

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON KANSER HÜCRELERİNDE RhoC
YOLAKLARI İLE EKSTRASELLÜLER
PROTEOLİZ ARASINDAKİ OLASI İLİŞKİNİN
İNVAZYON VE METASTAZ AÇISINDAN
BELİRLENMESİ**

DİDEM KELEŞ

**BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2015

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970004

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON KANSER HÜCRELERİNDE RhoC
YOLAKLARI İLE EKSTRASELLÜLER
PROTEOLİZ ARASINDAKİ OLASI İLİŞKİNİN
İNVAZYON VE METASTAZ AÇISINDAN
BELİRLENMESİ**

**BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ**

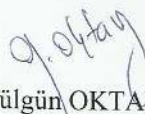
DİDEM KELEŞ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Gülgün OKTAY

Bu araştırma TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı ve DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012.KB.SAG.066 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970004

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı,
Biyokimya Doktora programı öğrencisi Didem KELEŞ '**Kolon Kanseri**
Hücrelerinde RhoC Yolakları ile Ekstrasellüler Proteoliz Arasındaki Olası
İlişkinin İnvazyon ve Metastaz Açısından Belirlenmesi' konulu Doktora
tezini 26/08/2015 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Gülgün OKTAY

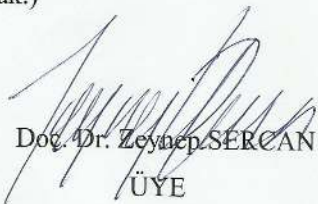
BAŞKAN

(Dokuz Eylül Üniv. Tıp Fak.)


Prof. Dr. Semra A. KOÇTÜRK

ÜYE

(Dokuz Eylül Üniv. Tıp Fak.)


Doç. Dr. Zeynep SERCAN

ÜYE

(Dokuz Eylül Üniv. Tıp Fak.)


Prof. Dr. Canan ÇOKER

ÜYE

(Dokuz Eylül Üniv. Tıp Fak.)


Prof. Dr. H. Hakan AYDIN

ÜYE

(Ege Üniv. Tıp Fak.)

Doç. Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR

YEDEK ÜYE

(Dokuz Eylül Üniv. Tıp Fak.)

Prof. Dr. Handan AK ÇELİK

YEDEK ÜYE

(Ege Üniv. Tıp Fak.)

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	iv
KISALTMALAR	x
TEŞEKKÜR	xiii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	5
1.2 Araştırmanın Amacı	5
1.3 Araştırmanın Hipotezleri	6
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 KOLOREKTAL KANSER	7
2.1.1 Kolorektal Kanserın Evrelendirilmesi	8
2.1.2 Kolorektal Kanser Progresyonu	10
2.1.3 Kolorektal Kanser Metastazı	12
2.2 RHO-GTPaz AİLESİ	13
2.2.1 Effektör Moleküller: ROCK ve mDia	15
2.2.2 Rho GTPaz'lar ve Kanser	16
2.2.3 Migrasyon ve İnvazyonda Rho GTPaz'ların Rollerı	18
2.2.4 Kanserde RhoC'nin Önemi	20
2.3 MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR	22
2.3.1 MMP'lerin Domain Yapısı	26
2.3.2 MMP'lerin Regülasyonu	28
2.3.2.1 MMP Gen Ekspresyonunun Regülasyonu	28
2.3.2.2 Proenzim Aktivasyonu (Sistein Şalter Mekanizması)	29
2.3.2.2.1 MMP-2'nin, MT1-MMP ve TIMP-2 Aracılığıyla Aktivasyonu	30

2.3.2.3 MMP'lerin İnaktivasyonu	31
2.3.3 Kanser Progresyonu ve Metastazda MMP'ler	32
2.3.3.1 Kolorektal Kanserde MMP'lerin Rolü	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1 Araştırmanın Tipi	38
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	39
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi /Çalışma Grupları	39
3.4 Çalışma Materyali	39
3.5 Araştırmanın Değişkenleri	39
3.6 Veri toplama Araçları	39
3.6.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	39
3.6.2 Yöntemler	42
3.6.2.1 Hücre Kültürü	42
3.6.2.1.1 Kültür Ortamlarının Hazırlanması	43
3.6.2.1.2 Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	43
3.6.2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması	44
3.6.2.1.4 Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü	44
3.6.2.1.5 Hücrelerin Dondurulması	45
3.6.2.1.6 Katlanma Zamanı Tayini	46
3.6.2.2 Hücre Canlılık Testi (WST-1)	46
3.6.2.3 RhoC siRNA Transfeksiyonu	47
3.6.2.4 Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Real Time PCR	49
3.6.2.4.1 Total RNA İzolasyonu	50
3.6.2.4.1.1 RNA'nın % 1,2 Formaldehit Agaroze Jelde Görüntülenmesi	51
3.6.2.4.2 Komplementer DNA (cDNA) sentezi	52
3.6.2.4.3 Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	53
3.6.2.5 Western Blot	55
3.6.2.5.1 Hücre Lizisi	55
3.6.2.5.2 Protein Tayini	56
3.6.2.5.3 SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	57
3.6.2.5.4 Proteinlerin PVDF Membrana Transferi	58
3.6.2.5.5 Bloklama, Antikor Bağlaması ve Kemilüminesan Görüntüleme	59
3.6.2.6 Jelatin Zimografi	60
3.6.2.6.1 Ortamların Konsantrasyon Edilmesi	60
3.6.2.6.2 Protein Tayini	61

3.6.2.6.3	Jelatin Zimogram Jel Hazırlama	61
3.6.2.6.4	Jelatin Zimografi	61
3.6.2.7	Matrijel İnvazyon ve Hücre Migrasyonu	62
3.7	Araştırma Planı ve Takvimi	64
3.8	Verilerin Değerlendirilmesi	65
3.9	Araştırmanın Sınırlılıkları	65
3.10	Etik Kurul Onayı	65
4.	BULGULAR	66
4.1	Kolon Kanseri Hücrelerinin Katlanma Zamanları	66
4.2	Transfeksiyon Reaktifinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	68
4.3	REAL-TIME PCR Sonuçları	70
4.3.1	RNA Örneklerinin %1,2 Formaldehit Agaroza Jelde Görüntülenmesi	70
4.3.2	mRNA Ekspresyon Analizi	71
4.3.2.1	RhoC mRNA Ekspresyonu	72
4.3.2.2	mDia mRNA Ekspresyonu	74
4.3.2.3	ROCK-1 mRNA Ekspresyonu	76
4.3.2.4	MMP-2 mRNA Ekspresyonu	78
4.3.2.5	MMP-9 mRNA Ekspresyonu	79
4.3.2.6	MMP-7 mRNA Ekspresyonu	81
4.3.2.7	MMP-14 mRNA Ekspresyonu	83
4.3.2.8	TIMP-1 mRNA Ekspresyonu	85
4.3.2.9	TIMP-2 mRNA Ekspresyonu	87
4.4	Western Blot Sonuçları	89
4.4.1	RhoC Protein Ekspresyonu	89
4.4.2	MMP-2 Protein Ekspresyonu	92
4.4.3	MMP-9 Protein Ekspresyonu	93
4.4.4	MMP-7 Protein Ekspresyonu	95
4.4.5	MMP-14 Protein Ekspresyonu	96
4.4.6	TIMP-2 Protein Ekspresyonu	96
4.5	Jelatin Zimografi Sonuçları	98
4.6	Hücre Migrasyonu ve Matrijel İnvazyon Sonuçları	102

5.	<i>TARTIřMA</i>	105
6.	<i>SONUÇ VE ÖNERİLER</i>	110
7.	<i>KAYNAKLAR</i>	113
8.	<i>EKLER</i>	129

TABLO DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. TNM evrelendirme sistemi.	8
Tablo 2. Duker evrelendirme sistemi.	9
Tablo 3. Kolorektal karsinomların Duker ve TNM evrelendirme sistemi.	9
Tablo 4. Proteazların sınıflandırılması	23
Tablo 5. MMP'ler ve substratları	24
Tablo 6. Proje süresince kullanılan kimyasal malzeme ve kitlerin marka ve kod numaraları	40
Tablo 7. Proje süresince kullanılan cihazların marka ve kod numaraları.....	42
Tablo 8. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri	43
Tablo 9. % 1,2'lik Formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler	52
Tablo 10. RT mix hazırlama	53
Tablo 11. Master mix hazırlama	54
Tablo 12. Hücre lizisinde kullanılan çözeltiler	56
Tablo 13. SDS-Poliakrilamid jellerin hazırlanması	57
Tablo 14. Kullanılan çözeltiler ve özellikleri	60
Tablo 15. Jelatin zimografide poliakrilamid jellerin hazırlanması	61
Tablo 16. Jelatin zimografi yönteminde kullanılan çözeltiler	62
Tablo 17. Kolon kanser hücrelerinde RhoC mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	72
Tablo 18. Kolon kanser hücrelerinde RhoC mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri..	73
Tablo 19. Kolon kanser hücrelerinde mDia mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	74
Tablo 20. Kolon kanser hücrelerinde mDia mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri ..	75
Tablo 21. Kolon kanser hücrelerinde ROCK-I mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	76
Tablo 22. Kolon kanser hücrelerinde ROCK-I mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.	77
Tablo 23. Kolon kanser hücrelerinde MMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	78

Tablo 24. Kolon kanser hücrelerinde MMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.	79
Tablo 25. Kolon kanser hücrelerinde MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	79
Tablo 26. Kolon kanser hücrelerinde MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri	80
Tablo 27. Kolon kanser hücrelerinde MMP-7 mRNA ekspresyon düzeylerine $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	81
Tablo 28. Kolon kanser hücrelerinde MMP-7 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.	82
Tablo 29. Kolon kanser hücrelerinde MMP-14 mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	83
Tablo 30. Kolon kanser hücrelerinde MMP-14 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri	84
Tablo 31. Kolon kanser hücrelerinde TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	85
Tablo 32. Kolon kanser hücrelerinde TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.	86
Tablo 33. Kolon kanser hücrelerinde TIMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	87
Tablo 34. Kolon kanser hücrelerinde TIMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.	88
Tablo 35. Kolon kanser hücrelerinde RhoC protein ekspresyon düzeylerine ait p değerleri. .	91
Tablo 36. Kolon kanser hücrelerinde MMP-2 protein ekspresyonu ait p değerleri.....	93
Tablo 37. Kolon kanser hücrelerinde MMP-9 protein ekspresyonu ait p değerleri.....	94
Tablo 38. Kolon kanser hücrelerinde MMP-7 protein ekspresyonu ait p değerleri.....	96
Tablo 39. Kolon kanser hücre hattında TIMP-2 protein ekspresyonu ait p değerleri.	97
Tablo 40. Kolon kanser hücrelerinde proMMP-2 aktivite düzeylerine ait p değerleri	100
Tablo 41. Kolon kanser hücrelerinde proMMP-9 aktivite düzeylerine ait p değerleri	101
Tablo 42. Kolon kanser hücrelerinde aktif MMP-9 aktivite düzeylerine ait p değerleri	102
Tablo 43. Kolon kanser hücrelerinde hücre migrasyonu denemesine ait p değerleri.	103
Tablo 44. Kolon kanser hücrelerinde matrijel invazyon denemesine ait p değerleri.	104

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. KRK'nın Duker evrelendirme sistemi	9
Şekil 2. Kolorektal karsinogenezinde adenom-karsinom sekansı	11
Şekil 3. Metastaz oluşumunda yer alan adımlar	13
Şekil 4. Memeli Rho GTPaz süperailisinin filogenetik şeması.	13
Şekil 5. Rho GTPaz aktivasyon döngüsü	14
Şekil 6. a) Rho GTPaz'ların, ROCK ve mDia aracılığıyla aktin nükleasyonu, polimerizasyonu ve aktin-miyozin çapraz bağların oluşumunu regüle etmesi, b) Stres fiberleri ve kontraktil halka oluşumunda Rho tarafından uyarılan aktin sitoskeletonu	16
Şekil 7. Ameboid ve mezenkimal motilite dönüşümü	19
Şekil 8. MMP'lerin domain yapılarına göre sınıflandırılması	27
Şekil 9. proMMP'lerin aktivasyon mekanizması	29
Şekil 10. proMMP-2 aktivasyon mekanizması.	31
Şekil 11. Kanser progresyonunda MMP'ler.	35
Şekil 12. Neubauer lamı sayım alanı	45
Şekil 13. Sentetik olarak üretilen siRNA'nın hücre içindeki metabolik yolu.	48
Şekil 14. Matrijel invazyon denemesinin prensibi	63
Şekil 15. Deney akış şeması	64
Şekil 16. HT-29 hücrelerinin katlanma zamanı	66
Şekil 17. HCT116 hücrelerinin katlanma zamanı	66
Şekil 18. SW480 hücrelerinin katlanma zamanı	67
Şekil 19. SW620 hücrelerinin katlanma zamanı	67
Şekil 20. LoVo hücrelerinin katlanma zamanı	67
Şekil 21. SW480 hücrelerinin 24 saat transfeksiyon reaktifi (TR) ile inkübasyon sonrası % canlılık değerleri	68
Şekil 22. SW620 hücrelerinin 24 saat transfeksiyon reaktifi (TR) ile inkübasyon sonrası % canlılık değerleri	69
Şekil 23. LoVo hücrelerinin 24 saat transfeksiyon reaktifi (TR) ile inkübasyon sonrası % canlılık değerleri	69

Şekil 24. A) HT-29, B) HCT116, C) SW480, D) SW620 ve E) LoVo kolon kanser hücrelerinin formaldehit agaroz jel elektroforezi görüntüleri.....	71
Şekil 25. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun RhoC mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi	73
Şekil 26. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun mDia mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi.	75
Şekil 27. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun ROCK-I mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi.	77
Şekil 28. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi	78
Şekil 29. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi	80
Şekil 30. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-7 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi	82
Şekil 31. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-14 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi	84
Şekil 32. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi	86
Şekil 33. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun TIMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi.	88
Şekil 34. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun RhoC protein ekspresyon düzeylerine etkisi	90
Şekil 35. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun RhoC protein ekspresyon düzeylerine etkisi.	91
Şekil 36. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-2 protein ekspresyon düzeylerine etkisi	92
Şekil 37. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA sustrumunun MMP-2 protein ekspresyonu üzerine etkisi	93
Şekil 38. Kolon kanser hücrelerinde MMP-9 protein ekspresyonuna ait western blot görüntüsü	94
Şekil 39. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-9 protein ekspresyon düzeylerine etkisi.	94

Şekil 40. Kolon kanser hücrelerinde MMP-7 protein ekspresyonuna ait western blot görüntüsü.	95
Şekil 41. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun MMP-7 protein ekspresyonu üzerine etkisi	95
Şekil 42. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun TIMP-2 protein ekspresyon düzeylerine etkisi	97
Şekil 43. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun TIMP-2 protein ekspresyonu üzerine etkisi.	97
Şekil 44. Kolon kanser hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerine ait jelatin zimogram görüntüsü	99
Şekil 45. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun proMMP-2 aktivitesi üzerine etkisi	100
Şekil 46. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun proMMP-9 aktivitesi üzerine etkisi	101
Şekil 47. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun aktif MMP-9 aktivitesi üzerine etkisi	102
Şekil 48. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun hücre migrasyonu üzerindeki etkisi	103
Şekil 49. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun hücre invazyonu üzerindeki etkisi	104

KISALTMALAR

- KRK:** Kolorektal kanser
ESM: Ekstrasellüler matriks
MMP: Matriks metalloproteinaz
ROCK: Rho kinaz
SEER: Surveillance, epidemiology and end results
FAP: Ailesel adenomatöz polipozis
HNPCC: Kalıtsal non-polipozis kolon kanseri
NSAID: Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar
MMR: Hatalı eşleşme tamiri
APC: Adenomatöz polipozis koli
K-RAS: Kirsten sıçan sarkomu viral onkogen homolog
p53: Tümör protein 53
ACF: Aberan kript odak
GSK-3 β : Glikojen sentaz kinaz 3 β
CKI: Kazein kinaz I
TCF/LEF: T-hücre faktörü/Lenfoit arttırıcı bağlama faktörü
EMT: Epitelyal-mezenkimal dönüşüm
Rho GEF: Rho GTPaz-spesifik guanin nükleotid çevirme faktörü
Rho GAP: Rho-spesifik GTPaz aktive eden protein
GDI: Guanin-nükleotid-dissosiyasyon inhibitörü
mDia: Drosophila diaphanous'un memeli homoloğu
MRLC: Miyozin II regülatör hafif zinciri
MYPT1: Miyozin fosfataz hedef alt birimi 1
SRF: Serum yanıt faktörü
STAT3: Sinyal aktarıcı ve transkripsiyon aktive edici-3
NF-kB: Nükleer faktör Kappa B
3D: Üç boyutlu
FAK: Fokal adezyon kinaz
IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
 α 1-Pi: α 1- proteinaz inhibitörü
IGFBP: İnsulin-benzeri büyüme hormonu bağlayıcı protein

IL-1 β : İnterlökin-1 β
TNF: Tümör nekroz faktör
HOXD10: HomeoboxD10
TIMP: Metalloproteinazların doku inhibitörü
MT-MMP: Membran tip-MMP
AP-1: Aktivatör protein
PEA3: Polioma güçlendirici aktivatör 3
Sp-1: Spesifite Protein 1
NF- κ B: Nükleer Faktör Kappa B
IL: İnterlökin
EGF: Epidermal büyüme faktörü
KGF: Keratinosit büyüme faktörü
NGF: Sinir büyüme faktörü
HGF: Hepatosit büyüme faktörü
bFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü
VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü
PDGF: Platelet türevi büyüme faktörü
MAPK: Mitojen aktive eden protein kinaz
ADAM: Bir disintegrin ve metalloproteinaz
RECK: Reversion-inducing-cystein-rich protein with kazal motifs
CT-PCPE: Prokollajen C terminal proteinaz güçlendiricinin bir C-terminal fragmenti
TGF- α : Transforme eden büyüme faktör- α
TGF- β : Transforme eden büyüme faktör β
HB-EGF: Heparin-bağlama epidermal büyüme faktörünü
FGF-2: Fibroblast büyüme faktörü-2
uPAR: Ürokinaz tip plasminojen aktivatör reseptörü
IL-2R α : İnterlökin-2 reseptör- α
CXCL12: CXC ligand 12
FBS: Fötal dana serumu
PBS: Fosfat tampon tuzu
DMSO: dimetilsülfoksit
WST-1: 4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat

siRNA: small interfering RNA
RISC: RNA-uyarımli susturma kompleks
AGO: Argonaute
Real Time Polimerase Chain Reaction: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA: Ribonükleik asit
mRNA: Mesajcı RNA
DNA: Deoksiribonükleik asit
cDNA: Komplementer DNA
Ct: Threshold cycle
dNTP: Deoksinükleosid trifosfat
SDS: Sodyum dodesil sülfat
PAGE: Poliakrilamid jel elektroforezi
BCA: Biçinkoninik asit
BSA: Sığır serum albumini
TEMED: N, N, N', N'-Tetrametiletilediamid
APS: Amonyumpersülfat
PVDF: Poliviniliden florür
TBS-T: Tris tampon tuzu - Tween
HRP: Yabanturbu Peroksidazı

TEŞEKKÜR

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

Desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Canan ÇOKER'e ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü Sayın Hocam Prof. Dr. İbrahim ASTARCIOĞLU'na ve Müdür Yardımcısı Sayın Hocam Doç. Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR'a,

Tez gelişimine bilimsel katkılarından dolayı doktora tez izleme komitesi üyeleri Sayın Hocalarım Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK ve Doç. Dr. Zeynep SERCAN'a,

Bitmek bilmez araştırmalarımnda ve laboratuvar çalışmalarımnda beni destekleyen sevgili arkadaşlarım Murat SİPAHİ ve Şeniz İNANÇ'a,

Çalışmalarım için gerekli olan kolon kanser hücre hatlarını bizimle paylaşan Sayın Hocam Prof. Dr. Mustafa BA DJAMGOZ ve Prof. Dr. Kemal KORKMAZ'a,

İnvazyon ve Migrasyon çalışmalarımnda değerli bilgi ve deneyimleriyle bana her konuda yardımcı olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli Hocam Prof. Dr. Neşe ATABEY ve arkadaşlarım Evin ÖZEN, Sanem TERCAN AVCI ve Ayşim GÜNEŞ'e,

2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu ile yurt dışında araştırmalarımı yapabilme imkanı sağlayan TÜBİTAK'a

Her türlü laboratuvar imkanı sağlayan IBG ve ARLAB çalışanlarına,

Tez ve diğer tüm evraklarımın takibinde büyük duyarlılık gösteren, güler yüzlü anabilim dalı sekreterimiz sevgili Eda OLUM'a ve güler yüzüyle bana moral veren sevgili Fadime ENGİN'e

Laboratuvardaki her türlü sorunlarımızla ilgilenen sevgili Emin ÇAVUŞLU ve Abdullah ADAGÜL'e

Bu zor yolda her zaman bana destek olan ve dostluğunu esirgemeyen sevgili arkadaşlarım, başta Uğur TÜFEKÇİ, Ayşenur KARAKUŞ, Ali Burak ÖZKAYA, Birce AKPINAR, Güneş ÖZEN ve Feriha TOKSÖZ olmak üzere tüm yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan canım kadar sevdiğim annem Sevim KELEŞ, babam Halis KELEŞ, kardeşim Taylan KELEŞ ve eşim Ertuğrul BARTIK başta olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

KOLON KANSER HÜCRELERİNDE RhoC YOLAKLARI İLE EKSTRASELLÜLER PROTEOLİZ ARASINDAKİ OLASI İLİŞKİNİN İNVAZYON ve METASTAZ AÇISINDAN BELİRLENMESİ

Didem KELEŞ, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Giriş: Kolorektal kanser kaynaklı ölümlerin çoğu, primerden çok metastatik hastalık sonucu gerçekleşmektedir; bu nedenle akciğer, prostat ve meme kanserinden sonra en sık ölümle sonuçlanan kanser türüdür. Ekstrasellüler alanda yer alan ve primer olarak ekstrasellüler matriksin yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteinazların (MMP'ler) kolorektal karsinogenezi ve metastazını desteklediği bilinmektedir. Bununla birlikte küçük GTPaz'lar ailesinden olan RhoC, hücre içi sitoskelet elemanlarının regülasyonunu sağlayarak hücre migrasyonunda rol almakta ve kanser metastazı ile yüksek korelasyon göstermektedir.

Amaç: Bu çalışmanın amacı; primer ve metastatik kolon kanser hücrelerinde sitoskelet elemanların regülasyonunda rol alan RhoC'nin ekstrasellüler proteolizden sorumlu olan MMP'ler arasındaki olası ilişkinin invazyon ve metastaz açısından araştırılmasıdır.

Yöntem: İlk olarak, primer (HT-29, HCT116, SW480) ve metastatik (SW620 ve LoVo) kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu siRNA tekniği ile susturuldu. Bu susturum sonucunda ROCK-I, mDia, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, TIMP-1 ve TIMP-2 mRNA ekspresyon düzeyleri Real Time PCR; MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14 ve TIMP-2 protein ekspresyon düzeyleri Western Blot tekniği ile incelendi. Bunun yanı sıra MMP-2 ve MMP-9 salınım ve aktivite düzeyleri Jelatin Zimografi tekniği ile belirlendi. RhoC susturumu sonrası kolon kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon yetenekleri Hücre Migrasyonu ve Matrijel İnvazyon teknikleri ile değerlendirildi.

Bulgular: RhoC'nin baskılanması sonucunda HT-29 hücrelerinde MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerinin azaldığı, TIMP-2 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin ise anlamlı olarak arttırdığı belirlendi. HCT116 hücrelerinde ise MMP-9 mRNA ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı, TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin ise arttığı belirlendi. Ayrıca RhoC inhibisyonu ile HT-29 hücrelerinde proMMP-2, proMMP-9 ve aktif MMP-9, SW480 hücrelerinde ise proMMP-2 aktivitelerinin azaldığı görüldü. Ek olarak, RhoC susturulan HT-

29, SW480, SW620 ve LoVo hücre hatlarında hücre migrasyonunun ve HT-29, HCT116, SW480 SW620 ve LoVo hücre hatlarında hücre invazyonunun baskılandığı belirlendi.

Sonuç: Sonuç olarak elde ettiğimiz verilerin ileride kolorektal kanser metastazının önlenmesi amacıyla; hem MMP aktivitesinin hem de RhoC sinyal yollarının baskılanmasını hedef alan, antimetastatik özellikte yeni terapötik ajanların geliştirilmesine katkı sağlayacağını öngörmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: RhoC, Matriks Metalloproteinaz, Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri, Kolon kanseri, Metastaz

DETERMINATION OF POSSIBLE RELATION BETWEEN RhoC AND EXTRACELLULAR PROTEOLYSIS IN TERMS OF INVASION AND METASTASIS IN COLON CANCER CELLS

Didem KELEŞ, Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences,
Department of Medical Biochemistry, 35340, Inciralti, İzmir

ABSTRACT

Introduction: Most of deaths derived from colorectal cancer are due to metastasis rather than primary tumor; therefore colorectal cancer is the fourth leading cause of cancer death after lung, prostate and breast cancers. It is known that matrix metalloproteinases (MMPs) which are primarily responsible for degradation of extracellular matrix and locate in the extracellular area contribute carcinogenesis and metastasis of colorectal cancer. In addition RhoC, a member of small GTPases family, is involved in cell migration by regulating cytoskeletal components and highly correlated with metastasis.

Objective: The aim of this research is to investigate the possible relation between RhoC that regulates the cytoskeletal components and MMP that is responsible for extracellular proteolysis in terms of invasion and metastasis in primary and metastatic colon cancer cells.

Method: At first, RhoC gene expression was silenced with siRNA transfection in primary (HT-29, HCT-116 and SW480) and metastatic (SW620 and LoVo) colon cancer cells. After this transfection ROCK-I, mDia, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression levels were investigated with Real Time PCR; the protein expression levels of MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-14 and TIMP-2 were determined with Western Blot. In addition, secretion and activity levels of MMP-2 and MMP-9 were detected with Gelatin Zymography. After RhoC silencing, migration and invasion capability of colon cancer cells were evaluated with Cell Migration and Matrigel Invasion techniques.

Results: The knockdown of RhoC resulted in decreased MMP-9 mRNA expression levels and significantly increased TIMP-2 mRNA and protein expression levels in HT-29 cells. In HCT116 cells, MMP-9 mRNA expression levels were significantly decreased and TIMP-1 mRNA expression levels were increased. Furthermore, RhoC inhibition declined proMMP-2, proMMP-9 and active MMP-9 activities in HT-29 cells and also proMMP-2 activity in

SW480 cells. In addition, cell migration was inhibited in RhoC silenced HT-29, SW480, SW620 ve LoVo cell lines and cell invasion was decreased in RhoC silenced HT-29, HCT116, SW480 SW620 and LoVo cells.

Conclusion: In conclusion, we predict that our results may contribute for developing new anti-metastatic therapeutic agents that target both RhoC signalling and MMP activity to prevent colorectal cancer metastasis.

Key Words: RhoC, Matrix Metalloproteinase, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, Colon Cancer, Metastasis

1. GİRİŞ ve AMAC

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Kolorektal kanser (KRK), 2012 yılında dünya genelinde beş yıllık sağkalımı % 60 - 65 arasında olan; akciğer, prostat ve meme kanserinden sonra en sık görülen bir malign tümördür. Metastatik kolorektal kanserli olgularda, birincil hedef organ karaciğerdir ve kansere bağlı ölümlerin başlıca sebebini oluşturmaktadır. Metastatik tümörlerin biyolojik ve klinik davranışları primerlerden farklılık sergilemekle birlikte, tümör fenotipindeki bu davranış farklılıklarının moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Tümör hücrelerinin yayılımında, ekstrasellüler matriksin (ESM) proteolitik yıkımı zorunlu bir basamaktır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ESM proteolizinden sorumlu olan matriks metalloproteinazların (MMP'ler), pek çok tümör dokusunda aşırı eksprese edildiği ve bu ekspresyonun tümör invazyon ve metastazı ile ilişkili olduğu rapor edilmektedir. Ancak *in vivo* hayvan tümör modellerinde ve insanlarda yapılan klinik çalışmalarda, MMP'leri hedef alan inhibitörlerin, hücre invazyonunu engellemede zayıf etkili olması, hücrenin alternatif bir invazyon modeline sahip olduğunu göstermektedir. Tümör invazyonunda iki tür hücre hareketi bulunmaktadır: 1) proteoliz aracılı mezenkimal hareket, 2) aktomiyozin aracılı ameboid hareket. Ameboid hareketin, aktinin yeniden organizasyonunda rol alan Rho/Rho kinaz (ROCK) mekanizmasına bağımlı olduğu bilinirken, proteoliz aracılı mezenkimal hareketin Rho sinyal iletimi ile ilgili olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Ancak yapılan araştırmalarda, Rho proteinlerinin, MMP ekspresyon ve/veya aktivitesini arttırabileceği öngörülmektedir.

1.2 Araştırmanın Amacı

Bu bilgiler ışığında, tez çalışmamızın temel amacı; kolon kanser hücrelerinde tümör invazyonu ve metastazına katkısı olduğu düşünülen RhoC ile ekstrasellüler proteolizden sorumlu olan MMP ekspresyonu, salınımı ve aktivitesi üzerindeki olası ilişkisini invazyon ve metastaz açısından araştırmaktır.

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

Projemizin hipotezini ise řu şekilde açıklayabiliriz: "Kolon kanser hücrelerinde RhoC, matriks metalloproteinaz ekspresyon, salınım ve aktivitesini arttırarak hücre migrasyonu ve invazyonunu arttırmaktadır."

İleri sürdüğümüz hipotezimizin doğruluğunu incelemek amacıyla hedeflerimizi řu şekilde sıralayabiliriz

1. İlk olarak insan primer kolon kanser hücrelerinde (HT-29, HCT116 ve SW480) ve metastatik kolon kanser hücre hattında (lenf nodu metastazı olan SW620 ve sol supraklaviküler bölgeye metastaz yapan LoVo) siRNA tekniği ile RhoC gen ekspresyonu susturuldu.
2. RhoC susturumunun; RhoC'nin alt akım efektör molekülleri olan ROCK-I ve mDia, ekstrasellüler proteolizden sorumlu olan MMP-2, MMP-7, MMP-9 ve MMP-14, endojen metalloproteinaz inhibitörü olan TIMP-1 ve TIMP-2 gen ekspresyon düzeylerine olan etkisi incelendi.
3. Bununla birlikte, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14 ve TIMP-2 protein ekspresyon düzeylerindeki olası deėiřimler incelendi.
4. Ayrıca RhoC susturumu sonrası MMP-2 ve MMP-9'un ekstrasellüler alana salınımı ve aktiviteleri üzerindeki etkisi araştırıldı.
5. RhoC susturumu sonrası kolon kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneklerindeki değişim irdelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KOLOREKTAL KANSER

% 80'i kolonda, % 20'si rektumda meydana gelen kolorektal kanser (KRK); 2012 yılında yapılan istatistiklere göre; dünya genelinde (başta Kuzey Amerika, Yeni Zelanda, Avustralya, Avrupa ve Güney Kore olmak üzere) erkeklerde akciğer ve prostat kanserinden sonra en sık görülen üçüncü; kadınlarda ise meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci büyük kanserdir. Ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde, erkeklerde sırasıyla prostat, akciğer ve kolorektal; kadınlarda ise meme, kolorektal ve akciğer kanseri en sık görülen kanserlerdir. Ekonomik olarak gelişen ülkelerde ise, erkeklerde sırasıyla akciğer, karaciğer ve mide; kadınlarda ise meme, serviks uteri ve akciğer kanseri ilk üç sırada yer almaktadır (1).

Yaşam tarzının değiştirilmesi, düzenli görüntüleme tekniklerinin kullanılması ile erken tanı ve etkili müdahale sonucu batı ülkelerinde (özellikle Birleşik Devletleri'nde) KRK insidansı düşmektedir. Buna karşılık Asya ve Doğu Avrupa'da sağlıksız beslenme, obezite ve sigara kullanımı gibi batı-tarzı yaşama adaptasyon nedeniyle KRK insidansı her geçen yıl artmaktadır. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) programının veritabanı analizlerine göre, KRK tanısı alan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı, dünya genelinde %60 - 65 arasında olduğunu bildirilmiştir (2).

KRK gelişimi, tipik olarak genetik ve çevresel etkiler arasındaki kompleks etkileşimin bir sonucudur. KRK hastalarının % 25'inde ailesel öykü bulunur 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 % 5-10'unu kapsayan kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC) (3).

KRK'nın bilinen pek çok risk faktörü vardır. Yapılan araştırmalara göre, 50 yaşın üstünde olmak, obezite, fiziksel olarak inaktif yaşam tarzı, alkol ve sigara kullanımı, çoğunlukla kırmızı etle beslenme, düşük kalsiyum alımı, düşük tam tahıllı gıdalarla, meyve ve sebze ile beslenme, polip/KRK geçmişi ya da aile öyküsü, ülseratif kolit veya Crohn hastalığı gibi kronik inflamatuvar barsak hastalık geçmişi, Tip 2 Diyabet varlığı KRK riskini artırmaktadır. Aspirin gibi non-steroid anti-inflamatuvar ilaçların (NSAID) düzenli kullanımının KRK riskini azalttığı ileri sürülmektedir. Ancak bu ilaçların düzenli kullanılması sonucunda mide kanaması gibi tehlikeli sağlık problemleriyle karşılaşmakta ve bu nedenle KRK'i önlemek amacıyla kullanımı tavsiye edilmemektedir. Menopozal hormon terapisinin (özellikle östrojen ve progesteron) de KRK riskini azalttığını gösteren çalışmaların sayısı

artmaktadır. Ancak hormon terapisinin meme kanseri, inme, kalp krizi risklerini arttırması nedeniyle KKK gelişimini önlemek amacıyla kullanılması önerilmemektedir (2).

2.1.1 Kolorektal Kanserın Evrelendirilmesi

Evrelendirme sistemi, kanserin nüfuz etme miktarını değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Günümüzde kanserin evrelendirilmesi amacıyla en sık kullanılan sistem TNM evrelendirme sistemidir. Burada T, tümör penetrasyonunun derinliği; N, lenf nodunun varlığı veya yokluğu; M, uzak metastazın varlığını veya yokluğunu göstermektedir (Tablo 1) (4). İlk KKK evrelendirme sistemi, 1932 yılında Dr Cuthbert E. Dukes tarafından ileri sürüldü ve hastalığın tanısı ve en iyi tedavi yönteminin belirlenmesi amacıyla günümüzde halen kullanılmaktadır (5) (Tablo 2). KKK evrelendirmesinde Dukes sistemi TNM sınıflandırma sistemine uyarlanmıştır ve bu paralel evrelendirme sistemi Tablo 3'te gösterilmiştir (6).

Tablo 1. TNM evrelendirme sistemi.

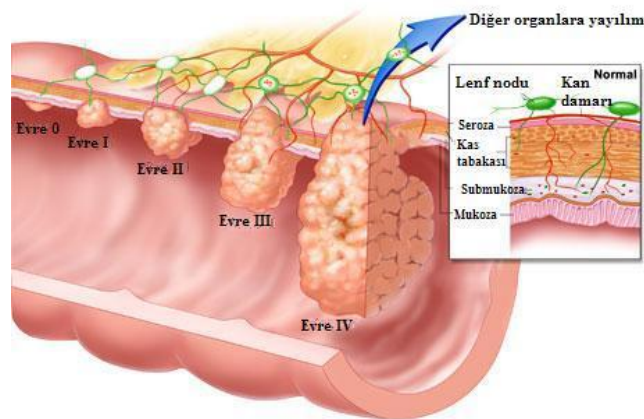
<i>Evre</i>	<i>T: İntestinal duvara invazyon derecesi</i>
T0	Tümör kanıtı yoktur
Tis	Kanser in situ (tümör var ancak invazyon yok)
T1	Submukozadan lamina propriaya invazyon (bazal membrana invazyon)
T2	Muscularis propriaya invazyon
T3	Subseroza invazyon
T4	Diğer organlara veya peritona direkt invazyon
<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

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. Kolorektal kansinomların Dukes ve TNM evrelendirme sistemi.

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



Şekil 1. KRK'nın Dukes evrelendirme sistemi (7). Bir tümör, barsak duvarı infiltrasyon uzunluğuna, lenf nodlarının varlığına veya karaciğer gibi uzak organlara yayılıp yayılmamasına göre sınıflandırılır.

2.1.2 Kolorektal Kanser Progresyonu

KRK, bir seri kompleks moleküler değişikliklerden oluşan heterojen bir hastalıktır. Normal kolonik mukozanın benign adenoma, ardından adenomatöz polipe ve daha sonra invazif kansere dönüşümü, içerisinde kromozomal ve mikrosatellit instabilitenin de bulunduğu bir seri genetik ve epigenetik süreçler ile bağlantılıdır (Şekil 2). Kromozomal instabilite kolorektal kanserlerin %70 - 85'inden sorumludur. Mikrosatellit instabilite ise kalan kolon kanserlerin %15'inde görülmekte ve DNA hatalı eşleşme tamiri (Mismatch Repair - MMR) sistemindeki kayıplar ile karakterizedir. Kolorektal karsinogenezini, DNA replikasyonu veya DNA tamir genleri, adenomatöz polipozis koli (APC), Kirsten sıçan sarkomu viral onkogen homolog (K-RAS), SMAD4 ve tümör protein 53 (p53)'ü kapsayan bir takım genlerdeki kalıtsal ve somatik mutasyonlar tetiklemekte ve desteklemektedir.

KRK oluşumunda en erken tanımlanabilen lezyon, aberrant kript odaklardır (aberrant crypt focus - ACF). Bu lezyonun gerçek neoplastik potansiyeli henüz belirlenmemiştir ancak bu lezyonların bir kısmı frank adenokarsinoma doğru ilerleyebilir ve bünyesinde K-RAS ve APC gen mutasyonlarını barındırabilir. Özellikle displastik aberrant kript odakları sıklıkla APC geninde mutasyonlar taşımaktadır.

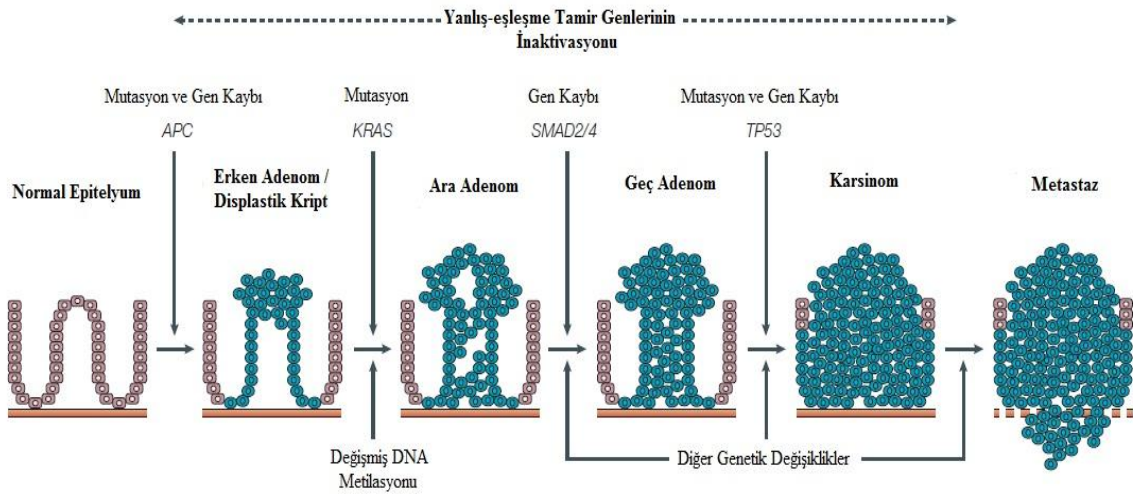
"Kolorektal Tümörigenezin Bekçisi" olarak da bilinen APC geni, kolorektal kanser olgularının %70-80'inde mutasyonlar nedeniyle inaktif formdadır. APC proteini; β -katenin, γ -katenin, glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β), Aksin/konduktin, tubulin gibi birçok hücreyel protein ile etkileşime girmektedir. APC'nin ana fonksiyonu, GSK-3 β ve iskele proteini olan Aksin/konduktin ile birlikte membrana bağlı olmayan sitozolik β -katenin havuzunu regüle etmektir. Fizyolojik koşullar altında β -katenin, hücre-hücre adezyon molekülü olan E-kadherin ile bağlı olarak bulunmaktadır. Kazein kinaz I (CKI) tarafından fosforilasyon, β -kateninin adheran kompleksten ayrılmasına ve sitozolde birikmesine neden olur. Sitozolde serbest halde bulunan β -katenin ya proteozomal yolla yıkıma uğrar ya da nükleusta bir takım genlerin aktivasyonunu sağlar. Degradasyon yolunda, serbest β -katenin sitoplazmada APC/Axin/GSK-3 β ile bir kompleks oluşturur. Bu komplekste GSK-3 β , β -kateninin amino ucunda bulunan belirli amino asitleri fosforiller ve ubiquitin-aracılı proteoliz ile proteozomlar tarafından degradasyona uğrar.

APC genindeki mutasyonlar sonucunda, APC/ β -katenin etkileşimi bozularak Wnt sinyal iletim yolu aşırı aktive olur ve kolonda tümör oluşum süreci başlar. APC'nin inaktif olması sebebiyle, serbest halde bulunan sitozolik β -katenin sitoplazmada birikir ve daha sonra

nukleusa transloke olur. Burada transkripsiyonel aktivatör görevi gören β -katenin, transkripsiyon faktörleri ailesinden T-hücre faktörü/Lenfoit arttırıcı bağlama faktörü (TCF/LEF) üyeleriyle birlikte, promotor sekanslarına bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Sonuç olarak; içerisinde c-Myc, siklin D1, MMP-7, gastrinin de bulunduğu bir takım spesifik genlerin transkripsiyonları aktive olur.

RAS ailesinin bir üyesi olan K-RAS, kolorektal karsinogenezinde en önemli protoonkogenlerden biridir. Kolon karsinomların %37-41'inde K-RAS mutasyonlarının olduğu ve erken süreçte APC mutasyonların ardından ortaya çıktığı belirlenmiştir. K-RAS gen mutasyonları EGFR-Ras-Raf-ERK-Jun/Fos metabolik yoluyla proliferasyonu uyarır ve prokaspazı fosforilleyerek apoptozu inhibe eder. Yapılan araştırmalarda K-RAS'ın adenom büyümesine aracılık ederek adenom-karsinom sekansının erken evrelerinde kolon kanser oluşumunu desteklediği ancak adenomların adenokarsinomaya dönüşümü için gerekli olmadığı belirlenmiştir.

Bir transkripsiyon faktörü olan p53, apoptoz ve hücre döngüsünün progresyonunu kontrol ederek genomik stabiliteyi sağlamada rol olan bir tümör süpresör genidir. p53'ün fonksiyonu G1 fazından S fazına geçmeden önce DNA hasarını tanımak, hücre döngüsü tutuklanmasını uyarmak ve DNA tamiri veya apoptoz sürecini başlatmaktır. Bu fonksiyonları nedeniyle "*Genomun Gardiyanı*" olarak da adlandırılmaktadır. p53 mutasyonları kolon adenomlarından ziyade kolon adenokarsinom sekansının daha ileri evrelerinde görülmekte ve adenomdan karsinoma dönüşümde aracılık ettiği ileri sürülmektedir (8).



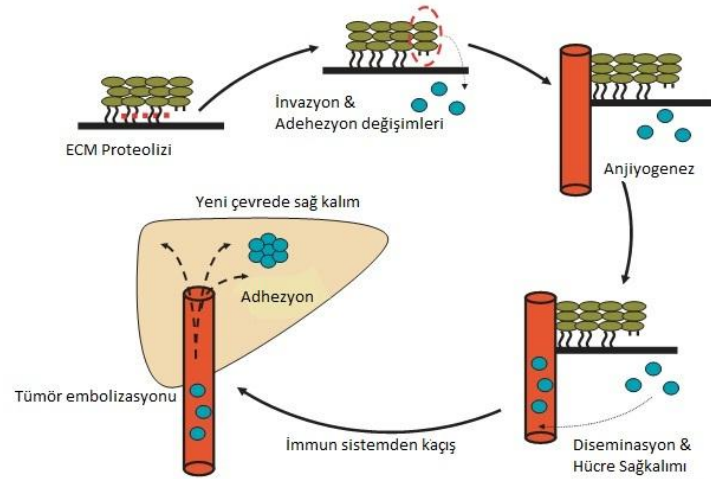
Şekil 2. Kolorektal karsinogenezinde adenom-karsinom sekansı (9).

2.1.3 Kolorektal Kanser Metastazı

Metastaz, kanser hücrelerinin primerden ayrılıp uzak organlarda sekonder lezyonlar oluşturduğu çok adımlı bir süreçtir. Primerün cerrahi girişimle alındığı hastaların çoğunda, daha sonradan uzak metastazların meydana geldiği görülmekte ve bu metastazların, ilk ameliyat sırasında fark edilmeyen mikrometastazlar nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir (10). Metastatik kaskad hakkındaki genel kanı; primer lezyondaki malign hücrelerde metastaz evresine ilerleme yeteneği veren bir dizi moleküler sürece dayanmaktadır. Bu moleküler süreçler sırasıyla aşağıdaki adımları kapsar (Şekil 3) (11):

- 1) Bazal membranın ve ESM'nin proteolizini kapsayan epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMT),
- 2) Adhezif özelliklerin değişmesi nedeniyle tümör hücrelerinin solid tümörden ayrılması,
- 3) Lokal invazyon ve hücre migrasyonu,
- 4) Anjiyogenez ve intravazasyon,
- 5) Vasküler sirkülasyonda immün sistemden kaçma ve canlı kalma,
- 6) Damarlardan ekstrasvazasyon,
- 7) Uzak embolizasyon ile yeni anatomik bölgeye yerleşme ve burada hayatta kalma,
- 8) Son olarak, mikro ve makrometastazların oluşması.

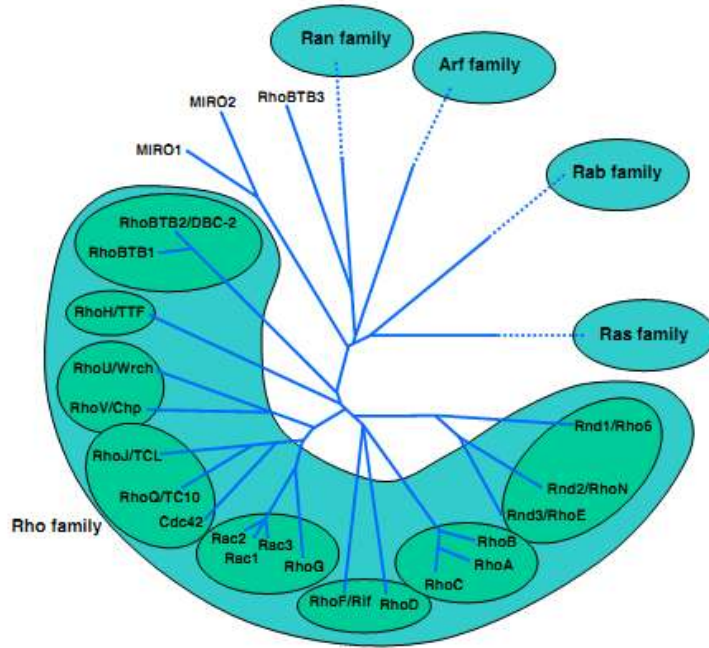
Dünya genelinde yeni KKK olguları 1.2 milyonu aşmış ve her yıl 600000 dan fazla olguda ölümle sonuçlanmıştır (12). KKK hastalarının %20'sinde teşhis konulduğu anda metastaz olduğu, %20-25'inde hastalık sırasında metastaz geliştiği ve bu nedenle %40-45 gibi bir yüksek mortalite oranı ile sonuçlandığı düşünülmektedir (13). Kolorektal kanserli hastalarda en sık karaciğer metastazı görülmekte ve kolorektal kansere bağlı ölümlerin en temel nedenidir. Hastaların yaklaşık %19'unda kolorektal kanser tanısı koyulduğu anda karaciğer metastazı bulunmaktadır (senkron metastaz), %30-40'ında ise primerün cerrahi girişim ile çıkarılmasından sonraki iki yıl içinde karaciğer metastazı (metakron metastaz) gelişmektedir (14). Karaciğer metastazının oluşması, gastrointestinal sistemin portal drenajından dolayı anatomik nedenle olabileceği gibi, metastaza katkıda bulunan birçok moleküler değişkenden de kaynaklanabilmektedir. Bugüne kadar, kanserin moleküler mekanizmaları üzerine çeşitli araştırmalar yapılmasına karşın, metastatik mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.



Şekil 3. Metastaz oluşumunda yer alan adımlar (10).

2.2 RHO-GTPaz AİLESİ

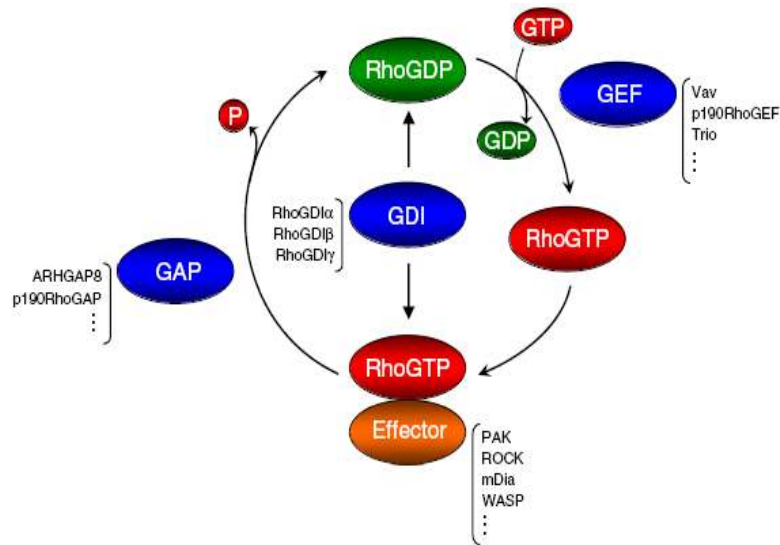
Ras-benzeri protein süper ailesine ait olan Rho GTPaz ailesi, 8 alt gruptan oluşur ve 20'den fazla üyeye sahiptir (Şekil 4). Rho GTPaz ailesi hücrenin farklı bölgelerinde stres fiber, kontraktıl halka gibi aktomiyozin demetlerin oluşumunu uyararak hücre morfogenez, adezyonu, migrasyonu ve hücre döngüsü gibi hücresel süreçlerde önemli rol oynamaktadırlar (15, 16). 1985 yılında ilk tanımlanan Rho GTPaz'lar RhoA, RhoB ve RhoC'dir (17). Bu üç protein %88'den fazla benzer amino asit sekansına sahip, oldukça homolog proteinlerdir (18).



Şekil 4. Memeli Rho GTPaz süperailisinin filogenetik şeması (19).

Rho GTPaz'ların bu fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için GTP bağlı aktif formda bulunmaları ve membrana tutunmaları gerekmektedir. Bunun için, Rho proteinleri, prenilasyon (farnesilasyon veya grenilasyon) veya palmitoilasyon ile C-terminal bölgelerine bir lipidik grubun bağlanmasıyla post translasyonel olarak modifiye edilerek membrana bağlanırlar. Rho proteinlerinde bulunan prenil grupların uzunlukları birbirinden farklıdır. Örneğin RhoB ya 15-karbonlu farnesil grubu ya da 20-karbonlu geranilgeranil grubu ile prenilenirken, RhoA ve RhoC sadece geranilgeranil grubu taşımaktadır. Bu farklılık Rho proteinlerin lokalizasyonlarını etkiler. Örneğin RhoB temel olarak geç endozomlar ve lizozomlarda bulunurken, RhoA ve RhoC sitoplazma veya plazma membranında lokalizedir (20).

Rho GTPaz'ların GDP bağlı inaktif formlarından GTP bağlı aktif formlarına dönüşümü, Rho GTPaz-spesifik guanin nükleotid çevirme faktörlerin (Rho GEF'ler) Db1 ailesi tarafından katalizlenir (21). GTP bağlı formdan GDP bağlı forma dönüşümü ise, Rho-spesifik GTPaz aktive eden proteinler (Rho GAP'lar) tarafından stimule edilmektedir (22). Bunların yanında guanin-nükleotid-dissosiyasyon inhibitörleri (GDI proteinleri), hem aktif hem de inaktif Rho GTPaz'ların C-terminal prenil gruplarına bağlanarak, Rho proteinlerinin membrana bağlanmalarını engeller ve sitoplazmada serbest halde kalmalarını sağlar. Ayrıca aktif Rho GTPaz'ın efektöre bağlanmasını ve inaktif Rho GTPaz'ın aktive olmasını engeller. Sonuç olarak, Rho GTPaz'ların altakım yollarındaki hedef efektörlerine ulaşmasını bloke eder (Şekil 5) (23). Aktive edilen Rho GTPaz'lar farklı efektör molekülere bağlanarak, hücrel yanıtı oluşturacak bir sinyal kaskadını tetiklerler.



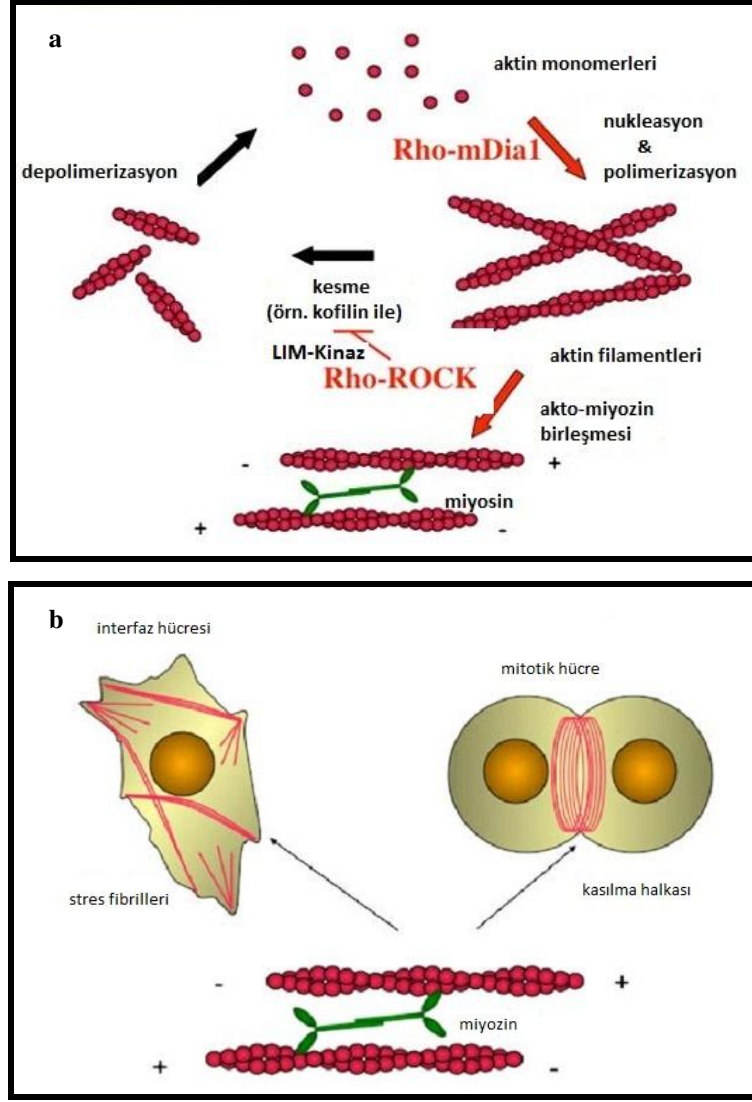
Şekil 5. Rho GTPaz aktivasyon döngüsü (19).

2.2.1 Effektör Moleküller: ROCK ve mDia

Rho proteinlerinin primer etkisi, hücrede aktin sitoskeletonunun spesifik bir tipini uyarmak ve mikrotübüllerin lokal dinamiklerini modüle etmektir. Rho tarafından uyarılan bu aktin sitoskeleton tipleri, bir interfaz hücreesindeki stres fiberler ile mitotik hücrede oluşan kontraktıl halkadır (Şekil 6b). Hem stres fiberler hem de kontraktıl halka miyozin ile çapraz bağlanmış antiparalel aktin filamanlardan oluşan aktomiyozin demetlerdir. Rho, aktin filamanların oluşumunu ve miyozinin aktivasyonunu uyarır. Bu nedenle hücre döngüsü fazına bağlı olarak hücrenin farklı bölgelerinde oluşan aktomiyozin demetlerde lokalizedir. Rho GTPaz'ların bu etkilerini ortaya çıkaran çeşitli efektör moleküller (WASP, PAK vb) bulunmaktadır ancak RhoA, B, C ailesine ait iki temel efektör bilinmektedir: ROCK (Rho kinaz) (24) ve mDia (*Drosophila diaphanous*'un memeli homoloğu) (25).

Bir formin molekülü olan mDia, profiline bağlanarak aktin nükleasyonunu ve polimerizasyonunu katalizleyerek düz ve uzun aktin filamanların oluşumunu sağlar. mDia'nın bilinen bir diğer fonksiyonu ise mikrotübül stabilizasyonunu regüle etmektir (26). ROCK ise çeşitli substratları fosforilleyen bir serin/threonin kinazdır (27). ROCK için tanımlanan primer rol, aktin-miyozin sitoskeleton organizasyonunu regüle etmektir. Fosforillenmiş miyozin II regülatör hafif zinciri (MRLC), miyozin II ATPaz'ı aktive ederek miyozinin F-aktin ile etkileşimine olanak sağlar ve aktomiyozin kontraktılitesinin oluşmasına katkıda bulunur (28). MLC defosforilasyonunu sağlayan MLC fosfataz kompleksi bir PP1cδ katalitik alt birimden, bir miyozini fosfataza hedefleyen miyozin bağlama altbiriminden (MYPT1) ve küçük bir regülatör altbirimden oluşur (29). ROCK tarafından MYPT1'in fosforilasyonu sonucunda miyozinin fosfatazdan ayrılması sağlanarak MLC defosforilasyonu inhibe edilir ve böylece net MLC fosforilasyonunda artışa neden olur (30). Ek olarak ROCK, LIM kinazı fosforilleyerek aktin filaman dinamiklerini regüle eder. Aktif LIM kinaz, aktin dağıtıcı protein olan kofilini fosforilleyerek inaktive eder ve böylelikle hücre içindeki aktin filaman sayısında net artışa neden olur (31) (Şekil 6a).

ROCK ve mDia'nın aktin ve miyozin üzerindeki etkileri Rho alt akımı ile birlikte hücrede aktomiyozin demetlerin uyarımı ile sonuçlanır (Şekil 6b). Sonuç olarak, mDia ve ROCK'ın birlikteliği, stres fiber ve kontraktıl halka gibi aktomiyozin demetlerin toplanması için gereklidir (32).



Şekil 6. a) Rho GTPaz'ların, ROCK ve mDia aracılığıyla aktin nükleasyonu, polimerizasyonu ve aktin-miyozin çapraz bağların oluşumunu regüle etmesi, b) Stres fiberleri ve kontraktıl halka oluşumunda Rho tarafından uyarılan aktin sitoskeleti (32).

2.2.2 Rho GTPaz'lar ve Kanser

Malign tümör hücreleri; kontrolsüz proliferasyon, epitelyal hücre polaritesinin kaybı, ESM ve komşu hücreler arasındaki etkileşimlerin değişmesi ve artmış migrasyon yeteneği gibi özelliklere sahiptir. Rho proteinleri tüm bu süreçleri regüle etmektedir ve bu nedenle Rho GTPaz'ların, regülatörlerinin ve alt akım efektörlerinin tümör oluşumu ve progresyonunu kontrol ettiği ileri sürülmektedir. Yapılan araştırmalar, kanserde Rho'ların birbirlerinden farklı bir şekilde regüle edildiğini ve farklı rollere sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin; RhoA ve Rac1 siklin D1 miktarını arttırarak G1-S geçişini desteklerken, RhoA ayrıca hücre

döngüsü inhibitörleri olan p21cip1 ve p27kip1 düzeylerini negatif yönde regüle eder. Böylelikle RhoA ve Rac1 hücre döngüsünü stimüle ederek hücre proliferasyonunu arttırır (33, 34). Buna karşılık Rnd3/RhoE siklin D1 ekspresyonunu posttranslasyonel düzeyde bloke ederek hücre döngüsünü inhibe eder (35). RhoA hücre döngüsü progresyonunu ve sitokinleri stimüle ettiği gibi hücre migrasyonunu da regüle eder (36). Cdc42 ise Serum yanıt faktörü (SRF) (37), Sinyal aktarıcı ve transkripsiyon aktive edici-3 (STAT3) (38) ve Nükleer faktör Kappa B (NFkB) (39) gibi transkripsiyon faktörlerini modüle ederek kanser hücre sağkalımını desteklemektedir. Buna karşın RhoB ekspresyonunun epitelyal kanser hücrelerinde ve fibroblastlarda apoptozu desteklediği ileri sürülmüştür (40, 41). Hücre migrasyonunda ise Rho GTPaz'lar, filapodial (Cdc42, RhoD, Rif, Wrch1, Chp) veya lamellipodial (Rac1, Rac2, Rac 3, RhoG) membran çıkıntılarının oluşumuna aracılık ederler (42). RhoA, B ve C stres fiberlerin ve fokal adezyonların oluşumunu, aktomiyozin hücre kasılmasını ve hücrenin arka ucunun ayrılmasını stimüle ederken (18), Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE ve Wrch-1 stres fiberleri negatif olarak etkiler (42). Ek olarak, Cdc42 hücre yönelenimini ve polarizasyonunu kontrol eden en önemli elemanlardan biridir (43).

Bu özellikleri nedeniyle Rho GTPaz'ların hem mRNA hem de protein ekspresyon düzeyleri kolon, akciğer, meme ve pankreas gibi farklı kanser türlerinde incelenmiştir. RhoA, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42, Wrch2/RhoV ve RhoF'nin de bulunduğu pek çok Rho GTPaz bazı insan tümörlerinde upregüle edilmektedir (44-46). RhoA çeşitli insan tümör tiplerinde upregüle edilirken, RhoB ekspresyonunun birçok tümör hücre tipinde azaldığı ve aşırı eksprese edilmesi sonucunda kanser hücre migrasyonu, invazyonu ve metastazının baskılandığı bildirilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle RhoB tümör süpresör olarak görülmektedir (47). Çeşitli araştırmalar *in vivo* metastazda RhoC'nin önemini ortaya koymuştur. Örneğin, RhoC baskılanan melanoma hücrelerinde, metastazın inhibe edildiği bildirilmiştir (36). Ek olarak RhoC delesyonu fare modelinde meme kanser büyümesine etki etmezken, spesifik olarak metastazı azaltmıştır (48).

2.2.3 Migrasyon ve İnvazyonda Rho GTPaz'ların Roller

Hücre migrasyonunda, aktin sitoskeleti ve mikrotübül organizasyonu kritik bir rol oynamaktadır. Hücre migrasyonu genellikle 4 adımlı bir döngüden oluşur:

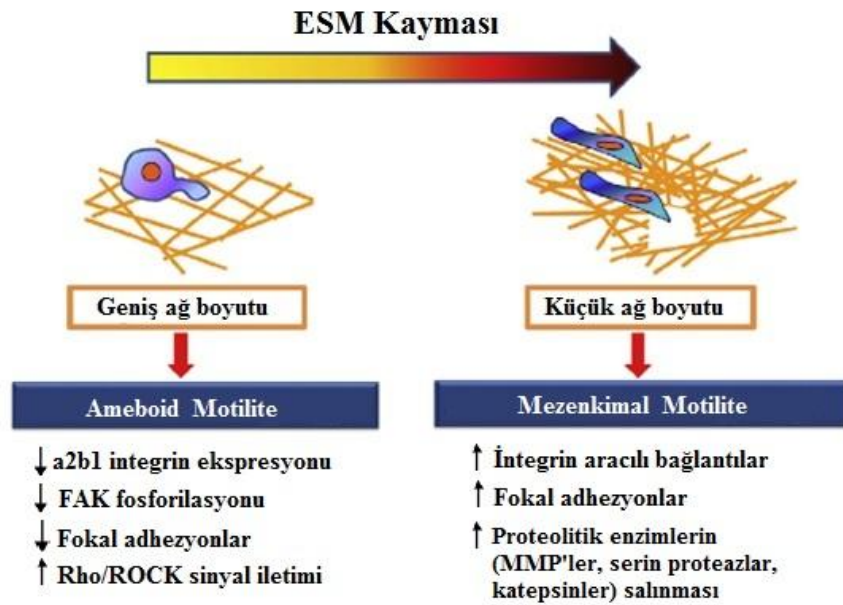
1. Hücrenin ön yüzünde membran çıkıntılarının (lamellipodia, filapodia) aktin polimerizasyon aracılığıyla oluşumu ile başlar.
2. Migrasyonu etkili hale getirmek için bu çıkıntıların fokal adezyonlar ve fokal bağlantılar gibi hücre-substrat bağlantı bölgesini oluşturan integrin protein ailesinin spesifik reseptörleri tarafından ECM'ye tutunması gerekir.
3. Göç döngüsü hücre bedeninin akto-miyozin aracılığıyla kontraksiyonu ile devam eder.
4. Daha sonra hücrenin arka bölgesinin ayrılması ile sonlanır.

Kollajen gibi ESM proteinlerinin fibriller ağ sistemleri, tümör hücrelerinin hareketini kısıtlamaktadır. Bu nedenle tümör hücrelerinin üç boyutlu (3D) alandaki invazyon davranışı çok önemlidir. Tümör hücrelerinin invazyonu için, hücre adezyonu/motilitesinin koordinasyonu ile ESM substratlarının proteolitik yıkımının gerekli olduğu düşünülmektedir ve bu görüş *in vivo* ve *in vitro* model çalışmaları ile desteklenmiştir (49). Ancak *in vivo* hayvan tümör modellerinde ve insanlarda yapılan klinik çalışmalarda ESM yıkımından sorumlu proteazları (özellikle MMP'leri) hedef alan inhibitörlerin uygulanmasının oldukça zayıf bir etkisi olmuştur. Bu durum MMP inhibisyonu olduğu durumda hücrenin alternatif bir invazyon modeline sahip olabileceğini düşündürmektedir. Friedl ve ark. (50) bu durumu aydınlatmak için MT1-MMP aşırı eksprese eden HT1080 fibrosarkoma hücrelerinin *in vitro* 3D kollajen matriksinde göçünü incelediler. Elde ettikleri verilere göre, proteaz inhibisyonunun olmadığı durumda, hücrelerin integrine bağımlı olarak kollajen matriksine bağlandığını, proteoliz ile matrikste tüp benzeri defektler ürettiğini ve oluşan bu tüplerden göç ettiğini belirlediler. Bu durum klasik motilite-proteoliz koordinasyon konsepti ile uyumludur. Ancak proteolitik aktivite inhibe edildiğinde, proteoliz bağımlı mezenkimal hareketin ameboid harekete dönüştüğü görülmüştür. Sahai ve Marshall (51), birkaç tümör hücre hattının 3D matriksteki davranışını incelediler ve bazı tümör hücrelerinin kontraksiyon yoluyla yuvarlak formda 3D matrikste göç ettiğini belirlediler. Sahai ve Marshall daha sonra bu mekanizmanın altında yatan sinyal yolağını incelediklerinde Rho/ROCK yolunun bu migrasyon yolu için temel güç olduğunu belirlediler. Sahai ve ark. bu çalışmayı daha sonra genişleterek yuvarlak morfolojiye sahip hücrelerin, invazyon için önlerinde bulunan kollajeni

ittirdiğini ve bu deformasyonun ROCK aktivitesi ve miyozin fosforilasyonuna bağlı olduğunu gösterdiler (52).

Sonuç olarak, ESM ağ boyutlarının geniş olması durumunda, hücrelerin Rho/ROCK yolağını aktive ederek ameboid hareketi kullandığı ileri sürülmüştür (53). Bu ameboid harekette kortikal aktomiyozin kasılma gücü ile hücreler morfolojilerini değiştirerek sferikal şekle adapte olurlar ve fibriler ağda bulunan boşluklardan geçebilirler. Ayrıca hücre yüzeyinde $\alpha 2 \beta 1$ integrinlerin ve fokal adezyon kinazların (FAK) fosforilasyonunda azaldığı gösterilmiş ve bu adezyona karşı düşük afinite sonucunda hücrelerin sferikal şekle daha kolay adapte olduğu belirlenmiştir (54).

ESM'deki ağ yoğunluğun artması (ESM kayması) durumunda, fibriler ağ çapları küçüleceğinden kanser hücrelerinin hareketi kısıtlanır (53). Kanser hücreleri, ECM'nin mekanik özelliklerindeki modifikasyonları integrin aracılı adezyonlar ve altakım mekanosensör protein sinyal iletimi (örneğin; vinkulin, FAK, ve filamin A) aracılığı ile algırlarlar (55-57). Bu algılama sistemi hücrelerde fokal adezyonların güçlenmesine, hücre çıkıntılarının ve yüksek çekme gücünün oluşmasına ve uzamış hücre şekline yol açar (58). ESM kayması sonunda hücre şeklindeki bu adaptasyonunun yanı sıra kanser hücreleri MMP'ler, serin proteazlar ve katepsinler gibi bir takım proteolitik enzimler aracılığı ile fiber matriksi degrade ederek ESM tarafından oluşan mekanik gücün üstesinden gelebilirler. Oluşan bu yeni hareket ise mezenkimal hücre hareketi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. Ameboid ve mezenkimal motilite dönüşümü (59).

2.2.4 *Kanserde RhoC'nin Önemi*

İnsan tümörlerinde Rho GTPaz'ların aşırı eksprese edildiğinin belirlenmesi ve tümör invazyonundaki fonksiyonlarının gösterilmesi, bu proteinlerin "invazyon-metastaz kaskadı"nda önemli olduklarını ortaya koymaktadır. Klinik kanserlerde ve tümör hücre hatlarında gen ekspresyon araştırmalarında, RhoA ve RhoC'nin aşırı ekspresyonu sıklıkla gösterilmiştir. Ek olarak RhoC ekspresyonunun klinik kanserlerin invazif fenotipi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (60). Suwa ve ark. 33 pankreatik duktal adenokarsinom olgusunda RhoA, B, C ekspresyonunu incelediler ve RhoC ekspresyon düzeyinin, malign olmayan dokulara göre tümör dokularında ve primerlere göre metastatik lezyonlarda daha yüksek olduğunu gösterdiler. Ayrıca RhoC'nin perinöral invazyon, lenf nodu metastazı ve zayıf prognoz ile ilişkili olduğunu bulurken, RhoA ve B ekspresyonunun klinikopatolojik verilerle herhangi bir korelasyon göstermediğini belirlediler (61). Clark ve ark. yüksek metastatik melanom hücrelerin genomik analizlerinde, RhoC geninin metastaz sürecinde yer alan bir gen olduğu tanımlanmıştır. A375P insan melanom hücrelerini veya B16F0 fare melanom hücrelerini nude farelere intravenöz olarak enjekte ederek akciğerde oluşan metastatik kolonilerin hücrelerini doku kültüründe büyütüp konukçu fareye tekrar enjekte ettiler. Bu prosedür üç kere tekrar ederek elde edilen her yeni hücre hattından yüksek metastatik potansiyeli olan hücre popülasyonları izole ettiler. Yapılan mikroarray analizleri sonucunda, her hücre hattından oluşan tüm metastatik dokularda üç genin - fibronektin, RhoC ve timozin $\beta 4$ - yüksek düzeyde eksprese edildiğini belirlediler. Ekzogenöz RhoC aşırı eksprese eden hücreler ile metastatik hücre popülasyonunda proliferasyonun artmadığını, ancak bu hücrelerin migrasyon yeteneğinin arttığını, daha invazif karakter kazandığını ve uzamış morfolojiye sahip olduğunu belirttiler (62). Bu çalışma böylece deneysel olarak RhoC'nin metastazdaki önemini doğrulamaktadır.

Pille ve ark. ise yüksek metastatik karaktere sahip olan MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde RhoA ve RhoC'nin ayrı ayrı baskılanması sonucunda hücre proliferasyonu ve invazyonunun inhibe edildiğini gösterdiler (63). Ma ve ark. miR-10b ekspresyonunun metastatik meme tümörlerinde ve metastatik meme hücre hatlarında aşırı eksprese edildiğini belirlediler. Daha sonra bu miR-10b'nin *in vitro*'da hücre migrasyonu ve invazyonunu regüle ettiğini ve *in vivo*'da tümör invazyonunu ve uzak metastazını başlattığını gösterdiler. miR-10b'nin uyardığı mekanizmayı incelediklerinde, miR-10b'nin içerisinde RhoC'nin de bulunduğu migrasyonda rol alan bir takım genlerin ekspresyonunu inhibe eden

HomeoboxD10 (HOXD10)'un translasyonunu inhibe ettiğini ortaya koydular (64). Benzer şekilde Nakayama ve ark. yumurtalık kanser hücrelerinde miR-10b uyarımı sonucunda HOXD10 proteinin azaldığını, RhoC ve MMP-14 proteinlerinin arttığını ve bu verilerle doğru orantılı olarak hücrelerin migrasyon ve invazyon yeteneklerinin arttığını ileri sürdü (65). Böylece tümör invazyonunda RhoC'nin bulunduğu dair kanıtlara bir yenisi daha eklenmiştir.

2.3 MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

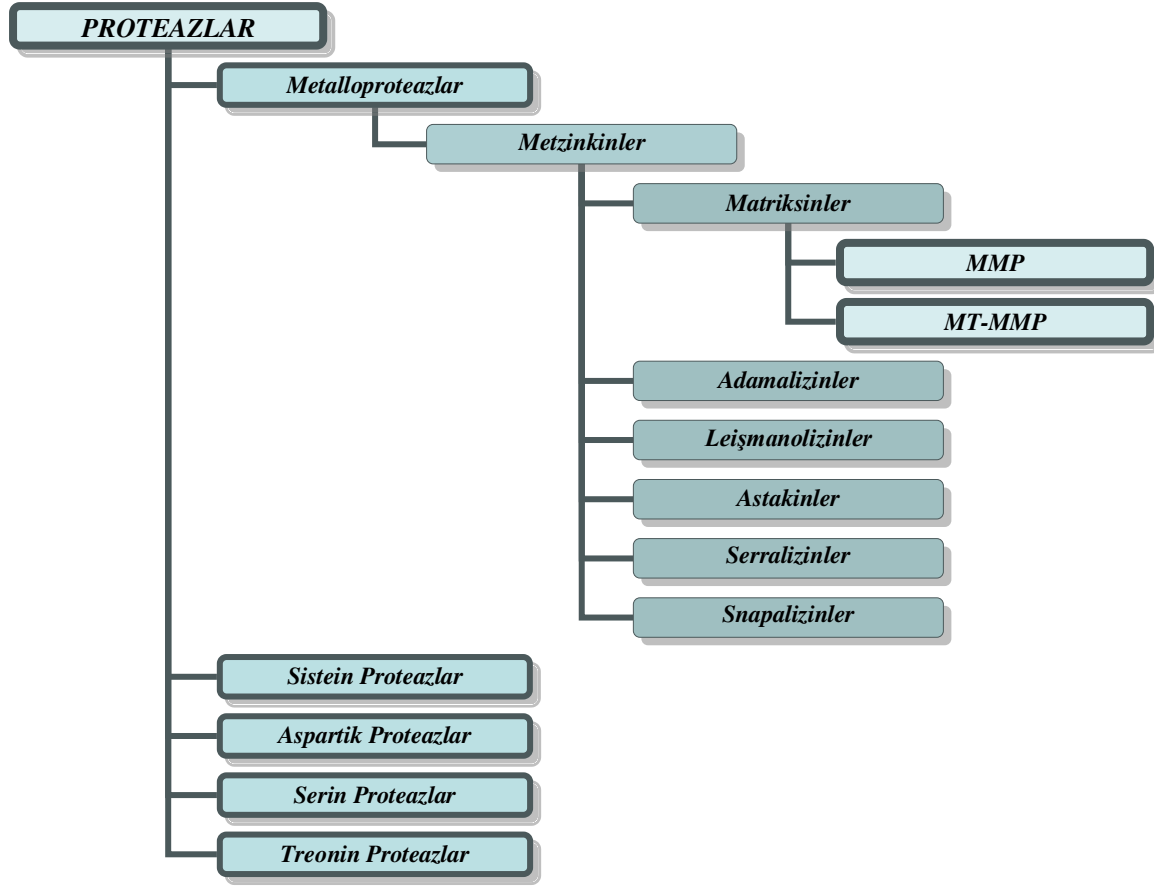
Kompleks bir ağ yapısında olan ESM; hücrelerin etrafında çeşitli yapısal proteinlerin ve makromoleküllerin oluşturduğu üç boyutlu bir mikroçevre oluşturur. ESM'nin temel bileşenleri; kollajenler, yapısal non-kollajenöz glikoproteinler (fibronektin, laminin, tenaskin ve nidojen/entaktin gibi) ve proteoglikanlardan 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 olabilmektedir, bu nedenle fizyolojik ve patolojik süreçte önemli fonksiyonlara sahiptirler.

Canlı organizmalarda bulunan metalloproteinazlar, aktif bölgelerinde Zn^{2+} atomu içeren endopeptidazlardır ve bundan dolayı, "metallo" ön ekini almaktadırlar. Metalloproteinazların metzinkin alt ailesi, üç-histidin çinko-bağlama motifi ve aktif bölgenin ardından korunmuş bir metiyonin dönüşü ile karakterize edilmiştir (66). Metzinkin ailesinin matriksin sınıfında yer alan matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), yaklaşık 28 üyeden oluşan ve ESM bileşenlerini yıkıma uğratabilen çinko ve kalsiyum bağımlı bir proteinaz ailesidir (67) (Tablo 4). Yapı, substrat spesifikliğı ve hücresel lokalizasyonlarına göre temel olarak 7 ayrı grupta sınıflandırılmışlardır (68):

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)

Ayrıca ekstrasellüler alana salınan MMP'ler ve membrana bağlanan (membran tip) MMP'ler olmak üzere iki ayrı grup altında da incelenmektedir. Membran tip MMP'ler (MT-MMP) hücre membranına kovalent bağlı olarak bulunurken, salınan MMP'ler ise ya integrinler veya CD44'e bağlanarak (69, 70) ya da hücre yüzey ilişkili heparan sülfat proteoglikanları, Tip IV kollajen veya ekstrasellüler matriks metalloproteinaz uyarıcısı (EMPRIN) (71) ile etkileşime girerek hücre yüzeyinde lokalize olabilirler.

Tablo 4. Proteazların sınıflandırılması



MMP'ler, çeşitli ESM bileşenlerini katabolize edilme yeteneklerinden dolayı patolojik doku yıkımı ve normal matriksin yeniden şekillenmesinde rol almaktadırlar. ESM bileşenlerinin yanı sıra bir takım büyüme faktörleri, reseptörler, kemokinler, Fas ligandı, diğer proteinazlar, integrinler ve hücre-hücre adezyon molekülleri gibi ESM dışı bileşenlerin de yıkımından sorumlu oldukları bilinmektedir (Tablo 5). Bu fonksiyonları nedeniyle MMP'ler; hücre büyümesi, differansiyasyon, apoptoz, migrasyon ve invazyon gibi pek çok hücrel fonksiyonda görev almaktadır. Dolayısıyla hem yara iyileşmesi, embriyo implantasyonu ve gelişimi, ovulasyon, kemik şekillenmesi ve fizyolojik anjiyogenez gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde hem de romatoid artrit, ateroskleroz, tümör invazyonu ve metastazı gibi patolojik hastalıklarda çok önemli rol oynarlar (72).

Tablo 5. MMP'ler ve substratları (73).

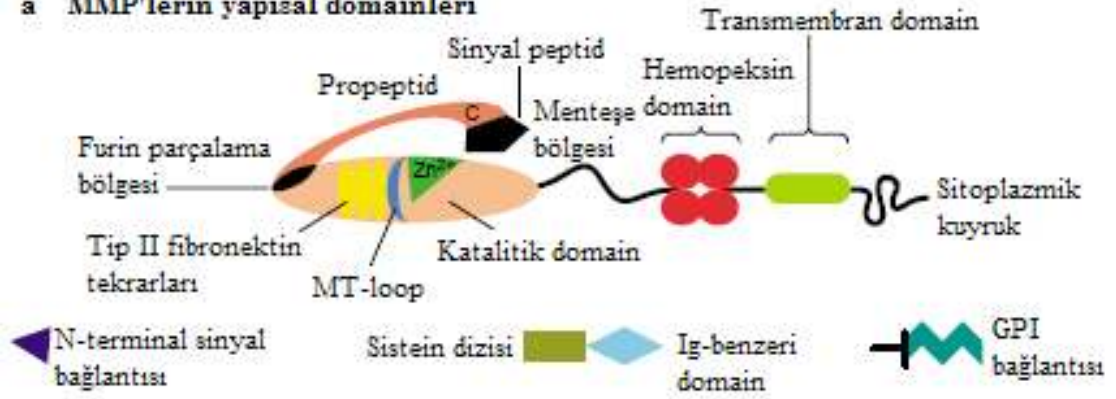
<i>MMP</i>	<i>Temel Adı</i>	<i>ESM Substratı</i>	<i>ESM-Dışı Substratı</i>
MMP-1	Kollajenaz - 1 Mco1-A	Kollajenler (I, II, III, VII, VIII, X), jelatin, proteoglikan bağlı protein, agrekan, versikan, tenakin, entaktin	α 1-PI, IL1- β , proTNF, IGFBP-3, MMP-2, MMP-9
MMP-2	Jelatinaz - A	Kollajenler (I, IV, V, VII, X, XI, XIV), jelatin, elastin, fibronektin, laminin-1, laminin-5, galektin-3, agrekan, dekorin, osteonektin proteoglikan bağlı protein	IL-1 β , α 1-PI, MMP-1, MMP-9, MMP-13
MMP-3	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 β , IGFBP-3, fibrinojen, çapraz bağlı fibrin, plazminojen, MMP-2/TIMP-2 kompleksi, MMP-7,-8,-9,-13
MMP-7	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, α 1-PI, plazminojen
MMP-8	Kollajenaz - 2	Kollajenler (I, II, III, V, VII, VIII, X), jelatin, agrekan	α 1-PI, α 2-antiplazmin, fibronektin
MMP-9	Jelatinaz-B	Kollajenler (IV, V, VII, X, XIV), jelatin, elastin, galektin-3, agrekan, fibronektin, proteoglikan bağlı protein, entaktin, osteonektin	α 1-PI, IL-1 β , plazminojen
MMP-10	Stromelizin- 2	Kollajenler (III, IV ve V), jelatin, kazein, elastin, agrekan, proteoglikan bağlı protein	MMP-1, MMP-8
MMP-11	Stromelizin- 3	Kazein, laminin, jelatin, fibronektin, kollajen IV, karboksimetillenmiş transferin	α 1-PI, kazein, IGFBP-1

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

2.3.1 MMP'lerin Domain Yapısı

MMP'lerin domain yapıları incelendiğinde, tüm MMP'lerin bir sinyal peptid, 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 (74). Ancak propeptid parçalandığı zaman, sistein ve Zn^{2+} arasındaki etkileşim kaybolur ve enzim aktif forma geçer (72). Substratın degradasyonu ve otolitik parçalanmadan sorumlu olan katalitik domain, **HEXXHXXGXXH** sekansı içerisinde bulunan ve hem Zn^{2+} hem de Ca^{2+} atomuna bağlanan korunmuş üç histidin kalıntısı içermektedir (75). C terminal domaini ise, hemopeksin ailesi üyelerinin sekansına çok benzemektedir ve substratın bağlanmasından sorumludur. Ayrıca metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) ile etkileşiminde rol almaktadır (66). 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 nativ tip I kollajene bağlanır ve böylelikle substrat spesifikliğine katkıda bulunur (67). Membrana bağlı olarak bulunan 6 farklı membran tip-MMP (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 intrasellüler proteinlerle (örneğin potansiyel fosforilasyon bölgeleri) etkileşerek aktivite ve lokalizasyonu regüle eder (72) (Şekil 8).

a MMP'lerin yapısal domainleri

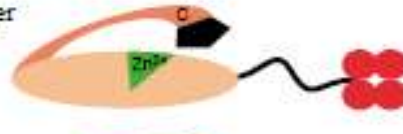


b Yapısal domainlerine göre MMP altgrupları

Matrilizinler:
MMP-7, MMP-26



Kollajenazlar, stromelizinler ve diğer
MMP'ler: MMP-1, MMP-8, MMP-13,
MMP-3, MMP-10, MMP-12, MMP-19,
MMP-20, MMP-27



Jelatinazlar: MMP-2, MMP-9



Fürin ile aktive edilen MMP'ler:
MMP-11, MMP-21, MMP-28



Membran-tip MMP'ler:
MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP,
MT5-MMP



GPI bağlı MMP'ler:
MT4-MMP, MT6-MMP



Tip II transmembran:
MMP-23A, MMP-23B



Şekil 8. MMP'lerin domain yapılarına göre sınıflandırılması (72).

2.3.2 MMP'lerin Regülasyonu

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 perisellüler birikimi)

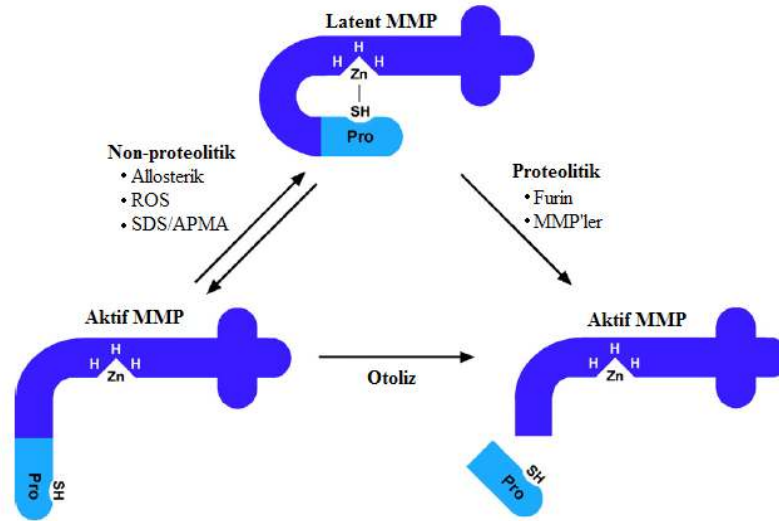
2.3.2.1 MMP Gen Ekspresyonunun Regülasyonu

MMP promotörleri, AP-1 (Aktivatör protein 1), PEA3 (Polioma güçlendirici aktivatör 3), Sp-1 (Spesifite Protein 1), β -katenin/ TCF-4 ve NF-kB içeren çeşitli trans-aktivatörler aracılığıyla MMP gen ekspresyon regülasyonunu sağlayan bir takım cis-elementleri içermektedir. İntegrinler, interlökinler, interferonlar, epidermal büyüme faktörü (EGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), sinir büyüme faktörü (NGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), platelet türevi büyüme faktörü (PDGF), TNF- α gibi çok çeşitli faktörler, AP-1 ve/veya PEA3 elementlerinin etkileşimi yoluyla MMP promotörlerin trans-aktivasyonuna neden olan hücre sinyal iletimini uyarmaktadırlar. AP-1 veya PEA3 sayesinde artan trans-aktivasyon, genellikle mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK) aracılı fosforilasyon üzerinden gerçekleşmektedir. AP-1 ve PEA-3 bağlama bölgelerinin yanı sıra, β -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 (76).

2.3.2.2 Proenzim Aktivasyonu (Sistein Şalter Mekanizması)

ProMMP'ler, korunmuş prodomaindeki sisteinin tiyol grubu ile katalitik bölgedeki çinko iyonunun etkileşmesi sonucu katalitik olarak inaktif durumda tutulurlar. Bir proMMP'nin katalitik olarak aktif olabilmesi için, tiyol-Zn²⁺ etkileşiminin parçalanması gerekmektedir. Van Wart ve Birkedal-Hansen (77) bu işlemin, tüm proMMP'lerin aktivasyonunda genel ve gerekli olduğunu ileri sürdüler ve bu mekanizmayı sistein şalter mekanizması olarak adlandırdılar. Esansiyel olarak; tiyol-Zn²⁺ etkileşimi, üç mekanizma ile kırılabilir ve bir latent MMP katalitik aktivitesini kazanabilir:

1. Fizyolojik (oksidanlar, disülfidler, elektrofiller) veya fizyolojik olmayan bileşikler,
2. Başka bir proteinaz tarafından prodomainin direkt parçalanması,
3. Prodomainin inter veya intramoleküler otolitik parçalanmasını sağlayan zimojenin kimyasal veya allosterik etkisi (Şekil 9).



Şekil 9. proMMP'lerin aktivasyon mekanizması. Latent formda prodomain, katalitik merkezi sararak substrat ile etkileşimini engeller. Furin veya diğer proteazlar tarafından prodomainin proteolitik parçalanması, katalitik bölgedeki çinkoyla etkileşen sisteinin tiyol grubunun uzaklaştırılmasını sağlar. Bu tiyol-çinko etkileşimi, APMA gibi moleküller aracılığıyla non-proteolitik olarak da parçalanabilmektedir (78).

proMMP'nin reaktif oksijen türleri (ROS) veya allosterik efektörler aracılığı ile aktivasyonunda prodomainin proteolitik olarak uzaklaştırılması gerekli değildir. Buradaki allosterik faktör zimojene bağlanarak konformasyonel değişikliğe neden olur ve katalitik

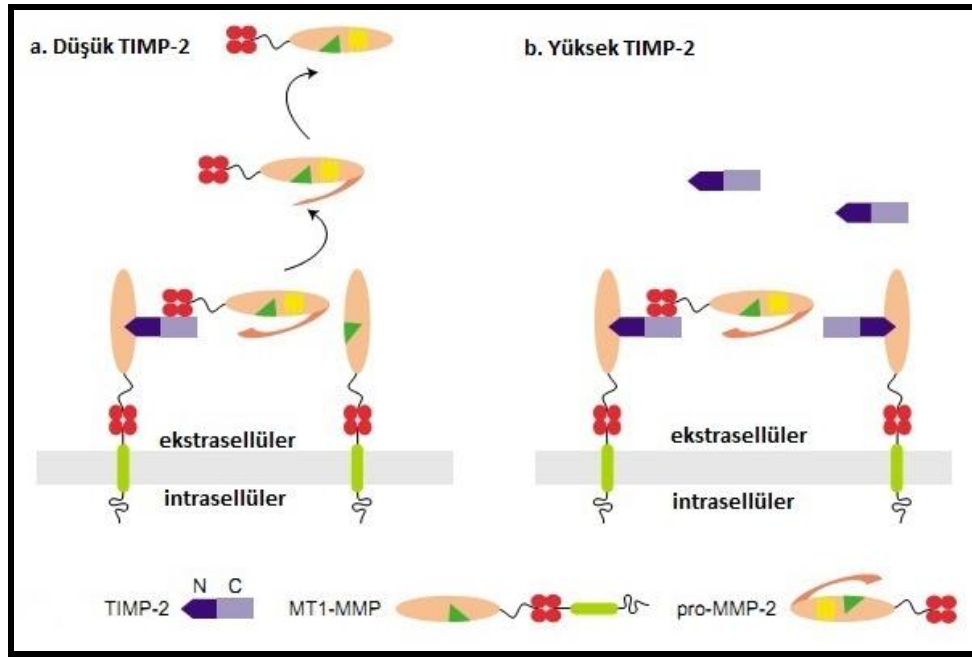
merkezdeki tiyol-Zn²⁺ arasındaki etkileşimi bozarak prodomain proteolitik olarak ayrılmaksızın aktivite olmasını sağlar. Daha sonra substrat proteoliz olur olmaz, enzim ya yeniden inaktif konformasyonuna döner ya da otoliz yoluyla prodomainini uzaklaştırarak aktif formda kalır (78).

Otolize ek olarak, MMP'lerin prodomainini diğer proteinazlar tarafından direkt olarak da parçalanabilir. MMP'lerin yaklaşık üçte biri (tüm membran tip MMP'ler de dahil), pro ve katalitik domainleri arasında, proprotein konvertazlar veya furinler için hedef olan RXKR veya RRKR sekansına sahiptir. Furin, trans-Golgi ağında bulunan subtilisin-benzeri bir serin proteazdır ve furinle parçalanma bölgesi olan MMP'ler, sekresyon metabolik yolu içerisinde intrasellüler olarak işlenirler (79-81). Ayrıca *in vitro*'da bir takım proteolitik enzimler de, latent formdaki MMP'lerin prodomainlerini parçalayarak aktivitelerini kazanmalarını sağlayabilirler (82). İlk parçalama, ya bir serin proteaz, bir MMP, bir aspartat proteaz ya da bir sistein proteaz tarafından gerçekleştirilebilir. Örneğin, miyofibroblast transdifferansiyasyonu sırasında pro-MMP-9'un aktivasyonu aktif MMP-13'ün varlığına ihtiyaç duymaktadır (83). Bu zamana kadar en iyi tanımlanmış non-furin proteolitik aktivasyon mekanizması, hücre yüzeyindeki proMMP-2'nin aktif MMP-14 tarafından parçalanmasıdır. Ancak, tüm MMP'lerin aktivasyon mekanizmaları henüz net olarak bilinmemektedir.

2.3.2.2.1 MMP-2'nin, MT1-MMP ve TIMP-2 Aracılığıyla Aktivasyonu

MMP-2'nin aktivasyon mekanizması, diğer MMP'lerden farklı olarak TIMP-2 bağımlı MT1-MMP aracılı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir (Şekil 10). MT1-, MT2-, MT3-MT5- veya MT6-MMP'lerin tümünün *in vitro*'da proMMP-2'yi aktive ettiği gösterilmiştir ancak MT1-MMP aracılığıyla pro MMP-2 aktivasyon mekanizması en çok çalışılan konulardandır (84-88). Pro MMP-2 aktivasyonunun güncel modeline göre; hücre yüzeyindeki MT1-MMP, TIMP-2 için reseptör olarak rol almakta ve TIMP-2, kendi N-terminal domaini aracılığıyla MT1-MMP'nin aktif bölgesine bağlanmaktadır. Bu ikili kompleks daha sonra pro MMP-2 için reseptör gibi hareket ederek TIMP-2'nin C terminal domaini ile birlikte pro MMP-2'nin C terminal domainine bağlanmaktadır (89). Oluşan üçlü komplekse en yakın olan serbest aktif MT1-MMP, daha sonra pro MMP-2'nin propeptid üzerinde bulunan N37-L38 bağını parçalar ve ara ürünler oluşturur. Ara ürünlerde bulunan kısmi propeptid bölgesi, otokatalitik bir mekanizma aracılığıyla ileri proteolize uğrayarak, tam bir aktif enzim oluşumu

gerçekleşir. Bu modelde, pro MMP-2 aktivasyon mekanizmasının gerçekleşebilmesi için, TIMP-2 konsantrasyonunun yeterli düzeyde düşük olması gerekmektedir, buna karşılık TIMP-2 düzeylerinin yükselmesi durumunda, tüm MT1-MMP'lerin aktivasyonu inhibe edileceğinden pro MMP-2 aktivasyonunu engellenir (90). TIMP-2 yokluğunda MT1-MMP, otokatalitik prosese uğrar ve 45 kDa'lık inaktif forma dönüşür. Bu sebeple, TIMP-2 molekülü doğrudan ve pozitif yönde otokatalitik prosesi sınırlayarak hücre yüzeyindeki aktif MT1-MMP konsantrasyonunu ve pro MMP-2 aktivasyonunu regüle eder (91).



Şekil 10. proMMP-2 aktivasyon mekanizması.

2.3.2.3 MMP'lerin İnaktivasyonu

Metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) 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. TIMP-2, tüm dokularda yapısal olarak eksprese edilirken; TIMP -1, -3, -4 ekspresyonu uyarılabilir ve doku spesifikliği 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 affinite gösterirler (92). TIMP-1^{-/-} olan farelerde akut akciğer hasarı, alveolar alanda hızlanmış re-epitelizasyon ve artmış nötrofil girişi ile karakterize edilmiştir (93). TIMP-3^{-/-} farelerde alveolar alanların

kendiliğinden genişlediği görülmüştür (94). Bu gibi anfizem benzeri değişiklikler, anormal MMP aktivitesine dayandırılmıştır. MMP ve TIMP arasındaki dengenin bozulması; tümör invazyonu, metastazı, anjiyogenezi ve yara iyileşmesini kapsayan birçok patolojik süreç ile sonuçlanabilir (95).

α -2-makroglobulin, pek çok aktif enzimi yakalayan ve daha sonra makrofajların 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 (96) inhibe ederken, CT-PCPE (Prokollajen C terminal proteinaz güçlendiricinin bir C-terminal fragmenti), *in vitro*'da MMP inhibitörü olarak fonksiyon gösterir (97).

2.3.3 Kanser Progresyonu ve Metastazda MMP'ler

Kanser progresyonunun altında yatan 6 temel değişim bulunmaktadır: 1) Kendi büyüme sinyallerini desteklenmesi, 2) Büyüme inhibitör sinyallerine karşı duyarsızlaşma, 3) Apoptozdan kaçma, 4) Sonsuz bölünme, 5) Devamlı anjiyogenezi, 6) İnvazyon ve metastaz (98). Tümör biyolojisinde ilk olarak MMP'lerin, ESM ve bazal membranın oluşturduğu fiziksel bariyeri kaldırarak metastazı kolaylaştırdığına inanılırdı. Ancak günümüzde MMP'lerin karsinogenezin farklı basamaklarında da çok yönlü biyolojik fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bir takım ESM bileşenlerinin proteolizi ile sinyal iletim yetenekleri olan gizli domainlerin salındığı gösterilmiştir (99).

MMP'lerin kanser progresyonunda hem kanseri destekleyici hem de inhibe edici birbirine zıt fonksiyonları bulunmaktadır (Şekil 11 A ve B). Kanser progresyonu basamakları göz önüne alındığında; tümör büyümesinde MMP'ler, IGF-BP kesilmesini sağlayarak IGF biyosağlanabilirliğini artırır, transforme eden büyüme faktör- α (TGF- α) gibi büyüme faktörlerinin transmembran prekürsörünü keser ve ESM regülasyonunu sağlayarak indirekt olarak ESM-integrin etkileşimini sağlar. Bu fonksiyonları aracılığıyla MMP'ler hücre büyümesini destekler. Buna karşılık MMP'ler, latent formda olan transforme eden büyüme faktör β (TGF- β) kompleksinden TGF- β salınımını sağlayarak kanser hücre büyümesini inhibe eder (100). Ek olarak MMP-7 öncül heparin-bağlama epidermal büyüme faktörünü (pro-HB-EGF) keser ve ERBB4 reseptör tirozin kinazı stimüle ederek hücre sağkalımını sağlayan olgun HB-EGF oluşturur (70). Ek olarak MMP'ler IGF salınımını sağlayarak ve FAS

ligandını keserek kanser hücre sağkalımını desteklerken, ESM kompozisyonunu değiştirip integrin sinyal yolağını etkileyerek apoptoza katkıda bulunur.

Anjiyogenezdeki rollerini incelendiğinde pro-anjiyogenik büyüme faktörü olan VEGF, fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2), and TGF- β biyosağlanabilirliğini arttırarak anjiyogenezi stimule eder ve böylelikle endotelial hücre migrasyonu ve proliferasyonuna destek olur. Bununla birlikte kollajen tip I, kollajen tip IV ve fibrin gibi ESM komponentlerini keserek endotelial hücre invazyonunu kolaylaştırır. Kesilmiş kollajen tip IV proanjiyogenik olarak $\alpha\beta3$ integrine bağlanır. Anti-anjiyogenik olarak, plasminojen ve kollajen tip XVIII'i keserek anti-anjiyogenik faktörler olan anjiyostatin ve endostatin oluşumunu sağlar. MMP'ler ayrıca kollajen IV'ün bir fragmenti olan tumstatinin oluşumuna da katılırlar. Ek olarak, endotel hücre yüzeyinde bulunan ve endotelial hücre invazyonu için gerekli olan ürokinaz tip plasminojen aktivatör reseptörü (uPAR) keserek anjiyogenezi inhibe ederler.

MMP'ler ayrıca kanser hücrelerine karşı immün reaksiyonları inhibe eder. MMP'ler T lenfositlerdeki interlökin-2 reseptör- α (IL-2R α) keserek T lenfosit proliferasyonunu inhibe ederler. Ayrıca kanser hücrelerine karşı gelişen T hücre reaksiyonlarının önemli bir inhibitörü olan TGF- β 'nın salınımını sağlarlar. $\alpha1$ -PI kesilmesini sağlarlar ve böylelikle doğal öldürücü hücrelerin kanser hücre duyarlılığının azalmasına neden olur. Çok çeşitli CC ve CXC kemokin ailesi üyelerini keserler ve böylelikle bu faktörler lökositleri artık çekemezler (100).

Hücre migrasyonu ve invazyonu açısından genellikle metastazı destekleyici rol üstlenirler. MMP-2 ve MMP-14 tarafından Laminin-5'in kesilmesi sonucunda hücre motilitisini tetikleyen kriptik bölge açığa çıkar (101, 102). Hyaluronan için temel reseptör olan CD44, MMP-14 tarafından kesilerek ekstrasellüler domaininin salınımını sağlar ve kesilme bölgesi mutasyona uğratıldığında ise hücre migrasyonu inhibe olur (103). CD44 ayrıca MMP-9'a da bağlanır ve böylelikle enzimin hücre yüzeyinde lokalize olmasını sağlar. Bu lokalizasyon MMP-9'un tümör invazyonu ve anjiyogenezi desteklemesi için gereklidir. Hücre yüzeyindeki CD44-MMP-9 kompleksinin bozulması sonucunda *in vivo*'da tümör invazifliği de inhibe olur (69).

MMP-7 ve MMP-3 tarafından E-kadherinin kesilmesi EMT'yi de tetikleyerek agresif malign davranış ile ilişkili olan bir hücresel fenotip kazandırır (104). Ayrıca MMP-3 hücre içinde reaktif oksijen türlerinin düzeylerini arttıran Rac1b ekspresyonunu uyararak EMT'yi tetikleyen Snail ekspresyonunu stimüle eder (105).

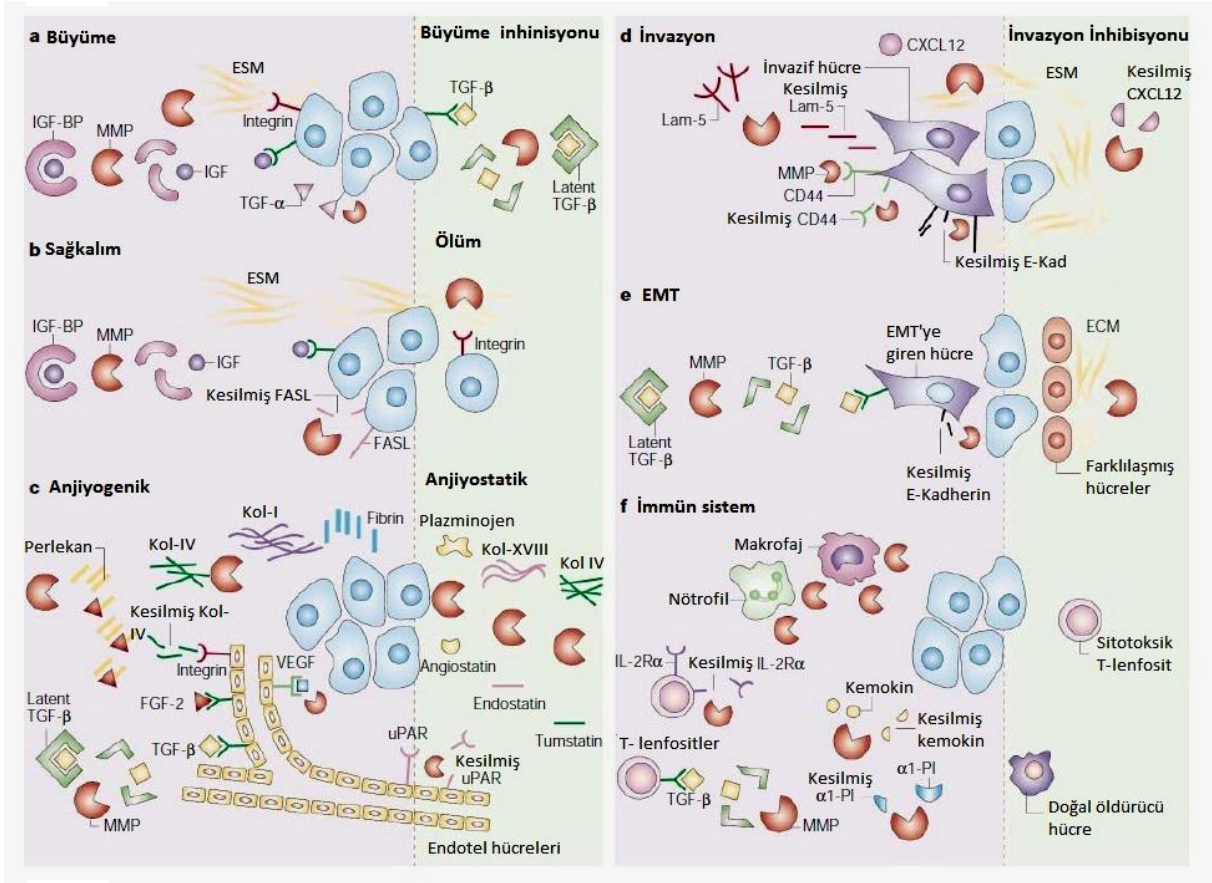
Kesilmiş E-kadherin parçaları daha sonra diğer kesilmemiş E-kadherin moleküllerine bağlanarak inhibe edebilir. Ayrıca E-kadherinin kesilmesi sonucunda serbest kalan β katenin nükleusa transloke olarak hücre proliferasyonunu desteklemektedir. Bununla birlikte MMP-28, TGF- β 'nın salınımı sağlayarak EMT'nin uyarılmasına katkıda bulunur (106).

İnvazyon sırasında MMP-2, -9 ve -14 hücre membranında özelleşmiş yüzey çıkıntıları olarak bilinen invadopodia'da lokalize olarak invazyona katkıda bulunurlar (107). MMP'ler ESM ve bazal membran degradasyonunu da sağlayarak invazyon için engel olan bariyerin ortadan kalkmasını sağlarlar. Örneğin MMP-2 ve MMP-9 bazal membranda bulunan kollajen tip IV'ün yıkımını sağlarlar (108). Buna ek olarak MMP-1 interstisyel kollajeni degrade ederek kanser hücrelerinin invazyonunu kolaylaştırır (109).

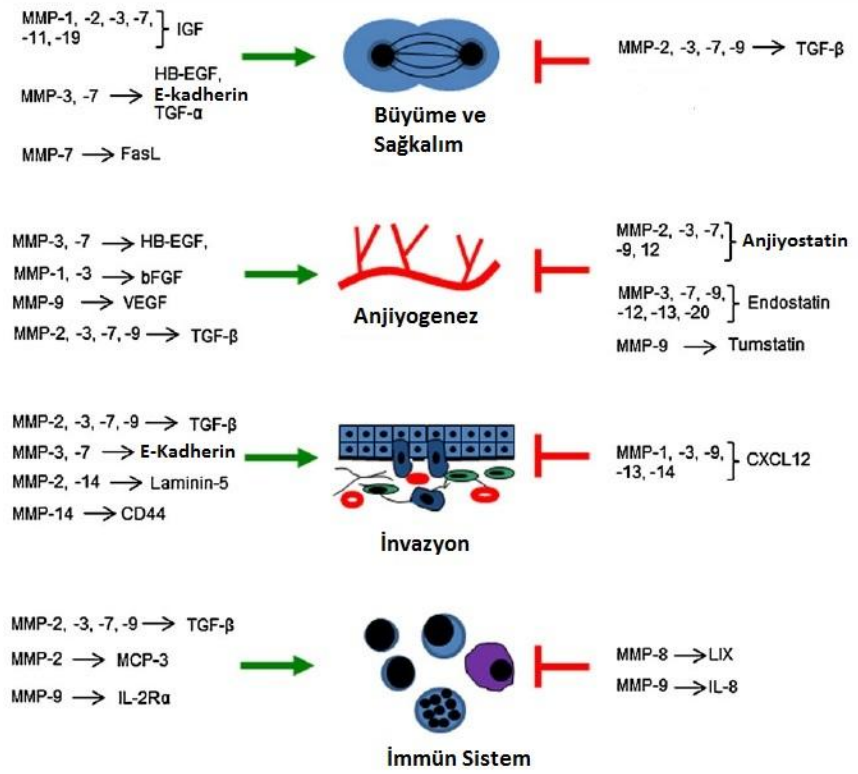
Her ne kadar invazyonu arttırıcı fonksiyonları olsa da metastazı bloke eden fonksiyonlara da sahiplerdir. Örneğin, MMP'ler meme kanser metastazına katkıda bulunan ve bir kemokin olan CXCL12'yi (CXCL12) keserek metastazı inhibe ederler (100).

Yapılan araştırmalarda artmış MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13 ve -14 ekspresyon düzeylerinin tümör progresyonu, metastazı ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (110-115). Son zamanlarda MMP-9'un üçlü negatif meme kanserinin tümör progresyonu ve metastazında etkili olduğu (116) ve melanomun erken evrelerinde MMP-9 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (117). Ek olarak, MMP-2 veya MMP-9 negatif farelerde kanser hücreleri akciğerlerde daha düşük koloni oluşturma kapasitesine sahiptir (118, 119). MMP-3 ve MMP-14'ün aşırı ekspresyonunun da meme karsinogenezi desteklediği ileri sürülmüştür (120, 121).

A



B



Şekil 11. Kanser progresyonunda MMP'ler (100, 122).

2.3.3.1 Kolorektal Kanserde MMP'lerin Rolü

Birçok MMP, çeşitli insan malign tümör türlerinde aşırı eksprese edilmektedir ve bu enzimlerin ekspresyonu ve aktivasyonu; metastatik potansiyel ve tümör agresifliği ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Kolorektal kanserli hastalardan alınan kan ve /veya doku örneklerinde MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13 ve MMP-14'ün yüksek düzeyleri pek çok çalışmada yayınlanmıştır (123-130). Özellikle MMP-2 ve MMP-9'un kolorektal karsinogenezinde ve metastazındaki önemini ortaya koyan araştırmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Örneğin, Herszényi ve ark. immünohistokimyasal olarak MMP-9 ekspresyonunun orta ve kötü differansiye tümörlerde iyi differansiye tümörlere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu gösterdi. Aynı zamanda hem tümör hem de stromal hücrelerde güçlü MMP-9 ekspresyonu olduğunu belirlediler. Real Time PCR çalışmalarında ise immünohistokimyasal çalışmaları ile uyumlu olarak; kanser dokularında normal kolonik mukozaya oranla daha yüksek MMP-9 ekspresyonunun olduğunu gösterdiler (131). Daha sonra Buhmeida (132) ve Chu (133)'nin yaptıkları immünohistokimya çalışmalarında kolorektal kanserde MMP-9'un bağımsız bir prognostik marker olarak rol alabileceği ve MMP-9 ekspresyonunun yüksek olduğu belirlenen hastalarda, hastalığın yeniden görülme riskinin yüksek olduğunu belirlemede önemli olabileceğini ileri sürdüler. Chu ve ark. MMP-9 immünopozitifliğinin invazyon derinliği, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz ile ilişkili olduğunu gösterdiler. Ayrıca Kaplan-Meier analizi ile MMP-9 pozitif olan hastalarda, MMP-9 negatif olan hastalara oranla daha kötü sağkalım olduğunu gösterdiler. Yapılan başka bir araştırmada MMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerinin Dukes C evresindeki kolorektal tümörlerinde Dukes B ve normal dokuya oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (134). Parson ve ark. aktif MMP-2/proMMP-2 oranının kolorektal kanser dokularında eşlenik normal dokulara göre 20 kat daha yüksek olduğunu belirlediler (135). Matsuyama ve ark.'nın yaptığı jelatin zimoğrafisi çalışmalarında ise MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinin karaciğer metastazı olan zenograftlarda, metastazı olmayan zenograftlara oranla arttığını rapor ettiler (136).

Erken kolonik adenomların büyümesinde ve invazif kansere dönüşmesinde MMP-7 önemli bir rol oynamaktadır (137). Yapılan araştırmalarda kolonik adenokarsinomların %90'ında yüksek MMP-7 ekspresyonu olduğu belirlenmiştir (138-140). Ayrıca immünohistokimya ve in situ hibridizasyon çalışmaları ile kolorektal kanserde MMP-7'nin aşırı ekspresyonunun direkt olarak nodal ve uzak metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir

(141). Daha önce kolorektal kanserli hastalardan alınan doku örneklerinde yaptığımız çalışmamızda, tümör dokularında eşlenik normal doku örneklerine oranla MMP-7 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin anlamlı yüksek olduğunu belirledik. Ek olarak, MMP-7 mRNA ekspresyon düzeylerinin tümör ve patolojik evre ile pozitif, yaş ile negatif korelasyon gösterdiğini saptadık. Ayrıca MMP-7 mRNA ekspresyonu 0,0006 eşik değerinde %81,3 duyarlılık ve % 81,2 özgüllüğe (AUC = 0.883) sahip olduğunu ve bu nedenle kolorektal kanserin tanısında potansiyel bir belirteç olabileceğini ileri sürdük. Ayrıca kazein zimografi ile pro ve aktif MMP-7 aktivite düzeylerinin ve in situ kazein zimografi ile lokal kazeinolitik aktivitenin kolorektal tümör dokularında arttığını gösterdik (142).

Takahashi ve ark. kolon kanserlerin %90'unda MMP-14'ün aşırı eksprese edildiğini ve MMP-14'ün Wnt sinyal yolağında yer alan β -Katenin/Tcf kompleksinin bir hedefi olduğunu ileri sürdüler (143). Yang ve ark. MMP-14 protein ekspresyon düzeylerinin kanser dokularında normal dokulara göre arttığını immünohistokimya çalışmaları ile gösterdiler. Ayrıca MMP-14 ekspresyonunun differansiyasyon derecesi, infiltrasyon deriliği, Duke's evresi ve lenf nodu metastazı ile arasında pozitif ilişkisi olduğunu belirlediler. Beş yıllık sağkalım ise MMP-14 pozitif hastalarda MM-14 negatif hastalara oranla daha düşük olduğunu ve bu nedenle MMP-14 ekspresyonunun bağımsız bir prognostik faktör olabileceğini ileri sürdüler (144).

MMP ve TIMP'ler arasındaki dengenin bozulması gastrointestinal malignansilerin gelişmesi için esansiyel bir adımdır ve tümör progresyonunun erken süreçlerinde kritik bir önem taşımaktadır. TIMP-1 tercihen MMP-1, MMP-3, MMP-7 ve MMP-9'u inhibe ederken, TIMP-2 tercihen MMP-2 ve MMP-9'u inhibe eder (145, 146). TIMP-2 düzeyinin tümör dokularında downregüle edildiğini gösterilmiştir (147). Örneğin, Baker ve ark.ları 46 kolorektal kanser hastasından alınan dokularda ELISA yöntemi ile (148), Tae-Dong ve ark.ları 22 kolorektal kanser hastasından alınan dokularda Western blot yöntemi ile (149) TIMP-2 düzeylerini incelemiş ve normal dokularda TIMP-2'nin aşırı eksprese olduğunu belirlemiştir. Benzer şekilde *in vivo* çalışmalarda farelerde TIMP-1 aşırı ekspresyonunun karaciğer ve beyine metastazını azaltmıştır (150-152).

3. GEREC ve YÖNTEM

Kolon kanser hücrelerinde (HT-29, HCT116, SW480, SW620, LoVo hücre hatlarında) sitoskelet elemanlarının regülasyonunda rol alan RhoC ile hücre invazyonuna katkısı olan MMP'ler arasındaki olası ilişkiyi belirlemek ve RhoC'nin kolon kanser hücre invazyondaki etkisini incelemek amacıyla aşağıdaki tekniklerden yararlanılmıştır:

- ✓ **Hücrelerin ikiye katlanma zamanlarının belirlenmesi:** HT-29, HCT116, SW620, SW480 ve LoVo kolon kanser hücrelerinin ikiye katlanma zamanları belirlendi.
- ✓ **WST-1 analizi:** Transfeksiyon reaktifinin SW620, SW480 ve LoVo kolon kanser hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkisi incelendi.
- ✓ **siRNA tekniği:** HT-29, HCT116, SW480, SW620 ve LoVo kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu siRNA tekniği ile susturuldu.
- ✓ **Real Time PCR:** RhoC gen ekspresyonu susturumu sonrası hem siRNA tekniğinin gerçekleştiğini kanıtlamak hem de bu susturumun MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, mDia ve ROCK-I mRNA ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Real Time PCR tekniği kullanıldı.
- ✓ **Western Blot:** RhoC gen ekspresyonu susturumu sonrası mRNA ekspresyon değişimlerinin proteine yansıyor yansımadığını belirlemek amacıyla Western Blot yöntemi ile RhoC, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14 ve TIMP-2 protein ekspresyon düzeyleri incelendi.
- ✓ **Jelatin Zimografi:** RhoC gen ekspresyonu susturumu sonrası MMP-2 ve MMP-9'un hücre dışına salınımı ve aktivite düzeyleri "Jelatin Zimografi" tekniği ile belirlendi.
- ✓ **Hücre Migrasyonu ve Matrijel İnvazyon Denemeleri:** RhoC gen ekspresyonu susturumu sonrası kolon kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneklerindeki değişimi incelenmek amacıyla "Hücre Migrasyonu ve Matrijel İnvazyon" teknikleri kullanıldı.

3.1 Araştırmanın Tipi

Bu çalışma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG) ve Araştırma Laboratuvarı (ARLAB)'nda Ocak 2012 - Haziran 2015 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi /Çalışma Grupları

In vitro hücre kültürü çalışması olması nedeniyle bir evreni ve örneklemi bulunmamaktadır.

3.4 Çalışma Materyali

HT-29 ve HCT116 insan kolon kanser hücre hatları, Ocak 2012 tarihinde Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümünden Prof. Dr. Kemal KORKMAZ tarafından, LoVo insan metastatik kolon kanser hücre hattı ise Nisan 2014 tarihinde Imperial Collage, Life Sciences Bölümünden (Londra – İngiltere) Prof. Dr. Mustafa Djamgoz tarafından hediye edilmiştir. Ocak 2013 tarihinde SW620 ve SW480 insan kolon kanser hücre hatları ATCC'den ticari olarak satın alınmıştır. HT-29, HCT116, SW480 ve SW620 DMSO içerisinde dondurulmuş hücreler sıvı azot/kuru buz içerisinde laboratuvar ortamında taşınmıştır. LoVo hücre hattı ise RPMI ortamı ile doldurulmuş 25cm²'lik flaskta kargo aracılığı ile 24 saat içerisinde laboratuvar ortamında getirtilmiştir.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

- ✓ RhoC susturumu (bağımsız değişken)
- ✓ mRNA ve protein ekspresyonu, aktivite, migrasyon ve invazyon değişimleri (bağımlı değişken)

3.6 Veri toplama Araçları

3.6.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitler Tablo no 6'da cihazlar ise Tablo no 7'de belirtilmiştir.

Tablo 6. Proje süresince kullanılan kimyasal malzeme ve kitlerin marka ve kod numaraları

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Model/Kod Numarası</i>
HT-29 hücre hattı	ATCC	HTB-38 TM
HCT116 hücre hattı	ATCC	CCL-247 TM
SW620 hücre hattı	ATCC	CCL-227 TM
SW480 hücre hattı	ATCC	CCL-228 TM
LoVo hücre hattı	ATCC	CCL-229 TM
RPMI	Lonza	BE12-167F
Mc Coy's 5A	Lonza	BE12-688F
Leibovitz's L-15	Lonza	BE12-700F
Fetal Dana Serum (FBS)	Lonza	DE14-801F
L-Glutamin	Lonza	BE17-605E
Penisilin/Streptomisin	Lonza	DE17-602E
Fosfat Tamponu Tuzu (PBS) (10X)	Lonza	BE17-517Q
Trypsin/EDTA	Lonza	CC-5012
Trypan Mavisı	Biochrom	L 6323
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Fischer Scientific	EC-200-664-3
RhoC siRNA	Dharmacon	LQ-008555-00
Non-Target siRNA	Dharmacon	D-001810-10
Transfeksiyon Reaktifi -1	Dharmacon	T-2001
Transfeksiyon Reaktifi - 2	Dharmacon	T-2002
WST-1 Kiti	Roche	11 664 807 001
Total RNA İzolasyon Kiti	Roche	11 828 665 001
cDNA Sentez kiti	Roche	04897030001
LightCycler 480 Probes Master	Roche	04887301001
Primer Prob RhoC	Roche	139281
Primer Prob MMP-2	Roche	103899
Primer Prob MMP-9	Roche	139820
Primer Prob MMP-7	Roche	104396
Primer Prob MMP-14	Roche	109081
Primer Prob TIMP-1	Roche	103847
Primer Prob TIMP-2	Roche	110664
Primer Prob ROCK-I	Roche	104682
Primer Prob mDia	Roche	116382
Primer Prob GAPDH	Roche	101128
Biçinkoninik asit total protein tayin kiti	Thermo Scientific	23225
Matrigel	Corning Life Sciences	354234
Motilite/invazyon kuyuları	BD Bioscience	354578
Diff-Quik Stain Set	Siemens	B4132-1A
% 37 Formaldehit	Sigma	F1635
Agaroz Tip III High EEO	Sigma	A6138
Etidyum Bromür	Sigma	E8751
Gliserol	AppliChem	A1123
EDTA	Sigma	E02P
MOPS	Sigma	M1254
N, N-dimetil formamide	Sigma	D8654

Sodyum asetat	CODEY	366207
Akrilamid	Sigma	A9099
N,N'metilen bisakrilamid	Sigma	M7279
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma	L-4390
TEMED	Sigma	T7024
Amonyumpersülfat (APS)	Sigma	A9164
İsopropanol	Riedel de Haen	24137
Tris-Baz	Sigma	T6066
Tris-HCl	Sigma	T5941
Sodyum klorür	Riedel de Haen	13423
Kalsiyum Klorür	Riedel de Haen	12022
NP-40	Sigma	NP40
Sodyum deoksikolat	Sigma	D6750
NaF	Sigma	S-1504
PMSF	Sigma	P7626
Leupeptin	Sigma	L2884
Pepstatin	Sigma	P5318
Isopropanol	Riedel de Haen	24137
Glisin	Sigma	G8898
Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific	22619
Rekombinant pro MMP-2	R&D	902-MPN
Rekombinant pro MMP-9	R&D	911-MP
Rekombinant Rho C	Abnova	H00000389-P01
Tween-20	AppliChem	A4974
Yağsız süt tozu	Appllichem	A0830
Metanol	Sigma	27,047-4
PVDF Membran	Santa Cruz	PV4HY000GL
Whatmann kağıdı	Bio-Rad	1703932
Mouse monoclonal GAPDH primer antikör	Santa Cruz	SC-365062
Polyclonal rabbit RhoC primer antikör	Cell Signaling	3430S
Polyclonal rabbit MMP-2 primer antikör	Santa Cruz	SC-8835
Polyclonal rabbit MMP-9 primer antikör	Cell Signaling	3852
Polyclonal rabbit MMP-7 primer antikör	Cell Signaling	3801
Polyclonal rabbit MMP-14 primer antikör	Cell Signaling	13130
Polyclonal rabbit TIMP-2 primer antikör	Cell Signaling	5738
Polyclonal rabbit β -aktin primer antikör	Cell Signaling	4967S
Goat anti-mouse IgG-HRP sekonder antikör	Santa Cruz	sc-2005
Anti-rabbit IgG, HRP- sekonder antikör	Cell Signaling	7074S
ECL Dura	Thermo Scientific	35075
Konsantratör tüp	Millipore	UFC200324
Jelatin Type B	Sigma	G-6144
Triton X-100	AppliChem	A4975
Brij 35	Sigma	430AG-6
Coomassie Blue R-250	Sigma	B0149
Asetik Asit	Riedel de Haen	27225

Tablo 7. Proje süresince kullanılan cihazların marka ve kod numaraları

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Model/Kod Numarası</i>
Laminar Akımlı Kabinet	ESCO	EQR / GL-64
CO ₂ İnkübatörü	Thermo Scientific	Model:311
Ters-faz Işık Mikroskobu	Nikon	ECLIPSE TS100
Nanodrop	Thermo	NanoDrop 3300
Thermal Block Cycler	Biorad	1709701EDU
RT-PCR Cihazı	Roche Ligtcycler® 480	Versiyon 2.0
RT-PCR Yazılımı	Roche Lightcycler® 480 Software	Verisyon 1.5.0
Horizontal Elektroforez Sistemi	Thermo Scientific	OWL EASYCAST B1
Güç Kaynağı	Thermo Scientific	EC 300 XL
Vertikal Elektroforez Sistemi	Biorad	-
Güç Kaynağı	Biorad	PowerPac Basic
Wet Transfer Sistemi	Biorad	Mini Trans Blot
Güç Kaynağı	Biorad	Power Pac Hc
Jel Görüntüleme Cihazı	Kodak/Carestream	4000MM IS
Jel Görüntüleme Cihazı	UVP	EC3 Chemi HR 410
Plak Okuyucu	BioTek	ELX 50
Termal Isıtıcı Blok	Stuart	SBH130D
Lab Roller	Labnet	H5000
Hassas Terazı	Precisa	XB 220A
Manyetik Karıştırıcı	VELP Scientifica	F20520162
pH Metre	J.P Selecta	4120500
Soğutmalı Etüv	VELP Scientifica	FOC 225E
Sabit açılı santrifuj	Heraeus	Biofuge Stratos
Salınımlı santrifuj	Hettich	320R
Otoklav	Hirayama	HICLAVE HV-50
Spinner	WISD	Wisespin CF-45
Vorteks	Heidolph	REAX Top
Derin Dondurucu -80 ⁰ C	Thermo Scientific	Forma Model 705
Derin Dondurucu -20 ⁰ C	Ariston	Hotpoint
Buzdolabı +4 ⁰ C	Ariston	Hotpoint

3.6.2 Yöntemler

3.6.2.1 Hücre Kültürü

Bu çalışmada primer (HT-29, HCT116 ve SW480) ve metastatik (lenf nodu metastazı SW620 ve sol supraklaviküler bölgeye metastaz yapan LoVo) kolon kanser hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatlarına ait genel bilgiler Tablo 8’de özetlenmiştir. Tüm çalışmalar aseptik koşullar altında, Sınıf II Laminar Flow içerisinde gerçekleştirildi (153).

Tablo 8. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri (154).

Hücre Hattı	Cinsiyet	Doku	Morfoloji	Tümör Evresi	Türü
HT-29	Kadın (44 yaş)	Kolon	Epitel	Primer (Evre I)	Kolorektal Adenokarsinom
HCT116	Erkek (48 yaş)	Kolon	Epitel	Primer	Kolorektal Karsinom
SW480	Erkek (50 yaş)	Kolon	Epitel	Primer (Dukes tip B)	Kolorektal Adenokarsinom
SW620	Erkek (51 yaş)	Kolon	Epitel	Metastatik, Lenf Nodu (Dukes tip C)	Kolorektal Adenokarsinom
LoVo	Erkek (56 Yaş)	Kolon	Epitel	Metastatik; sol supraklaviküler bölge (Dukes' tip C - Evre IV)	Kolorektal Adenokarsinom

3.6.2.1.1 Kültür Ortamlarının Hazırlanması

HT-29 ve HCT116 hücre hatları için McCoy's 5A, SW620 ve SW480 hücre hatları için Leibovitz's L-15 ve LoVo hücre hattı için RPMI 1640 kültür ortamları kullanıldı. Bu ortamlar içersine, %10 inaktif fetal dana serumu (FBS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL penisilin - 100 µg/mL streptomisin konuldu. HT-29, HCT116 ve LoVo hücre hatları 37°C'de %5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe, SW480 ve SW620 hücre hatları ise 37°C'de normal atmosfer ortamındaki CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.

3.6.2.1.2 Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

- 1) Sıvı azot tankında veya -80°C'deki dondurucuda saklanan hücreler çıkarılarak 37°C'deki su banyosunda hızla çözüldü.
- 2) Elde edilen hücre süspansiyonu 8 ml kültür ortamı içeren bir tüpe aktarıldı.
- 3) Hücreler, salınımlı santrifüjde oda sıcaklığında 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.
- 4) Süpernatant atıldı ve elde edilen hücre pelleti uygun kültür ortamı ile süspanse edildi.
- 5) Hücre sayımı yapıldıktan ve hücre canlılığı kontrol edildikten sonra hücre süspansiyonu 25 cm²'lik flaska ekildi.

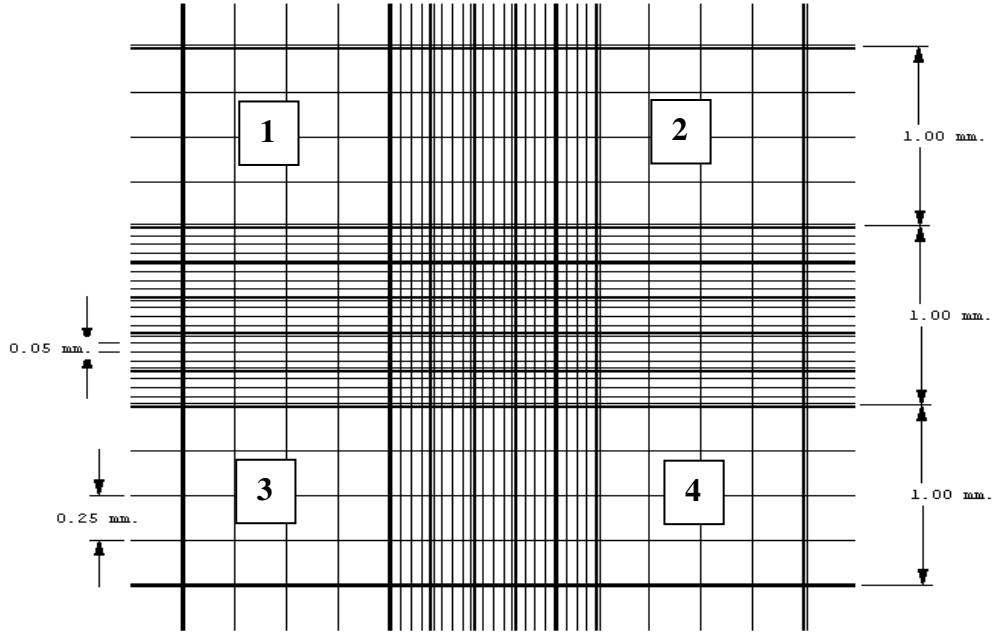
- 6) Inverted mikroskopta incelenen hücreler 37°C’de ve uygun atmosferdeki CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

3.6.2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması

1. Flaskların içindeki eski ortam atıldı ve flaska tutunan hücrelerin yüzeyi hem FBS’yi hem de ölü hücreleri uzaklaştırmak amacıyla 1X PBS ile yıkandı.
2. Flaska 1-2 ml Tripsin/EDTA konuldu ve hücreler kalkıncaya kadar (yaklaşık 1-5 dakika), 37°C’deki inkübatörde inkübe edildi.
3. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskop altında izlendikten sonra Tripsin/EDTA’yı inhibe etmek amacıyla, 1:1 oranında kültür ortamı eklendi ve hücreler steril bir falkon tüpe aktarıldı. Flaskın yüzeyi 1X PBS ile yıkanarak kalkan hücreler aynı falkonda toplandı.
4. Hücreler salınlımlı santrifüjde oda sıcaklığında 1300 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.
5. Süpernatant atıldı ve hücre pelleti uygun kültür ortamı ile süspanse edildi.
6. Hücre sayımı yapıldıktan ve hücre canlılığı kontrol edildikten sonra hücre süspansiyonu uygun kültür kabına ekildi.
7. Inverted mikroskopta incelenen hücreler 37°C’de ve uygun atmosferdeki CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

3.6.2.1.4 Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü

1. Bölüm 3.6.2.1.3’de "Hücrelerin Pasajlanması" protokolünde belirtildiği şekilde hücreler kaldırılarak, hücre süspansiyonu elde edildi.
2. Elde edilen hücre süspansiyonundan 50 µL alındı ve 1:1 oranında % 0,4 tripan mavisi ile bir tüp içinde karıştırıldı. Uygun miktarda steril 1X PBS ile seyreltme yapıldı.
3. Hazırlanan hücre/boya karışımından 10 µL Neubauer lamına (Şekil 12) aldı. Lamın sayım alanının köşelerinde bulunan dört büyük karede (1 mm²’lik bölümler) bulunan canlı (tripan negatif - renksiz) ve ölü (tripan pozitif - mavi renk) hücreler inverted mikroskopta sayıldı ve hücre sayımlarının ortalaması alındı.



Şekil 12. Neubauer lamı sayım alanı

4. Hücre süspansiyonunun mililitresindeki canlı ya da ölü hücre sayısını (hücre sayısı/ml) ve % hücre canlılığını belirlemek için aşağıdaki hesaplamadan yararlanıldı:

Hücre sayısı (hücre sayısı / ml): Ortalama hücre sayısı x seyreltme faktörü x 10^4

% Hücre canlılığı: (canlı hücre sayısı) / (ölü+canlı hücre sayısı) x 100

3.6.2.1.5 Hücrelerin Dondurulması

1. Flaskların içindeki eski ortam atıldı ve flaska tutunan hücrelerin yüzeyi hem FBS'yi hem de ölü hücreleri uzaklaştırmak amacıyla 1X PBS ile yıkandı.
2. Flaska yeterli miktarda Trypsin/EDTA konuldu ve hücreler kalkıncaya kadar (yaklaşık 1-5 dakika), 37°C'deki inkübatörde inkübe edildi.
3. Hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında izlendikten sonra Trypsin/EDTA'yı inhibe etmek amacıyla, 1:1 oranında uygun kültür ortamı eklendi ve hücreler steril bir falkon tüpe aktarıldı. Flaskın yüzeyi 1X PBS ile yıkanarak kalkan hücreler aynı falkonda toplandı.
4. Hücreler salınlı santrifüjde oda sıcaklığında 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.

5. Bu süre içerisinde dondurma ortamı hazırlandı: Uygun kültür ortamı içerisinde % 10 dimetilsülfoksit (DMSO), % 20 inaktif fetal FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL penisilin - 100 µg/mL streptomisin konuldu.
6. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti hazırlanan dondurma ortamında süspanse edildi.
7. Kriyo tüplere 2 mL hücre süspansiyonundan konuldu ve bu tüpler kriyo kutuya konularak -80°C'de saklandı.
8. Dondurulan hücreler, daha sonra ihtiyaç duyulan saklama zamanına göre -80°C'ye veya -186°C'ye (sıvı nitrojen) kaldırıldı.

3.6.2.1.6 Katlanma Zamanı Tayini

1. Kolon kanser hücrelerinin ikiye katlanma zamanlarını belirlemek amacıyla, 6 kuyucuklu plağın her bir kuyusuna SW480 hücre hattından 2×10^5 ; HT-29, HCT-116, SW620 ve LoVo hücre hatlarından 4×10^5 hücre ekildi.
2. Daha sonra plaklar 37°C'de ve uygun atmosferdeki CO₂ inkübatöründe 24 - 48 - 72 saat inkübe edildi.
3. Ekim yapıldıktan sonra 24 - 48 - 72. saatlerde bölüm 3.6.2.1.4'te belirtilen "Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü" protokolünde belirtildiği şekilde hücre sayımları yapıldı. Her sayım üç kere tekrar edildi.
4. Katlanma zamanı "www.doubling-time.com/compute.php" internet sitesinden ve "**Katlanma Zamanı = $T \ln 2 / \ln(X_e/X_b)$** " formülünden faydalanılarak hesaplandı (155). Buna göre;

T = İnkübasyon zamanı

X_b = İnkübasyona başlangıç zamanındaki hücre sayısı

X_e = İnkübasyonun sonlandığı zamandaki hücre sayısı

3.6.2.2 Hücre Canlılık Testi (WST-1)

Transfeksiyon reaktifinin SW480, SW620 ve LoVo hücre canlılığına olan etkisi WST-1 (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) reaktifi kullanılarak incelendi. Yöntemin prensibi; canlı hücrelerde, tetrazolyum tuzu olan WST-1'in mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından suda çözünebilir formazan kristalleri oluşturmaya

dayanır. Çözünen kristallerinin oluşturduğu sarı-turuncu renk 450 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür (156).

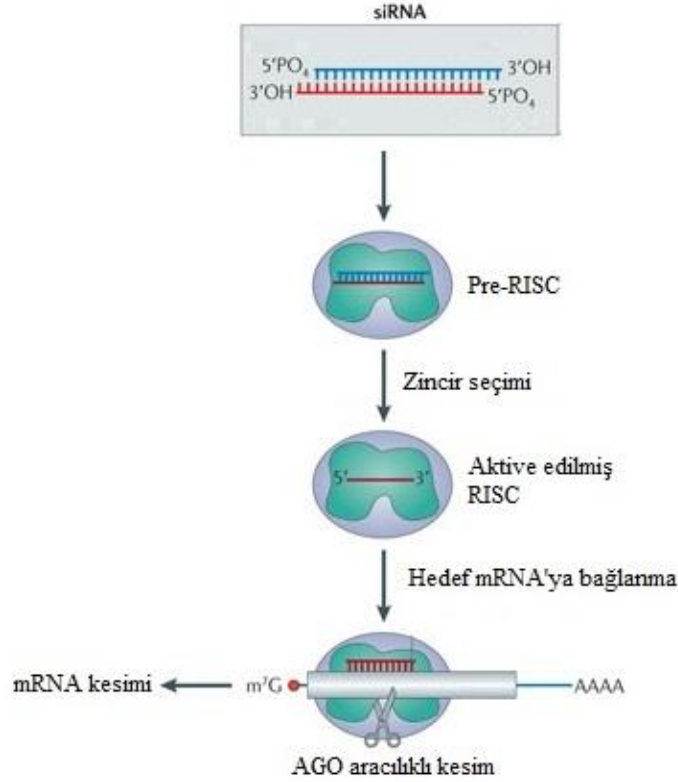
1. 96 kuyulu plağın kuyularına 100 µL kültür ortamı içerisinde $0,5 \times 10^4$ - 1×10^4 - 2×10^4 hücre olacak şekilde 3 farklı yoğunlukta hücre ekildi.
2. Hücrelerin plağın yüzeyine tutunmaları için 37°C’de ve uygun atmosferdeki CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübe edildi.
3. Süre sonunda ortamlar uzaklaştırıldı ve
 - Kontrol grubuna 100 µL taze antibiyotiksiz ortam,
 - Deney grubuna 5nM GAPDH siRNA ve 0,1 µL - 0,2 µL - 0,3 µL Transfeksiyon Reaktifi içeren 100 µL taze antibiyotiksiz ortam,
 - Kör olarak, hücre ekilmemiş kuyulara antibiyotiksiz taze ortam konuldu.
4. 37°C’de ve uygun atmosferdeki CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübe ettikten sonra; ışıksız ortamda her kuyuya 10 µL WST-1 reaktifi eklendi ve WST-1’in iyice karışması için 5-10 saniye plak karıştırıldı ve 37°C’de inkübe edildi.
5. WST-1 reaktifinin konulmasından 0,5 - 1 - 2 - 3. saatlerde plak okuyucuda 450 nm dalga boyunda (Referans dalga boyu: 632 nm) absorbansları kaydedildi ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak % canlılık belirlendi.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Ort Örnek Abs} - \text{Kör Abs} / (\text{Ort Kontrol Abs} - \text{Ort Kör Abs})) \times 100$$

3.6.2.3 *RhoC siRNA Transfeksiyonu*

Yöntemin prensibi 20-25 nükleotidlik çift zincirli "small interfering RNA (siRNA)" dizilerinin hücreye dışarıdan verilmesiyle hedef mRNA’nın yıkılımı ve hedef genlerin susturulmasıdır. Sentetik olarak üretilen siRNA, susturulacak hedef mRNA’nın, proteini kodlayan nükleotid sekansına komplementer olacak şekilde dizayn edilir. siRNA’nın memeli hücrelerine verilmesinde çeşitli teknikler kullanılmaktadır: 1) siRNA’nın mikroenjeksiyonu, 2) Katyonik lipidler ile transfeksiyonu, 3) siRNA’nın elektroporasyonu, 4) siRNA ekspresyonu içeren plazmidlerin transfeksiyonu, 5) siRNA eksprese eden rekombinant virüsler tarafından hücrelerin enfeksiyonu. Hücre içerisine transfekte edilen sentetik çift zincirli siRNA, öncül RNA-uyarımlı susturma kompleks (pre-RISC)’ye bağlanır ve pre-RISC içerisindeki Argonaute (AGO) proteini aracılığı ile çift zincirin birbirinden ayrılması sağlanır.

Ayrılan zincirlerden biri uzaklaştırılırken diğer zinciri taşıyan olgun RISC post translasyonel gen susturumu için hedef mRNA'nın degradasyonunu tetikler (Şekil 13) (157, 158)



Şekil 13. Sentetik olarak üretilen siRNA'nın hücre içindeki metabolik yolu.

1. Real Time PCR, Migrasyon ve İnvazyon çalışmaları için 6 kuyucuklu plağın her bir kuyusuna 5×10^6 ; Western blot ve Zimografi çalışmaları için 25 cm^2 'lik flasklara 1×10^6 HT-29, HCT116, SW480, SW620 ve LoVo kolon kanser hücresi ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Üç farklı grup oluşturuldu:
 - ✓ RhoC siRNA verilen deney gurubu (**R grubu**),
 - ✓ Non-target siRNA verilen negatif kontrol deney grubu (**N grubu**),
 - ✓ Kontrol grubu (**K grubu**).
2. HT-29 için 5×10^3 hücreye 0,2 μl ; HCT-116 için 5×10^3 hücreye 0,1 μl ; SW480, SW620 ve LoVo için 1×10^4 hücreye 0,1 μl olacak şekilde transfeksiyon reaktifi antibiyotiksiz ve serumsuz ortamda hazırlandı.
3. Ayrı bir tüpte 5nM RhoC ve Non-target siRNA antibiyotiksiz ve serumsuz ortamda hazırlandı.

4. Her iki çözelti pipetaj yapılarak karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
5. Daha sonra transfeksiyon reaktifi ile siRNA çözeltileri 1:1 oranında iyice karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Hücrelerin bulunduğu antibiyotikli ortam uzaklaştırıldı ve flasklar iki kere 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra her flaska antibiyotiksiz ortam konuldu.
7. Deney gruplarına hazırlanan konsantrasyonlarda RhoC siRNA ve Non-target siRNA verildi. Kontrol grubuna sadece antibiyotiksiz ortam verildi.
8. Ardından hücreler 37°C’de ve uygun atmosferdeki CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübe edildi.
9. **24 saat sonra:** Hücrelerin bulunduğu antibiyotiksiz ortam uzaklaştırıldı ve flasklar iki kere 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra her kuyuya taze ortam (%10 inaktif FBS, %1 L-glutamin ve % 1 penisilin/streptomisin içeren) konuldu.
10. **48 saat sonra:** Real Time PCR çalışmaları yapılacak hücreler tripsinle kaldırılarak, total RNA izolasyonunda kullanıldı. Migrasyon ve İnvazyon amaçlı kullanılacak hücreler ise tripsinle kaldırıldıktan sonra invazyon/migrasyon kuyularına ekildi. Western blot ve Zimografi çalışmalarında kullanılacak hücrelerde ise, serumlu ortam uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile yıkandıktan sonra hücrelere uygun serumsuz ortam (%1 Penisilin/Streptomisin, %1 L-glutamin içeren) konuldu. Flasklar 37°C’de ve uygun atmosferdeki CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübe edildi.
11. **72 saat sonra:** Ekstrasellüler alana salınan proteinleri içeren ortam bir tüpe alındı ve 2500rpm’de santrifüj edilerek ortamda bulunan ölü hücrelerin çöktürülerek uzaklaştırılması sağlandı. Süpernatant ayrı bir tüpe alınarak -80°C’de zimografi çalışmalarında kullanılmak üzere saklandı. İntrasellüler protein ekspresyon düzeylerini incelemek amacıyla flaskta bulunan hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra protein izolasyonunda kullanıldı.

3.6.2.4 Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Real Time PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR), DNA içerisinde yer alan, nükleotid dizisi bilinen özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen moleküler biyolojik bir yöntemdir. Kary Mullis tarafından 1983 yılında geliştirilen bu teknik, günümüzde DNA-temelli filogeni, genlerin klonlanması, katısal

hastalıkların tanısı, genlerin fonksiyonel analizleri, genetik parmak izlerinin tanımlanması, DNA klonlanması için sekanslama, enfektöz hastalıkların tanısı gibi pek çok amaç için sıklıkla kullanılmaktadır. Gen ekspresyonu analizlerinde, örneklerden öncelikle total RNA veya mRNA izolasyonu, daha sonra reverse transkriptaz tarafından komplementer DNA (cDNA) sentezi ve son olarak PCR işleminin uygulanması gereklidir (159, 160).

3.6.2.4.1 Total RNA İzolasyonu

Hücrelerden total RNA izole etmek amacıyla, DNaz ile muamele ederek genomik DNA kontaminasyonunu engelleyen kolon sistemine dayalı "Roche High Pure Total RNA Isolation" kiti kullanıldı.

1. 1×10^6 hücreye karşılık gelen hücre süspansiyonu 1,5 mL'lik DNaz/RNaz içermeyen tüplere aktarıldı.
2. Tüpler oda sıcaklığında 2500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
3. Santrifüj sonunda üst faz atıldı, pelletler 200 μ L 1X PBS ile süspanse edildi.
4. Süspansiyon içersine 400 μ L lizis/bağlanma tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 15 saniye vortekslendi.
5. Kitte bulunan filtreli tüpler, toplama tüplerinin içine yerleştirildi ve elde edilen hücre lizatı filtreli tüpe aktarıldı.
6. Tüpler oda sıcaklığında 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi.
7. Santrifüj sonunda toplama tüpündeki sıvı atılarak, filtreli tüp tekrar kendi toplama tüpüne yerleştirildi.
8. Steril bir tüpte örnek başına 90 μ L DNaz inkübasyon tamponu ile 10 μ L DNaz I olacak şekilde karıştırıldı.
9. Hazırlanan DNaz I çözeltisi örnek başına 100 μ L olacak şekilde filtreli tüpe konuldu ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
10. Inkübasyonun ardından, filtreli tüplere 500 μ L yıkama tamponu I eklendi ve tüpler oda sıcaklığında 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi.
11. Santrifüj sonunda toplama tüpündeki sıvı atılarak, filtreli tüp tekrar kendi toplama tüpüne yerleştirildi.
12. Filtreli tüplere 500 μ L yıkama tamponu II konuldu ve tüpler oda sıcaklığında 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi.
13. Santrifüj sonunda toplama tüpündeki sıvı atılarak, filtreli tüp tekrar kendi toplama tüpüne yerleştirildi.

14. Filtreli tüplere 200 µL yıkama tamponu II konuldu ve tüpler oda sıcaklığında 13000 g'de 2 dakika santrifüjlendi.
15. Toplama tüpleri atılarak, filtreli tüpler 1,5 mL'lik DNaz - RNaz içermeyen tüplere yerleştirildi.
16. Filtreli tüplerin içersine 50 µL elüsyon tamponu eklendi.
17. Tüpler oda sıcaklığında 8000 g'de 1 dakika santrifüjlendi.
18. Filtreli tüpler atıldı ve elde edilen RNA örneklerinin 260nm ve 280nm'de absorbanları alındı. RNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

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

$$\text{RNA saflığı} = A_{260nm}/A_{280nm} \text{ (Bu oran 1,8 – 2,0 arasında olmalı)}$$

19. Konsantrasyonları belirlenen örnekler daha sonraki denemeler için -80°C'ye kaldırıldı.

3.6.2.4.1.1 RNA'nın % 1,2 Formaldehit Agaroz Jelde Görüntülenmesi

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla, RNA örnekleri % 1,2'lik formaldehit agaroz jelde görüntülendi. 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 (155).

A. RNA % 1,2 Formaldehit Agaroz Jel Hazırlama

1. 50 mL agaroz jel için bir erlene; 0,6 gr agaroz 5 mL 10X Formaldehit Jel tamponu (Tablo 9) ve 45 mL DNaz/RNaz içermeyen dH₂O konuldu.
2. Karışım eriyene kadar mikrodalga fırında kaynatıldı.
3. Yaklaşık 65°C'ye kadar soğutuldu ve üzerinde 900 µL % 37 Formaldehit eklendi.
4. Hazırlanan çözelti horizontal elektroforez sistemine döküldü ve tarakları yerleştirildi.
5. Jelin polimerleşmesi için yaklaşık 30 dakika beklendi.

B. İzole Edilen RNA Örneklerinin Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

1. 5X RNA örnek yükleme tamponu (Tablo 9) ve 1 µg total RNA örnekleri DNaz/RNaz içermeyen tüplerde hazırlandı. Örnekler 65°C’de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edildi ve süre sonunda hızla buz içerisine alındı.
2. Hazırlanan % 1,2’lik formaldehit agaroz jel, elektroforez sistemine yerleştirildi ve üzerine 1X FA yürütme tamponu (Tablo 9) konuldu.
3. Taraklar çıkarıldıktan sonra örnekler kuyulara yüklendi.
4. Sabit 80 Volt’da 30-45 dakika elektroforez uygulandı ve jeller UVP jel dokümantasyon cihazında görüntülendi.

Tablo 9. % 1,2’lik Formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler

<i>Çözeltiler</i>	<i>Özellikleri</i>
10X Formaldehit Jel Tamponu	10 mM EDTA, pH 7,0 200 mM MOPS 50 mM Sodyum Asetat
5X RNA Örnek Yükleme Tamponu	80 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 720 µl % 37 Formaldehit 2ml % 100 Gliserol 3084 µl Formamid 4ml 10X FA Jel Tamponu Brom fenol mavisi 40 µg/mL Etidyum Bromür
1X Formaldehit Jel Yürütme Tamponu	50 mL 10X Formaldehit Jel Tamponu 10 mL % 37 Formaldehit 440 mL RNaz free dH ₂ O

4.6.2.4.2 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 deoksinnükleosid trifosfat (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 (155)

1. İlk olarak RNA örneklerinden 1 µg olacak şekilde alındı ve DNaz/RNaz içermeyen dH₂O ile son hacim 11 µL'ye tamamlandı.
2. Her tüpe 2 µL random hegzamer primer konuldu ve tüpler 5 saniye spin edildi.
3. RNA sekonder yapılarının denatürasyonu amacıyla tüpler, "Thermal Block Cycler PCR" cihazında 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. Inkübasyon sırasında örnek sayısına göre "RT mix" hazırlandı (Tablo 10).

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

3.6.2.4.3 Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Real Time PCR, çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresan sinyal veren boyalar (örn, SYBR Green) ya da özel probler kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı ile oluşan floresan sinyalin kantitasyonunu yapan bir PCR tekniğidir. Bu teknik; tekrarlanan üç termal döngü temeline dayanmaktadır: **1) Denatürasyon:** Kalıp DNA 90-95°C'de denatüre edilerek çift sarmal yapıdaki DNA zincirlerinin fiziksel olarak birbirinden ayrılması sağlanır. Elde edilen iki DNA zinciri, Taq polimeraz (DNA polimeraz) için kalıp görevi görür. **2) Primer bağlanması (annealing):** Bu basamakta sıcaklık 55-60°C dereceye düşürülerek hedef bölgeye komplementer olan primerlerin DNA zincirlerine bağlanması sağlanır. **3) Zincir uzaması (extension):** Bu basamak, Taq polimerazın aktivitesinin en yüksek olduğu 70-75°C arasında gerçekleştirilir ve aktifleşen Taq polimeraz seçici olarak hedef bölgeyi çoğaltır. Bu

üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur ve yaklaşık 25-40 döngü sonrası hedef bölgenin milyarlarca kopyası (amplikon) elde edilir (155).

Real-Time PCR diziye özgün olmayan floresan boyalar ya da diziye özgün probalar kullanılarak hedef genin hem kalitatif hem de kantitatif analizini sağlayan ve eş zamanlı olarak PCR reaksiyonunu görüntüleyen/kaydeden bir tekniktir. Real Time PCR yönteminin, konvensiyonel PCR yönteminden en önemli avantajları; reaksiyon sırasında veri takibinin yapılabilmesi, duyarlılığının yüksek olması, kantitasyon yapılabilmesi ve PCR sonrası elektroforez işlemini gerektirmemesidir (161).

1. GAPDH housekeeping gen olarak kullanıldı.
2. Örnek sayısına göre Master mix hazırlandı (Tablo 11).

Tablo 11. Master mix hazırlama

<i>Reaktifler</i>	<i>Tek örnek için miktar</i>
PCR grade dH ₂ O	2 µL
Primer Probe	1 µL
Master mix	5 µL

3. 96-kuyucuklu plak kullanıldı ve her kuyuya 8 µL Master mix ve 2 µL cDNA örnekleri konuldu. Negatif kontrol için PCR grade su kullanıldı. Çözeltilerin kuyuların dibinde toplanması ve iyice karışması için plak spin edildi.
4. Plak, Light Cyler 480 PCR cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki Real Time PCR işlemi başlatıldı:
 - a) 95°C’de 10 dakika, 1 döngü denatürasyon basamağı
 - b) 95°C’de 10 saniye,
 - c) 60°C’de 30 saniye,
 - d) 72°C’de 10 saniye, 40 döngü amplifikasyon basamağı
5. Roche Lightcycler 480 (V 1.5.0) yazılımı kullanılarak her bir örneğe ait hedef gen gen ekspresyonu, eşlenik housekeeping (GAPDH) gen ekspresyonuna oranlanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile "Rölatif Kantitasyon" yapıldı. Hesaplama aşağıdaki eşitlikten yola çıkılarak yapıldı.

$\Delta Ct_{\text{kontrol}} = \text{kontrolle ait hedef genin Ct değeri} - \text{kontrolle ait referans genin Ct değeri}$

$\Delta Ct_{\text{örnek}} = \text{örneğe ait hedef genin Ct değeri} - \text{örneğe ait referans genin Ct değeri}$

Normalize edilmiş hedef gen ekspresyonu: $2^{-(\Delta Ct_{\text{örnek}} - \Delta Ct_{\text{kontrol}})} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

3.6.2.5 Western Blot

Moleküler çalışmalarda sıklıkla kullanılan Western blot tekniği, bir protein lizatında ilgilenilen proteinin varlığının tayininde ve ekspresyon düzeyinin semi-kantitatif olarak belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir.

Bu yöntemde öncelikle indirgeyici koşullarda SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (PAGE) ile proteinlerin moleköl ağırlıklarına göre ayrımı sağlanır. Elektroföresin ardından jelde ayrımlanan proteinler, elektrobtlama yöntemiyle nitroselölöz veya PVDF gibi bir membrana transfer edilir. Transfer sonrası membran ilk olarak spesifik bir primer antikor ile inkübe edilir. Bu süreçte primer antikor membranda bulunan hedef proteine seçici olarak bağlanır. Daha sonra membran primer antikora bağlanan bir sekonder antikor ile inkübe edilerek ilgilenilen proteinin deteksiyonu sağlanır. Bunun için kullanılan sekonder antikora genellikle biyotin, alkalen fosfataz veya yabanturbu (horseradish-HRP) peroksidazı gibi bir enzim bağlıdır. Protein bantlarının deteksiyonunda yaygın olarak yabanturbu peroksidaz bağlı sekonder antikor kullanılmaktadır. Bu enzim hidrojen peroksit varlığında substratı olan luminöl oksitlemesine ve luminölün uyarılmış durumdan bazal duruma geçerken yaydığı kemilüminesan ışımının röntgen filmini yakması veya CCD kamera tarafından algılanmasıyla detekte edilir (155).

3.6.2.5.1 Hücre Lizizi

Hücrelerin membran ve intrasellöler proteinlerini elde etmek amacıyla hücreler RIPA tamponu ile lize edildi.

1. Yaklaşık 3×10^6 hücreye karşılık gelen hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 2500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
2. Santrifüj sonunda üst faz atıldı, pelletler 40 μ L Liziz Tamponunda (Tablo 12) pipetaj yapılarak lize edildi.
3. Daha sonra tüpler vortekslendi ve 5 dakika buz içerisinde bekletildi. Toplam 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir bu işlem tekrar edildi.
4. Liziz sonunda tüpler 10.000 g'de 10 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi.
5. Süpernatantlar yeni bir tüpe alındı ve analiz süresine kadar -80°C 'de saklandı.

Tablo 12. Hücre lizisinde kullanılan çözeltiler

<i>Çözeltiler</i>	<i>Özellikleri</i>
RIPA Liziz Tamponu	20 mM Tris-HCl pH 7,5
	150mM NaCl
	% 0,1 SDS
	% 1 NP-40
	50mM NaF
	50µg/mL PMSF
	1µg/mL Leupeptin
	1µg/mL Pepstatin

3.6.2.5.2 Protein Tayini

Elde edilen hücre lizatında bulunan total protein konsantrasyonu Biçinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile saptandı. Yöntemin prensibi, alkali koşullarda protein tarafından Cu^{+2} iyonunun Cu^{+1} iyonuna indirgenmesine ve BCA reaktifi tarafından renk değişimine dayanmaktadır (162)

1. Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA) ve kör olarak dH_2O kullanıldı.
2. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/ml) BSA standartları hazırlandı.
3. İçerisinde biçinkoninik asit bulunan A Reaktifi ve % 4 bakır sülfat içeren B Reaktifi 50:1 oranında karıştırılarak "Çalışma Reaktifi" hazırlandı.
4. 96 kuyucuklu bir mikroploğun kuyularına 25 µl standart ve örnekler konuldu.
5. Daha sonra her kuyucuğa 200 µl "Çalışma Reaktifi" eklendi ve pipetajla karıştırıldı.
6. Plüğün kapağı kapatıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
7. Süre sonunda mikroploak 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.

3.6.2.5.3 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Proteinler farklı yapı, yük ve molekül ağırlığına sahiplerdir. Bu nedenle proteinler SDS ile muamele edilerek hem proteinlerin negatif yükle yüklenmeleri hem de denatüre olarak primer yapıda kalmaları sağlanır. Akrilamid monomerlerinin polimerizasyonu ile oluşan poliakrilamid jel kullanılarak ise, elektriksel alanda farkı büyüklükteki proteinlerin farklı hızlarda göç etmeleri ve böylelikle birbirlerinden ayrılmaları sağlanır.

A. SDS-Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması

1. Öncelikle jel hazırlama düzeneği kullanılarak aralarında 0,75 mm boşluk bulunacak şekilde camlar sisteme yerleştirildi.
2. Öncelikle %10'luk ayırıcı jel çözeltisi hazırlanarak iki cam arasında döküldü (Tablo 13). Jellerin hava ile temasını engellemek amacıyla üzerine az miktarda izopropanol eklendi.
3. Yaklaşık 20 dakika jelin polimerleşmesi için beklendi.
4. Ayırıcı jel polimerleştikten sonra izopropanol döküldü ve jelin üzeri dH₂O ile yıkandı.
5. Ardından %5'lik paketleyici jel hazırlandı (Tablo 13) ve ayırıcı jelin 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 15 dakika paketleyici jelin polimerleşmesi için beklendi.

Tablo 13. SDS-Poliakrilamid jellerin hazırlanması

<i>Kullanılan Reaktifler</i>	<i>%10'luk Ayırıcı Jel</i>	<i>%5'lik Paketleyici Jel</i>
%30 Akrilamid/bis akrilamid karışımı	3,3 mL	0,67 mL
dH ₂ O	4,0 mL	2,1 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL	-
1,0 M Tris-HCl pH 6,8	-	380 µL
% 10 SDS	100 µL	40 µL
% 10 APS	100 µL	40 µL
TEMED	4 µL	4 µL

B. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1. Hazırlanan jel dikey elektroforez sistemine yerleştirildi ve içerisine 1X Yürütme Tamponu (Tablo 14) konuldu.
2. 0,5 mL'lik tüplerde 100 µg total protein olacak şekilde hücre lizatı ve 1:1 oranında 2X Örnek Yükleme Tamponu (Tablo 14) karıştırıldı.
3. Tüpler daha sonra termal bloğa yerleştirildi ve proteinlerin denatürasyonu için 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüpler hızla buz içerisinde yerleştirildi.
4. Tarak dikkatlice jelden çıkarıldı ve hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklendi.
5. Proteinlerin düzgün paketlenmesini sağlamak amacıyla öncelikle sabit 70V'da 30 dakika daha sonra 110V'da yaklaşık 90 dakika +4°C'de elektroforez işlemi uygulandı.

3.6.2.5.4 Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

Yöntem jel yüzeyine dik bir elektrik akımı uygulanarak eksi yüklü proteinlerin jelden çıkarak hemen üstünde bulunan membrana adsorbe olmalarını sağlayan elektroforetik transfer ilkesine dayanmaktadır.

1. Elektroforez sonrası sistemden çıkarılan jel, eşitlenmesi için 1X Transfer Tamponu (Tablo 14) içeren bir kap içerisine alındı.
2. Daha sonra PVDF membran, jel boyutu ile aynı olacak şekilde kesildi ve aktive edilmesi için %100 metanol içerisinde 1-2 dakika inkübe edildi. Süre sonunda membran, eşitlenmesi için 1X Transfer Tamponu içerisine alındı.
3. Aynı şekilde 2 adet kalın Whatmann kağıdı eşitlenmesi için, 1X Transfer Tamponu içeren ayrı bir kaba alındı.
4. Islak transfer sisteminde bulunan kaset içersine sırasıyla üst üste olacak şekilde 1 adet whatmann kağıdı, membran, jel ve tekrar 1 adet whatmann kağıdı yerleştirildi ve kaset sıkıca kapatıldı.
5. Islak transfer kasetleri ve buz bloğu transfer tankına yerleştirildi ve tank 1X Transfer Tamponu ile dolduruldu.
6. Tankın içerisine manyetik bar konuldu ve manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırılması sağlanarak sabit 130mA'de 18 saat +4°C'de transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.6.2.5.5 Bloklama, Antikor Bağlaması ve Kemilüminesan Görüntüleme

1. Spesifik olmayan bantların oluşumunu engellemek amacıyla transfer sonrası membran uygun bloklama çözeltisinde inkübe edildi. Bunun için membran 50mL'lik bir falkon tüpe alındı ve tüpe 5 mL bloklama çözeltisi olan %5 yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T (Tablo 14) konuldu. Daha sonra falkon tüp Lab Roller cihazında 5 rpm'de oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı.
2. Bu süre içerisinde kullanılacak antikor hazırlandı. Çalışma süresinde kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon oranları şu şekildedir: MMP-2 ve MMP-9 primer antikorlar 1:200; MMP-7 ve MMP-14 primer antikor 1:500; TIMP-2 ve RhoC antikorlar 1:1000; GAPDH 1:3000 oranında %5'lik yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T ile dilüe edildi.
3. Süre sonunda bloklama çözeltisi atıldı ve yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan ve çalışılacak olan primer antikor konuldu.
4. Tüp daha sonra Lab Roller cihazında 5 rpm ve +4°C'de karıştırılarak 18 saat inkübasyona bırakıldı.
5. Primer antikor ile muamelenin ardından, ortamdaki bağlanmamış antikor uzaklaştırmak amacıyla membran, oda sıcaklığında sırasıyla 1 kere 15 dakika, 3 kere 5 dakika süreyle 1X TBS-T ile yıkandı.
6. Bu sırada sekonder antikorlar hazırlandı: MMP-2 ve MMP-9 için 1:500, MMP-7 ve MMP-14 için 1:1000; TIMP-2 ve RhoC için 1:3000; GAPDH için 1:5000 oranında sekonder antikor % 1 yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T ile dilüe edildi.
7. Yıkamaların ardından membranlar ise hazırlanan sekonder antikorlarla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Daha sonra ortamdaki bağlanmamış antikor uzaklaştırmak amacıyla membran, oda sıcaklığında sırasıyla 1 kere 15 dakika, 3 kere 5 dakika süreyle 1X TBS-T ile yıkandı.
9. Yıkamalar sonrası membran KODAK 4000MM görüntüleme cihazı içersine yerleştirildi ve üzerlerine 1'er mL ECL çözeltisi eklenerek görüntüleri alındı.

Tablo 14. Kullanılan çözeltiler ve özellikleri

<i>Çözeltiler</i>	<i>Özellikleri</i>
1X Yürütme Tamponu	20 mM Tris-baz 0,2 M Glisin % 0,1 SDS 192 mM Glisin
2X Örnek Yükleme Tamponu	125mM Tris baz (pH 6,8) %4 SDS %10 β -Merkaptoetanol %20 Gliserol %0,004 Bromfenol mavisi
1X Transfer Tamponu	25 mM Trisbaz %20 Metanol
1X TBS-T	10 mM Tris-HCl 140 mM NaCl %1 Tween-20

3.6.2.6 Jelatin Zimografi

Zimografi, proteazların (özellikle MMP'lerin) aktif ve zimojen formlarını tayin etmede kullanılan basit ve duyarlı bir yöntemdir. Bu yöntemde öncelikle indirgeyici olmayan ve ısıyla denatüre edilmeyen koşullarda SDS-PAGE ile proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrımı sağlanır. Ayrımında kullanılan poliakrilamid jel, akrilamid ile kopolimerize olmuş spesifik bir substrat (örneğin, jelatin veya kazein) içerir. Elektroforez sırasında SDS, MMP'leri denatüre ederek inaktif formda olmalarını sağlar. Elektroforez sonrası, jeller Triton X-100 ile yıkanarak jellerden SDS'in uzaklaştırılması ve enzimlerin aktivitelerini geri kazanmaları sağlanır. Bu süreç içerisinde latent MMP'ler pro domianlerini kaybetmeden otokatalitik olarak aktive olurlar. Daha sonra poliakrilamid jel, aktivasyon tamponunda ve uygun sıcaklık ve sürede 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).

3.6.2.6.1 Ortamların Konsantre Edilmesi

1. Salınan proteinleri incelemek amacıyla alınan ortamlar 3 kDa ve yukarısını konsantre eden konsantratör tüplere konuldu.
2. Tüpler sabit açılı santrifüjde 7500g ve +4°C'de 30 dakika santrifüj edildi.

3. Santrifüj sonrası konsantre edilen örnekler yeni tüplere aktarıldı ve -80°C’de saklandı.

3.6.2.6.2 Protein Tayini

Jelatin Zimografi analizlerinde kullanılmak üzere konsantre edilen ortamlardaki total protein miktarı, bölüm 3.6.2.5.2’de açıklandığı gibi BCA yönteminden yararlanılarak belirlendi.

3.6.2.6.3 Jelatin Zimogram Jel Hazırlama

Bölüm 3.6.2.5.3 Bölüm A’da açıklandığı gibi SDS-Poliakrilamid Jel hazırlama yönteminden yararlanılarak 1mg/mL jelatin substrat içeren SDS-Poliakrilamid jeli hazırlandı. Jel içerikleri Tablo 15’de gösterilmiştir.

Tablo 15. Jelatin zimografide poliakrilamid jellerin hazırlanması

<i>Kullanılan Reaktifler</i>	<i>% 10’luk Ayırıcı Jel</i>	<i>% 5’lik Paketleyici Jel</i>
% 30 Akrilamid/bis akrilamid karışımı	1,7 mL	500 ul
dH ₂ O	1,4 mL	2,1 mL
10 mg/mL Jelatin	500 µL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,3 mL	-
1,0 M Tris-HCl pH 6,8	-	380 µL
% 10 SDS	50 µL	30 µL
% 10 APS	50 µL	30 µL
TEMED	2 µL	4 µL

3.6.2.6.4 Jelatin Zimografi

1. Hazırlanan jeller elektroforez sistemine yerleştirildi ve içerisine 1X Yürütme Tamponu (Tablo 16) eklendi.
2. Her kuyucukta 30 µg protein olacak şekilde konsantre ortam ve 2X Tris-Gly-SDS Örnek Yükleme Tamponu (Tablo 16) karıştırıldı.
3. Jellerden dikkatlice taraklar çıkarıldı ve hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklendi.
4. Proteinlerin düzgün paketlenmesini sağlamak amacıyla öncelikle sabit 70V’da 30 dakika daha sonra 110V’da yaklaşık 90 dakika +4°C’de elektroforez işlemi uygulandı.
5. Elektroforezden sonra jellerden SDS’i uzaklaştırmak amacıyla jeller yarım saat süreyle % 2,5 Triton X-100 "Renatürasyon Tamponu" (Tablo 16) ile yıkandı.

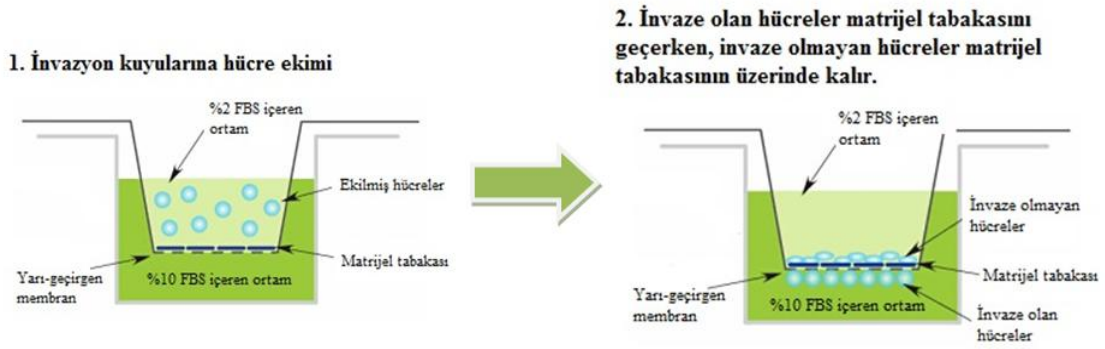
6. Daha sonra jeller, enzimlerin (pro ve aktif MMP-2) jel içindeki jelatini parçalamaları için 37°C’de 48 saat aktivasyon tamponunda inkübe edildi.
7. Jeller, Boyama Çözeltisi (Tablo 16) ile 1 saat boyunca boyama yapıldı.
8. Fazla boyadan arındırma amacıyla Yıkama Tamponu (Tablo 16) ile yıkama yapıldı.
9. UVP marka Jel Dokümantasyon Cihazı kullanılarak yıkanan jellerin görüntüleri alındı.

Tablo 16. Jelatin zimografi yönteminde kullanılan çözeltiler

<i>Çözeltiler</i>	<i>Özellikleri</i>
1X Yürütme Tamponu	20 mM Tris-baz 0,2 M Glisin % 0,1 SDS
2X Tris-Gly-SDS Örnek Yükleme Tamponu	1,0 ml 0,5 M Tris-baz (pH 6,8) 0,8 ml Gliserol 3,2 ml %10’luk SDS 0,2 ml % 0,2’lik Bromfenol mavisi 2,8 ml d H ₂ O
Renatürasyon Tamponu	% 2,5 Triton X-100
Aktivasyon Tamponu	0,5 M Tris-baz (pH 7,6) 0,1 M CaCl ₂ 0,5 M NaCl %0,5 Brij 35
Boyama Çözeltisi	%0,5 Coomassie Blue R-250 % 40 Metanol % 10 Asetik Asit
Yıkama Çözeltisi	% 40 Metanol % 10 Asetik Asit

3.6.2.7 Matrijel İnvazyon ve Hücre Migrasyonu

In vitro'da tümör hücrelerinin bazal membranlardan invaze olma kapasitelerini değerlendirebilmek amacıyla çeşitli *in vitro* sistemler geliştirilmiştir. Bunlardan bir örnek olan Matrijel ekstrasellüler matriks proteinlerinden zengin olan Engelbreth–Holm–Swarm fare sarkomasından ekstrakte edilen çözünebilir bir bazal membran preparatıdır (164). Başlıca laminin, kollajen IV, heparan sülfat proteoglikanlar, entaktin ve nidojen, tüm bazal membran komponentlerini içermektedir. Matrijel invazyonda, hücrelerin matrikse tutunup, matriksden invaze olma ve daha sonra kemoatraktana doğru migrate olma yeteneği ölçülmektedir (Şekil 14).



Şekil 14. Matrijel invazyon denemesinin prensibi

1. İnvazyon kuyularının oluşturulması için stok konsantrasyonu 9,8mg/ml olan matrigel son konsantrasyon 0,25mg/mL olacak şekilde ortam içinde hazırlandı.
2. Her invazyon kuyucuğuna 150 µl olacak şekilde matrijel eklenerek 2 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonrasında kuyular 300µl 0,1% BSA içeren ortam eklenerek bloklandı.
4. Matrigel ile kaplanmamış kuyular “Hücre Migrasyonu” deneyleri için kullanıldı.
5. İnvazyon çalışması için, %2 FBS içeren ortamda HT-29 hücrelerinden 5×10^5 ; HCT116 hücrelerinden 3×10^4 , SW480 hücrelerinden 2.5×10^4 ; SW620 hücrelerinden 4×10^5 ; LoVo hücrelerinden 2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde matrijel kaplı kuyulara ekildi.
6. Migrasyon çalışması için, %2 FBS içeren ortamda HT-29 hücrelerinden 3×10^5 ; HCT116 hücrelerinden 2×10^4 ; SW480 hücrelerinden 1×10^4 ; SW620 hücrelerinden 3×10^5 ; LoVo hücrelerinden 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde migrasyon kuyularına ekildi.
7. 24 kuyucuklu plaklara 500 µL %10 FBS içeren ortam konuldu. Hazırlanan invazyon/migrasyon kuyuları, 24 kuyucuklu plaklarda bulunan ortamların üzerine hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirildi ve uygun CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyon sonrası invazyon kuyuları Diff-Quik boyama kiti kullanılarak, hücreler öncelikle fikse edildi, daha eozin ve tiazin boya ile nükleus ve sitoplazma boyandı.
9. Kuyuların iç kısmında bulunan invaze/migrate olmayan hücreler pamuklu çubuk yardımıyla temizlendikten sonra, kuyuların alt tabanına (2% FBS’li ortamdan 10% FBS’li ortama) göç eden hücreler inverted mikroskopta sayıldı.

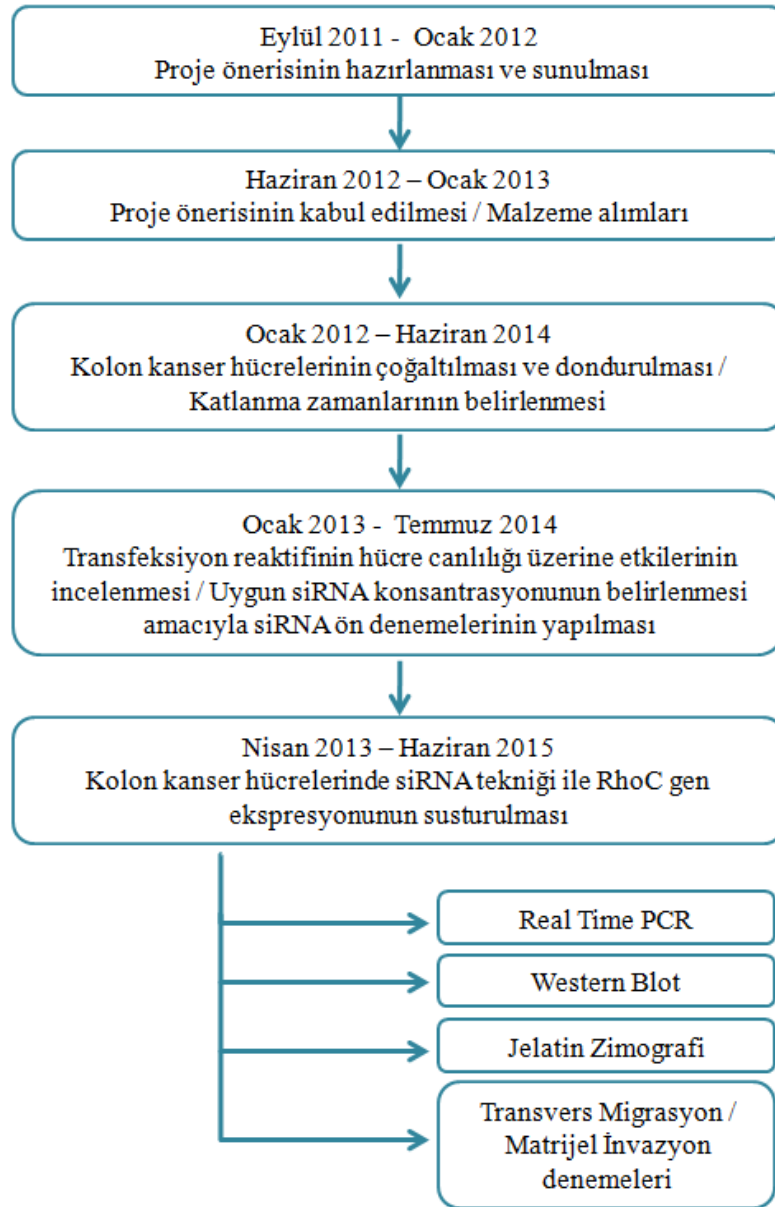
10. Yapılan hücre sayımı sonucunda % invazyon ve % migrasyon aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ İnvazyon} = (\text{Örnek invaze olan hücre sayısı} / \text{Kontrol invaze olan hücre sayısı}) \times 100$$

$$\% \text{ Migrasyon} = (\text{Örnek migrate olan hücre sayısı} / \text{Kontrol migrate olan hücre sayısı}) \times 100$$

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmanın planı ve takvimine ait akış grafiği Şekil 15'de gösterilmiştir.



Şekil 15. Deney akış şeması

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler GraphPad Prism 5.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Tüm çalışmalar en az 3 kere tekrar edildi. Gruplar arasındaki anlamlı farklılık "student's t" testi ile analiz edildi. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$ olarak ifade edildi.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızın sınırlılıklarını şu şekilde sıralayabiliriz:

1. Bazı kolon kanser hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerinin düşük olması ($Ct > 40$) nedeniyle, bu hücre hatlarında RhoC gen susturumunun MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerine olan etkisi incelenememiştir.
2. Bazı kolon kanser hücrelerinde MMP-2, MMP-9, MMP-7 ve TIMP-2 protein ekspresyonlarının deteksiyon limitinin altında olması nedeniyle Western blot çalışmalarında analiz edilememiştir.
3. Bununla birlikte kolon kanser hücrelerinde MMP-14 protein ekspresyon düzeyleri Western blot tekniği ile detekte edilememiştir.

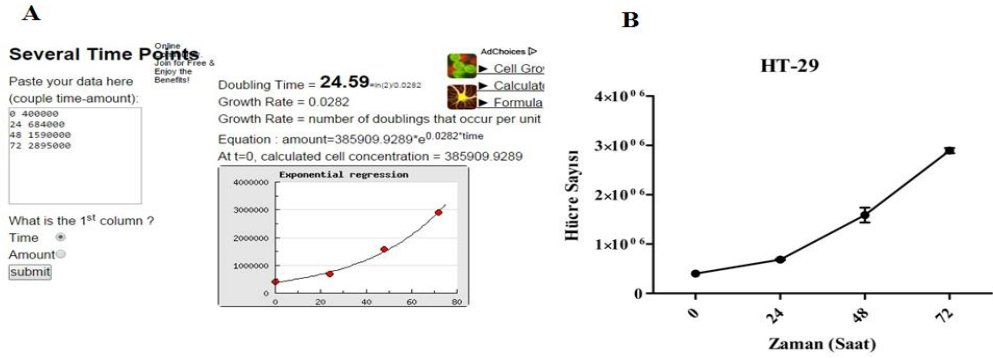
3.10 Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu, 22/03/2012 tarih ve 2012/11-02 karar numarası ile 548-GOA protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir. Daha sonra, 02.04.2015 tarihli ve 2015/10-31 karar numarası ile aynı protokol numaralı çalışmamızın proje adı değişikliği aynı etik kurul heyeti tarafından kabul edilmiştir (EK-1).

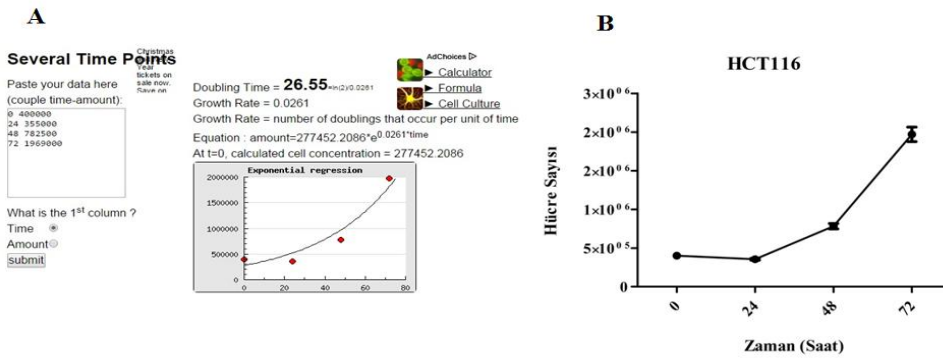
4. BULGULAR

4.1 Kolon Kanser Hücrelerinin Katlanma Zamanları

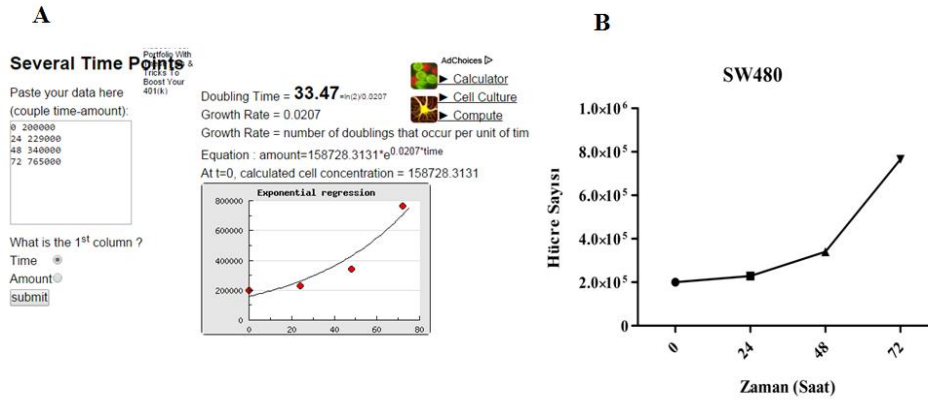
Bu çalışmada kullandığımız kolon kanser hücrelerinin ikiye katlanma zamanları HT-29 için 24,5 saat (Şekil 16); HCT116 için 26,5 saat (Şekil 17); SW480 için 33,4 saat (Şekil 18); SW620 için 41,4 saat (Şekil 19); LoVo için 26,1 saat (Şekil 20) olarak belirlendi. ATCC'nin hücre hatlarını inceleyen "Physical Sciences - Oncology Center Network Bioresource Core Facility"ye göre ikiye katlanma zamanları HT-29 için 23 saat; HCT116 için 21 saat; SW480 için 38 saat; SW620 için 26 saat; LoVo hücreleri için 34 saat olduğu rapor edildi (165).



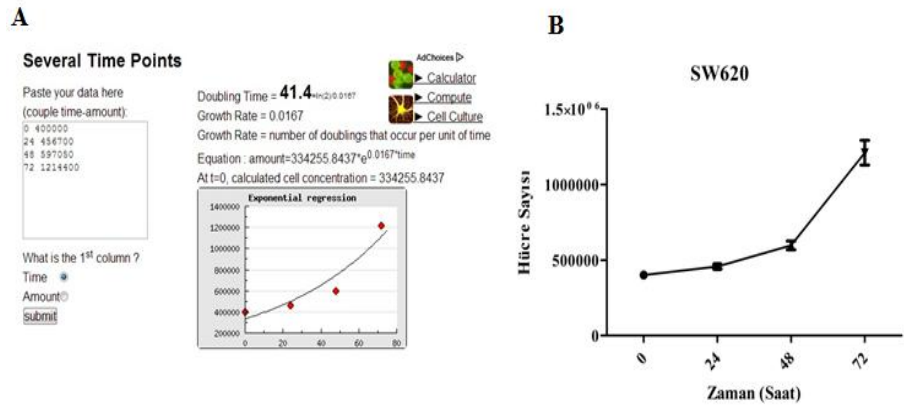
Şekil 16. HT-29 hücrelerinin katlanma zamanı. **A)** www.doubling-time.com/compute.php internet sitesinden elde edilen veriler; **B)** HT-29 hücrelerinin katlanma grafiği (Ortalama $\pm$ Standart hata)



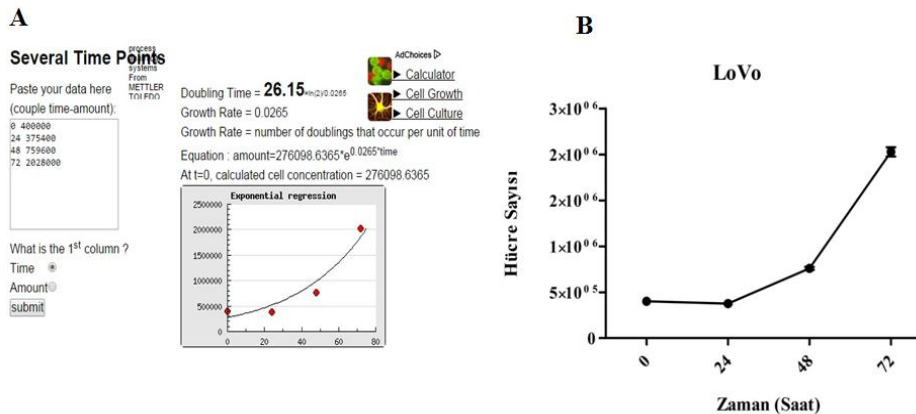
Şekil 17. HCT116 hücrelerinin katlanma zamanı. **A)** www.doubling-time.com/compute.php internet sitesinden elde edilen veriler; **B)** HCT116 hücrelerinin katlanma grafiği (Ortalama $\pm$ Standart hata)



Şekil 18. SW480 hücrelerinin katlanma zamanı. **A)** www.doubling-time.com/compute.php internet sitesinden elde edilen veriler; **B)** SW480 hücrelerinin katlanma grafiği (Ortalama $\pm$ Standart hata)



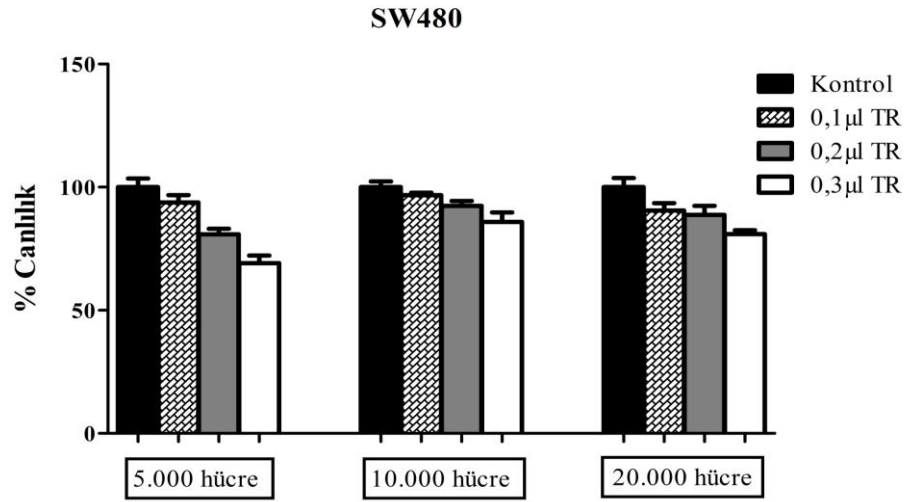
Şekil 19. SW620 hücrelerinin katlanma zamanı. **A)** www.doubling-time.com/compute.php internet sitesinden elde edilen veriler; **B)** LoVo hücrelerinin katlanma grafiği (Ortalama $\pm$ Standart hata)



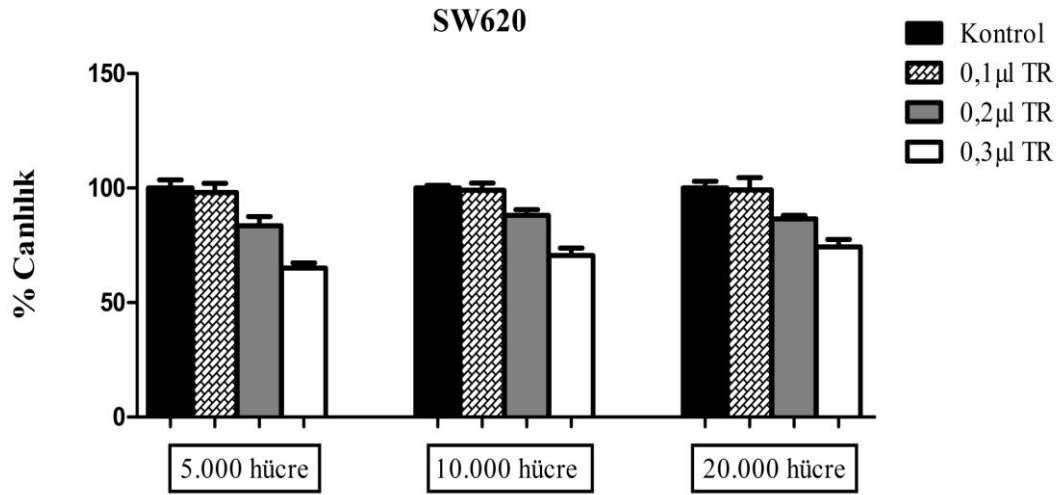
Şekil 20. LoVo hücrelerinin katlanma zamanı. **A)** www.doubling-time.com/compute.php internet sitesinden elde edilen veriler; **B)** LoVo hücrelerinin katlanma grafiği (Ortalama $\pm$ Standart hata)

4.2 Transfeksiyon Reaktifinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

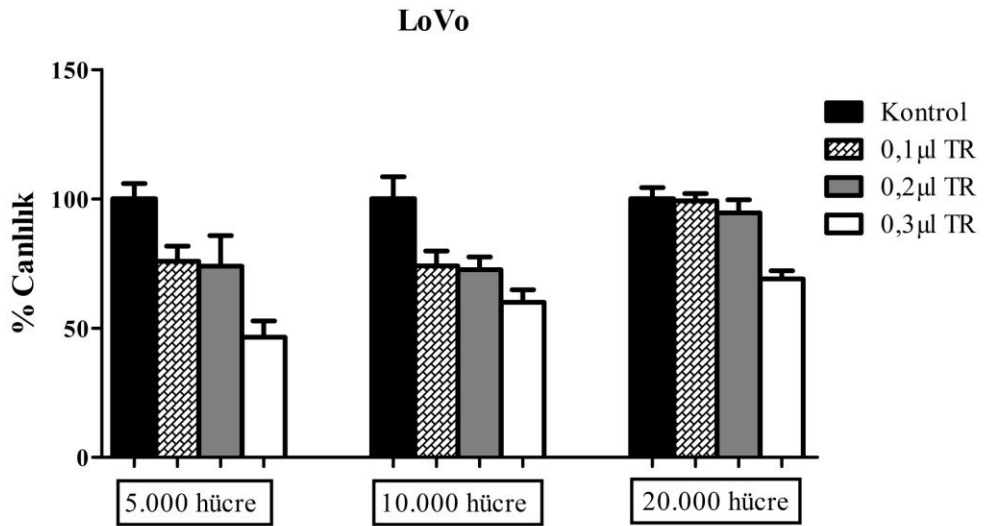
siRNA transfeksiyonunda kullanılan transfeksiyon reaktifinin SW480, SW620 ve LoVo hücre canlılığına olan etkisi WST-1 kullanılarak incelendi. SW480, SW620 ve LoVo hücrelerinde, 5000 hücre başına 0,3µL transfeksiyon reaktifinin verildiğinde hücre canlılıklarını sırasıyla % 69, % 65 ve % 49 oranında azalttığı belirlendi. Transfeksiyon reaktifinin daha düşük dozlarının ise (0,2 – 0,1 µL) ise her üç hücre hattında da hücre canlılığını daha az etkilediği görüldü. 10.000 ve 20.000 hücre başına verilen transfeksiyon reaktifinin hücre canlılığı üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 21-23). Üretici firma (Dharmacon – Thermo Scientific) HT-29 ve HCT116 için toksik olmayan transfeksiyon reaktifi miktarını belirlediğinden bu hücrelere canlılık testi uygulanmadı.



Şekil 21. SW480 hücrelerinin 24 saat transfeksiyon reaktifi (TR) ile inkübasyon sonrası % canlılık değerleri (Ortalama ±Standart hata)



Şekil 22. SW620 hücrelerinin 24 saat transfeksiyon reaktifi (TR) ile inkübasyon sonrası % canlılık değerleri (Ortalama $\pm$ Standart hata)

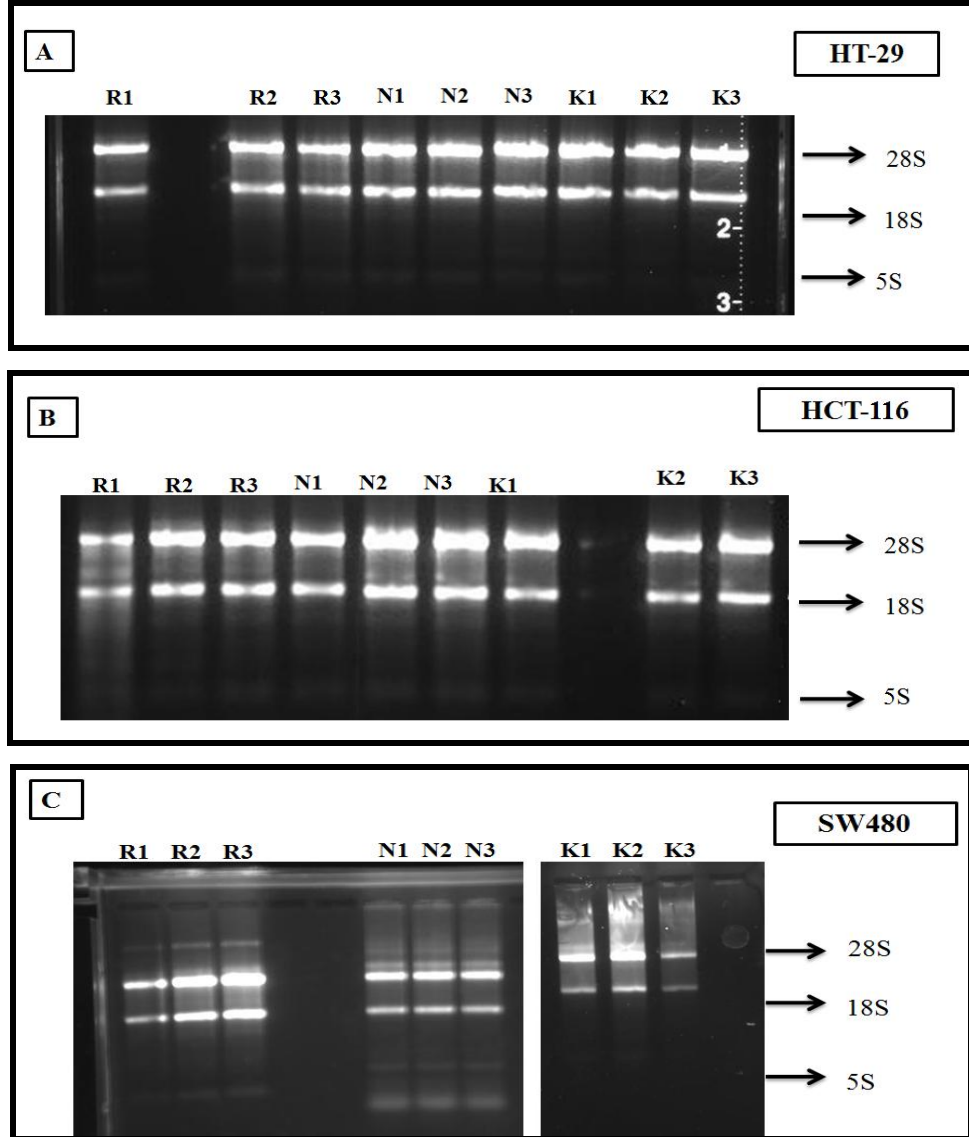


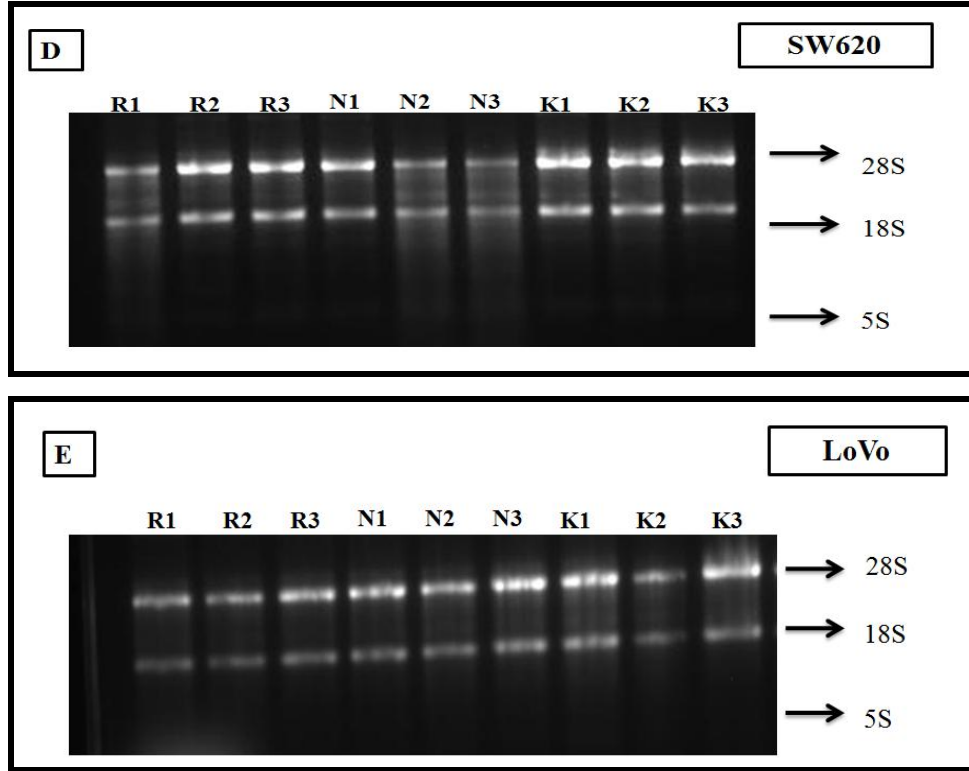
Şekil 23. LoVo hücrelerinin 24 saat transfeksiyon reaktifi (TR) ile inkübasyon sonrası % canlılık değerleri (Ortalama $\pm$ Standart hata)

4.3 REAL-TIME PCR Sonuçları

4.3.1 RNA Örneklerinin %1,2 Formaldehit Agaroza Jelde Görüntülenmesi

İzole edilen RNA örneklerinin intact olup olmadığını belirlemek amacıyla denatüre koşullar altında agaroz jel elektroforezi uygulandı. Bu jel görüntülerine göre, RNA örneklerinin intact (28S ve 18S’de keskin banda sahip) olduğu görüldü (Şekil 24).





Şekil 24. A) HT-29, B) HCT116, C) SW480, D) SW620 ve E) LoVo kolon kanser hücrelerinin formaldehit agaroz jel elektroforezi görüntüleri

4.3.2 mRNA Ekspresyon Analizi

RhoC siRNA susturumu sonrası kolon kanser hücrelerindeki RhoC, ROCK-I, mDia, MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 ve GAPDH mRNA ekspresyon düzeyleri, Light Cycler Software 480 1.5 (Roche Diagnostic) kullanılarak belirlendi. Her gene ait Ct (Threshold cycle) değerlerinden yararlanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile rölatif RNA ekspresyon analizi yapıldı.

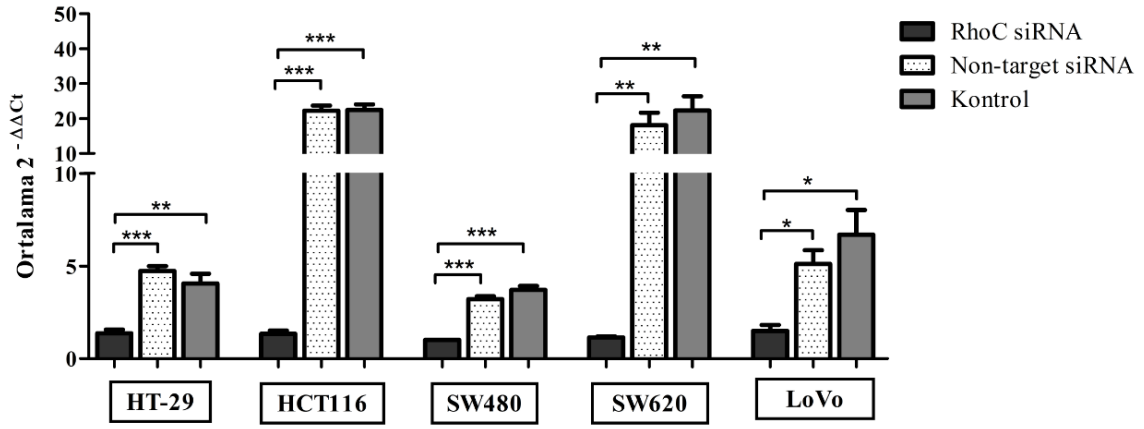
4.3.2.1 RhoC mRNA Ekspresyonu

Kolon kanser hücrelerinde, RhoC mRNA ekspresyon düzeyinin, RhoC siRNA grubunda Non-target siRNA ve Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak baskılandığı belirlendi (Şekil 25) (Tablo 17, 18).

Tablo 17. Kolon kanser hücrelerinde RhoC mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

<i>Hücre Hattı</i>	<i>Grup</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değeri				
		<i>1. Tekrar</i>	<i>2. Tekrar</i>	<i>3. Tekrar</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Hata</i>
HT-29	R Grubu	1,64	1,00	1,47	1,37	0,191
	N Grubu	4,20	4,92	5,07	4,73	0,269
	K Grubu	3,09	4,92	4,16	4,06	0,531
HCT116	R Grubu	1,62	1,39	1,00	1,34	0,181
	N Grubu	24,49	22,82	19,37	22,23	1,507
	K Grubu	19,78	25,37	22,21	22,45	1,618
SW480	R Grubu	1,00	1,02	1,00	1,01	0,007
	N Grubu	2,91	3,31	3,41	3,21	0,153
	K Grubu	4,09	3,68	3,37	3,71	0,209
SW620	R Grubu	1,00	1,25	1,17	1,14	0,737
	N Grubu	18,28	11,78	24,21	18,09	3,589
	K Grubu	25,69	27,07	14,27	22,34	4,056
LoVo	R Grubu	1,38	2,11	1,00	1,50	0,326
	N Grubu	4,16	6,58	4,60	5,11	0,744
	K Grubu	4,72	9,26	6,06	6,68	1,347

RHOC mRNA Ekspresyonu



Şekil 25. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun RhoC mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)

İstatistiksel olarak anlamlı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 18. Kolon kanser hücrelerinde RhoC mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.

İstatistiksel olarak anlamlı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

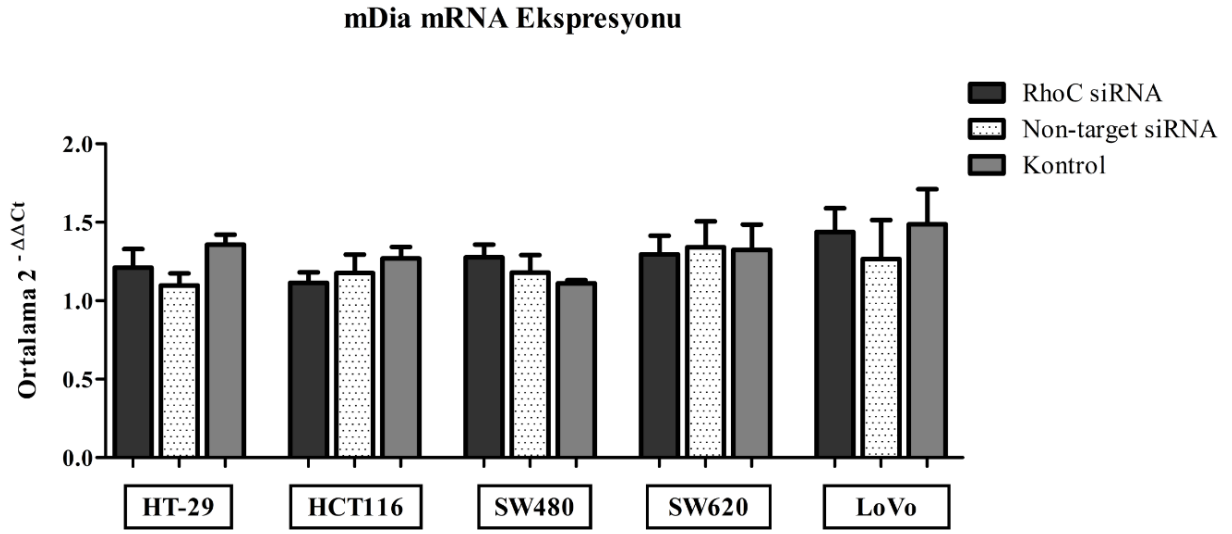
<i>Gen At</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,0005***
	R Grubu vs K Grubu	0,0089**
	N Grubu vs K Grubu	0,3209
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,0002***
	R Grubu vs K Grubu	0,0002***
	N Grubu vs K Grubu	0,9233
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,0001***
	R Grubu vs K Grubu	0,0002***
	N Grubu vs K Grubu	0,1233
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,0092**
	R Grubu vs K Grubu	0,0064**
	N Grubu vs K Grubu	0,4762
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,0112*
	R Grubu vs K Grubu	0,0201*
	N Grubu vs K Grubu	0,3662

4.3.2.2 mDia mRNA Ekspresyonu

Kolon kanser hücrelerinde, mDia mRNA ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark belirlenmedi (Şekil 26) (Tablo 19, 20).

Tablo 19. Kolon kanser hücrelerinde mDia mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

<i>Hücre Hattı</i>	<i>Grup</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değeri				
		<i>1. Tekrar</i>	<i>2. Tekrar</i>	<i>3. Tekrar</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Hata</i>
HT-29	R Grubu	1,44	1,04	1,15	1,21	0,119
	N Grubu	1,00	1,04	1,25	1,10	0,078
	K Grubu	1,35	1,25	1,47	1,36	0,064
HCT116	R Grubu	1,09	1,01	1,24	1,11	0,067
	N Grubu	1,40	1,13	1,00	1,18	0,118
	K Grubu	1,17	1,41	1,23	1,27	0,072
SW480	R Grubu	1,32	1,12	1,39	1,28	0,081
	N Grubu	1,38	1,00	1,16	1,18	0,110
	K Grubu	1,15	1,08	1,10	1,11	0,021
SW620	R Grubu	1,12	1,25	1,52	1,30	0,118
	N Grubu	1,11	1,66	1,25	1,34	0,165
	K Grubu	1,00	1,52	1,45	1,32	0,163
LoVo	R Grubu	1,72	1,20	1,39	1,44	0,152
	N Grubu	1,76	1,04	1,00	1,27	0,247
	K Grubu	1,90	1,43	1,13	1,49	0,224



Şekil 26. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun mDia mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 20. Kolon kanser hücrelerinde mDia mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,4703
	R Grubu vs K Grubu	0,3390
	N Grubu vs K Grubu	0,0605
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,6651
	R Grubu vs K Grubu	0,1877
	N Grubu vs K Grubu	0,5363
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,5184
	R Grubu vs K Grubu	0,5662
	N Grubu vs K Grubu	0,1168
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,8412
	R Grubu vs K Grubu	0,9009
	N Grubu vs K Grubu	0,9462
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,5891
	R Grubu vs K Grubu	0,8625
	N Grubu vs K Grubu	0,5455

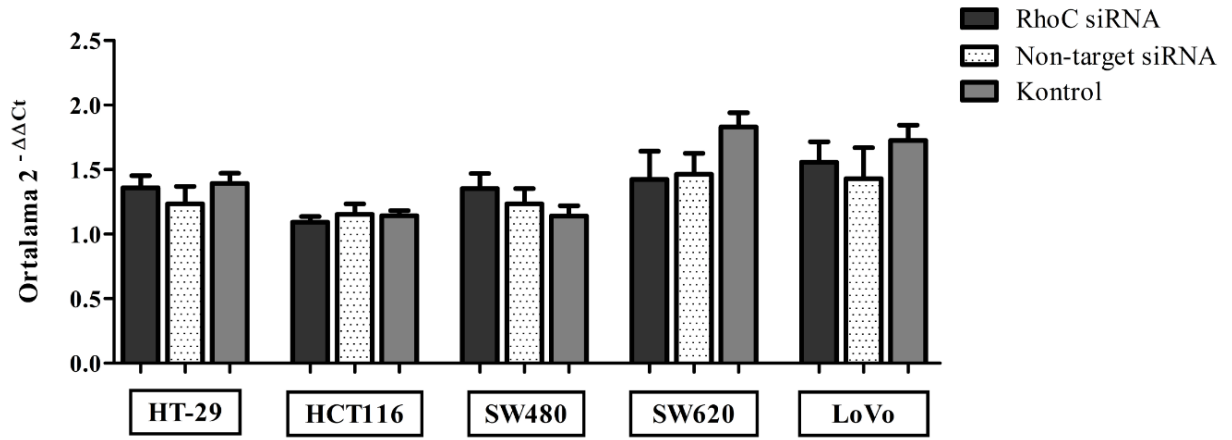
4.3.2.3 ROCK-I mRNA Ekspresyonu

Kolon kanser hücrelerinde ROCK-I mRNA ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark belirlenmedi (Şekil 27) (Tablo 21, 22).

Tablo 21. Kolon kanser hücrelerinde ROCK-I mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

<i>Hücre Hattı</i>	<i>Grup</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değeri				
		<i>1. Tekrar</i>	<i>2. Tekrar</i>	<i>3. Tekrar</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Hata</i>
HT-29	R Grubu	1,52	1,36	1,20	1,36	0,092
	N Grubu	1,23	1,00	1,47	1,23	0,136
	K Grubu	1,53	1,26	1,39	1,39	0,078
HCT116	R Grubu	1,12	1,01	1,15	1,09	0,043
	N Grubu	1,28	1,00	1,18	1,15	0,082
	K Grubu	1,07	1,20	1,16	1,14	0,038
SW480	R Grubu	1,55	1,36	1,15	1,35	0,116
	N Grubu	1,09	1,14	1,47	1,23	0,119
	K Grubu	1,00	1,14	1,28	1,14	0,081
SW620	R Grubu	1,00	1,53	1,74	1,42	0,220
	N Grubu	1,32	1,79	1,28	1,46	0,164
	K Grubu	1,74	2,05	1,70	1,83	0,111
LoVo	R Grubu	1,87	1,35	1,45	1,56	0,159
	N Grubu	1,83	1,46	1,00	1,43	0,240
	K Grubu	1,73	1,93	1,52	1,73	0,118

ROCK-I mRNA Ekspresyonu



Şekil 27. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun ROCK-I mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).

İstatistiksel olarak anlamlı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 22. Kolon kanser hücrelerinde ROCK-I mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

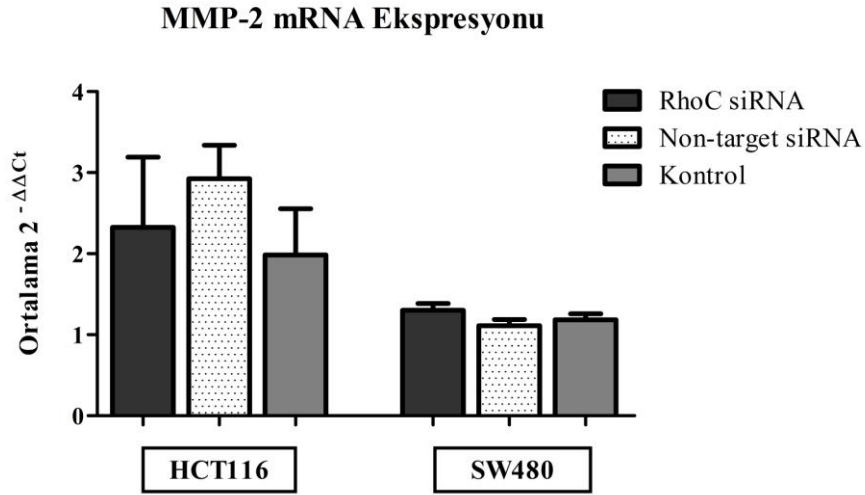
<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,4834
	R Grubu vs K Grubu	0,7964
	N Grubu vs K Grubu	0,3644
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,5512
	R Grubu vs K Grubu	0,4325
	N Grubu vs K Grubu	0,9173
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,5098
	R Grubu vs K Grubu	0,2048
	N Grubu vs K Grubu	0,5523
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,8911
	R Grubu vs K Grubu	0,1742
	N Grubu vs K Grubu	0,1371
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,6829
	R Grubu vs K Grubu	0,4400
	N Grubu vs K Grubu	0,3299

4.3.2.4 MMP-2 mRNA Ekspresyonu

HT-29, SW620 ve LoVo Kolon kanser hücrelerinde MMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerinin düşük olması ($Ct > 40$) nedeniyle, bu hücre hatlarında RhoC gen susturumunun MMP-2 üzerindeki etkisi incelenememiştir. Buna karşılık HCT-116 ve SW480 hücrelerinde RhoC gen susturumunun MMP-2 üzerindeki etkisi incelendiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmedi (Şekil 28) (Tablo 23, 24).

Tablo 23. Kolon kanser hücrelerinde MMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

Hücre Hattı	Grup	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değeri				
		1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	Ortalama	Standart Hata
HCT116	R Grubu	3,95	1,00	2,03	2,33	0,864
	N Grubu	3,75	2,49	2,53	2,92	0,414
	K Grubu	3,11	1,24	1,60	1,98	0,573
SW480	R Grubu	1,14	1,39	1,38	1,30	0,082
	N Grubu	1,26	1,00	1,07	1,11	0,078
	K Grubu	1,33	1,10	1,12	1,18	0,074



Şekil 28. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu susturumunun MMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 24. Kolon kanser hücrelerinde MMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,5672
	R Grubu vs K Grubu	0,7572
	N Grubu vs K Grubu	0,2541
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,1615
	R Grubu vs K Grubu	0,3364
	N Grubu vs K Grubu	0,5307

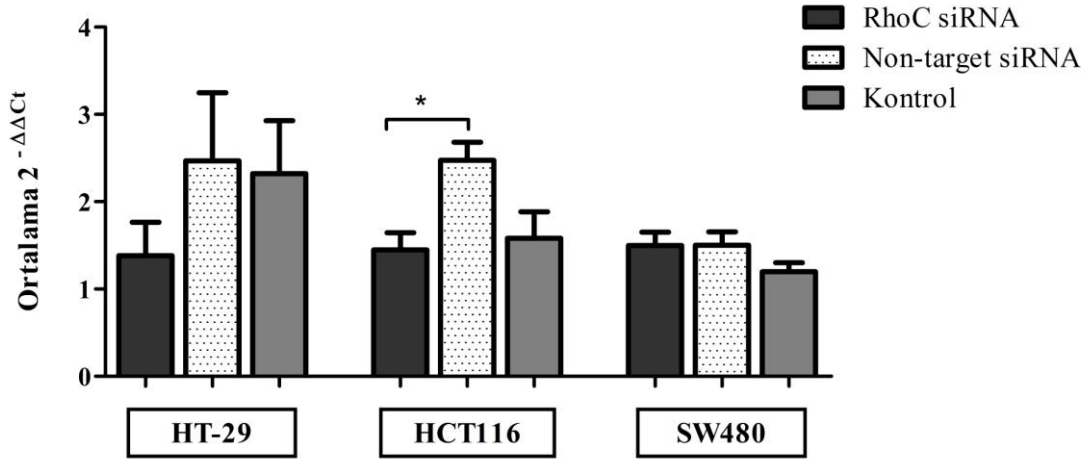
4.3.2.5 MMP-9 mRNA Ekspresyonu

SW620 ve LoVo Kolon kanser hücrelerinde MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerinin düşük olması ($Ct > 40$) nedeniyle, bu hücre hatlarında RhoC gen susturumunun MMP-9 üzerindeki etkisi incelenememiştir. SW480 hücrelerinde RhoC gen susturumunun MMP-9 üzerindeki etkisi incelendiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmedi. HT-29 hücrelerinde ise RhoC gurunda MMP-9 ekspresyonu diğer gruplara göre yaklaşık 2 kat oranında azaldığı, ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı görüldü. HCT-116 hücrelerinde, RhoC siRNA grubunda MMP-9 mRNA ekspresyonunun Non-target grubuna göre azaldığı ancak Kontrol grubuna göre değişmediği belirlendi (Şekil 29) (Tablo 25, 26).

Tablo 25. Kolon kanser hücrelerinde MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

<i>Hücre Hattı</i>	<i>Grup</i>	<i>2^{-ΔΔCt} Değeri</i>				
		<i>1. Tekrar</i>	<i>2. Tekrar</i>	<i>3. Tekrar</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Hata</i>
HT-29	R Grubu	2,15	1,00	1,00	1,38	0,383
	N Grubu	1,12	3,83	2,45	2,47	0,782
	K Grubu	1,12	2,81	3,04	2,32	0,605
HCT116	R Grubu	1,34	1,17	1,83	1,45	0,198
	N Grubu	2,68	2,68	2,06	2,47	0,207
	K Grubu	1,71	2,03	1,00	1,58	0,304
SW480	R Grubu	1,61	1,69	1,19	1,50	0,155
	N Grubu	1,66	1,65	1,20	1,50	0,152
	K Grubu	1,36	1,23	1,00	1,20	0,105

MMP-9 mRNA Ekspresyonu



Şekil 29. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 26. Kolon kanser hücrelerinde MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

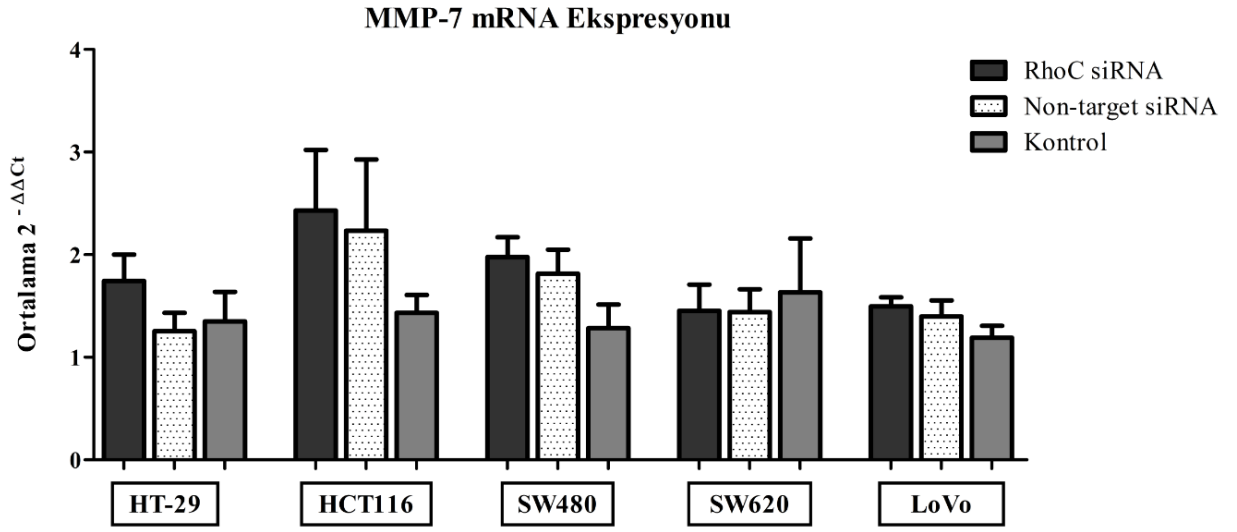
Gen Adı	Grup	p Değeri
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,2816
	R Grubu vs K Grubu	0,2598
	N Grubu vs K Grubu	0,8918
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,0230*
	R Grubu vs K Grubu	0,7320
	N Grubu vs K Grubu	0,0721
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,9770
	R Grubu vs K Grubu	0,1847
	N Grubu vs K Grubu	0,1721

4.3.2.6 MMP-7 mRNA Ekspresyonu

Kolon kanser hücrelerinde, MMP-7 mRNA ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark belirlenmedi (Şekil 30) (Tablo 27, 28).

Tablo 27. Kolon kanser hücrelerinde MMP-7 mRNA ekspresyon düzeylerine $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

<i>Hücre Hattı</i>	<i>Grup</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değeri				
		<i>1. Tekrar</i>	<i>2. Tekrar</i>	<i>3. Tekrar</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Hata</i>
HT-29	R Grubu	1,23	1,96	2,04	1,74	0,258
	N Grubu	1,03	1,61	1,12	1,25	0,180
	K Grubu	1,92	1,00	1,13	1,35	0,288
HCT116	R Grubu	1,28	3,24	2,77	2,43	0,591
	N Grubu	2,30	1,00	3,40	2,23	0,694
	K Grubu	1,73	1,44	1,13	1,43	0,173
SW480	R Grubu	2,14	2,20	1,59	1,98	0,194
	N Grubu	2,18	1,37	1,89	1,81	0,237
	K Grubu	1,74	1,00	1,11	1,28	0,231
SW620	R Grubu	1,00	1,88	1,48	1,45	0,254
	N Grubu	1,41	1,07	1,84	1,44	0,223
	K Grubu	1,12	2,68	1,10	1,63	0,523
LoVo	R Grubu	1,57	1,60	1,32	1,50	0,089
	N Grubu	1,28	1,71	1,20	1,40	0,158
	K Grubu	1,40	1,17	1,00	1,19	0,116



Şekil 30. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-7 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 28. Kolon kanser hücrelerinde MMP-7 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

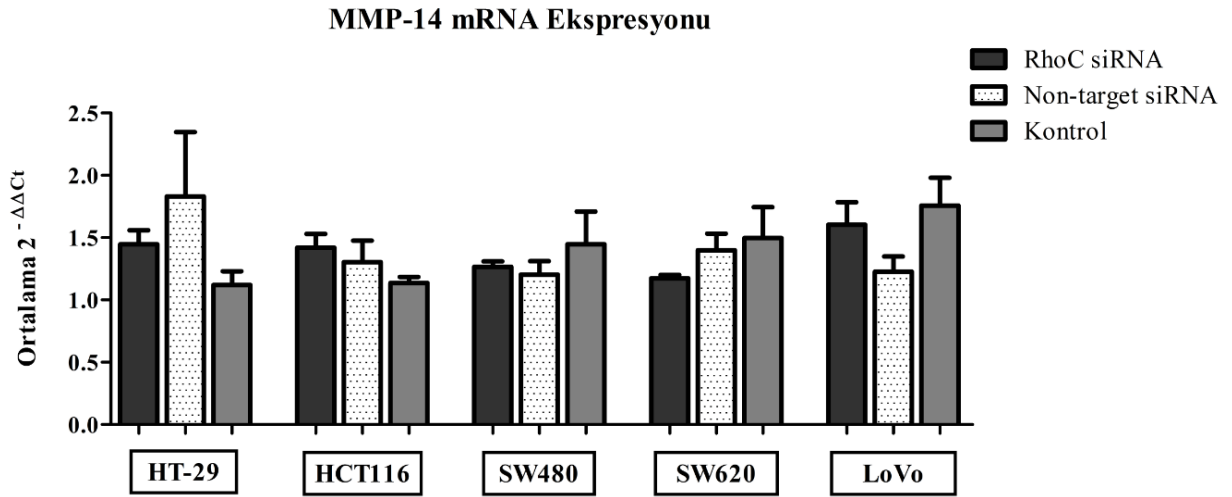
<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,1942
	R Grubu vs K Grubu	0,3659
	N Grubu vs K Grubu	0,7899
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,8397
	R Grubu vs K Grubu	0,1808
	N Grubu vs K Grubu	0,3258
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,6221
	R Grubu vs K Grubu	0,0829
	N Grubu vs K Grubu	0,1842
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,9704
	R Grubu vs K Grubu	0,7725
	N Grubu vs K Grubu	0,7510
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,6111
	R Grubu vs K Grubu	0,1036
	N Grubu vs K Grubu	0,3517

4.3.2.7 MMP-14 mRNA Ekspresyonu

Kolon kanser hücrelerinde, MMP-14 mRNA ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark belirlenmedi (Şekil 31) (Tablo 29, 30).

Tablo 29. Kolon kanser hücrelerinde MMP-14 mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

<i>Hücre Hattı</i>	<i>Grup</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değeri				
		<i>1. Tekrar</i>	<i>2. Tekrar</i>	<i>3. Tekrar</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Hata</i>
HT-29	R Grubu	1,67	1,32	1,35	1,45	0,112
	N Grubu	1,26	1,37	2,86	1,83	0,516
	K Grubu	1,02	1,00	1,34	1,12	0,110
HCT116	R Grubu	1,54	1,20	1,52	1,42	0,110
	N Grubu	1,31	1,00	1,60	1,30	0,173
	K Grubu	1,15	1,05	1,21	1,14	0,047
SW480	R Grubu	1,34	1,27	1,19	1,27	0,043
	N Grubu	1,37	1,00	1,24	1,20	0,108
	K Grubu	1,97	1,22	1,15	1,45	0,262
SW620	R Grubu	1,19	1,12	1,21	1,17	0,027
	N Grubu	1,45	1,60	1,15	1,40	0,132
	K Grubu	1,00	1,72	1,77	1,50	0,249
LoVo	R Grubu	1,87	1,68	1,26	1,60	0,180
	N Grubu	1,42	1,26	1,00	1,23	0,122
	K Grubu	1,72	2,16	1,39	1,76	0,223



Şekil 31. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-14 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama±Standart hata)

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 30. Kolon kanser hücrelerinde MMP-14 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

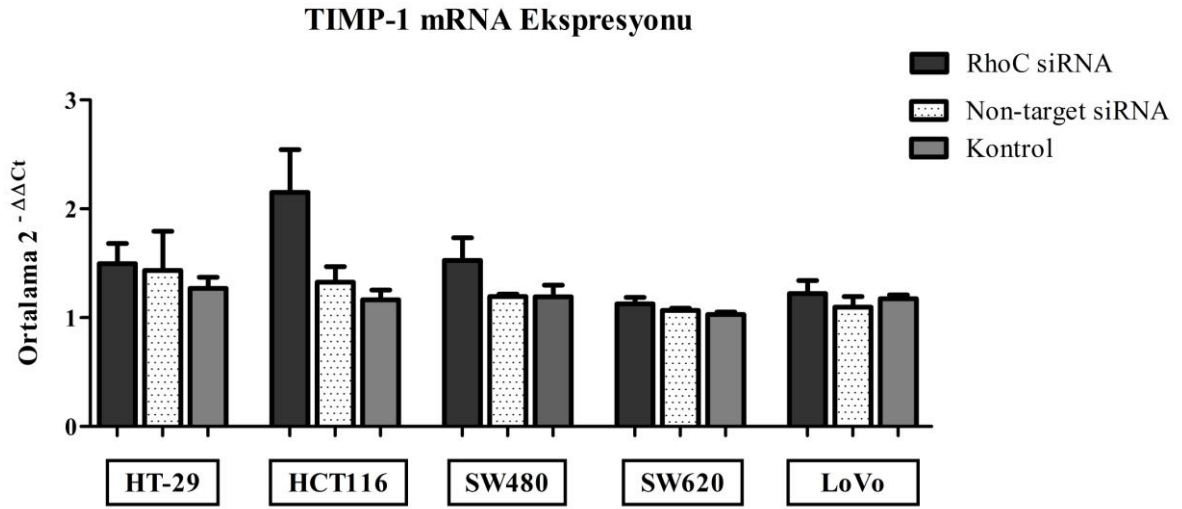
<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,5080
	R Grubu vs K Grubu	0,1061
	N Grubu vs K Grubu	0,2496
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,6002
	R Grubu vs K Grubu	0,0770
	N Grubu vs K Grubu	0,4055
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,6162
	R Grubu vs K Grubu	0,5357
	N Grubu vs K Grubu	0,4893
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,1686
	R Grubu vs K Grubu	0,2659
	N Grubu vs K Grubu	0,7488
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,1589
	R Grubu vs K Grubu	0,6212
	N Grubu vs K Grubu	0,1056

4.3.2.8 TIMP-1 mRNA Ekspresyonu

HT-29, SW480, SW620 ve LoVo kolon kanser hücrelerinde, TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark belirlenmedi. HCT116 hücrelerinde RhoC siRNA grubunda TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin Non-target siRNA ve Kontrol gruplarına göre yaklaşık 2 kat oranında arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Şekil 32) (Tablo 31, 32).

Tablo 31. Kolon kanser hücrelerinde TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

<i>Hücre Hattı</i>	<i>Grup</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değeri				
		<i>1. Tekrar</i>	<i>2. Tekrar</i>	<i>3. Tekrar</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Hata</i>
HT-29	R Grubu	1,21	1,44	1,84	1,50	0,184
	N Grubu	2,15	1,15	1,00	1,43	0,361
	K Grubu	1,10	1,26	1,45	1,27	0,101
HCT116	R Grubu	1,57	2,90	1,98	2,15	0,393
	N Grubu	1,06	1,54	1,38	1,33	0,141
	K Grubu	1,31	1,18	1,00	1,16	0,090
SW480	R Grubu	1,32	1,94	1,32	1,53	0,207
	N Grubu	1,23	1,15	1,20	1,19	0,023
	K Grubu	1,38	1,19	1,00	1,19	0,110
SW620	R Grubu	1,23	1,13	1,02	1,13	0,061
	N Grubu	1,03	1,08	1,09	1,07	0,019
	K Grubu	1,07	1,02	1,00	1,03	0,021
LoVo	R Grubu	1,17	1,04	1,45	1,22	0,121
	N Grubu	1,00	1,29	1,00	1,10	0,097
	K Grubu	1,16	1,24	1,12	1,17	0,035



Şekil 32. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata)

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 32. Kolon kanser hücrelerinde TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,8834
	R Grubu vs K Grubu	0,3412
	N Grubu vs K Grubu	0,6855
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,0707
	R Grubu vs K Grubu	0,1201
	N Grubu vs K Grubu	0,3842
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,1843
	R Grubu vs K Grubu	0,2236
	N Grubu vs K Grubu	0,9777
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,3977
	R Grubu vs K Grubu	0,2061
	N Grubu vs K Grubu	0,2589
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,4704
	R Grubu vs K Grubu	0,7299
	N Grubu vs K Grubu	0,4976

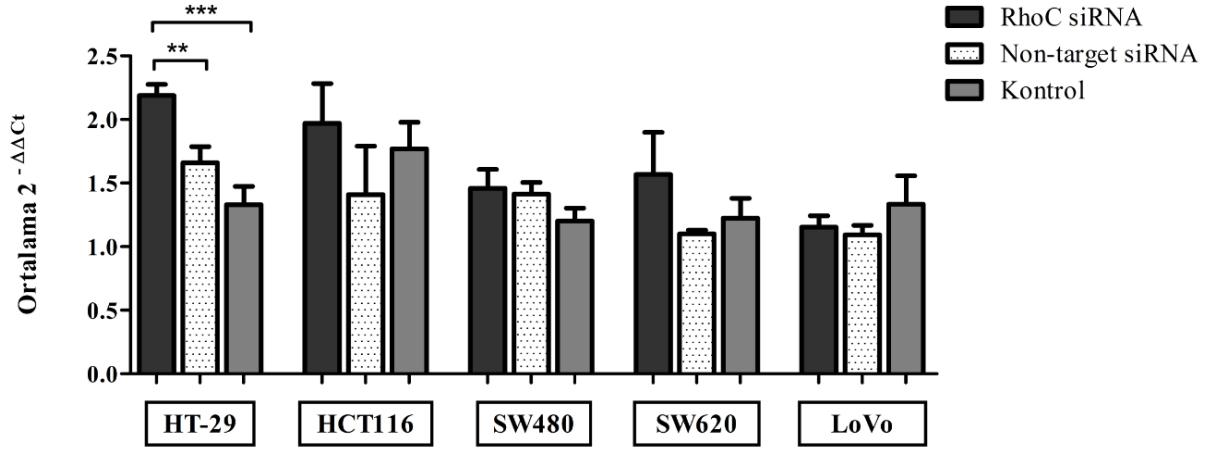
4.3.2.9 TIMP-2 mRNA Ekspresyonu

HCT116, SW480, SW620 ve LoVo kolon kanser hücrelerinde, TIMP-2 mRNA ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark belirlenmedi. Buna karşılık HT-29 hücrelerinde RhoC siRNA grubunda Non-target siRNA ve Kontrol gruplarına göre TIMP-2 gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış olduğu belirlendi (Şekil 33) (Tablo 33, 34).

Tablo 33. Kolon kanser hücrelerinde TIMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

<i>Hücre Hattı</i>	<i>Grup</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değeri				
		<i>1. Tekrar</i>	<i>2. Tekrar</i>	<i>3. Tekrar</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Hata</i>
HT-29	R Grubu	1,98	2,43	2,40	2,20	0,087
	N Grubu	1,11	1,60	1,61	1,66	0,126
	K Grubu	1,46	1,15	1,00	1,33	0,144
HCT116	R Grubu	1,44	2,52	1,95	1,97	0,312
	N Grubu	1,06	1,00	2,17	1,41	0,380
	K Grubu	1,36	1,92	2,03	1,77	0,207
SW480	R Grubu	1,73	1,22	1,43	1,46	0,148
	N Grubu	1,48	1,23	1,53	1,41	0,093
	K Grubu	1,34	1,00	1,26	1,20	0,103
SW620	R Grubu	1,00	2,15	1,55	1,57	0,332
	N Grubu	1,16	1,07	1,07	1,10	0,030
	K Grubu	1,02	1,53	1,12	1,22	0,156
LoVo	R Grubu	1,13	1,01	1,32	1,15	0,090
	N Grubu	1,00	1,24	1,04	1,09	0,074
	K Grubu	1,15	1,07	1,78	1,33	0,225

TIMP-2 mRNA Ekspresyonu



Şekil 33. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun TIMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 34. Kolon kanser hücrelerinde TIMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

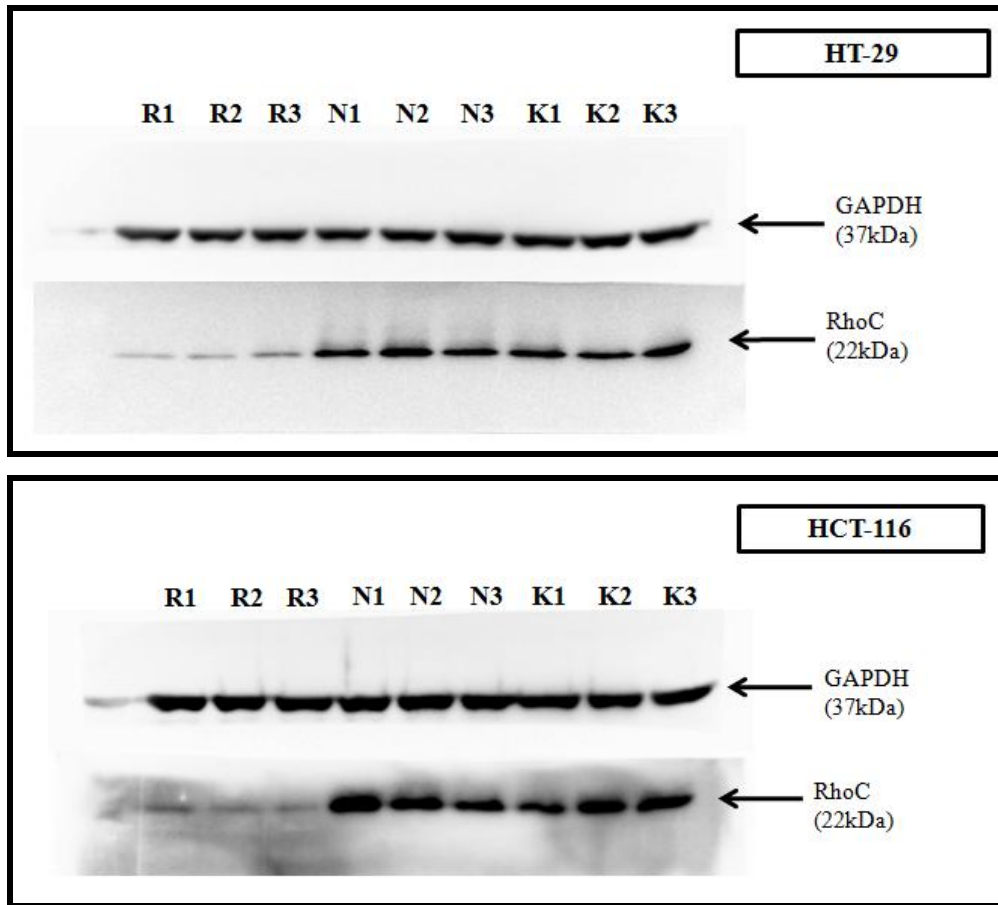
<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,0061**
	R Grubu vs K Grubu	0,0005***
	N Grubu vs K Grubu	0,1148
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,3185
	R Grubu vs K Grubu	0,6217
	N Grubu vs K Grubu	0,4528
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,8026
	R Grubu vs K Grubu	0,2223
	N Grubu vs K Grubu	0,1980
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,2342
	R Grubu vs K Grubu	0,4024
	N Grubu vs K Grubu	0,4809
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,6347
	R Grubu vs K Grubu	0,4983
	N Grubu vs K Grubu	0,3676

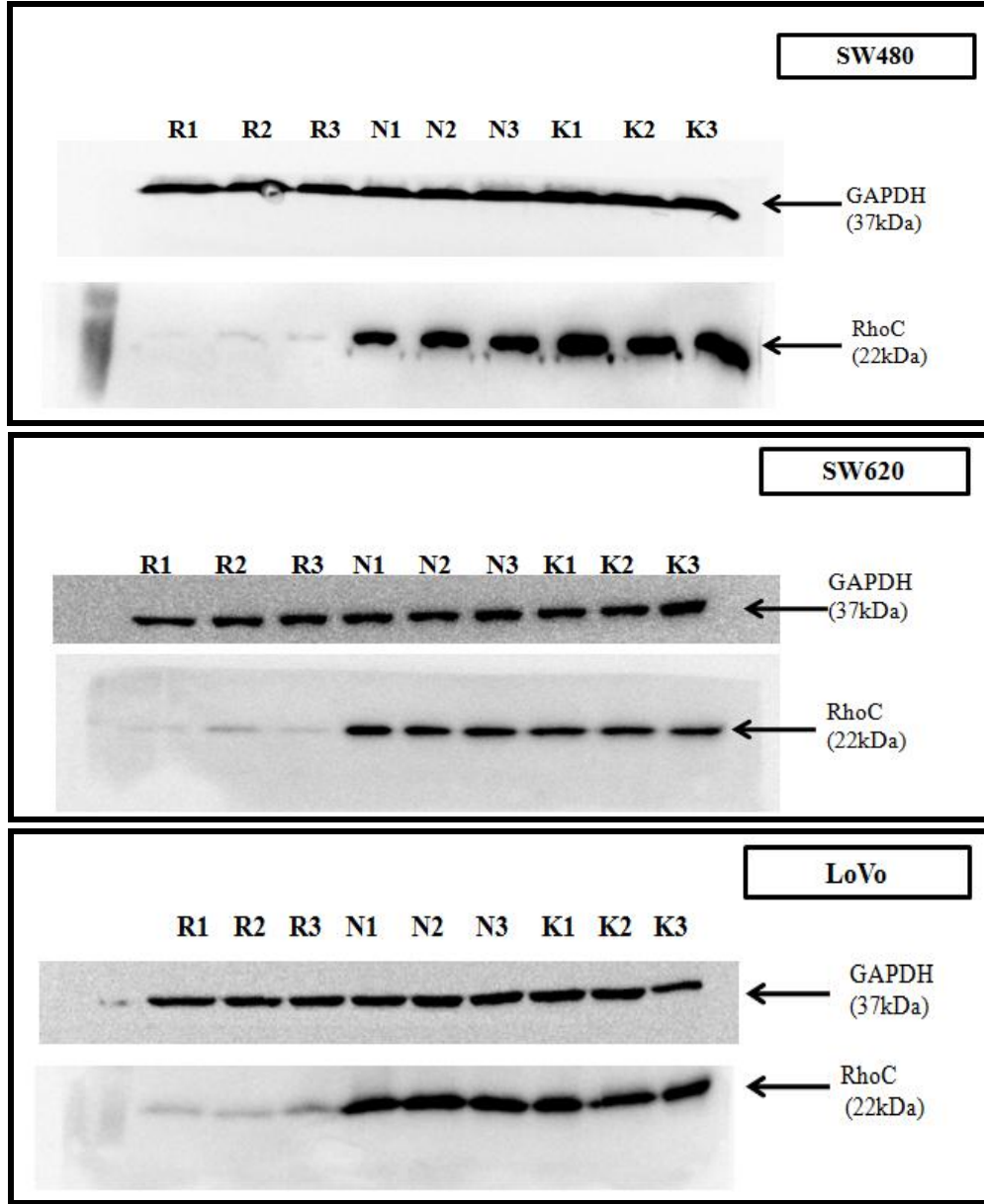
4.4 Western Blot Sonuçları

RhoC siRNA susturumu sonrası kolon kanser hücrelerindeki RhoC, MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-14, TIMP-2 ve GAPDH protein ekspresyon düzeyleri incelendi. Semi kantitatif analiz için elde edilen bantların dansitometrik analizleri UVP Bioimaging system with LabWorks 4.6 Image Acquisition Software kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için her bandın alan (mm^2) ve optik dansitesi (O.D/mm^2) belirlendi ve bandın yoğunluğu; "area density = alan x optik dansite" formülünden hesaplandı. Her gruba ait protein ekspresyon düzeyleri (area density) eşlenik GAPDH protein ekspresyon düzeyine (area density) oranlanarak rölatif kantitasyon yapıldı.

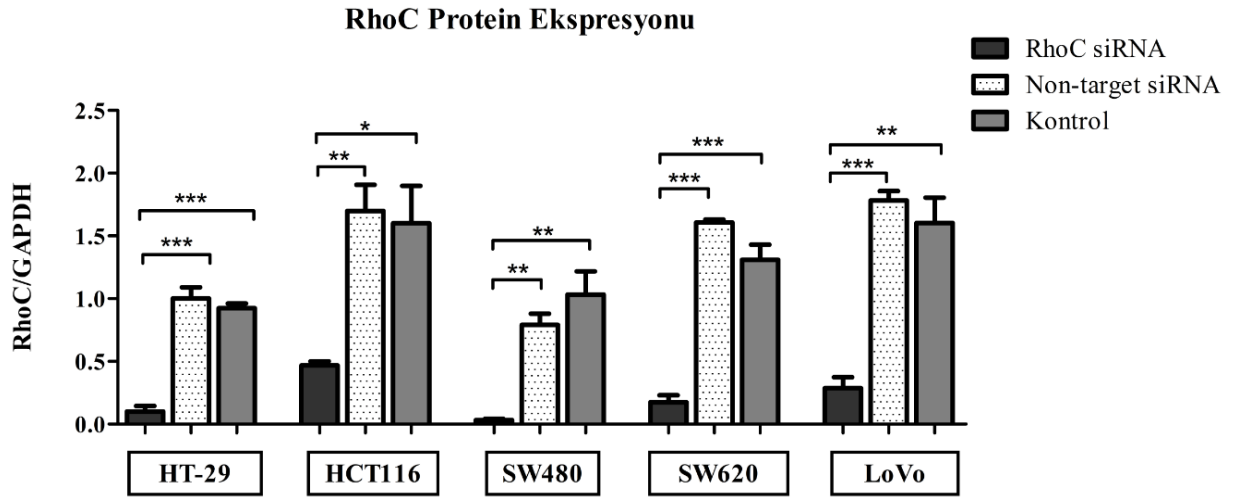
4.4.1 RhoC Protein Ekspresyonu

Kolon kanser hücrelerinde, RhoC protein ekspresyon düzeyinin, RhoC siRNA grubunda Non-target siRNA ve Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak baskılandığı görüldü (Şekil 34, 35) (Tablo 35).





Şekil 34. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun RhoC protein ekspresyon düzeylerine etkisi. R: RhoC siRNA grubu, N: Non-target siRNA grubu, K: Kontrol grubu



Şekil 35. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun RhoC protein ekspresyon düzeylerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart hata).

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

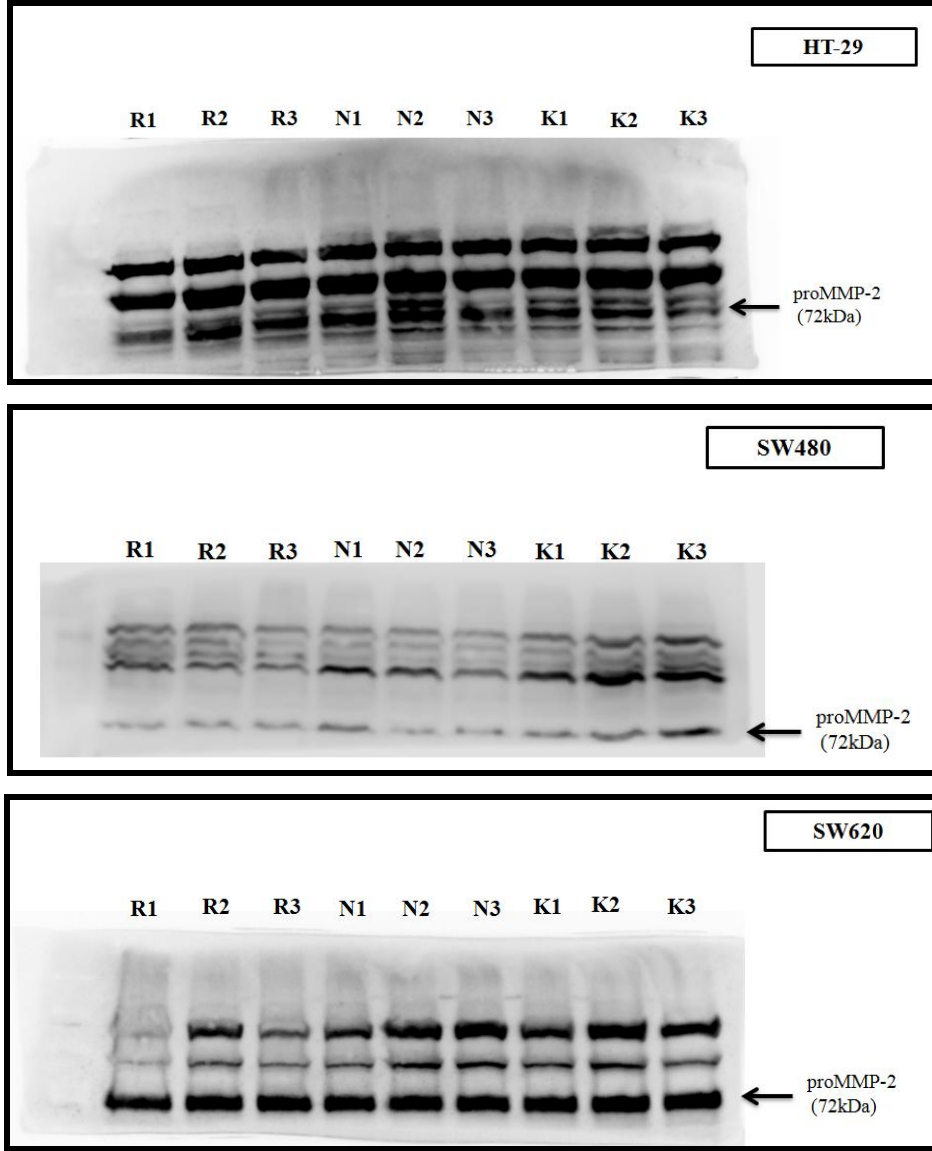
Tablo 35. Kolon kanser hücrelerinde RhoC protein ekspresyon düzeylerine ait p değerleri.

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

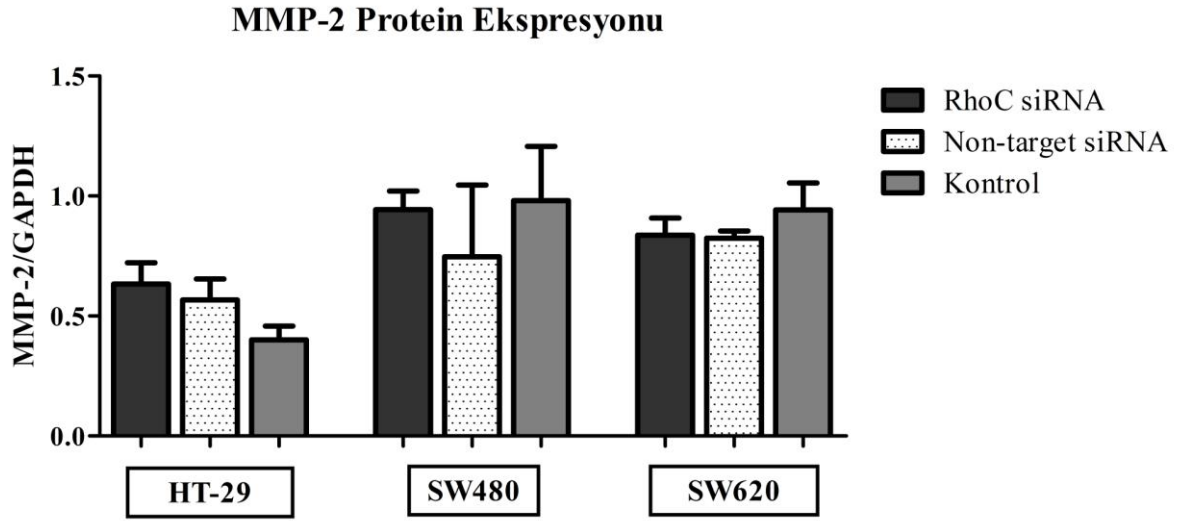
<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,0009***
	R Grubu vs K Grubu	0,0002***
	N Grubu vs K Grubu	0,4758
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,0043**
	R Grubu vs K Grubu	0,0199*
	N Grubu vs K Grubu	0,7978
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,0057**
	R Grubu vs K Grubu	0,0011**
	N Grubu vs K Grubu	0,3013
SW620	R Grubu vs N Grubu	< 0,0001***
	R Grubu vs K Grubu	0,0004***
	N Grubu vs K Grubu	0,0743
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,0002***
	R Grubu vs K Grubu	0,0039**
	N Grubu vs K Grubu	0,4471

4.4.2 MMP-2 Protein Ekspresyonu

HT-29, SW480 ve SW620 hücrelerinde MMP-2 protein ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark belirlenmedi. HCT116 ve LoVo hücrelerinde MMP-2 protein ekspresyon düzeylerinin düşük olması nedeniyle analiz yapılamadı (Şekil 36, 37) (Tablo 36).



Şekil 36. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-2 protein ekspresyon düzeylerine etkisi. R: RhoC siRNA grubu, N: Non-target siRNA grubu, K: Kontrol grubu



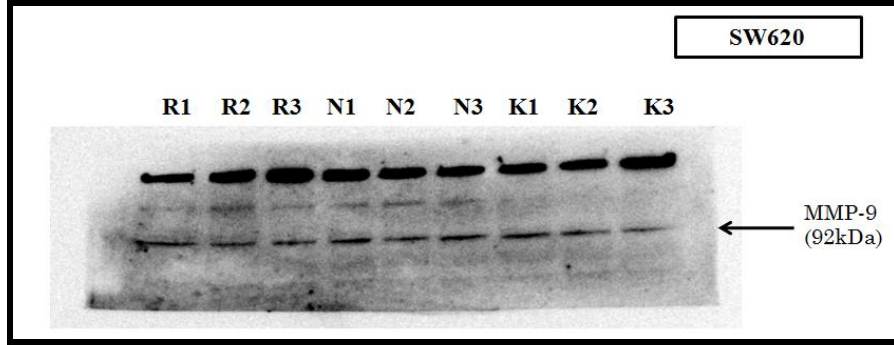
Şekil 37. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun MMP-2 protein ekspresyonu üzerine etkisi. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 36. Kolon kanser hücrelerinde MMP-2 protein ekspresyonu ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

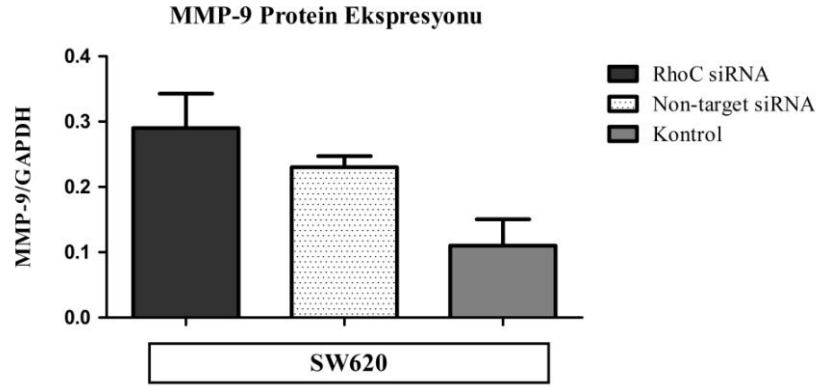
<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,6213
	R Grubu vs K Grubu	0,0913
	N Grubu vs K Grubu	0,1890
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,3326
	R Grubu vs K Grubu	0,8044
	N Grubu vs K Grubu	0,3427
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,2722
	R Grubu vs K Grubu	0,5150
	N Grubu vs K Grubu	0,7627

4.4.3 MMP-9 Protein Ekspresyonu

HT-29, SW480 ve LoVo hücrelerinde MMP-9'a ait herhangi bir bant elde edilemezken, HCT116 ve SW620 hücrelerinde MMP-9 protein ekspresyon düzeylerinin çok düşük olduğu görüldü. HCT116 hücrelerine ait bantların ince olması sebebiyle dansitometrik analizi yapılamadı. SW620 hücrelerinden elde edilen verilerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmedi. (Şekil 38, 39) (Tablo 37).



Şekil 38. Kolon kanser hücrelerinde MMP-9 protein ekspresyonuna ait western blot görüntüsü. R: RhoC siRNA grubu, N: Non-target siRNA grubu, K: Kontrol grubu



Şekil 39. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun MMP-9 protein ekspresyon düzeylerine etkisi.

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

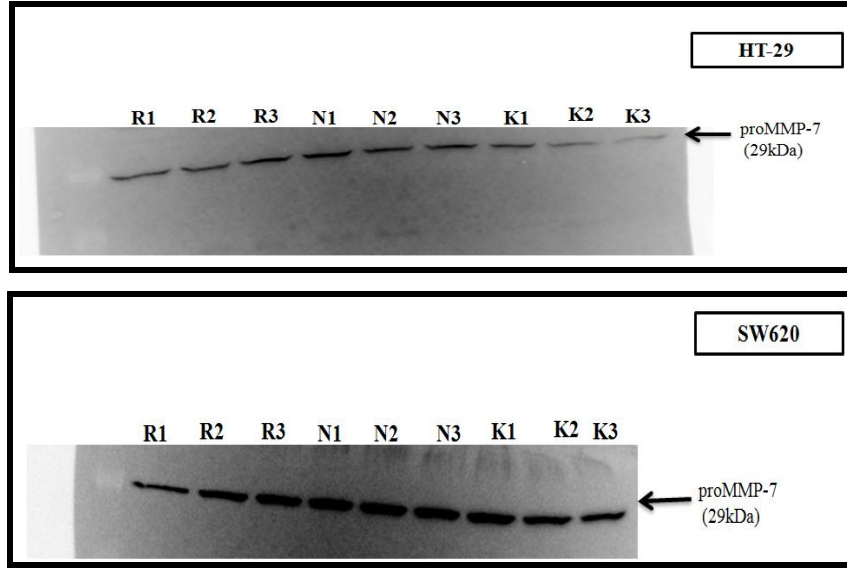
Tablo 37. Kolon kanser hücrelerinde MMP-9 protein ekspresyonu ait p değerleri.

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

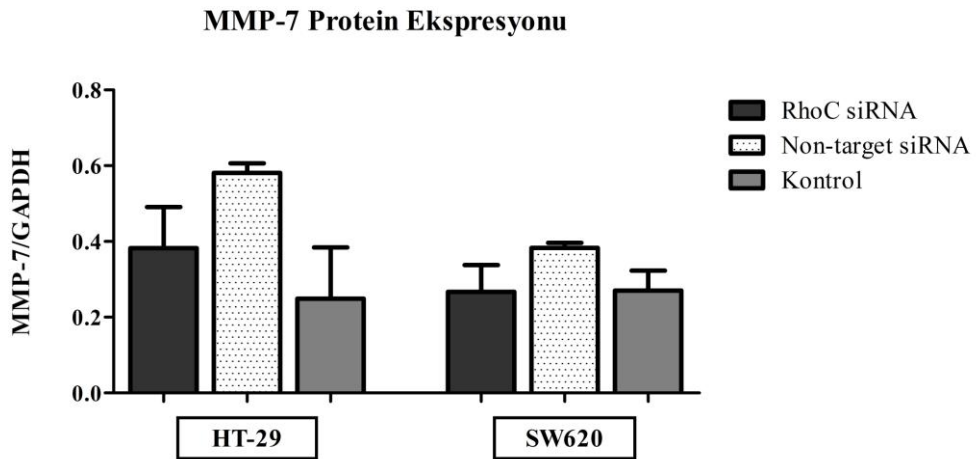
<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,3244
	R Grubu vs K Grubu	0,0511
	N Grubu vs K Grubu	0,0563

4.4.4 MMP-7 Protein Ekspresyonu

HCT116, SW480 ve LoVo hücrelerinde MMP-7'ye ait herhangi bir bant elde edilmedi. HT-29 ve SW620 hücrelerinde ise MMP-7 protein ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmedi. (Şekil 40, 41) (Tablo 38).



Şekil 40. Kolon kanser hücrelerinde MMP-7 protein ekspresyonuna ait western blot görüntüsü. R: RhoC siRNA grubu, N: Non-target siRNA grubu, K: Kontrol grubu



Şekil 41. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun MMP-7 protein ekspresyonu üzerine etkisi. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 38. Kolon kanser hücrelerinde MMP-7 protein ekspresyonu ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

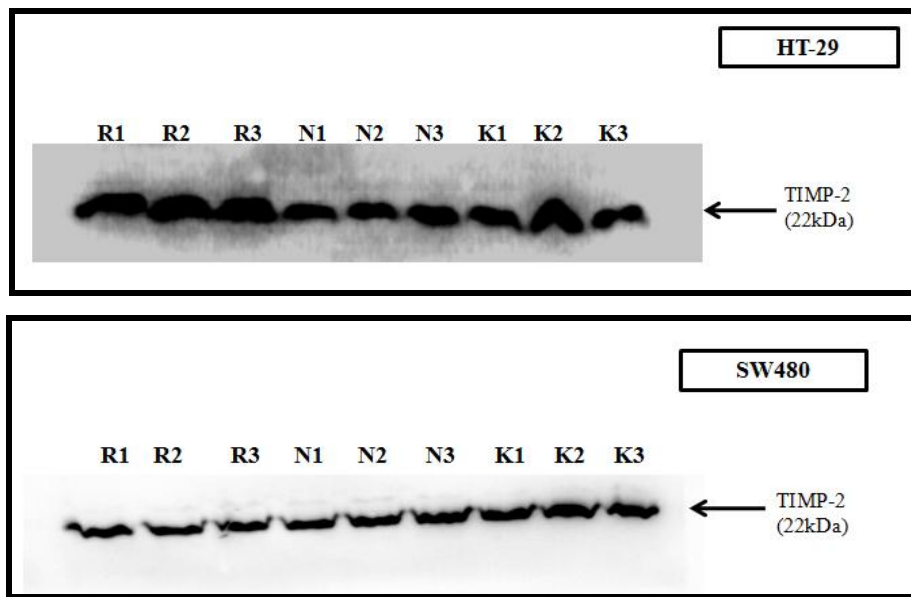
<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,1496
	R Grubu vs K Grubu	0,2402
	N Grubu vs K Grubu	0,0528
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,1828
	R Grubu vs K Grubu	0,9718
	N Grubu vs K Grubu	0,1064

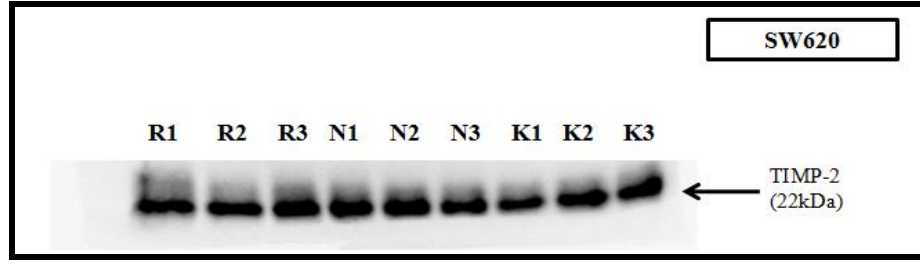
4.4.5 MMP-14 Protein Ekspresyonu

Kolon kanser hücrelerinde MMP-14 protein ekspresyonuna ait herhangi bir bant elde edilemediği için analizi yapılamadı.

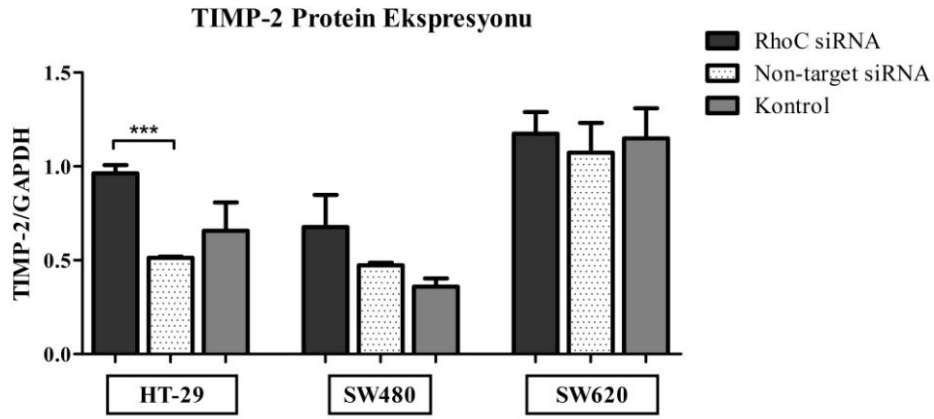
4.4.6 TIMP-2 Protein Ekspresyonu

RhoC gen ekspresyonunun susuturumu sonucu, HT-29 hücrelerinde RhoC siRNA grubunda Non-target siRNA ve Kontrol gruplarına göre TIMP-2 protein ekspresyon düzeyinde bir artış görülürken, SW480 ve SW620 hücrelerinde ise gruplar arasında herhangi bir fark belirlenmedi. HCT116 ve LoVo hücrelerinde ise TIMP-2'ye ait herhangi bir bant elde edilemedi (Şekil 42, 43) (Tablo 39).





Şekil 42. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun TIMP-2 protein ekspresyon düzeylerine etkisi. R: RhoC siRNA grubu, N: Non-target siRNA grubu, K: Kontrol grubu



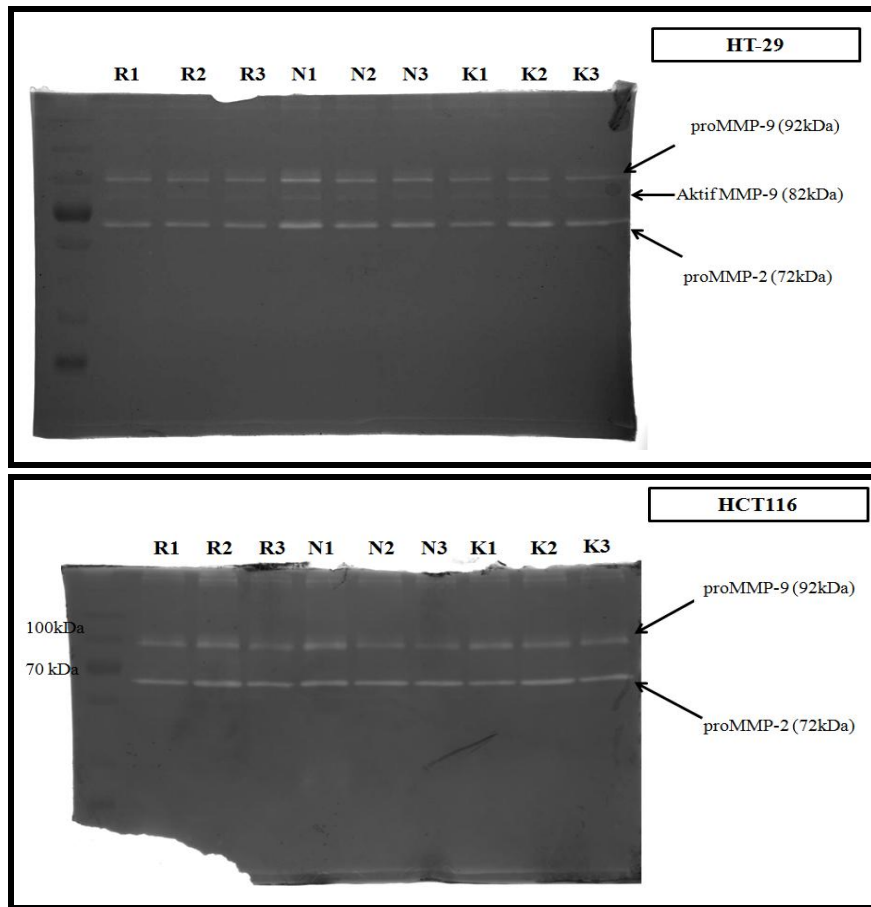
Şekil 43. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun TIMP-2 protein ekspresyonu üzerine etkisi. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

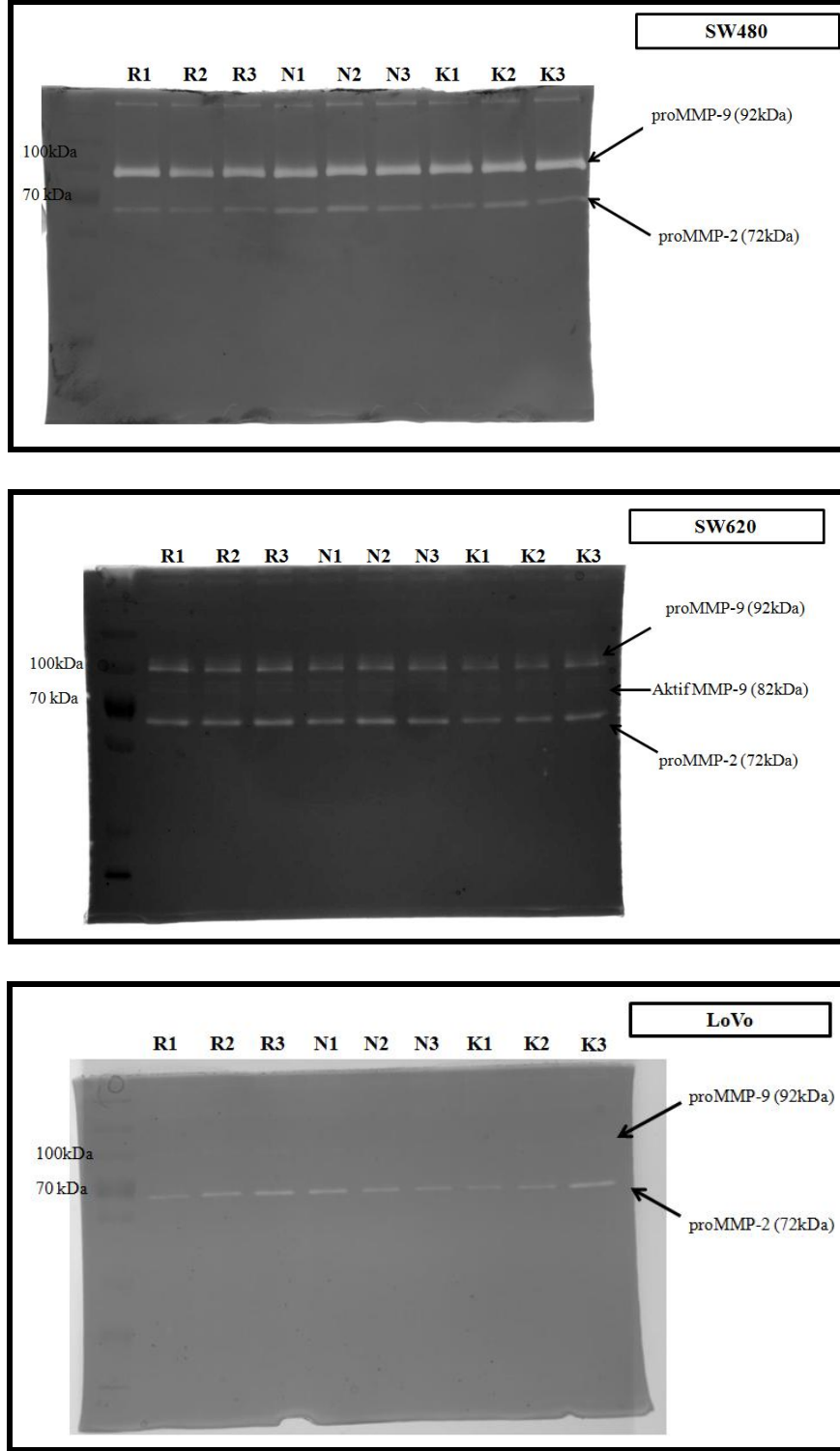
Tablo 39. Kolon kanser hücre hattında TIMP-2 protein ekspresyonu ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Gen Adı	Grup	p Değeri
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,0005***
	R Grubu vs K Grubu	0,1246
	N Grubu vs K Grubu	0,3993
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,3031
	R Grubu vs K Grubu	0,1438
	N Grubu vs K Grubu	0,0678
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,6133
	R Grubu vs K Grubu	0,9009
	N Grubu vs K Grubu	0,7398

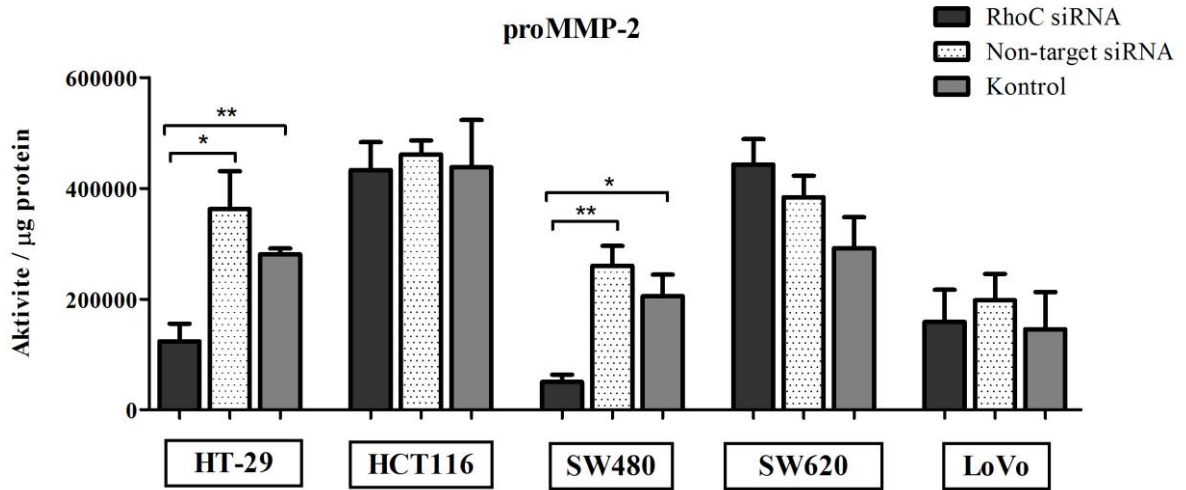
4.5 Jelatin Zimografi Sonuçları

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; HT-29 hücrelerinde hem proMMP-2 hem de proMMP-9 aktivitelerinde RhoC siRNA grubunda Non-target ve Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı görüldü. Aktif MMP-9 düzeyleri ise, RhoC grubunda Non-target grubuna göre yaklaşık 2 kat azalırken, Kontrol grubuna göre fark belirlenmedi. Buna ek olarak SW480 hücrelerinde proMMP-2 aktivite düzeyleri RhoC grubunda anlamlı olarak azalırken, proMMP-9 aktivite düzeyleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark belirlenmedi. SW620 hücrelerinde proMMP-9 düzeyleri RhoC grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, Non-target grubuna göre fark belirlenmedi. Burada negatif kontrole göre fark belirlenmemesi nedeniyle elde edilen bu veri anlamlı olarak değerlendirilmedi. Ek olarak, SW620 hücrelerinde proMMP-2 ve aktif MMP-9 açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. LoVo hücrelerinde proMMP-2 düzeyleri belirlenirken, proMMP-9 saptanmadı. Bu hücrelerde proMMP-2 düzeyleri gruplar arası anlamlı bir fark görülmedi. HCT-116 hücrelerinde ise proMMP-2 ve proMMP-9 düzeyleri açısından gruplar arası herhangi bir fark belirlenmedi (Şekil 44 - 47) (Tablo 40-42).





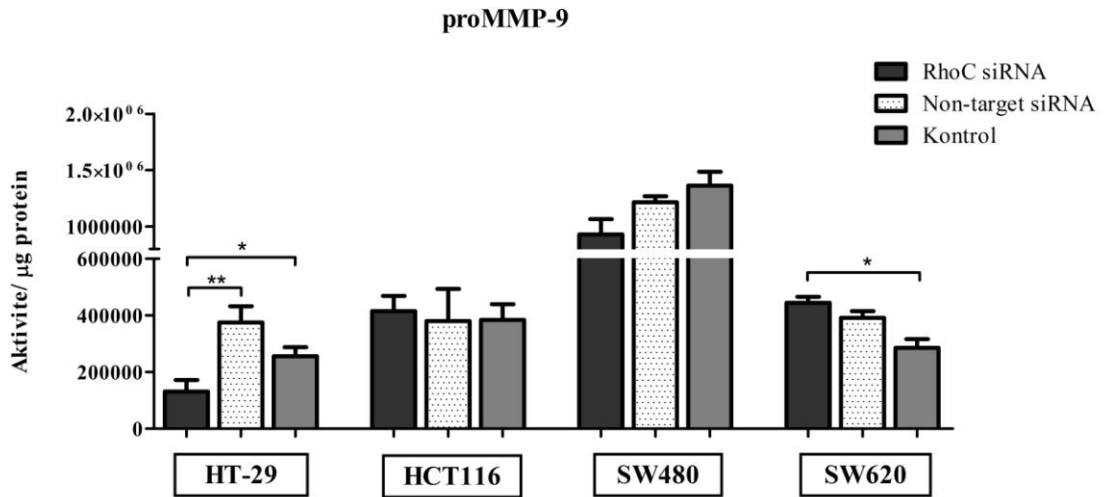
Şekil 44. Kolon kanser hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerine ait jelatin zimogram görüntüsü. R: RhoC siRNA grubu, N: Non-target siRNA grubu, K: Kontrol grubu.



Şekil 45. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun proMMP-2 aktivitesi üzerine etkisi. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 40. Kolon kanser hücrelerinde proMMP-2 aktivite düzeylerine ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

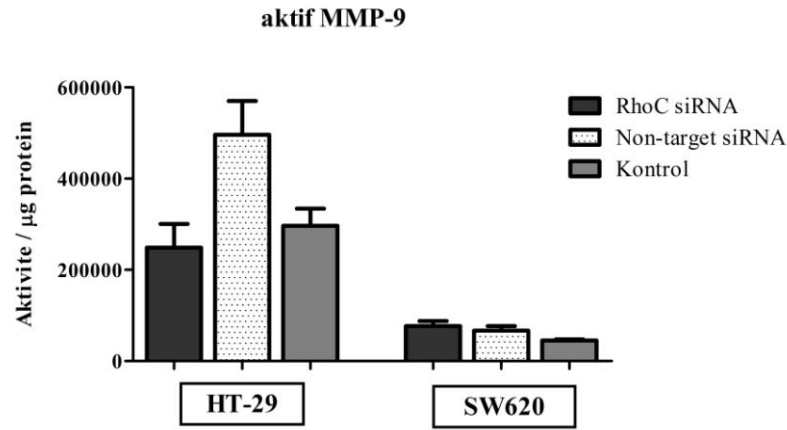
<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,0336*
	R Grubu vs K Grubu	0,0093**
	N Grubu vs K Grubu	0,3021
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,6425
	R Grubu vs K Grubu	0,9630
	N Grubu vs K Grubu	0,8067
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,0054**
	R Grubu vs K Grubu	0,0189*
	N Grubu vs K Grubu	0,3587
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,3785
	R Grubu vs K Grubu	0,1049
	N Grubu vs K Grubu	0,2512
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,6242
	R Grubu vs K Grubu	0,8888
	N Grubu vs K Grubu	0,5543



Şekil 46. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun proMMP-9 aktivitesi üzerine etkisi. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 41. Kolon kanser hücrelerinde proMMP-9 aktivite düzeylerine ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,0059**
	R Grubu vs K Grubu	0,0354*
	N Grubu vs K Grubu	0,0977
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,7966
	R Grubu vs K Grubu	0,7122
	N Grubu vs K Grubu	0,9781
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,1216
	R Grubu vs K Grubu	0,0768
	N Grubu vs K Grubu	0,3325
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,1694
	R Grubu vs K Grubu	0,0134*
	N Grubu vs K Grubu	0,0517



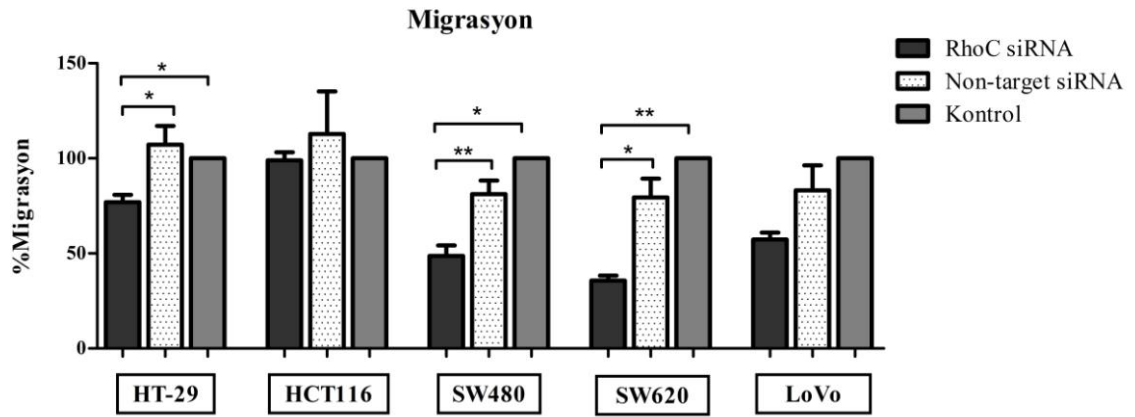
Şekil 47. Kolon kanser hücrelerinde RhoC siRNA susturumunun aktif MMP-9 aktivitesi üzerine etkisi. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 42. Kolon kanser hücrelerinde aktif MMP-9 aktivite düzeylerine ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,0520
	R Grubu vs K Grubu	0,4960
	N Grubu vs K Grubu	0,0735
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,5475
	R Grubu vs K Grubu	0,0535
	N Grubu vs K Grubu	0,1065

4.6 Hücre Migrasyonu ve Matrijel İnvazyon Sonuçları

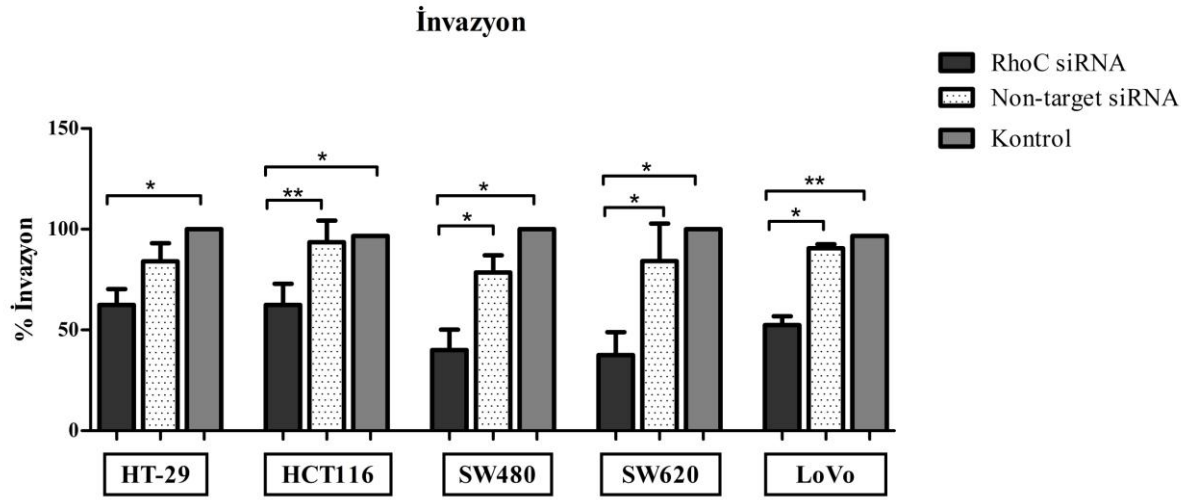
HT-29, SW480 ve SW620 hücrelerinde RhoC inhibe edilen grupta hücre migrasyonu Non-target ve Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azaldı. LoVo hücrelerinde de benzer şekilde migrasyon düzeylerinde ortalama %57 oranında azalma belirlendi. Ancak iki deneysel tekrar yapılması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi. HCT116 hücrelerinde ise gruplar arasında anlamlı fark belirlenmedi. Hücre invazyonları irdelendiğinde; HCT116, SW480, SW620 ve LoVo hücrelerinde hücre invazyonu RhoC siRNA transfekte edilen grupta Non-target ve Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azaldı. HT-29 hücrelerinde ise RhoC grubunda hücre invazyonu Kontrol grubuna göre anlamlı inhibe edilirken, Non-target grubuna göre %22 oranında bir azalma gösterdi (Şekil 49, 50) (Tablo 42, 43).



Şekil 48. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun hücre migrasyonu üzerindeki etkisi (Ortalama±Standart hata) İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 43. Kolon kanser hücrelerinde hücre migrasyonu denemesine ait p değerleri. İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,0378*
	R Grubu vs K Grubu	0,0271*
	N Grubu vs K Grubu	0,5437
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,6139
	R Grubu vs K Grubu	0,8306
	N Grubu vs K Grubu	0,6222
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,0021**
	R Grubu vs K Grubu	0,0114*
	N Grubu vs K Grubu	0,1161
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,0341*
	R Grubu vs K Grubu	0,0017**
	N Grubu vs K Grubu	0,1746
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,2248
	R Grubu vs K Grubu	0,0531
	N Grubu vs K Grubu	0,4206



Şekil 49. Kolon kanser hücrelerinde RhoC gen ekspresyonu sustrumunun hücre invazyonu üzerindeki etkisi (Ortalama±Standart hata)

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tablo 44. Kolon kanser hücrelerinde matrijel invazyon denemesine ait p değerleri.

İstatistiksel olarak anlamı: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

<i>Gen Adı</i>	<i>Grup</i>	<i>p Değeri</i>
HT-29	R Grubu vs N Grubu	0,2590
	R Grubu vs K Grubu	0,0405*
	N Grubu vs K Grubu	0,2175
HCT116	R Grubu vs N Grubu	0,0023**
	R Grubu vs K Grubu	0,0417*
	N Grubu vs K Grubu	0,7160
SW480	R Grubu vs N Grubu	0,0380*
	R Grubu vs K Grubu	0,0275*
	N Grubu vs K Grubu	0,1280
SW620	R Grubu vs N Grubu	0,0470*
	R Grubu vs K Grubu	0,0317*
	N Grubu vs K Grubu	0,4849
LoVo	R Grubu vs N Grubu	0,0233*
	R Grubu vs K Grubu	0,0023**
	N Grubu vs K Grubu	0,2860

5. TARTISMA

Bu çalışmada primer (HT-29, HCT116 ve SW480) ve metastatik (SW620 ve LoVo) kolon kanser hücrelerinde, metastazla yüksek korelasyon gösteren RhoC ile kolorektal kanser metastazına önemli katkıları olan MMP'ler arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu amaçla kolon kanser hücrelerinde RhoC ekspresyonu siRNA transfeksiyonu ile susturuldu ve RhoC baskılanmasının MMP ekspresyon/salınım/aktivite düzeyleri üzerindeki etkileri araştırıldı. Ek olarak, RhoC downregüle edilen hücrelerin migrasyon ve invazyon yeteneklerindeki değişim incelendi.

Bir kanser hücresinin sekonder bir bölgede kolonize olması için "invazyon-metastaz kaskadı" adı verilen ardışık bir seri adımları tamamlaması gerekir. Bu kaskad ilk olarak bazal membran ve çevre dokudan lokal invazyonlar ile başlar ve kanser hücrelerinin yakınındaki kan veya lenfatik damarlara intravazasyonu ile devam eder. Ardından bu damarlar aracılığı ile uzak bölgelere taşınma, damar lümeninden uzak dokunun parenkimasına ekstravazasyonu, küçük nodüllerin oluşması (mikrometastazlar) ve son olarak mikrometastatik lezyonların makroskopik tümörlere büyümesi (bu adım kolonizasyon olarak bilinir) ile son bulur (166).

Çalışmamızda 5nM RhoC siRNA transfeksiyonu yapılan primer (HT-29, HCT116, SW480) ve metastatik (SW620, LoVo) kolon kanser hücrelerinde RhoC mRNA ve protein ekspresyonlarının anlamlı olarak baskılandığını gösterdik. RhoC susturumu sonrası, Real Time PCR çalışmalarında, ROCK-I, mDia, MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-14, TIMP- 1 ve TIMP-2 mRNA ekspresyon düzeyleri incelendi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, RhoC baskılanan hücrelerde, Rho proteinlerinin alt akım efektör molekülleri olan ROCK-I ve mDia mRNA ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir etki görülmedi. HT-29 hücrelerinde RhoC susturumu sonucunda TIMP-2 mRNA ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak arttığı, MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerinin ise yaklaşık 2 kat oranında azaldığı belirlendi. HCT116 hücrelerinde ise MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı, TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin ise yaklaşık 2 kat oranında arttığı belirlendi. Ancak diğer hücre hatlarında incelenen genler açısından herhangi bir fark belirlenmedi.

Western blot çalışmalarında ise, RhoC siRNA transfeksiyonu sonrası MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14 ve TIMP-2 protein ekspresyon düzeyleri incelendi. Real Time PCR sonuçları ile uyumlu olarak HT-29 hücrelerinde RhoC siRNA transfeksiyonu yapılan grupta

TIMP-2 protein ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış belirlendi. Diğer hücre hatlarında ise incelenen proteinler açısından herhangi bir etki görülmedi.

Jelatin zimografi salınan MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerini incelemek amacıyla kullanılan Western blot tekniğine kıyasla oldukça duyarlı bir tekniktir (167). Jelatin zimogram jeller analiz edildiğinde, RhoC inhibe edilen HT-29 hücrelerinde hem proMMP-2 hem de proMMP-9 aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi. Aktif MMP-9 düzeylerinin de azaldığı görüldü ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Buna ek olarak, SW480 hücrelerinde RhoC-downregüle edilen grupta proMMP-2 aktivite düzeyleri anlamlı olarak azalırken, proMMP-9 aktivite düzeyleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark belirlenmedi. Diğer kolon kanser hücrelerinde ise MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi açısından herhangi bir fark elde edilmedi.

RhoC baskılanmasının hücre migrasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde; HT-29, SW480, SW620 ve LoVo hücrelerinin motilitesinin azaldığı görüldü. Ancak HCT116 hücrelerinde herhangi bir etki belirlenmedi. Ek olarak, RhoC inhibisyonu sonucunda HT-29, HCT116, SW480, SW620 ve LoVo kolon kanser hücrelerinin invazyon yeteneklerinin baskılandığı belirlendi.

Erişilebilir literatür incelendiğinde; kolorektal kanserde RhoC mRNA ve protein düzeylerini inceleyen üç yayın bulunmaktadır. Bellocin ve ark.larının yaptığı çalışmada, 566 kolorektal tümör ve eşlenik normal doku örneklerinde immünohistokimya yöntemi ile RhoC protein ekspresyon düzeyleri incelendi. Bu çalışmada hastaların %29,3'ünde herhangi bir RhoC pozitifitesi belirlenmemiştir. Bunun yanında hastaların %35'inde düşük, %23,7'sinde orta, %12'sinde ise yüksek düzeyde RhoC ekspresyonunun olduğu görüldü. Normal dokularda ise herhangi bir Rho boyaması belirlenmedi. Ayrıca artmış RhoC ekspresyonu ile azalmış sağkalım arasında anlamlı korelasyon belirlediler ve bu nedenle RhoC'nin prognostik bir belirteç ve terapötik hedef olabileceğini öngördüler. Bu çalışmada ayrıca kolon karsinom hücrelerinde (LIM 1862) RhoC ekspresyonu ve aktivasyonunun EMT tarafından uyarıldığı ve RhoC ekspresyonunun Ets-1 transkripsiyon faktörü tarafından regüle edildiği gösterildi (168). Wang ve ark.ları 68 kolorektal kanser hastasından alınan dokularda RhoC mRNA düzeylerini Real Time PCR ile inceleyerek tümör dokularında arttığını belirlemişlerdir (169). Wang ve ark. takip eden çalışmalarında, kolorektal tümör dokularında eşlenik normal dokulara kıyasla miR-10b mRNA ekspresyonunun anlamlı arttığını ve ileri evre ile ilişkili olduğunu gösterdiler. Aynı zamanda RhoC mRNA ve protein ekspresyonunun tümör dokularında

anlamli olarak arttığını belirlediler. miR-10b ve RhoC düzeyleri lenf nodu metastazı olan tümör dokularında lenf nodu olmayan dokulara göre arttığını ortaya koydular (170). Laboratuvarımızda daha önce yaptığımız bir çalışmada, 23 kolorektal tümör ve eşlenik normal dokularında RhoC mRNA ve protein ekspresyonu açısından anlamlı bir fark belirlenmedi. Ancak Wang ve ark.'nın çalışması ile uyumlu olarak RhoC protein ekspresyon düzeyleri ile lenfatik invazyon varlığı arasında pozitif korelasyon belirlendi (171).

RhoC'nin kolon kanser hücre invazyonu üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışma ile karşılaşılmıştır. Bu çalışmada HCT116 hücreleri RhoA ve RhoC shRNA taşıyan rekombinant adenovirüs ile transfekte edilmiştir. Böylelikle bu hücrelerde hem RhoA hem de RhoC ekspresyonunun bloke edildiği gösterilmiş ve bu blokasyon sonucunda HCT116 hücrelerin invazyonunda anlamlı baskılanma olduğu belirlenmiştir (172). Bu çalışma, HCT116 hücrelerinde RhoC siRNA transfeksiyonunun ardından invazyonun baskılandığını gösteren sonuçlarımızı desteklemektedir.

Her ne kadar yapılan araştırmalarda RhoC'nin metastaz süreci ile ilişkili olduğu belirlense de RhoC'nin metastatik süreçteki etki mekanizması henüz net olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan araştırmalarda RhoC ve MMP'ler arasında bir ilişki olabileceği öngörülmektedir. Bazal membran ve ekstrasellüler matriksin yıkımında görev alan MMP'ler, "invazyon-metastaz kaskadı"nın ilk adımına katkıda bulunarak tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyon potansiyelini arttıırırlar (173).

Literatürde kanser invazyonu ve metastazında RhoC'nin MMP ve TIMP proteinleri üzerine direkt etkisini inceleyen çok az sayıda makale bulunmaktadır. Ikoma ve ark. RhoC aşırı eksprese eden Lewis akciğer kanser hücrelerinde MMP-2, MMP-9, MMP-14 ve TIMP-2 mRNA düzeylerinin ve invazyonun arttığını, buna karşılık dominant negatif Rho verilen (Rho proteinlerinin baskılandığı) hücrelerde ise bu düzeylerin ve invazyonun anlamlı olarak baskılandığını tespit ettiler. Ayrıca farelerin sol akciğerlerine RhoC aşırı eksprese eden Lewis akciğer kanser hücrelerinin enjeksiyonu sonrası mediastinal lenf nodu metastazının arttığını gösterdiler. Zimografik analizlerde pro MMP-2, pro MMP-9 ve aktif MMP-2 düzeylerinin RhoC aşırı eksprese edilen grupta arttığını, RhoC baskılanan grupta ise azaldığını belirlediler. Tüm bu sonuçlar sonucunda RhoC'nin transkripsiyonel ve/veya enzimatik süreçte MMP'leri up-regüle ederek Lewis akciğer kanser hücrelerinin invazif kapasitesinin artmasına neden olduğunu ileri sürdüler (174). Başka bir çalışmada ise, RhoC aşırı eksprese eden özofajiyal squamöz karsinoma hücrelerinde *in vitro* hücre migrasyonun arttığı, bu hücrelerin nude

farelere verilmesi sonucunda tümör hücrelerinde MMP-1 ve MMP-9 proteinlerinde güçlü reaktivite, TIMP-3 ekspresyonunda ise kayıp olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada uygulanan deneysel metastaz modelinde ise RhoC'nin akciğer metastazını indüklediği gösterilmiştir (175). Xue ve ark. ise; hem RhoC siRNA transfeksiyonu yapılan hem de ROCK inhibitörü olan Y-27632 ile muamele edilen hepatosellüler karsinom hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 mRNA ve protein ekspresyonlarının azaldığını göstermiş ve bu nedenle aktif Rho sinyal yollarının MMP ekspresyonunu tetikleyebileceğini öngörmüştür (176). Tsuji ve ark.'nın çalışmasında, RhoC'nin RhoA'dan daha etkili bir şekilde ROCK ile etkileştiği ve epitel hücrelerin adheran bağlantıların parçalanmasını kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (177). ROCK'ın tercihlili olarak RhoC'ye bağlanması nedeniyle, *in vivo*'da RhoC aracılı tümör invazyon mekanizması, hücre-hücre bağlantısının ROCK aracılı parçalanması, ROCK-bağımlı transmigrasyonu ve tümör hücrelerinin ameboid hareketi ile kısmen açıklanmaktadır. Vishnubhotla ve ark. non-malign (NCM460 ve IEC-6) ve malign (Caco-2 E, SW620 ve HCT-116) kolon kanser hücrelerini tip I kollajen üzerinde kültüre ettiler. Transmisyon elektron mikroskopisi sonuçlarına göre MMP-2, MMP-9 ve MMP-13'ün ROCK-II ile birlikte invadopodia bölgesinde kolokelize olduğunu gösterdiler. Ardından ROCK-II'nin siRNA ile baskılanması sonucunda SW620 ve HCT116 hücrelerinde invazyonun baskılandığı belirlendi. Bununla birlikte ELISA Activity Assay kit ile yaptıkları analizlerde malign kolon kanser hücrelerinde MMP-2 ve MMP-13 aktivitelerinin azaldığını gösterdiler (178). Bu veriler ile elde ettiğimiz sonuçlar beraber değerlendirildiğinde, RhoC'nin ROCK aktivitesi üzerinden MMP aktivitesini regüle edebileceği düşünülmektedir. Zhao ve ark.'nın yaptığı bir diğer çalışmada epitelyal over kanser dokularında RhoC ekspresyonu ve MMP-9 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon olduğu, bununla birlikte over kanser hücrelerinde RhoC ekspresyonunun siRNA ile baskılanması sonucunda MMP-9 ekspresyonunun da baskılandığı ileri sürülmüştür (179). 2015 yılında yapılan son araştırmada ise, RhoC susturulan hepatosellüler karsinom hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 protein ekspresyon düzeylerinin baskılandığı ve bu baskılanmanın Rapamisin ile daha da arttığı gösterilmiştir (180).

Erişilebilir literatür incelendiğinde, primer ve metastatik kolon kanser hücrelerinde RhoC'nin MMP/TIMP proteinleri ve migrasyon/invazyon üzerindeki etkileri ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. Çalışmamızda HT-29, HCT116 ve SW480 primer kolon kanser hücre hatlarında RhoC'nin MMP ekspresyon/salınım/aktivite düzeylerini arttırıcı yönde etkileri olduğunu gösterdik. Buna karşılık metastatik kolon kanser hücre hattı olan SW620 ve

LoVo hücrelerinde RhoC'nin MMP ekspresyon/aktivite/salınım üzerinde etkisinin olmadığını belirledik. Sonuç olarak, primer kolon hücre hatlarında MMP-bağımlı olarak, metastatik kolon hücre hatlarında ise MMP-bağımsız olarak RhoC'nin migrasyon ve invazyon yeteneklerini arttığını saptadık.

Sonuç olarak elde ettiğimiz verilerin ileride tümör metastazının önlenmesi amacıyla; özellikle Evre I ve II olgularında, hem MMP aktivitesinin hem de RhoC sinyal yollarının baskılanmasını hedef alan, antimetastatik özellikte yeni terapötik ajanların geliştirilmesine katkı sağlayacağını öngörmekteyiz.

6. SONUC VE ÖNERİLER

1. Çalışmalarımız primer (HT-29, HCT116 ve SW480) ve metastatik (SW620 ve LoVo) kolon kanser hücre hatlarında gerçekleştirildi.
2. Bu hücre hatlarında, RhoC gen ekspresyonu siRNA transfeksiyonu ile susturuldu
3. HT-29 hücrelerinde RhoC baskılanması sonucunda TIMP-2 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak arttığı, MMP-9 mRNA ekspresyon düzeylerinin ise azaldığı belirlendi. Bu verilere paralel olarak proMMP-2, proMMP-9 ve aktif MM-9 düzeyleri RhoC inhibe edilen grupta azaldı. Tüm bu etkilerin bir sonucu olarak, HT-29 hücrelerinin hem motilite hem de invazyon yetenekleri baskılandı.
4. HCT116 hücrelerinde RhoC siRNA transfeksiyonu sonrası MMP-9 mRNA ekspresyon düzeyleri azalırken, TIMP-1 mRNA ekspresyon düzeylerinde artış saptandı. Ancak diğer genlerde ve MMP-2/MMP-9 aktivitelerinde herhangi bir etki görülmedi. Ayrıca RhoC baskılanmasının hücre migrasyonun üzerine herhangi bir etkisi belirlenmezken, invazyon düzeylerini azalttığı belirlendi.
5. SW480 hücrelerinde ise, RhoC inhibe edilen grupta proMMP-2 düzeylerinin düştüğü ancak proMMP-9 düzeylerinin diğer gruplara göre değişmediği görüldü. Bu hücrelerin invazyon ve migrasyon yetenekleri ise anlamlı olarak baskılandı.
6. SW620 ve LoVo hücreleri incelendiğinde ise, RhoC baskılanmasının sadece hücre motilitesini ve invazyonunu azalttığı, ancak MMP ekspresyon ve aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı belirlendi.

7. RhoC susturumu sonrası elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

RHOC SUSTURUMU SONUCUNDA					
PARAMETRELER	HT-29	HCT116	SW480	SW620	LoVo
TIMP-2					
mRNA ve protein ekspresyon düzeyi	Arttı	Değişmedi	Değişmedi	Değişmedi	Değişmedi
MMP-9					
mRNA ekspresyon düzeyi	Azaldı	Azaldı	Değişmedi	Değişmedi	Değişmedi
TIMP-1					
mRNA ekspresyon düzeyi	Değişmedi	Arttı	Değişmedi	Değişmedi	Değişmedi
ProMMP-2					
aktivite düzeyleri	Azaldı	Değişmedi	Azaldı	Değişmedi	Değişmedi
ProMMP-9					
aktivite düzeyleri	Azaldı	Değişmedi	Değişmedi	Değişmedi	Yok
Aktif MMP-9					
aktivite düzeyleri	Azaldı	Yok	Değişmedi	Yok	Yok
Hücre Migrasyonu	Azaldı	Değişmedi	Azaldı	Azaldı	Azaldı
Hücre İnvazyonu	Azaldı	Azaldı	Azaldı	Azaldı	Azaldı

- Özellikle HCT116, HT-29 ve LoVo hücrelerinde belirlenen, istatistiksel olmayan farkların anlamlı olup olmadığını irdelemek amacıyla deneysel tekrar sayılarının arttırılması gerektiği öngörüldü.
- Çalışmamızda detekte edilemeyen MMP'lerin ekspresyon düzeylerini belirlemek amacıyla immunfloresan mikroskopisi, immünpresipitasyon, ELISA gibi teknikler kullanarak ekspresyon çalışmalarını genişletmeyi hedeflemekteyiz.
- RhoC ve MMP ilişkisi belirlediğimiz hücre hatlarında RhoC'yi aşırı eksprese ettirerek, elde ettiğimiz sonuçların doğruluğunu göstermeyi hedeflemekteyiz.
- Kolon kanser hücrelerinde RhoC ve ekstrasellüler proteolizden sorumlu MMP'ler arasındaki ilişkiyi tanımlayan ve kolon kanser hücre invazyonu ve migrasyonundaki etkisini araştıran ilk çalışma niteliğine sahiptir.
- Sonuç olarak elde ettiğimiz verilerin ileride tümör metastazının önlenmesi amacıyla; özellikle Evre I ve II olgularında, hem MMP aktivitesinin hem de RhoC sinyal yollarının baskılanmasını hedef alan, antimetastatik özellikte yeni terapötik ajanların geliştirilmesine katkı sağlayacağını öngörmekteyiz.

- 13.** RhoC sinyal yolaklarının baskılanmasına dayalı geliştirilebilecek yeni terapötik ajanların patentleri alındığı takdirde metastatik kolorektal kanser tedavisine yönelik klinik araştırmalarda kullanılabilme olasılığı doğacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Torre L, Siegel R, Jemal A. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. American Cancer Society; 2015; 1-61.
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute, 2015; http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012.
3. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. Nat Rev Cancer, 2004; 4(10): 769-780.
4. Leslie H. Sobin, Mary K. Gospodarowicz, Christian Wittekind. TNM Classification of Malignant Tumours. 7th Edition. Wiley-Blackwell. 2009; 1-336.
5. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. Journal of Pathology and Bacteriology, 1932;35(3): 323 - 332.
6. Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. Dig Liver Dis, 2001; 33(4): 372-388.
7. <http://cancer.nmsu.edu/che/che.shtml>.
8. Kheirelseid, E. , Miller, N. and Kerin, M. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. Am J of Mol Biol, 2013; 3: 72-80.
9. Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. Nat Rev Cancer, 2005; 5(3): 199-209.
10. Rudmik LR, Magliocco AM. Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. J Surg Oncol, 2005; 92(4): 347-359.
11. Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. Biochim Biophys Acta, 2009; 1796(2): 293-308.
12. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2011; 61(2): 69-90.
13. Song X, Zhao Z, Barber B, Gregory C, et al. Characterizing medical care by disease phase in metastatic colorectal cancer. Am J Manag Care, 2011; 17 Suppl 5 Developing: SP20-25.
14. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2006.

15. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005; 21: 247-269.
16. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*, 2004; 116(2): 167-179.
17. Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell*, 1985; 41(1): 31-40.
18. Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res*, 2004; 301(1): 43-49.
19. Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*, 2008; 582(14): 2093-2101.
20. Adamson P, Paterson HF, Hall A. Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol*, 1992; 119(3): 617-627.
21. Zheng Y. Dbp family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci*, 2001; 26(12): 724-732.
22. Moon SY, Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*, 2003; 13(1): 13-22.
23. DerMardirossian C, Bokoch GM. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol*, 2005; 15(7): 356-363.
24. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, et al. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J*, 1996; 15(9): 2208-2216.
25. Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, et al. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J*, 1997; 16(11): 3044-3056.
26. Goode BL, Eck MJ. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*, 2007; 76: 593-627.
27. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003; 4(6): 446-456.
28. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009; 10(11): 778-790.
29. Hartshorne DJ, Hirano K. Interactions of protein phosphatase type 1, with a focus on myosin phosphatase. *Mol Cell Biochem*, 1999; 190(1-2): 79-84.

30. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 1996; 273(5272): 245-248.
31. Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, et al. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*, 1998; 393(6687): 805-809.
32. Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 2009; 28(1-2): 65-76.
33. Klein EA, Yang C, Kazanietz MG, Assoian RK. NFkappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. *Cell Cycle*, 2007; 6(9): 1115-1121.
34. Villalonga P, Ridley AJ. Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors*, 2006; 24(3): 159-164.
35. Villalonga P, Guasch RM, Riento K, Ridley AJ. RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol*, 2004; 24(18): 7829-7840.
36. Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2009; 1796(2): 91-98.
37. Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, 1995; 81(7): 1159-1170.
38. Debidda M, Wang L, Zang H, Poli V, et al. A role of STAT3 in Rho GTPase-regulated cell migration and proliferation. *J Biol Chem*, 2005; 280(17): 17275-17285.
39. Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev*, 1997; 11(4):463-75.
40. Croft DR, Olson MF. Transcriptional regulation of Rho GTPase signaling. *Transcription*, 2011; 2(5): 211-215.
41. Prendergast GC. Farnesyltransferase inhibitors define a role for RhoB in controlling neoplastic pathophysiology. *Histol Histopathol*, 2001; 16(1): 269-275.
42. Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*, 2004; 377(Pt 2): 327-337.
43. Czuchra A, Wu X, Meyer H, van Hengel J, et al. Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell*, 2005; 16(10): 4473-4484.

44. Aronheim A, Broder YC, Cohen A, Fritsch A, et al. Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol*, 1998; 8(20): 1125-1128.
45. Gomez del Pulgar T, Benitah SA, Valeron PF, Espina C, et al. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays*, 2005; 27(6): 602-613.
46. Gouw LG, Reading NS, Jenson SD, Lim MS, et al. Expression of the Rho-family GTPase gene RHOF in lymphocyte subsets and malignant lymphomas. *Br J Haematol*, 2005; 129(4): 531-533.
47. Huang M, Prendergast GC. RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol*, 2006; 21(2): 213-218.
48. Hakem A, Sanchez-Sweatman O, You-Ten A, Duncan G, et al. RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev*, 2005; 19(17): 1974-1979.
49. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol*, 1993; 9: 541-573.
50. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, 2003; 160(2): 267-277.
51. Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*, 2003; 5(8): 711-719.
52. Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, et al. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol*, 2006; 16(15): 1515-1523.
53. Brabek J, Mierke CT, Rosel D, Vesely P, et al. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Commun Signal*, 2010; 8: 22.
54. Carragher NO, Walker SM, Scott Carragher LA, Harris F, et al. Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene*, 2006; 25(42): 5726-5740.

55. Gehler S, Baldassarre M, Lad Y, Leight JL, et al. Filamin A-beta1 integrin complex tunes epithelial cell response to matrix tension. *Mol Biol Cell*, 2009; 20(14): 3224-3238.
56. Giannone G, Sheetz MP. Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol*, 2006; 16(4): 213-223.
57. Mohl C, Kirchgessner N, Schafer C, Kupper K, et al. Becoming stable and strong: the interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2009; 66(6): 350-364.
58. Peyton SR, Kim PD, Ghajar CM, Seliktar D, et al. The effects of matrix stiffness and RhoA on the phenotypic plasticity of smooth muscle cells in a 3-D biosynthetic hydrogel system. *Biomaterials*, 2008; 29(17): 2597-2607.
59. Taddei ML, Giannoni E, Comito G, Chiarugi P. Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer Lett*, 2013; 341(1): 80-96.
60. Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2(2): 133-142.
61. Suwa H, Ohshio G, Imamura T, Watanabe G, et al. Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer*, 1998; 77(1): 147-152.
62. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, 2000; 406(6795): 532-535.
63. Pille JY, Denoyelle C, Varet J, Bertrand JR, et al. Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Ther*, 2005; 11(2): 267-274.
64. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 2007; 449(7163): 682-688.
65. Nakayama I, Shibazaki M, Yashima-Abo A, Miura F, et al. Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells. *Int J Oncol*, 2013; 43(1): 63-71.
66. Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinase function. *Biochem Soc Symp*, 2003; (70): 1-14.
67. Gomis-Ruth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol*, 2003; 24(2): 157-202.

68. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1999; 43 Suppl: S42-51.
69. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*, 1999; 13(1): 35-48.
70. Yu WH, Woessner JF, Jr., 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(3): 307-323.
71. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001; 17: 463-516.
72. Lafleur MA, Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert Rev Mol Med*, 2003; 5(23): 1-39.
73. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, et al. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*, 2003; 253(1-2): 269-285.
74. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, et al. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein*, 1996; 49(1-3): 138-162.
75. Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, 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(17): 6322-6327.
76. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*, 2007; 211(1): 19-26.
77. 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 U S A*, 1990; 87(14): 5578-5582.
78. Fu X, Parks WC, Heinecke JW. Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin Cell Dev Biol*, 2008; 19(1): 2-13.
79. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*, 1995; 375(6528): 244-247.

80. Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, et al. 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(1): 101-104.
81. 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(3): 675-681.
82. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*, 1997; 378(3-4): 151-160.
83. Han YP, Yan C, Zhou L, Qin L, et al. A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem*, 2007; 282(17): 12928-12939.
84. Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura 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(12): 2707-2710.
85. Kinoshita T, Sato H, Takino T, Itoh M, et al. Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res*, 1996; 56(11): 2535-2538.
86. Butler GS, Will H, Atkinson SJ, Murphy G. Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem*, 1997; 244(2): 653-657.
87. Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, et al. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res*, 1999; 59(11): 2570-2576.
88. Velasco G, Cal S, Merlos-Suarez A, Ferrando AA, et al. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res*, 2000; 60(4): 877-882.
89. Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, et al. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem*, 1998; 273(2): 871-880.

90. Hernandez-Barrantes S, Shimura Y, Soloway PD, Sang QA, et al. Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 281(1): 126-130.
91. Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, 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(16): 12080-12089.
92. 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(4): 464-472.
93. Kim KH, Burkhart K, Chen P, Frevert CW, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 deficiency amplifies acute lung injury in bleomycin-exposed mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005; 33(3): 271-279.
94. Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, et al. 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(12): 9352-9360.
95. Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer*, 2003; 89(10): 1817-1821.
96. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, 2001; 107(6): 789-800.
97. Mott JD, Thomas CL, Rosenbach MT, Takahara K, et al. Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. *J Biol Chem*, 2000; 275(2): 1384-1390.
98. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100(1): 57-70.
99. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 1997; 89(17): 1260-1270.
100. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2(3): 161-174.

101. Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, et al. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*, 1997; 277(5323): 225-228.
102. Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, et al. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol*, 2000; 148(3): 615-624.
103. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol*, 2001; 153(5): 893-904.
104. Birchmeier C, Birchmeier W, Brand-Saberi B. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat (Basel)*, 1996; 156(3): 217-226.
105. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature*, 2005; 436(7047): 123-127.
106. Illman SA, Lehti K, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J Cell Sci*, 2006; 119(Pt 18): 3856-3865.
107. Nakahara H, Howard L, Thompson EW, Sato H, et al. Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94(15): 7959-7964.
108. Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis*, 1999; 17(4): 315-323.
109. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, et al. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med*, 1996; 2(4): 461-462.
110. Lochter A, Sternlicht MD, Werb Z, Bissell MJ. The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*, 1998; 857: 180-193.
111. Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol*, 2003; 12(2): 109-125.
112. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 2004; 1705(2): 69-89.

113. Wagenaar-Miller RA, Gorden L, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev*, 2004; 23(1-2): 119-135.
114. Ala-aho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. *Biochimie*, 2005; 87(3-4): 273-286.
115. Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie*, 2005; 87(3-4): 307-314.
116. Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, et al. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 2014; 5(9): 2736-2749.
117. van den Oord JJ, Paemen L, Opdenakker G, de Wolf-Peeters C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol*, 1997; 151(3): 665-670.
118. Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, et al. Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis*, 1999; 17(2): 177-181.
119. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, et al. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*, 1998; 58(5): 1048-1051.
120. Sternlicht MD, Lochter A, Sympton CJ, Huey B, et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*, 1999; 98(2): 137-146.
121. Ha HY, Moon HB, Nam MS, Lee JW, et al. Overexpression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 gene induces mammary gland abnormalities and adenocarcinoma in transgenic mice. *Cancer Res*, 2001; 61(3): 984-990.
122. Hadler-Olsen E, Winberg JO, Uhlin-Hansen L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumour Biol*, 2013; 34(4): 2041-2051.
123. Chan CC, Menges M, Orzechowski HD, Orendain N, et al. Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis*, 2001; 16(3): 133-140.
124. Malhotra S, Newman E, Eisenberg D, Scholes J, et al. Increased membrane type 1 matrix metalloproteinase expression from adenoma to colon cancer: a possible mechanism of neoplastic progression. *Dis Colon Rectum*, 2002; 45(4): 537-543.

125. Pesta M, Holubec L, Jr., Topolcan O, Cerna M, et al. Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res*, 2005; 25(5): 3387-3391.
126. Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH, Matrisian LM. Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Mol Carcinog*, 1994; 10(4): 199-206.
127. Bendardaf R, Lamlum H, Vihinen P, Ristamaki R, et al. Low collagenase-1 (MMP-1) and MT1-MMP expression levels are favourable survival markers in advanced colorectal carcinoma. *Oncology*, 2003; 65(4): 337-346.
128. 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(12): 3133-3140.
129. Garcia-Albeniz X, Pericay C, Alonso-Espinaco V, Alonso V, et al. Serum matrilysin correlates with poor survival independently of KRAS and BRAF status in refractory advanced colorectal cancer patients treated with irinotecan plus cetuximab. *Tumour Biol*, 2011; 32(2): 417-424.
130. Hilska M, Roberts PJ, Collan YU, Laine VJ, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2007; 121(4): 714-723.
131. Herszenyi L, Sipos F, Galamb O, Solymosi N, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in the normal mucosa-adenoma-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the colon. *Pathol Oncol Res*, 2008; 14(1): 31-37.
132. Buhmeida A, Bendardaf R, Hilska M, Collan Y, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in stage II colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer*, 2009; 40(3-4): 91-97.
133. Chu D, Zhao Z, Zhou Y, Li Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 2012; 19(1): 318-325.
134. Collins HM, Morris TM, Watson SA. Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors

- of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer*, 2001; 84(12): 1664-1670.
135. Parsons SL, Watson SA, Collins HM, Griffin NR, et al. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy. *Br J Cancer*, 1998; 78(11): 1495-1502.
 136. Matsuyama Y, Takao S, Aikou T. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol*, 2002; 80(2): 105-110.
 137. Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, et al. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94(4): 1402-1407.
 138. Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Arimura Y, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers. *Int J Cancer*, 2001; 95(5): 290-294.
 139. Pesta M, Topolcan O, Holubec L, Jr., Rupert K, et al. Clinicopathological assessment and quantitative estimation of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-7 and the inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res*, 2007; 27(4A): 1863-1867.
 140. Schwandner O, Schlamp A, Broll R, Bruch HP. Clinicopathologic and prognostic significance of matrix metalloproteinases in rectal cancer. *Int J Colorectal Dis*, 2007; 22(2): 127-136.
 141. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2004; 23(1-2): 101-117.
 142. Keles D, Arslan B, Terzi C, Tekmen I, et al. Expression and activity levels of matrix metalloproteinase-7 and in situ localization of caseinolytic activity in colorectal cancer. *Clin Biochem*, 2014; 47(13-14): 1265-1271.
 143. Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, et al. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene*, 2002; 21(38): 5861-5867.
 144. Yang B, Gao J, Rao Z, Shen Q. Clinicopathological and prognostic significance of alpha5beta1-integrin and MMP-14 expressions in colorectal cancer. *Neoplasma*, 2013; 60(3): 254-261.

145. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol*, 2010; 20(3): 161-168.
146. Lu KV, Jong KA, Rajasekaran AK, Cloughesy TF, et al. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Lab Invest*, 2004; 84(1): 8-20.
147. Offenberg H, Brunner N, Mansilla F, Orntoft Torben F, et al. TIMP-1 expression in human colorectal cancer is associated with TGF-B1, LOXL2, INHBA1, TNF-AIP6 and TIMP-2 transcript profiles. *Mol Oncol*, 2008; 2(3): 233-240.
148. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg*, 2000; 87(9): 1215-1221.
149. Kim TD, Song KS, Li G, Choi H, et al. Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2006; 6: 211.
150. Soloway PD, Alexander CM, Werb Z, Jaenisch R. Targeted mutagenesis of Timp-1 reveals that lung tumor invasion is influenced by Timp-1 genotype of the tumor but not by that of the host. *Oncogene*, 1996; 13(11): 2307-2314.
151. Kruger A, Fata JE, Khokha R. Altered tumor growth and metastasis of a T-cell lymphoma in Timp-1 transgenic mice. *Blood*, 1997; 90(5): 1993-2000.
152. Kruger A, Sanchez-Sweatman OH, Martin DC, Fata JE, et al. Host TIMP-1 overexpression confers resistance to experimental brain metastasis of a fibrosarcoma cell line. *Oncogene*, 1998; 16(18): 2419-2423.
153. Human Cell Culture Protocols second edition [Methods in Molecular Medicine](#) 2005 Publisher Humana Press DOI 10.1385/1592598617 Number of Pages 360 Editors: Picot, Joanna.
154. www.atcc.org.
155. Frederick M. Ausubel Roger Brent Robert E. Kingston Current Protocols in Molecular Biology. December 09, 2011.
156. Ngamwongsatit P, Banada PP, Panbangred W, Bhunia AK. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol Methods*, 2008; 73(3): 211-215.

157. Davidson BL, McCray PB, Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet*, 2011; 12(5): 329-340.
158. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 2002; 26(2): 199-213.
159. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 1990; 262(4): 56-61, 64-55.
160. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985; 230(4732): 1350-1354.
161. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 2006; 27(2-3): 95-125.
162. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 1988; 175(1): 231-237.
163. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem*, 1997; 249(1): 24-28.
164. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, et al. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*, 1982; 21(24): 6188-6193.
165. <http://physics.cancer.gov>.
166. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144(5): 646-674.
167. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*, 2005; 38(1): 72-83.
168. Bellovin DI, Simpson KJ, Danilov T, Maynard E, et al. Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene*, 2006; 25(52): 6959-6967.
169. Wang HB, Liu XP, Liang J, Yang K, et al. Expression of RhoA and RhoC in colorectal carcinoma and its relations with clinicopathological parameters. *Clin Chem Lab Med*, 2009; 47(7): 811-817.

170. Wang YF, Li Z, Zhao XH, Zuo XM, et al. MicroRNA-10b is upregulated and has an invasive role in colorectal cancer through enhanced RhoC expression. *Oncol Rep*, 2015; 33(3): 1275-1283.
171. Keles D, Inanc S, Canda Ae, Terzi C, Siaphi M, Fuzun M, Oktay G. The expression and activity levels of RhoC, ROCK-I, ROCK-II and MMP-2 in colorectal cancer. 22nd IUBMB 37th FEBS Congress FEBS Journal Abstract Book: 539, 2012, Sevilla, Spain.
172. Liu XP, Wang HB, Yang K, Sui AH, et al. Inhibitory effects of adenovirus mediated tandem expression of RhoA and RhoC shRNAs in HCT116 cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009; 28: 52.
173. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 1980; 284(5751): 67-68.
174. Ikoma T, Takahashi T, Nagano S, Li YM, et al. A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice. *Clin Cancer Res*, 2004; 10(3): 1192-1200.
175. Faried A, Faried LS, Kimura H, Nakajima M, et al. RhoA and RhoC proteins promote both cell proliferation and cell invasion of human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Eur J Cancer*, 2006; 42(10): 1455-1465.
176. Xue F, Takahara T, Yata Y, Xia Q, et al. Blockade of Rho/Rho-associated coiled coil-forming kinase signaling can prevent progression of hepatocellular carcinoma in matrix metalloproteinase-dependent manner. *Hepatol Res*, 2008; 38(8): 810-817.
177. Tsuji T, Ishizaki T, Okamoto M, Higashida C, et al. ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, 2002; 157(5): 819-830.
178. Vishnubhotla R, Sun S, Huq J, Bulic M, et al. ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging. *Lab Invest*, 2007; 87(11): 1149-1158.
179. Zhao Y, Zong ZH, Xu HM. RhoC expression level is correlated with the clinicopathological characteristics of ovarian cancer and the expression levels of ROCK-I, VEGF, and MMP9. *Gynecol Oncol*, 2010; 116(3): 563-571.

180. Xie SL, Zhu MG, Chen GF, Wang GY, et al. Effects of Ras homolog gene family, member C gene silencing combined with rapamycin on hepatocellular carcinoma cell growth. *Mol Med Rep*, 2015.

8. EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAYLARI

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/11-02	Tarih: 22.03.2012			
	Prof.Dr.Gülgün OKTAY'ın sorumlusu olduğu "Kolon Kanseri Hücrelerinde RhoC-GTPaz ile Ekstrasellüler Proteoliz Arasındaki Olası İlişkinin Belirlenmesi Kod:G.O-02" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2015/10-31	Tarih: 02.04.2015
	Prof.Dr.Gülgün OKTAY'ın sorumlusu olduğu "Kolon Kanseri Hücrelerinde RhoC-GTPaz ile Ekstrasellüler Proteoliz Arasındaki Olası İlişkinin Belirlenmesi Kod:G.O-02" isimli klinik araştırmaya ait 24.03.2015 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak; - Çalışma adı değişikliği (Kolon Kanseri Hücrelerinde RhoC Yolağı ile Ekstrasellüler Proteoliz Arasındaki Olası İlişkinin İnvazyon ve Metastaz Açısından Belirlenmesi) - RhoC'nin kolon kanser hücrelerinin invazyon yetenekleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla transvers migrasyon ve matris invazyon çalışmalarının yöntemler bölümüne eklenmesi ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
---------------	--

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ahmet Turan IŞIK	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

ÖZGEÇMİŞ
Araştırma Görevlisi DİDEM KELEŞ

TC Kimlik No / Pasaport No:	26485819340
Doğum Yılı:	1983
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 35340 İnciraltı-İZMİR 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	232 - 412 44 36 / 24436
Faks :	232 - 412 44 39
e-posta :	didem.keles@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Biyokimya	Doktora	2009-2015
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Biyokimya	Yüksek Lisans	2006- 2009
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya	Lisans	2001- 2006

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Biyokimya Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi	2009-2015

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Biyokimya, Kanser Moleküler Biyolojisi

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Kolon kanser hücrelerinde RhoC-GTPaz ile ekstrasellüler proteoliz arasındaki olası ilişkinin belirlenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	49000	06.2012-06.2014	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Sıçanlarda Formaldehit Maruziyetiyle Testislerde Oluşan Morfolojik Değişiklikler Üzerine N-Asetilsisteinin Etkisinin İncelenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	-	02.2012-02.2013	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Kronik Hareketsizlik Stresine Maruz Bırakılmış Ratlarda Resveratrolün Testis Üzerine Koruyucu Etkilerinin Araştırılması	Dokuz Eylül Üniversitesi	-	01.2012-01.2013	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Kolorektal kanser tanısında fekal ve plazma COX-2,MMP-7,TIMP-1 kombinasyonunun tümör belirteçi olarak değerlendirilmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	49000	01.2011-07.2012	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Kolon kanseri ve polip dokusunda matriks metolloproteinaz-7 (MMP-7), spesifik metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMPs) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunun Değerlendirilmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	17000	01.2011-07.2012	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal

Sıçan ince barsak radyoterapi modelinde Metalloproteinazların Erken inflamasyon süreçlerine etkileri	Dokuz Eylül Üniversitesi	-	02.2010-01.2013	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Matriks metallproteinaz -1, -8 ve -13 aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kollajen zimografi yönteminin standardizasyonu	Dokuz Eylül Üniversitesi	-	01.2010-01.2012	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Arsenik toksisitesinin testiste oluşturduğu hasara karşı resveratrolün koruyucu etkilerinin incelenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	20000	09.2009-09.2010	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Primer kolorektal tümörlerde ve metastatik karaciğer tümörlerinde migrasyon ve invazyon ile ilgili moleküllerin ekspresyonel değişikliklerinin kliniko-patolojik bulgularla ilişkisinin araştırılması	Dokuz Eylül Üniversitesi	105000	08.2008-08.2011	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Kutan Lupus Eritematozus Deri Lezyonlarında Matriks Metalloproteinaz-9 Düzeylerinin İncelenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	-	01.2008-01.2009	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Kolorektal Kanserde DNA Baz Hasarının İncelenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	-	01.2008-01.2009	Araştırmacı/ Uzman	Uluslararası
Kolorektal Kansere Hastalarında Kazein Zimografi ve İn Situ Kazein Zimografi	Dokuz Eylül Üniversitesi	37000	11.2007-11.2009	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal

Yöntemi ile Matriks Metalloproteinaz-7 Aktivitesinin ve Lokalizasyonunun Belirlenmesi.					
in Vivo Oksidan Stresin Tavşanlarda Kardiyak Doku Bileşenleri Üzerine Etkisi ve Bu Etkinin Taurin ile Modifikasyonu	Ege Üniversitesi	-	04.2007-04.2011	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Menisküs Yırtıklarında Mukoid Dejenerasyon Evresi ile Eklem Sıvısındaki Biyokimyasal Belirteç Düzeyleri Arasında İlişki Var Mıdır?	Dokuz Eylül Üniversitesi	-	01.2007-01.2008	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal
Sıçanlarda karotid arter ligasyonu ile oluşturulan intimal kalınlaşmanın patogeneğinde discoidin domain reseptörün olası rolü ve alendronatın etkisi	Ege Üniversitesi	8000	01.2006-01.2008	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			26
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler		Türk Biyokimya Derneği Üyeliği	

(Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	Moleküler Kanser Araştırma Derneği Üyeliği
--	--

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Poster Ödülü - RhoC, ROCK-II ve MMP-2'nin Kolorektal Kanser İnvazyonu Üzerindeki Etkisi - 23.Ulusal Biyokimya Kongresi	Türk Biyokimya Derneği	2011
Poster Ödülü- Arsenik Toksisitesinin Testiste Oluşturduğu Hasara Karşı Resveratrolün Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi - Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Mezuniyet Günü	Dokuz Eylül Üniversitesi	2010
Poster Ödülü - Kolorektal Kanserde Matriks Metalloproteinaz-7 Ekspresyonu ve Aktivitesinin Lokalizasyonu - 21.Ulusal Biyokimya Kongresi	Türk Biyokimya Derneği	2009
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitü Yüksek Lisans İkinciliği - Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Mezuniyet Günü	Dokuz Eylül Üniversitesi	2009
Poster Ödülü - Kolorektal Kanserde Matriks Metalloproteinaz-7 Ekspresyonu ve Aktivitesinin Lokalizasyonu- Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Mezuniyet Günü	Dokuz Eylül Üniversitesi	2009

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Ferda Hosgorler, Didem Keles , Serpil Tanriverdi-Akhisaroglu, Seniz Inanc, Mustafa Akhisaroglu, Ulker Cankurt, Zekiye Aydogdu, Ahmet Deniz Ucar, Oguz Cetinayak, Gulgun Oktay, Sevil Gonenc Arda. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effect of Valproic acid and Doxycycline independent from Matrix Metalloproteinase inhibition in early radiation damage , 2015, WULFENIA, KABUL EDİLDİ
Keles D , Arslan B, Terzi C, Tekmen I, Dursun Ezgi, Altungoz O, Oktay G. Expression and activity levels of matrix metalloproteinase-7 and in situ localization of caseinolytic activity in colorectal cancer, Clinical Biochemistry, 47:1265-1271, 2014
Sevin G, Ozsarlak-Sozer G, Keles D , Gokce G, Reel B , Ozgur HH, Oktay G, Kerry, Z. Taurine inhibits increased MMP-2 expression in a model of oxidative stress induced by glutathione depletion in rabbit heart. European Journal of Pharmacology, Volume: 706 Issue: 1-3 Pages: 98-106, 2013
Kirkali G, Keles D , Canda AE, Terzi C, Reddy PT, Jaruga P, Dizdaroglu M, Oktay G. Evidence for upregulated repair of oxidatively induced DNA damage in human colorectal cancer. DNA Repair, 10: 1114 – 1120, 2011

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Bengi G, **Keles D**, Topalak OS, Yalcin M, Kıyak R, Oktay G. The distinction between TIMP-1, COX-2 AND MMP-7 levels in different colon tissues. Euroasian Journal of hepato-gastroenterology, 2015. **KABUL EDİLDİ.**

Bitgül G, Tekmen I, **Keles D**, Oktay G. Protective Effects of Resveratrol against Chronic Immobilization Stress on Testis. 2013, ISRN Urology Article ID 278720, 10 page

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Uluslararası kongrede poster bildirisi: Keles D, Oktay G, Sipahi M, Inanc S, Djamgoz MBA. The effect of voltage-gated sodium channel on matrix metalloproteinase expression and activity in human breast cancer cells, 40th FEBS Congress The Biochemical Basis of Life, Temmuz 2015, Münih-Almanya

Uluslararası kongrede poster bildirisi: Keles D, Oktay G, Sipahi M, Inanc S, Djamgoz MBA. Matrix Metalloproteinase Expression and Activity in Human Breast Cancer Cells: Association with Voltage-Gated Sodium Channel, 3rd EACR-Sponsored Anticancer Agent Development Congress, Mayıs 2015, İzmir- Türkiye

Uluslararası kongrede poster bildirisi: Keles D, Sipahi M, Inanc S, Oktay G. RHOC-GTPase promotes colon cancer cell invasion in matrix metalloproteinase dependent manner, FEBS EMBO 2014 Congress, Eylül 2014, Paris – Fransa.

Uluslararası kongrede poster bildirisi: Inanc S, Keles D, Oktay G. Standardization of collagen zymography method for determining matrix metalloproteinases -1, -8 and -13 activities, FEBS EMBO 2014 Congress, Eylül 2014 Paris – Fransa.

Uluslararası kongrede poster bildirisi: Sipahi M, Keles D, Calan M, Bayraktar F, Oktay G. The effects of calcitriol on N-MYC downstream regulated gene-2 and sodium-iodide symporter gene expressions in undifferentiated human anaplastic thyroid cancer cell line, FEBS EMBO Congress, Eylül 2014 Paris – Fransa

Uluslararası kongrede poster bildirisi: Reel B, Ozbal S, Ergur BU, Yilmaz O, Keles D, Oktay G, Sevin G, Kerry Z. The role of discoidin domain receptor signaling and effect of alendronate in carotid artery ligation -induced intimal thickening in mice. 81st EAS Congress Book, p 1228 Haziran, 2013 Lyon, Fransa

Ulusal kongrede sözel bildirisi: İnanc Ş, Keleş D, Oktay G. Metalloproteinaz -1, -8 ve -13 Aktivitelerinin Kantitasyonu Amacıyla Kollajen Zimografi Yönteminin Standardizasyonu, 4. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 2012

Ulusal kongrede poster bildirisi: Kıyak R, Keleş D, Bengi G, Topalak ÖS, Oktay G. Kolorektal kanser tanısında fekal ve plazma COX-2, MMP-7, TIMP-1 kombinasyonunun tümör belirteci olarak değerlendirilmesi, 4. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 2012

Ulusal kongrede poster bildirisi: Kıyak R, Bengi G, Keleş D, Topalak ÖS, Oktay G. Kolon

kanseri ve polip dokusunda matriksmetolloproteinaz-7 (MMP-7), spesifik metolloproteinaz doku inhibitörleri (TIMPs) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunun değerlendirilmesi, 29.Ulusal Gastroenteroloji Haftası, 2012

Uluslararası kongrede poster bildirisi: Keleş D, İnanç Ş, Canda AE, Terzi MC, Sipahi M, Füzün M, Oktay G. The expression and activity levels of RhoC, ROCK-I, ROCK-II and MMP-2 in colorectal cancer, 37. FEBS and 22. IUBMB Congress, 2012

Ulusal kongrede poster bildirisi: Oktay G, Keleş D, İnanç Ş, Canda A, Ünek T, Sipahi M, Terzi M, Karademir S. RhoC'nin MMP-2 aktivasyonu aracılığıyla kolorektal kanser karaciğer metastazına katkısı, 6. CERRAHİ ARAŞTIRMA KONGRESİ, 2011

Ulusal kongrede poster bildirisi: Keleş D, İnanç Ş, Canda A, Terzi M, Sipahi M, Ellidokuz H, Füzün M, Oktay G. RhoC, ROCK-II ve MMP-2'nin Kolorektal Kanser İnvazyonu Üzerindeki Etkisi, 6. CERRAHİ ARAŞTIRMA KONGRESİ, 2011

Ulusal kongrede poster bildirisi: Keleş D, İnanç Ş, Canda A, Terzi M, Sipahi M, Ellidokuz H, Füzün M, Oktay G. RhoC, ROCK-II ve MMP-2'nin Kolorektal Kanser İnvazyonu Üzerindeki Etkisi, 23.Ulusal Biyokimya Kongresi, 2011

Ulusal kongrede poster bildirisi: Oktay G, Keleş D, İnanç Ş, Canda A, Ünek T, Sipahi M, Terzi M, Karademir S. RhoC'nin MMP-2 aktivasyonu aracılığıyla kolorektal kanser karaciğer metastazına katkısı, 23.Ulusal Biyokimya Kongresi, 2011

Ulusal kongrede poster bildirisi: Sevin G, Sözer G, Keleş D, Gökçe G, Reel B, Oktay G, Kerry Z. Oksidatif stres altındaki kalptetaurinin jelatinazlar üzerindeki düzenleyici rolü, 21. Ulusal Farmakoloji kongresi, 2011

Ulusal kongrede poster bildirisi: Reel B, Özbal S, Ergür BU, Yılmaz O, Keleş D, Oktay G, Sevin G, Kerry Z. Farelerde Karotid Arter Ligasyonu ile Oluşan İntimal Kalınlaşmada Diskoidin Domain Reseptör Sinyalizasyonunun Rolü ve Alendronatın Etkisi, 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2011

Ulusal kongrede sözlü bildirisi: Leyla Didem Kozacı, Buket Miranoğlu, Ömer Faruk Şendur, Didem Keleş, Gülgün Oktay. El osteoartriti olan hastalarda biyolojik markerlerinde değerlendirilmesi, Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 2011

Uluslararası kongrede poster bildirisi: Pınar İ, İşçen O, Keleş D, Özkal S, Oktay G. Is There Any Relationship Between the Grade of Mucoïd Degeneration of Torn Menisci and Biochemical Marker Levels in Synovial Fluid?, 8th Biennial ISAKOS Congress, 2011

Ulusal kongrede poster bildirisi: Dursun E, Tekmen I, Keleş D, Oktay G. Arsenik Toksisitesinin Testiste Oluşturduğu Hasara Karşı Resveratrolün Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Günü, 2010

Ulusal kongrede poster bildirisi: Yücel G, Keleş D, Oktay G, Aktan Ş. Kutan Lupus

Eritematozusda Matriks Metalloproteinaz-2, -9 Enzim Aktivite Düzeyleri, 23. Ulusal Dermatoloji Kongresi, 2010
Uluslararası kongrede sözel bildiri: Keleş D, Arslan B, Terzi M, Tekmen I, Dursun E, Altungöz O, Oktay G. Expression Levels of Matrix Metalloproteinase-7 and In Situ Localization of Caseinolytic Activity in Colorectal Cancer, 35th FEBS Congress, 2010
Uluslararası kongrede poster bildirisi: Kırkalı F, Keleş D, Canda A, Terzi M, Jaruga P, Dizdaroğlu M, Oktay G. Oxidatively induced DNA base damage in colorectal carcinoma., American Association for Cancer Research 101st Annual Meeting, 2010
Ulusal kongrede poster bildirisi: Didem KELEŞ, Gülgün OKTAY, Baha ARSLAN, Cem TERZİ, Işıl TEKMEN, Ezgi DURSUN, Oğuz ALTUNGÖZ. Kolorektal kanserde matriks metalloproteinaz-7 ekspresyonu ve aktivitesinin lokalizasyonu, 21. ulusal biyokimya kongresi, 2009
Ulusal kongrede poster bildirisi: Serpil Tanrıverdi-Akhisaroğlu, Zeynep Zadeoğluları, Didem Keleş, Zübeyde Erbayraktar, Aras Emre Canda, Cem Terzi, Hülya Ellidokuz, Mehmet Füzün, Gülgün Oktay. Kolorektal Kanserde MMP-2, MMP-9 ve İnhibitörleri TIMP-1, TIMP-2 ve RECK Gen Ekspresyonlarının Klinik Önemi, 21.Ulusal Biyokimya Kongresi, 2009
Ulusal kongrede Poster bildirisi: Keles D, Kirkali G, Canda AE, Cavdar Z, Terzi C, Fuzun M, Dizdaroğlu M, Oktay G. Oksidatif DNA baz hasarı: Kolorektal kanserde erken tanı belirteci. 20.Ulusal Biyokimya Kongresi Turkish Journal of Biochemistry, 20th National Biochemistry Congress Book, Vol 33, p 180, Kasım 2008, Nevşehir - Türkiye
Uluslararası kongrede Poster bildirisi: Keles D, Yeni F, Onal S, Telefoncu A. Selenocysteine and Selenoproteins: Biochemical Aspect. Abstract Book of International Symposium on Selenium in Health and Disease, p 51, Ekim 2006, Ankara - Türkiye

Diğer yayınlar

--