

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KANSER HASTALARINDA  
KAZEİN ZİMOGRAFI VE  
IN SITU KAZEİN ZİMOGRAFI YÖNTEMİ İLE  
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-7  
AKTİVİTESİNİN VE LOKALİZASYONUNUN  
BELİRLENMESİ**

**DİDEM KELEŞ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İZMİR-2009**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KANSER HASTALARINDA  
KAZEİN ZİMOGRAFI VE  
IN SITU KAZEİN ZİMOGRAFI YÖNTEMİ İLE  
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-7  
AKTİVİTESİNİN VE LOKALİZASYONUNUN  
BELİRLENMESİ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DİDEM KELEŞ**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Gülgün OKTAY

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından  
2007.KB.SAG.040 sayı ile desteklenmiştir.)

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılması aşamalarında beni daima destekleyen, engin deneyim ve bilgisinden yararlanmaktan mutluluk duyduğum, eğitimimin her adımında ilgi, sevgi ve yardımlarını benden esirgemeyen, değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülgün OKTAY'a,

Desteğini ve güler yüzünü asla esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Banu ÖNVURAL'a ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca desteğini ve ilgisini her zaman hissettiğim Sağlık Bilimleri Enstitü Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Gül GÜNER'e,

Doku örneklerinin düzenli ve dikkatli bir şekilde toplanmasını sağlayan Genel Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Cem TERZİ ve Uzm. Dr. Emre CANDAY'a, hem doku toplanması aşamasında hem de klinikopatolojik verilerin düzenlenmesi aşamasında elinden gelen her yardımı sağlayan Dr. Baha ARSLAN'a

İmmünohistokimyasal çalışmalarda, değerli bilgi ve deneyimleriyle bana her konuda yardımcı olan ve çalışmalarına kazandırdığı büyük katkılarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sevgili hocam Doc. Dr. Işıl TEKMEN ve arkadaşım Ezgi DURSUN'a,

Floresan mikroskobundaki görüntülerin alınmasında engin bilgisini ve değerli emeğini bizimle paylaştığı için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Doc. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ'e,

Bitmek bilmez araştırmalarım ve laboratuvar çalışmalarım her zaman yeniliklerle karşıma çıkan ve gece gündüz emek ve bilgilerini paylaşan canım arkadaşlarım Duygu ÜNÜVAR PURCU'a ve Ceren ŞENKAL'a,

Her türlü laboratuvar imkanı sağlayan ARLAB çalışanlarına,

Bu zor yolda her zaman bana destek olan ve dostluğunu esirgemeyen yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan canım kadar sevdiğim annem, babam ve kardeşim başta olmak üzere, biraz geniş ama bir o kadar sevgi dolu olan, MARDİN ve İZMİR'i bir noktada buluşturan tüm aileme teşekkür ederim. İyi ki varsınız...

# İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMALAR	vii
ÖZET	x
ABSTRACT	xii

## **1. GİRİŞ VE AMAÇ** **1**

---

## **2. GENEL BİLGİLER** **3**

---

<b>2.1 KOLOREKTAL KANSER</b>	<b>3</b>
2.1.1 KALIN BARSAK ANATOMİSİ	3
2.1.2 KOLON VE REKTUM HISTOLOJİSİ	5
2.1.3 KOLON VE REKTUM PATOGENEZİ	6
2.1.3.1 Adenomatöz Polipler (Adenomlar)	7
2.1.4 GENETİK DEĞİŞİKLİKLER	8
2.1.4.1 FAP ve HNPCC (Lynch Sendromu)	8
2.1.5 KOLOREKTAL KANSER EPİDEMİYOLOJİSİ	9
2.1.6 KOLOREKTAL KANSERİN EVRELENDİRİLMESİ	11
<b>2.2 EKSTRASELÜLER MATRİKS VE YAPISI</b>	<b>13</b>
<b>2.3 MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR</b>	<b>14</b>
2.3.1 MATRİKS METALLOPROTEİNAZ AİLESİ	14
2.3.2 MMP'LERİN DOMAIN YAPISI	18
2.3.3 MMP'LERİN REGÜLASYONU	20
2.3.3.1 MMP Gen Ekspresyonunun Regülasyonu	21
2.3.3.2 Proenzim Aktivasyonu (Sistein Şalter Mekanizması)	22
2.3.3.2.1 Allosterik Aktivasyon	23
2.3.3.2.2 Protein Konvertazlar	24
2.3.3.2.3 MMP'ler Tarafından proMMP'lerin Aktivasyonu	24
2.3.3.2.4 proMMP'lerin Oksidatif Aktivasyonu	25
2.3.3.3 Kompartmanlaşma	26
2.3.3.4 MMP'lerin İnaktivasyonu	27
2.3.3.4.1 Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri	27
2.3.3.4.2 Diğer Doğal İnhibitörler	28
2.3.3.4.3 Oksidatif İnaktivasyon	28
2.3.3.4.4 Endositoz	29
2.3.4 MMP'LERİN KANSERE KATKILARI	29
2.3.5 KOLOREKTAL KANSERDE MMP'LER	31
<b>2.4 MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-7 (MATRİLİZİN)</b>	<b>33</b>
2.4.1 KANSERDE MMP-7'NİN ÖZELLİKLERİ	34
2.4.1.1 Kanserde MMP-7'in Dağılımı	34

2.4.1.2	Kanser İnvazyonunda MMP-7'in Rolü	35
2.4.1.3	Kanser Büyümesinde MMP-7'in Rolü	36
2.4.1.4	MMP-7'in Apoptozdaki Rolü	37
2.4.1.5	Anjiyogenezde MMP-7'in Rolü	37
2.4.2	MMP-7'İN KKK'DEKİ ETKİSİ	39
<b>3.</b>	<b>MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERYAL</b>	<b>40</b>
3.1.1	KOLON VE REKTUM DOKU MATERYALLERİ	40
3.1.2	HASTA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI	40
<b>3.2</b>	<b>YÖNTEMLER</b>	<b>45</b>
3.2.1	POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)	45
3.2.1.1	RNA İzolasyonu	47
3.2.1.2	RNA'nın % 1,2 Formaldehit Agaroz Jelde Görüntülenmesi	49
3.2.1.3	Komplementer DNA (cDNA) sentezi	51
3.2.1.4	Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	53
3.2.2	KAZEİN ZİMOGRAFI VE ELISA ANALİZİ	55
3.2.2.1	Doku Homojenizasyonu	55
3.2.2.2	Protein Tayini	56
3.2.2.3	Kazein Zimografi	57
3.2.2.4	ELISA Yöntemi	62
3.2.3	İMMÜNOHİSTOKİMYA (IHC)	64
3.2.4	İN SİTU KAZEİN ZİMOGRAFI	67
<b>3.3</b>	<b>İSTATİSTİKSEL ANALİZ</b>	<b>68</b>
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>REAL TIME PCR SONUÇLARI</b>	<b>69</b>
4.1.1	RNA ÖRNEKLERİNİN %1,2 FORMALDEHİT AGAROS JELDE GÖRÜNTÜLENMESİ.	69
4.1.2	MMP-7 MRNA EKSPRESYON ANALİZİ	69
<b>4.2</b>	<b>KAZEİN ZİMOGRAFI VE ELISA SONUÇLARI</b>	<b>76</b>
4.2.1	PROTEİN TAYİNİ	76
4.2.2	KAZEİN ZİMOGRAFI	76
4.2.3	ELISA	78
<b>4.3</b>	<b>İMMÜNOHİSTOKİMYA SONUÇLARI</b>	<b>82</b>
<b>4.4</b>	<b>İN SİTU KAZEİN ZİMOGRAFI SONUÇLARI</b>	<b>86</b>
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>88</b>
<b>5.1</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>96</b>

## **TABLO LİSTESİ**

Tablo 1. Kolorektal kanserin risk faktörleri .....	10
Tablo 2. Dukas evrelendirme sistemi.....	11
Tablo 3. TNM evrelendirme sistemi.....	11
Tablo 4. Kolorektal karsinomların Dukas ve TNM evrelendirme sistemi.....	12
Tablo 5. Proteazların sınıflandırılması.....	14
Tablo 6. MMP'ler ve substratları.....	16
Tablo 7. MMP-7'nin biyokimyasal süreçleri .....	34
Tablo 8. PCR ve IHC denemelerinde kullanılan kolorektal kanserli hastaların klinikopatolojik verileri .....	41
Tablo 9. ELISA analizinde kullanılan kolorektal kanserli hastaların klinikopatolojik verileri	43
Tablo 10. RNA izolasyonunda kullanılan cihaz ve malzemeler .....	47
Tablo 11. %1,2 Formaldehit agaroz jelde hazırlanması ve görüntülenmesinde kullanılan cihaz ve malzemeler.....	49
Tablo 12. % 1,2 Formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler .....	51
Tablo 13. cDNA sentezinde kullanılan cihaz ve malzemeler .....	52
Tablo 14. RT mix hazırlama.....	52
Tablo 15. Real Time PCR denemesinde kullanılan cihaz ve malzemeler .....	54
Tablo 16. Master mix hazırlama .....	54
Tablo 17. Homojenizasyon için kullanılan cihaz ve kimyasallar .....	55
Tablo 18. Doku homojenizasyonunda kullanılan çözeltiler .....	55
Tablo 19. Protein tayininde kullanılan cihaz ve malzemeler .....	56
Tablo 20. Kazein zimografide kullanılan cihaz ve malzemeler .....	58
Tablo 21. Kazein zimografide poliakrilamid jellerin hazırlanması .....	59
Tablo 22. Kazein zimografi yönteminde kullanılan çözeltiler .....	61
Tablo 23. ELISA yönteminde kullanılan cihaz ve malzemeler.....	62
Tablo 24. IHC'de kullanılan cihaz ve malzemeler .....	64
Tablo 25. ISZ'de kullanılan cihaz ve malzemeler .....	67
Tablo 26. KRK dokularında $\beta$ -aktin ve MMP-7 mRNA ekspresyon değerleri.....	71
Tablo 27. Kolorektal tümör ve normal dokularında median rölatif MMP-7 ekspresyon verileri .....	72

Tablo 28. Kolorektal tümör dokularındaki rölatif MMP-7 ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik veriler arasındaki korelasyon .....	73
Tablo 29. Kolorektal tümör dokularında, yaş ve rölatif MMP-7 ekspresyon verilerinin alt grup karşılaştırması.....	73
Tablo 30. Kolorektal tümör dokularında, tümör evresi ve rölatif MMP-7 ekspresyon verilerinin alt grup karşılaştırması .....	74
Tablo 31. Kolorektal tümör dokularında, patolojik evre ve rölatif MMP-7 ekspresyon verilerinin alt grup karşılaştırması .....	74
Tablo 32. KKK dokularında MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri.....	78
Tablo 33. Kolorektal tümör ve normal dokularında ortalama MMP-7 protein düzeyleri.....	80
Tablo 34. Kolorektal tümör dokularındaki MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri ile perinöral invazyon arasındaki korelasyon.....	81
Tablo 35. Kolorektal tümör dokularında, perinöral invazyon ve MMP-7 protein düzeylerinin alt grup karşılaştırması .....	81
Tablo 36. Kolorektal tümör dokusunun immunreaktivite pozitifliğini değerlendirmede kullanılan skorlama yüzdesi .....	82
Tablo 37. Kolorektal kanserde MMP-7 ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalar. ....	91

## **SEKİL LİSTESİ**

Şekil 1. Kalın barsağın anatomisi .....	4
Şekil 2. Kolorektumun histolojisi .....	6
Şekil 3. KRK'nın Dukes evrelendirilme sistemi. ....	13
Şekil 4. MMP'lerin yapısal domainleri ve domain yapılarına göre sınıflandırılması .....	19
Şekil 5. proMMP'lerin aktivasyon mekanizması. ....	22
Şekil 6. MMP aktivitesinin allosterik regülasyonu.....	24
Şekil 7. KRK progresyonunda MMP'lerin fonksiyonu. ....	32
Şekil 8. E-kadherin adherans bağlantıların MMP-7 tarafından parçlanması .....	36
Şekil 9. PCR döngü basamakları .....	46
Şekil 10. % 1,2 Formaldehit agaroz jel hazırlama. ....	50
Şekil 11. İzole edilen RNA örneklerinin jele yüklenmesi.....	50
Şekil 12. cDNA sentezi akım şeması.....	51
Şekil 13. SYBR Green etki mekanizması .....	53
Şekil 14. SDS-PAGE örnek yükleme şeması.....	60
Şekil 15. ELISA çalışma prensibi.....	62
Şekil 16. IHC akış şeması .....	64
Şekil 17. ISZ akış şeması .....	68
Şekil 18. RNA jel görüntüsü .....	69
Şekil 19. Melting Curve Analizi.....	70
Şekil 20. Absolute Quantification Analizi .....	70
Şekil 21. Kolorektal tümör ve normal dokularında rölatif MMP-7 ekspresyon düzeylerinin median değerleri .....	72
Şekil 22. Kolorektal tümör dokularında, yaş alt grubunda rölatif MMP-7 ekspresyon düzeylerinin median değerleri .....	73
Şekil 23. Kolorektal tümör dokularında, tümör evresi alt grubunda rölatif MMP-7 ekspresyon düzeylerinin median değerleri .....	74
Şekil 24. Kolorektal tümör dokularında, patolojik evre alt grubunda rölatif MMP-7 ekspresyon düzeylerinin median değerleri.....	75
Şekil 25. BSA standart kalibrasyon eğrisi.....	76
Şekil 26. Kolorektal tümör ve normal dokularında kazein zimogram mini jel görüntüleri .....	77
Şekil 27. Kolorektal tümör ve normal dokularında kazein zimogram büyük jel görüntüleri ..	77



Şekil 28. Total MMP-7 standart kalibrasyon eğrisi.....	78
Şekil 29. Kolorektal tümör ve normal dokularında MMP-7 protein düzeylerinin ortalama değerleri.....	80
Şekil 30. Kolorektal tümör dokularında, perinöral invazyon grubunda MMP-7 protein düzeylerinin median değerleri .....	81
Şekil 31. Kolorektal tümör ve normal dokusunun hematoksilin eozin boyama görüntüleri...	83
Şekil 32. Normal dokunun immün boyama (MMP-7 + hemotoksilen) görüntüleri. ....	84
Şekil 33. Kolorektal tümör dokusunun immün boyama (MMP-7 + hemotoksilen) görüntüleri .....	85
Şekil 34. Kolorektal tümör ve normal dokuların ISZ görüntüleri .....	86
Şekil 35. Kolorektal tümör ve normal dokuların ISZ görüntüleri .....	87

## **KISALTMALAR**

**KRK:** Kolorektal Kanser

**APC:** Adenomatöz Polipozis Koli

**MMR:** Hatalı Eşleşme Tamiri

**p53:** Tümör Protein 53

**MCC:** Mutated in Colorectal Cancer

**DCC:** Deleted in Colorectal Cancer

**DPC4:** Deleted in Pancreatic Cancer

**nm23:** Nonmetastatik Gen 23

**ESM:** Ekstraselüler Matriks

**MMP:** Matriks Metalloproteinaz

**MT-MMP:** Membran-Tip Matriks Metalloproteinaz

**SEER:** Surveillance, Epidemiology and End Results

**DNA:** Deoksiribonükleik Asit

**FAP:** Ailesel Adenomatöz Polipozis

**HNPCC:** Kalıtsal Non-Polipozis Kolon Kanseri

**NSAID:** Nonsteroidal Anti-İnflamatuvar İlaçlar

**$\alpha$ 1-PI:**  $\alpha$ 1-Proteinaz İnhibitorü

**IGFBP:** İnsulin-Benzeri Büyüme Hormonu Bağlama Proteini

**IL-1:** İnterlökin-1

**TNF:** Tümör Nekroz Faktör

**TIMP:** Metalloproteinazların Doku İnhibitorü

**AP-1:** Aktivatör protein 1

**PEA3:** Polioma Enhancer A3

**Sp-1:** Specificity Protein 1

**TCF-4:** T Hücre Faktörü -Transkripsiyon Faktör 4

**NF- $\kappa$ B:** Nükleer Faktör Kappa B

**IL:** İnterlökinler

**EGF:** Epidermal Büyüme Faktörü

**KGF:** Keratinosit Büyüme Faktörü

**NGF:** Sinir Büyüme Faktörü

**HGF:** Hepatosit Büyüme Faktörü

**bFGF:** Temel Fibroblast Büyüme Faktörü  
**VEGF:** Vasküler Endotel Büyüme Faktörü  
**PDGF:** Platelet Türevi Büyüme Faktörü  
**MAPK:** Mitojen Aktive Eden Protein Kinaz  
**FAK:** Fokal Adhezyon Kinazı  
**LEF:** Lymphoid Enhancing Factor  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Hidrojen Peroksit  
**HOCl:** Hipoklorik Asit  
**ADAM:** Bir Disintegrin ve Metalloproteinaz  
**RECK:** Reversion-İnducing-Cystein-Rich Protein with Kazal Motifs  
**CT-PCPE:** A C-Terminal Fragment of Procollagen C-Terminal Proteinase Enhancer  
**NMR:** Nükleer Manyetik Rezonans  
**LRP:** Lipoprotein Reseptör-İlişkili Protein  
**TGF- $\beta$ :** Transforme Eden Büyüme Faktörü  
**IGF:** İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü  
**FGFR:** FGF Reseptörü  
**FasL:** Fas Ligandı  
**RNA:** Ribonükleik asit  
**mRNA:** Mesajcı RNA  
**HB-EGF:** Heparin-Bağlama Epidermal Büyüme Faktörü  
**RANKL:** Nükleer Faktör-Kappa B Ligandının Reseptör Aktivatörü  
**ErbB4:** V-Erb-A Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 4  
**sFasL:** Çözünür FasL  
**mFasL:** Membran-Bağlı FasL  
**TACE:** TNF- $\alpha$  Dönüştüren Enzim  
**VEGFR:** VEGF Reseptörü  
**GSK-3 $\beta$ :** Glikojen Sentaz Kinaz 3 $\beta$   
**Real Time PCR:** Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Real Time Polimerase Chain Reaction  
**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay -Enzim-Bağlı Immünosorbent Analizi  
**IHC:** İmmünohistokimya  
**ISZ:** In Situ Zimografi

**PAGE:** Poliakrilamid Jel Elektroforezi  
**ISH:** In Situ Hibridizasyon  
**dNTP:** Deoksinükleosid Trifosfat  
**cDNA:** Komplementer DNA  
**HRP:** Horseradish Peroxidase - Yabanturbu Peroksidazi  
**TMB:** Tetrametilbenzidin  
**FA:** Formaldehit  
**BCA:** Bikinkoninik Asit  
**BSA:** Sığır Serum Albumini  
**SDS:** Sodyum Dodesil Sülfat  
**TEMED:** N, N, N', N'-Tetrametiletildiamid  
**APS:** Amonyumpersülfat  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline  
**HE:** Hemotoksilen Eozin

**ÖZET**  
**KOLOREKTAL KANSER HASTALARINDA**  
**KAZEİN ZİMOGRAFI VE IN SİTU KAZEİN ZİMOGRAFI YÖNTEMİ İLE**  
**MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-7 AKTİVİTESİNİN VE**  
**LOKALİZASYONUNUN BELİRLENMESİ**

**Didem KELEŞ**  
**Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
**35340 İnciraltı-İzmir**

**Giriş:** %80’i kolonda, %20’si rektumda meydana gelen kolorektal kanser (KRK); başta endüstriyel batı dünyası olmak üzere dünya genelinde akciğer, prostat ve meme kanserinden sonra ölüme neden en büyük kanserdir. Yapılan pek çok çalışmada Matriks metalloproteinaz-7’nin (MMP-7) diğer MMP’lere göre tümör progresyonunda daha önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir.

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı; KRK hastalarından alınan tümörlü ve eşlenik normal doku örneklerinde MMP-7 ekspresyon (protein ve mRNA) düzeylerini ve MMP-7’nin aktif-latent formlarını incelemek ve MMP-7’nin lokal endojen aktivasyonunu In Situ Kazein Zimografi yöntemiyle gösterebilmektir.

**Materyal ve Yöntemler:** Çalışma, 31 KRK hastasından alınan kolorektal tümör ve eşlenik normal dokularında gerçekleştirildi. MMP-7 mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ve ELISA teknikleriyle, MMP-7 lokalizasyonu ise immünohistokimyasal boyama ve görüntüleme analizi ile belirlendi. MMP-7’nin proteolitik aktivitesini belirlemek amacıyla Kazein zimografi, lokal kazeinolitik aktiviteyi değerlendirmek amacıyla in situ kazein zimografi tekniği kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlar, tümörün klinikopatolojik değişkenleri ile (cinsiyet, yaş, tümör yerleşimi, tümör boyutu, tümör diferansiyasyonu, histolojik tip, uzak metastaz, T-evre, N-evre, patolojik evre, perinöral invazyon, lenfatik invazyon, vasküler invazyon) ayrı ayrı karşılaştırıldı.

**Bulgular:** MMP-7 mRNA ekspresyonu tümöral dokuda normal dokulara oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ( $p = 0,001$ ). Ayrıca mRNA ekspresyon düzeyleri, T evre ve P evre ile pozitif korelasyon ( $r = 0,687$   $p = 0,005$  ve  $r = 0,536$   $p = 0,04$ ), yaş ile negatif korelasyon ( $r = -0,588$   $p = 0,021$ ) gösterdi. Buna karşılık tümör ve normal dokularda MMP-7

protein ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir ( $p = 0,636$ ). MMP-7 protein düzeyleri ve klinikopatolojik değişkenler arasındaki ilişki incelendiğinde perinöral invazyon ile arasında pozitif korelasyon belirlenmiştir ( $r = 0,462$   $p = 0,010$ ). İmmünohistokimyasal boyama sonucu, tümör dokularında hücre sitoplazması ve membranında boyama görülürken, normal dokularda herhangi bir MMP-7 boyaması görülmedi. Ek olarak, tümör dokularında normal dokulara göre daha yüksek kazeinolitik aktivite görüldü ve bu aktivitenin epitel bölgede daha yoğun olduğu belirlendi.

**Sonuç:** Elde edilen sonuçlar MMP-7'nin kolorektal kanser gelişimde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bundan dolayı, kolorektal kanserde yeni kemopreventif terapi geliştirilmesinde MMP-7'nin hedef molekül olarak seçilebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kolorektal Kanser, Matriks Metalloproteinaz-7, Kazein Zimografi, In Situ Kazein Zimografi.

**ABSTRACT**  
**DETERMINATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-7 ACTIVITY  
AND LOCALIZATION WITH CASEIN ZYMOGRAPHY AND IN SITU CASEIN  
ZYMOGRAPHY IN COLORECTAL CANCER**

**Didem KELEŞ**  
**Dokuz Eylül University Health Sciences Institute**  
**35340 İnciraltı-İzmir-TURKEY**

**Background:** Colorectal cancer (CRC) that occurs at the percent in 80% of colon and 20% in rectum is now the most common cause of cancer related deaths after lung, prostate and breast cancer in Western world. There is increasing evidence to indicate that matrix metalloproteinase (MMP)-7 plays a more important role in tumor progression than other MMPs.

**Aim:** The aim of this study is to analyze MMP-7 expression (protein and mRNA) levels and active-latent forms of MMP-7 in tumor and paired normal tissue samples that are taken from colorectal cancer patients and to develop In Situ Casein Zymography technique for detection of local endogen activation of MMP-7.

**Material and Methods:** Thirty-one colorectal tumor and paired normal tissue samples were taken from patients with CRC. MMP-7 mRNA and protein expression levels were detected by Real Time PCR and ELISA whereas MMP-7 localization was examined by immunohistochemical staining and image analysis. Casein Zymography and In Situ Casein Zymography methods were used to detect proteolytic activity of MMP-7 and to estimate local caseinolytic activity, respectively. The results were compared with clinicopathological variables (such as gender, age, tumor localization, tumor size, tumor differentiation, histological type, distant metastasis, T-stage, N-stage, pathological stage, perineural invasion and vascular invasion).

**Results:** MMP-7 mRNA expressions in tumor tissues were statistically higher than paired normal tissues ( $p = 0.001$ ). Furthermore mRNA expression levels were positively correlated with T stage and P stage ( $r = 0.687$   $p = 0.005$  and  $r = 0.536$   $p = 0.04$ ) and negatively correlated with age ( $r = -0.588$   $p = 0.021$ ). In the results of immunohistochemical staining, it was observed that there were cytoplasm and cell membrane staining in tumor tissues whereas

there was no MMP-7 staining in paired normal tissues. Unlike there were no significant differences between tumor and paired normal tissues in MMP-7 protein expression levels ( $p = 0,636$ ). When it was analyzed the correlations between MMP-7 protein expression levels of tumor tissues and clinicopathological variables, it was determined that protein expression levels positively correlated with perineural invasion ( $r = 0.462$ ,  $p = 0.010$ ). In addition, it was found that caseinolytic activity, localize epithelium region, was higher in tumor tissues than the paired normal tissues.

**Conclusions:** Our results suggest that MMP-7 plays an important role in the progression of human colorectal cancer. Therefore MMP-7 may be selected as a target molecule in the use of new chemopreventive therapy in colorectal cancer.

**Key Words:** Colorectal Cancer, Matrix Metalloproteinase-7, Casein Zymography, In Situ Casein Zymography.



## BİRİNCİ BÖLÜM

### 1. GİRİŞ ve AMAC

Kolorektal kanser (KRK); akciğer, meme ve prostat kanserlerinden sonra en sık görülen dördüncü kanser türüdür (1). Kanserden ölümler sıralamasında ise KRK nedeniyle ölümler üçüncü sırada yer almaktadır (2). KRK'nın normal barsak epitelinden invaziv karsinomlara dönüşümü, 7-12 yıl sürmektedir. Erken tarama tekniklerinin geliştirilmesiyle birlikte günümüzde bu hastalık tedavi edilebilmektedir. Ancak KRK'dan ölen hastaların çoğu bu metastatik hastalığa yenik düşmektedir. Dünyada her yıl 900.000 yeni KRK teşhisi konmakta ve yaklaşık 500.000 kişi bu hastalıktan ölmektedir. Bu olguların, % 9,4'ünü erkekler, % 10,1'ini kadınlar temsil etmektedir (3).

Normal epitelden karsinom oluşumunda, birçok farklı genetik değişiklikler rol almaktadır. Sporadik kolon kanserinde, ailesel formlarda olduğu gibi, adenomatöz polipozis koli (APC) ve hatalı eşleşme tamir (MMR) genlerinde mutasyonlar görülmektedir (4). Ayrıca, K-ras (5) ve  $\beta$ -katenin gibi onkojenlerde ve p53 (tümör protein 53) (6) MCC (mutated in colorectal cancer) (7) DCC (deleted in colorectal cancer) (8), DPC4 (deleted in pancreatic cancer) ve nm23 (nonmetastatik gen 23) (9) gibi tümör baskılayıcı genlerde de mutasyonlar ve heterozigosite kaybı belirlenmiştir.

Kolorektal kanser oluşumunda genetik değişikliklerin yanı sıra, matriks metalloproteinazları (MMP) da kapsayan birçok gen upregüle edilmektedir. MMP'ler çeşitli ekstraselüler matriks (ESM) bileşenlerini yıkıma uğratabilen çinko bağımlı proteinaz ailesinin bir üyesidir. MMP'lerin aktivitesi temel olarak üç adımda regüle edilmektedir; transkripsiyonel düzeyde regülasyon, enzimin inaktif zimojen formunun aktivasyonu ve kendi doku inhibitörleri tarafından inhibisyonu (10). MMP'ler; yapı, substrat spesifikliğı ve hücrel lokalizasyonlarına göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelizinler, membran-tip MMP'ler (MT-MMP), matrilizinler, makrofaj elastaz ve diğer MMP'ler olmak üzere 7 sınıfa ayrılırlar (11).

Matriks metalloproteinaz-7 (MMP-7); matrilizinler sınıfında yer alan, bazı tümör hücreleri tarafından aşırı eksprese edilen ve tümörün metastatik potansiyelini arttırdığı düşünülen MMP ailesinin bir üyesidir. MMP-7; entaktin, laminin, jelatin, elastin, tip IV kollajen, fibronektin, agrekan ve proteoglikanları içeren ESM bileşiklerine karşı genel bir substrat spesifikliğine sahiptir (12).

Bu çalışmada, KKK'lı hastalardan alınan tümörlü ve eşlenik normal mukoza doku örneklerinde, "Real Time PCR (Real Time Polimerase Chain Reaction- Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)" ve ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- Enzim-Bağlı Immünosorbent Analizi) tekniği ile MMP-7'nin mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin ve "İmmünohistokimya" tekniği ile protein lokalizasyonunun belirlenmesi planlandı. Ayrıca aktif ve latent MMP-7 düzeylerini belirlemek için "Kazein Zimografi" yönteminin geliştirilmesi ve aktif MMP-7 lokalizasyonunun "In Situ Kazein Zimografi" yöntemiyle gösterilmesi amaçlandı. Buna ek olarak, elde edilen sonuçların tümörün klinikopatolojik değişkenleri ile (cinsiyet, yaş, tümör yerleşimi, tümör boyutu, tümör diferansiyasyonu, histolojik tip, uzak metastaz, T evre, N evre, patolojik evre, perinöral invazyon, lenfatik invazyon, venöz invazyon) ayrı ayrı karşılaştırılması hedeflendi.

## İKİNCİ BÖLÜM

### 2. GENEL BİLGİLER

#### 2.1 KOLOREKTAL KANSER

% 80'i kolonda, % 20'si rektumda meydana gelen kolorektal kanser (KRK); başta endüstriyel batı dünyası (özellikle ABD, Avustralya, Yeni Zelanda) olmak üzere dünya genelinde akciğer, prostat ve meme kanserinden sonra en sık görülen dördüncü ve ölüme neden olan üçüncü büyük kanserdir. Yaşam tarzının değiştirilmesi ve etkili müdahale sonucu batı ülkelerinde KRK insidansı düşmektedir, ancak Çin gibi yeni gelişmekte olan ülkelerde, ekonominin ilerlemesi ve eski batı-tarzi yaşama adaptasyon nedeniyle bu ülkelerde KRK insidansı artış göstermektedir.

Çevresel ve genetik faktörler, kolorektal karsinogenezin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Son yirmi yıl içerisinde diğer tümörlere oranla KRK'nın moleküler mekanizması daha iyi anlaşılmuş olmasına rağmen, özellikle ileri evre KRK prognozu henüz aydınlatılamamıştır. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) programının veritabanı analizlerine göre, KRK tanısı alan hastalarda erken tanı ve tedaviye bağlı olarak; 5 yıllık sağ kalım oranı, 1980'lerde % 56,5'ten, 1990'larda % 63,2'e yükselmiştir (13). Bu artışın temel nedeni, KRK tanısının hastalığın erken evresinde konulmasıyla ilişkilidir. Ancak ne yazık ki, KRK hastalarının sadece % 10'unda erken teşhis konulabilmektedir (14).

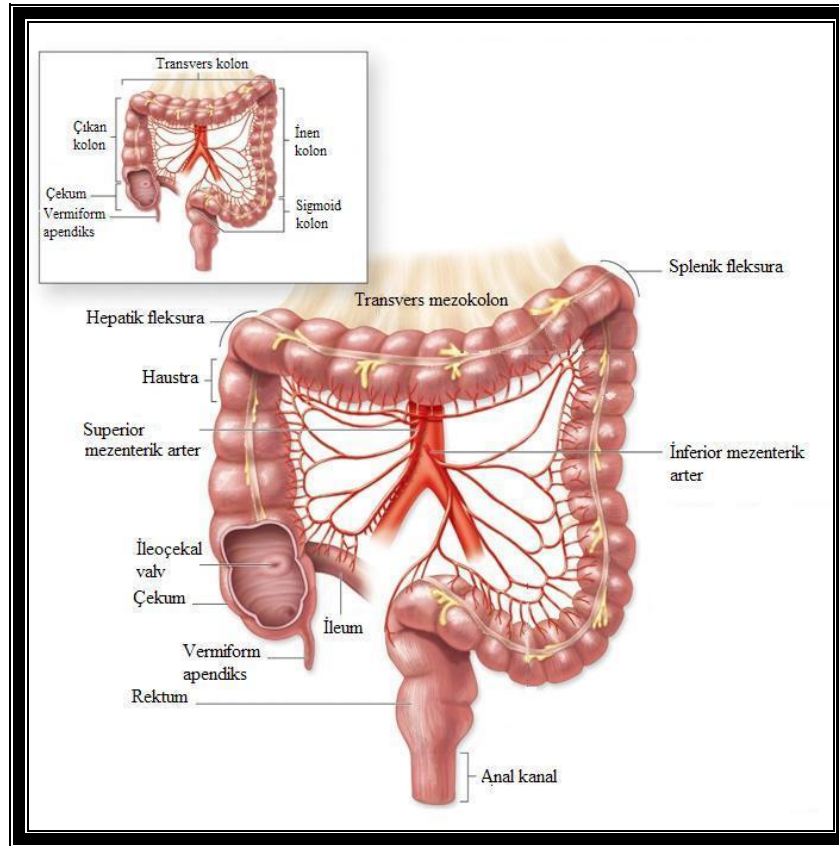
On yıl önce, tümör lokasyonu temel alınarak (splenik fleksuraya yakın veya uzak olmasına göre) KRK iki ayrı gruba bölünmüştür (15). Kanser bu iki anatomik bölümü, moleküler genetik metabolik yolu bakımından farklı bir predominans göstermektedir. Bu bilginin ardından "KRK'nın iki formu" hipotezi sayısız çalışmalarla desteklenmiştir (16). Günümüzde rektal kanser, genellikle kolon kanseri ile birlikte tartışılmaktadır ve bunun için "kolorektal kanser" terimi kullanılmaktadır.

##### 2.1.1 Kalın Barsak Anatomisi

İnce barsak ile anüs arasında yer alan kalın barsak; yaklaşık 1,5 metre uzunluğunda olup, büyük oranda su ve vitaminlerin (özellikle K vitamini, B5 vitamini ve biyotin) geri emiliminden ve feçes oluşumundan sorumludur. Kalın barsak; çekum, kolon, rektum ve anal kanal olmak üzere dört temel bölüme ayrılır. Mezokolon adı verilen abdomenin viseral periton uzantılarıyla abdomenin posterior duvarına tutunmaktadır.

İnce barsağın ileumundan, kalın barsağın çekum bölgesine açılan mukoz membrana ileoçekal valv adı verilir. İnce barsaktan kalın barsağa ileal materyallerin geçişi, bu valv aracılığıyla olmaktadır. Çekum, ileoçekal valvın hemen ardından gelir ve bir ucu kapalı diğer ucu açık olan iki kola ayrılır. Birinci kol, vermiform apendiksine bağlandığı bir ucu kapalı olan koldur, diğer kol ise kolona açılır.

Kolon, haustra adı verilen ardışık keselerin oluşturduğu bir tüpe benzerdir. Memelilerde kolon 4 bölümden oluşmaktadır: çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon. Çekumdan splenik fleksuraya (transvers ve inen kolonun bağlantı noktası) kadar olan kısma proksimal kolon (sağ kolon), geri kalan kısma ise distal kolon (sol kolon) adı verilir. Suyun ve vitaminlerin büyük bir kısmı çekum ve çıkan kolonda geri emilmektedir. Sigmoid kolon, gastrointestinal sistemin son kısmı olan 13-15 cm uzunluğundaki rektuma bağlıdır. Proksimal kolon, superior mezenterik arterden beslenirken, inferior mezenterik arter, distal kolon ve rektumu desteklemektedir (17) (Şekil 1).



Şekil 1. Kalın barsağın anatomisi (18)

## 2.1.2 Kolon ve Rektum Histolojisi

Kolon ve rektum duvarı 3 temel tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2);

### 1. Mukoza

- a) Epitel
- b) Lamina propria
- c) Muskularis mukoza
- d) Submukoza

### 2. Kas tabakası

- a) Sirküler kas tabakası
- b) Longitudinal kas tabakası

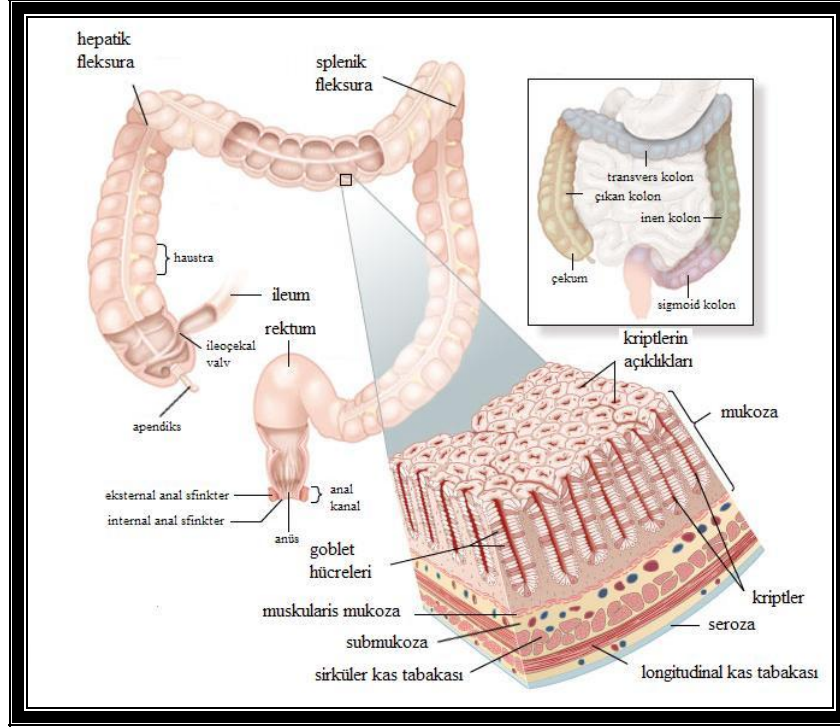
### 3. Seroza

Kolon mukozasında, ince barsaktaki gibi villuslar bulunmamaktadır, bunun yerine lümene doğru uzanan kolorektal kriptler (Lieberkühn kriptaları) adı verilen bezler bulunmaktadır. Kolonik epitel yüzeyi, tek tabakalı kolon hücreleri kaplamaktadır ve temel olarak iki hücre türünden oluşmaktadır. Bunlar; iyon ve su emiliminden sorumlu olan absorptif hücreler ve müsin sentezleyen ve depolayan goblet hücreleridir. Özellikle proksimal kolonda, absorptif ve goblet hücrelerinin yanı sıra salgı granülleri içeren özelleşmiş endokrin hücreleri ve fonksiyonu henüz bilinmeyen, eozinofilik salgı granülleri içeren Paneth hücreleri de bulunmaktadır (19). Rektumda yüksek konsantrasyonda endokrin hücrelerinin bulunması, rektum karsinomun yüksek insidansı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (20). Epitelin hemen altında epitel yüzeyini destekleyen kollajence zengin ince bir bazal membran bulunur.

Lamina propria, kriptler arasında uzanır ve muskularis mukozaya ulaşır. Lamina propriada fibroblastlar, lenfositler, plazma hücreleri, eozinofiller, makrofajlar ve mast hücreleri gibi çok çeşitli hücre türleri bulunmaktadır.

Muskularis mukoza, düz kas yapısındaki ince bir tabaka halindedir ve epitel ve lamina propriayı submukozadan ayırır. Muskularis mukozanın kasılması, normal fizyolojik süreçlerin (müsin sekresyonu, su ve elektrolitlerin emilimi gibi) devamlılığını sağlar. Submukoza, lamina propria gibi lenfositler, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve fibröz dokudan oluşmaktadır (19). Rektum duvarı genel yapı olarak kolon duvarına benzer ve aynı tabakaları içermektedir. Farklı olarak, Goblet hücre sayısı kolondan daha fazladır ve bez yapıları da

kolondakilerden daha uzundur. Ayrıca endoskopik ultrasonografi ile yapılan görüntülemelerde kolon duvar kalınlığının rektuma oranla daha ince olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. Kolorektumun histolojisi (21)

### 2.1.3 Kolon ve Rektum Patogenezi

KRK'nın bilinen 3 temel formu bulunmaktadır:

1. Sporadik
2. Ailesel
3. Kalıtsal

KRK'ların yaklaşık % 70'ini sporadik kanser olguları oluştururken, % 30'unu ailesel risk taşıyanlar, geri kalan çok az bir kesimi de kalıtsal formu taşıyan olgular oluşturmaktadır (22). En sık görülen kolon kanser hücre tipi adenokarsinomdur ve olguların yaklaşık % 95'inde bulunmaktadır. Adenokarsinom kolorektal mukozanın glandular epitelinde türevlenen bir malignant epitel tümörüdür. Nadir olarak, lenfoma ve skuamöz hücre kanser türleri de görülmektedir.

### 2.1.3.1 Adenomatöz Polipler (Adenomlar)

Polipler, mukozal örtülerden barsak lümenine doğru uzanan düz veya saplı büyümelerdir ve patolojik olarak polipler üç grupta incelenmektedir;

- 1) Neoplastik Olmayan Polipler
  - (a) İnflamatuvar polipler
  - (b) Hamartomlar
- 2) Neoplastik Polipler
  - (a) Adenomatöz polipler (Adenomlar)
    1. Tübüler Adenom
    2. Villöz Adenom
    3. Tübülovillöz Adenom
  - (b) Submukozal Polipler
  - (c) Malign Epitelyal Polipler
- 3) Hiperplastik Polipler (Metaplastik Polipler)

Potansiyel olarak premalignant lezyonlar ile KRK gelişimine etkisi olduğu düşünülmeyen juvenil polipler, hamartomlar ve inflamatuvar polipler birbirlerinden ayrı tutulurlar.

Adenomatöz polipler, benign lezyonlardır ancak önce adenokarsinoma ve daha sonra invazif adenokarsinoma transformasyon göstererek KRK oluşumunda rol oynarlar. Histolojik olarak adenomatöz polipler, tübüler (polipin dış yüzeyinden aşağı doğru genişleyen tübüler bezlerden oluşur), villöz (barsak mukozasının yüzeyinden dışa doğru genişleyen parmak benzeri epitelyal çıkıntılardan oluşur) veya her ikisi de (tübülovillöz) olabilir. Villöz poliplerin invaziv karsinoma dönüşme olasılığı, aynı boyuttaki tübüler poliplere göre daha yüksektir. Histolojik sınıfı dikkate alınmaksızın büyük poliplerin özellikle 1,0 cm çapından daha büyük olanların invaziv karsinoma dönüşmeleri daha muhtemeldir.

Adenomatöz poliplerin yanı sıra; tırtıklı adenomlar, hiperplastik polipler ve karışık poliplerin, adenomatöz poliplerden farklı bir metabolik yol ile (hatalı eşleşme tamir mekanizmasındaki anormallikler yolu ile) KRK oluşumunu arttırabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (3).

#### 2.1.4 Genetik Değişiklikler

DNA replikasyonu veya DNA tamir genleri, APC, K-ras ve p53'ü kapsayan spesifik DNA sekanslarındaki kalıtsal ve somatik mutasyonlar, sonsuz hücre bölünmesine neden olur.

KRK, bir seri kompleks moleküler değişikliklerden oluşan heterojen bir hastalıktır. Normal kolonik mukozanın benign adenoma, ardından kanser içeren adenomatöz polipe ve daha sonra potansiyel olarak hayatı tehdit eden invaziv kansere dönüşümü, bir seri genetik süreçler ile bağlantılıdır. APC, K-ras, DCC ve p53'ün de bulunduğu bir takım genlerdeki dengesizlikler sonucu bu hastalık gelişebilmektedir.

APC gen mutasyonları,  $\beta$ -kateninin bağlanmasını etkileyerek hücre adhezyonunu değiştirir ve ayrıca Wnt sinyal iletim yoluna etki eder. c-myc, bir transkripsiyon faktörüdür ve proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengeyi bozan anormal Wnt sinyal iletimi ile aktive edilir. APC'nin kaybı, tümör oluşumuna etki ederken,  $\beta$ -katenin ile kompleks oluşturan E-kadherinin inaktivasyonu tümör progresyonunda rol oynar. K-ras gen mutasyonları EGFR-Ras-Raf-ERK-Jun/Fos metabolik yoluyla proliferasyonu uyarır ve prokaspazı fosforilleyerek apoptozu inhibe eder.

KRK gelişimi, tipik olarak genetik ve çevresel etkiler arasındaki kompleks etkileşimin bir sonucudur. KRK hastalarının % 25'i bu hastalığın ailesel hikayesine sahiptir ve bu durum genetik faktörlerin önemini ortaya koymaktadır. Kalıtsal KRK iki ana gruba ayrılabilir: kolon kanseri olgularının % 1'ini kapsayan Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve olguların % 5-10'unu kapsayan kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC) (23).

##### 2.1.4.1 FAP ve HNPCC (Lynch Sendromu)

FAP, otozomal dominant bir hastalıktır ve her biri 1 cm yarıçapından daha küçük olan binlerce adenomatöz polipin varlığı ile karakterize edilmiştir. FAP olan kişiler normal görünüşlü kolonik mukoza ile doğarlar ve polipler 20-30'lu yaşlarda gelişmeye başlar. Eğer cerrahi müdahalede bulunulmazsa, KRK 40 yaşından itibaren gelişebilmektedir. FAP, neoplastik (somatik mutasyon) ve normal hücrelerde (germline mutasyon) 5q21 kromozonun (APC geni olarak da bilinir) delesyonu ile bağlantılıdır. Bu delesyon kolonik mukozada anormal proliferasyona neden olmaktadır. FAP olgularının yaklaşık % 25'i, herhangi bir ailesel hikayeye sahip olmamalarına rağmen APC mutasyonuna sahiptir, bu bireylerde mutasyon daha sonra kendiliğinden oluşmaktadır (23).



HNPCC, FAP gibi otozomal dominant bir hastalıktır. HNPCC’de adenokarsinomların oluşması ortalama 40-50’li yaşlarda ortaya çıkar ve genellikle sağ kolonda lokalize olur. FAP’ın aksine HPNCC, daha yüksek frekansa sahiptir (24). Her ne kadar Lynch sendromunda “non-polipozis” terimi adenomların oluşmadığı veya önemli olmadığı anlamını uyandırorsa da, HNPCC hastaları genel popülasyonla aynı oranda adenom oluşturmaktadırlar (25). HNPCC adenomları, morfolojik açıdan bakıldığında herhangi bir belirgin özellik sergilemezler, ancak adenomatöz lezyonlar sıklıkla mikrosatellit instabilite göstermektedir (26).

### **2.1.5 Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi**

2008 yılında American Cancer Society tarafından yapılan istatistiklere göre; tüm malignant hastalıklar içerisinde KRK insidansı, her iki cinsiyette de üçüncü sırada yer almaktadır (27). National Cancer Institute tarafından yapılan SEER programı verilerine göre, 1988-2001 yılları arasındaki KRK olgularının % 41,5’i proksimal kolonda, % 28,7’si distal kolonda % 29,8’i rektumda olduğu görülmüştür (28). Cinsiyet dağılımına bakıldığında kolon kanser insidansı her iki cinsiyette eşit iken, rektal kanser erkeklerde daha sıklıkla görülmektedir (29).

KRK’nın bilinen pek çok risk faktörü vardır. Ekolojik çalışmalardan, hayvan denemelerinden, olgu-kontrol ve kohort çalışmalarından elde edilen verilere göre; 50 yaşın üstündeki insanlar, polipli olgular, ülseratif kolitli olgular, yağdan zengin ve kırmızı etle beslenen bireyler, alkol ve sigara kullananlar ve ailesinde kolokteral kanser geçmişi olanlar yüksek KRK riski taşımaktadır. KRK risk faktörleri ve risk düzeyleri Tablo 1’de özetlenmiştir. Bugüne kadar lifden zengin beslenmenin KRK riskini azalttığı düşünülmekteydi. Ancak 16 yıl boyunca takip edilerek 88.757 hasta ile yapılan bir çalışmada, lifden zengin beslenmenin kolon kanseri riskini azaltmadığı belirlenmiştir (30) ve 2005 yılında yapılan bir meta-analiz çalışması da bu sonuçları desteklemektedir (31). Sağlıklı bir diyet ve düzenli bir yaşam tarzı ile bu kanserden % 65-70 oranında korunulabilmektedir.

**Tablo 1.** Kolorektal kanserin risk faktörleri

<b>Ortalama Risk</b>	50 yaş ve üstü
<b>Düşük Risk</b>	Doğum kontrol hapı kullanımı
	Düzenli egzersiz
	Folik asit içeren multivitamin alımı
	Uzun süre aspirin ve diğer nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçların (NSAID) kullanımı
<b>Yüksek Risk</b>	Ailesel hikayesi olanlar <ul style="list-style-type: none"><li>• Kolorektal Kanser</li><li>• Kolorektal adenomlar</li></ul>
	Kişisel hikayesi olanlar <ul style="list-style-type: none"><li>• Kolorektal adenomlar</li><li>• Yumurtalık, rahim kanseri</li></ul>
	Ailesel adenomatöz polipozis
	Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser
	Peutz-Jegher sendromu
	Juvenil polipozis
	Uzun dönem inflamatuvar barsak hastalığı
	Fiziksel inaktivite (haftada 3 saatten az egzersiz yapmak)
	Obezite
	Sigara kullanımı
Alkol kullanımı (Günde 1 bardaktan fazla alkol tüketimi)	

### 2.1.6 Kolorektal Kanserin Evrelendirilmesi

Evrelendirme sistemi, kanserin nüfuz etme miktarını değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. İlk KKK evrelendirme sistemi, 1932 yılında Dr Cuthbert E. Dukes tarafından ileri sürüldü ve pek çok doktor tarafından hastalığın tanısı ve en iyi tedavi yönteminin belirlenmesi amacıyla kullanıldı (32) (Tablo 2). En sık kullanılan kanser evrelendirme sistemidir. Burada T, tümör penetrasyonunun derinliği; N, lenf nodunun varlığı veya yokluğu; M, uzak metastazın varlığını veya yokluğunu göstermektedir (33) (Tablo 3).

**Tablo 2.** Dukes evrelendirme sistemi

<i>Evre</i>	<i>Histopatolojik Özellikleri</i>
Dukes A	İntestinal duvarla sınırlanan tümör varlığı
Dukes B	İntestinal duvara invazyon yapan tümör varlığı
Dukes C	Lenf nodunun varlığı
Dukes D	Uzak metastazın varlığı

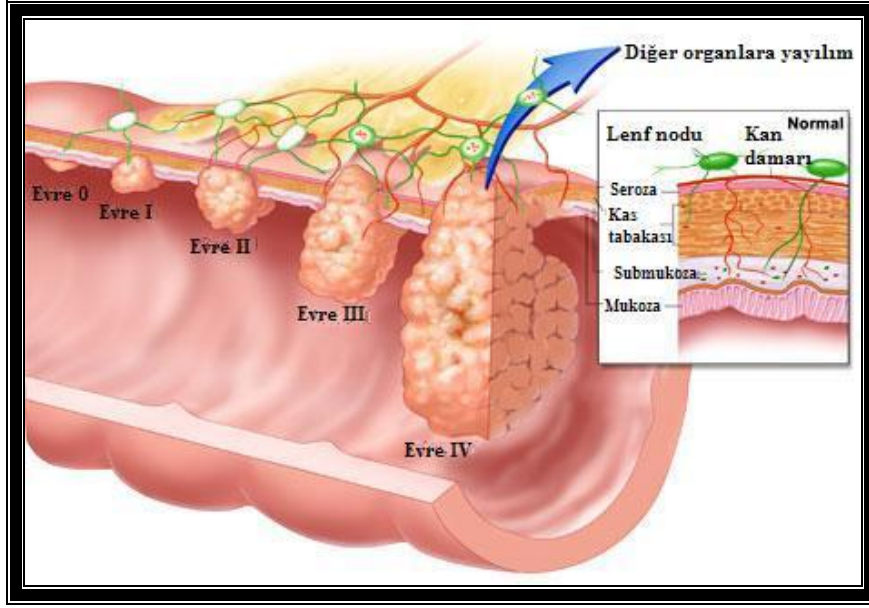
**Tablo 3.** TNM evrelendirme sistemi

<i>Evre</i>	<i>T: İntestinal duvara invazyon derecesi</i>
T0	Tümör kanıtı yoktur
Tis	Kanser in situ (tümör var ancak invazyon yok)
T1	Submukozadan lamina propriaya invazyon (bazal membrana invazyon)
T2	Muscularis propriaya invazyon
T3	Subseroza invazyon
T4	Diğer organlara veya peritona direkt invazyon
<i>Evre</i>	<i>N: Lenf nodunun bulunma derecesi</i>
N0	Lenf nodunun bulunmaması
N1	1-3 lenf nodunun varlığı
N2	4 veya daha fazla lenf nodunun varlığı
<i>Evre</i>	<i>M: Metastaz derecesi</i>
M0	Uzak metastazın olmaması
M1	Uzak metastaz varlığı

KRK evrelendirmesinde Dukes sistemi TNM sınıflandırma metoduna uyarlanmıştır (1). Bu paralel evrelendirme sistemi Tablo 4’te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Kolorektal karsinomların Dukes ve TNM evrelendirme sistemi

<i>Dukes Evresi</i>	<i>TNM</i>	<i>Histopatolojik Özellikler</i>
<b>Dukes A (Evre I)</b>	<b>T1N0M0</b>	Bölgesel lenf nodu içermeyen ve muskularise nüfuz etmemiş yüzeysel lezyonlar vardır.
<b>Dukes B (Evre II)</b>		Lenf nodu olmadan barsak duvarına daha derin nüfuz eden tümörleri kapsamaktadır.
<b>Dukes B 1</b>	<b>T2N0M0</b>	Tümörün muskularisle sınırlanması.
<b>Dukes B 2</b>	<b>T3-4N0M0</b>	Tümörün serozaya doğru veya seroza içine nüfuz etmesi.
<b>Dukes C (Evre III)</b>		Bölgesel nodlar içeren tümörler bu grupta yer alır.
<b>Dukes C 1</b>	<b>T2N1M0</b>	Tümörün muskularisle sınırlanması.
<b>Dukes C 2</b>	<b>T3-4N1M0</b>	Tümörün serozaya doğru veya seroza içine nüfuz etmesi.
<b>Dukes D (Evre IV)</b>	<b>TXNXM1</b>	Bu gruptaki tümörler; karaciğer, akciğer, kemik veya diğer anatomik olarak uzak bölgelere metastaz yapmıştır.



**Şekil 3.** KRK'nın Dukes evrelendirilme sistemi (34) Bir tümör, barsak duvarı infiltrasyon uzunluğuna, lenf nodlarının varlığına veya karaciğer gibi uzak organlara yayılıp yayılmamasına göre sınıflandırılır. Evrelendirme, prognozun belirlenmesi açısından önemlidir.

## 2.2 EKSTRASELÜLER MATRİKS VE YAPISI

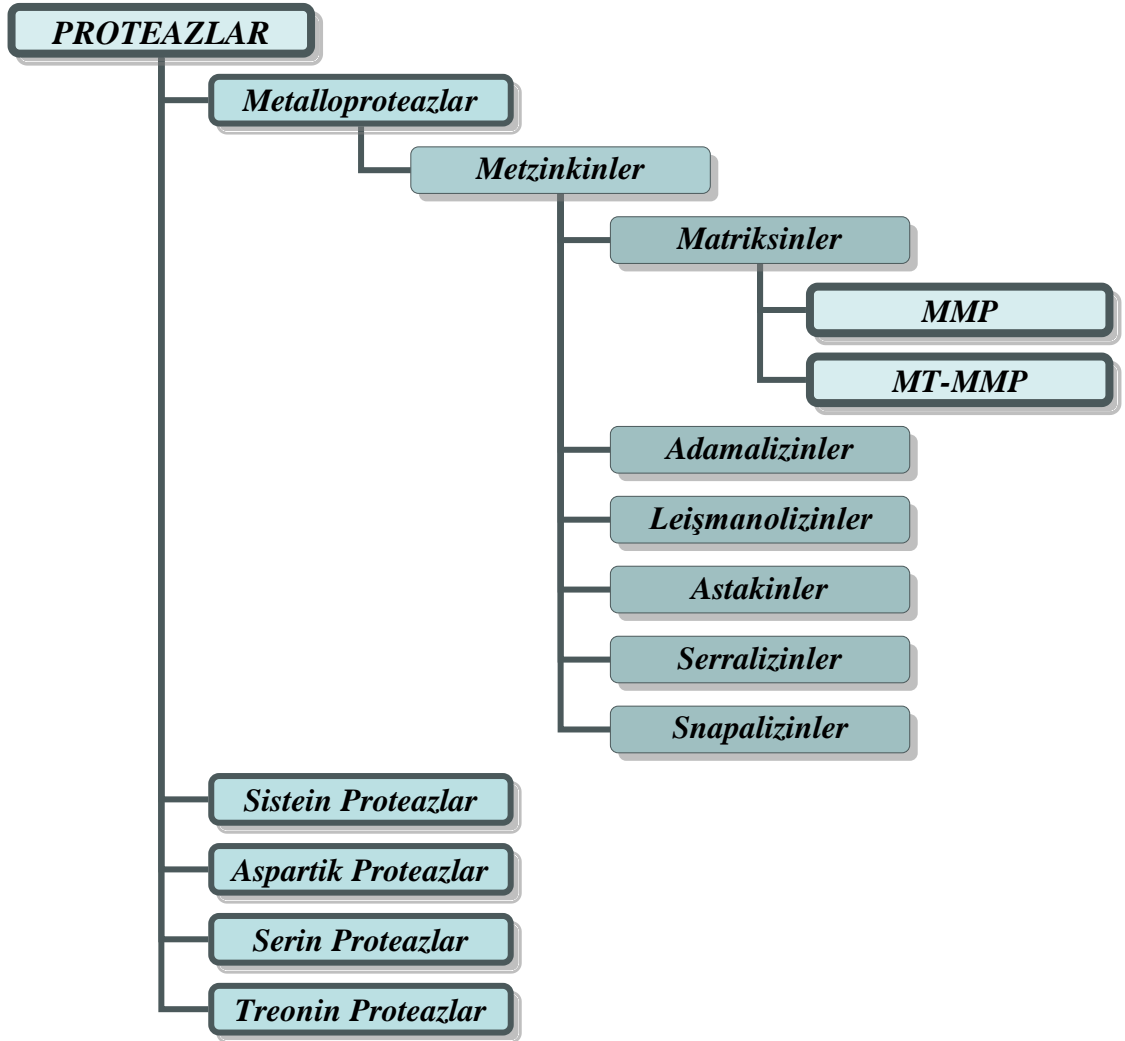
Canlı organizmada hücreler, kompleks bir ağ yapısında olan ekstraselüler matriks (ESM) olarak bilinen, çeşitli yapısal proteinlerin ve makromoleküllerin oluşturduğu üç boyutlu bir mikroçevrede bulunurlar. ESM; proliferasyon, migrasyon, diferansiyasyon ve apoptoz gibi hücre fonksiyonları etkilemenin yanı sıra; doku mimarisinde de temel bir rol oynamaktadır. ESM'nin temel bileşenleri; kollajenler, yapısal non-kollajenöz glikoproteinler (fibronektin, laminin, tenaskin ve nidojen/entaktin gibi) ve proteoglikanlardan oluşmaktadır. Fizyolojik süreç sırasında ESM kompozisyonu; özellikle proteazlar tarafından ESM'nin yeniden şekillenmesi sonucu çeşitlenebilmektedir. Proteazlar, ESM proteinlerinde bir takım yapısal ve konformasyonel değişikliklere neden olabilmektedirler, bu nedenle fizyolojik ve patolojik süreçte önemli fonksiyonlara sahiptirler (36). Örneğin, hücre adhezyonu ve migrasyonu için temel substrat olan laminin 5'in, membran-tip-1 matriks metalloproteinaz (MT1-MMP) ve matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) tarafından proteolitik olarak parçalanması, hücre migrasyonu ve tübül oluşumu ile bağlantılıdır (37).

## 2.3 MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

### 2.3.1 Matriks Metalloproteinaz Ailesi

Canlı organizmalarda bulunan metalloproteinazlar, aktif bölgelerinde  $Zn^{2+}$  atomu içeren endopeptidazlardır (bundan dolayı, “metallo” ön ekini almaktadırlar.) ve katalitik domainlerinin yapısına ve evrimsel ilişkilerine dayanarak alt ailelere veya gruplara ayrılırlar (Tablo 5). Metalloproteinazların metzinkin alt ailesi, üç-histidin çinko-bağlama motifi ve aktif bölgenin ardından korunmuş bir metiyonin dönüşü ile karakterize edilmiştir (38). Matriks metalloproteinazlar (MMP’ler), metzinkin ailesinin matriksin sınıfında yer alırlar (39) (Tablo 5).

**Tablo 5.** Proteazların sınıflandırılması



MMP'ler, ESM bileşenlerini yıkıma uğratabilen çinko bağımlı bir proteinaz ailesidir. ESM bileşiklerini katabolize edilme yeteneklerinden dolayı patolojik doku yıkımı ve normal matriksin yeniden şekillenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

MMP'ler, yaklaşık 28 üyeden oluşmaktadır (Tablo 6) ve yapı, substrat spesifikliğı ve hücrel lokalizasyonlarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır (11).

- 1) Kollajenazlar (MMP-1, -8, -13)
- 2) Jelatinazlar (MMP-2 ve -9)
- 3) Stromelizinler (MMP-3, -10 ve -11)
- 4) Membran-tip MMP'ler (MMP-14, -15, -16, -17, -24 ve -25)
- 5) Matrilizinler (MMP-7 ve -26)
- 6) Makrofaj elastaz (MMP-12)
- 7) Diğer MMP'ler (MMP-19, -21, -23, -27 ve -28)

MMP'ler, ESM bileşenlerinin yanı sıra bir takım büyüme faktörleri, reseptörler, kemokinler, Fas ligandı, diğer proteinazlar, integrinler ve hücre-hücre adhezyon molekülleri gibi ESM dışı bileşenlerin de yıkımından sorumludurlar (Tablo 6). Bu fonksiyonları nedeniyle MMP'ler; hücre büyümesi, diferansiyasyon, apoptoz, migrasyon ve invazyon gibi pek çok hücrel fonksiyonda görev almaktadır. Böylelikle yara iyileşmesi, embriyo implantasyonu ve gelişimi, ovulasyon, kemik şekillenmesi ve fizyolojik anjiyogenez gibi çeşitli fizyolojik süreçlerle ilişki içerisindedir. MMP'ler ayrıca romatoid artrit, ateroskleroz ve tümör invazyonu ve metastazı gibi bir takım patolojik hastalıklarda da çok önemli rol oynarlar (40).

**Tablo 6.** MMP'ler ve substratları (41)

<b>MMP</b>	<b>Temel Adı</b>	<b>ESM Substratı</b>	<b>ESM-Dışı Substratı</b>
<b>MMP-1</b>	Kollajenaz - 1 Mcol-A	Kollajenler (I, II, III, VII, VIII, X), jelatin, proteoglikan bağlı protein, agrekan, versikan, tenakin, entaktin	$\alpha$ 1-PI*, ILb-1*, proTNF*, IGFBP-3*, MMP-2, MMP-9
<b>MMP-2</b>	Jelatinaz - A	Kollajenler (I, IV, V, VII, X, XI, XIV), jelatin, elastin, fibronektin, laminin-1, laminin-5, galektin-3, agrekan, dekorin, osteonektin proteoglikan bağlı protein	IL-1b*, $\alpha$ 1-PI*, MMP-1, MMP-9, MMP-13
<b>MMP-3</b>	Stromelizin-1	Kollajenler (III, IV, V ve IX), jelatin, agrekan, versikan, perlekan, dekorin, proteoglikan bağlı protein, büyük tenaskin-C, fibronektin, laminin, entaktin, osteonektin	antitrombin-III, IL-1 $\beta$ *, IGFBP-3*, fibrinojen, çapraz bağlı fibrin, plazminojen, MMP- 2/TIMP-2 kompleksi, MMP-7,-8,-9,-13
<b>MMP-7</b>	Matrilizin	Kollajenler IV ve X, jelatin, agrekan, dekorin, proteoglikan bağlı protein, fibronektin, laminin, çözünmez fibronektin fibrilleri, entaktin, büyük ve küçük tenaskin-C	MMP-1, MMP-2, MMP-9 MMP-9/TIMP-1 kompleksi, $\alpha$ 1-PI*, plazminojen
<b>MMP-8</b>	Kollajenaz - 2	Kollajenler (I, II, III, V, VII, VIII, X), jelatin, agrekan	$\alpha$ 1-PI*, $\alpha$ 2-antiplazmin, fibronektin
<b>MMP-9</b>	Jelatinaz-B	Kollajenler (IV, V, VII, X, XIV), jelatin, elastin, galektin-3, agrekan, fibronektin, proteoglikan bağlı protein, entaktin, osteonektin	$\alpha$ 1-PI*, IL-1 $\beta$ *, plazminojen
<b>MMP-10</b>	Stromelizin- 2	Kollajenler (III, IV ve V), jelatin, kazein, elastin, agrekan, proteoglikan bağlı protein	MMP-1, MMP-8

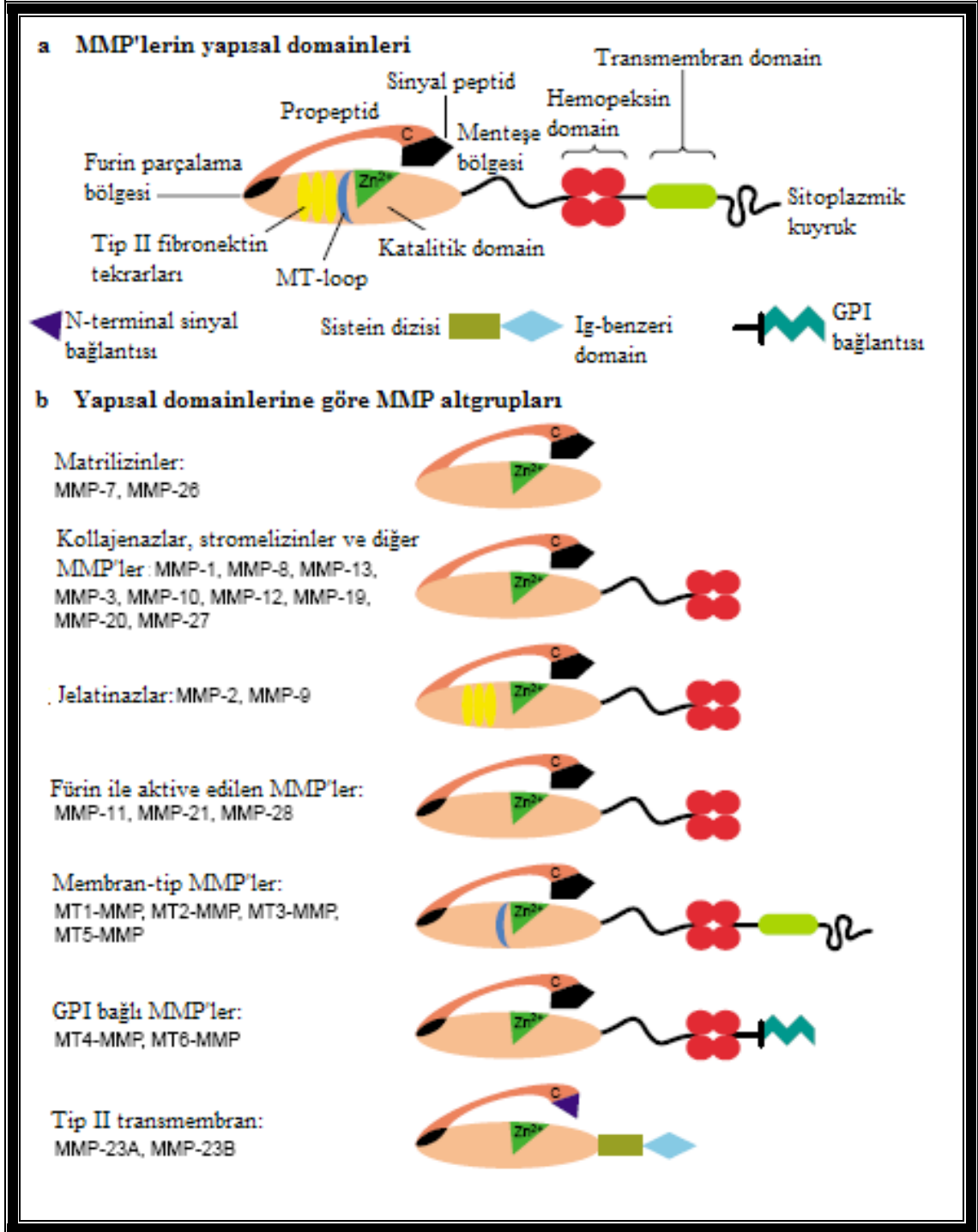


<b>MMP-11</b>	Stromelizin- 3	Kazein, laminin, jelatin, fibronektin, kollajen IV, karboksimetillenmiş transferin	$\alpha$ 1-P*, kazein, IGFBP-1*
<b>MMP-12</b>	Metalloelastaz	Kollajen IV, jelatin, kazein, elastin, laminin, proteoglikan monomeri, fibronektin, vitronektin, entaktin	$\alpha$ 1-PI*, fibrinojen, fibrin, plazminojen, myelin proteini
<b>MMP-13</b>	Kollajenaz- 3	Kollajenler (I, II, III, IV, IX, X, XIV), jelatin, agrekan, perlekan, büyük tenaskin-C, fibronektin, osteonektin	MMP-9, plazminojen aktivator inhibitor-2
<b>MMP-14</b>	MT1-MMP	Kollajenler (I, II ve III), Kazein, elastin, fibronektin, jelatin, laminin, vitronektin, büyük tenaskin-C, entaktin, proteoglikanlar	$\alpha$ 1-PI*, MMP-2, MMP-13
<b>MMP-15</b>	MT2-MMP	Büyük tenaskin-C, perlekan, fibronektin, laminin, entaktin, agrekan,	MMP-2
<b>MMP-16</b>	MT3-MMP	Kollajen-III, jelatin, kazein, fibronektin	MMP-2
<b>MMP-17</b>	MT4-MMP	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<b>MMP-18</b>	Kollajenaz- 4	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<b>MMP-19</b>	RASI-1	Jelatin	Bilinmiyor
<b>MMP-20</b>	Enamelizin	Amelojenin	Bilinmiyor
<b>MMP-21</b>	-	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<b>MMP-22</b>	-	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<b>MMP-23</b>	CA-MMP	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<b>MMP-24</b>	MT5-MMP	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<b>MMP-25</b>	Lökölizin	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<b>MMP-26</b>	Endometaz	Kollajen IV, jelatin, fibronektin	ProMMP-9, fibrinojen, $\alpha$ 1-PI*
<b>MMP-27</b>		Bilinmiyor	Bilinmiyor
<b>MMP-28</b>	Epilizin	Kazein	Bilinmiyor

\* $\alpha$ 1-PI,  $\alpha$ 1- proteinaz inhibitörü; IGFBP, insülin-benzeri büyüme hormonu bağlayıcı proteini; IL-1, interlökin-1; TNF, tümör nekroz faktör.

### 2.3.2 MMP'lerin Domain Yapısı

MMP'lerin domain yapıları incelendiğinde, tüm MMP'lerin bir sinyal peptidi, bir propeptid ve bir N terminal katalitik domaini içerdiği görülür. Ayrıca MMP-7, 23A, 23B ve -26 hariç, diğer MMP'ler bir C-terminal hemopeksin domaini içermektedir. Sinyal peptidi enzimin sekresyonu için önemli iken; propeptid, MMP'lerin regülasyonu için kritiktir. Propeptitte bulunan PRCG(V/N)PD motifinin içerisindeki sistein kalıntısı, aktif bölgede bulunan  $Zn^{2+}$  atomuna bağlanarak proteolitik aktiviteyi bloke eder (42). Ancak propeptid parçalandığı zaman, sistein ve  $Zn^{2+}$  arasındaki etkileşim kaybolur ve enzim aktif forma geçer (43). Katalitik domain, HEXXHXXGXXH sekansı içerisinde bulunan ve hem  $Zn^{2+}$  hem de  $Ca^{2+}$  atomuna bağlanan korunmuş üç histidin kalıntısı içermektedir. Katalitik domain substratın degradasyonu ve otolitik parçalanmadan sorumludur (44). C terminal domaini ise, hemopeksin ailesi üyelerinin sekansına çok benzemektedir ve pseudo-dört kat simetri ile  $\beta$ -pervane yapısına sahiptir. Bu domain substratın bağlanmasından sorumludur ve ayrıca metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) ile etkileşiminde rol oynamaktadır (45). N-terminal katalitik ve C-terminal hemopeksin domainleri, MMP fonksiyonu için önemli olan çeşitli uzunlukta ve esneyebilen bir bağlayıcı peptide bağlıdır. Jelatinazlar (MMP-2 ve -9), bir fibronektin tip II benzeri modülün üç ardışık kopyasından oluşan fibronektin benzeri domaine sahiptir. Bu domain denatüre tip IV ve V kollajenlere, elastine, denatüre ve native tip I kollajene bağlanmaktadır ve böylelikle substrat spesifikliğine katkıda bulunmaktadır (46). Membrana bağlı olarak bulunan 6 membran MT-MMP bulunmaktadır. MT1-, MT2-, MT3- ve MT5-MMP bir transmembran domaine (tip I transmembran) ve C terminal bölgesinde bir sitoplazmik kuyruğa sahiptir. Transmembran domaini, proteolitik aktivitenin hücre yüzeyinde lokalize olmasını sağlarken sitoplazmik kuyruk intraselüler proteinlerle (örneğin potansiyel fosforilasyon bölgeleri) etkileşerek aktivite ve lokalizasyonu regüle eder (Şekil 4) (40).



Şekil 4. MMP'lerin yapısal domainleri ve domain yapılarına göre sınıflandırılması

### 2.3.3 MMP'lerin Regülasyonu

MMP'ler, ekstraselüler matriksin yapım ve yıkımından sorumlu proteinazlardır, ancak matriks degradasyonu; bu enzimlerin predominant fonksiyonu değildir. Yapılan pek çok çalışma MMP'lerin; sitokinler, kemokinler, reseptörler, antimikrobiyal peptidler gibi non-matriks proteinler üzerinde de etkileri olduğunu göstermiştir (47). Bu nedenle, MMP'ler tek başına matriks katalizinden sorumlu proteinazlar olarak görülmemelidir, bunun yanı sıra hücre-hücre ve hücre-matriks sinyal olayların regülasyonunda ve latent proteinlerin fonksiyon kazanmasını sağlamada rolleri bulunmaktadır (48, 49). Tüm salgılanan proteinazlarda olduğu gibi MMP'lerin katalitik aktivitesi dört noktada regüle edilir:

1. Gen ekspresyonu,
2. Proenzim (veya zimojen) aktivasyonu,
  - 1) Allosterik aktivasyon,
  - 2) Protein kovertazlar tarafından aktivasyon,
  - 3) MMP'ler tarafından aktivasyon,
  - 4) Oksidatif aktivasyon,
3. Enzim inaktivasyonu,
  - 1) Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri
  - 2) Diğer doğal inhibitörler
  - 3) Oksidatif inaktivasyon
  - 4) Endositoz
4. Kompartmanlaşma (enzimin periselüler birikimi).

Tipik olarak, MMP'ler normal, sağlıklı dokularda eksprese edilmezler. Bunun aksine MMP ekspresyonunun bir takım düzeyleri, herhangi bir hastalıklı veya inflame olmuş dokudaki tamir ve yeniden şekillenme sürecinde ve kültürde büyütülen herhangi bir hücre tipinde görülmüştür. MMP'lerin kantitatif düzeyleri ve kalitatif modeli; dokular, hastalıklar, tümörler, inflamatuvar şartları ve hücre tipleri arasında çeşitlenmektedir. Çoğunlukla MMP üretimi, spesifik sinyaller tarafından transkripsiyonel düzeyde regüle edilir.

### 2.3.3.1 MMP Gen Ekspresyonunun Regülasyonu

MMP gen ekspresyonu, temel olarak transkripsiyonel düzeyde regüle edilmektedir. MMP promotörleri, AP-1 (Aktivatör protein 1), PEA3 (Polioma enhancer A3), Sp-1 (specificity Protein 1),  $\beta$ -katenin/ TCF-4 (T hücre faktörü 4) ve NF-kB (Nükleer Faktör Kappa B) içeren çeşitli trans-aktivatörler aracılığıyla MMP gen ekspresyon regülasyonunu sağlayan bir takım cis-elementleri içermektedir. Cis-elementlerin kompozisyonuna göre, MMP promotörleri üç gruba ayrılmaktadır. Birinci grup, MMP promotörlerin büyük çoğunluğunu kapsar ve bir TATA kutusu ve AP-1 bağlanma bölgesi içerir. Bu grup promotörlerin çoğu AP-1 bağlanma bölgesine komşu olan ve MMP transkripsiyon kontrolü konusunda yardımcı olan PEA-3 bağlanma bölgesi bulunmaktadır (50). İkinci grupta yer alan MMP promotörleri (MMP -8, -11 ve -21) sadece bir TATA kutusu içermektedir. Bu promotörlerin regülasyonu basit ancak birinci grup promotörlerden farklıdır. Son grup promotörler (MMP -2, -14 ve -28) herhangi bir TATA kutusu ve AP-1 bağlanma bölgesi içermemektedir, dolayısıyla bu promotörlerden transkripsiyon birçok bölgede başlamaktadır. Ayrıca, son gruptaki MMP'lerin ekspresyonu temel olarak, proksimal GC kutusuna bağlanan transkripsiyon faktörlerinin ubiquitöz Sp-1 ailesi tarafından belirlenir (Chakraborti et al., 2003). İnterlökinler (IL), interferonlar, epidermal büyüme faktörü (EGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), sinir büyüme faktörü (NGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), platelet türevi büyüme faktörü (PDGF), TNF- $\alpha$  gibi çok çeşitli büyüme faktörleri veya sitokinler, AP-1 ve/veya PEA3 elementlerinin etkileşimi yoluyla MMP promotörlerin trans-aktivasyonuna neden olan hücre sinyal iletimini uyarılmaktadırlar (51). AP-1 veya PEA3 sayesinde artan trans-aktivasyon, genellikle mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK) aracılı fosforilasyon üzerinden gerçekleşmektedir (52).

AP-1 ve/veya PEA3 cis-elementleri, ESM proteinleri tarafından MMP ekspresyonunun uyarımı için bir bağlantı noktası sunar. Hücre yüzey reseptörleri olan integrin ailesinin birbiri ile etkileşimi, MAPK metabolik yolu ile kesişen sinyalleri ileten fokal adhezyon kinazı (FAK) aktive eder, ve böylece AP-1 ve/veya PEA3 transkripsiyonel aktivitesinin artmasına neden olur. AP-1 ve PEA-3 bağlama bölgelerinin yanı sıra,  $\beta$ -katenin/ LEF bağlanması için MMP-7, -14, -12 ve -26 promotörlerdeki TCF-4 bölgesi, MMP-9 promotördeki NF-kB bağlama bölgesi de gen ekspresyonu regülatörleridir. TCF-4 bölgesi, tümör progresyonuna katkısı

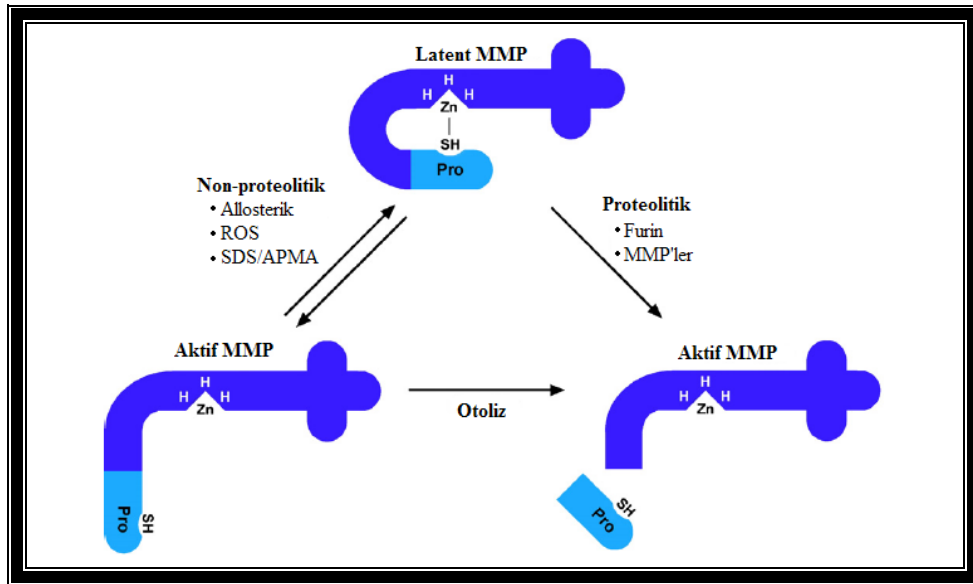
olduğu bilinen (örn, KKK) nükleer  $\beta$ -katenin üzerinden Wnt sinyal iletim yoluna yanıt olarak MMP ekspresyonuna aracılık eder (53).

### 2.3.3.2 Proenzim Aktivasyonu (Sistein Şalter Mekanizması)

ProMMP'ler, korunmuş prodomaindeki sisteinin tiyol grubu ile katalitik bölgedeki çinko iyonu etkileşmesi sonucu katalitik olarak inaktif durumda tutulurlar. Bir proMMP'nin katalitik olarak aktif olabilmesi için, tiyol-Zn<sup>2+</sup> etkileşiminin parçalanması gerekmektedir. Van Wart ve Birkedal-Hansen (54) bu işlemin, tüm proMMP'lerin aktivasyonunda genel ve gerekli olduğunu ileri sürdüler ve bu mekanizmayı sistein şalter mekanizması olarak adlandırdılar. Günümüze kadar bu isim geçerliliğini sürdürmüş ve yaygın bir şekilde kabul edilmiştir.

Esansiyel olarak; tiyol-Zn<sup>2+</sup> etkileşimi, üç mekanizma ile kırılabilir ve bir latent MMP katalitik aktivitesini kazanabilir:

1. Fizyolojik (oksidanlar, disülfidler, elektrofiller) veya fizyolojik olmayan bileşikler (alkilleme ajanları, ağır metal iyonları tarafından serbest tiyolün modifikasyonu) (55);
2. Başka bir proteinaz tarafından prodomainin direkt parçalanması,
3. Prodomainin inter veya intramoleküler otolitik parçalanmasını sağlayan zimojenin kimyasal veya allosterik etkisi (Şekil 5).



Şekil 5. proMMP'lerin aktivasyon mekanizması Latent formda prodomain, katalitik merkezi sararak substrat ile etkileşimini engeller. Furin veya diğer proteazlar tarafından

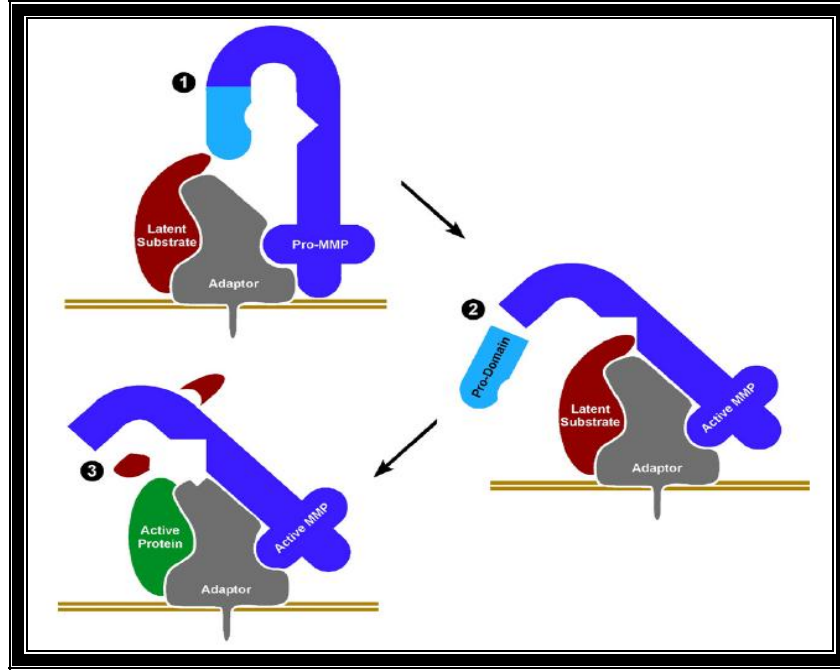
prodomainin proteolitik parçalanması, katalitik bölgedeki çinkoyle etkileşen sisteinin tiyol grubunun uzaklaştırılmasını sağlar. Bu tiyol-çinko etkileşimi, APMA gibi moleküller aracılığıyla non-proteolitik olarak da parçalanabilmektedir (10).

#### 2.3.3.2.1 Allosterik Aktivasyon

Sistein şalter mekanizmasına göre, aktivite kazanmak için prodomainin uzaklaştırılmasına gerek yoktur, sadece tiyol-çinko etkileşiminin yıkımı gereklidir. Daha önce de belirtildiği gibi, proMMP'ler non-substrat makromoleküller ile etkileşebilir veya post-translasyonel olarak modifiye edilebilir ve her ikisi de aktive edilmiş duruma dönüşmesine katkıda bulunan konformasyonel değişikliklere neden olabilir (Şekil 5). Sırayla sistein-Zn<sup>2+</sup> etkileşiminin allosterik olarak parçalanması, bir transisyonel (geçiş) aktif durumun ardından; prodomainin otolitik parçalanması oluşur (Şekil 5).

Epidermal yara kanaması ile yapılan çalışmalarda Parks ve meslektaşları, keratinosit migrasyonu için; tip I kollajen üzerinde MMP-1'in katalitik aktivitesinin gerektiğini belirlediler (55) ancak göç eden hücrelerden sadece proMMP-1 izole ettiler (56). Bu çalışma ile substrat varlığında (tip I kollajen), kollajen-bağlama- $\alpha 2\beta 1$  integrini kesen proMMP-1'in, prodomainin uzaklaştırılması olmadan aktif konformasyona değiştiğini ileri sürüldü. Diğer bir örnek ise Goldber ve meslektaşları MMP-9'un çok bulunduğu ve muhtemelen aktif olduğu plasentada, MMP-9'un neden sadece pro-formunda ekstrakte edildiğini bildiren bir yayındır. Pro-MMP-1/ $\alpha 2\beta 1$ /kollajen mekanizmasına benzer bir şekilde prodomain uzaklaştırılmadan bir model substratın varlığında enzimin stabil proteolitik aktivite kazandığı ileri sürüldü (57).

Her iki örnekte de substrat, prodomain parçalanması olmaksızın MMP proteolizi için gerekli ve kritiktir. Allosterik olarak aktive edilmiş bir pro-MMP, kendi prodomainin parçalanmasından çok, yüksek konsantrasyonlarda olabilen (örneğin pro-MMP-1 mekanizmasındaki kollajen gibi) doğal substrata göre davranmayı tercih eder. MMP'lerin substrat kullanımlı allosterik aktivasyonu bir takım dikkat çekici özelliklere sahiptir. Bu mekanizma basittir, sadece zimojen, substrat ve muhtemelen bunları bir araya getiren başka bir faktöre ihtiyaç vardır (Şekil 6). Ek olarak, substrat proteoliz olur olmaz, enzim yeniden inaktif konformasyonuna dönmesiyle allosterik etki kaybolur. Böylece bir mekanizma aktivasyonu, baskılamayı ve proteinaz aktivitesinin lokalizasyonunu kontrol edebilir (10).



**Şekil 6.** MMP aktivitesinin allosterik regülasyonu In vitro’da proteoliz için sadece bir proteaz ve bir substrat yeterliyken, in vivo’da bunların yanı sıra en az bir ilave bileşene ihtiyaç vardır. Buna göre; bir transmembran yardımcı faktör, proteinaz ve substrat ile etkileşime girer ve bu iki bileşeni proteolizi tetikleyecek formda bir araya getirir (10).

### 2.3.3.2.2 Protein Konvertazlar

Otolize ek olarak, MMP’lerin prodomaini direkt olarak diğer proteinazlar tarafından da parçalanabilir. MMP’lerin yaklaşık üçte biri (tüm memebran tip MMP’ler de dahil), pro ve katalitik domainleri arasında, proprotein konvertazlar veya furinler için hedef sekans görevi gören RXKR veya RRKR sekansına sahiptir (Şekil 4). Furin, tip-1-membran proteimidir ve trans-Golgi ağında bulunan subtilisin-benzeri bir serin proteazdır ve furinle parçalanma bölgesi olan MMP’ler, sekresyon metabolik yolu içerisinde intraselüler olarak işlenirler (58-61). Ancak çoğu MMP’lerde furin olmadan parçalanma gerçekleşmektedir ve bu proMMP’lerin gerçek in vivo aktivasyon mekanizması henüz bilinmemektedir.

### 2.3.3.2.3 MMP’ler Tarafından proMMP’lerin Aktivasyonu

In vitro’da bir takım MMP’ler, diğer zimojen MMP’lerin prodomainlerini parçalayabilirler ve aktif MMP’lerin, tamamıyla aktif bir enzim üretebilmek için, son proteolitik adıma aracılık edebileceği ileri sürülmüştür (62). İlk parçalama, ya bir serin



proteaz, bir MMP, bir aspartat proteaz ya da bir sistein proteaz tarafından gerçekleştirilebilir. Örneğin, miyofibroblast transdiferansiyasyonu sırasında pro-MMP-9'un aktivasyonu aktif MMP-13'ün varlığına ihtiyaç duymaktadır (63). Ancak, bu aktivasyon mekanizmaları henüz net olarak bilinmemektedir.

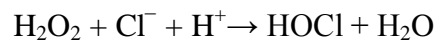
Bu zamana kadar en iyi anlatılmış bir proMMP'nin non-furin proteolitik aktivasyon mekanizması, aktif MMP-14 tarafından hücre yüzeyindeki proMMP-2'nin parçalanmasıdır (64-66). Farklı laboratuarlardan elde edilen veriler; pro-MMP-2'nin MMP-14 ve TIMP-2'nin birlikte fonksiyonuna ihtiyaç olduğu gösterilmiştir. TIMP'ler, genelde MMP'lerin inhibitörleri olarak görülürler, ancak bu sistemde TIMP-2, MMP-14 tarafından proMMP-2 aktivasyonunda kritik bir rol oynamaktadır. Doğru miktarda ekzogenöz TIMP-2, proMMP-2 aktivasyonunu artırırken (64), yüksek miktarları aktivasyonu bloke eder. (68-70). Bu mekanizma; TIMP-2'nin C terminal ucu ile hem proMMP-2'nin C terminali, hem de aktive edilmiş MMP-14'ün N terminalinin etkileşimini kapsar (67, 71). Önerilen üçlü kompleks içerisinde, TIMP-2; zimojen ve aktif proteazı yakın bir pozisyona getirir ve böylelikle MMP-14, pro-MMP-2'nin prodomainini parçalayabilir.

#### 2.3.3.2.4 proMMP'lerin Oksidatif Aktivasyonu

Lökositler veya diğer hücreler tarafından üretilen oksidanlar, MMP'leri hem aktive (prodomain tiyolün oksidasyonu ve ardından otolitik parçalanması ile) hem de daha sonradan inaktive (katalitik aktivite için kritik olan amino asitlerin modifikasyonu yoluyla) edebilir ve böylece proteolitik aktivitenin periselüler patlamasını kontrol eden bir mekanizma sağlar.

In vitro'da birkaç proMMP, prodomaindeki tiyol grubunu modifiye eden ve otolitik parçalanma aracılığı ile aktivasyonu sağlayan reaktif oksijen türleri tarafından aktive edilmektedir. Örneğin, lökosit-türevli oksidanlar; proMMP-1, -7 ve -9'u aktive ederken (72-74), nitrik oksit ve süper oksidin etkileşimi sonucu ortaya çıkan reaktif peroksinitrit; proMMP-1, -2 ve -9'u aktive etmektedir (75).

Fagositik hücrelerden salınan bir hem proteini olan myeloperoksidaz önemli bir reaktif oksijen türü kaynağıdır. Bu enzim hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) hipoklorik asit (HOCl) (76) üretmek için kullanır, reaksiyon aşağıdaki gibidir:



HOCl hızlı bir şekilde tiyol, tiyoester ve amino grupları ile reaksiyon verir (77). Bundan dolayı, bu hipohalöz asit prodomain sistein kalıntısının serbest tiyolünü kovalent olarak modifiye ederek latent MMP'leri aktive edebilir. Prodomain tiyolün modifikasyonu, prodomainin doğal konformasyonunu parçalayabilir ve bu da otolitik parçalanmayı ve aktivasyonu sağlar. Gerçektende ilk olarak Weiss ve meslektaşlarının proMMP-8 ve -9 (72, 78) ile; Fu ve arkadaşlarının proMMP-7 (74) ile gösterdiği gibi, HOCl etkili ve hızlı bir şekilde bu zimojenleri aktive eder. Korunmuş prodomaini taklit eden sentetik peptidleri ve rekombinant zimojen ve tandem kütle spektrofotrik analizi kullanılarak, HOCl'nin gerçektende prodomaindeki tiyolü oksijen vererek sülfirik aside (RSO<sub>2</sub>H) dönüştürdüğü gösterilmiştir. Prodomainin modifikasyonundan sonra oksijenlenmiş proMMP-7 kendi kendini otolitik olarak aktive edebilir. Bu mekanizma; kolaylıkla tiyol kalıntıları ile reaksiyon veren diğer oksidanlara, elektrofillere ve reaktif oksijen türlerinde de gerçekleşebilir. MMP düzeyleri ve myeloperoksidazın karakteristik amino asit oksidasyon ürünleri insanlarda inflamatuvar dokuda oldukça artmaktadır (79, 80). Bu gözlemler myeloperoksidaz tarafından HOCl üretiminin inflamasyon sırasında latent MMP'lerin aktivasyonu için periselüler bir mekanizma sağlayabildiğini ileri sürer. Myeloperoksidaz ve MMP-7 lipid-yüklü aterosklerotik plaklar içerisinde kololize olmasına rağmen (74), in vivo'da proMMP-7 aktivasyonu için myeloperoksidaza gerek olup olmadığı henüz belirlenmemiştir.

Bunların yanı sıra; MMP'lerin oksidatif modifikasyonu, enzim aktivitesini yok edebilir. Bu konu daha sonra tartışılacaktır.

### 2.3.3.3 Kompartmanlaşma

MMP'lerin substrat seçicilikleri iki süreçle gerçekleştirilir: enzim affinitesi ve kompartmanlaşma. Model substratların kullanıldığı kinetik çalışmalar, spesifik enzimlerin bir takım substratları diğerlerinden daha etkili bir şekilde parçaladığını belirlemiştir. Örneğin hem MMP-2 hem de MMP-9, kollajeni diğer jelatinolitik MMP'lerden daha iyi parçalama fonksiyonuna sahiptir (81) ve insan MMP-7 enzimi; diğer MMP'lerden daha kuvvetli proteoglikanaz ve elastazdır (82). Bu nedenle birçok potansiyel substratın bulunduğu doku çevresinde MMP katalizinin seçiciliği; aktif enzim konsantrasyonu tarafından regüle edilmesine ek olarak, tercih edilen substrat konsantrasyonu tarafından da yönetilebilmektedir.

Kompartmanlaşma, periselüler çevrede bir MMP'nin nasıl ve nerede salındığı ve lokalize olduğudur. Proteoliz spesifikliğinin regülasyonunda, enzim-substrat etkileşimi

afinitesi kadar kompartmanlaşma da önemlidir. Transmembran domaine sahip MMP'ler, salınan MMP'ler olarak da tanımlanır ve tam fonksiyon gösterebilmeleri için bir hücrel kompartman-spesifik lokalizasyon mekanizmasına ihtiyaç duyarlar. Proteazlar hücreler tarafından rasgele salgılanmazlar, muhtemelen önce hücre membranına bağlanırlar, böylelikle lokal olarak yüksek enzim konsantrasyonunu koruyabilir ve periselüler alandaki spesifik substratları parçalayabilirler.

Membran-bağlı MMP'lere ek olarak, birçok spesifik hücre-MMP etkileşimi de rapor edilmiştir. Örneğin; MMP-2  $\alpha_v\beta_3$ -integrine (83), MMP-9 CD44'e ve MMP-7 yüzey proteoglikanlara (84, 85), kolesterole (86) ve bir tetraspanin olan CD151'e (87) bağlanır. Salınan MMP'lerin hücre yüzeyine bağlanması, sistein-çinko bağının allosterik parçalanması ve prodomainin otokatalitik yıkımı yoluyla zimojen aktivasyonunu tetiklemektedir (Şekil 5).

Örneğin, Shiami ve arkadaşları bir tetraspanin olan CD151'in proMMP-7'ye bağlandığını ve MMP7'yi aktive ettiğini belirlediler. Yazarlara göre, CD151 proMMP-7'de bir konformasyonel değişikliğe neden olur; böylece periselüler düzeyde proMMP7'nin kendiliğinden aktivasyonunu kolaylaştırır (87) Ancak bu mekanizma henüz net değildir.

### **2.3.3.4 MMP'lerin İnaktivasyonu**

#### **2.3.3.4.1 Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri**

Metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) ailesi, dört glikoprotein üyesinden (TIMP-1, -2, -3, ve -4) oluşmaktadır; MMP ve bir disintegrin ve metalloproteinazların (ADAM) aktif merkezlerine bağlanarak bu proteinazları inhibe ederler. (D1) TIMP-2, tüm dokularda yapısal olarak eksprese edilirken; TIMP -1, -3, -4 ekspresyonu uyarılabilir ve doku spesifikliğı göstermektedir. Buna göre TIMP-1 üreme organ sistemlerinde; TIMP-3 kalp, böbrek ve timüste; TIMP-4 beyin, kalp, yumurtalık ve iskelet kasında daha çok bulunmaktadır. TIMP'ler spesifik metalloproteinazlar için farklı afinite gösterirler (88). TIMP-1-/- olan farelerde akut akciğer hasarı, alveolar alanda hızlanmış re-epitelizasyon ve artmış nötrofil girişi ile karakterize edilmiştir (89, 90). TIMP-3-/- farelerde alveolar alanların kendiliğinden genişlediğı görülmüştür (91). Bu gibi anfizem benzeri değişiklikler, anormal MMP aktivitesine dayandırılmıştır. Gill ve arkadaşları, TIMP3-/- akciğerlerde artmış jelatinaz aktivitesini (92) ve sentetik MMP inhibitörü ile gelişimsel akciğer fenotipinin kısmen kurtarıldığını (93) belirlediler. MMP ve TIMP arasındaki dengenin bozulması; tümör

invazyonu, metastazı, anjiyogenezi ve yara iyileşmesini kapsayan birçok patolojik süreç ile sonuçlanabilir (94).

#### **2.3.3.4.2 Diğer Doğal İnhibitörler**

$\alpha$ -2-makroglobulin, pek çok aktif enzimi yakalayan ve daha sonra maktrofajların çöpçü reseptörleri tarafından alınmasına aracılık eden geniş spektrumlu bir inhibitördür. Membran bağlı bir glikoprotein olan RECK (reversion-inducing-cystein-rich protein with kazal motifs) ise; MMP-2, -9 ve -14'ü (95) inhibe etmektedir. CT-PCPE (a C-terminal fragment of procollagen C-terminal proteinase enhancer), in vitro'da MMP inhibitörü olarak fonksiyon gösterir (96) ancak in vivo özellikleri henüz bilinmemektedir.

#### **2.3.3.4.3 Oksidatif İnaktivasyon**

Düşük konsantrasyonlarda otolitik aktivasyonu desteklemesine ek olarak HOCl'nin daha yüksek konsantrasyonları veya uzamış maruziyet süresi, aktive edilmiş MMP-7'yi inaktive eder (74). Spesifik bir çift triptofan-glisin (WG) kalıntısının HOCl aracılı oksidatif çapraz-bağlanması, MMP'nin tamamen inaktivasyonu ile sonuçlanır. Son ürün olan WG-4, indol halkası ve en yakın glisinin amid bağı arasında çapraz bağı olan yoğun biçimde floresan aromatik bir bileşiktir. Nükleer manyetik rezonans (NMR) çalışmaları, WG-4'ün kendi peptid yapısı üzerinde belirli konformasyonel kısıtlamalara neden olduğunu göstermiştir. Bu nedenle WG-4, lokal peptid yapısını değiştirerek MMP-7 fonksiyonu üzerinde uzun-aralıklı etkiler gösterebilir.

Fagositler tarafından HOCl'nin periselüler üretimi, inflamatuvar durum içerisinde MMP'lerin hem aktivasyonunu hem de inaktivasyonunu regüle etmek için fizyolojik bir mekanizma sağlar. HOCl, ilk hedef olarak muhtemelen prodomainde bulunan tiyol kalıntısını tercih eder ve onun oksijenasyonuna neden olur. Bunun sonucunda, hızlı ve otolitik bir aktivasyon gerçekleşir. İnflamasyon sırasında olduğu gibi; HOCl üretiminin devam edilmesi, daha sonra proteinde bulunan diğer bölgeleri ve kritik kalıntıları etkilemeye başlar ve enzim katalitik aktivitesini kaybeder. Böylelikle oksidanlar, MMP aktivitesini sınırlayabilirler.



MMP'lerin en büyük rolü; ESM'yi yıkabilme özelliğinden gelir. Yapılan çalışmalarda bir takım ESM bileşenlerinin proteolizi ile farklı sinyal iletim yetenekleri olan gizli domainlerin salındığı gösterilmiştir. Örneğin; MMP-2 tarafından laminin 5'in parçalanması, hücre motilitesi ve migrasyonuna neden olan bir gizli bir migrasyona öncülük eden bölgenin serbest kalmasına neden olur. (102). Ayrıca ESM'nin MMP'ler tarafından proteolizi, matrikse tutunan ve hücre proliferasyonu, invazyonu ve sağ kalma katkıda bulunan transforme eden büyüme faktörü-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin salındığı da gösterilmiştir (103).

İsimlerinde matriks geçmesine rağmen, MMP substratları ESM bileşenleri ile sınırlandırılmamıştır ve MMP aktivitesinin hedefi olan çeşitli matriks dışı proteinler de tanımlanmıştır. MMP'ler tarafından adhezyon proteinlerin parçalanması, tümör hücrelerinin invazyon ve migrasyon yeteneğine katkıda bulunmaktadır. Örneğin, MMP-3 ve MMP-7 in vitro'da hücre migrasyonu ve invazyonunu uyaran çözünür ektodomain fragmenti oluşturmak için E-kadherini parçaladığı gösterilmiştir (104). Bunlara ek olarak; MMP'ler bir takım büyüme faktörlerini (FGF, TGF $\beta$ , IL1- $\beta$  gibi) parçalayarak, proliferatif değişiklikleri uyaran aktif molekülleri oluşturabilirler (105). Ayrıca MMP'ler aktif insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF) ligandının salınımı ile sonuçlanan IGF-BP gibi büyüme faktörü modülatörlerini de parçalayabilirler. (106, 107). Ancak MMP'ler tarafından mitojenik faktörlerin parçalanması, bu faktörlerin aktivitelerinin inhibisyonu ile de sonuçlanabilir. Örneğin, hem IL-2'nin MMP-9 tarafından parçalanması (108), hem de FGF reseptörü (FGFR) tip I'in MMP-2 tarafından parçalanması (109) bu faktörlerin inaktivasyonu ile sonuçlanır.

Hücre proliferasyonunu değiştiren mitojenik faktörlerin parçalanmasına ek olarak, MMP'ler hücre ölümünü regüle edebilen substratları parçaladığı görülmüştür. Örneğin, MMP'ler; anoikis olarak bilinen hücre ölümünün bir formu ile sonuçlanan integrin-ESM etkileşimlerini yıkıma uğratabilirler (110). Ayrıca, TNF $\alpha$  ve Fas ligandı (FasL) gibi hücre ölümünü uyaran molekülleri proteolize edebilirler. (111, 112). Böylece MMP'ler potansiyel regülatör moleküllerin biyolojik aktivitelerini proteolize ederek ve değiştirerek tümör hücre bütünlüğüne ve progresyonuna katkıda bulunmaktadır.

### 2.3.5 Kolorektal Kanserde MMP'ler

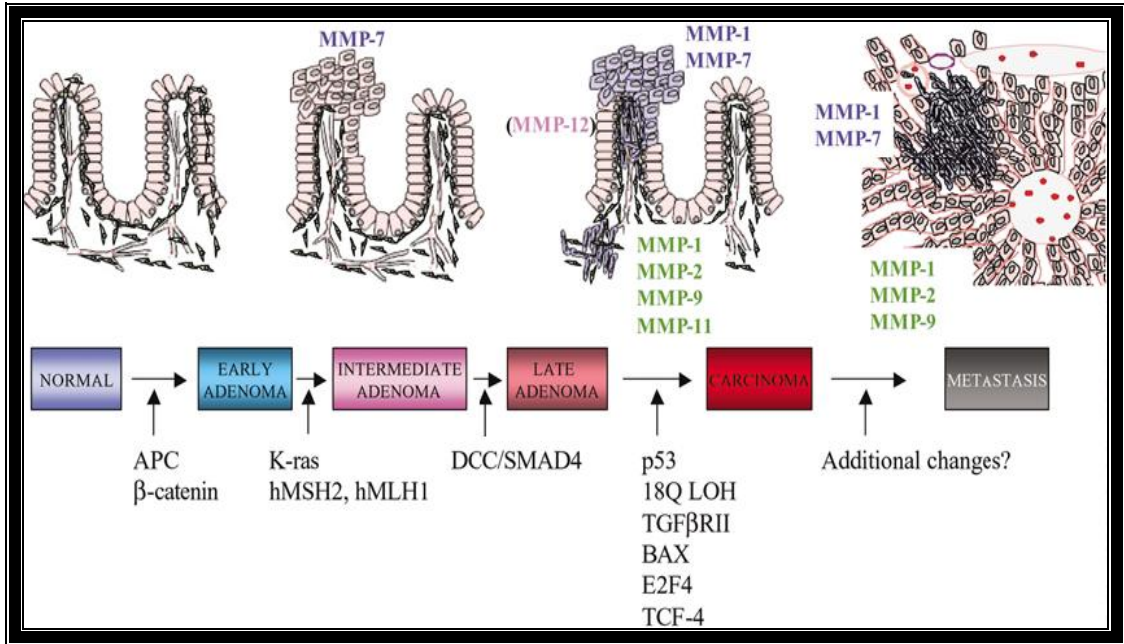
Birçok MMP, çeşitli insan malign tümör türlerinde aşırı eksprese edilmektedir ve bu enzimlerin ekspresyonu ve aktivasyonu; metastatik potansiyeli ve tümör agresifliği ile artmaktadır. İnsan kolon tümörlerinde MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12 ve -14'ün eksprese edildiği gösterilmiştir. Yapılan araştırmalarda MMP-7'nin (bir epitel spesifik MMP), insan malign kolorektal tümörlerin % 85'inde aşırı eksprese edildiği belirlenmiştir (113). Epidemiyolojik çalışmalarda, KRK'nın klinik sonuçları ile çeşitli MMP ekspresyonlarının prognostik değerleri incelenmiştir. Örneğin, KRK'de MMP-12'nin ekspresyonu (makrofaj spesifik metalloelastaz) koruyucu fayda sağladığı görülmektedir. MMP-12 ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, evre, lenf düğümü metastazı, karaciğer metastazı, makro ve histolojik sınıflandırma veya tümör boyutu arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır. Buna rağmen, MMP-12 ekspresyonunun eksikliği ile lenfatikler, vasküler sistem ve intestinal duvara invazyon arasında anlamlı bir korelasyon görülmüştür. Lokal rekürrens veya uzak metastaz ile herhangi bir ilişki olmamasına rağmen, MMP-12 ekspresyonunun sağ kalım kazancı arasında bir bağlantı bulunmaktadır. MMP-12'nin ekspresyonu olan hastalar (% 76) MMP-12 ekspresyonu olmayan hastalara (% 36) oranla 2 kat daha fazla sağ kalıma sahip olduğu görülmüştür (114). Çok değişkenli analiz, MMP-12 ekspresyonunun sağ kalımın anlamlı bir belirleyicisi olduğunu onaylamıştır. Ancak MMP-12'nin bu koruyucu avantajı hangi mekanizma ile sağladığı henüz bilinmemektedir.

Diğer MMP'lerin daha zayıf sağ kalım ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. MMP-9 mesajcı RNA (mRNA) ekspresyonu normal dokuya göre, tümörde 5 kat daha fazladır. Bu yüksek MMP-9 ekspresyonu, 30 ay sonra ölçüldüğünde hastalığın rekürrens olasılığının artması ile bağlantılıdır. Yüksek düzeyde MMP-9 içeren hastalarda (% 63,4) düşük düzeyde MMP-9 içeren hastalara (% 10) göre, hastalık 6 kat daha sık tekerrür eder. Ayrıca Kaplan-Meier sağ kalım analizi, yüksek MMP-9 mRNA ekspresyonuna sahip hastalarda düşük sağ kalım oranı olduğunu göstermiştir. Tek değişkenli analiz ile zayıf sağ kalımın; yüksek MMP-9 mRNA ekspresyonu, tümör diferansiyasyonu ve Dukes' evreleri ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir, ancak MMP-9 çok değişkenli analiz ile test edildiğinde sadece sağ kalımın indikatörü olarak istatistiksel önemi olduğu yaklaşımına varılmıştır (115).

Bir prognostik indikatör olarak MMP-7'nin analizi, pozitif MMP-7 ekspresyonunun invazyon derinliği, lenf düğümü metastazı, lenfatik invazyon ve ilerlemiş Dukes' evreleri ile karşılıklı ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir. Kaplan-Meier yaşam tablosu; 5-yıl sağ

kalımın, tümörlerinde MMP-7 ekspresyonu olmayan hastalarda (% 77,3) MMP-7 ekspresyonu olan hastalara (% 21,8) göre 3,5 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Çok değişkenli analiz, MMP-7 ekspresyonunun mortalite sonuçlarının anlamlı bir indikatörü olduğunu onaylamaktadır (116).

MMP-1 ekspresyonu; tümör yayılımı, düzeyi, lenf düğümü, metastaz varlığı ve kötü prognoz ile karşılıklı ilişki içerisinde. Normal kolorektal epitelde, MMP-1 ekspresyone edilmemektedir; ancak kolorektal karsinomaların % 76'sında MMP-1 için immünoaktivite belirlenmiştir (117). Bu veriler kolorektal kanserde MMP-1, -7, -9 ekspresyonunun anlamlı olarak zayıf sonuçlarla bağlantılı olduğunu göstermektedir (Şekil 2) (118) ve KRK hastalarını tedavide seçici MMP inhibitörlerinin terapötik faydası olabileceğini göstermiştir.



**Şekil 7.** KRK progresyonunda MMP'lerin fonksiyonu Koruyucu MMP, Epitelyal MMP, Stromal MMP. MMP'ler; primer adenom büyümesi, KRK hücrelerinin invazyonu, sekonder bölgede metastazın migrasyonu ve metastazın büyümesini kapsayan KRK'nin tüm adımlarında katkıda bulunmaktadır. MMP-12 ile sağ kalım arasında pozitif bir ilişki olduğu ve KRK gelişimine karşı koruyucu avantajlar sağladığı gösterilmiştir. MMP-7, tümör hücrelerinin adenomlarında ekspresyone edilen tek MMP iken; normal kolonik epitel hücrelerinde ekspresyone edilmemektedir. MMP-7 ekspresyon düzeyi, adenomdan karsinoma doğru artış göstermektedir. MMP-1, -2, -9 ve -11 kolorektal karsinomalarda stromal hücrelere bağlantılı olan tümörde ekspresyone edilir (119).



## 2.4 MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-7 (MATRİLİZİN)

MMP-7, glandular epitelde eksprese edilen MMP ailesinin bir üyesidir (120). Bu nedenle MMP-7 fonksiyonu, substratlarla etkileşebileceği ya apikal ya da bazolateral kompartmana (veya her ikisine de) salınmasıyla etkilenebilmektedir. MMP-7; normal meme ve kulak altı tükürük bezlerin duktal ve glandular epitelinde, karaciğer, pankreas, prostat ve peribronşiyal bezlerde temel olarak eksprese edilmektedir. İmmünohistokimyasal analizlerde MMP-7'nin, hücre içinde veya hücre yüzeyinde çok az bazolateral boyama ile birlikte primer olarak apikal ve lümeninde olacak şekilde glandular epitelde boyandığı görülmüştür (121). Ayrıca MMP-7, prodefensinler gibi antibakteriyal peptidleri proteolitik olarak aktive ederek akciğer ve barsak gibi organlarda doğuştan bağışıklığı korumak gibi önemli rollere de sahiptir. Antimikrobiyal propeptidler olan fare Paneth hücre  $\alpha$ -defensin prekürsörü, MMP-7 tarafından olgun defensin oluşumu için parçalanmaktadır (122). Tümör progresyonu sırasında MMP-7, glandular epitelden ortaya çıkan malign ve benign tümörlerde eksprese edilmektedir. MMP-7; elastin, tip IV kollajen, fibronektin, vitronektin, aggrekan ve proteoglikanları içeren ESM bileşiklerine karşı genel bir substrat spesifikliğine sahiptir (Tablo 7) (120). MMP-7, ayrıca ESM bileşenleri dışındaki bazı biyoaktif moleküllerin regülasyonunda da rol almaktadır. Diğer bazı MMP'ler gibi MMP-7 de; ektodomainde TNF- $\alpha$  prekürsörü (123), FasL (124), heparin-bağlama epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) (85), E-kadherin (104) ve  $\beta$ 4-integrin (125) gibi hücre yüzeyi moleküllerini kesme fonksiyonuna sahiptir.

FasL, TNF- $\alpha$  ve HB-EGF apikal olarak lokalize olurken; E-kadherin,  $\beta$ 4-integrin ve çeşitli ESM bileşenleri bazolateral olarak lokalize olmuştur. Polarize bir sistemde MMP-7 salınımının hangi mekanizma ile regüle edildiği henüz net değildir (121). Harrell ve arkadaşları bir *in vitro* model kullanarak, proMMP-7'nin primer olarak bazolateral kompartmana salındığını ileri sürmüşlerdir. Ancak MMP-7 apikal kompartmanda daha aktiftir ve bu durum MMP-7 aktivatörlerinin birlikte salındığı düşüncesini desteklemektedir.

**Tablo 7.** MMP-7'nin biyokimyasal süreçleri (12)

<i>Fonksiyon</i>	<i>Substrat</i>	<i>Lokalizasyon</i>
<b>Degredasyon</b>	Elastin	ESM
	Tip IV kollajen	ESM
	Fibronektin	ESM
	Vitronektin	ESM
	Agrekan	ESM
	Proteoglikan	ESM
	IGFBP-1,-2,-3,-4,-5,-6	Serum
	Plazminojen	Serum
<b>Aktivasyon</b>	ADAM-28	Lenfositler, bazı kanser hücreleri
	İntestinal $\alpha$ -defensin	İnce barsak kriptlerindeki Paneth hücreleri
	proMMP-2	Çeşitli
	proMMP-9	Çeşitli
<b>Kesme</b>	B4-integrin	Hücre yüzeyi
	E-kadherin	Hücre yüzeyi
	FasL	Hücre yüzeyi
	proHB-EGF	Hücre yüzeyi
	TNF- $\alpha$ prekürsörü	Hücre yüzeyi

## 2.4.1 Kanserde MMP-7'nin Özellikleri

### 2.4.1.1 Kanserde MMP-7'in Dağılımı

MMP'lerin birçoğu stromal fibroblastlar, makrofajlar ve endotelial hücreler gibi stromal hücreler tarafından predominant olarak üretilmesine rağmen, MMP-7'yi de kapsayan bazı MMP'ler; tümör hücreleri tarafından da eksprese edilmektedirler. MMP-7; mezenkimal tümörlerde ve çeşitli epitel tümörlerde aşırı eksprese edilmektedirler. Yapılan araştırmalarda MMP-7'in; özafagus (126), mide (127), kolon (116), karaciğer (128) ve pankreas (129) gibi sindirim organlarının invaziv kanserlerinde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. MMP-7 ekspresyonunun ilerlemiş klinikopatolojik evreler ve kötü prognoz ile bağlantısı olduğunu belirten önemli kanıtlar bulunmaktadır (126). MMP-7 ayrıca akciğer (130), deri (131), meme (132), prostat (133) gibi diğer organların kanserlerinde de aşırı eksprese edilmektedir.

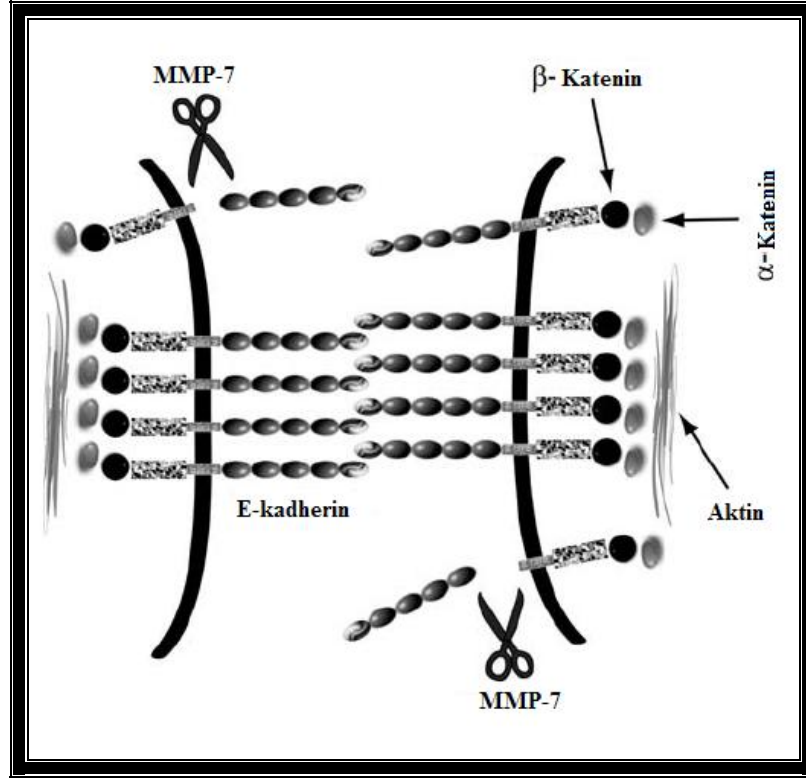
Kolorektal kanserde MMP-7 için invazif bölgedeki kanser hücrelerin sitoplazması bazolateral olarak boyanırken, neoplastik bezlerin apikal olarak bir boyama gözlenmektedir (116). İnvazif bölgedeki kanser hücrelerinde MMP-7'nin bazolateral olarak boyanması pek çok epitel tümör türünde görülmüştür ve bu durum MMP-7'nin matriks parçalayan proteaz olarak direk rolü olduğu düşüncesini ortaya koymaktadır.

#### **2.4.1.2 Kanser İnvazyonunda MMP-7'in Rolü**

Diğer MMP'ler gibi MMP-7 de; ESM substratlarını proteolitik olarak parçalayarak kanser invazyonunu tetiklemektedir. Ayrıca MMP-7; tümör invazyonunu kolaylaştırmak amacıyla pro-MMP-2 ve pro-MMP-9 gibi diğer MMP'leri aktive edebilmektedir (Tablo 7) (134). Yapılan araştırmalarda in vitro MMP-7'in mide, kolon ve pankreas kanser hücrelerinin invazivliğini desteklediği ve MMP-7 ekspresyonu ile özafagus, mide, kolon, karaciğer ve pankreas kanser hücrelerinin invazivliği arasında karşılıklı ilişki bulunduğu ileri sürülmüştür (126).

MMP-7 ayrıca, ESM dışı proteinlerin aktivitelerini regüle ederek tümör invazyonuna katkıda bulunmaktadır. Bir transmembran proteini olan E-kadherin, kateninlerin sitoplazmik kuyruğu ile etkileşerek hücre adhezyonunun pozitif regülasyonunda görev alır. MMP-7 ve MMP-3; E-kadherinin ektodomain kesme fonksiyonu ile çözünür E-kadherininin salınmasına neden olurlar. (104) (Şekil 8). Çözünür E-kadherin, E-kadherin fonksiyonunu inhibe ederek tümör hücrelerinin invazyon ve migrasyonunu destekler.

Osteoblastik ve osteolitik değişiklikler ile bağlantılı olan insan metastatik prostat kanserine benzeyen bir kemirgen modelinde; osteoklastlar tarafından üretilen MMP-7, nükleer faktör-kappa B ligandının reseptör aktivatörünü (RANKL) osteoklast aktivasyonunu destekleyen çözünür formuna dönüştürebilme yeteneğine sahiptir (135).



**Şekil 8.** E-kadherin adherans bağlantılarının MMP-7 tarafından parçlanması (12)

#### 2.4.1.3 Kanser Büyümesinde MMP-7'in Rolü

Yapılan araştırmalarda, MMP-7'in tümörigenezin erken evrelerinde etkisi olduğu gösterilmiştir (136). MMP-7 tarafından ESM dışı proteinlerinin modifikasyonu, MMP-7'in erken tümörigenezde rolü olduğunu gösteren mekanizmalardan biridir. MMP-7; olgun HB-EGF ürününü elde edebilmek için HB-EGF prekürsörünün (proHB-EGF) ektodomainini keser. Olgun HB-EGF; ErbB4 reseptörünü aktive ederek hücrel proliferasyonu tetikler ve apoptozu inhibe eder (85).

IGF sistemi; mitojenik ve antiapoptotik etkileri aracılığıyla tümörigenezde önemli bir rol oynamaktadır. IGF'lerin biyolojik olarak bulunabilirliği, IGFBP'lerle etkileşimleri tarafından regüle edilmektedirler. IGFBP'lerin proteolitik modifikasyonu, IGF'lerin biyolojik olarak bulunabilirliği arttırmaktadır. MMP-9, MMP-3 (137), MMP-7 (138) ve MMP-19 (139); IGFBP-3 gibi IGFBP'ler üzerinde proteolitik etki göstererek IGF regülasyonunda görev almaktadır. MMP-7; tüm IGFBP'leri (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, -6) parçalayabilme fonksiyonuna sahiptir, böylece IGF'lerin biyolojik olarak bulunabilirliğini arttırarak kanser hücrelerinin büyümesini ve sağ kalımını desteklemektedir (140).

ADAM ailesi üyesi olan ADAM-28, MMP-7'in substratıdır (141). Yapılan araştırmalarda, MMP-7 tarafından aktive edilen ADAM-28'in, IGFBP-3'ün hem serbest hem de IGF-I veya IGF-II ile kompleks formunu parçalayabildiği belirlenmiştir.

#### **2.4.1.4 MMP-7'in Apoptozdaki Rolü**

Programlanmış hücre ölümü yani apoptoz; istenmeyen hücrelerin uzaklaştırıldığı fizyolojik bir süreçtir. Apoptoz, çeşitli uyaranlar tarafından başlatılabilmektedir. FasL ölüm reseptörü Fas'ın bir transmembran uyarandır ve başlıca apoptoz tetikleyicilerinden biridir.

Yapılan çalışmalarda, çözümlü FasL'nin (sFasL) oluşması için MMP-7'in; kanser ve kanser olmayan hücre membranlarından membran-bağlı FasL'nin (mFasL) ektodomainini kestiğini göstermektedir (124). sFasL'nin salınması, Fas aktivasyonu aracılığıyla çevre hücrelerde apoptozu artırır. Ancak kanser hücreleri bu proapoptotik sinyale karşı dayanıklıdır. Çevredeki normal hücrelerin apoptotik etkisi ve kanser hücrelerinin antiapoptotik etkisi arasındaki farklılıkların olası nedenleri; sFasL'nin mFasL'ye kıyasla daha düşük apoptotik potansiyel taşıması ve çoğu kanser hücrelerinin sinyal iletim kaskatında bulunan bazı proteinlerin düzeylerindeki anormallikler nedeni ile Fas-aracılı apoptoza rölatif olarak daha dirençli olmasıdır (142).

TNF- $\alpha$ , MMP-7 tarafından hücre yüzeyinden yavaşça parçalanabilmektedir ve bir biyoaktif sitokin olan çözümlü TNF- $\alpha$  üretilir. TNF- $\alpha$ , TNF-reseptör-1'e bağlanarak apoptozu artırabilir. Ancak TNF- $\alpha$ 'nın MMP-7 tarafından parçalanması TNF- $\alpha$  dönüştüren enzime göre (TACE) yaklaşık 30 kat daha düşük spesifiklik sabitine sahiptir (143).

#### **2.4.1.5 Anjiyogeneizde MMP-7'in Rolü**

Anjiyogeneiz, yeni kan damarlarının gelişimi veya büyümesi sürecine verilen isimdir ve ayrıca neovaskülarizasyon olarak da bilinir. Bu süreç, kanser hücrelerinin büyümesi ve çevre dokulara saldırması için esansiyeldir. Anjiyogeneiz sırasında, MMP'ler; ESM içerisinde de novo kapillerin büyüebileceği ve uzayabileceği yeni açıklıkların oluşumunda önemli rol oynamaktadır.

Yapılan araştırmalarda, MMP'lerin tümör hücrelerine komşu vasküler endotel hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir. MMP-7-pozitif tümör hücrelerine yakın olan vasküler endotel hücrelerde; in situ hibridizasyon ve immünohistokimya teknikleri kullanılarak MMP-7'ye ait mRNA ve protein düzeyleri belirlenmiştir (144). Ayrıca doz-

bağımlı durumda in vitro'da MMP-7'in HUVEC hücrelerinin proliferasyonunu hızlandırdığı gösterilmiştir (145). Gastrik hücrelerde immünohistokimyasal araştırmalarda mikrodamar yoğunluğunun MMP-7 ekspresyonu ile karşılıklı ilişki içerisinde olduğunu görülmüştür. Bir başka çalışmada insan kolon kanser hücrelerinin bir fare modeline nakledilen bölgede, MMP-7-uyarımli anjiyogenezin, MMP-7-spesifik bir antisense oligonükleotid tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir (146). Bu sonuçlar MMP-7'in vasküler endotel hücrelerdeki proliferatif etkisi ile direk olarak anjiyogenezi tetiklediğini ileri sürmektedir.

Diğer yandan MMP'ler antianjiyojenetik etkiye sahip olan polipeptidleri oluşturarak anjiyogenezi inhibe etmektedirler. MMP-2, MMP-7, MMP-9 ve MMP-12 (147) bir anjiyogenez inhibitörü olan anjiyostatin fragmenti üretebilmek için insan plazminojenlerini parçalayabilme yeteneğine sahiptirler. Anjiyostatin endotel hücre proliferasyonunu azaltır ve endotel hücre apoptozunu tetikler ve böylece tümör büyümesinin potansiyel inhibitörü olarak rol alır (148). Diğer bir anjiyogenez inhibitörü olan endostatin, kan damarlarının büyümesini inhibe etme potansiyeline sahiptir. In vitro'da endostatin-içeren bir fragment; MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13 ve MMP-20 tarafından (149); in vivo'da ise MMP-7 tarafından (150), tip XVIII kollajenden oluşmaktadır. Ayrıca, antianjiyogenik olan neostatin-7 (C-terminal 28-kDa endostatin-içeren proteolitik fragment), MMP-7'in proteolitik etkisi ile tip XVIII kollajenden oluşmaktadır (151).

VEGF, anjiyogenezin en etkili mediyatörlerinden biridir. Yapılan son çalışmalar; MMP-3, -7, -9 ve -19'un, VEGF'in matriks bağıli izoformunlarını parçalayabildiğini ve matriksten çözünabilir fragmentler olarak salındığını göstermiştir. Böylece çözünür VEGF; ya MMP-bağımlı parçalama ya da matrikse bağlanma bölgesini uzaklaştıran mRNA splicing yoluyla oluşmaktadır. Ancak beklenenin aksine tümör sağ kalım için gerekli olan damar büyümesinde çözünür VEGF, matriks-bağıli VEGF'den daha az etkilidir. Bu durum çözünür VEGF ve matriks-bağıli VEGF'in aynı hücre yüzey reseptörü (VEGFR2) üzerinden etki etmelerine rağmen, farklı sinyal iletim sonuçları sağladığını ileri sürmektedir (152).

Sonuç olarak; MMP'lerin tümör anjiyogenezini regüle ettiği mekanizma oldukça karışıktır. MMP-7 ve diğer MMP'ler her zaman proanjiyogenik değil aynı zamanda antianjiyogenik etki de gösterebilmektedir ve bu iki etki arasındaki dengenin nasıl değiştiği henüz net değildir.

#### 2.4.2 MMP-7'nin KRK'deki Etkisi

Yapılan pek çok çalışmada, KRK'da pek çok MMP türünün hem ekspresyonunda hem de aktivitesinde artış olduğu kanıtlanmıştır (153). Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda bir takım spesifik MMP'lerin kolorektal tümörigenezinin erken evrelerinde ayrı bir rol oynadıkları anlaşılmıştır.

Özellikle erken kolonik adenomların büyümesinde ve invaziv kansere dönüşmesinde MMP-7 önemli bir rol oynamaktadır (136). Yapılan araştırmalarda kolonik adenokarsinomların % 90'ında MMP-7 ekspresyonunun olduğu gözlenmiştir (113). Ayrıca immünreaktif MMP-7'nin, kolorektal adenom hücrelerin sitoplazmasında lokalize olduğu belirlenmiştir (154). Artmış MMP-7 ekspresyonunun, nodal ve distal metastaz ile karşılıklı ilişki içerisinde olduğu in situ hibridizasyon ve immünohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir (136).

FAP olan ve APC geninde mutasyon taşıyan bireylerde MMP-7'nin aşırı eksprese olması, MMP-7'nin KRK gelişimi ve progresyonundaki önemini ortaya koymaktadır. APC genindeki fonksiyonel mutasyonlar, KRK'nın % 80'inde bulunmaktadır ve  $\beta$ -kateninin nükleer birikimine neden olmaktadır (155).  $\beta$ -katenin, sitoplazmada TCF'ye bağlanarak nükleusa girer ve burada c-myc, MMP-7, siklooksijenaz, ürokinaz-tip plazminojen aktivatör reseptörü, CD44 ve siklin D1'i içeren hedef genlerin ekspresyonunu düzenler. Bu proteinlerin KRK'da aşırı eksprese olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalar KRK'da, MMP-7 transkriptleri ve nükleer  $\beta$ -katenin protein düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir (156). Ayrıca  $\beta$ -katenin birikimi olmayan hücrelerde MMP-7 ekspresyonu belirlenememiştir.

Bazal fizyolojik durumda,  $\beta$ -katenin gap junctionlardaki E-kadherin ile kompleks oluştururken sitozolde, glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), konduktin/aksin ve APC ile büyük bir kompleks formundadır. GSK-3 $\beta$ , daha sonra  $\beta$ -kateninin ubiquitinyasyonuna ve proteolitik degradasyonuna neden olan,  $\beta$ -katenin fosforilasyonundan sorumludur (157). APC mutasyonları,  $\beta$ -kateninin degradasyonunu inhibe eder, dolayısıyla nükleer birikimine ve daha sonra transkripsiyon aktivasyonuna neden olur (156).

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### 3. **MATERYAL ve YÖNTEMLER**

MMP-7'nin KRK üzerindeki önemini incelemek amacıyla beş farklı teknikle yararlanılmıştır:

1. MMP-7 mRNA ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için “Real Time Polimerase Chain Reaction- Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR)” yöntemi,
2. MMP-7'nin protein ekspresyonunun belirlenmesi için “Enzim-Bağlı Immünosorbent Analizi (ELISA)”,
3. Pro- ve aktif- MMP-7 miktarının belirlenmesi için “Kazein Zimografi” yöntemi,
4. MMP-7 proteinin hücrel lokalizasyonunun belirlenmesi için “İmmünohistokimya (IHC)” yöntemi,
5. MMP-7 proteinin hücrel lokal aktivitesinin belirlenmesi için “In situ Kazein Zimografi (ISZ)” yöntemi.

#### 3.1 MATERYAL

##### 3.1.1 Kolon ve Rektum Doku Materyalleri

Çalışmamızda, kolon ve rektum kanser teşhisi konmuş hastalardan Dokuz Eylül Üniversitesi etik kurul onayı ile tümör dokuları ve tümörün en az 10 cm uzağından alınmış eşlenik normal dokuları, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından cerrahi müdahale sonucu alınmıştır. Operasyon sonrası alınan doku örnekleri, steril bir kriyoviyal içerisine alınarak hızla sıvı nitrojen içerisinde donduruldu. Ayrıca IHC denemeleri için birer doku örneği % 10'luk formaldehit içeren tüplere alındı ve oda sıcaklığında saklandı. Sıvı nitrojende dondurulan örnekler ise deneyler gerçekleştirilinceye kadar -80°C'de saklandı.

##### 3.1.2 Hasta Grubunun Oluşturulması

Çalışmamızda PCR ile IHC (n=18) denemeleri ve ELISA (n=31) analizi için ayrı hasta grupları oluşturulmuştur. Buna göre hastaların klinikopatolojik verileri iki ayrı kısımda incelenmiş ve aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (Tablo 8, 9).



**Tablo 8.** PCR ve IHC denemelerinde kullanılan kolorektal kanserli hastaların klinikopatolojik verileri

PARAMETRE	OLGU	
	SAYI	%
<b><i>CİNSİYET</i></b>		
Erkek	12	66,7
Kadın	6	33,3
<b><i>YAŞ</i></b>		
65 ≤	9	52,9
65 >	8	47,1
<b><i>NEOADJUVAN TERAPİ</i></b>		
Var	10	58,8
Yok	7	41,2
<b><i>TÜMÖR YERLEŞİMİ</i></b>		
Kolon	4	23,5
Rektum	13	76,5
<b><i>TÜMÖR BOYUTU</i></b>		
5 cm <	9	64,3
5 cm ≥	5	35,7
<b><i>TÜMÖR DİFERANSİYASYONU</i></b>		
Düşük	13	86,7
Yüksek	2	13,3
<b><i>MÜSİNÖZ TÜMÖR</i></b>		
Var	2	11,8
Yok	15	88,2
<b><i>UZAK METASTAZ</i></b>		
Var	4	23,5
Yok	13	76,5

PARAMETRE	OLGU	
	SAYI	%
<b><i>T EVRE</i></b>		
Erken Evre (Tis-T1-T2)	7	41,2
Geç Evre (T3-T4)	10	58,8
<b><i>N EVRE</i></b>		
N0	11	64,7
N1	3	17,6
N2	2	11,8
NX	1	5,9
<b><i>P EVRE</i></b>		
pE0	1	5,9
pE1	4	23,5
pE2	6	35,3
pE3	3	17,6
pE4	3	17,6
<b><i>PERİNÖRAL İNVAZYON</i></b>		
Yok	14	82,4
Var	3	17,6
<b><i>LENFATİK İNVAZYON</i></b>		
Yok	12	75,0
Var	4	25,0
<b><i>VENÖZ İNVAZYON</i></b>		
Yok	15	88,2
Var	2	11,8

**Tablo 9.** ELISA analizinde kullanılan kolorektal kanserli hastaların klinikopatolojik verileri

PARAMETRE	OLGU	
	SAYI	%
<b><i>CİNSİYET</i></b>		
Erkek	21	67,7
Kadın	10	32,3
<b><i>YAŞ</i></b>		
65 ≤	17	56,7
65 >	13	43,3
<b><i>NEOADJUVAN TERAPİ</i></b>		
Var	17	56,7
Yok	13	43,3
<b><i>TÜMÖR YERLEŞİMİ</i></b>		
Kolon	9	30,0
Rektum	21	70,0
<b><i>TÜMÖR BOYUTU</i></b>		
5 cm <	24	80,0
5 cm ≥	6	20,0
<b><i>TÜMÖR DİFERANSİYASYONU</i></b>		
Düşük	22	84,6
Yüksek	4	15,4
<b><i>MÜSİNÖZ TÜMÖR</i></b>		
Var	5	16,7
Yok	25	83,3
<b><i>UZAK METASTAZ</i></b>		
Var	4	13,3
Yok	26	86,7

PARAMETRE	OLGU	
	SAYI	%
<b><i>T EVRE</i></b>		
Erken Evre (Tis-T1-T2)	16	53,3
Geç Evre (T3-T4)	14	46,7
<b><i>N EVRE</i></b>		
N0	17	56,7
N1	7	23,3
N2	5	16,7
NX	1	3,3
<b><i>P EVRE</i></b>		
pE0	1	3,3
pE1	10	33,3
pE2	6	20,0
pE3	9	30,0
pE4	4	13,3
<b><i>PERİNÖRAL İNVAZYON</i></b>		
Yok	25	83,3
Var	5	16,7
<b><i>LENFATİK İNVAZYON</i></b>		
Yok	20	69,0
Var	9	31,0
<b><i>VENÖZ İNVAZYON</i></b>		
Yok	24	80,0
Var	6	20,0

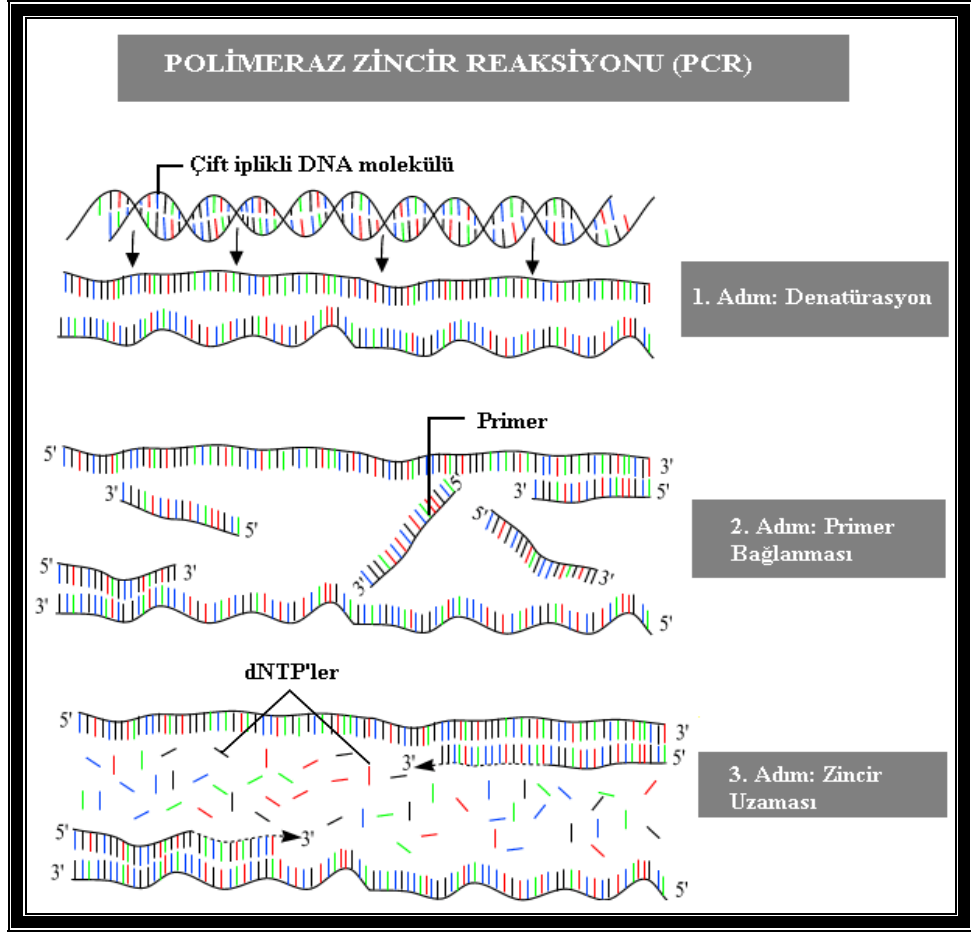
## 3.2 YÖNTEMLER

### 3.2.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Tepkimesi (Polymerase Chain Reaction - PCR), DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. PCR yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi ve DNA hesaplaması gibi değişik konularda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

PCR işlemi, genel olarak 30-40 döngüden oluşur ve her bir döngüde üç temel basamak bulunmaktadır (Şekil 9).

- 1) Denatürasyon basamağı (90-95 °C): Denatürasyon basamağında, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir ve bütün enzimatik reaksiyonlar durur (örneğin, bir önceki döngünün uzama basamağı)
- 2) Primer bağlanması (50-70 °C): Bu basamakta sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanarak kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç görevi yapar.
- 3) Elongasyon (Uzama) (70-75 °C): Bağlanma süresi bitince sıcaklık 70-75°C'ye çıkarılarak, sistem içerisinde bulunan ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz (Taq polimeraz) enzimi 5' → 3' yönüne olmak üzere ortamdaki deoksiniüksid trifosfatları (dNTP) kullanarak, primerlerin 3' ucuna nükleotidleri yerleştirir. Böylelikle zincir uzamasını sağlar ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir.



**Şekil 9.** PCR döngü basamakları (158)

Ard arda tekrarlanan denatürasyon, primer bağlanması ve uzama basamaklarıyla DNA sekansları üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni bir döngü sonucu sentezlenen ürünün ardışık döngüde primer için kalıp görevi görmesidir. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır.

PCR tekniği kullanılarak ayrıca gen ekspresyonunun analizi yapılabilmektedir. Bunun için öncelikle total RNA veya mRNA izolasyonu, daha sonra reverse transkriptaz tarafından komplementer DNA (cDNA) sentezi ve son olarak PCR işleminin uygulanması gereklidir (159).

### 3.2.1.1 RNA İzolasyonu

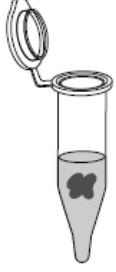
TriPure izolasyon reaktifi kullanılarak doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Tripure reaktifinde, fenol ve guanidin tiyosiyanat bir monofazik çözelti içerisinde birleştirilmiştir ve böylelikle hızlı ve etkili bir şekilde RNaz aktivitesi inhibe edilmiştir. Bu yöneme göre, Tripure reaktifi içerisinde dokular homojenize edilir ve daha sonra kloroform eklenerek faz ayırımı sağlanır. Üstte kalan şeffaf sulu fazda RNA, beyaz ara fazda DNA ve altta bulunan pembe renkli organik fazda protein bulunur. Daha sonra sıvı faza izopropanol eklenerek RNA çöktürülür ve etanol ile yıkama yapılır (160). Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 10'da gösterilmiştir.

**Tablo 10.** RNA izolasyonunda kullanılan cihaz ve malzemeler

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
Tissue Lyser Homojenizatör	Qiagen	-
Santrifüj Cihazı	Heraeus	-
TriPure Isolation Reagent (Trizol)	Roche	11667157001
Kloroform	Merck	M102431
Izopropanol	Riedel de Haen	24137
Absolute Etanol	Merck	1.00971.2500

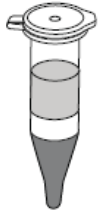
## Uygulama Adımları

### Homojenizasyon



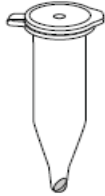
1. 100 mg doku örnekleri 1000 µl Trizol içeren tüplere alındı.
2. Tüplerin içerisine birer adet 0,5 mm çapında paslanmaz çelik boncuk konuldu ve 30Hz'de 4 dakika Tissue Lyser homojenizatörde homojenize edildi.
3. Homojenat 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

### RNA Ekstraksiyonu



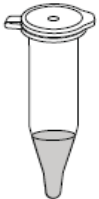
4. Homojenata 200 µl kloroform ilave edildi, pipetaj yardımıyla iyice karıştırıldı.
5. Daha sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
6. 12.000 rpm'de 30 dakika +4°C'de santrifüj yapıldı.

### RNA'nın Çöktürülmesi ve Yıkama



7. Oluşan 3 faz içerisinde üst faz yeni bir tüpe alındı ve üzerine 500 µl izopropanol konuldu. İyice pipetajla karıştırıldı.
8. Önce 2 saat -20°C'de, daha sonra bir gece -80°C'de saklandı.
9. 12.000 g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
10. Üst faz atıldı ve pellet 1,5 ml % 70 etanol ile yıkandı.
11. 12.000 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
12. Üst faz atıldı ve örnekler 5 dakika havada kurutuldu.

### RNA'nın Çözünmesi ve Kantitasyonu



13. 50µl RNaz free dH<sub>2</sub>O ile pelletin çözünmesi sağlandı.
14. PG T80 Spektrofotometre cihazı yardımıyla örneklerin 260nm'de absorbansları alındı. RNA konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$C_{\text{RNA}} = A_{260\text{nm}} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 40 \mu\text{g/ml}$$



### 3.2.1.2 RNA'nın % 1,2 Formaldehit Agaroz Jelde Görüntülenmesi

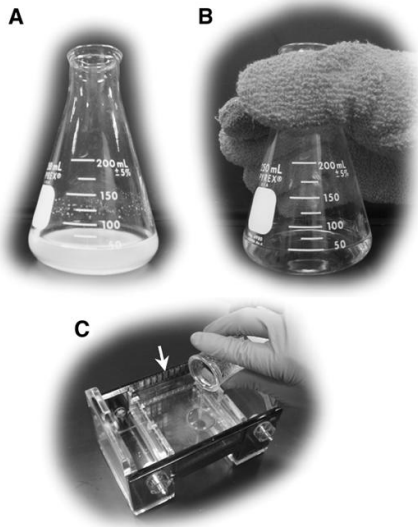
İzole edilen RNA örneklerinin bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla, RNA örnekleri % 1,2 Formaldehit agaroz jelde görüntülenmiştir. Çoğu RNA'lar intramoleküler baz eşleşmesinden dolayı sekonder yapılar oluştururlar. Bu durum elektroforez sırasında molekül boyutuna göre örneklerin doğru bir şekilde göç etmesine engel olur. Bu nedenle RNA örnekleri görüntülenirken jele, yürütme tamponuna ve örnek yükleme tamponuna denatürasyon ajanı olan formaldehit eklenir ayrıca örneklerin ısıyla denatürasyonu sağlanır (160). Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 11'de gösterilmiştir.

**Tablo 11.** %1,2 Formaldehit agaroz jelde hazırlanması ve görüntülenmesinde kullanılan cihaz ve malzemeler

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
Horizontal Elektroforez Sistemi	ATTO	-
Görüntüleme Cihazı	Vilber Lourmat	-
% 37 Formaldehit (12.3M)	Sigma	F1635
Agaroz Tip III High EEO	Sigma	A6138
Etidyum Bromür	Sigma	E8751
Gliserol	GPR	284546F
Agaroz Tip III High EEO	Sigma	A6138
EDTA	Sigma	E02P
MOPS	Sigma	M1254
N, N-Dimetil formamide	Sigma	D8654
Sodyum asetat	CODEY	366207

## Uygulama Adımları

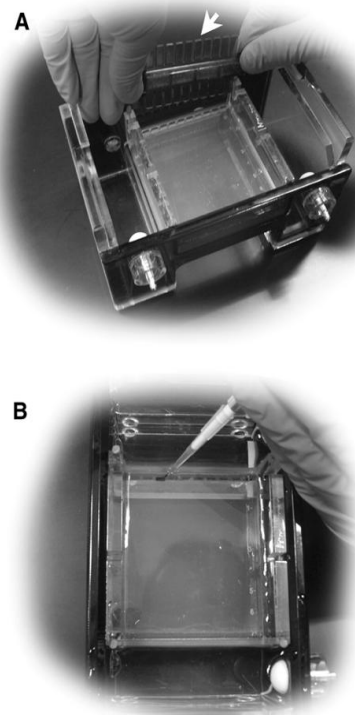
### RNA % 1,2 Formaldehit Agaroz Jel Hazırlama



1. 50 ml agaroz jel için bir erlene; 5 ml 10X FA jel tamponu (Tablo10), 45 ml RNaz free dH<sub>2</sub>O ve 6 gr agaroz konuldu (Şekil 10A).
2. Karışım eriyene kadar mikrodalga fırında 3-5 dakika kaynatıldı.
3. Yaklaşık 65°C'ye kadar soğutuldu (Şekil 10B).
4. Üzerinde 900µl % 37 Formaldehit ilave edildi.
5. Horizontal ATTA sistemine karışım döküldü ve tarakları yerleştirildi (Şekil 10C).
6. Jelin polimerleşmesi için yaklaşık 1 saat beklendi.

Şekil 10. % 1,2 Formaldehit agaroz jel hazırlama.

### İzole Edilen RNA Örneklerinin Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi



1. 5X RNA örnek yükleme tamponu (Tablo 12) ile RNA örnekleri karıştırılarak her kuyucukta 2 µg RNA olacak şekilde hazırlandı.
2. Hazırlanan örnekler 65°C'de 5 dakika inkübe edildi ve süre sonunda hızla buz içerisine alındı.
3. Daha önce hazırlanan % 1,2 formaldehit agaroz jel, elektroforez sistemine yerleştirildi ve üzerine 1X FA yürütme tamponu (Tablo 12) konuldu (Şekil 11A).
4. Taraklar jelde dikkatlice çıkarıldıktan sonra örnekler kuyucuklara yüklendi (Şekil 11B).
5. 80V sabit, 50mA'de 30-45 dakika elektroforez uygulandı ve jeller Vilber Lourmat cihazında görüntüledi.

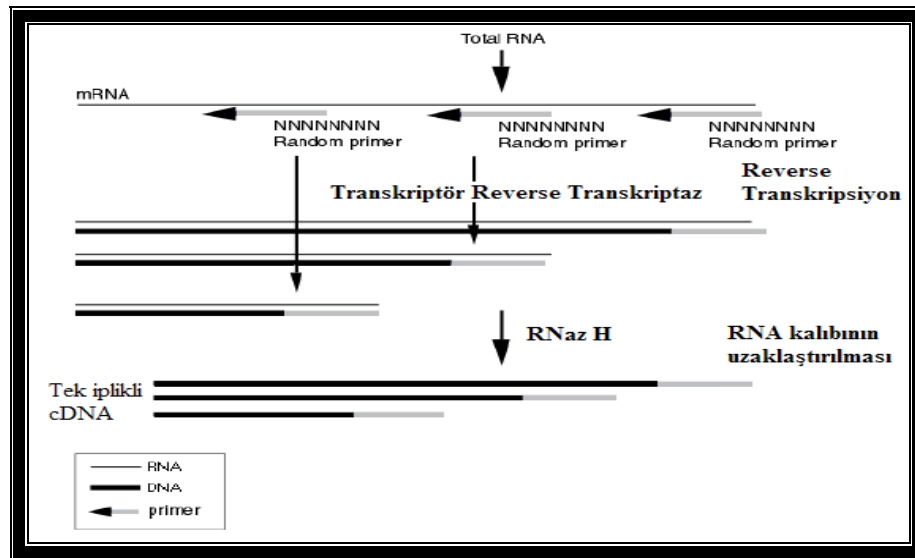
Şekil 11. İzole edilen RNA örneklerinin jele yüklenmesi.

**Tablo 12.** % 1,2 Formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler

<i>Çözeltiler</i>	<i>Özellikleri</i>
<b>10X Formaldehit (FA) Jel Tamponu</b>	10 mM EDTA, pH 7,0 200 mM MOPS 50 mM Sodyum Asetat
<b>5X RNA Örnek Yükleme Tamponu</b>	0,5 M EDTA pH 8,0 % 37 Formaldehit % 100 Gliserol Formamid 10X FA Jel Tamponu 40 µg/ml Etidyum Bromür
<b>1X FA Yürütme Tamponu</b>	50 ml 10X FA Jel Tamponu 10 ml % 37 Formaldehit 440 ml RNaz free dH <sub>2</sub> O

### 3.2.1.3 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

mRNA molekülünün tek iplikli cDNA molekülüne dönüştürülmesi işlemi iki basamakta gerçekleşir. İlk adımda mRNA random primer ile hibridize olur ve transkriptör reverse transkriptaz enzimiyle dNTP'ler kullanılarak zincir uzaması sağlanır. İkinci adımda ise, transkriptör reverse transkriptazın RNaz H aktivitesi aracılığıyla RNA-DNA hibritlerindeki RNA molekülü parçalanır ve tek iplikli cDNA elde edilir (Şekil 12) (160). Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 13'te gösterilmiştir.



**Şekil 12.** cDNA sentezi akım şeması (161)

**Tablo 13.** cDNA sentezinde kullanılan cihaz ve malzemeler

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
Thermal Block Cycler PCR Cihazı	MJ Research	-
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche	04896866001

### Uygulama Adımları

1. İlk olarak RNA örneklerinden 5 µg olacak şekilde alındı ve RNaz, DNaz free dH<sub>2</sub>O ile son hacim 11 µl'ye tamamlandı.
2. Her tüpe 2 µl random hegzamer primer konuldu.
3. RNA sekonder yapılarının denatürasyonu amacıyla tüpler, "Thermal Block Cycler PCR" cihazında 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sırasında örnek sayısına göre "RT mix" hazırlandı (Tablo 14).

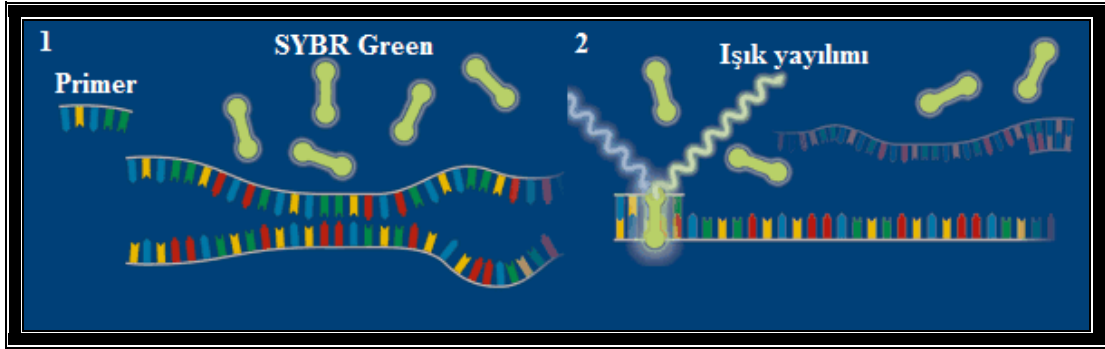
**Tablo 14.** RT mix hazırlama

<i>Reaktifler</i>	<i>Tek örnek için miktar</i>
Transcriptor RT Reaction Buffer	4 µl
Protector RNaz Inhibitor	0,5 µl
Deoxynucleotide mix	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase	0,5 µl

5. İnkübasyon sonrası her tüpe 7 µl RT mix konuldu.
6. Daha sonra tüpler Thermal Block Cycler PCR cihazına yerleştirilerek;
  - (a) 10 dakika 25°C'de
  - (b) 60 dakika 50°C'de
  - (c) 5 dakika 85°C'de
  - (d) ∞ zamanda +4°C'de inkübe edildi.
7. Sentezlenen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

### 3.2.1.4 Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Real Time PCR, çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresan sinyal veren boyalar (örn, SYBR Green) kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı ile açığa çıkan floresan sinyalin kantitasyonunu yapan bir PCR tekniğidir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "SYBR Green" miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. Floresan bir boya olan SYBR Green çift iplikli DNA heliksinin minör oluklarına bağlanır (Şekil 13). SYBR Green oldukça stabil bir boyadır, 30 amplifikasyon döngüsü sonunda sadece % 6 oranında aktivite kaybı gösterir.



Şekil 13. SYBR Green etki mekanizması

Real Time PCR yönteminin en önemli avantajları, reaksiyon sırasında veri takibinin yapılabilmesi, duyarlılığının yüksek olması, kantitasyon yapılabilmesi ve PCR sonrası elektroforez işlemini gerektirmemesidir.

Real Time PCR kullanımında SYBR Green kullanımının avantajları ucuz, kullanımı kolay ve duyarlı olmasıdır. Ancak bunun yanında bir takım dezavantajları da bulunmaktadır. SYBR Green çift iplikli DNA'ya bağlanma özelliği nedeniyle, reaksiyon sırasında oluşan primer-primer dimerlerine veya non-spesifik reaksiyon ürünlerine de bağlanarak hedef konsantrasyonun olduğundan daha fazla görünmesine neden olabilmektedir (158). Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 15'de gösterilmiştir.

**Tablo 15.** Real Time PCR denemesinde kullanılan cihaz ve malzemeler

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
Light Cycler PCR Cihazı	Roche	-
Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR GreenI	Roche	12239264001
Light Cycler Primer Set Human MMP-7	GmbH Hidelborg	150906
Light Cycler Primer Set Human $\beta$ -actin	GmbH Hidelborg	210307

### Uygulama Adımları

1.  $\beta$ -aktin housekeeping gen olarak kullanıldı.
2.  $\beta$ -aktin ve MMP-7 standartları 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranlarında seyreltildi.
3. Örnek sayısına göre Master mix hazırlandı (Tablo 16).

**Tablo 16.** Master mix hazırlama

<i>Reaktifler</i>	<i>Tek örnek için miktar</i>
PCR grade dH <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l
Light Cycler Primer Set	2 $\mu$ l
Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I	2 $\mu$ l

4. Kapiller soğutma bloğuna yerleştirildi ve her birine 10  $\mu$ l Master mix ve 10  $\mu$ l dilue edilmiş cDNA örnekleri konuldu. Kapillerin kapakları kapatıldı.
5. Kapiller 2000 rpm 30 saniye spin yapılarak çözeltilerin kapillerin dibinde toplanması sağlandı.
6. Kapiller, Light Cycler PCR cihazına yerleştirildi ve real time PCR işlemi başlatıldı. 95°C'de 10 dakika, 1 döngü denatürasyon basamağının ardından 95°C'de 10 saniye, 68°C'de 10 saniye, 72°C'de 10 saniye, 35 döngü amplifikasyon basamağı uygulandı.
7. Her bir örneğe ait MMP-7 mRNA ekspresyonu, eşlenik  $\beta$ -aktin mRNA ekspresyonuna oranlanarak "**Rölatif Kantitasyon**" yapılmıştır.

### 3.2.2 Kazein Zimografi ve ELISA Analizi

#### 3.2.2.1 Doku Homojenizasyonu

Kazein zimografi ve ELISA analizlerinde kullanılmak üzere, hücrelerin parçalanarak proteinlerin serbest kalması amacıyla doku homojenizasyonu yapıldı. Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 17’de gösterilmiştir.

**Tablo 17.** Homojenizasyon için kullanılan cihaz ve kimyasallar

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
Sonikatör	Sonic & Materials	-
Santrifüj Cihazı	Thermo	23225
Tris-HCl	Sigma	T5941
Sodyum klorür	Riedel de Haen	13423
Kalsiyum klorür	Riedel de Haen	12022
Brij 35	Sigma	430AG-6

#### Uygulama Adımları

1. Öncelikle 100 mg doku tartıldı ve 500 µl homojenizasyon tamponu (Tablo 18) içerisine alındı.
2. Sonikatör yardımıyla buz içerisinde dokular homojenize edildi.
3. Elde edilen homojenat 13.000 g’de 10 dakika +4°C’de santrifüj edildi.
4. Süpernatantlar yeni bir tüpe alındı ve analiz süresine kadar -20°C’de saklandı.

**Tablo 18.** Doku homojenizasyonunda kullanılan çözeltiler

<i>Çözeltiler</i>	<i>Özellikleri</i>
<b>Homojenizasyon Tamponu</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,0 10 mM CaCl <sub>2</sub> 0,15 M NaCl % 0,05 Brij 35

### 3.2.2.2 Protein Tayini

3.2.2.1’de elde edilen süpernatantta bulunan protein konsantrasyonu Bisinkonik Asit (BCA) yöntemi ile saptandı. Belirlenen protein değerleri, kazein zimografi yönteminde kuyucuklara yüklenecek protein miktarının belirlenmesi ve ELISA analizi sonucu elde edilen MMP-7 miktarının mg protein başına değerinin hesaplanması için kullanıldı. Yöntemin prensibi, alkali koşullarda protein tarafından  $Cu^{2+}$  iyonunun  $Cu^{1+}$  iyonuna indirgenmesine ve BCA reaktifi tarafından renk değişimine dayanmaktadır (162). Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 19’de gösterilmiştir.

**Tablo 19. Protein tayininde kullanılan cihaz ve malzemeler**

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
ELISA Okuyucu	Bio-Tek	-
Pierce BCA kit	Thermo	23225

#### Uygulama Adımları

1. Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA), Kör olarak  $dH_2O$  kullanıldı.
2. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25  $\mu g/ml$ ) BSA standardı hazırlandı.
3. İçerisinde bisinkonik asit bulunan BCA A Reaktifi ve % 4 bakır sülfat içeren BCA B Reaktifi 50:1 oranında karıştırılarak “Working Reagent” hazırlandı.
4. 96 kuyucuklu bir mikroplağa standart ve örneklerden 25’er  $\mu l$  konuldu.
5. Her kuyucuğa 200  $\mu l$  “Working Reagent” eklendi.
6.  $37^{\circ}C$ ’de 30 dakika inkübe edildi.
7. ELISA okuyucuda 562 nm’de örnek ve standartların absorbans değerleri okundu.
8. Elde edilen absorbans verilerine karşı standart konsantrasyonu grafiği çizildi ve bu standart grafiğinden yararlanılarak örneklerin total protein konsantrasyonu hesaplandı.



### 3.2.2.3 Kazein Zimografi

Zimografi, proteazların (özellikle MMP'lerin) aktif ve zimojen formlarını tayin etmede kullanılan basit ve duyarlı bir yöntemdir.

Bu yöntemde öncelikle indirgeyici olmayan koşullarda SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (PAGE) ile proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrımı sağlanır. Ayrımında kullanılan poliakrilamid jel akrilamid ile kopolimerize olmuş spesifik bir substrat (örneğin, kazein) içerir. Elektrofözezi sırasında SDS MMP'leri denatüre ederek inaktif formda olmalarını sağlar.

Elektrofözezi sonrası, jeller Triton X-100 ile yıkanır. Triton X-100, jellerden SDS'i uzaklaştırarak enzimlerin aktivitelerini geri kazanmalarını sağlar. Ayrıca latent MMP'ler herhangi bir parçalanma olmaksızın otoaktif olurlar. Daha sonra poliakrilamid jel, uygun bir aktivasyon tamponunda ve uygun sıcaklıkta inkübe edilir. Bu süreç içerisinde renatüre olan MMP'ler jel içerisinde bulunan substratı parçalarlar.

İnkübasyon sonrası jeller Coomassie Blue boyası ile boyandığında, parçalanmamış substrata ait koyu mavi bir arka plana karşılık, MMP aktivitesini gösteren substratın parçalandığı litik beyaz bantlar görülür (163). Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 20'de gösterilmiştir.

**Tablo 20.** Kazein zimografide kullanılan cihaz ve malzemeler

<i>Malzeme /Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
Vertikal Elektroforez Sistemi	Biorad	-
Görüntüleme Cihazı	UVP	-
% 12 Zymogram (Casein) Gel 1.0mmX12well	Invitrogen	EC64052
Casein (from bovine milk)	Sigma	C5890
Akrilamid	Fluka	01696
N, N' metilen bisakrilamid	Fluka	6667
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Fluka	71725
Isopropanol	Riedel de Haen	24137
2X Sample Buffer (Tris-Gly-SDS)	Invitrogen	LC2676
Low Molecular Weight Range	Sigma	M 3913
Rekombinant proMMP-7	Millipore	CC1057
Rekombinant aktif MMP-7	Millipore	CC1059
N, N, N', N'-tetrametiletildiamid (TEMED)	Sigma	T7024
Amonyumpersülfat (APS)	Amresco	0486
Triton X-100	AppliChem	A49750
Zymogram Developing Buffer	Invitrogen	LC2671
Coomassie Blue R-250	Sigma	B0149
Coomassie Blue G-250	AppliChem	A3480
Asetik Asit	Riedel de Haen	27225
Metanol	Merck	1.06018.2500
Glisin	Sigma	G8898
Tris baz	Sigma	T6066

## Uygulama Adımları

### Kazein Zimografi Jelinin Hazırlanması

Invitrogen marka hazır kazein zimografi jellerin kullanılmasının yanı sıra, ayrıca 1 mg/ml kazein substrat içeren SDS-PAGE jeli hazırlandı.

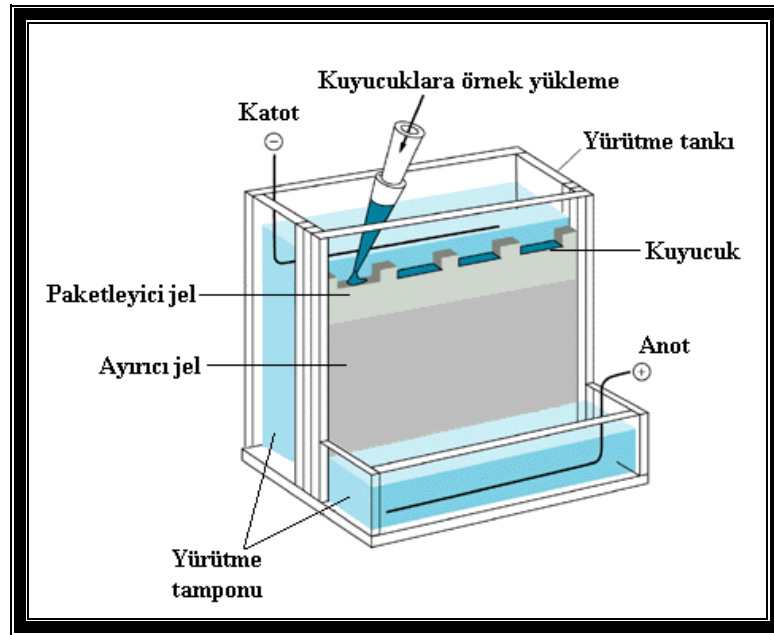
1. Öncelikle Biorad marka jel hazırlama düzeneği kullanılarak aralarında 0,75 mm boşluk bulunacak şekilde camlar sisteme yerleştirildi.
2. İlk olarak % 12'lik ayırıcı jel hazırlanarak (Tablo 21) iki cam arasında döküldü ve hava ile temasını engellemek amacıyla üzerine az miktarda izopropanol eklendi.
3. Yaklaşık 1 saat jelin polimerleşmesi için beklendi.
4. Ayırıcı jel polimerleştikten sonra izopropanol döküldü ve dH<sub>2</sub>O ile yıkama yapıldı.
5. Ardından % 5'lik paketleyici jel (Tablo 21) hazırlandı ve ayırıcı jel üzerine döküldü.
6. Örneklerin uygulanacağı kuyucukların oluşturulması için paketleyici jel üzerine hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde 0,75 mm kalınlığında 10 kuyucuklu taraklar yerleştirildi.
7. Yaklaşık 1 saat paketleyici jelin polimerleşmesi için beklendi.

**Tablo 21.** Kazein zimografide poliakrilamid jellerin hazırlanması

<i>Kullanılan Reaktifler</i>	<i>% 12'lik Ayırıcı Jel</i>	<i>% 5'lik Paketleyici Jel</i>
% 30 Akrlamid karışımı	8,0 ml	1,3 ml
dH <sub>2</sub> O	4,6 ml	5,5 ml
10 mg/ml Kazein substratı	2,0 ml	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5,0 ml	-
1,0 M Tris-HCl pH 6,8	-	1,0 ml
% 10 SDS	200 µl	80 µl
% 10 APS	200 µl	80 µl
TEMED	8 µl	8 µl

## SDS-PAGE Jel Elektroforezi

1. Hazırlanan jeller Biorad marka elektroforez tankına, hazır jeller ise Invitrogen marka elektroforez sistemine yerleştirildi ve içerisine “Yürütme Tamponu” (Tablo 22) eklendi.
2. Her kuyucukta 100 µg protein olacak şekilde homojenat ve “2X Tris-Gly-SDS Örnek Yükleme Tamponu” karıştırıldı.
3. Pozitif kontrol olarak rekombinant pro- ve aktif-MMP-7 proteini kullanıldı.
4. Jellerden dikkatlice taraklar çıkarıldı ve hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklendi.
5. Sistem kapatılarak sabit 125V’da 60-20mA/jel +4°C’de 6-7 saat elektroforez işlemi uygulandı (Şekil 14).



Şekil 14. SDS-PAGE örnek yükleme şeması (164)

## Örneklerin Aktivasyonu

6. Elektroforezden sonra jellerden SDS’i uzaklaştırmak amacıyla jeller yarım saat süreyle % 2,5 Triton X-100 “Renatürasyon Tamponu” (Tablo 22) ile yıkandı.
7. Daha sonra jeller, enzimlerin (pro ve aktif MMP-7) jel içindeki kazeini parçalamaları için 37°C’de bir gece aktivasyon tamponunda inkübe edildi.

## Jellerin Boyanması, Yıkanması ve Görüntülenmesi

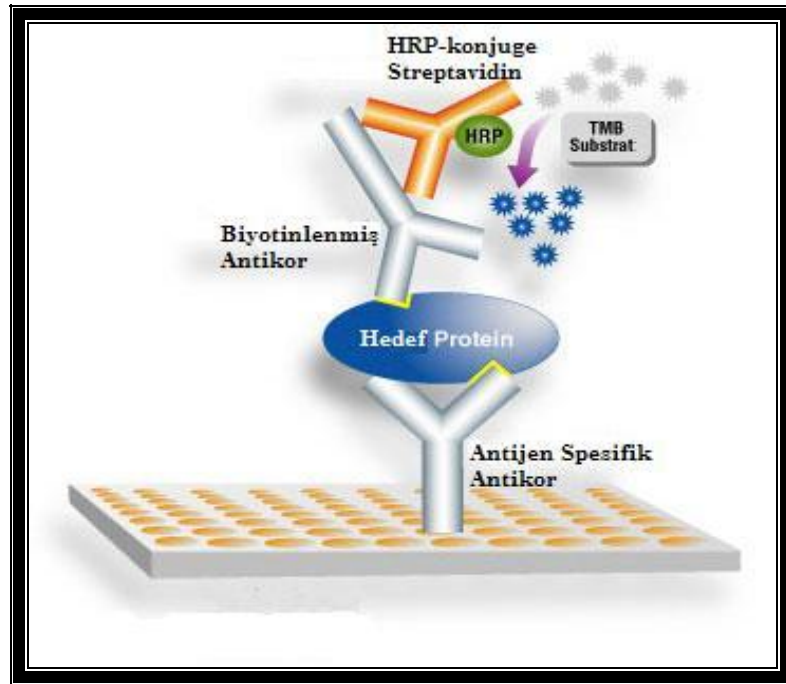
8. Jeller, “Boyama Çözeltisi” (Tablo 22) ile 2 saat boyunca boyama yapıldı.
9. Fazla boyadan arındırma amacıyla “Yıkama Tamponu” (Tablo 22) ile yıkama yapıldı.
10. UVP marka Jel Dökümantasyon Cihazı kullanılarak yıkanan jellerin görüntüleri alındı.

**Tablo 22.** Kazein zimografi yönteminde kullanılan çözeltiler

<i>Çözeltiler</i>	<i>Özellikleri</i>
<b>1X Yürütme Tamponu</b>	20 mM Tris-baz 0,2 M Glisin % 0,1 SDS
<b>Renatürasyon Tamponu</b>	% 2,5 Triton X-100
<b>Aktivasyon Tamponu</b>	10X Developing Buffer (Invitrogen)
<b>Boyama Çözeltisi</b>	%0,5 Coomassie Blue G-250 % 40 Metanol % 10 Asetik Asit
<b>Yıkama Çözeltisi</b>	% 40 Metanol % 10 Asetik Asit

### 3.2.2.4 ELISA Yöntemi

ELISA yöntemi kolorektal tümör ve eşlenik normal dokularındaki total MMP-7 (aktif ve latent form) protein ekspresyonunun kantitatif analizi amacıyla kullanılmıştır. Bu teknikte 96 kuyucuklu mikropalak, insan MMP-7'ye spesifik antikor ile kaplanmıştır. Örnek içerisinde bulunan MMP-7, kuyucukta kaplı olan spesifik antikora bağlanır. Yıkama işlemlerinden sonra sırasıyla biyotinlenmiş anti-human MMP-7 sekonder antikor, Horseradish Peroxidase-konjuge edilmiş-streptavidin ve enzime spesifik bir substrat olan TMB substratı kuyucuklara eklenir. Enzim, substratı renkli bir ürüne dönüştürür ve oluşan ürün miktarı örnekteki antijen miktarı ile doğru orantılıdır. Böylelikle oluşan renk yoğunluğundan ve standart grafiğinden yararlanılarak örnek içerisindeki MMP-7 miktarı ölçülür (Şekil 15). Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 23'de gösterilmiştir (165).



Şekil 15. ELISA çalışma prensibi (166).

Tablo 23. ELISA yönteminde kullanılan cihaz ve malzemeler

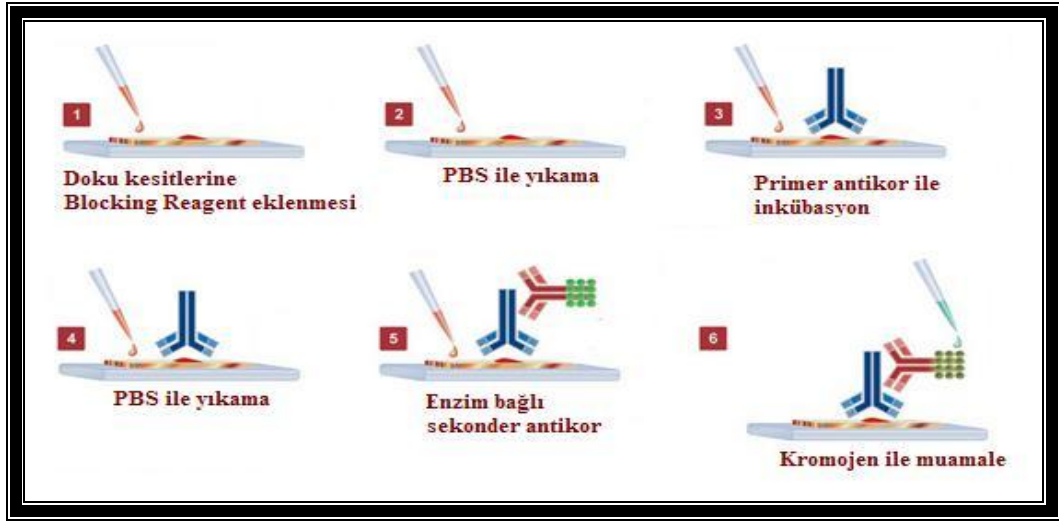
<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
ELISA Okuyucu	Bio-Tek	-
MMP-7 ELISA kit	RnD	ELH-MMP7-001

## Uygulama Adımları

1. MMP-7 standardı olarak rekombinat insan MMP-7, kör olarak “Assay Diluent” kullanıldı.
2. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda (60 – 20 – 6,67 – 2,22 – 0,74 – 0,25 – 0,082 ng/ml) MMP-7 standardı hazırlandı.
3. 96 kuyucuklu bir mikroyuvarla standart ve örneklerden 100'er µl konuldu ve plâğın üzeri kapatıldı.
4. Bir gece +4°C'de hafifçe karıştırılarak inkübe edildi.
5. Kuyucuklardaki çözelti döküldü ve “Wash Buffer” ile 4 kere yıkama yapıldı.
6. Her kuyucuğa 100'er µl biyotinlenmiş antikör konuldu ve hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
7. Kuyucuklardaki çözelti döküldü ve “Wash Buffer” ile 4 kere yıkama yapıldı.
8. Her kuyucuğa 100'er µl HRP-Streptavidin çözeltisi konuldu ve hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi.
9. Kuyucuklardaki çözelti döküldü ve “Wash Buffer” ile 4 kere yıkama yapıldı.
10. Her kuyucuğa 100'er µl “TMB-One Step Substrate” reaktifi konuldu ve hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
11. Daha sonra her kuyucuğa 50'şer µl “Stop Solution” eklendi
12. ELISA okuyucuda 450 nm'de örnek ve standartların absorbans değerleri okundu.
13. Elde edilen absorbans verileri ve karşı gelen standart konsantrasyonları kullanılarak logaritmik skalada standart grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanılarak örneklerin total MMP-7 konsantrasyonu hesaplandı.

### 3.2.3 İmmünohistokimya (IHC)

IHC, temel olarak antijen (protein) / antikor etkileşiminden faydalanılarak doku kesitlerinde protein lokalizasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan bir tekniktir. Bu antijen/antikor etkileşimi görüntülemek için farklı teknikler geliştirilmiştir. En yaygın görüntüleme tekniği, antikora bağlı formda bulunan ve renk oluşturan bir reaksiyonu katalizleyen peroksidaz gibi bir enzimin kullanımınıdır. Alternatif olarak, antikora bir rhodamin gibi bir florofor da bağlı olabilir (Şekil 16) (160). Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 24’de gösterilmiştir.



Şekil 16. IHC akış şeması (167)

Tablo 24. IHC’de kullanılan cihaz ve malzemeler

Malzeme /Cihaz Adı	Markası	Kod Numarası
Mikrotom	Reichert-Jung	-
Işık mikroskobu	Olympus BH-2	-
Hematoksilen	Riedel-de Haen	33230
Eozin	Merck	1345
Entellan	Merck	UN 1866
EnVision*kit	Dako	K4004
Monoklonal mouse antikor MMP 7 (clone ID2)	Labvision	MS-813-R7



## Uygulama Adımları

### *Işık Mikroskopik Doku Takibi*

1. % 10'luk formaldehit ile tespit edilen kalın barsak dokuları, fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akar suyun altında yıkandı.
2. Daha sonra, dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika % 70, % 80 ve % 96'lık etil alkol serilerinden geçirildi.
3. Ardından aseton ve ksilen serilerinden geçirildi.
4. 60°C'de parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü.

### *Hematoksilen-Eozin Boyama*

1. Mikrotom aracılığı ile alınan 5µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'de inkübasyondan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu.
2. Ardından rehidratasyon işlemi için % 96'dan % 70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler distile su ile yıkandı.
3. 2 dakika hematoksilen ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 30 saniye eozin boyası ile boyandı.
4. Aynı şekilde 5 dakika akarsu altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla % 70, % 80 ve % 96'lık alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı.

### *MMP 7'nin İmmünboyanması ve Görüntülenmesi*

1. Lizinli lama 5 µm kalınlığında alınan kalın barsak doku kesitleri, deparafinizasyon için ksilen ve rehidratasyon için % 100, % 96, % 80, % 70'lik etil alkol serilerinden geçirdikten sonra, Posphate Buffered Saline (PBS) ile yıkandı.
2. Antijen ile işleme sokmadan önce 15 dakika 0.1M sitrat tamponu (PH 6,0) içerisinde mikrodalgada ısıtıldı, oda ısısına gelene kadar beklendi.

3. PBS ile yıkanıp, preparat üzerindeki fazla sıvı alındıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için Peroxidase Blocking Reagent oda sıcaklığında 5 dakika uygulandı.
4. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra primer antikor olarak monoklonal mouse antikor MMP 7 (clone ID2) ile gece boyunca +4 °C'de inkube edildi.
5. Ertesi gün PBS ile yıkanan kesitler Peroxidase Labelled Polymer ile oda sıcaklığında 30 dakika inkube edildi. Kromojen olarak AEC (3-amino-9 ethylcarbazole) kullanıldı.
6. Distile su ile yıkama yapıldıktan sonra Mayer's hematoxilen ile artalan boyaması yapıldı. Ksilol banyolarından geçirildikten sonra, 1:1 oranında gliserol/dH<sub>2</sub>O karışımı ile lamalar kapatıldı.
7. Negatif kontrol için primer antikor kullanılmadan süreç işletildi.
8. Hazırlanan preparatlar Olympus BH-2 ışık mikroskopunda incelenerek gruplar karşılaştırıldı.

### 3.2.4 In Situ Kazein Zimografi

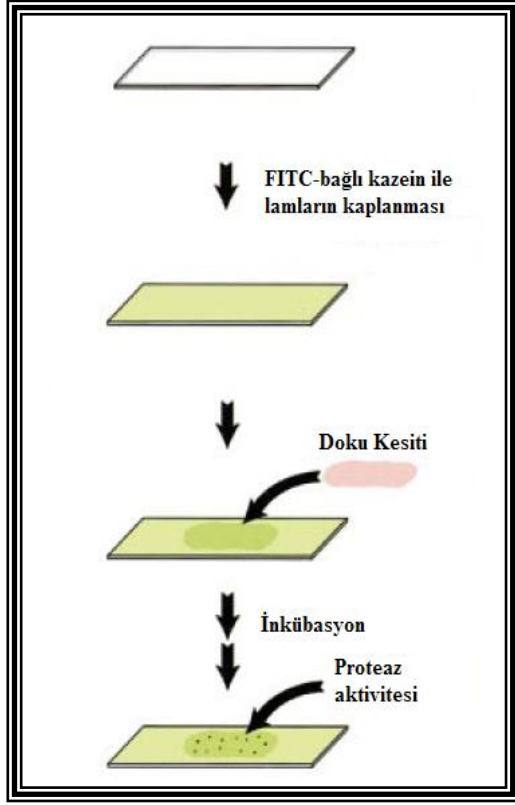
In situ zimografi (ISZ), ince bir substrat membranı üzerine yapıştırılmış donmuş kesit kullanılarak enzim aktivitesinin lokalizasyonu göz önüne getirmektedir (Şekil 17). Bugüne kadar ISZ çalışmaları MMP'ler ve plazminojen aktivatörleri üzerine yapılırken kazein, kollajen veya jelatin substrat olarak kullanıldı (168). Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 25'de gösterilmiştir.

**Tablo 25.** ISZ'de kullanılan cihaz ve malzemeler

<i>Malzeme Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
Cryotom Cihazı	Shandon	-
Floresan Mikroskobu	Nikon	-
FITC-cojugate casein	Invitrogen	C2990
Agaroz Tip VII-Low Gelling Temperature	Sigma	A4018
Zymogram Developing Buffer	Invitrogen	LC2671
EDTA	Sigma	E02P
DAPI	Appllichem	A4099
Antifade	Millipore	S7114

#### Uygulama Adımları

1. % 0,1 floresan işaretli substrat (0,1 mg/ml) ve % 0,1 agaroz uygun proteaz aktivite tamponunda birbirine karıştırıldı. Negatif kontrol amacıyla ayrıca içerisinde genel MMP inhibitörü olan EDTA içeren substrat çözeltisi hazırlandı.
2. Jel solüsyonu ışıktan korunarak yaklaşık 20 dakika kaynayan su banyosunda agaroz tamamen eriyene kadar karıştırıldı.
3. Substrat jel solüsyonundan 50 µl lam üzerine alındı. İkinci bir lam yardımıyla periferik yayma yapılarak lamın substrat jel çözeltisi ile kaplanması sağlandı. Daha sonra lamlar substrat ile birlikte siyah bir kutuda kurumaya bırakıldı.



Şekil 17. ISZ akış şeması (168)

4. Donmuş doku parçaları Cryotom cihazı yardımıyla 8µm kalınlığında kesilir ve kaplı lamaların üzerine yerleştirilir.
5. Lamalar “Aktivasyon Tamponu” (Tablo 22) içeren nemli kutulara konuldu ve ışıktan korumak amacıyla kutu folyo ile sarıldı.
6. 37°C’de 24–48 saat için zimografik reaksiyonun ilerlemesi için inkübe edildi.
7. Hücre nükleuslarını belirlemek amacıyla preparatların üzerine DAPI/Antifade (0,4µg/ml) çözeltisinden 20µl konuldu ve üzeri bir lamelle kapatılarak 10 dakika inkübe edildi.
8. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskobu ile değerlendirildi.

### 3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Elde edilen veriler SPSS 17.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Bağımlı iki grup arasındaki anlamlı farklılık Wilcoxon Sıralı İşaretler testi ve 2-paired t testi ile incelendi. Klinikopatolojik değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde nonparametrik Spearman korelasyon testi ve parametrik Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. Korelasyonun r değeri, 0,00-0,24 arasında ise zayıf; 0,25-0,49 arasında ise orta; 0,50-0,74 arasında ise güçlü ve 0,75-1,00 arasında ise çok güçlü olarak değerlendirildi. Nonparametrik testlerde ikili alt grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi, birden fazla alt grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Bu testlerde anlamlılık düzeyi  $p \leq 0,05$  olarak ifade edilmiştir.

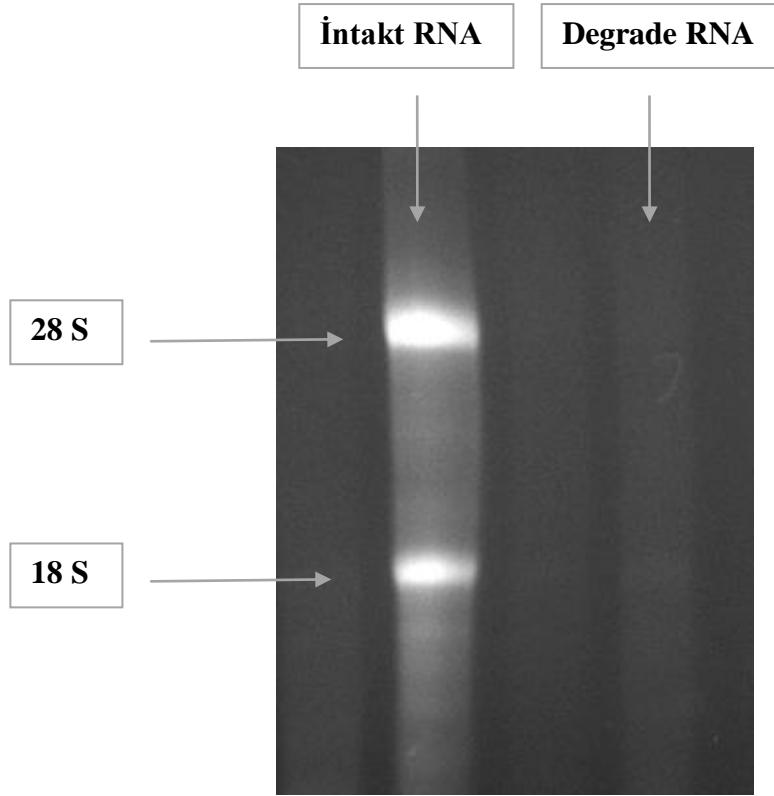
## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### 4. BULGULAR

#### 4.1 REAL TIME PCR SONUÇLARI

##### 4.1.1 RNA örneklerinin %1,2 formaldehit agaroz jelde görüntülenmesi.

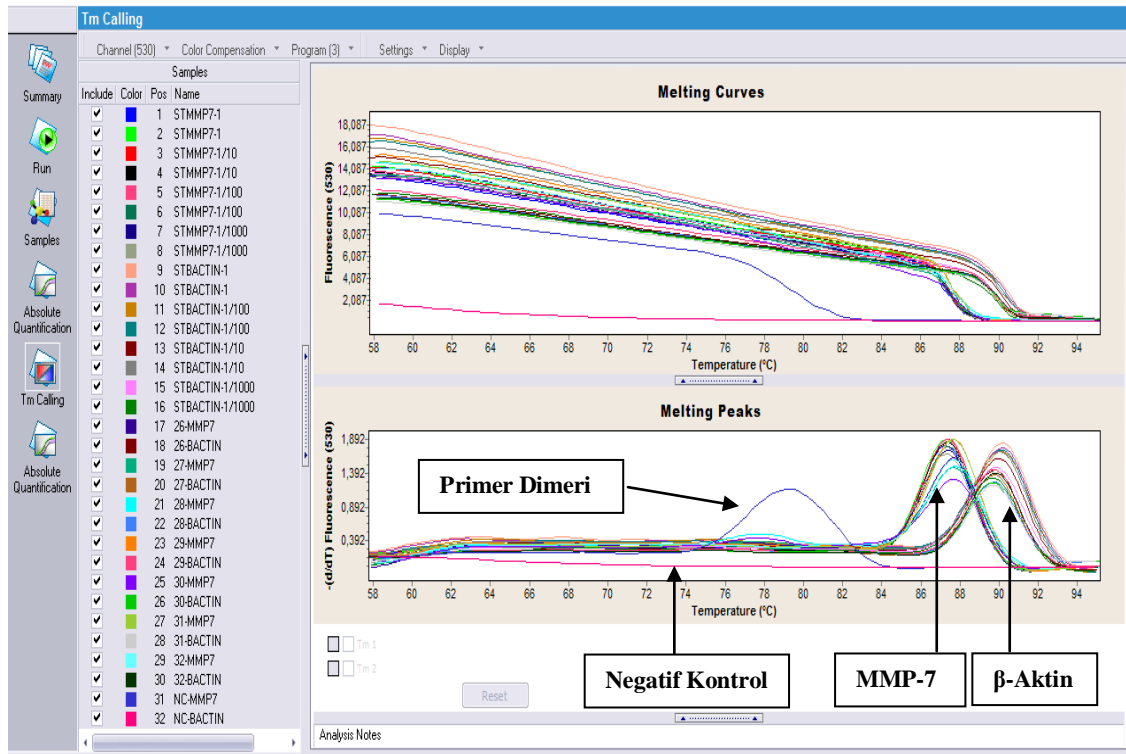
İzole edilen RNA örneklerinin intakt olup olmadığını belirlemek amacıyla denatüre koşullar altında agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Bu jel görüntülerine göre, intakt RNA örnekleri (28 S ve 18S’de keskin bant veren) Real Time PCR denemesinde kullanılırken, degrade RNA örnekleri değerlendirmeye alınmamıştır (Şekil 18).



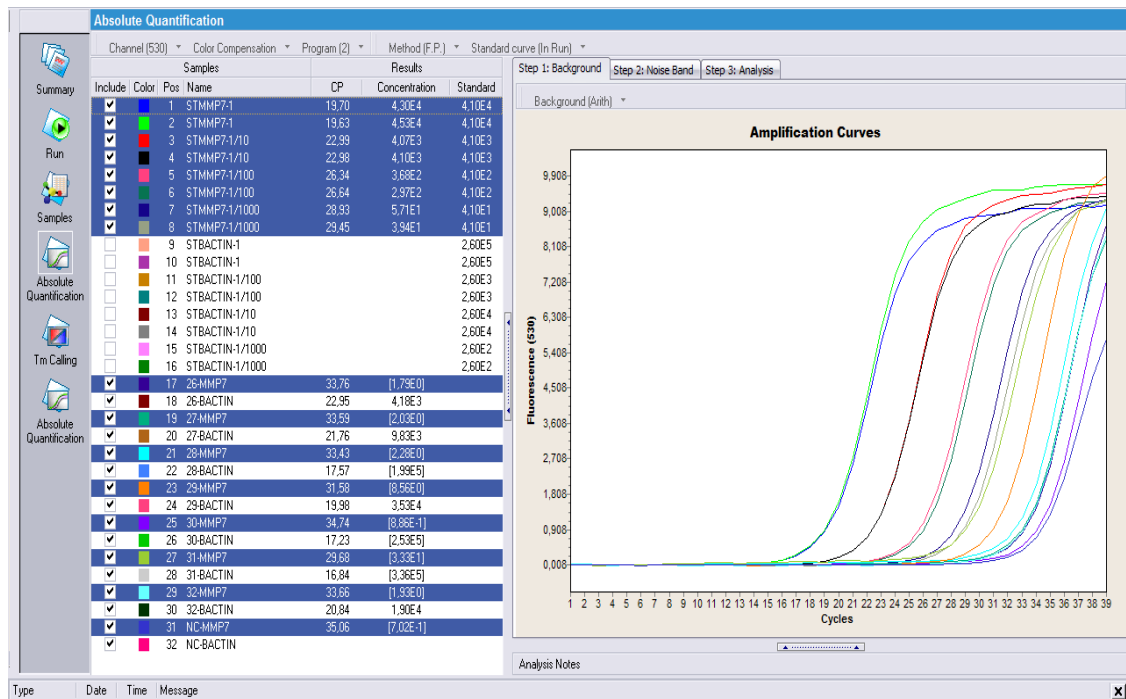
Şekil 18. RNA jel görüntüsü

##### 4.1.2 MMP-7 mRNA Ekspresyon Analizi

Kolorektal kanserli 18 hastadan alınan tümör ve eşlenik normal dokulardaki MMP-7 ve  $\beta$ -aktin mRNA ekspresyon düzeyleri, Light Cycler Software 4.05 (Roche Diagnostic) kullanılarak belirlendi. Melting Curve analizinde non spesifik bağlanma (örneğin, primer dimerleri) saptanan örnekler çalışmaya dahil edilmedi (Şekil 19). Absolute Quantification analizi ile MMP-7 ve  $\beta$ -aktin ekspresyonları oranlanarak rölatif kantitasyon yapıldı (Şekil 20) (Tablo 26).



Şekil 19. Melting Curve Analizi



Şekil 20. Absolute Quantification Analizi

**Tablo 26.** KRK dokularında  $\beta$ -aktin ve MMP-7 mRNA ekspresyon değerleri

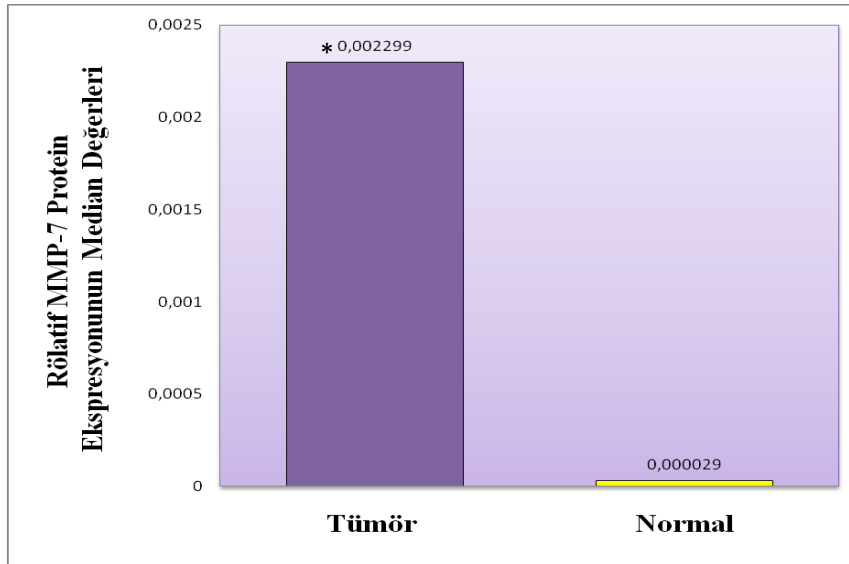
<b>Olgu No.</b>	<b>Tümör Dokusu mRNA Ekspresyonu</b>		<b>Normal Doku mRNA Ekspresyonu</b>	
	<b><math>\beta</math>-Aktin (kopya/<math>\mu</math>l)</b>	<b>MMP-7 (*10<sup>-3</sup>) (kopya/<math>\mu</math>l)</b>	<b><math>\beta</math>-Aktin (kopya/<math>\mu</math>l)</b>	<b>MMP-7 (*10<sup>-3</sup>) (kopya/<math>\mu</math>l)</b>
<b>1</b>	1	19,51	1	1,54
<b>2</b>	1	0,32	1	-
<b>3</b>	1	6,21	1	4,29
<b>4</b>	1	5,00	1	0,01
<b>5</b>	1	7,62	1	0,04
<b>6</b>	1	1,52	1	0,02
<b>7</b>	1	-	1	0,01
<b>8</b>	1	3,08	1	1,68
<b>9</b>	1	0,90	1	-
<b>10</b>	1	9,29	1	0,31
<b>11</b>	1	31,10	1	0,01
<b>12</b>	1	-	1	0,34
<b>13</b>	1	0,22	1	0,004
<b>14</b>	1	0,17	1	0,01
<b>15</b>	1	1,02	1	0,09
<b>16</b>	1	5,2	1	0
<b>17</b>	1	1,19	1	0
<b>18</b>	1	1,15	1	8,8

Kolorektal tümör ve eşlenik normal dokularında, rölatif MMP-7 ekspresyon düzeyleri bağımlı gruplarda Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanılarak incelendi ve iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ( $p < 0,005$ ) (Tablo 27) (Şekil 21).

**Tablo 27.** Kolorektal tümör ve normal dokularında median rölatif MMP-7 ekspresyon verileri

	<i>Olgu Sayısı</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>	<i>Median</i>	<i>p değeri</i>
Tümör Dokusu	16	0,00017	0,0311	0,002299	0,001*
Normal Doku	16	0,00000	0,0043	0,000029	

\* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )



**Şekil 21.** Kolorektal tümör ve normal dokularında rölatif MMP-7 ekspresyon düzeylerinin median değerleri, \* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )

Kolorektal tümör dokularındaki rölatif MMP-7 ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik veriler arasındaki ilişki, non-parametrik spearman's rho korelasyon testi kullanılarak incelendi ve yaş ile negatif, T evre ve P evre ile pozitif korelasyon olduğu belirlendi (Tablo 28).



**Tablo 28.** Kolorektal tümör dokularındaki rölatif MMP-7 ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik veriler arasındaki korelasyon

<i>Faktör</i>	<i>Korelasyon katsayısı</i>	<i>p değeri</i>
Yaş	-0,588	0,021*
T Evre	0,687	0,005*
P Evre	0,536	0,04*

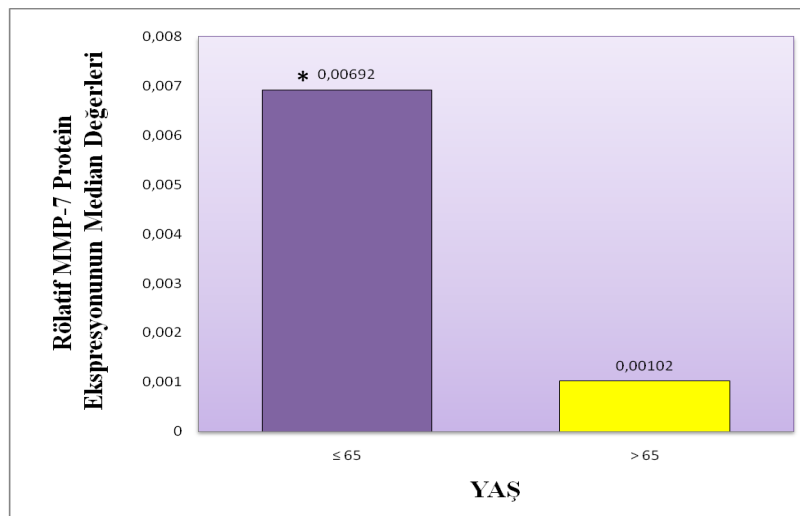
\* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )

Kolorektal tümör dokularındaki rölatif MMP-7 ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik veriler arasında alt grup karşılaştırılması bağımsız gruplarda Mann Whitney U ve Kruskal Wallis testi kullanılarak incelendi (Tablo 29-31) (Şekil 22-24).

**Tablo 29.** Kolorektal tümör dokularında, yaş ve rölatif MMP-7 ekspresyon verilerinin alt grup karşılaştırması

<i>Yaş</i>	<i>Olgu Sayısı</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>	<i>Median</i>	<i>p değeri</i>
$\leq 65$	8	0,00022	0,031	0,00692	0,029*
$> 65$	7	0,00017	0,005	0,00102	

\* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )

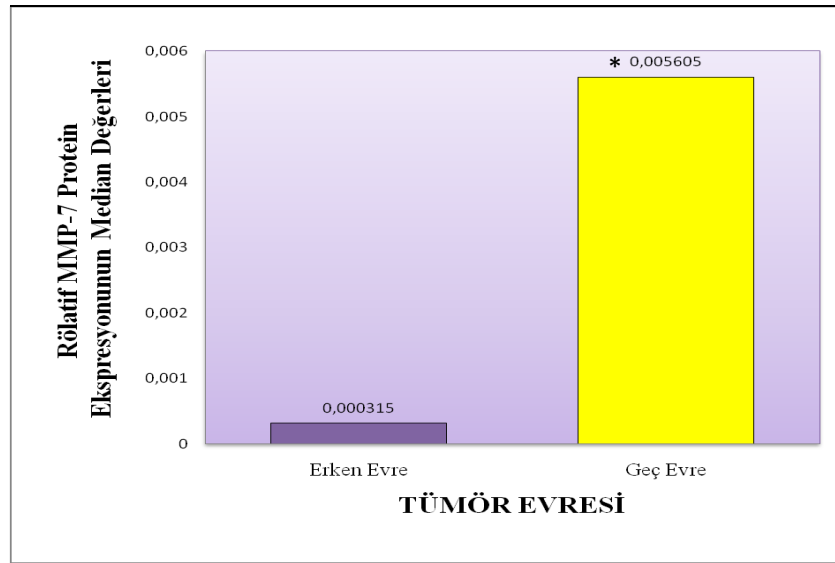


**Şekil 22.** Kolorektal tümör dokularında, yaş alt grubunda rölatif MMP-7 ekspresyon düzeylerinin median değerleri, \* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )

**Tablo 30.** Kolorektal tümör dokularında, tümör evresi ve rölatif MMP-7 ekspresyon verilerinin alt grup karşılaştırması

<i>T Evre</i>	<i>Olgu Sayısı</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>	<i>Median</i>	<i>p değeri</i>
Erken Evre (T0-1-2)	5	0,00017	0,0031	0,000315	0,008*
Geç Evre (T3-4)	10	0,00102	0,0311	0,005605	

\* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )

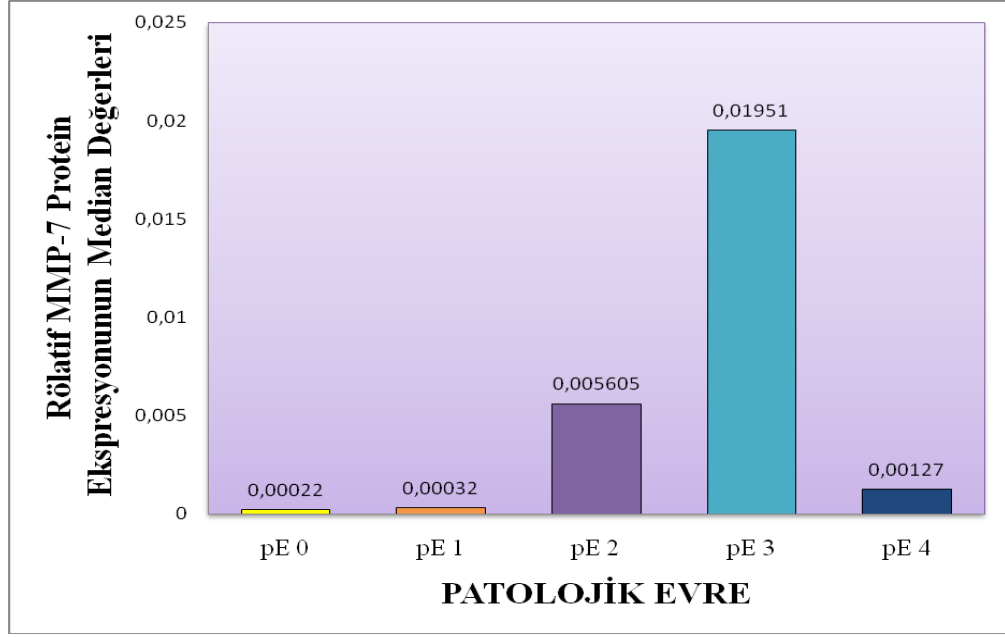


**Şekil 23.** Kolorektal tümör dokularında, tümör evresi alt grubunda rölatif MMP-7 ekspresyon düzeylerinin median değerleri, \* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )

**Tablo 31.** Kolorektal tümör dokularında, patolojik evre ve rölatif MMP-7 ekspresyon verilerinin alt grup karşılaştırması

<i>P Evre</i>	<i>Olgu Sayısı</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>	<i>Median</i>	<i>p değeri</i>
<b>pE0</b>	1	0,00022	0,00022	0,00022	0,039*
<b>pE1</b>	3	0,00017	0,0009	0,00032	
<b>pE2</b>	6	0,00115	0,00929	0,005605	
<b>pE3</b>	3	0,00119	0,0311	0,01951	
<b>pE4</b>	2	0,00102	0,00152	0,00127	

\* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )



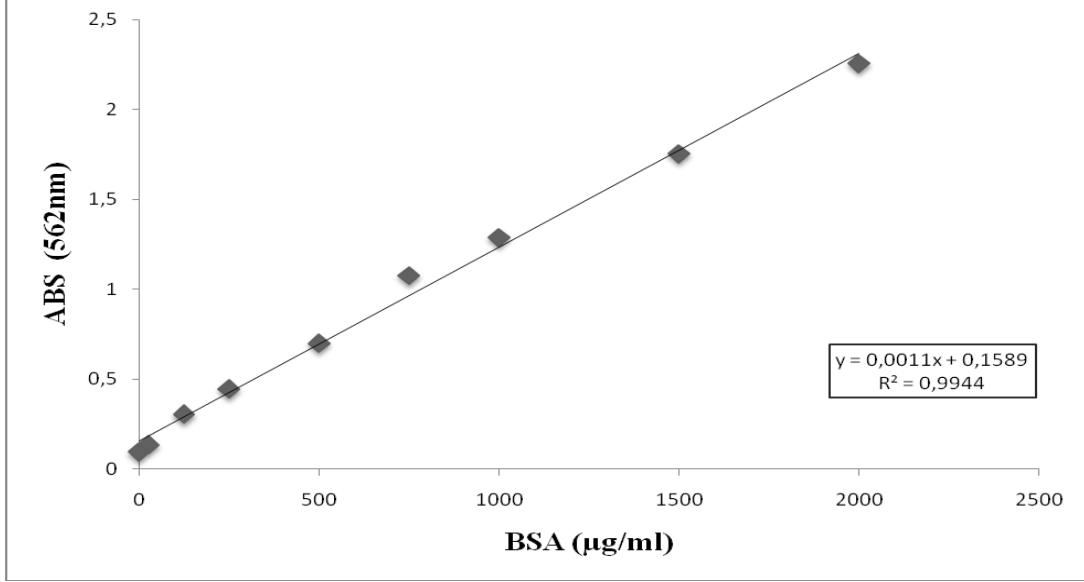
**Şekil 24.** Kolorektal tümör dokularında, patolojik evre alt grubunda rölatif MMP-7 ekspresyon düzeylerinin median değerleri

Kruskal Wallis varyans analizinde elde edilen farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı ve ikili alt gruplar halinde karşılaştırma yapıldı. Anlamlılık düzeyi Bonferroni düzeltmesi ile belirlendi ve p değeri 0,005'in altında olması durumunda istatistiksel anlamlı olarak değerlendirildi. Buna göre, MMP-7 mRNA ekspresyon düzeyleri ile patolojik evre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

## 4.2 KAZEİN ZİMOGRAFI VE ELISA SONUÇLARI

### 4.2.1 Protein Tayini

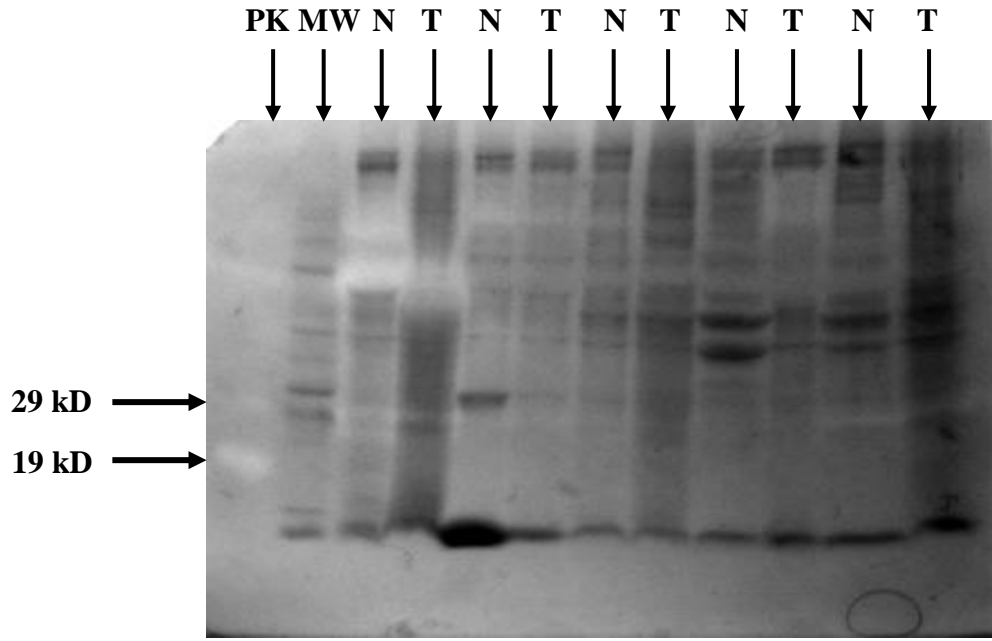
Kolon ve rektum tümör eşlenik normal dokuların protein düzeyleri Şekil 25’de gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı.



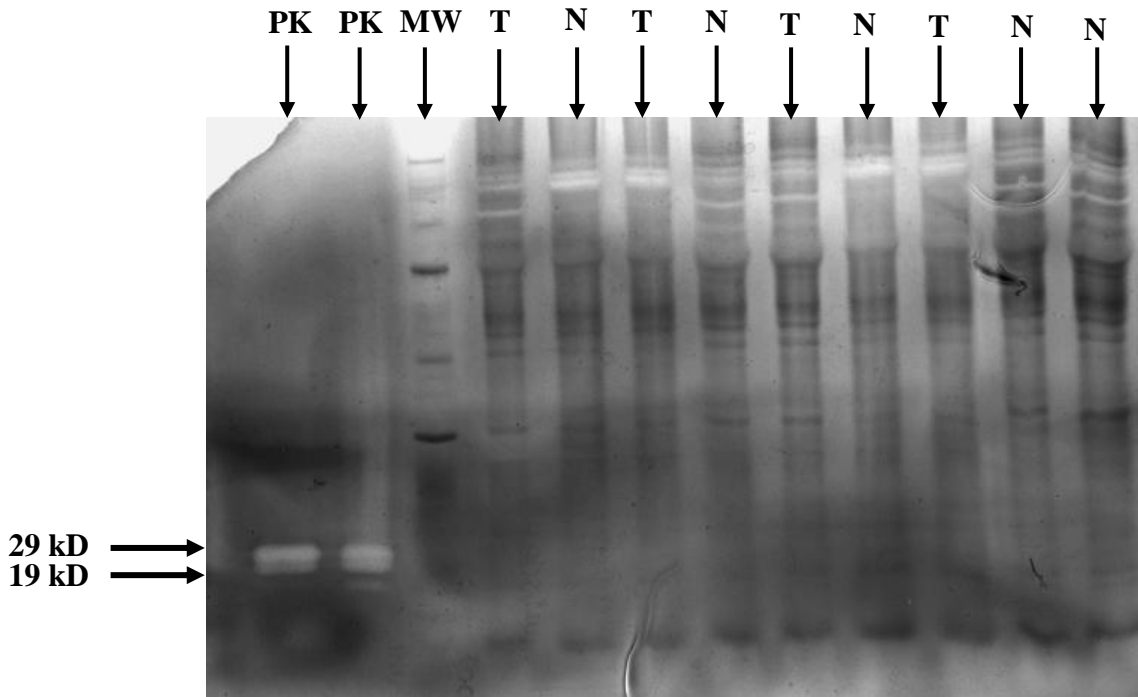
Şekil 25. BSA standart kalibrasyon eğrisi

### 4.2.2 Kazein Zimografi

Kolorektal tümör ve eşlenik normal dokuları için temsili kazein zimogram örnekleri Şekil 26 ve Şekil 27’de gösterilmiştir. MMP-7 aktivite düzeyleri bantların belirsiz ve görüntüleme cihazının ölçüm limitinin altında olması nedeniyle değerlendirilememiştir.



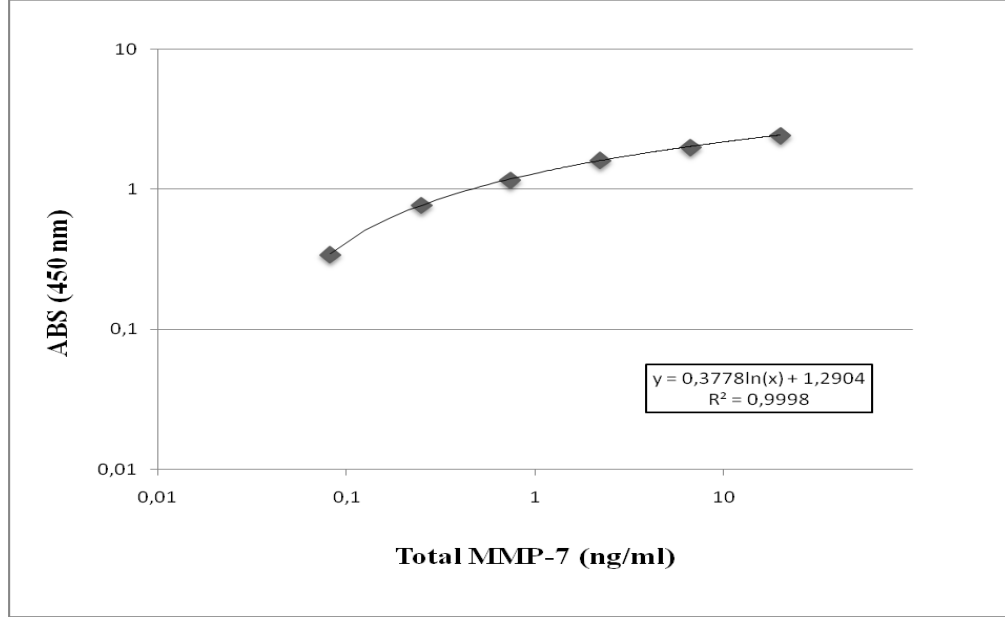
**Şekil 26.** Kolorektal tümör ve normal dokularında kazein zimogram mini jel görüntüleri (PK: Pozitif Kontrol, N: Normal doku, T: Tümör dokusu, MW: Molecular Weight Marker)



**Şekil 27.** Kolorektal tümör ve normal dokularında kazein zimogram büyük gel görüntüleri (PK: Pozitif Kontrol, N: Normal doku, T: Tümör dokusu, MW: Molecular Weight Marker)

### 4.2.3 ELISA

Kolorektal tümör ve eşlenik normal dokularındaki total MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri Şekil 28’de gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı. BCA analizinden elde edilen total protein miktarları kullanılarak mg protein başına total MMP-7 konsantrasyonu belirlendi (Tablo 32).



Şekil 28. Total MMP-7 standart kalibrasyon eğrisi

Tablo 32. KRK dokularında MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri

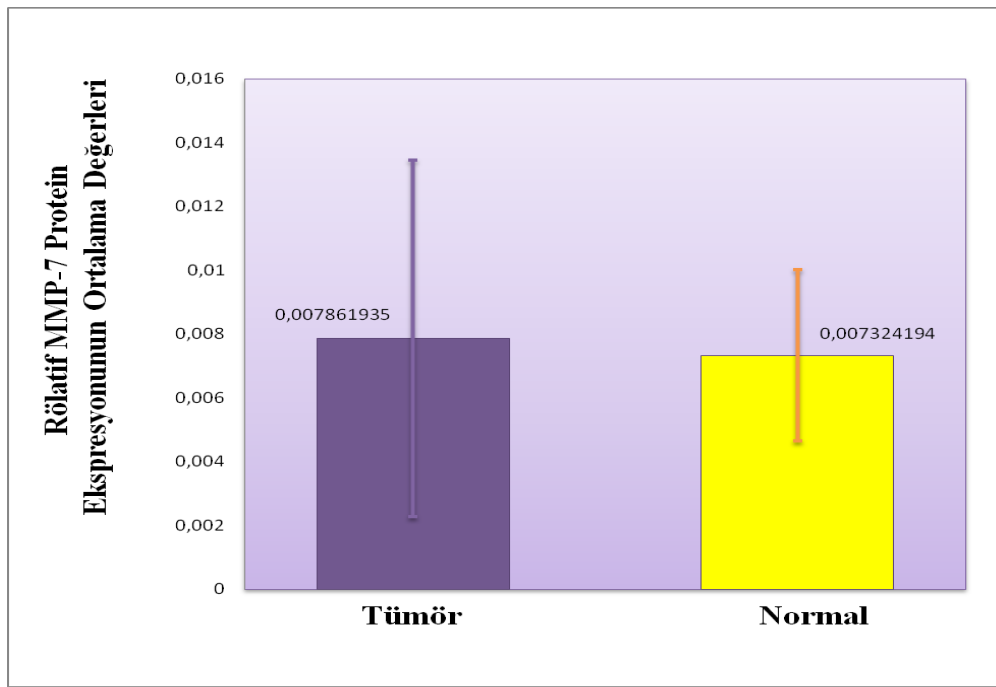
Olgu Sayısı	Tümör Dokusu MMP-7 Protein Ekspresyonu			Normal Doku MMP-7 Protein Ekspresyonu		
	MMP-7 Konsantrasyonu (ng/ml)	Total Protein (mg/ml)	ng MMP-7 / mg protein	MMP-7 Konsantrasyonu (ng/ml)	Total Protein (ug/ml)	ng MMP-7 / mg protein
1	0,0549	5,41	<b>0,01015</b>	0,0526	2,48	<b>0,02122</b>
2	0,0684	8,09	<b>0,00845</b>	0,0676	6,72	<b>0,01007</b>
3	0,087	9,19	<b>0,00947</b>	0,0967	8,87	<b>0,01091</b>
4	0,26	8,47	<b>0,03074</b>	0,0381	8,24	<b>0,00462</b>
5	0,1034	10,29	<b>0,01005</b>	0,0469	5,27	<b>0,00889</b>
6	0,0368	17,39	<b>0,00212</b>	0,0664	6,11	<b>0,01087</b>

<i>Olgu Sayısı</i>	<i>Tümör Dokusu MMP-7 Protein Ekspresyonu</i>			<i>Normal Doku MMP-7 Protein Ekspresyonu</i>		
	<b>MMP-7 Konsantrasyonu (ng/ml)</b>	<b>Total Protein (mg/ml)</b>	<b>ng MMP-7 / mg protein</b>	<b>MMP-7 Konsantrasyonu (ng/ml)</b>	<b>Total Protein (mg/ml)</b>	<b>ng MMP-7 / mg protein</b>
7	0,0656	9,55	<b>0,00687</b>	0,0535	9,24	<b>0,00579</b>
8	0,036	5,25	<b>0,00685</b>	0,089	13,21	<b>0,00676</b>
9	0,12	8,8	<b>0,01358</b>	0,0721	12,16	<b>0,00593</b>
10	0,1264	9,39	<b>0,01346</b>	0,0663	11,88	<b>0,00558</b>
11	0,0466	6,05	<b>0,00770</b>	0,0434	5,77	<b>0,00752</b>
12	0,0419	11,43	<b>0,00367</b>	0,0719	6,47	<b>0,01112</b>
13	0,0491	9,85	<b>0,00499</b>	0,0614	4,51	<b>0,01361</b>
14	0,0404	8,62	<b>0,00469</b>	0,0451	8,56	<b>0,00527</b>
15	0,0475	5,24	<b>0,00907</b>	0,0612	5,99	<b>0,01021</b>
16	0,0505	6,01	<b>0,00839</b>	0,0413	8,06	<b>0,00512</b>
17	0,0447	9,87	<b>0,00452</b>	0,0758	6,71	<b>0,01130</b>
18	0,0799	8,96	<b>0,00892</b>	0,0542	7,82	<b>0,00693</b>
19	0,0887	5,47	<b>0,01620</b>	0,0772	8,74	<b>0,00884</b>
20	0,0845	6,28	<b>0,01346</b>	0,0552	4,52	<b>0,01221</b>
21	0,0529	10,75	<b>0,00492</b>	0,0514	9,2	<b>0,00559</b>
22	0,0399	7,09	<b>0,00562</b>	0,0348	8,94	<b>0,00389</b>
23	0,0385	8,92	<b>0,00432</b>	0,0552	10,74	<b>0,00514</b>
24	0,0555	7,26	<b>0,00764</b>	0,036	5,52	<b>0,00651</b>
25	0,0409	10,7	<b>0,00383</b>	0,0389	5,36	<b>0,00727</b>
26	0,0425	7,13	<b>0,00596</b>	0,0337	6,04	<b>0,00558</b>
27	0,0374	10,11	<b>0,00370</b>	0,0394	7,5	<b>0,00526</b>
28	0,0423	3,84	<b>0,01100</b>	0,0415	6,3	<b>0,00658</b>
29	0,032	12,03	<b>0,00266</b>	0,035	7,56	<b>0,00463</b>
30	0,0376	8,65	<b>0,00435</b>	0,0409	6,74	<b>0,00607</b>
31	0,041	10,77	<b>0,00381</b>	0,0356	8,07	<b>0,00441</b>

Kolorektal tümör ve eşlenik normal dokularında, MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri bağımlı gruplarda 2-paired t testi kullanılarak incelendi ve iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ( $p>0,005$ ) (Tablo 33) (Şekil 29).

**Tablo 33.** Kolorektal tümör ve normal dokularında ortalama MMP-7 protein düzeyleri

	<i>Olgu Sayısı</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>Standart Hata</i>	<i>p değeri</i>
Tümör - Normal	31	0,00054	0,0063	0,0011	0,636



**Şekil 29.** Kolorektal tümör ve normal dokularında MMP-7 protein düzeylerinin ortalama değerleri

Kolorektal tümör dokularındaki MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik veriler arasındaki ilişki, Pearson korelasyon testi kullanılarak incelendi ve perinöral invazyon ile pozitif korelasyon olduğu belirlendi (Tablo 34). Buna karşılık diğer klinikopatolojik veriler arasında anlamlı bir fark görülmedi.



**Tablo 34.** Kolorektal tümör dokularındaki MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri ile perinöral invazyon arasındaki korelasyon

<i>Faktör</i>	<i>Korelasyon katsayısı</i>	<i>p değeri</i>
Perinöral invazyon	0,462	0,010*

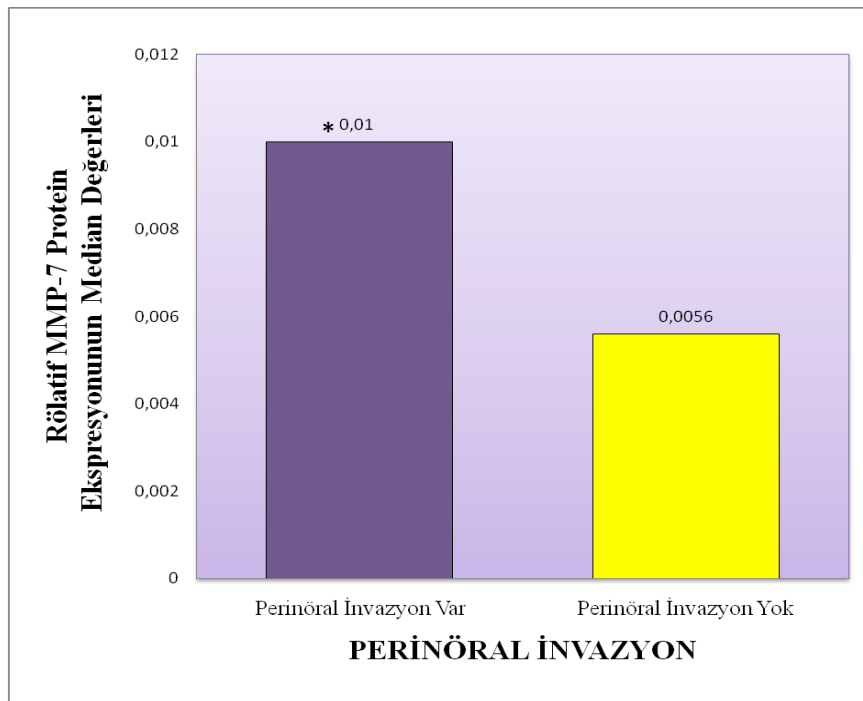
\* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )

Kolorektal tümör dokularındaki MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri ile perinöral invazyon arasındaki alt grup karşılaştırması, bağımsız gruplarda Mann Whitney U testi kullanılarak incelendi (Tablo 35) (Şekil 30).

**Tablo 35.** Kolorektal tümör dokularında, perinöral invazyon ve MMP-7 protein düzeylerinin alt grup karşılaştırması

<i>Perinöral İnvazyon</i>	<i>Olgu Sayısı</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>	<i>Median</i>	<i>p değeri</i>
Var	5	0,006	0,0307	0,01	0,042*
Yok	25	0,002	0,0162	0,0056	

\* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )



**Şekil 30.** Kolorektal tümör dokularında, perinöral invazyon grubunda MMP-7 protein düzeylerinin median değerleri, \* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0,05$ )

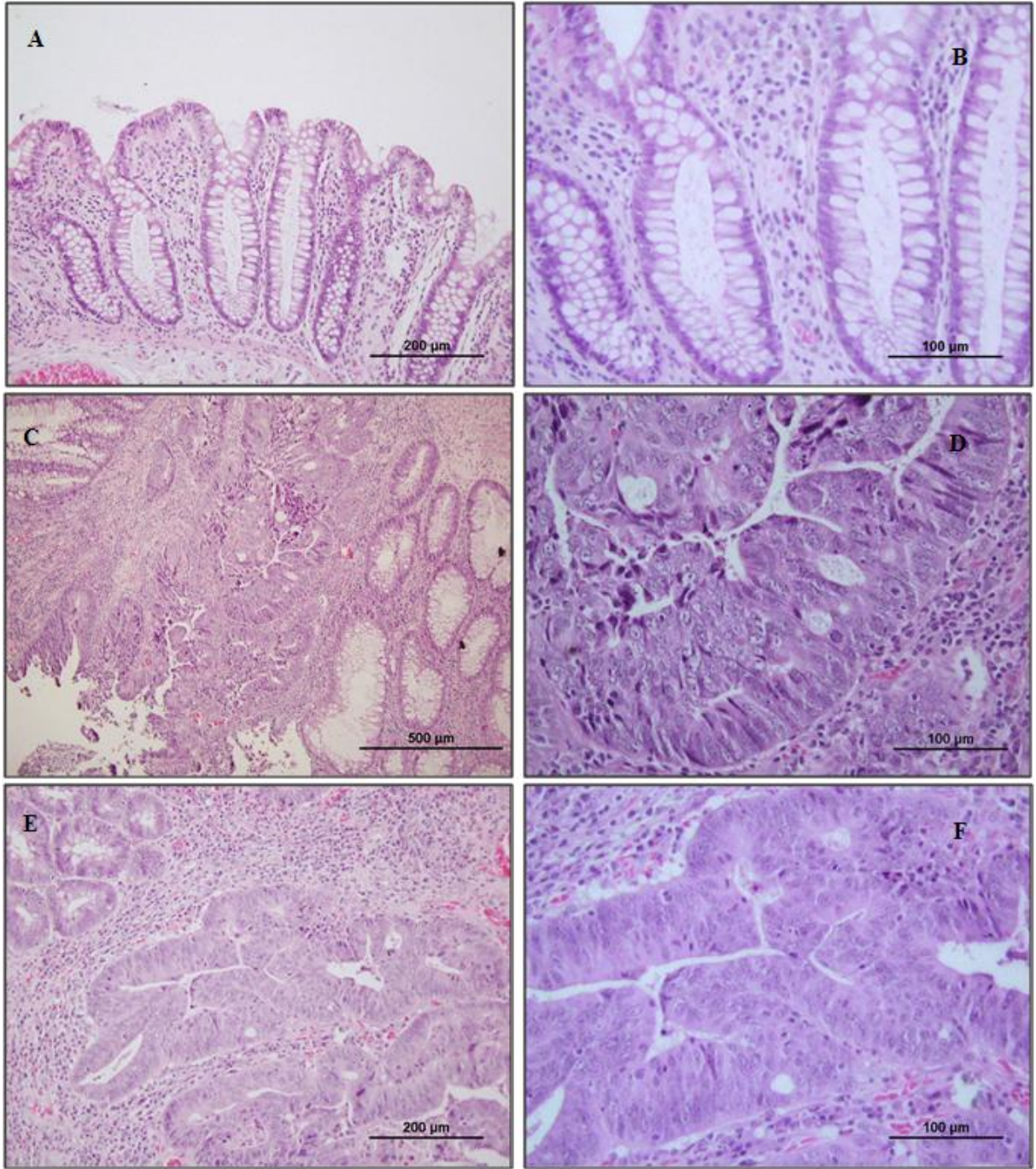
### 4.3 İMMÜNOHİSTOKİMYA SONUÇLARI

Kolorektal kanserli 16 hastadan alınan tümör ve normal dokuların, Hemotoksilen – Eozin (HE) ile boyanması sonucunda elde edilen görüntüleri Şekil 31’de gösterilmiştir. Şekil 32’te normal dokuların, Şekil 33’te ise kolorektal tümör dokularının immünboyaması sonucunda elde edilen görüntüleri gösterilmiştir.

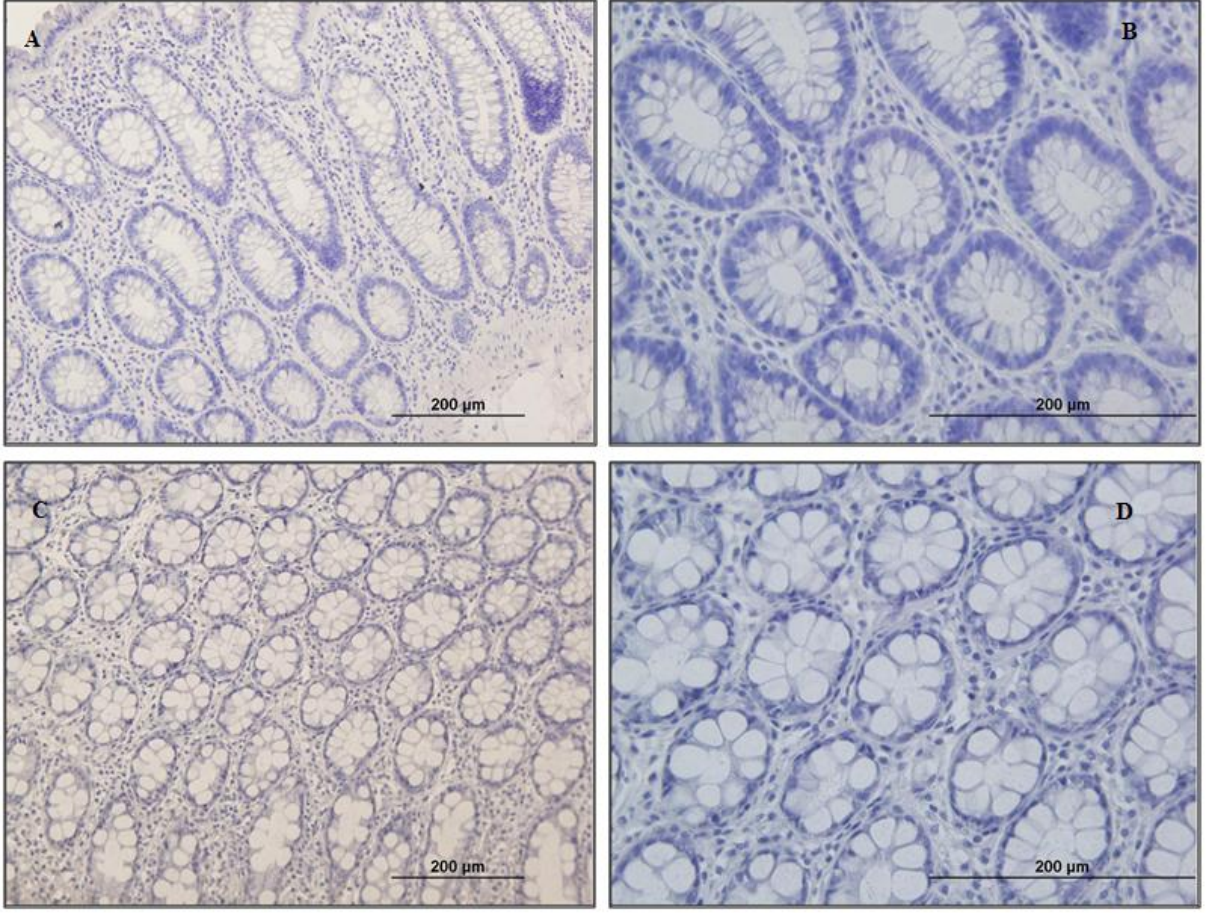
İmmunreaktivite pozitifliği, hücrelerdeki intrasitoplazmik ekspresyonun şiddetine ve dağılımına göre semikantitatif değerlendirme için skorlandı (Tablo 36) (169). Yapılan IHC skorlaması ile klinikopatolojik veriler arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark gözlenmedi.

**Tablo 36.** Kolorektal tümör dokusunun immunreaktivite pozitifliğini değerlendirmede kullanılan skorlama yüzdesi

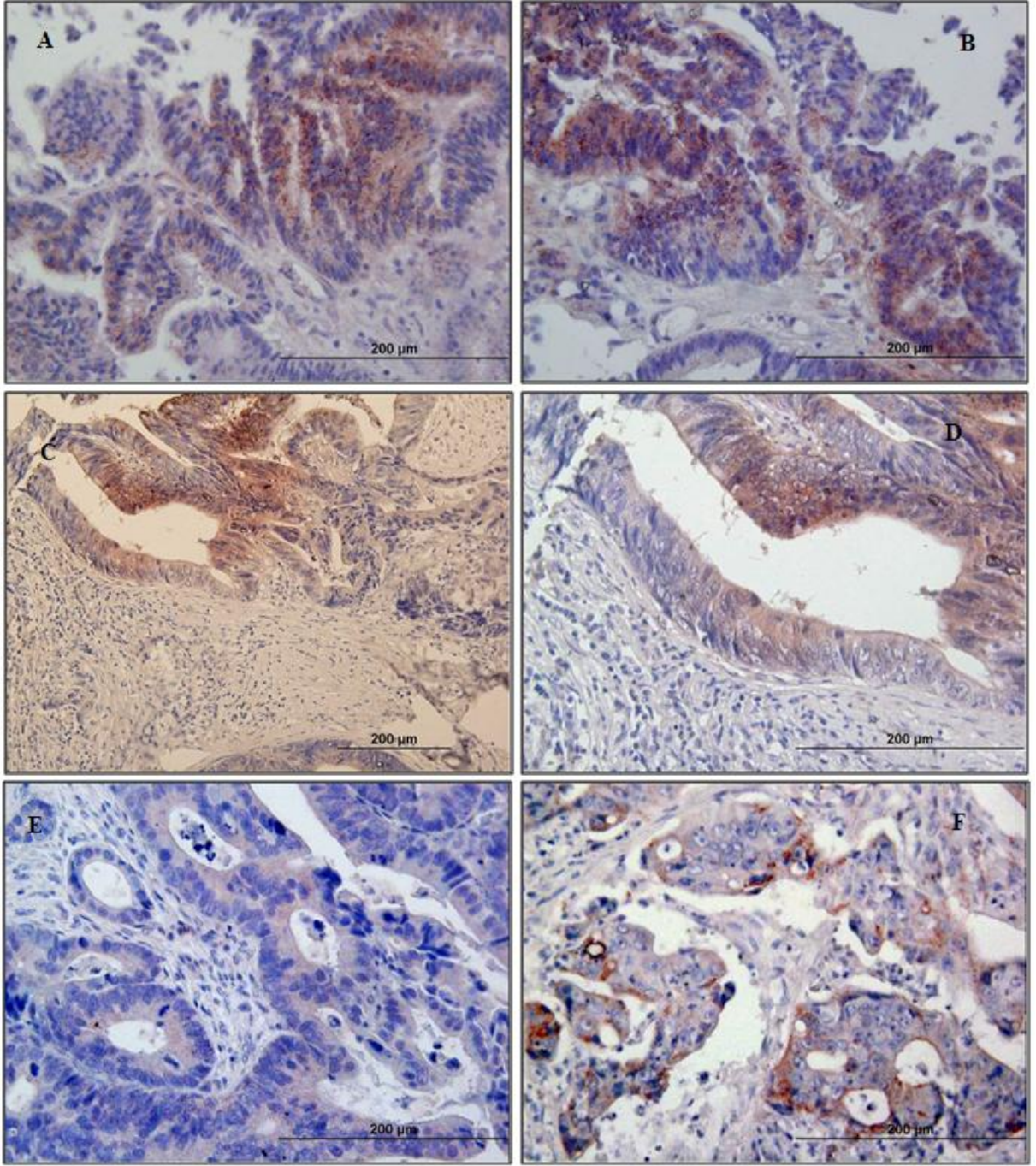
<i>IHC Skorlaması</i>	<i>Olgu Sayısı</i>	<i>%</i>
Hücrelerin %1-10'u pozitif	4	25,0
Hücrelerin %11-50'si pozitif	6	37,5
Hücrelerin %50'den fazlası pozitif	6	37,5
Total	16	100



**Şekil 31.** Kolorektal tümör ve normal dokusunun hematoxilen eozin boyama görüntüleri A. Kolon mukozasının normal histolojik görüntüsü, B. (A)'da görülen alandan alınmış daha büyük büyütmedeki görüntüsü, C. Kanserli ve sağlıklı kolon mukozası bir arada gözleniyor, D. (C)'de görülen kanserli alanın daha büyük büyütmede görüntüsü E. Kanserli kolon mukozası gözlenmekte, F.(E)'de görülen alanın daha büyük büyütmede görüntüsü.



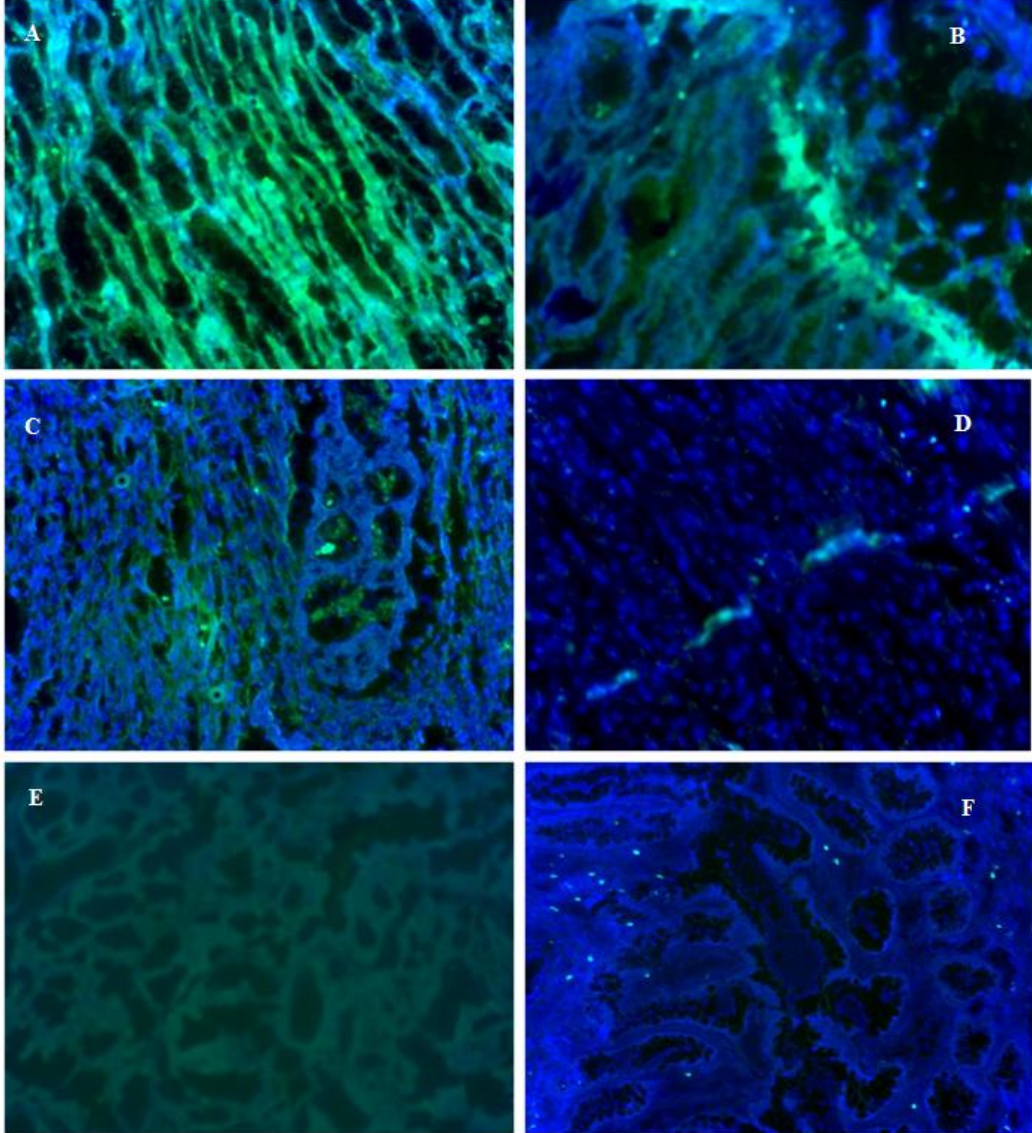
**Şekil 32.** Normal dokunun immün boyama (MMP-7 + hemotoksilen) görüntüleri A. Kolon mukozasının normal histolojik görüntüsü. MMP-7 pozitifliği hiçbir alanda gözlenmiyor, B. (A)'da görülen alanın daha büyük büyütmede görüntüsü, C. Kolon mukozasının normal histolojik görüntüsü, MMP7 (-) olarak değerlendirildi. D (C)'de görülen alanın daha büyük büyütmede görüntüsü.



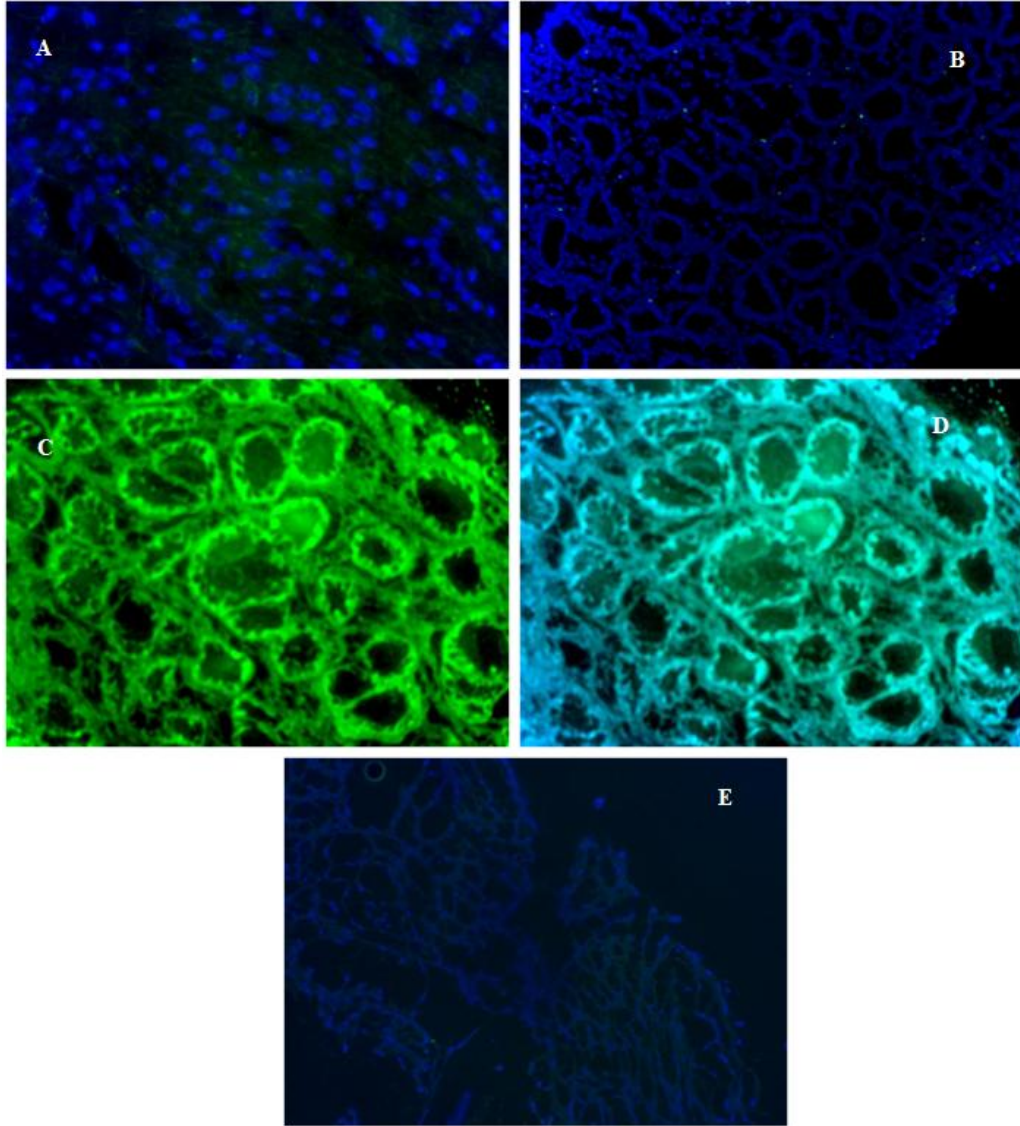
**Şekil 33.** Kolorektal tümör dokusunun immün boyama (MMP-7 + hemotoksilen) görüntüleri A. Kanserli hücrelerde, sitoplazmik granüler MMP-7 pozitifliği izlenmekte, B. (A)'da görülen alanın daha büyük büyütmede görüntüsü, C. MMP-7 immunreaktivitesi pozitif kanser hücreleri ve negatif olan stromal yapılar izlenmekte, D. Kanser hücrelerinde MMP-7 ekspresyonu, farklı yoğunluklarda gözlenmektedir. Stromal yapılar immunreaktivite göstermemektedir, E. Lezyondaki tüm kanserli hücreler MMP-7 (+) olarak izlenmekte, F. Kanser hücrelerinde MMP-7 ekspresyonu, farklı yoğunluklarda gözlenmektedir.

#### 4.4 IN SITU KAZEİN ZİMOGRAFI SONUÇLARI

Kolorektal tümör ve eşlenik normal doku kesitlerinin in situ kazein zimografi görüntüleri Şekil 34 ve 35’de gösterilmiştir. Floresan ışımının görüldüğü bölgeler pozitif kazeinolitik aktivite olarak değerlendirildi. DAPI ile boyanan hücre nükleusları, mavi renkli alanlar şeklinde görülmektedir.



**Şekil 34.** Kolorektal tümör ve normal dokuların ISZ görüntüleri (10x) A ve C. Tümör doku kesitlerinin ISZ görüntüleri. A’da belirgin bir şekilde kazeinolitik aktivitenin varlığı görülürken C’de çok daha az bir aktivite görülüyor. B ve D. A ve C’nin eşlenik normal doku kesitlerinin ISZ görüntüleri. B ve D’de damar yapısının etrafında bir kazeinolitik aktivite görülüyor, bunun dışındaki bölgelerde herhangi bir aktivite bulunmuyor. E ve F. Tümör ve eşlenik normal dokunun negatif kontrolü (EDTA).



**Şekil 35.** Kolorektal tümör ve normal dokuların ISZ görüntüleri (10x) A. Tümör doku kesiti, çok az kazeinolitik aktivitenin varlığı görülüyor. B. A'nın eşlenik normal doku kesiti, herhangi bir kazeinolitik aktivite görülüyor. C. Tümör doku kesiti, oldukça yüksek kazeinolitik aktivite görülüyor. D. C'nin DAPI boyaması ile elde edilen görüntüsü. E. C'nin eşlenik normal doku kesiti, herhangi bir aktivite görülüyor.

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, KKK'lı hastalardan alınan tümörlü ve eşlenik normal mukoza doku örneklerinde MMP-7'nin mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri ile aktivite düzeylerini, ayrıca hücrel lokalizasyonunu ve aktivitesinin lokalizasyonunu inceledik. Bununla birlikte tümör dokusunun MMP-7 mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik değişkenler (cinsiyet, yaş, tümör yerleşimi, tümör boyutu, tümör diferansiyasyonu, histolojik tip, uzak metastaz, T evre, N evre, patolojik evre, perinöral invazyon, lenfatik invazyon, venöz invazyon) arasındaki ilişkileri araştırdık.

Çalışmamızın sonunda, kolorektal tümör dokusundaki rölatif MMP-7 mRNA ekspresyon düzeylerinin, eşlenik normal doku ekspresyon düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu saptandı ( $p = 0,001$ ).

Kolorektal tümör dokusunun rölatif MMP-7 mRNA ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik veriler arasındaki ilişkiyi incelediğimizde ekspresyon düzeyleri ile yaş arasında negatif yönde güçlü derecede anlamlı bir korelasyon olduğu görüldü ( $r = -0,588$   $p = 0,021$ ). Gen ekspresyon düzeyi ile T evre ve P evre arasındaki ilişkiye bakıldığında ise pozitif yönde güçlü derecede anlamlı bir korelasyon olduğu belirlendi ( $r = 0,687$   $p = 0,005$ ;  $r = 0,536$   $p = 0,04$ ). Ancak diğer klinikopatolojik değişkenler arasında herhangi bir korelasyon belirlenmedi.

Elde edilen sonuçlara göre, tümör dokularındaki MMP-7 mRNA ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik değişkenler arasında alt grup karşılaştırması yapıldı. Bu incelemeye göre; 65 yaş ve altında olan bireylerde, 65 yaşın üstünde olan bireylere oranla ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ( $p = 0,029$ ). Ayrıca geç tümör evresinde (T3-4) olan bireylerde, erken tümör evresinde (T0-1-2) olan bireylere göre mRNA ekspresyonunun anlamlı yüksek olduğu görüldü ( $p = 0,008$ ). Patolojik evrede MMP-7'nin mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında evre ilerledikçe ekspresyon düzeylerinin arttığı görüldü ancak alt grup karşılaştırması yapıldığında bu artışın, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi.

Literatür incelendiğinde kolorektal kanserde tümöral dokularda MMP-7 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (170-181) (Tablo 37). Masaki ve arkadaşlarının kolon kanseri dokularında nothern blot ve in situ hibridizasyon tekniğini kullanarak (170); Hong-zhi ve arkadaşlarının rektal kanser dokularında, Pesta ve



arkadaşlarının ise kolorektal kanser dokularında Real Time PCR tekniğini kullanarak yaptıkları çalışmalarda MMP-7 ekspresyonunun normal dokulara göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir (171, 172). Çalışmamızda elde ettiğimiz, MMP-7 ekspresyon düzeyinin tümörlü dokuda normal dokudan daha fazla eksprese edilmesi yönündeki bulgular mevcut literatürler ile uyum göstermektedir.

Hong Zhi ve Masaki, çalışmalarında elde ettikleri ekspresyon düzeylerini klinikopatolojik verilerle karşılaştırdıklarında, Dukes evrelendirmesinde evre yükseldikçe MMP-7 ekspresyonunun arttığını gösterdiler (170, 171). Buna karşılık Pesta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, erken tümör evresi (Evre I-II) ve geç tümör evresi (Evre III-IV) arasında herhangi bir fark belirlenmemiştir (172). Çalışmamızda, geç tümör evresinde erken tümör evresine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek MMP-7 mRNA ekspresyon düzeyinin belirlenmesi ve patolojik evre ilerledikçe MMP-7 ekspresyon düzeyinin artması, Masaki ve Hong-Zhi'nin yaptığı çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Literatür incelendiğinde, Real Time PCR yöntemi kullanılarak MMP-7 gen ekspresyonu ile yaş arasında herhangi bir korelasyonun varlığına rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra Hong-zhi ve arkadaşları; yaptıkları IHC skorlama sonuçlarına göre, MMP-7 ekspresyonu ile yaş arasında negatif korelasyon olduğunu belirlediler (171). Bu bulgu bizim Real Time PCR sonuçlarımızla paralellik göstermektedir ve bu durum proteolitik aktivitenin genç hastalarda daha yüksek olabileceğini göstermektedir.

ELISA çalışmalarımızı değerlendirdiğimizde, tümör ve normal dokularda bulunan MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p = 0,636$ ). Buna karşılık MMP-7 protein düzeyleri ve klinikopatolojik veriler arasındaki ilişki incelendiğinde, perinöral invazyon ile pozitif yönde orta derecede anlamlı bir korelasyon belirlendi ( $r = 0,462$   $p = 0,010$ ). Ancak diğer klinikopatolojik değişkenler arasında herhangi bir korelasyon görülmedi.

Bu sonuç dikkate alınarak, tümör dokularındaki MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri ile perinöral invazyon arasında alt grup karşılaştırması yapıldı. Bu incelemeye göre; perinöral invazyon olan bireylerde, perinöral invazyon olmayan bireylere oranla ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ( $p = 0,042$ ).

Literatür taraması sonucunda, KRK hastalarında ELISA analizi ile MMP-7 protein ekspresyon düzeylerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak daha önce Dokuz Eylül Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılan ELISA

çalışmasında, KRK tümör ve eşlenik normal dokularında bulunan (n = 50) MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri arasında herhangi bir anlamlı fark belirlenmemiştir. Bunun yanı sıra tümörün MMP-7 protein düzeyleri, klinikopatolojik veriler ile karşılaştırıldığında metastaz arasında korelasyon olduğu belirlenmiştir (173).

Bizim ELISA çalışmamızda elde ettiğimiz tümör ve normal arasında anlamlı fark bulunmaması daha önce laboratuvarımızda yapılan ELISA çalışmasını desteklemektedir. Çalışmamızda MMP-7'nin mRNA ekspresyon düzeyleri tümör dokularında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunurken (p = 0,001), protein ekspresyon düzeylerinin tümör ve normal dokular arasında farklı bulunmaması MMP-7'nin KRK dokularında posttranslasyonel olarak regüle edildiğinin bir kanıtıdır. Ayrıca, perinöral invazyon olan olgularda artmış MMP-7 protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve daha önceki ELISA çalışmasında MMP-7 ile metastaz varlığı arasında korelasyonun saptanması yönündeki bulgular, MMP-7'nin tümöre metastatik potansiyel kazandırabileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir. Literatüre bakıldığında, KRK hastalarında MMP-7 protein ekspresyon düzeyi ile perinöral invazyon arasında herhangi bir korelasyon belirleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

İmmünohistokimyasal çalışmalarımızın sonuçlarına baktığımızda, normal kolon ve rektum mukozasında immunreaktivite negatif olarak saptandı. Tümör dokularından alınan kesitlerde ise, MMP-7 immunreaktivitesi farklı yoğunluklarda olmakla birlikte, pozitif olarak değerlendirildi. Normal mukoza dokusunda MMP-7 pozitifliği hiç gözlenmezken, kanser hücrelerinin pek çoğunun sitoplazması ve hücre membranları MMP-7 pozitif boyandı, fakat stromal hücrelerde pozitif boyanma gözlenmedi. Bununla birlikte semi-kantitatif değerlendirme için pozitif boyanan dokular boya alma derecelerine göre skorlandı, ancak bu skorlama sonuçları ile klinikopatolojik veriler arasında herhangi bir korelasyon bulunmadı.

Schwandner ve arkadaşlarının yaptığı IHC çalışmalarında, rektal kanser dokularında karsinom hücrelerinde MMP-7'nin sitoplazma ve hücre membranında pozitif olduğu buna karşın stromal hücrelerde boyama görülmediği belirtilmiştir (174). Aynı şekilde Hong-zhi ve arkadaşları IHC çalışmaları sonucunda rektal kanser hücrelerinin membran ve sitoplazmasının MMP-7 pozitifliğini belirtmişlerdir (171). Schwandner ve Hong-Zhi'nin elde ettiği bu veriler, bizim IHC sonuçlarımızı desteklemektedir. Bunun yanı sıra Schwandner ve arkadaşlarının yaptığı IHC skorlama verilerini klinikopatolojik veriler ile karşılaştırdıklarında, T evre ile arasında pozitif korelasyon olduğunu belirlediler (174). Bu bulgu bizim MMP-7 mRNA

ekspresyon düzeyleri ile T evre arasındaki pozitif korelasyon sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Günümüze kadar KRK'de MMP-7'nin ekspresyon düzeyleri ve immünboyanması üzerine yapılmış bazı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar ve bulguları ile ilgili sonuçlar Tablo 37'da gösterilmiştir.

**Tablo 37.** Kolorektal kanserde MMP-7 ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalar.

<i>Yöntem</i>	<i>Bulgu</i>	<i>Referans</i>
RT-PCR	Kolorektal tümör dokularında MMP-7'nin aşırı ekspresyonu	175 Brabletz T
	Rektal ve kolon tümör hücrelerinde yüksek MMP-7 mRNA ekspresyon düzeyi	176 Roeb E
	Adenomdan karsinom oluşum mekanizmasında yüksek MMP-7 ekspresyon düzeyi	177 Heslin MJ
IHC	Tümör hücrelerinde yüksek MMP-7 protein ekspresyonu Metastaz ile yüksek korelasyon	178 Masaki T
	Dukes Evresi ve Karaciğer metastazı ile MMP-7 protein ekspresyonu arasında yüksek korelasyon	179 Adachi Y
	Tümör hücrelerinde yüksek MMP-7 protein ekspresyonu Sağ kalım ile düşük korelasyon	116 Adachi Y 144 Nagashima Y
	Tümör Evresi ile yüksek korelasyon	116 Adachi Y
Nothern Blot	MMP-7 ekspresyon düzeyi ile Dukes evresi arasında yüksek korelasyon	170 Masaki M
ZIM, PCR	Evre ile yüksek korelasyon	180 Ishikawa T
ISH	Tümör hücrelerinde yüksek MMP-7 protein ekspresyonu Sağ kalım ile düşük korelasyon	181 McDonnell S 144 Nagashima Y

\*ZIM: Zimografi, PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, RT-PCR: Real Time PCR, ISH: In situ Hibridizasyon.

Bütün yaşıyan organizmalarda peptid bağlarının spesifik olarak parçalanması biyolojik proseslerin regülasyonunda oldukça önemlidir. Bu spesifik ve sınırlı substrat parçalaması, pek çok proteinin aktivitesi ve lokalizasyonunu regüle eden proteolitik süreçle ilişkilidir. Örneğin, proteolitik süreç, çoğu proteinin intraselüler ve ekstraselüler lokalizasyonunu kontrol eder; çeşitli enzimleri, sitokinleri, büyüme faktörlerini veya hormonları aktive veya inaktive eder. Bu sebeple bu enzimlerin aktivasyonu veya ekspresyonunda herhangi bir fonksiyon bozukluğu olması durumunda nörodejeneratif ve kardiovasküler hastalıklar, artrit ve kanser gibi patolojik durumlara neden olur (168). Bu nedenle proteazlar potansiyel terapötik hedeflerdir.

Dokulardaki proteazların varlığını belirlemede kullanılan çok çeşitli metodlar bulunmaktadır. Northern blotlama ve RT-PCR, doku ekstraktlarında mRNA'ların kantitasyonu için uygulanırken; in situ hibridizasyon, hücre preparatlarında veya doku kesitlerinde mRNA lokalizasyonunu belirlemek için kullanılır. Ancak transkripsiyonel aktivite belirli bir genin protein ürününün net miktarını ve aktivitesini yansıtmaz. Western blot ve immünohistokimya (IHC), protein miktarını ve lokalizasyonunu belirlemede kullanılır. İmmünohistokimyada kullanılan çoğu antikor bu enzimlerin aktif ve inaktif formlarını ayırt edemez. Ek olarak, bu antikorlar tür-spesiftir ve bütün türlerle çapraz reaksiyon vermez. Dolayısıyla bu teknikler dokudaki proteaz aktivitesi hakkında herhangi bir bilgi sağlayamaz. Çünkü proteazlar inaktif form olan zimojen formunda sentezlenirler ve aktivasyonları için proteolitik bir süreç gerekmektedir. Ayrıca, endojen proteaz inhibitörleri proteazlara bağlanabilir ve inhibe edebilir.

Bu nedenle doku ekstraktlarında proteaz aktivitesini belirlemek için bir takım biyokimyasal teknikler geliştirilmiştir (182). Zimografi hücre ve doku ekstraktlarında proteolitik aktivitenin analizi için kullanılan basit, duyarlı, kantite edilebilen fonksiyonel bir yaklaşımdır ve 25 yıl önce tanımlanmıştır (183). Yöntem, ESM bileşenlerini parçalayan enzimlerin özellikle de MMP'lerin saptanması için kullanılmaktadır. Standart zimografi metodu, bir protein substratı özellikle jelatin, kazein veya fibrin ile ko-polimerize olmuş SDS-PAGE kullanımına dayanır. SDS'in uzaklaştırılmasından sonra renatüre olabilme ve bir ko-polimerize edilmiş substrat üzerinde proteolitik aktivite uygulanabilme yeteneğine sahip olan proteazlar, bu metod ile analiz edilebilir. Zimografi, ELISA gibi diğer metodlardan daha fazla avantajlar sunmaktadır. Pahalı materyallere gerek yoktur (örn. antikorlar) ve aynı substrata

karşı aktivite gösteren farklı molekül ağırlığındaki proteazlar, tek bir jel üzerinde belirlenebilir ve kantite edilebilir (182).

Bizim çalışmamızdaki Kazein zimografi denemelerine bakıldığında proMMP-7 (29kD) varlığı çok net olmamakla birlikte görülmektedir. Ancak tekniğin diğer zimografik tekniklere göre (örneğin jelatin zimografi) duyarlılığının çok düşük olması (minimum  $\mu\text{g}$  protein) ve elde edilen bantların görüntüleme cihazında net bir şekilde görüntülenememesi nedeniyle sonuçlar değerlendirilememiştir. Literatür incelendiğinde kolorektal kanserde MMP-7 için kazein zimografi tekniğini uygulayan üç çalışma bulunmaktadır (180, 184, 185). Itoh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, MMP-7 enzim aktivitesinin kolorektal kanser dokularında normal dokulara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (184). Bunun yanı sıra Ishikawa ve arkadaşları ile Yamamoto ve arkadaşları yaptıkları denemeler sonucunda, adenomlarda MMP-7 aktivitesinin kanserli dokulara oranla daha düşük olduğunu ileri sürdüler (180, 185).

ELISA, Western Blot ve Zimografi tekniklerinde uygulanan doku homojenizasyon basamağı, enzim aktivitesinin lokalizasyonunun incelenmesini engeller. Ek olarak ekstraksiyon prosedürleri doku veya hücrelerde enzimleri aktive eder veya normal şartlarda hücre veya dokunun farklı kompartmanlarında lokalize olan inhibitörlerin aktif enzimlerle etkileşimlerine sebep olur. Aynı şekilde eğer spesifik bir proteaz aktivitesi hasarlı dokunun rölatif olarak küçük bir kısmında lokalize olmuş ise belirlenemeyebilir. Bu sebeplerden dolayı, doku kesitlerinde spesifik proteolitik aktivite lokalizasyon teknikleri, çeşitli fizyolojik ve patolojik şartlarda belirli proteazların üstlendiği roller hakkında önemli ek bilgiler sağlayabilir. Bu tekniklerden biri de dondurulmuş doku kesitlerine zimografinin bir uyarlaması olan in situ zimografidir (ISZ). ISZ doku kesitlerinde proteaz aktivitesi ve lokalizasyonu değerlendirebilmektedir (168).

1994'de P. Libby tarafından MMP ile in situ zimografi teknikleri geliştirilmiştir (186). ISZ göreceli olarak düşük maliyetli bir tekniktir ve enzimatik substrat bazlı bir destek veya kaplama kullanılır. Günümüzde kullanımı genişletilerek çeşitli dokularda spesifik proteaz aktivitesinin (özellikle MMP aktivitesinin) lokalizasyonu için kullanılmaktadır. Donmuş doku kesiti, proteaza spesifik bir substrat üzerine yerleştirilmektedir. Sonraki inkübasyon periyodu sırasında substrat verilen doza bağımlı olarak belirli bir süre sonra doğal lokasyonunda bulunan aktif enzim tarafından parçalanır. Inkübasyon periyodundan sonra, işaretli substratın lizisi ışık veya floresan mikroskopisi ile belirlenebilir. Dolayısıyla doku kesitindeki spesifik

proteaz aktivitesinin tam lokalizasyonunun belirlenmesine olanak verir. Doğal substrat belirlenecek olan proteaz aktivitesini etkilemektedir (168).

İmmünohistokimya, in situ hibridizasyonu, Western blotlama gibi diğer moleküler patoloji teknikleri ile birlikte kullanıldığında ISZ tekniği, proteazların rolü hakkında daha geniş bilgiye sahip olunmasını sağlar. Ancak bu tekniğin de proteazların kantitasyonu açısından bazı sınırlamaları vardır.

Bu çalışmada elde ettiğimiz ISZ sonuçları değerlendirildiğinde, tümör dokularında kazeinolitik aktivitenin varlığını gösteren floresan ışımının normal dokulardaki floresan ışımaya oranla oldukça yüksek olduğu görüldü. Ayrıca tümör dokularındaki bu yüksek floresan ışımaya incelendiğinde, dokunun epitel bölgesinde daha yoğun olduğu belirlendi.

## 5.1 SONUÇ VE ÖNERİLER

Özet olarak çalışmamızda; öncelikle Real Time PCR tekniği ile MMP-7'nin tümör hücrelerinde mRNA ekspresyon düzeylerini inceledik ve normal dokulara kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğunu belirledik. Ayrıca tümör evresiyle birlikte bu ekspresyon düzeyinin arttığını saptadık. Ancak bu sonuçlara dayanarak protein ekspresyonunun gerçekleştiği ileri sürülemez, çünkü MMP'ler post-translasyonel düzeyde de regüle edilmektedirler. Bu nedenle, hem protein ekspresyonunu incelemek hem de doku kesitlerindeki lokalizasyonunu görüntüleyebilmek amacıyla ELISA ve IHC tekniklerini kullandık. ELISA sonuçlarına göre, kolorektal tümör ve normal dokularında protein ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığını tespit ettik. IHC verilerimizi incelediğimizde MMP-7 immünboyamanın tümör dokusunun epitel bölgesinde normal dokuya göre daha yüksek olduğunu ve ayrıca MMP-7'nin hücre sitoplazması ve membranında lokalize olduğunu belirledik. Ancak yüksek protein ekspresyon düzeyi, proteolitik aktivitenin de yüksek olduğunu göstermez. Nitekim dokuda bulunan TIMP'lerin varlığı ve konsantrasyonu veya sentezlenen proteinlerin latent formda olmaları proteolitik aktiviteyi engelleyebilir. Hem latent hem de aktif formları ayrı ayrı değerlendirebilmek amacıyla kazein zimografi tekniği uygulanmıştır ancak tekniğin düşük duyarlılığa sahip olması (minimum  $\mu\text{g}$  protein) ve dokularımızdaki total MMP-7 düzeyinin düşük olması (pg protein) nedeniyle verimli sonuç elde edilememiştir. Bununla beraber kazein zimografi tekniğinin uygulama basamağı olan homojenizasyon basamağında latent enzimler aktif forma geçebilmekte veya degrade olabilmektedir. Ayrıca protein aktivitesi düşük olarak belirlense de dokunun belirli bölgesinde lokalize olmuş ve o bölgede

yüksek derecede proteolize neden oluyor olabilir. Bu nedenle, doku kesitlerindeki kazeinolitik aktivitenin varlığını ve lokalizasyonunu belirlemek amacıyla ISZ tekniği kullanılmıştır. ISZ sonuçlarına bakıldığında tümör dokularında özellikle epitel alanda kazeinolitik aktivitenin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Bugüne kadar kolorektal kanserde kazeinolitik aktivitenin lokalizasyonunu gösteren herhangi bir çalışmanın bulunmaması bizim çalışmamızın özgüllüğünü ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak;

- ✓ Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarına yapılan katkı açısından değerlendirildiğinde; Real Time PCR ve In Situ Kazein Zimografi yöntemlerinin laboratuvarımızda uygulanabilirliği ortaya konulmuştur ve bundan sonraki çalışmalara temel oluşturması amaçlanmıştır.
- ✓ Literatüre katkısı açısından değerlendirildiğinde ise; elde ettiğimiz sonuçlar, genç olgularda ve hastalığın geç evresinde olan olgular ile perinöral invazyon görülen olgular için yeni kemopreventif ve adjuvan tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde MMP-7'nin hedef molekül olabileceğini ortaya koymaktadır. Ek olarak, ISZ yöntemi kullanılarak kolorektal kanser hastalarında kazeinolitik aktivitenin lokalizasyonunun gösterilmesi, literatüre yeni bir katkı sağlayacaktır.

## ALTINCI BÖLÜM

### 6. KAYNAKLAR

1. Leon MP, Gregorio CD. Pathology of colorectal cancer. *Digest Liver Dis*, 2001;33: 372-86.
2. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Bühler MW. Colorectal cancer. *Lancet*, 2005;365: 153-65.
3. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg S, Diaz B et al. The national polyp study: patient and polyp characteristics associated with high grade dysplasia in colorectal adenomas. *J Natl Cancer Inst*, 1990;98: 371–379.
4. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*, 1992;1: 229–233.
5. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-deVries M, vanBloom JH. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 1987;327: 293–297.
6. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science*, 1991;253: 49–53.
7. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science*, 1991;251: 1366–1370.
8. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, Vogelstein B. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 1990;247: 49–59.
9. Dursun A, Akyurek N, Gunel N, Yamac D. Prognostic implication of nm23-H1 expression in colorectal carcinomas. *Pathology*, 2002;34: 427–432.
10. Xiaoyun F, William CP, Jay WH. Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2008;19: 2–13.
11. Kleiner DE, and Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol*, 1999;43: 42–51.
12. Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, and Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 2006;231: 20–27.



13. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlander N, Horner MJ, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Altekruse SF, Lewis DR et al. SEER cancer statistics review. 2008;P: 1975-2005.
14. Agency for HealthCare Policy and Research, Rockville, MD. Colorectal cancer screening. technical review. AHCPR (Agency for Health Care Policy and Research), 1998;Publication No. 98-0033.
15. Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann. Intern. Med*, 1990;113(10): 779-788.
16. Beart RW, Melton LJ3rd, Maruta M, Dockerty MB, Frydenberg, HB, O'Fallon WM. Trends in right and left-sided colon cancer. *Dis. Colon Rectum*, 1983;26(6): 393-398.
17. Rizzo DC. *Delmar's Fundamentals of Anatomy & Physiology*. Delmar: 2001.
18. [http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201\\_McKinley/Digestive%20System.htm](http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/Digestive%20System.htm).
19. Elson CO, Kagnoff MF, Fiocchi C, Befus AD, Targan S. Intestinal immunity and inflammation: recent progress. *Gastroenterology*, 1986;91: 746-68.
20. Shamsuddin AM, Phelps PC, Trump BF. Human large intestinal epithelium: light microscopy, histochemistry, and ultrastructure. *Hum. Pathol*, 1982;13(9): 790-803.
21. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/330544/large-intestine>.
22. Burt RW. Colon cancer screening. *Gastroenterology*, 2000;119: 837-53.
23. Engl JM, de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev*, 2004;4: 769—780.
24. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*, 1996;78: 1149-67.
25. Ponz de Leon M, Della Casa G, Benatti, Q Jass JR. Colorectal adenomas in surgical specimens from subjects with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Histopathology*, 1995;27: 263-7.
26. Peltomaki P. Microsatellite instability as an indicator of hereditary susceptibility to colon cancer. *Gastroenterology*, 1995;109: 2031-3.
27. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun M.J. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin*, 2008;58(2): 71-96.

28. Ries LAG, Young, JL, Keel GE, Eisner MP, Lin YD, Horner MJ. SEER Survival monograph: cancer survival among adults: U.S. SEER program, 1988-2001, patient and tumor characteristics. National Cancer Institute, 2007, SEER Program.
29. Wu X, Chen VW, Martin J, Roffers S, Groves FD, Correa CN, Hamilton-Byrd E, Jemal A. Subsite- specific colorectal cancer incidence rates and stage distributions among Asians and Pacific Islanders in the United States, 1995 to 1999. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 2004;13(7): 1215-1222.
30. Dietary fiber and risk of colorectal cancer and adenoma in women. *New England Journal of Medicine*, 1999;340: 169-76.
31. Dietary fiber and colorectal cancer: an ongoing saga. *Journal of the American Medical Association*, 2005;294(22): 2904 – 2906.
32. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *Journal of Pathological Bacteriology*, 1932;35:323.
33. Wittekind CH, Sobin LH. TNM classification of malignant tumours. New York: Wiley-Liss, 2002.
34. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/colon/Patient/page2>.
35. Pepper MS et al. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein*, 1996;49: 138-162.
36. Marc AL, Madeleine MH and Dylan RE. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Exp. Rev. Mol. Med*, 2003;Vol.5, DOI: 10.1017/S1462399403006628.
37. Seftor RE. et al. Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1- matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res*, 2001;61: 6322-6327
38. Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinase function. In: proceedings of the biochemical society symposium. 2003, p. 1–14.
39. Gomis-Ruth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol*, 2003;24: 157–202.
40. Egeblad M and Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2: 161-174.

41. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A and Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview molecular and cellular biochemistry. 2003;253: 269–285.
42. Becker JW. et al. Stromelysin-1: threedimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci*, 1995;4: 1966-1976.
43. Nagase H. et al. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans*, 1991;19: 715-718.
44. Bode W, Gomis-Ruth FX and Stockler W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zincbinding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins’. *FEBS Lett*, 1993;331: 134-140.
45. Gohlke U. et al. The C-terminal (haemopexin-like) domain structure of human gelatinase A (MMP2): structural implications for its function. *FEBS Lett*, 1996;378: 126-130.
46. Steffensen B, Wallon UM. and Overall CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem*, 1995;270: 11555-11566.
47. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix Metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2004;4: 617–29.
48. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*, 2000;14: 2123–33.
49. Parks WC. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen*, 1999;7: 423-32.
50. Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the fuss about? *Matrix Biol*, 1997;15: 519–526.
51. Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. New York: Academic. Pp, 1988; 299–359.
52. Yan C and Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression *J. Cell. Physiol*, 2007;211: 19–26.
53. Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol*, 2005; 205:130–144.

54. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990;87: 5578–82.
55. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol*, 1997;137: 1445–57.
56. Dumin JA, Dickeson SK, Stricker TP, Bhattacharyya-Pakrasi M, Roby JD, Santoro SA, et al. Procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. *J Biol Chem*, 2001;276: 29368–74.
57. Bannikov GA, Karelina TV, Collier IE, Marmer BL, Goldberg GI. Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J Biol Chem*, 2002;277: 16022–7.
58. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*, 1995;375: 244–7.
59. Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2). *FEBS Lett*, 1996;393: 101–4.
60. Kang T, Nagase H, Pei D. Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-golgi network. *Cancer Res*, 2002;62: 675–81.
61. Illman SA, Keski-Oja J, Parks WC, Lohi J. Mouse epilysin (MMP-28) is alternatively spliced and processed by a furin-like pro-protein convertase. *Biochemistry*, 2003;375: 191–7.
62. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*, 1997;378: 151–60.
63. HanYP, Yan C, Zhou L, Qin L, Tsukamoto H. A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem*, 2007;282: 12928–39.
64. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*, 1995;270: 5331–8.

65. Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y, et al. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*, 2000;275: 12080–9.
66. Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem*, 2000;275 :26411–5.
67. Cao J, Sata H, Takino T, Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *J Biol Chem*, 1995;270: 801–5.
68. Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fujii Y, Sato H, et al. Membrane type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer Res*, 1996;56: 2707–10.
69. Toth M, Bernardo MM, Gervasi DC, Soloway PD, Wang Z, Bigg HF, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J Biol Chem*, 2000;275: 41415–23.
70. Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, et al. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J*, 2001;20: 4782–93.
71. Cao J, Rehemtulla A, Bahou W, Zucker S. Membrane type matrix metalloproteinase 1 activates pro-gelatinase A without furin cleavage of the N-terminal domain. *J Biol Chem*, 1996;271: 30174–80.
72. Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C, Test ST. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science*, 1985;227: 747–9.
73. Michaelis J, Vissers MC, Winterbourn CC. Different effects of hypochlorous acid on human neutrophil metalloproteinases: activation of collagenase and inactivation of collagenase and gelatinase. *Arch Biochem Biophys*, 1992;292: 555–62.
74. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7) A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem*, 2001;276: 41279–87.

75. Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, et al. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxyxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 1997;342: 261–74.
76. Harrison JE, Schultz J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem*, 1976;251: 1371–4.
77. Peskin AV, Winterbourn CC. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radic Biol Med*, 2001;30: 572–9.
78. Peppin GJ, Weiss SJ. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986;83: 4322–6.
79. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 1994;94: 437–44.
80. Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu FF, Mueller DM, Pennathur S, Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J Biol Chem*, 1997;272: 3520–6.
81. Mackay AR, Hartzler JL, Pelina MD, Thorgeirsson UP. Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. *J Biol Chem*, 1990;265: 21929–34.
82. Filippov S, Caras I, Murray R, Matrisian LM, Chapman Jr HA, Shapiro S, et al. Matrilysin-dependent elastolysis by human macrophages. *J Exp Med*, 2003;198: 925–35.
83. Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*, 1996;85: 683–93.
84. Yu WH, Woessner Jr JF. Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrilysin (matrix metalloproteinase 7). *J Biol Chem*, 2000;275: 4183–91.

85. Yu WH, Woessner Jr JF, McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev*, 2002;16: 307–23.
86. Yamamoto K, Higashi S, Kioi M, Tsunozumi J, Honke K, Miyazaki K. Binding of active matrilysin to cell surface cholesterol sulfate is essential for its membrane-associated proteolytic action and induction of homotypic cell adhesion. *J Biol Chem*, 2006;281: 9170–80.
87. Shiomi T, Inoki I, Kataoka F, Ohtsuka T, Hashimoto G, Nemori R, et al. Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151. *Lab Invest*, 2005;85: 1489–506.
88. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 2003;92: 827–39.
89. Chen P, Farivar AS, Mulligan MS, Madtes DK. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 deficiency abrogates obliterative airway disease after heterotopic tracheal transplantation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006;34: 464–72.
90. Kim KH, Burkhardt K, Chen P, Frevert CW, Randolph-Habecker J, Hackman RC, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 deficiency amplifies acute lung injury in bleomycin-exposed mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005;33: 271–9.
91. Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem*, 1994;269: 9352–60.
92. Gill SE, Pape MC, Khokha R, Watson AJ, Leco KJ. A null mutation for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) impairs murine bronchiole branching morphogenesis. *Dev Biol*, 2003;261: 313–23.
93. Gill SE, Pape MC, Leco KJ. Tissue inhibitor of metalloproteinases 3 regulates extracellular matrix—cell signaling during bronchiole branching morphogenesis. *Dev Biol*, 2006;298: 540–54.
94. Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer*, 2003;89: 817–1821.

95. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, 2001;107: 789– 800.
96. Mott JD, Thomas CL, Rosenbach MT, Takahara K, Greenspan DS, Banda MJ. Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. *J Biol Chem*, 2000;275: 1384–90.
97. Emonard H, Bellon G, Troeberg L, Berton A, Robinet A, Henriot P, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of pro-MMP-2 TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J Biol Chem*, 2004;279: 54944–51.
98. Yang Z, Strickland DK, Bornstein P. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem*, 2001;276: 8403–8.
99. Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem*, 2001;276: 15498–503.
100. Barmina OY, Walling HW, Fiacco GJ, Freije JM, Lopez-Otin C, Jeffrey JJ, et al. Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. *J Biol Chem*, 1999: 30087–93.
101. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 1980;284: 67–68.
102. Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*, 1997;277: 225–228.
103. Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: Identification of the cleavage sites, kinetic analyzes and transforming growth factor-beta 1 release. *Biochem J*, 1997;322: 809–814.
104. Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci*, 2001;114: 111–118.



105. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, 200;14: 163–176.
106. Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem*, 1994;269: 25742–25746.
107. Thrailkill KM, Quarles LD, Nagase H, Suzuki K, Serra DM, Fowlkes JL. Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 1995;136: 3527–3533.
108. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res*, 2001;61: 237–242.
109. Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A, Vlodavsky I, Miao HQ, Ma YS. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996;93: 7069–7074.
110. Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science*, 1995;267: 891–893.
111. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med*, 1995;182: 1777–1783.
112. Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements JM, Crimmin M, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, et al. Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. *J Leukoc Biol*, 1995;57: 774–777.
113. Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH, Matrisian LM. Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Mol Carcinog*, 1994;10: 199–206.
114. Yang W, Aii S, Gorrin-Rivas MJ, Mori A, Onodera H, Imamura M. Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer*, 2001;91: 1277–1283.

115. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue rna levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol*, 1996;14: 3133–3140.
116. Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Arimura Y, Nishi M, Endo T, Imai K. Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers. *Int. J Cancer*, 2001;95: 290–294.
117. Shiozawa J, Ito M, Nakayama T, Nakashima M, Kohno S, Sekine I. Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol*, 2000;13: 925–933.
118. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 1997;89: 1260–1270.
119. Wagenaar-Miller RA, Gorden L, and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: Is it worth talking about? *Cancer and Metastasis Reviews*, 2004;23: 119–135.
120. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*, 2000;18: 1135–1149.
121. Harrell PC, McCawley LJ, Fingleton B, McIntyre JO, Matrisian LM. Proliferative effects of apical, but not basal, matrix metalloproteinase-7 activity in polarized MDCK cells. *Exp Cell Res*, 2005;303: 308–320.
122. Burke B. The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity. *Immunobiology*, 2004;209: 51–56.
123. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*, 1994;370: 555–557.
124. Vargo-Gogola T, Crawford HC, Fingleton B, Matrisian LM. Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand. *Arch Biochem Biophys*, 202;408: 155–161.
125. Von Bredow DC, Nagle RB, Bowden GT, Cress AE. Cleavage of beta 4 integrin by matrilysin. *Exp Cell Res*, 1997;236: 341–345.
126. Yamamoto H, Adachi Y, Itoh F, Iku S, Matsuno K, Kusano M, Arimura Y, Endo T, Hinoda Y, Hosokawa M, Imai K. Association of matrilysin expression with recurrence

- and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 1999;59: 3313–3316.
127. Aihara R, Mochiki E, Nakabayashi T, Akazawa K, Asao T, Kuwano H. Clinical significance of mucin phenotype, beta-catenin and matrix metalloproteinase 7 in early undifferentiated gastric carcinoma. *Br J Surg*, 2005;92: 454–462.
  128. Yamamoto H, Iku S, Adachi Y, Imsumran A, Taniguchi H, Nosho K, Min Y, Horiuchi S, Yoshida M, Itoh F, Imai K. Association of trypsin expression with tumour progression and matrilysin expression in human colorectal cancer. *J Pathol*, 2003;199: 176–184.
  129. Jones LE, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP, Boyd MT. Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clin Cancer Res*, 2004;10: 2832–2845.
  130. Bolon I, Devouassoux M, Robert C, Moro D, Brambilla C, Brambilla E. Expression of urokinase-type plasminogen activator, stromelysin 1, stromelysin 3, and matrilysin genes in lung carcinomas. *Am J Pathol*, 1997;150: 1619–1629.
  131. Karelina TV, Goldberg GI, Eisen AZ. Matrilysin (PUMP) correlates with dermal invasion during appendageal development and cutaneous neoplasia. *J Invest Dermatol*, 1994;103: 482–487.
  132. Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol*, 1996;149: 273–282.
  133. Pajouh MS, Nagle RB, Breathnach R, Finch JS, Brawer MK, Bowden GT. Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1991;117: 144–150.
  134. Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer*, 2005;114: 19–31.
  135. Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, Vargo-Gogola TC, Begtrup JL, Peterson TE, Fingleton B, Shirai T, Matrisian LM, Futakuchi M. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell*, 2005;7: 485–496.

136. Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997;94: 1402–1407.
137. Coppock HA, White A, Aplin JD, Westwood M. Matrix metalloprotease- 3 and -9 proteolyze insulin-like growth factor-binding protein-1. *Biol Reprod*, 2004;71: 438–443.
138. Miyamoto S, Yano K, Sugimoto S, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Kodama K, Goya M, Chiba T, Ochiai A. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res*, 2004;64: 665–671.
139. Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Sedlacek R. Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. *Mol Biol Cell*, 2003;14: 4569–4580.
140. Nakamura M, Miyamoto S, Maeda H, Ishii G, Hasebe T, Chiba T, Asaka M, Ochiai A. Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulinlike growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005;333: 1011–1016.
141. Mochizuki S, Shimoda M, Shiomi T, Fujii Y, Okada Y. ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004;315: 79–84.
142. Holler N, Tardivel A, Kovacovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, Tinel A, Deperthes D, Calderara S, Schulthess T, Engel J, Schneider P, Tschopp J. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*, 2003;23: 1428–1440.
143. Mohan MJ, Seaton T, Mitchell J, Howe A, Blackburn K, Burkhart W, Moyer M, Patel I, Waitt GM, Becherer JD, Moss ML, Milla ME. The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry*, 2002;41: 9462–9469.
144. Nagashima Y, Hasegawa S, Koshikawa N, Taki A, Ichikawa Y, Kitamura H, Misugi K, Kihira Y, Matuo Y, Yasumitsu H, Miyazaki K. Expression of matrilysin in vascular

- endothelial cells adjacent to matrilysin-producing tumors. *Int J Cancer*, 1997;72: 441–445.
- 145.** Huo N, Ichikawa Y, Kamiyama M, Ishikawa T, Hamaguchi Y, Hasegawa S, Nagashima Y, Miyazaki K, Shimada H. MMP-7 (matrilysin) accelerated growth of human umbilical vein endothelial cells. *Cancer Lett*, 2002;177: 95–100.
- 146.** Nishizuka I, Ichikawa Y, Ishikawa T, Kamiyama M, Hasegawa S, Momiyama N, Miyazaki K, Shimada H. Matrilysin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo. *Cancer Lett*, 2001;173: 175–182.
- 147.** Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol*, 1998;161: 6845–6852.
- 148.** Lucas R, Holmgren L, Garcia I, Jimenez B, Mandriota SJ, Borlat F, Sim BK, Wu Z, Grau GE, Shing Y, Soff GA, Bouck N, Pepper MS. Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood*, 1998;92: 4730–4741.
- 149.** Heljasvaara R, Nyberg P, Luostarinen J, Parikka M, Heikkila P, Rehn M, Sorsa T, Salo T, Pihlajaniemi T. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp Cell Res*, 2005;307: 292–304.
- 150.** Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, Fukai N, Azar DT. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001;42: 2517–2524.
- 151.** Chang JH, Javier JA, Chang GY, Oliveira HB, Azar DT. Functional characterization of neostatins, the MMP-derived, enzymatic cleavage products of type XVIII collagen. *FEBS Lett*, 2005;579: 3601–3606.
- 152.** Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol*, 2005;169: 681–691.
- 153.** Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*, 1999;189: 300–308.
- 154.** Fingleton BM, Heppner Goss KJ, Crawford HC, Matrisian LM. Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis. *APMIS*, 1999;107: 102–110.

- 155.** Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, 1997;275: 1787–1790.
- 156.** Crawford HC, Fingleton B, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian L. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*, 1999;18: 2883–2891.
- 157.** Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO*, 1997;16: 3797–3804.
- 158.** <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
- 159.** Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jona'k J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006;27: 95–125.
- 160.** Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons: 2003.
- 161.** <http://www.neb.com/nebecomm/products/productE6500.asp>.
- 162.** Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 1988;175(1): 231-237.
- 163.** Leber TM and Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem*, 1997;249: 24-28.
- 164.** [http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html).
- 165.** Maurel J, Nadal C, Garcia-Albeniz X, Gallego R, Carcereny E, Almendro V, et al. Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2007;121: 1066–71.
- 166.** [http://www.newenglandbiolabs.de/en/index.php?option=com\\_content&task=view&id=14&Itemid=20](http://www.newenglandbiolabs.de/en/index.php?option=com_content&task=view&id=14&Itemid=20)
- 167.** [http://www.abdserotec.com/antibodies/high\\_performance\\_reagents\\_to\\_support\\_immunohistochemistry-840.html](http://www.abdserotec.com/antibodies/high_performance_reagents_to_support_immunohistochemistry-840.html).
- 168.** Yan SJ, Blomme EAG. In situ zymography: a molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections. *Vet Pathol*, 2003;40: 227–236.
- 169.** Itatsu K, Zen Y, Ohira S, Ishikawa A, Sato Y, Harada K, Ikeda H, Sasaki M, Nimura Y and Nakanuma Y. Immunohistochemical analysis of the progression of flat and

- papillary preneoplastic lesions in intrahepatic cholangiocarcinogenesis in hepatolithiasis. *Liver International*, 2007; 1174-1184.
- 170.** Masaki M, Graham FB, Koshi M, Hiroaki U, Tsuyoshi A and Keizo S. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas. *Cancer*, 1995;75: 1516-9.
- 171.** Hong-zhi L, Zong-guang Z, Lie Y, Yong-yang Y et al. Clinicopathologic and prognostic significance of MMP-7 (Matrilysin) expression in human rectal cancer. *J Clin Oncol*, 2005;35: 739-744.
- 172.** Pesta M, Topolcan O, Holubec L, Rupert K, Cerna M et al. Clinicopathological assessment and quantitative estimation of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and the inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res*, 2007;27: 1863-1868.
- 173.** Oktay G, Terzi C, Cavdar Z, İşlekel H, Canda AE, Füzün M, Küpelioglu A, Güner G. Matrix metalloproteinase -7, -13, -2 and -9 in colorectal carcinoma: relationship to clinicopathological variables. *FEBS Journal*, 2006;273: 267.
- 174.** Schwandner O, Schlamp A, Broll R, Bruch HP. Clinicopathologic and prognostic significance of matrix metalloproteinases in rectal cancer. *Int J Colorectal Dis*, 2007;22: 127-136.
- 175.** Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F and Krichner T. B-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol*, 1999;155: 1033-1038.
- 176.** Roeb E, Arndt M, Jansen B, Schumpelick V and Matern S. Simultaneous determination of matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-1, MMP-3 and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis*, 2004;19(6): 518-524.
- 177.** Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Urist MM. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg*, 2001;233: 786-792.
- 178.** Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Goto A, Sakamoto A, Atomi Y. Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *Br J Cancer*, 2001;84: 1317-1321.

- 179.** Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut*, 1999;45: 252–258.
- 180.** Ishikawa T, Ichikawa Y, Mitsuhashi M, Momiyama N, Chishima T, Tanaka K, Yamaoka H, Mayazakic K, Nagashima Y, Akitaya T, Shimada H. Matrilysin is associated with progression of colorectal tumor. *Cancer Lett*, 1996;107: 5–10.
- 181.** McDonnell S, Navre M, Coffey RJ, Matrisian LM. Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas. *Mol Carcinog*, 1991;4: 527–533.
- 182.** Wilma M, Frederiks and Olaf RF. Mook Metabolic Mapping of Proteinase Activity with Emphasis on In Situ Zymography of Gelatinases: Review and Protocols. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2004;52(6): 711–722.
- 183.** Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem*, 1980;102: 196–202.
- 184.** Itoh F, Yamamoto H, Hinoda Y, Imai K. Enhanced secretion and activation of matrilysin during malignant conversion of human colorectal epithelial and its relationship with invasive potential of colon cancer cells. *Cancer*, 1996; 77: 1717-1721.
- 185.** Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Senota A, Yoshimoto M, Nakamura H, Imai K, Yachi A. Expression of matrilysin mRNA in colorectal adenomas and its induction by truncated fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994;;201(2): 657-64.
- 186.** Libby P, Sukhova G K, Lark M W, Galis Z S. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*,1994;94: 2493-2503.