). Bazı anormal epigenetik değişiklikler mide kanserinde tümör gelişimiyle ilişkilidir ve prognostik faktörler olabilirler.

- **Histon asetilasyon**

Histon deasetilasyon ile kromotin inaktivasyonu, $p21^{WAF1/CIP1}$ de dahil, birkaç tümör baskılayıcı genin transkripsiyonel baskılanmasına katılır. Mide kanseri dokularında $p21^{WAF1/CIP1}$ promotor bölgesinde histon immünoçökmesi olduğu zaman H3 ve H4 histon hipoasetilasyonunun %50'den daha fazla olduğu bilinmektedir (Yasui ve diğ., 2003).

Non-neoplastik mukoza hücreleriyle mide kanserli hücreler kıyaslandığında, asetile edilmiş histon H4 ifade seviyesi mide kanserli hücrelerinde daha azdır. Asetile edilmiş histon H4 ifadesinin azalması, tümör evresi, invazyon derinliğinin belirlenmesi ve lenf nodu metastazının belirlenmesinde önemlidir (Yasui ve diğ., 2003; Suzuki ve diğ., 2000).

- **Birden fazla genin DNA metilasyonu ile birikimi**

CpG adacıklarının hipermetilasyonu çeşitli tümör baskılayıcı genlerin susturulması ve tümörgeneze katılmasıyla ilişkilidir. Bu genler $p16^{MTS1/INK4A}$, *CDH1* (*E-cadherin*), *hMLH1*, *RAR-beta*, *RUNX3*, *MGMT*, *TSP1*, *HLTF*, *RIZ1*, ve *SOCS-1*'dir (Yokozaki ve diğ., 2001; Oue ve diğ., 2002; Oshimo ve diğ., 2004). Özellikle *CDH1*, *RAR-beta* ve *SOCS-1*'in DNA metilasyonu tümör invazyonu ve metastazla ilişkilidir.

Mide kanserinde CpG adacıkları genellikle metilatör fenotipe (CIMP) sahiptir. CIMP mide kanseri karsinogenezinde önemli bir yolak olabilir (Toyota ve diğ., 1999). Buna rağmen CIMP ve kanser prognozu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Mide kanserinde 12 tane tümör bağlantılı gende (*hMLH1*, *MGMT*, *p16*, *CDH1*, *RAR-beta*, *HLTF*, *RIZ1*, *TM*, *FLNs*, *LOX*, *HRASLS*, *HAND1*) DNA metilasyonu incelenmiş ve metilli genlerin yaklaşık beş tanesinin tümörle ilgili olabileceği bulunmuştur. Araştırmacılar daha sonra kanserleri 5 veya daha fazla metilli gene sahip olanlar ile 4 veya daha az metillenmiş gene sahip olanlar olarak iki gruba ayırmışlardır. Yüksek metilasyon grubu evre II ve IV'de, evre I ve II'ye göre daha fazla görülmektedir. Prognostik amacı tam olarak bilinmese de metillenmiş gen sayısı, tümör gelişiminde marker olarak kullanılabilir.

1.2.4.3. Genetik Polimorfizm

Genetik polimorfizm kansere neden olan endojenlerin belirlenmesi için önemlidir. Gonzalez ve arkadaşları tarafından mide kanserinde riski ve genetik

yatkınlıkları tanımlanmıştır (Gonzalez ve diğ. 2002). *IL-1beta (IL1B)*, *IL-1 reseptör antagonist (IL1RN)* ve *N-asetiltransferaz (NAT1)* mide kanserini etkileyen genetik polimorfizmlerindendir.

Tümörle bağlantılı genler ve mide kanseri arasındaki ilişkiyi anlamak için 500 örnekte vaka-kontrol ve vaka-vaka çalışması yapılmıştır (Kuraoka ve diğ., 2003; Matsumura ve diğ., 2005). Bu çalışmaya göre EGF (61 A/G), *E-katherin* (-160C/A), MMP-1 (-1607 1G/2G), ve MMP-9 (-1562 C/T) genlerinin promotör bölgelerinde SNP'leri bulunduğunda, *HER-2/c-erbB2* geninin transmembran domaininde tek nükleotid polimorfizmi (SNP) gözlenir. Bu SNP'lerin gen ifadesini etkilediği bilinmektedir. Yapılan vaka-kontrol çalışmasında *HER-2*, *EGF* ve *E-katherin* genlerindeki polimorfizm farklılık göstermişken, MMP-1 ve MMP-9 arasında bir fark bulunmamıştır. Mide kanseri hastalarında *MMP-9*, *E-katherin*, *HER-2* genotipleri; tümör invazyonu, metastaz ve tümör sınıflandırılmasıyla ilişkilidir. Bunların arasında yalnızca *MMP-1*'in belirli bir şekilde histolojik farklılaşmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle *HER-2*, *MMP-9* ve *E-katherin* prognostik faktör olarak kullanılabilir (Wu ve diğ., 2002; Pharoah ve diğ., 2002).

1.3. Matris Metaloproteinazlar (MMP'ler)

Ekstraselüler matris (ESM) makromolekülleri, hücrel ortamın şekillenmesi ve gelişiminde önemli rol oynarlar. Matrisinler olarak da adlandırılan MMP'ler, ESM bozulmasına katılan proteinazlardır (Woessner ve diğ., 2000; Hiller ve diğ., 2000). Birçok matrisinin ifadesi büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler ve hücrel transformasyon tarafından düzenlenir (Nagase, 1996; Fini ve diğ., 1998). Normal fizyolojik koşullar altında, MMP'lerin aktivasyonları; transkripsiyonların seviyesinde düzenlenme, prekürsör zimojen aktivasyonu, belirli bir ESM birleşeni ile etkileşim ve endojenlerle baskılanma şeklindedir. Aktivasyon kontrol kaybı arterit, kanser, ateroskleroz, anevrizma, nefrit, doku ülseri ve fibroz gibi hastalıklara neden olabilir. TIMP'ler dokularda MMP faaliyetlerinin kontrolüne katılan, matrislere özel inhibitörlerdir (Knäuper ve diğ., 1997).

1.3.1. Matrisin Ailesi Üyeleri

Bugüne kadar 24 omurgalıda matrisin keşfedilmiştir. Kolajenaz 1 (MMP-1) ile dizi homolojisi, MMP'leri zimojen biçimde koruyan (proMMP) propeptitteki sistein anahtar modeli PRCGXPD, katalitik domaindeki çinko-bağlayıcı model HEXGHXXGXXH bu aileye ait proteinazları belirlemek için kullanılan katalitik domainlerdir. MMP-23'ün sistein anahtar modeli yoktur, ancak katalik domainindeki amino asit dizisi MMP-1 ile bağlantıdır. MMP'ler genellikle prodomain, katalitik domain, bağlanma bölgesi ve hemopeksin domaininden oluşurlar (Şekil 1.8).

MMP'ler ya hücreden ya da plazma zarına sabitlenerek salgılanırlar. Bu enzimler omurgalı MMP'leri substrat özgünlüğü, dizi benzerliği ve domain organizasyonlarına göre 6 gruba ayrılmıştır (Şekil 1.6; Tablo 1.4).

- **Kollajenazlar**

MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18 bu gruptadır. Bu enzimlerin önemli özellikleri dokular arası kollajen I, II ve III'ü N-terminalden başlayarak belirli bölgelerinden kesmektir. Ayrıca kollajenler diğer ESM'leri veya ESM olmayan molekülleri de parçalayabilirler.

- **Jelatinazlar**

Jelatinaz A (MMP-2) ve jelatinaz B (MMP-9) bu gruptadır. Bunlar kolaylıkla denatüre olmuş kollajenazları ve jelatinleri parçalayabilirler. Bu enzimler jelatin, kollajen ve laminine bağlanabilen tip II fibronektin domainin 3'lü tekrarlarına sahiptirler. MMP-2 tip I, II ve III kollajenleri sindirirken MMP-9 sindiremez (Sheu ve diğ., 2001; Bergers ve diğ., 2000).

- **Sitromelisinler**

Sitromelisin 1 (MMP-3) ve sitromelisin 2'nin (MMP-10) ikisi de benzer substrat özgünlüğüne sahiptir, fakat MMP-3'ün proteolitik verimliliği MMP-10'a göre daha fazladır. ESM bileşenlerini parçalamak dışında, MMP-3 bir dizi proMMP'yi aktive eder (Bini ve diğ., 1996). MMP-11 "sitromelisin 3" olarak adlandırılır, ancak gen dizisinin ve substrat özgünlüğünün MMP-3'den farklı olmasından dolayı gruplama yapılırken genellikle "diğer MMP'ler" arasında sınıflandırılır.

- **Matrilisinler**

Matrilisinler hemopeksin domaini eksikliğiyle karakterize edilirler.

Endometaz olarak da bilinen matrilisin 1 (MMP-7) ve matrilisin 2 (MMP-26) bu gruptadır (Lochter ve diğ., 1996). ESM birleşenlerinin yanı sıra MMP-7 pro-defensin, Fas-ligand, pro-tümör nekroziz faktör (TNF) ve *E-katherin* gibi hücre yüzey moleküllerini de işler. MMP-26 önemli ESM birleşeni parçalayıcılarındandır.

- **Membran-tipi MMP'ler**

Altı tip MT-MMP vardır. Bunların dört tanesi tip-I transmembran proteini (MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-24) ikisi ise glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlantılı proteinlerdir (MMP-17 ve MMP-25). MT4-MMP dışında hepsi proMMP-2'yi aktive edebilirler. Bu enzimler aynı zamanda ESM moleküllerini parçalayabilirler. MT1-MMP tip I,II ve III'de kollajenolitik etkiye sahiptir. MT-1 MMP anjiyogenezde önemli rol oynar (Lijnen ve diğ., 2000). MT5-MMP beyine özgüdür ve beyincik tarafından ifade edilir (Nakamura ve diğ., 1998). MT6-MMP (MMP-25) yalnızca periferel kan lökositlerinde, anaplastik astrositomlarda ve gliyoblastomlarda ifade edilir (Murphy ve diğ., 1993; Pei D, Majmudar ve diğ., 1994).

- **Diğer MMP'ler**

Metaloelastaz-12 (MMP-12), makrofajlarda ifade edilir (Gall ve diğ., 2001) ve makrofajların göçü için gereklidir (Wilson ve diğ., 1999). Karaciğerdeki cDNA klonlamalarında ve romatoid artrit (RASİ) hastalarından alınan T- hücreleri-türevli otoantijenlerde MMP-19 bulunmuştur (Mitsiades ve diğ., 2001).

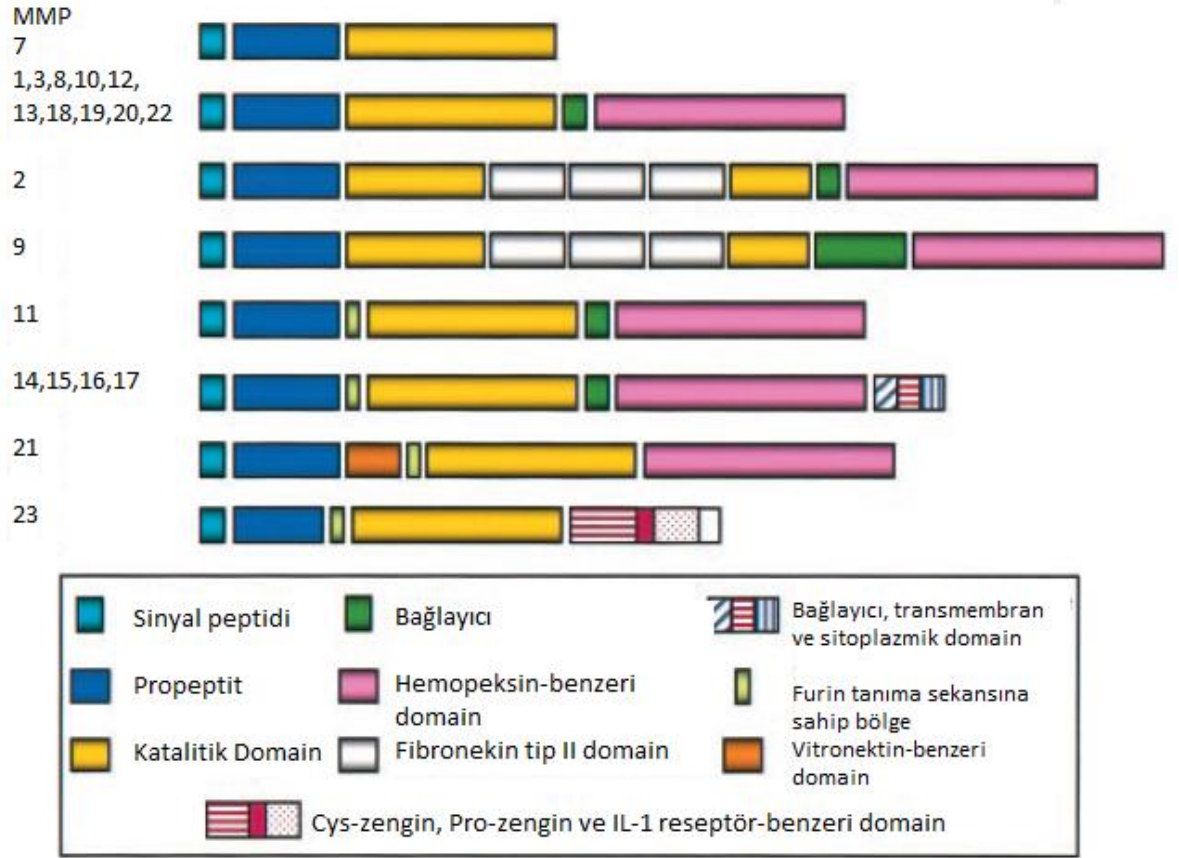
Amelogenini parçalayan MMP-20, yeni oluşan diş minesinin içinde yer alır. Amelogenin imperfaktası, bir genetik hastalıktan dolayı defektif diş minesinin oluşumudur ve MMP-20'nin böldüğü parçaların mutasyonlar amelogenin imperfaktası oluşumuna neden olur (Uria ve diğ., 2000).

MMP-22, insan homoloğu ETS dizilerinin kaynağında bulunmuştur. Bu enzimin görevi bilinmemektedir.

MMP-23, çoğalabilen dokularda ifade edilmektedir (Park ve diğ. 2000). Enzimin prodomaininde sistein anahtar modeli ve hemopeksin domaini yerine immünoglobulin-benzer domaini takip eden sisteince zengin domaine sahiptir. Epilisin ve MMP-28, ağırlıklı olarak keratinositlerde ifadelenir (Belkin ve diğ. 2001; d'Ortho ve diğ. 1997).

Tablo 1.4: Matris metalloproteinazlar (Knäuper ve diğ., 1997)

	ENZİM	MMP	KROMOZOM
Kolajenazlar	Interstisyel kollajenaz; kollajenaz 1	MMP-1	11q22-q23
	Nötrofil kollajenaz; kollajenaz 2	MMP-8	11q21-q22
	Kollajenaz 3	MMP-13	11q22.3
	Kollajenaz 4 (<i>Xenopus</i>)	MMP-18	Bilinmiyor
Jelatinazlar	Jelatinazlar A	MMP-2	16q13
	Jelatinazlar B	MMP-9	20q11.2-q13.1
Stromelisinler	Stromelisinler 1	MMP-3	11q23
	Stromelisinler 2	MMP-10	11q22.3-q23
	Stromelisinler 3	MMP-11	22q11.2
Matrilizinler	Matrilizinler 1	MMP-7	11q21-q22
	Matrilizinler 2	MMP-26	11p15
Membran-Tip MMP'ler	MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12
	MT2-MMP	MMP-15	15q13-q21
	MT3-MMP	MMP-16	8q21
	Transmembran MT5-MMP	MMP-24	20q11.2
GPI bağlayıcı	MT4-MMP	MMP-17	12q24.3
	MT6-MMP	MMP-25	16p13.3
Diğerleri	Makrofaj elastaz	MMP-12	11q22.2-q22.3
	İsim yok	MMP-19	12q14
	Enamelisin	MMP-20	11q22.3
	XMMP (<i>Xenopus</i>)	MMP-21	Bilinmiyor
	CA-MMP	MMP-23	1p36.3
	CMMP (<i>Gallus</i>)	MMP-27	11q24
	Epilisin	MMP-28	17q21.1



Şekil 1.6: Omurgalı matrisinin domain düzenlemeleri (Knäuper ve diğ., 1997'den midifiye edilmiştir)

1.3.2. Matrisin Gen İfadesinin Düzenlenmesi

Matrisinlerin en önemli özelliklerinden biri de, bu genlerin uyarılabilir olmasıdır. Büyüme faktörleri, sitokinler, kimyasal ajanlar (Örneğin, forbol esterler, aktin stres fiberdisrupting ilaçlar) fiziksel stres ve onkojenik hücresel dönüşümü vs. içeren efektörler ile MMP gen ifadesinin artırılması, baskılayıcı faktörler (örneğin, transforme edici büyüme faktörü β , retinoik asit, glukokortikoidler vs.) tarafından regülasyonu azaltabilir (Nagase, 1996).

Son çalışmalar sadece matrisin gen ifadesinde rol alan çözülebilen faktörleri değil, aynı zamanda hücre matrisi ve hücre-hücre etkileşimi gibi anahtar faktörleri de vurgulamaktadır. Örneğin; fibroslardaki MMP-1, 2 ve 3'ün tümör hücre yüzeyinde ifadesinin immunoglobulin ailesinin bir üyesi olan EMMPRIN (M6 antijen ya da basigin) tarafından başlatılması; T lenfoma hücrelerindeki MMP-9 ifadesinin lökosit fonksiyon bağımlı (LFA-1), interselüler adezyon molekülü (ICAM-1), hücre adezyon aracılığıyla başlatılması (Aoudjit ve diğ. 1998); T hücrelerindeki MMP-2 ifadesinin, ileri geç antijen-4 (VLA-4), vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1),

endotel hücrelere yapışma aracılığıyla başlatılması (Romanic ve diğ. 1994); minositlerdeki MMP-9 ifadesi aktif haldeki T hücrelerindeki g39-CD40 etkileşimi tarafından gerçekleşir (Malik ve diğ. 1996) ve makrofaj farklılaşması esnasındaki MMP-9 ifadesi için $\alpha 5\beta 1$ intekrin-fibronektin etkileşimi gereklidir (Xie ve diğ. 1998).

Bazı sinyal yolları, MMP genlerinin ifadesine neden olur. Tavşan sinoviyal fibroblastlarda $\alpha 5\beta 1$ integrinine çözünür antikor ilave edildiğinde aktin hücre iskeletinin bozulmasına ve MMP-1 ifadesinin artışına neden olur (Werb ve diğ., 1989). Bütün bunlar reaktif oksijen türlerini oluşturan ve *NF- κ B* aktivasyonunu baskılanmasını sağlayan GTP-bağlayıcı proteinin (Rac-1) aktivasyonuna neden olur (Kheradmand ve diğ., 1998). Bu sinyal yolları MMP-1 ifadesi otokrin uyarıcısı olan IL-1 α 'nın baskılanmasına yol açar (Kheradmand ve diğ., 1998).

1.3.3.Pro-Matrisinler aktivasyonu: Pro-MMP-2 Hücre Yüzey aktivasyonu

Pro-matrisinler inaktif zimojen olarak hücreden salgılanır. Salgılanan pro-matrisinler proteinazlar, non-proteolitik ajanlar (SH-reaktif ajanlar gibi), cıvalı birleşenler, reaktif oksijenler ve denatüranlar tarafından *in vitro* olarak aktive edilir. Aktivasyon sırasında Cys-Zn⁺² (sistein-anahtar) etkileşimi bozulur ve sonrasında pro-peptidlerin uzaklaştırılır (Nagase, 1997).

1994'te Sato ve arkadaşları yaptığı çalışmada pro-MMP-2'nin bir aktivatör olduğunu ispatlamışlardır. Yapılan son çalışmalar, bu aktivasyon için aktif MT1-MMP ve TIMP-2 bağlı MT-MMP olması gerektiğini öngörmektedir (Strongin ve diğ., 1995; Butler ve diğ., 1998; Kinoshita ve diğ., 1998). pro-MMP yollarının aktivasyonunu MT-MMP'ler aracılığıyla gerçekleştiriyor gibi gözükse de, Mazzieri ve arkadaşları, yüzey-bağlantılı pro-MMP-2'lerin hücre yüzeyi ile ilişkin uPA/plazmin sistemi ile de aktive edildiğini göstermişlerdir.

MMP-2 anjiyojenik endotel hücrelerde hücre yüzeyine lokalize olmuş durumdadır ve melanom hücrelerde $\alpha v\beta 3$ integrin ile bağlantılıdır (Brooks ve diğ. 1996). Yeni kan damarlarının invaziv davranışını engelleyen bu etkileşim, RGD peptid ve MMP-2'deki C-terminal domaini tarafından baskılanır (Brooks ve diğ. 1998). Fare melanom hücrelerine bağlı pro-MMP-2'ler RGD peptid tarafından baskılanamazlar, bu da hücre yüzeyine bağlanan MMP-2 modellerinin farklı olabileceğini düşündürmektedir.

1.3.4. TIMP'ler Çok Fonksiyonlu Proteinlerdir

Yaygın olarak TIMP'ler *in vitro* olarak hücre invazyonunu, *in vivo* olarak metastazı, tümör oluşumunu ve anjiyogenezi baskırlarlar (Gomez ve diğ., 1997). TIMP'ler biyolojik fonksiyonlar sergiler. TIMP-1 ve TIMP-2 çeşitli hücre tiplerinde mitojenik aktivite gösterir. Örneğin; bu inhibitörlerin ve TIMP-2'nin aşırı ifadesi tümör hücre büyümesini azaltır, ancak bu durum TIMP-1 için geçerli değildir. Bu inhibitörler fibroblast büyümeye bağlı insan endotel hücre gelişimini engeller (Murphy ve diğ., 1993). TIMP'lerin bu biyolojik aktiviteleri MMP-inhibitör aktivitelerinden bağımsızdır (Hayakawa ve diğ., 1994; Chesler ve diğ., 1995). *In vitro* olarak sıçan testisinin ve yumurtalıklarının steroid düzenlenmesinin uyarılmasında, TIMP-1-prokatepsin L kompleks yapısı bulunmuştur; ancak *in vivo* ortamda TIMP-1 eksikliği olan farelerde steroid düzenlenmesiyle ilgili bulgular azdır (Nothnick ve diğ. 1997). TIMP-1, MMP-1 üretimi için fibroblastları uyarır (Clark ve diğ.1994).

İnsan kolon karsinoma ve melanom hücrelerinde TIMP-3'un apoptozu baskıladığı gösterilmiştir (Smith ve diğ., 1997; Ahonen ve diğ., 1998). Bu baskılama muhtemelen TNF- α reseptörünün stabilizasyonu ile ilgilidir; TIMP-3 TNF- α dönüştürücü enzimleri ve *IL-6* reseptör bağlanmasını baskılar (Hargreaves ve diğ., 1998). Sıçan vasküler düz kas hücrelerinde TIMP-3'un aşırı ifadesi apoptoza neden olur, bu olay MMP'lerin baskılanmasıyla bağlantılı değildir (Baker ve diğ. 1998).

1.4. MMP-9

92-kDA tip IV kolajenaz veya jelatinaz B olarak da bilinen MMP-9 geni 20. kromozomun q kolunun 11. bölgesinde bulunmaktadır. MMP-9 geni hücre-dışı matrisin bozulmasında görevli olan çinko-metaloproteinaz ailesinin bir üyesidir. MMP-9 birçok fizyolojik (embriyonik gelişim, üreme, anjiyogenez, kemik gelişimi, yara iyileşmesi, hücre göçü, öğrenme ve hafıza gibi) ve patofizyolojik (artrit, intraserebral kanama ve metastaz gibi) süreçte ESM'lerin parçalanmasında görev alır. Örneğin, MMP-9 ifadesi embriyo implantasyonu için önemlidir. Erken gebelik döneminde trofoblastik invazyonu başlatır (Canete-Soler ve diğ., 1995).

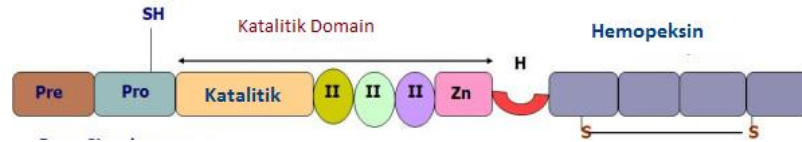
MMP-9 insan ve kemirgenlerde kardiyak doku oluşmasında görev alır ve embriyogenezin 16.-18. günlerinde sentezlenir (LAVB ve diğ., 2011; Ratajska ve diğ., 2002).

Yu ve Stamenkovic, tümör ile ilgili dokuların yeniden yapılanmasının kontrolünde görev alan reseptör CD44, MMP-9 ve TGFB arasındaki fonksiyonel ilişkiyi tanımlamışlar ve kemirgen memelilerin, karsinoma hücre yüzeylerine proteolitik olarak aktif MMP-9 reseptörleri bağlayarak çeşitli CD44 izoformlarının ifadesine bakmışlardır. MMP-9'un hücre yüzey ekspresyonu, sığır mikrovasküler endotel hücrelerinin kılcak tüpleri oluşturmasını uyarır. Hücre yüzeyindeki MMP-9'un yeri, tümör invazyonu ve anjiyogenezin başlatılması için önemlidir. Yu ve Stamenkovic, MMP-9 ve MMP-2'nin proteolitik olarak gizli TGFB2'yi parçalamasının, aktif TGFB'nin uyarılmasına nedem olduğunu ispatlamıştır. Yazarlara göre TGFB'nin bu mekanizması, MMP-9 aktivitesinin anjiyogenezi uyarmasının bir parçası olabilir (Yu ve diğ., 2000).

Lausch ve arkadaşları, endokondral kemikleşmede, MMP-13 ve MMP-9 arasında fonksiyonel bir ilişki olduğunu öne sürmüştür. Örneğin; direkt inaktivasyon (MMP-9 fonksiyon kaybı sonucu oluşan resesif hastalıklar), bozulmuş aktivasyon (MMP-13 fonksiyon kaybı sonucu oluşan resesif hastalıklar) ya da transkatalitik bozunma (MMP-13 fonksiyon kazancıyla oluşan dominant hastalıklar) sonucu oluşan MMP-9 protein fonksiyonundaki bozulma, metafiz anadysplasia (MANDP1) patogeneziyle ortak bir basamak gibi görünmektedir (Laush ve diğ., 2009).

1.4.1. MMP-9 Yapısı ve Aktivitesi

İnsanlarda MMP-9 bir NH₂-terminal pro-domain, bir katalitik domain, bir bağlayıcı domain, bir –COOH terminal hemopeksin-benzeri domainin bir araya gelmesinden oluşur. İnsanlarda pro-MMP-9 92-kDa, aktif MMP-9 ise 88-kDa'dur (Papazafiropoulou ve Tentolouris, 2009). MMP-9'un katalitik domaini, iki çinko iyonu, beş kalsiyum iyonu ve fibronektinin tip-II modülünün homolog üçlü tekrarlarından oluşur (Şekil 1.7). Katalitik domaindeki iki çinko iyonundan biri ve pro-domaindeki sistein anahtar motifi, yapısal olarak inaktif MMP-9'ların saklanmasını düzenler (Rowell ve diğ., 2002). Katalitik çinko iyonu proteolitik aktivite için önemlidir.



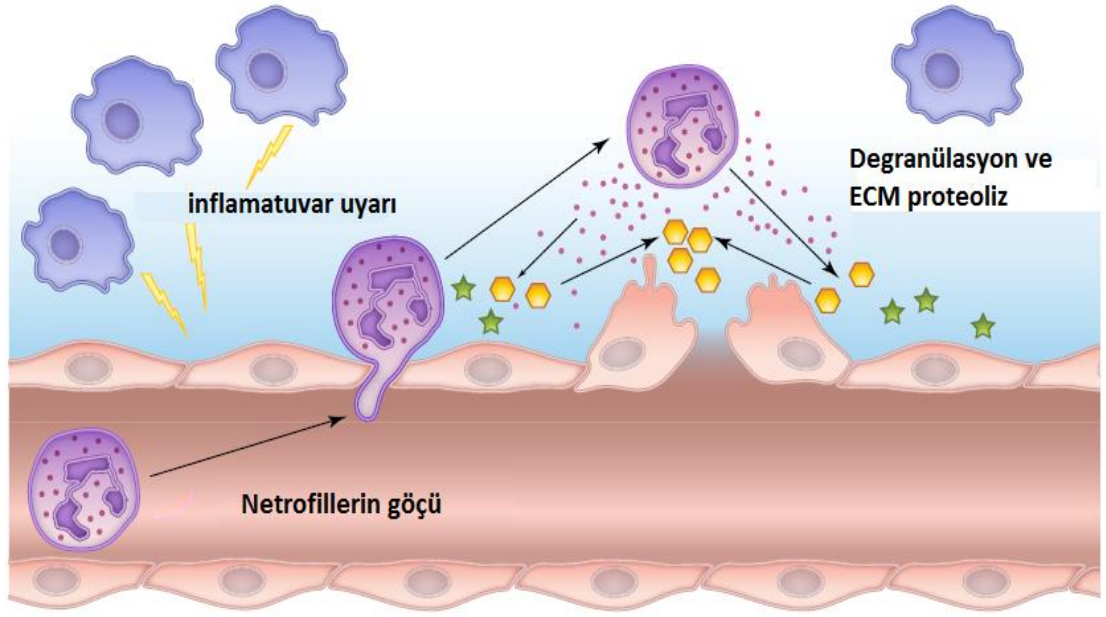
Şekil 1.7. MMP-9'un domain yapısı (Visse ve Nagase, 2003)

MMP-9'un fibronektin-benzeri domain 58 amino asitlik fibronektin tekrarlarından oluşur. Bu domain O-glikozil bakımından zengindir, katalitik domain ve hemopeksin domain arasında bağ oluşumunu sağlar. Fibronektin-benzeri domain esas olarak denatüre kollajen veya jelatinlere bağlanır (O'Farrell ve diğ., 1998). Hemopeksin-benzeri domain dizilerini plazmadaki benzer hemopeksinlerle paylaşır, MMP-9 da bu görülür.

Pro-MMP-9'un hemopeksin benzeri domain formu, kendi C-terminal formu olan TIMP-1 ve TIMP-3'le zayıf bir etkileşim içindedir (Nagase ve diğ., 2006.). Pro-MMP-9 golgi aygıtında salgılanmadan önce TIMP-1'le kompleks bir yapı içindedir (Roderfeld ve diğ., 2007). TIMP-1, pro-MMP-9'a C-Terminal aracılığıyla bağlanır ve NH₂ ucunu terk ederek diğer MMP'leri baskılar.

1.4.2. MMP-9'un Hücre Ekspresyonu

MMP-9'lara nötrofiller, makrofajlar ve fibroblastların da dâhil olduğu birçok hücre tipinde rastlanmıştır. Nötrofiller birçok proteaz içerirler. Örneğin; serin proteazlar (elastaz, katepsin G ve proteinaz 3), MMP'ler (MMP-8 ve -9) ve ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA). Nötrofillerden yayılan proteazlar, MMP-9 aktivasyonunu uyarır (Tschesche ve diğ., 2001). Nötrofil olarak, MMP-9, kemik iliğindeki granülosit farklılaşması sırasında sentezlenir. İnsanlarda nötrofil MMP-9 lipokalin ile kovalent bağ oluşturur, bu bağ proteolitik bozulmaya karşı koruyucudur (Di Carlo, 2013). MMP-9, vasküler endotelial büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü-2 gibi pro-anjiyojenik faktörlerin aktivasyonu ile ESM'yi degrade eder (Şekil 1.8).

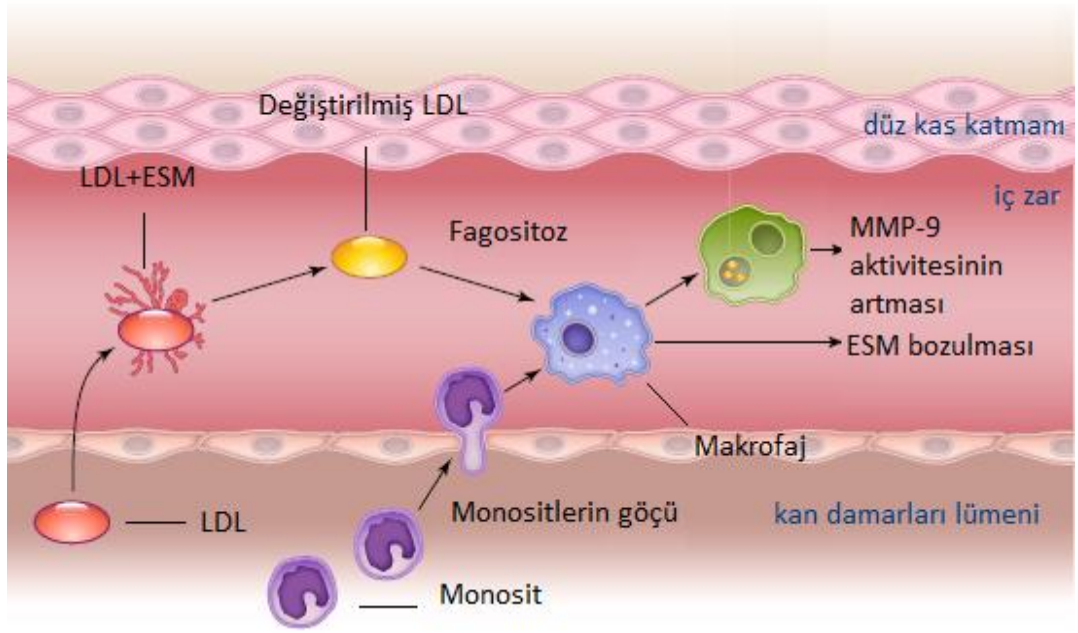


Şekil 1.8: İnflamasyon ve MMP-9 salgılanmasında netrofillerin rolü (Andriy ve diğ., 2013'ten modifiye edilmiştir)

Makrofajlar, MMP-9 için güçlü kaynaklardır. Fank ve arkadaşları, akut MI veya stabil angina hastalarının monositlerinden farklı makrofajlar izole etmişler ve hasta grubu ile kontrol grubunu kıyasladıklarında MMP-9 mRNA ve protein seviyesinin hasta gruplarında iki kat daha fazla olduğunu görmüşlerdir (Fang ve diğ., 2010). Monositlerin doku içine girişi, makrofaj geçişini gösterir. Bununla eş zamanlı olarak MMP-9 ifadesi de artar. ApoE eksikliği olan farelerde, MMP-9'un makrofajlardan salınımı elastin bozulmasına neden olur (Şekil 1.9). Makrofaj fenotiplerinden biri olan köpük hücreleri aktif-MMP-9'un en önemli kaynaklarıdır (Newby ve diğ., 2009). MI hastası, MMP-9 eksikliği olan farelerde, makrofaj infiltrasyonunun azalmasına bağlı olarak ruptur oranında düşüş ve ventrikülerin zayıfladığı görülmüştür (Ducharme ve diğ., 2000).

1.4.3. MMP-9'u Aktive Eden Bazı Düzenleyiciler

Transkripsiyonel seviyede MMP-9 birçok faktör tarafından düzenlenir. Bunların bazıları, E-26 (ETS) transkripsiyon faktörleri, NF-kB, polyomavirüs arttırıcı A-bağlayıcı protein-3 (Pea3), spesifik protein 1 (SP-1) ve serum amiloid A-aktive edici faktör (SAF) -1'dir (Crawford ve diğ., 1996).



Şekil 1.9: İnflamasyon ve MMP-9 salgılanmasında makrofajların rolü (Andriy ve diğ., 2013'ten modifiye edilmiştir)

MMP-9'u aktive eden en önemli düzenleyicilerden biri AP-1'dir (Wasylyk ve diğ., 1991). MMP-9 promotör bölgesi, 2 tane AP-1 bağlanma elementi içerir. AP-1 seviyelerindeki hızlı artış, MMP-9 transkripsiyonu ve aktivasyonu ile ilgilidir (Woessner ve diğ., 1991). SP-1 veya NF- κ B'nin, MMP-9'un promotör bölgelerindeki AP-1 elementlerine yukarı bölgesine bağlanması, MMP-9 transkripsiyonunun tamamen baskılanması için gereklidir.

SAF-1'in, MMP-9 promotör bölgesindeki AP-1 elementlerinin yukarı bölgesine bağlanması ve MMP-9 transkripsiyonunu baskılanmasıyla ilgili bir başka örnektir (Ray ve diğ., 2005). SAF-1 veya AP-1 mutasyonları MMP-9 promotörünün baskılanmasını, SAF-1 ve AP-1'in kabiliyetlerinin azalması ise MMP-9 transkripsiyonunu etkiler (Ray ve diğ., 2005).

NF- κ B mekanizması MMP-9 seviyesini artırır (Chen ve diğ., 2004). NF- κ B, promotör veya enhancerdeki κ B DNA'ya bağlanarak genin ifadesini düzenler. Bond ve arkadaşları düz kas hücrelerinde MMP-9 seviyesinin artmasının NF- κ B mekanizmasıyla bağlantılı olduğunu göstermişlerdir (Bond ve diğ., 2001). NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin baskılanması, vasküler düz kas hücreleri ve makrofajlarda MMP-9 üretimini azaltır. Reaktif oksijen türleri doğrudan veya dolaylı olarak NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve böylece

MMP-9'u etkinleştirebilir (Okamoto ve diğ., 2001). Ang-II direkt veya dolaylı olarak MMP-9'un ifadesini etkileyebilir. Ventriküler miyositlerde Ang-II doğrudan NF-kB'yi uyararak MMP-9 ifadesini başlatır. Miyokardiyumda üretilen aldosteron, NF-kB mekanizması yoluyla, MMP-9 üretimini tetikler (Rouet-Benzineb ve diğ., 2000).

1.4.4. MMP-9'la İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Embriyo gelişiminde ESM'nin degredasyonu ve yeniden şekillenmesi önemlidir. ESM'nin yeniden şekillenmesi trofoblast implantasyon ve plesanta oluşumu için önemlidir. Hem desidua hem de ekstravillous trofoblarda MMP'nin doğru ifade edilmesi ve lokal aktivasyonu erken gebelikte kritik bir noktadır (Goldman ve Shalev, 2003; Salamonsen ve diğ., 2000). MMP-2 ve MMP-9 desidual hücrelerdeki stomal hücrelerin farklılaşmasında önemlidir (Seval ve diğ., 2004; Xu ve diğ., 2000), presental dokuda ise trofoblast invazyonunu ve anjiyogenezin düzenlenmesini etkilerler (Niu ve diğ., 2000; Staun-Ram ve diğ., 2004). Erken gebelik görülen kadınlarda MMP-2 ve MMP-9 ifadesindeki bir bozukluğun implantasyon öncesinde endometrial gelişimi yavaşlattığı saptanmıştır. Bu bireylerde embriyo seçimi normalden daha uzun sürmektedir.

Erken gebelikte hem annede hem de embriyoda, MMP gen ifadesinde bir düzensizlik görülmüştür. MMP genlerinin promotör bölgelerindeki SNP'ler MMP genlerinin ifadesini etkilemektedir. Nina ve arkadaşları yaptığı çalışmada erken gebeliğin MMP1- 1607 1G/2G, MMP2 -735 C/T, MMP2-1306 C/T, MMP3-1612 5A/6A ve MMP9-1562 C/T SNP'leriyle bağlantılı olduğunu bulmuşlardır (Nina ve diğ.; 2012).

MS (Multipl Skleroz) patogenezi ve prognozu çok karmaşık olan bir hastalıktır. Hastalığın gelişiminde genetik yatkınlığın ve çevresel faktörlerin önemli olduğu çeşitli klinik çalışmalarda gözlemlenmiştir. SNP'lerin MS patogenezi etkilediğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. MMP'lerin yaklaşık %20'si merkezi sinir sisteminde bulunur. MS patogenezi MMP'ler kan-beyin bariyerini hasara uğratarak, inflamatuvar hücrelerin beyine istilasını hızlandırır. Dagmara ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MMP-1, -3 ve -9 polimorfizminin MS klinik seyri üzerindeki etkisine bakmışlar; ancak hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır (Dagmara ve diğ.;

2009).

Tümör oluşumu çeşitli genlerle ilişkilidir. Tümör invazyonu ve metastazın erken evrede önlenmesi, kanser tedavisi için önemlidir. Daha önce yapılan çalışmalar, ESM'nin degrade olmasının tümör invazyonu ve metastazda önemli bir adım olduğunu ve bu süreçte MMP-2 ve MMP-9'un önemli rol oynadıklarını göstermiştir. Birçok çalışmada kanserli hücrelerde MMP-2 ve MMP-9'un yüksek ifadesine ve aktivitesine rastlanmıştır. Kyung ve arkadaşları yaptığı çalışmada kolorektal kanserle MMP-1, -3,-7,-9 ve -14 polimorfizmleri arasındaki ilişkiye bakmışlar ve hastalarda MMP-9 seviyesi oldukça yüksek çıkmıştır (Kyung ve diğ.; 2010).

2. AMAÇ

Matris metalloproteinazlar fizyolojik ve patolojik doku yıkımında önemli rol oynayan, ekstrasellüler proteazlardır. MMP'ler ekstrasellüler matris ve bazal membranın protein birleşenlerini bozarak tümör hücrelerinin invazyonunu gerçekleştirirler. Tümör gelişiminin erken safhalarında gerçekleşen hücre çoğalmasının ve anjiyogenez modülasyonunun uyarılmasında MMP'lere rastlanmıştır (Alicia ve diğ., 2004).

İnsan MMP-9 geni 20q11.2–20q13.1'de bulunur, 13 ekzon ve 12 intron içerir (O-charoenrat ve diğ., 2001). C/T tek nükleotid değişimi promotör bölgesinde, -1562 pozisyonunda C/T polimorfizmine neden olur. MMP-9 transkripsiyonel aktivitesi, C/C genotipine sahip hücrelerde, C/T ya da T/T genotipine sahip hücrelere göre daha azdır (Folgueras ve diğ., 2004)

Son yıllarda kanser ile ilgili yapılan çalışmalar MMP'ler üzerine yoğunlaşmıştır. Morteza ve arkadaşlarının meme kanserinde MMP-9 geninin promotör polimorfizmiyle (-1562 C/T) ilgili yaptığı bir çalışmada, MMP-9 polimorfizminin metastazı etkilediği görülmüştür (Morteza ve diğ., 2009).

Yulan ve arkadaşlarının mesane kanserinde yaptığı MMP-1-2 ve -9 genlerinin polimorfizmleriyle ilgili bir çalışmada ise mesane kanserinin MMP-1 ve MMP-2 polimorfizmiyle bağlantılı olduğu; ancak MMP-9 ile bağlantılı olmadığı bulunmuştur. (Yulan ve diğ., 2013).

MMP-9 geninin promotör polimorfizmiyle (-1562 C/T) mide kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar da yapılmıştır. Yong ve arkadaşları mide kanseri ve ilerlemesinde MMP-9 polimorfizminin etkisine bakmış ve MMP-9 polimorfizminin (-1562 C/T) lenf nodu metastazında etkili olduğunu görmüştür.

Lee ve arkadaşları, mide kanseri olan kadınlarda, MMP-9 -1562 C/T polimorfizmi ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmaya göre heterozigot CT ve homozigot TT genotipine sahip kadın hastalarda mide kanseri riskinin homozigot CC genotipine sahip kadın hastalara göre daha yüksek olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir ($p=0,02$). Mide kanseri MMP-9 polimorfizm ile lenf nodu metastaz ($p=0,03$) ve invazyon derinliği ($p<0,01$) arasında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir (Lee ve diğ., 2013).

Yang ve arkadaşları mide kanserinde, MMP-9 polimorfizmi ile lenf nodu metastaz ve invazyon derinliği arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. MMP-9 polimorfizmi ve lenf nodu metastaz arasında anlamlı bir ilişki kurulmuşken ($p=0,08$), MMP-9 ile metastaz arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ($p=0,38$) (Yang ve diğ.,2005).

Shunji ve arkadaşları mide kanserinde tümör oluşumu üzerinde MMP-9 polimorfizm etkisine bakmışlardır. Yaptıkları çalışmada hasta ve kontrol grubu genotiplenmesi arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,223$). Ancak, mide kanseri MMP-9 polimorfizmi ile invazyon derinliği, klinik evre ve tümör derecesi arasında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir (her biri için $p<0,05$) (Shunji ve diğ.,2008).

Daha önce Türkiye’de mide kanseri ile MMP-9 gen promotör bölgesindeki (-1562 C/T) polimorfizm arasındaki ilişkiyle ilgili yapılan bir çalışma olmamıştır.

Yaptığımız bu çalışmada, mide kanseri hastalarının normal ve tümörlü dokularında MMP-9 geni promotörü -1562 C/T polimorfizmi PZR-RFLP yöntemi ile araştırılıp, tespit edilen genotiplerin *H.pylori* enfeksiyonu, invazyon derinliği, tümör evresi, tümör nekrozu, ailesel hikâye, sigara ve alkol kullanımı açısından karşılaştırılması hedeflenmektedir.

3. MATERYAL

3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Bu çalışmada kullanılan mide kanserli hastaların tümör ve evre doku örnekleri, bu hastalara ait patolojik bilgiler, ailesel hikâye, sigara, alkol kullanımı gibi bilgiler 2006-2009 yılları arasında Cerrahpařa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Patoloji Ana Bilim Dallarından temin edilmiştir. Doku örnekleri -80°C’de muhafaza edilmiştir. Daha önceden bu dokulardan izole edilen DNA örnekleri -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri

10X MgCl ₂ ’süz tampon	:200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 750 mM Tris-Hcl (pH,8), % 0,1 Tween 20, (Fermentas, LİTVANYA)
MgCl ₂	:dH ₂ O’da 25mM (Fermentas, LİTVANYA)
Deoksiribonükleotitler (dNTP)	:100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Fermentas, LİTVANYA)
Taq DNA Polimeraz	: 5U/μl Rekombinant Taq DNA (Fermentas, LİTVANYA)

3.3. Primerler

Bu çalışmada kullanılan primerler W. Rogier ve arkadaşlarının çalışması referans alınarak tasarlanmıştır. Primer dizileri ve özellikleri Tablo

3.1’de gösterilmiştir.

Tablo.3.1: MMP-9 geni -1562C/T polimorfik bölgesini oluşturup çoğaltmak için kullanılan primerler

Pozisyon	Primer İsmi	Primer Dizisi	Baz Uzunluğu (bp)	Erime Sıcklığı (TM)
-1562	MMP-9 F	5'-GCCTGGTCAACGTAGTGAAAC-3'	21	56,1°C
	MMP-9 R	5'-TCACCTTCTTCAAAGCCCTATT-3'	22	54°C

3.4. Restriksiyon Enzimi ve Reaksiyon Tamponu

NlaIII (Hin1II) : 10 U/μl (Fermenta, LİTVANYA)
Reaksiyon Tamponu : 10X Greenbuffer NlaIII
Tanıma yeri : 5'...CATG ↓ ...3'
3'... ↑ GTAC ...5'

3.5. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

10X TBE (Tris-Borik Asit- EDTA) (pH 8,3) (1 lt) 2H₂O (25 mM) : 100g Tris-Baz
55g Borik Asit
9,3g Na₂EDTA- 2H₂O (25 mM)

Agaroz jel : 0,5X TBE tamponunda
%2’lik ve %3’lük agaroz
(Prona, EEC)

Etidyum Bromür (EtBr) : 10 mg/ml
(Sigma, ALMANYA)

6X DNA yükleme boyası : 10 mM Tris-HCl (pH 7,6)
2,5 mg/ml BPB
2,5 mg/ml Ksilen Siyanol
60 mM EDTA
(Fermentas, LİTVANYA)

3.6. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 100 baz çiftlik DNA Markörü: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 baz çiftlik fragmanlar içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)

3.7. Cihazlar ve Markaları

Cihazlar	Marka
Tartılar	:Hassas Terazi, Sartorius BL 120 S (ALMANYA) Hassas Terazi, XB220 A (Presica, İSVİÇRE)
Derin Dondurucular	:-20°C, Arçelik 2021 D -80°C, Thermo Fisher Scientific
Buzdolapları	:Beko 8742, Arçelik 3061 Plus
Yatay Elektroforez Sistemi	:MultiSub Midi (Clever Scientific, İNGİLTERE) MiniRapide (Clever Scientific, İNGİLTERE)
Isı Bloğu	:DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Görüntüleme Sistemi	:Bio-RAD UniversalHoodII (BIO-RAD, İTALYA)
Otoklav	:Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)
Manyetik Karıştırıcı	:MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)
Vorteks	:Heidolph REAX (Heidolph, ALMANYA)
PZR Cihazları	:Teche TC-512 (İNGİLTERE)

Güç Kaynakları	Teche TecheGene (İNGİLTERE) :Pharmacia Biotech, (İSVEÇ)
Mikrodalga Fırın	:MD 592 SUPER (Arçelik, İSVEÇ)
Su Arıtma Sistemi	:Miilipore Milli Q Synthesis A10
Mikropipet Seti	:0,2-2, 2-20, 20-200, 200-1000 µl'lik Finnipipette (ThermoScientific, FINLANDIYA)

4.METOD

4.1. Primer Tasarımı

MMP-9 geni promotör bölgesi -1562. pozisyonundaki C/T SNP analizi için ileri ve geri primer diziye özel olarak tasarlandı.

Şekil 4.1 gösterilen primerlerin hedef dizi amplifikasyonu NCBI BLAST kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) test edildi.

```
5' GCCTGGTCAACGTAGTGAAAC CCCATCTCTACTAAAAATACAAAAATTTAGCCAG
GCGTGGTGGCGCAYGCCTATAATACCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATT
GCTTGAACCCGGGAGGCAGATGTTGCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTGCACTCCA
GCCTGGGTGACAGAGTGATACTACACCCCCAAAAATAAAAATAAAATAAATAAATAC
AACTTTTGAGTTGTTAGCAGGTTTTTCCCA AATAGGGCTTTGAAGAAGGTGA 3'
(278bç)
```

Şekil 4.1: PZR ile çoğaltılacak hedef bölgenin belirlenmesi (kırmızı ile vurgulanan yer ileri primer, mor ile vurgulanan geri primer, sarı ile vurgulanan yer restriksiyon enziminin bağlanma bölgesidir. Y: C/T değişimi)

4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimerik zincir reaksiyonu (PZR) hücre içinde DNA'nın kendini eşleme mekanizmasına dayanır. Bu teknikte ilk olarak yüksek sıcaklıkta çift sarmal DNA (dsDNA) çözülerek tek sarmal haline gelir. Bu aşama “denatürasyon” olarak adlandırılır. Primer eşleşmesi denilen olay da, primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin çoğaltılacak hedef diziye bağlanmasıdır. Mg⁺² iyonlarının varlığında, katalizör olan DNA polimeraz ile primerlere nükleotid (dNTP) eklenmesi ve DNA zincir uzaması ise “primer uzaması” olarak bilinir. Her bir döngüde üretilen ürün bir sonraki döngü için “kalıp DNA” görevi görür. Belirlenen döngü sayısı, amplifikasyon hakkında bilgi verir. Örneğin reaksiyonumuz 20 döngüden oluşuyorsa, PZR işlemi sonucu hedef bölge 2²⁰ kez kopyalanmış olur. Bu çalışmada kullanılan PZR bileşenleri

Tablo 4.1’de, döngü koşulları ise Tablo 4.2’de belirtilmiştir.

Tablo 4.1 PZR bileşenleri ve miktarları

PZR İçeriği (Reaktifler)	Kullanılan Miktar (Stok konsantrasyonu)
10X Tampon (NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 µl (10X)
MgCl ₂	3 µl (25mM)
MMP-9 F Primer	0.25 µl (10mM)
MMP-9 R Primer	0.25 µl (10mM)
dNTP	0.5 µl(10mM)
Taq Polimeraz	0.2 µl(5U/ µl)
DNA	1 µl (100ng)
dH ₂ O	17.3 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo 4.2: PZR koşulları

PZR Koşulları	
İlk Denatürasyon	94°C, 10 dk
Denatürasyon	94°C, 30 sn
Primerlerin Bağlanması	64°C, 30 sn
Uzama	72°C, 30sn
Son Uzama	72°C, 5 dk

4.3. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon enzimleri (RE), DNA ekseninde belli bir nükleotid sırasını tanıyıp kesim yapar. Restriksiyon enzimlerinin kesim sonucunda oluşturduğu parçalara, **restriksiyon parçaları** denir. DNA molekülü farklı kesim bölgelerine sahip olabilir. Değişik enzimlerle muamele sonucunda farklı uzunluklarda restriksiyon parçaları oluşur ve bu parçalar jel elektroforezi yoluyla birbirlerinden ayrılabilirler. DNA parçalarında görülen bu polimorfizmin nedeni; nokta mutasyonu veya inversiyon, delesyon, translokasyondan kaynaklanan büyük mutasyonlar da olabilir. RFLP analizinde restriksiyon enzimlerinin DNA’daki kesim noktalarındaki değişimlerden faydalanılır. PZR ile çoğaltılan DNA bölgesi RE kesimine maruz bırakılır. Jel elektroforezinde DNA parçalarına bakılır. DNA mutasyonları fragment sayısını değiştirecektir, bu nedenle jelde farklı büyüklüklerde bant görülmesi beklenir.

Bu çalışmadaki PZR ile çoğaltılan hedef bölgeler, NlaIII RE kesim

koşulları ve oluşması beklenen fragment uzunlukları Tablo 4.3’de özetlenmiştir. Eğer PCR örneği C alleleline sahipse kesim olmayacak, T alleleline sahipse 207-71 bç şeklinde kesim olacaktır.

Tablo 4.3: RFLP reaksiyon miktarları

RFLP Reaksiyon Miktarları
12 µl dH ₂ O
2 µl reaksiyon tamponu (10X Green Buffer)
15 µl PZR ürünü
1 µl NlaIII
RFLP Koşulları
37°C, 5 dk inkübasyon süresi
80°C, 5dk NlaIII enzimin inaktivasyon süresi
Beklenen DNA Parçaları
Homozigot CC genotipi: 278 bç
Heterozigot CT genotipi: 278 bç ve 207+71 bç
Homozigot TT genotipi: 207+71 bç

4.4. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA fragmanlarının boylarına göre ayırt edilmesini sağlayan jel elektroforezi, uygun bir tampon içerisinde jele yüklenen DNA’nın yapısındaki negatif yüklü fosfat grupları nedeniyle negatif elektrondan pozitif elektrona göç etme prensibine dayanır. En sık kullanılan jel elektroforezi yöntemleri: Agaroz jel ve poliakrilamid jeldir.

Agaroz, kırmızı alg türü olan Agar agar’dan izole edilmiş doğrusal bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözünebilir, soğutulduğunda ise polimerle karşılıklı hidrojen bağları kurarak jel yapısını oluşturur.

Agaroz yoğunluğu değiştirilerek (%0,5-1,5) jelin por çapını ayarlamak mümkündür. DNA’nın jelde en uygun şekilde yürümesini sağlamak için; küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için düşük agaroz yoğunluğu kullanılabilir.

Etidyum bromür, DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm’de ışığı absorblaması sonucu floresan etki gösterir ve DNA’nın jelde görünür hale gelmesini sağlar.

Bu çalışmada agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan agaroz jel konsantrasyonları, hangi yöntemlerde kullanıldıkları ve yükleme koşulları Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4: Agaroz jel konsantrasyonları kullanılan yöntemler ve yükleme koşulları

Kullanıldığı yöntem	Konsantrasyon	Hazırlanış	Yükleme koşulu	Yürütme şartı
PZR	%2’lik	-50 ml 0,5X TBE	-1 µl yükleme boyası (BPB) + 5 PZR ürünü	-120V -300A -35dk
		-1 gr toz agaroz	-2 µl 100 bç markör	
RFLP		-1.5µl EtBr	-10 µl RFLP ürünü -2 µl 100 bç markör	-120V -300A -25dk

%2’lik agaroz jel hazırlamak için 50ml 0,5X TBE içerisinde 1gr agarozun çözülmesi gerekir, bunun için karışım yaklaşık 1,5 dakika mikrodalga fırında kaynatılır. Kaynayan karışımın ısısı bir miktar düşürülerek 1,5 µl EtBr eklenir. Karışım, jel kasetine dökülerek jel kıvamına gelene kadar donması beklenir. Jel, içinde 0,5X TBE tampon bulunan yatay elektroforez tankına yerleştirilir. Taraklar alınarak kuyucuklara 0,5X TBE tampon girmesi sağlanır. Tablo 4.4’de belirtilen koşullarda, jele yükleme yapılır. RFLP yapılırken kullanılan enzim tamponu (greenbuffer) yeşil floresan boya içerdiği için RFLP ürünleri yüklenirken ayrıca BPB kullanılmamıştır. Yükleme sonrasında Tablo 4.4’de verilen uygun şartlarda DNA’nın anoda yürümesi gerçekleşir.

4.5. Dizi Analizi

PZR-RFLP yöntemi ile saptanan genotiplerin arasından DNA dizi analizi ile konfirme edilmek üzere rastgele olarak örnekler seçildi. Dizi analizi yapılacak DNA örneklerinin amplifikasyonu son hacim 50 µl olacak şekilde, tüm hacimler 2 katına çıkarılarak aynı koşullarda PZR yapıldı. Primerler 5mM konsantrasyonunda 10 µl olacak şekilde hazırlandı. PZR ürünlerinin kalitesine agaroz jelde bakıldıktan sonra, PZR ürünleri primerlerle birlikte pürifikasyon ve çift yönlü analiz için İontek firmasına gönderildi.

4.6. İstatistiksel Veri Analizi

Çalışmanın istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 19.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı değerler yaş ortalaması standart sapma olarak, kategorik değişkenler gözlem sayısı ve yüzde olarak gösterildi. İki genotip grubunun karşılaştırılmasında (*H.pylori* enfeksiyon, tümör evresi, invazyon derinliği, tümör nekrozu, ailesel hikâye, sigara kullanımı, alkol kullanımı) Mantel Haenzsel ve Fisher kesin olasılık testleri kullanıldı.

5. SONUÇLAR

5.1. Örneklerin Tanımı

Bu çalışmada, mide kanser vakası olan 30 hasta tümör dokusu ve bu hastaların mide çevre dokuları ile toplam 30 çift örnek kullanılmıştır. Tümör dokularına ait *H. pylori* enfeksiyonu, invazyon derinliği, tümör evresi, tümör nekrozu, sigara ve alkol kullanımı, ailesel hikâye bulgularına göre yüzdelik oranları ve yaş ortalaması \pm standart sapma olarak Tablo 5.1’de gösterilmiştir.

Tablo 5.1: Mide kanser hastalarının belirli karakteristik özelliklerine göre yüzdeleri

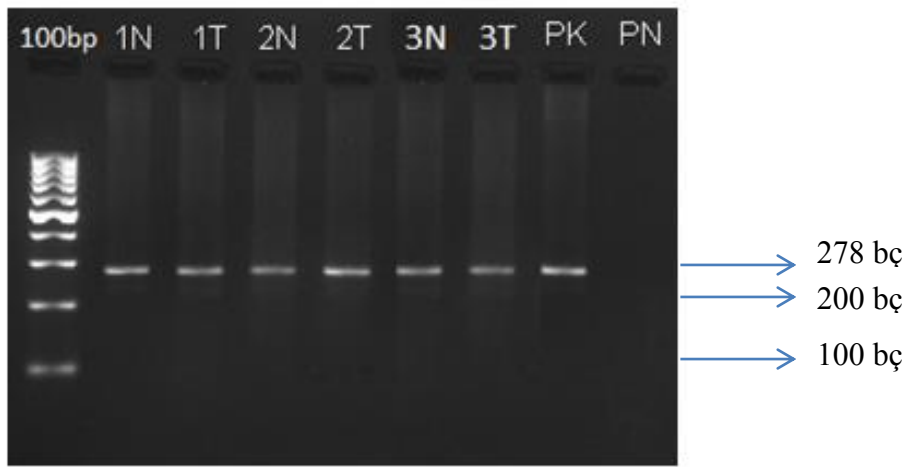
	n (Hasta sayısı)	Ortalama	Standart Sapma	
Yaş	30	55 (22-74)	$\pm 12,1$	
Cinsiyet				
Kadın	11	55,4	$\pm 14,2$	
Erkek	19	54,7	$\pm 11,3$	
Mide Kanseri	n(Hasta Sayısı)	Yüzde (%)	Bilgisi Olan Hasta Sayısı	Bilgisi Olmayan Hasta Sayısı
Toplam Hasta	30			
<i>H.pylori</i>	8	33	24	6
Tümör Evresi			20	10
1	3	15		
2	6	30		
3	11	55		
İnvazyon Derinliği			29	
I.Propira/M.Mukoza/ Submukoza	5	17		
m.propri	7	24		
Subseroza	-	-		
Seroza	17	59		
Tümör Nekrozu	14	47	30	0
Sigara	16	53	30	0
Alkol	6	20	30	0
Aile Hikâyesi	9	30	30	0

5.2. MMP-9 Geni Promotör Bölgesi -1562 C/T Polimorfizminin PZR-RFLP Yöntemi ile Moleküler Analizi

5.2.1. İlgili Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması

MMP-9 geni -1562C/T tek nükleotid polimorfizmi için diziye özel olarak geri ve ileri primer tasarlanmıştır.

Polimorfik bölge için tasarlanan bu primerler sınıflandırılarak çoğaltılmış ve 278 bç'lik PZR ürünü elde edilmiştir (şekil 5.1).

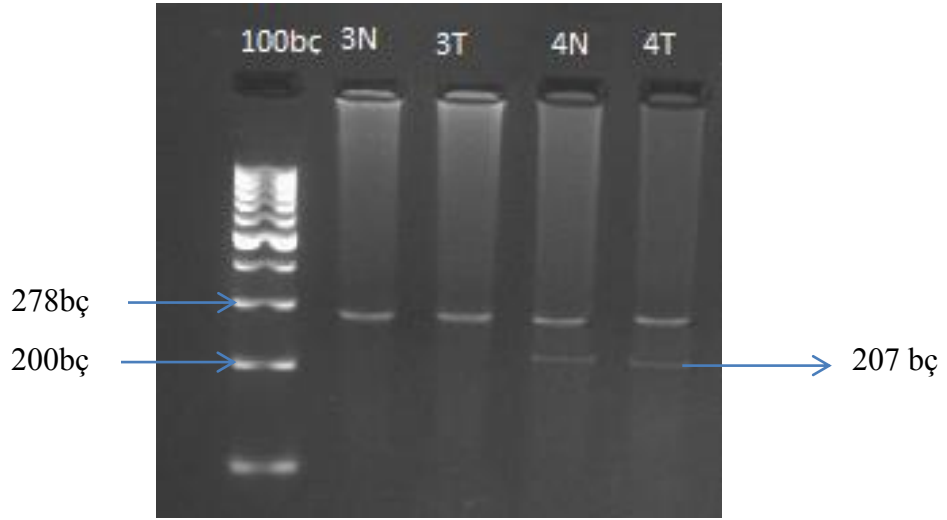


Şekil 5.1: MMP-9 -1562 C/T Polimorfik Bölgesinin PZR İle Amplifikasyon Sonuçlarının %2'lik Agaroz Jelde Görünümü (T: Tümörlü Doku, N: Normal Doku, PK: Pozitif Kontrol, PN: Negatif Kontrol)

5.2.2. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

Çoğaltılan ilgili MMP-9 gen lokusu, -1562 C<T tek nükleotid polimorfizmi analizi için NlaIII restriksiyon enzimi ile muamele edilmiştir. Bant boyları 100bç DNA markörleri ile %2'lik agaroz jelde 20 dakika yürütülerek değerlendirilmiştir. NlaIII restriksiyon enzimi PZR ürününde T alleli varsa, mutasyonu tanıyıp o bölgeden kesecektir. CC genotipinde 278 bç uzunluğunda bant görülmesi, CT genotipinde 278, 207, 71 bç uzunluğunda üç bant görülmesi ve TT genotipinde 207-71 bç uzunluğunda iki bant görülmesi beklenmektedir (Şekil 5.2).

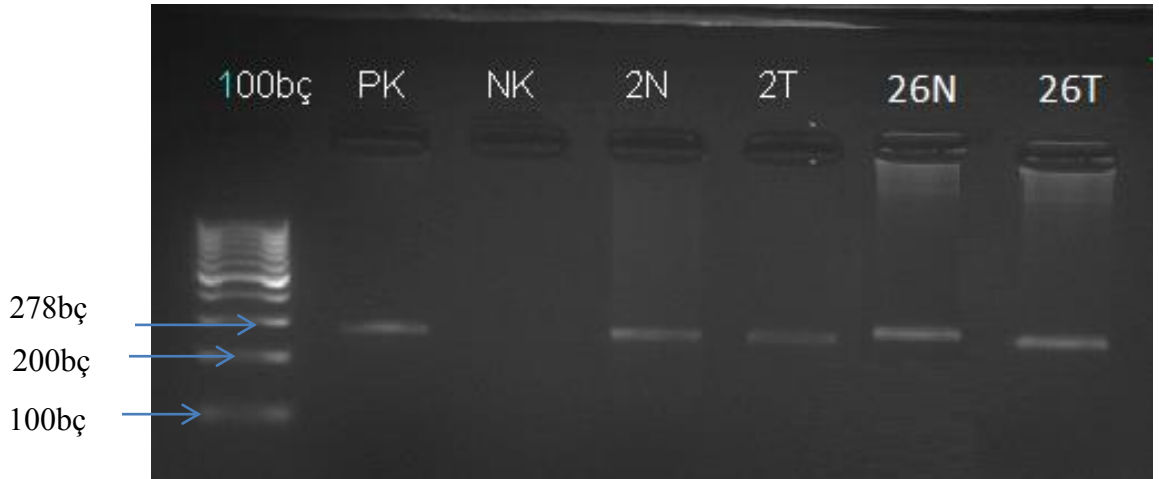
Hastaların hepsinin normal ve tümörlü dokusunda aynı genotipler saptandı. İncelenen hastaların 4 tanesinde heterozigot CT ve 26 tanesinde homozigot CC genotipi tespit edildi.



Şekil 5.2:Polimorfik Promotör Bölgesi Yapılan Örneklerin RFLP sonuçlarının %2'lik Agaroz Jelde Görünümü. (3N-T CC homozigot, 4N-T CT heterozigottur.) (N: Normal doku,T: Tümörlü doku).

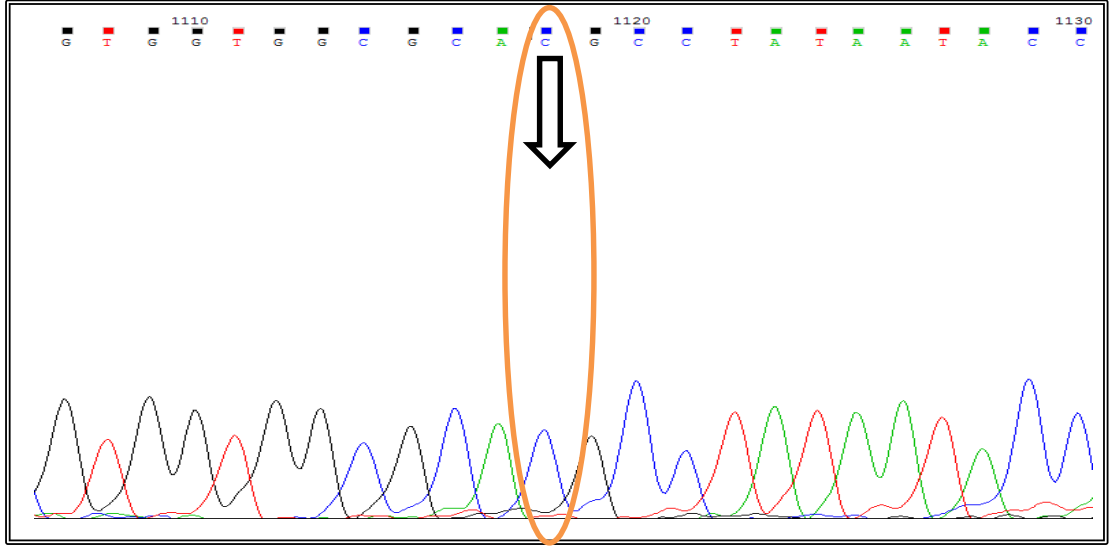
5.3. Dizi Analizi

DNA pürifikasyonu ve dizi analizi için rastgele seçilip gönderilen örneklerin PZR görüntüleri Şekil 5.3'te gösterilmiştir.



Şekil 5.3: Dizi Analizine Gönderilecek PZR Örneklerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntüsü (N: Normal Doku, T: Tümörlü Doku, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol)

Dizi analizi sonuçları ChromasPro 1.5 programı ile değerlendirilmiştir. Homozigot CC genotipine sahip 26N örneğinin kromatogram sonuçları Şekil 5.4'te gösterilmiştir.



Şekil 5.4: MMP-9 -1562 promotör bölgesi C/C homozigot kromatogram görünümü (CACG)

5.4. Verilerin İstatistiksel Analizi

PZR-RFLP yöntemiyle sonucu elde edilen hasta tümör dokusuna ait genotip ve allelotip sayısı Tablo 5.2'de gösterilmiştir. Genotip dağılımının Hardy Weinberg dengesine uyumluluğu analiz edilmiştir (Tablo 5.3.).

Tablo 5.2: Tümör dokularına ait MMP-9 -1562. promotör bölgesi ve allelotip sayısı ve yüzdeleri

Genotip	Genotip Sayısı	Genotip Yüzdesi	Allelotip	Allelotip sayısı	Allelotip yüzdesi
CC	26	86,7	C	56	93,3
CT	4	13,3	T	4	6,7

Tablo 5.3: Hardy Weinberg dengesine göre genotip dağılımı

Genotip (%)	X²	P
CC (87)		
CT (13)	0,48	0,49

X²: Ki-Kare, p: Anlamlılık

Hardy Weinberg dengesine göre X² değeri 0,48 ve p değeri 0,486 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlarına göre genotip dağılımı Hardy Weinberg dengesindedir (p≥0,05, X²≤3,84).

Homozigot CC ve heterozigot CT genotip grubunu *H.pylori* enfeksiyonu, invazyon derinliği, tümör evresi, tümör nekrozu, sigara, alkol kullanımı ve ailesel hikâye açısından karşılaştırmak için Mantel Haenzsel ve Fisher kesin olasılık testleri kullanıldı. P<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo 5.4). MMP-9 promotör bölgesi homozigot CC ve heterozigot CT genotipleriyle sigara kullanımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenirken (p=0,037), diğer hiçbir kategorik değişken açısından ilişki kurulamamıştır (p<0.05).

Bu sonuçlara göre hastaların 11'i (%55,3) kadın, 19'u (%5,7) erkektir. Bilgileri olan bireylerin 8'i (%33) *H.pylori* enfektidir. Tümör evre tiplerinde 3 (%15) kişi 1.evre, 6 (%30) kişi 2. evre ve 11 (%45) kişi 3.evrededir. İnvazyon derinliğine bakıldığında birinci derece birey sayısı 5 (%17), ikinci derece 7 (%24) ve üçüncü derece 17'dir (%59). Hastalar arasından 16 (%53) kişi sigara, 6 (%20) kişi alkol kullanırken 9 (%30) kişinin aile geçmişinde mide kanseri görülmüştür.

Tablo 5.4: Homozigot CC ve heterozigot CT genotiplerinin kategorik değişkenler açısından Mantel Haenzsel ve Fisher kesin olasılık testleri ile karşılaştırılması

	CC	CT	P
	n %	n%	
Cinsiyet			
Kadın	10 (38,5)	1 (25)	0,530 ^a
Erkek	16 (61,5)	3 (75)	
İnvazyon Derinliği			
L.Propriya/M.Mukoza/Submukoza	4 (16)	1 (25)	0,667 ^b
M.Propriya	7 (28)	0	
Subseroza	-	-	
Seroza	14 (56)	3 (75)	
Tümör Evresi			
1	2 (11,8)	1 (33,3)	0,868 ^b
2	6 (35,3)	0	
3	9 (52,9)	2 (66,7)	
Tümör Nekroz			
Yok	14 (53,8)	2 (50)	0,648 ^a
Var	12 (46,2)	2 (50)	
H.Pylori			
Yok	13 (65)	3 (75)	0,593 ^a
Var	7 (35)	1 (25)	
Sigara			
Var	16 (61,5)	0 (0)	0,037 ^a
Yok	10 (38,5)	4 (100)	
Alkol			
Var	6 (23,1)	0 (0)	0,557 ^a
Yok	20 (76,9)	4 (100)	
Aile Hikâyesi			
Var	8 (30,8)	1 (25)	0,655 ^a
Yok	18 (69,2)	3 (100)	

^a: Fischer kesin olasılık testi sonuçları

^b: Mantel Haenzsel olasılık testi sonuçları

6. TARTIŞMA

SNP iki birey arasındaki belli bir DNA parçasındaki tek bazlık farklılık olarak tanımlanabilir (Zang ve diğ., 2013). Brookes'a göre SNP, allel sıklığı %1 veya %1'den fazla olan popülasyonlarda normal bireylerde bulunan farklı sekans alleller genomik DNA'daki baz değişimidir (Brookes, 1999).

SNP'ler transisyon (bir pürin bazın "A, G" diğer bir pürin bazıyla veya bir pirimidin bazın "C, T" diğer pirimidin bazıyla değişmesi) ve transversiyon (bir pürin bazının bir pirimidin bazına değişimi veya tersi) gibi baz değişimlerinden kaynaklanır (Zang ve diğ., 2013). Transversiyonun varyantlarının sayısı, transisyonun sayısından daha fazla olduğu halde, transisyon sıklığı, transversiyonun sıklığından daha yüksektir. Bunun nedeni CpG adacıklarındaki C'lerin metilasyonla T'ye dönüşme olasılığının diğer herhangi bir nükleotid çiftinin mutasyona uğrama olasılığına göre 8.5 kat daha fazla olmasıdır. Bir popülasyondaki tek baz değişiminin frekansı % 1'den büyük ise bu değişim SNP, % 1'den küçük ise mutasyon olarak adlandırılır.

İnsan genomu yaklaşık 2.91 milyar baz çiftine ve 35.000 gene sahiptir. Tüm insanların baz diziliminin % 99.9'u birbirinin aynıdır. % 0.1'lik farklılık insanlar arasındaki çeşitliliğin nedenidir (Brooks ve diğ., 2006).

Mide kanseri hızlı seyredir. Mide tümörü midenin dış tabakasının içinden büyüyerek pankreas, özofagus veya bağırsak gibi çevre organların içine doğru uzanabilir. Mide kanseri hücreleri kan yoluyla karaciğer, akciğerler ve diğer organlara yayılabilir. Kanser hücreleri ayrıca lenfatik sistem aracılığıyla vücuttaki tüm lenf bezlerine yayılabilir (Haenszel ve diğ., 1972).

Mide kanserine neden olan çevresel faktörler arasında sigara, alkol, coğrafya, diyet, yaş, cinsiyet, *H. pylori* enfeksiyonu sayılabilir.

Mide kanseri Japonya, Malezya, Şili ve İzlanda'da daha sık görülür. Erkeklerde kadınlara göre daha fazla görülür. En sık görüldüğü yaşlar 50-60'lı yaşlardır. Sosyoekonomik düzeyi düşük toplumlarda sıklık yükselir (Whelen ve diğ., 1990). Bu çalışmada mide kanseri olan 30 hastanın tümörlü ve normal

dokusu incelenmiştir. 30 hastanın 11'i kadın 19'u erkektir. Yaş ortalaması ise kadınlarda 55.4, erkeklerde 54.7 olarak hesaplanmıştır.

H. pylori enfeksiyonu mide iltihabı, mide ülseri ve mide kanseri riskini arttırmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonu olan kişilerin sadece çok küçük bir kısmında mide kanseri gelişir. *H. pylori* enfeksiyonuna karşı antikorların varlığında mide kanseri riskinin 6 kat arttığı bilinmektedir (Viste ve diğ., 1986). Bu çalışmada 30 hastanın 8'inde *H. pylori* enfeksiyonu görülmüştür. İstatistiksel olarak genotip grubuyla *H.pylori* enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ($p=0,593$). Örnek sayısı arttırılarak anlamlı bir ilişki kurulabilir.

Correa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sigara ve mide kanseri arasında bir ilişki kurulamamıştır (Correa, 1992). Bizim yaptığımız bu çalışmada homozigot CC genotipine sahip 26 hastadan 16'sının sigara içtiği bilinmektedir. Heterozigot CT genotipine sahip 4 hastanın hiçbiri sigara içmemektedir. İstatistiksel olarak genotip gruplarıyla sigara kullanımı arasında anlamlı bir ilişki kurulmuştur ($p=0,07$).

Bu çalışmada hastaların %20'si alkol kullanmaktadır. Alkol ve mide kanseri arasında bir ilişki olmadığı düşünülebilir. Ancak kesin bilgi örnek sayısı arttırıldığında söylenebilir.

Mide kanserinin nadir türü ailesel geçişlidir. Bu çalışmada 30 hastanın 9'unun aile geçmişinde mide kanserine rastlanmıştır. İstatistiksel olarak bu sonuç anlamlı bulunmamıştır ($p=0,655$). Örnek sayısının artırılması ile anlamlı bir sonuç bulunabilir.

Mide kanserinin patolojisini etkileyen birçok prognostik faktör vardır. Büyüme faktörleri ve onların reseptörleri, hücre-hücre düzenleyicileri, hücre-adezyon molekülleri, MMP'ler gibi invazyon ve metastaza katılan gen ve moleküller prognostik faktörlere birer örnektir. Bu faktörlerin dışında epigenetik değişiklikler ve genetik polimorfizmler de mide kanserini etkileyen prognostik faktörlere dendir.

ESM makromolekülleri, hücresel ortamların şekillenmesi ve gelişiminde önemlidir. MMP'ler ESM bozulmasına katılan proteinazlardır

(Woessner ve diğ. 2000; Hiller ve diğ. 2000). Aktivasyon kontrol kaybı arterit, kanser gibi hastalıklara neden olabilir (Knäuper ve diğ. 1997).

MMP ailesinin bir üyesi olan MMP-9, 20. kromozomun uzun kolunun 11.bölgesinde bulunur. ESM'nin degradasyonu, tümör invazyonu ve metastaz için önemlidir. MMP-9'un ESM bozulmasında önemli olduğu düşünülmektedir. MMP9 -1562 C/T polimorfizminin mide kanseriyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Homozigot CC genotipine sahip bireylerde transkripsiyonel aktivite heterozigot CT ve homozigot TT'ye göre daha azdır. Yang ve arkadaşları yaptıklarının çalışmaya göre MMP9 -1562 C/T polimorfizminin invazyon derinliği arasında anlamlı bir ilişki kurulmuşken ($p<0,05$), metastaz ile MMP-9 polimorfizm arasında bir ilişki kurulamamıştır. Yaptığımız bu çalışmada, kullanılan hasta bireylerin %59'u üçüncü derece invazyona sahiptir. İnvazyon derinliği istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p=0,667$).

Shunji ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kanserli dokularda CC alleli, kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,223$). Lee ve arkadaşlarının, mide kanseri olan kadınlarda, MMP-9 -1562 C/T polimorfizmi ile ilgili yaptığı çalışmada, heterozigot CT ve homozigot TT genotipine sahip kadın hastalarda mide kanseri riskinin daha yüksek olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir ($p=0,02$). Bizim yaptığımız bu çalışmada, homozigot CC genotipine sahip birey sayısı 26'dır. Beklenildiği gibi, kanserli dokularda CC genotipi fazla görülmüştür. Sağlıklı bir grup kullanılarak, kanserli dokularla sağlıklı dokulardaki homozigot CC genotipi kıyaslanabilir ve mide kanserinde MMP-9 polimorfizmi etkisi söylenebilir.

Bütün bu veriler ışığında MMP-9 -1562 C/T polimorfizmi ile mide kanseri arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Sağlıklı bireylerden elde edilen DNA örneklerini kontrol grubu olarak kullanıp vaka-kontrol çalışması yapılarak veya örnek sayısı artırılarak çalışma geliştirilebilir.

7. KAYNAKLAR

Ahonen, M, Baker, A. H., and Kähäri, V. M. (1998) *Cancer Res.* 58, 2310–2315

Allan, J. A. Docherty, A. J. P. Barker, P. J., Huskisson, N.S., Reynolds, J. J., and Murphy, G. (1995) *Biochem. J.* 309, 299–306

Andriy Yabluchanskiy, Yonggang Ma, Rugmani Padmanabha Iyer, Michael E. Hall and Merry L. Lindsey. *Physiology* 28, 391-403, 2013.

Aoudjit, F., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (1998) *J. Immunol.* 160, 2967–2973

Arıncı K, Elhan A. Anatomi I.Cilt ,Güneş Kitabevi, Ankara 2001,ss 241- 245

Arumugam, S., Hemme, C. L., Yoshida, N., Suzuki, K., Nagase, H., Bejanskii, M., Wu, B., and Van Doren, S. R. (1998) *Biochemistry* 37, 9650–9657

Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992; 52: 6735-40

Baker, A. H., Zaltsman, A. B., George, S. J., and Newby, A. C. (1998) *J. Clin. Invest.* 101, 1478–1487

Becker, J. W., Marcy, A. I., Rokosz, L. L., Axel, M. G., Burbaum, J. J., Fitzgerald, P. M., Cameron, P. M., Esser, C. K., Hagmann, W. K., Hermes, J. D., and Springer, J. P. (1995) *Protein Sci.* 4, 1966–1976

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000;2:737-44.

Bini A, Itoh Y, Kudryk BJ, Nagase H. Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1): hydrolysis of the γ Gly 404-Ala 405 peptide bond. *Biochemistry.* 1996;35:13056-63

Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 50: 556–565, 2001

Brookes A. 1999. The Essence of SNPs. *Gene*, 234: 77-186.

Brooks, P. C., Silletti, S., von Schalscha, T. L., Friedlander, M., and Cheresch, D. A. (1998) *Cell* 92, 391–400

Brooks, P. C., Stromblad, S., Sanders, L. C., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Quigley, J. P., and Cheresch, D. A. (1996) *Cell* 85, 683–693

Brooks SA, See DR, Guedira GB. 2006. SNP Based Improvement of a Microsatellite Marker Associated with Karnal Bunt Resistance in Wheat. *Crop Science*, 46(4): 1467-1470.

Canete-Soler R, Gui YH, Linask KK, Muschel RJ. Developmental expression of MMP-9 (gelatinase B) mRNA in mouse embryos. *Dev Dyn* 204: 30–40, 1995.

Clark, I. M., and Cawston, T. E. (1989) *Biochem. J.* 263, 201–206

Chan AO, Lam SK, Chu KM, Lam CM, Kwok E, Leung SY, et al. Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* 2001;48:808–11.

Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5: 392–401, 2004

Chesler, L., Golde, D. W., Bersch, N., and Johnson, M. D. (1995) *Blood* 86, 4506–4515

Cocco P, Ward MH, Buiatti E. Occupational risk factors for gastric cancer: an Overview. *Epidemiol Rev.* 1996; 18: 218-34.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. *First American Cancer Society*

Crawford HC, Matrisian LM. Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enzyme Protein* 49: 20–37, 1996

d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broadspectrumproteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem.* 1997;250:751-7.

Dagmara Mirowska-Guzel, Grazyna Gromadzka, Andrzej Czlonkowski, Anna Czlonkowska. Association of MMP1, MMP3, MMP9, and MMP12 polymorphisms with risk and clinical course of multiple sclerosis in a Polish population. *Journal of Neuroimmunology* 214: 113–117, 2009.

Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen

accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 106: 55–62, 2000.

Fang L, Du XJ, Gao XM, Dart AM. Activation of peripheral blood mononuclear cells and extracellular matrix and inflammatory gene profile in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 119:175–183, 2010.

Feakins RM, Nickols CD, Bidd H, Walton SJ. Abnormal expression of pRb, p16, and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases: relationship with pathological features and survival. *Hum Pathol* 2003;34:1276–82.

Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J. J., Lichte, A., Tschesche, H., and Maskos, K. (1998) *EMBO J.* 17, 5238–5248

Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK. (1993). *Nature* 363, 38-45. MEDLINE

Fidler IJ. Critical determinants of human colon cancer metastasis. In: Tahara E, editor. *Molecular pathology of gastroenterological cancer*. Berlin Heidelberg New York Singapore Tokyo: Springer-Verlag; 1997. p. 147–69.

Fields BN, Knipe DM, Nowley PM: *Fields Virology*, Lippincott-Raven, New York (1996)

Fini, M. E., Cook, J. R., Mohan, R., and Brinckerhoff, C. E. (1998) in *Matrix Metalloproteinases* (Parks, W. C., and Mecham, R. P., eds) pp. 299–356, Academic Press, San Diego

Flint SJ, Enquist LW, Krung RM, Racaniello VR, Skalka AM: *Principles of Virology*, ASM Press Washington DC (2000).

Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacin A, Castells A, et al. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumor recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer* 2004;90:206–15

Gall AL, Ruff M, Kannan R, Cuniasse P, Yiotakis A, Dive V, Rio MC, Basset P, Moras D. Crystal structure of the stromelysin-3 (MMP-11) catalytic domain complexed with a phosphinic inhibitor mimicking the transition-state. *J Mol Biol.* 2001;307:577-86.

Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., and Thorgeirsson, U. P. (1997) *Eur. J. Cell Biol.* 74, 111–122

Gomis-Rüth, F. X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H., and Bode, W. (1997) *Nature* 389, 77–81

Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002;100:249–60.

Gürel S. Mide kanserlerinin genel özellikleri. *Güncel Gastroenteroloji* 1999; 3: 392-402.

Haas, T. L., Davis, S. J., and Madri, J. A. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 3604–3610

Hanaha, D. And Robert, A., Weinberg (2000). The Hallmarks of Cancer Cell, Vol.100, 57-70, January 7, Copyright 2000 by Cell Press

Hargreaves, P. G., Wang, F. F., Antcliff, J., Murphy, G., Lawry, J., Russell, R. G. G., and Croucher, P. I. (1998) *Br. J. Haematol.* 101, 694–702

Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E., and Shinagawa, A. (1994) *J. Cell Sci.* 107, 2373–237

Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J Biol Chem.* 2000;275:33008-13.

Horii A, Han HJ, Shimada M, Yanagisawa A, Kato Y, Yasui W, et al. Frequent replication errors at microsatellite foci in tumors of patients with multiple primary cancers. *Cancer Res* 1994;56:668–74.

Inoue T, Yashiro M, Nishimura S, Maeda K, Sawada T, Ogawa Y, et al. Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer. *Int J Mol Med* 1999; 4:73–7.

Kadono, Y., Okada, Y., Namiki, M., Seiki, M., and Sato, H. (1998) *Cancer Res.* 58, 2240–2244

Kapan M. Mide Kanseri: Tanı ve Cerrahi Tedavi. *Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu* 2001; 253-269

Kapan M, Pekmezci S, Şahin DA, Durgun V, Akın H, Geçioğlu A. Mide kanserleri: 664 olgunun analizi. *Kocaeli Üniversitesi Tıp Dergisi* 1997; 2:16-19.

Kido S, Kitadai Y, Hattori N, Haruma K, Kido T, Ohta M, et al. Interleukin 8 and vascular endothelial growth factor prognostic factors in human gastric carcinoma *Eur J Cancer* 2001;37:1482–7.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011–5.

Kinoshita, T., Sato, H., Okada, A., Ohuchi, E., Imai, K., Okada, Y., and Seiki, M. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 16098–16103

Knäuper V, Cowell S, Smith B, López-Otín C, O'Shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem.* 1997;272:7608-16.

Kondo T, Oue N, Yoshida K, Mitani Y, Naka K, Nakayama H, et al. Expression of POT1 is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:523-9.

Kuran O Sistemik Anatomi. Filiz Kitabevi, İstanbul 1983 ss: 388-396

Kuraoka K, Oue N, Matsumura S, Hamai Y, Ito R, Nakayama H, et al. A single nucleotide polymorphism in the transmembrane domain coding region of HER-2 is associated with development and malignant phenotype of gastric cancer. *Int J Cancer* 2003; 107:593-6.

Kyung Sook Park, Seon Jeong Kim, Kyung Ho Kim and Jin Cheon Kim. Clinical characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 1440-1746, 2010

Lausch, E., Keppler, R., Hilbert, K., Cormier-Daire, V., Nikkel, S., Nishimura, G., Unger, S., Spranger, J., Superti-Furga, A., Zabel, B. Mutations in MMP9 and MMP13 determine the mode of inheritance and the clinical spectrum of metaphyseal anadysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 85: 168-178, 2009. Erratum: *Am. J. Hum. Genet.* 85: 420 only, 2009.

LAVB, Nakao LS, Ramos SG, Filho AP, Murta LO Jr, Ingberman M, Tefe-Silva C, Precoma DB. Assessment of MMP-9, TIMP-1, and COX-2 in normal tissue and in advanced symptomatic and asymptomatic carotid plaques. *Thromb J* 9: 6, 2011.

Lee TY, Yu CC, Wu CC, Chang CS, Lin JT, Wu MS, Chen HP, Wu CY. MMP-9 -1562 Promoter Polymorphism Associated with Gastric Cancer Risk in Females. *Hepatogastroenterology.* 2013; 60-126

Lijnen HR, Arza B, Van Hoef B, Collen D, Declerck PJ. Inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by specific proteolysis with stromelysin-1 (MMP-3). *J Biol Chem.* 2000;275:37645-50

Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol.* 1997;139:1861-72.

Malik, N., Greenfield, B. W., Wahl, A. F., and Kiener, P. A. (1996) *J. Immunol.* 156, 3952-3960

Matsumura S, Oue N, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, et al.

A single nucleotide polymorphism of the MMP9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:19–25.

Mayer B, Jauch KW, Gunthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, et al. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993;342:1019–22.

McCance DJ; *Human Tumor Viruses*, ASM Press, Washington DC (1988)

Mimori K, Mori M, Shiraishi T, Fujie T, Baba K, Haraguchi M, et al. Clinical significance of tissue inhibitor of metalloproteinase expression in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1997;76:531–6.

Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from

Morteza Sadeghi, Majid Motovali-bashi, Zohreh Hojati. MMP-9 promoter polymorphism associated with tumor progression of breast cancer in Iranian population. *International Journal of Integrative Biology* 2009

Murphy, A. N., Unsworth, E. J., and Stetler-Stevenson, W. G. (1993) *J. Cell. Physiol.* 157, 351–358
Murphy G, Segain JP, O'Shea M, Cockett M, Ioannou C, Lefebvre O, Chambon P, Basset P. The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J Biol Chem.* 1993;268:15435-41

Muskett, F. W., Frenkiel, T. A., Feeney, J., Freedman, R. B., Carr, M. D., and Williamson, R. A. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 21736–21743

Nagase, H. (1996) in *Zinc Metalloproteases in Health and Disease* (Hooper, N. M., ed) pp. 153–204, Taylor & Francis, London

Nagase, H. (1997) *Biol. Chem.* 378, 151–160

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69: 562–573, 2006.

Nakamura H, Fujii Y, Ohuchi E, Yamamoto E, Okada Y. Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem.* 1998;253:67-75

Nassl M: Hepatitis B virüs replication: Novel roles for virüs-host interacions, *Intervitology* 42:100 (1999).

Newby AC, George SJ, Ismail Y, Johnson JL, Sala-Newby GB, Thomas AC. Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes. *Thromb Haemost* 101: 1006–1011, 2009

Nina Pereza, Sas̃a Ostojic, Marija Volk, Miljenko Kapovic, Borut Peterlin. Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Reproductive BioMedicine Online* 24: 567– 575, 2012

Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci.* 2001;114:111-118

Nothnick, W. B., Soloway, P., and Curry, T. E. (1997) *Biol. Reprod.* 56, 1181–1188

O'Farrell TJ, Pourmotabbed T. The fibronectinlike domain is required for the type V and XI collagenolytic activity of gelatinase B. *Arch Biochem Biophys* 354: 24–30, 1998.

Oshimo Y, Kuraoka K, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Chayama K, et al. Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004;112:212–8.

Oue N, Motoshita J, Yokozaki H, Hayashi K, Tahara E, Taniyama K, et al. Distinct promoter hypermethylation of p16ink4a, CDH1, and RAR-beta in intestinal, diffuse-adherent, and diffuse-scattered type gastric carcinoma. *J Pathol* 2002;198: 55–9.

Papazafropoulou A, Tentolouris N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Hippokratia* 13: 76–82, 2009.

Park HI, Ni J, Gerkema FE, Liu D, Belozero V, Sang QX. Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. *J Biol Chem.* 2000;275:20540-4.

Patricia González-Arriaga, Teresa Pascual, Arturo García-Alvarez, Ana Fernández-Somoano. Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. González-Arriaga et al. *BMC Cancer* 2012, 12:121

Pei, D., and Weiss, S. J. (1995) *Nature* 375, 244–247

Pei D, Majmudar G, Weiss SJ. Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell derived serpin by human stromelysin-3. *J Biol Chem.* 1994;269:25849-55

Pharoah PD, Oliveira C, Machado JC, Keller G, Vogelsang H, Laux H, et al. CDH1 c-160a promoter polymorphism is not associated with risk of stomach cancer. *Int J Cancer* 2002;101:196-7.

Pinto-de-Sousa J, Silva F, David L, Leitao D, Seixas M, Pimenta A, et al. Clinicopathological significance and survival influence of p53 protein expression in gastric carcinoma. *Histopathology* 2004;44:323–31.

Ratajska A, Cleutjens JP. Embryogenesis of the rat heart: the expression of collagenases. *Basic Res Cardiol* 97: 189–197, 2002.

Ray A, Bal BS, Ray BK. Transcriptional induction of matrix metalloproteinase-9 in the chondrocyte and synoviocyte cells is regulated via a novel mechanism: evidence for functional cooperation between serum amyloid A-activating factor-1 and AP-1. *J Immunol* 175: 4039–4048, 2005.

Roderfeld M, Graf J, Giese B, Salguero-Palacios R, Tschuschner A, Muller-Newen G, Roeb E. Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biol Chem* 388: 1227–1234, 2007.

Rowell S, Hawtin P, Minshall CA, Jepson H, Brockbank SM, Barratt DG, Slater AM, McPheat WL, Waterson D, Henney AM, Pauptit RA. Crystal structure of human MMP9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor. *J Mol Biol* 319: 173–181, 2002.

Romanic, A. M., and Madri, J. A. (1994) *J. Cell Biol.* 125, 1165–1178

Seltzer, J. L., Lee, A. Y., Akers, K. T., Sudbeck, B., Southon, E. A., Wayner, E. A., and Eisen, A. Z. (1994) *Exp. Cell Res.* 213, 365–374

Shimada T, Nakamura H, Ohuchi E, Fujii Y, Murakami Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase. *Eur J Biochem.* 1999;262:907-14

Shimada Y, Yamasaki S, Hashimoto Y, Ito T, Kawamura J, Soma T, et al. Clinical significance of dysadherin expression in gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:2818–23

Shunji Matsumura, Naohide Oue, Hirofumi Nakayama, Yasuhiko Kitadai, Kazuhiro Yoshida, Yoshiyuki Yamaguchi, Kazue Imai, Kei Nakachi, Keisuke Matsusaki, Kazuaki Chayama, Wataru Yasu. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2005, Volume 131; pp 19-25

Smith, M. R., Kung, H. F., Durum, S. K., Colburn, N. H., and Sun, Y. (1997) *Cytokine* 9, 770–780

Steffensen, B., Wallon, U. M., and Overall, C. M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 11555–11566

Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 5331–5338

Suzuki T, Kuniyasu H, Hayashi K, Naka K, Yokozaki H, Ono S, et al. Effect of

trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2000;88:992–7

Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:265–72.

Takahashi H, Endo T, Yamashita K, Arimura Y, Yamamoto H, Sasaki S, et al. Mucin phenotype and microsatellite instability in early multiple gastric cancers. *Int J Cancer* 2002;100:419–24.

Takahashi Y, Bucana CD, Akagi Y, Liu W, Cleary KR, Mai M, et al. Significance of platelet-derived endothelial cell growth factor in the angiogenesis of human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:429–34.

Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1679–84.

Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999;59:5438–42.

Tschesche H, Zolzer V, Triebel S, Bartsch S. The human neutrophil lipocalin supports the allosteric activation of matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 268: 1918–1928, 2001.

Uria JA, López-Otín C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res.* 2000;60:4745-51.

Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003, 92:827-39.

Viste A, Eide GE, Halvorsen K, et al. The prognostic value of Lauren's histopathological classification system and ABO blood groups in patients with stomach carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 1986; 12: 135-41.

Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B. The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J* 10: 1127–1134, 1991

Werb, Z., Tremble, P. M., Behrendtsen, O., Crowley, E., and Damsky, C. H. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 877–889

Werner M, Becker KF, Hofler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:207–16.

Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, López-Boado YS, Stratman JL,

Hultgren SJ, Matrisian LM, Parks WC. Regulation of intestinal α -defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*. 1999; 286:113-7

Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5: 2145–2154, 1991.

Woessner JF, Nagase H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford: Oxford University Press; 2000.

Xiangming C, Natsugoe S, Takao S, Hokita S, Tanabe G, Baba M, et al. The cooperative role of p27 and cyclin E in the prognosis of advanced gastric carcinoma. *Cancer* 2000;89:1214–9.

Xie, B., Laouar, A., and Huberman, E. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 11576–11582

Yang Tang, Jinwei Zhu, Ling Chen, Linyin Chen, Sheng Zhang, and Jianyin Lin. Associations of Matrix Metalloproteinase-9 Protein Polymorphisms with Lymph Node Metastasis but not Invasion of Gastric Cancer. *Clin Cancer Res* 2008

Yamauchi K, Uehara Y, Kitamura N, Nakane Y, Hioki K. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;79:256–62.

Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* 2001;4:113–21.

Yasui W, Oue N, Ono S, Mitani Y, Ito R, Nakayama H. Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2003;983:220–31.

Yasui W, Yokozaki H, Shimamoto F, Tahara H, Tahara E. Molecular-pathological diagnosis of gastrointestinal tissues and its contribution to cancer histopathology. *Pathol Int* 1999;49:763-74.

Yu, Q., Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14: 163-176, 2000.

Yulan Yan & Hongjie Liang & Taijie Li & Meng Li & Ruolin Li & Xue Qin & Shan Li. The MMP-1 , MMP-2, and MMP-9 gene polymorphisms and susceptibility to bladder cancer: a meta-analysis. *Tumor biol.* 2013

Zhang W, Gianibelli MC, Ma W. 2003. Identification of SNPs and development of Allele-Specific PCR Markers for GammaGliadin Alleles in *Triticum aestivum*. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 13-138.

Web Kaynakları

MMP-9. (2014). Erişim Tarihi: 20 Eylül 2014,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=4318>

THSK. (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu).(2012). Erişim Tarihi: 20 Ocak 2015
http://www.sagem.gov.tr/dosyalar/saglik_istatistikleri_2012.pdf

Dobrucalı. (2012). Erişim Tarihi. 25 Ocak 2015
<http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/atrofik-gastrit-ve-intestinal-metaplazi/>

8. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında, Ankara'da doğan Zeynep Doğru 2006 yılında Bursa Şükrü Şankaya Anadolu Lisesi'nden mezun oldu.

Lisans öğrenimini Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yaparak 2012 yılında mezun oldu.

Yüksek lisans eğitimine Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yapmak üzere 2012 yılında başlamıştır.