

Ht29 Kolon Karsinoma Hücrelerinde Caix Ekspresyonunun Akım Sitometri İle Gösterilmesi ve Optimizasyonu

Rahşan ILIKÇI SAĞKAN¹ Feray KÖÇKAR^{2*} Şükran YILMAZ³ Ali SENGÜL⁴ Uğur MUŞABAK¹

¹ GATA, İmmunoloji Böl., ANKARA

^{2*} BAÜ, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Böl., BALIKESİR

³ ŞAP Enstitüsü, Hücre ve Virüs Bankası Böl., ANKARA

⁴ Medikal Park Hastanesi, İmmunoloji Böl., ANTALYA

*Sorumlu Yazar

feraykocakar@hotmail.com

Geliş Tarihi : 10 Mayıs 2011

Kabul Tarihi : 15 Temmuz 2011

Özet

Karbonik anhidraz IX, karbonik anhidraz ailesinin bir üyesidir. Hipoksik koşullara cevapta hücre proliferasyonunun regülasyonu, tümör gelişimi ve onkogeneze önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, Karbonik Anhidraz IX'un protein düzeyindeki ifadesinin seviyesi, HT-29 kolon karsinoma hücre serisinde akım sitometrisi ile belirlenmiştir. Akım sitometrisi, hücre yüzeyindeki antijenlerin tespitinde önemli bir tekniktir. Bu kapsamda, HT-29 hücrelerinde CAIX protein ifade düzeyinde 24,48,72 saat inkübasyon sürelerinde zamana bağlı olarak bir düşüş gözlenmiştir. Adherent hücrelerde CAIX'un protein düzeyindeki ifadesini akım sitometrik olarak çalışmak için hücre kazıyıcı kullanılarak hücre süspansiyonu hazırlanması uygun bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Karbonik Anhidraz IX, Akım Sitometri, HT-29, Kolon kanseri

Abstract

Carbonic anhydrase IX is a member of carbonic anhydrase family. It is important role in response to hypoxic conditions, regulation of cell proliferation, tumor development and oncogenesis. In this study, the protein expression level of Carbonic anhydrase IX in HT-29 colon carcinoma cell line was determined by flow cytometry. Flow cytometry is a significant technique in determined cell surface antigens. In this context, the time-dependent decrease th level of the CAIX protein expression in HT-29 cells was observed at 24, 48,72 hours of incubations. It was concluded that cell suspensions should be prepared by using cell scrabing method in order to study the protein level of CAIX by flow cytometry analysis.

Key words: Carbonic anhydrase IX, Flow Cytometry, HT-29, colon cancer

GİRİŞ

Karbonik anhidrazlar (CAs, EC 4.2.1.1) yüksek yapılı omurgalılar, bitkiler, algler, bakteriler ve arkeaları da içeren bir dizi organizmada bulunan, çinko içeren metalloenzimlerdir. Bu proteinler, genel olarak CO₂'in geri dönüşümlü olarak hidrasyonunu katalizleyen enzimlerdir. α -CA ailesine dâhil, 15 farklı CA izoformu vardır. Bu enzimler, kinetikleri, dokulardaki dağılımları, ifade seviyelerindeki farklılıklar, hücre içindeki lokalizasyonları gibi özellikler bakımından çeşitlilik göstermektedirler. Karbonik anhidrazlar, pH dengesi, iyon transportu, respirasyon, glukoneogenezis, renal asidifikasyon, serebrospinal sıvı oluşumu, kemik rezorpsiyonu gibi biyolojik olaylarda görev alırlar [1,2]. Bu proteinlerin inhibisyonu ile çeşitli hastalıkların oluşması ve devam etmesi engellenmiş olur. [3,4].

Karbonik anhidraz IX (CAIX), membrana bağlı bir glikoproteindir. CAIX, ilk zamanlar tümörle-ilişkili membran antijeni MN olarak tanımlanmıştır ve serviks karsinoma hücre serisi HeLa' da belirlenmiştir [5]. Daha sonra insan CA9 geni klonlanarak dizi analizi yapıldı [6], genomik yapısı karakterize edilmiştir [7]. CA9 geni 11 ekzon ve 10 intron içermektedir ve kromozom 17 üzerinde lokalizedir (17q21.2) [7,8]. CA9 cDNA'sı 459 amino asit (aa) büyüklüğünde protein kodlar [7].

CAIX, hipoksik tümörlerde anormal bir ekspresyon profili gösterir. CAIX ifadesinin artışı, özofagus, akciğer,

böbrek, kolon ve rektum, göğüs, serviks, baş ve boyun ve mesane gibi çeşitli organlardan türeyen karsinomalarda hipoksik koşullar altında gerçekleşir [9]. Özellikle renal hücre karsinomlarında CAIX ifadesi artmaktadır [10,11]. CAIX protein ifadesi şeffaf hücreli renal karsinomlarda diagnostik bir belirteç olarak kullanılmaktadır [12,13]. Kolorektal tümörlerde de artan CAIX ifadesine bağlı olarak hastalığın tanısında kullanılabilir belirteçlerden birisidir [10,14]. Oligodendroglial beyin tümörlerinin büyük çoğunluğunda, CAIX ifadesi gözlenmektedir ve bu ifade seviyesi yaşamda kalım ile korelasyon göstermektedir. [15]. Küçük olmayan hücreli akciğer kanserinde CAIX pozitifliği ve kanserin tekrar ortaya çıkışı arasındaki korelasyon, akciğer tümör biyolojisi açısından önem taşımaktadır [16]. Tümör CAIX ifade seviyesi uterin serviks kanserinde lenf nodu metastazı ile doğru orantılı bir şekilde seyretmektedir [17]. Baş ve boyun karsinomasında, prostat tümörlerinde, ovaryum tümörlerinde CAIX ifadesi artış göstermektedir [10]. Melanoma ve meninjiomalarda hipoksik ve nekrotik bölgelerde CAIX ifadesi artar [10,18,19]. Glioblastoma hücre serilerinde de CAIX ifade edilmektedir. Non-Hodgkin lenfomada CAIX ifadesi, renal hücre karsinoma, kolorektal karsinoma, küçük olmayan hücreli karsinoma gibi solid tümörlerle karşılaştırıldığında çok düşük seviyededir [14,20-23].

Kolorektal kanser, hem kadınlarda hem de erkeklerde en yaygın görülen kanserler arasında üçüncü sırada yer almaktadır.

Bu oran bütün kanser ölümlerinin % 9'unu oluşturmaktadır [24]. 2007 yılında 3 farklı kolorektal karsinoma türünde yapılan bir çalışmada CAII ve CAXII mRNA'larının seviyesinin düştüğü, CAIX mRNA'sının ise seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre özellikle HPNCC'de CAIX, hem diagnostik hem de terapötik hedef olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada da yine CAIX mRNA'sının ifadesinde artış olduğu kolorektal karsinomali hastalarda gösterilmiştir. Kolorektal kanserde CAIX'un anormal ekspresyonu, kolorektal mukozada proliferasyonu gösteren bir belirteç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bundan dolayı CA9'u hedef alan tedavilere yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır [24].

Bu çalışmada, HT-29 (kolon karsinoma hücre serisi) hücreleri kolon kanseri modeli olarak seçilmiştir. Bu tümör serisi hücrelerinde, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon zamanlarında CAIX'un protein düzeyindeki ifadesi akım sitometri ile belirlenerek optimize edilmiştir. Hücreleri kaldırmada kullanılan iki farklı yöntemin CAIX protein ekspresyonuna katkıları belirlendi. Akım sitometride, PE (fikoeritrin) gibi bir florokromla işaretli CAIX monoklonal antikor kullanılarak protein düzeyinde ifade seviyesi saptanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bu çalışmada kullanılan "insan kolon karsinoma" (HT-29) hücre serisi Ankara Şap Enstitüsü'nde, Hücre Bankası sorumluluğunda olan ve Avrupa Kültür Koleksiyonları Organizasyonu üyesi olan Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (HÜKÜK) sağlandı. Besin ortamı olarak Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biochrom AG, Almanya) ve serum olarak fetal sığır serumu (FBS, Biochrom AG, Almanya) kullanıldı. İnsan CAIX'unun protein düzeyinde ifadesinin akım sitometrik analizi için anti-human karbonik anhidraz IX monoklonal antikor-PE (R&D Systems, İngiltere) kullanıldı. İzotipik kontrol olarak anti-mouse IgG2a-PE (BD Biosciences, USA) kullanıldı.

HT-29 Monolayer Hücre Kültürünün Hazırlanması

25 cm² hücre kültürü üretme kabında bulunan HT-29 tek tabaka hücre kültürü, önce Ca-Mg içermeyen fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7.2) ile ön yıkama yapıldı ve Tripsin-EDTA (%0.025 tripsin / % 0.02 ethylenediamineteraacetic acid (EDTA) (Biochrom AG, Almanya) solüsyonu ile 37°C° inkübatörde tripsinizasyona bırakılarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücreler %10 FBS serum içeren DMEM besi ortamı ile homojenize edilerek 150 cm² hücre üretme kabına aktarılıp pasajlama yoluyla ölçek büyütme işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamada hücreler yine kültür kabı yüzeyini %90-95 kapladığında, tripsinizasyon yapıldı, serumlu besi ortamı ile hücreler homojenize edildi, canlılık kontrolü ve hücre sayımı için 0,9 ml numune alındı. Alman numune içine 0,1 ml tripan mavisi (Biochrom AG, Almanya) konuldu ve hemasitometre (Bürker, Almanya) kullanılarak ışık mikroskopunda (Olympos CH, Japonya) hücre sayımı yapıldı.

CAIX İfadesinin Akım Sitometri ile Belirlenmesi ve Optimizasyonu

TNF α uygulaması için, 500 000 hücre/ml olacak şekilde 25cm² flaska HT-29 hücreleri ekildi. 24 saat sonra son

konsantrasyon 1000 ünite/ml olacak şekilde TNF α uygulandı. 72 saat inkübasyon sonra, akım sitometresinde CAIX protein ifadesi değerlendirildi. Sitokin uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

HT-29 kolon karsinoma hücrelerinde farklı zaman periyotlarında (24, 48, 72 saat) CAIX ifadesinin akım sitometrik analizi için optimizasyon çalışması yapıldı. Hücrelerin kaldırılmasında hücre kazıyıcı ya da Tripsin-EDTA uygulaması yapıldı. Daha sonra PBS ile 3 kez yıkandı. Son konsantrasyonu 25 μ g/ml olacak şekilde PE işaretli anti-human karbonik anhidraz IX monoklonal antikor (R&D Systems, England) seyreltildi. PBS ile yıkanmış olan hücrelere (1x10⁵ hücre) reaksiyonunun son hacmi 200 μ l olacak şekilde 10 μ l CAIX antikor ilave edildi. İşaretlenmemiş monoklonal antikorları görüntüleyebilmek için izotip kontrol olarak PE işaretli anti-mouse IgG2A monoklonal antikor kullanıldı. Aynı işlemler bu tüp içinde yapıldı. Hücrelerin antikorlara bağlanması için reaksiyon tüpleri karanlıkta, buz üzerinde 40 dak. inkübasyona bırakıldı. Bağlanmayan PE-konjuge antikorlar hücrelerden PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Hücreler PBS içerisinde hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra akım sitometri cihazında okumaya hazır duruma getirildi. CAIX ekspre eden hücrelerinin floresan boyanma yoğunluğu ile CAIX ifadesinin yoğunluğu arasında doğrudan bir ilişki vardır. CAIX'un hücre yüzeyindeki ifadesi, akım sitometrik analizle 488nm dalga boylu laser kullanılarak ve 565-605nm'de bir dedektörle emilen floresanın monitörlenmesi ile belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Deney sonuçları, SPSS (Statistics program for social and science) 11.5 istatistik programında tek yönlü ANOVA testi kullanılarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

CAIX protein seviyesinin analizinde akım sitometri kullanılmıştır. Deney, her bir zaman aralığında en az 3 tekrarlı olacak tarzda çalışılmıştır. Çalışmada akım sitometri cihazı olarak Beckman Coulter FC500 ve analiz programı kullanılmıştır ve antikor olarak, PE-etiketli CAIX monoklonal antikor kullanılmıştır. Öncelikle akım sitometrisi analizleri optimize edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonları, deneysel dizayndan sonra, hücre kazıyıcı ile ya da Tripsin-EDTA kullanılarak yüzeyden kaldırılmıştır. Sitokin olarak TNF α uygulanan hücrelerde, hücre yüzey kaldırma yöntemine bağlı olarak sitokin etkisinde herhangi bir farklılık olup olmadığı değerlendirilmiştir. Buna göre 72 saat 1000 ünite/ml TNF α HT-29 hücrelerine uygulanmış ve kontrol olarak hiçbir sitokin uygulanmamış hücrelerle değerlendirilmiştir. Her iki yöntemden elde edilen sonuçların karşılaştırmalı histogramları şekil 1'de gösterilmiştir. Bu hücre süspansiyonu, CAIX protein ifadesi analizleri için her bir deneyde 100 000 hücre/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Her seferinde en az 10 000 hücre olacak şekilde akım sitometride okuma gerçekleştirilmiştir. Buna göre, hücre kazıyıcısı ile elde edilen hücre popülasyonunda TNF α uygulamasında anlamlı bir azalma görülmesine karşın, Tripsin-EDTA uygulanmış hücrelerde aynı etkiye rastlanmamıştır.

Optimize edilen hücre kaldırma yöntemi kullanılarak 24, 48, ve 72 saat zaman aralıklarında CAIX protein ifadesi, akım sitometrik analizleri ile değerlendirilmiştir. Akım sitometrisinde

her bir örnek okutulup analiz edildiğinde; CAIX ifadesi 24 saat sonunda % 70.05±14.02; 48 saat sonunda % 55.68±18.60; 72 saat sonunda % 41.88±15.47 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar şekil 2 ve şekil 3’de gösterilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

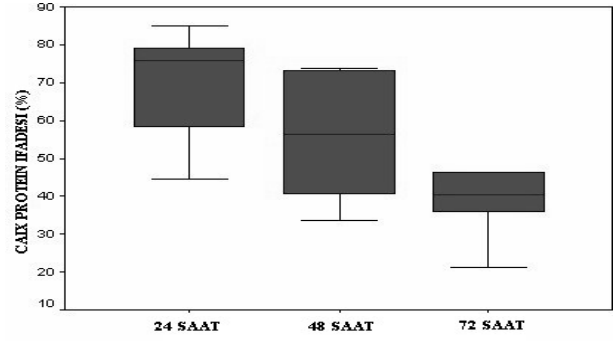
Hücrelerin hipoksik koşullara adaptasyonu ile birlikte tümör metabolizması ve mikroçevredeki değişimler, tümörün gelişmesi açısından çok önemlidir [25,26]. Transmembran karbonik anhidraz enzimlerinden CAIX, tümör metabolizması ile ilişkili olarak bilinen en önemli enzimlerdendir. Bu enzim, içerdiği hücre dışı enzim aktif bölgesi ile CO₂’in bikarbonat ve protona hidratasyonu reaksiyonunu katalizler. Ayrıca hücre-hücre adezyonu aracılığı ile de tümör invazyonunda rol oynar. CAIX’un normal dokulardaki ekspresyonu oldukça kısıtlıdır. Bununla birlikte, tümörün hipoksik koşullar ile artan CAIX ekspresyonu çeşitli tümörlerle olan bağlantısını açıkça ortaya koymaktadır [27]. Malin transformasyon ve karbonik anhidrazların ekspresyonu arasındaki ilişki tümörle ilişkili CA izoenzimlerinden CAIX ve CAXII’nin keşfine kadar net olarak ortaya çıkarılmamıştır. Son zamanlarda özellikle CAIX ve çeşitli kanserlerle ilişkili olarak yapılan çalışmalar, dikkatleri bu enzim üzerine çekmeyi başarmıştır [28].

Kolorektal tümörlerde hücre proliferasyonu ve displazi ile CAIX arasındaki bağlantıya yönelik kanıtlar, Sarnio ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur [29]. Kolon kanseri ile ilgili çalışmamızda model olarak kullandığımız HT-29 hücreleri, kolonik epitelini pek çok özelliğini göstermektedir. [30].

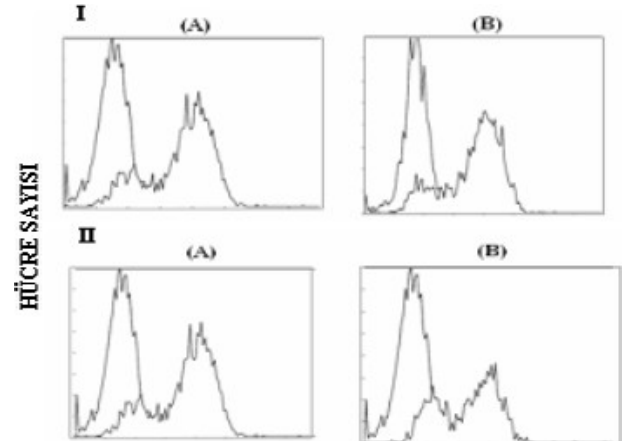
Bu çalışmamızda membrana bağlı ve pek çok tümör tipleriyle korelasyonu ortaya konmuş CAIX’un kolon kanseri modeli olan HT-29 hücrelerinde protein ifadesinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Özellikle bu sitokinlerin HT-29 hücrelerinde etkilerinin belirlenmesi çalışmada arzulanan hedeflediğimiz konular arasındadır. Öncelikle CAIX ifadesinin akım sitometrik olarak analizini yapmak için HT-29 hücrelerine uygulanan farklı hücre kaldırma yöntemleri bu çalışmada değerlendirmiştir. Hücre yüzey kaldırma yöntemi, akım sitometre sonuçlarını etkileyebilecek önemli parametrelerden birisidir. Bazı membran proteinlerin bu aşamada, zarar görmesi muhtemeldir. İlk olarak Tripsin-EDTA yardımıyla flastan alınıp hücre süspansiyonu hazırlandı. İkinci olarak, hücre kazıyıcı ile elde ettiğimiz hücre süspansiyonunda CAIX okumaları yapıldı. Sonuçlar değerlendirilirken sadece canlı hücre popülasyonu dikkate alınmıştır. Bu optimizasyon çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlara göre adherent hücrelerden Tripsin-EDTA ile elde edilen hücre süspansiyonundan CAIX ekspresyonun akım sitometrik analizi için uygun olmadığına karar verildi. Adherent hücrelerde, CAIX’un protein düzeyindeki ifadesini akım sitometrik olarak çalışmak için hücre kazıyıcı kullanılarak hücre süspansiyonu hazırlanmasının uygun olabileceğini söyleyebiliriz.

Sonuçta; HT-29 kolon karsinoma hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonlarında CAIX ifadesi akım sitometri ile analiz edildiğinde CAIX ifadesinde zamana bağlı olarak bir düşüş bulunmuştur. Ayrıca, bizim çalışmamızda HT-29 hücrelerinde CAIX antijeninin ekspresyon seviyesinin akım sitometrisi ile kolaylıkla saptanabildiği ortaya konmuştur. Akım sitometri,

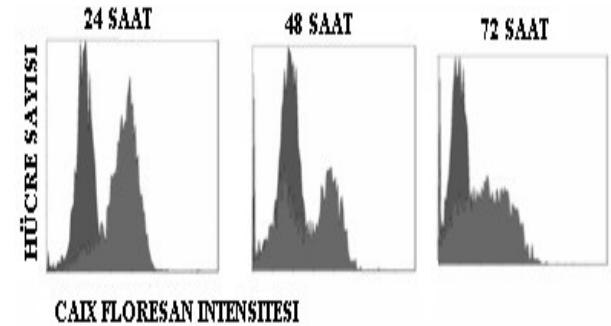
çeşitli hücrelerde immunositokimyasal analiz için oldukça hızlı bir araçtır ve bu yöntemle kantitatif ve multiparametrik analiz yapmak mümkündür. Malin hücrelerin yüzeyinde ifade edilen yüzey antijenlerini saptamak için monoklonal antikorların kullanımını temel almaktadır [10,20,31,32]. Ayrıca akım sitometrisi hematolojik malinitelerde anormal hücrelerin saptanmasında başarılı bir şekilde kullanılmasının yanı sıra bizim çalışmamızdaki gibi transmembran bir protein olan CAIX’un saptanmasında da kolaylıkla kullanılabileceği gösterilmiştir.



Şekil 2. HT-29 kolon karsinoma hücrelerinde 24, 48, 72 saat sonundaki CAIX ifadesinin akım sitometri ile elde edilen sonuçların grafiksel gösterimi



Şekil 1. HT-29 hücrelerinde, akım sitometride CAIX ekspresyonu için optimizasyon çalışması. I. Tripsin-EDTA kullanıldıktan sonra elde edilen akım sitometrik histogramlar II. Hücre kazıyıcı kullanılarak elde edilen akım sitometrik histogramlar (A) 72 saat HT-29 Kontrol hücreleri, (B) 72 saat TNFα uygulanmış HT-29 hücreleri.



Şekil 3. HT29 kolon karsinoma hücrelerinde 24, 48, 72 saat sonundaki CAIX ifadesinin akım sitometri ile elde edilen tipik histogramları

KAYNAKLAR

- [1] Supuran C., 2007, Carbonic anhydrase as drug targets-an overview, *Curr Top Med Chem*, 7:825-833.
- [2] Scozzafava A et al., 2006, Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy, *Expert Opin Ther Pat*, 16(12):1627-1664.
- [3] Pastorek J., et al., 1994, Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and putative helix-loop-helix DNA binding segment, *Oncogene*, 9:2788-2888.
- [4] Türeci O et al., 1998, Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cancers, *Proc Natl Acad Sci*, 95:7608-7613.
- [5] Pastorekova S et al., 1992, A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two component system, *Virology*, 187:620-6.
- [6] Pastorek J et al., 1994, Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment, *Oncogene*, 9:2877-88.
- [7] Opavsky R et al., 1996, Human MN/CA9 Gene, a Novel Member of the Carbonic Anhydrase Family: Structure and Exon to Protein Domain Relationships, *Genomics*, 33(3): 480-487.
- [8] Ivanov SV et al., 1998, Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel Lindau transgenes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:12596-12601.
- [9] Harris A., 2002, Hypoxia-A key regulatory factor in tumor growth, *Nat Rev Cancer*, 2: 38-47.
- [10] Ivanov S et al., 2001, Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer, *Am J Pathol.*, 158(3): 905-919.
- [11] Li G et al., 2007, MN/CA9: a potential gene marker for detection of malignant cells in effusions, *Biomarkers*, 12(2):214-220.
- [12] Liao S et al., 1997, Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney, *Cancer Res.*, 57:2827-2831.
- [13] Mckiernan J et al., Expression of the tumor-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma, *Cancer Res*, 57:2362-2365.
- [14] Saarnio J et al., 1998, Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation, *American Journal of Pathology*, 153(1):279-285.
- [15] Jarvela s et al., 2008, Carbonic anhydrase IX in oligodendroglial brain tumors, *BMC Cancer*, 8(1):1471-2407.
- [16] Kim SJ et al., 2005, Expression of HIF-1 alpha, CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 49(3):325-335.
- [17] Lee S et al., 2007, Tumor carbonic anhydrase 9 expression is associated with the presence of lymph node metastases in uterine cervical cancer, *Cancer Science*, 98(3):329-333.
- [18] Milani M. and A. Harris, 2008, Targeting tumour hypoxia in breast cancer, *European Journal of Cancer*, 44:2766-2773.
- [19] Goonewardene HM et al., 2002, Hypoxia-induced pathways in Breast Cancer, *Microscopy Research and Technique*, 59:41-48.
- [20] Wykoff C et al., 2000, Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases, *Cancer Res*, 60:7075-83.
- [21] Mckiernan J et al., Expression of the tumor-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma, *Cancer Res*, 57:2362-2365.
- [22] Vermylen P et al., 1999, Carbonic anhydrase IX antigen differentiates between preneoplastic malignant lesions in non-small cell lung carcinoma, *European Respiratory Journal*, 14(4):806-811.
- [23] Stewart M et al., 2002, Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma, *Histopathology*, 40(3):253-260.
- [24] Niemela A et al., 2007, Carbonic Anhydrase IX is Highly Expressed in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 16(9):1760-1766.
- [25] Hu, M., Polyak, K., 2008, Microenvironmental regulation of cancer development, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10.
- [26] Rademakers SE et al., 2008, Molecular aspects of tumour hypoxia, *Molecular Oncology*, 2:41-53.
- [27] Parkkila, S., 2008, Significance of pH regulation and carbonic anhydrases in tumour progression and implications for diagnostic and therapeutic approaches, *BJU International*, 101(4):16-21.
- [28] Pastorekova, S. and Pastorek, J., 2004, Cancer-related carbonic anhydrase isozymes. In: Supuran CT, Scozzafava A, Conway J, editors., *Carbonic anhydrase-Its inhibitors and activators*, Boca Raton (FL), 253-280.
- [29] Saarnio J et al., 1998, Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CAIX, with potential value as a marker of cell proliferation, *Am J Pathol*, 153:279-285.
- [30] Evans M et al., 2003, Glutamine Prevents Cytokine-Induced Apoptosis in Human Colonic Epithelial Cells, *Biochemical and Molecular Actions of Nutrients*, 3065-3071.
- [31] Supuran, C. and Scozzafava, A., 2007, Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry, *Bioorg Med Chem*, 15:4336-4350.
- [32] Supuran CT et al., 2003, Carbonic anhydrase inhibitors, *Med Res Rev*, 23(2):146-189.