

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİDE KANSERİNDE MATRİKS METALLOPROTEİNAZ (MMP)
GENLERİNİN İFADESİ ÜZERİNE OKSİDATİF STRES VE
RNA MÜDAHALESİNİN ETKİSİ**

SALİH GENCER

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA
AĞUSTOS 2009**

Tez Başlığı: Mide Kanserinde Matriks Metalloproteinaz (MMP) Genlerinin İfadesi Üzerine Oksidatif Stres ve RNA Müdahalesinin Etkisi

Tezi hazırlayan: Salih GENCER

Sınav Tarihi: 17. 08. 2009

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Ana bilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

İnönü Üniversitesi



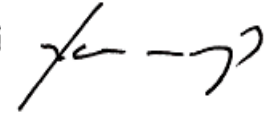
Prof. Dr. Murat ÖZMEN

İnönü Üniversitesi



Doç.Dr. Bengü ÇOBANOĞLU

Fırat Üniversitesi



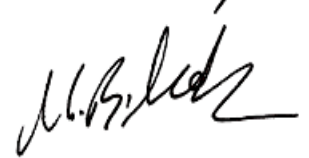
Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

İnönü Üniversitesi



Yrd. Doç.Dr. M.Burcu IRMAK YAZICIOĞLU

Fatih Üniversitesi



Prof. Dr. İsmail ÖZDEMİR

Enstitü Müdürü

AILEM'e

ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum “Mide Kanserinde Matriks Metalloproteinaz (MMP) Genlerinin İfadesi Üzerine Oksidatif Stres ve RNA Müdahalesinin Etkisi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hemde kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Salih GENCER

ÖZET

Doktora tezi

MİDE KANSERİNDE MATRİKS METALLOPROTEİNAZ (MMP) GENLERİNİN İFADESİ ÜZERİNE OKSİDATİF STRES VE RNA MÜDAHALESİNİN ETKİSİ

Salih GENCER

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
129 + xi sayfa

2009

Danışman: Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU

Mide kanseri dünya genelinde en sık görülen dördüncü kanser türü olup son yıllarda görülme sıklığının azalmasına rağmen, kanserle ilişkili ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Kanser ortaya çıkmasında oksidatif stresin rol oynadığı her ne kadar bilinse de, bu ilişkinin nasıl olduğu çok iyi bilinmemektedir. Tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz yapmaları, bölgesel bağ dokuyu parçalayan matriks metalloproteinazlar (MMP) ile gerçekleşir. Tümör hücrelerinin daha agresif hale gelmesinde ve genel anlamda kanserin yayılmasında MMP'ler büyük öneme sahiptir.

Bu çalışmada, tümör invazyonunda rol oynayan *MMP* genlerinin ve onkojenik transformasyonda rol oynayan β -katenin'in gastrik kanser biyopsilerinde ve hücre hatlarında oksidatif strese bağlı olarak değişimlerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. AGS hücre hattında MMP-3'e özgü RNA müdahalesinin etkisini araştırmak çalışmanın diğer bir amacını oluşturmaktadır. Gastrik kanserli biyopsi örneklerinde gen ifadelerine RT PCR, hücre hatlarında stres koşulları altında değişen gen ifadelerine ise Q-RT PCR ile bakılmıştır. Doku örnekleri ve hücre hatlarında β -katenin ve 8-OHdG'in lokalizasyonuna immünohistokimyasal yöntemle bakılmıştır. Değişen stres koşullarında hücre hatlarının invazyon seviyelerine bakılmıştır. *MMP-3*'ün ifade olduğu AGS hücre hattında *MMP-3* siRNA'sı hücre içerisine transfeksiyon yöntemi ile sokulup gen ifadesi değişimlerine Q-RT PCR ile bakılmıştır.

Çalışılan doku örneklerinde MMP ve β -katenin genlerinin tümürlü dokularda daha fazla ifade olduğu görülmüştür. Hücre içinde β -katenin'in % 85 oranında sitoplazmik ve membranöz lokalizasyonu görülürken, % 20 oranında nükleer lokalizasyonu görülmüştür. Hücre hatlarında H_2O_2 'nin göstermiş olduğu toksisite benzerlik gösterirken, hücrelerin bu strese verdikleri tepki farklı olmuştur. MKN-45 hücre hattı H_2O_2 ile apoptoza girerken diğer hücre hatlarının girmedikleri görülmüştür. *H. pylori* enfeksiyonu'nun β -katenin ve *MMP* genlerinin ifadelerinde değişiklik yaratmazken H_2O_2 *MMP-1*, *MMP-7*, *MMP-14*, *MMP-15*, *MMP-17* ve β -katenin ifadesinde artışa sebep olmuştur. Stres koşulunun ortadan kaldırıldığı durumda gen ifadelerinde görülen azalış, gen ifadelerindeki değişimin tamamen oksidatif strese bağlı olduğunun göstergesidir.

AGS hücre hattında *MMP-3* genin susturulması *MMP-15* ifadesini azaltırken *MMP-10*'nun ifadesini arttırmıştır. Gastrik kanserde de *MMP-3* genin diğer MMP'leri regüle etmesiyle kilit bir göreve sahip olabileceği düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Mide kanseri, Matriks metalloproteinaz, β -katenin, *Helicobacter pylori*, siRNA

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE EFFECT OF OXIDATIVE STRESS AND RNA INTERFERENCE ON EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP) GENES AT GASTRIC CANCER

Salih GENCER

Inonu University
Institute of Applied Sciences
Division of Biology
129 + xi pp

2009

Advisor: Hikmet GEÇKİL, Assoc. Prof.

Co-Advisor: M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU, Assist. Prof.

Gastric cancer is the fourth leading cancer type of all cancers and although there has been a decline in the incidence of this cancer in recent years, it is still one of the most common cause of deaths. Although the role of oxidative stress on cancer formation has long been known, its mechanism has not been elucidated yet. The invasiveness and metastasis of tumor cells are the result of degradation of connective tissue by matrix metalloproteinases (MMP). MMPs play a profound role on aggressiveness of tumor cells and their spread.

This study was undertaken to understand the role of MMP genes and β -catenin in gastric cancer biopsies and gastric cancer cell lines in relation to oxidative stress. Further, the aim of the study here was to determine the effect of MMP-3 dependent RNA interference on AGS cell line. The gene expression profiles of gastric cancer biopsies were investigated with RT-PCR, while the gene expression profiles of cell lines under stress conditions were determined through a Q-RT PCR study. The localization of β -catenin and 8-OHdG in tissue samples and cell lines was determined by an immunohistochemical method. To determine MMP-3 expression level, MMP-3 siRNA was introduced into AGS cell line expressing MMP-3 protein and expression level was determined by a method utilizing Q-RT PCR.

MMP and β -catenin genes were determined to have a higher expression level in tumor tissues studied. Localization studies showed that, 85 % of β -catenin was present in cytoplasm and membrane, while the rest was localized in nucleus. The toxicity of H_2O_2 on gastric cancer cell lines was similar to that of on normal cells but the response of cells to stress was different. One other striking finding was that MKN-45 cell line was determined to go to apoptosis upon treatment with H_2O_2 , the other cell lines did not show such behavior. While the infection by *H. pylori* did not cause a change in the expression levels of β -catenin and MMP genes, H_2O_2 stress resulted an increased level of expression in *MMP-1*, *MMP-7*, *MMP-14*, *MMP-15*, *MMP-17* and β -catenin genes. Down-regulation of the expression of these genes under no H_2O_2 conditions showed that the difference in gene expression profiles was due to oxidative stress.

The silencing of *MMP-3* gene in AGS cell line caused a decrease *MMP-15*, but an increase in *MMP-10* expression. It is assumed that, in gastric cancer the effect of *MMP-3* expression has a key role on regulation of other MMPs.

KEYWORDS: Gastric cancer, Matrix metalloproteinase, β -catenin, *Helicobacter pylori*, siRNA

TEŞEKKÜR

Bu çalışma boyunca her aşamada değerli bilgi birikimlerinden yararlandığım ve bu tezin oluşumuna sağladığı katkılarından dolayı danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'na;

Çalışmamı destekledikleri için, bilimsel anlayış ve insani tavırlarını her zaman örnek alacağım tez izleme komitemdeki değerli hocalarım Sayın Özfer YEŞİLADA ve Sayın Murat ÖZMEN'ne;

Çalışmamın patolojik değerlendirme kısmında yapmış olduğu yorumlar ve yol gösterici tavırlarından ötürü, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Gülen Bülbül DOĞUSOY'a;

Deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyoistatistik bölümü öğretim görevlisi Sayın Dr. Penbe ÇAĞTAY'a;

TÜBİTAK tarafından desteklenen proje (105S352 (SBAG-K-110)) kapsamında gerçekleştirdiğim bu tez çalışmasından dolayı TÜBİTAK'a;

Gerekli laboratuvar donanımı ve malzeme sağlamalarındaki katkılardan dolayı Fatih Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne;

Çalışmam boyunca desteği için Gürkan ŞEN'e

Yaşamım boyunca ve akademik çalışma hayatımda her zaman en büyük desteği aldığım canım Annem ve Babama;

Zor ve stresli çalışma sürecinde gösterdiği sabır ve destekleri için sevgili kardeşim Zerrin GENCER'e

Çalışma boyunca yanımda olan yakın aile dostlarıma;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Mide Kanseri.....	2
1.2. Oksidatif Stres.....	4
1.3. Oksidatif Stres ve Mide Kanseri.....	6
1.3.1. <i>Helicobacter pylori</i>	6
1.3.2. <i>Helicobacter pylori</i> ve Mide kanseri	7
1.4. Metastaz ve İnvazyon.....	9
1.4.1. Hücre Hareketinin Biyokimyasal Kontrol Noktaları.....	9
1.4.2. Ekstraselüler Matriks.....	9
1.4.3. Bazal Lamina.....	10
1.4.4. Ekstraselüler Matriks ve Kanser.....	10
1.5. Proteazlar.....	11
1.5.1. Matriks Metalloproteinazlar.....	12
1.5.2. MMP'lerin Biyolojik Fonksiyonları.....	15
1.5.3. MMP'lerin Hücrel Kaynağı.....	16
1.5.4. MMP Doku İnhibitörleri (TIMP).....	16
1.5.5. MMP'lerin Regülasyonu.....	16
1.6. Wnt Sinyal Yolu.....	17
1.6.1. β -Katenin.....	19
1.7. Apoptoz.....	19
1.8. 8-OHdG.....	19
1.9. RNA Müdahalesi (RNAi).....	20
1.9.1. RNAi Mekanizmasında Rol Alan Moleküller.....	20
1.9.2. RNAi ile Gen susuturulması.....	22
1.9.3. miRNA ve siRNA'nın Moleküler Mekanizması.....	23
1.9.4. RNAi Mekanizmasının Sürekliliği.....	24
1.9.5. RNAi ve Kanser.....	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	25
3. MATERYAL VE METOTLAR	29
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Ayıraçlar.....	29
3.2. Çalışmada Kullanılan Doku Örnekleri.....	29
3.3. Doku Örneklerinde Gen İfadesi.....	29
3.3.1. Doku örneklerinden RNA izolasyonu.....	29
3.3.2. Doku örneklerinden cDNA sentezi.....	29
3.3.3. Primer Dizaynı ve Sentezi	29
3.3.4. Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR).....	31
3.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	32
3.4. Doku Örneklerinde β -Katenin Lokalizasyonunun Tayini.....	33
3.5. Doku örneklerinde 8-OHdG'in Tayini.....	33

3.6.	Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları.....	34
3.6.1.	Hücre Hatlarının Büyütülmesi.....	34
3.6.2.	Hücre Hatlarının Çözülmesi.....	34
3.6.3.	Hücre Hatlarının Pasajlanması.....	34
3.6.4.	Hücre Hatlarının Dondurulması.....	35
3.7.	Hücre Hatlarında Gen İfadesi.....	35
3.13.	Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu.....	35
3.7.2.	Hücre Hatlarından cDNA Sentezi.....	36
3.8.	Hücre Hatlarının <i>Helicobacter Pylori</i> ile Enfeksiyonu.....	36
3.8.1.	Doku örneklerinden <i>Helicobacter pylori</i> izolasyonu.....	36
3.8.2.	<i>Helicobacter pylori</i> 'nin Çoğaltılması.....	36
3.8.3.	<i>Helicobacter pylori</i> suşlarının <i>cagA</i> ve <i>vagA</i> tiplendirmesi.....	36
3.8.4.	Enfeksiyon İşlemi.....	37
3.9.	Hücre Hatlarının H ₂ O ₂ ile Muamele Edilmesi.....	38
3.9.1.	Hücre Hatlarında H ₂ O ₂ 'nin Yol Açtığı Morfolojik Değişiklikler.....	38
3.9.2.	Hücre Hatlarında H ₂ O ₂ 'in Toksikitesinin Belirlenmesi.....	38
3.9.3.	Hücre Hatlarında Oksidatif Stresin Belirlenmesi.....	39
3.9.4.	Hücre Hatlarında Apoptozun Belirlenmesi.....	39
3.9.4.1.	Hoecht Çekirdek Boyaması.....	39
3.9.4.2.	TUNEL.....	40
3.9.4.3.	Kaspaz-3 aktivitesi.....	40
3.10.	Q RT PCR.....	40
3.10.1.	Q-RT PCR'in Gen İfadesi için Optimizasyonu.....	41
3.10.2.	Q-RT PCR ile Gen İfade Analizi.....	41
3.11.	Hücre hatlarında Kafeik asit fenetil ester (CAPE) ile stresin ortadan kaldırılması.....	42
3.12.	Hücre Hatlarında β-Katenin Lokalizasyonu'nun Belirlenmesi.....	42
3.13.	Hücre Hatlarında 8-OHdG'in Belirlenmesi.....	43
3.14.	Hücre Hatlarında İnvazyonun Belirlenmesi.....	43
3.15.	siRNA ile MMP-3 Geninin Susturulması.....	44
3.15.1.	Hücre Hatlarına MMP-3 siRNA'nın Transfeksiyonu.....	44
3.15.2.	Transfeksiyon Verim Analizi.....	45
3.15.3.	MMP-3 Geninin Susturum Analizi.....	45
3.16.	İstatistiksel Yöntem.....	45
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1.	Doku örneklerindeki β-katenin ve MMP genlerinin ifadesi.....	46
4.2.	Hasta dokularının klinikopatolojik özellikleri.....	51
4.3.	Mide kanserli doku örneklerinde β-katenin lokalizasyonu.....	53
4.4.	Doku örneklerinde 8-OHdG lokalizasyonu.....	54
4.5.	Hücre hatlarının Kültürü.....	56
4.6.	Hücre hatlarında β- katenin ve MMP genlerinin ifadesi.....	58
4.7.	<i>Helicobacter pylori</i> suşlarının <i>cagA</i> ve <i>vagA</i> tiplendirmesi.....	61
4.8.	Hücre hatlarında β-katenin ve MMP genlerinin ifadesi üzerine <i>H. pylori</i> enfeksiyonunun etkisi.....	61
4.9.	Hücre hatlarında H ₂ O ₂ 'nin oluşturduğu morfolojik değişiklik.....	63
4.10.	Hücre hatlarında H ₂ O ₂ 'nin sitotoksik etkisinin tespit edilmesi.....	66
4.11.	Hücre hatlarında canlı hücre içi oksidatif stres seviyesi.....	70
4.12.	Hücre hatlarının apoptoz durumları.....	77
4.13.	Gen İfade analizi için Q-RT PCR optimizasyonu.....	88
4.14.	Hücre hatlarında Oksidatif stres sonucu MMP genlerinin ifadesi.....	90

4.15.	Hücre hatlarında görülen oksidatif stresin ortadan kaldırılmasında kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in etkisi.....	94
4.16.	Hücre Hatlarında Hücre içi Oksidatif Stresin CAPE ile Ortadan Kaldırılması Sonucu β -katenin ve MMP Genlerinin İfadeleri.....	95
4.17.	Hücre hatlarında 8-OHdG lokalizasyonuna H_2O_2 'in etkisi.....	99
4.18.	Hücre hatlarında β -katenin lokalizasyonuna H_2O_2 'in etkisi.....	100
4.19.	Hücre hatlarında H_2O_2 'in invazyona etkisi.....	101
4.20.	AGS Hücre Hattında MMP-3 siRNA'nın Transfeksiyon Analizi.....	102
4.21.	AGS Hücre Hattında MMP-3 Geninin Susturulma Analizi.....	103
4.22.	AGS Hücre Hattında MMP-3 Geninin Susturulması Sonucu β -katenin ve MMP Genlerinin İfadesi.....	105
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	106
6.	KAYNAKLAR	114
	ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Kanserin çok aşamalı oluşum süreci.....	2
Şekil 1.2.	Midenin Anatomik Yapısı.....	3
Şekil 1.3.	Oksidatif ve redüktif stres arasındaki denge.....	4
Şekil 1.4.	<i>Helicobacter pylori</i> 'nin morfolojik yapısı.....	7
Şekil 1.5.	Üreaz aktivitesi.....	7
Şekil 1.6.	<i>Helicobacter pylori</i> ile gastrik epitel hücrelerinin enfeksiyonu.....	8
Şekil 1.7.	Ekstrasellüler matriks.....	10
Şekil 1.8.	Protezların sınıflandırılması.....	12
Şekil 1.9.	Kanonikal ve non-kanonikal Wnt sinyal yolu.....	18
Şekil 1.10.	Oksijen radikalleri ile 8-OHdG oluşumu.....	20
Şekil 1.11.	Dicer ile uzun çift zincirli RNA (dsRNA)'dan siRNA oluşumu.....	21
Şekil 1.12.	RNA müdahalesi (RNAi) ile gen susuturum mekanizması.....	23
Şekil 4.1.	Mide kanserli hastalardan alınan normal mide dokusu ve tümörlü mide dokusunda MMP-1, 2, 3, 7 ve 8 genlerinin ifadesi.....	47
Şekil 4.2.	Mide kanserli hastalardan alınan normal mide dokusu ve tümörlü mide dokusunda MMP-9, 10, 11, 12 ve 14 genlerinin ifadesi.....	48
Şekil 4.3.	Mide kanserli hastalardan alınan normal mide dokusu ve tümörlü mide dokusunda MMP-15, 23, 28 ve β -Katenin genlerinin ifadesi.....	49
Şekil 4.4.	Mide kanserli 76 hastadan alınan normal mide dokusu ve tümörlü mide dokusunda β -katenin ve MMP genlerinin ekspre olduğu hasta sayısı... ..	50
Şekil 4.5.	Tümörlü dokularda membranöz ve sitoplazmik β - katenin lokalizasyonu	53
Şekil 4.6.	Tümörlü dokularda nükleer ve sitoplazmik β - katenin lokalizasyonu.....	54
Şekil 4.7.	Tümörlü dokularda 8-OHdG lokalizasyonu.	55
Şekil 4.8.	Hücre hatlarının invert ışık mikroskop görüntüleri.....	57
Şekil 4.9.	Hücre hatlarında β -katenin ve MMP genlerinin ifadesi.....	60
Şekil 4.10.	<i>Helicobacter Pylori</i> 'nin multipleks PCR ile <i>cagA</i> , <i>vacA</i> genotiplendirmesi..	61
Şekil 4.11.	$Cag^{(+)}$, $vag^{(+)}$ <i>H. pylori</i> ile enfekte edilen MKN-45 Hücre Hattında MMP-7 İfadesi.....	62
Şekil 4.12.	MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında 200 μ M H_2O_2 'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu morfolojik değişiklik	63
Şekil 4.13.	AGS ve Kato III hücre hatlarında 200 μ M H_2O_2 'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu morfolojik değişiklik	64
Şekil 4.14.	HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında 200 μ M H_2O_2 'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu morfolojik değişiklik.....	65
Şekil 4.15.	MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında, H_2O_2 ' in farklı konsantrasyon ve zaman dilimlerinde göstermiş olduğu sitotoksik etki.....	67
Şekil 4.16.	AGS ve Kato III hücre hatlarında, H_2O_2 ' in farklı konsantrasyon ve zaman dilimlerinde göstermiş olduğu sitotoksik etki.....	68
Şekil 4.17.	HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında, H_2O_2 ' in farklı konsantrasyon ve zaman dilimlerinde göstermiş olduğu sitotoksik etki.....	69
Şekil 4.18.	H_2O_2 'ye maruz bırakılan MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında canlı hücre içi oksidatif stres seviyeleri.....	71
Şekil 4.19.	H_2O_2 'ye maruz bırakılan AGS ve Kato III hücre hatlarında canlı hücre içi oksidatif stres seviyeleri.....	72
Şekil 4.20.	H_2O_2 'ye maruz bırakılan HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında canlı hücre içi oksidatif stres seviyeleri.....	73
Şekil 4.21.	MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında 200 μ M H_2O_2 'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu canlı hücre içi oksidatif stres	74
Şekil 4.22.	AGS ve Kato III hücre hatlarında 200 μ M H_2O_2 'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu canlı hücre içi oksidatif stres.....	74
Şekil 4.23.	HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında 200 μ M H_2O_2 'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu canlı hücre içi oksidatif stres.....	76

Şekil 4.24.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında apoptoza girmiş hücrelerin Hoechst 33258 boyaması ile tespiti.....	78
Şekil 4.25.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan AGS ve Kato III hücre hatlarında apoptoza girmiş hücrelerin Hoechst 33258 boyaması ile tespiti.....	79
Şekil 4.26.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında apoptoza girmiş hücrelerin Hoechst 33258 boyaması ile tespiti.....	80
Şekil 4.27.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan MKN-45 hücre hatında apoptoza girmiş hücrelerin TUNEL ile tespiti.....	81
Şekil 4.28.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan 23132/87 hücre hatında apoptoza girmiş hücrelerin TUNEL ile tespiti.....	82
Şekil 4.29.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan AGS hücre hatında apoptoza girmiş hücrelerin TUNEL ile tespiti.....	83
Şekil 4.30.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan Kato III hücre hatında apoptoza girmiş hücrelerin TUNEL ile tespiti.....	84
Şekil 4.31.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan HGC-27 hücre hatında apoptoza girmiş hücrelerin TUNEL ile tespiti.....	85
Şekil 4.32.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan CLS-145 hücre hatında apoptoza girmiş hücrelerin TUNEL ile tespiti.....	86
Şekil 4.33.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan hücre hatlarının apoptoz seviyeleri.....	87
Şekil 4.34.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan hücre hatlarında kaspaz-3 enzim aktivitesi.....	87
Şekil 4.35.	cDNA ların seri sulandırılmaları ile Q-RT PCR optimizasyonu.....	88
Şekil 4.36.	Kontrol ve H ₂ O ₂ stresine maruz kalmış hücre hatlarında GAPDH geninin İfadesi.....	89
Şekil 4.37.	Kontrol ve 12 saat 100 µM H ₂ O ₂ stresine maruz kalmış MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında MMP-7 geninin ifadesi.....	89
Şekil 4.38.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan MKN-45 hücre hattında β-Katenin, MMP-1, MMP-7 genlerinin ifadesi.....	91
Şekil 4.39.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan MKN-45 hücre hattında MMP-14, MMP-15, MMP-17 genlerinin ifadesi.....	92
Şekil 4.40.	MKN-45 ve 23132/87 hücre hattında görülen hücre içi oksidatif stres'e CAPE'nin etkisi.....	94
Şekil 4.41	CAPE ile hücre içi stresin ortadan kaldırıldığı hücre hatlarında görülen β-katenin ifade oranı.....	96
Şekil 4.42	CAPE ile hücre içi stresin ortadan kaldırıldığı hücre hatlarında görülen MMP-1, MMP-7 ve MMP-14 ifade oranı.....	97
Şekil 4.43	CAPE ile hücre içi stresin ortadan kaldırıldığı hücre hatlarında görülen MMP-15, MMP-17 ve MMP-28 ekspresyon oranı.....	98
Şekil 4.44	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında nükleer 8-OHdG lokalizasyonu.....	99
Şekil 4.45	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında β-katenin lokalizasyonu.....	100
Şekil 4.46	H ₂ O ₂ stresine maruz kalan MKN-45, 23132/87 ve AGS hücre hatlarında invazyon.....	101
Şekil 4.47	AGS hücre hattında MMP-3 siRNA transfeksiyonunu.....	102
Şekil 4.48	AGS hücre hattında 24 saat susturulmuş MMP-3 geninin ifadesi.....	103
Şekil 4.49	AGS hücre hattında MMP-3 geninin susturulmasında referans gen olan GAPDH geninin İfadesi.....	104
Şekil 4.50	AGS hücrelerinde MMP-3'ün kontrol ve susturulmuş örnekte İfadesi.....	104
Şekil 4.51	MMP-3 geninin susturulması sonucu AGS hücre hattında görülen MMP genlerinin ifadesi.....	105

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Radikal ve radikal olmayan oksijen metabolitleri.....	5
Çizelge 1.2.	Matriks metalloproteinazların sınıflandırılması.....	15
Çizelge 3.1.	MMP, β -Katenin ve GAPDH genleri için spesifik primerler.....	30
Çizelge 3.2.	PZR reaksiyonunda kullanılan 25 μ l'lik master mix.....	32
Çizelge 3.3.	<i>CagA</i> ve <i>VacA</i> genleri için dizayn edilen primerler.....	37
Çizelge 3.4.	<i>H. pylori</i> suşlarının <i>cagA</i> ve <i>vagA</i> tanısında kullanılan multipleks PCR için 25 μ l'lik master mix.....	37
Çizelge 3.5.	Gerçek zamanlı PCR için hazırlanan 25 μ l'lik master mix.....	41
Çizelge 4.1.	Hasta dokularının klinikopatolojik özellikleri.....	52
Çizelge 4.2.	Hücre hatlarında β -Katenin ve MMP genlerinin ifadesi.....	59
Çizelge 4.3.	<i>H. pylori</i> ile enfekte edilen hücre hatlarında görülen gen ifadesi değişikliği.....	62
Çizelge 4.4.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan hücre hattında görülen gen ifadesi değişikliği.....	93
Çizelge 4.5.	CAPE ile hücre stresin ortadan kaldırıldığı hücre hattında görülen gen ifadesi değişikliği.....	96
Çizelge 4.6.	MMP-3 Geninin susturulması sonucu AGS hücre hattında görülen Gen ifadesi değişikliği.....	105

SİMGELER VE KISALTMALAR

AK	Adenokarsinom
<i>cagA</i>	<i>H. pylori</i> için patojenite sağlayan gen
CAPE	Kafeik asit fenitil ester
Ct	Treshold (sınır) döngü sayısı
DMEM	Hücre büyüme ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
ESM	Ekstra selüler matriks
FBS	Fetal bovin serumu
GADPH	Glikoz 6 fosfat dehidrojenaz
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
MMP	Matriks metalloproteinaz
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNAi	RNA interferans (müdahale)
ROT	Reaktif oksijen türleri
RPMI-1640	Hücre büyüme ortamı
siRNA	Küçük çift zincirli RNA
TYK	Taş yüzük hücreli karsinom
<i>vacA</i>	<i>H.pylori</i> için stotoksin protein sentezleyen gen
Wnt	Wingless sinyal yolu

1. GİRİŞ

Son 25-30 yılda kanser araştırmalarındaki hızlı ilerleyiş, kanser hakkında bildiklerimizi önemli ölçüde arttırmıştır. Bu araştırmalar sonucunda kanserin, genomdaki dinamik değişiklikleri içeren karmaşık bir hastalık olduğu anlaşılmıştır [1]. Basit bir terimle kanser, hücrelerin kontrolsüz ve zamansız büyümesi olup, yaklaşık 100'den fazla düzensizliğin rol oynadığı karmaşık bir hastalıktır [2]. Kanser, ortaya çıktığı doku türüne göre farklı karakteristik özelliklere sahiptir. Farklı orijinlerden gelen kanserler farklı özelliklere sahiptir. Kanserın yaklaşık % 85'i epitel hücrelerinde meydana gelir ve bu kanser türü karsinoma olarak sınıflandırılır. Kemik ve kas gibi mezoderm hücrelerinden türevlenen kanserler sarkoma olarak adlandırılır. Göğüs gibi salgıbezi dokularında görülen kanserler ise adenokarsinomlar olarak bilinmektedir [3].

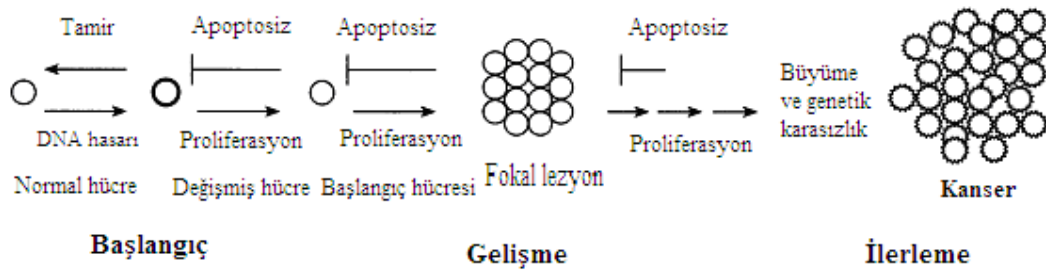
Kanser oluşumu çeşitli dış ve iç faktörlerin birlikte rol oynamasıyla gerçekleşir. Fiziksel (UV ışını, X ışını, vs.), kimyasal (aflatoksin, benzen vs.) ve biyolojik (papiloma virüs ve *Helicobacter pylori*) ajanlar dış faktörleri oluştururken, metabolik bozukluklar ve DNA hasarı gibi bir takım iç faktörler, dış faktörlerin yaratmış olduğu olaylar sonucu ortaya çıkarlar. Bazı kanser oluşumlarında spesifik karsinojenler karakteristik mutasyonlara yol açarak etkili olabilirler [4].

Kanser kontrolsüz hücre büyümesi ve orijin aldığı bölgeden başka bir bölgeye invazyon yapması ile karakterizedir. Bu bağlamda iyi huylu tümör (benign) ve kötü huylu (malignant) tümör kavramları ortaya çıkmaktadır. Metastaz yapma özelliğine sahip olmayan iyi huylu tümörün aksine, ölümcül olan kötü huylu tümör invazyon ve metastaz özelliğine sahiptir [3]. Hücre seviyesinde genetik bir hastalık olan kanserde hücreler, normal hücrelere göre bir takım metabolik farklılıklar gösterirler. Bunların başında hücre büyümesindeki artış, apoptozdaki azalış, genomik kararsızlık ve farklı dokulara invazyon ve metastaz yapabilme özellikleri gelmektedir. Bunlara ilave olarak, Hanahan ve Weinberg tarafından belirlenen ve pek çok kanser araştırmasında ve anti kanser ilaçların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir takım kriterler mevcuttur. Büyüme sinyalleri olmaksızın kendi kendine yetebilme, anti-büyüme sinyallerine duyarsızlık, apoptozdan kaçış, sınırsız kopyalanma potansiyeli, anjiogenez, invazyon ve metastaz bu kriterleri oluşturmaktadır [1].

Kanser oluşum süreci başlangıç, gelişme ve ilerleme olmak üzere üç aşamada tamamlanmaktadır (Şekil 1.1). Başlama evresi, çeşitli mutajenik (veya karsinojenik)

faktörlerin DNA’da oluşturduğu hasar sonucu, somatik mutasyona bağlı olarak oluşan geri dönüşümsüz bir evre olarak karakterize edilir. Kimyasal karsinojenlere aromatik aminler, nitrozaminler, alkilleyiciler, fiziksel karsinojenlere ultraviyole ışınları örnek olarak verilebilir [5].

Karsinojenlerin ya da virüslerin etkisiyle mutasyona uğramış (genetik değişimi başlamış) bir hücre genellikle hücre bölünmesi uyarısı alınca kadar sessiz kalır. Çeşitli indükleyici ajanlar çoğalmayı başlatan epigenetik değişikliklere neden olur ve çoğalma uyarısı oluştururlar. Bu ajanlar (örneğin, hormonlar) çoğunlukla bir sinyal iletim yolunu etkiler ve etki geri dönüşümlüdür. Fosfolipid ve nükleik asit sentezinde, enzim indüksiyonunda, prostaglandin salınımında ve diğer bazı metabolik olaylardaki değişiklikler tümör indükleyici ajanlar ile bağlantılı aktivitelerdir. Bu ajanlar karsinojenik veya mutajenik olmayabilirler. Forbol esterleri, sakkarin ve östrojen hormonu bilinen kanser indükleyici ajanlar arasında sayılabilirler. Son evre olan ilerleme aşamasında, genomik kararsızlık oluşur; aneuploidi, tümör baskılayıcı aktivite kaybı (örneğin *p53* gen inaktivasyonu) ve farklılaşma değişiklikleri görülür. Hücrelerde daha agresif ve metastatik fenotiplerin ortaya çıkmasıyla sonuçta **invazyon ve metastaz** gelişir [6 - 8].



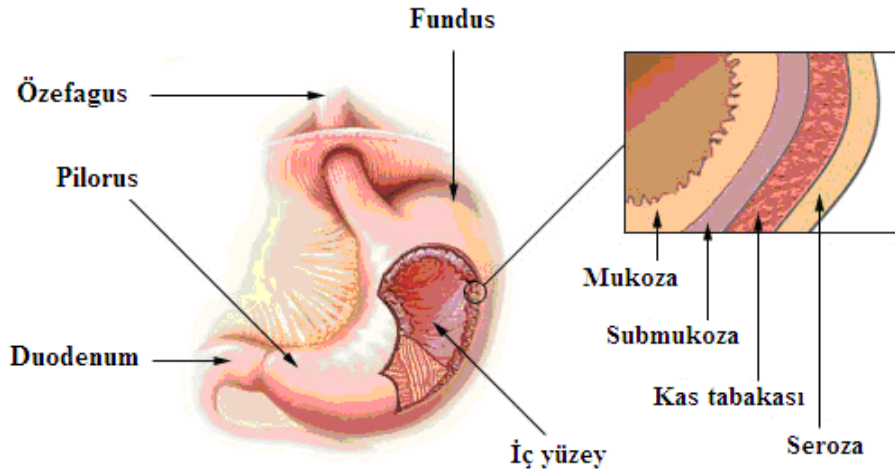
Şekil 1.1. Kanserinin çok aşamalı oluşum süreci.

1.1. Mide Kanseri

Dünya genelinde sıklıkla görülen mide kanseri, kanserle ilişkili ölümlerden sorumlu olarak ikinci sırada yer almaktadır. Cerrahi ve diğer terapötik yöntemlerdeki ilerlemelere rağmen, mide kanseri ile ilgili ölümlerin önüne geçilememektedir [9]. Mide kanseri 50 yaşından sonra daha sık görülmektedir. Ortalama yaşam süresinin giderek uzaması, ileri yaşlarda mide kanseri olgularının ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bir

insanın 40 yaşından önce mide kanseri olma oranı oldukça düşüktür, fakat yaş ilerledikçe görülme sıklığı artmakta ve 70’li yaşlarda en üst seviyeye ulaşmaktadır [10, 11]. Lauren sınıflandırmasına göre mide kanseri **intestinal** ve **difüz** tip olmak üzere iki histolojik gruba ayrılmaktadır [12]. Bu sınıflandırma tümörlerin mikroskobik konfigürasyonlarına ve büyüme özelliklerine bağlı olarak yapılmaktadır. Difüz tip kanser hücreleri midenin stromasına nüfuz eden ve birbirine yapışık olmayan kanser hücreleri olup bir beze (salgı bezi) görünümünde olmayan hücrelerdir. Bu hücreler genellikle mide duvarının en derin kısımlarına kadar nüfuz edebilirler. İntestinal tipin tersine difüz tip daha az çevresel faktörlerle ilişkilidir ve daha çok genç insanlarda görülür. İntestinal tip kanser hücreleri mikroskop altında kolonileşmiş mukoza görünümüne benzer salgı bezleri şeklinde görülürler [13,14]. İntestinal tip genellikle karaciğer metastazı ile ortaya çıkarken difüz tip daha çok peritonal yayılımlar ile ortaya çıkmaktadır.

Mide kanserinin ortaya çıkmasında bir takım çevresel faktörler ve biyolojik faktörler yer almaktadır. Çevresel faktörlerin başında beslenme kültürü gelmektedir. Uzak doğu ülkelerinde mide kanseri, beslenme kültürü şeklinden dolayı dünya genelinde ön sıralarda yer almaktadır. Biyolojik faktörlerin başında ise oksidatif stres ve gram negatif bir bakteri olan ve mide mukozasına (Şekil 1.2) yerleşerek yaşayan *Helicobacter pylori* gelmektedir.

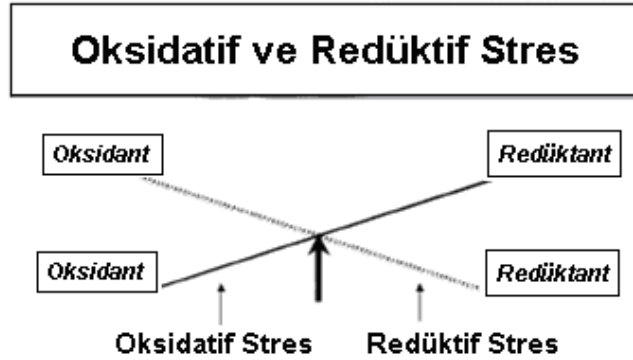


Şekil 1.2. Midenin anatomik yapısı.

1.2. Oksidatif Stres

Lipid, DNA, protein gibi moleküllere zarar veren reaktif oksijen türleri (ROT) genel olarak radikal olan ve radikal olmayan bileşikler olarak iki guruba ayrılabilir (Çizelge 1.1). Radikaller, süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH^\cdot), nitrik oksit radikali (NO^\cdot) gibi yapısında eşleşmemiş bir elektron çifti bulunduran moleküllerdir. Radikal olmadıkları halde hidrojen peroksit (H_2O_2), ve tekil oksijen ($^1O_2^\cdot$) gibi bileşikler radikal olmayan reaktif türlerin başında gelirler [15]. Süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH^\cdot) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri, hücre içerisinde elektron transport zinciri ve fizyolojik olaylar sonucunda oluşmaktadır. Oksidatif stres olarak ifade edilen reaktif oksijen türlerinin hücre içerisinde aşırı derecede birikimi pek çok akut fizyolojik ve patolojik durumlarda gözlenir. Aynı zamanda yaşlanma ve kanser gibi pek çok kronik hastalık sırasında oksidatif stres önemli rol oynar [16, 17].

Bir oksidant hücre içerisinde kontrol edilmediği zaman DNA, lipit, karbohidrat ve protein gibi farklı molekülleri etkileyerek onların fonksiyonunu bozabilir. Biyolojik bir oksidasyon olayını (oksidatif hasarı) önleyen bileşikler antioksidanlar olarak isimlendirilir [18]. Canlı sistemlerde bu antioksidan ajanlar ile oksidan ajanlar arasında bir denge söz konusudur ve bu denge biyokimyasal olayların ve hücre yaşamının devamı için sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir [19, 20]. Oksidan bileşiklerdeki artış sonucu dengenin kayması oksidatif stres varlığı olarak nitelendirilir ve bu süreç hücrede oksidatif hasara yol açmaktadır. Denge, antioksidanlar tarafına kaydığında ise redüktif (indirgeyici) stres olarak isimlendirilen bir stresin varlığı ortaya çıkar ve bu durumda hücrede çeşitli hasarlara neden olabilir (Şekil 1.3) [15].



Şekil 1.3. Oksidatif ve redüktif stres arasındaki denge.

Aerobik organizmalarda, oksijen kullanımının doğal sonucu olarak, reaktif oksijen türleri meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizma, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROT oluşmaktadır [15-20]. Reaktif oksijen türleri, oksijen radikalleri ile bazı radikal olmayan oksijen türevleri için kullanılan ortak bir terimdir. Önemli radikal ve radikal olmayan oksijen metabolitleri Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Radikal ve radikal olmayan oksijen metabolitleri.

İsim	Sembol
Oksijen Radikalleri	
Oksijen (bi-radikal)	O_2^{\cdot}
Süperoksit anyonu	$O_2^{\cdot-}$
Hidroksil	OH
Peroksil	ROO^{\cdot}
Alkoksil	RO^{\cdot}
Nitrik oksit	NO^{\cdot}
Radikal Olmayan Oksijen Türevleri	
Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Ozon	O_3
Tekil Oksijen	1O_2
Aldehitler	HCOR
Peroksinitrit	ONOOH

Biyolojik sistemlerde oksidatif stres yaratan ROT’leri, endojen ve ekzojen kökenli faktörler ile ortaya çıkmaktadır [18]. Stres kaynağı olan bu faktörleri şu şekilde sınıflandırabiliriz;

1. Endojen kaynaklar

- Mitokondriyal elektron transport zinciri
- Endoplazmik retikulum
- Redoks döngüsü
- Fagositik ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar
- Ksantin Oksidaz, NADPH Oksidaz gibi oksidan enzimler
- Otooksidasyon reaksiyonları

2. Eksojen Kaynaklar

- Diyet faktörleri
- Çevresel faktörler
- İlaçlar

Araştırmacılar yıllardır reaktif oksijen türlerinin hücreye nasıl zarar verdiğini anlamak için oksidatif stres çalışmalarına odaklanmışlardır. Őimdilerde ROT'nin biyolojik molekülleri nasıl etkiledikleri hakkında pek çok veri bulunmaktadır. Kanseri gibi oksidatif strese ilişkili pek çok kronik hastalık, DNA mutasyonu, protein hasarı ve gen ifadesindeki değişimlerin bir sonucudur. Örneğin H₂O₂'in bir tümör indükleyici olarak görev yaptığı bildirilmiştir [21]. ROT'nin gen ifadelerini nasıl geri dönüşümlü bir şekilde kontrol etdiklerini anlamaya yönelik yapılan çalışmalarda, en az 127 genin ve sinyal iletilen proteinin hücredeki oksidasyon ve redüksiyon olaylarına duyarlı olduğu ifade edilmektedir [22].

1.3. Oksidatif Stres ve Mide Kanseri

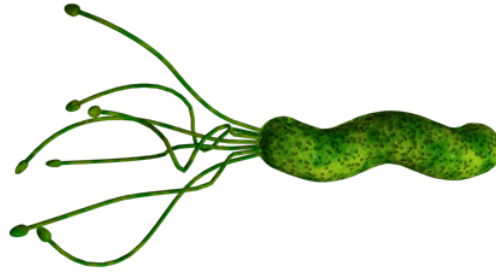
Oksidatif stres kanserin oluşmasında aracı bir faktör olarak bilinmektedir. Kanserin oksidatif mekanizması tam olarak bilinmese de, ROT'un bu süreçte iki şekilde önemli rol aldığı bilinmektedir. Birincisi, DNA da meydana gelen oksidatif hasar mutasyona yol açarak kanserin ortaya çıkmasına ve ilerlemesine neden olur. İkincisi ise, ROT'nin aracı olduğu sinyal iletim yolları ile gen ifadesinin kontrol edilmesidir. Bu kontrol durumu kanserin oluşumunda ve ilerlemesindeki bütün basamaklarda etkilidir [21].

Mide mukozası mukoza hücreleri, bakteri ve sindirilen besinlerden gelen oksidanlara sürekli olarak maruz kalır [23]. Mukus tabakası yüzeyi ile temas halinde olan mide epitel hücreleri oksidatif strese karşı ilk savunma tabakasını oluştururlar. Bu epitel hücreleri oksidanlara maruz kalmalarına rağmen çok etkilenmeden yapılarını korurlar, fakat akut ve kronik iltihaplanmalar sonucu aşırı derecede ROT'nin oluşumu epitel hücrelerinde bir oksidatif strese yol açar. Mide mukozasının iltihaplanması ve ülser oluşumu, alkol tüketimi, soğuk stres, iskemik perfüzyon ve *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkilidir ve bu olaylar midede oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olurlar [24-26]. Mide dokusunda ortaya çıkan oksidatif stres beraberinde kanseri oluşumunu da getirmektedir [27].

1.3.1. *Helicobacter pylori*

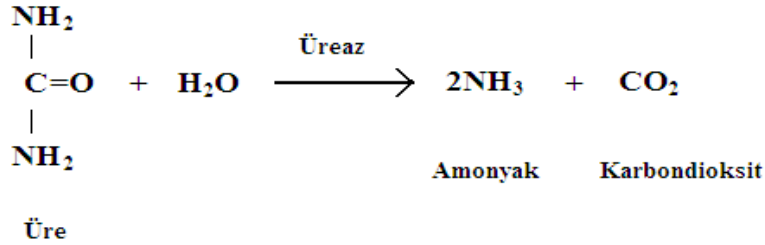
Helicobacter pylori mikroaerofilik ve spiral şeklinde (Şekil 1.4) olan gram negatif bir bakteri olup mide mukozasında yaşamaktadır. *H. pylori* 1982 yılında keşfedilmiş [28] olup, gelişmiş ülkelerin nüfusunun yaklaşık % 25-50'sinde bu bakteri enfeksiyonu

görülürken gelişmekte olan ülkelerin yaklaşık % 70- 90'ında bu enfeksiyon görülmektedir [29]. *H. pylori*, peptik ülser, kronik aktif gastrit ve mide kanseri oluşumu ile yakından ilişkilidir. Sahip olduğu flagellalar sayesinde insan mide mukozasına girebilme ve burada koloni oluşturabilme yeteneğine sahip olan bu bakteri mide epitel hücreleri ile direk etkileşime girer. Bu etkileşim ile oluşan bazı histolojik değişiklikler kronik gastrit (mukozanın iltihaplanması), ülser (mukozanın incilmesi) ve kansere yol açmaktadır [30].



Şekil 1.4. *Helicobacter pylori*'nin morfolojik görünümü

H. pylori üreaz enzimi sayesinde oldukça asidik olan mide mukozasında yaşayabilmektedir. Üreaz aktivitesiyle ortamdaki üreyi amonyak ve karbondioksit çevirir (Şekil 1.5), açığa çıkan NH_4 , pH'yı yükselterek bakterinin yaşayacağı bir ortam oluşturur [31].

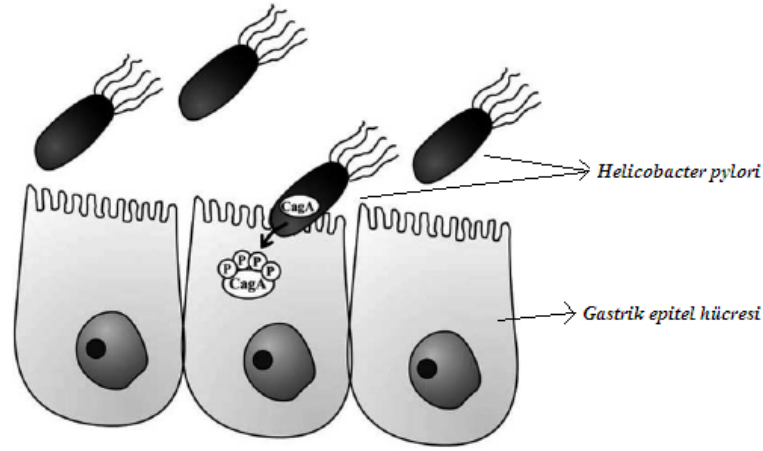


Şekil 1.5. Üreaz aktivitesi

1.3.2. *Helicobacter pylori* ve Mide Kanseri

Epidemiyolojik çalışmalar, *H. pylori* ile enfekte olmuş hastalarda adenokarsinoma oluşma riskinin 6 kat daha fazla olduğunu göstermiştir [32, 33]. IARC/WHO tarafından 1994'de *H. pylori* insan için tip I karsinojen olarak sınıflandırılmıştır [34]. *H. pylori* suşları, 40'dan fazla bakteri proteinini kodlayan, 40 kb'lık bir bölge olan *cag* patojenizite adasının (PAI) varlığı veya yokluğu bakımından tip I ve tip II olmak üzere

iki kısma ayrılabilir. Yapılan bazı çalışmalarda, $cagA^{(+)}$ *H. pylori* suşu ile enfekte olan gastrik epitel hücrelerinin hücre döngüsünde ve apoptoz mekanizmalarında çeşitli değişiklikler görülmüştür [35-37] (Şekil 1.6). *H. pylori* suşlarının yaklaşık % 50'si sitotoksin protein olan VacA'yi ifade eder. Bu toksin protein kendiliğinden epitel hücre membranından içeriye girip, bikarbonat ve organik anyonların salınmasına yol açarak transmembran porların oluşmasını sağlar. Bu da gastrik epitel hücrelerinin permeabilizasyonu ile üre geçişine imkan sağlar [35]. Gastrik kanser görülen hastaların çoğunda $VacA^{(+)}$ *H. pylori* suşlarına rastlanmıştır.



Şekil 1.6. *Helicobacter pylori* ile gastrik epitel hücrelerinin enfeksiyonu

H. pylori ile gelişen gastrik kanser oluşumunda iki temel mekanizma ileri sürülmektedir. Birincisi, gastrik epitel hücrelerinin aşırı derecede çoğalması (hiper proliferasyon), ikincisi ise mide mukozasının oksidatif hasara uğraması. *H. pylori* konakçı hücre içerisindeki MAP kinazların (mitojen aktive edici protein kinazlar) fosforilasyonunu başlatarak hücre bölünmesini ve farklılaşmasını hızlandırır. *H. pylori* $cag^{(+)}$ suşlarının $cag^{(-)}$ suşlarına göre daha fazla ve etkin bir şekilde MAP kinaz fosforilasyonunu başlattığı bilinmektedir [37, 38].

H. pylori enfeksiyonu konakçı hücrede oksijen radikallerinin ve peroksidatif hasarın artmasına neden olarak kanser gelişimini tetiklemektedir. Bazı çalışmalar, serbest radikallerin gastrik epitel hücrelerinde oksidatif hasarı doğrudan başlatmadığını, bu hasarın peroksi nitrit oluşumu yoluyla olduğunu göstermiştir [39]. Oksidatif DNA hasarının gastrik epitel hücrelerinde birikmesi sonucu, çeşitli gen modifikasyonları görülür ve sonrasında kanserli hücreler ortaya çıkar [40].

1.4. Metastas ve İnvazyon

Kanser ölümlerinin asıl nedeni primer tümör hücresinin oluşumundan ziyade, primer tümör hücresinin metastaz yapması olduğu bilinmektedir ve kanser ölümlerinin yaklaşık % 90'ı tümörün metastaz yapması yüzünden gerçekleşmektedir [41]. Çoğu kanser vakası ve kanserden ölüm durumu tümörün ilk olduğu bölgeden diğer bölgelere yayılmasından meydana gelir. Tümör yayılımı invazyon ve metastaz olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. İnvazyon olayında tümör hücresinin komşu organlara yayılımı söz konusu iken metastaz olayında tümör hücresinin invazyon yaptıktan sonra farklı organlara yayılması söz konusudur [4].

Kanser oluşumunda invazyon ve metastaz oldukça kompleks mekanizmalardır. Çünkü normal epitel hücreleri sıkı bir şekilde birbirleriyle yapışıktırlar ve bir bazal membran ile çevrelenmişlerdir. Tümör hücresinin invazyonunda bazal membran ve ekstraselüler matriksin yıkımı ile hücrelerin yüzey tutunma özellikleri (adhezyon) azalır ve hücre hareketliliği artar. Metastaz olayında ise bunlara ilave olarak tümör hücrelerinin kan ve lenf damarlarına girerek orada canlı kalmaları ve sonrasında çoğalarak farklı doku ve organlara yayılmaları gerçekleşir [4].

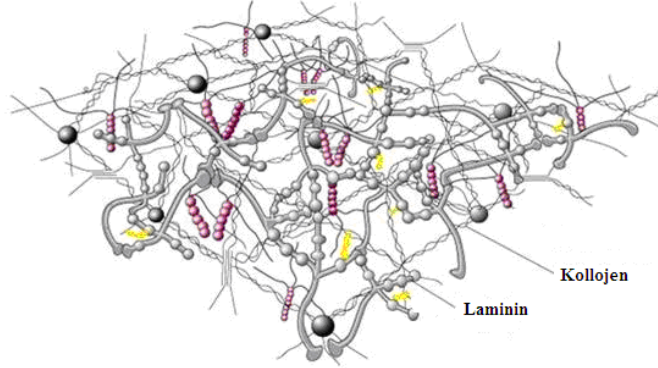
1.4.1. Hücre Hareketinin Biyokimyasal Kontrol Noktaları

Hücre şeklinin değiştirilmesinde hücre iskeletindeki ilk olaylar, hücre-hücre ve hücre-substrat arasındaki bağın zayıflamasıyla ilişkilidir. Hücre-hücre adezyonu, karsinojenik mutasyonlar ve hücre içerisinde bazı sinyal iletim faktörleriyle ilişkili olarak azalabilir [42].

1.4.2. Ekstraselüler Matriks

Hücreler karmaşık bir ekstraselüler matriksin (ESM) içine gömülü olarak bulunurlar. Bu ekstraselüler matriks hücrelere sadece mekanik destek sağlamakla kalmaz aynı zamanda hücre büyümesini, adezyonu ve hücre hareketini etkiler. Tümör invazyonunda, kanser hücreleri alt kısımlarda bulunan dokulara ve damarlara ulaşmak için ESM'i yıkmak zorundadırlar. ESM binlerce biyoyaktif molekül içerir fakat asıl yapıyı fibroz proteinler

ve polisakkaritler oluşturur (Şekil 1.7). İpliksi yapıdaki proteinler genel olarak yapısal (kollojenler ve elastin) ve adeziv (fibronektin ve laminin) olmak üzere iki fonksiyonel gruba ayrılırlar [43].



Şekil 1.7. Ekstraselüler matriks.

1.4.3. Bazal Lamina

Hücre dışı (ekstraselüler) matriksin bir tabakası olan bazal lamina ona bağlı olan hücreler tarafından sentezlenmektedir. Lamina densa ve lamina lucida olmak üzere iki tabakadan oluşur. Bazal laminanın yapısında bulunan tip 4 kollojen ve laminin kolayca kıvrılabileceği bir formda bir arada bulunurlar. Diğer bileşenler (ör: heparan sülfat, proteoglikanlar) bu yapıda bir iskele (çatı) görevi görür. Bazal laminanın bu yapısı mekanik bir destek sağlamanın yanı sıra, doku bileşenlerinin geçişi için seçici-geçirgen özellik gösteren bir bariyer görevi de üstlenir. Ayrıca, bazal laminanın yapısında hücre yüzey reseptörleriyle etkileşecek olan spesifik ligantlar bulunur. Bazal lamina ile hücre yüzeyinin bu şekilde etkileşimi hücrenin farklılaşmasını, metabolizmasını ve metastazını (hareketini) etkiler [44].

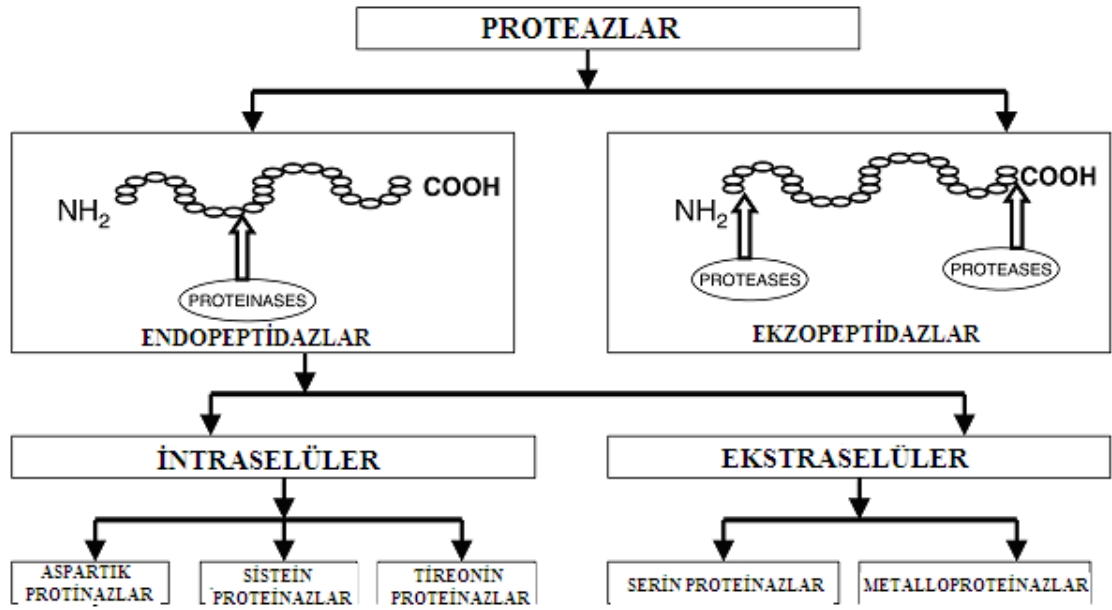
1.4.4. Ekstraselüler Matriks ve Kanser

Kanserin ortaya çıktığı bölgeden (orijininin) diğer bölgelere yayılması, kanser hücresi ve onun mikroçevresi arasında meydana gelen pek çok etkileşimle ilişkilidir. Bu bağlamda kanserin yayılmasında ekstraselüler matriks önemli bir rol oynamaktadır. ESM bileşenleri ve onların hücre membranında yer alan reseptörleri hem normal hem de anormal büyüme (kansere) esnasında meydana gelen değişikliklere maruz kalırlar [45],

46]. Tümör hücrelerinin bazal lamina boyunca göç etmesi için ESM bileşenlerinin yıkımı tümör hücreleri için bir ön gereksinimdir. Tümör hücrelerinin invazyonu için ESM bileşenlerinin yıkımında matriks metalloproteinazlar (MMP), ürokinaz aktivatörler ve benzeri proteolitik enzimler görev almaktadır. Proteolitik aktivasyon sonrası ESM'den çeşitli sinyal molekülleri ortaya çıkar ve bu sinyal molekülleri hücre yüzey reseptörleri ile etkileşerek tümör hücresinin invazyonunda düzenleyici bir mekanizma ortaya koyar [47, 48]. Ayrıca ESM bileşenlerinin tümör hücresinden salınan faktörler ile etkileşmesi sonucu hücrelerin hareketini kontrol eden bir sinyal mekanizması ortaya çıkar. Bu sinyal mekanizması, yani ligant-reseptör çiftinin bağlanmasından sonra sinyalin iletilmesi ve bu süreçte meydana gelen olaylar, hücre hareketinin regülasyonunda önemlidir [49].

1.5. Proteazlar

Tümör invazyonunda proteazların önemi ilk defa 1925 yılında Fischer tarafından bulundu. Daha sonra serin, sistein ve metalloproteinazlar gibi proteazların kanserle ilişkili oldukları anlaşıldı [50]. Proteazlar, peptit bağlarını kıran ve çeşitli biyolojik olayların gerçekleşmesinde önemli rol oynayan enzimlerdir [51]. Pek çok organizmanın genlerinin yaklaşık % 2'si proteazları kodlamaktadır ve hemen hemen çoğu fizyolojik olayda proteazlar rol oynamaktadır. Sindirimde, immünolojik fonksiyonlarda, büyüme ve apoptoz gibi pek çok olayda proteazlar öncü roller üstlenirler [52, 53]. Proteazların proteolitik aktiviteleri, düzensiz protein yıkımını önlemek için sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. Aksi takdirde proteolitik aktivitenin dengesizliği, osteoarthritis ve **kanser** gibi pek çok hastalığın ortaya çıkmasına neden olur [54]. Peptit bağının pozisyonuna bağlı olarak proteazlar, ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Şekil 1.8). Ekzopeptidazlar polipeptit zincirini ya amino uç kısmından ya da karboksi uç kısmından keserler. Böylece ekzopeptidazlar aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Proteinazlar olarak da bilinen endopeptidazlar molekülün ortasında yer alan peptit bağlarını kırarlar. Bunlar katalitik mekanizmalarına göre hücre içi ve hücre dışı olarak iki alt gruba ayrılırlar. Aspartik, sistein ve treonin proteinazlar hücre içi grup içinde yer alırken, serin proteinazlar ve **metalloproteinazlar** hücre dışı grupta yer alırlar [55].



Şekil 1.8. Proteazların sınıflandırılması.

1.5.1. Matriks Metalloproteinazlar

Hücre dışı proteinazlar büyüme, gelişme ve hastalıklarla ilişkili pek çok süreç için gerekli enzimlerdir. Hücre dışı proteinazlar olan ve matriksinler olarak da bilinen [56] matriks metalloproteinazlar (MMP) hücre dışı matriksi yıkan çinko bağımlı proteinazlardır. İnsanlardan amfibilere kadar pek çok organizmada bulunan MMP enzim grubunun yaklaşık 26 üyesi bulunmaktadır [57]. Bu enzimler embriyonik gelişme, yaraların iyileşmesi ve morfogenez gibi normal dokuların şekillenmesinin yanısıra, kronik ülser, artrit ve kanser gibi patolojik dokuların şekillenmesinde de rol oynarlar. Özellikle MMP'ler tümör invazyonunda, metastazda ve angiogenezde oldukça etkilidirler. Normal ve tümör hücrelerinin vücut boyunca hareket etmelerinde çok önemli işlevlere sahiptirler [58]. MMP'ler aynı zamanda düzenleyici moleküller olarak da görev yaparlar, adezyon molekülleriyle, sitokinlerle ve çeşitli büyüme faktörleriyle etkileşerek biyolojik olayların hızlanmasında veya yavaşlamasında etkili olurlar [58-60].

MMP'lerin her bir üyesi bir proteaz domaini içermektedir. Bu domain katalitik bir Zn atomuyla kompleks oluşturan üç histidin amino asidini yapısında bulundurmaktadır. MMP'ler bir de yapılarında düzenleyici domain içerirler. Bu domain

MMP'lerin aktif formda kalmasından sorumludur [61]. MMP'lerin çoğu latent formda sentezlenir, fakat birkaç tanesi de membran geçişli (transmembran) domainine sahiptir ve hücre membranına yapışık olarak bulunur. Substrat özgüllüğü ve dizi homolojisi bakımından MMP'ler beş alt guruba ayrılır (Çizelge 1.2). Bunlar, kollojenazlar, stromelisinler, jelatinazlar, membran bağımlı olanlar ve diğerleri şeklindedir [62].

a-) Kollojenazlar

Matriks metalloproteinaz ailesine ait üç kollojenaz olan *MMP-1*, *MMP-8* ve *MMP-13* ekstraselüler matriksin kollojen yapılarını yıkarlar. *MMP-1* intestinal kollojenaz, *MMP-8* nötrofil kollojenaz olarak da bilinir [63]. Kollojenazlar ayrıca büyüme faktörleri gibi matriks proteini olmayan diğer proteinleri de yıkarak, hücrenin büyümesine ve yaşam sürecine etki ederek bu yolda düzenleyici bir göreve sahiptirler. Organ gelişimi ve doku rejenerasyonunun yanı sıra kollojenazlar tümör gelişimi ve metastazda da önemli rol oynarlar. Proteinleri yıka bakımından oldukça yüksek bir potansiyel güce sahip oldukları için, kollojenazların aktiviteleri ve ifadeleri sıkı bir şekilde kontrol altındadır. Bu kontrol transkripsiyon ve post transkripsiyon seviyesinde hücre içi ve hücre dışı sinyal yollarıyla gerçekleşmektedir [64].

b-) Sitromelisinler

MMP-3 (sitromelisin-1), *MMP-10* (sitromelisin-2) ve *MMP-11* (sitromelisin-3) sitromelisinler grubunu oluşturan matriks metalloproteinazlardır. *MMP-3* ve *MMP-10* peptidoglikan core proteinlerini, laminin, fibronektin, elastin, jelatin, kollojen tip III, tip IV, tip V, tip VII ve tip IX gibi oldukça geniş bir substrat spesifitesiyle ekstra selüler matriks bileşenlerini yıkarken, *MMP-11* ise büyük ekstraselüler matriks bileşenlerinin hiç birini yıkamamaktadır. Sitromelisinler yara iyileşmesi, iltihaplı hastalıklar ve tümör invazyonunda önemli ölçüde rol oynarlar [64, 65].

c-) Jelatinazlar

Jelatinazlar grubunu *MMP-2* (Jelatinaz A) ve *MMP-9* (Jelatinaz B) oluşturmaktadır. Bu iki enzim ekstraselüler matriksin jelatin, laminin ve fibriler olmayan kollojen tip IV ve tip V bileşenlerini yıkarlar. *MMP-2* ve *MMP-9* anjiogenezde çok önemli rol oynarlar

[66]. MMP'ler hücre için yabancı ve tehlike uyandıran ajanları ortadan kaldırmak için ortama salınırlar fakat, aşırı derecede salındıklarında ekstraselüler matriksi ve hücreleri tahrip ederler ve akabinde iltahap oluşumunu uyarırlar [67]. *MMP-2* fibroblast, endotel hücreler ve epitel hücreler gibi pek çok hücre tipinde sentezlenir. *MMP-9* ise genellikle makrofajlar, nötrofiller, monositler gibi iltihaplanmayla ilişkili hücreler tarafından sentezlenir [66, 68].

d-) Membran Bağımlı Metalloproteinazlar

Membran bağımlı matriks metalloproteinazlar hücre membranına bağlı bir şekilde bulunurlar. Hücre yüzeyinde lokalize olmuş bu enzimler hücre ile matriks arasındaki etkileşimde önemli rol oynarlar. MT-MMP-1 (MMP-14), MT- MMP-2 (MMP-15), MT-MMP-3 (MMP-16), MT-MMP-4 (MMP-17), MT-MMP-5 (MMP-24) ve MT-MMP-6 (MMP-25) bilinen membran bağımlı matriks metalloproteinazlardır [69, 70]. MMP-14 hücre yüzeyinde aktif formda bulunan bir enzim olup, hücre dışı matriksin laminin, kollojen, fibronektin gibi bileşenlerini yıkar. Hücre yüzeyinde lokalize olmuş bu MMP'ler, hücre-matriks etkileşimi ve diğer MMP'lerin aktivasyonunda görev alabilecekleri belirtilmiştir. Bu bağlamda MMP-14 ve MMP-15 aktif olmayan formdaki pro MMP-2 ve pro MMP-13'ü aktive eder [71-74]. MT-MMP'ler kanserde invazyon bakımından önemli etkilere sahiplerdir ve bu MMP'lerin ifade seviyeleri kanser dokularında artış göstermektedir [75].

e-) Diğer MMP'ler

Hücre dışı matriksin elastin bileşenini yıkan bu grubun içinde MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-23 ve MMP-28 yer alır. MMP-19 ESM ve bazı zarın bir çok bileşenini yıkabilir fakat hiç bir proMMP'yi aktive edemez [76]. MMP-23 çoğunlukla yumurtalık, testis ve prostat gibi organlarda ifade olur ve üreme prosesinde özgül bir role sahiptir [77]. Literatürde bu grup MMP'ler ile ilgili çok fazla bilgi bulunmamaktadır ve bu çalışma ile bu grup MMP'ler hakkında da literatüre yeni veriler sunulmuştur.

Çizelge 1.2. Matriks metalloproteinazların sınıflandırılması

Grup	MMP proteini	Enzim İsmi	Grup substratları
Kollojenazlar	MMP-1 MMP-8 MMP-13	İntestinal kollojenaz Nötrofil kollojenaz Kollojenaz-3	Kollojenaz I, II, III, VII, VIII, X, Jelatin, PG kor protein
Jelatinazlar	MMP-2 MMP-9	Jelatinaz-A Jelatinaz-B	Kollojenaz I, II, III, IV, V, VII, X, XI, elastin, jelatin, fibronektin, PG kor protein
Sitromelisinler	MMP-3 MMP-10 MMP-11 MMP-7	Sitromelisin-1 Sitromelisin-2 Sitromelisin-3 Matrilisin	PG kor protein, fibronektin, laminin, kollojen IV, V, X, XI, elastin
Membran bağımlı MMP'ler	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP	Jelatinaz-A, kollojen I, II, III, jelatin , proteoglikan, fibronektin, vibronektin, laminin-1
Diğerleri	MMP-12 MMP-19 MMP-20 MMP-23 MMP-28	Metallo-elastaz Enamelisin Epilisin	Elastin ,kollojen V, jelatin, fibronektin, fibrinojen

PG = Peptidoglikan

1.5.2. MMP'lerin Biyolojik Fonksiyonları

Ekstra selüler matriksin yıkılması embriyonik gelişim, organ morfogenezi, kemiklerin şekillenmesi, yaraların iyileşmesi, metastaz ve apoptoz gibi pek çok normal biyolojik proses için gereklidir. MMP'lerin bu tür biyolojik olaylarda rol aldıkları düşünülmektedir. Ayrıca MMP'ler kanser, nörolojik hastalıklar, kan beyin bariyerinin kırılması, kardiyovasküler hastalıklar, gastrik ülser gibi pek çok hastalıkta rol oynarlar [78, 79]. MMP'lerin karsinogenezi başlatarak, metastatik yayılım için bazal membran bariyerlerini kırıp tümör ilerlemesine katkıda buldukları varsayılmaktadır. Son

zamanlardaki çalışmalar MMP'lerin tümör hücrelerinin hayatta kalmalarında da önemli rol oynadıklarını göstermektedir [80- 82].

1.5.3. MMP'lerin Hücresel Kaynağı

MMP'lerin normal dokularda ifade edildikleri bilinmektedir. MMP-2'nin normal yetişkin dokularında stromal hücrelerde en çok ifade edilen enzim olduğu rapor edilmektedir. *MMP-7* daha çok gastrointestinal sistem ve endometriumda ifade olurken *MMP-9*'un hemopoietik hücrelerde ifade olduğu bilinmektedir [83]. Çoğu malignan tümörlerde MMP'lerin öncelikli kaynağı stromal fibroblastlardır. Ayrıca iltihaplanmaya yol açan hücreler tarafından üretilen sitokinler, tümör ve stromal hücrelerdeki MMP ifadesini artırmaktadır [84].

1.5.4. MMP Doku İnhibitörleri (TIMP)

Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) ESM'in şekillenmesi, büyüme faktörleri ve reseptörlerinin aktivitesi, MMP'lerin inhibisyonu gibi çeşitli biyolojik prosesleri regüle ederler. Son yıllarda yapılan çalışmalar, dört üyesi (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 TIMP-4) bulunan bu grubun hücre proliferasyonu (çoğalması) ve apoptoz gibi çok önemli proseslerde de rol oynadıklarını göstermiştir [85]. Fizyo-patolojik proseslerde ESM yıkımı MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki ilişki ile dengelenmektedir. TIMP-1 ve TIMP-2 MMP'lerin aktivitesini inhibe ederek tümör büyümesini, metastaz ve invazyonu engeller [86]. Sadece ESM'de bulunan TIMP-3'ün ise bazı hücre tiplerinde hücre döngüsüne bağımlı olayları regüle ettiği bilinmektedir [87].

1.5.5. MMP'lerin Regülasyonu

MMP'lerin fonksiyonlarının regülasyonu çok yönlü bir şekilde gerçekleşmektedir. Transkripsiyon, salgılanma, zimojen aktivasyonu ve proteolitik aktivitenin inhibisyonu çok yönlü regülasyon prosesinde yer alan mekanizmalardır [88]. Normal *in vivo* durumlar altında MMP'lerin aktivitesi sıkı bir şekilde kontrol edilir. Normal koşullarda dokulardaki MMP ifadesi düşük seviyelerde görülür fakat bu seviye kanser, doku tahribi ve iltihaplanma gibi durumlarda hızlı bir şekilde üst seviyelere çıkmaktadır [84]. MMP'lerin transkripsiyon seviyesinde regülasyonuna TNF α , EGF, IL-1 IL-6, TNF β

gibi çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri katılır ve bu faktörler hücre çeşidine ve durumuna göre MMP'lerin üretimini artırır. Aynı zamanda onkogenler, hormonlar ve çeşitli kimyasal ajanlar, hücre-hücre etkileşimleri ve hücre-matriks etkileşimleri MMP'lerin ifadesini artırabilir veya azaltabilir [88]. MMP genleri ekstraselüler uyarılarla indüklenebilirler [89].

MMP'lerin çoğu hücreler tarafından inaktif zimojenler olarak salgılanırlar. Periselüler boşlukta proteolitik olarak aktive edilirler. ProMMP formunun bu latentliği prodomeindeki sistein ile katalitik domaindeki çinko arasında yer alan kovalent bağ vasıtasıyla gerçekleşir. Buradaki sistein-çinko etkileşiminin ortadan kalkması ile MMP'ler aktif hale gelirler. ProMMP'ler reaktif oksijen türleri ve bazı deterjanlar gibi ajanlarla da aktive edilebilirler [79, 90].

1.6. Wnt Sinyal Yolu

Wnt sinyal yolu, birçok canlı türünde organ gelişimi, hücre adezyonu, hücre polaritesi, hücre bölünmesi ve hücre göçü gibi pek çok biyolojik prosede rol oynar [91 -97]. Fakat normal fonksiyonunun dışında anormal bir şekilde aktive olduğunda kanser oluşumu ile ilişkili roller üstlenir. Örneğin kolorektal kanserlerin % 90'ından daha fazlası bu sinyal yolunda ortaya çıkan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır [94]. *Wnt* ailesine ait genler sinyal molekülleri olarak görev yapan bir grup glikoproteinleri kodlamaktadırlar. Genellikle 350-400 amino asit uzunluğundaki bu glikoproteinleri kodlayan *Wnt* genleri memelilerden nematolara (*C.elegans*) kadar pek çok canlı türünde homolog genler olarak bulunmaktadır [98]. Wnt ailesi sistein amino asidi bakımından zengin olan en az 19 tane glikoprotein içermektedir. Bunlar genellikle hücreye bağlı olarak bulunurlar, çok azı ekstraselüler olarak bulunur. Wnt proteinlerinin doğrudan neoplastik transformasyon ile ilişkili oldukları görülmüştür [94].

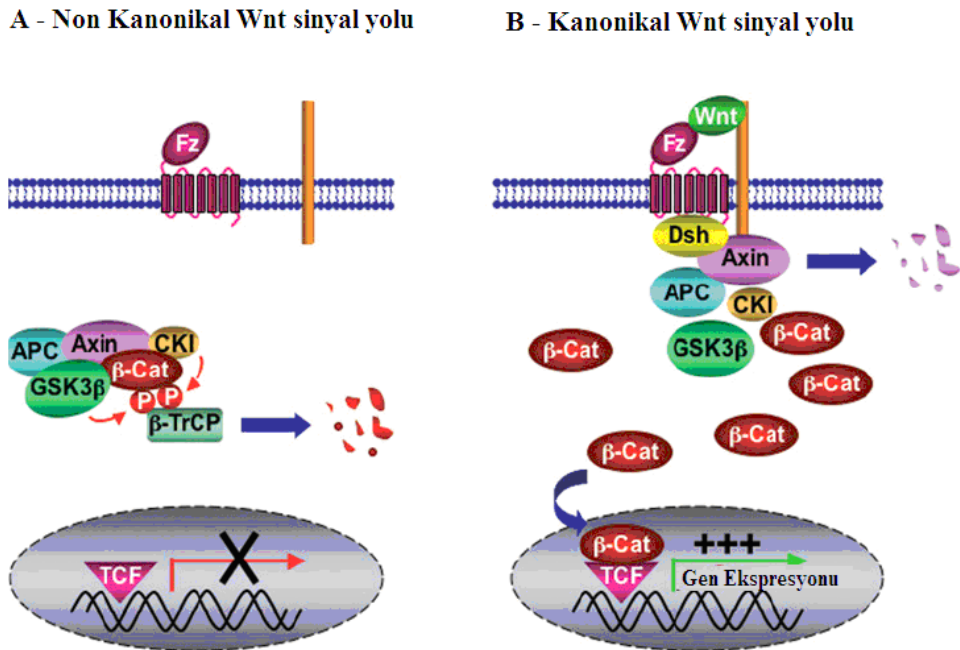
Wnt sinyal yolu kanonikal ve non-kanonikal wnt sinyal yolu olmak üzere ikiye ayrılır;

a-) Kanonikal Wnt sinyal yolu: Wnt/ β -katenin sinyal yolu olarak da ifade edilen bu sinyal yolunda, Wnt proteini Frizzled genleri (*FZD1-10*) tarafından kodlanan Wnt reseptörlerinden bir tanesine bağlanır. Wnt'in bağlanması sitoplazmik bir protein olan Dishevelled'in (Dsh) fosforilasyonuna neden olur, fosforillenmiş Dsh axin'e bağlanır böylece APC/axin/GSK kompleksi birbirinden ayrılır. Böylece β -katenin

fosforillenmeden serbest kalır ve çekirdeğe transfer olur. Çekirdeğe transfer olan β -katenin bir transkripsiyon faktörü olan T-cell faktöre bağlanarak *cMyc*, *cyclin D1* ve *MMP-7* gibi pek çok genin transkripsiyonunu aktive eder (Şekil 1.9). Böylece nükleer β -katenin karsinogenez ile ilgili genlerin transkripsiyonunu etkilemesi bakımından aktif Wnt sinyal yolunun önemli bir markırırır [94].

b-) Non-kanonikal Wnt sinyal yolu: β -katenin'in rol oynamadığı bu sinyal yolunda Wnt'in bağlanması iki farklı yolda sinyal iletimine neden olabilir. Birincisi, Wnt bazı FZD reseptörlerine bağlanarak hücre içine kalsiyum salınımı sağlayarak protein kinaz-C'yi (PKC) aktive eder. İkincisi ise Dsh, jun-N terminal kinaz (JNK) sinyal yolunu aktive eder. JNK çekirdeğe transfer olur ve burada c-jun, ATF ve p53 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder [94].

Kanonikal Wnt sinyal yolunun kanser oluşumu ile ilişkisi olduğu bilinirken, non-kanonikal Wnt sinyal yolunun kanser oluşumu ile ilişkisi henüz tam olarak anlaşılmamıştır [94].



Şekil 1.9 . Kanonikal ve non-kanonikal Wnt sinyal yolu

1.6.1. β -katenin

Kateninler α , β ve γ olmak üzere üç çeşit olup sitoplazmik proteinlerdir. Bu proteinler hücreler arası bağlantıda E-kaderin ile ilişkilidirler. β -katenin Wnt sinyal yolunun önemli bir bileşenidir [43]. Omurgalı canlılarda β -katenin, embriyonik gelişim ve tümör oluşumunda çok önemli role sahiptir [99,100]. GSK-3 β ve diğer kinazlar β -katenin'i fosforile ederek stabil olmayan hale sokarlar. Pek çok tümör hücresinde β -kateninde yer alan bu fosforilasyon bölgesinin mutasyonuna rastlanmıştır [101]. Aynı zamanda β -katenin T-cell faktör (TCF) ailesinin transkripsiyon faktörleriyle etkileşerek bazı genlerin regülasyonunu sağlamaktadır. Örneğin, kolorektal kanserde *MMP-7*'nin yüksek oranlarda ifadesinde β -katenin önemli rol oynamaktadır [102]. Ayrıca β -katenin'in hücre büyümesi, hücre hareketi ve tümör oluşumunda rol oynadığı görülmektedir [103].

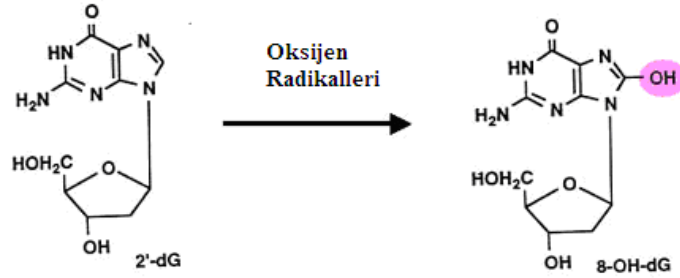
1.7. Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz enerji gerektiren biyokimyasal bir mekanizmadır. Apoptoz embriyonik gelişim, immün sistemin çalışması, normal hücre gelişimi gibi çeşitli biyolojik olaylarda oldukça önemli olan bir prosedir [104]. Apoptoz dışarıdan (extrinsic) ve içeriden (intrinsic) uyarılmak üzere iki ayrı sinyal yoluyla gelişebilir. Hücre dışından gelen faktörlerle gelişen apoptoz, tümör nekrosis faktör (TNF) ligantları ile aktive olan spesifik reseptörlerin indüklenmesiyle başlar. Hücre içi faktörlerle gelişen apoptozde ise mitokondriden başlayan hücre içi bir takım sinyal yollarıyla gelişir. Her iki durumda da apoptozun gerçekleşmesinde kaspazlar olarak adlandırılan spesifik proteazlar rol oynamaktadır [105].

Kaspazlar aspartat-spesifik sistein proteazlardır ve substratlarını aspartat kısmından keserler. Kaspazlar inaktif polipeptitler (zimojen) olarak sentezlenirler ve daha sonra bu prokaspazlar aktif kaspazlar haline dönüşürler. Yaklaşık 15 çeşit kaspaz bulunmaktadır [106].

1.8. 8-OHdG

Oksidatif stres DNA üzerinde zincir kırıkları, pürinsiz (apurinic) bölge oluşumu (AP), şeker hasarı, DNA-protein çapraz bağlanması, pürin ve pirimidin bazlarının modifikasyonu gibi çeşitli hasarlara neden olmaktadır [107]. Cu^{+2} iyonları en çok G-C'ce zengin bölgelerde bulunduğundan, en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz guanindir. Bu iyonların polianyonik karakterde olan DNA'nın özellikle guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlandığı ve H_2O_2 ile etkileşime girerek DNA hasarını başlattığı gösterilmiştir (Şekil 1.10). Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-OHdG'dir [108]. 8-OHdG içeren DNA'nın, *in vitro* DNA sentezi sırasında bir kalıp olarak kullanıldığı zaman yanlış okumaya ve GC—TA mutajenezine yol açtığı gösterilmiştir [109].



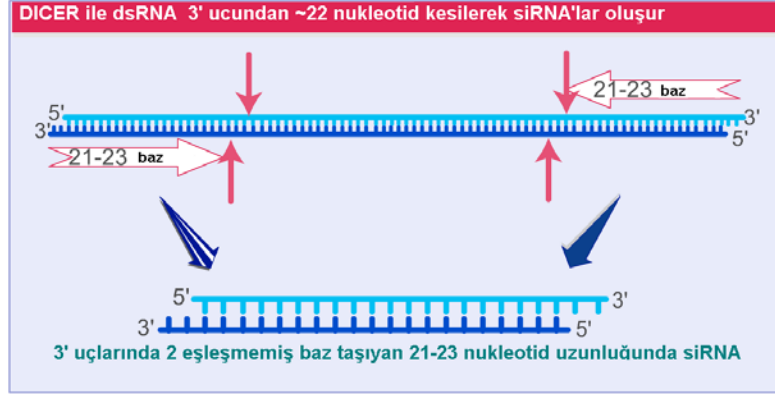
Şekil 1.10. Oksijen radikalleri ile 8-OHdG oluşumu

1.9. RNA Müdahalesi (RNAi)

RNA müdahalesi çeşitli organizmalarda hemeostasiyi devam ettirmek için genlerin ifadesini düzenleyen endojen bir prosedir [110]. Son yıllarda keşfedilen RNA müdahalesi teknolojisi gen ifadesini susturmak için oldukça etkili bir yöntemdir. Post-transkripsiyonel gen susturulması prosesini içeren RNAi'nin temelinde, susturulacak hedef mRNA'ya dizi özgüllüğü gösteren ve onu inhibe eden çift zincirli RNA'lar yatmaktadır. Diğer gen ifadesi susturma yöntemlerine (anti-sens teknolojisi ve knock-out teknolojisi) göre oldukça başarılı olan RNAi, pek çok kanser türünde yüksek potansiyele sahip etkili bir terapotik araç olarak düşünülmekte ve kullanılmaktadır [111]. Tümör hücrelerinde invazyona yol açan *MMP-3*'ün bu teknoloji ile susturulması buradaki çalışmanın amaçları arasında yer almaktadır.

1.9.1. RNAi Mekanizmasında Rol Alan Moleküller

Dicer: Çift zincirli RNA'ya özgül olan ve RNAaz III ailesinine dahil bir ribonükleazdır. ATP bağımlı; dimer bir yapıya sahiptir. Enzim, uzun çift zincirli RNA'yı 21-25 nükleotid uzunluğundaki küçük RNA (siRNA) parçalarına ayırır (Şekil 1.11) [112].



Şekil 1.11. Dicer ile uzun çift zincirli RNA (dsRNA)'dan siRNA oluşumu.

Küçük müdahaleci (siRNA) RNA'lar: Küçük RNA'lar yaklaşık 21-23 nükleotid uzunluğunda, hem anlamlı hem de anlamsız zincire sahip çift zincirli RNA'lardır. Dicer enziminin spesifik olmayan nükleaz aktivitesiyle uzun çift zincirli RNA'lardan oluşurlar. siRNA'ların her iki zincirinde; 5'-fosfat ucuna; 3'-hidroksil ucuna ve 3' ucunda 2/3-nükleotidlik eşleşmemiş açık uç bulunur. Oldukça etkili olan bu siRNA'ların ortak özelliklerine baktığımızda sens zincirin nisbeten kararlı 5' ucu anti-sens zincirinin nisbeten kararsız 5' ucu ve çift zincirli yapının ortasında kesim bölgesinde bir kararsızlık söz konusudur [112, 113].

MikroRNA (miRNA)'lar: miRNA'lar bitki ve hayvan genomlarından kodlanan ancak bir proteine transle olmayan çift zincirli kısa RNA molekülleridir. Bu oldukça korunmuş yaklaşık 21 nükleotid uzunluğundaki yapılar hedef mRNA'ların 3' transle olmayan bölgelerine bağlanarak gen ifadesini düzenlerler. Yüksek ökaryotlarda miRNA'ların rolünün neredeyse transkripsiyon faktörleri kadar önemli olduğu sanılmaktadır [113, 114].

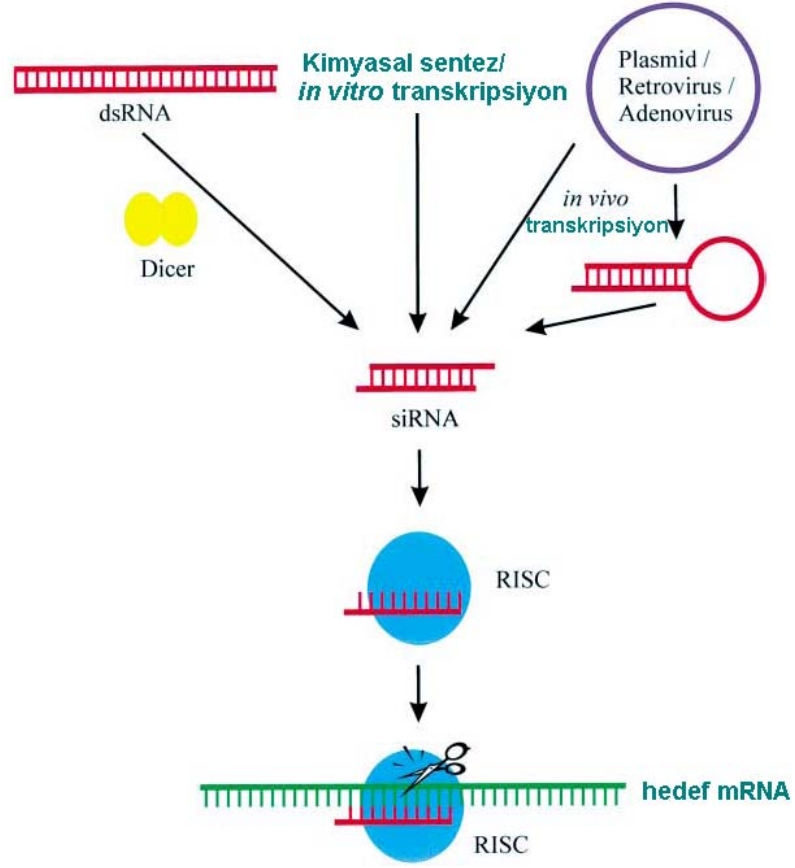
İnsan genomunda 200-300 kadar özel miRNA geninin olduğu sanılmaktadır. Dizileri canlı grupları arasında önemli benzerlik göstermektedir. Bu da bu moleküllerin oldukça eski ve düzenleyici bir rolüne işaret etmektedir. Bazı miRNA genleri

kromozomlar üzerinde genellikle normal genlerin bulunmadığı bölgelerde bulunurlar ve bağımsız olarak transkribe olurlar. İntronların birçoğu ise primer mRNA (işlenmemiş mRNA)'nın intronları tarafından kodlanır. siRNA'lardan farklı olarak çift zincirli bir gövde ve tek zincirden oluşan bir baş kısmı taşırlar (saç tokası şeklinde, İng. hairpin) [115, 116].

RNA ile indüklenen susturma kompleksi-(RISC): Çok alt üniteli kompleks bir RNA nükleaz'dır. Yapısı henüz tam olarak anlaşılammış olup yaklaşık 500 kDa büyüklüğünde ve argonat ailesi üyesidir. Yapısında RNA bağlayıcı proteinler ve RNA helikaz bulunmaktadır. RNA bağlayıcı proteinler ile çift zincirli RNA'lara bağlanır, helikaz enzimi ile de çift zincirli RNA'nın sens ve anti-sens zincirlerini birbirinden ayırır. siRNA'lar ve miRNA'lar tarafından aktive olan ATP bağımlı bir enzim olup dizi özgüllü gösteren bir nükleaz'dır. Tam komplementerlik gerektirir, yani hedef mRNA dizisi ile anti-sens zincir arasında tam bir komplementerlik söz konusu olduğunda nükleaz aktivitesi gösterir. Kesme bölgesi komplementer olunan bölgenin tam ortasında yer alır [117, 118].

1.9.2. RNAi ile Gen Susturulması

RNA müdahalesi (RNAi) bitkiler ve hayvanlarda gözlenen diziye özgü transkripsiyon sonrası bir gen susturma mekanizmasıdır. Bu mekanizma genin mRNA dizisine komplementer çift iplikli RNA tarafından uyarılır. Çift iplikli RNA molekülü, aktarıldığı hücrelerde 21-25 bazlık küçük RNA parçaları (siRNA) halinde işlev görür. Hücre içerisinde siRNA parçaları, çok bileşenli bir nükleaz olan RNA tetikli susturma kompleksi (RISC) ile etkileşerek hücre mRNA'sının diziye özgü olarak yıkımında görev alır (Şekil 1.12). Doğada bulunan bu mekanizma, moleküler biyolojide gen-protein işlevi analizi ve gen tedavisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir [115, 117- 119] .



Şekil 1.12. RNA müdahalesi (RNAi) ile gen susuturum mekanizması

1.9.3. miRNA ve siRNA'nın Moleküler Mekanizması

miRNA ve siRNA moleküler mekanizmada stratejik olarak farklı şekillerde rol alırlar. Moleküler orijinleri ile de miRNA'lar siRNA'lardan farklıdırlar. miRNA'lar genom tarafında kodlanan bir prekürsörden yapılırlarken, siRNA'lar uzun dsRNA'lardan oluşurlar ve bu dsRNA'lar eksojen kaynaklı da olabilirler (ör.viral veya kimyasal olarak yapılmış dsRNA'lar). miRNA'lar genellikle 3'transle olmayan mRNA bölgelerine bağlanıp hedef mRNA'nın translasyonunu negatif etkilerken, siRNA'lar hedef mRNA'lar ile kusursuz komplementerlik oluştururlar ve bu bölgeden hedef mRNA kesilir. miRNA'nın peş peşe kesilip işlenmesi ve olgunlaşması iki RNaz enzimi ile başarılır. Bu enzimlerin her ikisi de dsRNA spesifik endonükleazlar olup 3'ucunda 2 eşleşmemiş nukleotid bulunduran dsRNA'lar üretirler. Drosha esas olarak nukleusta bulunur. Drosha tarafından nukleusta üretilen pre-miRNA'lar eksportin proteinleri yardımı ile sitoplasmaya gelir ve burada DICER tarafından ikinci bir işleme tabi tutulur ve olgun miRNA'lar oluşur [115, 118, 120].

1.9.4. RNAi Mekanizmasının Sürekliliği

RNAi teknolojisinin uygulanmasında bir problem olarak hedef mRNA'yı kesen mekanizmanın sürekli olarak işlemesi gerekmektedir. Bu mekanizma sürekli işlediği takdirde etkili bir gen susturulması mümkün olmaktadır. Bazı canlılarda (bitkiler ve *C. elegans*) bu mekanizmayı sürekli hale sokacak RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi mevcuttur. Bu enzim kesilen mRNA'nın bir parçasını ve siRNA'ları kalıp olarak alıp bunlardan tekrar çift zincirli RNA'lar oluşturur ve mekanizma tekrar başlayarak devam eder. Fakat RNA bağımlı RNA polimeraz memelilerde ve *D. melanogaster*'de bulunmamaktadır. Bu canlılarda etkili bir şekilde gen susturulması için endojen olarak siRNA sentezleme mekanizmaları geliştirilmektedir [112, 119, 121].

1.9.5. RNAi ve Kanser

RNAi çeşitli kanserlerin tedavisinde gen terapisinin uygulanması bakımından oldukça gelecek vaat edici bir teknolojidir [110]. Kanser hücreleri, onko-genler ve tümör-baskılayıcı genlerin az ifade olması, fazla ifade olması veya delesyona uğraması ile karakterizedirler. Bu bağlamda, tümör hücreleri ile normal hücreler karşılaştırıldığında ve kodlanmayan RNA (ncRNA)'ların kanser hücrelerinde zarara uğradıkları görülmüştür ve bu açıdan kodlanmayan RNA'ların kanser oluşumunda ve kanserin ilerlemesinde önemli olabileceği düşünülmüştür [110, 122]. Şu ana kadar memelilerde siRNA'ların endojen olarak ifade edildiklerine yönelik bir veri bulunmamaktadır. Fakat miRNA'ların çeşitli organizmalarda ve hücre tiplerinde buldukları bilinmektedir [123]. Çeşitli miRNA'ların ifadeleri, kronik lenfoik lösemi, kolorektal neoplasmia, Burkitt's lenfoma gibi çeşitli kanserlerde görülmektedir [124 -126]. İnsan miRNA'ları bazı kanserlerde ilişkisi olan genomik bölgelerde ve kırılma bölgelerinde daha çok lokalize olmuşlardır [127].

Son zamanlarda genlerin fonksiyonlarını ve ilişkili birçok metabolik yolun yapısını anlamak için siRNA teknolojisi kullanılmaktadır. Aynı zamanda kanserin de aralarında yer aldığı pek çok hastalığın tedavisine yönelik kullanım alanları amaçlanmıştır [128]. Bu amaçlara ulaşmak için RNAi teknolojisi tümör oluşumu, büyümesi ve metastas gibi kanserin önemli ve değişik aşamalarında kullanılmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kanser çok basamaklı genetik bir hastalık olup hedef genlerdeki bozuklukların birikimi sonucu ortaya çıkar. Mitokondriyel solunum sonucu ortaya çıkan ya da dışarıdan maruz kalınan serbest radikaller eğer hücre içi mekanizmalarla elimine edilmezlerse hücre içinde bulunan proteinlerde, lipidlerde ve nükleik asitlerde hasar meydana getirerek işlevlerini yapmalarını engelleyebilirler. Oksidatif stress ile kanser oluşumu arasındaki ilişkiye yönelik çalışmalar [16, 21, 22, 27, 129] olmasına rağmen ilişki mekanizması çok iyi bilinmemektedir.

Literatürde, mide kanserinde *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-13* genlerinin ifadesinde artış olduğu gösterilmiştir. *MMP-2* ve *MMP-13*'ün ifadesindeki artış tümör ilerlemesini ve invaziv fenotipi beraberinde getirmiştir [130]. Ayrıca Bloomston ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, pankreas kanserinde *MMP-2* ve *MMP-9* genlerinin ifadesinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. [131].

Son yapılan genomik çalışmalardan, matriks metalloproteinazları kodlayan 24 farklı genin olduğunu ve bunlardan sadece iki tanesinin Wnt sinyal yoluyla ilişkili olduğu bilirlenmiştir. Matriks metalloproteinaz-7 (*MMP-7*) ve matriks metalloproteinaz-26'nın promotorlarının fosforillenmemiş nükleer β -katenin ile aktive olabilecekleri gösterilmiştir [132, 133]. Özellikle epitelial orijinli kanserler başta olmak üzere pek çok kanser türünde yüksek bir *MMP-7* ifadesi bulunmuştur. Ayrıca normal dokularla karşılaştırıldığında tümörlü dokularda bu genin daha yüksek bir ifadesi görülmüştür [129].

H. pylori efeksiyonu gastrit, peptik ülser ve mide kanseri oluşumunda etkilidir. Ancak burada tümör oluşumunda ve tümör invazyonunda yer alan moleküller ve mekanizmalar hala tam olarak bilinmemektedir. *H. pylori* efeksiyonunun, bağışıklık sisteminin aktivasyonuna bağlı olarak, oksidatif stres yarattığı bilinmektedir. Bu da bakteri efektör molekülleri, epitel hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki dengeyi bozarak onkojenik potansiyel teşkil eden mutasyonların birikimine sebep olup damarlanmayı (anjiogenez), tümör gelişimini, tümör invazyonunu ve metastazı destekler [37, 38].

H. pylori ile enfekte olmuş kanserli mide dokusunda *MMP-7* geninin ifadesinde bir artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *H. pylori*'nin *MMP-2* ve *MMP-9* ifadesini de arttırdığı bilinmektedir [36, 37].

İnvazyon ve metastaz tümör hücrelerinin bazal membrana bağlanmalarını, bölgesel bağ dokuyu parçalamalarını ve akabinde sindirilmiş dokudan çıkarak geçmelerini içerir. Bağ doku yıkımının büyük kısmını çinkoya bağımlı olan ve bağ dokunun her bileşenini yok eden matriks metalloproteinazlar (MMP) gerçekleştirmektedir. Bununla birlikte Wnt sinyal yolunun bazı MMP'leri regüle ettiği gösterilmiştir [94]. β -katenin Wnt sinyalyolunda yer alan ve bazı MMP'lerin regülasyonunda rol alan bir proteindir. İnvaziv mide kanserlerinde MMP'lerin ve β -katenin'in regülasyonunda normalden farklılıklar görülmekle birlikte bu farklılıklarla oksidatif stres arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma yoktur.

Yapılan çalışmalar uzun süreli oksidatif strese maruz kalan meme epitel dokusunda, oksidatif stresin, *MMP-3*, *MMP-10* ve *MMP-13*'ü aktif hale getirerek, E-kaderin ve integrin ifadelerini etkileyerek, hücrelere invaziv bir potansiyel verdiği [134, 135], HT-29 kolorektal kanser hücre hattında oksidatif stresin *MMP-7* mRNA ve protein düzeyini arttırdığı [136] ve göz kanseri biyopsilerinde ve hücre hatlarında da, hücre içinde MMP ve matriks metaloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) dengesinin MMP'ler yönünde olduğu gösterilmiştir [137]. Bu da bize mide mukozasında oksidatif stress varlığında *MMP*'lerin ifadesinde değişiklik olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, mide kanserinde *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-13* genlerinin ifadesinde artış gösterilmiştir. *MMP-2* ve *MMP-13*'ün ifadesindeki artış tümör ilerlemesini ve invaziv fenotipi beraberinde getirmiştir [130]. Bunlarla birlikte, mide kanserinde MMP genlerinde oksidatif strese bağlı değişikliklerle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Gastrik kanser hücre hattı olan MGC803'de H_2O_2 ile indüklenen apoptozun moleküler mekanizması araştırılmıştır. H_2O_2 'e maruz kalan hücrelerde canlılık oranının azaldığı ve apoptozun arttığı görülmüştür. Hücreler 400 μ M H_2O_2 ile muamele edildiğinde, *Bax* geninin ifadesi artarken, *Bcl-2* geninin ifadesinin azaldığı görülmüştür. Oksidatif stres altındaki MGC803 hücre hattının apoptoz mekanizmasında, Fas aracılı yüzey reseptörlerinin ve mitokondri aracılı apoptotik yolların aktif olduğu görülmüştür [138].

Buna ek olarak, *MMP-7* ve *MMP-26* genlerinin Wnt sinyal yolunda yer aldığı ve β -katenin tarafından regüle edildiği bilinmektedir. [139, 140]. Gastrik kanserlerde *MMP-26* ile ilgili bir çalışmaya henüz rastlanılmamıştır. Wnt sinyal yolu gelişim süresince yetişkin dokularında hücre kaderini ve hücre proliferasyonunu regüle ettiği gibi mide dokusunda da aynı işlemi yapar [141]. Gastrik kanserde Wnt sinyal yolu

bozuklukları gösterilmiştir ve ifadesi artan Wnt sinyal yolu moleküllerinin *WNT2*, *β-katenin* ve *MMP-7* olduğu rapor edilmiştir [142, 143]. Ancak mide kanserinde oksidatif stresin Wnt sinyal yolu molekülleri üzerindeki etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir.

Gastrik adenokarsinoma dokularında Wnt sinyal yolu analizine yönelik yapılan çalışmada, 311 gastrik adenoma dokusunda immünohistokimyasal yöntemle *β-katenin*'in hücre içerisindeki lokalizasyonu incelenmiştir. Çalışma sonucunda, 90 gastrik kanser dokusunda (% 29) nükleer *β-katenin* lokalizasyonu görülürken, 221 dokuda (% 71) membranöz *β-katenin* lokalizasyonu görülmüştür [144].

Ayrıca gastrik kanserde *MMP* genlerinin ve *β-katenin*'in regülasyonunu anlamaya yönelik bir gen susturum teknolojisi olan RNAi teknolojisinin kullanıldığı çok az çalışma vardır. Bu tez kapsamında bu sinyal yolunda yer alan ve diğer *MMP*'leri regüle ettiği düşünülen *MMP-3*'ün özgül siRNA'lar kullanılarak susturulup, *MMP*'lerin ifadesindeki değişiklikler araştırılacaktır. MKN-45 hücre hattında E-kaderin'nin RNAi teknolojisiyle susuturulmasına yönelik yapılan çalışmada, mRNA ve proteinin önemli derecede inhibe edildiği görülmüş ve E-kaderinin inhibisyonu gastrik kanser hücrelerinin invazyon yapma yeteneklerini arttırdığı anlaşılmıştır [145].

Yeni kan damarlarının oluşumunu içeren tümör anjiyogenezi, anjiyogenetik faktörler ile anjiyogenetik inhibitörler arasındaki dengenin değişmesiyle ortaya çıkar. Anjiyogenesisiz'in histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri ile baskılanabildiği gösterilmiştir [146]. Membran bağımlı bir glikoprotein olan RECK matriks metalloproteinazları negatif yönde regüle ederek tümör metastazını ve anjiyogenezi inhibe eder. CL-1 karaciğer kanser hücre hattında siRNA ile RECK'in susturulması sonucu HDAC'ların tümör invazyonunu ve anjiyogenezi nasıl baskıladığı anlaşılmıştır. Bu çalışma aynı zamanda kanser terapisi için yeni bir strateji ortaya koymuştur [147].

Tümör invazyonu ve metastazında görev alan önemli proteinler arasında MMP-9 ve katepsin B yer alır. SNB19 hücre hattında, MMP-9 ve katepsin B'nin susturulması sonucu hücreler arasındaki etkileşimin azaldığı görülmüştür. Ayrıca MMP-9 ve katepsin B'nin RNAi ile eş zamanlı susturulmasının, insan glioma (beyin tümörü) tedavisinde etkili bir çözüm olacağı gösterilmiştir [148]. Bütün bu sonuçlar, tümör büyümesine ve metastazında rol alan hedef genlere karşı spesifik RNAi teknolojisinin kullanılmasının çeşitli tümörlerin tedavisinde gelecek vaad eden bir araç olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, tümör invazyonunda rol oynayan MMP genlerinin ve onkojenik transformasyonda rol oynayan *β-katenin*'in gastrik kanser biyopsilerinde ve hücre

hatlarında oksidatif strese bağlı olarak değişimlerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu genlerin ifadesi, stresin olmadığı, ortadan kaldırıldığı ya da kontrol edildiği durumlarda, stresli koşullar ile karşılaştırılıp, aradaki fark ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca oksidatif stress ile tetiklenen, hastalığın ilerlemesinin durdurulmasında önemli derecede rol oynayacağı düşünölen moleküllerin açığa çıkartılması çalışmanın amaçları içerisinde yer almaktadır. Bu bakımdan orijinal olan bu çalışmada, ayrıca amaca bağlı olarak MMP-3 mRNA'sına yönelik kullanılacak olan siRNA ile susturum sonucu MMP'lerin ifade profilindeki değişikliklerin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Literatürde henüz böyle bir çalışmanın olmayışı ve ilk defa bu çalışmayla bu ilişkinin ortaya çıkartılması çalışmayı ayrıca önemli kılmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayıraçlar

Bu çalışmada kullanılan bütün kimyasallar ve ayıraçlar analitik saflık derecesinde olup Sigma, Merck, BioChrom, Bio-Rad, Roch firmalarından temin edildi. Hücre soylarının büyüme ortamları olan RPMI-1640, DMEM, HAM's F12, Fetal Bovin Serum (FBS), tripsin, penisilin/streptomycin BioChrom firmasından satın alındı. PCR için dizayn edilen primerler İon-Tek firmasından (Türkiye), MMP-3 siRNA ve transfeksiyon reaktifi Dharmacon (İngiltere) firmasından satın alındı.

3.2. Çalışmada Kullanılan Doku Örnekleri

Çalışmada kullanılan kanserli mide dokusu örnekleri, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesinde yatmakta olan 76 hastadan normal doku ve tümörlü doku olmak üzere 76 çift olarak temin edildi. Bu doku örnekleri önce sıvı nitrojene konulduktan sonra uzun süreli saklamak için – 80 °C'de tutuldu.

3.3. Doku Örneklerinde Gen ifadesi

Doku örneklerinde β -katenin ve MMP genlerinin ifadesine yarı-nicel RT-PCR ile bakıldı. Bunun için öncelikle dokulardan RNA izolasyonu ve sonrasında cDNA sentezi yapıldı.

3.3.1. Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu

Doku örneklerinden RNA izolasyonu "NucleoSpin RNA II Kit" i kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için dokular önce sıvı nitrojen içerisine konuldu, sonra doku ezilerek homojenize edildi ve kit protokolü takip edilerek RNA izolasyonu tamamlandı. RNA konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 260 nm'de belirlendi ve uzun süreli kullanım için -80 °C'de saklandı.

3.3.2. Doku Örneklerinden cDNA Sentezi

Doku örneklerinden izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi için “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit” i (Fermentas) kullanıldı. İzole edilen RNA örneklerinden 6 µl kullanılırken, sentez için oligo(dT) 18 primer kullanıldı ve daha sonra kit protokolü takip edilerek cDNA sentezi tamamlandı. Bu cDNA örnekleri yine uzun süreli kullanım için -80 °C’de saklandı.

3.3.3. Primer Dizaynı ve Sentezi

Çalışmada analiz edilen *MMP* genleri, β -*katenin* ve *GAPDH* geni için primer dizaynı primer-3 programı (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) kullanılarak yapıldı. Dizayn edilen primerler İon-tek firmasından temin edildi. Her primerin bağlanma sıcaklığı ve çalışma koşulları optimize ederek belirlendi. Bu primerlerin özellikleri Çizelge 3.1’de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. *MMP* genleri, β -*katenin* ve *GAPDH* geni için spesifik primerler

Primer	Dizi	Amplikon Boyu	Bağlanma Sıcaklığı
<i>MMP-1</i>	Forward: 5- ATGCTGAAACCCTGAAGGTG -3	348 bp	55 °C
	Reverse: 5- GAGCATCCCCTCCAATACCT -3		
<i>MMP-2</i>	Forward: 5-TGGGGAGTACTGCAAGTTCC -3	301 bp	56 °C
	Reverse: 5-ATACTTCTTGTCGCGGTTCGT -3		
<i>MMP-3</i>	Forward: 5-GTCTCTTTCACTCAGCCAAC-3	250 bp	55 °C
	Reverse: 5-ATCAGGATTTCCTCCCCTCAG-3		
<i>MMP-7</i>	Forward: 5-TCCCGCGTCATAGAAATAATG-3	451 bp	57 °C
	Reverse: 5-AGGAATGTCCCATACCCAAAG-3		
<i>MMP-8</i>	Forward: 5-TGATGAAAAAGCCTCGCTG-3	290 bp	56 °C
	Reverse: 5-TGTTGATATCTGCCTCTCCC-3		
<i>MMP-9</i>	Forward: 5- CCTTCCTTATCGCCGACAAG -3	225 bp	60 °C
	Reverse: 5- TGAACAGCAGCATCTTCCCC-3		
<i>MMP-10</i>	Forward: 5- CATTCTTGTGCTGTTGTGTC -3	225 bp	63 °C

	Reverse: 5- TGTCTAGCTTCCCTGTCACC -3		
<i>MMP-11</i>	Forward: 5- AGACACCAATGAGATTGCAC -3	249 bp	57 °C
	Reverse: 5- GCACCTTGGAAGAACCAAATG -3		
<i>MMP-12</i>	Forward: 5- ACTACACATTCAGGAGGCAC-3	270 bp	56 °C
	Reverse: 5- CAAATTGGGGTCACAGAGAG -3		
<i>MMP-14</i>	Forward 5- ATAAACCCAAAAACCCACC -3	251 bp	61°C
	Reverse 5- AACACCCAATGCTTGTCTC -3		
<i>MMP-15</i>	Forward 5- ACAACTATCCCATGCCCATC-3	242 bp	57 °C
	Reverse 5- ACCTGTCCTCTTGGAAGAAG-3		
<i>MMP-17</i>	Forward 5- TCCAGATCGACTTCTCCAAG -3	225 bp	62 °C
	Reverse 5- CCACATGGCTTAACCCAATG -3		
<i>MMP-19</i>	Forward 5- GCTACCCCAAACCAATCAAG -3	255 bp	62 °C
	Reverse 5- TGGTATCCAAGTTATGCC -3		
<i>MMP-23</i>	Forward 5- CGACTTCTGCTACGAATTCCC-3	321 bp	57 °C
	Reverse 5- TTGGCGATGATGCTCAGGTG -3		
<i>MMP-28</i>	Forward 5- AGGCATTCCTAGAGAAGTACG -3	338 bp	58 °C
	Reverse 5- CTTACGCCTCATTTTGGTCC -3		
<i>β-Katenin</i>	Forward: 5-CAGAAGCTATTGAAGCTGAGG-3	326 bp	63 °C
	Reverse: 5-TTCCATCATGGGGTCCATAC-3		
<i>GAPDH</i>	Forward 5- GACCTGCCGTCTAGAAAAAC-3	126 bp	60 °C
	Reverse 5- TTGAAGTCAGAGGAGACCAC -3		

3.3.4. Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonunda kullanılan Taq tamponu (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), ileri (forward) ve geri (revers) primer (İon-tek), Taq DNA polimeraz (Fermentas), cDNA ve H₂O₂ miktarları 25 µM master-miks için optimize edildi. Optimize edilen konsantrasyonlar Çizelge 3.2’de yer almaktadır. Her PCR reaksiyonunda internal kontrol olarak GAPDH (Glikoz altı fosfat dehidrogenaz) geni kullanıldı. Başlangıç

denaturasyonu 94 °C’de 4 dakikadır ve her primerin bağlanma sıcaklığı Çizelge 3.1’de verilmiştir. Extension 72 °C’de 20 saniye ve Final Extension 72 °C’de 4 dakika olarak optimize edilmiştir. PCR döngü sayısı genel olarak 25-30 olarak belirlendi. Her örneğin PCR ürünü etidyum bromid içeren % 2’lik agaroz jelde yürütüldü ve transilüminatör (Bio Rad) üzerine konularak fotograflandı.

Çizelge 3.2. PCR reaksiyonunda kullanılan 25 µl’lik master mix

Reaktifler	Son Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
10X Buffer	2.5	1X
25 mM MgCl ₂	2	2mM
2 mM dNTP mix	2.5	0.2 mM
İleri primer (10 pmol)	1	0.4 pmol
Geri primer (10 pmol)	1	0.4 pmol
Taq Polimerase (5 U/µl)	0.2	1U
cDNA	1	-
ddH ₂ O	14.8	-
Toplam hacim	25	

3.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Bütün PCR örnekleri % 2’lik agaroz jelde yürütüldü. Jel hazırlama ve yürütme tamponu olarak TAE (Tris-Asetik asid-EDTA, (pH 8.0)) kullanıldı. Jeller için 80 ml 1X TAE tamponuna 1.6 g agaroz (Sigma) ilave edildi ve solüsyon mikrodalga fırında tamamen eriyip berraklaşmaya kadar kaynatıldı. Solüsyonun ısısı 60-70 °C’ye düşünce 10 mg/ml etidyum bromid solüsyonundan 8 µl eklenerek hafifçe karışması sağlandı. Daha sonra temiz ve kuru bir jel döküm kabına tarak dişlerini kapatacak kalınlıkta jel solüsyonu döküldü ve 20 dakika polimerleşmesi için bekletildi. Polimerleşen jel yürütme tankı içine alınarak taraklar çıkarıldı ve jeli yaklaşık 0.5 cm kapatacak miktarda jel yürütme tamponu tanka dolduruldu. PCR örnekleri ve markır (belirteç) DNA uygun kuyucuklara eklenerek sabit voltaj (75 Volt) ve akımda (20-25 mA) jel 45 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Daha sonra jeldeki bantlaşma motifi transilüminatör (Bio Rad) aracılığı ile görüntülenerek fotoğrafı çekildi.

3.4. Doku Örneklerinde β -katenin Lokalizasyonunun Tayini

İmmünohistokimyasal yöntem kullanılarak β -kateninin hücre içindeki lokalizasyonu belirlendi. Parafine gömülü kanserli mide doku örneklerinden 4 mikron kalınlığında kesit alındı. Bu kesitler bir gece 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Kesitlerin alındığı bu slaytlar ksilen ve alkol ile deparafinize edildikten sonra 1X’lik EDTA tamponunda (pH 8.0) 15 dakika kaynatıldı. Daha sonra DakoCytomation LSAB2 System-HRP kiti kullanılarak protokol tamamlandı. Primer antikor olarak Mouse Monoklonal (6F9) β -katenin antikoruna (abcam) kullanıldı. Antikor protokole göre 1:1000 oranında % 1 BSA içeren PBS içerisinde sulandırılarak kullanıldı. Sekonder antikor olarak Kit’te yer alan primer antikor tanıyan biotin ile işaretli sekonder antikor kullanıldı. Sinyali görünür (renkli) hale getirmek için streptavidin horseradish peroksidaz (HRP) kullanıldı. HRP substratı olarak da 3-3’- diamino benzidin tetrahidroklorür (DAP) kullanıldı. Son olarak Haematoksilen ile hücrelerin çekirdekleri boyandı ve invert mikroskopta (Zeiss, Axiovert 40 CLF) gözlemlendi.

3.5. Doku Örneklerinde 8-OHdG’in Tayini

İmmünohistokimyasal yöntem kullanılarak 8-OHdG’nin hücre içindeki lokalizasyonu belirlendi. Parafine gömülü kanserli mide doku örneklerinden 4 mikron kalınlığında kesit alındı. Bu kesitler bir gece 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Kesitlerin alındığı bu slaytlar ksilen ve alkol ile deparafinize edildikten sonra 1X’lik Sitrat tamponunda 15 dakika kaynatıldı. Daha sonra DakoCytomation LSAB2 System-HRP kiti kullanılarak protokol tamamlandı. Primer antikor olarak Mouse Monoklonal 8-OHdG antikoruna (Cosmo Bio Co., LTD) kullanıldı. Antikor protokole göre 1:20 oranında % 1 BSA içeren PBS içerisinde sulandırılarak kullanıldı. Sekonder antikor olarak Kit’te yer alan primer antikor tanıyan biotin ile işaretli sekonder antikor kullanıldı. Sinyali görünür (renkli) hale getirmek için streptavidin horseradish peroksidaz (HRP) kullanıldı. HRP substratı olarak da 3-3’- diamino benzidin tetrahidroklorür (DAP) kullanıldı. Son olarak haematoksilen ile hücrelerin nükleusları boyandı ve invert mikroskopta (Zeiss, Axiovert 40 CLF) gözlemlendi.

3.6. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Bu çalışmada kullanılan gastrik kanser hücre hatları olan MKN-45 ve 23132/87 Almanya hücre kültürü koleksiyonundan (DSMZ), KatoIII, AGS, HGC-27 ve CLS-145 Avrupa hücre kültürü koleksiyonundan (CLS) temin edilmiştir.

3.6.1. Hücre Hatlarının Kültürü

MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarının % 10 FBS içeren RPMI 1640 büyüme ortamında; AGS, Kato III ve HGC-27 hücre hatlarının % 10 FBS içeren DMEM büyüme ortamında; CLS-145 hücre hattının ise F:12 büyüme ortamında % 5 CO₂ karbondioksit içeren inkübatörde 37 °C'de kültürü yapılmıştır.

3.6.2. Hücre Hatlarının Çözülmesi

Sıvı nitrojen tankında özel karyovialler içinde bulunan (-190 °C) hücre hatları hızlı bir şekilde buz içerisinde konulduktan sonra hızlıca 37 °C'de su banyosunda çözüldü. Çözülmüş olan hücreler steril bir şekilde 2 ml büyüme ortamı içerisine transfer edildi. Daha sonra hücreler 4 °C, 1400 rpm de 5 dakika satrifüj edildi ve hücrelere zarar vermeden süpernatant kısmı dikkatlice atıldı. Hücre pelletleri 7 ml taze büyüme ortamında çözülerek 100 mm steril petri kaplarına transfer edildi ve 37 °C de % 5 CO₂ karbondioksit içeren karbondioksit inkübatöründe büyümeye bırakıldı. Daha sonra hücreler buldukları petri kabını % 70-80 oranında büyüterek kapladıktan sonra yeni büyüme ortamlarına pasajlandı.

3.6.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması

Hücre hatları buldukları petri kabını % 70-80 oranında büyüterek kapladıktan sonra kültür büyüme ortamı vakumla çekilerek uzaklaştırıldı. Hücreler 37 °C de ısıtılmış PBS ile iki kez yıkandı ve hücreleri tuttukları yerden kaldırmak için 1 ml tripsin/EDTA ile 37 °C de 5 dakika muamele edildi. Tripsini inaktive etmek için 5 ml FBS içeren büyüme ortamı hücrelerin üzerine eklendi. Sonra hücrelerin büyüme karakteristiklerine ve çalışma amacına bağlı olarak hücreler hemositometrede sayılarak uygun miktarları yeni

büyüme ortamlarına transfer edildi ve 37 °C de karbondioksit inkübatörüne konularak kültürleri yapıldı.

3.6.4. Hücre Hatlarının Dondurulması

Hücre hatları buldukları petri kabını % 70-80 oranında kapladıktan sonra kültür büyüme ortamı vakumla çekilerek uzaklaştırıldı. Hücreler 37 °C de ısıtılmış PBS ile iki kez yıkandı ve hücreleri tutdukları yerden kaldırmak için 1 ml tripsin/EDTA ile 37 °C de 5 dakika bekletildi. Tripsini inaktive etmek için 5 ml FBS içeren büyüme ortamı hücrelerin üzerine eklendi. Hücreler hemositometrede sayıldıktan sonra 4 °C, 1400 rpm'de 5 dakika sentrifüj edildi ve süpernatant kısmı hassas biçimde dikkatlice alındı. Hücre pelletleri 1 ml dondurma ortamında (% 20 FBS, % 10 DMSO, % 70 büyüme ortamı) 4×10^6 hücre olacak şekilde çözülerek karyovial tüplere transfer edildi. Bu tüpler bir gece -80 °C' de bekletildikten sonra ertesi gün sıvı nitrojen tankına yerleştirildi.

3.7. Hücre Hatlarında Gen İfadesi

Çalışmada kullanılan MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında β -katenin ve MMP genlerinin ifadesine yarı-nicel (semi-kantitatif) RT-PCR ile bakıldı. Bunun için öncelikle hücrelerden RNA izolasyonu ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirildi.

3.7.1. Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarından "NucleoSpin RNA II Kit"i kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için yaklaşık 5×10^6 hücre kitle beraber sağlanan 350 μ l liziz tamponunda homojenize edildi ve kit protokolü takip edilerek RNA izolasyonu tamamlandı. RNA konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 260 nm'de belirlendi ve örnekler uzun süreli kullanım için -80 °C'de saklandı.

3.7.2. Hücre Hatlarından cDNA Sentezi

Hücre hatlarından izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi için “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit”i (Fermentas) kullanıldı. İzole edilen RNA örneklerinden 1 µg alınarak bundan cDNA sentezi için oligo(dT) 18 primer kullanıldı ve daha sonra kit protokolü takip edilerek cDNA sentezi tamamlandı. Bu cDNA örnekleri yine uzun süreli kullanım için -80 °C’de saklandı.

Dokular için uygulanan PCR reaksiyonu aynı şekilde hücreler için de uygulandı. Bölüm 3.3.3, bölüm 3.3.4 ve bölüm 3.3.5’de ifade edilen işlemler hücrelerdeki gen ifadeleri için de yapıldı.

3.8. Hücre Hatlarının *Helicobacter pylori* ile Enfeksiyonu

3.8.1. Doku Örneklerinden *Helicobacter pylori* İzolasyonu

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesinde mide rahatsızlıkları olan hastalardan endoskopi yöntemi ile biyopsi alınıp, biyopsi içindeki bakterilerin Kolombiya agar içeren kanlı agar plaklarda kültürü yapıldı.

3.8.2. *Helicobacter pylori*’nin Çoğaltılması

Mide biyopsilerini almak için steril ependorf tüp içerisine steril 100 µl PBS konuldu. Mide biyopsileri steril PBS içinde hızlı bir şekilde laboratuara taşındı. Taşıma süresinin kısa olması bakterilerin canlı kalması açısından önem arz etmektedir. Bakteriler üzerine 100 µl steril PBS ilave edildi ve homojenizator yardımı ile homojenize edildi. Homojenize edilen solüsyondan 100 µl alındı ve kanlı agar plate üzerine damlatılıp cam baget yardımı ile ekim yapıldı. Daha sonra örnekler CO₂ inkübatörüne kaldırıldı ve bir hafta büyümesi için bekletildi.

3.8.3. *Helicobacter pylori* Suşlarının *cagA* ve *vagA* Tiplendirmesi

Kültürü yapılan *H. pylori* suşlarının *cagA* ve *vagA* tiplendirmesi Çizelge 3.3’de bu genler için tasarlanan primer ile PCR yapılarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre, hücre hatları *H. pylori cagA*⁺ ve *cagA*⁻ suşları ile enfekte edildi. *H. pylori* suşlarının

cagA ve *vacA* tanısında kullanılan multipleks PCR için 25 µl'lik mastır miks Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. *CagA* ve *VacA* genleri için dizayn edilen primerler

Genotip	Primer	Dizi	Amplikon Boyu (bp)
<i>vacA</i> s1s2	VAI-F	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'	259/286
	VAI-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	
<i>vacA</i> m1m2	VAG-F	5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3'	567/642
	VAG-R	5'-GCGTCAAAATAATTCCAAGG-3'	
<i>cagA</i>	cag5c-F	5'-GTTGATAACGCTGTCGCTTC-3'	350
	cag3c-R	5'-GGGTTGTATGATATTTCCATAA-3'	

Çizelge 3.4. *H. pylori* suşlarının *cagA* ve *vacA* tanısında kullanılan multipleks PCR için 25 µl'lik master mix

Reaktifler	Başlangıç Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	Son hacim (µl)
Taq tamponu	10X	1X	2.5
dNTP	2mM	0.2uM	2.5
MgCl ₂	25mM	2mM	2
Primerler (x6)	25pmol/µl	25pmol	1 x 6 = 6
ddH ₂ O	-	-	6.8
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	1 U	0.2
Template DNA	-	-	5
Toplam hacim			25

3.8.4. Enfeksiyon İşlemi

MKN-45 ve 23132/87 hücre hatları *H. pylori* *cagA*⁺ ve *cagA*⁻ suşları ile enfekte edilerek oksidatif strese maruz bırakıldı. Aynı şekilde enfeksiyon işlemi için 6 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 1x10⁵ hücre gelecek şekilde ekim yapıldı ve gece boyunca (15-18 saat) bekletildi. Ertesi gün besi yeri tazelandı ve üzerine her bir hücreye 100 bakteri gelecek şekilde enfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bakteriler hücre

kültürüne ilave edildikten sonra örnekler sırası ile 24 ve 48 saat enfeksiyona maruz bırakıldı.

3.9. Hücre Hatlarının H₂O₂ ile Muamele Edilmesi

MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27 ve CLS-145 hücre hatları 2×10^4 hücre/ml olacak şekilde % 10 FBS içeren RPMI-1650 büyüme ortamında bir gece kültüre edildi. Onaltı saat sonra hücreler tutunduktan sonra büyüme ortamı atıldı ve 2 kez 37 °C'de ısıtılmış PBS ile yıkandı. Daha sonra 50, 100, 200, 500, 1000 μ M H₂O₂ içeren büyüme ortamı hücrelerin üzerine ilave edildi. Bu konsantrasyonlardaki H₂O₂'nin hücreler üzerinde göstermiş olduğu toksisite belirlendi. Ayrıca, bu konsantrasyonlarda canlı hücre içi oksidatif stres seviyesi ve apoptoza girmiş hücreler belirlenerek %'lik değerleri hesaplandı.

3.9.1. Hücre Hatlarında H₂O₂'in Yol Açtığı Morfolojik Değişiklikler

MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında 200 μ M H₂O₂'in 24 saat sonra yol açtığı morfolojik değişiklikler invert mikroskopta (Zeiss, Axiovert 40 CLF) gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

3.9.2. Hücre Hatlarında H₂O₂ Toksisitesinin Belirlenmesi

H₂O₂'nin toksisitesi MKN-45 ve 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27, CLS-145 hücre hatlarında MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) toksisite testi ile yapıldı. Bunun için 96 kuyucuklu mikroyuvarlıkta her bir kuyucuğa 3×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Bir sonraki gün büyüme ortamı yenilenip belirtilen konsantrasyonlarda (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M ve 1000 μ M) H₂O₂ eklendikten sonra örnekler 6, 12, 24 ve 48 saat süre ile 37 °C, % 5 CO₂'de inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon süreleri sonunda 100 μ l MTT (5 mg/ml) eklendi ve 4 saat 37 °C'de bekletildikten sonra reaksiyon 100 μ l % 10 SDS içeren DMF solüsyonu ile durduruldu. Daha sonra örneklerdeki renk artışı 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.9.3. Hücre Hatlarında Oksidatif Stresin Belirlenmesi

MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27, CLS-145 hücre hatlarında hücre içi oksidatif stresin varlığı DCFH (2'-7'-dikolorodihidroflorosein) kullanılarak gösterildi. Altı kuyucuklu playtlerin her kuyucuğuna 1×10^5 hücre düşecek şekilde ekim yapıldı. Ertesi gün (yaklaşık 16 saat sonra) büyüme ortamı tazelenip belirtilmiş olan konsantrasyonlardaki (50- 1000 μM) H_2O_2 playtlere ilave edildi. Daha sonra bu örnekler 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra hücre içi oksidatif stres tayini için büyüme ortamları çekilip atıldıktan sonra, hücreler 37 °C'de ısıtılmış PBS (pH 7.4) ile 3 kez yıkandı ve DCFH-DA reaksiyon karışımı ile 15 dakika 37 °C de bekletildi. Sonra, tekrar PBS ile 3 kez yıkandı ve floresan mikroskop altında incelenip fotoğrafları çekildi.

3.9.4. Hücre Hatlarında Apoptozun Belirlenmesi

MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27, CLS-145 hücre hatlarında oksidatif stres sonucu oluşan apoptosis tayini için üç ayrı çalışma yapıldı. Hücre çekirdeğini boyayan, floresan bir boya olan Hoechst 33258 kullanılarak apoptotik hücreler belirlenmeye çalışıldı. Bu yöntemin dışında daha yukarıdaki amaç için daha spesifik olan TUNEL deneyi ve hücrelerin kaspaz-3 enzim aktivitesine bakıldı.

3.9.4.1. Hoechst Çekirdek Boyması

H_2O_2 'e maruz bırakılan MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27, CLS-145 hücre hatlarında apoptotik hücre ölümünü tespit için Floresan bir boya olan Hoechst 33258 (sigma) kullanıldı. Altı kuyucuklu playtlerin her kuyucuğuna 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ertesi gün (yaklaşık 18 saat sonra) büyüme ortamı tazelenip belli konsantrasyonlarda (50- 1000 μM) H_2O_2 ilave edildi ve 6, 12, 24 ve 48 saat sonra apoptotik hücrelerin tayini için büyüme ortamları alındıktan sonra örnekler PBS (pH 7.4) ile 3 kez yıkandı. Sonra hücreler soğuk metanolde 5 dakika tutularak fiske edildi ve PBS (pH 7.4) ile tekrar yıkandı. Hoechst 33258 ile 10 dakika karanlıkta tutuldu. Daha sonra örnekler dd H_2O_2 ile 10 dakika muamele edilip floresan mikroskop altında bu hücrelerin fotoğrafları çekildi.

3.9.4.2. TUNEL

MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27, CLS-145 hücre hatlarında TUNEL apoptosis deneyi için *in situ* “hücre ölüm tayin kiti” (Roche) kullanılarak hücrelerin apoptoza girip girmedikleri incelendi. Bunun için, altı kuyucuklu playtlerin her kuyucuğuna yaklaşık 1×10^5 hücre ekildi. Ertesi gün (yaklaşık 18 saat sonra) büyüme ortamı tazelenip % 0.01 FBS varlığında uygun konsantrasyonlarda H_2O_2 ($50 \mu M$ - $1000 \mu M$) playtlere ilave edildi. Oniki ve 24 saat sonra önce, hücrelerin üzerindeki eski besiyeri çekilip 3 kez soğuk PBS ile yıkandı ve sonrasında % 4 lük paraformaldehit ile oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek fiske edildi. Daha sonra hücreler permeabilizasyon solüsyonunda (% 1 Triton-X, % 10 sodyum sitrat) 5 dakika bekletilerek geçirgen hale getirildi ve kitle sağlanan iki solüsyon üretici firmanın kullanım kılavuzuna göre uygun miktarlarda hücrelerin üzerine damlatıldı ve örnekler $37^\circ C$ 'de 1 saat bekletildi. Daha sonra floresan invert mikroskopta apoptoza girmiş hücreler incelendi ve bu hücrelerin %'lik değerleri belirlendi.

3.9.4.3. Kaspaz-3 Aktivitesi

MKN-45, 23132/87 hücre hatları farklı konsantrasyonlarda ($50 \mu M$ - $200 \mu M$) H_2O_2 'e 24 saat boyunca maruz bırakıldı. Sonrasında hücrelerin apoptoza girip girmedikleri kaspaz-3 enzim aktivitesine bakılarak incelendi. Bunun için playtlere yaklaşık 1×10^5 hücre ekildi. Ertesi gün (yaklaşık 18 saat sonra) büyüme ortamı tazelenip uygun konsantrasyonlarda H_2O_2 ($50 \mu M$ - $200 \mu M$) playtlere ilave edildi ve 24 saat sonra kaspaz-3 tayin kiti (Sigma) kullanılarak hücrelerin apoptoza girip girmedikleri ve hangi düzeyde apoptoza girdikleri belirlendi. Hücreler 24 saat sonra kitle beraber gelen protokole göre eritildikten (lisis) sonra Bradford yöntemine göre total protein tayini yapıldı [148] ve kolorometrik olarak kaspaz-3 enzim aktivitesi spesifik aktivite cinsinden hesaplandı.

3.10. Q-RT PCR

H. pylori ile enfekte edilen ve H_2O_2 ile strese maruz bırakılan MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarındaki gen ifadesi değişiklikleri oldukça duyarlı bir teknik olan kantitatif gerçek zamanlı (real time) PCR (Q-RT PCR) ile incelendi.

3.10.1. Q-RT PCR'ın Gen İfadesi için Optimizasyonu

Çalışmada eksternal kontrol olarak kullanılan GAPDH geni için cDNA'ların bir seri sulandırılmaları (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) ile Q-RT PCR optimizasyonu yapıldı. Optimizasyon sonrası 1:100 sulandırılan cDNA örnekleri kullanıldı. Floresan prob olarak SYBR green süpermix (Bio-Rad) kullanıldı. Başlangıç denatürasyonu 95 °C, 10 dakika; bağlanma sıcaklığı Çizelge 3.1'de verilmiştir; uzatma (extension) 72 °C, 25 saniye ve döngü sayısı 40 olarak yapıldı. Her PCR örneği üç tekrarlı yapıldı. Çalışmada yapılan 25 µl'lik master mix'in içeriği Çizelge 3.5 verilmiştir.

Çizelge 3.5. Gerçek zamanlı PCR için hazırlanan 25 µl'lik master mix

Reaktifler	Başlangıç Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	Son hacim (µl)
10X Syber Green mix	10X	1X	12.5
İleri Primer	10 pmol/µl	10 pmol	1
Geri primer	10 pmol/µl	10 pmol	1
Template DNA	-	-	2
ddH ₂ O	-	-	8.5
Toplam hacim			25

3.10.2. Q-RT PCR ile Gen İfade Analizi

Q-RT PCR ile gen ifade analizinde ΔCt yöntemi kullanıldı [149]. Örnek ile kontrol arasında analizi yapılan genin ifadesindeki değişikliğin kaç kat olduğunu gösteren bu yöntemde,

$$R = \frac{E_{\text{Hedef Gen}}^{\Delta Ct}}{E_{\text{Kontrol Gen}}^{\Delta Ct}}$$

formülü kullanılarak hedef genin ifade oranı bulundu. Burada;

$\Delta Ct = Ct \text{ kontrol} - Ct \text{ örnek}$

E= PCR verimliliği (efficiency)

R= İfade oranı

Gerçek zamanlı PCR cihazında (Corbett, RG-6000) gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu elde edilen E ve ΔCt değerleri ile yukarıdaki denklem kullanılarak ifade oranları hesaplandı.

3.11. Hücre Hatlarında Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) ile Stresin Ortadan Kaldırılması

MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında $200\mu\text{M}$ H_2O_2 ile oluşturulan stres kafeik asid fenetil ester (CAPE) ile ortadan kaldırıldı. Her iki hücre hattı % 10 FBS içeren RPMI büyüme ortamında % 70 oranında petri kabını kapatacak şekilde büyütüldükten sonra $200\mu\text{M}$ H_2O_2 ilave etmeden 3 saat önce $3\mu\text{g/ml}$ CAPE (Sigma) büyüme ortamına eklendi ve daha sonra $200\mu\text{M}$ H_2O_2 ortama eklendi. Kontrol olarak H_2O_2 içermeyen ve sadece $200\mu\text{M}$ H_2O_2 içeren kontrol setleri yapıldı. Pleytler 24 saat karbondioksit inkübatöründe inkübe edildikten sonra canlı hücre içi oksidatif stresin varlığı, bölüm 3.9.3'de ifade edildiği şekilde DCFH ($2'$ - $7'$ -dikolorodihidroflorosein) kullanılarak gösterildi. Ayrıca CAPE ile stresin ortadan kaldırıldığı bu iki hücre hattından RNA izolasyonu (bölüm 3.7.1) ve cDNA sentezi (bölüm 3.7.2) yapıp Q-RT PCR (bölüm 3.10) ile β -katenin ve *MMP* genlerinin ifadesine bakıldı.

3.12. Hücre Hatlarında β -katenin Lokalizasyonun Belirlenmesi

MKN-45 ve 23132/87 hücre hatları $50\mu\text{M}$ - $200\mu\text{M}$ H_2O_2 'ye 24 saat maruz bırakıldıktan sonra β -katenin'in hücre içerisindeki lokalizasyonu immünohistokimyasal yöntemle belirlendi. Bunun için 6 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 1×10^5 hücre gelecek şekilde ekim yapıldı ve gece boyunca (yaklaşık 16 saat) bekletildi. Ertesi gün besiyeri tazelenip üzerine $50\mu\text{M}$ - $200\mu\text{M}$ H_2O_2 eklenip 24 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler % 4 paraformaldehid ile oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek fiske edildi. Fiksasyon işleminden sonra DakoCytomation LSAB2 System-HRP kiti kullanılarak β -katenin'in hücre içerisindeki lokalizasyonu belirlendi. Primer antikor olarak Mouse Monoklonal (6F9) β -katenin antikoruna (abcam) kullanıldı. Antikor protokole göre 1:1000 oranında % 1 BSA içeren PBS içerisinde sulandırılarak kullanıldı. Sekonder antikor olarak Kitle yer alan primer antikor tanıyan biotin işaretli sekonder bir antikor kullanıldı. Sinyali görünür (renkli) hale getirmek için streptavidin

horseradish peroksidaz (HRP) kullanıldı. HRP substratı olarak da 3-3'-diamino benzidin tetrahidroklorür (DAP) kullanıldı. Son olarak *haematoksilen* ile hücrelerin nükleusları boyandı ve mikroskopta (Zeiss, Axiovert 40 CLF) gözlemlendi.

3.13. Hücre Hatlarında 8-OHdG'in Belirlenmesi

MKN-45 ve 23132/87 hücre hatları 50µM - 200 µM H₂O₂'ye 24 saat maruz bırakıldıktan sonra 8-OHdG'in hücre içerisindeki lokalizasyonu immünohistokimyasal yöntemle belirlendi. Bunun için 6 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 1x10⁵ hücre gelecek şekilde ekim yapıldı ve gece boyunca (yaklaşık 16 saat) bekletildi. Ertesi gün besi yeri tazelendi ve üzerine 50µM - 200 µM H₂O₂ eklenip 24 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler % 4 paraformaldehid ile oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek fiske edildi. Fiksasyon işleminden sonra DakoCytomation LSAB2 System-HRP kiti kullanılarak β-katenin'in hücre içerisindeki lokalizasyonu belirlendi. Primer antikor olarak Mouse Monoklonal 8-OHdG antikor (cosmobio) kullanıldı. Antikor protokole göre 1:20 oranında % 1 BSA içeren PBS içerisinde sulandırılarak kullanıldı. Sekonder antikor olarak Kit'te yer alan primer antikor tanıyan biotin ile işaretli sekonder antikor kullanıldı. Sinyali görünür (renkli) hale getirmek için streptavidin horseradish peroksidaz (HRP) kullanıldı. HRP substratı olarak da 3-3'-diamino benzidin tetrahidroklorür (DAP) kullanıldı. Son olarak *haematoksilen* ile hücrelerin nükleusları boyandı ve mikroskopta (Zeiss, Axiovert 40 CLF) gözlemlendi.

3.14. Hücre Hatlarında İnvazyonun Belirlenmesi

H₂O₂ ile strese maruz bırakılan MKN-45, 23132/87 ve AGS hücre hatlarında meydana gelen invazyon "Transwell chamber" sistemi kullanılarak belirlendi [115]. Transwell chamberların membranı 75 µl, matrijel (2 mg/ml, Sigma) ile kaplandı ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. RPMI (%10 FBS) büyüme ortamında büyütülen MKN-45 ve 3132/87 hücre hatları tripsin ile toplandıktan sonra, FBS içermeyen RPMI' da 1x10⁶/ml hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Matrijel ile kaplı transwell chamber sisteminin üst kısmına (chamber) her hücre hattı için 200 µM H₂O₂ içeren 200 µl hücre süspansiyonu eklendi, alt kısmına (chamber) ise 600 µl % 10 FBS içeren RPMI büyüme ortamı eklendi. Aynı şekilde kontrol olarak, üst kısma sadece 200 µl hücre süspansiyonu alt kısma ise 600 µl % 10 FBS içeren RPMI büyüme ortamı eklenerek her

hücre hattı için bir kontrol sistemi hazırlandı. Transwell chamber sistemleri 48 saat karbondioksit inkübatöründe (37°C, % 5 CO₂) inkübe edildi. İnkübasyondan sonra chamberin üst kısmında invazyon olmayan hücreler ve matrijel bir pamuk kürdan yardımı ile uzaklaştırıldı. Membranın alt kısmında invazyon yapan hücreler PBS ile yıkanıp % 4'lük paraformaldehid ile fikse edildi ve daha sonra giemsa ile 15 dakika boyandı. Mikroskop altında invazyon yapan hücrelerin sayısını bulmak için membran üzerinde 5 farklı alan (200x) sayıldı ve invazyon oranı hesaplandı.

3.15. siRNA ile *MMP-3* Geninin Susturulması

MMP-3'ün ifade olduğu AGS hücre hattında *MMP-3* geni siRNA susturum teknolojisiyle susturuldu. *MMP-3* mRNA'sına spesifik olan siRNA hücre içerisine transfeksiyon yöntemiyle sokuldu. Transfeksiyon reaktifi olarak lipofectamin 2000 (invitrogen) kullanıldı. *MMP-3*'e spesifik siRNA (hedefe varan *MMP-3* pool, Dharmacon), kontrol için *MMP-3* 'e spesifik olmayan siRNA (non targeting siRNA pool, Dharmacon) ve transfeksiyon indikatörü siGLO (Dharmacon) kullanıldı. Transfeksiyondan bir gün önce 1x10⁶ AGS hücresi 35 mm 'lik petri kabına ekildi. Bir gece boyunca 37 °C'de % 5'lik CO₂ inkübatöründe büyümeye bırakıldı. Hücreler ertesi gün % 80-90 oranında petri kabını kapatacak kadar büyünce, siRNA'nı transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi.

3.15.1. Hücre Hatlarına *MMP-3* siRNA'nın Transfeksiyonu

Transfeksiyona hazır hale gelen 3 ayrı petrideki AGS hücrelerinin her birine ayrı transfeksiyonlar yapıldı. Birinci petriye kontrol amaçlı yaptığımız *MMP-3*'e spesifik olmayan siRNA, ikinci petriye *MMP-3*'e spesifik siRNA ve üçüncü petriye ise yapılan transfeksiyonun ne kadar başarılı olduğunu anlamak için transfeksiyon indikatörü olan siGLO transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra gen ifade analizi yapıldı. Öncelikle transfeksiyonu yapılacak olan siRNA, sipesifik olmayan siRNA ve siGLO'nun -80 °C'de bulunan 20 µM stokları DNase/RNase içermeyen ddH₂O ile 2 µM'a seyreltildi. Daha sonra her bir transfeksiyon için iki ayrı steril tüp içerisinde transfeksiyon reaktifi hazırlandı. Birinci tüpe 200 µl 2 µM siRNA ve 200 µl DMEM (serum ve antibiyotik içermeyen) karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İkinci tüpe ise 10 µl lipofektamin 2000 ve 390 µl DMEM (serum ve antibiyotik içermeyen)

karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Birinci ve ikinci tüp pipetlenerek birbirine karıştırıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hazır hale gelen transfeksiyon reaktifi falkon tüp içerisinde bulunan 3.2 ml DMEM (antibiyotik ve serum içermeyen) içerisine eklenip karıştırıldıktan sonra hücreler üzerine eklendi. Hücreler 24 saat boyunca 37 °C'de % 5'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.

3.15.2. Transfeksiyon Verim Analizi

Transfeksiyon işlemi gerçekleştirildikten 24 saat sonra transfeksiyonun ne kadar başarılı olduğunu anlamak için siGLO transfeksiyonu yapılan petri floresan invert mikroskopta (Zeiss, Axiovert 40 CLF) incelendi. Transfeksiyonun gerçekleştiği yeşil renkli hücrelerin toplam hücre sayısına oranı ile transfeksiyon verimi belirlendi.

3.15.3. MMP-3 Geninin Susturum Analizi

MMP-3 geninin susturum oranına ve diğer MMP genlerinin ifadesi üzerindeki etkisine transkripsiyon seviyesinde bakıldı. Bunun için transfeksiyonun yapıldığı hücrelerden RNA izolasyonu (bölüm 3.4) sonrasında cDNA sentezi (bölüm 3.5) ve Q-RT PCR (bölüm 3.10) yapıldı. *MMP-3*'ün susturma oranı örnekle ile kontrol arasındaki ifade oranının kıyaslanmasıyla (bölüm 3.10.2) hesaplandı.

3.16. İstatistiksel Yöntem

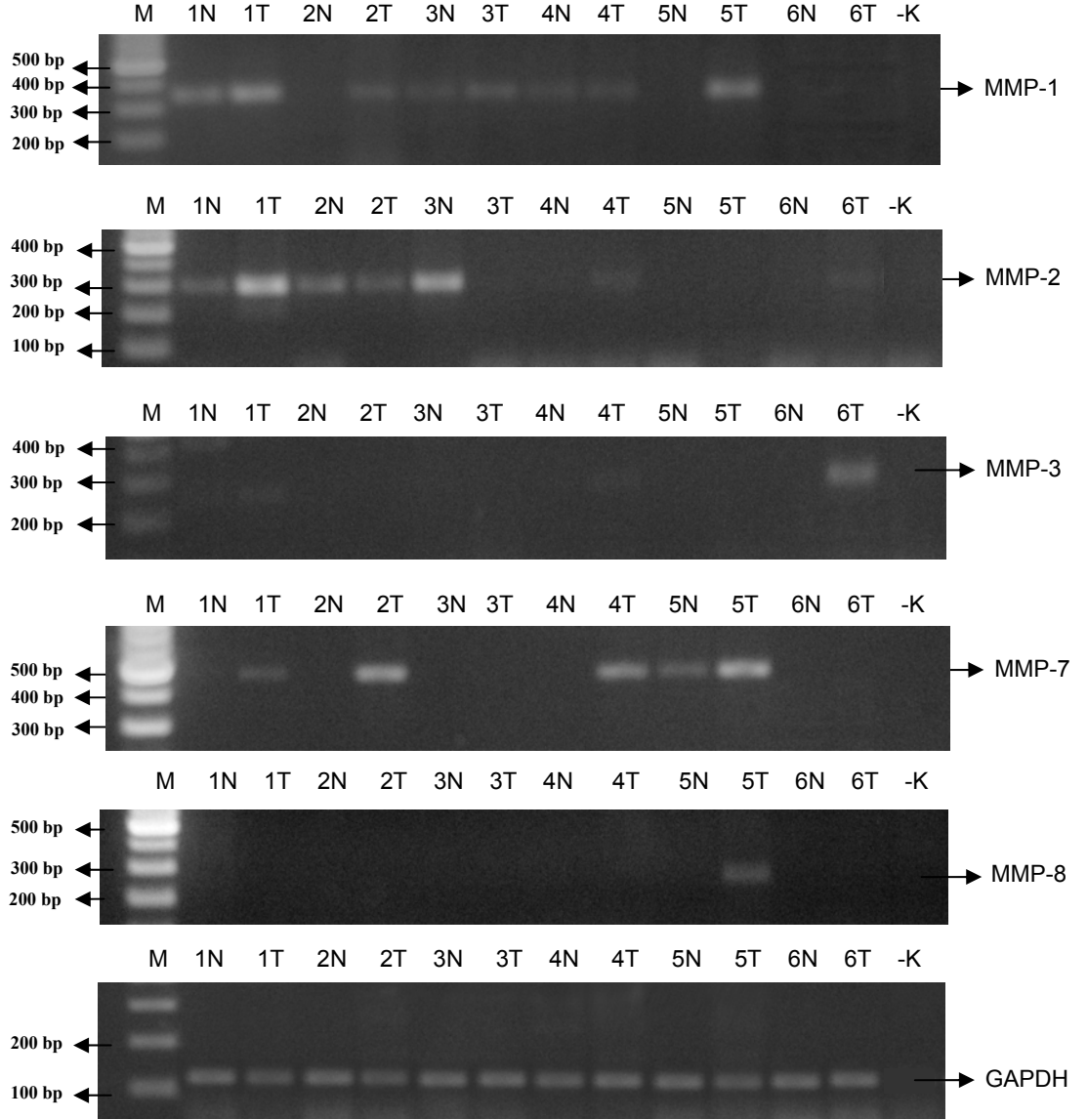
İstatistiksel değerlendirmeler SPSS[®] Version 10.0[®] paket programı kullanılarak yapıldı. Doku örneklerinde parametreler (β -katenin ve MMP genlerinin ifadeleri arasındaki ilişki, normal ve tümörlü dokular arasındaki ilişki) arasındaki bağıntı *Kendall's tau* testi ile yapıldı. Dokuların patolojik özellikleri (*H. pylori*, tümör derecesi) ile gen ifadeleri arasındaki ilişki *Fischer kesin olasılık testi* ile yapıldı. $P < 0.05$ ve $P < 0.01$ seviyesinde değerlendirme yapıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

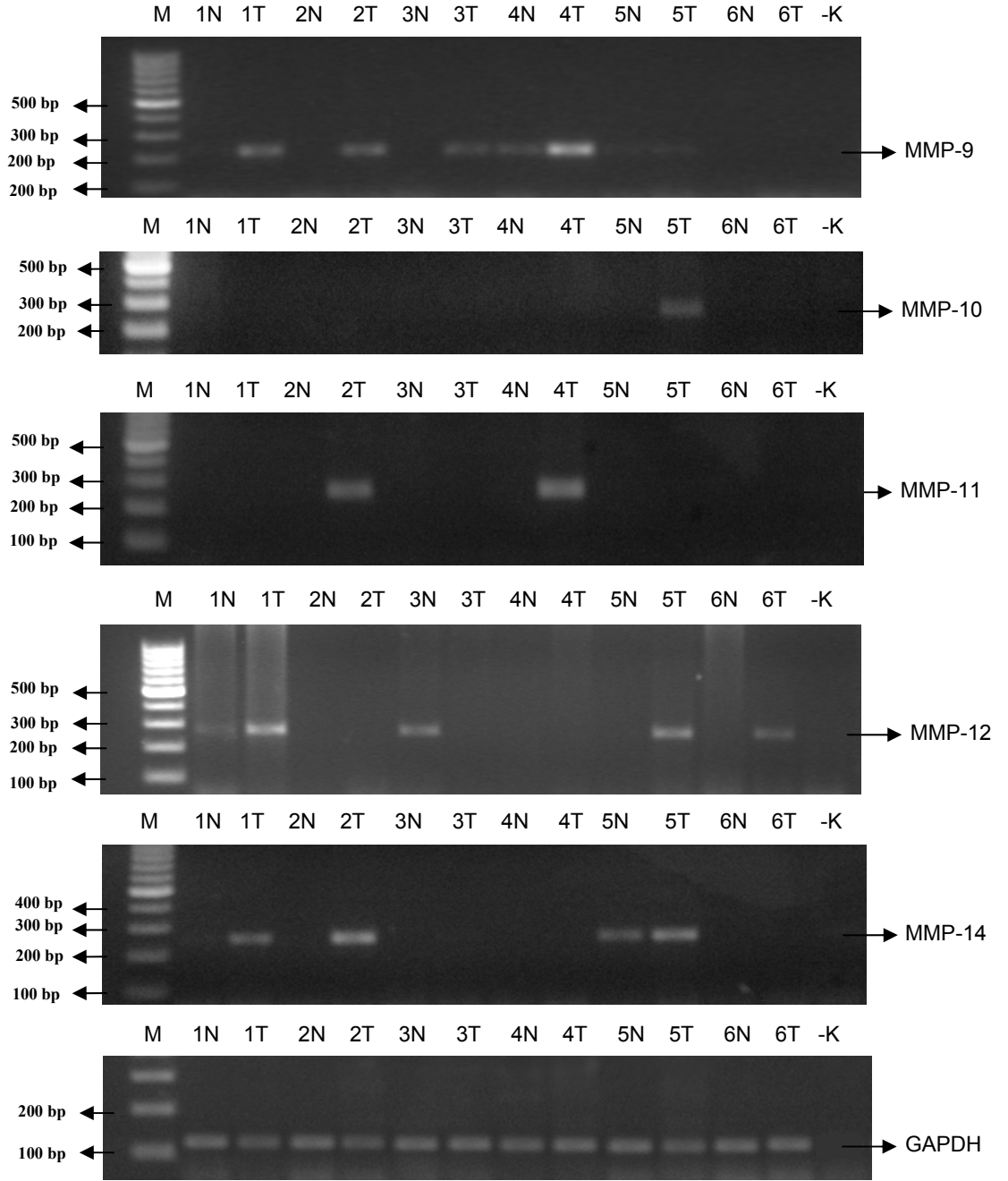
4.1. Doku Örneklerinde β -katenin ve MMP Genlerinin İfadesi

Toplam 76 tümörlü doku ve 76 normal doku örneğinde β -katenin ve MMP genlerinin ifadesine bakıldı. *MMP-1* ifadesi normal dokuların % 20, tümörlü dokuların % 40; *MMP-2* normal dokuların % 18, tümörlü dokuların % 31; *MMP-3* ifadesi normal dokuların % 15, tümörlü dokuların % 31’inde görüldü. *MMP-7* ifadesi tümörlü dokuların % 39’da görülürken normal dokularda sadece % 1.5 oranında görüldü. *MMP-17*, *MMP-19*, *MMP-26* ve *MMP-27* ifadesi ise ne normal dokuların ne de tümörlü dokuların hiç birinde görülmedi. Dokularda en az ifade edilen genler *MMP-8* ve *MMP-10* olarak saptandı. *MMP-8*’nin, normal dokularda % 6, tümörlü dokularda % 11 oranında ifade edildiği görülürken, *MMP-10*’ın normal dokularda % 8, tümörlü dokularda % 18 oranında ifade edildiği belirlenmiştir. Normal ile tümörlü doku arasındaki ifade farkı en az olan genlerin *MMP-9*, *MMP-12*, *MMP-23* ve *MMP-28* olduğu gözlenmiştir. *MMP-9* normal dokularda % 26, tümörlü dokularda % 35; *MMP-12* ve *MMP-23* normal dokularda % 16, tümörlü dokularda % 24; *MMP-28* ise normal dokularda % 15, tümörlü dokularda % 21 oranında bir ifadeye sahiptir. Membran bağlı MMP’lerden *MMP-14* normal dokularda % 22, tümörlü dokularda % 44; *MMP-15* normal dokularda % 22, tümörlü dokularda % 34 oranında görüldü. β -katenin ise normal dokularda % 35, tümörlü dokularda ise % 52 oranında belirlendi (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

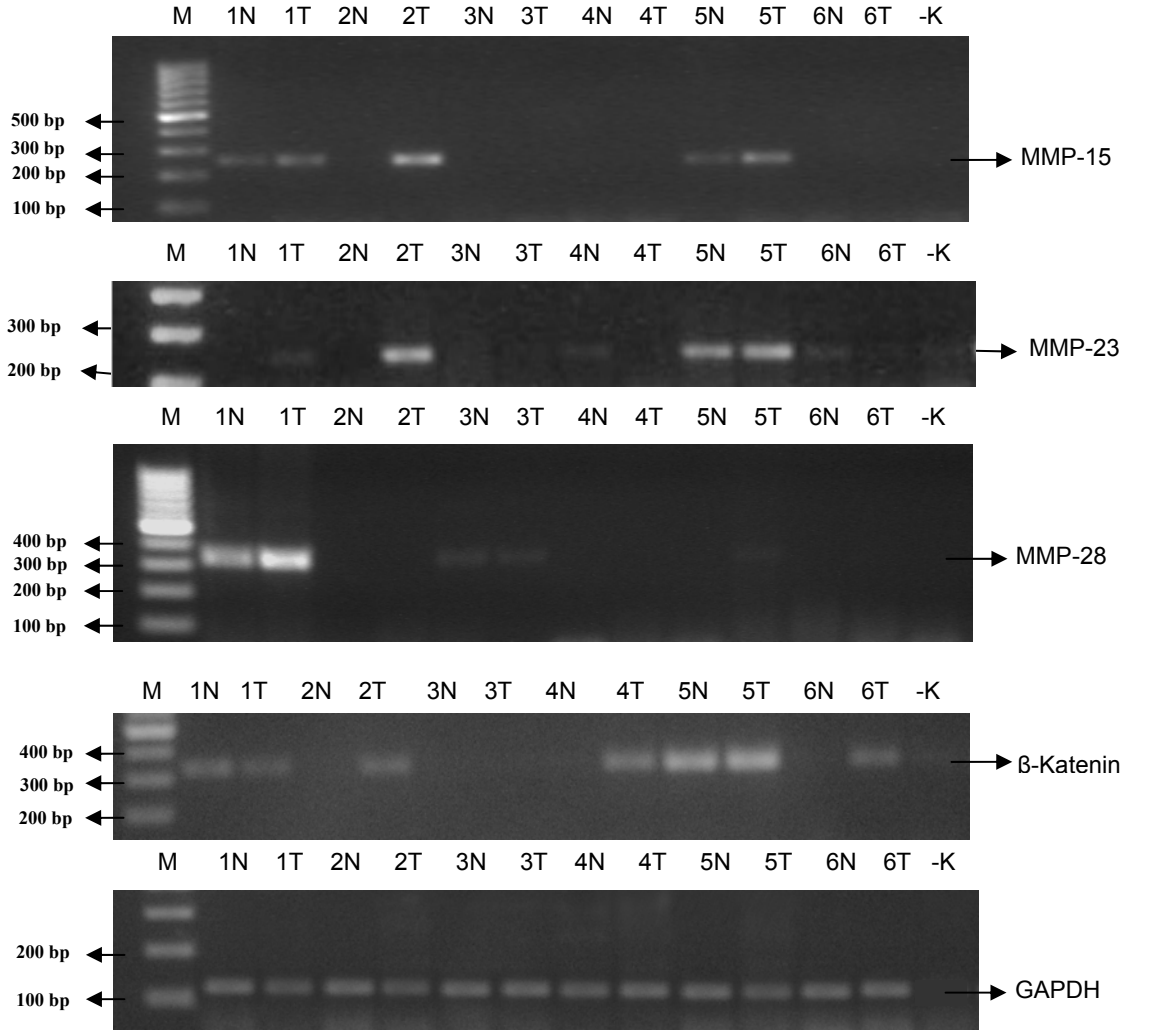
Genel olarak çalışılan bütün MMP genlerinin ve β -katenin geninin normal dokulara kıyasla tümörlü dokularda daha çok ifade oldukları görüldü. Tümörlü dokularda ifade olan bazı MMP’ler arasında korelasyon olduğu görüldü. *MMP-1* ile *MMP-2* arasında pozitif bir korelasyon ($r = 0.316$ $p < 0.01$); *MMP-1* ile *MMP-3* arasında ($r = 0.316$ $p < 0.01$); *MMP-1* ile *MMP-12* arasında ($r = 0.237$ $p < 0.05$); *MMP-1* ile *MMP-15* arasında ($r = 0.248$ $p < 0.05$) yine pozitif yönde korelasyonlar görüldü. *MMP-2* ile *MMP-3* arasında ($r = 0.321$ $p < 0.01$); *MMP-2* ile *MMP-12* arasında ($r = 0.274$ $p < 0.05$); *MMP-3* ile *MMP-12* arasında ($r = 0.274$ $p < 0.05$) ve *MMP-7* ile *MMP-10* ($r = 0.233$ $p < 0.05$) arasında pozitif yönde korelasyonlar görüldü. Ayrıca *MMP-9* ile *MMP-14* ($r = 0.253$ $p < 0.05$); *MMP-9* ile *MMP-28* ($r = 0.256$ $p < 0.05$); *MMP-12* ile *MMP-14* ($r = 0.313$ $p < 0.01$); *MMP-14* ile *MMP-15* ($r = 0.231$ $p < 0.05$); ve *MMP-15* ile *MMP-23* ($r = 0.243$ $p < 0.05$) arasında pozitif yönde bir korelasyon olduğu görüldü.



Şekil 4.1. Mide kanserli hastalardan alınan normal mide dokusu ve tümörlü mide dokusunda *MMP-1*, *2*, *3*, *7* ve *8* genlerinin transkripsiyon seviyesinde ifadesinin yarı nicel RT-PCR ile analizi. N: Normal doku, T: tümörlü doku.

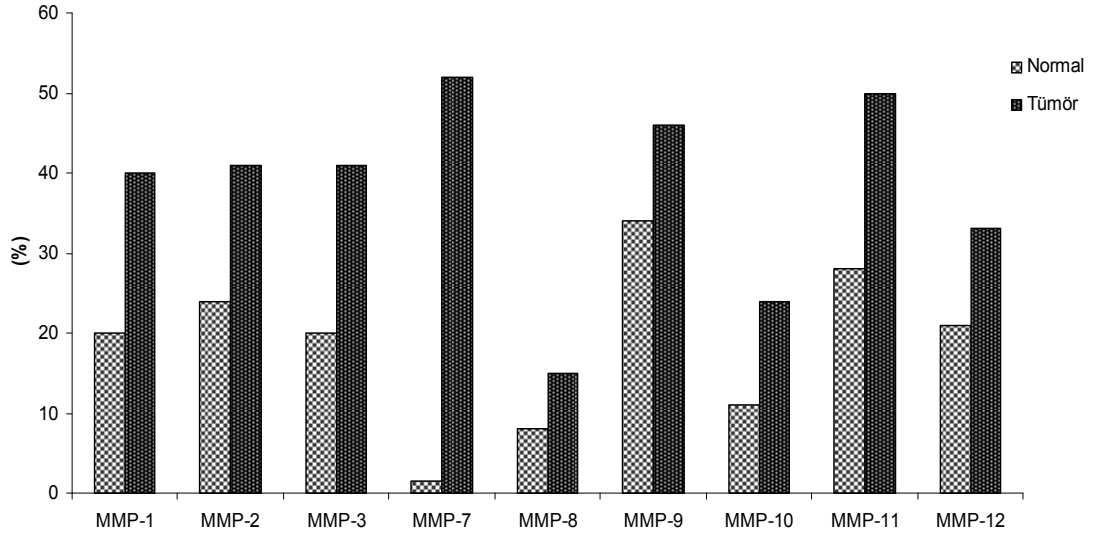


Şekil 4.2. Mide kanserli hastalardan alınan normal mide dokusu ve tümörlü mide dokusunda *MMP-9*, *10*, *11*, *12* ve *14* genlerinin transkripsiyon seviyesinde ifadesinin yarı nicel RT-PCR ile analizi. N: Normal doku, T: tümörlü doku.

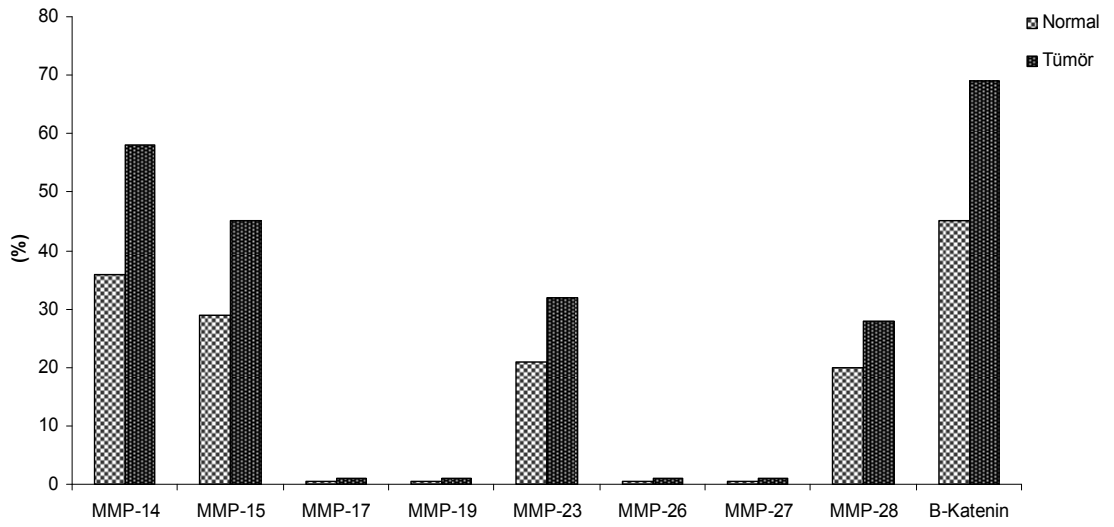


Şekil 4.3. Mide kanserli hastalardan alınan mide dokusu ve tümörlü mide dokusunda *MMP-15*, *23*, *28* ve *β-katenin* genlerinin transkripsiyon seviyesinde ifadesinin yarı nicel RT-PCR ile analizi. N: Normal doku, T: tümörlü doku.

a)



b)



Şekil 4.4. Mide kanserli 76 hastadan alınan normal mide dokusu ve tümürlü mide dokusunda β -katenin ve MMP genlerinin ifade olduğu hasta sayısı (%'lik dilimde) .

4.2. Hasta Dokularının Klinikopatolojik Özellikleri

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Bölümündeki hastalardan temin edilen doku örneklerinin ve hastaların klinikopatolojik özellikleri Çizelge 4.1’de yer almaktadır. Erkek hasta sayısı 51, kadın hasta sayısı 25 olan toplam 76 hasta üzerinden yürütülen bu çalışmada hastaların yaş ortalaması 61.8’dir. Kanserin histolojik tipi adenokarsinom (AK), taş yüzük hücreli karsinom (TYK) ve bu iki sınıfın dışında kalanlar (diğer) şeklinde üç kısma ayrıldı. Hastaların % 60’ında adenokarsinom, % 22’sinde taş yüzük hücreli karsinom ve % 18’de diğer histolojik tipler görüldü. Tümör derecesi bakımından hastalar; I. Derece, II. Derece, III. Derece, İndiferansiye ve diğerleri şeklinde 5 kategoriye ayrıldı. Hastaların tümör derecelerinin en çok III. derecede (% 25) ve II. Derecede (% 22) oldukları görüldü.

Hastaların *H. pylori* ile enfeksiyonları incelendiğinde, % 37’inde *H. pylori* görülürken, % 51’inde görülmemiştir. İnvazyon derinliği bakımından en derin invazyon olan T3 seviyesi hastaların % 49’unda görülürken T2, % 38’inde T1 ise % 8’inde görülmektedir. Çalışılan dokuların % 61’inde nekroz görülürken, % 34’de görülmedi.

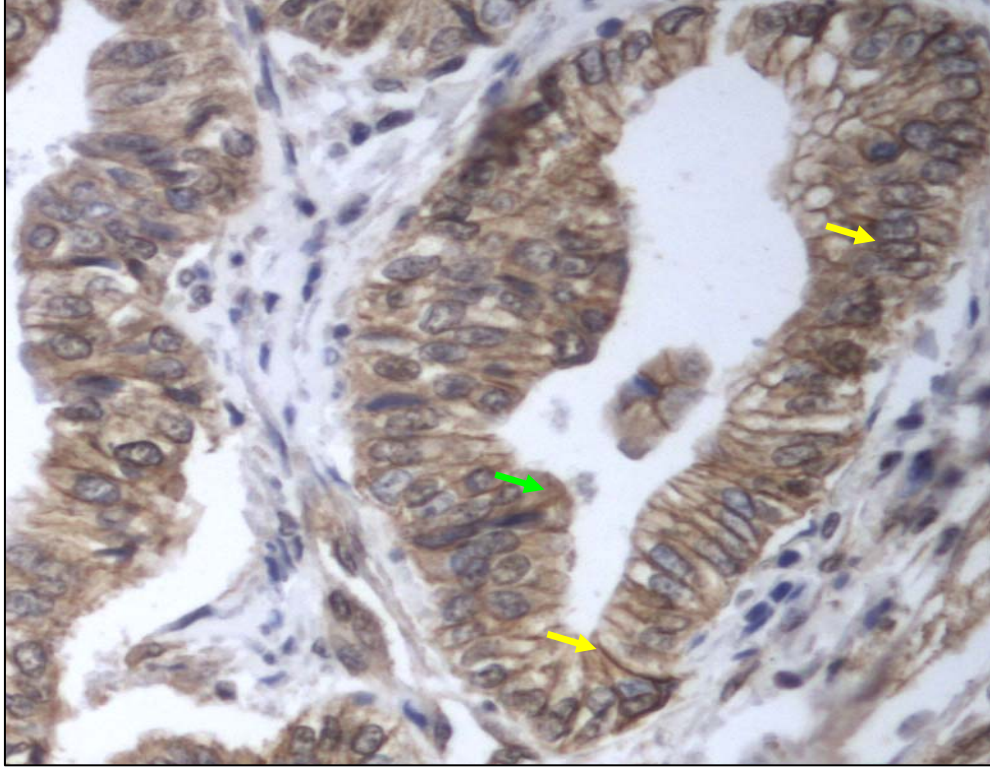
Tümör dokularında histolojik derece ile *MMP-1* ifadesi arasında pozitif yönlü bir ilişki olduğu görüldü ($p < 0.05$). Tümörün histolojik derecesi arttıkça *MMP-1* ifadesi de artmaktadır. Histolojik derece ile diğer gen ifadeleri arasında anlamlı bir ilişki görülmedi. Ayrıca *H. pylori* faktörü ile tümörlü dokulardaki gen ifadeleri ilişkilendirildiğinde, gastrik kanserde *H. pylori* *MMP-2* ifadesini arttırmaktadır ($p < 0.05$). Yine aynı şekilde *H. pylori* *MMP-3* ifadesini de arttırmaktadır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.1. Hasta dokularının klinikopatolojik özellikleri. A.K.: Adenokarsinom; TYK.: Taş yüzük hücreli karsinom.

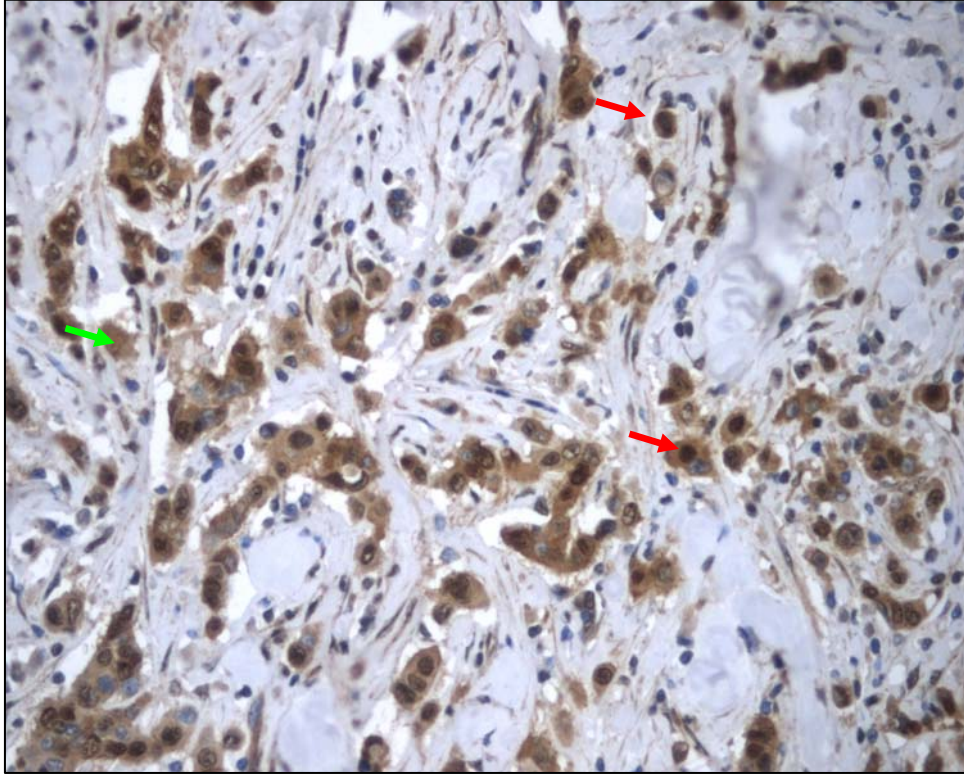
Parametreler	Hasta karakteristiği (n), (%)
Toplam hasta sayısı	76 (100)
Yaş (ortalama)	61.8
Cinsiyet	
Erkek	51 (67)
Kadın	25 (33)
Histoloji	
AK.	45 (60)
TYK.	17 (22)
Diğer	14 (18)
Tümör Derecesi	
Derece 1	9 (12)
Derece 2	22 (29)
Derece 3	25 (33)
İndiferansiye	8 (11)
Diğer	12 (15)
<i>Helicobacter pylori</i>	
Pozitif	28 (37)
Negatif	39 (51)
Tanımsız	9 (12)
İnvazyon Derinliği	
T1	6 (8)
T2	29 (38)
T3	37 (49)
Diğer	4 (5)
Nekroz	
Pozitif	46 (61)
Negatif	26 (34)
Tanımsız	4 (5)

4.3. Mide Kanserli Doku Örneklerinde β -katenin Lokalizasyonu

Çalışılan 76 mide kanserli doku örneğinde β -katenin % 20 oranında nükleusta görülürken yaklaşık % 85 oranında sitoplazma ve membranda görüldü. Nükleer lokalizasyon daha çok taş yüzük hücreli adenokarsinomda görüldü. Genelde kuvvetli derecede sitoplazmik ve membranöz boyanma görülürken, nükleer boyanmanın zayıf derecede olduğu görüldü (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Bir transkripsiyon faktörü olan β -katenin'in nükleer lokalizasyonu bazı MMP'lerin ifadesi açısından önem kazanmaktadır. Bu açıdan nükleer β -katenin ile çalışılan MMP'lerin ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.



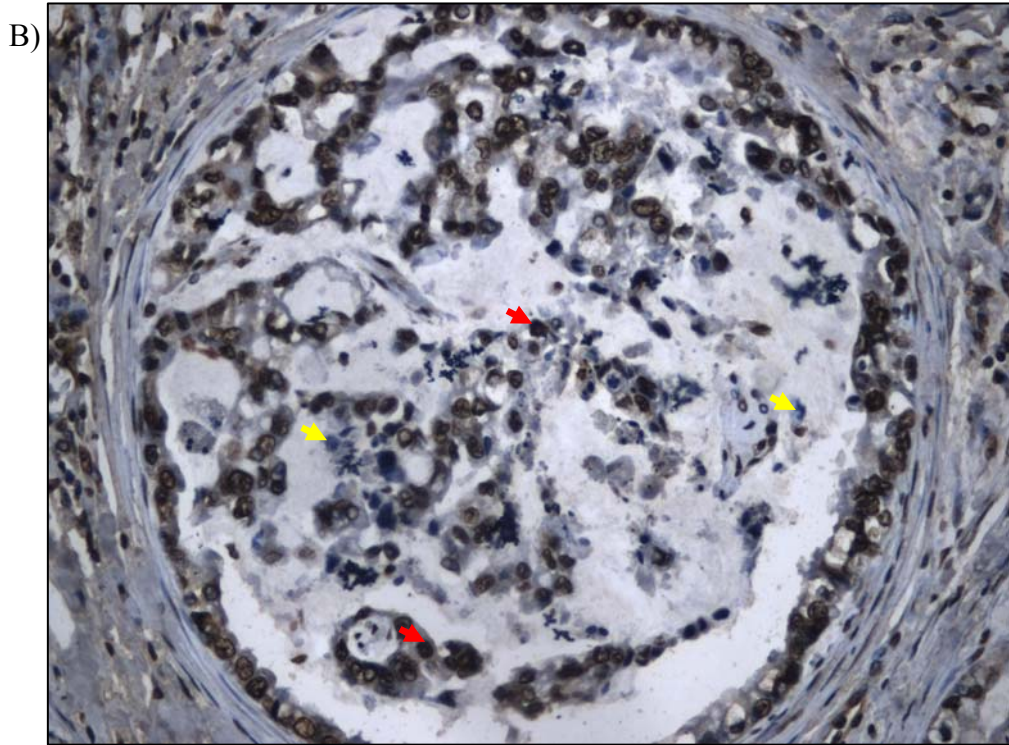
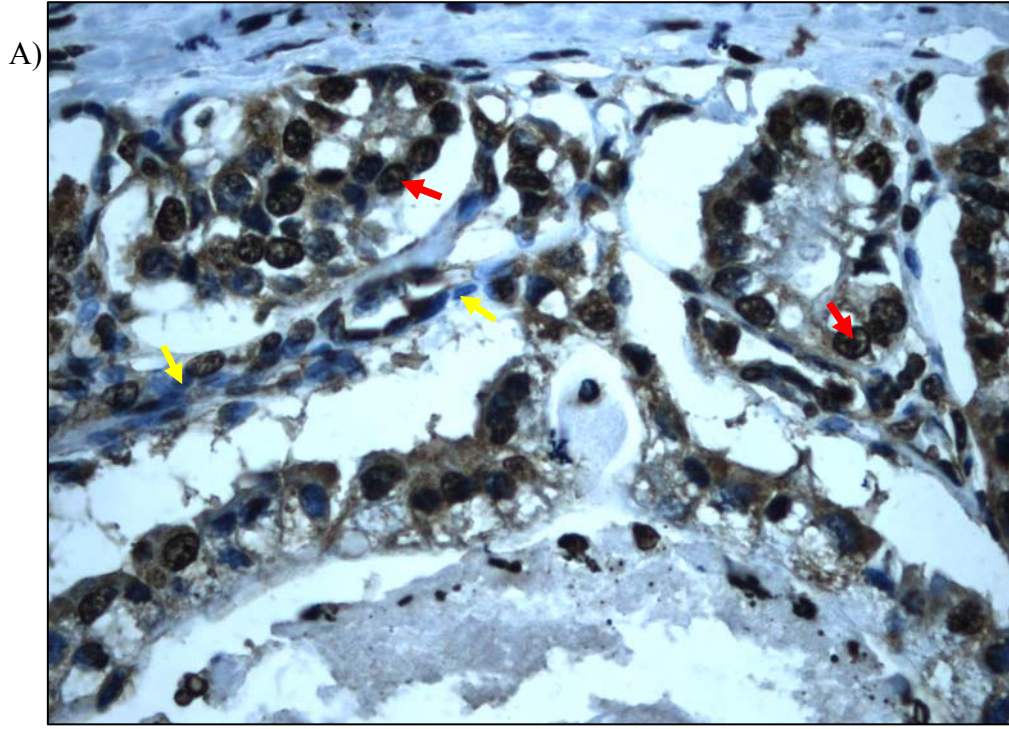
Şekil 4.5. Tümörlü dokularda membranöz ve sitoplazmik β - katenin lokalizasyonu (400x). Sarı oklar membranöz lokalizasyonu; yeşil oklar sitoplazmik lokalizasyonu gösterir.



Şekil 4.6. Tümörlü dokularda nükleer ve sitoplazmik β - katenin lokalizasyonu (200x). Kırmızı oklar nükleer lokalizasyonu; yeşil oklar sitoplazmik lokalizasyonu gösterir.

4.4 . Doku Örneklerinde 8-OHdG Lokalizasyonu

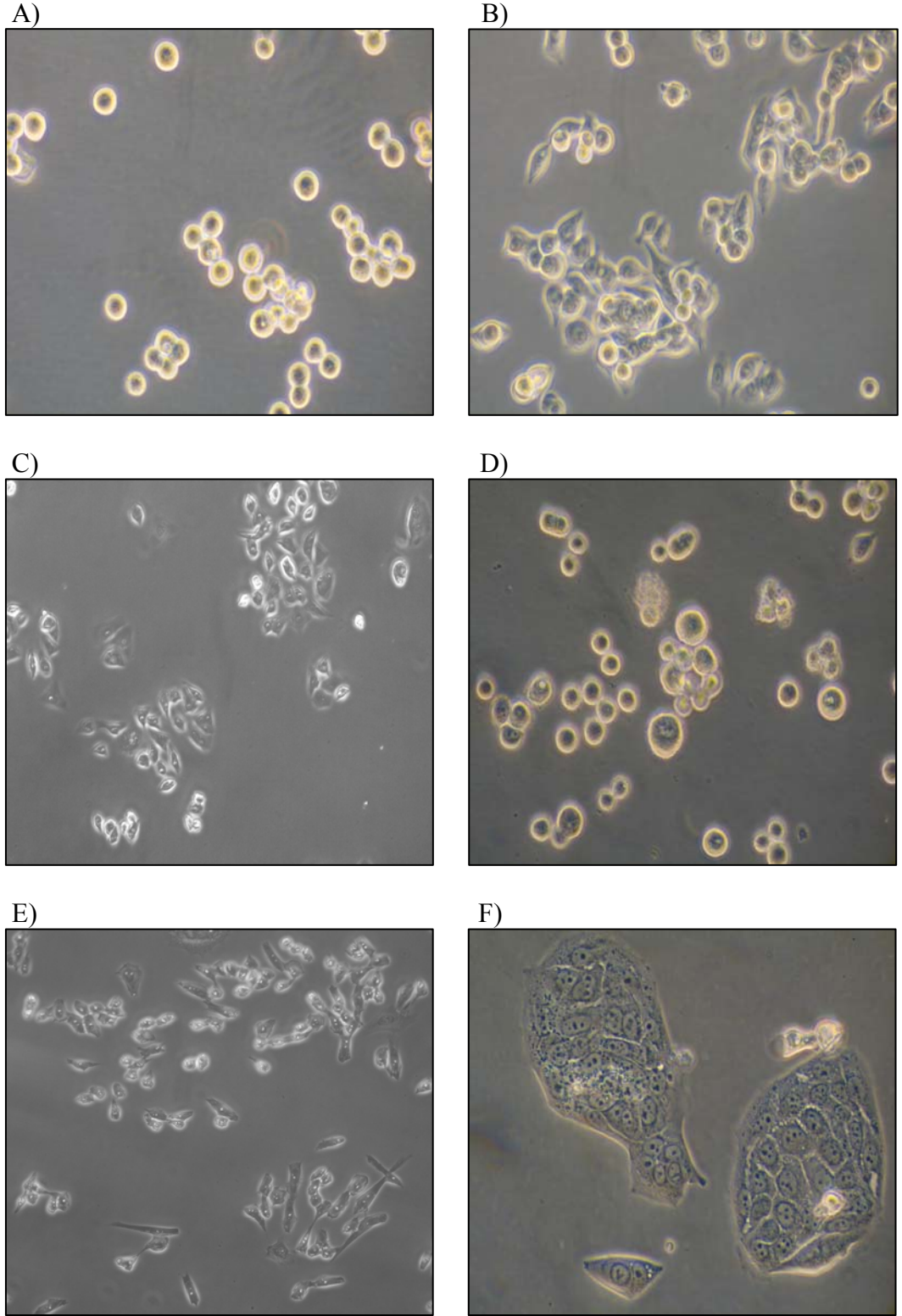
Çalışılan 76 mide kanserli doku örneğinin hepsinde 8-OHdG lokalizasyonu görüldü. Hücre içerisinde DNA'da mevcut olan oksidatif stresin bir belirteci olan 8-OHdG'in bütün dokularda % 100 pozitif çıkması, çalışılan tüm doku örneklerinin tamamen oksidatif stres altında olduğunu göstermektedir. Hem taş yüzük hücreli karsinomda hem de adenokarsinomda hücrelerin yaklaşık % 90-100'ünde kuvvetli bir nükleer boyanma görüldü (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Tümörlü dokularda 8-OHdG lokalizasyonu. Kırmızı oklar 8-OHdG'in nükleer lokalizasyonunu, Sarı oklar ise lokalizasyonunun olmadığı nükleusları göstermektedir. A): Adenokarsinom tip mide kanseri (400x), B): Taş yüzük hücreli karsinom (200x).

4.5. Hücre Hatlarının Kültürü

Çalışmasının hücre kültürü kısmında MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27, CLS-145 olmak üzere toplam 6 adet gastrik kanserli hücre hatları ile çalışıldı. MKN-45 ve 23132/87 Almanya hücre kültürü bankasından (DSMZ), AGS, Kato III, HGC-27 ve CLS-145 Avrupa hücre kültüründen temin edildi. MKN-45 ve 23132/87 % 10 FBS içeren RPMI-1640 büyüme ortamında; AGS, Kato III, HGC-27 ve CLS-145'in ise % 10 FBS içeren DMEM büyüme ortamında kültürleri yapıldı. Bu hücrelerin invert ışık mikroskop görüntüleri Şekil 4.8'de yer almaktadır.



Şekil 4.8. Hücre hatlarının invert ışık mikroskop görüntüleri (200x). A: MKN-45, B: 23132/87, C: AGS, D: Kato III, E: HGC-27, F: CLS-145.

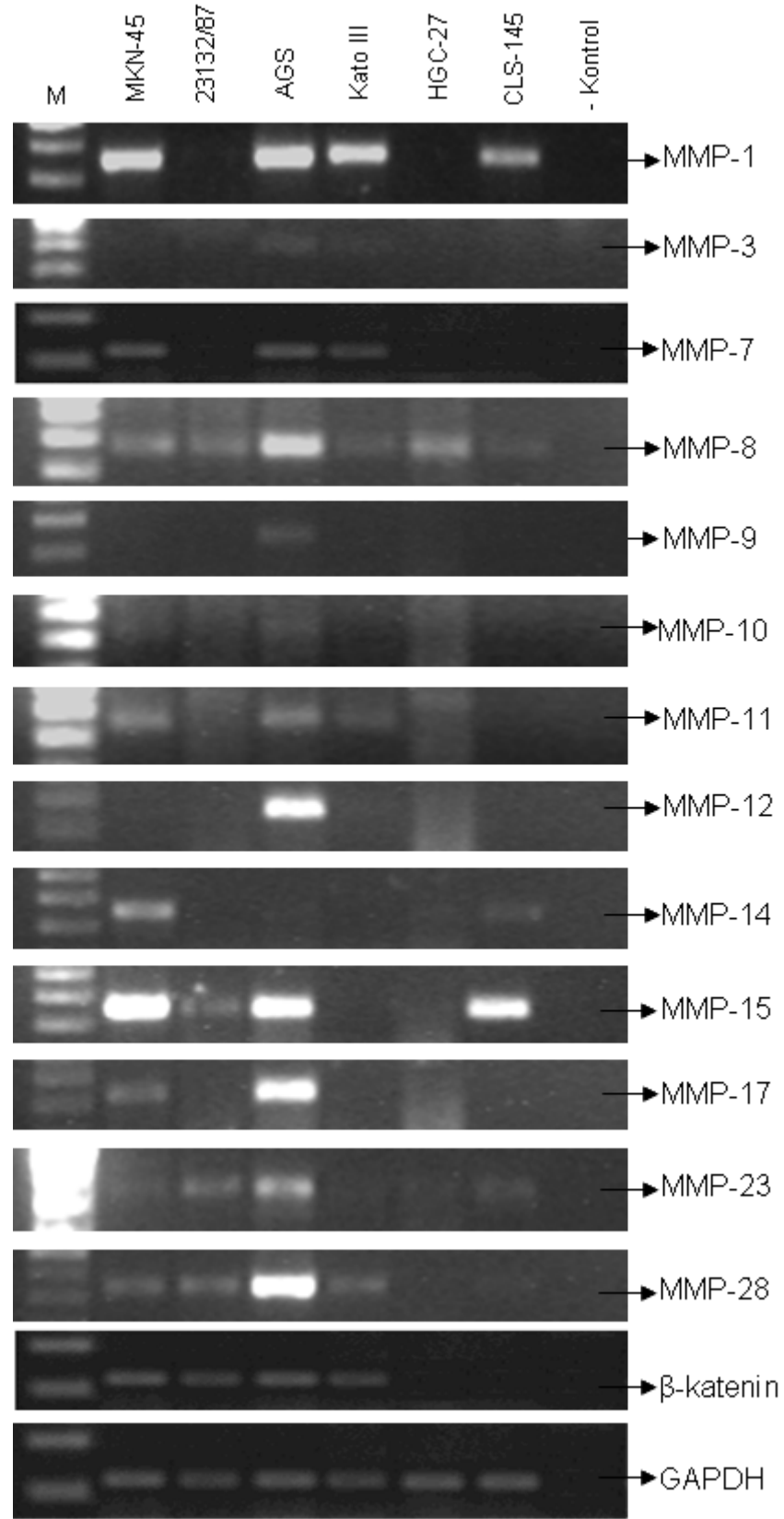
4.6. Hücre Hatlarında β - katenin ve MMP Genlerinin İfadeleri

MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında β - katenin ve *MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 19, 23, 26, 27, 28* genlerinin ifadelerine yarı-nicel RT-PCR yöntemi ile bakıldı. *MMP-2, MMP-26* ve *MMP-27* genlerinin hiç bir hücre hattında ifade olmadığı görüldü. Diğer genlerin hücre hatlarındaki ifadeleri farklılık göstermektedir. MKN-45 hücre hattında, *MMP-1, 7, 10, 11, 14, 15, 17, 19, 23* ve *28*, genlerinin ifade olduğu belirlendi. 23132/87 hücre hattında ise, *MMP-11, 15, 19, 23* ve *28* genlerinin ifadesi saptandı. AGS hücre hattında, *MMP-1, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 23* ve *28* genleri ifade olduğu görülürken, bu hücre hattında çalışılan 17 MMP geninden 12 tanesinin ifade olduğunun görülmesi ile diğer hücre hatlarından daha saldırgan (agresif) bir hat olduğunu göstermektedir. Kato III hücre hattında, *MMP-1, 3, 7, 8, 11, 23* ve *28* genleri ifade olduğu görüldü. HGC-27 hücre hattında, sadece *MMP-8* ve *MMP-23* genlerini ifade olduğu kaydedildi. CLS-145 hücre hattın da ise *MMP-1, 8, 14, 15, 23* genlerinin ifade olduğu gösterildi. β -katenin ifadesi ise MKN-45, 23132/87, AGS ve Kato III hücre hatlarında görülürken, bu durum HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında görülmedi. Çalışılan Hücre hatlarındaki β -katenin ve MMP genlerinin ifadesi Şekil 4.9 ve Çizelge 4.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.2. Hücre hatlarında β -Katenin ve MMP genlerinin ifadeleri

Hücre / Gen	<i>MMP-1</i>	<i>MMP-2</i>	<i>MMP-3</i>	<i>MMP-7</i>	<i>MMP-8</i>	<i>MMP-9</i>	<i>MMP-10</i>	<i>MMP-11</i>	<i>MMP-12</i>	<i>MMP-13</i>	<i>MMP-14</i>
MKN45	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
23132/87	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AGS	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Kato III	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
HGC-27	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
CLS-145	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

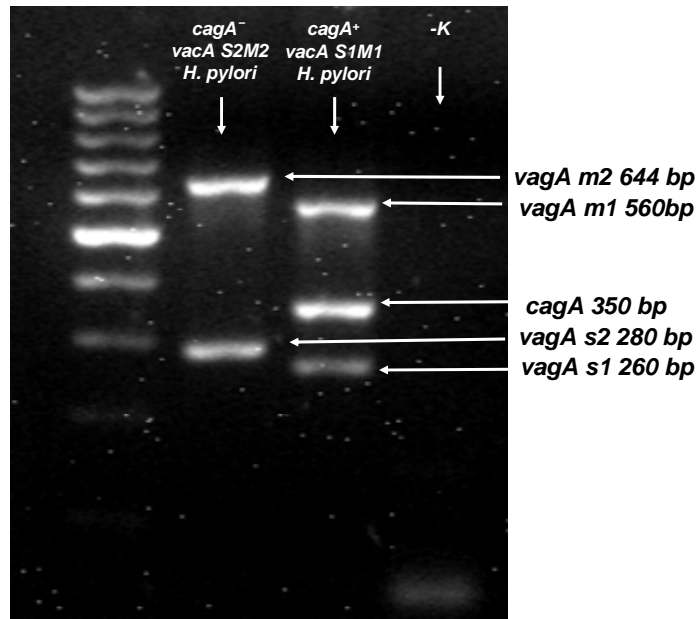
Hücre / Gen	<i>MMP-15</i>	<i>MMP-16</i>	<i>MMP-17</i>	<i>MMP-19</i>	<i>MMP-23</i>	<i>MMP-26</i>	<i>MMP-27</i>	<i>MMP-28</i>	β -Catenin	<i>GAPDH</i>
MKN45	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
23132/87	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
AGS	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
Kato III	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
HGC-27	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
CLS-145	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+



Şekil 4.9. Hücre hatlarında β -katenin ve MMP genlerinin transkripsiyon seviyesinde ifadesi.

4.7. *Helicobacter pylori* Suşlarının *cagA* ve *vagA* Tiplendirmesi

Biyopsi örneklerinden elde edilen *H. pylori* suşlarının multipleks PCR sonucu Şekil 4.10'da görülmektedir. Elde edilen biyopsi örneklerinden *cagA*⁽⁻⁾ suşunda 350 bp 'lık *cagA* genin ifade olmadığı görülmektedir. Bu verilere göre MKN-45 ve 23132/87 hücre hatları *cagA* geninin ifade olduğu *cagA*⁽⁺⁾ *vacA* *S1M1* suşu, (*cagA*⁽⁺⁾ *vacA*⁽⁻⁾ olarakta bilinen) ile enfekte edilmiştir.



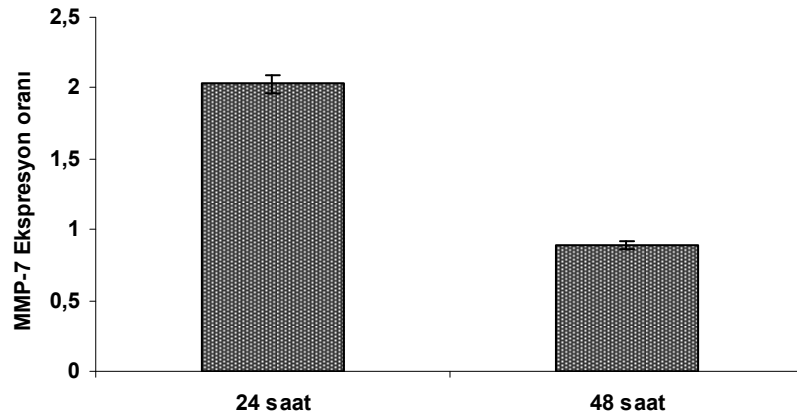
Şekil 4.10. *Helicobacter pylori* multipleks PCR ile *cagA*, *vacA* genotiplendirmesi

4.8. Hücre Hatlarında β -katenin ve MMP Genlerinin İfadesi Üzerine *H. pylori* Enfeksiyonunun Etkisi

Q RT PCR ile analizi yapılan MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarının *cagA*⁽⁺⁾, *vacA*⁽⁺⁾ *H. pylori* suşu ile 24 ve 48 saat enfeksiyonu sonucu MKN-45 hücre hattında *MMP-7* ve β -*katenin* genlerinde ifade artışı görülürken, 23132/87 hücre hattında incelenen genlerin ifadelerinde hiçbir değişiklik görülmedi (Çizelge 4.3). *H. pylori* *cagA*⁽⁺⁾ *vacA*⁽⁺⁾ ile 24 saat enfekte edilen MKN-45'de *MMP-7* ifadesi, *H. pylori* enfeksiyonu yapılmayan kontrole göre 2.1 kat artış gösterirken, 48 saat enfeksiyonda 0.9 kat artış göstermiştir (Şekil 4.11).

Çizelge 4.3. *H. pylori* ile enfekte edilen hücre hatlarında görülen gen ifadesi değişikliği

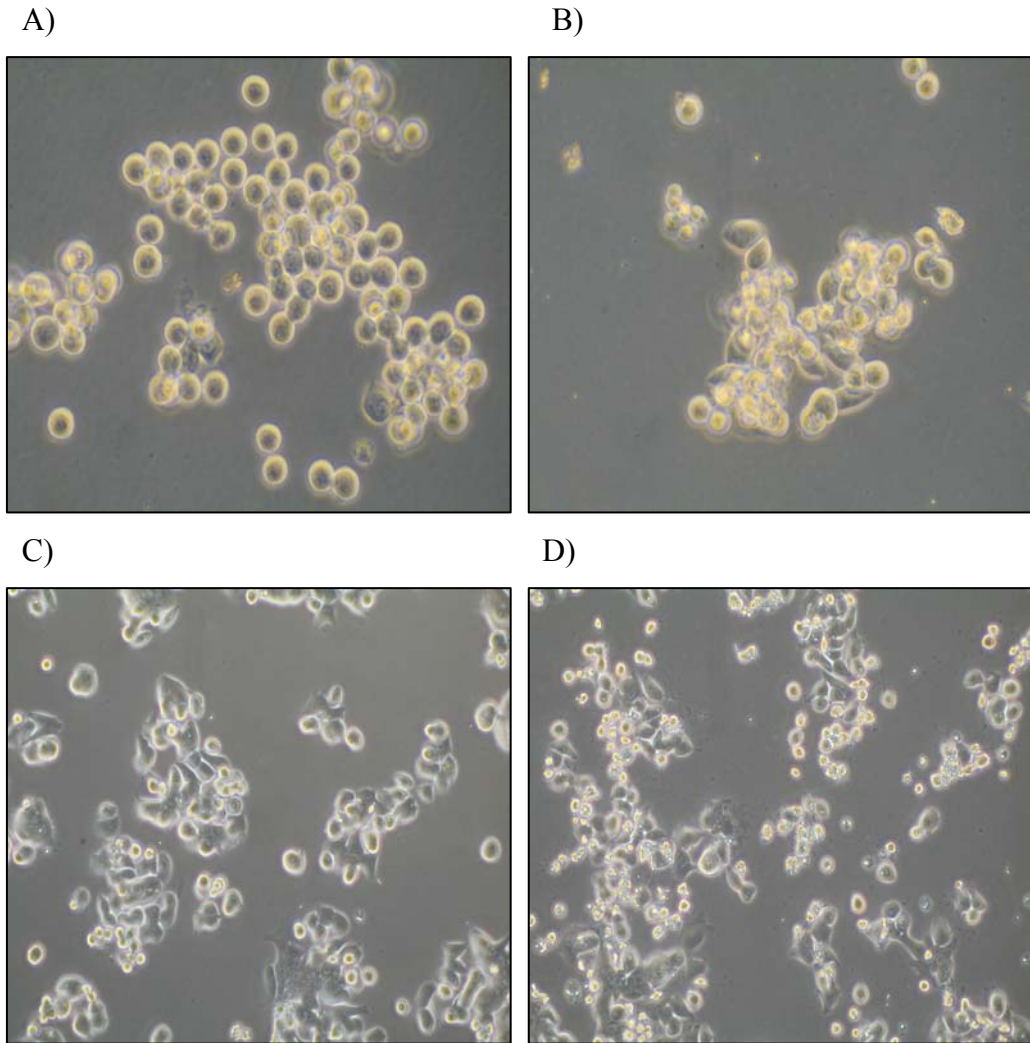
Gen / Hücre	MKN-45 (<i>cag</i> ⁽⁺⁾)	23132/87 (<i>cag</i> ⁽⁺⁾)
<i>MMP-1</i>	–	–
<i>MMP-7</i>	↑	–
<i>MMP-10</i>	–	–
<i>MMP-11</i>	–	–
<i>MMP-14</i>	–	–
<i>MMP-15</i>	–	–
<i>MMP-17</i>	–	–
<i>MMP-19</i>	–	–
<i>MMP-23</i>	–	–
<i>MMP-28</i>	–	–
<i>β-katenin</i>	–	–



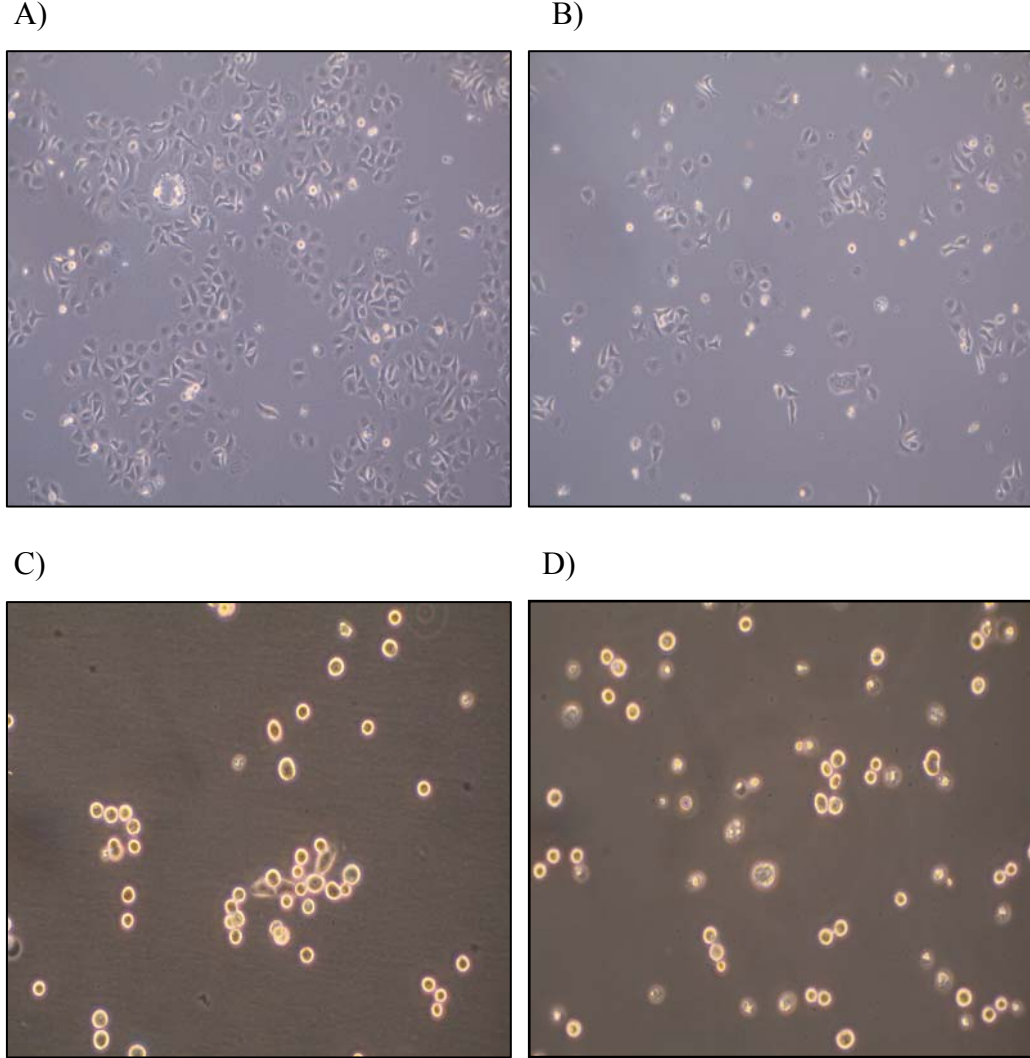
Şekil 4.11. *H. pylori cagA*⁽⁺⁾ *vacA*⁽⁺⁾ ile enfekte edilen MKN-45 hücre hattında *MMP-7* ifadesinin kontrole (*H. pylori* ile enfekte edilmeyen) göre artış oranı. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.

4.9. Hücre Hatlarında H₂O₂'nin Oluşturduğu Morfolojik Değişiklik

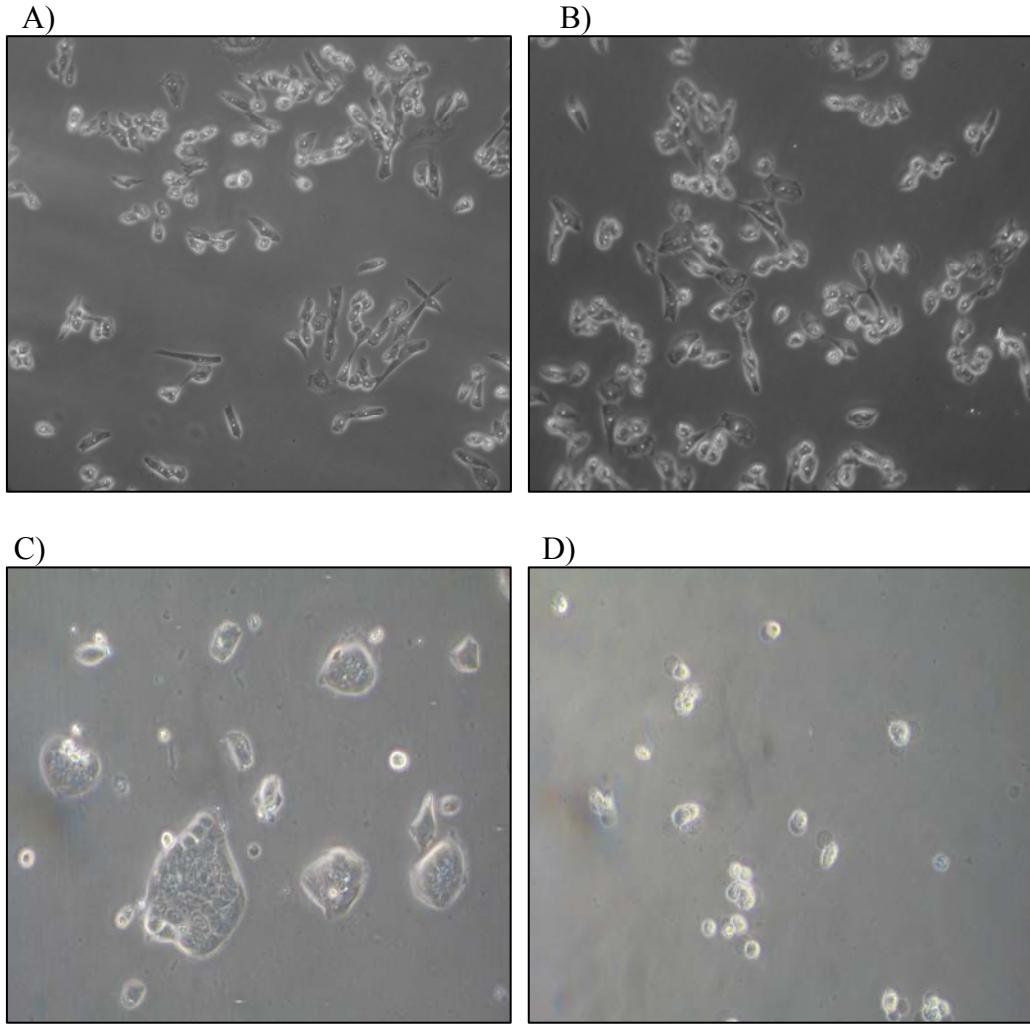
H₂O₂'in toksik etkisinden dolayı çalışmada kullanılan bütün hücre hatlarında morfolojik değişiklikler görüldü. Bütün hücre hatlarında 200 µM H₂O₂, kontrolleriyle (H₂O₂ muamelesi görmemiş) kıyaslandığında morfolojik anormalliklere rastlandı. Ayrıca hücrelerin yüzeye tutunma özelliklerinin kaybolduğu ve bir kısmının nekroza uğradıkları görüldü (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14).



Şekil 4.12. MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında 200µM H₂O₂'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu morfolojik değişikliklerin invert ışık mikroskop görüntüsü (200X). A: kontrol MKN-45, B: 200µM H₂O₂ muamelesi görmüş MKN-45; C: kontrol 23132/87, D: 200µM H₂O₂ muamelesi görmüş 23132/87.



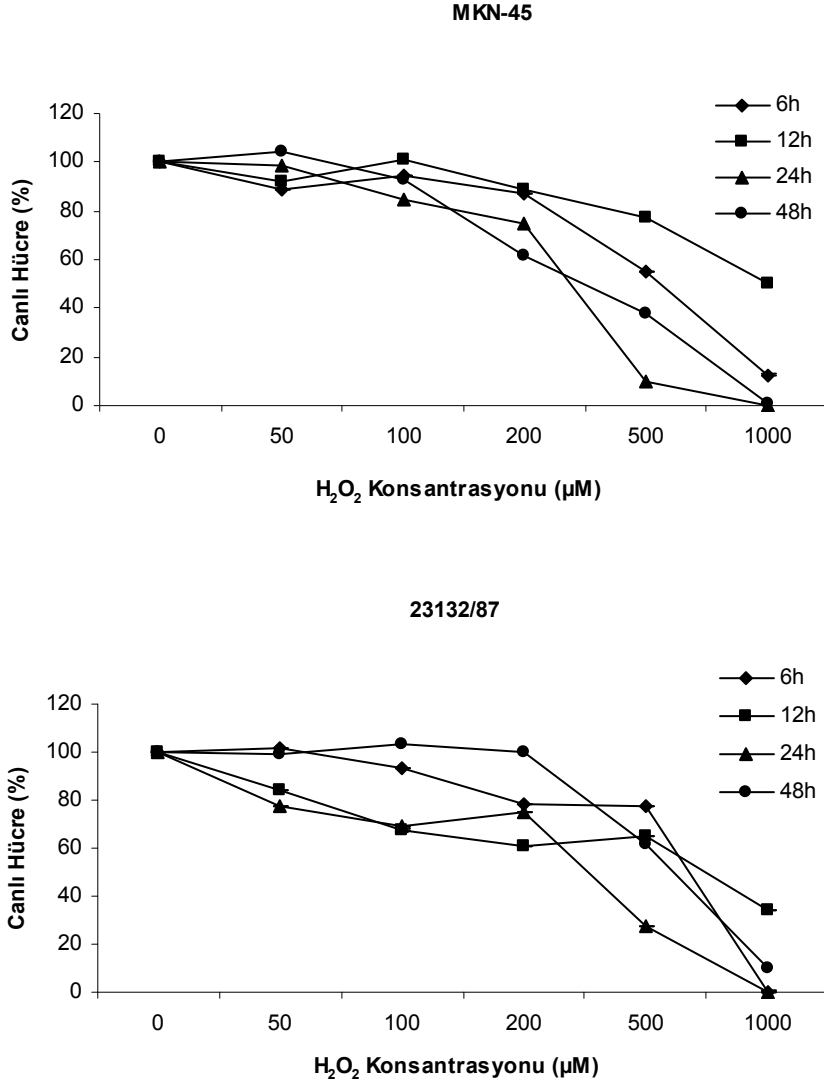
Şekil 4.13. AGS ve Kato III hücre hatlarında 200μM H₂O₂'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu morfolojik değişikliklerin invert ışık mikroskop görüntüsü (200X). A: kontrol AGS, B: 200μM H₂O₂ muamelesi görmüş AGS; C: kontrol Kato III, D: 200μM H₂O₂ muamelesi görmüş Kato III.



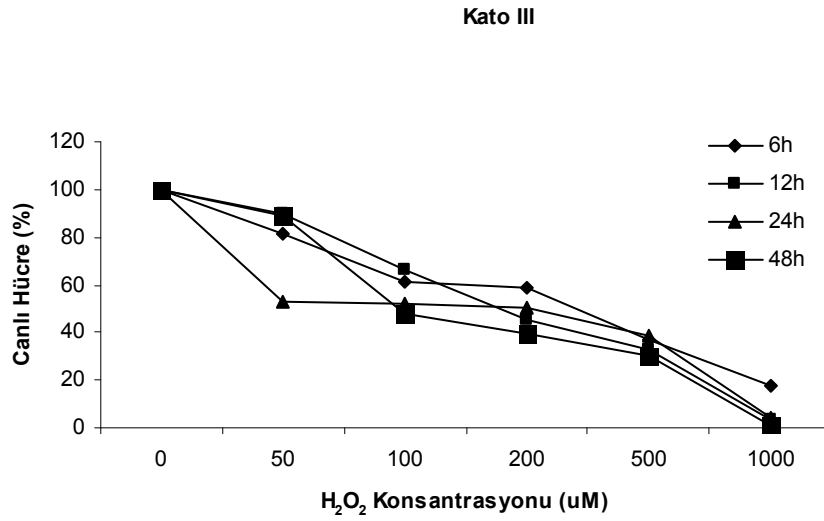
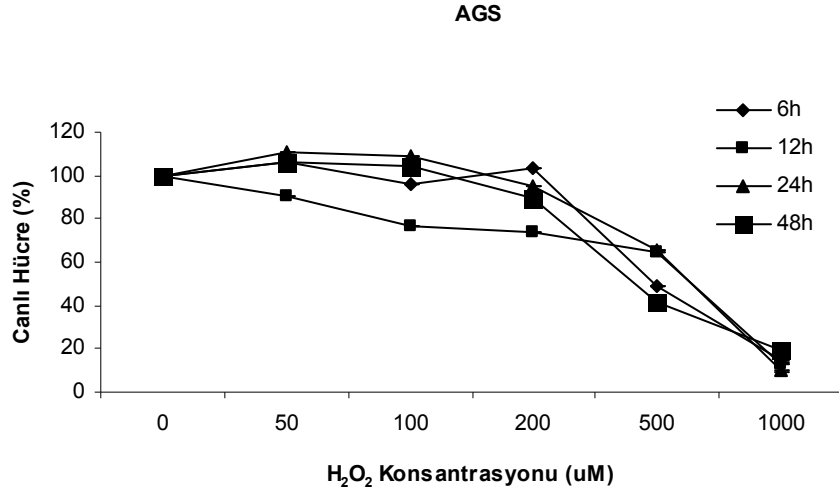
Şekil 4.14. HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında 200µM H₂O₂'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu morfolojik değişikliklerin invert ışık mikroskop görüntüsü (200X). A: kontrol HGC-27, B: 200µM H₂O₂ muamelesi görmüş HGC-27; C: kontrol CLS-145, D: 200µM H₂O₂ muamelesi görmüş CLS-145.

4.10. Hücre Hatlarında H₂O₂'nin Sitotoksik Etkisinin Tespit Edilmesi

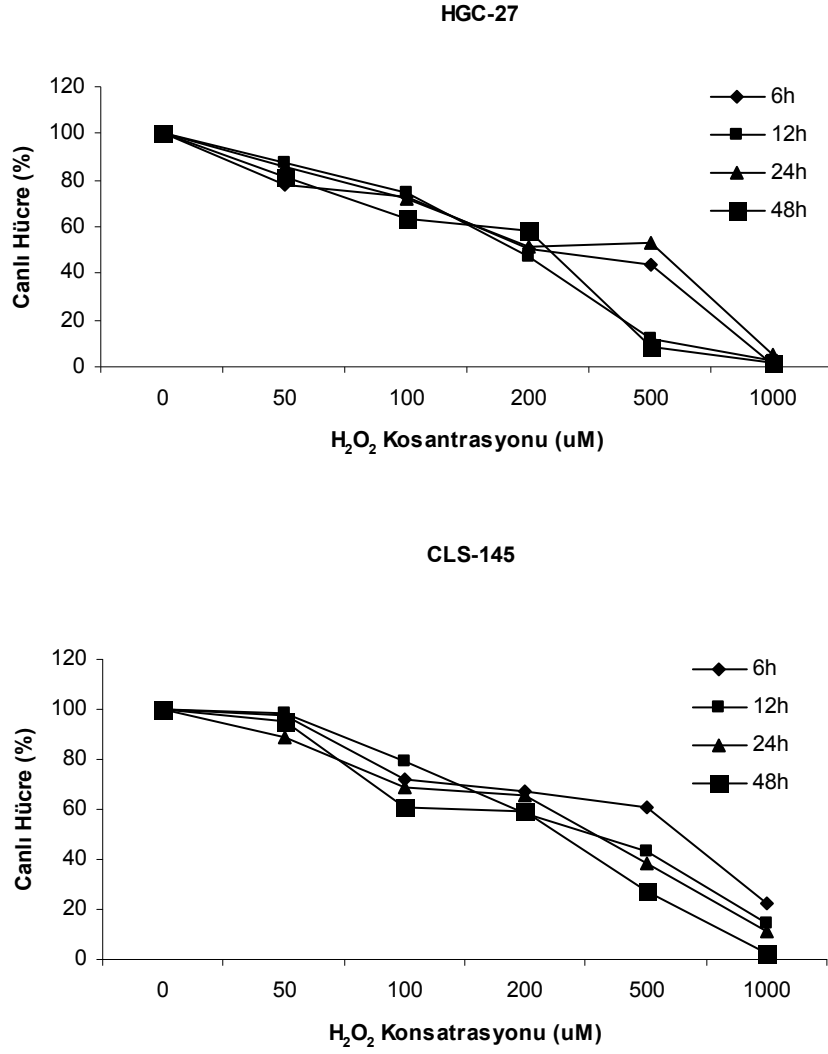
MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında 50-1000 µM H₂O₂'in sitotoksik etkisi 6, 12, 24 ve 48 saat zaman dilimlerinde MTT yöntemiyle bakıldı. MKN-45, 23132/87, AGS hücre hatlarında 50-200 µM H₂O₂ yaklaşık olarak aynı toksik etkiyi gösterirken (canlı hücre sayısı % 80- 60 oranında bir değere sahiptir), Kato III, HGC-27 ve CLS-145 hücre hattında konsantrasyon arttıkça canlı hücre sayısı lineer bir şekilde azalış göstermektedir. Bütün hücre hatlarında 6. saat ile 48 saat arasında çok farklı bir sitotoksik etki görülmezken H₂O₂'nin konsantrasyonuna bağımlı bir toksisite görülmektedir, yani doz bağımlı bir toksik etki söz konusudur. Bütün hücre hatlarında 500-1000 µM konsantrasyonlarda % 1-50 oranında canlı hücre görülmektedir (Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).



Şekil 4.15. MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında, H₂O₂' in farklı konsantrasyon ve zaman dilimlerinde göstermiş olduğu sitotoksik etki. Sitotoksosite, H₂O₂ muamelesi sonucu canlı kalan hücreleri belirleme esasına dayanan ve kolorimetrik bir yöntem olan MTT canlılık testi ile tespit edildi. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.



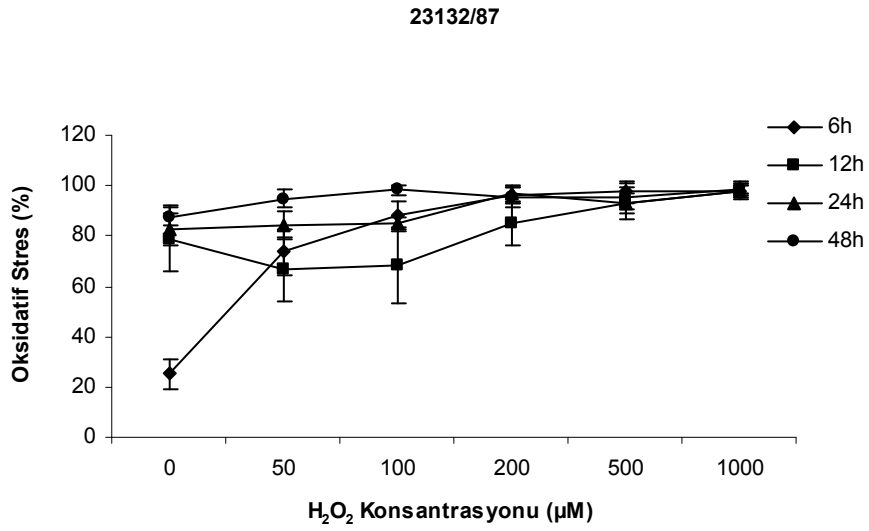
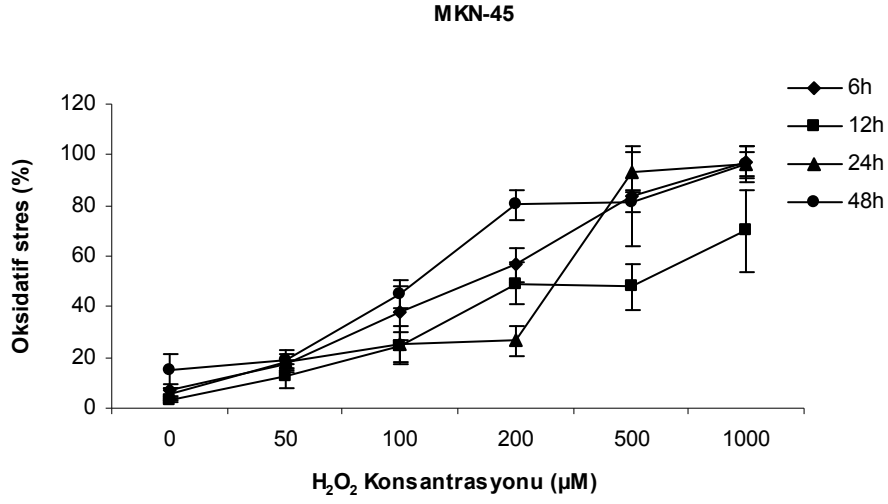
Şekil 4.16. AGS ve Kato III hücre hatlarında, H₂O₂' in farklı konsantrasyon ve zaman dilimlerinde göstermiş olduğu sitotoksik etki. Sitotoksiste, H₂O₂ muamelesi sonucu canlı kalan hücreleri belirleme esasına dayanan ve kolorimetrik bir yöntem olan MTT canlılık testi ile tespit edildi. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.



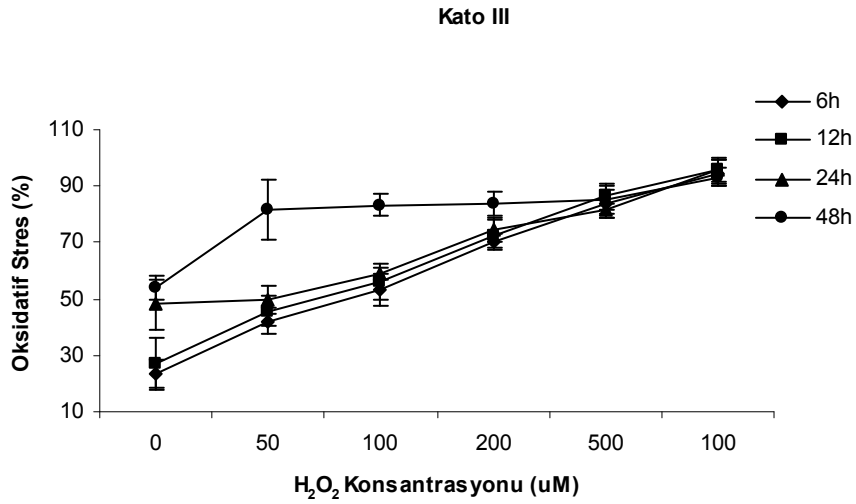
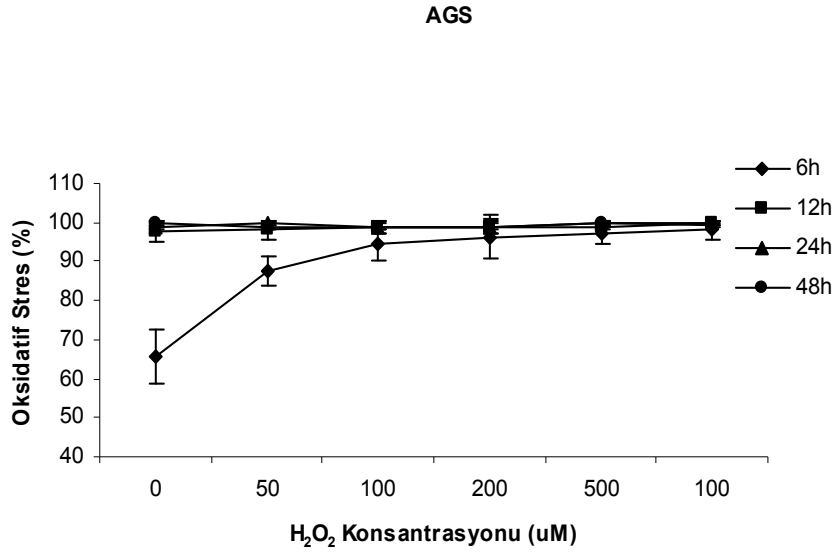
Şekil 4.17. HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında, H₂O₂' in farklı konsantrasyon ve zaman dilimlerinde göstermiş olduğu sitotoksik etki. Sitotoksosite, H₂O₂ muamelesi sonucu canlı kalan hücreleri belirleme esasına dayanan ve kolorimetrik bir yöntem olan MTT canlılık testi ile tespit edildi. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.

4.11. Hücre Hatlarında Canlı Hücre İçi Oksidatif Stres Seviyesi

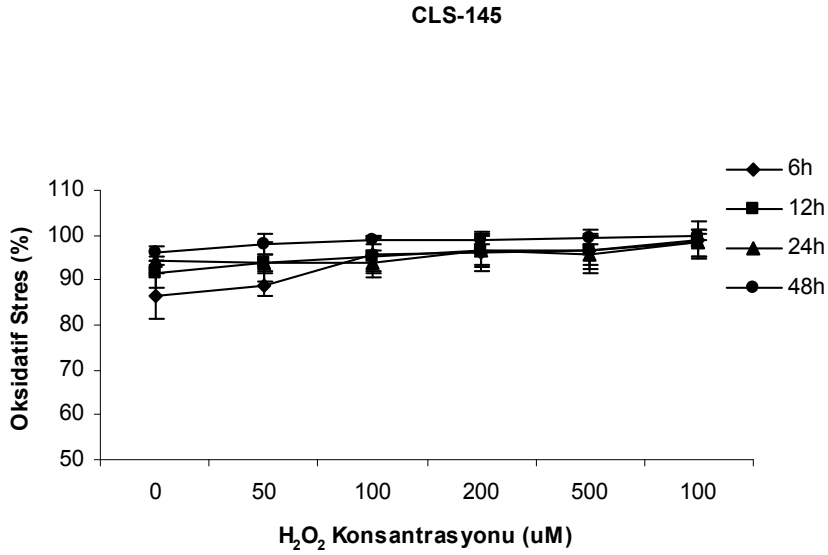
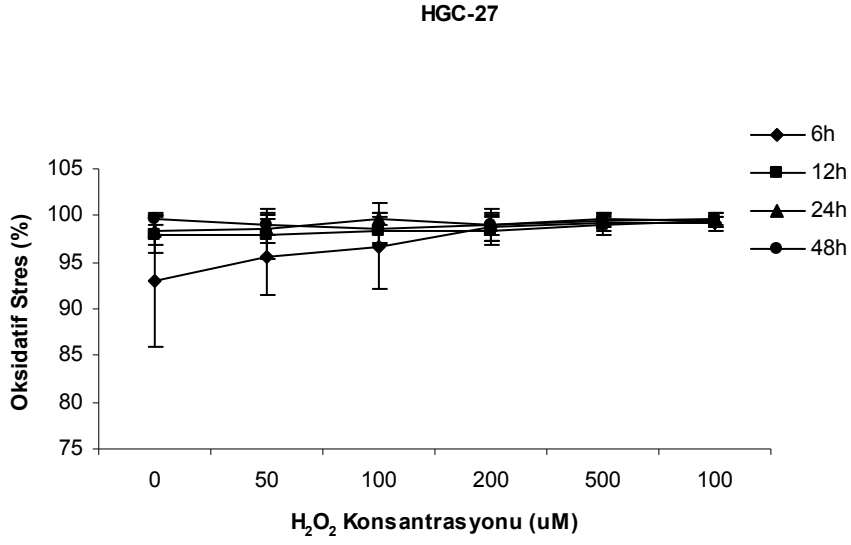
MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında 50-1000 μM H_2O_2 'in hücre içerisinde oluşturmuş olduğu oksidatif stres 6, 12, 24 ve 48 saat zaman dilimlerinde DCFH-DA yöntemiyle tespit edildi. MKN-45 ve Kato III hücre hattının dışındaki hücre hatlarında birbirine benzer bir stres durumu görüldü. MKN-45 ve Kato III'de H_2O_2 konsantrasyon artışına orantılı olarak hücre içi stresin arttığı saptandı. MKN-45'de 200 μM H_2O_2 hücrelerin yaklaşık % 40-60'ında bir oksidatif stres yaratırken Kato III'de hücrelerin yaklaşık % 75'inde oksidatif stres yarattığı görüldü. 23132/87, AGS, HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında doğal olarak hücre içi bir stresin varlığı görüldü. Yani hücrelere dışarıdan eklenen H_2O_2 'in ilave edilmediği kontrol örneklerinde yüksek düzeylerde stresin oluştuğu görüldü. Bu hücre hatlarının hepsinde bütün konsantrasyonlarda zamana bağlı olmaksızın % 70-100 arasında değişen bir oranda canlı hücre içi stres görüldü (Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Ayrıca kontrol ve strese sokulan örneklerin floresan invert mikroskoptaki görüntülerine baktığımızda, MKN-45 ve Kato III'ün kontrollerinde, H_2O_2 muamelesi yapılan örneklerle kıyasla daha az bir floresan ışımaya daha az sayıda hücrenin strese girdiği görüldü. 23132/87, AGS, HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında ise hem kontrol hemde H_2O_2 muamelesi yapılan örneklerde aynı miktarda bir floresan ışımaya ile benzer sayıda hücrenin strese girdiği görüldü (Şekil 4,21, Şekil 4,22, Şekil 4 23). Dolayısı ile bu hücre hatlarında yüksek oranlarda endojen kaynaklı hücre içi stresin olduğu anlaşıldı.



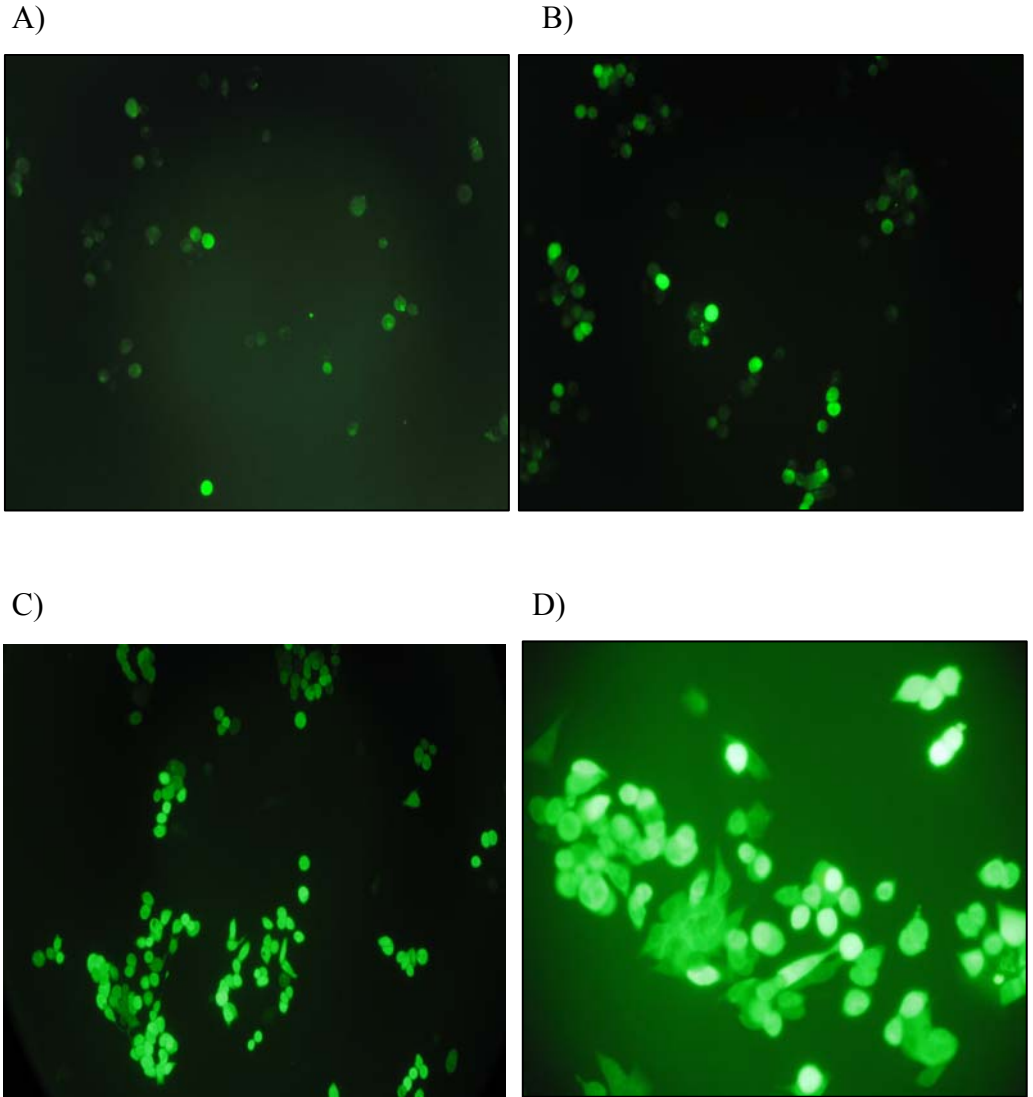
Şekil 4.18. Farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında canlı hücre içi oksidatif stres seviyeleri. Oksidatif stres analizi oksidant duyarlı floresan bir boya olan DCFH-DA yöntemi ile belirlendi. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.



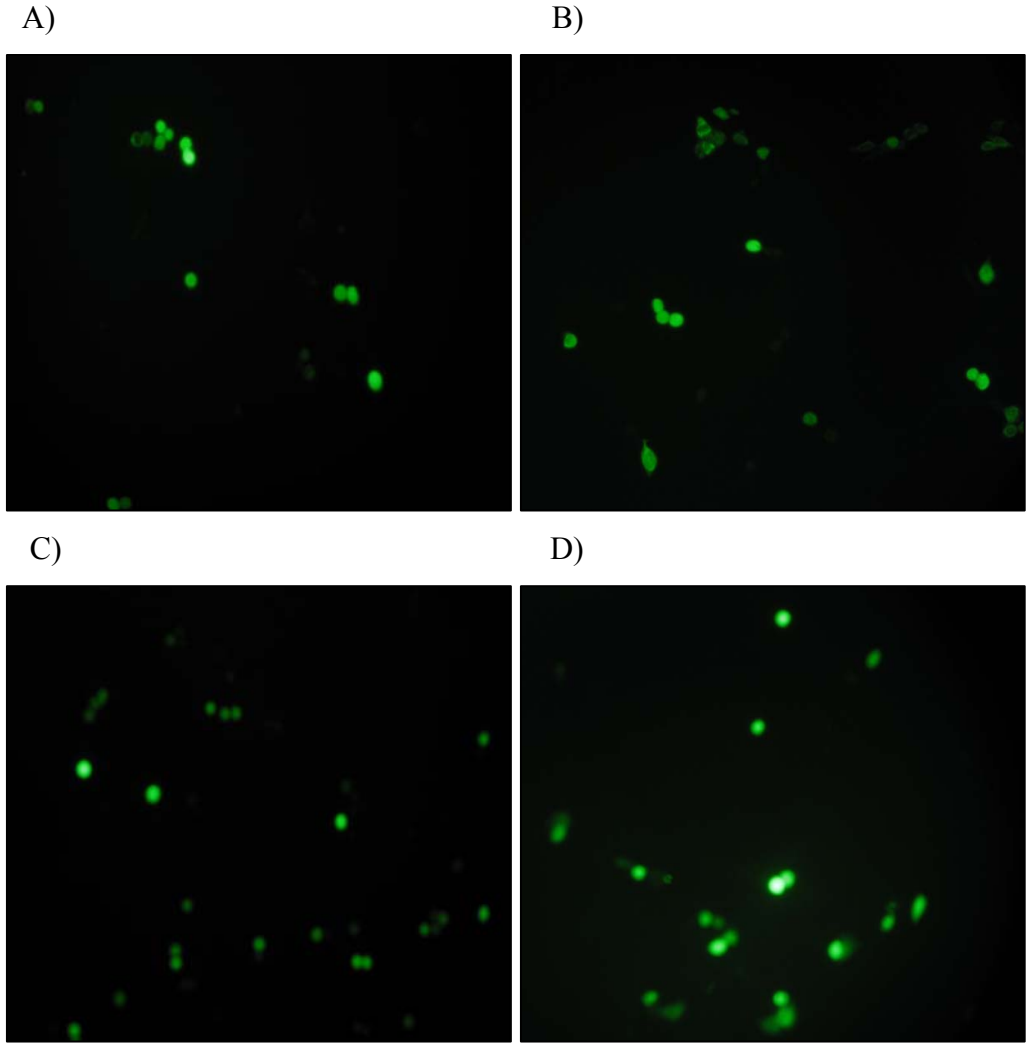
Şekil 4.19. Farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan AGS ve Kato III hücre hatlarında canlı hücre içi oksidatif stres seviyeleri. Oksidatif stres analizi oksidant duyarlı floresan bir boya olan DCFH-DA yöntemi ile belirlendi. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.



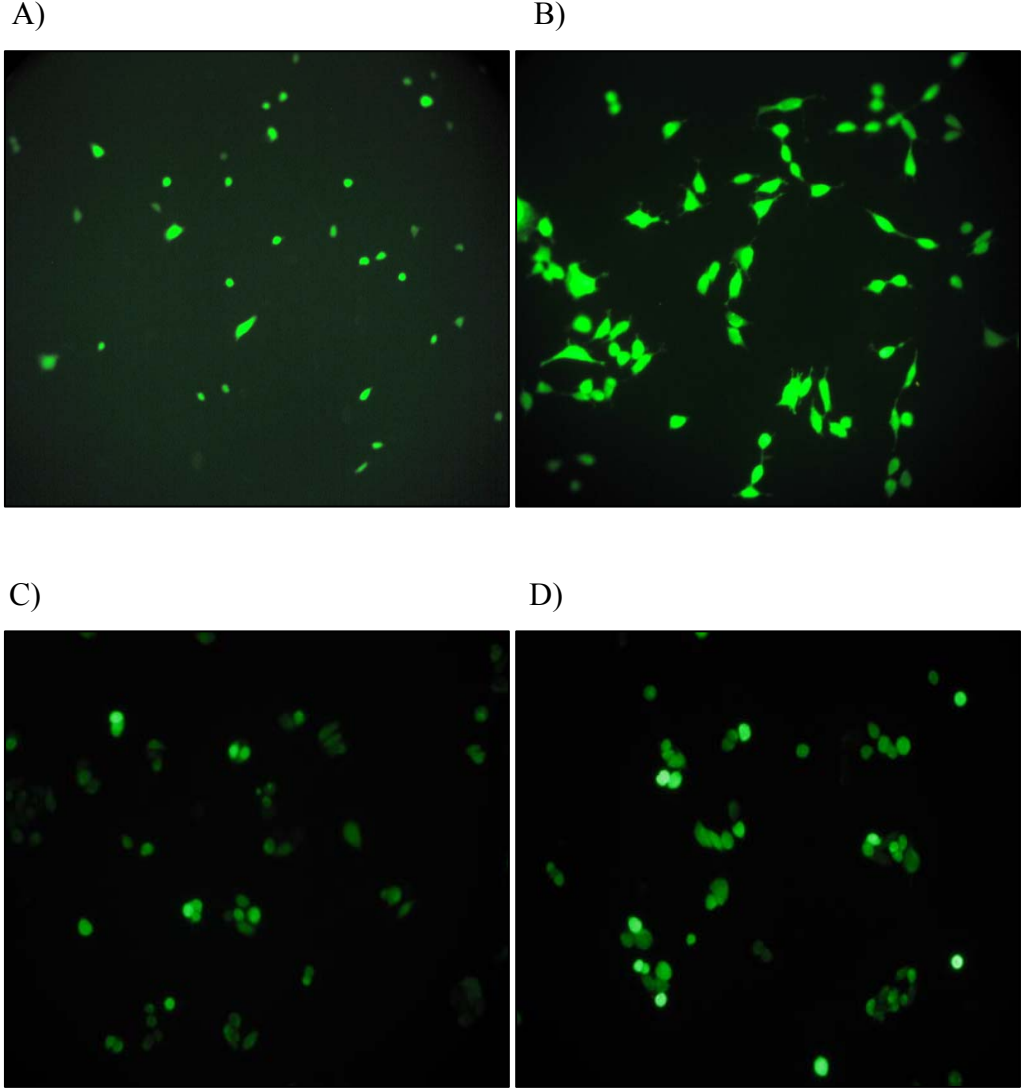
Şekil 4.20. Farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında canlı hücre içi oksidatif stres seviyeleri. Oksidatif stres analizi oksidant duyarlı floresan bir boya olan DCFH-DA yöntemi ile belirlendi. Her bir veri üç bağımsız değer ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.



Şekil 4.21. Oksidantlara duyarlı floresan bir boya olan DCFH-DA yöntemi ile MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında 200 μM H_2O_2 'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu canlı hücre içi oksitatif stresin floresan invert ışık mikroskop ile görüntülenmesi (200X). A: kontrol MKN-45, B: 200 μM H_2O_2 muamelesi görmüş MKN-45; C: kontrol 23132/87, D: 200 μM H_2O_2 muamelesi görmüş 23132/87.



Şekil 4.22. Oksidantlara duyarlı floresan bir boya olan DCFH-DA yöntemi ile AGS ve Kato III hücre hatlarında 200 μM H_2O_2 'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu canlı hücre içi oksidatif stresin floresan invert ışık mikroskop ile görüntülenmesi (200X). A: kontrol AGS, B: 200 μM H_2O_2 muamelesi görmüş AGS; C: kontrol Kato III, D: 200 μM H_2O_2 muamelesi görmüş Kato III.

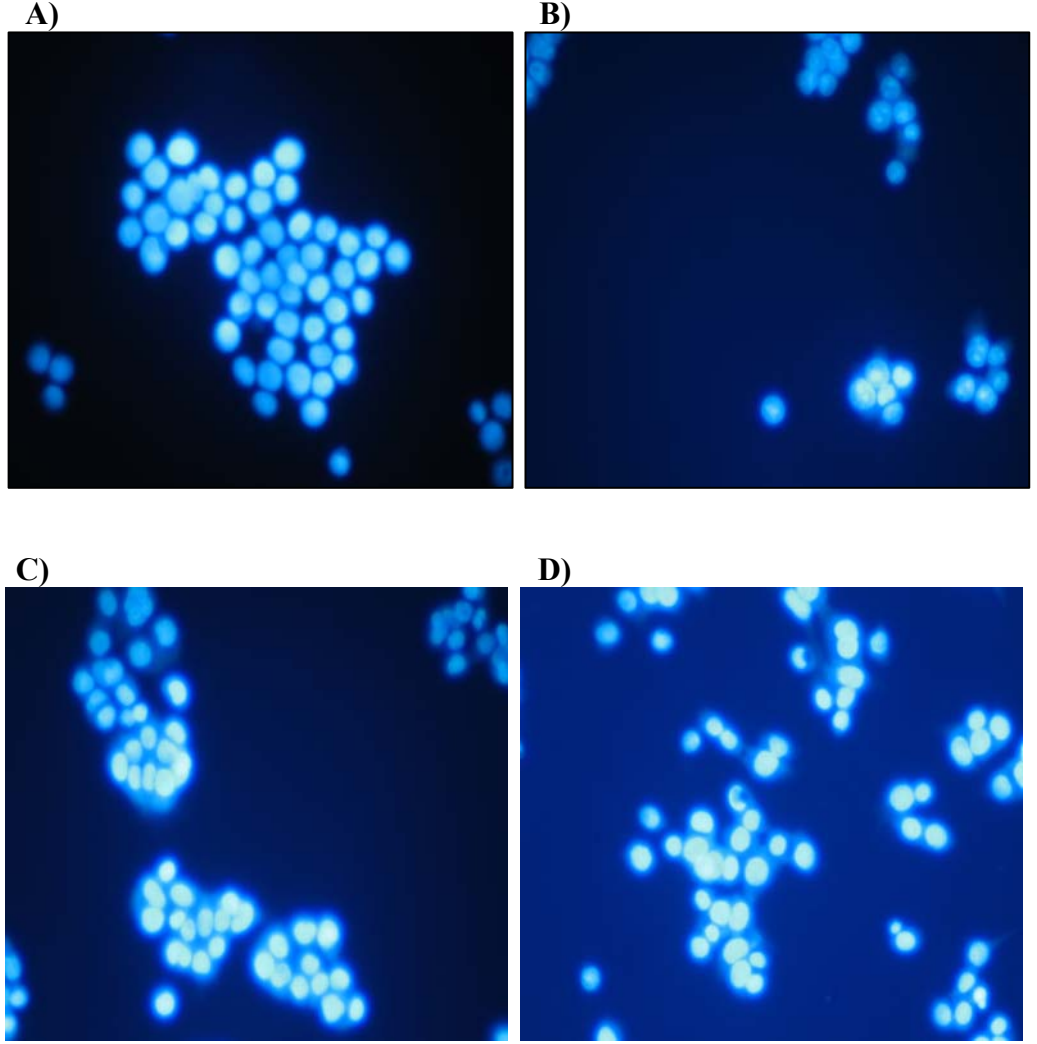


Şekil 4.23. Oksidantlara duyarlı floresan bir boya olan DCFH-DA yöntemi ile HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında 200 μM H_2O_2 'in 24 saat sonra oluşturmuş olduğu canlı hücre içi oksidatif stresin floresan invert ışık mikroskop ile görüntülenmesi (200X). A: kontrol HGC-27, B: 200 μM H_2O_2 muamelesi görmüş HGC-27; C: kontrol CLS-145, D: 200 μM H_2O_2 muamelesi görmüş CLS-145.

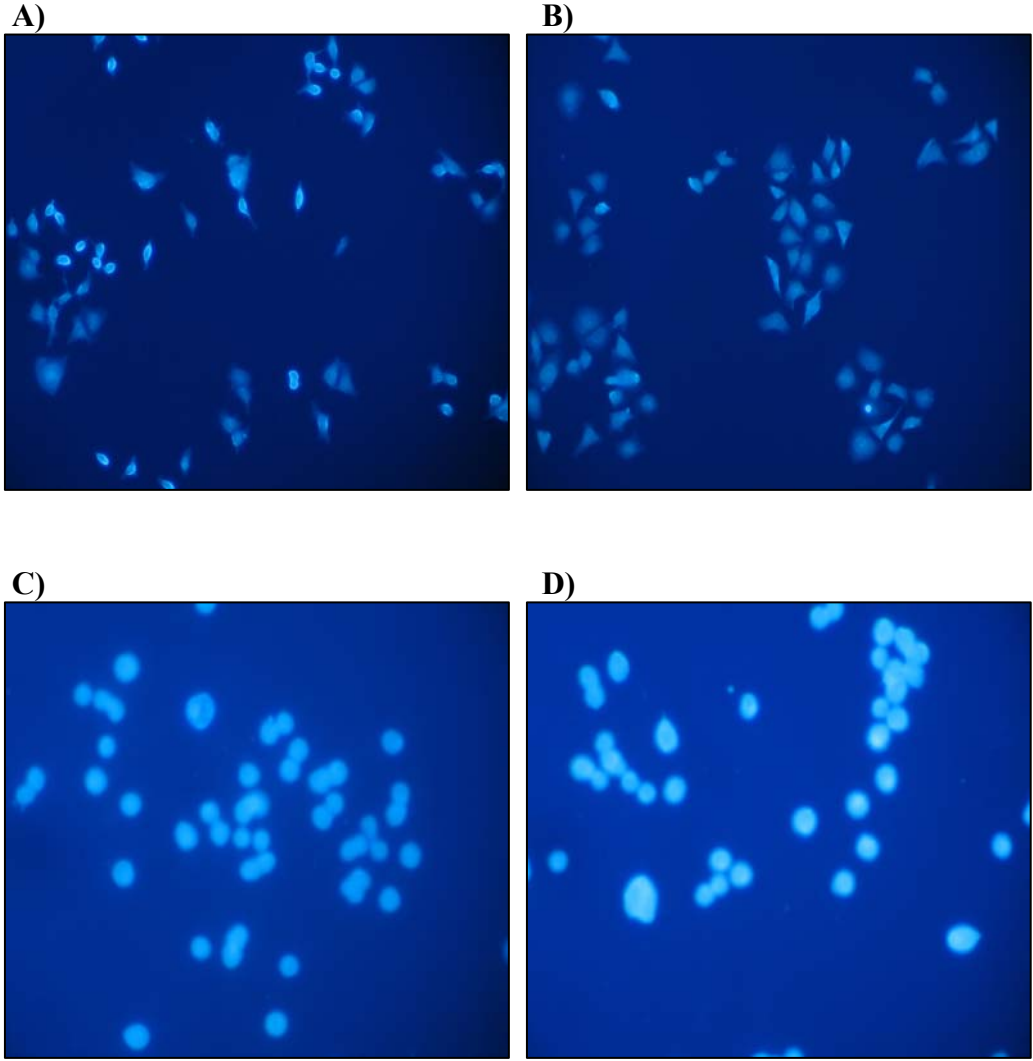
4.12. Hücre Hatlarının Apoptoz Durumları

Farklı konsantrasyonlarda ve farklı zaman dilimlerinde H₂O₂'e maruz kalmış MKN-45, 23132/87, AGS, Kato III, HGC-27, CLS-145 hücre hatlarında apoptoz iki farklı yöntemle bakıldı. Birincisi floresan bir boya olan ve hücre çekirdeğini boyayan Hoechst 33258 boyaması kullanılarak apoptotik hücreler tesbit edildi (Şekil 4.24, 4.25, 4.26). İkincisi ise DNA' da oluşmuş olan kırıkları tespit esasına dayanan TUNEL apoptoz deneyi ile apoptotik hücreler tesbit edildi (Şekil 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31, 4.32) . Hoechst çekirdek boyama yönteminde MKN-45 hücre hattı hariç diğer hücre hatlarının hiç birinde kayda değer bir apoptotik hücre görülmedi. Apoptoza girmiş hücrelerin bu yöntemle incelendiğinde çekirdeklerinin bir kaç parçaya bölünmüş şekilde görünmesi, ya da çekirdeğin hilal şeklinde görünmesi gerekir. MKN-45'de çok belirgin olmayan böyle bir görüntü görüldü (Şekil 4.24, B). Hücrelerin apoptoza girdiklerini daha iyi anlamak için Hoechst çekirdek boyama yönteminden daha duyarlı bir yöntem ile yapılan TUNEL apoptozdeneyinde MKN-45'in apoptoza girdiği görülürken, diğer hücre hatlarında hiç apoptozgörülmedi. MKN-45'de H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak apoptoz oranının arttığı görüldü. Apoptoz oranı 50 µM H₂O₂'de % 35 iken, bu oran 100 µM'da % 68, 200 µM ise % 80 olarak görüldü (Şekil 4.33).

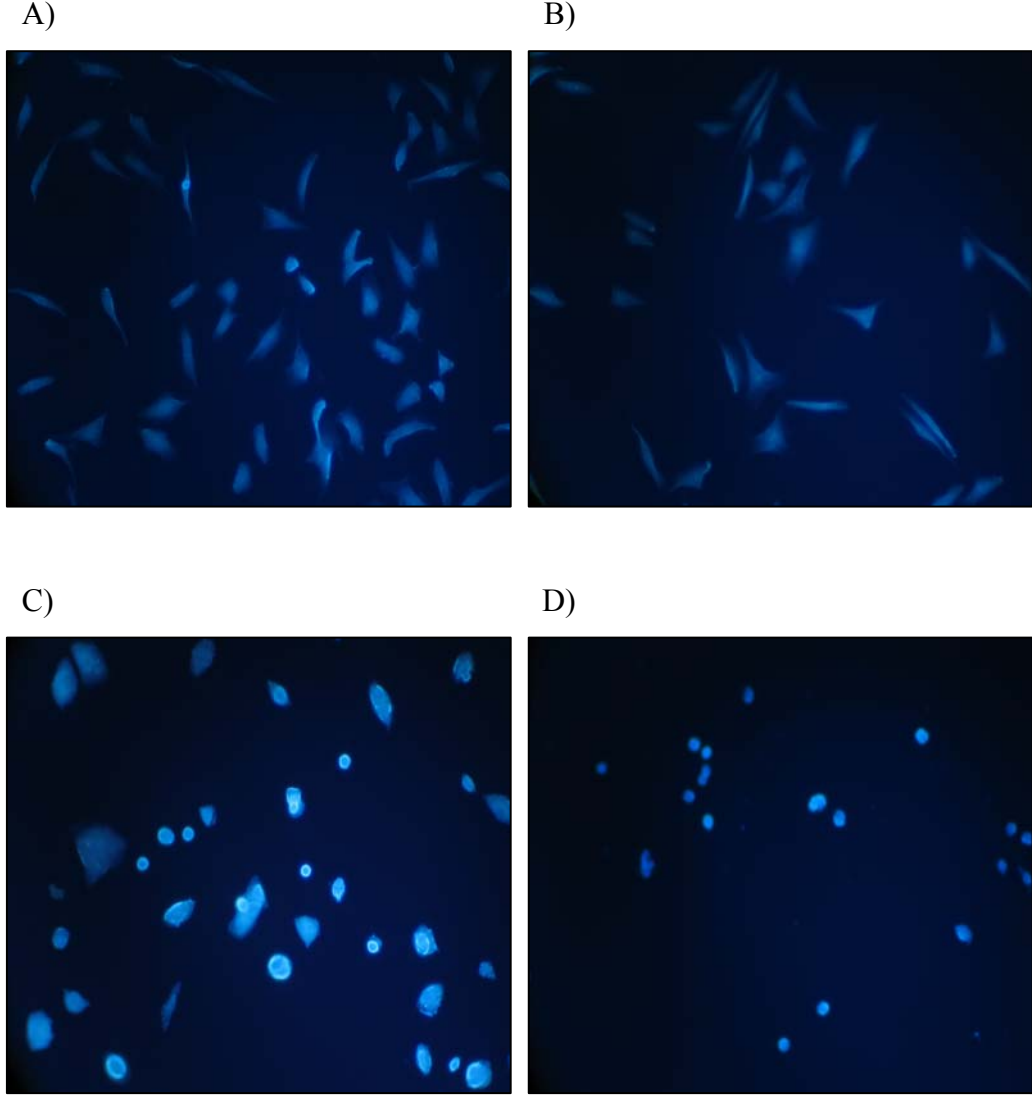
Ayrıca yukarıda bahsedilen yöntemler ile apoptoza girdiği bilinen MKN-45 ve apoptoza girmediği bilinen 23132/87 hücre hatlarında diğer bir apoptoz markırı olan kaspaz-3 enzim aktivitesine bakıldı. 23132/87 hücre hattında ve TUNEL apoptoz deneyi ile apoptoza girdiği görülen MKN-45'de kaspaz-3 aktivitesi görülmedi. Bu sonuç bize MKN-45 hücre hattında H₂O₂ nin oluşturmuş olduğu apoptosizin kaspaz-3 bağımlı olmayan bir apoptotik yolla gerçekleştiğini gösterdi (Şekil 4.34).



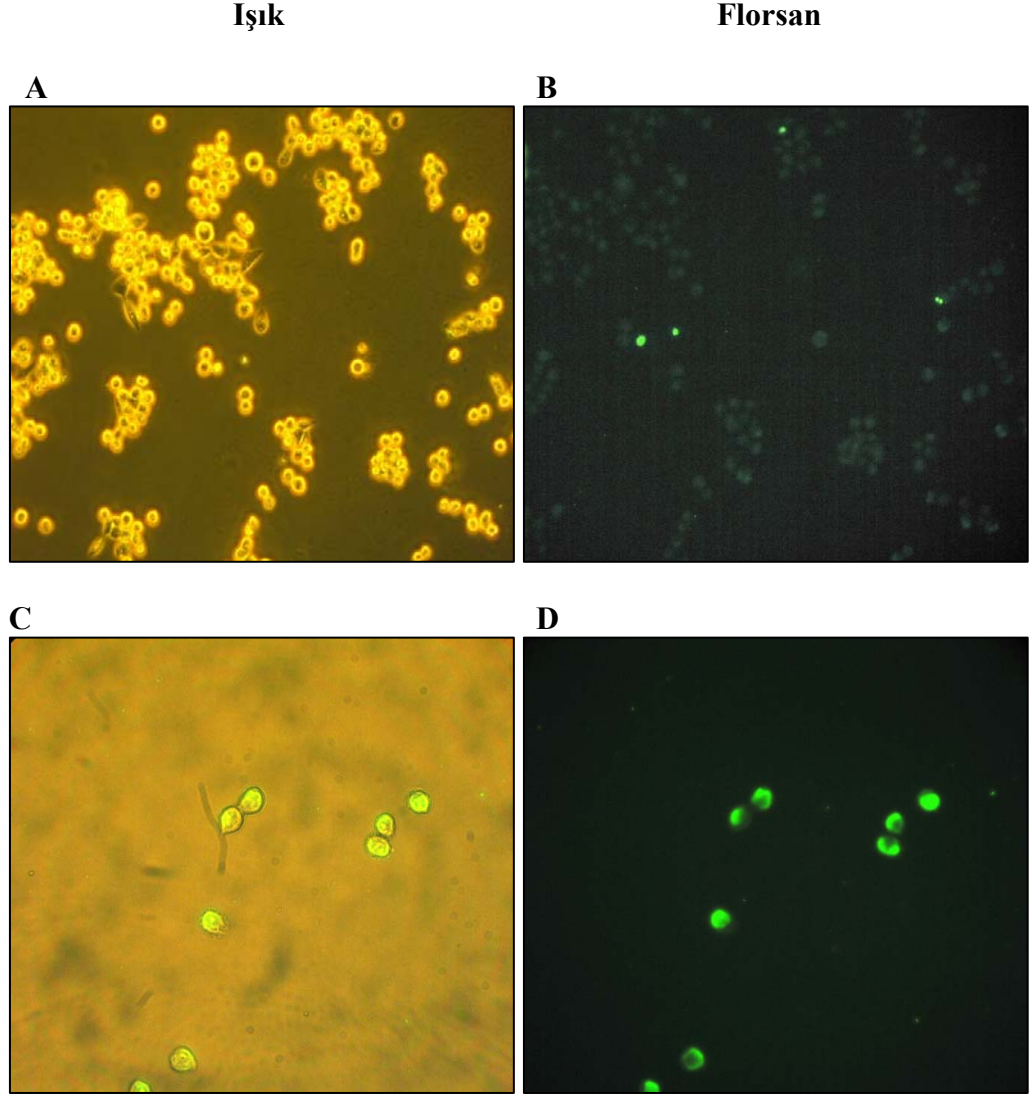
Şekil 4.24. Farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında apoptoza girmiş hücrelerin tespiti için floresan bir boya olan Hoechst 33258 boyaması sonucu hücrelerin görüntüsü (200x). A) kontrol MKN-45; B): 200 μM H₂O₂' maruz kalmış MKN-45; C): kontrol 23132/87, D): 200 μM H₂O₂'e maruz kalmış 23132/87.



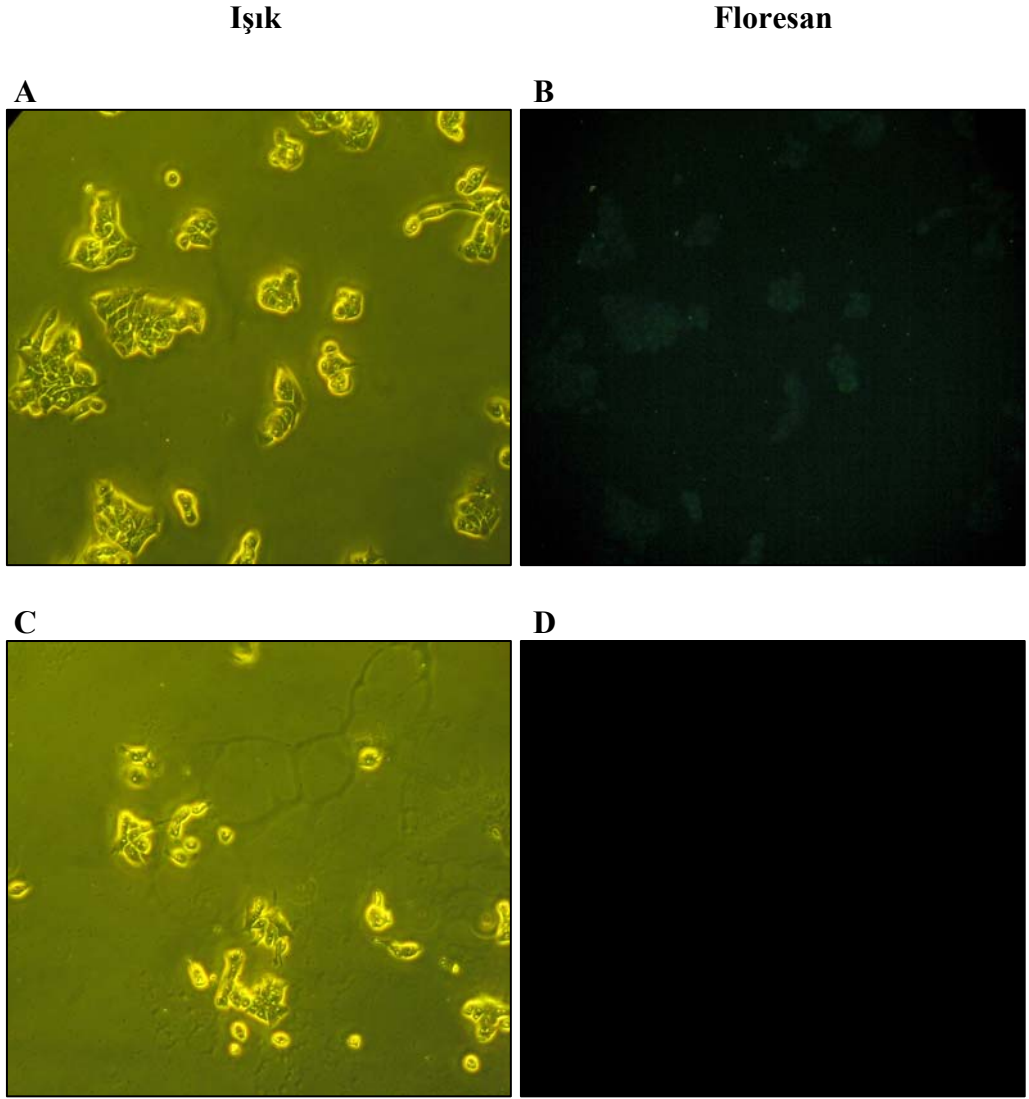
Şekil 4.25. Farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan AGS ve Kato III hücre hatlarında apoptoza girmiş hücrelerin tespiti için floresan bir boya olan Hoechst 33258 boyaması sonucu hücrelerin görüntüsü (200x). A) kontrol AGS; B): 200 µM H₂O₂' maruz kalmış AGS; C): kontrol Kato III, D): 200 µM H₂O₂'e maruz kalmış Kato III.



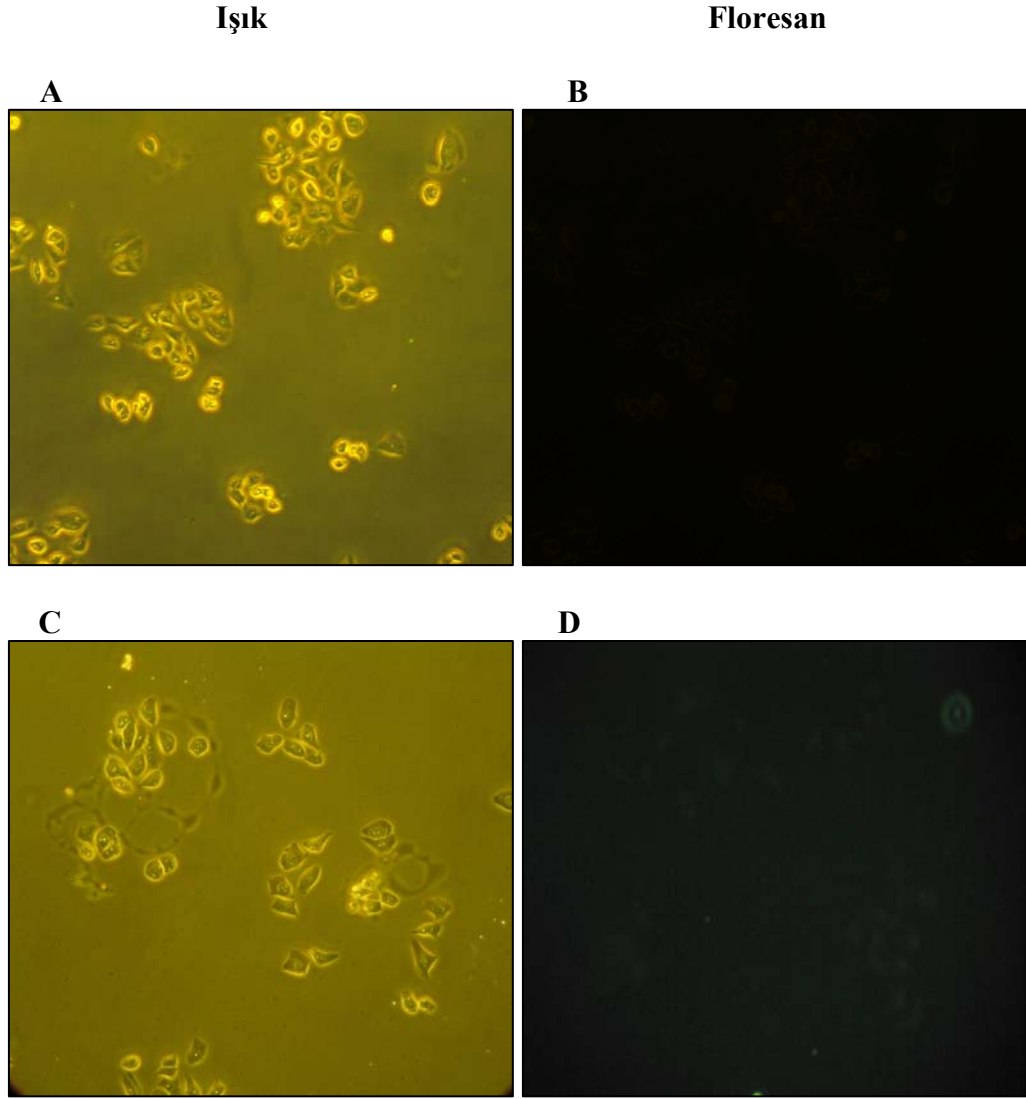
Şekil 4.26. Farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında apoptoza girmiş hücrelerin tespiti için floresan bir boya olan Hoechst 33258 boyaması sonucu hücrelerin görüntüsü (200x). A) kontrol HGC-27; B) 200 µM H₂O₂' maruz kalmış HGC-27; C) kontrol CLS-145, D) 200 µM H₂O₂'e maruz kalmış CLS-145.



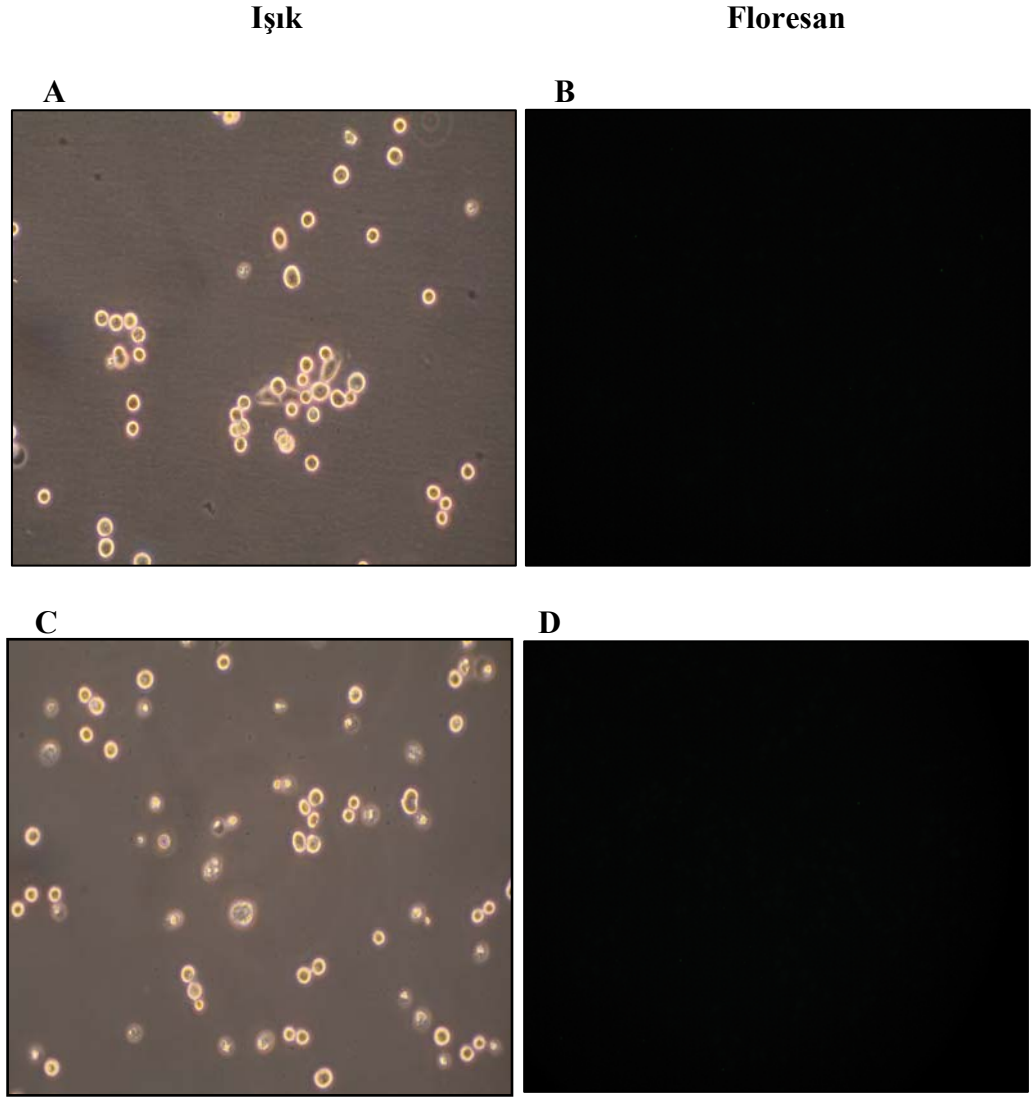
Şekil 4.27. MKN-45 hücre hatınının 200 μM H_2O_2 'e 24 saat maruz kaldıktan sonra apoptoza girmiş hücrelerin tespiti için TUNEL deneyi sonucu hücrelerin florsan mikroskop görüntüleri (200X). A): kontrol MKN-45 (ışık); B): kontrol MKN-45 (floresan); C): 200 μM H_2O_2 ' maruz kalmış MKN-45 (ışık); D): 200 μM H_2O_2 'e maruz kalmış MKN-45 (floresan).



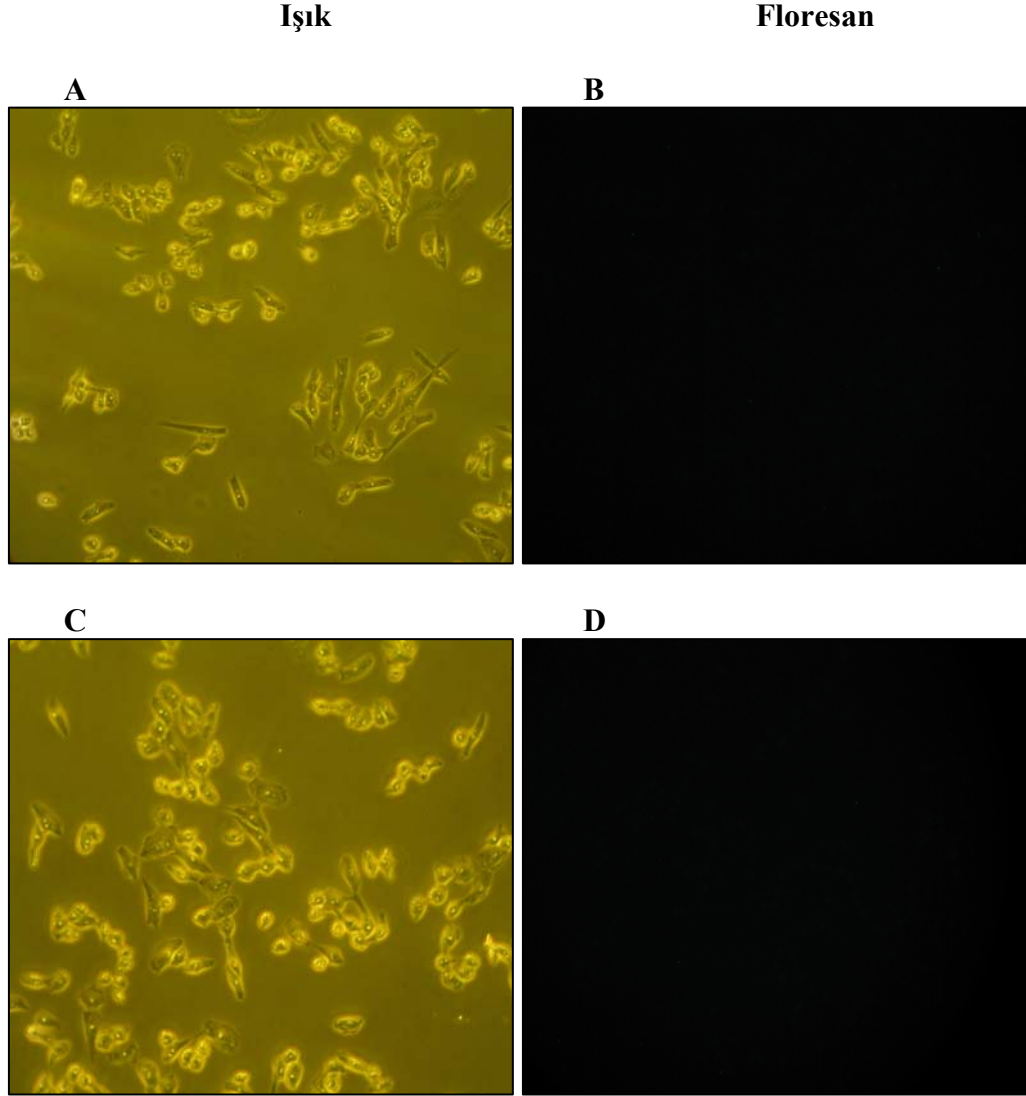
Şekil 4.28. 23132/87 hücre hatınının 200 μM H_2O_2 'e 24 saat maruz kaldıktan apoptoza girmiş hücrelerin tespiti için TUNEL deneyi sonucu hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri (200X). A): kontrol 23132/87 (ışık); B): kontrol 23132/87 (floresan); C): 200 μM H_2O_2 ' maruz kalmış 23132/87 (ışık); D): 200 μM H_2O_2 'e maruz kalmış 23132/87 (floresan).



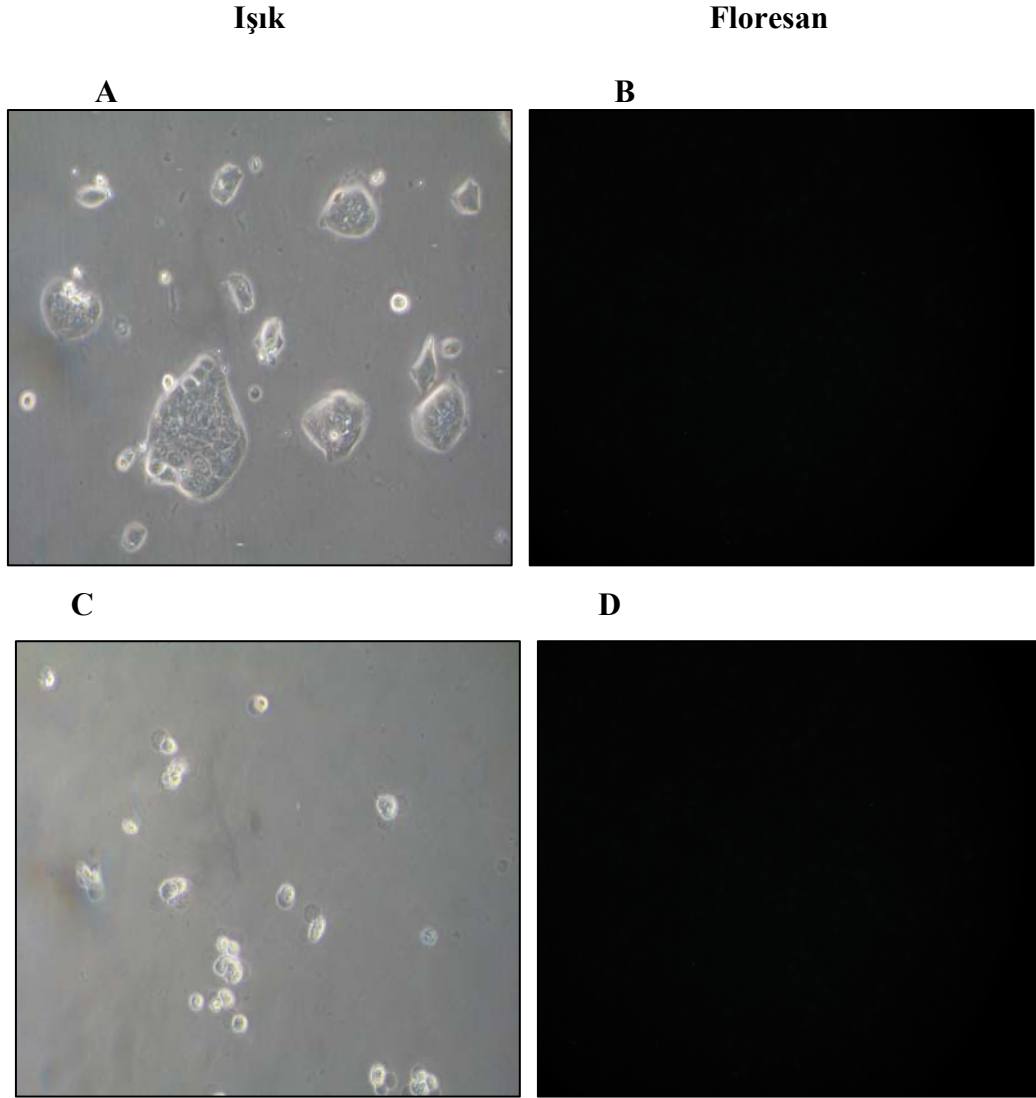
Şekil 4.29. AGS hücre hatınının 200 μM H_2O_2 'e 24 saat maruz kaldıktan sonra apoptoza girmiş hücrelerin tespiti için TUNEL deneyi sonucu hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri (200X). A): kontrol AGS (ışık); B): kontrol AGS (floresan); C): 200 μM H_2O_2 'e maruz kalmış AGS (ışık); D): 200 μM H_2O_2 ' maruz kalmış AGS (floresan).



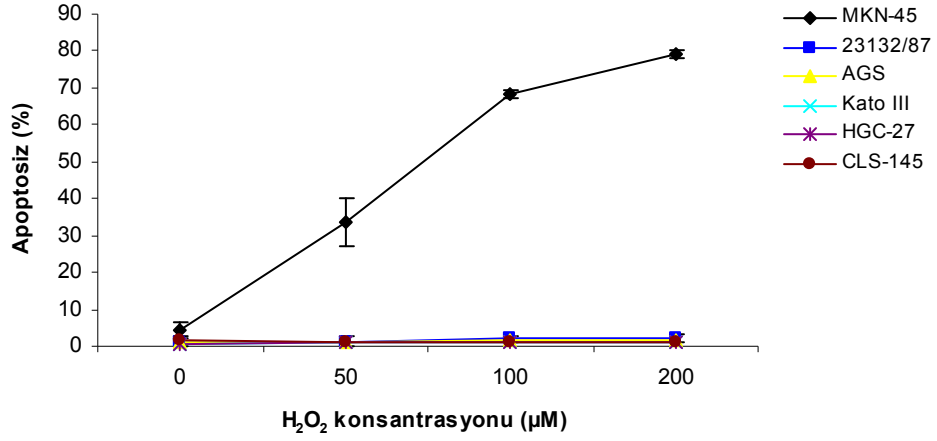
Şekil 4.30. KatoIII hücre hatının 200 μM H_2O_2 'e 24 saat maruz kaldıktan apoptoza girmiş hücrelerin tespiti için TUNEL deneyi sonucu hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri (200X). A): kontrol Kato III (ışık); B): kontrol Kato III (floresan); C): 200 μM H_2O_2 'e maruz kalmış Kato III (ışık); D): 200 μM H_2O_2 ' maruz kalmış Kato III (floresan).



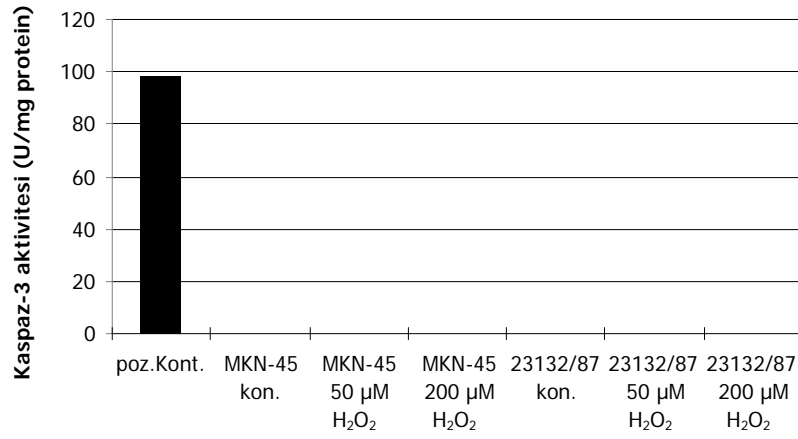
Şekil 4.31. HGC-27 hücre hatınının 200 μM H_2O_2 'e 24 saat maruz kaldıktan apoptoza girmiş hücrelerin tespiti için TUNEL deneyi sonucu hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri (200X). A): kontrol HGC-27 (ışık); B): kontrol HGC-27 (floresan); C): 200 μM H_2O_2 'e maruz kalmış HGC-27 (ışık); D): 200 μM H_2O_2 ' maruz kalmış HGC-27 (floresan).



Şekil 4.32. CLS-145 hücre hatınının 200 μM H_2O_2 'e 24 saat maruz kaldıktan apoptoza girmiş hücrelerin tespiti için TUNEL deneyi sonucu hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri (200X). A): kontrol CLS-145 (ışık); B): kontrol CLS-145 (floresan); C): 200 μM H_2O_2 'e maruz kalmış CLS-145 (ışık); D): 200 μM H_2O_2 ' maruz kalmış CLS-145 (floresan).



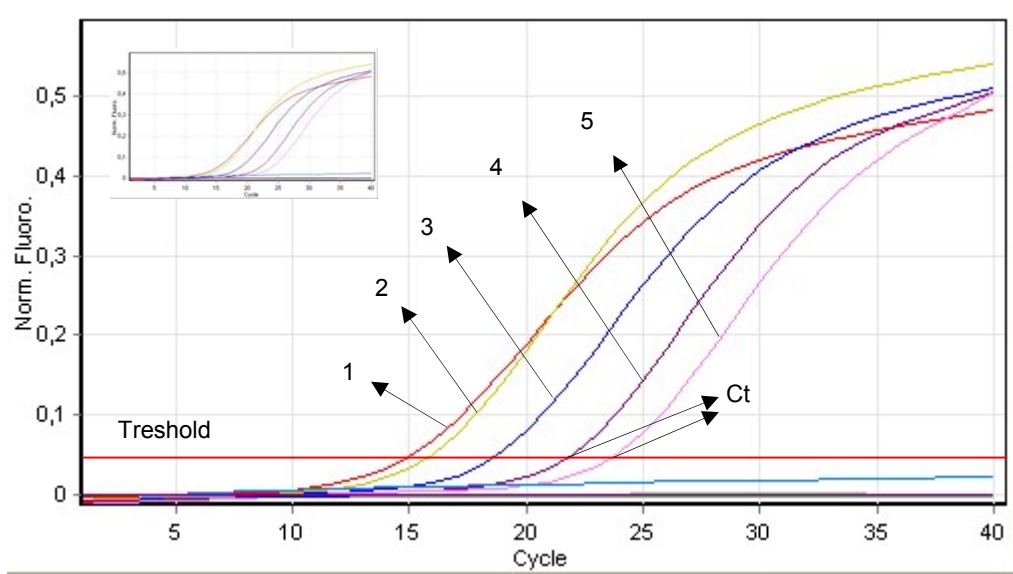
Şekil 4.33. Farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan hücre hatlarında apoptoza girmiş hücrelerin varlığını tespit etmek için TUNEL apoptoz deneyi ile apoptoz seviyeleri. Her bir veri üç bağımsız değerın ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.



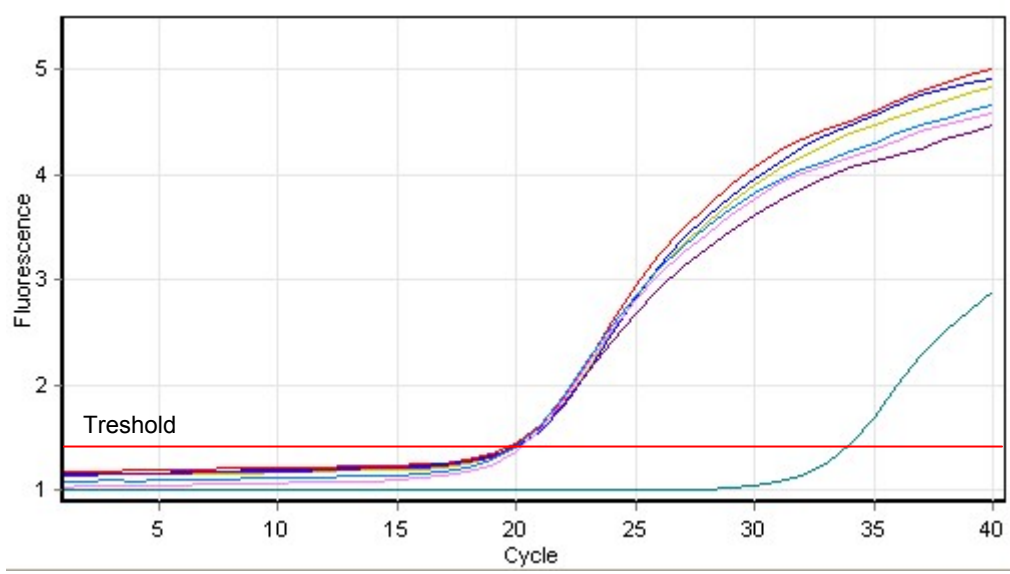
Şekil 4.34. Farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan MKN-45 ve 23132/87 hücre soylarında apoptoza girmiş hücrelerin varlığını tespit etmek ve apoptoz düzeylerini tesbit etmek için Kaspaz-3 enzim aktivitesi.

4.13. Gen İfade Analizi için Q-RT PCR Optimizasyonu

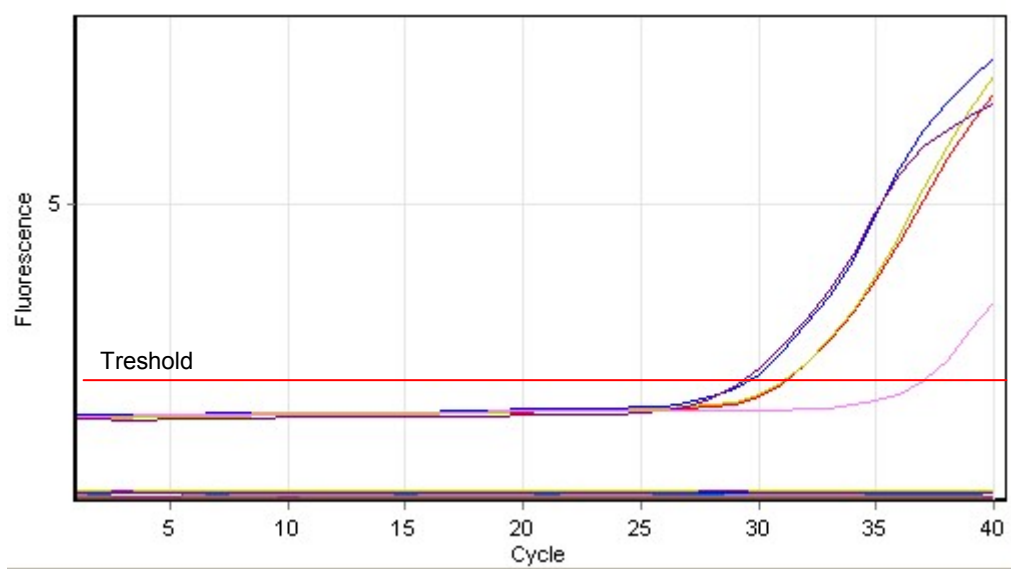
H₂O₂ ile oksidatif strese girmiş MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında β -*katenin* ve *MMP* genlerinin ekspresyonu Q-RT PCR ile yapıldı. Öncelikle optimizasyon çalışması yapıldı. cDNA'nın seri sulandırılmaları sonucu 1:100 oranında sulandırımın PCR verimliliği için uygun olduğu görüldü (Şekil 4.35). İnternal kontrol olarak kullanılan *GAPDH* genin ifadesi hem kontrol hem de H₂O₂ stresine maruz kalmış hücre hatlarında aynı çıktı. Bütün örneklerde Ct değeri 20 (\pm 1) olarak görüldü (Şekil 4.36). Örnek olarak sunulan, MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında kontrol ve 12 saat 100 μ M H₂O₂ stresine maruz kalmış örneklerdeki *MMP-7* ifadesi Şekil 4.37'de gösterilmiştir. 23132/87'de ifade görülmezken, MKN-45'de strese girmiş örneklerin Ct değerleri 29.3 iken kontrolün Ct değerinin 31.2 olduğu görüldü (Şekil 4.37). Bu durum, *MMP-7* geninin H₂O₂ stresine girmiş MKN-45 hücre hattında arttığını göstermektedir.



Şekil 4.35. *GAPDH* geni için cDNA ların bir seri sulandırılmaları (1= (1:1); 2=(1:10); 3=(1:100); 4=(1:1000); 5=(1:10000)) ile Q-RT PCR optimizasyonu.



Şekil 4.36. Kontrol ve H₂O₂ stresine maruz kalmış hücre hatlarında *GAPDH* geninin Q-RT PCR ile belirlenen ifade seviyesi.



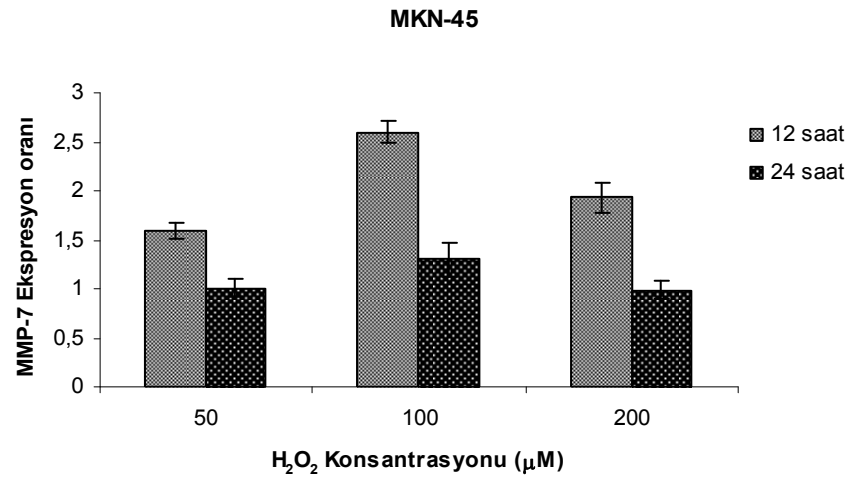
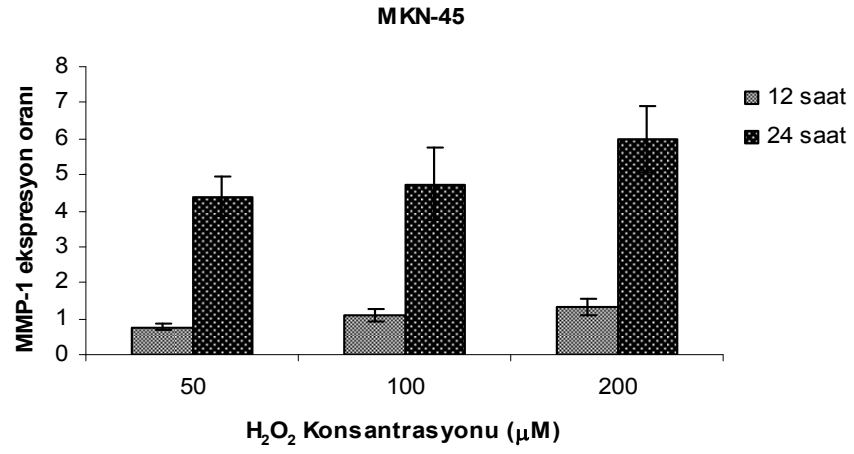
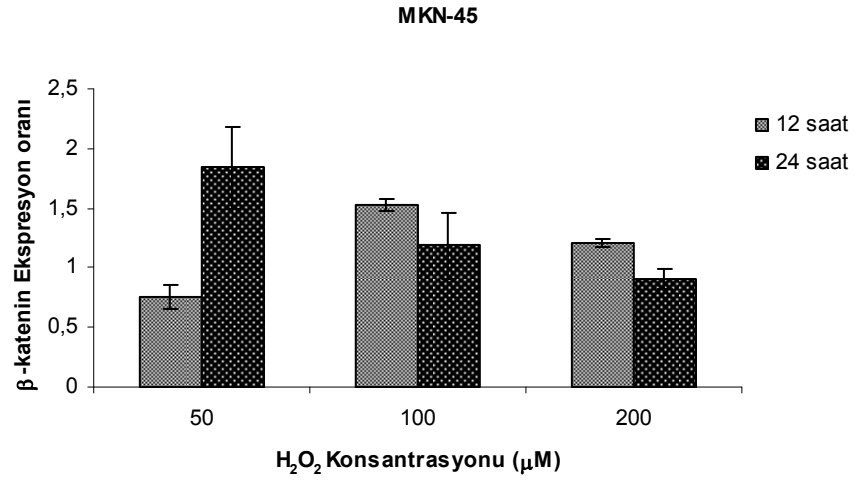
Şekil 4.37. Kontrol ve 12 saat 100 µM H₂O₂ stresine maruz kalmış MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında *MMP-7* geninin Q-RT PCR ile belirlenen ifade seviyesi. (Kırmızı: kontrol; Mavi: strese maruz kalmış örnek).

4.14. Hücre Hatlarında Oksidatif Stres Sonucu *MMP* Genlerinin İfadesi

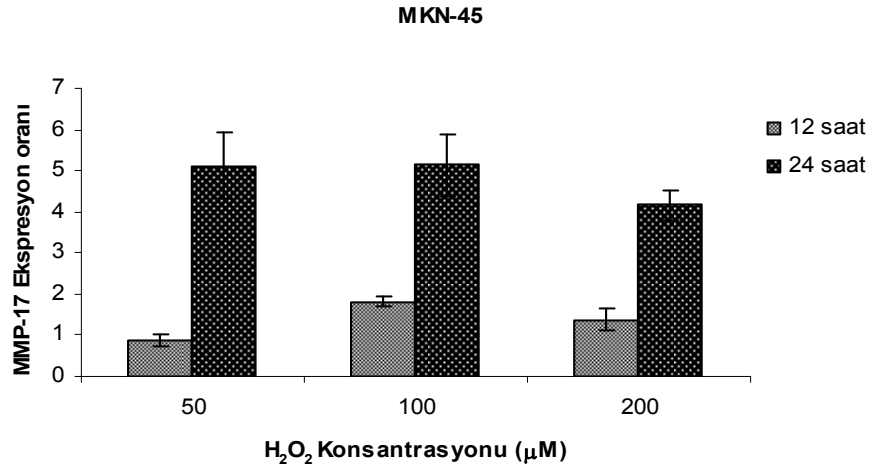
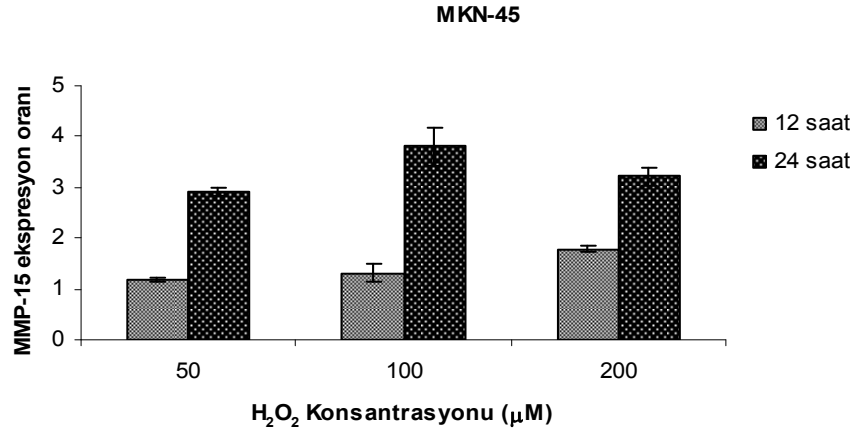
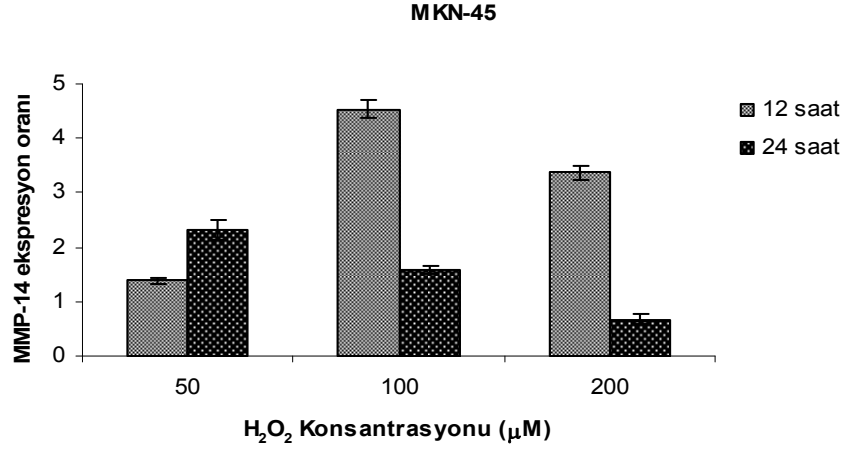
Çalışmanın bu aşamasında H_2O_2 stresine karşı vermiş oldukları tepki tamamen bir birinden farklılık gösteren MKN-45 ve 23132/87 hücre hatları 50-200 μM H_2O_2 'ye 12 ve 24 saat maruz bırakıldıktan sonra β -katenin ve *MMP* genlerinin ifadelerindeki değişiklik gerçek zamanlı RT-PCR (Q-RT PCR) ile tespit edildi. RT-PCR ile yapılan sonuçlarda 23132/87 hücre hattında ifade olduğu görülen *MMP-11*, *MMP-19*, *MMP-23* ve *MMP-28* genlerinin strese girmiş 23132/87'de hiçbirin ifadesinde artış veya azalış olmadığı görülürken *MMP-15* ifadesinde bir artışın olduğu görüldü. MKN-45 hücre hattında ise *MMP-1*, *MMP-7*, *MMP-14*, *MMP-15* ve *MMP-17* genlerinin ifadesinde H_2O_2 stresine bağlı bir artışın olduğu görüldü (Çizelge 4.4). β -katenin ifadesinde ise 24 saat strese maruz kalan hücrelerde H_2O_2 konsantrasyonunun artmasıyla gen ifadesinin artış oranının azaldığı görüldü.

Kontrole (H_2O_2 ile muamele görmemiş) göre 12 saat, 50 μM H_2O_2 'de β -katenin ifadesindeki artış oranının 0.76 kat (% 76) , 100 μM H_2O_2 'de 1.69 kat, 200 μM H_2O_2 'de ise 1.35 kat olduğu görüldü. 24 saat'de ise 50 μM H_2O_2 'de 1.82 kat, 100 μM H_2O_2 'de 1.33 kat, 200 μM H_2O_2 'de ise 0.92 (% 92) kat olduğu görüldü. *MMP-7* ve *MMP-14* 'ün ifadesi 12 saat strese maruz kalan hücrelerde daha çok görülürken, *MMP-1*, *MMP-15* ve *MMP-17*'nin ifadesi 24 saat strese maruz kalanlarda daha çok görüldü. *MMP-7* ifadesi 12 saat'de 50 μM H_2O_2 'de 1.64 kat; 100 μM H_2O_2 'de 2.7 kat; 200 μM H_2O_2 'de 2.07 kat artış gösterirken, 24 saat'de ise sırasıyla 1 kat 1.3 kat ve 0.98 (% 98) kat artış göstermiştir. *MMP-14*'ün 12 saat'deki artış oranı sırasıyla 1.4 kat; 4.4 kat ve 2.03 kat iken 24 saatteki artış oranı sırasıyla 2.45 kat, 1.7 kat ve 0.8 (% 80) kat olarak görüldü (Şekil 4.38 ve Şekil 4.39).

MMP-1 ifadesinin, 12 saatte bütün konsantrasyonlarda pek fazla artmadığı, fakat 24 saatte ise uygulanan konsantrasyona göre sırasıyla 4.6 kat; 4.9 kat ve 6.1 kat arttığı görüldü. Benzer profil *MMP-15* ve *MMP-17* ifadelerinde de görüldü. *MMP-15* ifadesinin 24 saatte sırasıyla 3 kat; 3.9 kat ve 3.4 kat arttığı görülürken, *MMP-17* ifadesinin 24 saate sırasıyla 5.05 kat; 5.1 ve 4.3 kat arttığı görüldü (Şekil 4.39).



Şekil 4.38. Farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan MKN-45 hücre hattında β-katenin, *MMP-1*, *MMP-7* genlerinin ifadelerinin kontrole göre artış oranı. Her bir veri üç bağımsız değer ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.



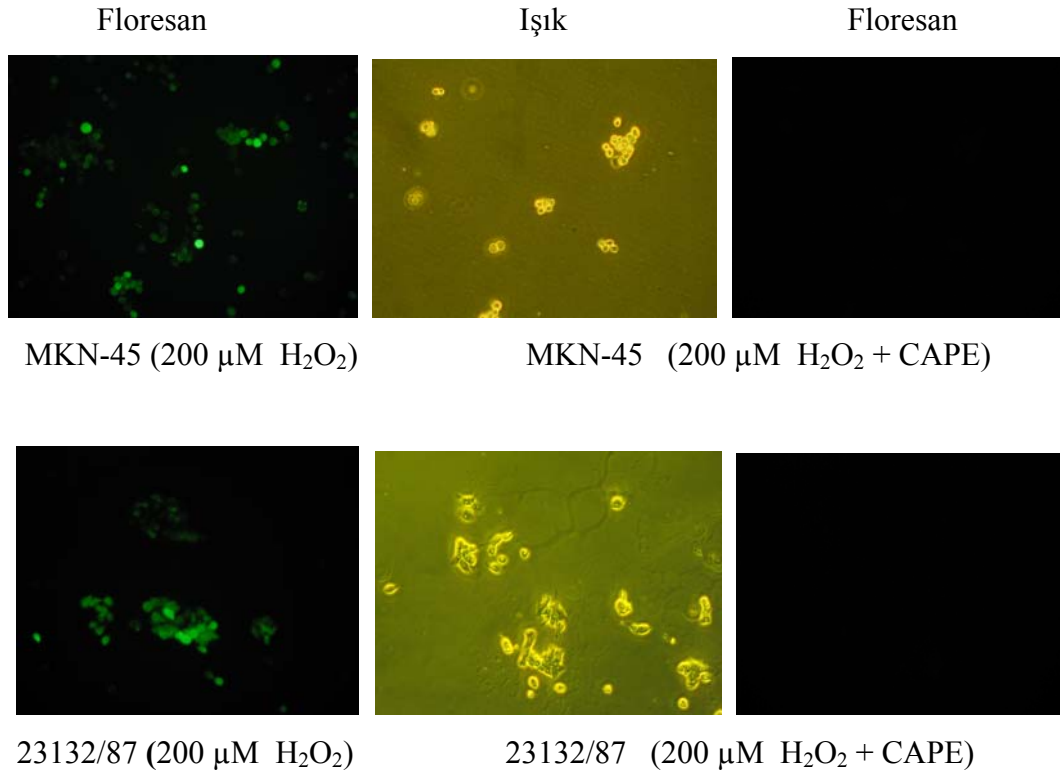
Şekil 4.39. Farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan MKN-45 hücre hattında *MMP-14*, *MMP-15*, *MMP-17* genlerinin ifadelerinin kontrole göre artış oranı. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. H₂O₂'ye maruz bırakılan hücre hatlarında görülen gen ifade değişikliği

Gen / Hücre	MKN-45 (Kontrol)	MKN-45 (H ₂ O ₂)	23132/87 (Kontrol)	23132/87 (H ₂ O ₂)
<i>MMP-1</i>	–	↑	–	–
<i>MMP-7</i>	–	↑	–	–
<i>MMP-10</i>	–	–	–	–
<i>MMP-11</i>	–	–	–	–
<i>MMP-14</i>	–	↑	–	–
<i>MMP-15</i>	–	↑	–	–
<i>MMP-17</i>	–	↑	–	–
<i>MMP-19</i>	–	–	–	–
<i>MMP-23</i>	–	–	–	–
<i>MMP-28</i>	–	–	–	–
<i>β-katenin</i>	–	↑	–	–

4.15. Hücre Hatlarında Görülen Oksidatif Stresin Ortadan Kaldırılmasında Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'in Etkisi

MKN-45 ve 23132/87 hücre hatları, antioksidan özelliği ile bilinen kafeik asit fenetil ester (CAPE) ile 24 saat maruz bırakıldıktan sonra hücre içi oksidatif stresin her iki hücre hattında da ortadan kalktığı görülmektedir. Hücre içi oksidatif stres durumları birbirinden farklılık gösteren bu iki hücre hattında, 24 saat zaman diliminde 200 μ M H₂O₂ ile yaratılmış olan hücre içi oksidatif stresin 3 μ M CAPE ile tamamen ortadan kalktığı görüldü. H₂O₂'den bağımsız endojen kaynaklı bir hücre içi stresin görüldüğü 23132/87 hücre hattın da stresin CAPE ile tamamen ortadan kalktığı görüldü. İlave edilen H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak hücre içi oksidatif stres seviyesi artan MKN-45 hücre hattında da CAPE ile stresin tamamen ortadan kalktığı görüldü (Şekil 4.40).



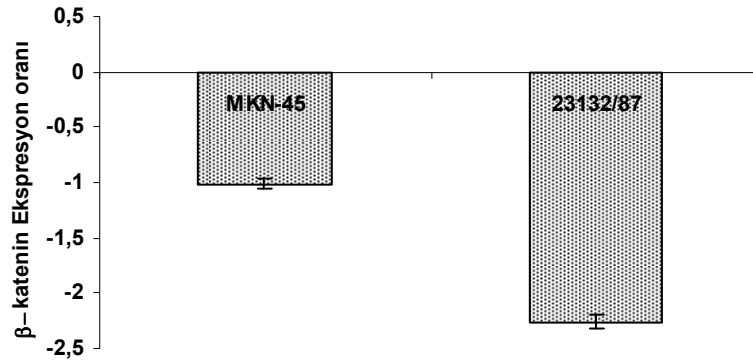
Şekil 4.40. MKN-45 ve 23132/87 hücre hattında görülen hücre içi oksidatif stres'e CAPE'nin etkisi (200x).

4.16. Hücre Hatlarında Hücre içi Oksidatif Stresin Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) ile Ortadan Kaldırılması Sonucu β -katenin ve MMP Genlerinin İfadeleri

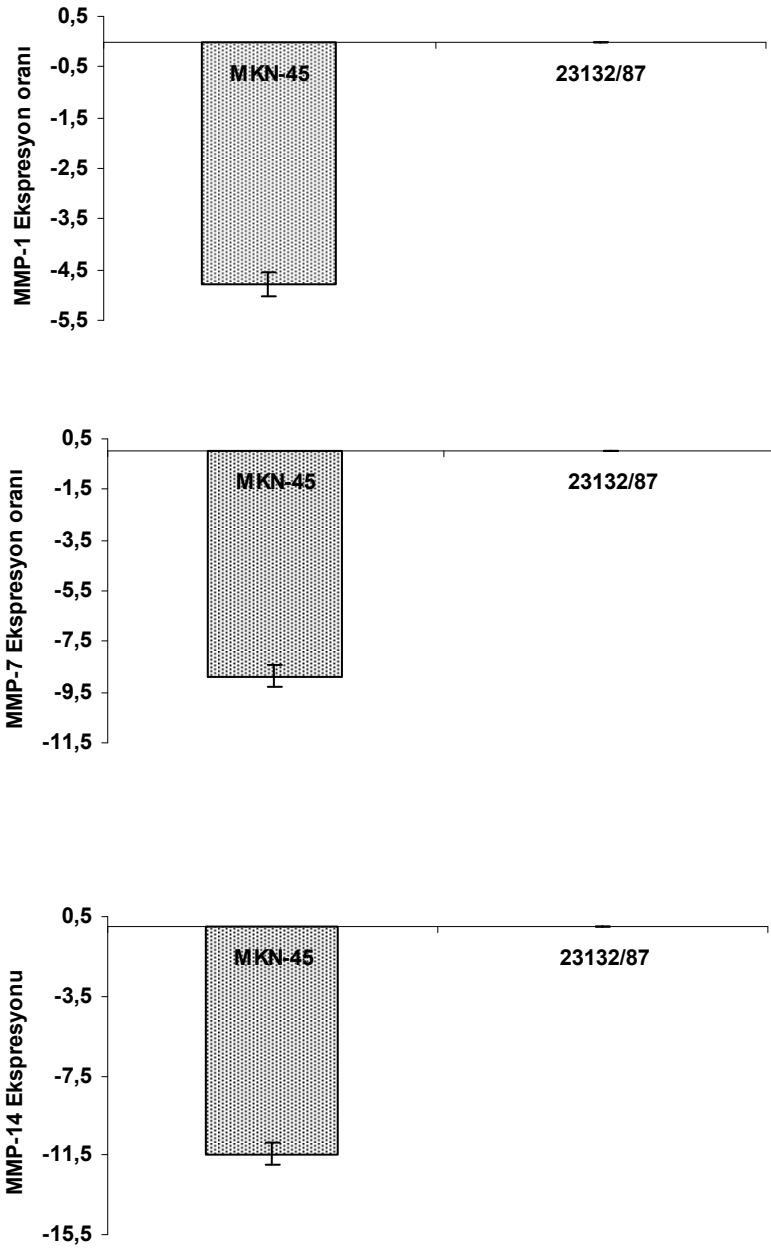
MKN-45 hücre hattında H₂O₂ uygulaması sonucu ifadelerinde artış görülen *MMP-1*, *MMP-7*, *MMP-14*, *MMP-15*, *MMP-17* ve β -katenin genlerinin ifadesi CAPE uygulaması ile azaldı. 23132/87 hücre hattında ise *MMP-15*, *MMP-28* ve β -katenin genlerinin ifadelerinde bir azalış olduğu görüldü (Çizelge 4.5). CAPE ile muamele edilen MKN-45'de β -katenin ifadesi H₂O₂ ile muamele edilen MKN-45'deki β -katenin ifadesi ile kıyaslandığında 1 kat azalan bir ifade oranı görülürken, bu 23132/87'de 2.4 kat azalış olarak görüldü (Şekil 4.41). Normalde 23132/87'de ekspresyonu görülmeyen *MMP-1* ve *MMP-7* genlerinin ifadesinde MKN-45'de stres gören örneğe azalış göstermiştir. *MMP-1* ifadesi 4.7 kat azalırken, *MMP-7* 8.7 kat azalış göstermiştir. *MMP-15* ifadesi MKN-45'de 1.3 kat azalırken 23132/87' de 10.8 kat azalış göstermiştir. Sadece MKN-45'de ifade olan *MMP-14* ve *MMP-17* genlerinde ise ifade sırasıyla 11.2 kat ve 0.38 (% 38) kat azalış göstermiştir. Hem MKN-45'de hemde 23132/87'de ifade olan *MMP-28*'de ise stresin ortadan kaldırılması sonucu ifadenin sırasıyla 1.2 kat ve 0.27 (% 27) kat azaldığı görüldü (Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.43) .

Çizelge 4.5. CAPE ile hücre stresin ortadan kaldırıldığı hücre hattında görülen gen ifade değişikliği

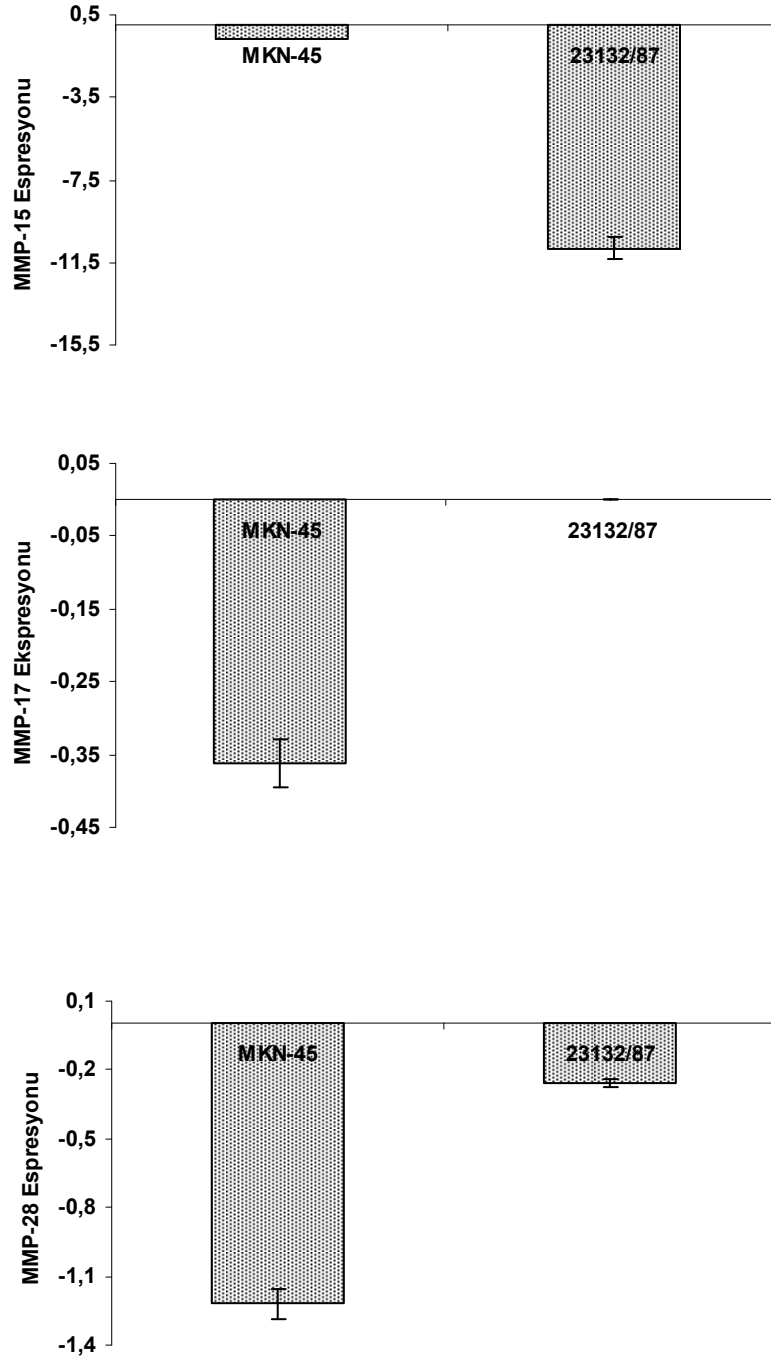
Gen / Hücre	MKN-45 (H ₂ O ₂)	MKN-45(CAPE)	23132/87(H ₂ O ₂)	23132/87(CAPE)
<i>MMP-1</i>	↑	↓	–	–
<i>MMP-7</i>	↑	↓	–	–
<i>MMP-10</i>	–	–	–	–
<i>MMP-11</i>	–	–	–	–
<i>MMP-14</i>	↑	↓	–	–
<i>MMP-15</i>	↑	↓	–	↓
<i>MMP-17</i>	↑	↓	–	–
<i>MMP-19</i>	–	–	–	–
<i>MMP-23</i>	–	–	–	–
<i>MMP-28</i>	–	–	–	↓
<i>β-katenin</i>	↑	↓	–	↓



Şekil 4.41. 24 saat 200µM H₂O₂'ye maruz bırakılan hücre hatlarında görülen *β-katenin* ifadesi referans alındığında, CAPE ile hücre içi stresin ortadan kaldırıldığı hücre hatlarında görülen *β-katenin ifade oranı*. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.



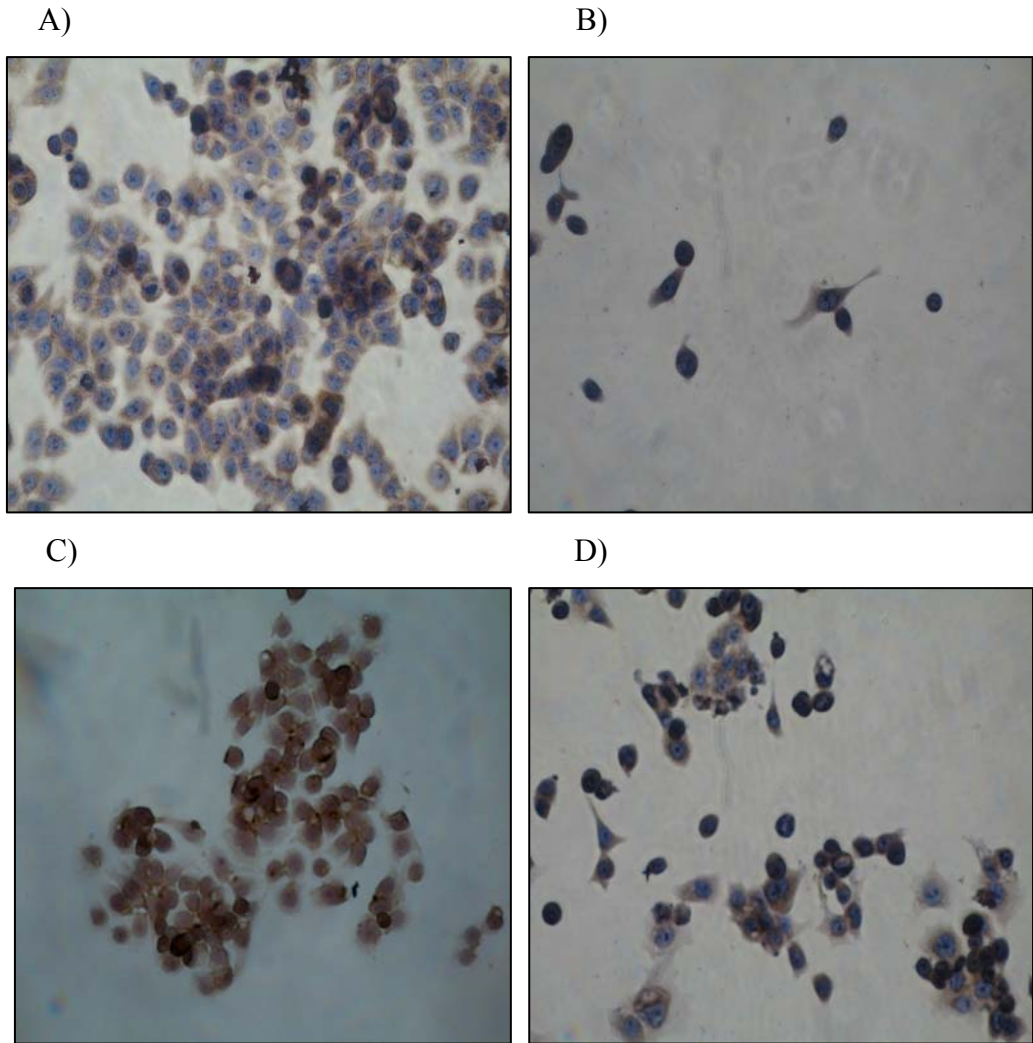
Şekil 4.42. 24 saat $200\mu\text{M}$ H_2O_2 'ye maruz bırakılan hücre hatlarında görülen *MMP-1*, *MMP-7* ve *MMP-14* ifadesi referans alındığında, CAPE ile hücre içi stresin ortadan kaldırıldığı hücre hatlarında görülen *MMP-1*, *MMP-7* ve *MMP-14* ifade oranı. Her bir veri üç bağımsız değer in ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.



Şekil. 4.43. 24 saat 200 μ M H₂O₂'ye maruz bırakılan hücre hatlarında görülen *MMP-15*, *MMP-17* ve *MMP-28* ifadesi referans alındığında, CAPE ile hücre içi stresin ortadan kaldırıldığı hücre hatlarında görülen *MMP-15*, *MMP-17* ve *MMP-28* ifade oranı. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.

4.17. Hücre Hatlarında 8-OHdG Oluşumuna H₂O₂' in Etkisi

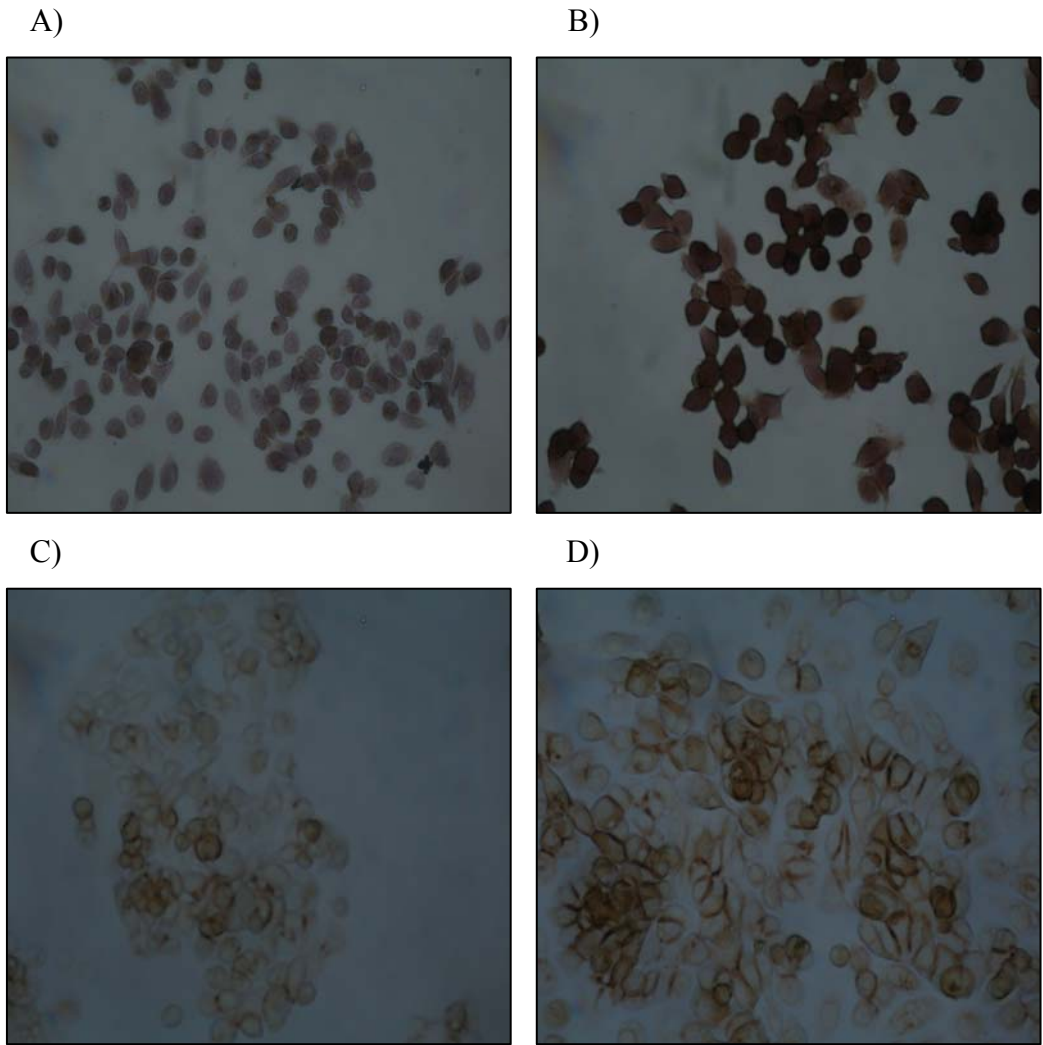
MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarının 24 saat 200 µM H₂O₂ ile strese sokulması sonucu her iki hücre hattında da nükleer 8-OHdG lokalizasyonu görüldü. Hem MKN-45 hem de 23132/87 hücre hattında stres uygulaması sonucu % 90 oranında 8-OHdG lokalizasyonu görülürken. H₂O₂ stresine maruz bırakılmayan kontrol hücrelerinde de % 10-20 oranlarında 8-OHdG lokalizasyonu görüldü (Şekil 4. 44).



Şekil 4. 44. MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarının 24 saat 200 µM H₂O₂ ile strese sokulması sonucu hücre hattında nükleer 8-OHdG lokalizasyonu (200x). A): kontrol MKN-45; B): 200 µM H₂O₂' maruz kalmış MKN-45; C): kontrol 23132/87; D): 200 µM H₂O₂' maruz kalmış 23132/87.

4.18. Hücre Hatlarında β -katenin Lokalizasyonuna H_2O_2 'in Etkisi

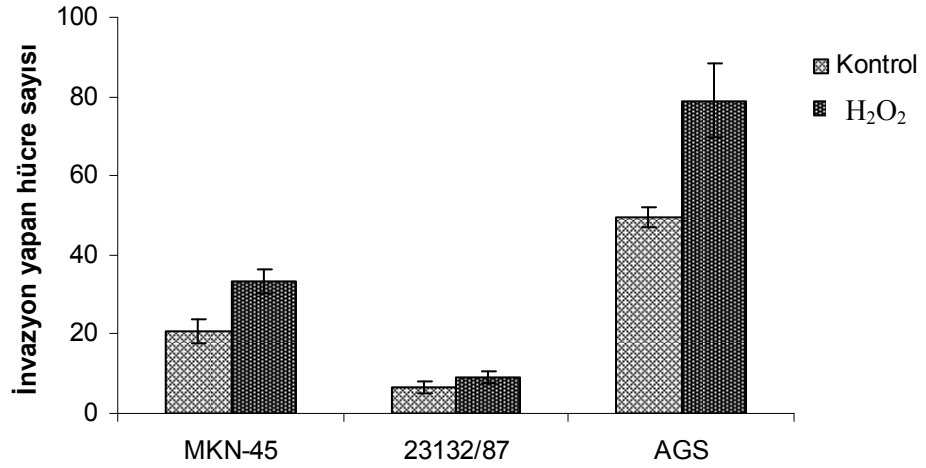
MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarının 24 saat $200 \mu M H_2O_2$ ile strese sokulması sonucu her iki hücre hattında da β -katenin lokalizasyonu görüldü. Hem MKN-45 hem de 23132/87 hücre hattında stres uygulaması sonucu daha kuvvetli bir boyanma görüldü. H_2O_2 stresine maruz bırakılmayan kontrol hücrelerinde ise daha zayıf bir boyanma görüldü. MKN-45'de daha çok nükleer ve sitoplazmik lokalizasyon görülürken, 23132/87'de daha çok membranöz ve sitoplazmik lokalizasyon görüldü (Şekil 4.45).



Şekil 4.45. MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarının 24 saat $200 \mu M H_2O_2$ ile strese sokulması sonucu hücre hattında β -katenin lokalizasyonu (200x). A): kontrol MKN-45; B): $200 \mu M H_2O_2$ maruz kalmış MKN-45; C): kontrol 23132/87; D): $200 \mu M H_2O_2$ maruz kalmış 23132/87.

4.19. Hücre Hatlarında H₂O₂'in İnvazyona Etkisi

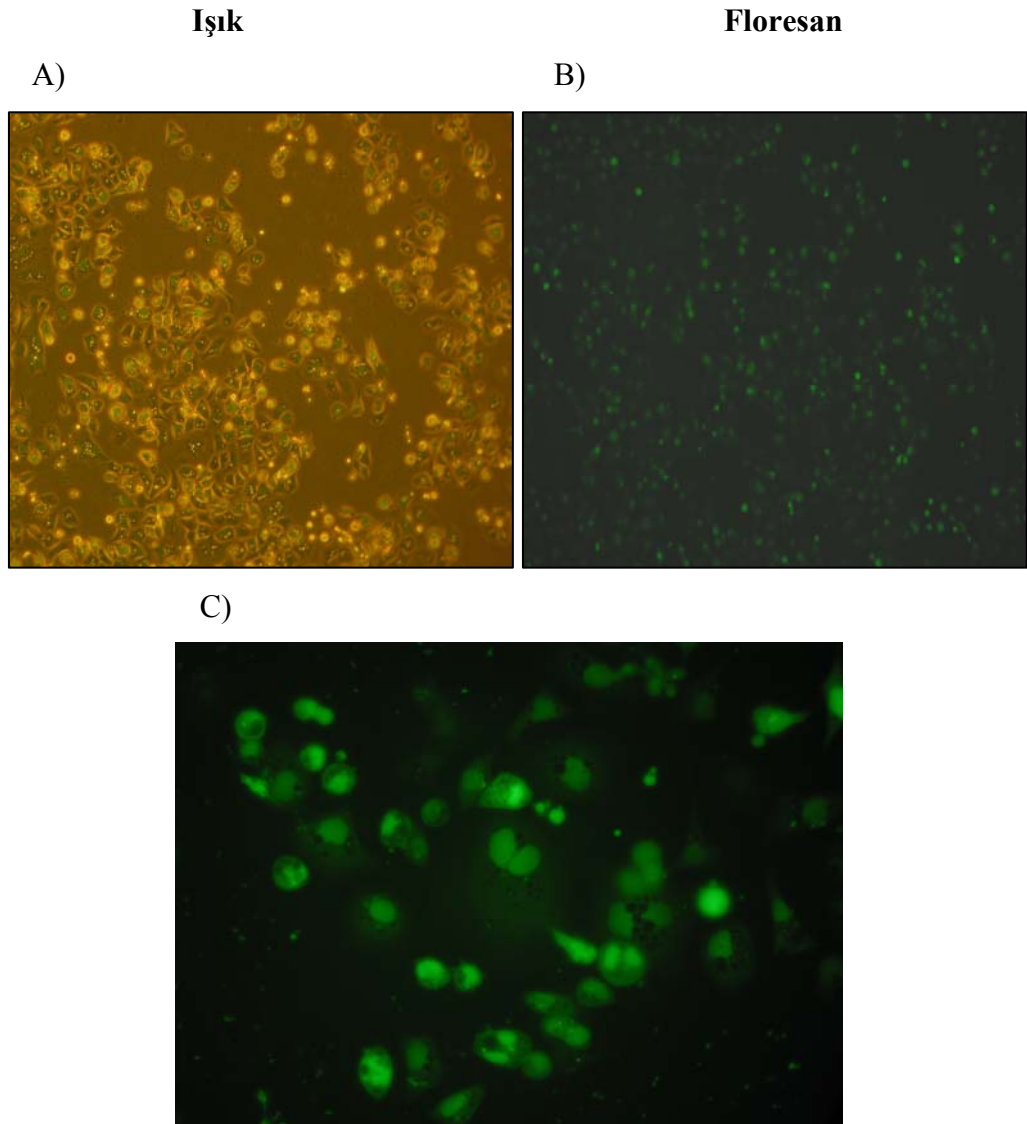
MKN-45, 23132/87 ve AGS hücre hatlarında 200µM H₂O₂ stresine 24 saat maruz kalan hücre hatlarında invazyon özelliklerinin değiştiği görüldü. Metastatik özelliğe sahip olmayan, az farklılaşmış ve difüz tip mide kanserli hücreler olarak bilinen MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarının invazyon yapma yeteneği, ileri derecede farklılaşmış AGS hücresine göre 2-5 kat az olduğu görüldü. H₂O₂ stresi MKN-45'de invazyonu yaklaşık 2 kat arttırırken 23132/87'de bu artış yok denecek kadar az görüldü. AGS 'de ise yaklaşık 1.5 kat artış görüldü (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. 200µM H₂O₂ stresine 24 saat maruz kalan MKN-45, 23132/87 ve AGS hücre hatlarında invazyon. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.

4.20. AGS Hücre Hattında MMP-3 siRNA'nın Transfeksiyon Analizi

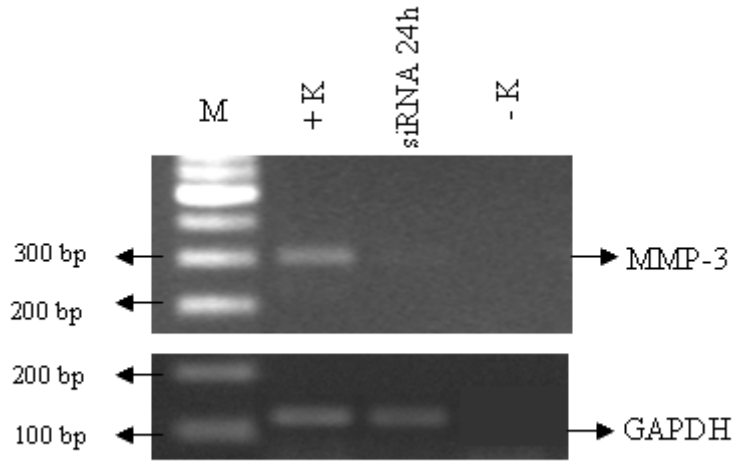
Transfeksiyon reaktifi olarak Lipofectamin 2000 (İnvitrogen) kullanılarak AGS hücre hattında yapılan MMP-3 siRNA transfeksiyonunun % 90 oranında başarılı bir şekilde gerçekleştiği görüldü. siRNA transfeksiyonu gerçekleşen hücreler floresan ışık altında yeşil renkli görülmektedirler (Şekil 4.47). Bu hücrelerin ışıkta görülen toplam hücreye oranı yaklaşık olarak % 90' dir.



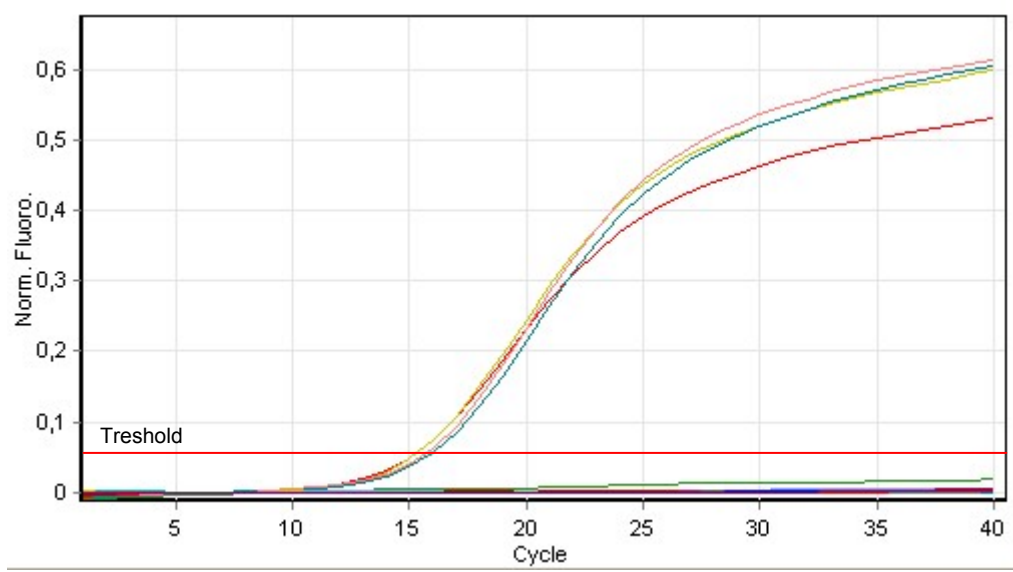
Şekil 4.47. AGS hücre hattında MMP-3 siRNA transfeksiyonunun gerçekleştiği hücreler. A) toplam hücre görüntüsü (100x), B) siRNA transfeksiyonunun gerçekleştiği hücreler (100x), C) siRNA transfeksiyonunun gerçekleştiği hücreler (400x).

4.21. AGS Hücre Hattında MMP-3 Geninin Susturulma Analizi

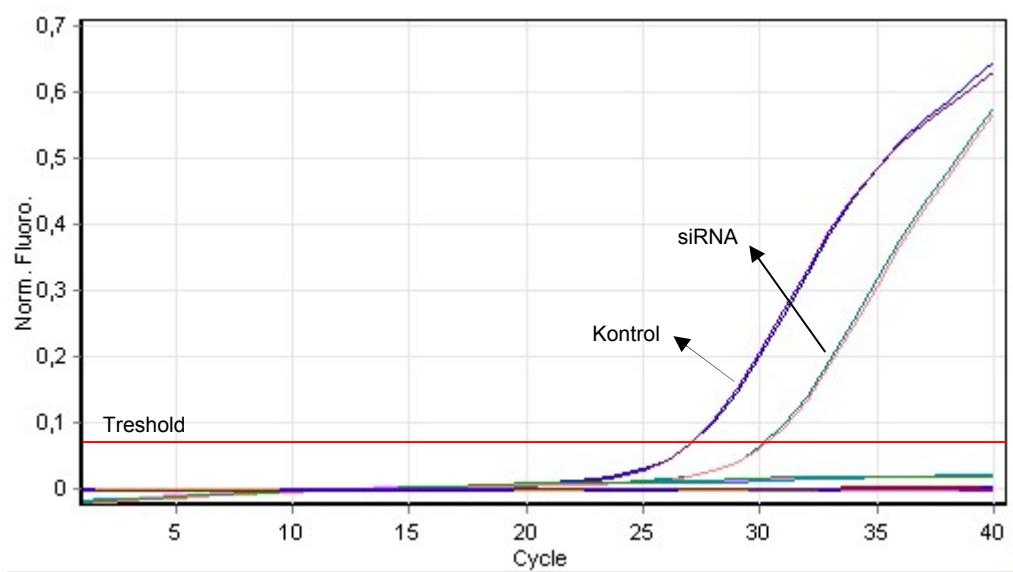
MMP-3 siRNA' sının % 90 oranında transfeksiyonunun başarıyla gerçekleştirildiği AGS hücre hattında MMP-3 genin transkripsiyon seviyesinde susturulduğu RT PCR ve Q-RT PCR ile gösterildi. Kontrol AGS'de *MMP-3* ifadesi görülürken siRNA transfeksiyonu yapılan AGS'de ifadesinin ortadan kalktığı görülmektedir (Şekil 4.48). Q-RT PCR ile yapılan çalışmada, *MMP-3*'ün % 80 oranında susturulduğu görüldü (Şekil 4.43). Yapılan PCR sonucunda referans gen (*GAPDH*) ve *MMP-3* geni için verimlilik katsayısı (E) 1.75 olarak görüldü. Bütün örneklerin *GADPH* için Ct değerleri ortalama 15.3 (± 0.5) bulundu (Şekil 4.49). Kontrol örneğinin *MMP-3* için Ct değeri 25.1 olarak görülürken siRNA uygulanan örneğin Ct değeri 28.2 olarak görüldü. *GAPDH* için Δ Ct değeri 0.2 bulunurken *MMP-3* için Δ Ct değeri 3.1 bulundu ve bu verilere göre ifade oranı 5.3 kat azalmış olarak hesaplandı. Bu orana göre *MMP-3* ifadesinin % 80 oranında susuturulduğunu görmekteyiz (Şekil 50).



Şekil 4.48. AGS hücre hattında 24 saat susturuluş *MMP-3* genin ifadesi (agaroz jel görüntüsü). M: markır; +K: *MMP-3* geninin ifade olduğu kontrol AGS; siRNA 24h: *MMP-3* geninin 24 saat susturumu.



Şekil 4.49. AGS hücre hattında, *MMP-3* geninin susturulmasında referans gen olarak kullanılan *GAPDH*'in bütün örneklerde aynı şekilde görülen ifadesi.



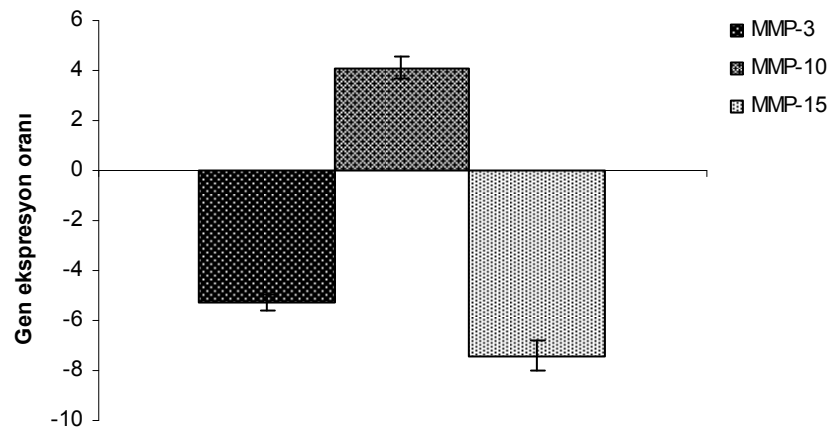
Şekil 4.50. AGS hücre hattında 24 saat susturuluş *MMP-3* genin, kontrol ve siRNA ile susturulan örnekte ifadesi.

4.22. AGS Hücre Hattında *MMP-3* Geninin Susturulması Sonucu β -katenin ve *MMP* Genlerinin İfadesi

MMP-3 geninin susuturulması sonucu AGS'de ifade olan β -katenin ve *MMP* genlerinin ifadesine Q-RT PCR ile bakıldı. *MMP-3* geninin susturulması sonucu ifadesi değişen genlerin Çizelge 4.6'de görülmektedir. *MMP-3*'ün susuturulmasıyla AGS'de ifade olan *MMP-1*, *MMP-7*, *MMP-8*, *MMP-11*, *MMP-12*, *MMP-15*, *MMP-17* ifadesi değişmediği görüldü. Diğer yandan *MMP-15*'in ifadesinde azalış, *MMP-10*'un ifadesinde ise bir artış görüldü. Kontrol AGS'ye göre *MMP-3* ifadesinin 5.3 kat azalması, *MMP-10* ifadesini 4.1 kat arttırırken, *MMP-15* ifadesini 7.4 kat azaltmıştır (Şekil 4.51).

Çizelge 4.6. *MMP-3* genin susturulması sonucu AGS hücre hattında görülen gen ifade değişikliği.

Gen / Hücre	Kontrol	MMP3- siRNA
<i>MMP-1</i>	-	-
<i>MMP-7</i>	-	-
<i>MMP-3</i>	-	↓
<i>MMP-10</i>	-	↑
<i>MMP-11</i>	-	-
<i>MMP-12</i>	-	-
<i>MMP-15</i>	-	↓
<i>MMP-17</i>	-	-
β -katenin	-	-



Şekil 4. 51. *MMP-3* genin susturulması sonucu AGS hücre hattında görülen *MMP* genlerinin kontrole (*MMP-3* siRNA tansfeksiyonu yapılmamış AGS) göre gen ifade oranı. Her bir veri üç bağımsız değerlerin ortalaması olup standart sapmalar (σ_{n-1}) veri değerlerinin üzerinde belirtilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsanlarda tümör oluşumu çok basamaklı bir süreç olup genetik temelli bir hastalıktır. Kansere hücrelerinde, normal hücre döngüsünü ve hemostaziye sağlayacak regülasyon mekanizmalarında bozukluklar vardır. Malin oluşumunu destekleyen kanser hücrelerinin edineceği altı gerekli faktör, büyüme sinyallerinde kendine yeterlilik, büyüme faktörü inhibitörlerine karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçış, sonsuz replikasyon potansiyeli, damarlanma, doku invazyonu ve metastazdır [1]. İnvaziv mide kanserlerinde MMP'lerin ve β -katenin'in regülasyonunda normalden farklılıklar gösterilmekle birlikte bu farklılıklarla oksidatif stres arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma henüz yoktur.

Çoğu kanser türünde olduğu gibi gastrik kanserde de MMP genlerinin ifadesi artmaktadır [130]. Literatürde *MMP-7*, *MMP-1* genlerinin yüksek oranlarda ifade olduğu yer almasına rağmen diğer MMP'ler ile ilgili çok fazla bilgiye rastlanılmamaktadır. Bu çalışma yaklaşık 25 MMP geninden 17 tanesi çalışılarak, çok çalışılmayan MMP genleri hakkında veri sunulmaktadır. Çalışılan MMP genlerinin çoğunun gastrik kanserde yüksek oranlarda ifade edildiği görülmektedir. Özellikle literatürde çok yer almayan *MMP-12*, *MMP-23* ve *MMP-28* genlerinin de gastrik kanserde yüksek oranlarda ifade olduğu görülmektedir. Ayrıca dokulardaki gen ifadelerinin %'lik dilimine baktığımızda, tümörlü dokularda gen ifadelerinin normal dokulara göre fazla olduğunu görmekteyiz. Bu durum bize, MMP'lerin normal fizyolojik olayların dışında kanserin oluşumu ve invazyonunda önemli anahtar genler olduğunu göstermektedir [78-80].

Tümör invazyonunda ve metastazında MMP'lerin üstlendiği görevler son zamanlarda pek çok bilim adamının dikkatini çekmiştir. Normal mukoza dokusunda ifade olmayan fakat tümörlü dokuda ifade olan *MMP-7*, mide kanserinde belirleyici bir gen olarak ifade edilir [150]. Bizim çalışmamızda da *MMP-7* ifadesi normal dokularda görülmezken tümörlü dokularda görülmüştür. Tümörlü dokulardaki ifade oranı ile normal dokulardaki ifade oranı farkı en fazla olan genidir. *MMP-7* ile aynı grupta olan bir diğer matriks metalloproteinaz geni olan *MMP-26*'nın, meme kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanseri gibi epitel orijinli kanserlerde ifade olduğu bilinmektedir [151, 152]. Dolayısı ile bu bağlamda, epitel orijinli olan gastrik kanserde de bu geninin ifade olabileceği düşünülürken çalıştığımız normal ve tümörlü dokuların hiçbirinde *MMP-26* ifadesi görülmemiştir. Substrat özgüllüğü bakımından aynı sınıfta olan bu iki genden

birisi (*MMP-7*) gastrik kanserde önemli bir anahtar gen görevi üstlenirken diğerinin (*MMP-26*)'nın böyle bir rol üstlenmediği anlaşılmaktadır.

Bazı kanserlerin ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde β -katenine bağımlı olan kanonikal ve β -katenine bağımlı olmayan nankanonikal Wnt sinyal yolunun etkili olduğu bilinmektedir [94, 95, 99]. Literatürde yer alan bazı kaynaklarda gastrik kanserde kanonikal Wnt sinyal yolunun aktif olduğu ileri sürülürken [94] bir kısmında ise non-kanonikal Wnt sinyal yolunun aktif olduğu belirtilmektedir [153]. Pek çok kanser türünde olduğu gibi mide kanserinde de *MMP-7* ifadesinin Wnt/ β -katenin sinyal yolu ile regüle edildiği bilinmektedir. Dokular üzerinde yapmış olduğumuz çalışmalarda tümörlü dokularda β -katenin ile *MMP-7* ifadesi arasında anlamlı bir korelasyon görülmemesi, mide kanserinde *MMP-7* ifadesinin β -katenine bağımlı olmayan Wnt sinyal yoluyla yani nankanonikal Wnt sinyal yoluyla aktive olduğunu düşündürmektedir.

MMP'ler latent (aktif olmayan) enzimler olarak sentezlenir ve daha sonra hücreler arası boşlukta proteolitik olarak aktive edilirler. Bu aktivasyonda, plazma proteinazları ve MMP'lerin görev aldıkları bilinmektedir. Yani MMP'ler birbirlerinin regülasyonunda rol oynarlar [84]. Kolon kanserinde proMMP-2 (aktif olmayan MMP-2) MMP-14 ile aktive olabildiği [154] ve MMP-3'ün pro MMP-7'yi aktive edebileceği bilinmektedir [58]. Yine aynı şekilde MMP-7'nin proMMP-2'yi ve proMMP-9'u aktive ettiği bilinmektedir. Bu bağlamda, bizim dokular üzerinde çalışmış olduğumuz MMP'lerden bazılarının arasında ifade yönünden bir korelasyon görülmesi bu MMP'lerin birbirlerinin regülasyonunda rol oynayabileceklerini düşündürmektedir.

Oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri tümör oluşumu ile yakından ilişkilidir. Serbest radikaller hücreden antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından elimine edilmezlerse hücre içinde oksidatif stres yaratarak moleküllerde hasar oluşturup tümör oluşumunu tetiklerler. Oksidatif stres sonucu oluşan DNA lezyonları genotoksik ve mutajenik olup, en çok bilinen oksidatif strese bağlı lezyon da 8-OH-dG oluşumudur [107, 108]. Çalışmış olduğumuz doku örneklerinin hangi düzeyde stres altında olduğunu immünohistokimyasal yöntemle belirlemiş olduğumuz 8-OH-dG göstermektedir. Tümörlü hücrelerin çekirdeklerinde görülen 8-OH-dG, bu hücrelerin oksidatif stres altında olduğunu göstermektedir. Özellikle OH[•] radikallerinin DNA üzerinde yaratmış olduğu etkiyle oluşan 8-OHdG, DNA üzerinde nokta mutasyonlara yol açarak tümör oluşumuna neden olur. Dokulardaki MMP genlerinin ekspresyonunun normal dokulara oranla yüksek çıkması,

hücrelerde mevcut olan bu stres koşullarıyla ilişkili olabilir. Reaktif oksijen türleri çoğu genin transkripsiyonunu etkilediği, özellikle düşük miktarda H₂O₂'nin transkripsiyon faktörü gibi görev yaparken, yüksek miktarlarda hücredeki apoptotik mekanizmaları tetikler.

Gastrik kanser oluşumu kompleks ve çok aşamalı bir süreçtir, bu kompleks oluşumda *H. pylori* enfeksiyonunun önemli girişimleri söz konusudur. *H. pylori*'nin virülans faktörü karsinogenesisle ilişkili olup bu bakterinin gastrik kanserde hücre proliferasyonunu ve apoptozunu etkilediği bilinirken, gastrik kanser oluşumunda etkili faktörler henüz tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızın amaçları içerisinde yer alan, *H. pylori* enfeksiyonu ile metastaza yol açan MMP genlerinin ifadeleri arasındaki ilişkiyi kıyasladığımızda istatistiksel olarak kayda değer bir veri elde edilemedi. Çalışmış olduğumuz doku örneklerinin sadece % 37'sinde *H. pylori* enfeksiyonu görülmesi bu ilişkinin negatif çıkması sebeplerinden biri olarak düşünülmektedir. Ayrıca *H. pylori*'nin DNA üzerinde yol açtığı hasar ve mutasyonlar reaktif oksijen türleri aracılığıyla olmaktadır [37]. Bu bağlamda, enfeksiyon sonucu salgılanan sitokinler, büyüme faktörleri ve bakterinin efektör molekülleri epitel hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki dengeyi bozarak onkojenik potensiyel teşkil eden mutasyonların birikimine sebep olup tümör gelişimini ve metastazı desteklediği belirlenmiştir [38]. Hücreler üzerinde yaptığımız deneylerde, *H. pylori* enfeksiyonu MKN-45'de *MMP-7* ifadesini arttırırken diğer MMP'lerde bir ifade artışının olmayışı bu genlerin farklı faktörlerle regüle olmasıyla ilişkili olabilir.

Multipleks PCR ile genotipik tanısını yaptığımız ve toksik genler taşıyan *H. pylori cagA⁽⁺⁾ vacA⁽⁺⁾* suşunun, toksik genler taşımayan *cagA⁽⁻⁾ vacA⁽⁻⁾* suşuna göre MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında daha çok morfolojik değişikliklere yol açtığı görülmüştür [155]. *cagA⁽⁺⁾ vacA⁽⁻⁾* suşunun, konakçı hücrelerde mitokondri aracılı yol ile apoptotik mekanizmayı tetiklediği bilinmektedir. *H. pylori* enfeksiyonu sonucu çalışmış olduğumuz MMP genlerinin ifadelerinde bir değişikliğin olmadığı görüldü. Bunun, bakterinin konakçı hücrede tümör oluşumunu, hücre bölünmesini arttıran bir sinyal yolu olan MAPK sinyal yolunu aktive ederek yaptığı bilinmektedir. Dolayısı ile *H. pylori*'nin, oluşan tümör hücrelerinin metastaz yapmasını sağlayan MMP genlerinin ifadelerinde önemli değişikliklere yol açmadığı anlaşılmaktadır.

Doku örneklerinde tesbit ettiğimiz β -katenin lokalizasyonunun nükleer olmayışı çoğunlukla, stoplazmik veya membranöz olması, gastrik kanserde nonkanonikal Wnt sinyal yolunun aktif olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca MKN-45 ve

23132/87 hücre hatlarında yapmış olduğumuz çalışmalarda nükleer β -katenin lokalizasyonunun görülmeyişi bu öngörüğü desteklemektedir. Kanonikal Wnt sinyal yolunda APC/axin/GSK kompleksi birbirinden ayrılır, stoplazmadaki β -katenin fosforillenmeden serbest kalır ve çekirdeğe transfer olur. Nankanonikal Wnt sinyal yolunda ise β -katenin rol almadığı jun-N terminal kinaz (JNK) sinyal yolunu aktive olur ve JNK çekirdeğe transfer olur, burada c-jun, ATF ve p53 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder [94].

MMP'lerin yüksek miktarlarda ifade olmaları, tümör hücrelerinin agresiflikleriyle ilişkilidir. Çalışmada kullandığımız hücre hatları içerisinde AGS'nin ileri derecede farklılaştığı ve daha agresif olduğu bilinmektedir. MMP ifadesi açısından da bir kıyaslama yaptığımızda, çalışılan 17 MMP geninden 12 tanesinin ifade edildiğini görmekteyiz. Öte yandan az farklılaşmış ve difüz tip gastrik kanser orijinli hücreler olan MKN-45'de 10 MMP'geni, 23132/87'de ise sadece 5 tane MMP geninin ifade olduğu görülmektedir. Ayrıca bu üç hücre hattı için yaptığımız invazyon deneyinde AGS hücrelerinin invazyon yeteneğinin en fazla olduğunu görmekteyiz.

Oksidatif stresin kanser hücrelerinde görülen apoptotik mekanizmada önemli roller üstlendiği kabul edilmektedir. H_2O_2 tarafından indüklenen apoptoz, reaktif oksijen türleri tarafından indüklenen apoptoz çalışmaları için bir model olarak kabul edilir. Dışarıdan eklenen H_2O_2 hücre zarından kolayca geçerek hücre içerisinde reaktif olayları başlatır. Düşük miktarlarda H_2O_2 hücrelerde apoptosizi tetiklerken, yüksek miktarlarda aşırı toksik etki göstererek nekroza yol açar [156]. Çalıştığımız hücreler üzerinde H_2O_2 'nin toksisitesinin $500\mu M$ - $1000\mu M$ arasında olduğu görüldü. Bu da literatürde bahsedilen yüksek miktarda H_2O_2 ile hücrelerde nekroza yol açmaktadır. Dolayısı ile bütün hücre hatlarında $50-200\mu M$ H_2O_2 'nin hücrelerde stres yaratmak için uygun dozlar olduğu kabul edilebilir. Özellikle $200\mu M$ H_2O_2 hücrelerde % 50 oranında stres yaratmasıyla gen ifadesi ve apoptoz çalışmalarında sınır belirleyici konsantrasyon olarak değerlendirilebilir.

Hücre hatlarında gen ifadesi değişimlerini değerlendirmek için yaptığımız canlı hücre içi oksidatif stres analizinde hücre hatları farklı özellikler göstermişlerdir. Daha az farklılaşmış özellikleriyle bilinen MKN-45 ve Kato III hücre hatlarında dışarıdan eklenen H_2O_2 konsantrasyonuna paralel olarak hücre içi stresin arttığı görülürken 23132/87, AGS, HGC-27 ve CLS-145 hücre hatlarında endojen bir oksidatif stres varlığı görüldü. Bu sonuç bize bu hücre hatlarının oluşan hücre içi oksidatif stresi elimine edebilme özelliklerine sahip olduklarını göstermektedir. Çünkü yapmış

olduğumuz apoptoz çalışmalarında bu hücre hatlarının hepsinin H₂O₂ ile apoptoza girmedikleri görüldü.

Yapılan birçok çalışmada memeli hücrelerinde apoptosizi tetikleyen sinyal yollarının çok karmaşık olduğu ve hücre tipine göre bu anti ve pro apoptotik sinyal yollarının değiştiği gösterilmiştir [157, 158]. Hücrenin hayatta kalması, anti apoptotik faktör Bcl-2'nin ifade olması ve anti apoptotik faktör Bax'ın ifadesinin düşmesiyle ilişkilidir. bu durumun tam tersi apoptozu tetikler. H₂O₂ ile strese giren hücrelerde Bax'ın aşırı ifade olduğu ve Bcl-2'nin ifadesinin azaldığı görülmektedir. Çalıştığımız hücre hatlarından H₂O₂ ile apoptoza giren MKN-45'de böyle bir mekanizma rol oynarken apoptozun görülmediği diğer hücrelerde muhtemelen böyle bir mekanizma görülmemektedir. Bu hücre içi stres seviyesinin yüksek olduğu bu hücre hatlarında dışarıdan ilave edilen H₂O₂'in yukarıda bahsedilen apoptotik mekanizmayı indüklediği tahmin edilmektedir. MKN-45 hücresinde yapmış olduğumuz kaspaz-3 enzim aktivitesinin negatif çıkması bize bu hücre hattında H₂O₂ ile tetiklenen apoptotik mekanizmanın kaspaz 3'ten bağımsız olduğunu göstermektedir. Bu veri literatürdeki veriler ile uyumaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda H₂O₂'nin apoptosizi protein kinaz C yolu ile yaptığı görülmüştür [159, 160].

Az farklılaşmış ve hücre içi oksidatif stres durumları birbirinden farklılık gösteren MKN-45 ve 23132/87 hücre hatlarında H₂O₂'nin MMP genlerinin ifadeleri üzerindeki değişikliklere baktığımızda, MKN-45'de *MMP-1*, *MMP-7*, *MMP-14*, *MMP-15*, *MMP-17*'nin ifadesi artarken 23132/87'de sadece *MMP-15*'in ifadesi artmıştır. Toplamda 10 tane MMP geninin ifade edildiği MKN-45'de stres sonrası 5 tane MMP geninin ifadesinde artış görülürken 23132/87'de sadece bir MMP ifadesinde artış görülmüştür. Bu strese dirençli olan 23132/87 hücre hattında dışarıdan ilave edilen stres kaynağının (H₂O₂) bu hücreyi daha agresif hale sokmadığı anlaşılıyor. Bu veri yapılan invazyon deneyi ile de doğrulanmaktadır. Çok farklılaşmadıkları için henüz metastatik özellikleri olmayan bu hücre hatlarından MKN-45'de invazyonun 23132/87'ye göre biraz daha fazla olduğu görülmektedir. Buna karşın daha çok farklılaşmış ve metastatik özelliği bilinen AGS hücre hattının stres altında daha çok invazyon yaptığını görmekteyiz. Bu durum bize, oksidatif stresin çok farklılaşmamış gastrik kanserde invazyonu ve metastazı çok az etkilediği fakat ileri derecede farklılaşmış gastrik kanserde metastası hızlandırdığını göstermektedir.

MKN-45'de stres koşullarında ifadesi artan MMP'lerden *MMP-7* ve *MMP-14* kısa süreli stres koşulunda (12 saat H₂O₂'de) daha fazla ifade olurken *MMP-1*, *MMP-*

15, *MMP-17* uzun süreli stres koşulunda (24 saat H_2O_2 'de) daha fazla ifade edilmektedirler. *MMP-7* ile *MMP-14*'ün ifadelerinin 12 saatte fazla olması ve 24 saatte azalması literatürde yer alan bu iki gen arasındaki ilişkiyi destekler niteliktedir. β -katenin ise MKN-45'de stres altında artış gösterirken, 23132/87'de ifadeye hiç bir değişiklik göstermemektedir. β -katenin hücreler arası bağlantıda rol üstlenen bir protein olarak düşünüldüğünde, 23132/87'de membranöz β -katenin lokalizasyonunun görülmesi ve stres altında ifadenin değişmemesi, bu hücrede hücreler arası haberleşmenin ve adezyonun kuvvetli olduğunu, invazyon yeteneğinin ise az olduğunu görmektedir. MKN-45'de ise H_2O_2 ile artan nükleer β -katenin lokalizasyonunu görmektedir. Dolayısı ile bu hücrede membranöz β -katenin lokalizasyonunun görülmemesi ve stres altında nükleer lokalizasyonunun artması, bir takım genlerin transkripsiyonunu etkileyerek invazyonu ve metastazı başlatan bir süreci beraberinde getirir.

Stres koşullarında analizini yapmış olduğumuz MMP genlerinden daha çok membran tip matriks metalloproteinazların (*MMP-14*, *MMP-15*, *MMP-17*) ifadelerinde bir artışın olduğunu görmektedir. Hücre yüzeyinde bulunan "urokinaz tip plasminojen aktivatör" (u-PA) sistemi özellikle membran tip MMP'lerin aktivitesini düzenleyerek anjiyogenezde önemli rol oynadıkları bilinmektedir [161]. Pek çok kanser türünde oksidatif stres altında, *u-PA* geninin ifadesinde artış olduğu görülmüştür. Stres koşullarında diğer MMP genlerine göre, membran tip MMP genlerinin ifadelerindeki artışın u-PA sistemi aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stres altında gen ifadesi artan u-PA sistemi, özellikle membran tip MMP'lerin ifadesini de arttırmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan bu sistem ile membran tip MMP'ler arasında tümör invazyonunu destekleyen karmaşık bir ilişki bulunmaktadır.

Antioksidan özelliği ile bilinen kafeik asit fenil ester (CAPE) ksantin oksidaz siklooksijenaz gibi bazı enzimlerin aktivitelerini inhibe eder. Ayrıca transkripsiyon faktörü olan NF-kB'yi inhibe ederek iltihaplanmayı önlediği ve anti-tümör özelliğine sahip olduğu bilinmektedir [162]. Hücre hatlarında H_2O_2 ile yaratmış olduğumuz oksidatif stresi CAPE ile ortadan kaldırdığımızda, hücre hatlarında ifadesi artan MMP'genlerinin önemli derecede ifadelerinin azaldığını gördük. Endojen kaynaklı hücre içi stres seviyesi yüksek olan 23132/87 hücre hattında H_2O_2 ile ifadesi artmayan *MMP-15* ve *MMP-28* genlerinin ifadesi hücre içi stresin ortadan kaldırılmasıyla önemli derecelerde azalış göstermesi, MMP genlerinin ifadesinin hücrelerdeki oksidatif stres seviyesi ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca transkripsiyon faktörü gibi davranan β -katenin ifadesinde görülen azalış stresin ortadan kalkmasıyla tümör

oluşumunu tetikleyen diğer genlerin ifadesinde de önemli azalışlar olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca CAPE kanser hücreleri için seçici bir sitotoksositeye sahiptir ve tümör hücrelerini apoptosize sürükler.

Çalışmanın diğer bir amacını oluşturan RNA müdahalesinin MMP genlerinin ifadesinde yol açacağı değişiklikleri tespit etmek olmuştur. Bunun için MMP'ler içerisinde sadece AGS hücresinde ifade olan ve daha çok agresifliğe yol açtığı düşünülen *MMP-3* genine özgü bir RNA susturumu gerçekleştirilmiştir. *MMP-3*'ün pro*MMP-7*'yi aktive ettiği ve *MMP-7*'nin de pro *MMP-2* ve pro *MMP-9*'u aktive ettiği bilinmektedir. Dolayısı ile *MMP-3*'ün susturulması ile hücrede görülen MMP ifadesinin azalacağı ve tümör hücresinin invaziv ve metastatik özelliğinin azalacağı kanısına varılmıştır. Bu çalışma bu konuda ilk olmasıyla da çalışmanın orijinalliğini ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmada *MMP-3* geni AGS hücre hattında başarıyla susuturulmuş olup diğer MMP genlerinin ifadesinde azalış ve artışlar görülmüştür. *MMP-3*'ün susturulması *MMP-15*'in ifadesini azaltırken, *MMP-10* ifadesini arttırmıştır. Ayrıca dokularda yapılan çalışmada *MMP-3*'ün *MMP-2* ve *MMP-12* ile aralarında bir korelasyonun görülmesi sonucu ($p < 0.01$) *MMP-3*'ün literatürde henüz bilinmeyen diğer MMP'leri de regüle edebileceği düşüncesiyle susturulmuştur. Ayrıca, hücre içerisinde endojen reaktif oksijen türlerinin oluşmasında görev alan *Rac-1* ve *Rac-2* genleriyle de yakından ilişkili olduğu bilinmektedir [163] *MMP-3*'ün susturulması bu bağlamda da bir önem kazanmaktadır.

Substrat özgüllüğü bakımından aynı grupta yer alan *MMP-3* ve *MMP-10* yakın ilişki içerisinde olan proteinlerdir. Doku gelişimi, immün cevap ve tümör hücresinin invazyonunda bu genlerinin ifadesi büyük önem kazanmaktadır. Dolayısı ile paralel yönde çalışan bu iki genden (*MMP-3* ve *MMP-10*) birinin susturulması diğerinin ifadesini arttırmış olabilir. *MMP-3*'ü susturduğumuzda *MMP-10*'nun ifadesinin artması bu yönlü bir ilişkiden kaynaklanıyor olabilir.

Yapılan çalışmalarda *MMP-15*'in akciğer, prostat, melanoma gibi çeşitli kanser türlerinde anti-apoptotik bir görev üstlendiği görülmüştür. Tümör invazyonunu destekleyen *MMP-15*'in siRNA ile susturulması sonucunda hücrelerde apoptozoranının arttığı görülmüştür [164]. Yapmış olduğumuz çalışmada *MMP-3*'ün susturulması sonucu *MMP-15*'in ifadesinde görülen azalış bu noktada büyük bir önem kazanmaktadır. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi gastrik kanserde de *MMP-15*'in anti apoptotik bir rol üstleniyor olması ve bu genin ifadesinin *MMP-3* geninin ifadesine paralel olarak azalması, bu kanserin tedavisinde kullanılacak kilit bir noktayı ortaya koymaktadır.

Dolayısı ile pek çok kanser türünde olduğu gibi gastrik kanserde de *MMP-3*, diğer *MMP* genlerinin ifadesini etkilemesi bakımından önemli bir markır gen olmaktadır.

Son zamanlarda kanserin RNAi teknolojisiyle tedavi edilmesine yönelik olarak bazı kanser türlerinde anahtar rol üstlenen *MMP*'ler susturulmuştur [165, 166]. Gastrik kanserde de *MMP-3* genin diğer *MMP*'leri regüle etmesiyle kilit bir göreve sahip olabileceği düşünülmektedir. Bu genin kanserin RNAi temelli terapisinde önemli bir yer alacağı ve yapılacak olan ileri çalışmalar ile daha etkili sonuçlar ortaya koyacağı düşünülmektedir. Literatürde henüz *MMP*'ler arasındaki regülasyonun nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir ve bu karmaşık regülasyon ağı kanser türüne göre de değişiklik göstermektedir. Burada elde edilen verilerin bu karmaşıklığa bir ölçüde çözüm olacağı ve yeni çalışmalara ışık tutacağı ön görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] D. Hanahan and R. A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*, **Cell**, 100 (2000) 57–70.
- [2] <http://www.nih.gov/about/almanac/archive/2003/organization/NCI.htm> (National Cancer Institute)
- [3] L. Pecorino, *Molecular Biology of Cancer, Mechanisms, Targets, and Therapeutics* Oxford press, Second edition, 2008, 112-120.
- [4] W.A. Schulz, *Molecular Biology of Human Cancer*, Springer, capter 9, 2005, 209-215.
- [5] JK. Cowell, *Molecular Genetics of Cancer*, Academic Pres, Second edition, 2001, 32-41.
- [6] MK. Brenner, *Gene Therapy in Cancer*, Marker Dekker Inc, New York, 1996, 115- 122.
- [7] GD. Kruh, KD. Tew, *Basic Science of Cancer*, Current Medicine, Inc, ,Philadelphia, 2000, 141-147.
- [8] Nickoloff JA and Hoekstra MF, *DNA Damage and Repair* Vol.3, Humana Press,Totowa,New Jersey, 2001, 98-105.
- [9] B. J. Dicken, D. L. Bigam,C. Cass, John R. Mackey, FRCP, Anil A. Joy, FRCP, and Stewart M. Hamilton, FRCS, *Gastric Adenocarcinoma Review and Considerations for Future Directions*, **Annals Surg.**, 241, (2005) 348-360.
- [10] K. K Yamagushi, T. Taniguchi, et al. *Clinicopathological of gastric cancer in elderly*, **Br J. Cancer.**, 73 (1996) 798-802.
- [11] R. Gore, *Gastrointestinal cancer*, **Radiol Clin. North Am.**, 35 (1997) 295–310.
- [12] T. Lauren, *The two histological main types of gastric carcinoma*. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 64 (1965) 34- 41.
- [13] C. Fenogilo-Preiser, F. Carneiro, P. Correa, et al. *Gastric carcinoma*. In: *Hamilton S, Aaltonin L, eds. Pathology and Genetics. Tumors of the Digestive System*, **Lyon Press**, 1 (2000) 37–52.
- [14] M. Werner, K. Becker, G. Keller, *Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology*. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 127 (2001) 207–216.
- [15] R. Kohen and A. Nyska, *Redox Reactions, and Methods for Their Quantification Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants*, **Toxicol. Pathol.**, 30 (2002) 620-645.
- [16] K. Z Guyton, Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., and Holbrook, N. J. **J. Biol.Chem.**, 271 (1996) 4138–4142.
- [17] R. L Whisler, M. A Goyette, I. S. Grants, and Newhouse, Y. G. **Arch.Biochem. Biophys.**, 319 (1995) 23–35.
- [18] RL. Prior, G. Cao. *In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods*, **Free Radic. Biol. Med.**, 27 (1999) 1173–1181.

- [19] FQ. Schafer, GR. Buettner, *Redox environments of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*, **Free Rad. Biol. Med.**, 30 (2001) 1191–1212.
- [20] J. Hrbac, R. Kohen, *Biological redox activity: Its importance, methods for its quantification and implication for health and disease*, **Drug Develop. Res.**, 50 (2000) 516–527.
- [21] L. Brad. Upham and G. James Wagner, *Toxicant-Induced Oxidative Stress in Cancer*, **Toxicol. Scienc.**, 64 (2001) 1–3.
- [22] R. G. Allen, and M. Tresini, *Oxidative stress and gene regulation*, **Free Radic. Biol. Med.**, 28 (2000) 463–499.
- [23] H. Hiraishi, A. Terano, S. Ota, Mutoh, H., Sugimoto, T., Harada, T., Razandi, M., and Ivey K. J., *Monochloramine-induced cytotoxicity to cultured rat gastric mucosal cells: Role of glutathione and iron in protection and injury*, **Gastroenterol.**, 106 (1994) 1199–1207.
- [24] G. S. Smith, D. Mercer, W. Cross, J. M., Barreto, J. C., and Miller, T. A., *Gastric injury induced by ethanol and ischemia-reperfusion in the rat*, **Dig. Dis. Sci.**, 41 (1996) 1157–1164.
- [25] N. Yajima, H. Hiraishi, and T. Harada, *Protection of cultured rat gastric cells against oxidant stress by iron chelation*, **Dig. Dis. Sci.**, 40 (1995) 879–886.
- [26] T. Yoshikawa, Y. Naito, A. Kishi, T. Tomii, Kaneko, T., Inuma, S., Ichikawa, H., Yasuda, M., Takahashi, S., and M. Kondo, *Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats.*, **Gut**, 34 (1993) 732–737.
- [27] I. M. Drake, M. J. Davies, N. P. Mapstone, M. E Dixon, C. J. Schorah, White, K. L. M., Chalmers, D. M., and Axon, A. T. R., *Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals*, **Carcinogenesis**, 17 (1996) 559–562.
- [28] JR. Warren, BJ. Marshall, *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*, **Lancet**, 1 (1983) 1273–1278.
- [29] M. Gooz, P. Gooz, Aj Smolka, *Epithelial and bacterial metalloproteinases and their inhibitors in H. pylori infection of human gastric cell*, **Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 281(2001) 823-832.
- [30] A. De Luca, G. Iaquinto, *Helicobacter pylori and gastric diseases: a dangerous association*, **Cancer Letters**, 213 (2004) 1–10.
- [31] S. Kikuchi, *Epidemiology of Helicobacter pylori and gastric cancer*, **Gastric Cancer**, 5 (2002) 6–15.
- [32] G.D Parsonnet, D.P Friedmann, Vandersteen, Y. Chang, J. Vogelman, N. Orentreich, R.K. Sibley, *Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma*, **N. Engl. J. Med.**, 325 (1991) 1127–1131.
- [33] Eurogast Study Group, *An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer*, **Lancet**, 341 (1993) 1359–1362.

- [34] IARC, *Schistosomes liver flukes and Helicobacter pylori. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, **IARC Sci.**, Lyon, (1994), pp. 1–241.
- [35] F. Tombola, C. Carlesso, G. Szabo, M. de Bernard, J.M. Reyrat, J. Telford, et al., *Helicobacter pylori vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation*, **Biophys. J.**, 76 (1999) 1401–1409.
- [36] S.F. Moss, E.M. Sordillo, A.M. Abdalla, V. Makarov, Z. Hanzely, G.I. Perez-Perez, et al., *Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonization with cagA Helicobacter pylori strains*, **Cancer Res.**, 61 (2001) 1406–1411.
- [37] A. De Luca, A. Baldi, P. Russo, A. Todisco, L. Altucci, N. Giardullo, et al., *Co-expression of Helicobacter pylori's proteins CagA and HspB induces cell proliferation in AGS gastric epithelial cells, independently from the bacterial infection*, **Cancer Res.**, 63 (2003) 6350–6356.
- [38] S. Keates, A.C. Keates, M. Warn, R.M. Peek Jr., P.G. Murray, C.P. Kelly, *Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag⁺ and cag⁻ Helicobacter pylori*, **J. Immunol.**, 163 (1999) 5552–5559.
- [39] J.S. Beckman, T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall, B.A. Freeman, *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 87 (1990) 1620–1625.
- [40] H. Nishibayashi, S. Kanayama, T. Kiyohara, K. Yamamoto, Y. Miyazaki, Y. Yasunaga, *Helicobacter pylori-induced enlarged-fold gastritis is associated with increased mutagenicity of gastric juice, increased oxidative DNA damage, and an increased risk of gastric carcinoma*, **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 18 (2003) 1384–1391.
- [41] M. Yilmaz, C. Gerhard and L. Francois, *Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis*, **Trends Mol. Med.**, 13 (2007) 12.
- [42] PM Comoglio, Baccacoi *Scatter factors and invasive growth*, **Semin. Cancer Biol.**, 11 (2001), 153-162.
- [43] A. Wells, *Cell mobility in cancer invasion and metastasis*, Springer, 2007, 68-74.
- [44] A.B Dennis, L. Julian, R Martin, R. Keits, W. James D, **Mol. Biol. Cell. Third ed.** Garland publishing, (1994) 989-994.
- [45] TK Brog. *It's the matrix ECM, proteases, and cancer*. **Am.J. Pathol.**, 164 (2004) 1141-1142.
- [46] M Mareel, A Leroy, *Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion*. **Physiol. Rev.**, 83 (2003) 337-76.
- [47] M. Zhang et al. *Epidermal growth factor modulates cell attachment to hyaluronic acid by the cell surface glycoprotein CD44*. **Clin. Exp. Metastasis**, 14 (1996) 268-76.
- [48] M. Zhang et al. *Epidermal growth factor induced CD44 gene expression through a novel regulatory element in mouse fibroblasts*. **J. Biol. Chem.**, 272 (1997) 14139-46.

- [49] Xie H, et. Al. *In vitro* invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells is modulate by EGF receptor-mediated signals. **Clin.Exp.Metastasis**, 13 (1995) 407-19.
- [50] P. Mignatti, DB Rifkin. *Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion*. **Physiol. Rev.**, 73 (1993)161-195.
- [51] B. Turk, *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, 5 (2006) 785-799.
- [52] W. Kwang, *International Review of Cell and Molecular Biology*, American Chemical Society Published, 2002,
- [53] DP. Dickinson, *Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease*. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, 13 (2002) 238-275.
- [54] D. Turk, G Guncar, *Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 59 (2003) 203-213.
- [55] TE Cawston, AJ Wilson, *Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease*. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, 20 (2006) 983-1002.
- [56] M. Corbel, E. Boichot and V. Lagente, *Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury*, **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 33 (2000) 749-754.
- [57] M.Egebland, and Z. Werb, *New functions matrix metalloproteinases in cancer progression*. **Nature Rev. Cancer**, 2 (2002) 161-174.
- [58] R. Elke, A. Marlies, *Simultaneous determination of matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by mutiplex PCR in colorectal carcinomas*, **Int. J. Colorectal Dis.**, 19 (2004), 518-524.
- [59] CM Overall, GA McQuibban, Clark- Lewis I, *Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics*. **Biol. Chem.**, 383 (2002) 1059– 1066.
- [60] PE Van den Steen, P Proost, Grillet B, Brand DD, Kang AH, Van Damme J, Opdenakker G., *Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis*, **FASEB J.**, 16 (2002) 379–389.
- [61] E. Roeb, K. Schleinkofer, T Kernebeck, S Poetsch, I Behrmann, B Jansen, S Matern, Grtzing J, *The MMP-9 hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist*. **J. Biol. Chem.**, 277 (2002) 50326–50332.
- [62] R. Hoekstra, F.A.L.M. Eskens, J. Verweij, *Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Current Developments and Future Perspectives*, **Oncologist**, 6 (2001) 415-427.
- [63] De Quan Li, Tie Yan Shang, Hyun-Seung Kim, Abraham Solomon, Balakrishna L. Lokeshwar, and Stephen C. Pflugfelder, *Regulated Expression of Collagenases MMP-1, -8, and-13 and Stromelysins MMP-3, -10, and -11 by Human Corneal Epithelial Cells*, **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 44 (2003)

- [64] R. Ala-aho, VM Kahari, *Collagenases in cancer*. **Biochimie.**, (2005) 87(3-4):273-86.
- [65] G. Murphy, AJP Docherty. *The matrix metalloproteinases and their inhibitors*. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 7 (1992) 120–125.
- [66] M. Corbel, E. Boichot and V. Lagente, *Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury*, **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 33 (2000) 749-754.
- [67] Tetley TD. *Proteinase imbalance: its role in lung disease*. **Thorax**, 48 (1993) 560-565.
- [68] PM. Yao, B. Maitre, C. Delacourt, Buhler JM, Harf A & Lafuma C., *Divergent regulation of 92-kDa gelatinase and TIMP-1 by HBECs in response to Il-1 β and TNF- α* , **American J. Physiol.**, 273 (1997) 866-874.
- [69] <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Membranetype%20matrix%20metalloproteinasen>.
- [70] D. Pei, *Leukolysin/MMP25/MT6-MMP. a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage*. **Cell Res.**, 9 (1999) 291–303.
- [71] H Nagase, *Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration*. **Cell Res.**, 8 (1998) 179-186.
- [72] Will H, Atkinson S J, Butler G S, Smith B, Murphy G., *The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3.*, **J. Biol. Chem.**, 271 (1996) 17119–17123.
- [73] H. Miyamori, T. Takino, M. Seiki, Sato H., *Human membrane type-2 matrix metalloproteinase is defective in cell-associated activation of progelatinase A*. **Biochem Biophys. Res. Commun.**, 267 (2000) 796–800.
- [74] V. Knäuper, H Will, Lopez-Otin C et al., *Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme.*, **J. Biol. Chem.**, 271 (1996) 17124–17131.
- [75] Gilles C, Polette M, Piette J, Munaut C, Thompson EW, Birembaut P, et al., *High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells*. **Int. J. Cancer**, 65 (1996) 209–222.
- [76] Stracke J O, Hutton M, Stewart M et al. *Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme*. **J. Biol. Chem.**, 275 (2000) 14809–14816.
- [77] E. Kerkela, U. Saarialho-Kere, *Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer*, **Experimental Dermatology**, 12 (2003) 109–125.
- [78] Parks W.C., R. P., Mecham. *Matrix metalloproteinases*. **Academic press**. San Diego. 1998.
- [79] Nagase H. J.F, Woessner Jr. *Matrix metalloproteinases*, **J. Biol. Chem.**, 274 (1999) 21491-21494.

- [80] Liaw. L H.C. Crawford, *Functions of extracellular matrix and matrix degradating proteases during tumor progression*, **Brazilian J.Med.Biol.Res**, 32 (1999) 805-812.
- [81] Mc Cawley, L.J.L. M.Matrisian., *Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression*, **Mol.Med.**, 6 (2000) 149-156.
- [82] Jhonsan NM., Ahonem VM Kahari, *Matrix metalloproteinases in tumor invasion*, **Cell. Mol. Life.**, 20 (2000) 5-15.
- [83] Parsons SL., Watson PD., Brown H, M. Collins, R.JC. Steele., *Matrix metalloproteinases*, **Br.J.Surg.**, 84 (1997) 160-166.
- [84] Sang-Oh Yoon, Soo-Jin Park, Sun Young Yoon, Chang-Hyun Yun, and An-Sik Chung, *Sustained Production of H₂O₂ Activates Pro-matrix Metalloproteinase-2 through Receptor Tyrosine Kinases/Phosphatidylinositol 3-Kinase/NFκB Pathway*, **The J. Biol. Chem.**, 277:(33) (2002) 30271–30282.
- [85] Melendez-Zajgla J, Del Pozo L, Ceballos G, Maldonado V. *Tissue inhibitor of metalloproteinase-4, The road less traveled*, **Mol. Cancer**, 21 (2008) 7-85.
- [86] Mannello F, Gazzanelli G, *Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications*, **Apoptosis**, 6 (2001) 479-482.
- [87] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*, **Eur. J. Cell. Biol.**, 74 (2) (1997) 111-122.
- [88] E. Kerkela,U. Saarialho-Kere, *Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer*, **Experimental Dermatology**, 12 (2003) 109–125.
- [89] Westermark J. And Kahari V.M., *Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion*, **FASEB J.** 1999, 13: 781-792.
- [90] Ravanti L., Kahari VM., *Matrix metalloproteinases in wound repair*, **Int.J. Mol.Med.**, 6 (2000) 391-407.
- [91] Lilien J, Balsamo J., *The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin*. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 17 (5) (2005) 459-465.
- [92] Venkiteswaran K, Xiao K, Summers S, et al. *Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin*. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, 283 (3) (2002) 811-821.
- [93] Reya T, Clevers H. *Wnt signalling in stem cells and cancer*. **Nature**, 434(7035) (2005) 843-850.
- [94] Doucas H, Garcea G, Neal CP, et al. *Changes in the Wnt signalling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance*. **Eur. J. Cancer**, (2005) 41 (3) 365-379.
- [95] Gregorieff A, Clevers H. *Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer*, **Genes Dev.**, 19 (8) (2005) 877-890.

- [96] Behrens J. *Control of beta-catenin signaling in tumor development*. **Ann. NY. Acad. Sci.**, 910 (2000) 21-33.
- [97] Wang J, Wynshaw-Boris A., *The canonical Wnt pathway in early mammalian embryogenesis and stem cell maintenance/differentiation*. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, 14:(5) (2004) 533-539.
- [98] Ken M. Cadigan and Roel Nusse¹, *Wnt signaling: a common theme in animal development*, **Genes Dev.**, 11 (1997) 3286-3305.
- [99] Polakis P. *The oncogenic activation of beta-catenin*. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, 9 (1999) 15-21.
- [100] Wodarz A, Nusse R. *Mechanisms of Wnt signaling in development*. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, 14 (1998) 59-88.
- [101] Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. *The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3*. **Genes Dev.**, 10 (1996) 1443-1454.
- [102] Brabletz T, Jung A, Hermann K, Gunther K, Hohenberger W, Kirchner T. *Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front*. **Pathol. Res. Pract.**, 194 (1998) 701-704.
- [103] Connaci-Sorrel ME, Ben Yedida T, Shtutman M, Feinstein E, Einat P, Ben Ze'ev A, *Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin /LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis*. **Genes Dev.**, 16 (2002) 2058-2072.
- [104] Susan Elmore, *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*, **Toxicol Pathol.**, 35(4): (2007) 495-516.
- [105] Hippokratis Kiaris, *Understanding carsinogenesis*, Wiley-vch Verlag GmbH&KGaA, 2006.
- [106] <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Caspases>
- [107] Halliwell, B. and Dizdaroglu, M, *The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques*, **Free Radical Research Commuications**, 16 (1992) 75-87.
- [108] Helbock, H.J., Beckman, K.B. and Ames, B.N. *8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-Hydroxy-guanine as biomarkers of oxidative DNA damage*. **Methods in Enzymology**, 300 (1999) 156-166.
- [109] Kasai, H. *Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis*. **Mutation Research**, 387 (1997) 147-163.
- [110] Maen Abdelrahim, stephen Safe, Cherly Baker and Ala Abudayyeh, *RNAi and cancer: Implications and applications*, **Journal of RNAi and Gene Silencing**, 2 (2006) 136-145.
- [111] Lu PY, Xie FY and Woodle MC, *siRNA-mediated antitumorigenesis for drug target validation and therapeutics*, **Curr. Opin. Mol. Ther.**, 5 (2003) 225-234.

- [112]Mattick, J. S. and I. V. Makunin, *Small regulatory RNAs in mammals*, **Hum. Mol. Genet.**, 14:(1) (2005) 121-132.
- [113]Elbashir, S. M., W. Lendeckel, et al.. *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. **Genes Dev.**, 15: (2) (2001)188-200.
- [114]Cullen, B. R, *Transcription and processing of human microRNA precursors*, **Mol. Cell.**, 16: (6) (2004). 861-866.
- [115]Bartel B., *MicroRNAs directing siRNA biogenesis."* **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 12: (7) (2005) 569-71.
- [116]Matzke, M. A. and J. A. Birchler, *RNAi-mediated pathways in the nucleus*, **Nat. Rev. Genet.**, 6: (1) (2005) 24-35.
- [117]Vermeulen, A., L. Behlen, et al. *The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency*, **RNA**, 11 (2005) 674-682.
- [118]Kim, V. N.. *Small RNAs: classification, biogenesis, and function*, **Mol. Cells**, 19 (1) (2005) 1-15.
- [119]Soutschek, J., A. Akinc, et al. *Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs*, **Nature**, 432: (7014) (2004) 173-181.
- [120]Sontheimer, E. J. and R. W. Carthew, *Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs*, **Cell**, 122: (1) (2005) 9-12.
- [121]Ambros, V., *microRNAs: tiny regulators with great potential*, **Cell**, 107:(7) (2001) 823-6.
- [122]Eis PS, Tam W, Sun L, et al, *Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell Lymphomas*, **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, 102 (2005) 3627-3632.
- [123]Lagos-Quintana M, Rauhut R, Mayer J, Borkhardt A and Tuschl T., *New microRNAs from mouse and human*, **RNA**, 9 (2003) 175-179.
- [124]Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F and Croce CM., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99 (2002) 15524-15529.
- [125]Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP and James RJ. *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*, **Mol. Cancer Res.**, 1 (2003) 882-891.
- [126]Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S and Borkhardt A. *High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma*. **Genes Chromosomes Cancer**, 39 (2004) 167-169.
- [127]Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M and Croce CM.. *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 101 (2004) 2999-3004.

- [128] Lu PY, Xie FY and Woodle MC.. *siRNA-mediated antitumorigenesis for drug target validation and therapeutics*, **Curr. Opin. Mol. Ther.**, 5 (2003) 225-234.
- [129] H. Nishibayashi, S. Kanayama, T. Kiyohara, K. Yamamoto, Y. Miyazaki, Y. Yasunaga, et al., *Helicobacter pylori-induced enlarged-fold gastritis is associated with increased mutagenicity of gastric juice, increased oxidative DNA damage, and an increased risk of gastric carcinoma*, **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 18 (2003) 1384–1391.
- [130] Nomura, H., Fujimoto, N., Seiki, M., Mai, M., and Okada, Y. *Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas*, **Int. J. Cancer**, 69 (1996) 9-16 .
- [131] Mark Bloomston. MD, Emmanuel E. Zervos, *Matrix Metalloproteinases and their role in pancreatic cancer*, **Annual of surgical Oncology**, 9:(7) (2002) 668-674.
- [132] Kolligs FT, Bommer G, Goke B. *Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis*. **Digestion**, 66 (2002) 131-44.
- [133] Marchenko ND, Marchenko GN, Weinreb RN, Lindsey JD, Kyshtoobayeva A, Crawford HC, et al. *Beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 36 (2004) 942-56.
- [134] Yamashita K, Azumano I, Mai M, Okada Y. *Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis*. **Int. J. Cancer**, 79 (1998) 187-94.
- [135] Wu, C. Y., Wang, C. J., Tseng, C. C., Chen H. P., Wu, M. S., Lin, J. T., Inoue, H., and Chen, G. H. *Helicobacter pylori promote gastric cancer cells invasion through a NF-kappaB and COX-2-mediated pathway*. **World J. Gastroenterol**, 7 (21) (2005) 3197-3217.
- [136] Kim, M., Murakami, A., Kawabata, K., and Ohigashi, H. *Epigallocatechin-3-gallate promotes pro-matrix metalloproteinase-7 production via activation of the JNK1/2 pathway in HT-29 human colorectal cancer cells*. **Carcinogenesis**, 26:(9) (2005) 1553 - 1562.
- [137] Hemmerlein, B., Johannis, U., Halbfass, J., Bottcher, T., Heuser, M., Radzun, H. J., and Thelen, P. *The balance between MMP-2/-9 and TIMP-1/-2 is shifted towards MMP in renal cell carcinomas and can be further disturbed by hydrogen peroxide*. **Int. J. Oncol.**, 24:(5) (2004) 1069-1076.
- [138] Y Mao, G Song, Q Cai, M Liu, H Luo, M Shi, G Ouyang, S Bao, *Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gastric carcinoma MGC803 cells*, **Cell biology international**, 30 (2006) 332-337.
- [139] Kolligs, F.T., Bommer, G., and Goke, B. *Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis*, **Digestion**, 66 (2002) 131-144.
- [140] Marchenko, N. D., Marchenko, G. N., Weinreb, R. N., Lindsey, J. D., Kyshtoobayeva, A., Crawford, H. C., and Strongin, A. Y. *Beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells*. **Int. J. Biochem.**, 36 (2004) 942-956.

- [141] Yuasa Y. *Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis*. **Nat. Rev. Cancer.**, 3:(8) (2003) 592-600.
- [142] Katoh, M. *WNT2 and human gastrointestinal cancer*. **Int. J. Mol. Med.**, 12:(5) (2003) 811-816.
- [143] Cheng, X. X., Wang, Z. C., Chen, X. Y., Sun, Y., Kong, Q. Y., Liu, J., and Li, H. *Correlation of Wnt-2 expression and beta-catenin intracellular accumulation in Chinese gastric cancers: relevance with tumour dissemination*. **Cancer Lett.**, 223:(2) (2005) 339-347.
- [144] M Wilson. Clements, J Wang, A Sarnaik, OJ Kim, J MacDonald, C Fenoglio-Preiser, J Groden, and AM. Lowy, *β -Catenin Mutation Is a Frequent Cause of Wnt Pathway Activation in Gastric Cancer*, **Cancer Research**, 62 (2002) 3503–3506.
- [145] Zhi-Hong Zheng, Xiu-Ju Sun, Hai-Tao Zhou, Chao Shang, Hong Ji, Kai-Lai Sun, *Analysis of metastasis suppressing function of E-cadherin in gastric cancer cells by RNAi*, **World J. Gastroenterol.**, 11:(13) (2005) 2000-2003.
- [146] Yanan Sun, Ming Liu, Baofeng Yang, Baoxin Li, Jianguang Lu, *Role of siRNA silencing of MMP-2 gene on invasion and growth of laryngeal squamous cell carcinoma*, **European archives of oto-rhino-laryngology**, 265 (2008) 1385-1391.
- [147] G Bergers and LE Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*, **Nat. Rev. Cancer**, 3 (2003) 401-410.
- [148] Bradford, M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. **Anal. Biochem.**, 7 (1976) 248-254.
- [149] MW.Pfaffl, *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*, **Nucleic acids research**, 29 (2001) 900.
- [150] Yamashita K, Azumano I, Mai M, Okada Y. *Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis*. **Int. J. Cancer**, 79 (1998) 187-94.
- [151] Marchenko ND, Marchenko GN, Strongin AY. *Unconventional activation mechanisms of MMP-26, a human matrix metalloproteinase with a unique PHCGXXD cysteine-switch motif*. **J. Biol. Chem.**, 277 (2002) 18967-18972.
- [152] Marchenko GN, Ratnikov BI, Rozanov DV, Godzik A, Deryugina EI, Strongin AY. *Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin*. **Biochem. J.**, 356 (2001) 705-718.
- [153] Jason R. Jessen. *Noncanonical Wnt Signaling in Tumor Progression and Metastasis* **Zebrafish**, 6(1) (2009), 21-28.
- [154] Sato, K., Tsuchiya, M., Saldanha, J., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kishimoto, T. and Bendig, M., *Humanization of a mouse anti-human interleukin-6 receptor antibody comparing two methods for selecting human framework regions*, **Mol. Immunol.**, 31 (1994) 371-381.

- [155] Gürkan Şen, "*Analysis of Wnt Pathway in Gastric Carcinoma*", Master thesis, Fatih University Turkey, 2009.
- [156] Sahara T, Fukuo K, Sugimoto T, Morimoto S, Nakahashi T, Hata S, et al. *Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells*. **J. Immunol.**, 160 (1998) 4042-4049.
- [157] Von Harsdorf R, Li PF, Dietz R von, *Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis*, **Circulation**, 99:(22) (1999) 2934-41.
- [158] Cory S, Adams JM, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*, **Nat. Rev. Cancer**, 2:(9) (2002) 647-56.
- [159] K Shuichi, H Toshihide, I Masaaki, T Motoaki, T Yoshio, S Kenichi, *Effect of oxidative stress by hydrogen peroxide in human gastric cancer cell line MKN-45*, **J. Tohoku Pharmaceutical University**, 46 (1999) 183-190.
- [160] KR Brunt, KK Fenrich, G Kaini, et al., *Protection of human vascular smooth muscle cells from H₂O₂ induced apoptosis through functional codependence between HO-1 and AKT*, **Arter. Throm. Vasc. Biol.**, 26 (2006) 2027-2034.
- [161] A Collen, R Hanemaaijer, F Lupu, PH Quax, N van Lent, J Grimbergen, E Peters, *Membrane-type matrix metalloproteinases-mediated angiogenesis in a fibrin-collogen matrix*, **Blood**, 102 (2003) 1810-1817.
- [162] Ming-Jen Chen, Wen-Hsiung Chang, Ching-Chung Lin, Chia-Yuan Liu, Tsang-En Wang, Cheng-Hsin Chu, Shou-Chuan Shih, Yu-Jen Chen, *Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Apoptosis of Human Pancreatic Cancer Cells Involving Caspase and Mitochondrial Dysfunction*, **Pancreatology (IAP)**, 8:(6) (2008) 566-576.
- [163] D. Sun, D. Xu, B. Zhang, *Rac signaling in tumorigenesis and as target for anticancer drug development*, **Drug Resistance**, 9,(6) (2008) 274-287.
- [164] R Abraham, J Schafer, M Rothe, J Bange, P Knyazev, and A Ullrich, *Identification of MMP-15 as an Anti-apoptotic Factor in Cancer Cells*, **The Journal Of Biological Chemistry**, 280 (2005) 34123-34132.
- [165] LT Liu, HC Chang, LC Chiang and WC Hung, *Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion*, **Cancer Res.**, 63 (2003) 3069-3072.
- [166] SS Lakka, CS Gondi et al., *Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis*, **Oncogene**, 23 (2004) 4681-4689.

CV

SOYADI, ADI: GENCER, Salih

DOĞUM TARİHİ: 07/07/1982

E-mail: sgencer@inonu.edu.tr , salihgencer@gmail.com

EĞİTİM

1998-2002	Lisans	İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü
2002-2004	Yüksek Lisans	İnönü Üniversitesi Biyoloji/Moleküler Biyoloji
2004-2009	Doktora	İnönü Üniversitesi Biyoloji/Moleküler Biyoloji

MS Tez : *Vitreoscilla* hemoglobin geni klonlanmış bakterilerde L-asparaginaz enziminin sentezi: önemli bir kanser kemoterapi ajanı

Tez Danışmanı: Hikmet Geckil, Doç. Dr., İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü

PhD Tez: Mide Kanserinde Matriks Metalloproteinaz (MMP) genlerinin İfadesi Üzerine Oksidatif Stress ve RNA Müdahalesinin Etkisi

Tez Danışmanı: Hikmet Geckil, Doç. Dr., İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Eş-Danışman: M.Burcu Irmak Yazıcıoğlu, Yrd.Doç.Dr., Fatih Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

UZMANLIK ALANI

Moleküler Biyoloji, Biyokimya, Kanser Biyolojisi, Oksidatif Stress, RNA interferans Mikrobiyal Genetik, Mikrobiyal Metabolizma, Endüstriyel Enzimler,

Anahtar kelimeler: Endüstriyel Enzimler, Bakteriyal hemoglobin, *Vitreoscilla* hemoglobini, L-asparaginaz, Oksijenle regüle olan genler, Kanser biyolojisi, MMP genleri, β -Katenin, Wnt sinyal yolu, Oksidatif stres, RNA interferans (Bakterial hemoglobin, *Vitreoscilla* hemoglobin, L-asparaginase, Oxygen-regulated genes, Cancer biology, MMP Genes, β -Catenin, Wnt signaling, Oxidative stress, RNA interference).

YAYINLARI

1. Geckil H, **Gencer S**, Kahraman H, Erenler SO (2003), Genetic engineering of *Enterobacter aerogenes* with *Vitreoscilla* hemoglobin gene: cell growth, survival, and antioxidant enzyme status under oxidative stress. **Research in Microbiology** 154 (6): 425-431.
2. Geckil H, **Gencer S** (2004), Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake. **Applied Microbiology and Biotechnology** 63 (6): 691-697.
3. Erenler SO, **Gencer S**, Geckil H, Stark BC, and Webster DA (2004), Cloning and expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Enterobacter aerogenes*: effect on cell growth and oxygen uptake. **Applied Biochemistry and Microbiology** 40 (3): 288-295.
4. Geckil H, **Gencer S**, Uckun M (2004), *Vitreoscilla* hemoglobin expressing *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* respond differently to carbon catabolite and oxygen repression for production of L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Enzyme and Microbial Technology** 35 (2-3): 182-189.
5. Geckil H, Arman A, **Gencer S**, Ates B and Yilmaz HR (2004), *Vitreoscilla* hemoglobin renders *Enterobacter aerogenes* highly susceptible to heavy metals. **Biomaterials** 17 (6): 715-723.
6. Geckil H, Ates B, **Gencer S**, Uckun M, and Yilmaz I (2005), Membrane permeabilization of gram-negative bacteria with a potassium phosphate/hexane aqueous phase system for the release of L-asparaginase: an enzyme used in cancer therapy. **Process Biochemistry** 40 (2): 573-579.
7. Geckil H, **Gencer S**, Ates B, Ozer U, Uckun M, and Yilmaz I (2006), Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, L-asparaginase, by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnology Journal** 1: 203-208.
8. Ates B, **Gencer S**, Erenler SO, Uckun M, Ozer U, Yilmaz I, and Geckil H. Production of L-asparaginase, a chemotherapeutic enzyme, in bacteria expressing *Vitreoscilla* haemoglobin. **FEBS Journal**, (2006); 273: 139-139.
9. Kahraman H, **Gencer S**, Geckil H. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on L-lysine alpha-oxidase, a chemotherapeutic enzyme, from *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Journal**, (2006); 273: 139-140.
10. Gencer S, Sen G, Yazicioglu MBI, Dogusoy G. Noncanonical pathway stimulator Wnt5a is upregulated in gastric carcinoma. **FEBS Journal** (abstract), (2008); 275: 348-348.
11. Gencer S, Yazicioglu MBI, Dogusoy G. Expression of MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer. **FEBS Journal** (abstract), (2008); 275: 263-263.
12. Sen G, Gencer S, Yazicioglu MBI, Dogusoy G. Analysis of Wnt ligands and beta-catenin in gastric tumors. **FEBS Journal** (abstract), (2008); 275: 309-309.

ALDIĞI ÖDÜLLER

- Yüksek Lisans Bursu Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (2003-2004)
- Genç Araştırmacı Ödülü II. Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu (2004)
- Yayın Teşvik Ödülleri Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (2004-2006)
- Bilimsel Etkinliklere Katılım Bursu Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (2006)
- Doktora Bursu Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (2006-2009)

TOPLANTI, ABSTRAKTLAR ve TÜRKÇE YAYINLAR

1. Gencer S, Geckil H, Uckun M. (2004). *Vitreoscilla* hemoglobin geni klonlanmış bakterilerde antineoplastik L-asparajinaz enziminin sentezi. II. Klinik Biyokimya Kanser Sempozyumu (Bursa).
2. Geckil H, Ates B, Gencer S, Uckun M, and Yilmaz I. (2004). Gram-negatif bakterilerde L-asparajinaz salınımı için potasyum fosfat/heksan sulu faz sistemi ile membran permeabilizasyonu. II. Klinik Biyokimya Kanser Sempozyumu (Bursa).
3. Ateş B, Yılmaz İ, Geçkil H, Gencer S ve Uçkun M (2004). *Vitreoscilla* hemoglobin geni klonlanmış *Enterobacter aerogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da L-asparajinaz üretimi: kanser kemoterapisinde kullanılan önemli bir enzim. II. Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu (Bursa).
4. Gencer S, Geckil H, and Uckun M (2004). *Vitreoscilla* hemoglobin expressing *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* respond differently to carbon catabolite and oxygen repression for production of L-asparaginase: an enzyme used in cancer therapy. XVII. Biyoloji Kongresi (Adana).
5. Uckun M, Geckil H Gencer S (2004). *Vitreoscilla* hemoglobin geni klonlanmış *Enterobacter aerogenes*'in çoğalma ve antioksidant karakterleri. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi (Adana).
6. Kahraman H, Gencer S, Geckil H (2005). Bakteriyel hemoglobin geni klonlanmış *Pseudomonas aeruginosa* tarafından lizin oksidaz sentezi: önemli bir kanser kemoterapi ajanı. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Eskişehir).
7. Gencer S, Ates B, Geckil H, Yilmaz I (2005). Rekombinan bir oksijen alım sistemi taşıyan bakterilerde L-asparajinaz sentezinin karbon katabolit ve azotla regülasyonu. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Eskişehir).
8. Ates B, Gencer S, Erenler SO, Uckun M, Ozer M, Yilmaz I, and Geckil H. (2006) Production of L-asparaginase, a chemotherapeutic enzyme, by bacteria expressing *Vitreoscilla* hemoglobin. 31st FEBS Congress (Istanbul).
9. Kahraman H, Gencer S, and Geckil H. (2006) Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on L-lysine oxidase, a chemotherapeutic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. 31st FEBS Congress (Istanbul).
10. İleri Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri Uygulamalı Eğitim Kursu, TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü , 2006 (Gebze- Kocaeli).

11. RNA İnterferans (RNAi) Kursu, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, 2007 (Ankara)
12. Salih Gencer, Gürkan Şen, M. Burcu Irmak Yazıcıoğlu, M. Fatih Abasıyanık. (2008) *Helicobacter pylori* ile Enfekte Olmuş MKN-45 ve 23132/87 Hücre Soylarında β -Katenin, MMP-7 ve MMP-26 Genlerinin Ekspresyon Analizi, 2. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, (Uludağ-Bursa).
13. Gürkan Şen, Salih Gencer, M. Burcu Irmak Yazıcıoğlu, M. Fatih Abasıyanık.(2008), Frizzled 1, Frizzled 3 ve Frizzled 4 Genlerinin Mide Kanserindeki Ekspresyon Analizi, 2. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, (Uludağ-Bursa).
14. G. Dogusoy, N. Kepil, A.S. Demiröz, S. Gencer, M. Paksoy, A.k. Belli, M.B. Irmak-Yazicioglu. (2008), Gastrik Karsinomlarda MMP-26, MMP-7 ve β -Katenin Ekspresyonlarının Araştırılması, 2. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, (Uludağ-Bursa).
15. Salih Gencer, Gülen Doğusoy, Melih Paksoy, Ahmet Korkut Belli, Fatih Aydoğan, M. Burcu Irmak Yazıcıoğlu. (2008), Gastrik Kanserde MMP-7, MMP-26 ve β -Katenin Genlerinin Ekspresyon Analizi, 19. Biyoloji Kongresi (Trabzon).
16. S. Gencer, G. Dogusoy, A.K. Belli, M.B. Irmak Yazicioglu. (2008), "Expression of MMP-2 and MMP-9 in Gastric Cancer", 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, (Atina / Yunanistan).
17. Gencer S, Sen G, Yazicioglu MBI, Dogusoy G. (2008), "Noncanonical pathway stimulator Wnt5a is upregulated in gastric carcinoma", 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, (Atina / Yunanistan).
18. Sen G, Gencer S, Yazicioglu MBI, Dogusoy G. (2008), "Analysis of Wnt ligands and beta- catenin in gastric tumors", 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, (Atina / Yunanistan).

VERDİĞİ SEMİNERLER

- Kanser kemoterapisinde kullanılan bakteriyel orijinli bir enzim: L-asparajinaz (28 Ocak 2004)
- Genleri susturan teknoloji: RNA müdahalesi (RNA interference), (25 Ocak 2006)
- Aynı genlere sahip bireylerin farklı karakterleri arkasındaki gizli güç: EPIGENETİK (12 Temmuz 2006)

GÖREV ALDIĞI PROJELER

- Geçkil H., Aydın S., Erenler Ş.Ö., Gencer S., ve Uçkun M. (2005-2006) "L-asparaginaz geninin (*ansB*) farklı Gram-negatif bakterilere klonlanması, izolasyonu ve L-asparaginaz üretimi: kanser kemoterapisinde kullanılan önemli bir enzim". İleri Araştırma Projesi, Devlet Planlama Teşkilatı (DPT 2003/K120610), *Araştırmacı*, Proje bütçesi: 70,000 YTL
- Geçkil, H., Gencer, S., Erenler, Ş.O., Kahraman, H. ve Ateş N.C. (2002-2004) "Vitreoscilla hemoglobin geni klonlanmış *Enterobacter aerogenes*: bazı endüstriyel uygulamalar", TÜBİTAK Projesi, Proje no: TBAG2267(102T197), *Araştırmacı*, Proje bütçesi: 65,000 TL
- Meliha Burcu Irmak, Gülen B. Doğusoy, Melih Paksoy, Ahmet K. Belli, Mustafa Fatih Abasıyanık, Salih Gencer, (2006-2009) "Oksidatif stresin mide kanseri üzerine etkisi", TÜBİTAK Projesi, Proje no: 105S352 (SBAG-K-110), *Araştırmacı*, Proje bütçesi: 227,400 YTL