

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

**GASTRİK KANSERLERDE MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ-3
GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİ 5A/6A
POLİMORFİZM ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Serkan DEMİR**

**Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

İstanbul – 2012

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

**GASTRİK KANSERLERDE MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ-3
GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİ 5A/6A
POLİMORFİZM ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Serkan DEMİR**

**Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

İstanbul – 2012

ÖNSÖZ

Bu çalışma, 2009-2012 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bana gösterdiği sonsuz sabır ve verdiği destek ile tez çalışmamın tamamlanmasını mümkün kılan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim. Tez çalışmamda kullanılmak üzere gerekli örneklerle erişimi sağladığı için kendisine minnettarım.

Tez dönemim boyunca da göstermiş oldukları anlayış, sabır ve manevi desteklerinden dolayı başta ailem ve sevgili arkadaşım Ar. Gör. Anıl Cebeci'ye aynı zaman da desteklerini eksik etmeyen Ar. Gör. Deniz Kanca, Ar. Gör. Ozan Tiryakioğlu, Ar. Gör. Özlem Kurnaz ve tezim boyunca yanımda duran yakın dostum Sevcan Atay, Fulya Dal ve Serdar Erdoğan'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İstanbul, 2012

Serkan Demir

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Şekiller	III
Tablolar	IV
Kısaltmalar	V
Genel Bilgiler	VI
General Information	VII
1. Giriş	1
1.1. Kanser Nedir?	1
1.2. Midenin Yapısı	8
1.3. Gastrik Kanser	9
1.3.1. Gastrik Kanserin Etiyopatogenezi	10
1.3.1.1. Biyolojik Etmenler	10
1.3.1.1.1. Helikobakter Piloni	10
1.3.1.1.2. Oksidatif Stres	11
1.3.1.2. Çevresel Faktörler	12
1.3.1.2.1 Diyet	12
1.3.1.2.2 Radyasyon	12
1.3.1.2.3 Alkol ve Sigara Kullanımı	13
1.3.1.2.4 Pernisiyöz Anemi	13
1.3.1.2.5 Sosyoekonomik Durum	13
1.3.1.3. Kişisel Özellikler	13
1.4. Gastrik Kanserinin Genetiği	14
1.5. Ekstraselüler Matris (ESM)	15
1.6. Matris Metalloproteinazlar	16
1.7. MMP-3	25
2. Amaç	30
3. Materyal	31
3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler	31
3.2. Araştırma İçin Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar ve Markaları	31

3.3. Genomik DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar	32
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar	32
3.5. Primerler.....	32
3.6. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar.....	32
3.7. DNA Büyüklük Markörleri	33
4. Metot	34
4.1. Genomik DNA İzolasyon İşlem Basamakları.....	34
4.2. Primer Tasarımı	35
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	35
4.3.1. PZR Optimizasyon Çalışmaları.....	36
4.4. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	36
4.5. Jel Elektroforezi	36
4.6. Dizi Analizi	37
4.7. MMP3 Promotör 5A/6A Polimorfik Bölgesinin Moleküler Analizi.....	37
4.8. İstatistiksel Veri Analizi	37
5. Bulgular.....	38
5.1. Örneklerin Tanımı	38
5.2. DNA İzolasyonu ve Tespiti	39
5.3. MMP-3 Geni Promotör Bölgesi -1171. -/A Polimorfizm Analizi	40
5.3.1. İlgili Gen Bölgesinin PZR İle Çoğaltılması.....	40
5.3.2. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi.....	40
5.3.3. Dizi Analizi	42
5.4. Verilerin İstatistiksel Analizi	43
6. Tartışma.....	45
7. Kaynaklar	48
8. Özgeçmiş.....	59

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1.	Kanserin karakteristik özellikleri..... 2
Şekil 1.2.	Karsinogenez oluşumunun şematik olarak gösterimi..... 5
Şekil 1.3.	Mide kısımlarının histolojik olarak adlandırılması 9
Şekil 1.4.	Memelilerde MMP domainlerinin yapısı 21
Şekil 1.5.	MMP'lerin transkripsiyon regülasyonu 22
Şekil 1.6.	ProMMP nin aktivasyon mekanizması 24
Şekil 1.7.	MMP-3 polimorfizmlerinin genotiplendirilmesi 26
Şekil 4.1.	PZR ile çoğaltılacak hedef bölgenin belirlenmesi 35
Şekil 5.1.	Mide kanserli hastalardan elde edilen normal (N) ve tümörlü (T) dokuların genomik DNA izolatlarının % 0,7 lik agaroz jelde görünümü 39
Şekil 5.2.	MMP-3 polimorfik promotör bölgesinin PZR ile amplifikasyon sonuçlarının %2'lik agaroz jelde görünümü..... 40
Şekil 5.3.	Polimorfik promotör bölgesi amplifikasyonu yapılan örneklerin RFLP sonuçlarının %4'lük agaroz jelde görünümü 41
Şekil 5.4.	Polimorfik promotör bölgesi amplifikasyonu yapılan örneklerin RFLP sonuçlarının %4'lük agaroz jelde görünümü 41
Şekil 5.5.	Polimorfik promotör bölgesi amplifikasyonu yapılan örneklerin RFLP sonuçlarının %4'lük agaroz jelde görünümü 41
Şekil 5.6.	Dizi analizine gönderilecek PZR örneklerinin %2'lik agaroz jelde görünümü..... 42
Şekil 5.7.	MMP-3 -1171 promotör bölgesi 5A/6A kromotogram görünümü.....42
Şekil 5.8.	MMP-3 -1171 promotör bölgesi 6A/6A kromotogram görünümü.....43

TABLolar

	Sayfa No
Tablo 1.1. MMP'lerin tipleri, substratları ve görevleri	19
Tablo 1.2. MMP-3 5A/6A polimorfizminin çeşitli hastalıklarla olan ilişkisi	29
Tablo 3.1. MMP-3 5A/6A polimorfik bölgesini oluşturup çoğaltmak için kullanılan primerler	32
Tablo 4.1. TthIII1 polimorfik bölgenin çoğaltılması için belirlenmiş PZR döngüsü ve sıcaklık-zaman değerleri	35
Tablo 4.2. TthIII1 polimorfik bölgenin çoğaltılması için optimize edilmiş PZR koşulları ve reaktif miktarları	36
Tablo 4.3. TthIII1 için reaksiyon miktar ve koşulları	36
Tablo 4.4. MMP-3 RFLP reaksiyon miktarları ve koşulları	36
Tablo 4.5. PCR-RFLP sonucu MMP-3 için beklenen DNA parça uzunlukları	36
Tablo 4.6. MMP-3 dizi analizi için dizayn edilmiş primerler	37
Tablo 4.7. MMP-3 promotör polimorfizm bölgesi, kesimi ve beklenen parça uzunlukları	37
Tablo 5.1. Gastrik kanseri hastalarının belirli karakteristik özelliklerine göre yüzde oranları	39
Tablo 5.2. Genotip ve allelotip sayısı ve yüzdeleri	43
Tablo 5.3. 5A/6A ve 6A/6A genotiplerinin pearson kıkare ve fischer kesin olasılık testleri ile sonuçların gastrik kanseri risk faktör ile ilişkisi	44
Tablo 5.4. Hastaların genotiplerine göre yaş dağılım ortalamaları	44

KISALTMALAR

A	: Adenin
APMA	: Aminofenil civa asetat
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
BabA	: Kan Gruplarının Antijenlerini Bağlayan Adenozin
Bç	: Baz Çifti
BFA	: Brefeldin A Parçalama Ajanı
C-	: Karboksil
C	: Sitozin
Cu	: Bakır
DCC	: Kolorektal karsinom ile ilişkili gen
DupA	: Duodenal Ülser Oluşumunu Arttıran Gen
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ESM	: Ekstrasellüler Matris
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromid
FAP	: Ailesel Adenomatöz Polipozis
FAK	: Fokal Adhezyon Kinaz
Fe	: Demir
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
G	: Gram
G	: Guanin
Gsk-3β	: Glikojen Sentaz Kinaz -3β
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HNSCC	: Baş ve Boyun Sküamöz Hücreli Karsinoma
HFFF2	: İnsan sünnet derisi fibroblast hücreleri
IL-1	: İnterlökin-1
IL-8	: İnterlökin-8
IKK	: İkb Kinazı
Kb	: Kilobaz
MAPK	: Mitojen Aktif Protein Kinaz
Mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
μm	: Mikro Molar
MMP	: Matris Metalloproteinaz
MT-MMP	: Membran Tip Matris Metalloproteinaz
NaCl	: Sodyum Klorür
NFAT	: Aktive edilmiş T Hücreleri Nükleer Faktörü
NIK	: Nf-κb Uyarıcı Kinaz
NSCLC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
ng	: Nanogram
Or	: Göreli Orantı

PAI	: Plasminojen Aktivatör İnhibitör
PAK1	: P21 Uyarıcı Kinaz 1
PDGF	: Trombosit Türevli Büyüme Faktörü
Page	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PGDF-B	: Platelet Türevi Büyüme Faktörü-B
RUNX3	: Runt ilişkili Transkripsiyon Faktörü 3
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RB1	: Retinoblastoma Geni
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SH	: Src Homoloji Domain
SMC	: Düz Kas Hücresi
SRC	: Sark Geni
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizmi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
T4SS	: Tip IV Sekresyon Sistemi
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-β
T	: Timin
TBE	: Tris-Borik Asit-Edta
TIMP	: Metalloproteinaz Doku İnhibitörü
TNF-A	: Tümör Nekroz Faktörü-A
Tgf-Aβ	: Tümör Büyüme Faktörü Aβ
U	: Ünite
Uv	: Ultraviyole
μl	: Mikrolitre
uPA	: Urokinaz Plasminojen Aktivatör
uPA-R	: Urokinaz Reseptör
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Serkan Demir
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Ocak 2012

ÖZET

GASTRİK KANSERLERDE MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-3 GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİ 5A/6A POLİMORFİZM ANALİZİ

Gastrik kanser dünyada ikinci derecede sıklıkta ölümlerin görüldüğü multifaktöriyel bir hastalıktır. Dünya coğrafyasında özellikle Çin gibi birçok uzak doğu ülkesinde görülme sıklığı açısından liderdir. Beslenme şekilleri, çevresel faktörler, sigara ve aşırı alkol tüketimi ve *Helikobakter pilori* enfeksiyonu gastrik kanserin temel faktörlerini oluştururlar. Midenin tümörleşme sürecinde, tümörleşen hücrelerin bazal membranları Matris metalloproteinaz enzim ailesi üyeleri tarafından kontrolsüz bir şekilde parçalanırlar. MMP'ler çinko bağımlı enzimlerdir. Bu enzim ailesi endopeptidazlar olup ekstrasellüler matriste protein degradasyonu yaparlar. Bu enzimlerin yüksek parçalayıcı etkisi sebebiyle MMP ekspresyonları kontrollü bir şekilde gerçekleşir. Aksi takdirde kanserleşme sürecindeki invazyon ve metastaz aşamasına büyük oranda katkıda bulunabilirler. MMP enzim ailesinin en geniş substrat çeşitliliğine sahip olanı MMP-3'tür. Bunların yanı sıra MMP-3'ün diğer bir görevi de başka metalloproteinazları aktive edebilme yeteneğidir. Bu özellikler MMP-3'ün kanser araştırmalarında öncelikli konu olmasına yol açmıştır. MMP-3 promotör bölgesi 5A/6A polimorfizm bölgesi özellikle akciğer, ovaryum ve meme tümürleri üzerinde çalışılmıştır. Yaptığımız çalışmada MMP-3 geni promotör bölgesi 1171. pozisyonda görülen 5A/6A insersiyon ve delesyon polimorfizminin PZR-RFLP yöntemi ile gastrik kanserli hastalarda moleküler analizi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: MMP-3, gastrik kanser, metalloproteinaz, polimorfizm

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Serkan DEMİR
Department : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Supervisor : Assist. Prof. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Degree Awarded and Date : Master of Science – January 2012

SUMMARY

THE 5A/6A POLIMORPHISM ANALYSIS OF MMP-3 PROMOTOR REGIONS IN GASTRIK CANCER

Gastric cancer is a multifactorial disease which occurs second degree frequency of death in the world. It takes the first rank in terms of occurring frequency especially most of the Far East countries like China. Diet type, environmental factors, cigarette, excessive alcohol consumption and *Helicobacter pylori* infection are the main risk factors of the gastric cancer. At tumor formation process of the stomach, basal membranes of the tumorous cells has been disrupted uncontrolled by matrix metalloproteinase enzyme family. Matrix metalloproteinases are zinc-dependent enzymes. This endopeptidase enzyme family is responsible for protein degradation at extracellular matrix. Due to lysis properties of these enzymes, they are expressed in a control manner. Otherwise, they could contribute to the cancer progression. MMP-3 has the largest substrate range in matrix metalloproteinase enzyme family. Besides, MMP-3 has the ability to activate other metalloproteinases. These abilities lead MMP-3 to become prior subject at cancer studies. MMP-3 promoter 5A/6A polymorphism has been studied especially at lung, ovary, breast, colon and gastric tumors. At this study, 5A/6A and 6A/6A polymorphisms recognized at MMP-3 gene promoter -1171 region has been analyzed using PCR-RFLP methods.

Key words: MMP-3, gastric cancer, metalloproteinase, polymorphism.

1. GİRİŞ

1.1.Kanser Nedir?

Güncel uluslararası verilere göre; 2008 yılı tamamında 12,4 milyon tahmin edilen yeni kanser vakası ve 7,6 milyon ölüm meydana gelmiştir. Dünyada görülen en yaygın kanserler akciğer (1,52 milyon), meme (1,29 milyon) ve kolorektal (1,15 milyon) kanserleridir. Kötü prognoz nedeniyle ölüm oranlarının en yüksek olduğu kanserler ise akciğer kanseri (1,31 milyon), gastrik kanseri (780,000) ve karaciğer kanseri (699.000) olarak belirtilmiştir (Ferlay ve ark., 2004; Ferlay ve ark., 2007; Amerikan Kanser Topluluğu, 2008).

Kanser, kalıtsal ya da sonradan kazanılmış çok sayıda genetik ve epigenetik faktörlerin sonucunda multifaktöriyel olarak ortaya çıkan hücre bölünmesinin kontrol edilemediği genetik bir hastalıktır. Pek çok kanser tipi sonradan hücre düzeyde edinilmiş çeşitli özelliklerle karşımıza çıkar. Bu özellikler, hücrenin büyüme sinyallerini açısından kendi kendine yetmesi, büyümeyi inhibe eden sinyallere karşı duyarsızlığı, apoptozisten kaçması, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenezisde süreklilik, doku invazyonu ve metastaz yapabilmesidir (Şekil 1.1) (Hanahan ve Wienberg, 2000).



Şekil: 1.1. Kanserın karakteristik özellikleri (Hanahan ve Wienberg, 2000'den adapte edilmiştir).

- **Hücrenin Büyüme Sinyalleri Açısından Kendi Kendine Yetmesi**

Normal hücrelerin, istirahat halinden proliferatif duruma gelmeden önce mitojenik büyüme sinyalleri tarafından uyarılması gerekir. Bu sinyaller, büyüme faktörleri, ekstrasellüler matris (ESM) komponentleri ve hücre-hücre adhezyon molekülleri gibi çeşitli transmembran reseptörler tarafından hücre içine gönderilir. Bilindiği üzere normal hücreler bu büyüme faktörleri salınmadan çoğalamazlar. Onkogenler tarafından etkilenen kanser hücreleri ise herhangi bir büyüme faktörünü taklit ederek bölünebilir ve çevresinden bağımsız bir şekilde çoğalabilir. Hücre kültüründe, mitojenik büyüme faktörleri normal hücrelere verildiği zaman hücreler çoğalma eğilimi gösterirler. Tümörleşen hücrelerde ise bu eğilim, büyüme indükleyicileri azalsa dahi kendisini aşırı bölünmeye yöneltmeye devam eder. Bu sonuç tümör hücrelerinin çevresindeki büyüme faktörlerinden bağımsız bir şekilde

davrandığını ve homeostatik mekanizmalardan etkilenmeden hareket ettiğini gösterir (Hanahan ve Wienberg, 2000).

- **Büyüme İnhibe Eden Sinyallere Karşı Duyarsızlık**

Normal doku içerisinde, büyüme inhibe edici çeşitli sinyaller, doku homeostazisini korumak ve hücreleri dinlenme safhasında tutabilmek için görevlendirilmişlerdir. Bu sinyaller, ESM'nin hücre yüzeyi içinde gömülü büyüme inhibitörleri ile immobilize inhibitörleri içerir ve büyüme faktörleri gibi transmembran hücre yüzey reseptörleri ile birlikte intrasellüler sinyal döngüsünde hareket ederler. Büyüme inhibe edici sinyaller iki mekanizma ile hücre proliferasyonu bloke edebilirler. Hücreler ekstrasellüler sinyal akışı sebebiyle aktif proliferatif döngüden G_0 evresine geçmeleri için bu inhibitörler tarafından zorlanabilirler. Aynı zamanda postmitotik faktörler tarafından indüklenen hücreler yine büyüme inhibe edici sinyaller tarafından döngünün kontrollü devam etmesi için engellenebilirler. Hücreler kanserleşmeye başladığı zaman büyüme inhibe edici sinyallerden kaçınmaya başlarlar (Hanahan ve Wienberg, 2000).

- **Apoptozisten Kaçmak**

Tümör hücre popülasyonlarının yeteneği sadece hücre proliferasyon oranı değil aynı zamanda hücreleri tahrip etme oranlarıyla belirlenir. Programlanmış hücre ölümü (apoptozis) bu yıpranmanın önemli bir kaynağını temsil eder. Çeşitli fare modelleri üzerinde yapılan kanser araştırmalarında tıpkı insanlarda görülen karsinogenezis gibi bütün kanser tiplerinde, tümör hücrelerinin apoptozise direnç gösterdiği kanıtlanmıştır. Tümör hücrelerindeki Fas ligand ekspresyonu, Fas ilişkili apoptozise direnç göstererek apoptozis mekanizmasından kaçmasına yardımcı olur böylelikle hücreler apoptozise girmeden sınırsız bir şekilde çoğalmaya devam ederler (Hanahan ve Wienberg, 2000).

- **Sınırsız Replikasyon Potansiyeli**

Büyüme sinyalleri anatomisi, büyümeyi inhibe edici faktörlere karşı duyarsızlık ve apoptozise direnç, kanser hücrelerinin çevresinden alabileceği uyarı ve sinyaller ile bağlantısının kopmasına yol açar ve kendi yaşam programlarını tekrar ayarlarlar. Yeniden programlanma ile kanser hücre popülasyonları zamanla makroskopik görünüme ulaşabilen büyük kitleler haline geleceklerdir. Son otuz yıl içerisinde yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinin içinde buldukları hücre döngüsüne direnç göstermenin ötesinde kendi hücre döngüsü mekanizmalarını ortaya çıkıdığı yönünde bulgular gösterilmiştir (Hanahan ve Wienberg, 2000).

- **Anjiyogenezis Sürekliliği**

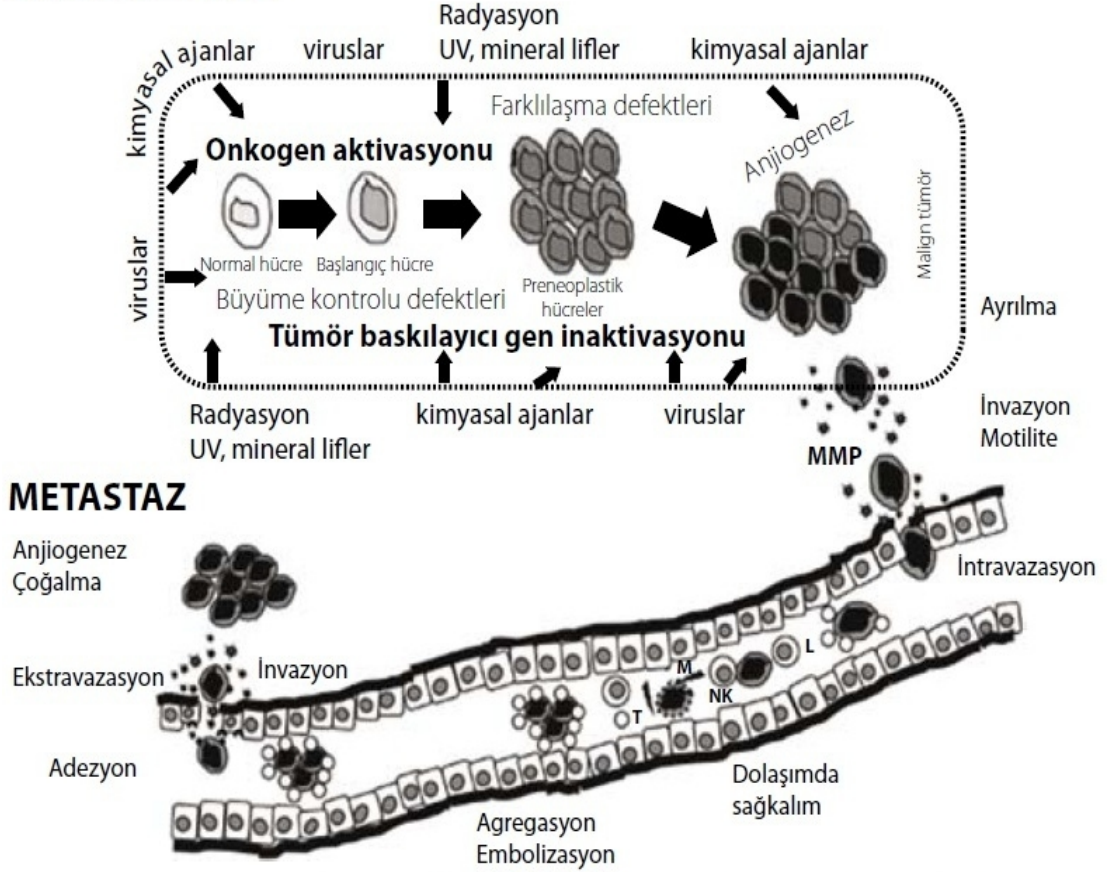
İnsan dolaşım sisteminde var olan damarlardan yeni damarların oluşumuna anjiyogenezis denir. Anjiyogenezis, hem doğal fizyolojik hem de patolojik bir olaydır. Yaraların iyileşmesi ve menstürasyon sürecinde anjiyogenezis fizyolojik iken; tümörögenesis, inflamatuvar hastalıklar ve dejeneratif maküler göz hastalıklarında patolojiktir. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin rol aldığı anjiyogenezisde endotel hücreleri temel rolü üstlenmişlerdir. Anjiyogenezis hipoksi ve enfeksiyon uyarısı ile aktive edici faktörlerin indüklemesi ile başlar. Anjiyogenezisi başlatıcı faktörler VEGF, PGDF, EGF, FGF TGF- $\alpha\beta$, IL-8 ve TNF- α 'dır. Buna karşın trombospondin, angiostatin, endostatin, VEGF inhibitörü ise anjiyogenezisi inhibe edici faktörlerdir. Tümörleşme sürecinde, hipoksi koşulları besin ve oksijen ihtiyacını sağlayabilmek için tümöral anjiyogenezise yol açar. Tümörler büyümeye başlarlar ve tümör büyüdükçe yine hipoksi koşulları ortaya çıkar böylece anjiyogenezis tekrar uyarılır. Böylelikle vücut homeostazisinden bağımsız yeni tümörlerin göç edebilmeleri için yeni damarlar ortaya çıkar (Hanahan ve Wienberg, 2000).

- **Doku İnvazyonu ve Metastaz**

Yarattığı koşullarla kendi kontrolünü eline alan tümör hücreleri çevre doku ve organlara yayılımında ilk olarak primer tümörden ayrılmaya başlar. İkinci aşama ise kanser hücrelerinin ESM ile endotel hücrelerine tutunmasıdır ve özellikle integrin ve selektin gibi bazı adhezyon molekülleri tümör hücrelerinin invazyonunda yardımcı olurlar. Sonraki aşamada tümör hücreleri bazal membranı yıkmak için matris

metalloproteinazlar (MMP), plazminojen aktivatörleri gibi enzim gruplarını aktive ederler. Böylelikle tümör hücreleri çevre dokulara göç etmeye başlar. Bazal membranı yıkan tümör hücreleri metastaz yapabilmek için kaderin ailesi, integrinler, laminin-elastin bağlayıcı proteinler ve CD44 gibi hücre adhezyon moleküllerinin yardımıyla komşu organlara göç ederler (Hanahan ve Wienberg, 2000). (Şekil 1.2) (İçli ve Akbulut, 2005).

KARSİNOGENEZ



MMP: matriks metaloproteinaz, L: lenfosit, NK: natural killer hücre, M: mekanik faktörler, T: trombosit A: adezyon molekülleri

Şekil 1.2. Karsinogenez oluşumunun şematik olarak gösterimi (İçli ve Akbulut, 2005).

Kimyasal, viral ve fiziksel karsinojenler, DNA'da çeşitli nükleotit değişimlerine sebep olur ve normal hücreler, farklı tiplere modifiye olarak bambaşka hücre tipleri haline gelir. Karsinogenez; karsinojen miktarı, karsinojen etkisinde kalım süresi, genetik yatkınlık ve uyarıcı etkenlerin varlığı olmak üzere başlıca dört durumla ilgilidir (Hanahan ve Wienberg, 2000) (Şekil 1.2) (İçli ve Akbulut, 2005).

Kanserin tipik belirtileri, hücre bölünmesi ve ömrü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçabilme kapasitelerini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkar. Süreç içerisinde

regülasyonu bozulmuş, normal hücre büyümesini ve davranışlarını denetleyen çeşitli kontrol mekanizmalarından kaçındıkları için hücrelerden oluşan vücuttan bağımsız bir kitlenin oluşumuna neden olur. Bu kitle sonunda büyüyerek vücut metabolizmasındaki fizyolojik süreçleri alt üst edecek, kitlenin yerine ve büyüklüğüne bağlı olarak çok sayıda kanser hücrelerinin vücut içerisinde hızlı bir şekilde yayılmasına yol açacaktır (Merlo ve ark., 2006).

İnsan DNA'sında yaklaşık 3000 ile 5000 genin hücre döngüsünde görev alan ve kanser sürecinde ilk etkilenen proteinleri kodladığı tahmin edilmektedir. İşlevini kaybeden bir gen, önemli bir proteinin anormal düzeyde üretimine ya da gerekli proteinlerin üretimine engel olabilir. Örneğin; kanserde önemli bir yer tutan K-RAS proto-onkogeninde ortaya çıkan bir mutasyon, hücre zarının içinde bulunan küçük bir proteinin hücre büyüme sinyalini arttıran bir proteine dönüşmesine sebep olur. Bu protein normal işlevinde hücre yüzeyindeki büyüme faktörlerinin reseptörleri ile hücre çekirdeğine hücre bölünmesini başlatması için büyüme sinyalleri gönderen moleküler sistemler arasında bir ara sinyal olarak çalışır. KRAS geni mutasyon geçirip onkogen halini aldığı anda reseptör protein daima açık durumda kalarak sürekli hücre bölünme sinyali verir. Buna karşın tümör baskılayıcı genler ise etkin olmadıklarında kanser gelişimine katkıda bulunurlar. TP53 geni program sonucu hücre döngüsü askıya almak, oluşan DNA hasarını onarmak ve apoptozisi indüklemek ile görevlidir. Bu gende görülen mutasyonlar üretilen P53 proteinin yapısını bozar ve işlevsiz hale getirir. Böylece işlevi bozulmuş olan p53 proteini hücre çoğalmasını durduramaz. TP53 tümör baskılayıcı geni hemen her kanserde işlev kaybı gösterir (Olivier ve ark., 2008).

DNA tamir genleri, mutajenik kimyasalların ve UV ışını gibi ajanların neden olduğu çeşitli DNA hasarlarını onaran ve hücredeki genomik yapının korunmasından sorumlu olan gen grubudur. DNA tamir genlerinin fonksiyonu mutasyon defekti ya da DNA replikasyon problemleri ile oluşan DNA hataları ile bağlantılıdır. Şayet hata tamir edilmezse, DNA tamir genleri apoptozisi indükler. DNA tamir genlerinin fonksiyon bozuklukları, hücrelerde mutasyonların birikmesine sebep olur (Wyllie, 1997).

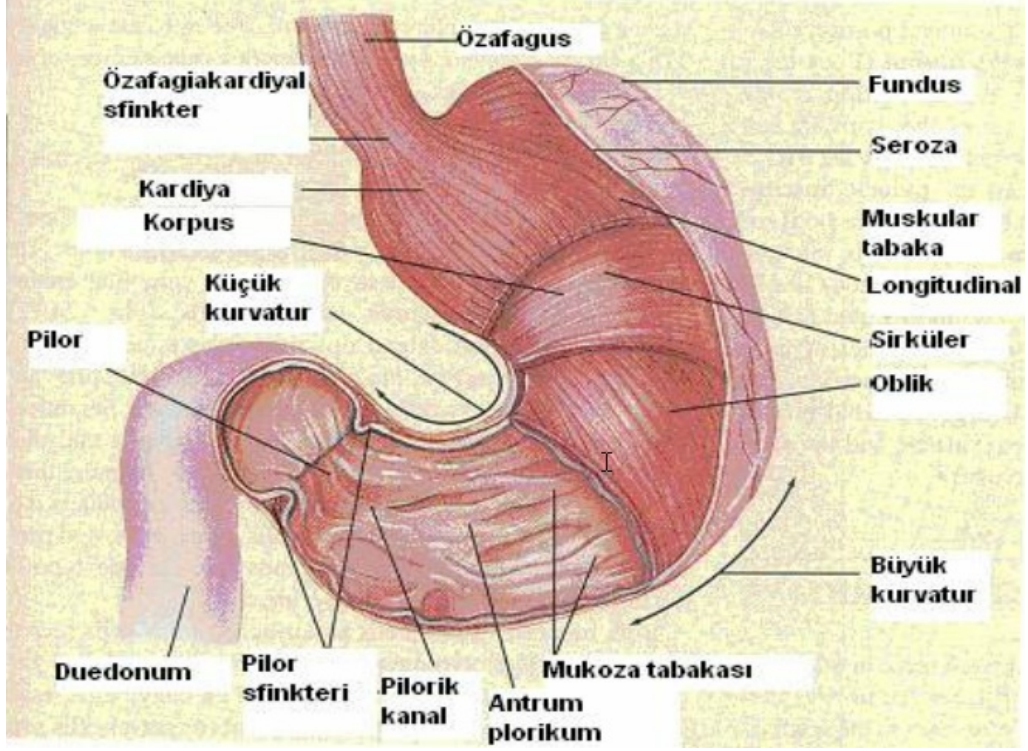
Kanserler türevlendikleri doku tiplerine göre karsinoma, sarkoma, miyeloma, lösemi ve lenfoma gibi beş ana sınıfa ayrılır (Hanahan ve Wienberg, 2000). Epitel doku tipinden tüvlenen kanser türlerine karsinom denir ve tüm kanserlerin hemen hemen %80' ini oluşturur. Karsinomlar çeşitli organlardan ya da salgı bezlerinden tüvlenirse bunlara adenokarsinom, sküamöz hücrelerden tüvlenirse de sküamöz hücre karsinomu olarak adlandırılırlar (Kahn ve ark., 1986). Özellikle kas ve yağ dokusu ile kemik, kıkırdak, tendonlar gibi bağ ve destek dokusu elemanlarında görülen tümör tipine sarkoma denir. Bu tümörler de tüvlendikleri kökenlere göre osteosarkom, kondrosarkom ve liposarkom gibi isimler alırlar (Hanahan ve Wienberg, 2000). Kemik iliğindeki plazma hücrelerinden gelişen tümör tipine myeloma denir (Kahn ve ark., 1986). Normal lenfosit hücrelerinin hızlı çoğalmaları veya programlanmış saatlerinden daha uzun süre yaşamaları ile meydana gelen kanserler lenfoma olarak adlandırılır. Malign lenfoid hücreler lenf düğümü, dalak ve kemik iliğinde çoğalırlar. Bu kanser tipi Hodgkin hastalığı ya da Hodgkin dışı lenfoma olmak üzere iki gruba ayrılır (Hanahan ve Wienberg, 2000). Lösemi, kemik iliği ve lenf düğümlerinden kaynaklanan, vücutta belli bir kitle oluşturmayan ama dolaşım sistemi ve kan hücreleri ile alakalı olduğu için doğrudan metastaz yapan saldırgan bir kanser türüdür. Bu kanser türü dünyada her yıl 25.000 den fazla kişide görülür. Bununla birlikte çocuklara oranla yetişkinlerde on kat fazla görülür. Dört ana tipte lösemi vardır: akut lenfositik, akut granülositik, kronik granülositik ve kronik lenfositik tiplerdir (Kahn ve ark., 1986).

Kanserlerin başlıca yayılım yolları; vücut boşlukları ve yüzeyle, lenf ve kan damarlarıdır. Tümörler vücut boşluklarını çevreleyen yüzeyle ulaştıkları zaman, tümörden kopan hücre yığınları vücut boşluğundaki komşu doku ve organlara yayılabilir. Bu yolla yayılım en sık yumurtalık kaynaklı kanserlerde görülür. Lenf damarları yoluyla yayılmada; özellikle karsinomların hareket alanı lenf damarlarıdır. Yayılım sırasında kan yoluna da geçişler olabilir. Çünkü lenf damarları ile kan damarları arasında pek çok bağlantı vardır. Bölgesel lenf düğümlerine ulaşan kanser hücreleri bölgede tutulur ve kanserin yayılmasına bir süre engel oluşturulur. Ancak lenf düğümü kanser hücreleri ile dolduğu zaman diğer lenf düğümlerine de geçişler görülebilir. Kan damarları yoluyla yayılımda daha çok sarkoma ve karsinomlar görülür. Özellikle venöz damarların membranları kanser hücreleri tarafından kolayca invaze edilebilir ve koparak kan akımına karışıp başka doku ve organlara ulaşabilir.

Kan dolaşımı ile en sık görülen metastazlar karaciğer ve akciğerdir. Tiroid foliküler karsinom, renal hücreli karsinom ve hepatosellüler karsinom kan yoluyla yayılan kanser türleridir (Kazancıgil, 1982).

1.2. Midenin Yapısı

Mide sindirim kanallarının en geniş yeridir ve özefagus ile doudenum arasına yerleşmiştir (Arıncı ve Elhan, 2001). Mide yiyecek ve içecekleri sindiren ve hormon salgılayan hem ekzokrin hem de endokrin bir organdır. Mide; kardia, fundus, korpus ve pilor olmak üzere dört kısımda incelenir (Şekil 1.3). Mide içten dışa doğru tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olmak üzere dört tabakadan oluşmuştur (Junquera ve ark., 1993). Tunika mukoza üç farklı tabaka içerir. Bunlar; yüzey epiteli, lamina propria, ve muskularis mukozadır. Yüzey epiteli mide mukozası mukus ve bikarbonat sekrete eden yüksek kolumnar bir epitelyum ile döşelidir. (Carlos ve Carneiro, 2006). Salgılanan bu mukus, kalın bir jel katmanı oluşturarak hücreleri mide tarafından salınan HCI gibi kuvvetli asitlerden korur. Lamina propria, mukoza içerisinde bazal membranın altına yerleşmiş olan kollajen ve elastik lifler ile bir retikülin yolu ile yapısal destek sağlayan alandır. Muskularis mukoza; mukozanın alt sınırını sirküler bir iç tabaka ve longitudinal bir dış tabaka içeren düz kasların ince bantlarının oluşturduğu yapıdır. Submukoza; muskularis mukoza ve muskularis propria arasında lokalize olmuş durumdadır. Muskularis eksterna; farklı plaklara yerleşmiş düz kasın üç tabakasını içerir. Seroza ise mide duvarının en dışından bulunan bağ dokusunu bir tabakasındır (Carlos ve Carneiro, 2006).



Şekil 1.3. Mide kısımlarının histolojik olarak adlandırılması (Dere, 1999).

1.3 Gastrik Kanser

Gastrik kanser birçok ülkede özellikle uzak doğu ülkelerinde en sık görülen bir hastalıktır. 2000 yılı verilerine göre dünyada tüm kanserlerin %8,7'si, kanser ölümlerinin de %10,4'ü mide tümörlerinden kaynaklanmaktadır. Çin'de kanserlerin %39'unun gastrik kanser ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Li ve ark., 2002; Parkin ve ark., 2005). Çevresel faktörler, beslenme şekilleri, sigara, alkol ve *H.pilori* enfeksiyonu en bilinen gastrik kanseri sebepleridir (Galanis ve ark., 1997; Takezaki ve ark., 1999; Clements ve ark., 2002). Dünyanın birçok ülkesinde gastrik kanseri vaka oranları düşmesine rağmen gelişmekte olan ülkelerde gastrik kanseri vakalarında artış görülmektedir (Kelley ve Duggan, 2003). Türkiye, Afrika, Asya'nın doğusu, Kuzey Amerika ve Japonya'da gastrik kanseri sıklığı yüksektir (Kaas ve ark., 1998). Bu kanser aynı zamanda yaş büyüklüğü ile doğru orantılı bir şekilde artış göstermektedir. Hastaların birçoğu 50-70 yaşları arasındadır. Erkeklerde kadınlara oranla daha yaygın olmakla beraber yaklaşık olarak erkek/kadın oranı sıklığının yüksek olduğu yerlerde 2:1, düşük olduğu bölgelerde ise 3:2'dir (Davis, 1993).

Gastrik kanseri mide ülserinde hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyip normal dokulara invazyon yapmasıyla karakterizedir. Gastrik kanserlerin büyük bir kısmı adenokarsinomlardır ve midenin en iç tabakasındaki mukoza hücrelerinden gelişen bir kanser şeklidir (Yamaoka ve ark.,1999; Kolligs ve ark., 2002; Moon ve ark.,2004; Beswick ve ark., 2006).

Adenokarsinomlar, intestinal tip ve diffüz tip olmak üzere iki kategoriye ayrılır. İntestinal (diferansiye) tip; salgı bezi benzeri tübüler yapılar oluşturur ve koheziv neoplastik hücrelerden meydana gelir. Diffüz (indiferansiye) tipte ise hücre kohezyonu yoktur ve mide duvarı belirgin bir kitle oluşturmaksızın kalınlaşır (Christian ve ark., 1999; Kelley ve ark., 2003).

İntestinal tip erkeklerde ve yaşlı gruplarda daha fazla görülürken, diffüz karsinomlar genç yaş gruplarında sık görülür. Kadın ve erkekte görülme oranı ise eşittir. İntestinal tip gastrik kanserlerinin %60-80'i antrum küçük kurvaturda gelişir (Kelley ve ark., 2003).

1.3.1.Gastrik Kanserin Etiyopatogenezi

Gastrik kanserin etiyolojisi biyolojik faktörler, çevresel etmenler ve kişisel özellikler olarak üç gruba ayrılır.

1.3.1.1.Biyolojik Etmenler

1.3.1.1.1.Helikobakter pilori

H.pilori enfeksiyonu gastrik kanser oluşumunda büyük bir etki mekanizması olarak görev alır. Gram negatif bir bakteri olan *H.pilori* spiral şekilli ve insan mide mukozasında yaşayabilen mikroaerofilik (%1'den az oksijenli ortamda yaşayabilen) bir bakteri türüdür. Dünyada insanların %50'sinden fazlası üst gastrointestinal bölgede *H.pilori*'yi taşımaktadır. *H.pilori* enfeksiyonu mide mukoza hücrelerinde görülen çeşitli problemlerden dolayı dünya genelinde sıkça karşılaşılan bir enfeksiyon çeşididir ve kronik gastrit, ülser ve gastrik kanser oluşumuna sebebiyet veren tehlikeli bir bakteri türüdür (Noyan ve ark., 2009). Normal şartlar altında midenin mikro çevresi virüs, bakteri ve diğer mikroorganizmaların yaşamı için uygun ortama sahip değildir. Ama *H.pilori* mide mukozasında yaşayıp üreyebilecek yeteneklere sahip olarak evrimleşmiştir. Bakterinin bu yeteneği; bünyesinde

bulundurduğu üreaz enzimi ile üreyi amonyağa çevirerek mide asiditesini azaltması sayesinde kendisine uygun yaşam ortamı sağlayarak gerçekleştirir (Venkateshwari ve ark., 2011).

H.pilori enfeksiyonu mide mukozasında birbirlerini etkileyen zincirleme olaylar şeklinde gerçekleşir. Bakterinin mide mukozasındaki kolonizasyonu kronik gastrit ile sonuçlanabileceği gibi bazı hastalarda ise kronik gastrit, ülser veya kansere dönüşebilmektedir. Aynı zamanda *H.pilori* enfeksiyonu bireylerde uzun vadede, mide iltihabı, pernisiyöz anemi, intestinal metaplazi, FAP veya mide polipleri oluşturabilir. (Venkateshwar ve ark., 2011). *H.pilori*'nin indüklediği değişikliklerin mekanizması NF- κ B'nin aktivasyonunu ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu artırır (Hatakeyama ve Brzozowski, 2006).

1.3.1.1.2. Oksidatif Stres

Gastrik kanser oluşum sürecinde etkili olan biyolojik faktörlerden birisi de oksidatif strestir. Vücut oksidanlar ile antioksidanlar arasında bir dengeye sahiptir. Bu dengenin bozulmasıyla da vücutta oksidatif stres meydana gelir. Özellikle DNA'ya zarar vererek çeşitli mutasyonlara sebep olan reaktif oksijen türleri vücutta oksidatif stres yaratarak kanserin oluşmasına ve ilerlemesine etki eder (Kim ve ark., 2010).

Oksijen, yaşam için temel bir kaynak olmasına karşın, ETS (Elektron Transfer Sistemi) gibi çeşitli metabolik süreçler sırasında ortaya çıkan bazı ROS (Reaktif Oksijen Türleri) türleri vücuda yüksek oranda zarar verme potansiyeline sahiptir. Birçok serbest radikal oluşturduğu ROS, O₂'ye nazaran kimyasal reaktivitesi çok yüksek olan oksijen formlarıdır (Nawar, 1996). Bu radikallerin başlıcaları; tekil oksijen (¹O₂), süperoksit anyonu (⁻O₂), hidroksi (⁻HO), peroksi (ROO⁻) ve alkoloksi (RO⁻), hidrojen peroksit ve nitrik oksit gibi kararsız moleküllerdir (Diplock, 1998).

Serbest radikaller, en son elektron orbitallerinde bir ya da daha fazla çift oluşturamamış elektron içeren yüksek enerjili ve kararsız bileşiklerdir. Bu kararsızlık, serbest radikallere reaktif özellik kazandırarak hücrel protein, lipid ve DNA gibi önemli biyolojik materyallere zarar vermelerine sebep olmaktadır. Bu zararların kalp damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, immün sistemin

zayıflaması, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanmayı teşvik ettiği çalışmalarla gösterilmiştir (Diplock, 1998).

Serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonları önleme, yakalama ve işlevsiz hale getirme yeteneğinde olan moleküllere antioksidan denir. Antioksidanlar mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Birincil antioksidanlar; serbest radikallerle doğrudan reaksiyona girerek daha fazla zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni radikal oluşumunu önleyen moleküllerdir. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi enzim sistemleri birincil antioksidan grubunda yer alırlar (Diplock, 1998). Oksijen radikalini yakalayıp radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşikler de ikincil antioksidanlar kategorisine girerler (Ou ve ark., 2002).

1.3.1.2. Çevresel Faktörler

1.3.1.2.1 Diyet

Beslenme faktörü mide içi tümörleşmeye yol açan önemli bir etmendir. Uzak Doğu ülkelerinde gastrik kanser vakalarının dünyada birinci sırada olmasının temel sebebi beslenme çeşitlilikleri ve alışkanlıklarıdır. Yapılan araştırmalarda yemek pişirme yöntemleri gastrik karsinom ile ilişkilendirilmiştir. Soğutmanın olmaması; korunmuş, tütülenmiş, konserve ve tuzlanmış gıdaların tüketimi; nitratlarla su kontaminasyonu taze meyve ve sebze yokluğu yüksek risk alanlarında yaygın bir problem olarak göze çarpmaktadır. Öte yandan yeşil lifli sebzelerin alımı, C ve E vitaminleri, beta karoten ve selenyum içeren turunçgillerin tüketiminin antioksidan özelliklerinden dolayı gastrik kanser gelişimini önemli ölçüde geriletmediği gösterilmiştir (You ve ark., 2000; Kelley ve Duggan, 2003).

1.3.1.2.2 Radyasyon

Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda radyasyonun gastrik kanser riskini iki ile dört kat oranında arttırdığı belirtilmiştir (Kelley ve Duggan, 2003). Ancak radyoloji alanında çalışan uzman ve teknisyenler üzerinde yapılan araştırmalarda gastrik kansere yakalanma sıklığını arttırdığı gözlemlenmemiştir. Nitekim Japonya'da atom bombasından kurtulan ve maruz kalanlara kıyasla karşılaşılan dozlar oldukça düşük olmuştur (Christian ve ark., 1999).

1.3.1.2.3 Alkol ve Sigara Kullanımı

Sık alkol kullanan hastaların alkol kullanmayanlara göre gastrik kanserine yakalanma riski 2 kattır (Kelley ve Duggan, 2003). Sigara içiminin ise gastrik kansere yakalanma riskiyle doğrudan ilişkisinin olup olmadığı ile ilgili yapılan çalışmalarda sonuçlar çelişkilidir. Kimi araştırmacılar sigara içiminin doza bağlı olarak gastrik kanseri ile ilişkisinin olduğunu, bazı çalışmalarda ise gastrik kansere yakalanma riskinin sigara içim miktarı ile doğrudan bir ilişkisinin olmadığını vurgulamaktadır. (Kelley ve Duggan, 2003).

1.3.1.2.4 Pernisiyöz Anemi

Pernisiyöz anemi, gastrik mukozasını etkileyen ağır bir kansızlığa ve sinir sistemi bozukluklarına neden olan bir hastalıktır. 4517 pernisiyöz anemi hastasının 20 yıllık takibi çalışmasında, bu hastalığın gastrik kanser riskini 3 kat arttırdığı görülmüştür (Kelley ve Duggan, 2003).

1.3.1.2.5 Sosyoekonomik Durum

Gastrik kanserin gelişme ve görülme oranı, gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere nazaran daha fazladır (Kelley ve Duggan, 2003).

1.3.1.3. Kişisel Özellikler

Bazı kişisel özellikler gastrik kanseri yakalanma riskini yükseltebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin A kan grubuna sahip olan bireylerde diğer kan gruplarına göre gastrik kanserine yakalanma riskleri daha yüksektir. A kan grubu özellikle diffüz tip gastrik kanseri ile ilişkilidir (Christian ve ark., 1999). Bir diğer faktör ise pozitif aile hikayesidir. Bu faktör gastrik kanserini arttıran olasılıkla ilgilidir Zanghieri ve ark. yapmış oldukları çalışmalarında ailesinde gastrik kanseri hastalığı görülen bireylerin 3 kat daha yüksek oranda gastrik kanserine yatkın olduğunu göstermişlerdir (Zanghieri ve ark., 1990).

1.4. Gastrik Kanserinin Genetiği

Moleküler genetik çalışmalar, karsinogenezisin çok basamaklı yolağında ve tümör gelişiminde genetik değişimlerin rolü hakkında ipuçları sunmuştur. Onkogenlerin etkisi, mutasyon yoluyla tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesi, bu genleri taşıyan kromozomlarda heterojenite kaybı ve DNA replikasyonunda hataların oluşması (özellikle basit tekrarlayan sekanslarda) gastrik malignite bağlamında tartışılmıştır (Christian ve ark., 1999).

P53 mutasyonu ve hipermetilasyonu, p16, APC, RB1, DCC, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 ve RUNX3 gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, E-cadherin, α -katenin kaybı, cyclin D1, c-met, β -katenin gibi bazı onkogenler ile EGF, TGF, c-erb-B2 gibi büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonu midede kanserleşme sürecinde rol oynar (Hollstein ve ark., 1991; Sipponen, 2002; Subramaniam ve ark., 2009).

MLH1 sporadik gastrik kanserinde protein sentezi baskılanması ve bunu takiben mikrosatelit DNA'ların stabilitesinden sorumlu olan bir tümör baskılayıcı genidir (Fleisher ve ark., 1999; Leung ve ark., 1999). RUNX3 çekirdek bağlayıcı faktör alt birimi ile DNA'y bağlanır ya da sağkalım ve farklılaşma yollarını düzenler. RUNX3 invaziv ve invazyon öncesi epitelyal ve mezenşimal tümörler de tümör baskılayıcı bir gen olarak kabul edilir (Subramaniam ve ark., 2009). Bu baskılayıcı aktivite, ilk kez 2002 yılında nakavt fareler üzerinde gastrik epitelyal hücrelerde gösterilmiştir (Li ve ark., 2002). APC, E-Kaderin ve RUNX3 tümör baskılayıcı genleri ile K-RAS, HER2 ve β -katenin gibi onkogenlerde görülen mutasyonların gastrik kanser ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Ushijima ve Sasako, 2004; Parkin ve ark., 2005; Satiroğlu ve ark., 2006). Özellikle COX2 gen ekspresyon seviyesinin gastrik adenokarsinomal dokularda anlamlı bir artışı olduğu görülmüştür (Ristimaki ve ark., 1997).

Wnt/Beta-katenin sinyal yolu tüm kanserlerde önemli bir rol üstlenen ve üzerinde en çok çalışılmış sinyal yoludur. Son yapılan çalışmalarda gastrik kanserli hücrelerin, COX2 ekspresyonu ile GSK-3 β enziminin inhibisyonu ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğu belirtilmiştir. Wnt/Beta-katenin sinyal yolu ile COX2 gen ekspresyonunun da sıkı bir ilişki içerisinde olduğu çeşitli araştırmalarla desteklendiği de hesaba katılırsa, gastrik kanserinde Wnt/Beta-katenin sinyal yolağı ile aralarında

bir bağ olabileceği anlaşılır (Nagase ve ark., 1996; Fini ve ark., 1998; Israel ve ark., 2001; Akhter ve ark., 2007).

1.5. Ekstraselüler Matris

ESM, çeşitli proteinler ve polisakkaritlerden oluşan, hücreler için destek görevi gören, hücre büyümesi ve dokuların hayatta kalması için oluşan biyokimyasal tepkimeler için bir sinyal yolu ve hücreler arası iletişim merkezidir. Bu yüzden herhangi bir tümörleşme durumunda ilk zarar görecekt alanlardan birisidir (Pak ve ark., 1997; Wada ve ark., 1998). ESM, fibroblastlar, osteoblastlar ve bazal epitel hücreleri dahil olmak üzere matris kendisi içinde bulunan epitelyal hücreler ve stromal hücreler tarafından üretilir. ESM içinde birincil proteinler olarak görev yapan moleküller kollajenlerdir. Kollajenler 29 farklı proteinden oluşan bir protein ailesidir. ESM içinde tüm tipleri bulunmaz ama belirli tipleri mevcuttur. Bunlar tip I,III, VI, V ve glikozaminoglikan içeren tip XI kollajendir (Hulmes ve ark., 2002). Kollajenlerin birçok farklı tipi ESM ve bazal membranın yapısında görev alırlar. Bu görevler, ESM içerisindeki matrise yapısal destek ve diğer ESM proteinlerine bağlanma alanları oluşturmakta ve tümör gelişiminde invazyon ve metastaza katkıda bulunmaktadır. Kollajenler, solid tümörlerin oluşumunu etkileyen ve kollajen lif yoğunluğunun büyük bir yapısal bileşenidir (Gao ve ark., 2010; Kakkad ve ark., 2010). Elastin, kollajen ile birlikte, ESM için önemli yapısal bir proteindir. Elastin, fibrillin ile birlikte, birçok dokuda doğal esneklik için sorumludur (Kielty ve ark., 2002).

ESM'deki tümör kaynaklı malign hücreler, endotel hücreler, perisitler, fibroblastlar ve tümör ilişkili makrofaj ile VEGF gibi birçok büyüme faktörünün toplamını içine alan bölgeye tümör stroması denir. Stromal ve kanser hücreleri devam eden ESM modellemesi ve bu süreçteki tümör hücre göçü için çeşitli proteazlar ürettikleri öne sürülmüştür (Kalluri ve Zeisberg, 2006; Fried ve Wolf, 2009). Kanser oluşumunun hemen hemen tüm yönleri (örneğin; büyüme, farklılaşma, motilite ve apoptozis) ve sinyal iletim ağları, hücreler ile ESM arasında fiziksel etkileşimlerle düzenlenebilir. Örneğin, epitel hücrelerin normal fonksiyonları bazal membrana bağlıdır ve ESM'de laminin, tip IV, XV, XVII kollajenler, perlekan ve nidojen ile yüksek oranda özelleşmişlerdir Bazal lamina kaybının ileri aşaması, neoplastik düzensizliklerin ve metastatik invazyon sınırlarının bozulmasının ilk basamağıdır (Kalluri, 2003).

ESM, protein komponentlerinin sadece hücrelerin yapısal destek elemanları olarak değil aynı zamanda çeşitli biyolojik fonksiyonlarına da sahiptirler. ESM proteinleri büyüme faktörleri, sinyal reseptörleri ve adhezyon molekülleri ile etkileşim halindedirler. Buna en iyi örnek ise fibronektindir. ESM proteinleri gibi diğer hücre türleri arasında fibroblastlar tarafından üretilen fibronektin dimer olarak bulunur, kollajenleri ve heparan sülfat proteoglikanları bağlarlar. Böylece birçok hücre yüzey reseptör sistemleri için yapısal bir çerçeveye katkıda bulunurlar (Ruoslahti, 1988).

ESM içerisinde görevli birçok enzim ailesi vardır; bunlar MMP'ler ve heparanazlardır. Heparanaz enzimi heparan sülfatın (HS) arasındaki üronik asit ve glikozaminleri kesen bir endoglikuronidazdır. HS'nin üç kesim hedefi vardır. Bunlar; matris proteinlerinin hayati çapraz bağlayıcılarının çıkarılması, protein-protein bağlanmalarını düzenleyen HS'ye bağlı büyüme faktörlerinin serbestleşmesi ile hücre göçü ve doku yeniden modellenmesidir (Dempsey ve ark., 2000; Li ve Vlodavsky, 2009).

1.6. Matris Metalloproteinazlar

Proteolitik enzimler genel olarak terminal ya da internal peptid bağlarını deşredere etme durumlarına göre sırası ile ekzopeptidazlar veya endopeptidazlar olmak üzere ikiye sınıflandırılırlar. Endopeptidaz ailesinin büyük bir kısmı katalitik mekanizmaları ve inhibitörlere karşı hassasiyetleri göz önüne alınarak serin, sistein, aspartik endopeptidazlar veya metalloproteinazlar olarak gruplandırılırlar (Stetler ve ark., 1993).

MMP'ler; ESM'nin bütün komponentlerini yıkıma uğratabilen 25'den fazla üyesi olan bir enzim ailesidir (Nagase ve ark., 1999). MMP'ler anjiyogenezis, apoptozis, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim, blastokist implantasyonu, organ morfolojisi, sinir büyüme, yumurtlama, servikal dilatasyon, endometrial döngü ve kemik yeniden modellenmesi gibi normal biyolojik süreçlere katılırken aynı zamanda da artrit, kanser, kalp hastalığı, nefrit, nörolojik hastalık, kan beyin bariyeri dejenerasyonu, periodontal hastalık, deride ülser, gastrik ülser, kornea ülseri, karaciğer fibrozis, amfizem ve fibrotik akciğer hastalığı gibi çeşitli patolojik süreçlerde de rol oynarlar (Nagase ve ark., 1999; Parks ve ark., 2004). MMP'ler, proteinaz inhibitörlerini, latent büyüme faktörlerini, kemotaktik molekülleri, büyüme

faktörü bağlanma proteinlerini, hücre yüzey reseptörlerini ve hücre-hücre adhezyon moleküllerini yıkıma uğratırlar. MMP'lerin ifadesi, transkripsiyonel büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler ve hücresele dönüşüm ile düzenlenir. MMP'lerin proteolitik aktiviteleri ve MMP öncüleri, metalloproteinaz doku inhibitörleri ile gelen etkinleştirme sırasında kontrol edilir (Sternlicht, 2001; DeClerck ve ark., 2004; Thiel ve ark., 2006).

MMP enzim ailesinin üyeleri çinko katalitik bir bölgeye sahip olmaları ve N terminal domainlerinin yapısı bakımından tüm üyelerde benzerlik gösterir. Aynı zamanda MMP'lerin büyük bir kısmı hemopeksin domainine sahiptirler. C-terminal hemopeksin bölgesi, enzimin substratı tanıyabilmesi ve yıkım sonrası enzimi kontrol altına alabilmesi bakımından çok önemli bir yer teşkil etmektedir (Birkedal-Hansen ve ark., 1993). Membran tip MMP'ler (MT-MMP) gibi bazı MMP'lerin propeptit ve N terminal bölgesi arasında kısa bir peptit yapı bulunmaktadır. Bu, golgide yerleşmiş bir serin proteaz olan furin tarafından tanınır, böylece bu tür MMP'ler aktif formda salgılanır. MMP-8 (kollajenaz-2) ve MMP-9 (jelatinaz-B) nötrofil içindeki spesifik granüllerde depolanmış olarak bulunurken, diğer çoğu MMP'ler sitokinlerin stimülasyonu sonucu değişik konnektif doku hücreleri tarafından üretilir (Nagase ve ark., 1999).

MMP'lerin hedefleri arasında diğer proteinazlar, proteinaz inhibitörleri, çeşitli pıhtılaşma faktörleri, kemotaktik moleküller, latent büyüme faktörleri, büyüme faktörlerini bağlayıcı proteinler, hücre yüzey reseptörleri, hücre-hücre adhezyon molekülleri ve bütün ESM proteinleri gösterilebilir. Bu da MMP'lerin birçok biyolojik işlem üzerinde düzenleyici bir etkisinin olduğunu gösterir (Nagase ve ark., 1999).

MMP'ler yapılarının farklılıkları ve substrat özgüllükleri bakımından çeşitli alt gruplara ayrılabilirler. Bu alt gruplar; İnterstisyel kollajenazlar (MMP-1, -8 ve -13) tip1 kollajenin yıkımından sorumlu iken, jelatinazlar (MMP-2 ve -9) tip 4 kollajenin, stromelizinler (MMP-3 -10 ve -11) ise tip 4-5 kollajen ve proteoglikanların yıkımını üstlenirler. Stromelisinlerin geniş bir substrat spesifitesi vardır. MMP-3 çeşitli büyüme faktörleri ve IL-1 ve TNF- α gibi sitokinler tarafından hızla indüklenebilir. MMP-3 ve MMP-10'un benzer bir substrat spesifitesi vardır ancak bu enzimlerin ekspresyon paternleri çoğunlukla farklıdır. MT-MMP'ler (MMP-

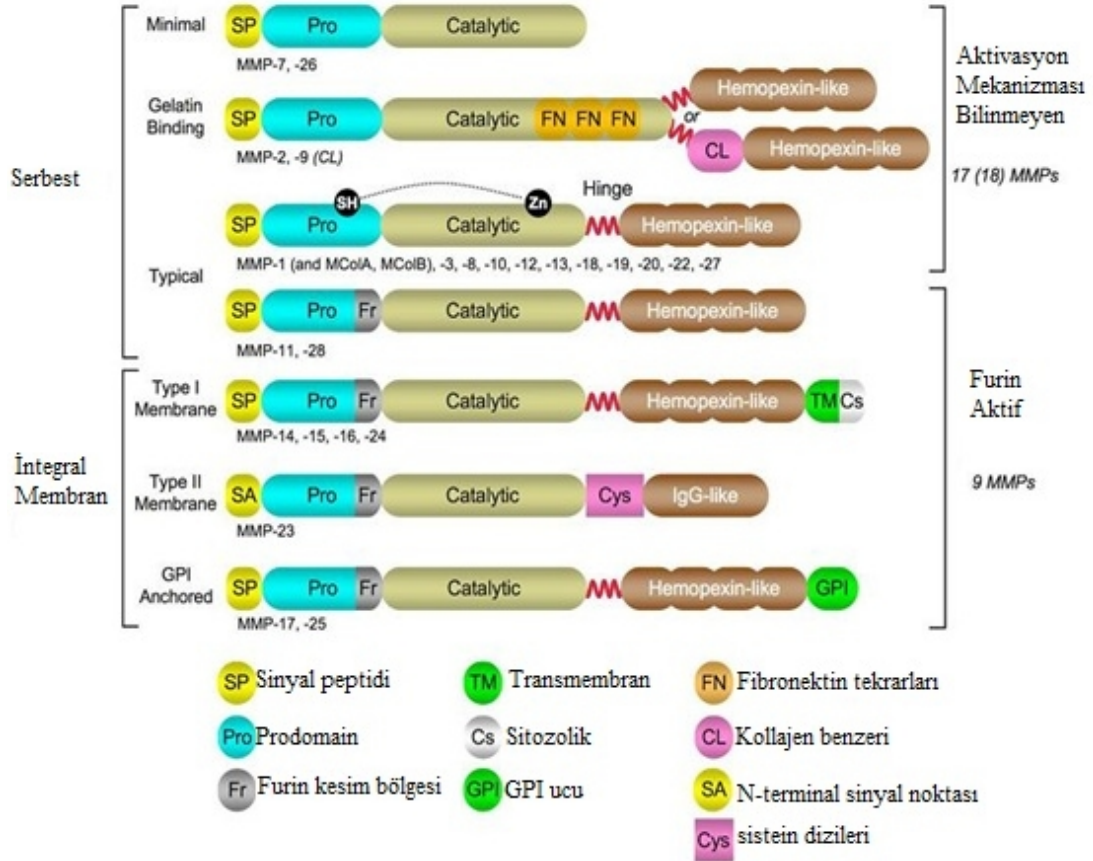
14, -15, -16 ve -17) ise hem kollajen yıkımından sorumlu, hem de MMP öncüllerinin etkinleştirilmesinde de görev alırlar. Diğer MMP'ler ise MMP-11, -12 ve -19'dur. Matrizilinler Kollajen tip IV, elastin, fibronektin, laminin gibi substratları degradasyonunu sağlayan enzimlerdir. Şimdilik MMP-7 olarak adlandırılmış tek üyesi bulunmaktadır (Visse ve Nagase., 2003) (Tablo 1.1). TIMP'ler, MMP'lerin spesifik doku inhibitörleridir ve MMP'lerin doku içindeki lokal aktivitelerini kontrol etme rolü üstlenmişlerdir (Patterson ve ark., 2001).

Tablo 1.1 MMP lerin tipleri, substratları ve görevleri (Chaudhary ve ark., 2010)

Enzim	Substratları	Ekspresyon ve Görev
Kollajenazlar		
Kollajenaz-1 (MMP-1)	Kollajen I, II, III, VII, VIII, X, agrekan	Gelişim, doku tamiri
Kollajenaz -2 (MMP-8)	Kollajen I, II, III, agrekan, serpin, a2M	Lökositler ve kırıkta
Kollajenaz -3 (MMP-13)	Kollajen I, II, III, IV, IX, X, XIV, jelatin, fibronektin, laminin, tenascin C, agrekan, fibrillin, osteonektin, serpin	Kemik gelişimi, İnvaziv tümörler
Stromelizinler		
Stromelizin-1 (MMP-3)	Kollajen tip IV, V, VII, IX, X, XIV, fibronektin, elastin, jelatin, laminin, agrekan, nidogen, fibrillin, osteonektin, a1PI, MBP	Keratinositler Fibroblastlar
Stromelizin-2 (MMP10)	Kollajen IV, V, IX, X, XIV, fibronektin, elastin, jelatin, laminin, agrekan, nidojen	Keratinositler Fibroblastlar
Stromelizin -3 (MMP11)	a1PI	İnsan invaziv kanserleri
Metalloelastazlar		
(MMP-12)	kollajen tip IV, jelatin, fibronektin, laminin MBP, elastin, vitronektin, nidojen, a1PI, fibrillin, plasminojen, apo A, proteoglikan	Makrofajlar
Matrilizinler		
Matrilizin-1 (MMP-7)	Kollajen tip IV, elastin, fibronektin, laminin, nidojen, tenasin, osteonektin, MBP, dekorin, versikan, a1PI	Kanal epitel hücreleri Ekzokrin bezler
Matrilizin-2 (MMP-26)	Kollajen tip IV, jelatin, fibronektin, fibrin, fibrinojen, tip I jelatin, a1PI, b-kazein,	Uterus ve plasenta Üreme sürecinde
Jelatinazlar		
Jelatinaz A (MMP-2)	Kollajen I, IV, V, VII, X, jelatin, fibronektin, tenasin, fibrillin, osteonektin, MBP, dekorin, a2M	Degradasyon Fibriller kollajenazlarla yarıklanma
Jelatinaz B (MMP-9)	Kollajen tip IV, V, VII, XI, XIV, XVII, jelatin, elastin, fibrillin, osteonektin, fibronektin,	Kollajenazlar, invazyon Malign tümörlerde
MMP-28	ND	Testis, akciğer, keratinositler.

MMP'ler domainlerinin kompozisyonuna göre alt gruplara ayrılırlar da bu konuda henüz görüş birliği sağlanabilmiş değildir (Şekil 1.4). Domainlerin yapısının tek başına substratları tanıyabilecek özellikte bir fonksiyonu yoktur. Ancak domainler iki alt grupta toplanabilir. Bunlar; hücre yüzeyine salgılanan ve cis de bağlanan MMP'ler ve furin tanıma bölgeleri içeren MMP'lerdir. MMP'lerin dokuz tanesi membran bağımlı enzimlerdir ve diğerlerini (insanda -17, farede -18) aktive edecek furin tanıma bölgesine sahiptir. Membran tip MMP'ler (TM; MMP-14, -15, -16, and -24) bir transmembran üzerinden, GPI bağlantılılar (MMP-17 ve -25) ya da bir N terminal sinyal bağlantılı (SA; MMP-23) olarak hücre yüzeyine bağlanırlar (Ra ve William, 2007).

MMP'ler, inaktif proenzimler ya da zimojenler olarak sentezlenirler. Bu latent durum, propeptid domainin C- terminal ucu yakınlarında çiftleşmemiş bir sistein sülfhidril grubu tarafından sağlanır. Bu sülfhidril grubu aktif çinko iyon alanı için dördüncü ligand olarak görev görür. Aktivasyon; sistein-çinko (Cys-Zn+2, sistein anahtarı) etkileşiminin bozulmasını ve propeptid domainin uzaklaştırılmasını gerektirir. Böylece tiyol grubu MMP hedefindeki molekülün peptid bağlarını hedefleyen bir su molekülü ile değiştirilir. Salgılanan pro-MMP'ler, *in vitro* koşullarda başka proteinazlar ve SH-reaktif ajanlar, civa bileşikleri, reaktif oksijen ve denatürantlar gibi çeşitli ajanlar tarafından aktive edilirler (Sternlicht ve ark., 2001; Page-McCaw ve ark., 2007).

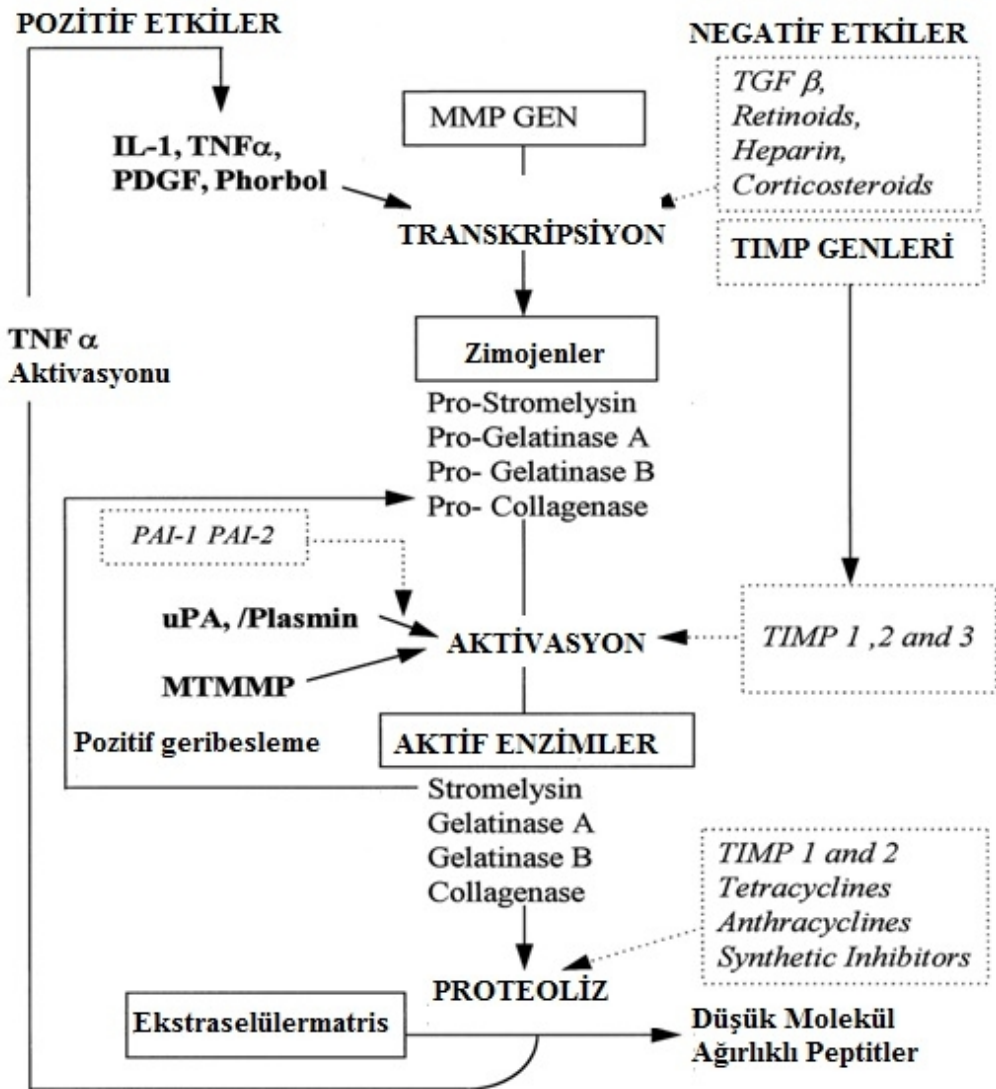


Şekil 1.4. Memelilerde MMP domainlerinin yapısı (Ra ve William, 2007'den adapte edilmiştir).

MMP'lerin isimlendirilmelerine göre sadece ekstrasellüler matris içinde görev aldıkları düşünülse de matris yıkımı ne sadece bu enzimler için ortak ne de baskın bir fonksiyondur. Aslında hücre-hücre ve hücre-matris sinyalleşme olaylarını düzenleyen ve latent proteinlerin fonksiyon kazanmalarını sağlayan enzimler olarak tanımlanabilir (Parks, 1999; Vu ve Werb, 2000; Ra ve William, 2007). Çünkü son yıllarda yapılan araştırmalar, birçok MMP'lerin sitokinler, kemokinler, reseptörler, antimikrobiyal peptidler ve bunun gibi birçok protein çeşitleri gibi, matris dışı proteinlerin parçalanmasında da görev alabildiklerini göstermiştir. Örneğin; IL-1 ve TNF- α gibi bazı sitokinler pek çok hücre tiplerini yıkıcı etkileri olan proteinaz sentezi yönünde stimüle ederler. MMP-1, MMP-3 ve diğer MMP'lerin sentez ve salınımı IL-1 ve TNF- α tarafından stimüle edilir (Sternlicht ve ark., 2001; Page-McCaw ve ark., 2007).

MMP'lerin katalitik aktiviteleri dört yoldan düzenlenir. Gen transkripsiyonu, enzimin perisellüler birikimi, proenzim aktivasyonu ve aktif enzimin inaktivasyonudur. Aynı zamanda substrat uygunluğu ve afinitesi de bu düzenlemeyi

kontrol eden ilerletici bir mekanizmadır. MMP-2, MMP-19, MMP-28 ve bazı MT-MMP'ler normal dokularda eksprese edilir ve vücut homeostazisinde rol oynarlar. MMP'lerin nitel ve nicel düzeyde tümörler, çeşitli iltihaplar ve hücre tipleri arasında farklılık gösterse de, aktif hücrede ve kültür medyumlarında çeşitli şekillerde kendilerini eksprese edebilirler. Çoğunlukla MMP'lerin üretimi geçici sinyaller ve sınırlı bölgelerde düşük transkripsiyona uğrarlar (Sternlicht ve ark., 2001) (Şekil 1.5).

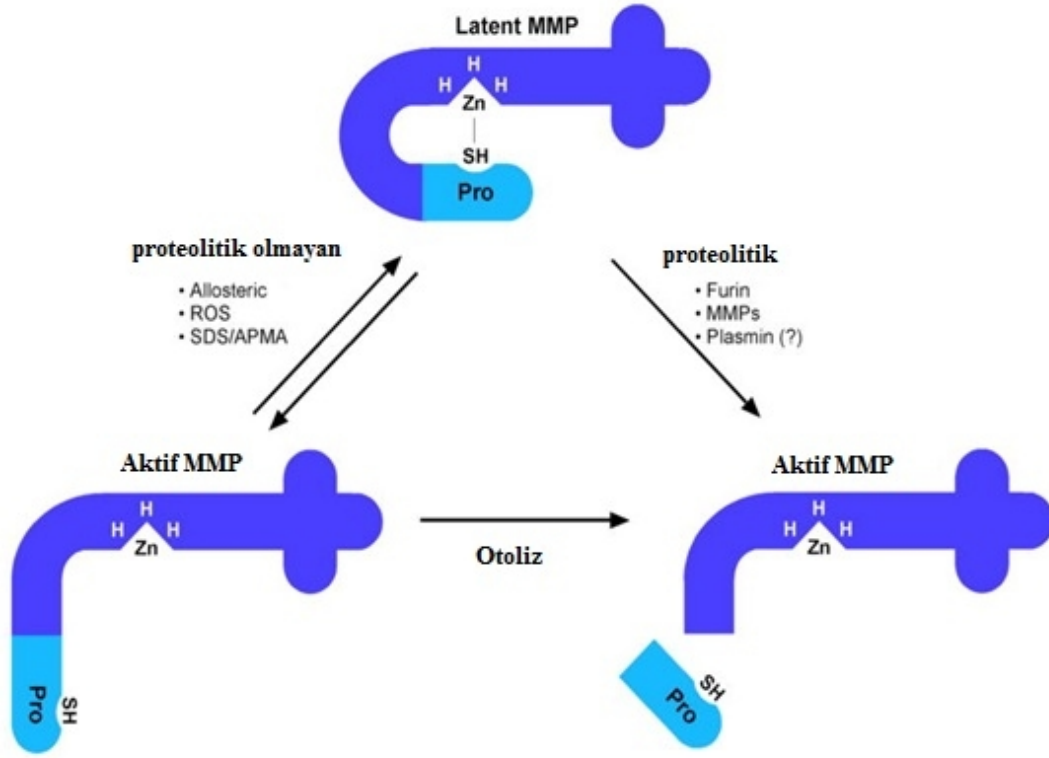


Şekil 1.5. MMP'lerin transkripsiyon regülasyonu (Dollery ve ark., 1995'den adapte edilmiştir).

Sitokinler ve büyüme faktörlerinin bir kısmı, IL-1, PGDF ve TNF- α içeren MMP'lerin sentez aşamalarında indükleyici olarak kendilerini gösterirler. Fakat TGF- β , heparin ve kortikosteroidler gibi diğer faktörler ise baskılayıcı bir etkiye sahiptirler (Birkedal-Hansen ve ark., 1993). MMP kontrolünün ikinci aşaması; latent

zimojen enzimlerin aktivasyonudur. Bazı plazmin bağımsız yollar bulunmasına rağmen plazmin, aktif moleküle geçecek latent propeptitlerin bölünmesini stümüle ettiği ve MMP'lerin çoğu için potansiyel bir aktivatör olduğu bildirilmiştir (Sperti ve ark., 1992; Nagase ve ark., 1990). Hücre öncüllerinde lokalize olan proteolitik aktivasyon mekanizmasının uPA'nın bağlanması ve aktivasyonu ile meydana geldiği düşünülmektedir (Kirchheimer ve Remold, 1989). uPA ve uPA-r, monositler ve makrofajlar gibi çeşitli hücrelerde eksprese edilir. uPA'nın antikorları ile inhibitörleri matrisin degradasyonunu önlediği çalışmalarla ortaya konulmuştur (Estreicher ve ark., 1989). Proteolitik sistem ile pıhtılaşma zincirleri arasında çeşitli benzerlikler vardır örneğin; plazmin kesimi MMP-3'ü aktive ettiğinde ortaya çıkan aktif enzim, diğer proenzimleri pozitif geri besleme döngüsü oluşturarak aktive edebilir. Kollajenazların C- terminal ucu stromelisinler tarafından kesildiği zaman, beş ile sekiz kat arasında proteolitik aktivasyon oranı yükselir (Dollery ve ark., 1995). Yakın bir zamanda açıklanan, hücre yüzeyine proteolitik aktivasyon süreçleriyle lokalize olmuş olan MT-MMP'ler, bir çeşit integral membran proteindirler ve plazmin/plazminojen aktivatör sistemi gibi projelatinaz A aktivatörüdürler. Bu durum, bütün MMP'ler için paralel transmembran kontrol sisteminin var olabileceğini işaret eder (Sato ve ark., 1994).

MMP'lerin zimojen olarak durumunun korunumu prodomaindeki sistein korumalı serbest tiyol ile enzimin katalitik grubundaki HIS bağımlı çinko atomu arasındaki elektrostatik etkileşimler ile sağlanır. Prodomain, kataliz bölgesini kapalı tutar böylece protein substratı ile herhangi bir etkileşim önlenmiş olur (Şekil 1.6). Furin ya da diğer proteazlar tarafından prodomainin proteolitik kesim alanı, tiyol sınırlarını ortadan kaldırır. Tiyol çinko etkileşimi laboratuvar koşullarında proteolitik olmayan araçlarla bozulabilir, örneğin SDS ve APMA, doku ve hücreler içinde, pro-MMP'ler integrinler ve proteoglikanlar gibi diğer makromoleküllere bağlanabilir ve bu etkileşimler çinko bağlı tiyol gruplarının allosterik yapılarının bozulmasına yol açabilir (Dollery ve ark., 1995).



Şekil 1.6. ProMMP nin aktivasyon mekanizması (Ra ve William, 2007'den adapte edilmiştir).

Sistein anahtar mekanizmasının önemli bir komponenti olan prodomainin, enzimin zimojen aktivitesini elde etmek için ortadan kaldırılmasına gerek yoktur. Ancak tiyol çinko etkileşiminin bozulması kensinlikle gereklidir. Bu kavram, proMMP'lerin zimograf substrat değişimlerinin (SDS aktiviteli) yalnızca yapay bir jel aktivasyon sisteminde en iyi şekilde gösterilmiştir. Sistein çinko etkileşiminin bozulması nasıl olursa olsun, prodomainin proteolizi *in vivo* koşullarda MMP aktivasyonu için son aşama olarak kabul edilebilir. ProMMP'ler, çeşitli konformasyonel değişimler ve aktivasyon durumlarının korunması sebebiyle substrat olmayan makromoleküller ya da translasyon sonrası değişimler ile etkileşimde bulunabilir. Buna karşılık, sistein çinko bileşiğinin allosterik bozunmaları, prodomainin otolitik kesimine izin veren aktif geçiş durumunu ortaya çıkarır. *İn vitro* koşullarda, MMP'lerin birisi diğer inaktif MMP'nin aktivasyonunu yönetmek için bu MMP'nin domanini kesebilir bu sayede aktif bir MMP başka bir enzimin aktifleşmesi için aracılık edebilir. İlk bölünme, bir serin proteinaz veya bir MMP tarafından yapılabilir (Nagase, 1996).

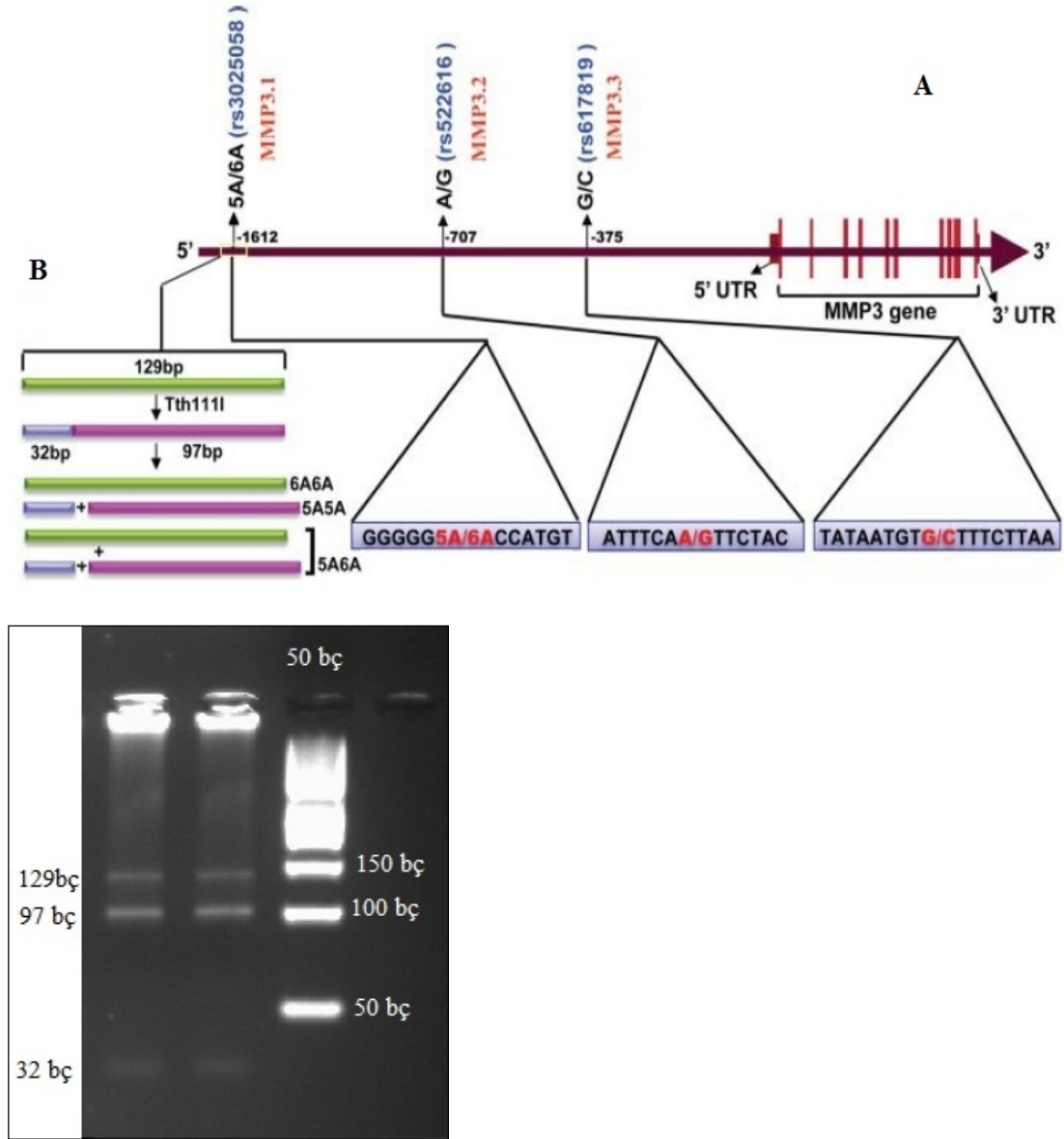
1.7. MMP-3

MMP-3 geni 11. kromozomun q kolunda 22. bölgede yer almaktadır. Bu gen normal hücrelerin büyük bir bölümünde özellikle stromal fibroblastlar, keratinositler, endotel epitel hücrelerde ve tümör hücrelerinde eksprese olurlar (Freije ve ark., 2003). MMP-3 proteinazı ekstraselüler matris elemanlarından kollajen tipleri IV, V, VII, IX, X, XIV, lamininler, elastin, entaktin, fibronektin, fibrinler, fibulin, bağlı proteinle, osteonektin, tenaskin, vitronektin ve ekstrasellüler matris proteoglikanlarını degrede edebilir. MMP-3 aynı zamanda serbest hücre yüzey moleküllerini özellikle E-kaderin, L-selektin, heparin bağlı EGF büyüme faktörü ve TNF- α gibi hücreler arasında görevli olan elementleri yıkabilir ve MMP-1 ve MMP-9 gibi proMMP'leri aktive edebilme yeteneklerine sahiptirler. MMP-3 stromal MMP'ler arasından onkolojik etkileri olan aday bir genidir. MMP-3 hedef hücrenin farklılaşma konumuna göre apoptozisi veya proliferasyonu tetikleyebilir. Ayrıca bu enzim doğal tümör promotörü olarak anjiyogenezi tetikler. (Overall ve ark., 2002; Visse ve ark., 2003).

MMP-3 genindeki olası bir SNP, transkripsiyonal başlangıç bölgesinin 1171 baz önünde yer alır. Bu polimorfizm promotör bölgesinde bir transkripsiyonal aktiviteyi sağlayabilecek 5 ya da 6 adenin içerir. MMP-3'deki olası polimorfizmler birlikte böbrek karsinoması, kolorektal kanser ve meme kanseri gibi çeşitli tümörlere sebebiyet verebilirler. Bu polimorfizmler aynı zamanda ovaryum kanseri, kolorektal ve kutanöz malign melanom ile invazyon oluşumu sürecinde güçlü bir ilişki içerisindedirler (Ye ve ark., 1995; Ye ve ark., 1996; Brinckerhoff, Rutter ve Benbow, 2000; Biondi ve ark., 2000; Ye ve ark., 2001; Van Themsche, Potworowski ve St-Pierre., 2004).

MMP-3 geni promotör bölgesi -1171. pozisyonunda 5A/6A polimorfizmi ile karakteristiktir. 6A alleli *in vitro*'da 5A allelinden daha düşük promotör aktivitesi gösterir (Zhu ve ark., 2006; Deguara ve ark., 2007). MMP-3'deki polimorfizm meme, böbrek, karaciğer, ağız ve akciğer kanserlerinin yanında damar tıkanıklığı, kalp hastalıkları, romatizma, miyopi, migren ve bunama gibi hastalıklara yatkınlık çalışmalarında da gösterilmiştir (Kanamori ve ark.,1999; Ghilardi ve ark., 2002; Hirata ve ark., 2003; Fang ve ark., 2005) (Tablo 1.2) (Muhnoz ve ark., 2010) (Şekil

1.7).



Şekil 1.7. MMP-3 polimorfizmlerinin genotiplendirilmesi (Dey ve ark., 2011'den adapte edilmiştir). (A) MMP-3 promotör bölgesinde görülen -1171 5A/6A (-1612)(rs3025058) , -707(rs522616) A/G ve -375(rs617819) G/C polimorfizmlerinin şematik görünümü. (B) MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizminin RFLP şematik ve PZR-RFLP %4'lük agaroz jel görüntüsü.

MMP-3 geninin çeşitli fizyolojik olaylardaki rolünün yanında, hücre kültürü çalışmaları bu genin kanserin ilerleme sürecinde etkili olduğunu göstermiştir. Buna destek olarak yapılan bir çalışma fare meme epitel hücrelerinde MMP-3'ün epitel mezankimal geçişi indüklediği gösterilmiştir (Przybylo ve Radisky, 2007). Diğer bir çalışmada, metastatik sıçan embriyo hücrelerinde yüksek oranda MMP-3 ekspresyonu saptanmış, metastatik olmayanlarda ise MMP-3 ekspresyonu

gözlemlenemeyecek kadar az olduğu bildirilmiştir (Sreenath ve ark., 1992). T98G glioma hücrelerinde invazyondaki artışa TNF- α tarafından indüklenen MMP-3'ün sebep olduğu gösterilmiştir. MMP-3 geninin siRNA ile susturulması sonucunda meme kanserli hücrelerde MMP-3'ün invaziv role sahip olduğu (Hegedüs ve ark., 2000), insan kondrosarkom hücre hattı JJ012'de ise migrasyonu engellediği gösterilmiştir (Tang ve ark., 2010). Gastrik kanseri hücre hattı AGS'de siRNA yöntemi kullanılarak MMP-3 geninin susturulması sonucu invaziv hücre sayısında azalmaya, MMP-3'ün aynı hücrelerde overekspresyonu ise invaziv hücre sayısında artışa sebep olduğu ilk defa Yazıcıoğlu ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Gencer ve ark., 2011). Bu çalışmada MMP-3 geninin gastrik kanserin ilerlemesinde önemli bir rolü olabileceği vurgulanmıştır.

Krippel ve arkadaşları tarafından meme kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada MMP-3'ün promotör bölgesinde görülen 5A/6A polimorfizminin meme kanseri ile ilişkisi olmadığı gösterilmiştir. MMP-3 promotör polimorfizmi fonksiyonel olarak gösterilmiş olmasına rağmen meme kanseri üzerindeki etkisinin normal vaka kontrol çalışmalarında görülemeyecek kadar küçük olduğu belirtilmiştir (Krippel ve ark., 2004). Ancak Holliday ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ise meme kanserinde MMP-3 5A/6A genotipinin tümör oluşum sürecinde yüksek oranda eksprese olabileceği ifade edilmiştir (Holliday ve ark., 2007). Hinoda ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada, MMP-3 6A/6A genotipinin kolorektal kanser hastalarında kontrol grubuna göre daha fazla görüldüğü anlaşılmıştır. Bu araştırmanın ilginç yanı hastalarda 6A/6A genotipinin beklenenden oldukça fazla gözlemlenmiş olmasıdır (Hinoda ve ark., 2002). Fang ve arkadaşlarının Çin'de yapmış oldukları küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hastalarında görülen MMP-3 5A/6A promotör polimorfizmi çalışmasında, MMP-3 promotör polimorfizminin NSCLC'nin gelişimini sigarayı bırakmış hastalarda da devam ettirebileceği gösterilmiştir (Fang ve ark., 2005). Bu veriler, aktive edilmiş kimyasal karsinojenler tarafından oluşturulan metabolik değişikliklerle etkileşime giren MMP-3 5A allelinin NSCLC'ye sebep olabileceğini göstermektedir. Yüksek düzeyde görülen MMP-3 ekspresyonu diğer MMP'leri (MMP-1 ve MMP-9) de etkilemekte ve metastazın lokal düzeyde gelişimine sebep olmaktadır. Sonuç olarak MMP-3 5A allelinin NSCLC hastalarında ve özellikle Çinli sigara içicilerinde yüksek risk faktörü olduğu kanıtlanmıştır (Fang ve ark., 2005). Shan ve arkadaşları

tarafından yapılmış olan bir çalışmada kadınlarda endometriozis ile MMP-3 promotör polimorfizminin direk ilişkisi olmadığı görülmüştür. Çalışmada MMP-3 genotip frekansının, hastalar ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlemlenmiştir. (Shan ve ark., 2005). Lu ve arkadaşlarının hastaları yaş, cinsiyet ve histolojik düzeylerine göre sıraladıkları başka bir çalışmada, hastaların MMP-3 5A/6A polimorfizmine sahip 1171 bç'lik MMP-3 gen bölgesi beyin astrositoması riskini değiştirmemiştir. Daha önceki çalışmalarda Çin'in Hebei bölgesindeki 5A allele sahip bireylerin özefagual sküamöz hücre karsinomuna yatkın oldukları bildirilmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanser düzeyinde de aynı risk bulunmuştur, ayrıca yüksek düzeyde lenf nodülü metastazı görülmüştür. Aynı popülasyondaki MMP-3 polimorfizmi ise meme kanser riskini değiştirmemiştir (Ghilardi ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2004; Fang ve ark., 2005).

Smolarz ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada; 5A/6A polimorfizminin ovaryum kanseri üzerindeki rolü henüz kanıtlanamamıştır. Kısıtlı kanıtlara dayanarak ovaryum kanserinin yüksek düzeydeki MMP ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir, polimorfizm ve ovaryum kanseri hastalarının klinik durumunu açıklayan korelatif bir çalışma daha mantıklı gözükmemektedir. Bu çalışmada, 118 ovaryum kanser hastasında 5A/6A polimorfizmi genotipi ile kanserin oluşumu hakkında bir ilişki bulunamamıştır. Buna ek olarak 5A/6A genotipi ve ovaryum kanseri invazivliğiyle bir bağlantı bulunamamıştır (Smolarz ve ark., 2003). Murray ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş oldukları çalışmalara göre gastrik kanserinin büyük bir kısmı MMP-2'yi %94, MMP-9'u %70, MMP-1'i %73 eksprese etmesine rağmen tümörlerin sadece %27'lik kısmında MMP-3 bulunmuştur (Murray ve ark., 1998). Bu sonuç MMP-3 ekspresyonunun gastrik kadriak adenokarsinom'da önemli bir olay olmadığını kanıtlamaktadır. Ancak küçük bir örnek boyutu ile çalışıldığı için anlamlı bir sonuca varılması güçtür, daha fazla örnek sayısı ile yapılacak ileriki çalışmalar MMP-3'ün -1171. pozisyonundaki 5A/6A SNP'nin gastrik kardial adenokarsinom gelişimindeki etkisini belirlemek için gereklidir. Sonuç olarak çalışma, tek bir MMP-3 promotör bölgesindeki -1171. pozisyonundaki A insersiyonu/delesyonu polimorfizminin gastrik kardial adenokarsinomda gelişim riskini ve lenfatik metastazını modifiye edemeyeceği görülmüştür (Zhang ve ark., 2004).

Tablo 1.2. MMP-3 5A/6A polimorfizminin çeşitli hastalıklarla olan ilişkisi (Muhnoz ve ark., 2010)

Allel	Hastalık
5A	Romatit artrit
5A	Lumbar disk dejenerasyonu
5A	Miyopi
5A	Koroner damar hastalıkları
5A	Periferel arterial tıkanıklık
5A	Migren
5A	Ağız kanseri
5A	Meme kanseri süreci
5A	Vasküler bunama
5A	Akut miyokardial infarktojen
5A	Meme kanseri
5A	Akut koroner sendrom
5A	Hepatoselüler karsinom
5A	Gastrik kanseri
6A	Kaynaşık spondilitis
6A	Anjiyopatik koroner plak
6A	Damar aterosiklerozis yatkınlığı
6A	Şiddetli Romatit artrit
6A	Şahdamarı daralması

2.AMAÇ

MMP-3, karsinogenez sürecinde ESM'yi degrades ederek invazyona sebep olan önemli bir gendir. 6A alleleline sahip bireyler ile koroner damar hastalıkları arasında bir ilişki olup düşük düzeyde MMP-3 gen ekspresyonunun damar duvarlarında matris birikimine neden olarak damar tıkanıklığına yol açtığı tespit edilmiştir (Humphries ve ark., 1998; Gnasso ve ark., 2000). MMP-3 geninin promotör bölgesi -1171. pozisyonunda bulunan 5A/6A tek nükleotit polimorfizminin meme, akciğer, kolon, HNSCC ve böbrek kanserlerine yatkınlığı artırdığı bilinmektedir (Hirata ve ark., 2003). MMP-3 promotör bölgesi 5A/5A genotipi de meme kanserlerinde yüksek oranda görülüp, tümör ilerlemesine ve invazyonuna katkıda bulunur (Holliday ve ark., 2007).

İnsan fibroblast hücre kültürü (HFFF2) çalışmalarında 5A allelinin daha yüksek promotör aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (Ye ve ark., 1996). Bunun yanında akciğer ve kolon kanserlerinde 5A/6A genotipinin 6A/6A genotipine göre yüksek oranda promotör aktivitesi gösterdiği çalışmalarla gösterilmiştir.

Son zamana kadar gastrik kanserin gelişimi ve ilerlemesi üzerinde MMP-3 geninin 5A/6A tek nükleotit polimorfizmi ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. MMP-3 promotör bölgesi -1171. pozisyonun 5A/6A insersiyon/delesyon polimorfizminin gastrik kanseri ile olan ilişkisini araştıran iki çalışma ile ilgili çelişkili bulgular vardır. Zhang ve arkadaşları bu polimorfizmin gastrik kanser ile bir ilişkisi olmadığını, Dey ve arkadaşları ise Doğu Hindistan popülasyonunda anlamlı bir ilişkisinin olduğunu saptamıştır (Zhang ve ark., 2004; Dey ve ark., 2011).

Bu çalışma, gastrik kanseri hastalarının normal ve tümörlü dokusunda MMP-3 geni promotöründeki 5A/6A insersiyon delesyon polimorfizmini PZR-RFLP yöntemi ile araştırıp, tespit edilen genotiplerin *H. pilori* enfeksiyonu, RNA düzeyinde saptanmış ekspresyon (Gencer, 2009), invazyon derinliği, tümör evresi ve tümör nekrozu açısından karşılaştırılmasını hedeflemektedir.

3.MATERYAL

3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Bu çalışmada kullanılan 41 adet gastrik kanserli hastanın tümör ve evre doku örnekleri 2006-2009 yılları arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Patoloji Ana Bilim Dallarından temin edilmiş olup –80 °C’de muhafaza edilmiştir. Hastalara ait patolojik bulgular ve tümör dokularında RNA düzeyinde MMP-3 ekspresyonları önceden tespit edilmiş ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

3.2. Araştırma İçin Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar ve Markaları

CİHAZLAR	MARKA
Görüntüleme Sistemleri	: Bio-RAD Universal Hood II
Isı Bloğu	: DB 2D
Manyetik Karıştırıcılar	: MR3001
Güç Kaynakları	: EPS301, PowerPac Basic
Spektrofotometreler	: Shimadzu UV
Thermo Cycler	: Techne TC-512
Elektroforez Sistemleri	: MultiSub Midi (Clever Scientific)
Santrifüjler	: MiniSpin Plus (Eppendorf)
Otoklav	: Dik Tip Otoklav (BES)
Tartı	: Hassas Terazı, XB220 A (Presica)
Su Banyoları	: Nüve BM 402
Vorteks	: Heidolph REAX
Su Arıtma Sistemi	: Millipore Milli Q Synthesis A10
Buzdolapları	: Beko 8742, Arçelik 3061 Plus
Derin Dondurucular	: -20 ⁰ C, Arçelik 2021 D, : -80 ⁰ C, Thermo Fisher Scientific
Mikropipet Seti	: 0,2-2, 2-20, 20-200, 200-1000µl’lik Finnpipette(ThermoScientific, FİNLANDİYA)

3.3. Genomik DNA izolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

Doku örnekleri Axygen AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit Prosedürü (05/11 Ver.1) DNA izolasyon kiti ile izole edilmiştir.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar

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

3.5. Primerler

Bu çalışmada incelenen polimorfik bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primer diziler tablo 3.1' de gösterilmiştir. Primerler dizayn edilirken Shan ve arkadaşlarının çalışmasından referans alınmıştır (Shan ve ark. 2005).

Tablo 3.1. MMP-3 5A/6A polimorfik bölgesini oluşturup çoğaltmak için kullanılan primerler

PRİMER	PRİMER DİZİSİ
Forward	5'-GGTCTCCATTCTTTGATGGGGGAAAGA-3'
Reverse	5'-CTTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT-3'

3.6. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) (pH 8,3)	: 890 mM Tris-Baz, 890 mM Borik Asit, 20 mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O
6X DNA yükleme boyası	: 10mM Tris-HCl (pH 7,6) 2,5 mg/ml BPB 2,5 mg/ml Ksilen siyanol 5g/ml gliserol 60mM EDTA (Fermentas, LİTVANYA)

Etidyum Bromür (EtBr)	: 10 mg/ml (Sigma, ALMANYA)
Agaroz Jel	: 0,5X TBE tamponunda %0,7, %1, %4'lük agaroz (Prona, EEC)

3.7. DNA Büyüklük Markörleri

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

4. METOT

4.1 Genomik DNA izolasyon işlem basamakları

Genomik DNA izolasyonu Axygen AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit Prosedürü (05/11 Ver.1) ile aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Dokudan 1-20 mg olacak şekilde parça alındı ve homojenat oluşturmak için, önceden soğutulmuş olan havan üzerinde hızlı ve kuvvetli şekilde ezildi.
2. 650 µl tampon G-A ve 0,9 µl RNase A eklendi tampon G-A ile ezilen dokunun karışabilmesi için dokuyu 30 s yavaşça ezmeye devam edildi.
3. Oluşan homojenatın 650 µl'sini alındı ve 2 ml mikrofüj tüpüne eklendi (prosedür gereği homojenatın hacmi 650 µl'den azsa, eksik hacmi tampon G-A ile 650 µl'ye tamamlandı). 5 dk 65°C'lik su banyosunda inkübe edildi.
4. 400 µl tampon G-B ve 1 ml tampon DV (önceden soğutulmuş) eklendi. Kuvvetli şekilde karıştırıldı ve 12000 g'de 2 dk santrifüj edildi.
5. Üst fazdan olabildiğince fazla alındı ve tüpten uzaklaştırıldı. Orta fazdaki çökeltiliyi ve alt fazı tüpte tutuldu. 1 ml tampon DV (önceden soğutulmuş) eklendi, iyice karıştırıldı ve 12000 g'de 2 dk santrifüj edildi.
6. Üst fazı atıldı. Alt fazı, 2 ml mikrofüj tüpe yerleştirilmiş olan spin-filter'a geçirildi ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
7. Spin-filter atıldı. Tüpün içersine 400 µl tampon BV eklendi ve ters-düz edilerek iyice karıştırıldı.
8. 2 ml mikrofüj tüpün içersine miniprep kolonu yerleştirildi. 7. basamaktaki sıvı karışımı miniprep kolonuna aktarıldı. 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
9. 2 ml mikrofüj tüpteki filtrat döküldü ve tüpün içersine miniprep kolonu tekrar yerleştirildi. Kolonun içersine 500 µl Tampon W1 eklendi ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
10. Filtrat atıldı ve 2 ml mikrofüj tüpün içersine miniprep kolonu tekrar yerleştirildi. 700 µl tampon W2 eklendi ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
11. Filtrat atıldı ve 2 ml mikrofüj tüpün içersine miniprep kolonu tekrar yerleştirildi. İkinci defa 700 µl tampon W2 eklendi ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

12. Filtrat atıldı ve 2 ml mikrofüj tüpün içersine miniprep kolonu tekrar yerleştirildi. 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
13. Miniprep kolonu temiz 1,5 ml mikrofüj tüp içersine yerleştirildi. Genomik DNA'yı kolondan süzmek için, kolon membranının tam ortasına (65°C'de ılık hale getirilmiş) 100-200 µl eluent (ya da saf su) eklendi. Oda ısısında 1 dk bekletildi. 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

4.2 Primer tasarımı

MMP-3 geni promotör bölgesi -1171. pozisyonunda 5A/6A SNP analizi için forward primerin 3' ucunun 2. pozisyonundaki A yerine G yerleştirerek bir bazı hedef diziye mismatch olacak şekilde tasarlanırken reverse primer diziye spesifik olarak seçildi. Primerlerin şekil 4.1'deki hedef dizi amplifikasyonu NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)'da test edildi. Forward primerdeki mismatch TthIII1 enzimi için, enzim tanıma bölgesi 5A/6A polimorfizmi için seçildi.

5' **GGTTCTCCATTCCTTTGATGGGGGAAAA/GACC** ↓ **ATGTCTTGTCCCTGATTGAAA**
TACAGGGAAAATATTTGGCCACATTGATATGAGGACAAGGAGAACAGAGTGTTGG
CAGTGTATGTGAATTCCAGGAAG 3'

Şekil:4.1. PZR ile çoğaltılacak hedef bölgenin belirlenmesi (Kırmızı ile vurgulanmış bölgeler primer bağlanma bölgelerini, mavi ile vurgulanmış olan bölge primerin değiştirilen bazını ve sarı ile vurgulanmış olan bölge restriksiyon enzimi tanıma bölgesidir)

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışmada MMP-3 promoter 5A/6A bölgesinin çoğaltılması için tablo 3.2'de gösterildiği gibi PZR koşulları uygulanmıştır. PZR sonrası hedeflenip çoğaltılmış olan bölgesini kontrol etmek için 5 µl PZR ürünü 1 µl DNA yükleme boyası ile karıştırılıp %2'lik agaroz jele 100 bç'lik DNA markörü ile birlikte yüklenip 120V-300 mA'de 25 dakika yürütüldü.

Tablo 4.1. TthIII1 polimorfik bölgenin çoğaltılması için belirlenmiş PZR döngüsü ve sıcaklık zaman değerleri

MMP-3 5A/6A (129 bç)		
İlk denatürasyon	94 °C, 5 dk	Döngü sayısı : 35
Denatürasyon	94 °C, 30 sn	
Bağlanma	65 °C, 30 sn	
Uzama	72 °C, 30 sn	
Son uzama	72 °C, 5 dk	

4.3.1.PZR Optimizasyon Çalışmaları

Bu çalışmada farklı MgCl₂ konsantrasyon ve primer bağlanma dereceleri kullanılarak optimum deney düzeneği oluşturulmuştur. Tablo 4.1 PZR döngüsünü ve koşullarını göstermektedir.

Tablo 4.2. TthIII1 polimorfik bölgenin çoğaltılması için optimize edilmiş PZR koşulları ve miktarları

Primerlerin bağlanma sıcaklığı	: 65°
MgCl ₂	: 2 mM
Taq polimeraz	: 1U
Forward ve Revers primerler	: 0,1 µM
dNTP karışımı	: 0,2 mM
10X Tampon	:25 mM

4.4. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

PZR ile çoğaltılan hedef bölgeler tablo 4.3'deki TthIII1 restriksiyon endonükleaz enzimi koşulları tablo 4.4'de ki miktar oranları kullanılarak ile 65⁰C'de 4 saat inkübe edildi. Hedeflenen bölge tablo 4.5'deki gibi fragmentler oluşması beklenecektir.

TthIII1 enzim kesim bölgesi 5'..... GACN N NGTC.....3'
3'..... CTGN N NCAG.....5'

Tablo 4.3. TthIII1 için reaksiyon miktar ve koşulları

Restriksiyon Enzimi	Miktar (U)	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)
TthIII1(PsyI)	10	65	4

Tablo 4.4. MMP-3 RFLP reaksiyon miktarları ve koşulları

8 µl PCR ürünü
1 µl reaksiyon tamponu (Tampon B)
1 µl Tth111I (PsyI) restriksiyon enzimi
65° 'de 4 saat inkübasyon süresi

Tablo 4.5. PZR-RFLP sonucu MMP-3 için beklenen DNA parça uzunlukları

PCR Ürünü Uzunluğu : 129 bç	
Kesim Noktası: 32 bç	Uzun Fragment : 97 bç

4.5. Jel Elektroforezi

Çalışmamızda DNA izolatlarını görüntülemek için %0,7'lik, PZR ürünlerini görüntülemek için %2'lik ve enzim kesimini görüntülemek için %4'lük agaroz jel kullanılmıştır.

4.6. Dizi Analizi

PZR-RFLP yöntemi ile saptanan genotipler arasından DNA dizi analizi ile konfirme edilmek üzere rastgele olarak 6A/6A homozigot ve 5A/6A heterozigot örnekler seçildi. Dizi analizi yapılacak DNA örnekleri sekans için optimize edilmiş primerlerle (Tablo 4.6) amplifikasyonu yapıldı. Amplifiye edilen PZR örneklerinin kalitesi agaroz jel elektroforezi ile saptandıktan sonra pürifikasyon ve çift yönlü primer dizi analizi işleminin gerçekleştirilmesi için Macrogen firmasına gönderildi.

Tablo 4.6. MMP-3 dizi analizi için dizayn edilmiş primerler

PRİMER	PRİMER DİZİSİ
Forward	5'-TCCTCATATCAATGTGGCCAAA-3'
Revers	5'-CGGCACCTGGCCTAAAGAC-3'

4.7. MMP3 Promotör 5A/6A Polimorfik Bölgesinin Moleküler Analizi

Çalışmamızda, MMP-3 geni promotör aktivitesini değiştirdiği bilinen -1171 5A/6A polimorfizmi ve bu polimorfizmin mide tümör dokusu PZR-RFLP metodu ile araştırılıp, *H.pilori* enfeksiyonu, ekspresyon, invazyon derinliği, tümör evresi ve tümör nekrozu açısından ikili karşılaştırmalarla değerlendirilmiştir. Polimorfik gen bölgesi uygun primerler ve enzimler kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltılmış ve bunu takiben polimorfik DNA dizileri, restriksiyon enzim kesimi ve agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. PZR ürünleri ve kesim sonrası oluşan fragmentlerin boyları Tablo 4.7'de gösterilmiştir. Saptanan polimorfizmlerin verileri istatistiksel olarak incelenmiştir.

Tablo 4.7. MMP-3 promotör polimorfizm bölgesi, kesimi ve beklenen parça uzunlukları

Polimorfik Bölge	SNP numarası	Enzim Kesimi	Beklenen Allel Boyu
-1171 5A/6A	rs3025058	TthIII1(PsyI)	97 -32- 129 bç
-1171 5A/5A	rs3025058	TthIII1(PsyI)	97-32 bç
-1171 6A/6A	rs3025058	TthIII1(PsyI)	129 bç

4.8. İstatistiksel Veri Analizi

Çalışmanın istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 17.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı değerler yaş ortalaması (\pm) standart sapma olarak, kategorik değişkenler gözlem sayısı ve yüzde olarak gösterildi. İki genotip grubunun karşılaştırılmasında (ekspresyon, *H. pilori* enfeksiyon, tümör evresi, invazyon derinliği ve tümör nekrozu) Pearson ki-kare ve Fisher kesin olasılık testleri kullanıldı. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Örneklerin Tanımı

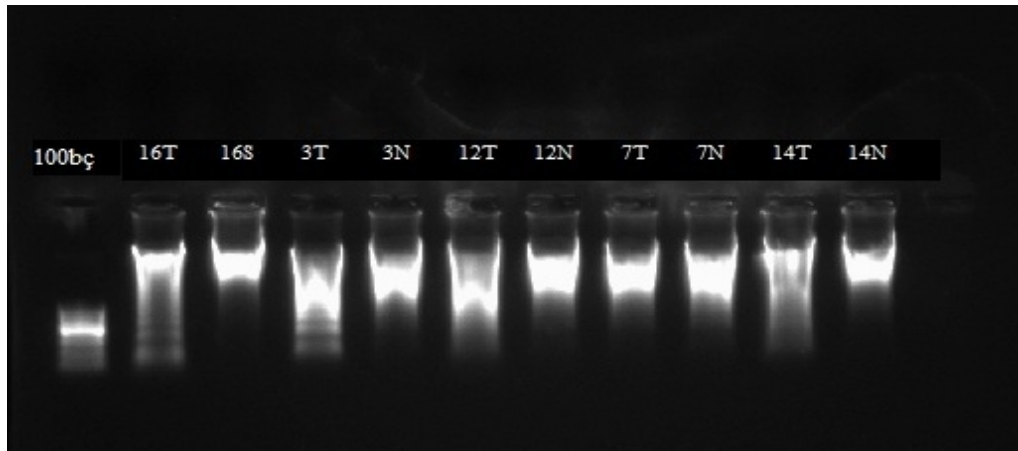
Araştırmamızda gastrik kanser vakası olan 41 hasta tümör dokusu ve bu hastaların mide çevre dokuları ile toplam 41 çift örnek kullanılmıştır. Tümör dokularında görülen *H.pilori* enfeksiyonu, RNA düzeyinde ekspresyon, invazyon derinliği, tümör evresi ve tümör nekrozu bulguları baz alınarak ikili karşılaştırmalarda bulunulmuştur. Aynı zamanda hasta bireylerin yukarıda belirtilmiş olan parametrelere göre yüzdeler oranları hesaplanmıştır (Tablo 5.1). Hastaların yaş ortalaması \pm standart sapma olarak tablo 5.1’de verilmiştir. Aynı zamanda hastaların genotip frekansları da tablo 5.2’de gösterilmiştir.

Tablo 5.1. Gastrik kanser hastalarının belirli karakteristik özelliklerine göre yüzde oranları

	n(Hasta Sayısı)	Ortalama	Standart sapma	
Yaş	41	59 (34-86)	± 13.26	
Gastrik kanser	n	%	Bilgisi olan hasta sayısı	Bilgisi olmayan hasta sayısı
Toplam hasta	41			
Cinsiyet				
Kadın	13	32		
Erkek	28	68		
H. pilori	13	38	34	7
Tümör Evresi			28	13
1	5	18		
2	9	32		
3	14	50		
İnvazyon derinliği			41	0
L.propria/M.mukoza/ Submukoza	6	15		
M.propria	9	22		
Subseroza	1	2		
Seroza	25	61		
Tümör nekrozu	20	49	41	0
Ekspresyon	41		41	0
yok	12	29		
düşük	14	34		
yüksek	15	37		

5.2. DNA izolasyonu ve Tespiti

Hasta doku örneklerden bölüm 4.1’de anlatılan yöntemle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA izolatlarından 3µl alınarak % 0,7 lik agaroz jelde incelenmiş ve DNA’nın elde edildiği doğrulanmıştır (Şekil 5.1).

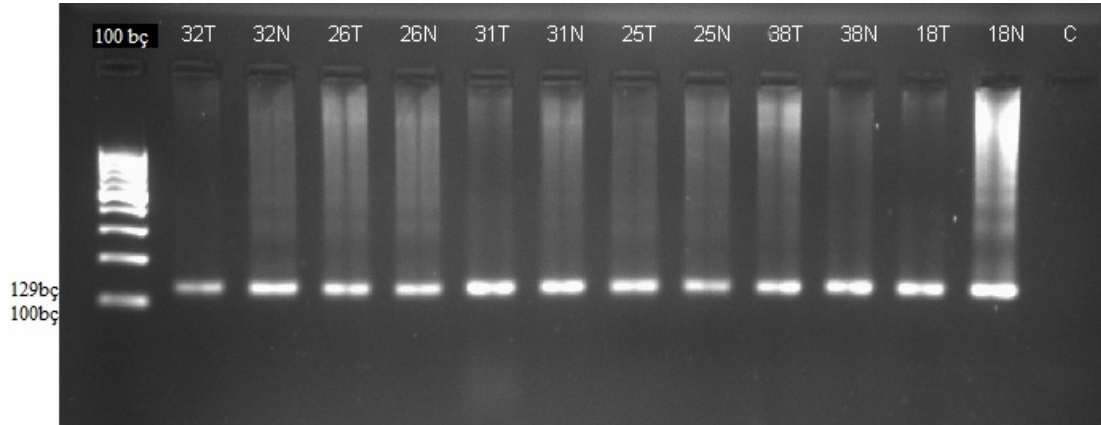


Şekil 5.1. Gastrik kanserli hastalardan elde edilen örnek normal (N) ve tümörlü (T) dokuların genomik DNA izolatlarının % 0,7 lik agaroz jelde görünümü (100bç: Moleküler ağırlık markörü)

5.3. MMP-3 Geni Promotör Bölgesi -1171. 5A/6A ve 6A/6A Polimorfizm Analizi

5.3.1. İlgili Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması

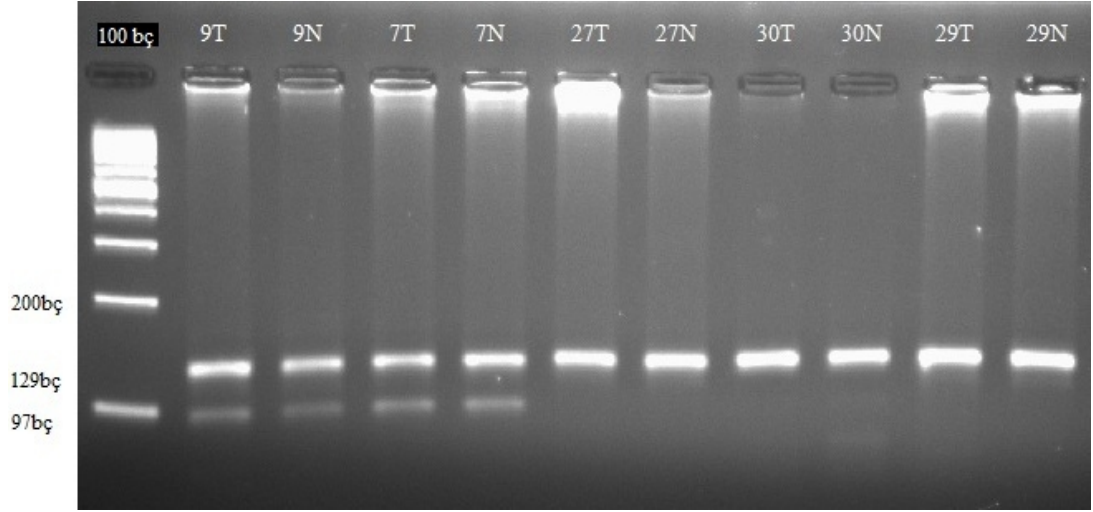
MMP-3 geni promotör bölgesi -1171. pozisyonunda 5A/6A tek nokta polimorfizm taraması PZR-RFLP yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Total genomik DNA daki MMP-3 geni promotör bölgesinde polimorfizm taraması için forward primerin 3' ucundan 2. Adenin Guanine modifiye edilmesiyle 5A taşıyan örneklerde TthIII1 enzim kesim bölgesi oluşturulmuştur Bu kesim bölgesi 6A allele sahip bireylerde bulunmaz. Revers primer ise 5A/6A promotör dizisine spesifiktir. Çalışmamız için DNA amplifikasyonu aşamasında beklediğimiz ilgili gen bölgesinin 129 bç'lik DNA fragmenti 100 bç'lik marker ile %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 5.2).



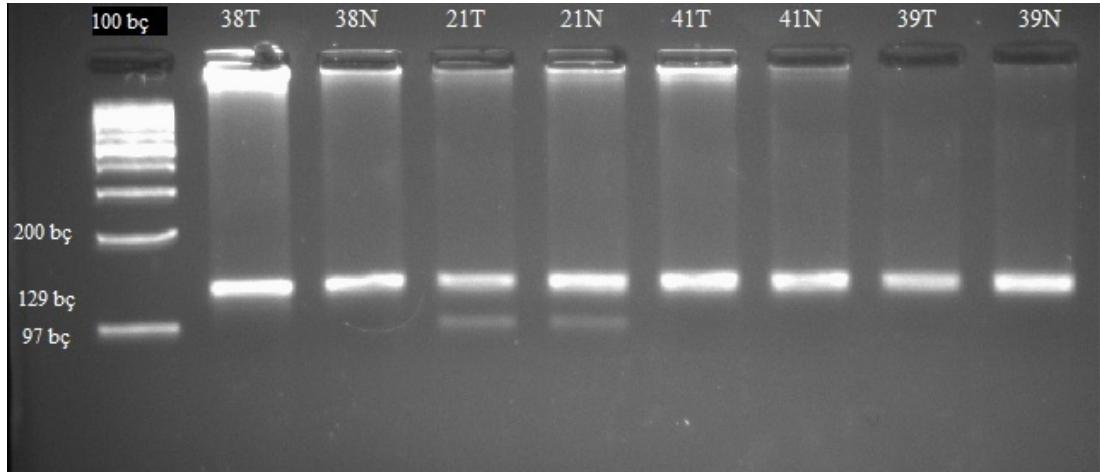
Şekil 5.2. MMP-3 1171 5A/6A polimorfik promotör bölgesinin PZR ile amplifikasyon sonuçlarının %2'lik agaroz jelde görünümü (T: Tümör doku, N: Normal doku)

5.3.2. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

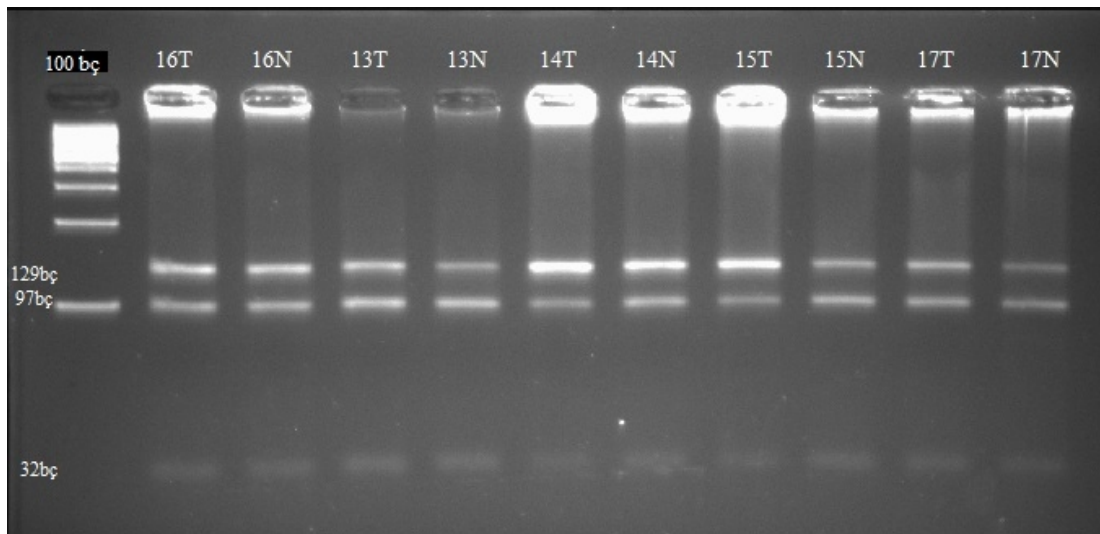
Çalışmamızın enzim kesimi aşamasında amplifikasyon sonucu elde ettiğimiz 129 bç'lik PZR'nın TthIII1 restriksiyon enzimi ile 65°'de 4 saat inkübasyonda tutulduktan sonra %4'lük agaroz jelde analiz edildi. Aynı hastaya ait normal ve tümörlü dokuda aynı genotip saptandı (Şekil 5.3, 5.4, 5.5). Hastalarda MMP-3 -1171 pozisyonunda homozigot 5A/5A genotipine rastlanmazken, 5A/6A heterozigot ve 6A/6A homozigot genotipler gözlemlendi (Şekil 5.3, 5.4, 5.5).



Şekil 5.3. Polimorfik promotör bölgesi amplifikasyonu yapılan örneklerin RFLP sonuçlarının %4'lük agaroz jelde görünümü (9T-N ile 7T-N 5A/6A heterozigot diğerleri ise 6A/6A homozigottur.)



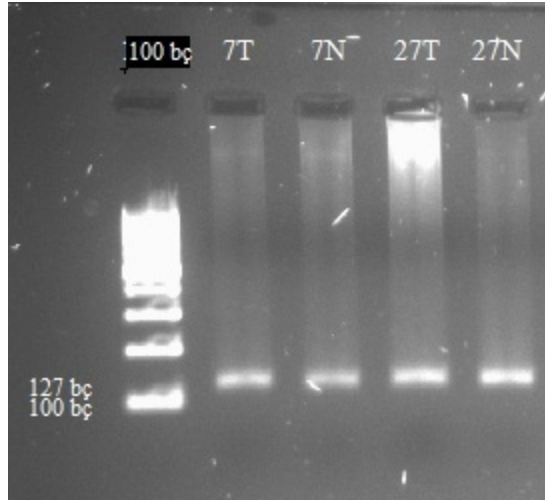
Şekil 5.4. Polimorfik promotör bölgesi amplifikasyonu yapılan örneklerin RFLP sonuçlarının %4'lük agaroz jelde görünümü (21T-N 5A/6A heterozigot, diğerleri ise 6A/6A homozigottur)



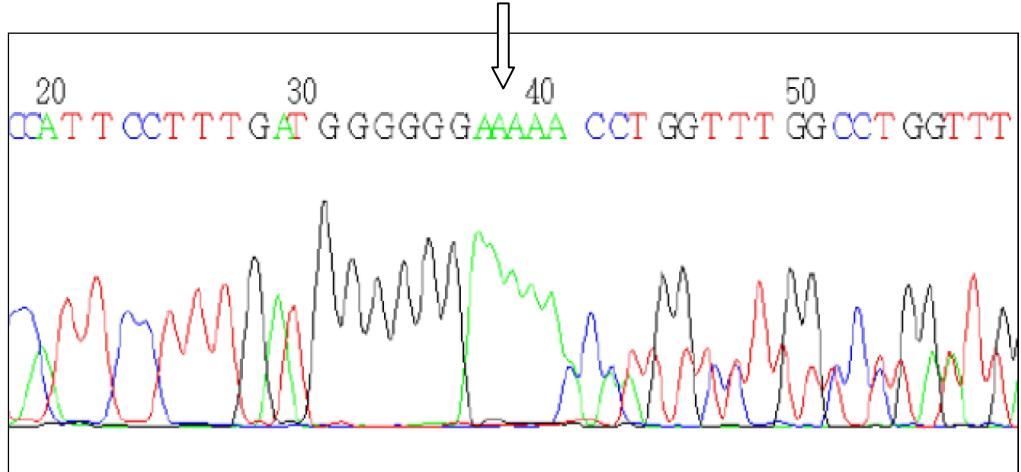
Şekil 5.5. Polimorfik promotör bölgesi amplifikasyonu yapılan örneklerin RFLP sonuçlarının %4'lük agaroz jelde görünümü (Tüm örnekler 5A/6A heterozigottur)

5.3.3.Dizi Analizi

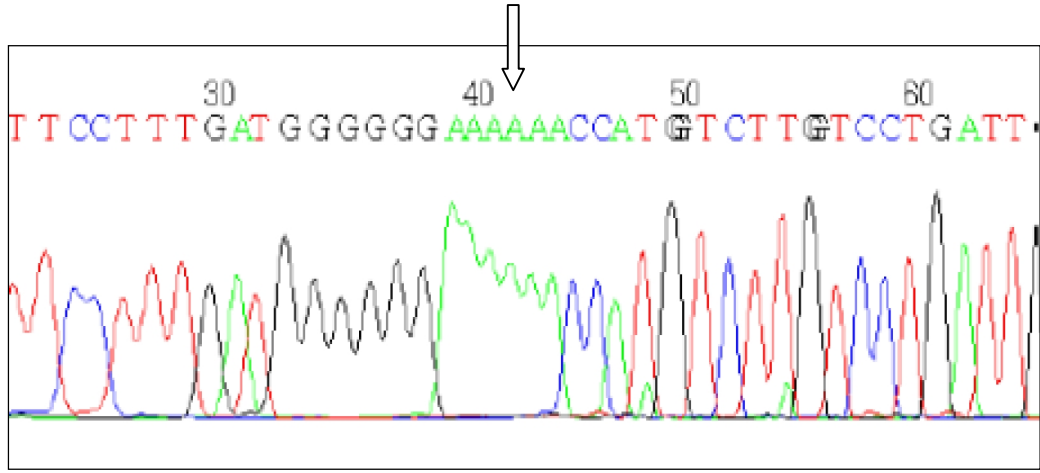
DNA pürifikasyonu ve dizi analizi için rastgele seçilip gönderilen örneklerin PZR görüntüleri şekil 5.6'da , dizi analizi sonuçları gösterimi de şekil 5.7 ve 5.8'de ki kromotogram sonuçlarında gösterilmiştir. Beklenildiği gibi MMP-3 promotör bölgesi -1171. pozisyonda 5A/6A polimorfizmi gösteren dizide 5 tane adenin, 6A/6A polimorfizmi gösteren dizide se 6 tane adenin görülmüştür.



Şekil 5.6. Dizi analizine gönderilecek PZR örneklerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü



Şekil 5.7. MMP-3 -1171 promotör bölgesi 5A/6A heterozigot kromotogram görünümü



Şekil 5.8. MMP-3 -1171 promotör bölgesi 6A/6A homozigot kromotogram görünümü

5.4. Verilerin İstatistiksel Analizi

PZR-RFLP sonucu elde edilen hasta tümör dokusuna ait genotip ve allelotip frekans ve yüzdeleri tablo 5.2’de gösterilmiştir. Genotip dağılımının Hardy Wienberg dengesine uyumluluğu analiz edildiğinde X^2 değeri 5,5 olarak hesaplanıp, genotip dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p=0.0189$).

Tablo 5.2. Tümör dokularına ait MMP-3 -1171. promotör bölgesi genotip ve allelotip sayısı ve Yüzdeleri

Genotip	Genotip sayısı	Genotip yüzdesi	Allelotip	Allelotip sayısı	Allelotip yüzdesi
5A/6A	22	%53,7	5A	22	%27
6A/6A	19	%46,3	6A	60	%73
Total	41	%100	Total	82	%100

5A/6A ve 6A/6A genotip grubunun *H.pilori* enfeksiyonu, RNA ekspresyonu, invazyon derinliği, tümör evresi ve tümör nekrozu açısından karşılaştırılmasında Pearson ki-kare ve Fisher kesin olasılık testleri kullanıldı. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tablo 5.3’de belirttiği gibi MMP-3 promotör bölgesi 5A/6A ve 6A/6A genotipleri, ekspresyon açısından tümör dokuları birbirleri ile karşılaştırıldıkları zaman iki genotip arasında anlamlı bir fark bulundu ($X^2=6,69$, $p= 0,035$). 5A/6A genotipi %80 yüksek ekspresyon gösterirken, 6A/6A genotipi ise %20 oranında yüksek ekspresyon gösterdi. Aynı zamanda genotip gruplarıyla invazyon derinliği arasında sınıra yakın bir anlamlılık saptandı ($p=0,064$). MMP-3 promotör bölgesi 5A/6A ve 6A/6A genotipleri; *H.pilori* enfeksiyonu, tümör evresi ve tümör nekrozu sonuçları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Bu sonuçlara göre hastaların 13'ü (%32) kadın, 28'i (%68) erkektir. Bu bireylerin bilgileri olanlar arasından 13'ü (%38) *H.pilori* enfekte iken, 20'sinde (%49) tümör nekrozu mevcuttur. Tümör evresi tiplenesinde 5'i (%18) tip1, 9'u (%32) tip2 ve 14'ü (%50) tip3 eğilimindedir. Hastaların 6'sı (%15) 1.derece, 9'u (%22) 2. derece, 1'i (%2) 3.derece ve 25'i (%61) ise 4. derece invazyon derinliği göstermiştir. Hastaların 12 (%29)'si RNA düzeyinde ifade edilmezken, 14 (%34)'ü 1.derece, 15 (%37)'i ise 2. derecede ifade edilmiştir (Tablo 5.3).

Tablo 5.3. 5A/6A ve 6A/6A genotiplerinin kategorik değişkenler açısından Pearson kıkare ve Fischer kesin olasılık testleri ile karşılaştırılması

	5A/6A	6A/6A	P
	n %	n %	
H.Pilori			0,724^a
Yok	11 (%64,7)	10 (%58,8)	
Var	6 (%35,3)	7 (%41,2)	
Ekspresyon			0,035^a
Yok	5 (%22,7)	7 (%36,8)	
Düşük	5 (%22,7)	9 (%47,4)	
Yüksek	12 (%54,5)	3 (%15,8)	
İnvazyon Derinliği			0,064^b
L.propria/M.mukoza/ Submukoza	3 (%13,6)	3 (%15,8)	
M.propria	8 (%36,4)	1 (%5,3)	
Subseroza	0 (%0)	1 (%5,3)	
Seroza	11 (%50)	14 (%73,7)	
Tümör Evresi			0,59^b
1	3 (%21,4)	2 (%14,3)	
2	3 (%21,4)	6 (%42,9)	
3	8 (%57,1)	6 (%42,9)	
Tümör Nekroz			0,278^a
Yok	13 (%59,1)	8 (%42,1)	
Var	9 (%40,9)	11 (%57,9)	

^a:Pearson kıkare testi sonuçları

^b: Fischer kesin olasılık testi sonuçları

Tablo 5.4. Hastaların genotiplerine göre yaş dağılım ortalamaları

Gen Grubu	N (Hasta Sayısı)	Yaş Ortalaması	Standart Sapma
5A/6A	22	57,27	± 13,04
6A/6A	19	61,05	± 13,57

6.TARTIŞMA

Geçmişten günümüze uzanan evrimsel süreçte türler içi ve türlerarası farklılıktan genetik çeşitlilik sorumludur. Genlerde nükleotit düzeyindeki değişiklikler bir popülasyonda %1'den daha yüksek sıklıkla görülüyor ise polimorfizm olarak adlandırılır. İnsan genom projesi ile insan genomundaki DNA'nın %99,9 benzerlik gösterdiği kanıtlanmıştır. Diğer %0,1'lik fark ise, bireysel genotip ve fenotipik değişikliklerin sorumlusudur (Lander ve ark., 2001). Bir gende kodlayıcı bölgede oluşan herhangi bir değişiklik fenotipi etkiler. Genin ifadesi ise genellikle genin promotör ya da arttırıcı bölge gibi düzenleyici bölgeleri ve bu bölgelere bağlanan transkripsiyon faktörleri ile kontrol edilir (Sefton, 2001). SNP (tek nükleotit polimorfizmleri)'ler insan genomunda en sık bulunan (yaklaşık her 1000 nükleotide bir) DNA değişimleri olup evrimsel süreçte türler için hem bir avantaj kaynağı olarak hem de çeşitli mutasyonlara ve buna bağlı olarak kanser gibi çeşitli genetik hastalıklara sebebiyet verebilirler (Risch, 2000; Carlson ve ark., 2003).

MMP-3, MMP ailesinin geniş düzeyde substrat özelliği gösteren anahtar üyelerinden birisidir. MMP-3; tip 2, tip 4 ve tip 9 kollajenlerini, proteoglikanları, lamininleri, fibronektinleri, jelatinleri ve elastinleri degrade edebilir. Ayrıca kollajenaz, matrisilin ve jelatinaz B gibi diğer MMP üyelerini de aktive edebilir (Matrisian, 1990; Birkedal-Hansen ve ark., 1993).

MMP-3 geninin promotör bölgesindeki polimorfizm ilk olarak 1995 yılında rapor edilmiştir. Bu polimorfizm -1612 pozisyonundaki polimonomerik adenozinlerin boyutundaki varyasyon nedeniyle oluşmuştur. Sonuç olarak bir allelde 5A ve diğer allelde 6A meydana gelmiştir (Ye ve ark., 1995).

MMP-3 promotör bölgesindeki -1171 pozisyonundaki tek bir A delesyon/insersiyon polimorfizmi MMP-3'ün transkripsiyonel düzeyini ve bölgesel ekspresyonunu arttırmaktadır. Örneğin; 5A allelinin 6A'dan iki kat daha yüksek promotör aktivitesine sahip olduğu *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Ye ve ark., 1995, 1996). *In vitro* promotör fonksiyon analizleri ile fibroblastlar ve vasküler düz

kas hücrelerinde 5A allelinin 6A allele göre daha fazla promotör aktiviteye neden olduğu gösterilmiştir (Ye ve ark., 1996; Beyzade ve ark., 2003). NF- κ B, IL-1 ve PGDF- β gibi faktörlerin MMP-3 transkripsiyonunu regüle ettikleri bildirilmiştir (Maria ve ark., 1991).

MMP-3 geni promotör bölgesi 1171. pozisyonundaki 5A/6A polimorfizminin, meme, böbrek, karaciğer, ağız ve akciğer kanserlerinin yanında damar tıkanıklığı, kalp hastalıkları, romatizma, miyopi, migren ve bunama gibi hastalıklara genetik yatkınlık oluşturduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Kanamori ve ark.,1999; Ghilardi ve ark., 2002; Hirata ve ark., 2003; Fang ve ark., 2005). Bu lokasyondaki 5A/6A insersiyon/delesyon polimorfizmi ile ilgili iki yayından sadece Dey ve arkadaşlarının Hindistan popülasyonu üzerindeki çalışması ile bu polimorfizmin gastrik kansere yakalanma riski oluşturduğu ileri sürülmüştür (Dey ve ark., 2011).

Bu çalışmada, gastrik kanser hastalarının doku örneklerinde normal ve tümör dokularının aynı genotiplere sahip olduğu görüldü. Tümör dokularında gözlemlenen genotipler 5A/6A ve 6A/6A olup 5A/5A genotipine rastlanmadı. Çalışmamızda örnek sayısı artırılarak 5A/5A genotiplerine de rastlanabilir. Literatürde de 5A/5A genotipi bir çok çalışmada çok nadir görülmüştür (Krippel ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2004; Dey ve ark., 2011).

Bununla beraber, 5A/6A ve 6A/6A genotipleri ekspresyon açısından karşılaştırıldıklarında iki genotip grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ($X^2=6,69$, $p=0,035$). Çalışılan tümör dokularında yapılan genotiplendirme sonucunda tespit edilen 5A/6A genotipi ve 6A/6A genotipiyle, MMP-3'ün önceden gerçekleştirilmiş RNA düzeyinde ekspresyonu açısından karşılaştırılmıştır. Tüm tümör dokularının MMP-3 ekspresyonu birbirleri ile kıyaslandığında, 5A/6A'ya sahip dokuların %80'inin yüksek MMP-3 ekspresyonu gösterdiği, 6A/6A genotipinin ise sadece %20 oranında yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu gözlenmiştir.

Bu polimorfizmin ekspresyon ile ilişkisi henüz yayımlanan in silico promotör bağlanma çalışmaları (Matinspector yazılımı, TFSEARCH ve TESS) ile de desteklenir. Bu makalede biyoinformatik programlarla MMP-3 promotör bağlanma bölgeleri tahmin edilmiş ve 5A/6A polimorfizmin NF-KB, Tcf-4 ve CIZ transkripsiyon faktörü bağlanmasında etkili olduğu ifade edilmiştir (Dey ve ark.,

2011). Aynı zamanda genotip gruplarıyla invazyon derinliği arasında sınıra yakın bir anlamlılık saptanmıştır ($p=0,064$). Bu sınıra yakın anlamlılık örnek sayısının artırılması ile istatistiksel olarak anlamlı hale gelebilir. Genotipler tümör nekrozu, *H.pilori* ve tümör evresi sonuçlarının p değeri 0,05 den daha büyük olduğu için tümör dokuları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak Polonya'da yapılan bir çalışmada MMP-3 5A/6A polimorfizminin ovaryum kanserinin tümör evrelerinde rol oynadığı anlaşılmıştır (Szylo ve ark., 2002).

Bu çalışmada elde edilen veriler, MMP-3 5A/6A polimorfizminin, MMP-3 ekspresyonunun transkripsiyonel olarak düzenlenmesinde ve invazyon ile ilişkilendirilmesinde önemli bir yer tuttuğunu düşündürmektedir. Tüm bu bulgularla 5A/6A genotipinin gastrik kanser riskine katkıda bulunduğunu tahmin etmekteyiz. Ancak doğrulamak için sağlıklı bireylerden elde edilen DNA rneklerinin kontrol grubu olarak kullanılarak, vaka-kontrol çalışması ile bu hipotezin test edilmesi gerekir

7. KAYNAKLAR

Abe, J., Berk, B.C. (1999). Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.* 274 21003–21010.

Akhter, Y., Ahmed, I., Devi, S.M., Ahmed, N. (2007). The co-evolved *H.pilori* and gastric cancer: Trinity of bacterial virulence, host susceptibility and lifestyle, *Infect Agent Cancer* 2:2-6.

American Cancer Society (2008). Cancer Facts & Figures (Kanser Hakkında Bilgiler ve İstatistikler). *Atlanta: American Cancer Society*.

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

Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 272 217–221.

Beswick, E.J., Suarez, G., Reyes, V.E. (2006). *H. pilori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol* ;12:5599-605.

Beyzade, S., Zhang, S., Wong, Y., Day, I.N.M., Eriksson, P., Ye, S. (2003). Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*;41:2130–7.

Birkedal-Hansen H., Moore W, Bodden M.K, Windsor L.J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler J.A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.*;4:197-250.

Biondi, M.L., Turri, O., Leviti, S., Seminati, R., Cecchini, F., Bernini, M., Ghilardi, G. and Guagnellini, E. (2000). MMP1 and MMP3 *polymorphisms in promoter regions and cancer. Clin. Chem.*, 46, 2023—2024.

Brinckerhoff, C.E., Rutter, J.L., Benbow, U. (2000). Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res*, 6(12):4823-4830.

Carlos, L., Carneiro, J. (2006). Temel Histoloji, *Çeviri Editörleri Yener Aytekin ve Seyhun Solakoğlu*, 299–308.

Carlson, C.S., Eberle, M.A., Rieder, M.J., Smith, J.D., Kruglyak, L., Nickerson, D.A. (2003). Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nature Genetics*, 33: 518-521.

Catarzi, S., Degl’Innocenti, D., Iantomasi, T., Favilli, F., Vincenzini, M.T. (2002). The role of H₂O₂ in the platelet-derived growth factor-induced transcription of the

gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 1388–1394.

Chapple, I.L.C. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases, *J. Clin. Periodontol.* 24 287–296.

Chaudhary, A.K., Singh, M., Bharti, A.C., Asotra, K., Sundaram, S., Mehrotra, R. (2010). Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck, *Journal of Biomedical Science*, 17:1.

Christian, T.K., Stadtlander, H., Waterbor., J.W. (1999). Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis*, 20(12);2195–2207.

Clements, W.M., Wang, J., Sarnaik, A., Kim, O.J., MacDonald, J. (2002). beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res* 62: 3503–3506.

Davis, G.R. (1993). Neoplasm of the stomach. *Gastrointestinal Disease*. *Gastrointestinal Disease*. 5th Ed., Philadelphia: *WB Saunders Company*, 763-782.

DeClerck, Y.A., Mercurio, A.M., Stack, M.S., Chapman, H.A., Zutter, M.M., Muschel, R.J. (2004). Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 164(4):1131-39.

Deguara, J., Burnand, K.G., Berg, J. (2007). An increased frequency of the 5A allele in the promoter region of the MMP3 gene is associated with abdominal aortic aneurysms. *Hum Mol Genet.* 16: 3002-3007,

Dey, S., Stalin, S., Gupta, A., Saha, D., Kesh, K., and Swarnakar, S. (2011). Matrix Metalloproteinase Gene Promoter Polymorphisms and Their Haplotypes Are Associated with Gastric Cancer Risk in Eastern Indian Population Department of Physiology, *Drug Development Diagnostic and Biotechnology Division, Indian Institute of Chemical Biology*.

Diplock, A. (1998). Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p., Belgium.

Dollery, C.M., McEwan, J.R., Henney, A.M. (1995). Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 77: 863-9.

Esposito, F., Chirico, G., Gesualdi, N.M., Posadas, I., Ammendola, R., Russo, T., Cirino, G., Cimino, F. (2003). Protein kinase B activation by reactive oxygen species is independent of tyrosine kinase receptor phosphorylation and requires Src activity, *J. Biol. Chem.* 278 20828–20834.

Estreicher, A., Wohlwend, A., Belin, D., Schleuning, W.D., Vassalli, J.D. (1989). Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 264:1180-1189

- Fang, S., Jin, X., Wang, R., Li, Y., Guo, W., Wang, N., Wang, Y., Wen, D., Wei L., and Zhang, J. (2005). Polymorphisms in the MMP1 and MMP3 promoter and non-small cell lung carcinoma in *North China Carcinogenesis* vol.26 no.2 pp.481—486.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. (2004). GLOBOCAN 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. *IARC Cancer Base International Agency for Research on Cancer*
- Ferlay, J., Autier, P., Bonio, M. (2007). Avrupada Kanser Vakaları ve Ölümler, 2006. *Ann Oncol* 16:481-488.
- Fleisher, A., Esteller, M., Wang, S., Tamura, G., Suzuki, H., Yin, J., Zou, T., Abraham, J., Kong, D., Smolinski, K. (1999). Hypermethylation of the hmlh1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 59: 1090–1095
- 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.
- Freije, J.M., Balbin, M., Pendas, A.M., Sanchez, L.M., Puente, X.S., Lopez-Otin, C. (2003). Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Med Biol* 532:91-107.
- Fried, P., Wolf, K. (2009) Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Reviews* 28 129–135.
- Gao, Y., Xiao, Q., Ma, H., Li, L., Liu, J., Feng, Y., Fang, Z., Wu, J., Han, X., Zhang, J. (2010). LKB1 inhibits lung cancer progression through lysyl oxidase and extracellular matrix remodeling. *PNAS* 107 18892–18897
- Galanis, D.J., Lee, J., Kolonel, L.N. (1997). The influence of cigarette smoking, alcohol, and green tea consumption on the risk of carcinoma of the cardia and distal stomach in Shanghai, China. *Cancer*; 79: 1840-1841.
- Gencer, S. (2009). Mide kanserinde matris metalloproteinaz (MMP) genlerinin ifadesi üzerine oksidatif stres ve RNA müdahalesinin etkisi yayınlanmış doktora tezi. Malatya İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gencer, S., Yazicioglu, M.B., Cebeci, A., Irmak, M.B. (2011). Silencing of the MMP-3 Gene by siRNA Transfection in Gastric Cancer AGS Cells *Turkey J Gastrointestin Liver Dis* March Vol. 20 No 1, 19-26.
- Ghilardi, G., Biondi, M.L., Caputo, M., Leviti, S., DeMonti, M., Guagnellini, E. and Scorza, R. (2002a). A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility. *Clin. Cancer Res.*, 8, 3820—3823.

- Ghilardi, G., Biondi, M.A., DeMonti, M., Turri, O., Guagnellini, E.S.R. (2002b). Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with carotid artery stenosis. *Stroke* 33: 2408-2412.
- Gnasso, A., Motti, C., Irace, C., Carallo, C., Liberatoscioli, L., Bernardini, S., Massoud, R., Mattioli, P.L., Federici, G., Cortese, C. (2000). Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 1600–1605.
- Hanahan, D. and Robert, A., Weinberg (2000). The Hallmarks of Cancer Cell, Vol. 100, 57–70, January 7, Copyright 2000 by Cell Press
- Hatakeyama, M., Brzozowski, T. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 11 (Suppl. 1), 14-20.
- Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C., (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 30–40.
- Hegedüs L, Cho, H., Xie, X., Eliceiri, G.L., (2000). Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *J Cell Physiol.*,216(2):480-5.
- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., Floyd, R.A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. *Free Rad Biol Med*; 28: 1456-1462
- Hinoda, Y., Okayama, N., Takano, N., Fujimura, K., Suehiro, Y., Hamanaka, Y., Hazama, S., Kitamura, Y., Kamatani, N. and Oka, M. (2002). Association of functional polymorphisms of MMP-1 and MMP-3 genes with colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 102,526—529
- Hirata, H., Naito, K., Yoshihiro, S., Matsuyama, H., Suehiro, Y. And Hinoda, Y. (2003). A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with conventional renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 106, 372—374.
- Hirata, Y., Maeda, S., Ohmae, T., Shibata, W., Yanai, A., Ogura, K., Yoshida, H., Kawabe, T., Omata, M. (2006). *Helicobacter pylori* induces IκB kinase nuclear translocation and chemokine production in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 74:1452-1461.
- Holliday, D., L., Hughes, S., Shaw, J.A., Walker, R.A., Jones, J.L. (2007). Intrinsic genetic characteristics determine tumor-modifying capacity of fibroblasts: matrix metalloproteinase-3 5A/5A genotype enhances breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res* 9: 67.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C. (1991). P53 mutations in human cancers. *Science*; Jul 5;253(5015):49-53.

Hulmes, D.J. (2002). Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *Journal of Structural Biology* 137 2–10.

Humphries, S.E., Luong, L.A., Talmud, P., J., Frick, M.H., Kesaniemi, Y.A., Pasternack, A., Taskinen, M.R., Syvanne, M. (1998). The 5A/6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP-3) gene predicts progression of angiographically determined coronary artery disease in men in the LOCAT gemfibrozil study: Lopid Coronary Angiography Trial. *Atherosclerosis*, 139:49–56.

Israel, D.A., Salama, N., Arnold, C.N., Moss, S.F., Ando, T., Wirth, H.P. (2001). *H.pilori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest* 107:611-20.1997;388:539-47.

İçli, F., Akbulut, H., Onkolojiye Giriş. İn.iliçin G,Biberoğlu K, Süleymanlar G ve ark.;eds.İç Hastalıkları.Güneş Kitapevi;2005:2007-2014

Junquera, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. (1993). Basic Histology (7 th ed) Ed Aytekin,Y.,*Bariş Kitapevi,İstanbul*,ss 346-356

Jon R., Kelley, J., Duggan, M. (2003). Commentary, Gastric cancer epidemiology and risk factors, *Journal of Clinical Epidemiology*, 56:1–9

Kaaks, R., Tuyns, A.J., Haelterman, M., Riboli, E., (1998). Nutrient intake patterns and gastric cancer risk:A case-control study in Belgium. *Int J Cancer*. 78: 415–420.

Kahn, P., Frykberg, L., Brady, C., Stanley, I., Beug, H., Vennstrom, B., Graf, T. (1986). *v-erbA* cooperates with sarcoma oncogenes in leukemic cell transformation. *Cell* 45, 349–356.

Kakkad, S.M., Solaiyappan, M., O'Rourke, B., Stasinopoulos, I., Ackerstaff, E., Raman, V., Bhujwalla, Z.M. & Glunde, K. (2010). Hypoxic tumor microenvironments reduce collagen I fiber density. *Neoplasia* 12 608–617.

Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews. Cancer* 3 422–433.

Kalluri, R., Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews. Cancer* 6 392–401.

Kanamori, Y., Matsushima, M., Minaguchi, T., Kobayashi, K., Sagae, S., Kudo, R., Terakawa, N. and Nakamura, Y. (1999). Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer Res.*,59, 4225—4227.

Kazancıgil, A. (1982). Anderson Patoloji, Cilt: I, (Anderson, W.A.D., Kissane, J.M.; Pathology Seventh Ed. Çevirisi). Güven Yayıncılık San. Ve Tic. A.Ş., Ankara.

Kelley, J.R., Duggan, J.M. (2003). Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol*. 56:1-9.

- Kielty, C.M., Sherratt, M.J., & Shuttleworth, C.A. (2002). Elastic fibres. *Journal of Cell Science* 115 2817–2828
- Kim, E.S., Khuri, F.R., Herbst, R.S. (2001). Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225), *Curr. Opinion Oncol.* 13 506–513.
- Kim, Y., Seo, H., and Kim, H. (2010) Beta-karoten and Lutein Inhibit Hydrogen peroxide-induced activation of NF-KB and IL-8 expression in Gastric epithelial AGS cells *J Nutr Sci Vitaminol*, 57, 216-223,2011
- Kirchheimer, J.C., Remold, H.G. (1989). Functional characteristics of receptor bound urokinase on human monocytes: catalytic efficiency and susceptibility to inactivation by plasminogen activator inhibitors. *Blood.* 74:1396-1402
- Knight, J.A. (2000). Free radicals, antioxidants, and the immune system, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30 145–158.
- Kolligs, F.T., Bommer, G., Goke, B. (2002). Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion* 66: 131–144.
- Krippel, P., Langsenlehner, U., Renner, W., Yazdani, B., Biuki, B., Koöppel, H., Leithner, A., Wascher, T.C., Paulweber, B., Samonigg, H. (2004). The 5A/6A Polymorphism of the Matrix Metalloproteinase 3 Gene Promoter and *Breast Cancer* 13518 Vol. 10, 3518–3520, May 15,
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409: 860-921.
- Leung, S., Yuen, S., Chung, L., Chu, K., Chan, A., Ho, J. (1999). MLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 59: 159–164.
- Li, Q.L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X.Z., Lee, K.Y., Nomura, S., Lee, C.W., Han, S.B., Kim, H.M., Kim, W.J., Yamamoto, H., Yamashita, N., Yano, T., Ikeda, T., Itohara, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S.C., Ito, Y. (2002). Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*; 109: 113–124.
- Li, J.P., Vlodavsky I. (2009). Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. *Thromb Haemost.* Nov;102(5):823-8.
- Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L., Snyder, S.H. (1994). Nitric-oxide – a physiological messenger. *Ann Intern Med* 120: 227-237.
- Lu, Z.Q., Wang, Y.M., Cao, Y.Y., Zhang, Q.J., Zhang, X.H., Li, Y.H., Wang, H.S., Xie, H.L., Jiao, B.H., Zhang, J.H. (2007). Correlations of polymorphisms in matrix metalloproteinase-3 and -7 promoters to susceptibility to brain astrocytoma May;26(5):463-8.

- Maria, T., Diaz-Meco, S.B., Quiiionesn, S., (1991). Maria, M., Municio, S., Sanzzj, L. Protein Kinase C-independent Expression of Stromelysin by Platelet-derived Growth Factor, *ras* Oncogene, and Phosphatidylcholine-hydrolyzing Phospholipase C by *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 22597-22602.
- Matrisian, L.M. (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6:121– 5.
- Merlo, L.M., Pepper, J.W., Reid, B.J. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process *Nat Rev Cancer* 6: 924-935.
- Michael, H., Ros., G., Kaye, I. (2003). Wojciech Pawlina, *Histology A Text and Atlas*, Fourth Edition, LWW, 480–490.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5: 691–701.
- Munhoz, F.B.A., Godoy-Santos, A.L., Santos. M.C.L.G. (2010). MMP-3 polymorphism: *Genetic marker in pathological processes (Review)*. 735-740
- Murray, G.I., Duncan, M.E., Arbuckle, E., Melvin, W.T. and Fothergill, J.E. (1998). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut*, 43, 791--797.
- Nagase, H., Enghild, J.J., Suzuki, K., Salvesen, G. (1990) Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. *Biochemistry*. 29:5783-5789.
- Nagase, H. (1996). in *Zinc Metalloproteases in Health and Disease* (Hooper, N. M., ed) pp. 153–204.
- Nagase, H., Woessner, J.F., (1999) . Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-494.
- Nawar, W., W. (1996). Lipids. In “Food Chemistry”, O.R. Fennema (Ed), pp: 225-319. *Marcel Dekker, New York*.
- Noyan, T., Guducuoglu, H., Ilhan, M. (2009). A Study of Oxidative Stress Parameters in Anti-Helicobacter Pylorus Immunoglobulin G Positive and Negative Gastric Cancer Patients *Yonsei Med J* 50(5): 677-682.
- Olivier, M., Petitjean, A., Marcel, V. (2008). Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther Advance online yayınları* 19 September: 10:1038.
- Orange, J.S., Levy, O., Geha, R.S. (2005). Human disease resulting from gene mutations that interfere with appropriate nuclear factor kappa B activation, *Immunol. Rev.* 203 21–37.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical

absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 50(11); 3122-3128.

Page, A., McCaw, A., Ewald, A.J., Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221–33.

Pak, J. H., Liu, C. Y., Huangpu, J., and Graham, J. S. (1997). *FEBS Lett.* 404,283–288.

Pande, V., Ramos, M.J. (2005). NF-kappa B in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 12 357–374.

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*; 55:74-108.

Parks, W.C., Wilson, C.L., Lopez-Boado, Y.S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4:617–629.

Parks, W.C. (1999). Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen* 7:423–432.

Patterson, M.L., Atkinson, S.J., Knäuper, V., Murphy, G. (2001). Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.*;503:158-62.

Przybylo, J.A., Radisky, D.C. (2007). Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition: tumor progression at Snail's pace. *Int J Biochem Cell Biol.*39(6):1082-8.

Ra, H.J., and William, C. (2007). Parks Center for Lung Biology, University of Washington, *Seattle WA Matrix Biol.* October , 26(8): 587–596.

Risch, N.J. (2000). Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405: 847-856.

Ristimaki, A., Honkanen, N., Jankala, H., Sipponen, P., Harkonen, M. (1997). Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 57:1276–1280.

Ruoslahti, E. (1988). Fibronectin and its receptors. *Annual Review of Biochemistry* 57 375–413.

Sah, V.P., Seasholtz, T.M., Sagi, S.A., Brown, J.H. (2000). The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 40: 459-489.

- Satiroglu, N.L., Tufan, N.L., Bir F, Calli-Demirkan, N. (2006). Investigation of HER-2 codon 655 single nucleotide polymorphism frequency and c-ErbB-2 protein expression alterations in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 12:3283–3287.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shingawa, A., Yamamoto, E., Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*. 370:61-65
- Sefton, B., M. (2001). Overview of protein phosphorylation. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 14: Unit14.1.
- Shan, K., Ying, W., Jian-Hui, Z., Wei, G., Na, W., and Yan, L. (2005). The function of the SNP in the MMP1 and MMP3 promoter in susceptibility to endometriosis in China. *Molecular Human Reproduction* Vol.11, No.6 pp. 423–427,
- Sipponen P. (2002). Gastric cancer: pathogenesis, risks and prevention. *J Gastroenterol*, 37:39–44.
- Smolarz, B., Szyłło, K., Romanowicz, H., Makowska, H., Niewiadomski, M., Kozłowska, E., Kulig, A. (2003). PZR Analysis of Matrix Metalloproteinase 3 (MMP-3) Gene Promoter Polymorphism in Ovarian Cancer *Pol J Pathol* 54, 4, 233-238.
- Sperti, G., van Leeuwen, R.T.J., Quax, P.H.A., Maseri, A., Kluft, C. (1992). Cultured rat aortic vascular smooth muscle cells digest naturally produced extracellular matrix: involvement of plasminogen-dependent and plasminogen-independent pathways. *Circ Res*. 71:385-392.
- Sreenath, T., Matrisian, L.M., Stetler-Stevenson, W., Gattoni-Celli, S., Pozzatti, R.O. (1992). Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res*. 1992 Sep 15;52(18):4942-7.
- Sternlicht, M.D., Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516.
- Stetler, W.G., Stevenson, W.G., Liotta, L.A., Kleiner, D.E. (1993). Extra cellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Faseb J*, 7:1434-41.
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 10: 1881-1896.
- Sun, Y., Oberley, L.W. (1996). Redox regulation of transcriptional activators, *Free Rad. Biol. Med.* 21 335–348.
- Subramaniam, M.M., Chan, J.Y., Yeoh, K.G., Quek, T., Ito, K., Salto, M., Tellez, M. (2009). Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1796: 315–331

Szylo, K., Smolarz, B., Romanowicz, H., Makowska, H., Niewiadomski, M., Kozłowska, E., Kulig, A. (2002). The promoter polymorphism of the matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) gene in women with ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res*;21:357–61.

Takezaki, T., Gao, C.M., Ding, J.H., Liu, T.K., Li, M.S., Tajima, K. (1999). Comparative study of lifestyles of residents in high and low risk areas for gastric cancer in Jiangsu Province, China; witspecial reference to allium vegetables. *J Epidemiol* 9:297-305

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279: L1005-L1028

Thiel, A., Heinonen, M., Rintahaka, J., Hallikainen, T., Hemmes, A. (2006). Expression of cyclooxygenase-2 is regulated by glycogen synthase kinase-3beta in gastric cancer cells. *J Biol Chem* 281: 4564–4569.

Torres, V.J., Ivie, S.E., McClain, M.S., Cover, T.L. (2005). Functional properties of the p33 and p55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem*;280:21107-21114

Ushijima, T., Sasako, M. (2004). Focus on gastric cancer. *Cancer Cell* 5: 121–125.

Overall, C.M., Lopez, C., Olin, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, 2:657-72.

Vachtenheim, J. (1997). nOccurrence of ras mutations in human lung cancer, *Neoplasma* 44 145–149.

Valko, M. Rhode, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur M. (2006). Chemico Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer -Biological Interactions 160 1–40

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37-56
Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signaling. *Curr Med Chem*, 11: 1163-1182

Van Themsche, C., Potworowski, E.F., St-Pierre, Y. (2004). Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315, 884—891.

Venkateshwari, A., Krishnaveni, D., Venugopal, S., Shashikumar, P., Vidyasagar, A., Jyothy, A. (2011). *H.pilori* infection in relation to gastric cancer progression. *Indian J Cancer*. Jan-Mar;48(1):94-8.

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

- Vu, T.H., Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14:2123–2133.
- Wada, K., Sato, H., Kinoh, H., Kajita, M., Yamamoto, H., and Seiki, M. (1998). *Gene (Amst.)* 211, 57–62.
- Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways, *J. Mol. Med.* 74 589–607.
- Wyllie, A. (1997). Apoptosis and carcinogenesis, *Eur J Cell Biol.*, Vol73, 189-197.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Gutierrez, O., Kim, J.G., Kashima, K., Graham, D.Y. (1999). Relationship between *H.pilori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: Studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 37:2274-9.
- Ye, S., Watts, G.F., Mandalia, S., Humphries, S.E. and Henney, A.M. (1995). Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br. Heart J.*, 73, 209—215.
- Ye, S., Eriksson, P., Hamsten, A., Kurkinen, M., Humphries, S. E. And Henney, A.M. (1996). Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J. Biol. Chem.*, 271,13055 13060.
- Ye, S., Dhillon, S., Turner, S.J., Bateman, A.C., Theaker, J.M., Pickering, R. M., Day, I. and Howell, W.M. (2001). Invasiveness of cutaneous malignant melanoma is influenced by matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism. *Cancer Res.*, 61, 1296—1298.
- You, W., Zhang, L., Gail, M., Chang Y. (2000). Gastric Dysplasia and Gastric Cancer: H.pilori , Serum Vitamin C, and Other Risk Factors, *J Natl Inst*, 92:1607–12.
- Zhang, J., Jin, X., Fang, S., Li, Y., Wang, R., Guo, W., Wang, N., Wang, Y., Wen, D., Wei, L., Kuang, G. and Dong, Z. (2004). The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric cardiac adenocarcinoma *Carcinogenesis vol.25 no.12 pp.2519-2524.*
- Zanghieri, G., Di Gregorio, C., Sacchetti, C. (1990). Familial occurrence of gastric cancer in the 2 –year experience of a population –based registry. *Cancer.* 66:2047–2051.
- Zhu, C., Odeberg, J., Hamsten, A., Eriksson, P. (2006). Allele-specific MMP-3 transcription under in vivo conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 1150-1156.

8. ÖZGEÇMİŞ

Serkan Demir, 1985 yılında İstanbul'da doğdu. 2003 yılında İstanbul Çapa Anadolu Öğretmen Lisesi'nden mezun olduktan sonra yine aynı yıl Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı yüksek öğrenimini 2008 yılında tamamladı.

Yüksek lisans eğitimine 2009 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne girerek devam etti.