

Bazı Sitokinlerin Hep3B Hücrelerinde CAIX Ekspresyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

Hatice YILDIRIM^{1*},

Feray KÖÇKAR¹

¹Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Balıkesir.

*Sorumlu Yazar

e-mail: hbozkurt@balikesir.edu.tr

Geliş Tarihi : 22 Temmuz 2009

Kabul Tarihi : 15 Kasım 2009

Özet

Bu çalışmada, insan hepatoma (Hep3B) hücrelerinde IL-6 ve TNF- α sitokinlerinin, 15 farklı CA izoformundan biri olan kanser ilişkili karbonik anhidraz IX mRNA düzeyindeki etkileri belirlenmiştir. mRNA düzeyi üç farklı zaman zaman aralığı 24, 48 ve 72 saatlerde her bir sitokin için iki farklı konsantrasyon kullanılarak RT-PCR tekniği ile belirlenmiştir. IL-6 ve TNF- α tüm zaman aralıkları ve konsantrasyonlarda CAIX mRNA seviyesinde azalmaya neden olmasına rağmen, yalnızca 24 ve 48 saat 100 Ü/ml TNF- α uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Karbonik anhidraz IX, sitokin, RT-PCR

Determination of the effects of some cytokines on CAIX expression at Hep3B cells

Abstract

In this work, we have determined the effects of IL-6 and TNF- α cytokines at mRNA level of CAIX that is cancer related one of the isoforms of fifteen different carbonic anhydrases, in Hep3B cells. Three different time intervals and two different concentrations for each cytokine were analyzed by RT-PCR technique. CAIX mRNA levels of Hep3B cells were down-regulated by IL-6 and TNF- α at all time points and concentrations. Statistically decrease in the CAIX mRNA level in Hep3B cells were only at 24 h 100 U/ml and 48 h 100 U/ml TNF- α stimulation.

Keywords: Carbonic anhydrase 9, cytokine, RT-PCR

GİRİŞ

Karbonik anhidraz enzimleri çeşitli fizyolojik ve patolojik işlemlerde önemli rol oynayan ve katalitik aktiviteleri için sıkıca bağlı Zn²⁺ iyonu içeren metaloenzimlerdir. [1, 2]. İlk olarak, sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz, canlılarda CO₂ molekülünün hidrasyonunu ve HCO₃⁻ iyonunun dehidrasyonunu katalizleyen bir enzimdir [3].



Karbondoksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizlemeleri aracılığıyla bu enzimler, hücre membranında ve hücre içindeki değişik bir çok alanda gaz değişimi, iyon transportu ve asit baz dengesinin sağlanması olaylarına katılmaktadırlar [4-6]. Karbonik anhidraz IX (CAIX), insanlarda bulunan 15 farklı CA izoformundan biridir ve ekstra selüler CA domaini içeren transmembran bir proteindir [7]. CAIX'un protein kodlayan dizisi 11 ekson içermektedir, yaklaşık 11 kb büyüklüğündedir ve 9. kromozomun p12-p13 bölgesinde bulunmaktadır. Northern blot çalışmaları CAIX'un 1,5 kb uzunluğunda mRNA transkripti oluşturduğunu göstermiştir. Oluşan mRNA 54 ve 58 kDa büyüklüğünde iki transmembran proteini şeklinde işlenmektedir. Kanser hücre hatlarından elde edilen ve normal dokulardan elde edilen CAIX cDNA dizileri karşılaştırıldığında, tümör hücreleri ve normal hücrelerde farklı fonksiyonlara sebep olabilecek herhangi bir mutasyon bulunmamıştır [8-12].

CAIX tümör oluşumunda anahtar öneme sahip kontrol mekanizmalarından olan pH'nın kontrolü ve hücre adezyonunda büyük öneme sahiptir. Katı tümörlerdeki CAIX ekspresyon paterni CA izoformları arasında özgündür ve CAIX'un hücrel hipoksiya belirteci olarak kullanılmasını sağlamaktadır. CAIX'un ekspresyonu birçok kanser türünde hastalık süreci ile ilişkilidir. Tümörlerdeki CAIX ekspresyonu tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermektedir [7, 13-15]. Normal dokulardaki CAIX ekspresyonu oldukça sınırlı olmasına karşın, böbrek kanserleri, kolon kanseri, mesane kanseri, serviks kanseri, akciğer ve meme kanseri gibi birçok kanser türünde CAIX ekspresyonu gözlenmektedir [16-22]. Kanser ilişkili CAIX'un hücre membranındaki pozisyonu nedeniyle, immunoterapötik hedef olarak kullanılmasını amaçlayan çalışmalar vardır [23,24]. Ayrıca karbonik anhidrazilere spesifik inhibitör ya da aktivatörler kullanılarak kanser, obezite ve osteoporoz gibi hastalıkların tedavisinde kullanımı da amaçlanmaktadır [25]. Hem kemoterapiye hem de radyoterapiye dayanıklı böbrek kanserli ve CAIX ekspresyonunun yüksek olduğu bireylerde IL-2 sitokin tedavisine olumlu cevap alınmış olması sitokinler ile ilgili çalışmalarında artmasına sebep olmuştur [26]. Farklı sitokinler kullanılarak Blok ve ark. tarafından yapılan çalışmada, böbrek kanseri hücre hatlarında IL-1- β ve IL-4'ün CAIX ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [27]. Hücrel düzenleyici proteinler olan sitokinler, çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanarak hedeflenen hücrelerin davranışlarını etkileyen moleküllerdir. Her sitokin özgün hücre yüzey reseptörüne bağlanarak, hücre içi sinyal yollarının

fonksiyonlarının değişimine sebep olur. Bu değişimler diğer moleküller için hücre yüzey reseptör sayısının artması ya da hücrenin kendi etkilerinin değişmesi şeklinde olabilir. Çoğu sitokinlere hücreyel yanıt hedef hücrelerde gen ekspresyon değişimleri ile meydana gelir ve böylece hücreler yeni fonksiyonlar geliştirebilir ya da proliferasyon olabilir [28]. Çalışmamızda İnterlökin-6 (IL-6) ve Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)'nın farklı konsantrasyon ve zaman aralıklarında, Hep3B hücrelerinde CAIX mRNA seviyesindeki etkileri RT-PCR tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışma IL-6 ve TNF- α sitokinlerinin etkilerinin moleküler seviyede araştırılması için yapılan çalışmaların ilk basamağıdır ve gelecek çalışmalar için ışık tutacak niteliktedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

İnsan hepatoma hücre hattı Hep3B, ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures)'den temin edildi. Sitokinler Peprotech'den satın alındı. Kullanılan bütün hücre kültürü materyalleri Greiner ya da Gibco'dan satın alındı.

Hücre Kültürü ve Sitokin uygulamaları

İnsan hepatoma hücre hattı (Hep3B) hücreleri, 5 ml medyumda 25 cm² flaklarda, içerisinde 100 ünite/ml penisillin, 10 µg/ml streptomisin, 0,2 mM L-Glutamine ve % 10 ısı ile inaktive edilmiş FCS içeren DMEM medyumunda, 37°C'de %5 CO₂ atmosferinde büyütüldü. Hücreler 500 ve 1000 Ü/ml IL-6 ile 100 ve 10 Ü/ml TNF- α uygulamasıyla 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı.

cDNA Sentezi

Total RNA izolasyonu için RNeasy total RNA isolation kit (Qiagen) kullanıldı. cDNA sentezi için izole edilen total RNA dan 1µg kullanıldı. Kısaca 1µg total RNA, 1µl random primer ve distile su toplam hacim 10 µl olacak şekilde karıştırıldı. Karışım 10 dakika 70°C de inkübe edildi ve sonra buz üzerine alınarak karışım üzerine 5×MMLV (Moloney murine leukaemia virus) tampon, dNTP mix (10mM of each of dATP, dGTP, dTTP and dCTP), RNase inhibitörü (RNasin) ve MMLV reverse transcriptase enzimi ilave edilerek 42 °C de 50 dakika inkübe edildi. Sentezlenen cDNA 5 kat distile su ile dilue edilerek -20°C de saklandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonları 50µl hacimde yapıldı. Kalıp olarak elde edilen cDNA'dan 10 µl, her bir primer konsantrasyonu 2 µM, 1x tampon (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 (v/v) Triton X-100), 200 mM her bir dNTP ve 2,5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. MgCl₂ konsantrasyonu (2mM, 4mM ve 6 mM) ise her bir PCR reaksiyonu için optimize edildi. İnsan Karbonic Anhidraz 9 için PCR koşulları, 1 döngü 96°C de 5dakika; 30 döngü 93°C de 45saniye, 59°C de 45saniye, 72°C de 90 saniye; ve son döngüsü 72°C de 10 dakika şeklindedir. β -2-microglobulin için yalnızca bağlanma sıcaklığı 60°C ve döngü sayısı 19 olacak şekilde değiştirilmiştir. Bu koşullar PCR ürünü ve RNA kalıbı (cDNA) arasındaki direkt korelasyonu gösterecek şekilde optimize edilmiştir. PCR sonuçları % 2' lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak, Gel Doc sistem ile fotoğraflandırılmış ve Syngene GeneTools software ile dansitometrik analizleri yapılmıştır. Primer dizileri Çizelge 1'de gösterildiği şekildedir.

Çizelge 1. Dizayn edilen spesifik primerlerin dizisi, uzunlukları ve ürün boyutları

Primer	Uzunluk(bç)	Dizisi	Ürün (bç)
CAIX –F	20	TCTCATCTGCACAAGGAACG	349
CAIX –R	20	ACTTCAGCCGCTACTTCCAA	
h β 2mikro –F	20	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC	314
h β 2mikro–R	22	CATGTCTCGATCCCCTTAAC	

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Minitab 15. programı kullanıldı (ANOVA). İstatistiksel olarak $p \leq 0.05$ ise anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

IL-6 ve TNF- α sitokinlerinin Hep3B hücrelerindeki CAIX mRNA seviyesine etkilerinin belirlenmesi amacıyla RT-PCR tekniği kullanıldı. Hep3B hücreleri farklı konsantrasyonlarda sitokinlerle (500Ü/ml IL-6, 1000Ü/ml IL-6, 100 Ü/ml TNF- α , 10Ü/ml TNF- α) farklı zaman aralıklarında (24 s, 48 s ve 72 s) inkübe edildi. Daha sonra hücrelerden total RNA izolasyonu yapılarak RT-PCR analizi yapıldı. Şekil 1’de IL-6 uygulaması sonucunda elde edilen CAIX ve h- β -2-mikroglobulin PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi ile ayrımları görülmektedir. Şekil 1.A’da ise PCR sonuçlarının dansitometrik analizi ile elde edilen grafik görülmektedir. Verilerin dansitometrik analizi CAIX PCR sonucunun aynı zaman aralığı ve konsantrasyon için elde edilen h- β -2-mikro PCR sonucuna oranlanması ile yapılmıştır. Sonuçlar sitokin uygulanmamış kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı belirlenmiştir. Buna göre her iki konsantrasyon için 24, 48 ve 72 saat IL-6 ile muamele edilmiş hücrelerde CAIX mRNA seviyesinde azalma gözlenmiştir (Şekil 1). Ancak özellikle 24 ve 48 saat zaman aralıklarındaki azalma daha dikkat çekici olduğundan bu gruplar en az 3 kez tekrarlanarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1.C). Sonuç olarak, sitokin uygulanmamış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24 ve 48 saat için 500Ü/ml ve 1000Ü/ml IL-6 uygulamasının Hep3B hücrelerinde CAIX mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime sebep olmadığı belirlenmiştir.

Şekil 2’de Hep3B hücrelerine 24, 48 ve 72 saat 100Ü/ml ve 10Ü/ml TNF- α uygulaması sonucunda elde edilen CAIX ve h- β -2-mikroglobulin PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi ile ayrımları verilmiştir. Şekil 2.A’da ise TNF- α uygulamasından sonra elde edilen PCR sonuçlarının dansitometrik analizi görülmektedir. Grafikte de görüldüğü gibi, tüm konsantrasyon ve zaman aralıklarında TNF- α uygulaması CAIX mRNA seviyesinde düşüğe sebep olmuştur. 72 saat sonucunda, özellikle 100Ü/ml TNF- α uygulanan gruplarda kontrol grubu ile mRNA seviyeleri karşılaştırıldığında, yalnızca %1 oranında bir farklılık olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle 72 saat zaman aralığı ihmal edilerek yalnızca 24 ve 48 saat uygulamaları en az 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuçta, 100Ü/ml TNF- α uygulamasının, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında hem 24 saatte hem de 48 saatte Hep3B hücrelerinde CAIX mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Şekil 2.C).

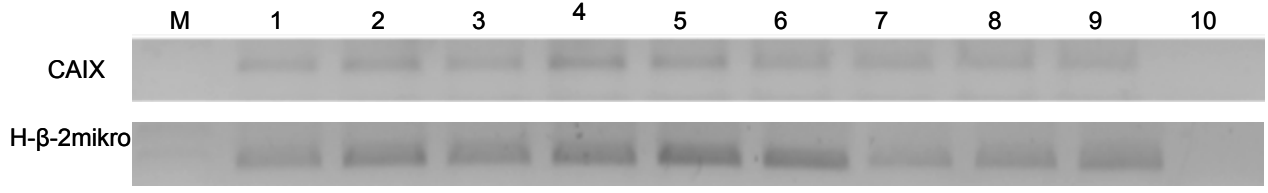
TARTIŞMA VE SONUÇ

Karbonik anhidrazlar, hem prokaryot hem de ökaryotlarda bulunan ve pH regülasyonu, CO₂ ve HCO₃⁻ taşınımı, su-elektrolit dengesi, tümör oluşumu ve büyüme gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol alan eşsiz metaloenzimlerdir [1, 2, 29, 30]. CAIX izoenzimi tümörlü hücrelerde aktivitelerini gösteren buna bağlı olarak da kanserle ilişkili olan izoenzim olarak tespit edilmiştir. [31, 32]. CAIX temel olarak katı tümörlerde bulunur ve normal dokulardaki ifadesi oldukça sınırlıdır. CAIX’un normal olarak ifade olduğu yerler sindirim sistemi epitellerinde bazolateral plazma membranlarındadır. Aynı zamanda midenin ve safra kesesinin mukozasında bulunur. Duodenum, ince bağırsağın ilk bölümlerinde, pankreas ve safra kanallarındaki epitelde, erkek üreme organlarında ve vücut boşluklarını döşeyen mezotelde de CAIX bulunur [16,17, 33].

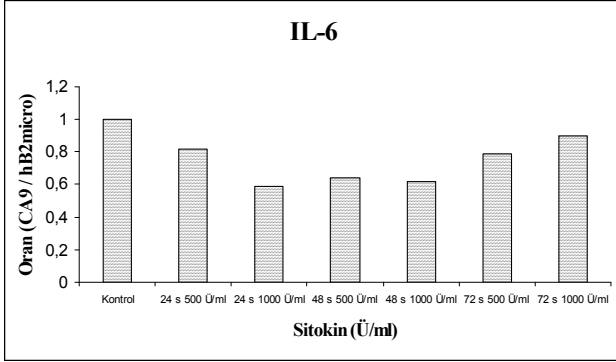
CAIX’un geniş bir aralıktaki tümörler ile sıkı ilişkisi, transkripsiyonel kontrolünde hipoksiya ve yüksek hücre yoğunluğunun etkili olmasından dolayıdır. Tümörlerdeki CAIX ekspresyonu tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermektedir. Örneğin beyin ve akciğer kanserlerinde CAIX varlığı kötü prognoz ile ilişkilidir [4]. Yine farklı meme kanseri hücre hatlarında CAIX spesifik RNAi ile yapılan çalışmalar, CAIX’un hipoksi ve normoksi koşullarında tümör hücrelerinin yaşaması ve varlığını sürdürmesi için önemli olduğunu, CAIX’un biyolojik etkisini mikroçevredeki pH’yı etkileyerek gerçekleştirdiğini göstermiştir. CAIX spesifik RNAi ile muamele edilen hücrelerde hipoksiya sebebiyle CA aktivitesi tamamen bloke edildiğinde, büyümelerinde gerileme ve hipoksi koşullarındaki yaşamlarında %50 azalma olduğu gözlenmiştir [34].

Tümörlü dokulardaki yükselmiş CAIX ekspresyonunu gösteren çok sayıda immunohistokimyasal çalışmalar bulunmaktadır. Baş ve boyun kanserine ait incelenen 79 örneğin 71 tanesinde CAIX’un yüksek ekspre olduğu, aynı örneklerde tümör dokusunu çevreleyen normal epitelyum hücrelerinde ise CAIX’un yok veya çok düşük seviyede olduğu bulunmuştur [35]. Benzer olarak 134 hastaya ait akciğer kanseri patolojik örnekleri ile yapılan çalışma, CAIX ekspresyonunun tümör gelişimi ve prognozu ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir [22]. Ayrıca Hep3B hücre hattı ve diğer hücre hatları ile yapılan *in vitro* çalışmalar pH değişimi, hipoksiya ya da hücre yoğunluğu gibi faktörlere bağlı olarak CAIX ekspresyonunun değişimini göstermektedir [35, 36]. Farklı sitokinlerin böbrek kanseri hücre hatlarındaki CAIX ekspresyon seviyesine etkilerinin belirlendiği çalışmada, IL-13 ve TGF- β CAIX ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik oluşturmamış ancak IL-1- β ve IL-4’ün ekspresyonda azalmaya sebep olduğu bulunmuştur

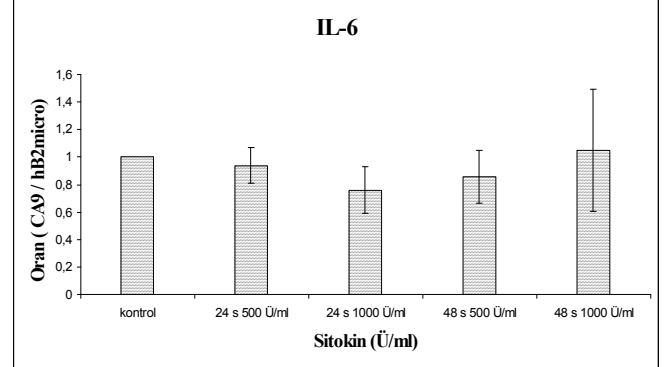
A



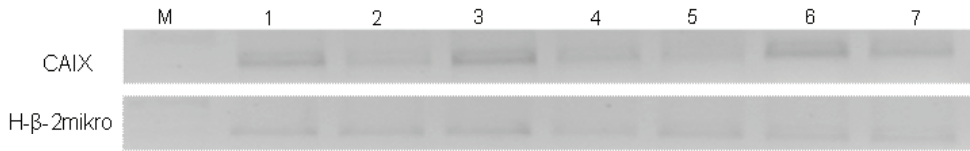
B



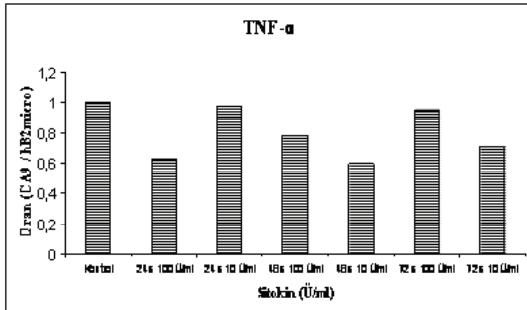
C



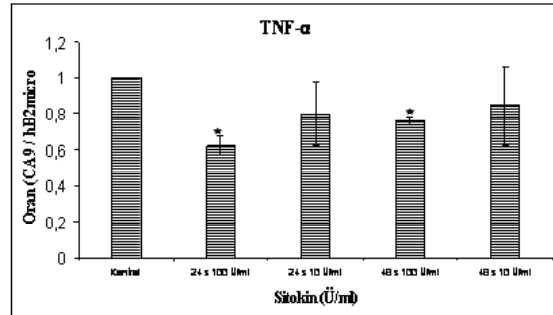
A



B



C



Şekil 2. A) Hep3B hücrelerinde TNF-α uygulaması sonucunda elde edilen RT-PCR analiz sonucu. 1: Kontrol, 2: 24 s 100Ü/ml TNF-α, 3: 24s 10Ü/ml TNF-α, 4: 48 s 100Ü/ml TNF-α, 5: 48 s 10Ü/ml TNF-α, 6: 72 s 100Ü/ml TNF-α, 7: 72 s 10Ü/ml TNF-α, M: Marker B) Hep3B hücrelerinde TNF-α uygulaması sonucunda elde edilen PCR sonuçlarının dansimetrik analizi. CAIX PCR sonuçlarının h-β-2-mikroglobilin PCR sonuçlarına oranlanarak normalize edilmesi C) Hep3B hücrelerinde 24 ve 48 saat TNF-α uygulaması sonucunda elde edilen PCR sonuçlarının dansimetrik analizi. Grafikte üç tekrar sonucu elde edilen veriler görülmektedir. [* istatistiksel olarak anlamlı değerler]

[27]. Hep3B hücre hattı kullanılarak IL-6 ve TNF- α sitokinlerinin CAIX mRNA seviyelerine etkilerinin belirlendiği çalışmamızda, IL-6 uygulamasının 24, 48 ve 72 saatte mRNA seviyesinde azalmaya sebep olduğu belirlenmiş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 100Ü/ml TNF- α ise 24 ve 48 saat sonunda Hep3B hücrelerinde CAIX mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. Sitokinlerin hücrelerin immun cevabın oluşmasındaki etkileri ve özellikle interlökinlerin hücre büyümesi, tümör nekroz faktörlerin ise kanserli hücrelerin yıkımı üzerindeki etkileri dikkate alındığında, CAIX ekspresyon seviyesinde azalmaya neden olan sitokinler kanserin sitokinlerle kombine terapileri için çok önem taşımaktadırlar.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma temel olarak TÜBİTAK TBAG 105T326 numaralı proje ile, kısmen ise Balıkesir Üniversitesi Araştırma Projesi 2007/09 ile desteklenmiştir. Ayrıca Cardiff Üniversitesi (İngiltere) öğretim üyelerinden Dr. Dipak R. RAMJİ ve grubunda çalışan Dr J. E. McLaren, Dr. N. N. Singh ve Mrs Li, N.'ye yardımlarından dolayı çok teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Lindskog S., 1982, Carbonic anhydrase. In: Eichhorn GL & Marzilli L (eds), *Advances in Inorganic Biochemistry*. 4: 115-170.
- [2] Coleman JE., 1998, Zinc enzymes, *Curr Opin Chem Biol*. 2(2): 222-234
- [3] Supuran, CT and Scozzafava A., 2001, Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Curr. Med.Chem.* 61-97.
- [4] Kopacek J et al., 2005, MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1729: 41–49
- [5] Chegwiddden, WR et al., 2000, In the Carbonic Anhydrase New horizons, Birkhauser Verlag,Basel. 343-363.,
- [6] Wistrand, P.J., 1981, The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte, *Acta Physiol. Scand.* 343-363
- [7] Kaluz S et al., 2009, Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show?, *Biochim. Biophys. Acta*. doi:10.1016/j.bbcan.2009.01.001.
- [8] 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.
- [9] Nakagawa Y et al., 1998, Radiation hybrid mapping of the human MN/CA9 locus to chromosome band 9p12–p13, *Genomics*. 53 (1): 118–119.
- [10] 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 (10): 2877–2888.
- [11] Pastorekova S et al.,1997, Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts, *Gastroenterology*. 112 (2): 398–408.
- [12] Barathova M et al.,2008, Alternative splicing variant of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX expressed independently of hypoxia and tumour phenotype, *British J. Cancer*. 98: 129–136
- [13] Pastorekova S et al., 2006, Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance, *Adv. Clin. Chem.* 42 (42): 167–216.
- [14] Parkkila S., 2008, Significance of pH regulation and carbonic anhydrases in tumour progression and implications for diagnostic and therapeutic approaches, *Bju Int*. 101: 16–21.
- [15] Shuch B et al., 2008, Carbonic anhydrase IX and renal cell carcinoma: prognosis, response to systemic therapy, and future vaccine strategies, *Bju Int*. 101: 25–30.
- [16] Koukourakis MI et al., 2001, Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy, *Clin Cancer Res*. 7(11):3399-403
- [17] 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, *Am J Pathol*. 153: 279-285.
- [18] Dorai T et al., 2005, The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer, *Eur J Cancer*. 41(18):2935-47
- [19] Turner KJ et al.,2002, The hypoxia-inducible genes VEGF and CA9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer, *Br J Cancer*. 86(8):1276-82.
- [20] Olive PL et al., 2001, Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer, *Cancer Res*. 61(24):8924-9
- [21] Chia SK et al., 2001, Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma, *J Clin Oncol*. 19(16):3660-8
- [22] Kon-no H et al., 2006, Carbonic anhydrase IX expression is associated with tumor progression and a poor prognosis of lung adenocarcinoma, *Lung Cancer*.54(3):409-18.
- [23] Bui M.H.T et al.,2003, Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy, *Clin. Cancer Res*. 9 (2): 802–811.
- [24] Surfus JE et al.,1996, Anti-renal-cell carcinoma chimeric antibody G250 facilitates antibody-dependent cellular cytotoxicity with in vitro and in vivo interleukin-2-activated effectors, *J. Immunother*. 19 (3): 184–191.
- [25] Supuran CT.,2008, Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, *Nat Rev Drug Discov*. 7(2):168-81

- [26] Atkins M et al., 2005, Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer, *Clin Cancer Res.* 11(10):3714-21
- [27] Blok VT et al., 2003, Cytokines affect resistance of human renal tumour cells to complement-mediated injury, *Scand J Immunol.* 57(6):591-9
- [28] Gunes H.,1999, Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri, *Tr. J. of Biology.* 23: 283–292
- [29] 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
- [30] Parkkila S and Parkkila A-K., 1996, Carbonic anhydrase in the alimentary tract. Roles of the different isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal, *Scand J Gastroenterol.* 31: 305-317
- [31] Franchi M et al., 2003, Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane Cancer-associated Isozyme IX with Lipophilic Sulfonamides, *J Enzyme Inhib. And Med. Chem.*18(4): 333-338.
- [32] Türeci Ö et al., 1998, Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers, *Proc. Natl Acad. Sci.* 95: 7608–7613.
- [33] Saarnio J et al., , 1998, Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity, *J Histochem Cytochem.* 46: 497-504
- [34] Robertson N et al., 2004, The role of carbonic anhydrase IX, in human tumor cell growth, survival and invasion, *Cancer Research.* 64: 6160–6165.
- [35] Beasley NJ et al., 2001, Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and microvessel density, *Cancer Res.*61(13):5262-7.
- [36] Willam C et al., 2006, Inconsistent effects of acidosis on HIF-alpha protein and its target genes, *Pflugers Arch.* 451(4):534-43.