

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KALLİKREİNLERİN BEYİN TÜMÖRLERİNİN PROGNOZUNDA YENİ BELİRTEÇ  
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Gamze TURNA**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Nedret KILIÇ

ANKARA  
OCAK 2014

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KALLİKREİNLERİN BEYİN TÜMÖRLERİNİN PROGNOZUNDA YENİ BELİRTEÇ  
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Gamze TURNA**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Nedret KILIÇ

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2010-106 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA  
OCAK 2014

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya (Tıp) Ana Bilim Dalı Doktora Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 23/01/2014

İmza

Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU  
Gazi Üniversitesi  
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Nedret KILIÇ  
Gazi Üniversitesi

İmza

Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU  
Gazi Üniversitesi

İmza

Prof. Dr. Çiğdem ÖZER  
Gazi Üniversitesi

İmza

Prof. Dr. Pakize Doğan  
Hacettepe Üniversitesi

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	i
İçindekiler.....	ii
Şekiller.....	iv
Tablolar.....	v
Semboller ve Kısaltmalar.....	vi
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Proteazlar.....	3
2.2.Serin Proteazlar.....	3
2.3. Kallikreinler.....	4
2.3.1.Doku Kallikreinleri Gen ve Protein Yapısı.....	7
2.3.2.Kallikreinlerin Substrat Özgüllüğü.....	11
2.3.3.Kallikreilerin Alternatif Transkriptleri.....	11
2.3.4.Kallikreinlerin Düzenlenme Mekanizmaları.....	12
2.3.4.1.Hormonal Düzenlenme.....	12
2.3.4.2.Epigenetik ve microRNA'lar ile Düzenlenme.....	13
2.3.5.Kallikreinlerin Fizyolojik Fonksiyonları.....	14
2.3.6.Kallikreinlerin Sinyal Mekanizmaları.....	19
2.3.7.Kallikrein Kaskadlarının Proteolitik Aktivasyonu.....	21
2.3.8.Kallikreinlerin Kanser Pathofizyolojisindeki Rollerini.....	22
2.3.8.1.Tümör Büyümesinde Kallikreinlerin Rolü.....	22
2.3.8.2.Anjiyogenez ve Kallikreinler.....	24
2.3.8.3.İnvazyon-Metastaz ve Kallikreinler.....	27
2.3.9.Kanser Biyobelirteci olarak Kallikreinler.....	29
2.3.10.Kallikreinlerin Terapötik Kullanımları.....	29
2.4.Beyin Tümörleri.....	30
2.4.1.Menenjiom.....	31
2.4.2.Glioblastoma Multiforme.....	33
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>36</b>
3.1. Deney Grupları.....	36
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	36
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	37
3.4. Kullanılan Kitler.....	40
3.5. Yöntemlerin Uygulanması.....	40
3.5.1. Dokudan RNA İzolasyonu.....	40
3.5.2. cDNA Sentezi.....	41
3.5.3. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile Hedef Bölgenin Çoğaltılması.....	42
3.5.4. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini.....	46
3.5.5.Western Blot Yöntemi ile Protein Ekspresyonlarının Gösterilmesi.....	47
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	50
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>51</b>
4.1. KLK5 mRNA ve Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	51
4.2. KLK6 mRNA ve Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	53

4.3. KLK7 mRNA ve Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi .....	55
<b>5.TARTIşMA .....</b>	<b>58</b>
<b>6.SONUÇ.....</b>	<b>67</b>
<b>7.ÖZET .....</b>	<b>68</b>
<b>8.SUMMARY .....</b>	<b>70</b>
<b>9.KAYNAKLAR .....</b>	<b>72</b>
<b>10.EKLER .....</b>	<b>105</b>
<b>11.ÖZGEÇMİş.....</b>	<b>107</b>

## **Şekiller**

Şekil 1. Doku kallikrein gen lokusunun organizasyonu

Şekil 2. Kallikrein gen yapısı

Şekil 3. Kallikrein protein yapısı

Şekil 4. Seminal pıhtının sıvılaşması

Şekil 5. Derinin deskuamasyonu

Şekil 6. Parkinson hastalığında KLK6'nın rolü

Şekil 7. Tümör hücre büyümesi ve inhibisyonunda kallikreinlerin rolü

Şekil 8. Anjiyogenezde kallikreinlerin rolü

Şekil 9. *KLK5* ve GAPDH PZR ürünlerinin jel görüntüsü

Şekil 10. *KLK5* ve  $\beta$ -Aktin Western blot görüntüsü

Şekil 11. *KLK6* ve GAPDH PZR ürünlerinin jel görüntüsü

Şekil 12. *KLK6* ve  $\beta$ -Aktin Western blot görüntüsü

Şekil 13. *KLK7* ve GAPDH PZR ürünlerinin jel görüntüsü

Şekil 14. *KLK7* ve  $\beta$ -Aktin Western blot görüntüsü

**Tablolar**

Tablo 1. İnsan Kallikrein ailesinin gen ve protein adları

Tablo 2. RT-PZR'da kullanılan primer dizileri

Tablo 3. KLK5 mRNA ekspresyonunun yaş grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri ile ilişkisi

Tablo 4. KLK6 mRNA ekspresyonunun yaş grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri ile ilişkisi

Tablo 5. KLK7 mRNA ekspresyonunun yaş grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri ile ilişkisi

## **Sembol ve Kısaltmalar**

**KLK:** Kallikrein geni

**KLK:** Kallikrein proteini

**$\Psi$ KLK:** Kallikrein pseudogen

**PSA:** Prostat Spesifik Antijen

**ACPT:** Testiküler Asit Fosfataz geni

**CAG:** Kanseri-ilişkili gen

**Siglec:** Sialik asit bağlayıcı Ig-benzeri lektin

**uPA:** Ürokinaz tip plazminojen aktivatör

**IGF:** İnsülin-benzeri büyüme faktörü

**IGFB:** İnsülin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein

**TGF- $\beta$ :** Dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$

**TGF $\alpha$ :** Dönüştürücü büyüme faktörü  $\alpha$

**PAR:** Proteaz aktive edici reseptörler

**MMP:** Matriks Metalloproteaz

**MAPK:** Mitojen aktiviteli protein kinaz

**VEGF:** Vasküler endotelial büyüme faktörü

**bFGF:** Bazik fibroblast büyüme faktörü

**Akt/PKB:** Protein kinaz B

**EMT:** Epitelial mezenkimal geçiş

**PR:** Progesteron reseptörü

**ER:** Östrojen reseptörü

**EGF:** Epidermal büyüme faktörü

**EGFR:** Epidermal büyüme faktörü reseptörü

**PDGFB:** Platelet kaynaklı büyüme faktörü B

## 1.GİRİŞ

Günümüzde kanser dünyadaki insan ölümlerinin başlıca nedenlerinden biridir<sup>1</sup>. Karsinogenez gen yapısının ve gen ifadenmesinin değişimini de içeren kompleks işlemlerin sonucu oluşabilmektedir<sup>2</sup>. Kallikreinler serin proteaz enzim ailesinin bir alt grubudur<sup>3</sup>. Serin proteazlar da proteazların alt grubudur ve proteolitik kaskadlara katılmaktadırlar<sup>4</sup>. Proteolitik kaskadlar kan pıhtılaşması, besin sindirimi ve apoptoz gibi birçok fizyolojik olayda görev almaktadır<sup>4</sup>.

İnsan kallikreinleri plazma kallikreinleri ve doku kallikreinleri olmak üzere başlıca iki gruba ayrılır ve insan doku kallikrein ailesi 15 gen içermektedir (*KLK1-15*)<sup>3</sup>. Tüm kallikrein proteinleri pre-pro peptitler olarak sentezlenmektedir<sup>5</sup>. Bu peptitler otoaktivasyonla, diğer kallikreinlerle ya da farklı proteazlarla aktif şekle dönüştürülmektedir<sup>4</sup>. Kallikreinler testis, prostat, meme, endometrium ve merkezi sinir sistemi gibi birçok dokuda eksprese olmaktadır<sup>5</sup>. Çeşitli kanser hücre dizileriyle yapılan çalışmalarda birçok kallikreinin özgül steroid hormonlar tarafından düzenlendiği gösterilmektedir<sup>6</sup>. Birçok çalışmada insan kallikrein ailesinin kanserle ilişkili olabileceği ve çeşitli kallikreinlerin prostat, meme, testis ve yumurtalık kanserlerinde farklı düzeylerde eksprese olduğu belirtilmektedir<sup>7-12</sup>.

Glioblastoma insanda görülen en yaygın ve agresif beyin tümörüdür. Glioblastoma primer ve sekonder olmak üzere başlıca iki kategoride sınıflandırılmaktadır<sup>13</sup>. Menenjiomlar ise genellikle yavaş büyüyen benign tümörlerdir<sup>14</sup>. Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından derece I, II, III olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadırlar<sup>15</sup>. Menenjiomlar primer intrakraniyal tümörlerin % 18'ini, intraspinal tümörlerin ise % 25'ini oluşturmaktadırlar<sup>16</sup>.

Kallikreinlerin çeşitli kanser tiplerinde yeni bir kanser belirteci olma olasılığı vurgulanmaktadır. Bu çalışmada patolojik olarak menenjiom ve glioblastoma teşhisi almış hastalardan elde edilen tümör doku örneklerinde kallikrein 5, 6 ve 7'nin revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile mRNA ve Western blot yöntemi ile protein ekspresyonlarının araştırılması amaçlandı.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Proteazlar

Proteazlar peptid bağlarını geri dönüşümsüz olarak hidroliz eden peptid hidrolazlar olarak da bilinen proteinlerdir<sup>17</sup>. Proteazlar virüslerden omurgalılara kadar pek çok biyolojik sistemde tanımlanmışlardır<sup>18</sup>. Bu enzimler bağışıklık, gelişme, kan pıhtılaşması ve yara iyileşmesi gibi normal fizyolojik süreçlere katılmaktadırlar<sup>17,19,20,21,22</sup>. İnsan genomu 569'dan fazla proteolitik enzim ya da homologunu kodlamaktadır<sup>23</sup>. Proteazlar katalitik mekanizmaları temel alınarak beş ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; serin, treonin, sistein, aspartat ve metallo proteazlardır<sup>24</sup>. Proteazların ağırlıkları 10 kDa'luk monomerlerden birkaç 100 kDa'luk multimerik komplekslere varan bir aralıkta değişmektedir<sup>18</sup>. Proteaz katalizi bir polipeptid zincirinin içinden (endoproteaz aktivite) ya da amino ya da karboksil uçtan (ekzoproteaz aktivite) başlayabilir<sup>25</sup>. Proteazlar protein yıkımına, diğer proteazların ve sinyal moleküllerinin aktivasyonuna katılmaktadırlar.<sup>26</sup> Agresif kanserin tümör hücre invazyonu, anjiyogenez ve metastaz gibi bazı işaretleri direkt olarak proteolitik aktivitenin sonucunda oluşmaktadır<sup>27</sup>. Malignitenin ilerlemesi genellikle proteolizin normal düzenlenme mekanizmasının ortadan kaldırılması ile ilişkilidir ve kanserde pek çok proteazın aktivitesi değişmektedir<sup>27</sup>.

### 2.2. Serin Proteazlar

Yaklaşık tüm proteazların üçte biri serin proteazlar olarak sınıflandırılabilir. Bunlar aktif bölgelerinde nükleofilik serin rezidüsü içerdikleri için serin proteazlar olarak adlandırılmaktadır. Bu sınıf katalitik üçlü olarak Asparajin-Histidin-Serin varlığı ile ayırt edilmektedir<sup>28</sup>. Serin

proteazlar çok yönlü ve yaygın olarak çalışılan proteolitik enzimlerdir ve substrat özgüllüklerine göre üç ana sınıfa ayrılmaktadırlar<sup>29,30</sup>. Bunlar:

1. Tripsin-benzeri serin proteazlar
2. Kimotripsin-benzeri serin proteazlar
3. Elastaz-benzeri serin proteazlar

Serin proteazlar sindirim, pıhtılaşma, hücrel ve humoral bağışıklık gibi normal fizyolojik süreçlerde ve kanser, nörodejeneratif hastalıklar gibi patofizyolojik süreçlerde de rol alabilmektedirler<sup>31-35</sup>. Serin proteazlar 11 klan şeklinde organize edilmişlerdir ve bunlardan çoğu tripsin/kimotripsin-benzeri serin proteazların bulunduğu SA klanında yer almaktadır<sup>36</sup>.

### 2.3. Kallikreinler

Kallikreinler (KLK) kininojenlerden vazoaktif bir peptid olan bradikinin oluşturma yetenekleriyle tarif edilmiş serin proteazlardır. Kallikrein ismi, ilk olarak 1930'larda bu enzim grubunun aktivitesini pankreatik ekstraktlarda tanımlayan Werle ve ark.'dan gelmektedir. Zira Yunancada pankreas "*kallikreos*" demektir<sup>37,38</sup>. 1970'lerde adli amaçlı olarak semende erkeğe özgü antijenlerin araştırılması kallikrein 3 (KLK3 ya da PSA)'ün keşfine yol açmıştır<sup>39</sup>. 1990'larda ise 12 yeni serin proteaz geni keşfedilmiştir ve bunlar ilk üç kallikreine sekans ve yapısal benzerlikleriyle birlikte kromozomda kallikreinlerle aynı bölgede (19q13.4 ) bulunmaları nedeniyle kallikrein ailesine dahil edilmiştir<sup>40,41,42</sup>.

Önemli olarak iki tip kallikrein tanımlanmıştır. Bunlar; karaciğerden köken alan ve kanda dolaşan plazma kallikreini ve birçok

dokuda lokal olarak aktif olan glandular ya da doku kallikreindir<sup>38,43</sup>. Plazma kallikreini doku kallikreinine göre daha kompleks bir serin proteazdır. Çünkü plazma kallikreini proteolitik katalitik bölgesine ek olarak başka fonksiyonel bölgeler de içermektedir<sup>38</sup>. Plazma kallikreini 4. kromozomda (4q35), doku kallikreini ise 19. kromozomda (19q13.4) bulunmaktadır<sup>5</sup>. Doku kallikreini (EC.3.4.21.35) tripsin ya da kimotripsin benzeri serin proteazların S1 ailesinin ( klan SA) üyeleridir ve en az altı memeli takımında bulunmaktadır<sup>45-49</sup>.

Daha önceleri kallikrein genleri KLK ile proteinleri ise hK ile gösterilmekteydi. 2006 yılında HGNC (HUGO Nomenclature Committee)'nin kallikrein alt komitesi tarafından önerilen resmi adlandırma sistemine göre kallikreinler KLK olarak ifade edilmeye başlandı<sup>50</sup>. Bu sisteme göre genler italik yazı tipi ile (*KLK2*) gösterilirken, proteinler standart yazı tipi ile (KLK2) gösterilmektedir (Tablo 1).

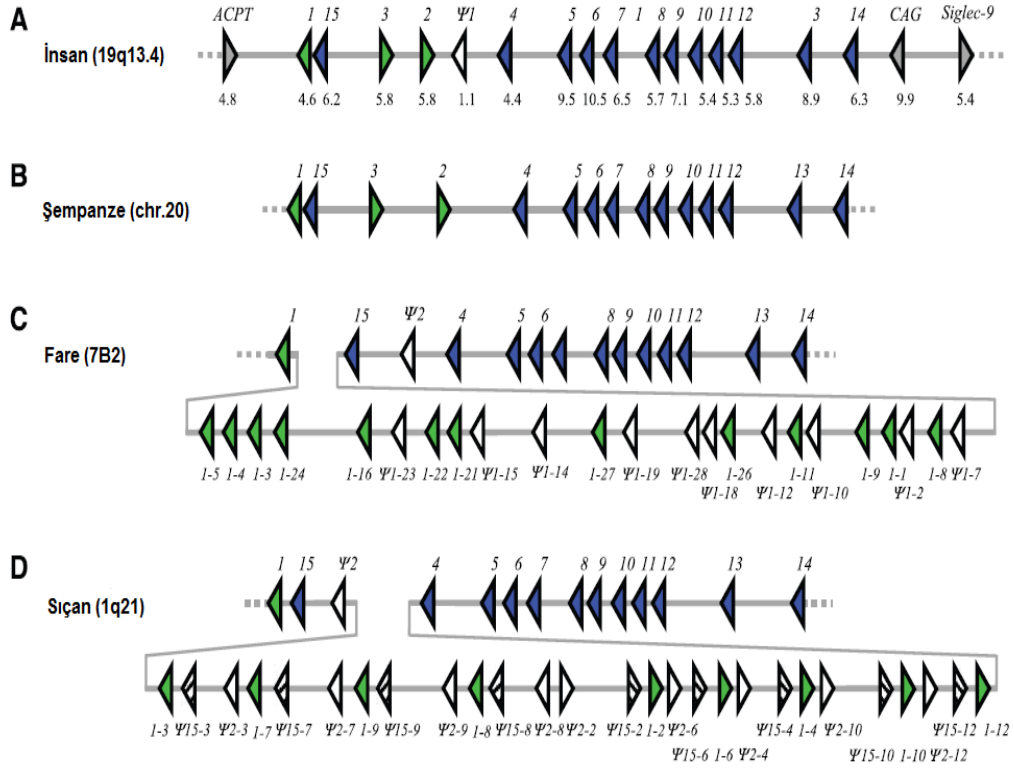
**Tablo 1. İnsan Kallikrein ailesinin gen ve protein adları<sup>5</sup>**

<b>Gen adı</b>	<b>Protein adı</b>	<b>Diğer ad ya da sembolleri</b>
<i>KLK1</i>	KLK1 (hK1)	Pankreatik/renal kallikrein, hPRK
<i>KLK2</i>	KLK2 (hK2)	Glandular kallikrein, hGK-1
<i>KLK3</i>	KLK3 (hK3)	Prostat spesifik antijen, PSA, APS
<i>KLK4</i>	KLK4 (hK4)	Prostaz, KLK-L1, EMSP1, PRSS17, ARM1
<i>KLK5</i>	KLK5 (hK5)	KLK-L2, HSCTE
<i>KLK6</i>	KLK6 (hK6)	Proteaz M, Neurosin, PRSS9
<i>KLK7</i>	KLK7 (hK7)	HSCCE, PRSS6
<i>KLK8</i>	KLK8 (hK8)	Neuropsin; Ovasin; TADG-14, PRSS19, HNP
<i>KLK9</i>	KLK9 (hK9)	KLK-L3 protein
<i>KLK10</i>	KLK10 (hK10)	NES1, PSSSL1
<i>KLK11</i>	KLK11 (hK11)	TLSP/Hippostasin, PRSS20
<i>KLK12</i>	KLK12 (hK12)	KLK-L5 protein
<i>KLK13</i>	KLK13 (hK13)	KLK-L4 protein
<i>KLK14</i>	KLK14 (hK14)	KLK-L6 protein
<i>KLK15</i>	KLK15 (hK15)	prostinojen, HSRNASPH

### 2.3.1.Doku Kallikreinleri Gen ve Protein Yapısı

İnsan kallikrein gen lokusu 19. kromozomun uzun kolunun sitogenik bölgesinde q13.3-13.4 telomer yönüne doğru bulunmaktadır ve sentromerik yönde testiküler asit fosfataz genine (ACPT), telomerik yönde ise kanser-ilişkili gen (CAG) ve sialik asit bağlayıcı Ig-benzeri lektin (Siglec) ailesinin bir üyesi olan Siglec-9 'a bağlanmaktadır<sup>51,52</sup>. Bu lokus 265 kb uzunluğundadır ve 15 fonksiyonel gen (*KLK1-15*) ve en az bir pseudogen (*ΨKLK*) içermektedir (Şekil 1). Bu pseudogenlere ilişkin çelişkili bilgiler mevcuttur, örtüşen DNA dizilerinin ya 5 ekzonlu bir pseudogen ya da 1 ekzondan oluşan işlenmiş pseudogen meydana getirdiği rapor edilmektedir<sup>53,54</sup>.

Kallikrein genleri ardışık bir sırada sıkıca kümelenmiştir ve herhangi bir kallikrein olmayan gen araya giremez. İnsandaki üç klasik kallikrein geni (*KLK1*, *KLK2* ve *KLK3*), *KLK15* ile birlikte 60 kb'lık bir bölgede kümelenmiştir buna karşın *KLK4-KLK14* ve *ΨKLK1* pseudogen, telomerik yön ile *KLK2* arasında bulunmaktadır. İnsan, şempaze ve kemirgen genomları arasında kallikrein gen organizasyonunun sintenik ilişkisi nispeten korunmuştur<sup>36</sup> (Şekil 1). İnsan kallikrein genlerinin boyutları intron uzunluğuna bağlı olarak 4-10 kb aralığında farklılık göstermektedir<sup>41,55</sup>.

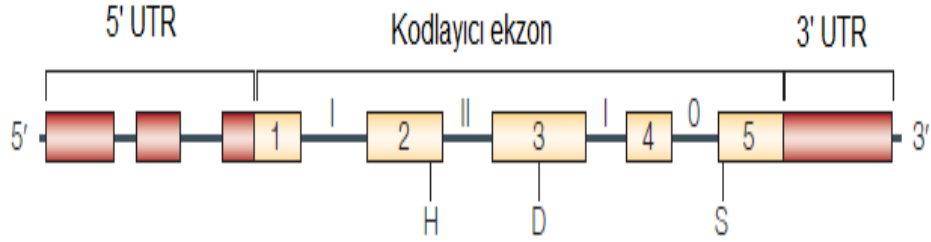


**Şekil 1. Doku kallikrein gen lokusunun organizasyonu<sup>36</sup>, A. İnsan (gen uzunlukları belirtilmektedir), B. Şempanze, C. Fare, D. Sıçan**

Kallikrein genleri ekzon/intron organizasyonu, ekzonik bölgelerin sayısı ve uzunluğu, intron fazı, korunmuş translasyonel başlangıç ve durdurma bölgeleri ve katalitik üçlü kodonlarını da içeren pek çok ortak özelliği paylaşmaktadır<sup>56</sup>.

Tüm kallikrein genleri 5 kodlayıcı ekzon içermektedir ve bunların çoğu (*KLK1*, *KLK2* ve *KLK3* hariç) bir ya da daha fazla 5'-untranslated bölgeye (5' UTR) sahiptir (Şekil 2). İlk ekzon daima 5' UTR içermektedir. Bu bölgeyi metiyonin başlangıç kodonu takip etmektedir. Burası ekzon sonundan ~50 bç uzaklıkta bulunmaktadır. Stop kodonu daima son kodlayıcı ekzonun başlangıcından ~150 bç içeride bulunmaktadır. Ekzon boyutları çok benzer ya da özdeştir<sup>5</sup>.

Kodlayıcı ekzonun intron fazları tüm genlerde korunmuştur ( yani intron bir önceki ekzonun son kodonu ile ilişkili olarak başlar). İtron fazın modeli daima I-II-I-0'dır. Serin proteazların katalitik üçlü rezidü pozisyonları korunmuştur, histidin daima ikinci kodlayıcı ekzonun sonlarına yakın, aspartat üçüncü ekzonun ortalarında ve serin rezidüsü son ekzonun başlangıcında bulunmaktadır<sup>5</sup>. *KLK3* ve *KLK2* dışındaki tüm kallikrein genlerinin transkripsiyon yönü telomerden sentromeredir<sup>36</sup>.

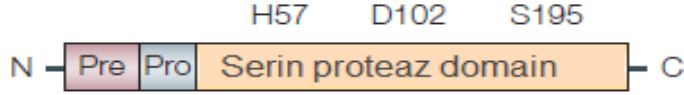


**Şekil 2. Kallikrein gen yapısı<sup>44</sup>**

Kallikrein proteinleri tek zincirli pre-pro-serin proteazlar olarak sentezlenmektedir<sup>57</sup> (Şekil 3). Her protein salgılanmadan önce proteinin N-terminalinden ayrılan 16-30 amino asitlik bir sinyal dizisi (pre-) içermektedir<sup>55</sup>. Bu dizi onları salgılanmak üzere endoplazmik retikuluma yönlendirmektedir. Sinyal peptidi kallikreinlerin inaktif zimojen formunu oluşturmak için ayrılmaktadır<sup>58</sup>. Pro-domainler 4-37 amino asitten oluşan kısa peptid dizileridir ve aktif enzim spesifik proteoliz ile propeptid bölgesinin çıkarılması ile üretilmektedir<sup>55,58</sup>.

Zimojenlerin peptid zincirlerinin moleküler ağırlığı 24-29 kDa arasındadır fakat glikozilasyondan dolayı olgun proteinlerin boyutları biraz daha büyüktür ve görünür ağırlıkları 30-40 kDa aralığında değişmektedir<sup>58</sup>.

Olgun kallikreinler histidin (H), aspartat (D) ve serin (S)'den oluşan çok iyi korunmuş katalitik üçlü içermektedir<sup>55</sup>.



**Şekil 3. Kallikrein protein yapısı**<sup>44</sup>

Tüm proteinler 10-12 sistein rezidüsü içermektedir. Sistein rezidülerinin pozisyonları da korunmuştur. Protein katlanmasının sistein rezidüleri arasında oluşan 5-6 disülfid bağı aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. KLK1-3 ve KLK13'de 5 disülfid bağı ve geri kalan kallikreinlerde ise 6 disülfid bağı oluşmaktadır<sup>5,57</sup>.

Kristal yapıları belirlenen olgun KLK1, KLK3, KLK4, KLK5-7 ve pro-KLK6 proteinlerinin oldukça benzerlik gösterdikleri saptanmıştır<sup>44,59,60</sup>. Bu kallikreinlerde içeri doğru katlanan 6 sarmal  $\beta$ -fıçı ve bir  $\alpha$ -heliksten oluşan birbirini etkileyen 2 hidrofobik domain bulunmaktadır ve katalitik üçlü frontal yüzey üzerinde yüzeysel bir çukur olarak iki domainin arasındaki ara yüzeyde bulunmaktadır<sup>56,61,62,63</sup>. KLK1 ise, klasik kallikreinlere özgü, ek olarak "kallikrein ilmek" içermektedir. Bu ilmek 95. pozisyonda ekli 11 amino asitten oluşmaktadır. Aktif bölgeye yakınlığı gözönüne alındığında, bu kallikrein ilmeğinin enzimin substrata erişebilirliğini etkilediğine inanılmaktadır. Substrat/inhibitör bağlama substrat bağlama bölgelerini çevreleyen çeşitli dış ilmekler tarafından belirlenebilmektedir<sup>62,64</sup>.

### 2.3.2. Kallikreinlerin Substrat Özgüllüğü

Kallikreinlerin özgüllüğü genellikle P1-S1 etkileşimi ve S1 alt bölgesinin 189. pozisyonunda bulunan amino asit tarafından belirlenmektedir, katalitik serin rezidüsünün (Ser195) amino terminalinde altı amino asit bulunmaktadır<sup>44</sup>. Tripsin-benzeri özgüllüğe sahip 12 kallikreinden KLK1,2,4,5,6,8,10,11,12,13,14 S1 bölgelerinde aspartat KLK15 ise glutamat içermektedir ve bunlar P1 pozisyonundaki arjinin veya lizin gibi bazik amino asitlerin karboksil kısmını yıkmaktadırlar. Kimotripsin-benzeri özgüllüğe sahip KLK3, 7 ve 9 ise S1 bölgelerinde sırasıyla serin, asparajin ve glisin gibi nonpolar amino asitleri içermektedir ve bunlar P1 pozisyonunda tirozin, triptofan ve fenilalanin gibi büyük hidrofobik amino asitlerle ilgili substrat bağlarını yıkmaktadırlar<sup>55,65,66</sup>.

Kallikreinlerin substrat özgüllüğünü tespit etmek için faj değiştirme, kombinasyonel kütüphaneler, floresan rezonans enerji transferi (FRET) ve kinetik deneyler gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır<sup>67</sup>.

### 2.3.3. Kallikreilerin Alternatif Transkriptleri

Kallikrein genleri alternatif kırılmaya tabi tutulmaktadır ve bu şekilde fonksiyonel olarak farklı birçok protein izoformunu kodlayan iki ya da daha fazla mRNA varyantı üretilmektedir<sup>68</sup>.

Günümüze kadar kallikreinlere ait 70 alternatif kırılma varyantı karakterize edilmiştir. Kırılma sırasıyla; ekzon kaybı, ekzon uzama/kesilme ya da intron korumanın bir sonucu olarak ilk kodlayıcı bölgede meydana gelmektedir<sup>69</sup>. Ek olarak KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7 ve KLK11'i içeren alternatif transkripsiyonel başlangıç bölgesine sahip kallikrein mRNA transkriptleri tanımlanmıştır<sup>36</sup>.

Ayrıca KLK2, KLK3 ve KLK7 için alternatif poliadenilasyon kırılma bölgelerinden kaynaklanan pek çok transkript bulunmaktadır<sup>36</sup>. mRNA splays varyantlarının kanseri de içeren pek çok hastalığın etiolojinde önemli bir rolü olduğu kabul edilmektedir<sup>70</sup>.

#### 2.3.4. Kallikreinlerin Düzenlenme Mekanizmaları

##### 2.3.4.1. Hormonal Düzenlenme

Son on yılda tamamlanan, kanserli hastaların kanser dokuları ve kan serumlarındaki kallikreinlerin kapsamlı ekspresyon profiline göre solid tümör kanserlerinin birçoğunda kallikreinlerin regülasyonunun bozulduğu belirtilmektedir<sup>71</sup>. Biriken kanıtlar çeşitli neoplastik ve steroid hormonlarla düzenlenen dokulardan köken alan hastalıklarda kallikreinlerin, transkripsiyon ve protein düzeylerinde artma ya da azalma olduğu gösterilmektedir. Bazı kallikrein genlerinin promotor çalışmaları transkripsiyonun cis-düzenlenmesine katıldığına inanılan hormon cevap elementlerini (HRE'ler) açığa çıkarmıştır<sup>44</sup>. Kallikrein lokusunda en az 14 fonksiyonel hormon cevap elementi belirlenmiştir. Kallikrein ekspresyonu androjenler, östrojenler, progesteronlar, mineralokortikoidler ve glukokortikoidleri de içeren steroid hormonlarla sıkı şekilde düzenlenmektedir<sup>72</sup>. Kallikrein ailesinin iki klasik üyesinin, KLK2 ve KLK3, ekspresyonunun hormonal kontrolü bunun en çarpıcı örneğidir. KLK2 ve KLK3'ün ekspresyonunun prostat ve meme kanseri hücre hattında androjen ve progesteronlara yanıt olarak arttığı bilinmektedir<sup>70</sup>. Bu hormonal kontrol, bu iki genin promotor bölgesinde bulunan hormon cevap elementlerine bağlanmaktadır<sup>73</sup>. Diğer taraftan KLK1, KLK6 ve KLK10 gibi diğer kallikreinler östrojenlere daha duyarlıdır<sup>74-76</sup>. Bazı genlerin hormonal düzenlenme paternleri farklılık gösterebilmektedir. Örneğin; KLK4 prostat ve meme hücre hatlarında androjenler tarafından, endometrial kanser

hücre hatlarında ise östrojenler tarafından upregülasyona uğramaktadır<sup>77-79</sup>. Yine KLK12 prostat hücre hatlarında androjenler ve progesteronlar tarafından, meme kanser hücre hatlarında ise östrojenler ve progesteronlar tarafından upregülasyona uğramaktadır<sup>80</sup>.

#### 2.3.4.2. Epigenetik ve microRNA'lar ile Düzenlenme

Kallikreinlerin mRNA ekspresyonunun düzenlenmesi özellikle DNA metilasyonu gibi epigenetik faktörler aracılığıyla da olabilmektedir<sup>70</sup>. Örneğin; meme kanserinin gelişimi ve progresyonu sırasında DNA metilasyonunun tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasında yaygın bir modülatör olarak işlev gördüğü bulunmuştur<sup>81</sup>. Başka bir çalışmada ise *KLK10*'un 3. ekzonunun epigenetik metilasyonunun ilerlemiş meme kanserlerinin çoğunda gen ekspresyonunun kaybına neden olduğu belirtilmiştir<sup>82</sup>. *KLK10* mRNA'sının azalması, mide kanseri, akciğer kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom ve akut lenfoblastik lösemi gibi çeşitli kanserlerde CpG adacıklarının hipermetilasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Benzer şekilde *KLK6* geninin aşırı ekspresyonu demetilasyon ile bağlantılı iken inaktivasyonu *KLK6*'nın proksimal promotorunda bulunan spesifik CpG dinükleotidlerinin hipermetilasyonu ile ilişkilendirilmektedir<sup>70</sup>.

Son zamanlarda keşfedilmiş olan microRNA'lar (miRNA'lar) gen ekspresyonunu düzenleyen küçük kodlanmayan RNA'lardır<sup>83</sup>. miRNA genlerinin sıklıkla kanser-ilişkili genomik bölgelerde buldukları genom çalışmalarında gösterilmiştir<sup>84</sup>.

miRNA'lar ile posttranskripsiyonel kontrol mekanizması, kallikreinlerin mRNA ve protein düzeyleri arasındaki önemli farklılıkları açıklamak için ileri sürülmektedir<sup>85</sup>. miRNA'lar mRNA'lara kısmen

bağlanarak işlev görmektedirler ve böylece hedef proteinin ekspresyonunu negatif olarak düzenlemektedirler<sup>86</sup>. Bir miRNA birden fazla kallikreini hedefleyebilmekte böylece çoklu kallikrein protein ekspresyonlarını eş zamanlı olarak kontrol edebilmektedir<sup>85</sup>. Farklı miRNA hedef tahmin algoritmaları kullanarak, Chow ve ark. 96 tane miRNA'nın bir veya daha fazla kallikreini hedeflediğini kanıtlamışlardır. KLK10 en çok hedeflenen kallikreindir (19 miRNA tarafından), onu KLK5 ve KLK13 izlemektedir. Buna karşın KLK1,3,8 ve 12'nin bilinen miRNA'larla etkileşimi hakkında bir bulguya rastlanılmamıştır. Şunu belirtmek yerinde olur ki KLK2,4,5 ve 10'nun 3' UTR'lerinde çoklu miRNA hedefleme bölgesi olduğu tahmin edilmektedir. Şüphesiz ki miRNA-kallikrein ilişkisini doğrulamak için daha ileri düzeydeki deneysel değerlendirmeler gereklidir<sup>70,87</sup>.

### 2.3.5. Kallikreinlerin Fizyolojik Fonksiyonları

Kallikreinler başlıca deri, meme, prostat, kolon, pankreas ve beyini de içeren pek çok organda eksprese olmaktadır. Salgılandıktan sonra kallikreinler ter, süt, tükürük, seminal plazma ve serebrospinal sıvı gibi vücut sıvılarına girmektedir<sup>71</sup>. Bunlar bağımsız ya da bir proteolitik kaskadın parçası olarak kan basıncının düzenlenmesi, elektrolit dengesi, ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanması, prohormonların işlenmesi, nöral plastisite ve deri deskuamasyonu gibi çok çeşitli fizyolojik süreçlere katılmaktadır<sup>36</sup>.

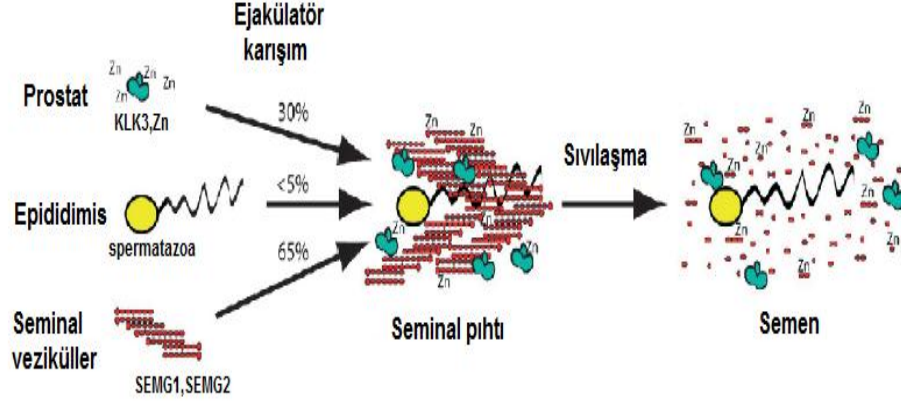
Klasik kallikreinlerin (KLK1, KLK2 ve KLK3) diğer kallikreinlerden daha önce keşfedilmelerinden dolayı fonksiyonel rolleri daha uzun süre çalışılmıştır. KLK1 böbrek, kan damarları, merkezi sinir sistemi, pankreas, barsak, dalak, tükürük ve ter bezlerini de içeren çok sayıda dokuda eksprese edilmektedir. Aynı zamanda KLK1 plazmada da belirlenmiştir ve muhtemelen ekzokrin bezlerden köken almaktadır. KLK1

başlıca düşük molekül ağırlıklı kininojenden (LWMK) kallidin salınımı aracılığıyla işlev göstermektedir<sup>88</sup>.

KLK1'in kinin-aracılı sinyal yolunun, kan basıncı düzenlenmesi, düz kas kasılması, nötrofil kemotaksisi, ağrı indüksiyonu, damar geçirgenliği, elektrolit dengesi ve inflamasyonu da içeren birtakım süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir<sup>36</sup>. Bhaola ve ark. , KLK1'in pro-insülini, düşük yoğunluklu lipoproteini, atrial natriüretik faktörün öncüsünü, prorenini, vazoaktif intestinal peptidi, pro-kollajenazı ve anjiotensinojeni böldüğünü göstermişlerdir<sup>89</sup>.

Diğer klasik kallikreinler KLK2 ve KLK3 nispeten düşük kininojenaz aktiviteye sahiptir<sup>90</sup>. Dört in-vitro çalışma KLK2'nin kendini aktive edebildiğini göstermiştir<sup>91-94</sup>. KLK2 tarafından pro-KLK3'ün aktivasyonu ile ilişkili çalışmalar da yayınlanmıştır<sup>92,94-96</sup>.

KLK2 ve KLK3 başlıca prostat ve seminal plazmada eksprese olmaları nedeniyle kapsamlı olarak incelenmişlerdir. KLK3 seminal vezikül proteinlerinden olan seminogelin I ve II'yi parçalayarak seminal pıhtının çözünmesini sağlar ki bu da sperm hareketliliği için gerekli bir işlemdir<sup>97,98</sup> (Şekil 4). Ayrıca KLK2'de bu proteinleri parçalayabilir ancak KLK2'nin seminal plazmadaki konsantrasyonu KLK3'e göre 100-500 kez daha azdır ve bu nedenle de KLK2'nin seminal proteinlerin yıkımındaki rolü muhtemelen daha azdır<sup>99</sup>.

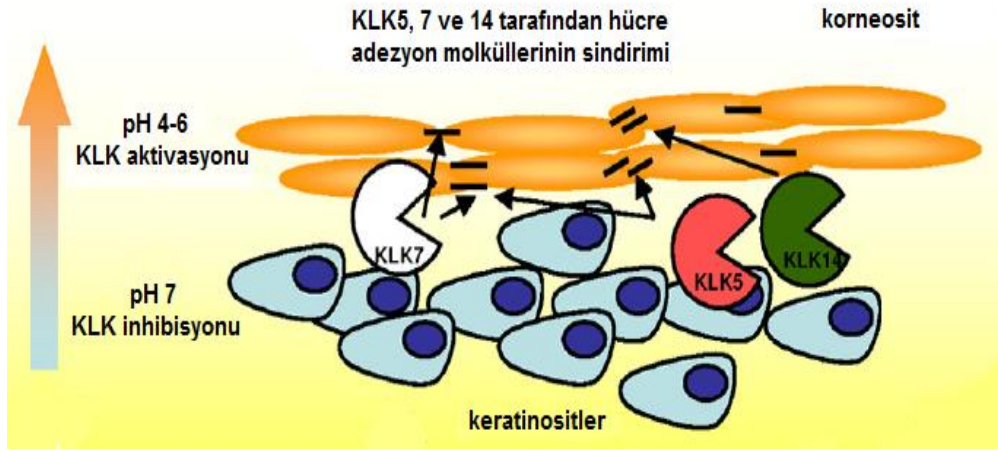


**Şekil 4. Seminal pıhtının sıvılaşması**<sup>58</sup>

Bu fonksiyonlarının yanı sıra KLK2'nin insülin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3 (IGFBP-3) proteolizi aracılığıyla büyüme faktörlerini düzenlediği ileri sürülmektedir. Son zamanlarda, KLK2'nin ürokinaz tip plazminojen aktivatörünün (uPA) zimojen ya da tek zincirli formunu in-vitro koşullarda aktive ettiği bulunmuştur<sup>100</sup>. PSA (KLK3) için IGFBP3, dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), bazal membran, paratiroid hormon ilişkili peptid ve plazminojeni içeren çeşitli potansiyel substratlar tespit edilmiştir<sup>101-103</sup>. İnsan KLK4 proteini muhtemelen diş minesi oluşumu sırasında mine matriks proteini parçalanması veya işlenmesi aracılığıyla diş gelişimine katılabilmektedir<sup>36</sup>.

Ayrıca bazı çalışmalar kallikreinlerin derinin normal fizyolojisinde önemli rol oynayabildiğine dair çok güçlü kanıtlar sağlamaktadır. KLK5 ve KLK7 derinin en dış tabakası keratinli tabakadan (stratum corneum) izole edilmiştir<sup>104,105</sup>. Aktif KLK5, KLK7 ve KLK14'ün korneosit bağlayıcı proteinler desmoglein, desmokollin ve korneodesmosini parçalayarak derinin deskuamasyonuna katılabildikleri gösterilmiştir<sup>106</sup> (Şekil 5). Deskuamasyona ek olarak, KLK7 patolojik keratinizasyon, psöriyazis ve interlökin-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinleri

aktive etme yeteneğinden dolayı inflamatuvar reaksiyonları da içeren deri patofizyolojisinde de rol oynamaktadır<sup>36</sup>. KLK14'ün keratinli tabakadaki toplam tripsin benzeri proteolitik aktivitenin yaklaşık olarak yarısına katkıda bulunmasından dolayı derinin yeniden yapılanmasında önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir<sup>107</sup>.



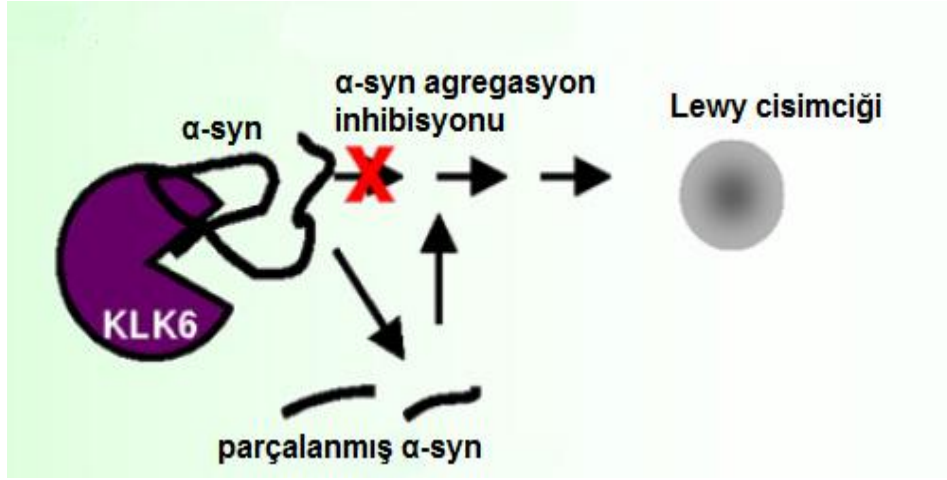
Şekil 5. Derinin deskuamasyonu<sup>49</sup>

Katelisidin insan derisinde bulunan antimikrobiyal peptidlerin en iyi bilinenlerinden birisidir<sup>108</sup>. KLK5 ve KLK7'nin katelisidin öncüsünü (hCAP18) olgun formuna (LL-37) dönüştürerek etkin şekilde derideki antimikrobiyal aktiviteye katıldıkları in-vitro olarak gösterilmiştir<sup>109</sup>.

Çeşitli kallikreinlerin pankreastaki peptid hormonların işlenmesine katılmış olabileceklerini gösteren veriler bulunmaktadır. İmmünohistokimyasal çalışmalar KLK1, KLK6, KLK10 ve KLK13'ün sırasıyla insülin, glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeptid sentezleyen, özelleşmiş  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  ve pankreatik polipeptid hücrelerinin bulunduğu Langerhans adacıklarında çok miktarda eksprese olduğunu göstermiştir<sup>110-112</sup>. Buna göre, bu kallikreinlerin pankreatik kininaz 1 ve pankreatik kininaz 2 gibi diğer prohormon konvertazlarla işbirliği içinde prohormon aktivasyonuna katılabildikleri düşünülmektedir<sup>113</sup>.

Son alışmalar beyinde salgılanan serin proteazların önemli rollerinin olduğunu ortaya çıkarmaktadır. *KLK6* ve *KLK8* ile onların kemirgen ortologları arasında yüksek oranda amino asit dizisi benzerliği (~%70) bulunmaktadır ve bu durum bu proteinlerin benzer aktiviteler gösterdiğini düşündürmektedir<sup>114-117</sup>. *KLK6* geninin fare ortoloğunun olgun oligodendrositlerde eksprese olduğu saptanmıştır. Bu genin miyelinasyon ya da miyelindeki proteinlerin donüşümü gibi oligodendrositlerin olgunlaşmasından sonra meydana gelen süreçlerde rol oynadığı düşünülmektedir<sup>118</sup>. *KLK6*'nın sıçan ortoloğu miyelensefalon spesifik proteaz (MSP) olarak adlandırılmaktadır ve bu enzim kemirgenin merkezi sinir sisteminde bol miktarda bulunmaktadır<sup>114-116</sup>. Ayrıca Multipl skleroz lezyonlarının gelişmesini de içeren merkezi sinir sistemi demiyelinizan hastalığının düzenlenmesinde rol oynayabilir<sup>115</sup>. MSP'nin glutamat reseptör-aracılı sitotoksik hasara yanıt olarak arttığı gösterilmiştir<sup>114</sup>. Scarisbrick ve ark. merkezi sinir sistemi demiyelinasyonunda *KLK6*'nın rolünü araştırarak aşırı *KLK6*'nın farklılaşmış oligodendrositlerde belirgin bir işleyiş kaybına neden olduğunu belirtmişlerdir. Miyelin bazik protein ve miyelin oligodendrosit glikoprotein *KLK6*'nın substratları olarak işlev görebilmektedir<sup>117</sup>.

İnsan *KLK6*'nın amiloid öncü proteini parçalama yeteneğine sahip olduğu ve muhtemelen  $\beta$ -amiloid peptidlerini oluşturduğu için Alzheimer hastalığının gelişiminde kısmen rol aldığı belirtilmektedir<sup>119,120</sup>. Aynı zamanda *KLK6*  $\alpha$ -sinnkleini ( $\alpha$ -syn) parçalayarak  $\alpha$ -syn'nin polimerizasyonunu inhibe etmekte ve beyinde Parkinson hastalığının bir özelliği olan agregatlara neden olmaktadır. Bu agregatlar Lewy cisimciklerinde yer almaktadır<sup>121,122</sup> (şekil 6).



Şekil 6. Parkinson hastalığında KLK6'nın rolü<sup>49</sup>

Kemirgenlerde, fare *KLK8*'i çok iyi çalışılan kallikreinlerden biridir. Başlıca fare hipokampal pirimidal nöronlarında eksprese edilir. *KLK8*'in sinaptogeneze ve nöral gelişime katıldığı belirtilmektedir<sup>123</sup>. Farelerde yapılan çeşitli çalışmalar *KLK8*'in fibronektin, jelatin, kollajen ve laminin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin yıkımı üzerinden nöral plastitede rol oynayabileceğini düşündürmektedir<sup>38</sup>. *KLK8*'in ekstrasellüler matriks proteini fibronektini proteolitik yıkıma uğratarak uzun-dönemli güçlenmede (LTP) düzenleyici molekül olarak davrandığı gösterilmiştir<sup>38</sup>. *KLK8* monoklonal antikörlerinin intraventriküler olarak enjeksiyonunun epileptik paterni düşürdüğü gösterilmiştir<sup>124</sup>. Oksidatif stresin *KLK8* ekspresyonunu belirgin şekilde azalttığı belirtilmiştir<sup>125</sup>.

### 2.3.6. Kallikreinlerin Sinyal Mekanizmaları

Ortaya çıkan kanıtlar kallikreinlerin sinyal transdüksiyon yollarıyla karşılıklı etkileşimleri aracılığıyla kısmen işlev gördüklerini belirtmektedir. Kallikreinlerin aktif kininler, uPA, proteaz aktive edici reseptörler (PAR) ve matriks metalloproteazlar (MMP) aracılığıyla sinyal iletimi incelenmiştir<sup>126</sup>.

Kininler aracılığıyla kallikrein sinyali şimdiye kadar en iyi açıklanmış sinyal yollarından birisidir. KLK1'in başlıca substratı düşük moleküler ağırlıklı kininojendir (LMWK). Bu molekülün proteolizi sonrasında dekapeptid kallidin ve nonapeptid bradikinin oluşmaktadır<sup>88</sup>. Kallidin ve bradikininin fizyolojik etkileri B1 ve B2 olarak gösterilen iki bradikinin reseptörü aracılığıyla meydana çıkmaktadır. Bradikinin reseptörleri aracılığıyla sinyal iletimi pro-inflamatuar sitokinlerin salgısını uyarak doğuştan bağışıklıkta da önemlidir<sup>58,127,128</sup>.

Kinin peptidleri cAMP-prostasiklin, nitrik oksit, cGMP, mitojen aktiviteli protein kinaz (MAPK) gibi bazı alt hedefleri aktive etmektedirler. Kallikrein-kinin sistem kan basıncının düzenlenmesi, sodyum homeostasisi, inflamasyon ve anjiyogenezde içeren çok çeşitli işlemleri etkilemektedir<sup>129</sup>.

Kinin sisteme ek olarak, bazı kallikreinler örneğin; KLK2 ve KLK4, uPA-uPAR sinyal yolu ile karşılıklı etkileşimde bulunabilmektedir. KLK2 tek zincirli uPA'yı Lys<sup>158</sup>'den kopararak aktive etmektedir<sup>100</sup>. Benzer şekilde, aktif kimerik KLK4'ün in-vitro olarak uPA'yı aktive ettiği bulunmuştur<sup>130</sup>. uPA/uPAR sinyali ile plazminojen aktivasyonunun çeşitli ekstrasellüler matriks bileşenlerinin parçalanması ve MMP aktivasyonunu da içeren biyolojik etkilerinin olduğu belirtilmektedir<sup>44</sup>. Örneğin; KLK7'nin proMMP9'u bölerek aktif MMP9'u oluşturduğu gösterilmiştir<sup>131</sup>.

Son olarak ortaya çıkan kanıtlar, kallikreinlerin aktifleştirme ve sinyal gönderme işlemlerini PAR ailesinin çeşitli üyeleri yoluyla yaptığını göstermektedir. PAR1-4 G protein kenetli reseptörler (GPCR) süper ailesinin üyeleridir<sup>132</sup>. Aktivasyon, reseptörün ekstrasellüler N-terminalinin bir kısmının ayrılması ile gerçekleştirilir, bunun sonucunda bir bağlı ligand oluşur ve bölünmüş reseptör aktifleşir<sup>133</sup>. PAR1 KLK1, KLK4,

KLK5, KLK6 ve KLK14 tarafından, PAR2 KLK2, KLK4, KLK5, KLK6 ve KLK14 tarafından, PAR4 ise KLK1 ve KLK6 tarafından aktive edilmektedir ve bu yolla sinyal yollarının aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bazı çalışmalar PAR2'nin KLK4 tarafından bölünmesinin MAPK sinyal yolunu aktive ettiğini ve böylece prostat ve kolon kanser hücrelerinin büyümesine neden olduğunu belirtmişlerdir<sup>134</sup>.

### 2.3.7. Kallikrein Kaskadlarının Proteolitik Aktivasyonu

Proteazlar genellikle proteolitik kaskadlarla aktive edilmektedir. Bu kaskadlar birbirini izleyen üç ana faz başlama, ilerleme ve sonlanma ile düzenlenebilmektedir<sup>135</sup>. Uyarı sonucunda, başlatıcı zimojenler (pro-enzimler) otokataliz ile kendini aktive etmektedir. Aktif başlatıcılar daha sonra aşağı yönlü ilerletici proteazları dönüştürür ve bunlarda sonlandırıcı zimojenlerin aktifleşmesini katalizlemektedirler<sup>67</sup>.

Proteolitik aktivasyonun geri dönüşümsüz yapısı nedeniyle bu kaskadlar bir seri feedback döngüsü ve inhibitörler aracılığıyla sıkıca düzenlenmektedir. Proteolitik düzenleyici mekanizmalar kontrolsüz proteaz aktivasyonuna bağlı zararlı etkilerin önlenmesinde kritik role sahiptir<sup>126</sup>. Proteolitik kaskadlar çok sayıda proteaz ailesinde kapsamlı olarak incelenmiştir ve koagülasyon-fibrinoliz, kaspaz-aracılı apoptoz ve hem doğuştan hem de sonradan kazanılmış bağışıklığın kompleman sistemi gibi yaşamsal fizyolojik süreçlerde iyi tanımlanmıştır<sup>136-138</sup>.

Kallikreinlerin fizyolojik fonksiyonlarını proteolitik kaskadlar yoluyla ortaya koydukları düşünülmektedir<sup>5,106</sup>. Örneğin, enterokinaz pro-KLK11'i aktive ederken, tripsinin pro-KLK5, pro-KLK6, pro-KLK7 ve pro-KLK15'i aktive ettiği gösterilmiştir. Çoğu kallikrein tripsin-benzeri özgülüğe sahip olduğu için otoaktivasyon ve diğer proKLK'ların aktivasyonundan

sorumlu tutulmaktadır<sup>36</sup>. Daha öncede belirtildiği gibi bazı kallikreinler kimotripsin-benzeri proteazlardır bundan dolayı aktivasyonları için diğer tripsin-benzeri proteazlara ihtiyaç duymaktadırlar<sup>67</sup>.

KLK5'in prostat kaskadını başlatıcı anahtar molekül olduğu ve kendini aktive ettikten sonra pro-KLK2, pro-KLK3, pro-KLK6, pro-KLK7, pro-KLK11, pro-KLK12 ve pro-KLK14'ü aktive ettiği ileri sürülmektedir<sup>106</sup>. KLK5, 7 ve 14'ün derinin keratinli tabakasında bir proteolitik kaskada dahil olduğu belirtilmektedir<sup>106</sup>. Bu kallikreinlerin kontrolsüz aktivasyonunun çeşitli deri hastalıklarındaki aşırı deskuamasyonun majör nedeni olduğu düşünülmektedir<sup>139,140</sup>.

Çeşitli kallikreinelere bağlanarak onların aktivitelerini inhibe eden çeşitli endojen inhibitörler tanımlanmaktadır. Bunlar;  $\alpha_1$ -antikimotripsin (ACT), protein C inhibitör (PCI),  $\alpha_2$ -makroglobulin,  $\alpha_2$ -antiplazmin,  $\alpha_1$ -antitripsin,  $\alpha_1$ -proteaz inhibitör, antitrombin III, proteaz inhibitör 6 ve kallistatindir<sup>38</sup>. Yine  $Zn^{2+}$  ve pH da kallikreinlerin enzimatik aktivitelerinin önemli inhibitörleridir<sup>49</sup>.

### 2.3.8. Kallikreinlerin Kansere Patofizyolojisindeki Rollerini

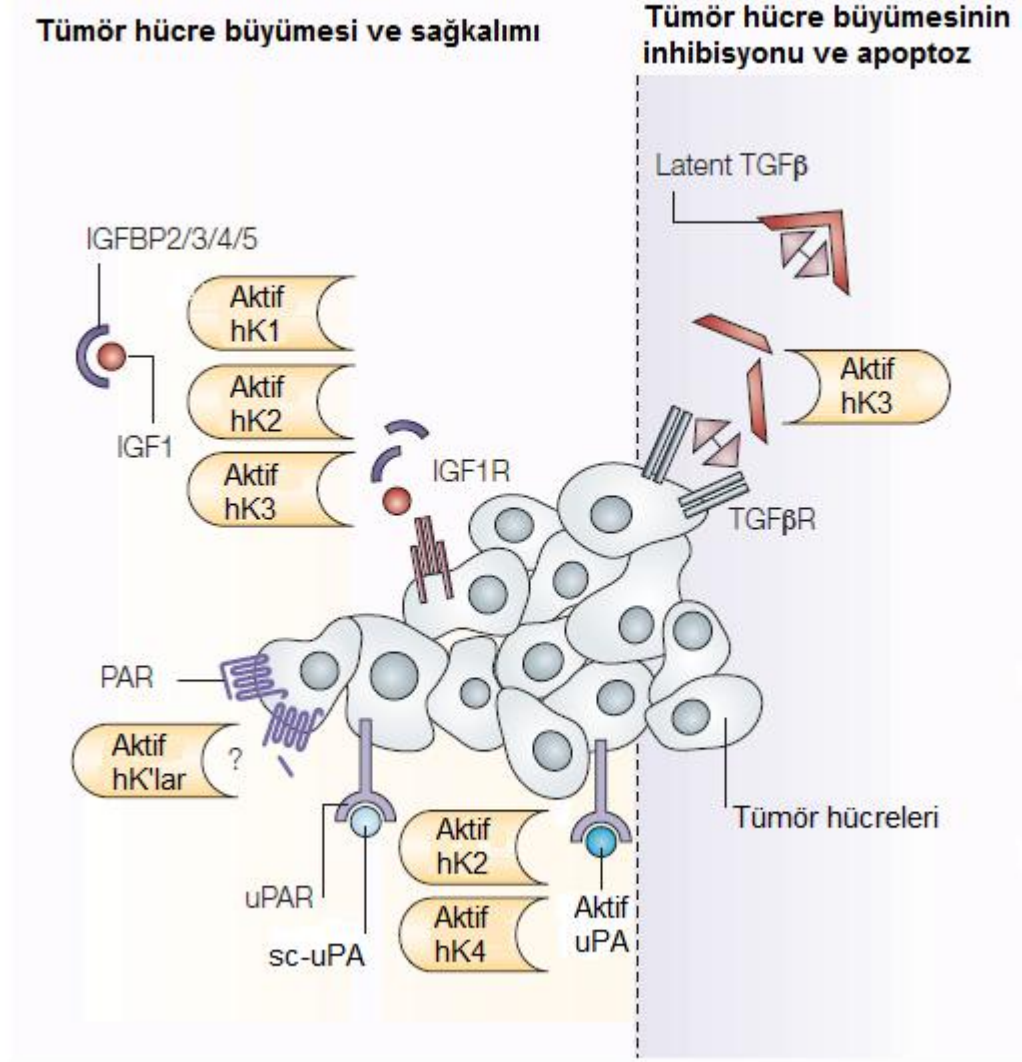
#### 2.3.8.1. Tümör Büyümesinde Kallikreinlerin Rolü

Kallikreinlerin tümör hücre proliferasyonunu düzenleyerek erken neoplastik progresyona katılabileceklerine dair ortaya çıkan yeni kanıtlar bulunmaktadır. Kallikrein-aracılı tümör gelişiminin başlıca insülin-benzeri büyüme faktörleri (IGF) aracılığıyla modüle edildiğine inanılmaktadır<sup>44</sup>.

IGF aksı hücre büyümesinin düzenlenmesi, farklılaşma ve apoptozda önemli rol oynamaktadır<sup>141,142</sup>. IGF aksı embriyonik dokuların büyümesi ve farklılaşmasına katılabilmektedir ve özel koşullar altında tümörjenez süreçlerinde de rol oynayabilmektedir<sup>143,144</sup>. IGF'ler, onların yarı ömrünü uzattığına ve onları hedef dokularına taşıdığına inanılan kendi bağlayıcı proteinlerine (IGFBP) bağlıdır<sup>145</sup>. IGF'ler etki göstermeden önce, IGFBP'lerden ayrılmalıdırlar. Çünkü IGFBP proteinleri, IGF'lerin IGF1 reseptörüne (IGF1R) bağlanmasını antagonize etmektedirler. KLK1, KLK2 ve KLK3 IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4 ve IGFBP5'i parçalayan IGFBP proteazlardır ve bu proteazlar onların tümör baskılayıcı etkilerini ortadan kaldırarak IGF1'e olan afinitelerini düşürmektedir<sup>44</sup>. Örneğin; KLK2 IGFBP3'ü parçalayarak IGF'nin kullanılabilirliğini artırmak tadır ve hücre çoğalmasını hızlandırabilmektedir<sup>146</sup>.

Yine KLK4 ve KLK11'in de IGFBP3'ü parçaladığı belirlenmiştir. Bu bulguların aksine, meme kanserinde KLK3'ün tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir<sup>147-149</sup>. Ayrıca KLK3'ün, birçok normal ve neoplastik hücrede büyümenin baskılayıcısı ve apoptozun indükleyicisi olan latent TGF $\beta$ 'yı aktive ettiği bildirilmiştir<sup>150</sup>.

Benzer şekilde, Bindukumar ve ark. seminal plazmadan saflaştırılan serbest KLK3 ile muamele edilmiş PC-3M prostat kanseri hücre hattında KLK3'ün tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu uyardığını ve tümör büyüme promotorlarını baskıladığını göstermiştir<sup>151</sup>. KLK10'un meme ve testis kanserlerinde ekspresyonunun azalması tümör baskılayıcı rolü olduğunu düşündürmektedir<sup>9,152</sup>. Bu kallikreinlerin tümör önleyici rollerinin lehine kanıtlar olmasına rağmen onların in-vivo koşullarda patolojik fonksiyonları halen tartışmalıdır.



Şekil 7. Tümör hücre büyümesi ve inhibisyonunda kallikreinlerin rolü<sup>44</sup>

### 2.3.8.2. Anjiyogenez ve Kallikreinler

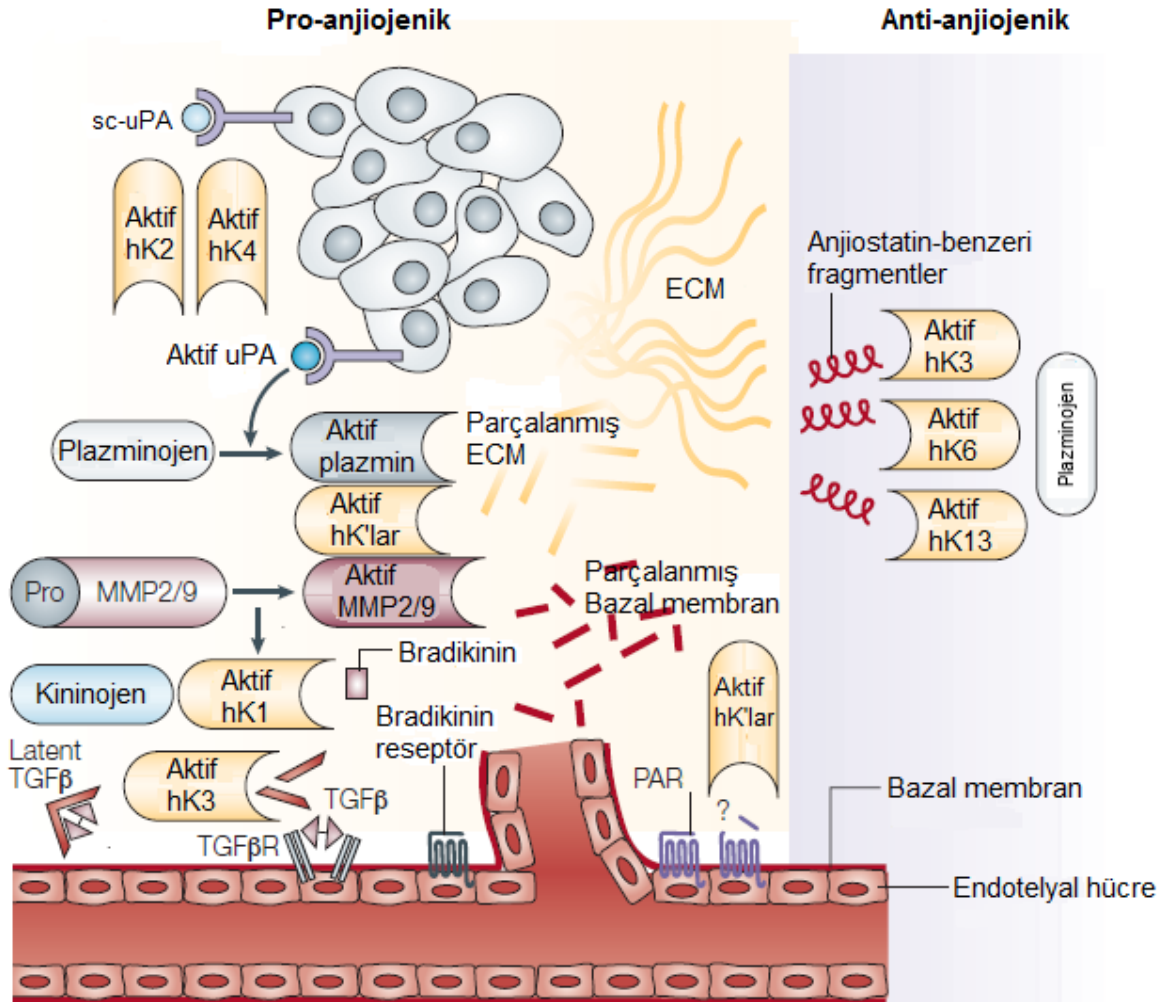
Anjiyogenez önceden var olan kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesidir ve bu durum malign tümör gelişiminde kaçınılmaz bir süreçtir. Anjiyogenez, tümör gelişimi ve progresyonuna

neden olan proanjjiyojenik ve anjiyostatik faktörlerin dengede tutulmasıyla düzenlenmektedir<sup>153</sup>. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) anjiyogenezin pozitif düzenleyicileri iken interferon- $\alpha$ , anjiyostatin ve endostatin inhibitörleridir<sup>154</sup>.

Kallikreinlerin anjiyogenezdeki rollerinin henüz tam olarak ortaya çıkarılmamasına rağmen ekstrasellüler matriks yeniden yapılanmasına ve anjiyogenez-ilerletici süreçlere olan katkıları inkar edilmemektedir. Kallikreinler yeni kan damarlarının büyümesi için gerekli olan ekstrasellüler boşluğu sağlamak için ekstrasellüler matriks proteinlerini ya kendileri doğrudan ya da uPA ve MMP'ları aktive ederek parçalamaktadırlar<sup>155</sup>. Örneğin; KLK2, KLK3, KLK6 ve KLK7 farklı ya da kısmen örtüşen ekstrasellüler matriks proteinlerinin hidrolizini doğrudan katalizlerken bazı kallikreinler ise dolaylı olarak ekstrasellüler matriks parçalanmasını etkilemektedir. Örneğin; KLK1 pro-MMP2 ve pro-MMP9'u aktive etmektedir<sup>44</sup>.

Aynı zamanda KLK2, 4 ve 12 plazmin oluşumuna sebep olan uPA sistemi aracılığıyla sinyal oluşturmaktadır. Plazmin fibronektin, proteoglikanlar ve fibrini de içeren çok sayıda ekstrasellüler matriks proteinini ayrıştırmakta ve latent kollajenazları aktive etmektedir<sup>67</sup>. Kallikrein-kinin sistemin aktivasyonu aktif kinin peptidlerinin salınımına neden olmaktadır. Aktif kinin cAMP, protein kinaz B (Akt/PKB) ve VEGF'nin aktivasyonu, JNK ve TGF $\beta$  sinyal yolunun baskılanması aracılığıyla anjiyogenez uyarmaktadır<sup>156</sup>. Benzer şekilde, KLK1 ve 12'nin endotelial hücreler tarafından eksprese edildiğine ve kinin sinyal yolu aracılığıyla fonksiyon yaptığına inanılmaktadır<sup>157,158</sup>.

Bu bulguların aksine bazı kallikreinlerin anjiyogenezi baskılayabildiği gösterilmiştir. Örneğin; KLK3'ün endotelial hücre proliferasyonunun ve anjiyogenezin etkili inhibitörleri olan anjiyostatin-benzeri bileşikler aracılığıyla vaskülatör oluşumunu önlediğine inanılmaktadır<sup>103</sup>. KLK3'e ek olarak KLK5, KLK6 ve KLK13'ün de plazminojenden anjiyostatin-benzeri fragmentleri oluşturabildiğine dair in-vitro veriler elde edilmektedir<sup>158-161</sup>.



Şekil 8. Anjiyogenezde kallikreinlerin rolü<sup>44</sup>

### 2.3.8.3. İnvazyon-Metastaz ve Kallikreinler

Metastaz kompleks bir süreçtir. Bu süreçte bir dizi basamak mevcuttur. Öncelikle kanser hücreleri primer tümörden ayrılır, çevre dokulara ve bazal membranlara invazyon gerçekleştirir ve daha sonra kan ya da lenf dolaşımına girerek uzak bir hedef dokuya ulaşır ve orada kolonize olurlar<sup>162</sup>.

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) epitel hücrelerinin mezenkimal-benzeri fenotipe dönüşümünü sağlayan hücresel bir süreci temsil etmektedir ve böylece bu hücrelerin migrasyonunu, invazivliğini ve büyümesini artırmaktadır<sup>163</sup>. EMT, epitelyal orjinlerinden dolayı solid tümörlerin çoğunun progresyonu için bir kontrol noktası olarak kabul edilmektedir. EMT E-kadherinin kaybını uyarır ve N-kadherin ve vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonunu artırır böylece tümör hücrelerinin hareketliliğini ve invazivliğini geliştirmektedir<sup>155</sup>.

Veveris-Lowe ve ark. yaptığı bir çalışmada KLK3 ve KLK4'ün EMT'nin belirteci olabilecek fenotipik değişimlere katıldığını ve bu kallikreinlerin sabit ekspresyonunun prostat hücre hattı PC-3 de hücre invazivliğinde artışa neden olduğunu belirtmişlerdir<sup>164</sup>. Başka bir çalışmada ise KLK3'ün baskılanmasının LNCaP prostat kanser hücrelerinde invazyonu azalttığı gözlemi EMT de KLK3'ün önerilen fonksiyonu ile tutarlılık göstermektedir<sup>165,166</sup>. Bunun aksine KLK3 ile tedavi edilen farelerde akciğer metastazının sayısındaki azalma KLK3'ün tümör metastazını inhibe ettiğini göstermektedir<sup>167</sup>. KLK3'ün metastatik rolünün hücreye özgü mü yoksa in-vivo anti-anjiyogenik etki ile mi dengelendiği ilave araştırmalara ihtiyaç duymaktadır.

KLK7'nin prostat kanser hücrelerinde EMT-benzeri değişimleri uyararak onların migrasyon ve invazyon kapasitesini artırdığı gösterilmiştir<sup>168</sup>. Yumurtalık kanser hücrelerinde in-vitro koşullarda KLK4, KLK5, KLK6 ve KLK7'nin düzenli ekspresyonunun invazivliği artırdığı gösterilmiştir<sup>169</sup>. Seröz epitelyal over kanserinde KLK7'nin sabit bir şekilde aşırı ekspresyonunun çok hücreli agregatların oluşumunu teşvik ettiği ve bu yolla kanser hücrelerinin sağkalımına ve paklitaksele olan direncine olanak sağladığı bulunmuştur<sup>170</sup>.

Kallikreinlerin EMT'deki önerilen fonksiyonlarına ek olarak ekstrasellüler matriks yıkımı ve yeniden yapılanması aracılığıyla metastatik yayılmaya ilişkili olduğu gösterilmektedir. Çok sayıda in-vitro substrat çalışmaları fibronektin, kollajen, laminin ve proteoglikanları içeren çeşitli ekstrasellüler matriks proteinlerinin parçalanmasına kallikreinlerin direk ya da dolaylı olarak katıldığını göstermiştir<sup>67</sup>. MMP'ler, plazmin ve katepsinler kanser-ilişkili ekstrasellüler matriks parçalanmasından sorumludurlar<sup>26</sup>. Kallikreinler uPA ve MMP sinyal yolları ile doku yıkımına katılabilmektedir<sup>67</sup>. Prostat-ilişkili KLK2, KLK3 ve KLK14'ün in-vitro koşullarda fibronektin ve laminini parçaladığı bulunmuştur<sup>99,165,171</sup>.

Ekstrasellüler matriks yıkımında anahtar rol oynayan plazmin, uPA ve uPA reseptör kompleksi tarafından plazminojenden aktive edilebilmektedir. KLK4, uPA'nın pro enzimini aktive ederek ya da hücre yüzey reseptörünü ayırarak tümör-ilişkili plazminojenin aktivasyonuna aracılık edebilmektedir. Son zamanlarda yeni bulgular kemik metastazında çeşitli kallikreinlerin olası rolünü belirtmiştir<sup>67,172</sup>.

### 2.3.9. Kanser Biyobelirteci olarak Kallikreinler

Tümör belirteci olarak kallikreine odaklanılması 1970'lerin sonu ve 1980'lerin başında prostatta, malign şekle dönüşmüş prostatta ve prostat kanserli hastaların serumlarında bulunan KLK3'ün (PSA) keşfiyle başlamaktadır<sup>173-175</sup>. KLK3 prostat kanserinin tarama, tanı, evreleme ve takibinde kullanılan önemli bir biyobelirteçtir<sup>176</sup>. Benign prostat hiperplazili erkeklerde serum KLK3 düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir<sup>58</sup>.

Tanısal gücünü arttırmak için KLK3'e tamamlayıcı olarak serum KLK2 düzeyleri üzerine çalışmalar yürütülmektedir. Prostat kanserli hastaların serum KLK2 düzeyleri sağlıklı kontrol ve benign prostat hiperplazili hastalarla karşılaştırıldığında belirgin olarak yüksek bulunmuştur<sup>177-179</sup>. Bu genlere ek olarak KLK5, KLK11, KLK14 ve KLK15'in prostatta eksprese edildiği ve bunların prostat kanserinde diagnostik ve prognostik biyobelirteç olabilecekleri belirtilmektedir<sup>58</sup>. Yumurtalık kanserinde bir grup hasta serumunda KLK5, KLK6, KLK8, KLK10, KLK11 ve KLK14 düzeylerinin artmasından dolayı bu kallikreinlerin yumurtalık kanseri için potansiyel biyobelirteç olabilecekleri düşünülmektedir<sup>44</sup>. Özellikle erken evre (I,II) yumurtalık kanserli hastalarda ameliyat öncesi serum KLK6 ve KLK10 düzeylerinin kanser antijen 125'in (CA125) tanısal duyarlılığını artırabileceği belirtilmiştir<sup>180,181</sup>. Meme kanserinde KLK3 düzeyinin iyi prognostik belirteç olduğu gösterilmiştir<sup>182</sup>.

### 2.3.10. Kallikreinlerin Terapötik Kullanımları

Hücre büyümesinin düzenlenmesi, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi birçok kanser ilişkili sürece dahil olduğundan ve neoplastik ilerlemeyi teşvik ya da inhibe etme yeteneklerinden dolayı kallikreinler terapötik müdahaleye yönelik potansiyel hedefleri temsil etmektedirler<sup>70</sup>.

Farklı terapötik yaklaşımlar arasında kallikreinlerin proteolitik aktivitesinin kullanılması ya da modülasyonu en etkili olanlarıdır. Örneğin; KLK3-spesifik peptid taşıyıcılarına konjuge sitotoksik ajanlar (doksorubisin, vinblastin) prostat kanserinde tümör hedeflemek için ön ilaçlar olarak tasarlanmıştır<sup>44</sup>. Pre-klinik çalışmalar bu ön ilaçların in-vitro koşullarda KLK3-üreten prostat kanser hücrelerine seçici olarak toksik olduğunu göstermektedir<sup>183</sup>. Yine spesifik olmayan endojen serpinlerin yapısal özelliklerine göre KLK2 ve KLK14'e spesifik sentetik inhibitörler yapıldığı belirtilmektedir<sup>184,185</sup>.

## 2.4.Beyin Tümörleri

Beyin tümörleri tüm kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahip kanserlerden biridir<sup>186</sup>. Beyin, diğer intrakranial ve merkezi sinir sistemi tümörleri köken aldıkları bölge, morfolojik özellikler, genetik değişiklikler, büyüme potansiyeli, invazivlik derecesi, ilerleme ve nüks için eğilim ve tedaviye cevap gibi başlıklarda değişkenlikleri fazla olan heterojen neoplazm gruplarıdır<sup>187</sup>.

Köken aldıkları hücre, histopatolojik özellikleri ve anaplazi derecesi temel alınarak tümörlerin WHO sınıflandırılması merkezi sinir sistemi malignitelerinin uluslararası standardizasyonunu sağlamaktadır. Tümörler dört gruba ayrılmaktadır<sup>188</sup>. Bunlar:

1. Derece 1 → benign
2. Derece 2 → düşük dereceli
3. Derece 3 } yüksek dereceli ya da malignant
4. Derece 4 }

### 2.4.1. Menenjiom

Menejiomlar en sık görülen iyi huylu intrakraniyal tümörlerdir ve tüm intrakraniyal tümörlerin %13-26'sını oluşturmaktadır<sup>189,190</sup>. Menenjiomlar araknoid hücrelerden köken almaktadırlar ve kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülmektedir<sup>189,190</sup>. Yıllık insidansı her 100.000 kişide kadınlarda 2-7 erkeklerde 1-5 arasındadır<sup>191</sup>. Çocuklarda ve ergenlerde menenjiom görülme oranı her iki cinsiyette de eşittir. Menenjiomlar en sık 60-70'li yaşlarda görülmektedir. Çoğu menenjiom uzun süreli iyi prognoza sahiptir<sup>190</sup>. Menenjiomların histolojik derecelendirilmesi WHO sınıflandırılmasına dayanmaktadır ve malignite derecesine göre üç gruba ayrılmaktadır<sup>192,193</sup>.

1. Bening menenjiom (WHO Derece I)
2. Atipik menenjiom (WHO Derece II)
3. Anaplastik menenjiom (WHO Derece III)

Makroskobik olarak menenjiomlar lobüler mimariye sahip düzgün sınırlı kitleleri oluşturmaktadırlar<sup>194</sup>. Çoğu menenjiom yavaş büyüyen lezyonlardır ve tipik olarak gittikçe artan intrakraniyal basınç semptomlarıyla ilişkilidir. Baş ağrısı ve nöbetler yaygındır ve diğer semptomlar tümörün büyüklüğü ve yerleşimine bağlıdır<sup>195</sup>. Birçok menenjiom için iyonize radyasyon, kafa travması, hormonlar ve diğer reseptörlere bağlanma bölgeleri, genetik faktörler gibi çeşitli risk faktörleri tanımlanmaktadır<sup>189,196</sup>. Örneğin; menenjiomların %60'dan fazlası 22q12.2 kromozomu üzerinde bulunan nörofibromatoz 2 (NF2) tümör baskılayıcı geninin somatik mutasyonunu göstermektedir<sup>197</sup>.

Menenjiomların neredeyse %61'i menenjiom büyümesinde önemli rol oynayan progesteron reseptörlerine (PR) sahiptir. PR ekspresyonu benign histolojik derece ile ilişkilendirilmektedir. Derece II ve III de genellikle PR bulunmamaktadır<sup>198-200</sup>. Östrojen reseptörünün (ER) ekspresyonu ise daha az bağlantılıdır<sup>201</sup>. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) reseptörünün menenjiomların yarısından fazlasında bulunduğu belirtilmektedir<sup>202</sup>. Somatostatin reseptörleri menenjiomların %70-100'ünde eksprese olmaktadır. İmmünohistokimya kullanılarak yapılan bir çalışma somatostatin reseptörlerinin yüksek mikrodamar yoğunluğu ile uyumlu olarak yüksek derece menenjiomlarda sıklıkla eksprese edildiğini belirtmiştir<sup>203</sup>. Artan VEGF önemli ölçüde damarlanma, tümör çevresi ödemi ve çoğalma ile ilişkilendirilmektedir<sup>204</sup>. VEGF ekspresyonunun ve vasküler geçirgenlik faktörünün ekspresyonunun artışı menenjiomlarda mikrodamar yoğunluğu ve mikrokistik morfolojinin artışıyla ilişkilidir<sup>205</sup>.

Menenjiomlar epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) ve onun ligandları olan epidermal büyüme faktörünü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )'yı eksprese etmektedir. Bu reseptörlerin aktivasyonunun tümör gelişimini teşvik edebileceği düşünülmektedir<sup>206,207</sup>.

Menenjiom hücrelerinde platelet kaynaklı büyüme faktörü B (PDGFB) eksprese olmaktadır ve kısmen RAF-1-MEK-1-MAPK/ERK yolunun aktivasyonu ile PDGF-BB 'nin menenjioma hücre çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir<sup>208-210</sup>. Atipik ve anaplastik menenjiomlarda benign menenjiomlara oranla PDGF ekspresyon düzeyleri daha yüksek bulunmuştur<sup>211</sup>. Derece I menenjiomlarda fosfoinozid 3 kinaz-protein kinaz B (PI3K-Akt) yolunun da aktive olduğu bulunmuştur<sup>212</sup>. Bunlara ek olarak atipik ve anaplastik menenjiomlarda muhtemelen invaziv süreçlere katılan transkripsiyon faktörü Ets-1 ve matris metalloproteinaz 2 ve 9'un ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir<sup>213</sup>. Siklooksijenaz

ekspresyonu ile tümör ilerlemesi ve anjiogenez arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir<sup>214,215</sup>.

Menenjiomlar cerrahi, radyoterapi ve medikal terapi (hormonal ve kemoterapi vb.) gibi yöntemlerle tedavi edilmektedir<sup>190</sup>.

#### 2.4.2. Glioblastoma Multiforme

Gliomalar glia hücrelerinden (astrozit, oligodendrosit, endodermal hücreler) ya da kanser kök hücrelerinden köken almaktadır ve WHO'nun sınıflandırmasına göre dört dereceye ayrılmaktadır<sup>216</sup>. Bunlar;

1. Derece I (Pilositik astrozitoma)
2. Derece II (Diffüz astrozitoma)
3. Derece III (Anaplastik astrozitoma)
4. Derece IV (Glioblastoma multiforme (GBM))

Derece III ve IV malignant glioma olarak nitelendirilmektedir. Glioblastomalar malign gliomaların yaklaşık %60-70'ini, anaplastik astrozitomalar %10-15'ini, anaplastik oligodendrogliomalar ve anaplastik oligoastrozitomalar %10'unu ve geriye kalan oran ise daha az yaygın olan tümörleri oluşturmaktadır<sup>217</sup>. Glioblastoma Amerika ve Avrupa ülkelerinde görülen en yaygın primer merkezi sinir sistemi tümörüdür ve her yıl 100.000 de 3 kişi GBM tanısı almaktadır<sup>218</sup>.

Glioblastomalar biyolojik ve genetik farklılıkları gözönüne alınarak iki alt gruba ayrılmaktadır<sup>219</sup>. Bazı düşük dereceli gliomalar nüksedebilir, ilerleyebilir ve GBM'ye dönüşebilmektedir. Bunlar sekonder glioblastoma olarak adlandırılmaktadır buna karşın de novo GBM tümörleri primer GBM olarak adlandırılmaktadır<sup>218</sup>.

Primer GBM hastalarının yaş ortalaması yaklaşık olarak 62, sekonder GBM hastalarının yaş ortalaması ise yaklaşık olarak 45'tir. Primer GBM erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir. Sekonder GBM de ise durum tam tersidir. Primer GBM gençlerde daha nadir görülmektedir. Beş yıllık sağ kalım 15-45 yaşları arasında yaklaşık olarak %13, 75 yaş ve üzeri için ise yalnızca %1 olarak belirtilmiştir<sup>218,220</sup>.

GBM'nin etiyolojisi bilinmemekle birlikte çeşitli çevresel ve genetik ajanların risk faktörü olduğu muhtemelen multifaktöriyel bir süreçtir<sup>218</sup>. Malignant glioblastomalar için belirlenen risk faktörü iyonize radyasyondur<sup>221</sup>.

GBM'nin histolojik özellikleri dikkate değer değişiklikler göstermektedir fakat vasküler hiperproliferasyon ve nekroz GBM'yi düşük dereceli gliomalardan ayıran başlıca diagnostik özelliklerdir<sup>222</sup>. GBM dağınık invazivlik, immün baskılama, agresif çoğalma, damarlanma, kemoterapi ve radyoterapiye direnç ile karakterizedir<sup>216</sup>. Neoplastik hücreler hızlıca komşu beyin parankima hücrelerini istila ederler fakat oldukça invaziv ve pro-anjiogenik özelliklere sahip olmalarına rağmen merkezi sinir sistemi dışına metastaz yapmazlar<sup>218</sup>.

Glioma hücreleri ve bağışıklık hücreleri arasındaki karmaşık etkileşimlere IL-6, IL-8, TGF- $\beta$  ve VEGF gibi glioma-kaynaklı sitokinlerin aracılık ettiği düşünülmektedir. Ayrıca glioma hücrelerinin çevredeki IL-10 ve prostaglandinler gibi immünosupressif faktörlerin ekspresyonunu uyardığı düşünülmektedir<sup>223</sup>. Bu faktörlerin çoğu GBM de aşırı eksprese olmaktadır. Tümör neoanjiogenezinde anahtar rol oynayan VEGF kemik iliği progenitör hücrelerinden kaynaklanan dendritik hücrelerin olgunlaşmasını inhibe eder ve GBM tümör hücre çoğalmasını teşvik etmektedir<sup>224</sup>.

Malignant gliomalı hastaların serumlarında TGF- $\beta$  düzeylerinin arttığı bildirilmiştir ve artan TGF- $\beta$  düzeyleri ve yüksek tümör derecesi arasında bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Malignant beyin tümörlerinde TGF- $\beta$  ekspresyonunun hücre büyümesini, migrasyonu, invazyonu, angiogenezi ve immün baskılamayı arttırdığı bulunmuştur<sup>225</sup>.

EGFR amplifikasyonu primer glioblastomalarda meydana gelir ve bu hastaların yaklaşık olarak %40-50'sinde görülmektedir. EGFR amplifikasyonu olan tümörlerin yaklaşık yarısında esas olarak EGFRvIII olarak bilinen ekstrasellüler ligand bağlama domaininden yoksun EGFR'nin otofosforile varyantı eksprese edilmektedir. Bu varyant kinaz inhibitörleri, immünotoksinler ve peptid aşular için önemli bir terapötik hedef olmaktadır<sup>226,227</sup>.

Büyüme faktörü reseptör sinyali sağ kalım, çoğalma, invazyon ve angiogenez için transkripsiyonal programların aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu büyüme faktörleriyle aktive edilen ortak sinyal iletim yolları çoğalma ve hücre döngüsü işlemlerine katılan Ras-MAPK ve apoptoz inhibisyonu ve hücrel çoğalmaya katılan PI3K-Akt-mTOR (rapamisin'in memeli hedefi) dir. PI3K yolunu negatif olarak düzenleyen tümör supresör gen fosfataz ve tensin homolog (PTEN) glioblastoma hastalarının %40-50'sinde inaktivedir<sup>227,228</sup>.

Malignant gliomaların tanısı için genellikle manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ya da bilgisayarlı tomografi (BT) önerilmektedir<sup>217</sup>. GBM'de cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemler kullanılarak tedavi uygulanmaktadır<sup>216</sup>.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Deney Grupları**

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahi Anabilim Dalına başvuran ve patolojik inceleme sonrası menenjiom derece I ve glioblastoma multiforme teşhisi konulmuş hastalardan alınan doku örneklerinde KLK5, KLK6 ve KLK7 mRNA ve protein ekspresyonları Biyokimya Araştırma Laboratuvarında ölçüldü. Daha önce radyoterapi ve kemoterapi almış hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Gruplar; menenjiom derece I (n=15) ve glioblastoma multiforme (n=15) olarak düzenlendi. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kurumsal Araştırma Değerlendirme Komisyonu (Etik Kurul) 25.06.2010 tarih ve 107 no'lu kararı ile kabul edildi.

#### **3.2. Kullanılan Cihazlar**

- Hassas Terazi (Shimadzu, Japonya)
- Homojenizatör (Heidolph, Almanya)
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Cihazı (Apollo ATC 201,CLP Inc., ABD)
- Kuru ısı bloğu (BIOSAN, EU)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- NanoDrop ND 1000 UV-Vis Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)

- Elektroforez Sistemi
- Jel Görüntüleme sistemi (Syngene, ABD)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik, Türkiye)
- Etüv (Nüve, Türkiye)
- Derin Dondurucu -80 °C (Sanyo, Japonya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Soğutmalı santrifüj ( Hermle, Almanya)
- Western Blot Cihazı (Sci-plas, İngiltere)
- Çalkalayıcı (Edmund Bühler, Almanya)
- Benmari (P-D Industriegesellschaft mbH, Almanya)
- Vorteks (Ika, Germany)
- Mikropipetler
- ELISA (TECAN, İsviçre)
- Sonikatör (Sonics, ABD)

### **3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- Agaroz (Lonza, ABD)

- dNTP (Genmark, Tayvan)
- Taq DNA polimeraz ( Thermo Scientific, İngiltere)
- Trizma-Base (Sigma, ABD)
- Borik asit (Merck, Almanya)
- Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma, ABD)
- Kloroform (Amresco, ABD)
- Etanol (Kimetsan, Türkiye)
- Etidyum bromid (Sigma, ABD)
- Orange G (Sigma, ABD)
- Gliserol ( Amresco, ABD)
- Primerler (Ella Biotech, Almanya)
- Glisin (Applichem, Almanya)
- Akrilamid (Sigma, ABD)
- Bisakrilamid (Applichem, Almanya)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Applichem, Almanya)
- Amonyum persülfat (APS) (Serva, Almanya)

- Tetrametilendiamin (TEMED) (Serva, Almanya)
- Tween-20 (Merck, Almanya)
- Sodyum klorür (Carlo Erba, İtalya)
- Ticari yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye)
- Hidroklorik asit (HCL) (Carlo Erba, İtalya)
- $\beta$ -merkaptoetanol (Sigma, ABD)
- Metanol (Merck, Almanya)
- Luminol Reaktifi (Santa Cruz, ABD)
- PVDF membran (Santa Cruz, ABD)
- Örnek Tamponu 2X (Sample Buffer 2X) (Serva, Almanya)
- Kallikrein primer antikorlar (Santa Cruz, ABD)
- $\beta$ -Aktin primer antikor (Thermo Scientific, ABD)
- Sekonder antikorlar (Santa Cruz, ABD)
- Protein Beliteci (Protein Ladder) (Thermo Scientific, ABD)
- DNA Belirteci (DNA Ladder) ( Biobasic, Kanada)
- Lizis Reaktifi (QIAGEN, ABD)

- RIPA Tamponu (Cell Signaling, ABD)
- Ticari film (Kodak, ABD)
- Ticari Developer solüsyonu (ILFORD, İngiltere)
- Ticari Fixer solüsyonu (ILFORD, İngiltere)

### **3.4. Kullanılan Kitler**

- RNA izolasyon kiti (QIAGEN, ABD)
- cDNA sentez kiti (QIAGEN, ABD)
- BCA Protein tayin kiti (Thermo Scientific, ABD)

### **3.5. Yöntemlerin Uygulanması**

#### **3.5.1. Dokudan RNA İzolasyonu**

##### **Kullanılan reaktifler ve solüsyonlar**

- RNA izolasyon kiti
- Kloroform
- %70'lik etanol solüsyonu:

70 ml etanol + 30 ml steril distile su ile karıştırılır.

### Deneyin yapılışı:

Meningioma ve glioblastoma dokularından RNA izolasyonu için (Qiagen, ABD) protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu yapıldı. 100 mg olarak tartılan dokular buz üzerinde bulunan RNase free tüplere alındı ve üzerlerine 1ml lizis reaktifi eklendi. Daha sonra buz içerisinde homojenizasyonları gerçekleştirildi. Homojenat içeren tüpler oda ısısında 5 dk. bekletildi. Bu tüplere 200 µl kloroform eklendi ve tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra 15 sn. kuvvetlice çalkalandı. Bu karışım oda ısısında 2-3 dk. bekletildikten sonra 12.000 g'de 4 °C 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra örnekler üç faza ayrıldı ve üstteki RNA içeren şeffaf sulu faz yeni tüplere alındı ve üzerlerine alınan sulu fazla eşit miktarda %70'lik etanol eklenerek vorteksle iyice karıştırıldı. Bu aşamadan sonra kit protokolüne göre kitin içerisindeki özel RNeasy spin kolonlar ve tamponlar kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND 1000 Spektrofotometre ile ölçülerek cDNA sentezinde kullanılincaya kadar RNA'lar -80 °C'de saklandı.

### 3.5.2. cDNA Sentezi

#### Kullanılan reaktifler ve solüsyonlar

- cDNA sentez kiti

### Deneyin yapılışı:

cDNA sentez kiti (Qiagen, ABD) ile RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. RNA'lar buzun üstünde eritildikten sonra yine buz üzerinde genomik DNA'nın eliminasyonu için kit içerisindeki gDNA Wipeout tamponu, RNase free su ve RNA örneği tüplerin içerisinde karıştırıldıktan

sonra 42 °C'de 2 dk. inkübe edildi. Daha sonra yine buz üzerinde reverse transkripsiyon master karışım hazırlandı ve ilk basamakta hazırlanan genomik DNA'dan arındırılmış karışımla muamele edildikten sonra 42 °C'de 15 dk. inkübe edildi. Daha sonra 95 °C'de 3 dk. inkübasyonla revers transkriptaz inaktive edildi ve oluşan cDNA'lar revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yapıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

### 3.5.3. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile Hedef Bölgenin Çoğaltılması

#### Kullanılan reaktif ve solüsyonlar

- 5X Tris-Borik asit- EDTA (TBE) tamponu stok solüsyonu:

Trizma-Base                      54 g

Borik asit                              27.5 g

EDTA (0.5 M, pH:8.0)      20 ml

Kimyasallar çözülerek distile suyla 1 litreye tamamlanır.

- Elektroforez yürütme tamponu (1X TBE):
- 5X TBE tamponundan 200 ml alınarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

- Jel Yükleme Tamponu:

Orange G                    25 mg

Gliserol                    3 ml

5X TBE tamponu    2 ml

5 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanır ve +4 °C'de saklanır.

- Agaroz jel hazırlanması:

2 g agaroz tartılıp 1X TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır ve mikrodalga fırın içerisinde şeffaf hale gelinceye kadar ısıtılır. Daha sonra biraz soğutulur ve jel tepsinine dökülür, jel tarağı yerleştirilir ve jelin donması beklenir.

- Etidyum bromid solüsyonu hazırlanması:

1 g etidyum bromid tartılır, distile suyla 100 ml'ye tamamlanır ve manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmesi sağlanır. Hazırlanan etidyum bromid solüsyonunun son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid solüsyonu hazırlanır.

### Deneyin yapılışı:

KLK5, KLK6 ve KLK7 genlerinin mRNA ekspresyonları RT-PZR kullanılarak belirlendi. Bu genlerin amplifikasyonu forward ve reverse

primerler kullanılarak yapıldı. Çalışmada kullanılan primerlerin listesi tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2. RT-PZR'da kullanılan primer dizileri**

Gen	Primer	Nükleotid dizisi
KLK5 <sup>229</sup>	Forward	5'-GCCACTACTCCCTGTCACCA-3'
	Reverse	5'-GCATCCTCGCACCTTTTCTG-3'
KLK6 <sup>230</sup>	Forward	5'-CATGGCGGACCCTGCGACAAGAC-3'
	Reverse	5'-TGGATCACAGCCCGGACAACAGAA-3'
KLK7 <sup>231</sup>	Forward	5'-GAATGAGTACACCGTGCACC-3'
	Reverse	5'-TGCCAGCGCACAGCATGGAA-3'
GAPDH	Forward	5'-GCAAATTCCATGGCACCGT-3'
	Reverse	5'-TCGCCCCACTTGATTTTGG-3'

PZR karışımının içinde DNaz-RNaz içermeyen su, 1X Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 0,6 µM forward ve reverse primerleri ile 0,026 U/µl Taq polimeraz bulunur. Toplam karışım 19 µl olacak şekilde ependorflara dağıtım yapılır ve her tüpe 1 µl cDNA eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlanır. KLK5, KLK6, KLK7 ve GAPDH için hazırlanan PZR karışımları aşağıdaki sıcaklık döngüleri uygulanarak çoğaltılmıştır.

### KLK5

95 ° C 5 dk.  
95 ° C 20 sn. }  
57 ° C 20 sn. } 45 döngü  
72 ° C 1.30 dk. }  
72 ° C 5 dk.

### KLK6

95 ° C 10 dk.  
95 ° C 10 sn. }  
62 ° C 10 sn. } 40 döngü  
72 ° C 10 sn. }  
72 ° C 5 dk.

### KLK7

94 ° C 9 dk.  
94 ° C 30 sn. }  
68 ° C 1 dk. } 40 döngü.  
72 ° C 1 dk. }  
72 ° C 10 dk.

### GAPDH

95 ° C 5 dk.  
95 ° C 30 sn. }  
55 ° C 30 sn. } 30 döngü  
72 ° C 30 sn. }  
72 ° C 5 dk.

PZR cihazında çoğaltılan PZR ürünlerini görmek için %2'lik agaroz jele 5 µl örnek+ 5 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. İlk kuyucuğa DNA belirteci yüklendi. Elektroforezde 1X TBE tamponu kullanılarak yürütüldükten sonra etidyum bromid boyası ile boyama gerçekleştirildi ve UV ışık altında görüntüldü. KLK5 için 304 bç, KLK6 için 215 bç, KLK7 359 bç ve GAPDH için 106 bç'lik amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi reaksiyonun kabul edilebilir olduğunu gösterdi.

#### 3.5.4. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

##### Kullanılan reaktifler ve solüsyonlar:

- 1X RİPA Buffer:

10X RİPA bufferdan (Cell Signaling, ABD) 1 ml alınarak distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.

- Biçinkonik Asit (BCA) Protein Tayin Kiti

##### Protein izolasyonu:

Meningiom ve glioblastoma dokularından 100 mg doku 1 ml 1X RİPA tamponuyla homojenize edildi. Daha sonra 14.000 g'de +4 °C'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant yeni tüplere alikotlandıktan sonra kullanılıncaya kadar -80 °C'ye kaldırıldı.

##### Biçinkonik Asit (BCA) kiti ile protein miktar tayini:

Meningiom ve glioblastoma dokularından izole edilen proteinlerin miktarları BCA protein tayin kitinin (Thermo scientific, ABD) protokolüne göre gerçekleştirildi.

1. Kit içerisinde bulunan siğir serum albümin ile 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0 µg/ml konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı.

2. Protein örnekleri ve standartların her birinden 25 µl 96 kuyucuklu plakaya konuldu.

3. Kitin içindeki iki reaktif 50:1 oranında karıştırılarak bu karışımdan 200 µl her bir kuyucuğa eklendi ve 37°C'lik etüvde yarım saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 562 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirildi. Standart eğri çizilerek hesaplamalar yapıldı.

### 3.5.5. Western Blot Yöntemi ile Protein Ekspresyonlarının Gösterilmesi

#### Kullanılan reaktifler ve solüsyonlar

- 2X Sample Buffer :

Her kullanımdan önce 2x Sample Bufferın (Serva, Almanya) toplam hacminin %5'i olacak şekilde içerisine β-merkaptoetanol eklendi.

- 1.5 M Tris solüsyonu (pH: 8.8)
- 0.5 M Tris solüsyonu (pH: 6.8)
- %30'luk Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu:

29.2 g Akrilamid + 0.8 bisakrilamid tartılarak 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

- %10 SDS solüsyonu
- %10 APS solüsyonu (Her kullanımdan önce taze hazırlanır)

- TEMED
- 10X Running Buffer:

30.3 g Tris-base }  
144 g Glisin } tartılarak 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır.  
10 g SDS }

- 1X Running Buffer hazırlanışı:

10x Running Bufferdan 100 ml alınarak 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır. pH: 8.3'e HCl ile ayarlanır.

- 10X Transfer Buffer:

30.3 g Tris-base }  
144 g Glisin } tartılarak 1000 ml'ye distile su ile  
tamamlanır.

- 1X Transfer Buffer hazırlanışı:

200 ml 10X transfer buffer+ 150 ml metanol+ 650 ml distile su karıştırılarak hazırlanır.

- %5'lik yağsız süt tozu (TBS-t ile hazırlanır)

- TBS-t solüsyonu:

2.42 g Tris-base

8 g NaCl



tartılarak 1000 ml'ye distile su ile

tamamlanır. pH: 7.6'ya ayarlandıktan sonra bu solüsyonun içine %0.2 Tween-20 eklenir.

- Primer ve Sekonder antikorların hazırlanışı:

Primer ve Sekonder antikorlar TBS-t ile hazırlanan %3'lük yağsız süt tozu içerisinde hazırlandı.

- Luminol Reaktifi

Deneyin yapılışı:

KLK5, KLK6 ve KLK7 genlerinin protein ekspresyonlarının gösterilmesi Western blot yöntemi kullanılarak yapıldı. BCA kiti ile protein miktarları belirlenen menenjiom ve glioblastoma örnekleri jele yüklenmek üzere hazırlandı. Tüm örneklerden eşit miktarda protein, 2X sample buffer ile karıştırıldıktan sonra örnekler 5 dk. kaynatıldı. Daha sonra hazırlanan örnekler üst kısmı %5'lik yığınlama ve alt kısmı %12'lik ayırma jelinden oluşan SDS-poliakrilamid jele yüklendi ve 1X running buffer içerisinde yürütüldü. Moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler ıslak transfer yöntemiyle PVDF membrana transfer edildi. Daha sonra membran % 5'lik yağsız süt tozu içerisinde 2 saat inkübe edildi ve 3 kez TBS-t solüsyonu ile yıkanarak proteine özgü primer antikorla (KLK5, KLK6, KLK7 1/500,  $\beta$ -Aktin 1/4000 dilüsyon) gece boyu (overnight) muamele edildi. 3 kez TBS-t ile yıkanan membran 2 saat sekonder antikor (1/10000 dilüsyon) ile muamele edildikten sonra 3 kez TBS-t ile yıkandı. Karanlık odada

membranın üzerine luminol reaktifi ilave edildi ve filme yakılarak görüntü elde edildi.

### **3.6. İstatistiksel Değerlendirme**

KLK5, KLK6 ve KLK7 pozitifliğinin yaşı grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri arasındaki karşılaştırmaları için Pearson ki-kare ve Yate's düzeltmeli ki-kare testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1.KLK5 mRNA ve Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

*KLK5* mRNA ekspresyonu ile yaş grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edildi ( $p > 0.05$ ) (Tablo 3). Fakat *KLK5* mRNA ekspresyonu menenjiom grubunun %73.3'ünde glioblastoma grubunun ise %60'ında tespit edildi ve bu histolojik gruplar arasında menenjiom grubunun *KLK5* mRNA ekspresyonunun glioblastoma grubuna oranla nispeten daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 9).

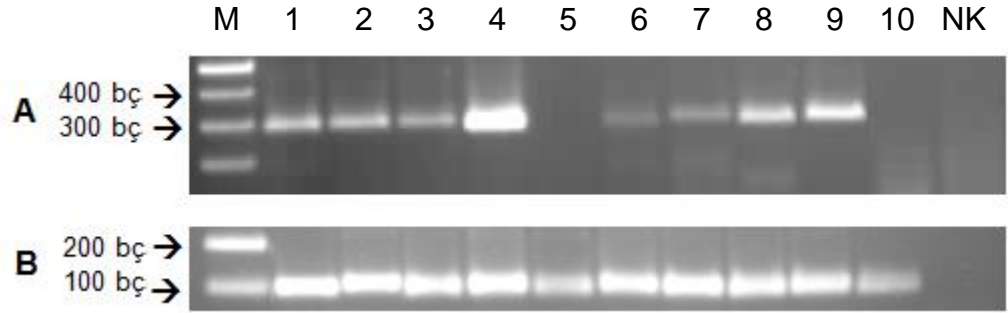
Yine bu bulgulara paralel olarak *KLK5* protein ekspresyonu ile yaş grupları, tümör derecesi, tümörlerin histolojik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı belirlendi ( $p > 0.05$ ). *KLK5* protein ekspresyonu menenjiom grubunun %73.3'ünde glioblastoma grubunun ise %53.3'ünde tespit edildi ve bu histolojik gruplar arasında menenjiom grubunda *KLK5* protein ekspresyonunun glioblastoma grubuna oranla daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 10). Ayrıca glioblastoma grubunda mRNA ekspresyonu olan bir örneğin protein ekspresyonu olmadığı belirlendi.

**Tablo 3. KLK5 mRNA ekspresyonunun yaş grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri ile ilişkisi**

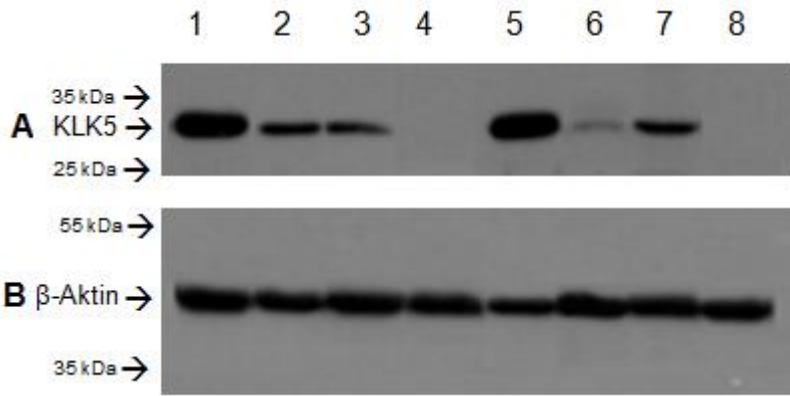
	Hasta sayısı	Hasta sayısı (%)		p-değeri
		KLK5-negatif	KLK5-pozitif	
<u>Yaş</u>				
18-40 yaş	4	1 (%25)	3 (%75)	0.861 <sup>a</sup>
40-60 yaş	16	6 (%37.5)	10 (%62.5)	
> 60 yaş	10	3 (%33.3)	7 (%66.7)	
<u>Tümör derecesi</u>				
I	15	4 (%26.7)	11 (%73.3)	0.699 <sup>b</sup>
IV	15	6 (%40)	9 (%60)	
<u>Histolojik tip</u>				
Menenjiom	15	4 (%26.7)	11 (%73.3)	0.699 <sup>b</sup>
Glioblastoma	15	6 (%40)	9 (%60)	

<sup>a</sup>Pearson ki-kare testi

<sup>b</sup>Yate's düzeltmeli ki-kare testi



Şekil 9. A. *KLK5* PZR ürünlerinin jel görüntüsü, B. *GAPDH* PZR ürünlerinin jel görüntüsü (1,2,3,4,5→ menenjiom grubu, 6,7,8,9,10→ glioblastoma grubu, NK:Negatif kontrol)



Şekil 10. A. *KLK5* Western blot görüntüsü, B.  $\beta$ -Aktin Western blot görüntüsü (1,2,3,4→menenjiom grubu, 5,6,7,8→ glioblastoma grubu)

#### 4.2. *KLK6* mRNA ve Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

*KLK6* mRNA ekspresyonu ile yaş grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edildi ( $p > 0.05$ ) (Tablo 4). Fakat *KLK6* mRNA ekspresyonu menenjiom grubunun %53.3'ünde glioblastoma grubunun ise %80'inde tespit edildi ve bu gruplar arasında glioblastoma grubunun *KLK6* mRNA ekspresyonunun menenjiom grubuna oranla yüksek olduğu belirlendi (Şekil 11).

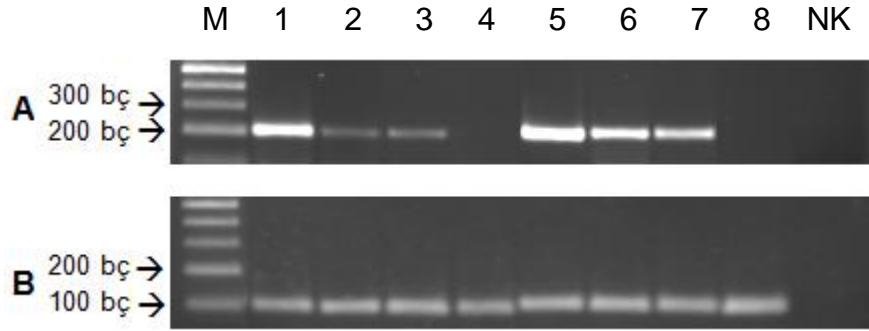
Yine bu bulgulara paralel olarak KLK6 protein ekspresyonu ile yaş grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ). Glioblastoma grubunun %60'ında menenjiom grubunun ise %53.3'ünde KLK6 protein ekspresyonu tespit edildi. Fakat glioblastoma grubunda mRNA ekspresyonu görülen üç örneğin protein ekspresyonu olmadığı tespit edildi (Şekil 12).

**Tablo 4. KLK6 mRNA ekspresyonunun yaş grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri ile ilişkisi**

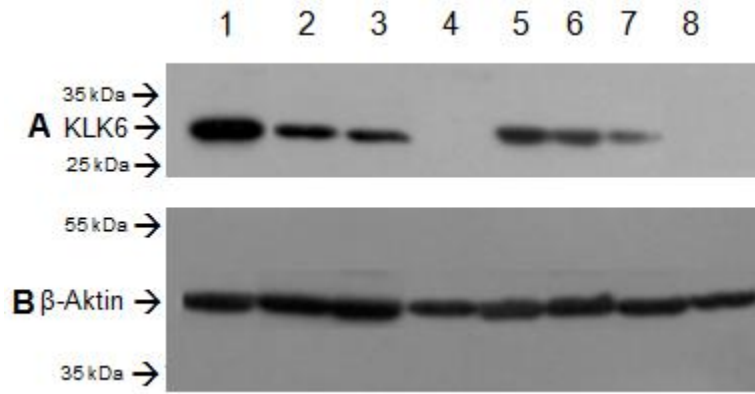
	Hasta sayısı	Hasta sayısı (%)		p-değeri
		KLK6-negatif	KLK6-pozitif	
<u>Yaş</u>				
18-40 yaş	4	1 (%25)	3 (%75)	0.837 <sup>a</sup>
40-60 yaş	16	5 (%31.3)	11 (%68.7)	
> 60 yaş	10	4 (%40)	6 (%60)	
<u>Tümör derecesi</u>				
I	15	7 (%46.7)	8 (%53.3)	0.245 <sup>b</sup>
IV	15	3 (%20)	12 (%80)	
<u>Histolojik tip</u>				
Menenjiom	15	7 (%46.7)	8 (%53.3)	0.245 <sup>b</sup>
Glioblastoma	15	3 (%20)	12 (%80)	

<sup>a</sup>Pearson ki-kare testi

<sup>b</sup>Yate's düzeltilmeli ki-kare testi



Şekil 11. A. *KLK6* PZR ürünlerinin jel görüntüsü, B. *GAPDH* PZR ürünlerinin jel görüntüsü (1,2,3,4→menenjiom grubu, 5,6,7,8→ glioblastoma grubu, NK: Negatif kontrol)



Şekil 12. A. *KLK6* Western blot görüntüsü, B.  $\beta$ -Aktin Western blot görüntüsü (1,2,3,4→menenjiom grubu, 5,6,7,8→ glioblastoma grubu)

#### 4.3. *KLK7* mRNA ve Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

*KLK7* mRNA ekspresyonu ile yaş grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edildi ( $p > 0.05$ ) (Tablo 5). Fakat *KLK7* mRNA ekspresyonu menenjiom grubunun %66.7'sinde glioblastoma grubunun ise %60'ında tespit edildi ve bu histolojik gruplar arasında menenjiom grubunun *KLK7* mRNA ekspresyonunun glioblastoma grubuna oranla nispeten yüksek olduğu belirlendi (Şekil 13).

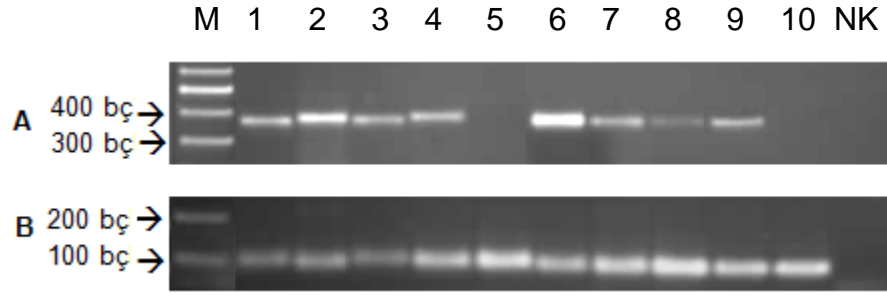
Yine bu bulgulara paralel olarak KLK7 protein ekspresyonu ile yaş grupları, tümör derecesi, tümörlerin histolojik tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edildi ( $p > 0.05$ ). KLK7 protein ekspresyonu menenjiom grubunun %66.7'sinde glioblastoma grubunun %60'ında belirlendi ve KLK7 protein ekspresyonunun menenjiom grubunda glioblastoma grubuna oranla nispeten yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 14).

**Tablo 5. KLK7 mRNA ekspresyonunun yaş grupları, tümör dereceleri ve tümörlerin histolojik tipleri ile ilişkisi**

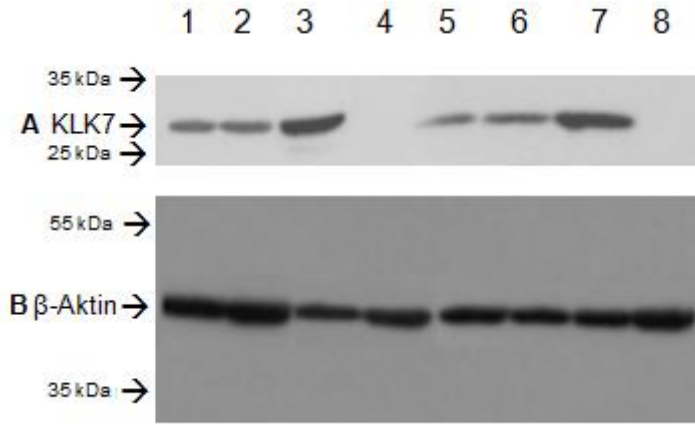
	Hasta sayısı	Hasta sayısı (%)		p-değeri
		KLK7-negatif	KLK7-pozitif	
<u>Yaş</u>				
18-40 yaş	4	1 (%25)	3 (%75)	
40-60 yaş	16	7 (%46.7)	9 (%53.3)	0.680 <sup>a</sup>
> 60 yaş	10	3 (%30)	7 (%60)	
<u>Tümör derecesi</u>				
I	15	5 (%33.3)	10 (%66.7)	1 <sup>b</sup>
IV	15	6 (%40)	9 (%60)	
<u>Histolojik tip</u>				
Menenjiom	15	5 (%33.3)	10 (%66.7)	1 <sup>b</sup>
Glioblastoma	15	6 (%40)	9 (%60)	

<sup>a</sup>Pearson ki-kare testi

<sup>b</sup>Yate's düzeltilmeli ki-kare testi



**Şekil 13. A. *KLK7* PZR ürünlerinin jel görüntüsü, B. *GAPDH* PZR ürünlerinin jel görüntüsü (1,2,3,4,5→ menenjiom grubu, 6,7,8,9,10→ glioblastoma grubu, NK: Negatif kontrol)**



**Şekil 14. A. *KLK7* Western blot görüntüsü, B.  $\beta$ -Aktin Western blot görüntüsü (1,2,3,4→ menenjiom grubu, 5,6,7,8→ glioblastoma grubu)**

## 5. TARTIŞMA

Serin proteazlar kan pıhtılaşması, büyüme ve anjiogenik faktörlerin aktivasyonu ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin degradasyonunu içeren biyolojik fonksiyonlara katılmaktadırlar<sup>232,233</sup>. Kallikreinler serin proteazların alt grubudur ve çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahiptirler. Kallikrein-aracılı ekstrasellüler proteoliz tümör büyümesinin düzenlenmesi, invazyon, metastaz ve anjiogenezide içeren kanser gelişiminin birçok aşamasında önemlidir<sup>36,44,234</sup>. Doku kallikreinleri fizyolojik koşullarda birçok dokuda farklı düzeyde eksprese edilmektedir. Biriken kanıtlar insan doku kallikrein ailesi üyelerinin malignite ile ilişkili olduğunu belirtmektedir<sup>44</sup>.

KLK5 başlıca testis, beyin, meme ve epidermiste eksprese olmaktadır<sup>55,105</sup>. KLK5 ekspresyon düzeyinin çeşitli kanserlerde değiştiği bilinmektedir. Yumurtalık kanserli dokularda yapılan bir çalışmada KLK5 ekspresyon düzeyleri araştırılmış ve KLK5 ekspresyonunun yumurtalık kanserli dokularda normal dokulara oranla arttığı ve yüksek dereceli yumurtalık kanserinde düşük dereceli yumurtalık kanserine oranla daha fazla eksprese olduğu ve bu durumun kötü prognozun belirteci olabileceğini belirtilmiştir<sup>10</sup>. Yine özellikle *KLK4* ve *KLK5* mRNA'larının aşırı eksprese olmasının derece I ve II yumurtalık kanserinde de kötü prognozun belirteci olabileceği düşünülmektedir<sup>10,235</sup>.

Yousef ve ark. meme kanserli olgularda revers transkriptaz PCR kullanılarak KLK5 ekspresyonunu araştırdıkları çalışmalarında meme kanseri derece I ve II'de KLK5 ekspresyonunun daha az, derece III'de ise daha fazla eksprese olduğunu saptamışlardır<sup>236</sup>. Avgeris ve ark. ise malign meme kanseri dokularında KLK5 ekspresyonunun benign meme kanseri dokularına oranla anlamlı olarak azaldığını belirtmişlerdir<sup>237</sup>.

*KLK5* testiste çokça eksprese edilmektedir. Testis kanserli hastaların kanserli dokularında çevredeki kanserli olmayan dokulara oranla *KLK5* düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiştir. Erken evreye (evre I) göre geç evrede (II ve III) *KLK5*'in düşük seviyeleri, *KLK5*'in elverişli bir prognostik belirteç olabileceğini düşündürmektedir<sup>238</sup>.

Korbakis ve ark. prostat kanserinde *KLK5* ekspresyonunu araştırdıkları çalışmalarında prostat kanser dokularında benign prostatik hiperplazi dokularına oranla *KLK5* ekspresyonunun azaldığını belirtmişlerdir<sup>239</sup>. Yine başka bir çalışmada prostat kanser dokularıyla normal dokular karşılaştırıldığında *KLK5* ekspresyonunun kanserli dokularda azaldığı, evre III ile evre I,II karşılaştırıldığında ise evre III'de *KLK5* ekspresyonunun azaldığı belirtilmektedir<sup>240</sup>.

Alzheimer hastalığında *KLK5* ekspresyon düzeyi kontrol grubu ile Alzheimer hasta grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir<sup>241</sup>.

Yaptığımız bu çalışmada menenjiom grubunun %73.3'ünde glioblastoma grubunun ise %60'ında *KLK5* mRNA ekspresyonunun olduğu saptanmıştır ve bu histolojik gruplar arasında *KLK5* mRNA ekspresyonunun menenjiom grubunda glioblastoma grubuna oranla nispeten daha yüksek olduğunu belirlenmiştir. Benzer şekilde *KLK5* protein ekspresyonu menenjiom grubunun %73.3'ünde glioblastoma grubunun ise %53.3'ünde tespit edilmiştir.

*KLK6* ekspresyonu çeşitli malignitelerde farklı olarak deregüle edilmektedir. Bununla birlikte tanı, prognoz ve terapötik müdahale için kanser biyobelirteci olarak potansiyel kullanımı belirtilmektedir<sup>242</sup>. İlginç olarak *KLK6* yumurtalık, kolorektal, mide, akciğer,

pankreatik ya da rahim kanserlerinde artış gösterirken, meme ve prostat kanserlerinde ise azalmaktadır<sup>230,243-248</sup>. Bu durum bu genin doku tipine ve tümör mikroçevresine bağlı olarak kanser-ilerletici ya da kanser-engelleyici aktivite sergilediğini belirtmektedir<sup>249</sup>.

Klucky ve ark. *KLK6*'nın E-kaderin dağılımını etkileyerek yani hücre-hücre temasını azaltarak hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu ilerlettiğini göstermişlerdir<sup>250</sup>. Magklara ve ark. *KLK6*'nın ekstrasellüler matriks temel bileşenlerinden fibrinojen ve kollajen tip I'i ve bazal membran bileşenlerinden kollajen tip IV'ü in-vitro koşullarda degrade edebildiğini göstermişlerdir<sup>119</sup>. Başka bir grup ise *KLK6*'nın tümör parankimasının laminin ve fibronektinini sindirebildiğini belirtmişlerdir<sup>62</sup>. Ekstrasellüler matriks bileşenlerinin parçalanmasının hücrelerin etkileşimlerini bozabileceği ve tümör hücre büyümesine ve malign transformasyona neden olan hücre çoğalmasının değişmiş düzenlenmesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Nagahara ve ark. mide kanseri hücre hattında *KLK6* genini in-vitro koşullarda susturduklarında tümör hücre çoğalmasının ve invazivliğinin azaldığını göstermişlerdir<sup>244</sup>. Aksine Pampalakis ve ark. ise meme kanserinde *KLK6*'nın epitelyal mezenkimal geçişi inhibe ederek tümör-koruyucu rolü olduğunu belirtmişlerdir<sup>247</sup>.

Kolon kanserinde *KLK 6, 8 ve 10*'un ekspresyonunun tümörlü dokuda arttığı, *KLK 1*'in ekspresyonunun ise azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır<sup>251</sup>. Ogawa ve ark. kolarektal kanserinde real-time kantitatif revers transkriptaz PCR yöntemiyle *KLK6* ekspresyon düzeyini ölçmüşler ve *KLK6*'nın kanserli dokularda aşırı eksprese olduğunu ve normal dokulara göre anlamlı olarak yüksek düzeyde bulunduğunu göstermişlerdir<sup>230</sup>. Yine başka bir çalışmada da kolorektal kanser dokularıyla normal kolon dokuları karşılaştırıldığında *KLK6*'nın kanserli dokularda aşırı eksprese olduğu belirtilmiştir<sup>251</sup>.

Liu ve ark. ilerlemiş mide kanseri dokuları ile bitişiğindeki kanser olmayan dokular ve mide ülser dokularını karşılaştırıldığında KLK6 düzeyinin kanserli dokuda diğer dokulara oranla anlamlı olarak yüksek bulunduğunu belirtmişlerdir<sup>252</sup>.

Pankreas kanserinde yapılan bazı çalışmalarda KLK 6'nın ekspresyonunun normal pankreatik dokuya göre tümör dokusunda 5 kat, KLK 10'un ise 13 kat arttığı belirlenmiştir<sup>251,253</sup>.

Santin ve ark. uterusun seröz papillar karsinomunda (USPK) KLK6 düzeyinin değişimini inceledikleri çalışmalarında USPK'da endometrioid kanserine oranla KLK6 gen ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca kontrol, benign ve endometrioid kanserli hastaların serum ve plazma KLK6 konsantrasyonları karşılaştırıldığında bu üç grup arasında anlamlı bir fark saptanmazken, USPK hastaları ve bu üç grup karşılaştırıldığında ise USPK hastalarının serum ve plazma KLK6 konsantrasyonlarının anlamlı bir artış gösterdiğini saptamışlardır<sup>246</sup>.

KLK6 kallikreinler arasında en ümit verici yumurtalık kanser biyobelirteçlerinden biri olarak görünmektedir. KLK6 ile CA125 ( yumurtalık kanserinde yaygın olarak kullanılan kanser belirteçidir) kombinasyonu yalnızca CA125 duyarlılığı ile karşılaştırıldığında duyarlılığın %21 arttığı gösterilmiştir<sup>254</sup>.

*KLK6* birçok dokuda eksprese edilmesine rağmen beyinde yüksek miktarda eksprese edilmektedir<sup>110,120</sup>. Anormal *KLK6* ekspresyonunun hormon bağımlı kanserler, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda gözlemlendiği belirtilmiştir. Ogawa ve ark. Alzheimer hastalarında *KLK6* mRNA düzeylerinin pariyetal kortekste azaldığını gözlemlemişlerdir.

Diamandis ve ark. yaptığı çalışmada ise KLK6 protein düzeylerinin frontal kortekste Alzheimer hastalarında kontrollere oranla yaklaşık olarak iki kat azaldığını saptamışlardır<sup>121</sup>. Halbuki Shimizu-Okabe ve ark. ise Alzheimer hastaları ile sağlıklı kontrolleri kıyasladıklarında KLK6 protein düzeylerinde anlamlı bir fark saptamamışlardır<sup>241</sup>.

Ashby ve ark. Alzheimer ve vasküler demans hastalarında KLK6 mRNA ve protein düzeylerini araştırmışlar ve Alzheimer hastalarında kontrol grubuna oranla KLK6 mRNA ve protein düzeylerinin frontal kortekste anlamlı düzeyde azaldığını, vasküler demanslı hastalarda ise kontrol grubuna oranla frontal kortekste KLK6 mRNA düzeylerinde anlamlı bir fark olmasa da protein düzeylerinde ise anlamlı bir artış olduğunu belirtmişlerdir<sup>255</sup>.

KLK6'nın demiyelinize multipl sklerozda upregüle olduğu ve bu hastaların serebrospinal sıvılarında da düzeyinin yüksek olduğu gösterilmiştir<sup>256,257</sup>. KLK6  $\alpha$ -sinnükleini degrade edici enzimdir ve  $\alpha$ -sinnüklenin aktivitesini azaltarak Parkinson hastalığının gelişimine katılabileceği belirtilmiştir<sup>258</sup>.

Strojnik ve ark. primer beyin tümörlerinde KLK6 düzeylerini incelemişler ve 11 tane benign ve 40 tane malign tümör olmak üzere toplamda 51 primer beyin tümör dokusu ile yaptıkları çalışmada immünohistokimyasal (IHC) analiz sonucunda KLK6'nın tüm tümörlerin %72.5'unda eksprese olduğu, benign tümörlerde malign tümörlere oranla yüksek düzeyde bulunduğu saptanmıştır. Real-time PCR ile yapılan *KLK6* ekspresyon analizinde ise malign tümörlerden yalnızca bir glioblastoma örneğinde benign tümörlere nazaran yüksek *KLK6* ekspresyonu saptanmış fakat genel duruma bakıldığında ise malign tümörlerde *KLK6*'nın azaldığını belirtmişlerdir<sup>259</sup>.

Yukarıdaki bulguların aksine Talieri ve ark. benign ve malign çeşitli histolojik tiplerde toplam 73 beyin tümör dokusu ve iki farklı glioblastoma ve bir nöroblastoma hücre hattında yaptıkları çalışmada revers transkriptaz PCR ve kantitatif real-time PCR ile *KLK6* mRNA düzeylerini araştırmışlardır. *KLK6* mRNA ekspresyonunun tümör derecesi, malignite statüsü (düşük ya da yüksek) ve tümörlerin histolojik tipi ile ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu belirtilmiştir. Glioblastoma (%70,6) gibi yüksek maligniteli tümörlerde menenjiom (%12,5) gibi düşük maligniteli tümörlere oranla *KLK6* mRNA düzeylerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Yine sadece nöroblastoma hücre hattında *KLK6* ekspresyonunun pozitif olduğunu ve diğer iki glioblastoma hücre hattında ise *KLK6* mRNA ekspresyonunun olmadığını saptamışlardır<sup>186</sup>.

Bu çalışmamızda Talieri ve ark.'nın bulgularına paralel olarak *KLK6* mRNA ekspresyonunu menenjiom grubunun %53.3'ünde glioblastoma grubunun ise %80'inde tespit edilmiştir ve bu gruplar arasında glioblastoma grubunun *KLK6* mRNA ekspresyon sıklığının menenjiom grubuna oranla yüksek olduğu belirlenmiştir. Glioblastoma grubunun %60'ında menenjiom grubunun ise %53.3'ünde *KLK6* protein ekspresyonu saptanmıştır. Fakat glioblastoma grubunda mRNA ekspresyonu görülen üç örneğin protein ekspresyonu olmadığı tespit edilmiştir.

*KLK7* başlıca deride eksprese edilmesine rağmen böbrek, merkezi sinir sistemi, meme ve tükürük bezleri gibi çeşitli dokularda da eksprese edilmektedir<sup>260</sup>.

Yousef ve ark. *KLK7* ekspresyonunun steroid hormonlarla düzenlendiğini belirtmişlerdir. *KLK7* steroid hormon bağımsız malignitelerde (pankreatik, kolon ve akciğer kanseri gibi) farklı eksprese

edilebilmektedir. Bu sonuçlar bu gen için aydınlatılması gereken alternatif bir düzenlenme mekanizması olabileceğini düşündürmektedir<sup>261</sup>.

KLK7 doku protein düzeyi yumurtalık kanserinde normale oranla yüksek bulunmuştur. Ekspresyon düzeyleri ile kanser evreleri arasında korelasyon olduğu ve KLK7 protein düzeyinin evre III ve IV'de yüksek olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte KLK7 ekspresyonu yumurtalık kanseri için prognostik önem taşımamakta ve sağ kalım, tümör derecesi ya da hastalık evresi ile güçlü bir korelasyon göstermemektedir<sup>262</sup>. Başka bir çalışmada ise yine *KLK7* ekspresyon düzeyinin yumurtalık kanserinde derece III'de anlamlı olarak arttığı belirtilmiştir<sup>263</sup>.

Inoue ve ark. kolorektal kanseri dokularında ve onların çevresindeki kanser olmayan dokularda ve 9 farklı kolon kanseri hücre hattında real-time PCR ile *KLK7* mRNA ekspresyonunu incelemişler ve kanserli dokularda kanser olmayan dokulara göre *KLK7* ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca 9 kolorektal kanser hücre hattının 6'sında *KLK7* ekspresyonunun olduğu belirtilmiştir<sup>264</sup>.

Pankreas kanseri üzerine yapılan bir çalışmada ise KLK7 mRNA ve protein düzeyleri araştırılmış ve pankreas duktal adenokarsinoma dokularında normal dokulara oranla KLK7 mRNA ve protein düzeylerinde artış saptandığı ve KLK7'nin E-kadherin dağılımını etkileyerek pankreatik kanser hücre invazyonunu arttırdığı belirtilmiştir<sup>265</sup>.

Xuan ve ark. prostat kanserinde yaptıkları çalışmada prostat kanser dokularında normal dokulara ve benign prostat kanser dokularına oranla *KLK7* mRNA ve protein düzeylerinin azaldığını tespit etmişlerdir<sup>266</sup>.

Talieri ve ark. meme kanserli hastalarda *KLK7* mRNA ekspresyon düzeylerini araştırmışlar ve meme kanserinin düşük evrelerinde (I ve II) *KLK7* mRNA ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığını ve bu örneklerde progesteron reseptörlerinin pozitif olduğunu, evre III'de ise *KLK7*'nin mRNA düzeylerini arttırdığını belirtmişlerdir<sup>260</sup>.

*KLK7*'nin ekspresyon düzeyleri Alzheimer hastalığında araştırılmış ve Alzheimer dokuları ile normal dokular karşılaştırıldığında *KLK7* düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadığı belirtilmiştir<sup>241</sup>.

Prezas ve ark. benign ve malign çeşitli histolojik tiplerdeki 73 beyin tümör dokusu ve iki glioblastoma ve bir nöroblastoma hücre hattında yaptıkları çalışmada revers transkriptaz PCR ile *KLK7* ve *KLK8* ekspresyonunu incelemişler ve *KLK7* ve *KLK8* mRNA ekspresyonu ile tümör dereceleri, malignite statüleri (düşük ya da yüksek) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını saptamışlardır. Menenjiom ve glioblastoma gruplarının %50'sinde *KLK7* ekspresyonu tespit etmişlerdir. *KLK7* ve *KLK8*'in nöroblastoma hücre hattında eksprese olduğunu fakat iki glioblastoma hücre hattında eksprese olmadığını belirtmişlerdir<sup>231</sup>.

Bu çalışmamızda menenjiom grubunun %66.7'sinde glioblastoma grubunun ise %60'ında *KLK7* mRNA ekspresyonu tespit edilmiştir. Benzer şekilde *KLK7* protein ekspresyonu menenjiom grubunun %66.7'sinde glioblastoma grubunun %60'ında belirlenmiştir.

Merkezi sinir sistemi tümörlerinde doku kallikreinleri ile ilişkili az sayıda çalışma yapılmış olması nedeniyle bu kallikreinlerin beyin tümörlerindeki patofizyolojik rolleri henüz tam olarak tanımlanamamaktadır. Bundan dolayı bu konuyla ilişkili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. SONUÇ

Kanserde kallikreinleri mRNA ve protein ekspresyonlarının bozulduğu bilinmektedir. Bundan dolayı kallikreinlerin kanser belirteci ya da terapötik kullanımlarının olabileceği düşünülmektedir. Bu konu üzerine çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Prostat kanserinde belirteç olarak kullanılan KLK3 (PSA) bu duruma bir örnek oluşturmaktadır.

Bu çalışmada menenjiom ve glioblastoma beyin tümörlerinde kallikrein 5, 6 ve 7 (KLK5, KLK6 ve KLK7) mRNA ve protein ekspresyonları araştırıldı.

KLK5 mRNA ve protein ekspresyonları sırasıyla menenjiom grubunda %73.3 ve %73.3, glioblastoma grubunda %60 ve %53.3 olarak, KLK6 mRNA ve protein ekspresyonları sırasıyla menenjiom grubunda %53.3 ve %53.3, glioblastoma grubunda %80 ve %60 olarak, KLK7 mRNA ve protein ekspresyonları sırasıyla menenjiom grubunda %66.7 ve %66.7, glioblastoma grubunda ise %60 ve %53.3 olarak tespit edildi.

Sonuç olarak tüm veriler göz önüne alındığında menenjiom grubunda KLK5 ve KLK7 mRNA ve proteinlerinin, glioblastoma grubunda ise KLK6 mRNA ve proteinlerinin daha sıklıkla eksprese olduğunu söylemek olasıdır.

## 7. ÖZET

### **Kallikreinlerin Beyin Tümörlerinin Prognozunda Yeni Belirteç olarak Araştırılması**

Kallikreinler serin proteaz enzim ailesinin bir alt grubudur. İnsan doku kallikrein ailesi 15 gen içerir ve bunlar 19. kromozomda (19q13.4) bulunur. Birçok çalışmada insan kallikrein ailesinin kanserle ilişkili olabileceği ve çeşitli malignitelerde farklı düzeylerde eksprese oldukları belirtilmiştir. Bu çalışmada menenjiom ve glioblastoma beyin tümörlerinde kallikrein 5, 6 ve 7 (KLK5, KLK6 ve KLK7) mRNA ve protein ekspresyonlarının belirlenmesi amaçlandı.

Menenjiom (n=15) ve glioblastoma (n=15) beyin tümörlerinde KLK5, KLK6 ve KLK7 genlerinin revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile mRNA ve western blot yöntemi ile protein ekspresyonları belirlendi.

*KLK5* mRNA ekspresyonu menenjiom grubunun %73.3'ünde glioblastoma grubunun %60'ında, *KLK6* mRNA ekspresyonu menenjiom grubunun %53.3'ünde glioblastoma grubunun %80'inde, *KLK7* mRNA ekspresyonu menenjiom grubunun %66.7'sinde glioblastoma grubunun %60'ında tespit edildi. Bu bulgulara paralel olarak *KLK5* protein ekspresyonu menenjiom grubunun %73.3'ünde glioblastoma grubunun %53.3'ünde, *KLK6* protein ekspresyonu menenjiom grubunun %53.3'ünde glioblastoma grubunun %60'ında, *KLK7* protein ekspresyonu menenjiom grubunun %66.7'sinde glioblastoma grubunun %60'ında belirlendi.

Sonuç olarak tüm veriler göz önüne alındığında menenjiom grubunda *KLK5* ve *KLK7* mRNA ve proteinlerinin, glioblastoma grubunda

ise KLK6 mRNA ve proteinlerinin daha sıklıkla eksprese olduğunu söylemek olasıdır.

Anahtar kelimeler: KLK5, KLK6, KLK7, Menenjiom, Glioblastoma

## **8. SUMMARY**

### **An Investigation of Kallikreins as Novel Markers for Prognosis in Brain Tumors**

Kallikreins are a subgroup of serine protease family. Human tissue kallikrein family consists of 15 genes and these are located on the 19th (19q13.4) chromosome. Several studies have shown that human kallikrein family may be related with cancer. Their expression profile vary in several malignancies. In this study we aimed to determine kallikrein 5, 6 and 7 (KLK5, KLK6, KLK7) mRNA and protein expression in meningioma and glioblastoma brain tumors.

Meningioma (n=15) and glioblastoma (n=15) brain tumor samples were examined for KLK5, KLK6 and KLK7 mRNA gene expression using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Their protein expression were determined using Western blot.

KLK5 mRNA was expressed in 73.3% of meningioma group and in 60% of glioblastoma group, KLK6 mRNA was expressed in 53.3% of meningioma group and in 80% of glioblastoma group, KLK7 was expressed in 66.7% of meningioma group and in 60% of glioblastoma group. In parallel with these findings KLK5 protein expression was determined in 73.3% of meningioma group and in 53.3% of glioblastoma group, KLK6 protein expression was determined in 53.3% of meningioma group and in 60% of glioblastoma group, KLK7 protein expression was determined in 66.7% of meningioma group and in 60% of glioblastoma group.

It can be concluded that KLK5 and KLK7 mRNA and proteins are expressed more frequently in meningioma group, KLK6 mRNA and proteins are expressed more frequently in glioblastoma group.

Key words: KLK5, KLK6, KLK7, Meningioma, Glioblastoma

## 9. KAYNAKLAR

1. Raj Kapoor B, Sankari M, Sumithra M, Anbu J, Harikrishnan N, Gobinath M, et al. Antitumor and Cytotoxic effects of *Phyllanthus polyphyllus* on ehrlich ascites carcinoma and human cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2007; 71(9): 2177-2183.
2. Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP, Human tissue kallikreins: The cancer biomarker family. *Cancer Lett* 2007; 249(1): 61-79.
3. Yousef GM, Kishi T, Diamandis EP, Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. *Clin Chim Acta* 2003; 329(1-2): 1-8.
4. Pampalakis G, Sotiropoulou G, Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1776(1): 22-31.
5. Yousef GM, Diamandis EP, Human Tissue Kallikreins: A New Enzymatic Cascade Pathway?. *Biol Chem* 2002; 383(7-8): 1045-57.
6. Paliouras M, Diamandis EP, Coordinated steroid hormone-dependent and independent expression of multiple kallikreins in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 102(1): 7-18.
7. Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Ashworth LK, Diamandis EP, Molecular Cloning of the Human *Kallikrein 15* Gene (*KLK15*). *J Biol Chem* 2001; 276(1): 53-61.
8. Liu XL, Wazer DE, Watanabe K, Band V, Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down-regulated during breast cancer progression. *Cancer Res* 1996; 56(14): 3371-9.
9. Luo LY, Rajpert-De Meyts ER, Jung K, Diamandis EP, Expression of the normal epithelial cell-specific 1 (NES1; *KLK10*) candidate tumour

suppressor gene in normal and malignant testicular tissue. *Br J Cancer* 2001; 85(2): 220-4.

10. Kim H, Scorilas A, Katsaros D, Yousef GM, Massobrio M, Fracchioli S, et al. Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression is an indicator of poor prognosis in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2001; 84(5): 643-50.

11. Magklara A, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Yousef GM, Fracchioli S, et al. The Human *KLK8* (*Neuropsin/Ovasin*) Gene: Identification of Two Novel Splice Variants and Its Prognostic Value in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(4): 806-11.

12. Diamandis EP, Okui A, Mitsui S, Luo LY, Soosaipillai A, Grass L, et al. Human Kallikrein 11: A New Biomarker of Prostate and Ovarian Carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62(1): 295-300.

13. Cerami E, Demir E, Schultz N, Taylor BS, Sander C, Automated Network Analysis Identifies Core Pathways in Glioblastoma. *PLoS One* 2010; 5(2): e8918

14. Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E, Altered expression of b-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* 2006; 49(2): 178-87.

15. Aruga J, Nozaki Y, Hatayama M, Odaka YS, Yokota N, Expression of ZIC family genes in meningiomas and other brain tumors. *BMC Cancer* 2010; 10: 79.

16. Carroll RS, Brown M, Zhang J, DiRenzo J, Font De Mora J, Black PM. Black, Expression of a Subset of Steroid Receptor Cofactors Is Associated with Progesterone Receptor Expression in Meningiomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6(9): 3570-5.

17. Doucet A, Overall CM., Protease proteomics: Revealing protease in vivo functions using systems biology approaches. *Mol Aspects Med.* 2008;29(5):339-58.
18. Sajid M, McKerrow JH., Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;120(1):1-21.
19. Belaaouaj A., Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes Infect.* 2002;4(12):1259–1264.
20. Parks W.C., Wilson C.L., Lopez-Boado Y.S., Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(8): 617–629.
21. Ge G., Greenspan D.S., Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Def. Res. C Emb. Today* 2006;78 (1):47–68.
22. Page-McCaw A., Ewald A.J, Werb, Z., Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007;8(3):221–233.
23. Puente X.S., Sanchez L.M, Overall C.M., Lopez-Otin C., Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* 2003;4(7):544–558.
24. Vandeputte-Rutten L, Gros P, Novel proteases: common themes and surprising features. *Curr Opin Struct Biol.* 2002;12(6):704-8.
25. Castro HC, Abreu PA, Geraldo RB, Martins RC, dos Santos R, Loureiro NI, et al. Looking at the proteases from a simple perspective. *J Mol Recognit.* 2011 ;24(2):165-81.
26. Mason SD, Joyce JA, Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* 2011 ;21(4):228-37.

27. Joyce J.A, Pollard J.W, Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Can.* 2009; 9:239–252.
28. Hedstrom L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem Rev* 2002; 102(12): 4501-24.
29. Wu Q, Kuo H, Deng GG, Serine proteases and cardiac function. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1751(1):82–94.
30. Walker B, Lynas JF, Strategies for the inhibition of serine proteases. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58(4):596–624.
31. Perona JJ, Craik CS, Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* 1995; 4:337-60.
32. Sim RB, Laich A, Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28:545-50.
33. Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, et al. Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clin & Exp Metastasis* 2000; 19:193-207.
34. Noel A, Gilles C, Bajou K, et al. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis* 1997; 17:221-39.
35. Turgeon VL, Houenou LJ, The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997; 25:85-95.
36. Borgoño CA, Michael IP, Diamandis EP, Human Tissue Kallikreins: Physiologic Roles and Applications in Cancer. *Mol Cancer Res.* 2004 ;2(5):257-80.
37. Werle E. Zur Kenntnis des haushalts des Kallikreins. *Biochem Z* 1934; 269: 415–34.

38. Clements JA, Willemsen NM, Myers SA, Dong Y, The Tissue Kallikrein Family of Serine Proteases: Functional Roles in Human Disease and Potential as Clinical Biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004; 41(3):265-312.
39. Hara M., Koyanagi Y., Inoue T., Fukuyama T., Some physico-chemical characteristics of “-seminoprotein”, an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1971; 25:322–324.
40. Diamandis EP, Yousef GM, Clements J, Ashworth LK, Yoshida S, Egelrud T, et al. New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family. *Clin Chem.* 2000 ;46(11):1855-8.
41. Yousef G. M., Chang A., Scorilas A., Diamandis, E. P. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 ;276(1):125-33.
42. Harvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson SA, Ashworth LK, Clements JA, Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J Biol Chem.* 2000; 275(48):37397-406.
43. Kaplan AP, Silverberg M, The coagulation-kinin pathway of human plasma. *Blood.* 1987 ;70(1):1-15.
44. Borgoño CA, Diamandis EP, The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(11):876-90.
45. Meyer W. Distribution of tissue kallikrein in the integumental blood vessel system of wild mammals. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001; 47 Online Pub:OL125-30.

46. Yousef GM, Diamandis EP, An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clin Biochem.* 2003 ;36(6):443-52.
47. Olsson AY, Lilja H, Lundwall A, Taxon-specific evolution of glandular kallikrein genes, and identification of a progenitor of prostate-specific antigen. *Genomics.* 2004 ;84(1):147-56.
48. Kizuki K, Suzuki T, Kudo M, Noguchi T, Immunohistochemical demonstration of tissue kallikrein in the neurons of rat brain. *Brain Res.* 1994 ;634(2):305-9.
49. Sotiropoulou G, Pampalakis G, Diamandis EP, Functional Roles of Human Kallikrein-related Peptidases. *J Biol Chem.* 2009 ;284(48):32989-94.
50. Lundwall A, Clauss A, Olsson AY, Evolution of kallikrein-related peptidases in mammals and identification of a genetic locus encoding potential regulatory inhibitors. *Biol Chem.* 2006 ;387(3):243-9.
51. Yousef GM, Diamandis M, Jung K, Diamandis EP, Molecular cloning of a novel human acid phosphatase gene (acpt) that is highly expressed in the testis. *Genomics* 2001; 74:385-95.
52. Foussias G, Yousef GM, Diamandis EP, Identification and molecular characterization of a novel member of the siglec family (SIGLEC9). *Genomics* 2000; 67:171-8.
53. Lu W, Zhou D, Glusman G, Utleg AG, White JT, Nelson PS, KLK31P is a novel androgen regulated and transcribed pseudogene of kallikreins that is expressed at lower levels in prostate cancer cells than in normal prostate cells. *Prostate.* 2006 ;66(9):936-44.

54. Yousef GM, Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP, Cloning of a kallikrein pseudogene. *Clin Biochem.* 2004 Nov;37(11):961-7.
55. Yousef GM, Diamandis EP, The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev.* 2001;22(2):184-204.
56. Emami N, Diamandis EP, Utility of Kallikrein-Related Peptidases (KLKs) as Cancer Biomarkers. *Clin Chem.* 2008 ;54(10):1600-7.
57. Obiezu CV, Diamandis EP, Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. *Cancer Lett.* 2005 ;224(1):1-22.
58. Lundwall A, Brattsand M, Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol Life Sci.* 2008 ;65(13):2019-38.
59. Debela M, Hess P, Magdolen V, Schechter NM, Steiner T, Huber R, et al. Chymotryptic specificity determinants in the 1.0 Å structure of the zinc inhibited human tissue kallikrein 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 ;104(41):16086-91.
60. Debela M, Goettig P, Magdolen V, Huber R, Schechter NM, Bode W, Structural basis of the zinc inhibition of human tissue kallikrein 5. *J Mol Biol.* 2007 ;373(4):1017-31.
61. Debela M, Magdolen V, Grimminger V, Sommerhoff C, Messerschmidt A, Huber R, et al. Crystal structures of human tissue kallikrein 4: activity modulation by a specific zinc binding site. *J Mol Biol.* 2006 ;362(5):1094-107.
62. Bennett MJ, Blaber SI, Scarisbrick IA, Dhanarajan P, Thompson SM, Blaber M, Crystal structure and biochemical characterization of human kallikrein 6 reveals that a trypsin-like kallikrein is expressed in the central nervous system. *J Biol Chem.* 2002 ;277(27):24562-70.

63. Gomis-Rüth FX, Bayés A, Sotiropoulou G, Pampalakis G, Tsetsenis T, Villegas V, et al. The structure of human prokallikrein 6 reveals a novel activation mechanism for the kallikrein family. *J Biol Chem.* 2002 ;277(30):27273-81.
64. Laxmikanthan G, Blaber SI, Bennett MJ, Scarisbrick IA, Juliano MA, Blaber M, 1.70 Å X-ray structure of human apo kallikrein 1: structural changes upon peptide inhibitor/ substrate binding. *Proteins.* 2005 ;58(4):802-14.
65. Brillard-Bourdet M, Moreau T, Gauthier F, Substrate specificity of tissue kallikreins: importance of an extended interaction site. *Biochim Biophys Acta.* 1995 ;1246(1):47-52.
66. Oka T, Hakoshima T, Itakura M, Yamamori S, Takahashi M, Hashimoto Y, et al. Role of loop structures of neuropsin in the activity of serine protease and regulated secretion. *J Biol Chem.* 2002 ;277(17):14724-30.
67. Emami N, Diamandis EP, New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family. *Mol Oncol.* 2007 ;1(3):269-87.
68. Kurlender L, Borgono C, Michael IP, Obiezu C, Elliott MB, Yousef GM, et al. A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. *Biochim Biophys Acta.* 2005 ;1755(1):1-14.
69. Michael IP, Kurlender L, Memari N, Yousef GM, Du D, Grass L, et al. Intron retention: a common splicing event within the human kallikrein gene family. *Clin Chem.* 2005 ;51(3):506-15.
70. Kontos CK, Scorilas A, Kallikrein-related peptidases (KLKs): a gene family of novel cancer biomarkers. *Clin Chem Lab Med.* 2012 ;50(11):1877-91.

71. Shaw JL, Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem* 2007; 53:1423 – 32.
72. Lawrence MG, Lai J, Clements JA, Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocr Rev* 2010; 31:407 – 46.
73. Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput JA, Romijn JC, Trapman J, Characterization of the prostate-specific antigen gene: a novel human kallikrein-like gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 ;159(1):95-102.
74. Yousef GM, Luo LY, Scherer SW, Sotiropoulou G, Diamandis EP, Molecular characterization of Zyme/Protease M/Neurosin (PRSS9), a hormonally regulated kallikrein-like serine protease. *Genomics* 1999; 62:251-9.
75. Luo LY, Grass L, Diamandis EP, The normal epithelial cell-specific 1(NES1) gene is up-regulated by steroid hormones in the breast carcinoma cell line BT-474. *Anticancer Res* 2000;20:981-6.
76. Clements J, Mukhtar A, Ehrlich A, Yap B, Glandular kallikrein gene expression in the human uterus. *Braz J Med Biol Res* 1994;27:1855-63.
77. Nelson PS, Gan L, Ferguson C, Moss P, Gelinias R, Hood L, et al. Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3114-9.
78. Yousef GM, Obiezu CV, Luo LY, Black MH, Diamandis EP, Prostase/KLKL1 is a new member of the human kallikrein gene family, is expressed in prostate and breast tissues, and is hormonally regulated. *Cancer Res* 1999;59:4252-6.

79. Myers SA, Clements JA, Kallikrein 4 (KLK4), a new member of the human kallikrein gene family is up-regulated by estrogen and progesterone in the human endometrial cancer cell line, KLE. *J Clin Endocrinol & Metab* 2001;86:2323-6.
80. Yousef GM, Magklara A, Diamandis EP. KLK12 is a novel serine protease and a new member of the human kallikrein gene family— differential expression in breast cancer. *Genomics* 2000;69:331-41.
81. Jovanovic J, Rønneberg JA, Tost J, Kristensen V, The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol.* 2010;4(3):242-54.
82. Zhang Y, Bhat I, Zeng M, Jayal G, Wazer DE, Band H, Human kallikrein 10, a predictive marker for breast cancer. *Biol Chem.* 2006;387(6):715-21.
83. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambros S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2257-61.
84. Calin GA, Croce CM, MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene.* 2006;25(46):6202-10.
85. Yousef GM. microRNAs: a new frontier in kallikrein research. *Biol Chem* 2008;389:689 – 94.
86. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350- 5.
87. Chow TF, Crow M, Earle T, El-Said H, Diamandis EP, Yousef GM, Kallikreins as microRNA targets: an in silico and experimental- based analysis. *Biol Chem* 2008;389:731 – 8.
88. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A, The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci.* 2005;99(1):6-38.

89. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K, Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992;44:1– 80.
90. Deperthes D, Marceau F, Frenette G, Lazure C, Tremblay RR, Dube JY, Human kallikrein hK2 has low kininogenase activity while prostate-specific antigen (hK3) has none. *Biochim Biophys Acta* 1997;1343:102-6.
91. Mikolajczyk SD, Millar LS, Marker KM, Grauer LS, Goel A, Cass MM, et al. Ala217 is important for the catalytic function and autoactivation of prostate-specific human kallikrein 2. *Eur J Biochem.* 1997;246(2):440-6.
92. Lovgren J, Rajakoski K, Karp M, Lundwall A, Lilja H. Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:549-55.
93. Lovgren J, Tian S, Lundwall A, Karp M, Lilja H, Production and activation of recombinant hK2 with propeptide mutations resulting in high expression levels. *Eur J Biochem* 1999;266:1050-5.
94. Denmeade SR, Lovgren J, Khan SR, Lilja H, Isaacs JT, Activation of latent protease function of pro-hK2, but not pro-PSA, involves autoprocessing. *Prostate* 2001;48:122-6.
95. Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, Millar LS, Saedi MS, Expression of pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. *Cancer Res* 1997;57:3111-4.
96. Takayama TK, Fujikawa K, Davie EW, Characterization of the precursor of prostate-specific antigen. Activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *J Biol Chem* 1997;272:21582-8.
97. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 1985; 76: 1899–903.

98. Lilja H, Abrahamsson PA, Lundwall A. Semenogelin, the predominant protein in human semen: Primary structure and identification of closely related proteins in the male accessory sex glands and on the spermatozoa. *J Biol Chem* 1989; 264: 1894–900.
99. Deperthes D, Frenette G, Brillard-Bourdet M, Bourgeois L, Gauthier F, Tremblay RR, et al. Potential involvement of kallikrein hK2 in the hydrolysis of the human seminal vesicle proteins after ejaculation. *J Androl*. 1996;17(6):659-65.
100. Frenette G, Tremblay RR, Lazure C, Dube JY, Prostatic kallikrein hK2, but not prostate-specific antigen (hK3), activates single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Int J Cancer* 1997;71:897– 9.
101. Cohen P, Graves HC, Peehl DM, Kamarei M, Giudice LC, Rosenfeld RG, Prostate-specific antigen (PSA) is an insulinlike growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1046–53.
102. Killian CS, Corral DA, Kawinski E, Consakitine RI, Mitogenic response of osteoblast cells to prostate-specific antigen suggests an activation of latent TGF-beta and a proteolytic modulation of cell adhesion receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:940– 7.
103. Heidtmann HH, Nettelbeck DM, Mingels A, Jager R, Welker HG, Kontermann RE, Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen. *Br J Cancer* 1999;81:1269– 73.
104. Hansson L, Strömquist M, Bäckman A, Wallbrandt P, Carlstein A, Egelrud T, Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem*. 1994;269(30):19420-6.

105. Brattsand M, Egelrud T, Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem.* 1999;274(42):30033-40.
106. Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T, A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 2005;124(1):198-203.
107. Stefansson K, Brattsand M, Ny A, Glas B, Egelrud T, Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum. *Biol Chem.* 2006;387(6):761-8.
108. Larrick JW, Hirata M, Zhong J, Wright SC, Anti-microbial activity of human CAP18 peptides. *Immunotechnology.* 1995;1(1):65-72.
109. Yamasaki K, Schaubert J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, et al. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J.* 2006;20(12):2068-80.
110. Petraki CD, Karavana VN, Skoufogiannis PT, Little SP, Howarth DJ, Yousef GM, et al. The spectrum of human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin) expression in human tissues as assessed by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 2001;49(11):1431-41.
111. Petraki CD, Karavana VN, Diamandis EP. Human kallikrein 13 expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 2003;51:493-501.
112. Petraki CD, Karavana VN, Revelos KI, Luo LY, Diamandis EP, Immunohistochemical localization of human kallikreins 6 and 10 in pancreatic islets. *Histochem J* 2002;34:313-22.

113. Yoi OO, Seldin DC, Spragg J, Pinkus GS, Austen KF, Sequential cleavage of proinsulin by human pancreatic kallikrein and a human pancreatic kininase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3612-6.
114. Scarisbrick IA, Towner MD, Isackson PJ. Nervous system-specific expression of a novel serine protease: regulation in the adult rat spinal cord by excitotoxic injury. *J Neurosci* 1997;17:8156-68.
115. Scarisbrick IA, Asakura K, Blaber S, Blaber M, Isackson PJ, Bieto T, et al. Preferential expression of myelencephalon-specific protease by oligodendrocytes of the adult rat spinal cord white matter. *Glia*. 2000;30(3):219-30.
116. Scarisbrick IA, Isackson PJ, Ciric B, Windebank AJ, Rodriguez M, MSP, a trypsin-like serine protease, is abundantly expressed in the human nervous system. *J Comp Neurol* 2001;431:347-61.
117. Scarisbrick IA, Blaber SI, Lucchinetti CF, Genain CP, Blaber M, Rodriguez M, Activity of a newly identified serine protease in CNS demyelination. *Brain* 2002;125:1283-96.
118. Yamanaka H, He X, Matsumoto K, Shiosaka S, Yoshida S, Protease M/neurosin mRNA is expressed in mature oligodendrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;71:217–24.
119. Magklara A, Mellati AA, Wasney GA, Little SP, Sotiropoulou G, Becker GW, et al. Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6: autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 ;307(4):948-55.
120. Little SP, Dixon EP, Norris F, Buckley W, Becker GW, Johnson M, et al. Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 1997;272:25135-42.

121. Ogawa K, Yamada T, Tsujioka Y, Taguchi J, Takahashi M, Tsuboi Y, et al. Localization of a novel type trypsin-like serine protease, neurosin, in brain tissues of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2000; 54(4):419-26.
122. Iwata A, Maruyama M, Akagi T, Hashikawa T, Kanazawa I, Tsuji S, et al. Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: Implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Hum Mol Genet*. 2003;12(20):2625-35.
123. Suzuki J, Yoshida S, Chen ZL, Momota Y, Kato K, Hirata A, et al. Ontogeny of neuropsin mRNA expression in the Mouse brain. *Neurosci Res* 1995;23:345–51.
124. Momota Y, Yoshida S, Ito J, Shibata M, Kato K, Sakurai K, et al. Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy. *Eur J Neurosci* 1998;10:760– 4.
125. Akita H, Matsuyama T, Iso H, Sugita M, Yoshida S. Effects of oxidative stress on the expression of limbic-specific protease neuropsin and avoidance learning in mice. *Brain Res* 1997;769:86– 96.
126. Emami N, Diamandis EP, Human tissue kallikreins: a road under construction. *Clin Chim Acta*. 2007;381(1):78-84.
127. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL, International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: From molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*. 2005;57(1):27-77.
128. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR, The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev*. 1998;50(3):357-86.

129. Campbell DJ. The kallikrein–kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001;28:1060–5.
130. Takayama TK, McMullen BA, Nelson PS, Matsumura M, Fujikawa K, Characterization of hK4 (prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry*. 2001;40(50):15341-8.
131. Ramani VC, Kaushal GP, Haun RS, Proteolytic action of kallikrein-related peptidase 7 produces unique active matrix metalloproteinase-9 lacking the C-terminal hemopexin domains. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(8):1525-31.
132. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R, Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):245-82.
133. Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW, Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol*. 1998;274(6 Pt 1):C1429-52.
134. Dong Y, Loessner D, Irving-Rodgers H, Obermair A, Nicklin JL, Clements JA, Metastasis of ovarian cancer is mediated by kallikrein related peptidases. *Clin Exp Metastasis*. 2013.
135. Amour A, Bird M, Chaudry L, Deadman J, Hayes D, Kay C, General considerations for proteolytic cascades. *Biochem Soc Trans*. 2004 Feb;32(Pt 1):15-6.
136. Schenone M, Furie BC, Furie B, The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol*. 2004;11(4):272-7.

137. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK, Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett.* 2006;11(4):506-25.
138. Kemper C, Atkinson JP, T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(1):9-18.
139. Komatsu N, Suga Y, Saijoh K, Liu AC, Khan S, Mizuno Y, et al. Elevated human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of peeling skin syndrome-type B patients suggests an over-desquamation of corneocytes. *J Invest Dermatol* 2006;126:2338–42.
140. Schechter NM, Choi EJ, Wang ZM, Hanakawa Y, Stanley JR, Kang Y, et al. Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). *Biol Chem.* 2005;386:1173–84.
141. Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, et al. A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;182(2):593-9.
142. Valentinis B, Baserga R, IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol Pathol.* 2001;54(3):133-7.
143. Accili D, Nakae J, Kim JJ, Park BC, Rother KI, Targeted gene mutations define the roles of insulin and IGF-I receptors in mouse embryonic development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1999;12(4):475-85.
144. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE, The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev.* 2000 ;21(3):215-44.

145. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(13):7324-9.
146. Hekim C, Riipi T, Weisell J, Närvänen A, Koistinen R, Stenman UH, et al. Identification of IGFBP-3 fragments generated by KLK2 and prevention of fragmentation by KLK2-inhibiting peptides. *Biol Chem*. 2010;391(4):475-9.
147. Matsumura M, Bhatt AS, Andress D, Clegg N, Takayama TK, Craik CS, et al. Substrates of the prostate-specific serine protease prostase/KLK4 defined by positional scanning peptide libraries. *Prostate*. 2005;62(1):1-13.
148. Sano A, Sangai T, Maeda H, Nakamura M, Hasebe T, Ochiai A, Kallikrein 11 expressed in human breast cancer cells releases insulin-like growth factor degradation of IGFBP-3. *Int J Oncol*. 2007;30(6):1493-8.
149. Yu H, Diamandis EP, Levesque M, Gai M, Roagna R, Ponzzone R, et al. Prostate specific antigen in breast cancer, benign breast disease and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*. 1996;40(2):171-8.
150. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A, TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 2001;29(2):117-29.
151. Bindukumar B, Schwartz SA, Nair MP, Aalinkeel R, Kawinski E, Chadha KC, Prostate-specific antigen modulates the expression of genes involved in prostate tumor growth. *Neoplasia*. 2005;7(3):241-52.
152. Dhar S, Bhargava R, Yunes M, Li B, Goyal J, Naber SP, et al. Analysis of normal epithelial cell specific-1 (NES1)/Kallikrein 10 mRNA expression by in situ hybridization, a novel marker for breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(11):3393-8.

153. Folkman J, Kalluri R. Cancer without disease. *Nature*. 2004;427(6977):787.
154. Kerbel R, Folkman J, Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(10):727-39.
155. Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A, Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biol Chem*. 2012;393(5):301-17.
156. Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL, Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(3):333-57.
157. Giusti B, Serrati S, Margheri F, Papucci L, Rossi L, Poggi F, The antiangiogenic tissue kallikrein pattern of endothelial cells in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3618-28.
158. Emanuelli C, Minasi A, Zacheo A, Chao J, Chao L, Salis MB, et al. Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation*. 2001;103(1):125-32.
159. Michael IP, Sotiropoulou G, Pampalakis G, Magklara A, Ghosh M, Wasney G, et al. Biochemical and enzymatic characterization of human kallikrein 5 (hK5), a novel serine protease potentially involved in cancer progression. *J Biol Chem*. 2005;280(15):14628-35.
160. Bayés A, Tsetsenis T, Ventura S, Vendrell J, Aviles FX, Sotiropoulou G, Human kallikrein 6 activity is regulated via an autoproteolytic mechanism of activation/inactivation. *Biol Chem*. 2004;385(6):517-24.

161. Sotiropoulou G, Rogakos V, Tsetsenis T, Pampalakis G, Zafiropoulos N, Simillides G, et al. Emerging interest in the kallikrein gene family for understanding and diagnosing cancer. *Oncol Res.* 2003;13(6-10):381-91.
162. Hunter KW, Crawford NP, Alsarraj J, Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res.* 2008;10 Suppl 1:S2.
163. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA, Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871-90.
164. Veveris-Lowe TL, Lawrence MG, Collard RL, Bui L, Herington AC, Nicol DL, et al. Kallikrein 4 (hK4) and prostate-specific antigen (PSA) are associated with the loss of E-cadherin and an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like effect in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12(3):631-43.
165. Webber MM, Waghray A, Bello D, Prostate-specific antigen, a serine protease, facilitates human prostate cancer cell invasion. *Clin Cancer Res.* 1995;1(10):1089-94.
166. Ishii K, Otsuka T, Iguchi K, Usui S, Yamamoto H, Sugimura Y, Evidence that the prostate-specific antigen (PSA)/Zn<sup>2+</sup> axis may play a role in human prostate cancer cell invasion. *Cancer Lett.* 2004;207(1):79-87.
167. Fortier AH, Nelson BJ, Grella DK, Holaday JW, Antiangiogenic activity of prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(19):1635-40.
168. Mo L, Zhang J, Shi J, Xuan Q, Yang X, Qin M, Human kallikrein 7 induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells: a role in prostate cancer invasion and progression. *Anticancer Res.* 2010;30(9):3413-20.

169. Prezas P, Arlt MJ, Viktorov P, Soosaipillai A, Holzscheiter L, Schmitt M, Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol Chem.* 2006;387(6):807-11.
170. Dong Y, Tan OL, Loessner D, Stephens C, Walpole C, Boyle GM, Kallikrein-related peptidase 7 promotes multicellular aggregation via the alpha(5)beta(1) integrin pathway and paclitaxel chemoresistance in serous epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2010;70(7):2624-33.
171. Borgoño CA, Michael IP, Shaw JL, Luo LY, Ghosh MC, Soosaipillai A, Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14. *J Biol Chem.* 2007;282(4):2405-22.
172. Sohara Y, Shimada H, DeClerck YA, Mechanisms of bone invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2005;228(1-2):203-9.
173. Kuriyama M, Wang MC, Lee CI, Papsidero LD, Killian CS, Inaji H, et al. Use of human prostate-specific antigen in monitoring prostate cancer. *Cancer Res.* 1981;41(10):3874-6.
174. Wang MC, Papsidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM, Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate.* 1981;2(1):89-96.
175. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM, Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol.* 1979;17(2):159-63.
176. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E, Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med.* 1987;317(15):909-16.

177. Becker C, Piironen T, Pettersson K, Björk T, Wojno KJ, Oesterling JE, et al. Discrimination of men with prostate cancer from those with benign disease by measurements of human glandular kallikrein 2 (HK2) in serum. *J Urol.* 2000;163(1):311-6.
178. Partin AW, Catalona WJ, Finlay JA, Darte C, Tindall DJ, Young CY, et al. Use of human glandular kallikrein 2 for the detection of prostate cancer: preliminary analysis. *Urology.* 1999;54(5):839-45.
179. Saedi MS, Hill TM, Kuus-Reichel K, Kumar A, Payne J, Mikolajczyk SD, et al. The precursor form of the human kallikrein 2, a kallikrein homologous to prostate-specific antigen, is present in human sera and is increased in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clin Chem.* 1998;44(10):2115-9.
180. Luo LY, Katsaros D, Scorilas A, Fracchioli S, Bellino R, van Gramberen M, et al. The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Res.* 2003;63(4):807-11.
181. Diamandis EP, Scorilas A, Fracchioli S, Van Gramberen M, De Bruijn H, Henrik A, et al. Human kallikrein 6 (hK6): a new potential serum biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian carcinoma. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):1035-43.
182. Yu H, Giai M, Diamandis EP, Katsaros D, Sutherland DJ, Levesque MA, et al. Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res.* 1995;55(10):2104-10.
183. Denmeade SR, Nagy A, Gao J, Lilja H, Schally AV, Isaacs JT, Enzymatic activation of a doxorubicin-peptide prodrug by prostate-specific antigen. *Cancer Res.* 1998;58(12):2537-40.

184. Cloutier SM, Kündig C, Felber LM, Fattah OM, Chagas JR, Gygi CM, et al. Development of recombinant inhibitors specific to human kallikrein 2 using phage-display selected substrates. *Eur J Biochem.* 2004;271(3):607-13.
185. Felber LM, Kündig C, Borgoño CA, Chagas JR, Tasinato A, Jichlinski P, Mutant recombinant serpins as highly specific inhibitors of human kallikrein 14. *FEBS J.* 2006;273(11):2505-14.
186. Talieri M, Zoma M, Devetzi M, Scorilas A, Ardavanis A, Kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) gene expression in intracranial tumors. *Tumour Biol.* 2012;33(5):1375-83.
187. Gurney JG, Kadan-Lottick N, Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. *Curr Opin Oncol.* 2001;13(3):160-6.
188. Heggenhougen K. *International Encyclopedia of Public Health.* Academic Press;2008.
189. Bondy M, Ligon BL, Epidemiology and etiology of intracranial meningiomas: a review. *J Neurooncol* 1996;29:197–205.
190. Marosi C, Hassler M, Roessler K, Reni M, Sant M, Mazza E, et al. Meningioma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;67(2):153-71.
191. Longstreth Jr WT, Dennis LK, McGuire VM, Drangsholt MT, Koepsell TD, Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer* 1993;72:639–48.
192. Ian R Whittle, Colin Smith, Parthiban Navoo, Donald Collie, Meningiomas. *Lancet* 2004;363:1535–43.
193. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G, Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol.* 2006;5(12):1045-54.

194. Alexiou GA, Markoula S, Gogou P, Kyritsis AP, Genetic and molecular alterations in meningiomas. *Clin Neurol Neurosurg.* 2011;113(4):261-7.
195. Sheporaitis LA, Osborn AG, Smirniotopoulos JG, Clunie DA, Howieson J, D'Agostino AN, Intracranial meningioma. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1992;13(1):29-37.
196. Gu J, Liu Y, Kyritsis AP, Bondy ML, Molecular epidemiology of primary brain tumors. *Neurotherapeutics* 2009;6:427–35.
197. Surace EI, Lusic E, Murakami Y, Scheithauer BW, Perry A, Gutmann DH. Loss of tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) expression in meningioma correlates with increased malignancy grade and reduced patient survival. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63:1015–27.
198. Paulus W, Meixensberger J, Hofmann E, Roggendorf W, Effect of embolisation of meningioma on Ki-67 proliferation index. *J Clin Pathol* 1993;46:876–77.
199. Ludwin SK, Rubinstein LJ, Russell DS, Papillary meningioma: a malignant variant of meningioma. *Cancer* 1975;36:1363–73.
200. Pasquier B, Gasnier F, Pasquier D, Keddari E, Morens A, Couderc P, Papillary meningioma: clinicopathologic study of seven cases and review of the literature. *Cancer* 1986; 58: 299–305.
201. Kepes JJ, Moral LA, Wilkinson SB, Abdullah A, Llana JF, Rhabdoid transformation of tumor cells in meningiomas: a histologic indication of increased proliferative activity: report of four cases. *Am J Surg Pathol* 1998;22:231–38.

202. Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Abell-Aleff PC, Meyer FB, "Rhabdoid" meningioma: an aggressive variant. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1482–90.
203. Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM, Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 1993;53:1312–26.
204. Yoshioka H, Hama S, Taniguchi E, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K, Peritumoral brain edema associated with meningioma: influence of vascular endothelial growth factor expression and vascular blood supply. *Cancer*. 1999;85(4):936-44.
205. Christov C, Lechapt-Zalcman E, Adle-Biassette H, Nachev S, Gherardi RK, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptor flt-1 in microcystic meningiomas. *Acta Neuropathol*. 1999;98(4):414-20.
206. Halper J, Jung C, Perry A, Suliman H, Hill MP, Scheithauer B. Expression of TGF alpha in meningiomas. *J Neurooncol* 1999;45:127–34.
207. Andersson U, Guo D, Malmer B, Bergenheim AT, Brannstrom T, Hedman H, et al. Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol* 2004;108:135–42.
208. Wang JL, Nister M, Hermansson M, Westermark B, Ponten J, Expression of PDGF beta-receptors in human meningioma cells. *Int J Cancer* 1990;46:772–8.
209. Johnson MD, Woodard A, Kim P, Frexes-Steed M, Evidence for mitogen-associated protein kinase activation and transduction of mitogenic signals by platelet-derived growth factor in human meningioma cells. *J Neurosurg* 2001;94:293–300.

210. Johnson M, Toms S. Mitogenic signal transduction pathways in meningiomas: novel targets for meningioma chemotherapy? *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:1029–36.
211. Nagashima G, Aoyagi M, Yamamoto S, Wakimoto H, Tamaki M, Yamamoto K, et al. Involvement of dysregulated c-myc but not c-sis/PDGF in atypical and anaplastic meningiomas. *Clin Neurol Neurosurg* 2001;103:13–8.
212. Johnson MD, Okedli E, Woodard A, Toms SA, Allen GS, Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-p7S6K pathway activation and transduction of mitogenic signals by platelet-derived growth factor in meningioma cells. *J Neurosurg* 2002;97:668–75.
213. Okuducu AF, Zils U, Michaelis SA, Michaelides S, von Deimling A, Ets-1 is up-regulated together with its target gene products matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in atypical and anaplastic meningiomas. *Histopathology* 2006;48:836–45.
214. Buccoliero AM, Castiglione F, Degl’Innocenti DR, Arganini L, Taddei A, Ammannati F, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in meningiomas: real time PCR and immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15:187–92.
215. Ragel BT, Jensen RL, Gillespie DL, Prescott SM, Couldwell WT, Ubiquitous expression of cyclooxygenase-2 in meningiomas and decrease in cell growth following in vitro treatment with the inhibitor celecoxib: potential therapeutic application. *J Neurosurg* 2005;103:508–17.
216. Zhu VF, Yang J, Lebrun DG, Li M, Understanding the role of cytokines in Glioblastoma Multiforme pathogenesis. *Cancer Lett.* 2012;316(2):139-50.

217. Wen PY, Kesari S, Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008;359(5):492-507.
218. Kanu OO, Mehta A, Di C, Lin N, Bortoff K, Bigner DD, et al. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(6):701-18.
219. Ohgaki H, Kleihues P, Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007;170:1445-53.
220. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004;64(19):6892-9.
221. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL, Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin* 2007;25:867-90.
222. Kleihues P, Sobin LH, World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 2000;88(12):2887.
223. Zou JP, Morford LA, Chougnet C, Dix AR, Brooks AG, Torres N, et al. Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *J Immunol* 1999;162(8):4882-92.
224. Wu AH, Xiao J, Anker L, Hall WA, Gregerson DS, Cavenee WK, et al. Identification of EGFRvIII-derived CTL epitopes restricted by HLA A0201 for dendritic cell based immunotherapy of gliomas. *J Neurooncol*. 2006;76(1):23-30.
225. Joseph JV, Balasubramanian V, Walenkamp A, Kruyt FA, TGF- $\beta$  as a therapeutic target in high grade gliomas - promises and challenges. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(4):478-85.

226. Pelloski CE, Ballman KV, Furth AF, Zhang L, Lin E, Sulman EP, et al. Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol* 2007;25:2288-94.
227. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007;21:2683-710.
228. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997;15:356-62.
229. Planque C, de Monte M, Guyetant S, Rollin J, Desmazes C, Panel V, et al. KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329(4):1260-6.
230. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Nagahara H, et al. Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2889-93.
231. Prezas P, Scorilas A, Yfanti C, Viktorov P, Agnanti N, Diamandis E, et al. The role of human tissue kallikreins 7 and 8 in intracranial malignancies. *Biol Chem*. 2006;387(12):1607-12.
232. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG, Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 1991;64:327-336.
233. Tryggvason K, Hoyhtya M, Salo T, Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta*. 1987;907:191-217.

234. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA, General mechanisms of metastasis. *Cancer*. 1997;80:1529-1537.
235. Obiezu CV, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Yousef GM, Fracchioli S, et al. Higher human kallikrein gene 4 (KLK4) expression indicates poor prognosis of ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001;7(8):2380-6.
236. Yousef GM, Scorilas A, Kyriakopoulou LG, Rendl L, Diamandis M, Ponzone R, et al. Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR: an independent indicator of poor prognosis in breast cancer. *Clin Chem*. 2002;48(8):1241-50.
237. Avgeris M, Papachristopoulou G, Polychronis A, Scorilas A, Down-regulation of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) expression in breast cancer patients: a biomarker for the differential diagnosis of breast lesions. *Clin Proteomics*. 2011;8(1):5.
238. Yousef GM, Obiezu CV, Jung K, Stephan C, Scorilas A, Diamandis EP, Differential expression of Kallikrein gene 5 in cancerous and normal testicular tissues. *Urology*. 2002;60(4):714-8.
239. Korbakis D, Gregorakis AK, Scorilas A, Quantitative analysis of human kallikrein 5 (KLK5) expression in prostate needle biopsies: an independent cancer biomarker. *Clin Chem*. 2009;55(5):904-13.
240. Yousef GM, Scorilas A, Chang A, Rendl L, Diamandis M, Jung K, et al. Down-regulation of the human kallikrein gene 5 (KLK5) in prostate cancer tissues. *Prostate*. 2002;51(2):126-32.
241. Shimizu-Okabe C, Yousef GM, Diamandis EP, Yoshida S, Shiosaka S, Fahnestock M, Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport*. 2001;12(12):2747-51.

242. Mavridis K, Scorilas A. Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. *Future Oncol.* 2010;6:269–85.
243. Shan SJ, Scorilas A, Katsaros D, Diamandis EP, Transcriptional up-regulation of human tissue kallikrein 6 in ovarian cancer: Clinical and mechanistic aspects. *Br J Cancer.* 2007;96:362–72.
244. Nagahara H, Mimori K, Utsunomiya T, Barnard GF, Ohira M, Hirakawa K, et al. Clinicopathologic and biological significance of KLK6 overexpression in human gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:6800–6.
245. Ruckert F, Hennig M, Petraki CD, Wehrum D, Distler M, Denz A, et al. Co-expression of KLK6 and KLK10 as prognostic factors for survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 2008;99(9):1484–92.
246. Santin AD, Diamandis EP, Bellone S, Soosaipillai A, Cane S, Palmieri M, et al. Human kallikrein 6: A new potential serum biomarker for uterine serous papillary cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(9):3320–5.
247. Pampalakis G, Prosnikli E, Agalioti T, Vlahou A, Zoumpourlis V, Sotiropoulou G, A tumor-protective role for human kallikrein-related peptidase 6 in breast cancer mediated by inhibition of epithelial-to mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2009;69 (9):3779–87.
248. Petraki CD, Gregorakis AK, Papanastasiou PA, Karavana VN, Luo LY, Diamandis EP, Immunohistochemical localization of human kallikreins 6, 10, 13 in benign and malignant prostatic tissues. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2003;6(3):223–7.
249. Krenzer S, Peterziel H, Mauch C, Blaber SI, Blaber M, Angel P, et al. Expression and function of the kallikrein-related peptidase 6 in the human melanoma microenvironment. *J Invest Dermatol.* 2011;131:2281–8.

250. Klucky B, Mueller R, Vogt I, Teurich S, Hartenstein B, Breuhahn K, et al. Kallikrein 6 induces E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration and invasion. *Cancer Res.* 2007;67:8198–6.
251. Yousef GM, Borgoño CA, Popalis C, Yacoub GM, Polymeris ME, Soosaipillai A, et al. In-silico analysis of kallikrein gene expression in pancreatic and colon cancers. *Anticancer Res.* 2004;24(1):43-51.
252. Liu X, Xiong H, Li J, He Y, Yuan X, Correlation of hK6 expression with tumor recurrence and prognosis in advanced gastric cancer. *Diagn Pathol.* 2013;8:62.
253. Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, et al. Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res.* 2003;63(24):8614-22.
254. Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, Yu Y, Lu KH, Diamandis EP, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2005;99(2):267-77.
255. Ashby EL, Kehoe PG, Love S, Kallikrein-related peptidase 6 in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain Res.* 2010;1363:1-10.
256. Scarisbrick IA, Blaber SI, Tingling JT, Rodriguez M, Blaber M, Christophi GP, Potential scope of action of tissue kallikreins in CNS immune-mediated disease. *J Neuroimmunol.* 2006;178:167–76.
257. Hebb AL, Bhan V, Wishart AD, Moore CS, Robertson GS, Human kallikrein 6 cerebrospinal levels are elevated in multiple sclerosis. *Curr Drug Discov Technol.* 2010;7(2):137–40.

258. Tatebea H, Watanabeb Y, Kasaia T, Mizunoa T, Nakagawaa M, Tanakab M, et al. Extracellular neurosin degrades  $\alpha$ -synuclein in cultured cells. *Neurosci Res.* 2010;67:341–6.
259. Strojnik T, Kavalar R, Zajc I, Diamandis EP, Oikonomopoulou K, Lah TT, Prognostic impact of CD68 and kallikrein 6 in human glioma. *Anticancer Res.* 2009;29(8):3269-79.
260. Talieri M, Diamandis EP, Gourgiotis D, Mathioudaki K, Scorilas A, Expression analysis of the human kallikrein 7 (KLK7) in breast tumors: a new potential biomarker for prognosis of breast carcinoma. *Thromb Haemost.* 2004;91(1):180-6.
261. Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, Soosaipillai A, Diamandis EP, The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family - genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation. *Gene.* 2000;254(1-2):119-28.
262. Shan SJ, Scorilas A, Katsaros D, Rigault de la Longrais I, Massobrio M, Diamandis EP, Unfavorable prognostic value of human kallikrein 7 quantified by ELISA in ovarian cancer cytosols. *Clin Chem.* 2006;52(10):1879-86.
263. Kyriakopoulou LG, Yousef GM, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Fracchioli S, et al. Prognostic value of quantitatively assessed KLK7 expression in ovarian cancer. *Clin Biochem.* 2003;36(2):135-43.
264. Inoue Y, Yokobori T, Yokoe T, Toiyama Y, Miki C, Mimori K, et al. Clinical significance of human kallikrein7 gene expression in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(11):3037-42.

265. Johnson SK, Ramani VC, Hennings L, Haun RS, Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. *Cancer*. 2007;109(9):1811-20.

266. Xuan Q, Yang X, Mo L, Huang F, Pang Y, Qin M, et al. Expression of the serine protease kallikrein 7 and its inhibitor antileukoprotease is decreased in prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(11):1796-801.

## 10. EKLER

### EK 1. Etik Kurul Onayı



T.C  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KURUMSAL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU  
GAZİ UNİVERSİTY MEDICAL FACULTY INSTITUTIONAL REVIEW BOARD  
ANKARA-TÜRKİYE  
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	PROTOKOL ADI	"Kallikreinlerin Beyin Tümörlerinin Prognozunda Yeni Belirteç Olarak Araştırılması"				
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI	Prof.Dr.Nedret Kılıç				
<b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>	Belge Adı	Tarihi / değişiklik No.su	Dili Türkçe			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ					
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Karar No:107	Tarih: 25 Haziran 2010				
	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı araştırma projesine ait dosya etik açıdan incelenmiş, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler yönünden bütçe dışında uygun olduğuna karar verilmiştir. Komisyonun kararı, projenin bütçesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Komisyonumuza bildirilmesi gerekmektedir.					
<b>KURUMSAL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ</b>						
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU (2010 Versiyonu), BİYOTİK SÖZLEŞMESİ, KLİNİK ARAŞTIRMALAR HAKKINDA YÖNETMELİKTE DEĞİŞİKLİK YAPILMASINA DAİR YÖNETMELİK(11 Mart 2010 tarih ve 27518 sayılı)					
<b>ÜYELER</b>						
Ünvanı / Adı / Soyadı Ek Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof.Dr.Aynur OĞUZ BAŞKAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları- Çocuk Onkoloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K	x E H H	xx E H H	
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN YRD.	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	x E H H	xx E H H	
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D.	E	x E H H	E H H	Katılmadı
Prof.Dr.Çağatay ÇİFTER ÜYE	Genel Cerrahi	G.Ü.T.F Genel Cerrahi A.D.	E	x E H H	E H H	Katılmadı
Prof.Dr.Aysel ARICIOĞLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	K	x E H H	xx E H H	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	E	x E H H	xx E H H	Katılmadı
Prof.Dr.Öznur L. BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D.	K	x E H H	xx E H H	
Prof.Dr.Gonca AKBULUT ÜYE	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	x E H H	xx E H H	
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları - Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hast.A.D-Nefroloji B.D.	E	x E H H	xx E H H	
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik	G.Ü.T.F Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	x E H H	xx E H H	
Doç.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D.	K	x E H H	xx E H H	
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	x E H H	xx E H H	
Hukuk Müşaviri Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşaviri	G.Ü.Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	x E H H	xx E H H	

\* Araştırma İle İlişki  
\*\* Toplantıda Bulunma

## **EK 2. Teşekkür**

Değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve devam etmesinde her türlü desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nedret KILIÇ'a;

Doktora eğitimim boyunca teorik derslerimde değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Tez çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Gökhan KURT'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Şevin GÜNEY'e, Sayın Prof. Dr. K. Gonca Akbulut'a;

Tez çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen değerli dostlarım Yasemin IŞIK KOÇ'a ve Nevin BELDER'e;

Doktora eğitimim boyunca sağladığı burstan dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK);

Hayatım boyunca bana destek olan sevgi ve ilgilerini benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## 11. ÖZGEÇMİŞ

**Adı:** Gamze

**Soyadı:** Turna

**Doğum yeri ve tarihi:** Ankara/ 1981

**Eğitimi:**

**2008-halen:** Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Eğitimi

**2006-2008:** Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Eğitimi

**2005-2006:** Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Alan Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Eğitimi

**2000-2004:** Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

**Yabancı dili:** İngilizce

**Bilimsel etkinlikler:** Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Yurt içi Yüksek Lisans Bursu

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Yurt içi Doktora Bursu