

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**ANJİOGENEZİS ETKİLİ FAKTÖRLERİN KARBONİK ANHİDRAZ IX
GEN EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

AYLA SOLMAZ AVCIKURT

BALIKESİR, NİSAN - 2014

KABUL VE ONAY SAYFASI

AYLA SOLMAZ AVCIKURT tarafından hazırlanan “ANJIOGENEZİS ETKİLİ FAKTÖRLERİN KARBONİK ANHİDRAZ IX GEN EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 11.04.2014 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof.Dr.Feray KOÇKAR



Üye
Prof.Dr.Sezai TÜRKEL



Üye
Prof.Dr.Dilek T. BALIK



Üye
Doç.Dr.Ekrem DÜNDAR



Üye
Yard.Doç.Dr.Sümeyye AYDOĞAN
TÜRKOĞLU



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Cihan ÖZGÜR

.....

ÖZET

**ANJİOGENEZİS ETKİLİ FAKTÖRLERİN KARBONİK ANHİDRAZ IX
GEN EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ
DOKTORA TEZİ
AYLA SOLMAZ AVCIKURT
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ
(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. FERAY KOÇKAR)**

BALIKESİR, NİSAN - 2014

Karbonik Anhidraz IX katı tümörlü hücrelerde ifadesi olan Karbonik Anhidraz ailesinin bir üyesidir. CAIX'un ekspresyonu bir çok kanser türünde hastalık süreci ile ilişkilidir. Kanser ile ilişkili olan CAIX geninin regülasyonunun aydınlatılması, kanser tanı ve tedavisi için yeni bir yaklaşım olacaktır. VEGF anjiogenez olayının regülasyonunda anahtar role sahip bir sitokindir. Bu anlamda CAIX ve VEGF'in hipoksiyaya yanıtta indüklenebildiği bilinmekle beraber, VEGF'in CAIX un ekspresyonunu etkileyip etkilemediği konusunda ayrıntılı bilgi yoktur.

Bu çalışmada, farklı sitokinlerin VEGF₁₆₅, TNF- α ve TGF- β karaciğer kanser hücreleri üzerindeki proliferatif etkileri hem normal oksijen koşullarında hemde düşük oksijen koşullarında MTT testi ile değerlendirildi. Kimyasal indüklenmiş hipoksi modeli HIF1 α mRNA seviyesinde doğrulandı. CAIX ve CAXII'nin hipoksik koşullar altında indüklendiği mRNA seviyesinde belirlendi. Daha sonra VEGF sitokini hem normal oksijen hemde hipoksik koşullarda, farklı zaman aralıklarında uygulandı. VEGF hem normal oksijen koşullarında, hem de hipoksik koşullar altında CAIX mRNA düzeyinde artışa neden olduğu gerçek zamanlı PZR analizi ile gösterildi. Aynı artış akış sitometri analizi ile protein düzeyinde doğrulandı. VEGF etkisi, karaciğer hücreleri haricinde farklı doku modelinde, osteosarkom hücrelerinde de gösterildi. Saos-2 hücrelerinde VEGF'in CAIX artış etkisi, gerçek zamanlı PZR, akış sitometrisi ve western blot analizi ile doğrulandı. Farklı osteosarkom modeli MG-63 hücrelerinde CAIX mRNA artışı devam etmiştir. Hep3B, Saos-2 ve MG-63 hücrelerinde benzer yerleşimli CAXII mRNA düzeyinde de artış belirlendi. Ayrıca farklı yolak inhibitörlerinin CAIX mRNA üzerindeki etkileri gerçek zamanlı PZR ile belirlendi.

ANAHTAR KELİMELER: Karbonik Anhidraz IX, CAIX, CAXII, VEGF

ABSTRACT

**DETERMINATION OF THE EFFECTS ANGIOGENESIS RELATED
FACTORS ON CARBONIC ANHYDRASE IX GENE EXPRESSION
PH.D THESIS
AYLA SOLMAZ AVCIKURT
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY**

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KOÇKAR)

BALIKESİR, APRIL 2014

Carbonic Anhydrase IX expressed in solid tumor cell is a member of the carbonic anhydrase family. CAIX expression in many cancer types is associated with disease processes. Elucidation of CAIX regulation associated with cancer would be a new approach in cancer treatment. VEGF is a cytokine that plays a key role in the regulation of angiogenesis. In this sense, although CAIX and VEGF is inducible in response to hypoxia, there is no detailed information about the effect of VEGF of the expression of CAIX.

In this study, the proliferative effect of different cytokines, VEGF₁₆₅, TNF- α and TGF- β , on liver cancer cells in normal and low oxygen conditions were evaluated by MTT assay. Chemically induced hypoxic conditions was confirmed the mRNA level of HIF1 α . The fact that CAIX and CAXII could be induced under hypoxic conditions was determined at the mRNA level. Then, VEGF was applied in both normal and hypoxic conditions at different time intervals. Real-time PCR analysis demonstrated that VEGF causes an increase in CAIX mRNA level in both normal oxygen and hypoxic conditions. The same increase at the protein level analysis was confirmed by flow cytometry. VEGF effect was also demonstrated in different tissue model, osteosarcoma cells as well as Hep3B cells. Upregulation of CAIX gene with VEGF was confirmed by real time PCR, flow cytometry and western blot in Saos-2 cells. The VEGF dependent CAIX expression was still in the increase in the second osteosarcoma model, MG-63. VEGF upregulates CAXII mRNA expression that is another membrane located CA isoform in Hep3B, Saos-2 and MG-63 cells. Different inhibitors that blocks the pathways on CAIX mRNA level was also determined by real time PCR.

KEYWORDS: Carbonic anyhidrase IX, CAIX, CAXII, VEGF

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Anjiogenez.....	1
1.1 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vasküler Endotelial Growth Faktör; VEGF165).....	4
1.2 VEGF Reseptörleri ve Aktivitesinin Düzenlenmesi	6
1.2.1 VEGFR1	7
1.2.2 VEGFR2	8
1.2.3 VEGFR3	8
1.3 Tumor Nekroz Faktör (TNF).....	9
1.4 Transforme Edici Büyüme Faktör- β (TGF- β).....	10
1.5 Hipoksi Ve Kanser	10
1.6 HIF1	12
1.7 Karbonik Anhidrazlar	14
1.7.1 Karbonik Anhidraz 9 (CAIX).....	16
1.7.2 Karbonik Anhidraz 12 (CAXII).....	19
2. MATERYAL YÖNTEM.....	23
2.1 Materyal.....	23
2.1.1 Kimyasallar	23
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	24
2.1.3. Stok Solüsyonlar	25
2.1.3.1. Agaroz Jel Elektforezi Solüsyonları	25
2.1.3.2. Formaldehit Jel Elektforezi.....	26
2.2 METOTLAR	26
2.2.1 Çalışmada Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu	26
2.1.3 DNA ile ilgili teknikler	27
2.1.3.1 DNA Agaroz Jel Elektforezi.....	27
2.1.4 Hücre Kültürü	27
2.1.4.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı.....	27
2.1.5 RNA ile ilgili Teknikler	32
2.1.6.1 Hücre pelletlerinden RNA izolasyonu	32
2.1.6.2 RNA Miktar Tayini.....	33
2.1.6.3 RNA Jel Elektforezi.....	33
2.1.6.4 cDNA Eldesi (RT –PZR)	34
2.1.6.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	34
2.1.7 Gerçek Zamanlı PZR (Q-PZR).....	36
2.1.7.1 Sonuçların değerlendirilmesi	36
2.1.8 Western Blot Çalışmaları.....	37

2.1.9	Westernblot ve RNA İzolasyonları İçin Dondurulmuş Hücre Hazırlanması	37
2.1.10	Westernblot İçin Önceden Dondurulmuş Hücrelerden Total Hücre Estraktı Hazırlama	37
2.1.11	Western Blot	38
2.1.12	PVDF Membrandan Antikorların Ayrılması (Stripping).....	39
2.1.13	Akış Sitometri Analizleri	40
2.1.14	Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması.....	40
2.2	Yolak İnhibisyon deneyleri	41
2.2.1	Deney Dizayını:	41
2.2.2	Kullanılan inhibitörler.....	41
2.2.2.1	Cycloheksimid	41
2.2.2.2	MEK 1.....	42
2.2.2.3	Wortmanin:	42
2.3	İmmunflorasan Boyama Çalışmaları.....	43
3.	BULGULAR	44
3.1	VEGF, TNF α ve TGF β sitokinlerinin normal oksijen ve hipoksik koşullar altındaki Hep3B hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi.....	44
3.2	Hep3B hücrelerinde membran bağlı ve tümör ilgili CAIX ve CAXII mRNA seviyelerinin normal oksijen ve hipoksik koşullar altında karşılaştırılması.....	49
3.2.1	Hipoksi ve normoksi koşullarda HIF1 mRNA seviyesi belirlenmesi....	52
3.3	Anjiogenez ilgili VEGF sitokininin CAIX ekspresyonuna etkilerinin belirlenmesi	53
3.3.1	VEGF165 sitokininin Hep3B hücrelerinde CAIX gen ifadesine etkilerinin belirlenmesi.....	54
3.3.2	Hep3B Hücre Hattına VEGF sitokininin CAIX protein düzeyine etkisinin Akış sitometri Deneyleri ile belirlenmesi	59
3.3.3	VEGF Sitokininin CAIX proteinine farklı doku modeli olarak kemik kanser hücreleri Saos-2 ve MG-63 hücre hattında ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi.....	61
3.3	Anjiogenez katkıda bulunan faktörlerden VEGF165'in farklı zaman aralıklarında, normal oksijen ve hipoksik koşullar altındaki Saos-2 Hücrelerinde CAIX ve CAXII mRNA ve protein seviyesine etkileri.....	63
3.3.1	VEGF165'in farklı zaman aralıklarında, normal oksijen ve hipoksik koşullar altındaki Saos-2 Hücrelerinde CAIX ve CAXII mRNA seviyesine etkileri	63
3.3.2	VEGF165 Uygulanmış Saos-2 Hücre Hattı Westernblot Uygulaması..	69
3.3.3	Saos-2 Hücre Hattında Flowsitometri deney sonuçları	70
3.4	İnhibisyon Deneyi Sonuçları	74
3.3	Epidermal growth faktörünün (EGF) CAIX ve CAXII mRNA üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	77
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	80
5.	KAYNAKLAR.....	86
6.	EKLER.....	97

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Tümör ve normal dokularda damar formasyonu modeli	4
Şekil 1.2: VEGF-A varyantlarının şematize edilmesi	6
Şekil 1.3: VEGF izoformları ve reseptörleri	9
Şekil 1.4: Karsinogenez boyunca hücre ile çevresel etkileşimler modeli ve tümör büyümesi ve tümör evresinin fiziksel koşullarla ilişkisi. Normal epitel (gri), hiperplastik (pembe), hipoksik (mavi), glikolitik (yeşil) ve hareketli (sarı) hücreler.	12
Şekil 1.5: HIF1- α 'nın hipoksik ve normoksik durumlarda düzenlenmesi	13
Şekil 1.6: HIF tarafından oluşturulan transaktivasyon	14
Şekil 1.7: Bazı CA izoenzimleri şematik olarak hücredeki lokalizasyonları	16
Şekil 1.8: Karbonik anhidraz 9 genel yapısı	17
Şekil 1.9: CAIX ekspresyonu, hipoksi ve HIF-1 aktivasyonunun ilişkisi	18
Şekil 1.10: Tümör hücrelerin de pH düzenlenmesinde CAIX un rolü	19
Şekil 1.11: Çalışma basamaklarını özetleyen akış diyagramı	22
Şekil 2.1: İnsan CAIX geninin ekspresyonu belirlemek amacıyla kullanılan hücre hatlarının resimleri: (A) Hep3B (İnsan Karaciğer Karsinomu), (B) MG-63 (İnsan Kemik Karsinomu), (C) Saos-2 (İnsan Kemik Karsinomu).....	29
Şekil 2.2: Hemositometre	30
Şekil 2.3: MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim.....	32
Şekil 3.1: 1, 24, 48 ve 72 saat zaman ve 2 farklı konsantrasyonda normoksik koşullarda, 5 ng/ml ve 20 ng/ml VEGF ₁₆₅ uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri.....	45
Şekil 3.2: 1, 24, 48, 72 saat zaman aralıkları ve 2 farklı konsantrasyonda hipoksik koşullarda, 5 ng/ml ve 20 ng/ml, VEGF ₁₆₅ uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri.....	46
Şekil 3.3: 1, 24, 48, 72 saat 2 farklı konsantrasyonda normoksik koşullarda, 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml TGF- β uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri.....	47
Şekil 3.4: 1, 24, 48, 72 saat 2 farklı konsantrasyonda hipoksik koşullarda, 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml TGF β uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri.....	47
Şekil 3.5: 1, 24, 48, 72 saat 2 farklı konsantrasyonda normoksik koşullarda, 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml TNF α uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri.....	48
Şekil 3.6: 1, 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve 2 farklı konsantrasyonda hipoksik koşullarda, 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml TNF α uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri.....	49
Şekil 3.7: Hep3B hücre hattında normoksi ve hipoksi koşullarında CAIX mRNA seviyesinin karşılaştırılması.	50
Şekil 3.8: Hep3B hücre hattında normoksi ve hipoksi koşullarında CAXII mRNA seviyesinin karşılaştırılması.	51
Şekil 3.9: Normoksida CAIX ve CAXII mRNA seviyelerinin karşılaştırılması...51	
Şekil 3.10: HIF'in hipoksi ve normoksida mRNA seviyesinin karşılaştırılması. ..53	
Şekil 3.11: Yapılan deneylerin akış diyagramı.....	54

Şekil 3.12: RNA jel Elektroforezi.	55
Şekil 3.13: Yapılan cDNA'ların insan β -2 mikroglobülin primerleri ile klasik PZR sonucu jel elektroforez görüntüsü.	56
Şekil 3.14: Hep3B hücre hattında normoksi koşullarında VEGF ₁₆₅ sitokininin 1, 3, 6 ve 24 saatlik zaman aralıklarında CAIX ekspresyonuna etkisi ($p \leq 0,05$)	57
Şekil 3.15: Hep3B hücre hattında hipoksi koşullarında VEGF ₁₆₅ sitokininin 1, 3, 6, 24 saatlik zaman aralıklarında CAIX ekspresyonuna etkisi ($p \leq 0,05$).	57
Şekil 3.16: Hep3B hücre hattında normoksi koşullarında VEGF ₁₆₅ sitokininin 1, 3, 6 ve 24 saatlik zaman aralıklarında CAXII ekspresyonuna etkisi ($p \leq 0,05$).	58
Şekil 3.17: Hep3B hücre hattında hipoksi koşullarında VEGF ₁₆₅ sitokininin 1, 3, 6 ve 24 saatlik zaman aralıklarında CAXII ekspresyonuna etkisi ($p \leq 0,05$)	58
Şekil 3.18: Akış sitometri Hep3B hücre hattı kontrol grupları.....	59
Şekil 3.19: Akış sitometri 1 saat VEGF ₁₆₅ uygulanmış Hep3B hücreleri.....	60
Şekil 3.20: Akış sitometri 3 saat VEGF ₁₆₅ uygulanmış Hep3B hücreleri.....	60
Şekil 3.21: Akış sitometri 6 saat VEGF ₁₆₅ uygulanmış Hep3B hücreleri	60
Şekil 3.22: Hep3B hücrelerinde 1, 3 ve 6 saat VEGF ₁₆₅ uygulamasının CAIX protein seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$).....	61
Şekil 3.23: MG-63 hücrelerinde 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat VEGF ₁₆₅ uygulamasının CAIX mRNA seviyesindeki etkileri. ($p \leq 0,05$).....	62
Şekil 3.24: MG-63 hücrelerinde 1, 3, 6, 24 48 ve 72 saat VEGF ₁₆₅ uygulamasının CAXII mRNAseviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$).	63
Şekil 3.25: Saos-2 hücreleirnde CAIX proteinin immunoflorasans tekniği ile gösterilmesi	64
Şekil 3.26: Saos-2 hücre hattında VEGF ₁₆₅ sitokininin 1, 3 ve 6 saatlik zaman aralıklarında, normoksi koşullarında CAIX ekspresyonuna etkisi. ($p \leq 0,05$)	65
Şekil 3.27: Saos-2 hücre hattına VEGF ₁₆₅ sitokininin 1, 3 ve 6 saatlik zaman aralıklarında, hipoksi koşullarında CAIX ekspresyonuna etkisi.	65
Şekil 3.28: Saos-2 hücre hattına VEGF ₁₆₅ sitokininin 1, 3 ve 6 saatlik zaman aralıklarında, normoksi koşullarında CAXII ekspresyonuna etkisi. ...	66
Şekil 3.29: Saos-2 hücre hattına VEGF ₁₆₅ sitokininin 1, 3 ve 6 saatlik zaman aralıklarında, hipoksi koşullarında CAXII ekspresyonuna etkisi.....	66
Şekil 3.30: Saos-2 hücre hattına VEGF ₁₆₅ sitokininin 24, 48 ve72 saatlik zaman aralıklarında, normoksi koşullarında CAIX ekspresyonuna etkisi.....	67
Şekil 3.31: Saos-2 hücre hattına VEGF ₁₆₅ sitokininin 24, 48 ve72 saatlik zaman aralıklarında, hipoksi koşullarında CAIX ekspresyonuna etkisi.	67
Şekil 3.32: Saos-2 hücre hattına VEGF ₁₆₅ sitokininin 24, 48 ve72 saatlik zaman aralıklarında, normoksi koşullarında CAXII ekspresyonuna etkisi. ...	68
Şekil 3.33: Saos-2 hücre hattına VEGF ₁₆₅ sitokininin 24, 48 ve72 saatlik zaman aralıklarında, hipoksi koşullarında CAXII ekspresyonuna etkisi.....	68
Şekil 3.34: VEGF ₁₆₅ uygulanmış Saos-2 hücre hattında CAIX protein seviyeleri(1 ve 3 saat).....	69
Şekil 3.35: VEGF ₁₆₅ uygulanmış Saos-2 hücre hattında CAIX protein seviyeleri (6 ve 24 saat)	70
Şekil 3.36: Akış sitometri Saos-2 hücre hattı normoksi kontrol grupları	71
Şekil 3.37: Akış sitometri Saos-2 hücre hattı normoksi kontrol grupları	71

Şekil 3.38: Akış sitometri Saos-2 hücre hattı normoksi kontrol grupları	72
Şekil 3.39: Akış sitometri VEGF ₁₆₅ uygulanmış Saos-2 hücre hattı hipoksi	72
Şekil 3.40: Akış sitometri Saos-2 hücre hattı hipoksi kontrol grupları	72
Şekil 3.41: Akış sitometri VEGF ₁₆₅ uygulanmış Saos-2 hücre hattı hipoksi grupları	73
Şekil 3.42: Akış sitometri VEGF ₁₆₅ uygulanmış Saos-2 hücre hattı hipoksi grupları	73
Şekil 3.43: Saos-2 hücrelerinde 6 saat VEGF ₁₆₅ uygulamasının CAIX protein seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$).....	74
Şekil 3.44: Hep3B hücre hattına normoksi çeşitli inhibitörler uygulandığında CAIX ekspresyonuna etkileri.....	76
Şekil 3.45: Hep3B hücre hattına hipoksi çeşitli inhibitörler uygulandığında CAIX ekspresyonuna etkileri.....	77
Şekil 3.46: MG-63 hücrelerinde 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat EGF uygulamasının CAIX mRNA seviyesindeki etkileri. ($p \leq 0,05$).....	78
Şekil 3.47: MG-63 hücrelerinde 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat EGF uygulamasının CAXII mRNA seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$)	78
Şekil 3.48: Saos-2 hücrelerinde 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat EGF uygulamasının CAIX mRNA seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$).....	79
Şekil 3.49: Saos-2 hücrelerinde 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat EGF uygulamasının CAXII mRNA seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$)	79

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üreticilerin listesi	23
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan araç gereçler ve alındıkları firma isimleri	24
Tablo 2.3: Agaroz Jel Elektrofözezi Solusyonları	25
Tablo 2.4: Formaldehit agaroz jel elektrofözezi solusyonları	26
Tablo 2.5: RT –PZR tablosu	34
Tablo 2.6: Human β -2 mikroglobilin PZR tablosu	35
Tablo 2.7: CAIX, CAXII ve insan β 2-mikroglobülin primer özellikleri	35
Tablo 2.8: Real Time-PCR döngü koşulları	36
Tablo 2.9: Western blot çalışmalarında kullanılan tampon ve çözeltiler	39
Tablo 2.10: SDS-PAGE jeli miktar ve son konsantrasyonları	40

SEMBOL LİSTESİ

CA	:	Karbonik Anhidraz (Carbonic Anhydrase)
CAIX	:	Karbonik anhidraz IX izoenzimi (Carbonic Anhydrase IX)
CA9	:	Karbonik anhidraz 9 geni
CAXII	:	Karbonik anhidraz XII izoenzimi (Carbonic Anhydrase XII)
CA12	:	Karbonik anhidraz 12 geni
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktörü
IGF	:	Plesantal Büyüme Faktörü
ANG-1	:	Angiopoetin-1
bp	:	Baz çifti (Base pair)
Kb	:	Kilo baz
cDNA	:	Komplementer DNA (Complementary DNA)
CO₂	:	Karbondioksit molekülü
HIF	:	Hipoksi Uyarıcı Faktör (Hypoxia Induced Factor)
DEPC	:	Dietilpirokarbonat
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleikasit
dNTP	:	Deoksiribonükleozittrifosfat
VHL	:	Von Hippel Lindau tümör baskılayıcı geni
EDTA	:	Etilendiamintetraasetikasit
VEGF₁₆₅	:	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü
TGF	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF	:	Tümör nekroz faktör
IL	:	İnterlökin
IFN	:	İnterferon
gDNA	:	Genomik DNA
TF	:	Transkripsiyon Faktörü
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
FBS	:	Doğmamış dana serumu (Fetal Bovine Serum)
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleikasit (Messenger Ribonucleicacid)
MAPK	:	Mitojen aktive protein kinaz
JAK	:	Janus Kinaz (Janus Kinase)
O₂	:	Oksijen molekülü
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RNA	:	Ribonükleikasit
RT-PZR	:	Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Taq	:	Thermus aquaticus
UV	:	Ultra viole
NRARP	:	NOTCH-düzenleyici Ankyrin Tekrarlayan Protein

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak hazırlanan bu çalışmanın deneysel aşamaları, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji laboratuvarlarında yapılmış olup, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Feray KÖÇKAR danışmanlığında sonuçlanmıştır. Yoğun laboratuvar çalışmalarım süresince beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, engin bilgi ve tecrübeleriyle beni özveriyle yetiştiren değerli hocalarım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a ve Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'a en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunarak değerli fikirleriyle çalışmalarına katkıda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Sezai TÜRKEL'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında desteklerini hep hissettiğim; Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU, Dr. Rahşan SAĞKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda en yoğun ve zorlu çalışma zamanlarımda ve özel yaşantımda hep yanımda olan kardeşlerim Esra TOKAY'a, Dr.Meltem AYDIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışma arkadaşlarım Merve KARAMAN, Derya OKUYAN, A. Tuğşen AYDEMİR, Z. Ece CEYLAN, Ceylan TOPRAK, Mihrap Y. KAYA, Serhad ONAT, Selin S. AYAZ, Gizem GÜLER, Sevgi BAYSAL, Sinem GÜLTEKİN, Kubilay T. GÜNERHAN, Uzm. Ferit KARANFİL'e çok teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen Dr.Mithat ÇITAK'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini aldığım sonsuz sevgilerini üzerimde hissettiğim canım anne ve babama, anlayışıyla beni yalnız bırakmayan eşim Cevdet AVCIKURT'a,

Canımdan çok sevdiğim çocuklarım Eray ve Kutay'a ,

Sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

1.1 Anjiogenez

Organizmada damarlar sayesinde bir çok besin maddesi, oksijen ve sinyal molekülleri dokulara ulaşır, bunu takiben karbondioksit ve hücrelerin metabolik artıkları dokulardan ve organlardan uzaklaştırılır [1,2]. Yeniden damarlanmanın iki farklı bileşeni vardır. Bunlar vaskülogenez ve anjiogenezdir. Memeli embriyosu gelişmeye başladığında anjioblastlar endotel hücrelerine farklılaşır. Bu hücreler vasküler labirenti meydana getirir. Bu olaya vaskülogenez adı verilir [3]. Embriyoda yolk kesesinde öncü kan damarları basit endotelial tüplerin primitif damar ağının içine anjioblastların agregasyonu vasıtasıyla gelişmektedir [4]. Farklı sinyaller ven veya arteriöl farklılaşmasını sağlar. Bunu takip eden olaylar vasküler ağın gelişimini sağlar. Damar ağının oluşmasına genel olarak anjiogenez adı verilir. Arteriogenez oluşurken endotel kanallarının etrafı vasküler düz kas hücreleri veya perisitler tarafından sarılır. Bu hücreler endotel hücrelerini stabilize eder ve perfüzyonu sağlar [5].

Anjiogenez doku büyümesi ve yenilenmesi için faydalı olmasına rağmen, bazı enflamatuar ve malign hastalıklarda hastanın ölümüne bile sebep olabilecek sonuçlar doğurur. Çünkü damarlar vücudun hemen hemen her organında yer almaktadır ve yeniden damarlanma sayısız hastalığa neden olmaktadır. Aslında kanserde prognoz ve tedaviyi etkileyen en önemli kriterlerden biri metastazdır. İşte kanserde metastazı sağlayan en önemli olay anjiogenezdir. Sadece birkaç hastalık yetersiz damarlanma yüzünden meydana gelmektedir. Bu hastalıklar; inme, kalp krizi, ülseratif bozukluklar, pulmoner hipertansiyon, kanamayla giden göz hastalıklarıdır. Dokular muhtemelen başka etkiler altında kalarak da damar ağı oluşturmaktadırlar. Fakat bu mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır. Örneğin varolan damarlardan yavru damarlar ayrılır ve tümör hücreleri varolan vasküler yapıyı kullanır buna damar mimigrisi adı verilir (Şekil 1.1). Olası kanser kök hücreler yeni damar oluşumunu sağlar, yetişkin damar hücrelerinin tamiri ve

patolojik yeni damarlanma kemik iliği kök hücrelerinin bir araya gelmesi ile meydana gelir. Öncül hücreler daha sonra damar hattını belirlerler (Şekil 1.1). Kolletarel damarlar iskemik dokulara kanı getirirler. İskemik dokuların tekrar damar buldurmasında, terapatik anjiogenez mekanizmaları ihtiyacı karşılamaz. Bunun yerine özellikle kanser ve göz hastalıklarındaki damar oluşumunu hedeflemek başarıyı beraberinde getirir.

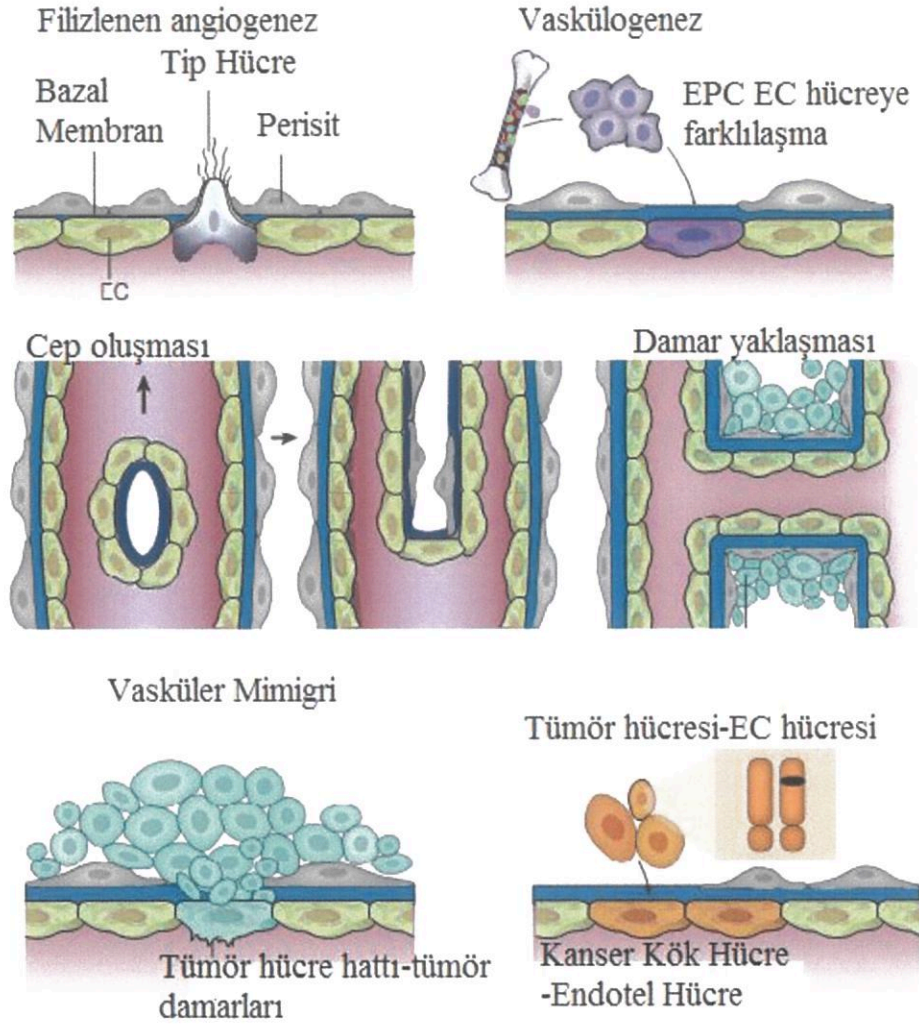
Sağlıklı bireyde *sessiz endotel hücreleri* uzun bir yaşam süresine sahiptir. Sessiz endotel hücreler, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), NOTCH, angiopoetin-1 (Ang-1) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi sinyallerden etkilenmezler. Damarlar oksijeni taşıdıkları için endotel hücreleri oksijen ve Hipoksik indüklenen Faktör (Hipoksia Inducible Factor; HIF) sensörlerine sahiptir. Bu faktörler kan damarlarında kan akışının en uygun şekilde olmasına izin verir. Sessiz haldeki endotel hücreleri tek tabakalı parmak hücreleri oluşturur, bu hücreler bağlantı bölgeleri, E-kaderin ve claudin'lerle bağlantılıdır. Bu endotel hücreleri perisitler tarafından çevrilidir. Perisitler endotel hücre proliferasyonunu baskılar ve Angiopoetin-1 (Ang-1) ve VEGF gerektiği durumlarda salgırlar. Perisitler bazal membranı oluşturur.

Damar oluşumundaki sıralı basamakları incelediğimizde; Endotelial hücreler angiogenik sinyaller (VEGF, VEGF-C, Ang-2 ve TGF) ya da kemokinleri hissettiği zaman (ki bu faktörler hipoksik, enfeksiyon durumunda ve tümör hücreleri tarafından salgılanan kemokinlerdir) perisitler ilk olarak Ang-2' ye cevap olarak bazal membrandan proteolitik degradasyonla ayrılırlar. Bu olay matriksi metalloproteinazlar tarafından yapılır. Endotel hücrelerin bağlantıları gevşer, VEGF endotel hücre tabakasının geçirgenliğini artırır. Böylece plazma proteinlerinin damarın dışına çıkmasına ve ekstrasellüler alanda ilerlemesine neden olur. İntegrin sinyal iletimine cevap olarak endotel hücreleri matrikse doğru göç eder. Proteazlar anjiogenik moleküller olan ve ekstra sellüler matrikste depolanan VEGF-C ve FGF'yi serbest bırakır. Tek bir endotel hücresi seçilir ve diğerlerinin göçü engellenir ve ekstrasellüler matriksi anjiogenez için tekrar modellerler. Perfüz tüpü oluşturmak üzere ve diğer endotel hücreleri anjiogeneze gitmesini engellemek için, seçilen bu hücre **tip hücre** olarak isimlendirilir (Şekil 1.1). Tip hücrenin komşu hücreleri stalk hücreleri oluşturmak üzere çoğalarak lümeni oluşturur. Stalk hücreleri NOTCH, NOTCH Düzenlenen Ankrin Tekrar Proteini (NOTCH-regulated ankyrin repeat

protein; NRARP), Wnt'ler, Plesantal Büyüme Faktörü (Placental Growth Factor; PGF) ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) tarafından uyarılır ve lümende e-kadherin, CD34, Sialomusinler (sialomucin), VEGF ve hedgehog protein tarafından uyarılarak yapılır. Tip hücreleri yalancı ayak taşırlar, yalancı ayaklar çevresel sinyalleri algırlar. Oysa stalk hücreleri Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Faktör; EGF17) gibi molekülleri ekstrasellüler matrikse salgırlar. Bu moleküller komşu pozisyonlar hakkında bilgi verir. Böylece stalk ilerlemesi devam eder.

HIF1 α tarafından indüklenen endotel hücreleri angiogenik sinyallere daha kolay cevap verir. Miyoloid kök hücreler diğler damar kollarının birleşimine yardım eder ve böylece kan akımının akışı sağlanır. Damarın fonksiyonel olabilmesi için olgunlaşması gerekir. Endotelyal hücreler sessiz durumuna geçerler. PLGF, PDGF, ANG-1, TGF- β , Efrin-B-2 ve NOTCH gibi sinyallerin perisitler tarafından sarılması sağlar. Aynı zamanda TIMP olarak bilinen proteaz inhibitörleri, bazal membranın tekrar oluşumuna neden olur. Bağlantılar tekrar kurulur ve optimum kan akışını sağlar.

Anjiogenez sürecinde, VEGF kadar PIGF'de önemli bir anjiogenik faktördür. VEGF'in aksine gelişimle ilgili değildir. Sadece hastalık durumuyla ilgilidir. PIGF direkt ve indirekt mekanizmalarla anjiogenezi uyarır aynı zamanda kemik iliği kökenli myeloid hücreleri aktive eder. Tümör hücreleri için besleyici bir ortam oluşturur. Plesanta büyüme faktörünün antikoru ile nötralize edilmesi damar perfüzyonunun ve olgunlaşmasının iyileştirilmesini sağlar ve kemöterapiye cevabı arttırır. VEGF-B sadece bazı dokularda anjiogenik etkisi vardır (Örn. kalp). Aynı zamanda nöronal hücre canlı kalınımını da arttırır. Endotel hücre kanallarının kararlı olması için endotel hücreleri PDGF salgırlar. PDGF damarların düzgün görev yapabilmesi için önemlidir ve bazı büyüme faktörleri (PDGF, TGF- β anjiopoetin) bu olaya katkıda bulunur. PDGF reseptörünün duvar hücrelerinde engellenmesi, VEGF'in perisit kaplanmasını azaltır ve anormal tümör duvarı oluşturur [6].



Şekil 1.1: Tümör ve normal dokularda damar formasyonu modeli [6]

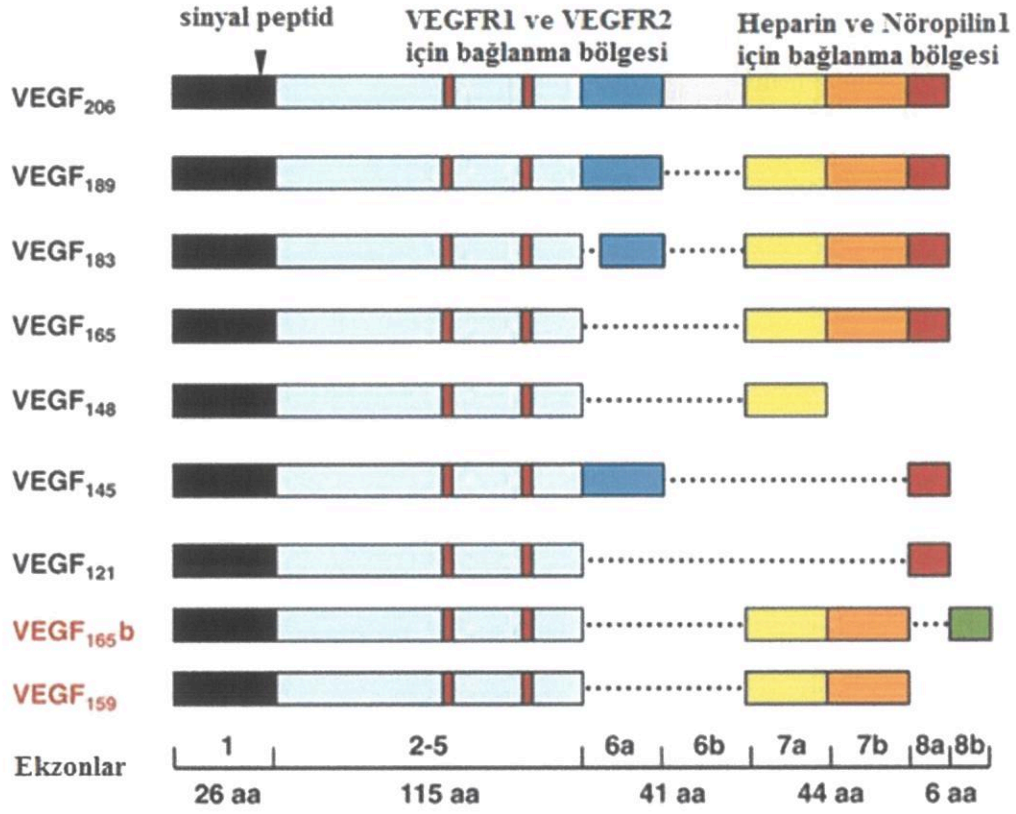
1.1 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vasküler Endotelial Growth Faktör; VEGF)

Vertabralılarda hemen hemen bütün dokular, oksijen ve besin maddelerine damar sistemi sayesinde ulaşabilir [7]. Birçok hastalığın ilerlemesinde ve özellikle kanserde damar ağının arttığı gözlemlenmiştir [8]. Birçok hastalığın vasküler sistemle yakından ilgili olması, angiogenezin moleküler temelini anlaşılmasını son derece önemli kılar. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), Anjiopoetin, Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor; PDGF), gibi bazı faktörler angiogenezde son derece önemli rol oynarlar. Bu faktörlerin içinden VEGF ve VEGF'in reseptörleri, embriyogenezin erken dönemlerinden itibaren memeli

kan ve lenf damarlarının oluşmasını sağlar ve aynı zamanda patolojik durumlarda da yeni damar oluşumunda rol oynayan yapılardır [9].

VEGF ilk defa 1983 yılında tanımlanmıştır [10]. VEGF 'in ilk keşfedildiği zaman damar permeabilitesini arttırdığı gözlenmiş, bu yüzden ilk olarak VPF (Vasküler Permeabilite Faktör) olarak isimlendirilmiştir. 1990'da VPF'nin dizilenmesi ve saflaştırılması tamamlanmıştır. Sonuçta, Connaly 1989'da VPF ile VEGF 'in aynı molekül olduğunu göstermiştir [11]. Şu anda VEGF 'in fizyolojik ve patolojik anjiogenezden sorumlu olduğu bilinmektedir [12,13]. VEGF ailesi, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plesanta Büyüme Faktör adlı 6 tane üyeden oluşmuştur.

Bu ailenin en aktif üyesi VEGF-A, 45 kDa ağırlığında heparin bağlı homodimerik form olup, 6p 21.3 kromozomda lokalize olmuştur Alternatif kesim ile 4 farklı türü vardır. Bunlar, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₅ 'tir [14,15]. İnsanlarda, VEGF geni 8 ekzon 7 introndan meydana gelir. İki kısa izoform olan, VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅, mitojenik aktivite ve permeabiliteyi artırıcı etki gösterir. Uzun izoformları VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₅ ise sadece permeabilite artırıcı etki gösterir (Şekil 1.2) [16]. Artmış VEGF seviyeleri akciğer, pankreas, meme, ovaryum, böbrek, safra kesesi kanserleri gibi birkaç farklı insan malign hastalıklarında gösterilmiştir [17-19]. Düşük oksijen seviyesi, VEGF ekspresyonu için en büyük uyarıcıdır ve nekrotik alanlarda VEGF ekspresyonu en yüksek seviyelere çıkar [20, 21]. VEGF'in ekspresyonu büyüme faktörleri, diğer sitokinler, PDGF, Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) İnsülin Benzeri Büyüme Faktör (IGF), Tümör Nekrozis Faktör (TNF- α) ve östrodiol ile düzenlenir [22,23].



Şekil 1.2: VEGF-A varyantlarının şematize edilmesi [24].

1.2 VEGF Reseptörleri ve Aktivitesinin Düzenlenmesi

VEGF reseptörleri Tirozin Kinaz süper familyasının içindedir. Bu reseptörler PDGF ve FGF reseptörleriyle benzerlik gösterir. Üç farklı VEGF reseptörü vardır (Şekil 1. 3). VEGFR1, VEGFR2 ve VEGFR3. VEGF reseptörleri hem homodimer hem de heterodimer olabilirler. VEGF reseptörünün yaklaşık 750 aminoasitlik, ekstrasellüler domaini immunglobilin benzer domainleri içerir. Örneğin, VEGFR3'te 5 immunglobilin domaini disülfid bağı ile şekillenir. Ekstra sellüler domaini tek bir transmembran bölge, bir tirozin kinaz domaini ve C-terminal domaini takip eder (Şekil 1.3). Yapısal ve fonksiyonel çalışmalar farklı domainlerin VEGF aktivitesinde farklı aktiviteleri yerine getirdiğini göstermiştir. VEGFR1'in ekstrasellüler domaininin kristal yapısı, ekstrasellüler domainin tek olduğunu ve ligandlarla

kompleks oluşturduğunu göstermiştir. Immunglobülin domain-2 ile reseptördeki ligand bağlayan bölge arasında kompleks oluşur [24].

Bunun yanı sıra biyokimyasal analizler VEGFR2 deki Immunglobülin domain-3 son derece önemli olduğunu göstermiştir. VEGF reseptörlerinin alternatif kesim veya proteolitik süreçleri VEGFR1, VEGFR2 ve VEGFR3 'ün farklı varyantlarının salgılanmasına neden olur. VEGF reseptörleri primer olarak vasküler sistemde ekspre olmalarına rağmen, bazı çalışmalar non-endothelial hücrelerde de VEGFR ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir. Ancak genetik modeller, VEGF ve VEGFR'lerin vasküler sistemde çok önemli fonksiyonları olduğunu gösteriyor. Tirozin kinazların aktivitesi ligandlar tarafından düzenlenir. Özellikle VEGFA ligandı hipoksik koşullar altında dramatik bir şekilde ekspresyonu artar. Hipoksi VEGFA'nın promotor bölgesine spesifik olarak bağlanan Hipoksi İndükleyen Faktörün 1 α (HIF1 α) kararlı hale getirir. Benzer şekilde VEGFR1'in ekspresyonu direk olarak HIF'ler tarafından düzenlenebilir. VEGFR2 hipoksi boyunca düzenlenir HIF'lerin bu düzenlemede rolü tam aydınlatılmamıştır. VEGFR3 ekspresyonu farklılaşmış embriyonik kök hücrelerde düzenlenebilir ki bu kök hücreler hipoksik atmosferde kültür edilebilir. Ancak VEGFR3 reseptör ile hipoksinin düzenlenmesi *in vivo* 'da henüz aydınlatılmamıştır [24].

1.2.1 VEGFR1

Yedi tane ekstraselüler immunoglobülin benzer domain, bir tek transmembran bölge ve hücre içi tirozin kinaz bölgesinden meydana gelir. VEGFR1, VEGFA ve VEGFB ve Plazenta Büyüme Faktör'e (PIGF) yüksek ilgiyle bağlanır. Gelişim boyunca VEGFR1 ilk kez anjiyoblastlarda eksprese olur. VEGFR1'in sonraki embriyonik aşamalarda ekspresyonu devam eder. VEGFR1 ostoblastlarda, monosit, plasental trofoblast, böbrek mezeneşimal hücrelerinde ve bazı hematopoetik kök hücrelerde ekspre olur. Son dönemlerde hayvan çalışmalarında anjiyogenezde VEGFR1'in kritik rolü olduğu gösterilmiştir. Birçok bulgu VEGFR1'in damar endotelinde anahtar rol oynadığını göstermiştir. Bununla beraber doku spesifik büyüme faktörlerinin salınımına sebep olduğu gösterilmiştir. Selveraj ve arkadaşları PIGF bağlanmış VEGFR1'in monositlerde P13 kinaz/AKT ve ERK1/2 yolağını aktive ettiğini göstermiştir [25]. Son çalışmalar, VEGFR1'in hemotepoezis ve

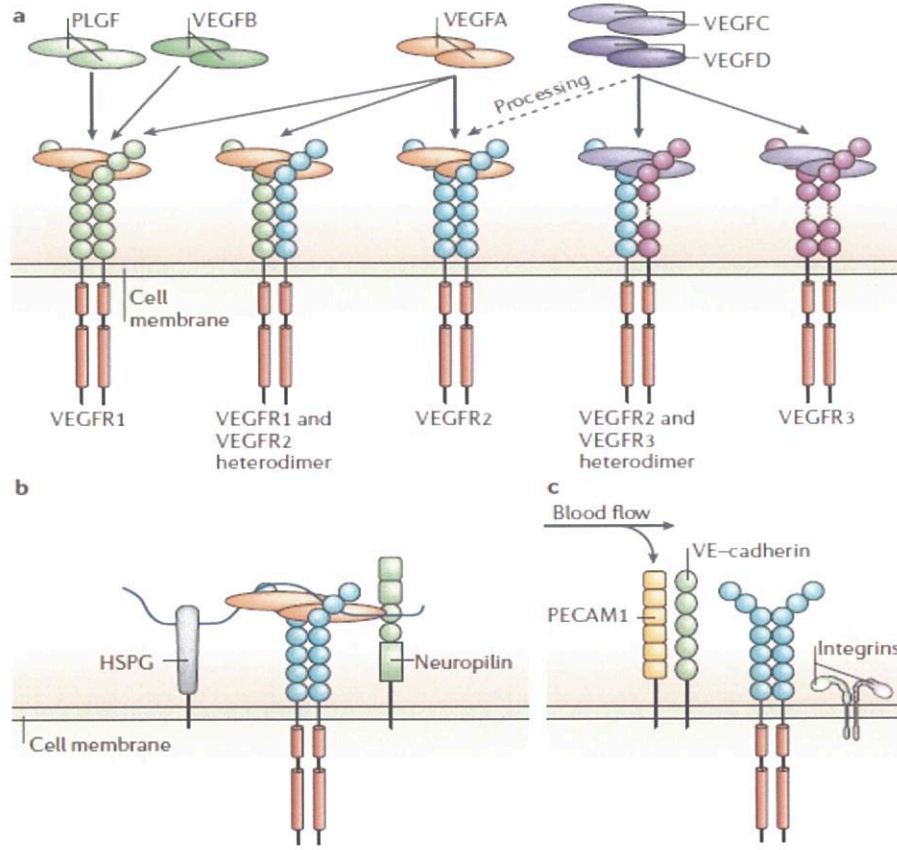
endotelial progenitörlerin etkilerini göstermiştir. Bunun yanı sıra VEGFR1 kollateral damar büyümesi kalp kasında arteriyojenik aktivite ve kemik iliğindeki hücrelerin (Ör; monosit) yenilenmesinde önemli rol oynar [25].

1.2.2 VEGFR2

VEGFR1'e benzer şekilde yedi ekstraselüler bölgeye, bir transmembran domaini ve bir tirozin kinaz domaini sahiptir. VEGFR2 proteini 230kDa ağırlığında ve hücre yüzeyinde ekspre olur. VEGFR2 dimerizasyonu ve güçlü ligand bağlı tirozin fosforilasyon ile hücrelerde mitojenik kemotaktik sonuçlara sebep olur. VEGFR2, VEGFA, VEGFC, VEGFD ve VEGFE'ye bağlanır. Aynı zamanda VEGFR2 sinir hücrelerinde osteoblastlarda megakaryositlerde ve hematopoetik kök hücrelerde ekspre olur. VEGFR2 aktivasyonu endotelial hücre büyümesini Raf-MEK-ERK yolunu aktive ederek indükler [26].

1.2.3 VEGFR3

VEGFR 'ün sadece altı tane immunoglobülin domaini vardır. VEGFR3 tercihen VEGFC ve VEGFD bağlanır. İnsanlarda C-terminal bölgeleri farklı iki izoforma sahiptir. Bu reseptör yaygın bir şekilde damarsal tümörlerde bulunur. Hatta damarsal kanserlerin endotelial hücre farklılaşmasının belirteci olarak düşünülmektedir. VEGFR3 *in vivo*'da endotelial hücre-perisit/düz kas hücrelerinde düzenlemeye neden olur. VEGFR3 aktivasyonu neoplastik durumlarda (örneğin melanoma ve göğüs kanseri) gözlenir. Ayrıca VEGFR3 bloke edilirse lenf anjiyogenez ve lenf nodu metastası önemli bir şekilde inhibe edilir. Bu yüzden VEGFR3'ün özel inhibitörleri belki de yeni lenfatik büyümeyi engeller [26].



Şekil 1.3: VEGF izoformları ve reseptörleri [27].

1.3 Tumor Nekroz Faktör (TNF)

Tumor Nekroz Faktör, (TNF) ailesi üzerinde en çok çalışılan protein ailelerinden bir tanesidir ve 19 üyeden oluşan bir süper aile olarak isimlendirilir [28]. Bunlardan TNF- α ve TNF- β üzerinde en çok çalışılanlardır. TNF- α , başta makrofaj ve lenfositler olmak üzere çeşitli immun ve somatik hücrelerde sentezlenen, doğal ve kazanılmış bağışıklık, hücre regülasyonu, farklılaşma ve apoptoz süreçlerinde önemli rollere sahip, birbirinden farklı tip hücrelerde birden fazla etkisi olan, polipeptid yapıda bir proinflamatuvar bir sitokindir [29]. TNF- α 'nın iki formu vardır, membrana bağımlı transmembran (pro-TNF) mTNF- α olarak da isimlendirilir, çözülebilir (solubul) formu sTNF- α veya matür (olgun) TNF olarak adlandırılır. TNF- α 'nın aksine TNF- β sadece solubl formda bulunur ve sTNF- β olarak adlandırılır [30,31]. Hücre membranında sentezlenen TNF- α ilk olarak 26 kD olarak sentezlenir,

uyaranlara yanıt olarak 26 kD mTNF, TNF dönüştürücü enzim (TACE) tarafından yıkılır ve 17 kD'luk olgun (matür) sTNF- α oluşur [32-34]. Spesifik olarak TNF- α 'nın bazı etkileri ise şöyledir. Ülseratif kolit, krohn hastalığı, diyabet, multipl sklerozis, aterosklerozis ve inme hastalıklarında TNF- α 'nın fazla ifade olduğu gözlenmiştir. Ayrıca romatoid artrit ve diğer immun sistem hastalıklarında TNF- α 'nın anahtar rol oynadığı belirlenmiştir [35-38]. TNF- α bu rolleri oynarken IL-1, IL-6, IL-8 ve GM-CSF gibi diğer proinflatuar sitokinlerin de salınımına neden olur.

1.4 Transforme Edici Büyüme Faktör- β (TGF- β)

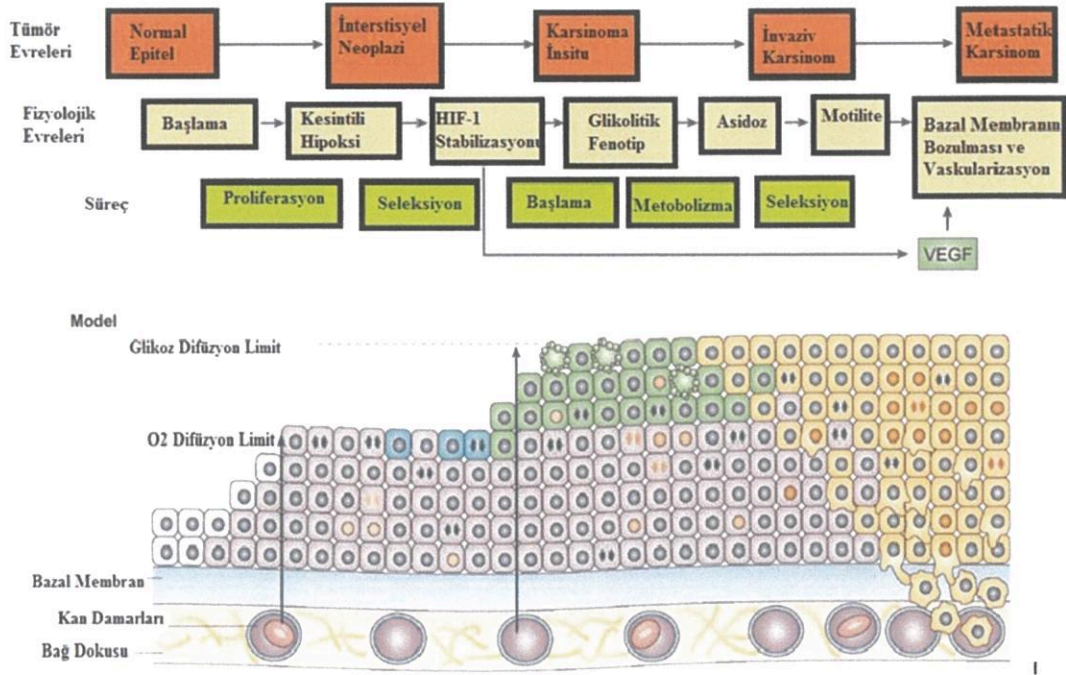
Transforme Edici Büyüme Faktör- β (Transforming growth Faktor- β) birçok hücrede proliferasyon, farklılaşma, gelişme, anjiogenez, yara iyileşmesi gibi birçok fonksiyonu düzenleyen sitokindir. Kanser gibi patolojik bozukluklara bakıldığında TGF- β iki kritik rol oynamaktadır. Birincisi tümör baskılanması ve diğeri tümör oluşturması. TGF- β erken dönem kanserde baskılayıcı özellik gösterirken, ileri evre kanserde özellikle anjiogenez ve invazyonu attırarak kanseri düzenleyici rol üstlenmektedir. TGF- β büyük bir süper ailenin üyesidir. Bu aile üç TGF- β izoformunu (TGF- β 1, - β 2 ve - β 3), aktivinler, kemik morfojenik proteinler (BMPs), inhibitörler, içinde barındıran büyük bir ailedir. Kanser hücreleri genellikle büyük miktarda TGF- β ve onun benzerlerini sekrete eder [39,40]. TGF- β hücrelerden ekstrasellüler proteinlere bağlı, inaktif latent homodimerik polipeptid olarak sekrete edilir [41, 42]. Olgun bioaktif TGF- β latent formdan proteolitik kesilme ile oluşur. TGF- β dört reseptör subüniti ile ilişki halindedir. Bu reseptörler bir çok başka sitokinler tarafında uyarılabilir [43].

1.5 Hipoksi ve Kanser

Solid tümörlerin büyümesi boyunca kanser ve stromal hücreler, lokal ve genel olarak oksijene, besinlere, büyüme faktörlerine ve sinyal moleküllere ihtiyaç duymaktadırlar. Bu ihtiyaçlar damarlar tarafından sağlanır, tümör çevredeki normal dokuya bası yapar, normal dokunun mekanını kısıtlar, bunun yanı sıra yüksek

interstisyel basınç metabolik atıkların geçişlerini hızlandırır (Şekil 1.4). Bu fiziksel koşullar ve çeşitli genetik alt yapı tümör hücrelerinin onkojenik organizasyonu sonuç olarak yüksek heterojen tümör dokusu oluşmasına neden olur. Aynı zamanda bölgesel hipoksi ve /veya asidozis ile kendini gösterir [44].

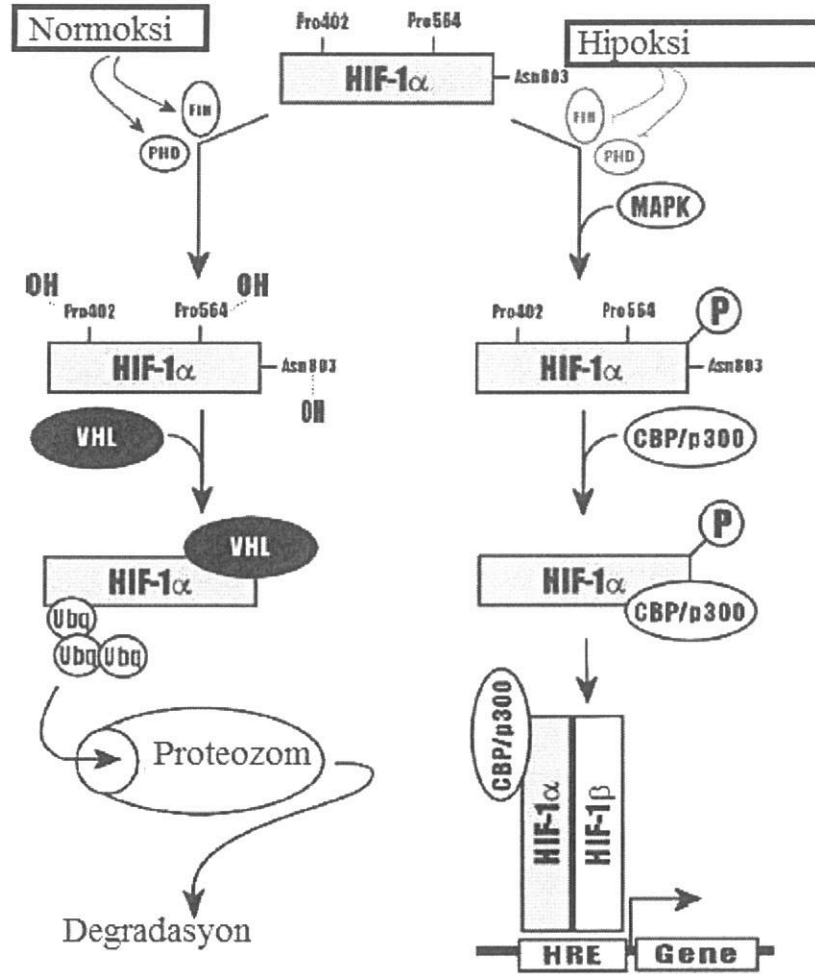
Hipoksi, ortamda oksijen miktarının azalması anlamına gelmektedir. Hipoksi tümörlerin oluşması ve büyümesinden sorumlu anahtar rol oynar. Hipoksi indukleyen factor -1 (HIF-1) hipoksiyaya cevapta en önemli transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 iki alt birimden oluşur. Bunlar HIF-1 α ve HIF-1 β dir. HIF-1 α oksijen seviyesine göre düzenlenen fonksiyonel alt birimdir. HIF-1 α oksijenle düzenlenen bir domain içermektedir. Normal oksijenli koşullarda HIF-1 α alt ünitesi prolin hidroksilazlar tarafından hidroksillenmektedir. O₂ bağımlı degradasyon domaininde korunmuş 2 prolin residüsü bulunmaktadır. Nükleusta HIF-1 β ile dimerleşir ve spesifik HRE'lere (Hipoksi Response Element) bağlanır. Yaklaşık olarak tüm genlerin %2.6'sı HIF-1 α aktivasyonu ile regüle olduğu bilinmektedir. CoCL₂, HIF-1 α 'i normal oksijen koşullarında inhibe eden prolin hidroksilazlara bağlanarak onların aktivesini durdurur. Böylece HIF-1 hidroksilenmez ve aktif hale geçer. Aktif hale geçen HIF-1 oksijen yetersizliğindeki seviyesine ulaşır ve hipoksi ile regüle olan diğer genlerin transkripsiyonlarını etkiler [45, 46].



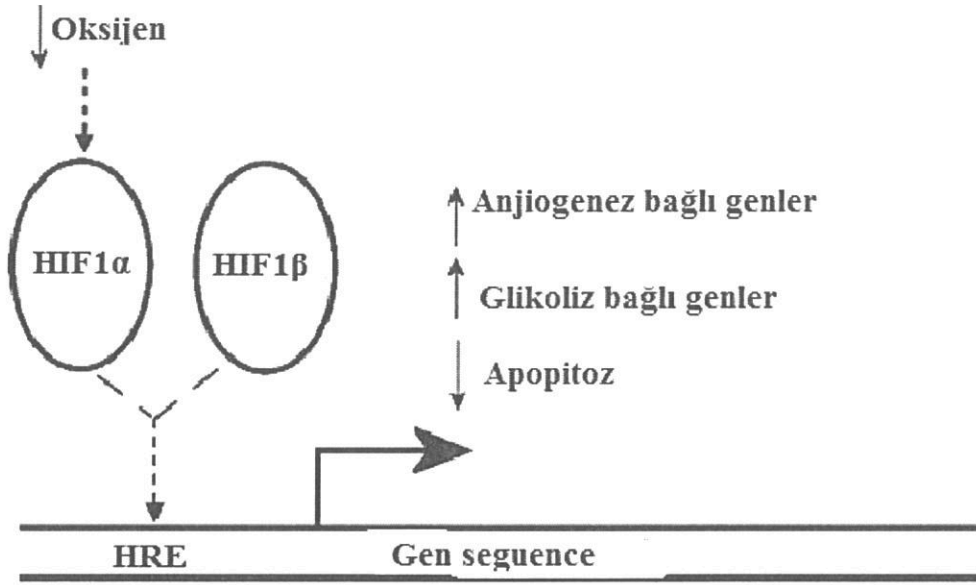
Şekil 1.4: Karsinogenez boyunca hücre ile çevresel etkileşimler modeli ve tümör büyümesi ve tümör evresinin fiziksel koşullarla ilişkisi. Normal epitel (gri), hiperplastik (pembe), hipoksik (mavi), glikolitik (yeşil) ve hareketli (sarı) hücreler. [47].

1.6 HIF1

HIF1 iki alt üniteden oluşmaktadır; HIF-1 β sürekli eksprese edilirken, HIF-1 α ekspresyonu oksijen varlığına göre olmaktadır. Normalde, HIF1 α yapısındaki korunmuş prolin ve asparajin rezidüleri, oksijen duyarlı hidroksilazlar tarafından modifiye edilirler. Fakat hipoksiya koşullarında, bu rezidüler oksijen azlığından dolayı hidroksilazlar tarafından modifiye edilemez. Böylece (pVHL) aracılığı ile degradasyon ve HIF-1 aracılığı ile inaktivasyon engellenir. Bu durum ise ortamda HIF-1 α nın birikmesine, HIF-1 α ile HIF-1 β 'nın ile dimerler oluşturmasına, hedef genlerdeki HRE bölgelerine bağlanmaya, kofaktörler ile etkileşmesine neden olur ve HIF-1 transaktivasyon kapasitesi uyarılır (Şekil 1.5 ve Şekil 1.6). Bunun dışında, HIF-1 α , normal oksijen koşullarda farklı ekstraselüler sinyaller aracılığıyla, PI3K ile MAPK yolları gibi yollar aracılığı ile yada onkojenik değişiklikler ile de artırılabilir. Halbuki PI3K aktivasyonu HIF-1 α proteininin düzeyinin azalması ile sonuçlanır, MAPK aktivasyonu ise onun transaktivasyon özelliklerini geliştirir.



Şekil 1.5: HIF1- α 'nın hipoksik ve normoksik durumlarda düzenlenmesi [48].



Şekil 1.6: HIF tarafından oluşturulan transaktivasyon [43]

Tümör büyümesi ve metastazın bağımlı olduğu bir başka olayda anjiogenezdir. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) bu olayın regülasyonunda anahtar bir role sahip bir sitokindir. VEGF’de hipoksi durumlarında HIF-1’e bağı olarak kontrol edilen bir genlerdir. Hem CAIX hem de VEGF her ikisinde hipoksik durumlarda indüklenen genlerdir. Ancak VEGF gibi bazı sitokinlerin tümörlere karşı bağışıklık sisteminin aracı molekülleri gibi çalıştıkları gibi, kanser patogenezinde önemli oldukları bilinmektedir. Hatta VEGF gibi bazıları hipoksik durumlarda indüklenmektedir. Sitokinler bu gibi durumlarda patogeneze ilgili genlerin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu artırarak ya da azaltarak etkili olurlar. Bu anlamda CAIX ve VEGF’in hiposiyaya yanıtta indüklenilebildiği bilinmekle beraber, VEGF’in CAIX un ekspresyonu etkileyip etkilemediği konusunda ayrıntılı bilgi yoktur. Yalnız, her ikisinin ekspresyonunun bazı kanser türlerinde arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir [49-51].

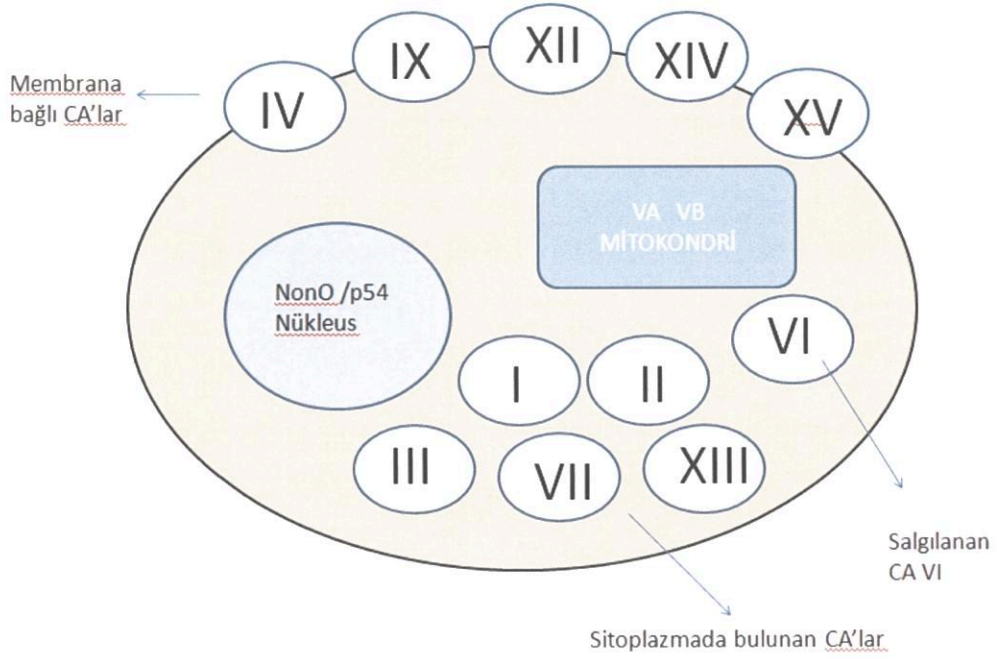
1.7 Karbonik Anhidrazlar

Karbonik anhidrazlar (Karbonat Hidroliyaz, Karbonat Ahidraz, Karbonik Asit Anhidraz, Karbonat Dehidrataz E.C.4.2.1.1) canlılarda CO₂ molekülünün

hidratasyonunu ve HCO_3^- iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen enzimlerdir ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). Karbonik anhidrazlar katalitik aktiviteleri için yapısında sıkıca bağlı Zn^{+2} iyonu içeren metaloenzimlerdir ve hemen hemen bütün organizmalarda bulunmaktadır [52]. Karbonik anhidrazlar beş gen ailesi olarak sınıflandırılmışlardır. Bunlar α -CA, β -CA, γ -CA, δ -CA ve ε -CA gen aileridir. Omurgalı dokularda bulunan sınıf α -gen sınıfıdır. Aminoasit benzerliğine bakıldığında gen sınıfları arasında önemli bir benzerlik görülmemektedir [53].

Tüm karbonik anhidrazlar hipoksiya tarafından düzenlenir. Bu enzimler pH regülasyonu ve iyon transportu sürecinde önemli rol oynarlar; kemik rezorpsiyonu mide ve pankreas sıvılarının sekresyonu, göz içi ve beyin omurilik sıvı oluşumu gibi birçok biyolojik önemli olayda görev almaktadırlar [54].

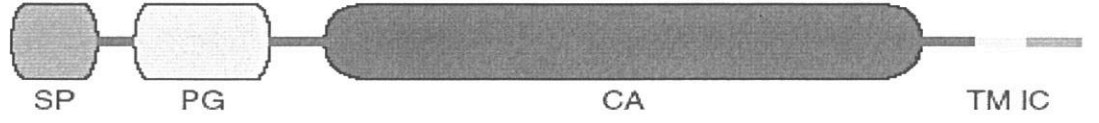
Memelilerde bulunan ve enzimatik olarak aktif olan 15 farklı CA izoenzimi tespit edilmiştir. Bunların çoğu baskın olarak farklılaşmış hücrelerle ilişkilidir ve çeşitli doku ve organlarda özelleşmiş fonksiyonları yerine getirirler. 5 tanesi sitoplazmada bulunur (CAI, CAII, CAIII, CAVII ve CAXIII), 5 tanesi hücre membranına bağlı olarak bulunur (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV ve CAXV), 2 tanesinin mitokondriyal enzim olduğu tespit edilmiştir (CAVA ve CAVB) ve bir tanesi ise salgılanan bir enzimdir (CAVI). Henüz sınıflandırılmamış bir formu NonO/p54nrb tanımlanmıştır (Şekil 1.7) [55, 56].



Şekil 1.7: Bazı CA izoenzimleri şematik olarak hücredeki lokalizasyonları

1.7.1 Karbonik Anhidraz 9 (CAIX)

CAIX, 54 ve 58 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. CA IX normal dokularda ekspresyonu oldukça sınırlıdır. Ancak çeşitli kanser türlerinde ekspresyonu oldukça artar [57, 58]. İnsan CA IX 1994 te klonlanmış, CA IX gen 1996 da karakterize edilmiştir [59, 60]. CA IX'un kristal yapısında katalitik domain 2009'da rapor edilmiştir. α -CA enzimler arasında eşsiz guaterner yapıya sahiptir. Monomerik CA IX 422 amino asitten oluşur. Epitel hücrelerin bazolateral plazma membranında ve bazı durumlarda çekirdekte de ekspre edildiği gözlenmektedir. CAIX, yapı olarak bir sinyal peptit, proteoglikan bölge, CA aktif bölgesi, transmembran bölgeleri ve hücre içi intrastoplazmik kuyruklara sahiptir (Şekil 1.8).



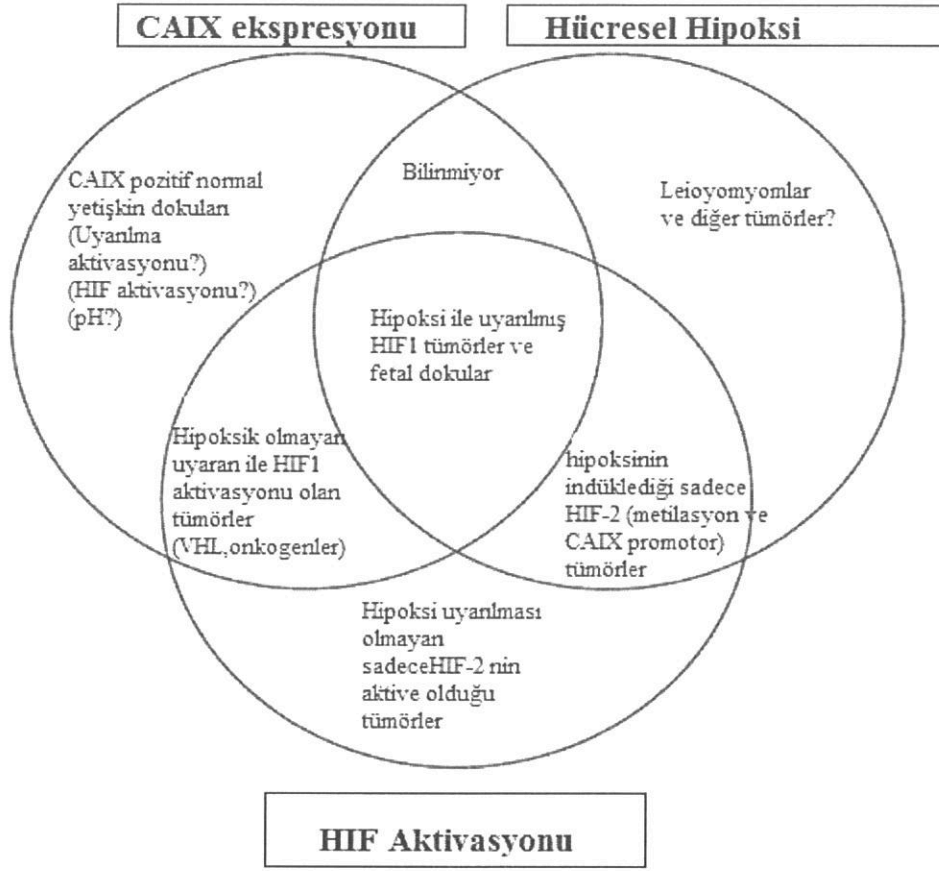
Şekil 1.8: Karbonik anhidraz 9 genel yapısı.

(SP: sinyal peptid bölgesi, PG: proteoglikan bölge, CA: karbonik anhidraz aktif bölgesi TM: trans membran bölge, IC: intrastoplazmik kuyruklar,)

CAIX izoenzimi normal olarak ekspre olduğu yerler sindirim sistemi epitellerinde bazolateral plazma membranlarındadır. Aynı zamanda midenin ve safra kesesi mukozasında bulunur [61, 62]. Duodenum ince bağırsağın ilk bölümlerinde daha fazladır ve rektuma doğru gittikçe azalır [63].

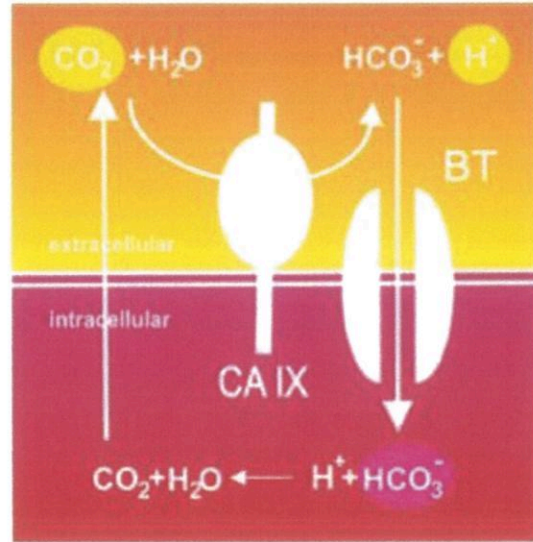
Mide epitelinin aksine bağırsak epitelinde ekspresyonu hızlı proliferen alanlardır. Bu nedenle CAIX'nun hücre farklılaşması ve çoğalmasında rolü olduğu düşünülür [64]. Pankreas ve safra kanallarındaki epitelde, erkek üreme organlarında ve vücut boşluklarını döşeyen mezotelde bulunur. Bunun yanı sıra, anormal CAIX ekspresyonu CAIX negatif dokularda oluşan karsinomlarda da gözlenmektedir. Serviks kanseri, akciğer kanserleri, meme kanseri ve böbrek kanseri bunların en çok bilinen örnekleridir [65-67]. Ancak ilginç olarak CA9 pozitif olan dokulardan köken alan tümörlerde CAIX ekspresyonu azalmış ya da yoktur [68, 69].

Tümörlerdeki CAIX ekspresyonu tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermektedir. CAIX ekspresyonu kötü prognozu göstermektedir. Örneğin astrositoma, meme, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun tümörleri ve serviks kanserinde CAIX un yüksek olması kötü prognozu gösterir [70-73]. Bunun aksine böbrek berrak hücreli tümörlerde CAIX iyi prognoza işaret eder [74]. Bunun yanı sıra hem normoksik ve hemde hipoksik durumlarda HIF1 α 'nın eksprese olduğu hastalıklar vardır. RCCC HIF-1 α , ifade edildiğinde, normoksik ve hipoksik koşullarda hem de kararlı olan bir VHL "hastalığı" olduğu, bununla beraber, bu nispeten eşsiz bir durumdur (Şekil 1.9). Bu nedenle, CAIX ifade eksikliği olduğu durumlarda, hipoksik dokular ve tek HIF-2 α ifade olabilir. CA9 tümör oluşumu süresince pH kontrolünde ve hücre adezyonunda büyük öneme sahiptir [75].



Şekil 1.9: CAIX ekspresyonu, hücresel hipoksi ve HIF-1 aktivasyonunun birbirleriyle ilişkisi [76].

Tümörde oksijen yetersizliği olduğu için enerji için anaerobik glikolize gidilmektedir ve laktik asit ile H^+ açığa çıkmaktadır. Sonuçta ortamın pH 'ı değişir. Hipoksiya, asidik pH ile ilişkili olarak tümör büyümesini arttırıcı bir faktördür. Karbonik anhidraz enzimleri, pH'nın regülasyonu için önemlidirler ve literatürde tümör ile ilişkili olan CAIX un sıkı bir şekilde HIF1 (Hipoxia Inducible Factor) yolağı ile kontrol edildiği belirtilmiştir (Şekil 1.10). Yüksek hücre yoğunluğunda, CAIX transkripsiyonunun artmasıyla çevresel hipoksiya meydana gelir. Bu durum SP1 ile HIF-1 beraber etkisiyle ilgilidir ve PI3K yolağına göre işlemektedir. En yüksek CAIX ekspresyonu; hücre yoğunluğunun yüksek ancak oksijen yoğunluğunun düşük olduğu koşullarında gerçekleşmektedir [77].



Şekil 1.10: Tümör hücrelerin de pH düzenlenmesinde CAIX un rolü .

Membranda bulunan CAIX pH regülasyonunda önemlidir. Hipoksiya ve hücre yoğunluğu birbiri ile ilişkili ancak farklı iki yol aracılığı ile CAIX promoterunu aktive etmektedir. CAIX geninin transkripsiyon başlangıcı ve PR1 bölgesi arasındaki promoter dizisi HRE (Hypoksi Response Element) bağlanma domaini içerir ve bu element HIF1 tarafından tanınır. HIF1 ise hipoksiyaya yanıt olarak transkripsiyonun regülasyonunu sağlar [78, 79]. HIF-1 hipoksiya koşullarında CAIX'un transkripsiyonunu güçlü şekilde indükler fakat tam bir indüksiyon için SP1/3 transkripsiyon faktörünün PR1 e bağlanması gereklidir.

1.7.2 Karbonik Anhidraz 12 (CAXII)

CA XII ilk kez birbirinden bağımsız iki grup tarafından 1998'te tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Enzim 325 amino asitten oluşur. CA domainine sahiptir. Kısa ekstra sellüler kısmı bir hidrofobik transmembran domain ve C- terminal sitoplazmik kuyruğa sahiptir. CA XII'nin ekspresyonu CA IX ile benzerlik gösterir. Her iki enzimde hipoksi tarafından indüklenir ve bazolateral plazma membranında lokalize olur. Tümör hücre hatları ve gerçek kanserlerde her iki enziminde artmış ekspresyonu gözlenmektedir. Son zamanlarda karbonik anhidrazların birçok fetal dokuda ekspresyon olduğu gözlenmiştir [80]. Karbonik anhidraz 12 (CAXII) karbonik

anhidrazlar ailesinden transmembran, ekstra sellüler, çinko bağımlı metalloenzimlerden birisidir. Diğer karbonik anhidrazlar gibi CO₂'in bikarbonata hidrasyonunu sağlamakla görevlidir. Dolayısıyla tümör mikro çevresindeki asidite ve tümör malignitesini düzenlemektedir. CAXII ilk olarak böbrek kanserinde yüksek miktarda eksprese olduğu gözlenmiştir, fakat şuan da birçok kanser türünde eksprese olduğu keşfedilmiştir. Birçok kanser türünde over ekspresyonu CAIX ile sıkı bir ilişki göstermekte ve hipoksi ile ilişkili olmasına rağmen meme kanserinde CAIX ile bağlantılı olmayan bir ekspresyonu vardır. Özellikle östrojen reseptörü pozitif meme kanserinde CAXII nin ekspre olduğu gözlenmiştir. Bu durum CAXII nin östrojen ile kontrol edilebileceğini işaret etmektedir [81-84].

CAIX ve CAXII izoenzimleri tümörlü hücrelerde aktivitelerini gösteren buna bağlı olarak da kanserle ilişkili olan izoenzimler olarak tespit edilmişlerdir [85, 86].

1.8 Çalışmanın Amacı

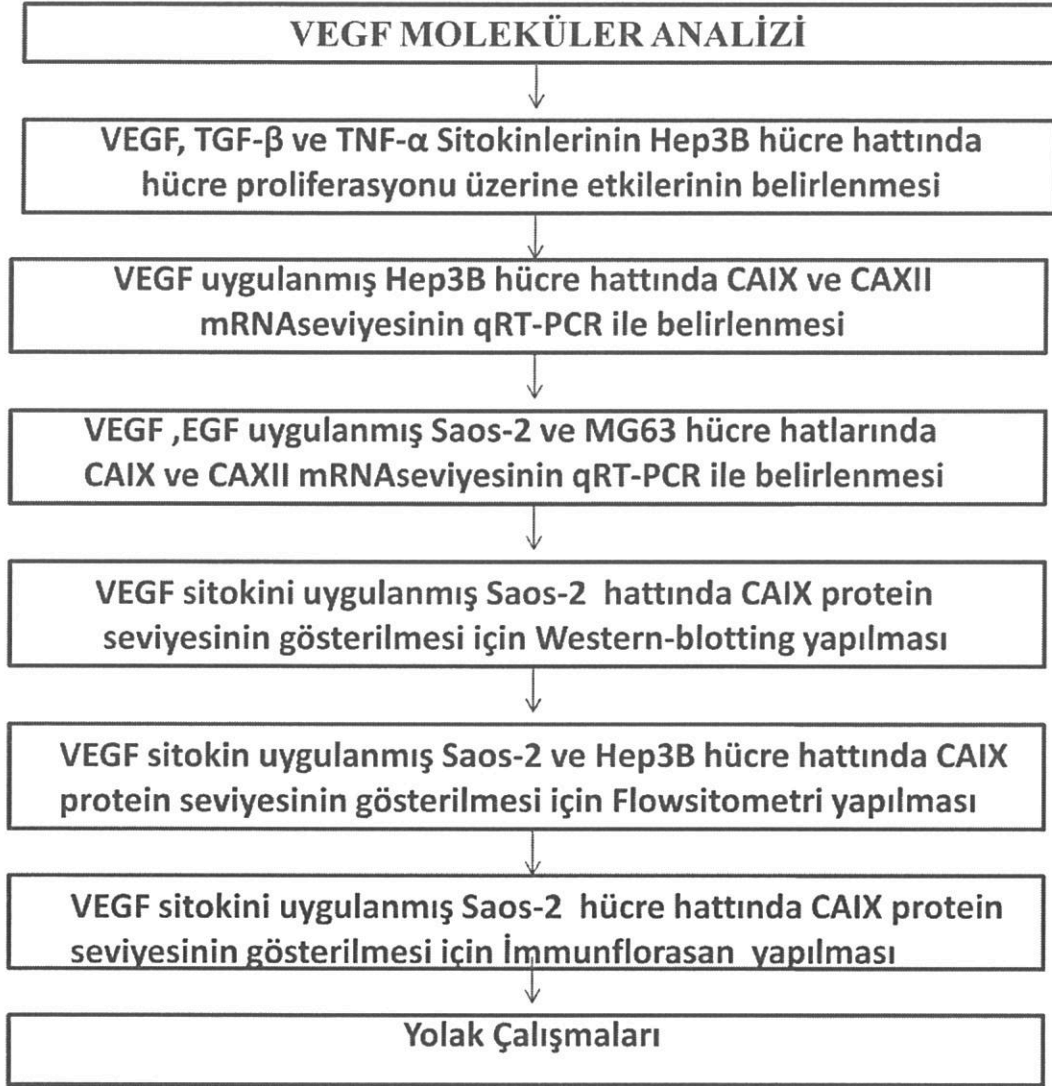
Karbonik anhidraz enzimleri çeşitli fizyolojik ve patolojik proseslerde önemli rol oynayan enzimlerdir. Bu enzimler karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizleyerek hücre membranında ve hücre içindeki değişik birçok alanda önemli görevler üstlenmişlerdir. 14 farklı CA izoenzimi vardır ve bunlardan kanser ile ilişkisi tespit edilmiş olan CAIX, genellikle katı tümörlü hücrelerde aktivite gösterir. CAIX'un ekspresyonu bir çok kanser türünde hastalık süreci ile ilişkilidir. Kanser ile ilişkili olan CAIX geninin regülasyonunun aydınlatılması, kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olacaktır.

VEGF anjiogenez olayının regülasyonunda anahtar bir role sahip bir sitokindir. VEGF de hipoksi durumlarında HIF-1'e bağlı olarak kontrol edilen bir gendir Hem CAIX hem de VEGF her ikiside hipoksik durumlarda indüklenen genlerdir. Ancak VEGF gibi bazı sitokinlerin tümörlere karşı bağışıklık sisteminin aracı molekülleri gibi çalıştıkları gibi, kanser patogeneziinde önemli oldukları bilinmektedir. Hatta VEGF gibi bazıları hipoksik durumlarda indüklenmektedir. Sitokinler bu gibi durumlarda patogenezi ile ilgili genlerin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu arttırarak yada azaltarak etkili olurlar. Bu anlamda CAIX ve VEGF'nin hipoksiyaya yanıtta indüklenilebildiği bilinmekle beraber, VEGF'nin

CAIX'un ekspresyonu etkileyip etkilemediği konusunda ayrıntılı bilgi yoktur. Yalnız, her ikisinin ekspresyonunun bazı kanser türlerinde arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (86).

Bu nedenle bu tez de günümüzün en önemli hastalıklarından birisi olan kanser ile ilişkisi tespit edilmiş olan CAIX geninin regülasyonu ve tümör angiogenezinde önemli olan VEGF ile ilişkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu bilgilerin kanser tedavisi ve kanser gelişiminin engellenmesi konusunda ışık tutacağını ümit etmekteyiz.

Özellikle katı tümörlerde tümör belirteci olma özelliğine sahip olan ve tümör mikro çevresinin asidifikasyonunda rol alan CAIX, karbondioksitin bikarbonat ve protona hidratasyonunu katalizlemektedir. Birçok kanser türünde ifade seviyesinin arttığı gözlenen CAIX'a spesifik çok sayıda inhibitörler sentezlenmekte ve kanserin tanı ve tedavisinde kullanılması amaçlanmaktadır (Şekil 1.11).



Şekil 1.11: Çalışma basamaklarını özetleyen akış diyagramı

2. MATERYAL YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıktadır .

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üreticilerin listesi

Kimyasallar	Üretici Firma
Tris Base	Sigma
NaCl	Sigma
EDTA	Riedel
Borik Asit	Merck
Gliserol	Merck
CaCl ₂	Sigma
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	Merck
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medyum)	Sigma
Taq DNA polimeraz, dNTP karışımı	Fermantas
L-glutamin	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
Sığır Serum Albumini(BSA)	Sigma

Revers Transkriptaz	Fermentas
β -merkaptetanol	Sigma
SYBR-Green PCR Master Karışımı	Sigma
Tetramethylethylenediamine(TEMED)	Sigma
Amonyum Persülfat	Merck
PVDF membran	Millipore
β -Aktin Antikoru(A5441)	Sigma
Sekonder antikor (goat, anti-rabbit) (Ab97069)	Abcam
Alexa Flour 488 Sekonder Antikor	Invitrogen
Page Ruler Plus Prestained Protein Markır (26616)	Thermo
X-Ray Film	Kodak
ECL (Elektrochemiluminescence) Kit	Pierce
MEK İnhibitörü	Sigma
Wortmannin	Cell Signaling
L-Glutamine	Sigma
PBS	Sigma
Agaroz	Prona

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan araç gereçler ve alındıkları firma isimleri

Kullanılan Gereç	Modeli
CO ₂ 'li inkübatör	Nuair
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
İnverted Mikroskop	Nikon Eclipse
-80 °C ultralow freezer	Thermo

Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Arçelik,Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, USA
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Otoklav	Hirayama, Japonya
pH Metre	WTW, Almanya
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1(Comecta Sa,)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Germany
Sıcak su banyosu	Consort, ingiltere
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	GFL, Almanya
UV visible spektrofotometre	Heios α (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Hassas Terazi	Sartorius, Almanya
96 kuyulu plaka okuyucu spektrofotometre	Biotek
Otomatik pipetler	Finnpipette
DNA elektroforezi	Minicell Primo
UVPJel Görüntüleme	UVP
PZR	Thermo
Mikro santrifüj	Thermo
Elektroforez	Apelex, İNGİLTERE
SDS PAGE Aparatları	BioRad

2.1.3. Stok Solüsyonlar

2.1.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

Tablo 2.3: Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

Solüsyon	İçeriği
5X TBE (pH:8,00)	54 g Tris Base, 27,5 g Borik Asit tartılır. 20 ml 0,5M EDTA pH:8,00 ve dH ₂ O ile

	1 litreye tamamlanır.
0,5X TBE Tamponu(pH:8,00)	5X TBE stok tampondan 100ml alınarak üzeri dH ₂ O ile 1litreye tamamlanır
Etidyum Bromür Stok Solüsyonu	10 mg/ml olacak şekilde dH ₂ O ile hazırlandı. Işık geçirmesini engelleyen koyu renk bir kapta muhafaza edildi.
DNA büyüklük belirteci	100 µl DNA ladder, 200 µl steril suda çözülerek hazırlanır.

2.1.3.2. Formaldehit Jel Elektrofrezisi

Tablo 2.4: Formaldehit agaroz jel elektrofrezisi solüsyonları

Solüsyon	İçeriği
10XFA Jel Tamponu (pH 7,00)	41,9 g MOPS, 6,8 g, C ₂ H ₃ NaO ₂ 3 H ₂ O, 20 mL EDTA (0,5M), dH ₂ O ile 1 L ye tamamlandı. pH 7 olarak hazırlanıp oda sıcaklığında saklandı.
RNA Jel Yürütme Tamponu	50 ml 10XFA, 20 ml formaldehit, 40 ml DEPC'li H ₂ O
RNAaz İçermeyen dH ₂ O	1 ml DEPC, 1 L dH ₂ O karıştırılarak otoklavlandı. 37 °C 'de bir gece bekletildi. +4 buzdolabında saklandı.

2.2 METOTLAR

2.2.1 Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Isıya dayanıklı tüm pipet uçları, ependorflar, cam malzemeler santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121 °C' de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

Doku Kùltürü Laboratuvarı her hafta periyodik olarak virkon ve çamaşır suyu içeren sıvılarla temizlendi. Oda kullanılmadığı zamanlarda UV lamba kullanılarak odanın havasının sterilizasyonu sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar flow açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı. Aynı zamanda çalışmaya başlamadan önce ve çalışma bittikten sonra laminar flow alkol ile temizlendi.

2.2.1 DNA ile ilgili teknikler

2.2.1.1 DNA Agaroz Jel Elektrofrez

DNA elektrofrez için yatay jeller kullanıldı ve 80 volt elektrik akımında 45 dakika örnekler yürütüldü. Elektrofrez tamponu olarak 0,5 x TBE tercih edildi. Agaroz jelle son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edildi. DNA'yı izleme boyası olarak bromfenol mavisi kullanıldı. Çalışmalarda plazmit DNA'lar için %0,8 ve ekspresyon profillerini karşılaştırmak için %2'lik konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. Elektrofrezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünün belirlenmesi için 1 kb DNA ladder ile karşılaştırıldı. Elektrofrez sonuçları UVP jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

2.2.2 Hücre Kùltürü

2.2.2.1 Hücre Kùltüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı

2.2.2.1.1 Hücre Kùltürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kùltürü medyumu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine L-Glutamine son konsantrasyonu 0,2 mM ve FCS son konsantrasyonu % 10

olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüm bileşenler 0,22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

2.2.2.1.2 FCS Hazırlanması

FCS (Fetal Calf Serum) –20 °C’de saklanır ve taşınması soğuk zincirle yapılır. Stok serum ilk kullanımdan önce 56 °C 1 saat ısı ile inaktive edilir ve tekrar -20 °C de saklanır.

2.2.2.1.3 PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Tablet şeklinde temin edilen PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), her tableti 100 ml dH₂O ile hazırlanmış ve otoklav edilmiştir. 2-8 °C’de saklanmıştır.

2.2.2.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Çalışmada insan hepatoma hücre hattı (Hep3B), osteosarkoma hücre hatları (MG-63 ve SAOS-2) kullanılmıştır.

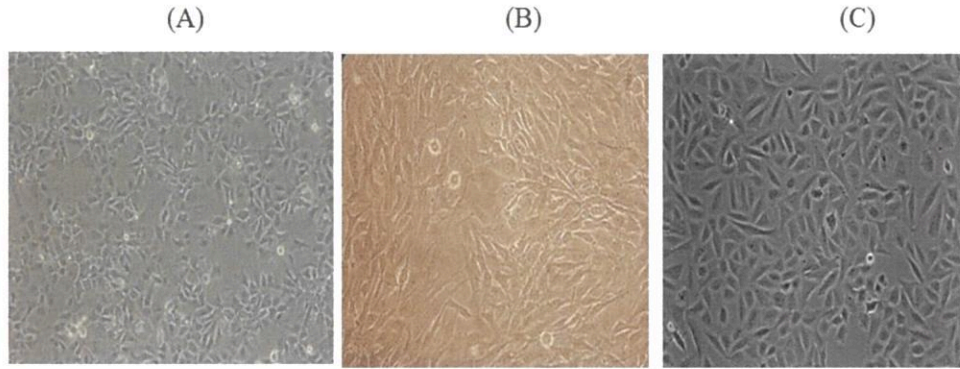
2.2.2.1.5 Hücre Soyunun Başlatılması

Uzun dönemde -80°C’de saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için -80°C’den çıkarılan hücreler 37 °C sıcaklığındaki su banyosuna alınır ve hızlıca çözümleri sağlanır. Çözünen hücreler %10’luk FCS içeren medyuma alınır, alt üst edilir ve 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır, oluşan pellet medyum ile çözülür ve flasklara ekim yapılır. Flasklar etiketlenir ve 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konulur.

2.2.2.1.6 Hücrelerin Büyütülmesi

Hücreler 15 ml medyumda 75 cm² flasklarda, içerisinde 0,2 mM L-Glutamine ve % 10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 1 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

Öncelikle insan hepatoma hücre hattı olan Hep3B hücreleri çalışmalarda kullanılmak üzere büyütülmüştür. Çalışmada ayrıca insan osteosarkom hücre hatları MG-63 ve Saos-2 büyütüldü.



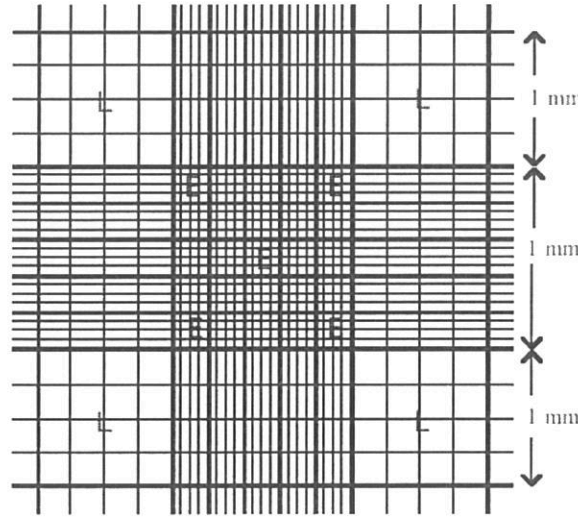
Şekil 2.1: İnsan CAIX geninin ekspresyonu belirlemek amacıyla kullanılan hücre hatlarının resimleri: (A) Hep3B (İnsan Karaciğer Karsinomu), (B) MG-63 (İnsan Kemik Karsinomu), (C) Saos-2 (İnsan Kemik Karsinomu).

2.2.2.1.7 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırılır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkanır ve 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılır. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklenir ve 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülür. Süpernatant uzaklaştırılır, pellet medyum ile çözülür ve flasklara ekim yapılır. Flasklar etiketlenir ve 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konulur.

2.2.2.1.8 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Tripan mavisi boyaması) ve Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1mm^2 alan, 0.1 mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre (Şekil 2.2) lamı kullanılır. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için $10\ \mu\text{l}$ hücre süspansiyonu eşit hacimde tripan mavi (1:1 dilasyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı olanlar boyanmazlar ve sayım yapılır.



Şekil 2.2 Hemositometre

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulunur.

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/ml} = \text{hemositometre sayım sonucu} \times 2 \times 10^4$$

2.2.2.1.9 Hücrelerin -80°C 'de Saklanması

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırılır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkanır ve $75\ \text{cm}^2$ flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılır. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklenir ve 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülür. Süpernatant

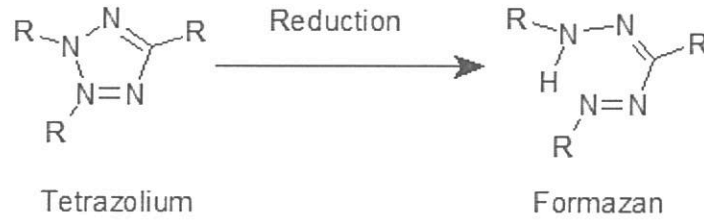
uzaklaştırılır, pellet % 10 DMSO içeren FCS ile dikkatlice çözülür ve soğuğa dayanıklı tüplerine konularak, etiketlenerek 80⁰C'deki dolaba konulur.

2.2.2.1.10 Sitotoksosite Deneylerinin Kurulması

75 cm² flaskta büyümekte olan hücreler yüzeyi %80 oranında kapladıklarında , içerisindeki medyum uzaklaştırılır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkanır ve 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA eklenir. 3-5 dakika CO₂ 'li inkübatörde inkübe edilir. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklenir. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülür. Supernatant uzaklaştırılır, pellet 10ml kadar medyum ile çözülür. Süspansiyondaki canlı hücre sayısını belirlemek için tripan mavi boyaması yapılır ve canlı hücre sayısı belirlenir. Hücre sayısı belirlendikten sonra, 96 kuyucuklu plaka için hücre sayısı 5000 hücre/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. 5000 hücre son hacim 200 µl olacak şekilde %10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisine ekilmiştir. Hücre uygulaması yapıldıktan sonra 1 gece bekletilmiştir. Ertesi sabah TNF- α , TGF- β ve VEGF₁₆₅ sitokinleri farklı dozlarda uygulanmıştır. Ayrıca 150 Mm CoCl₂ ile hipoksik ortam oluşturulmuştur. 1, 3, 24, 48 ve 72 saatlerde MTT testi yapılarak 550 nm de absorbanları alınmıştır.

2.2.2.1.11 MTT Testi

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksosite ölçümü için kullanılan ve kantitatif kolorometrik bir yöntem olan MTT metodu canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan MTT 'yi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim

Bu metoda göre istenilen inkübasyon periyodundan sonra (6, 24, 48 ve 72 saat) hücrelerin bulunduğu ortama, optimizasyon sonucu belirlenen son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde stok MTT solüsyonu eklenir ve 4 saat 37 °C, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırılır, 0.004 M HCl içeren isopropanol ile kristaller çözülür ve UV spektro okuyucu ile 550 nm dalga boyunda absorbans alınır.

2.2.3 RNA ile ilgili Teknikler

2.2.3.1 Hücre pelletlerinden RNA izolasyonu

%80-90 oranında doluluk görülen flasklardan hücreler tripsin EDTA ile kaldırdı. Tripan mavi ile hücre sayma işlemi bölüm 2.1.4.1.8 'de anlatıldığı gibi yapıldı. Her bir küçük flaska 2×10^6 hücre konuldu üzerine 5 ml %10 FCS içeren medyum konuldu. Hücrelerin yüzeye tutunması beklenildi. Ertesi gün %10 FCS içeren medium uzaklaştırıldı. % 0,1 BSA içeren DMEM ile serum açlığı oluşturuldu. Bir gece etüvde bekletilen hücelere ertesi gün son konsantrasyon 20 ng/ml olacak şekilde VEGF₁₆₅ sitokin eklendi. 1, 3, 6, 24, 48, ve 72 saatlerin sonunda her bir flasktan medyum uzaklaştırıldı. Tripsin ile hücreler yüzeyden kaldırdı. %10 FCS içeren medyum eklendi, herbir flask protein ve RNA değerlendirilmesi yapılabilmesi

için iki ayrı falkona ayrıldı. 1000g de 5 dakika santrifüj edilen hücrelerin üzerinden medyum uzaklaştırıldı ve -80 dondurucuya kaldırıldı. Pellet haline getirilerek RNA izolasyonları için -80 dondurucuda saklanan örnekler buz üzerinde dikkatlice çözüldü. Fermentas RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonları yapıldı. RNA örnekleri uzun dönemde -80 °C dondurucuda saklanmaktadır.

2.2.3.2 RNA Miktar Tayini

İzole edilen RNA'ların miktarları ve saflıklarının tayini için 260nm ve 280 nm'de absorbansları alınmıştır. Bu amaçla kuvartz küvetlere kör değer için 200 µl dH₂O, RNA ölçümleri için 195 µl dH₂O ve ilgili RNA konuldu. Elde edilen absorbans değerleri ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

$$\text{DNA miktarı} = A_{260} \times 40 \times 40 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

2.2.3.3 RNA Jel Elektroforezi

Jel dökülmeden önce tüm elektorforez tankı ve aparatları %5 lik SDS ile yıkandıktan sonra DEPC'li sudan geçirildi. Sonra etanol ile yıkandı ve kuru peçete ile kurulandı. 0,5 g agaroz, 5 ml 10XFA jel tampon ve 50 ml DEPC'li su mikrodalga fırında kaynatıldı. Üzerindeki buhar çıkması bittiğinde 900 µl formaldehit ve 1 µl etidyum bromür eklenerek kasete döküldü. Jelin donması beklendi. Tanka 1XFA jel tamponu dolduruldu. Kaset tanka yerleştirildi. 5 µl RNA örneği ve 3 µl 2X yükleme boyası 65 °C' de 5 dakika bekletildi. Örnekler soğutulduktan sonra kuyulara yüklendi.

2.2.3.4 cDNA Eldesi (RT –PZR)

Miktarları belirlenen RNA örneklerinden 1000 ng olacak şekilde RNA kalıbı kullanılarak RT-PZR yapıldı. RT-PZR aşağıdaki tabloya uygun olarak her deney grubu için yapıldı.

Tablo 2.5: RT –PZR tablosu

RNA kalıp	
Oligo dT	1 µL
Distile H ₂ O	
65 °C'de 5dk	
5X Reaksiyon Tamponu	4 µL
Ribolock Rnase inhibitör	0,5µL
dNTP Karışımı	2µL
Revers Transkriptaz	2µL
Son hacim	20µL
Yavaşça karıştır ve kısa süreli santrifüj yap	
42 °C'de 60 dk	
70 °C'de 5 dk	

2.2.3.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA eldesinden sonra CAIX, CAXII, human β-2 mikroglobilin için optimize edilen şartlarda PZR yapıldı.

Tablo 2.6: Human β -2 mikroglobülin PZR tablosu

β -2 mikroglobülin	Örnek	N.K.	P.K.
cDNA kalıp	1 μ L	-	1 μ L
Taq Buffer	5 μ L	5 μ L	5 μ L
MgCl ₂	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Forward primer	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Reverse Primer	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Taq polimeraz	0,5 μ L	0,5 μ L	0,5 μ L
dH ₂ O	39,5	39,5	39,5
Son hacim	50 μ L	50 μ L	50 μ L

2.2.3.5.1 Primer Tasarımı

CAIX ve CAXII primer tasarımı için www.restrictionmapper.org, www.ncbi.nlm.nih.gov ve www.idtdna.com adreslerinden yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, T_m sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Ayrıca tasarlanan primerler databanklarda (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB dizileri) bulunan DNA dizileri ile blast yapılarak CAIX ve CAXII geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 2.7 CAIX, CAXII ve insan β 2-mikroglobülin primerlerinin özellikleri

Primer	Uzunluk (bç)	Dizi	Ürün (bç)
CAIX-Forward	20	5'-TCT CAT CTG CAC AAG GAA CG-3'	349
CAIX-Reverse	20	5'-ACT TCA GCC GCT ACT TCC AA-3'	349
CAXII-forward	20	5'-AAG AAG TAC CCG TCG TGT GG-3'	369

CAXII-reverse	20	5'-GAG GCC TTC TGA CTT GTT GC-3'	369
H- β -2-forward	20	5'-TTT CTG GCC TGG AGG CTA TC -3'	370
H- β -2-reverse	21	5'-CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC-3'	370

2.2.4 Gerçek Zamanlı RT-PZR (Q-RT-PZR)

Bu çalışmalar Light Cycler 485 aleti kullanılarak gerçekleştirildi. 5 μ l Master karışımı, 1 μ l cDNA, 100ng/ μ l 'lik 0,5 μ l forward ve reverse primerler, 3 μ l distile H₂O konularak son hacim 10 μ l de tamamlandı. Her bir cDNA en az üç tekrarlı olmak üzere CAIX, CAXII ve insan β -2-Mikroglobülin genleri ile çalışıldı. β -2 Mikroglobülin geni normalizasyon için kullanılmıştır.

Tablo 2.8: Real Time-PZR döngü koşulları

Bölüm	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Ön ısıtma	1	95 °C	10 dakika
Çoğaltma	40	95 °C	10 saniye
		51 °C	10 saniye
		72 °C	10 saniye
Erime eğrisi	1	95 °C	5 saniye
		65 °C	1 dakika
		97 °C	-
Soğutma	1	40 °C	30 saniye

2.2.4.1 Sonuçların değerlendirilmesi

Real-Time PZR deney sonuçları Livak metoduna göre değerlendirilmiştir. CAIX ve CAXII için elde edilen Ct değerleri nin her biri insan β -2-Mikroglobülin geninin ortalamasından çıkarıldı. Elde edilen değer 2 tabanında kuvveti alındı. Deney sonuçları kontrol grubuna bölündü. 1'in katları şeklinde sonuçlar elde edildi.

Minitab (One Way Anova) ile istatistik değerlendirme yapıldı. $p \leq 0,05$ değerler anlamlı kabul edildi.

2.2.5 Western Blot alışmaları

2.2.6 Westernblot ve RNA İzolasyonları İçin Dondurulmuş Hücre Hazırlanması

RNA deneylerinin kurulması sırasında aynı popülasyondaki bir kısım hücre westernblot için kullanılabilir. Bunun için işlem basamakları şoyledir; 25cm²'lik flasktan medyum uzaklaştırılır. 5ml PBS ile iki kez yıkanır, 1mL tripsin EDTA eklendikten sonra 37C⁰'de etüvde 3 dk bekletildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları mikroskopta kontrol edildikten sonra %10 FCS içeren DMEM besiyerinden 6mL eklenerek, 4mL'si RNA izolasyonu için bir falkona ayrılır. Geriye kalan 2mL'si protein deneyleri için ependorf tüpe aktarılır. Her ikisi de 1000rpm'de 5 dk santrifüj edilerek st kısımda kalan medyum dikkatlice uzaklaştırılır. 1'er mL PBS eklenerek pellet dikkatlice yıkanır ve 1000rpm'de 5 dk santrifüj edildi. st kısımda kalan PBS uzaklaştırılır ve hücre pelletleri -80C'ye kaldırılır.

2.2.7 Westernblot İçin nceden Dondurulmuş Hücrelerden Total Hücre Estraktı Hazırlama

Hücre pelletleri dondurucudan çıkarıldıktan hemen sonra buz üzerine alınarak işlemlere başlanır. Yaklaşık 500.000 hücre olacak şekilde dondurulmuş hücreler kullanılır. Pelletin zerine 70 l buzda bekletilmiş soğuk Laemli tamponu eklendi. Pipet ile karıştırılarak hücrelerin lizis olması sağlanır. 1 dk süresince hücreler vortekslenir. 30dk buz üzerinde bekletilir. (Bu sırada çözünebilir proteinlerin birçoğu supernatana çıkacaktır.) 14000g'de 30 dk süresince santrifüj edildi. Supernatan alınarak protein için kullanılır. Pellet atılır.

2.2.8 Western Blot

Elektroforez aparatları ve cam levhalar su ve %70'lik etanol ile temizlendi. Ayırma ve yığıma jeli Tablo 2.9'da belirtilen şekilde hazırlanır.

Örneklerin yüklenmesi; protein ekstraksiyonu Laemli buffer ile yapıldığı zaman örnekler yalnız bromfenol mavisi ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenir. Protein ekstraksiyonu NP-40 tamponu ile yapıldığı zaman örnekler β -Merkaptoetanol içeren yükleme boyası ile karıştırılarak yüklenir. Tank 0.1 (w/v) SDS içeren 1X Yürütme Tamponu ile doldurularak (orta kısım ve alt kısım) 200 volt ve 126 mA akımda yaklaşık 45-50 dakika jelde örneklerin göç etmesi sağlanır.

Proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membran kullanılır. Kısaca; yığıma jeli kesilerek uzaklaştırılır ve jel transfer tamponu içine alınarak dengelenmesi için oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir. Whatman 3 MM kağıt ve PVDF membran (1dk metanolde aktive edilmiş) jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlanır. Bu sırada sünger pedler ve transfer aparatları da transfer tamponu içine alınır. Daha sonra transfer kaseti arasına sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger olacak şekilde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirilir. Kaset, transfer tamponu ile dolu olan blot tankına yerleştirilir ve 15 volt, 400 mA akımda 1 gece boyunca transferin gerçekleşmesi sağlanır.

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membran ilk olarak 20 ml bloklama çözeltisinde (%5 (w/v) yağsız süt tozu ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS) 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında çalkalanır. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez membran yıkanır, bunun için %0.1(v/v) Tween 20 içeren 1X TBS kullanılır. Sonra membran primer antikor ile 1-1.5 saat oda sıcaklığında ya da +4°C'de 1 gece horizontal çalkalayıcıda inkübe edikten sonra 5 dakikalık sürelerle %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS ile 3 kez yıkanır. Membran sekonder antikora alınarak 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Pierce ECL Western Blotting Substratı kullanılarak bantlar görüntülenir.

2.2.9 PVDF Membrandan Antikorların Ayrılması (Stripping)

PVDF membrandan antikorların ayrılması amacıyla membran % 0.05 Tween 20 içeren 1X TBS ile yıkanır. Stripping tamponundan (çizelge 2.9) 10ml eklenerek iki kez 15 dk boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak yıkandıktan sonra musluk suyunda durulanır. % 0.05 Tween 20 içeren 1X TBS ile yıkanır. Membran bu basamaktan sonra ECL substratı ile muamele edilerek kontrol edilir. % 0.05 Tween 20 içeren 1X TBS ile tekrar yıkanır ve bloklama tamponu (%5 yağsız süt tozu ve %0.05 Tween 20 içeren 1X TBS) eklenerek 1saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır. Yeni antikorlar tatbik edilir.

Tablo 2.9: Western blot çalışmalarında kullanılan tampon ve çözeltiler

Solüsyon	İçeriği
Laemli Tamponu	0.125 M Tris-HCl(pH: 6,8), %4 (w/v) SDS, %10 (v/v) Gliserol, %10 (v/v) β -Mercaptoetanol
Bromfenol Mavis Solusyonu	%0.05 (w/v) bromfenol mavi distile su içinde çözülerek hazırlandı.
SDS Page Alt Jel	1.5 M Tris-HCl (pH:8.8), %10 (w/v) SDS
SDS Page Üst Jel	1 M Tris-HCl (pH:6.8), %10 (w/v) SDS
SDS Page Yürütme Tampon Çözeltisi	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 (w/v) SDS
Western Blot Transfer Çözeltisi	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol
Otoklavlanmış 10X TBS (Tris Buffered Saline)	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH: 7.4
Yükleme Boyası	1,4 gr Tris 4 gr SDS ,20 gr Sükroz,4MG bromfenol mavis pH:6.8 de 100ml ye tamamlanarak hazırlanır.
Boyama Çözeltisi	0,25 g Coomassie Brilliant Blue 250 ,100ml%95'lik Etanol,%10 Asetik Asit

Stripping Tamponu	1M Glycine,%1 SDS ,pH:2,5
Film yıkama Tamponu	3,5 L su içine 1,25 L A solusyonu 125ml B solusyonu,125 ml C solusyonu eklenerek hazırlandı.
Fiksator Tampon	1,4 L su içine 500 ml A solusyonu ve 50 ml C solusyonu eklenerek hazırlandı.
Panceou Boyası	10 ml saf su içine 300 µl glasiyel asetik asit, 0,033 g Poncau boyası konuldu. Saf su ile 30 ml ye tamamlanarak hazırlandı.

Tablo 2.10: SDS-PAGE Ayırma ve yığma jeli bileşen miktar ve son konsantrasyonları

Jel İçeriği	%10 Ayırma Jeli	%5 Yığma Jeli
Yığma Jeli Tamponu	-	2,5 ml
Ayırma Jeli Tamponu	2,5 ml	-
Akrilamid:Bisakrilamid(37,5:1)	2,5 ml	1,25 ml
DdH ₂ O	5 ml	6,25 ml
%10(w/v) Amonyum PerSülfat	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

2.2.10 Akış Sitometri Analizleri

Bu metot 6 kuyucuklu plakalar ile uygulandı. Sitokin uygulamasından 24 saat önce hücreler 5×10^5 hücre/ kuyu olacak şekilde yayıldı. Belirlenen konsantrasyonlarda sitokinler ile inkübasyondan sonra medium uzaklaştırıldı ve PBS ile kuyular yıkandı. Bundan sonraki basamaklar buz üzerinde yapıldı.

2.2.11 Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması

Hücreler PBS içinde kazınarak ependorf içine alındı. 1000 rpm de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 2 kez %1 BSA içeren PBS ile yıkandı. 1:10 oranında dilüe edilmiş fikoeritrin işaretli monoclonal CAIX antikor (R&D system) ile 40 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Bağlanmamış antikorların ve kalıntıların uzaklaştırılması için 2 kez daha aynı şekilde yıkama yapıldı. Ve %1 Paraformaldehit solusyonu ile fiksasyonu yapıldı. Fikse edilmiş örnekler analiz edilmek üzere 5 ml lik tüplere transfer edildi.

2.3 Yolak İnhibisyon deneyleri

İnhibisyon deneylerinde kullanılan inhibitörler cycloheksimid, MEK-1 ve wortmanin'dir.

2.3.1 Deney Dizayını:

İlk gün hücreler sayılarak herbir küçük flask için 2.000.000 olacak şekilde hücreler flasklara konuldu. Sitokin deneyleri için DMEM+BSA'lı medyumda 1 gece bekletildi. Ertesi gün hücrelerde bir sorun olup olmadığı mikroskopta kontrol edildi ve daha sonra uygun konsantrasyonda inhibitör uygulandı. (Kullanılan inhibitöre göre Kontrol grubu DMSO veya su) 1 saat beklendi. 1 saat sonunda uygun konsantrasyonda sitokin uygulandı. 6 saat beklendi. 6 saat sonunda medyum uzaklaştırıldı. Herbir flaska 2 ml Tripsin EDTA eklendi. 3 dakika etüvde bekletildi. Üzerine %10 FCS içeren DMEM medyumdan 6 ml konuldu. Protein ve RNA analizi için 2 ayrı falkona konulup çökürülür. Üsteki süpernatant dökülür. Hücre pelletleri, RNA ve protein için ayrılmış olarak -80°C'e kaldırıldı.

2.3.2 Kullanılan inhibitörler

2.3.2.1 Sikloheksimid

Protein sentezi inhibitörüdür. 1g olarak satın alınan cycloheksimid'den 0.01gr tartıldı ve 1mL suda çözüldü. Daha sonra ependorflara bölünerek -20⁰C'de doku kültürü buz dolabına konuldu. Ana stok 1mg/ml olarak hazırlanmış oldu. Çalışma son konsantrasyonu küçük flasklar için 10µg/ml olarak belirlendi.

$$10.000 \mu\text{g/ml} \cdot x = 10\mu\text{g/ml} \cdot 5000\mu\text{l}$$

x = 5 µl ana stoktan alınarak uygulandı.

2.3.2.2 MEK 1

Protein kinazları inhibe eden bir kimyasaldır. Protein sentezini inhibe eder. 1,5 mg olarak satın alınan MEK1 280 µL DMSO içerisinde çözüldü. Daha sonra ependorflara bölünerek -20⁰C'de doku kültürü buz dolabına konuldu. Ana stok 20 mM olarak hazırlanmış oldu. Çalışma son konsantrasyonu küçük flasklar için 10 µM olarak belirlendi.

$$20.000 \mu\text{M} \cdot x = 10 \mu\text{M} \cdot 5000 \mu\text{l}$$

x= 2,5 µl ana stoktan alınarak uygulandı.

2.3.2.3 Wortmanin:

Yaygın olarak kullanılan Fosfoinositid 3-kinaz (PI3Ks) inhibitörüdür.1 mg Wortmanin 1160 µL DMSO içerisinde çözüldü. Daha sonra ependorflara bölünerek -20⁰C'de doku kültürü buz dolabına konuldu. Ana stok 2mM olarak hazırlanmış oldu. Çalışma son konsantrasyonu küçük flasklar için 1µM olarak belirlendi.

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 1 \mu\text{M} \cdot 5000 \mu\text{l}$$

x = 2,5 µl ana stoktan alınarak uygulandı.

2.3.2.4 SP600125

Hücrelerde doza bağlı c-JUN fosforilasyonunu inhibe eder.inflamatuar genlerin (IL-2, COX-2, TNF- α , IFN- γ) ekspresyonunu bloke eden bir inhibitördür. JNK-1,-2, and -3 inhibitor ü olarak kullanılır.

2.4 İmmunflorasan Boyama Çalışmaları

Hücreler her bir kuyucukta 125.000 hücre olacak şekilde 24'lük kuyucuklu plakalarda ekildi. Ekimden önce her bir kuyucuğa 1 tane yuvarlak lamel konuldu. Hücreler flaskta %80-90 doluluk olana kadar büyütüldü. Son konsantrasyon 20 ng/ml olacak şekilde VEGF₁₆₅ eklendi ve 6 saat beklendi. Üzerlerindeki medyum döküldü, hücrelerin üzerine PBS içerisinde çözülmüş %4 paraformaldehid 150 μ l miktarda zemini kaplayacak şekilde eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika hücreler fikse edildi. Bu şekilde fiksasyon işlemi tamamlandı. Fiksatif uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir plate 3 kez PBS ile yıkandı. Spesifik bağlanmaları engellemek için %1 BSA içeren medyumda 1 saat beklendi. Daha sonraki basamakta PBS ile 5 dakika yıkandı. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve primer antikor eklendi. (Primer antikor 1/100 oranında %1 BSA içeren serum ile sulandırıldı). 60 dk +4⁰C de inkübe edildi. İşlem humid chamber de yapıldı. Daha sonra 3 kez PBS ile 5 er dakika yıkandı. Bundan sonraki basamaklara karanlıkta devam edildi. İmmun floresan boya içeren anti rabbit sekonder antikor 1/100 oranında %1 BSA lı medyumda hazırlandı. 1 saat sekonder antikorda bekletildi. Uygulamanın sonunda 3 kez PBS ile 5 dakika yıkandı. Sekonder antikor ortamdan uzaklaştırıldı. Tekrar PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Tüm kuyucuklara 0.5mg/ml DAPI (4-6 diamino-2-phenylindole) eklendi. Dışarda bir lam hazırlandı, lamın üzerine 1 damla %30 gliserol eklendi. DAPI hücrelerin çekirdeğini boyama amacıyla kullanılmıştır. Lameller kapatma solusyonu damlatılmış lam üzerine ters kapatıldı. Preperat ilgili sekonder antikora uygun dalga boylarında floresan mikroskobunda görüntülendi.

3. BULGULAR

3.1 VEGF, TNF- α ve TGF- β sitokinlerinin normal oksijen ve hipoksik koşullar altındaki Hep3B hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

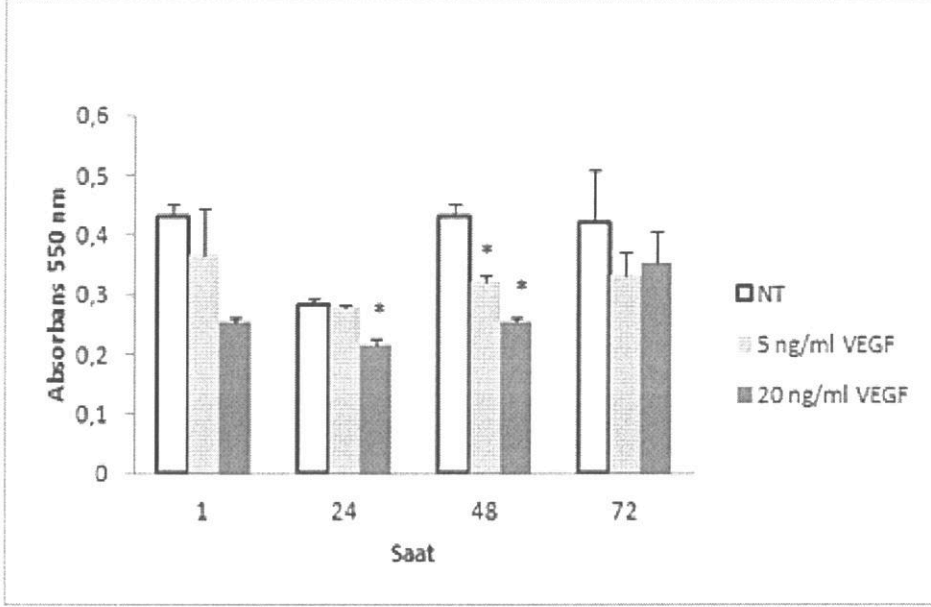
Sitokinler hücreler üzerinde pleiotropik etkiye sahip protein yapısındaki hücreler arası iletişim molekülleridir. Çalışmamızda VEGF₁₆₅, TNF- α ve TGF- β sitokinlerinin normal oksijen ve hipoksik koşullar altındaki Hep3B hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için MTT testi kullanılmıştır.

Başta VEGF₁₆₅ olmak üzere, farklı sitokinlerin hücreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 2.2.3.10'de belirtilen şekilde Hep3B hücrelerine uygulama yapılmıştır. Çalışmada doza bağımlı cevabın olup olmadığını görmek için iki farklı sitokin dozu kullanılmıştır. Hem hipoksi hem de normoksik koşullarda VEGF₁₆₅, 5 ng/ml ve 20 ng/ml olarak, TNF- α 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml olarak ve TGF- β 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml olarak Hep3B hücrelerine eklenmiştir. Hipoksik koşullar için ayrıca CoCl₂ eklenmiştir. CoCl₂ kimyasal uyarılmış hipoksi modeli son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir hipoksi modelidir. Sistemde CoCl₂ prolin hidrosilazları spesifik olarak inhibe eder. Böylece Hif1 α 'nın ekspresyonu hücrede artar. Hücrede hipoksik ortam oluşur [87].

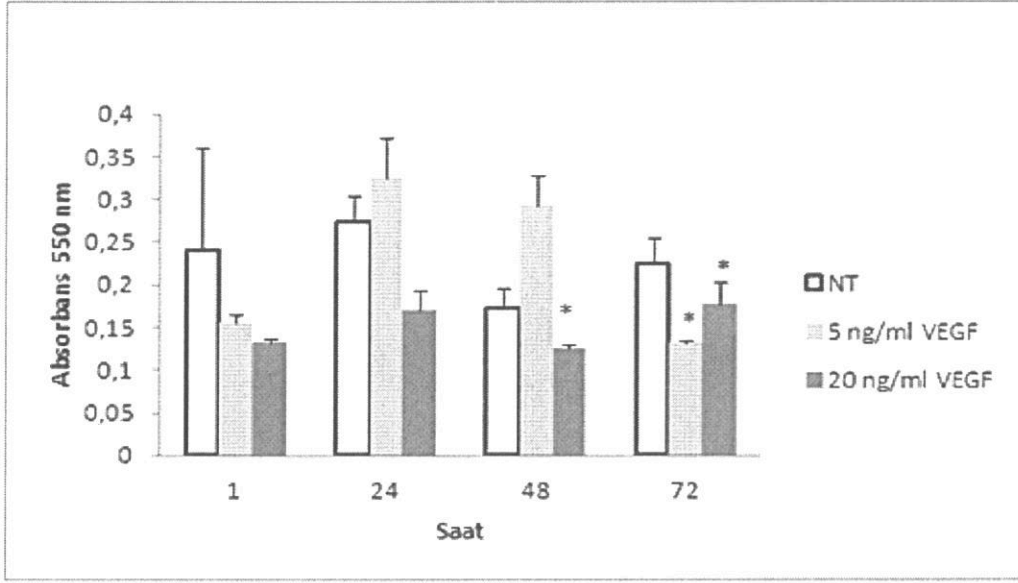
İki farklı sitokin konsantrasyonu 1 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat zaman aralıklarında uygulanarak, her zaman aralığının sonunda MTT testi uygulanmıştır. 550 nm'de alınan absorbanslara göre grafikler oluşturulmuştur. Sonuçların ortalamaları, standart sapmaları alınmış ve Mini Tab, One Way analizi kullanılarak kontrol hücreleri ile karşılaştırılarak $p \leq 0,05$ altındaki değerler anlamlı kabul edilmiştir.

Hücre canlılığı üzerine yapılan ilk deney VEGF₁₆₅ sitokini ile olmuştur. Normoksik koşullarda VEGF₁₆₅ uygulaması ile 1 ve 72 saatlerde herhangi bir etki görülmemişken 24 saatte 20 ng/ml dozunda ve 48 saatte hem 5 ng/ml ve 20 ng/ml VEGF₁₆₅ dozunda anlamlı azalış gözlenmiştir (Şekil 3.1). Hipoksi koşullarında ise 48

saatte 20 ng/ml dozunda, 72 saatte de hem 5 ng/ml ve 20 ng/ml VEGF₁₆₅ dozunda anlamlı azalış gözlenmiştir (Şekil 3.2).

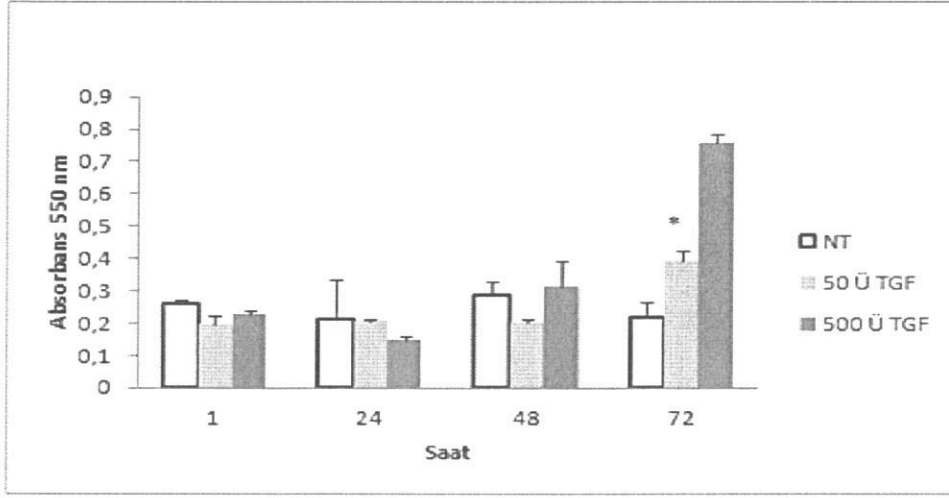


Şekil 3.1: 1, 24, 48 ve 72 saat zaman ve 2 farklı konsantrasyonda normoksik koşullarda, 5 ng/ml ve 20 ng/ml VEGF₁₆₅ uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri. NT, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücrelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir. * İstatistiki analizler sonucu anlamlı görülen yani $p \leq 0,05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.

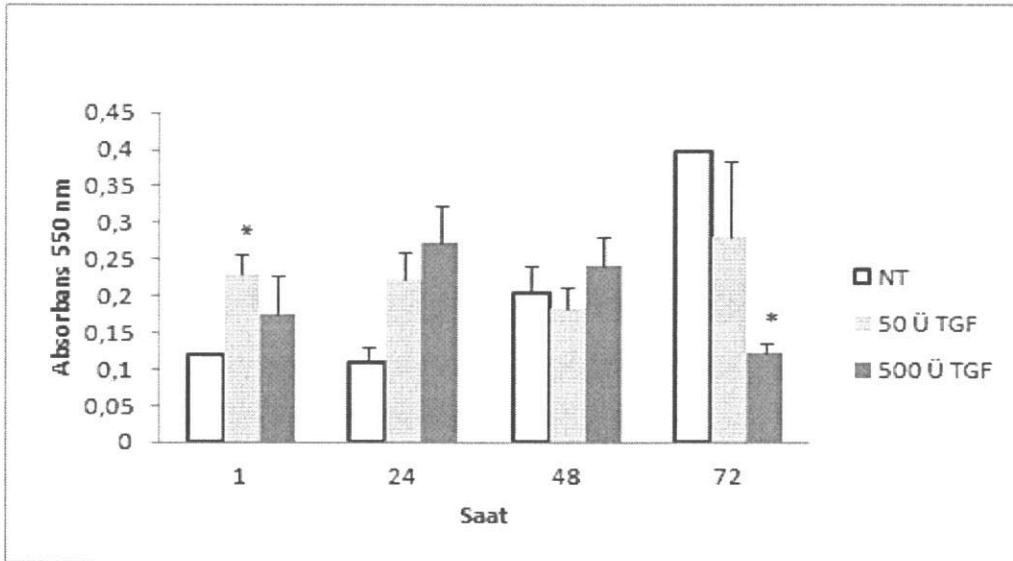


Şekil 3.2: 1, 24, 48, 72 saat zaman aralıkları ve 2 farklı konsantrasyonda hipoksik koşullarda, 5 ng/ml ve 20 ng/ml, VEGF₁₆₅ uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri. NT, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir.* İstatistiki analizler sonucu anlamlı görülen yani $p \leq 0,05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.

Hücre canlılığı üzerine yapılan ikinci deney TGF β sitokini ile olmuştur. Şekil 3.3.' de normoksik koşullarda TGF- β uygulaması ile 1 saat, 24 saat ve 48 saatlerde herhangi bir etki görülmemişken 72 saatte 50 Ü/ml dozunda anlamlı artış gözlenmiştir. Şekil 3.4.'te hipoksik koşullarda ise 1 saat 50 Ü/ml dozunda ve 72 saat 500 Ü/ml dozunda anlamlı artış gözlenmiştir.

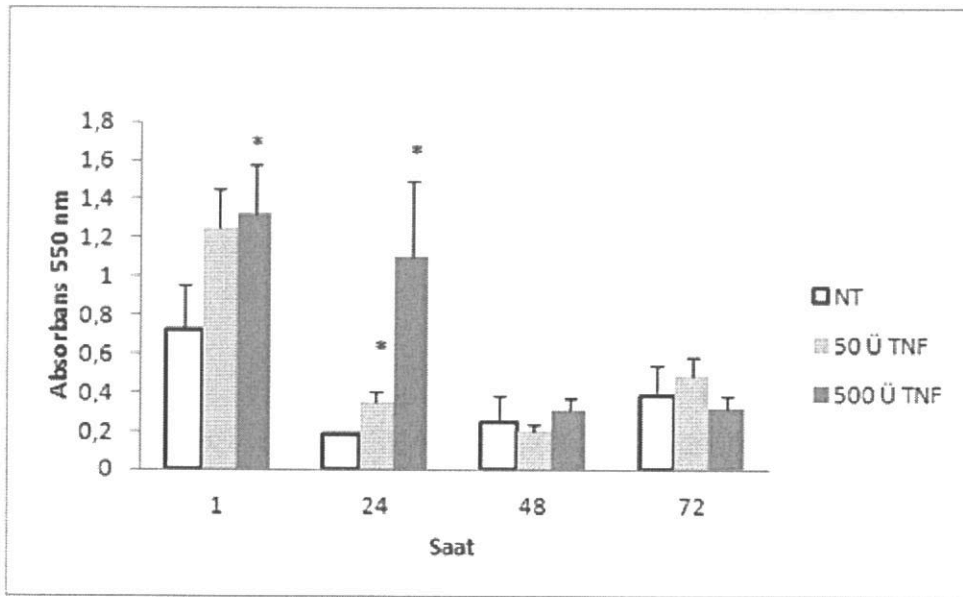


Şekil 3.3: 1, 24, 48, 72 saat 2 farklı konsantrasyonda normoksik koşullarda, 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml TGF- β uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri. NT, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir.* İstatistiki analizler sonucu anlamlı görülen yani $p \leq 0,05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.

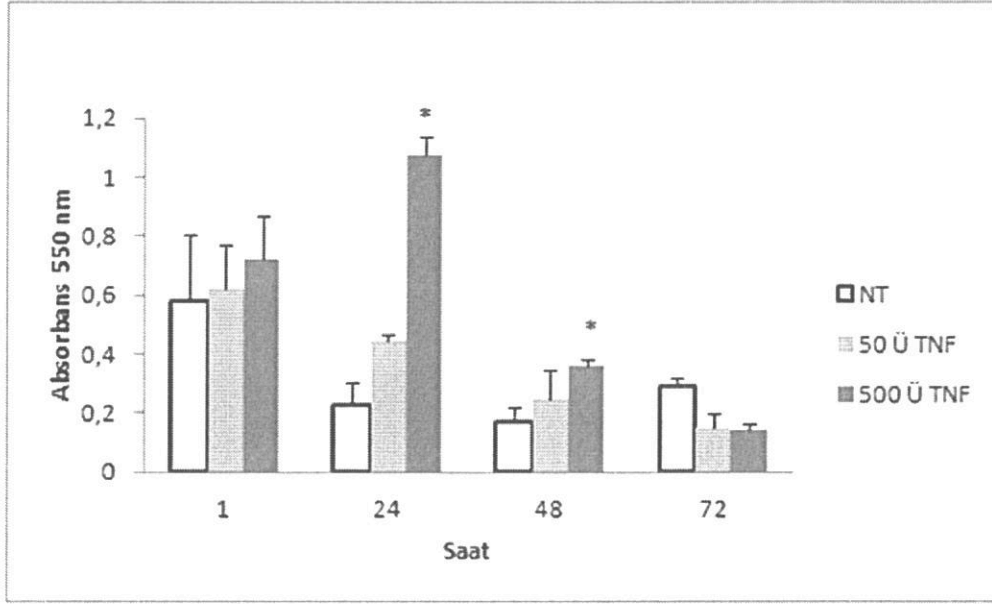


Şekil 3.4: 1, 24, 48, 72 saat 2 farklı konsantrasyonda hipoksik koşullarda, 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml TGF β uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri. NT, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir.* İstatistiki analizler sonucu anlamlı görülen yani $p \leq 0,05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.

Şekil 3.5 'de normoksik koşullarda Hep3B hücre hattında 48 saat ve 72 saatlerde kontrol grubuna göre herhangi bir etki görülmezken, 24 saatte 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml dozlarda proliferasyonda artış görülmüştür. Şekil 3.6'da hipoksik koşullarda da 24 saatte normoksik koşullardaki gibi bir etki gözlenirken, 48saatte 500Ü/ml TNF- α uygulanmasında da hücre proliferasyonunda anlamlı artış gözlenmiştir. 72 saatte ise 500Ü/ml TNF- α uygulaması hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalışa sebep olmuştur.



Şekil 3.5: 1, 24, 48, 72 saat 2 farklı konsantrasyonda normoksik koşullarda, 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml TNF α uygulanmış insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri. NT, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücrelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir. * İstatistiki analizler sonucu anlamlı görülen yani $p \leq 0,05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.



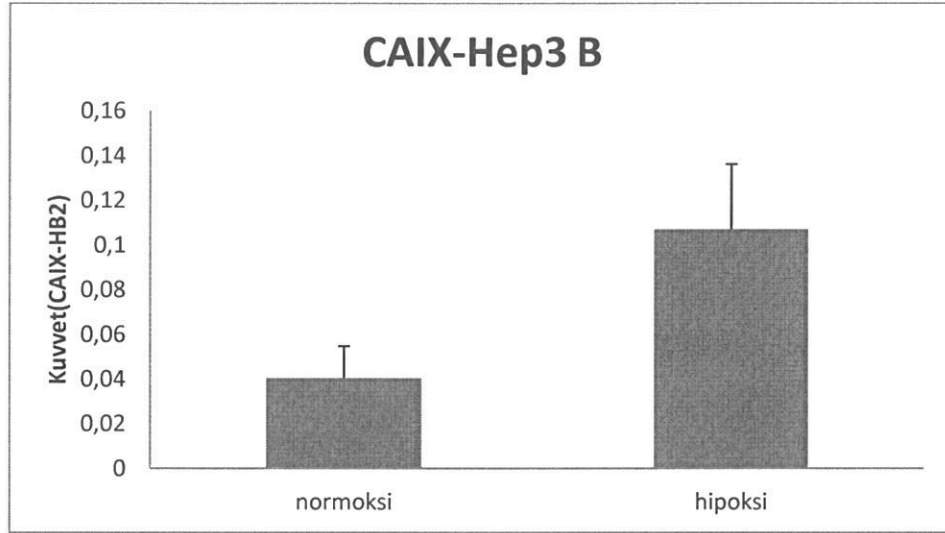
Şekil 3.6: 1, 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve 2 farklı konsantrasyonda hipoksik koşullarda, 50 Ü/ml ve 500 Ü/ml TNFα uygulanan insan karaciğer kanseri modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri. NT, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücrelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir.* İstatistikî analizler sonucu anlamlı görülen yani $p \leq 0,05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.

3.2 Hep3B hücrelerinde membran bağlı ve tümör ilgili CAIX ve CAXII mRNA seviyelerinin normal oksijen ve hipoksik koşullar altında karşılaştırılması

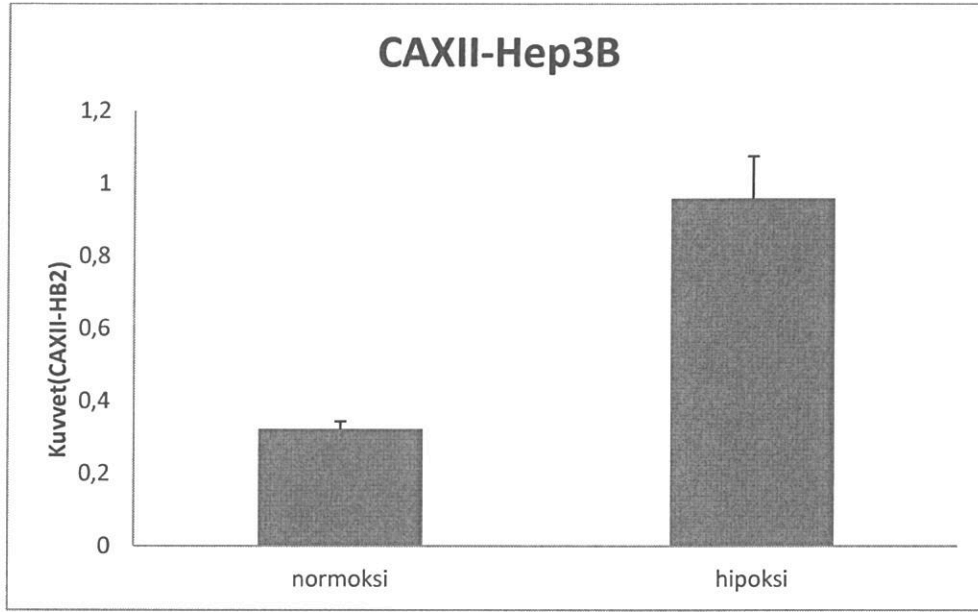
CAIX ve CAXII proteinlerinin her ikisi de membran bağlı olarak çalıştığı ve tümör durumunda arttığı rapor edilmiştir. Halbuki bu proteinlerin aynı hücre tipinde ve normal ve hipoksik koşullar altında ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması ile herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle ilk olarak Hep3B hücrelerinde 25cm² lik flasklarda 2 milyon hücre konularak 24 saat sonra bir flask normal oksijen koşullarında devam edilmiş ve diğer flask 150 µM CoCl₂ uygulaması ile hipoksik ortam oluşturulmuştur. 1 saat, 3

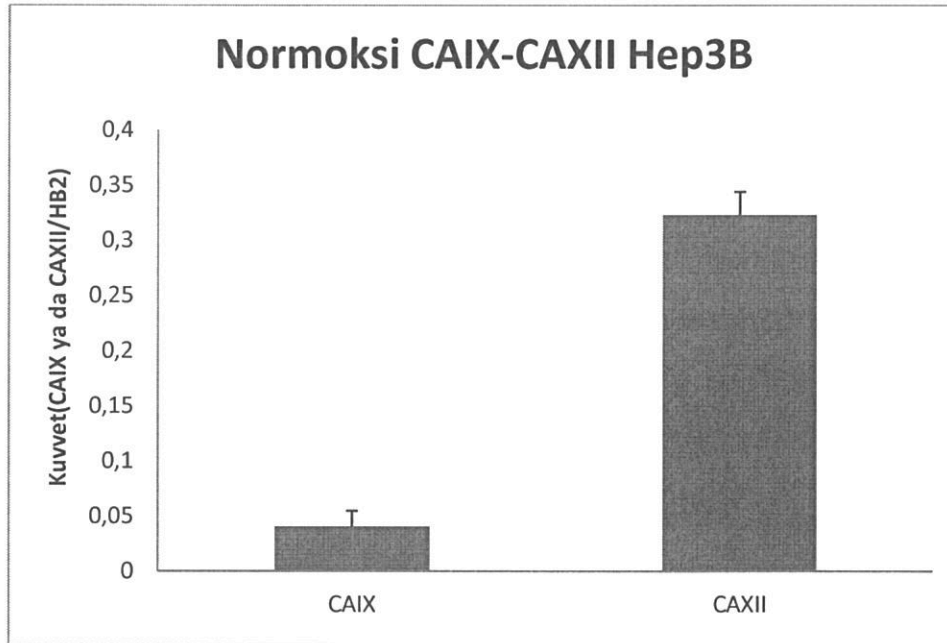
saat, 6 saat ve 24 saat sonrası hücreler alınarak Bölüm 2.2.3.1'de anlatıldığı üzere RNA izolasyonu yapılmıştır. Bölüm 2.2.3.2'de belirtildiği şekilde RNA miktarı ölçüldü. Bölüm 2.2.3.4'te anlatıldığı şekilde RT-PCR gerçekleştirildi ve cDNA'lar yapıldı. cDNA'ların çalışıp çalışmadığı klasik PZR ile bakıldı. Real time PCR sonucunda elde edilen cT değerleri Bölüm 2.2.4.1'de anlatıldığı şekilde değerlendirilmiştir. CAIX ve CAXII mRNA'ları normoksi ve hipoksi koşullar altında durumu değerlendirilmiştir. Buna göre CAIX ve CAXII mRNA'larının hipoksik koşullar altında transkripsiyonel olarak regüle olduğu anlaşılmıştır (Şekil 3.7. ve Şekil 3.8.).



Şekil 3.7: Hep3B hücre hattında normoksi ve hipoksi koşullarında CAIX mRNA seviyesinin karşılaştırılması.



Şekil 3.8: Hep3B hücre hattında normoksi ve hipoksi koşullarında CAXII mRNA seviyesinin karşılaştırılması.

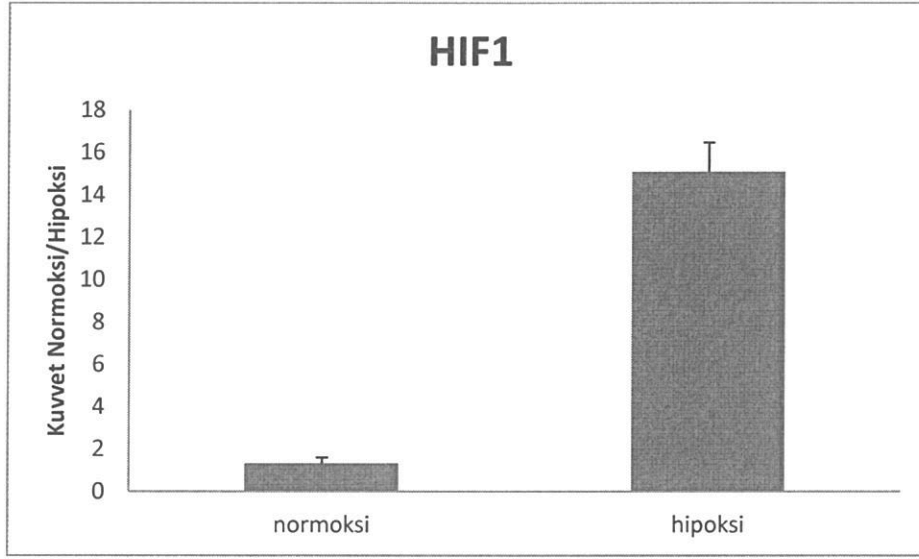


Şekil 3.9: Normoksi koşullarında CAIX ve CAXII mRNA seviyelerinin karşılaştırılması.

İkinci olarak CAIX ve CAXII mRNA'larının miktarlarına bakıldığında CAXII mRNA seviyesinin Hep3B hücrelerinde daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 3.9).

3.2.1 Hipoksi ve normoksi koşullarında HIF1 in mRNA seviyesinin belirlenmesi

Hep3B hücreleri Bölüm 2.2.2.1.6 belirtildiği üzere büyütüldü. 2 milyon hücre olacak tarzda küçük flasklara hücreler 24 saat öncesinden konuldu. Hipoksi koşulları son konsantrasyon 150 μ M olacak tarzda CoCl_2 uygulanarak sağlandı. Deneylere normal oksijen koşulları da dahil edildi. Farklı zaman aralıklarında 1 saat, 3 saat, 6 saat ve 24 saatte hücreler flasklardan kaldırıldı. Bölüm 2.2.3.1'de anlatıldığı şekilde hücre pelletlerinden RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 2.2.3.2'de belirtildiği gibi RNA miktar tayini yapıldı. RT-PZR ile cDNA'lar yapıldı. cDNA'ların çalışıp çalışmadığı klasik PZR ile bakıldı. Çalışan cDNAlardan HIF1 primerleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR deneyi kuruldu. qRT-PZR çalışmaları üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Sonuçlar Bölüm 2.2.4.1 de anlatıldığı şekilde Livak metoduna göre değerlendirildi. İstatistik analiz için Mini Tab (One Way ANOVA) program kullanıldı. Buna göre $p \leq 0,05$ olan değerler istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

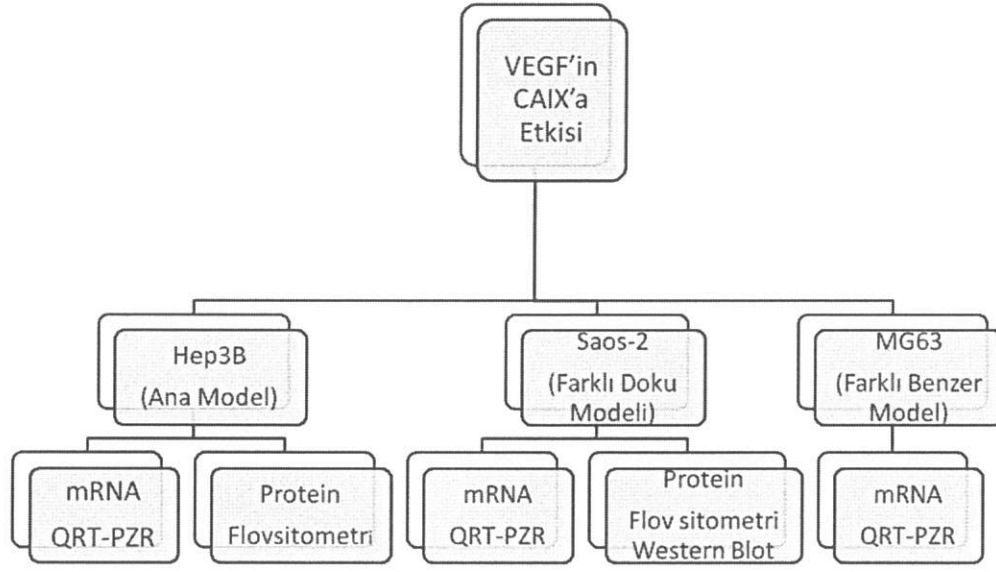


Şekil 3.10: HIF'in hipoksi ve normoksi koşullar altında mRNAseviyesinin karşılaştırılması.

Yaptığımız çalışmada kimyasal olarak 150 μ M CoCl₂ ile oluşturulan kimyasal hipoksi ile HIF1 seviyesinde anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 3.10).

3.3. Anjiogenez ilgili VEGF₁₆₅ sitokinin CAIX ekspresyonuna etkilerinin belirlenmesi

VEGF₁₆₅ sitokinin CAIX geninin regülasyonunda etkisi başlıca modelimiz olan Hep3B hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. VEGF₁₆₅ sitokini 1 saat, 3 saat, 6 saat ve 24 saat zaman aralıklarında Hep3B hücrelerine muamele edilerek mRNA seviyeleri gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. Benzer etkinin benzer görev yaptığı düşünülen CAXII mRNA seviyesine bakılarak da kontrol edilmiştir. Ayrıca protein düzeyindeki etki akış sitometri analizi yapılarak belirlenmiştir. Etkinin belirlenmesinden sonra bu etkinin He3B'ye spesifik olup olmadığı farklı bir hücre modeli olan Saos-2 ve MG-63 hücrelerinde belirlenmiştir. Hem CAIX ve hemde CAXII mRNA seviyelerinde etkinin belirlenmesinden sonra CAIX protein seviyesi akış sitometrisi ve Western blot ile belirlenmiştir. Deney basamakları Şekil 3.11'da gösterilmiştir.



Şekil 3.11: Yapılan deneylerin akış diyagramı.

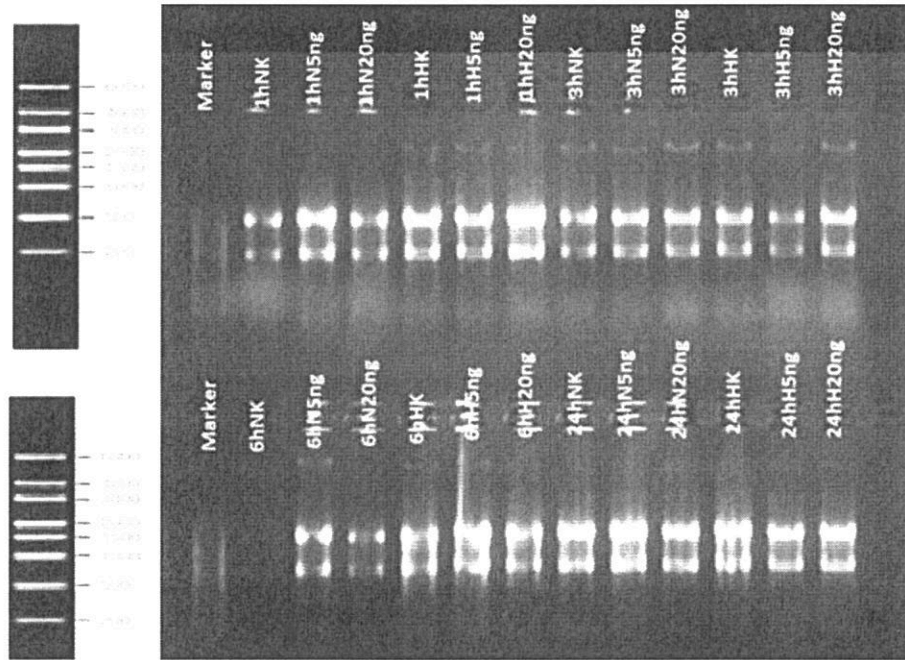
3.3.1. VEGF₁₆₅ sitokinin Hep3B hücrelerinde CAIX gen ifadesine etkilerinin belirlenmesi

Hep3B hücreleri Bölüm 2.2.2.1.6 belirtildiği üzere büyütülmüştür. 2 milyon hücre olacak tarzda küçük flasklara hücreler 24 saat öncesinden konuldu. Hipoksi koşulları son konsantrasyon 150 μ M olacak tarzda CoCl₂ uygulanarak sağlandı. Aynı zamanda deneylere normal oksijen koşulları da dahil edildi. Hep3B hücrelerinde hipoksi ve normoksi koşullarında sitokin uygulaması oluşturuldu. Hep3B hücrelerinde son konsantrasyon 20 ng/ml VEGF₁₆₅ uygulanması gerçekleştirildi. Hep3B hücrelerine VEGF₁₆₅ sitokini farklı zaman aralıklarında (1saat, 3 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat) aralıklarında uygulanmış ve CAIX ve CAXII ekspresyon seviyelerine etkileri analiz edilmiştir.

RNA izolasyonu Bölüm 2.2.3.1'da belirtildiği üzere gerçekleştirildi. RNA'ların kalitesi RNA jeli kullanılarak kontrol edildi. Bunun için Bölüm 2.2.3.3'te belirtildiği üzere RNA jeli hazırlandı. Şekil 3.12 elde edilen RNA'ların durumunu

göstermektedir. RNA'ların konsantrasyonu Bölüm 2.2.3.2 belirtildiği üzere belirlenmiştir. Revers transkripsiyon reaksiyonu Bölüm 2.2.3.4.'te anlatıldığı üzere 1000 ng RNA olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'ların validasyonu için klasik RT-PZR insan β -mikroglobulin primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnsan β -mikroglobulin primerleri aynı zamanda gerçek zamanlı PZR reaksiyonunda normalizasyon amaçlı kullanılmıştır. RT-PCR ve real time PCR'da kullanılan primer bilgileri Tablo 2.7'de belirtilmektedir. Primerler birbirini takip eden farklı ekzonlardan oluşturulmuştur. Tabloda primer dizileri ve son ürün büyüklükleri görülmektedir.

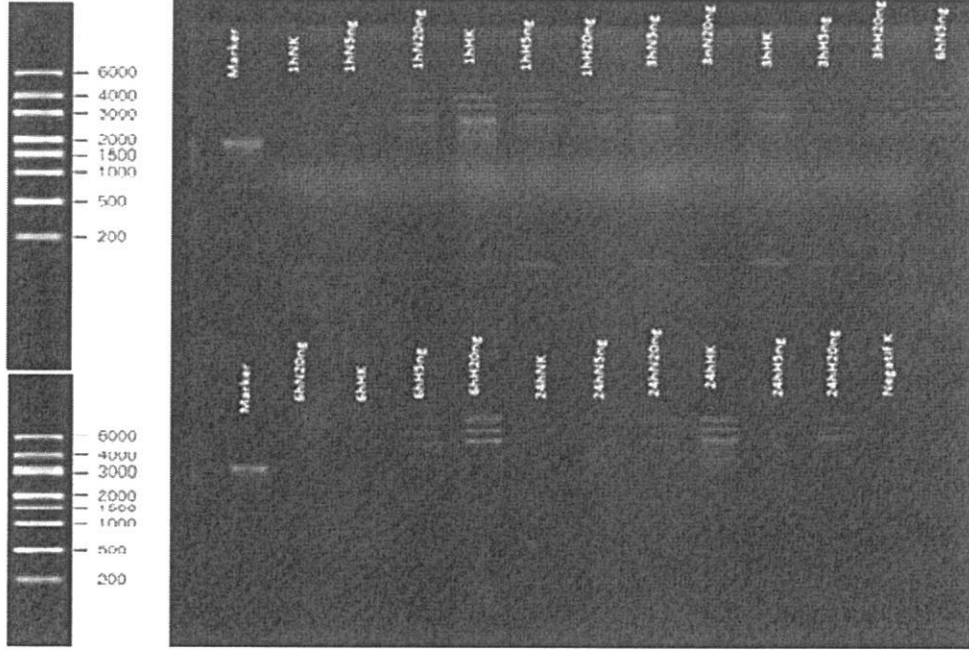
Klasik PZR reaksiyonu Bölüm 2.2.3.5'te belirtildiği üzere 2 mM MgCl₂, 1 μ l cDNA kullanılarak son hacim 50 μ l olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları Tablo 2.5'te belirtilmiştir.



Şekil 3.12: RNA jel Elektroforezi.

RT-PZR ürünlerinden 5 μ l % 2'lik jel elektroforezinde yürütülerek PZR sonucu değerlendirilmiştir. Jel elektroforezi Bölüm 2.2.1.1 belirtildiği üzere

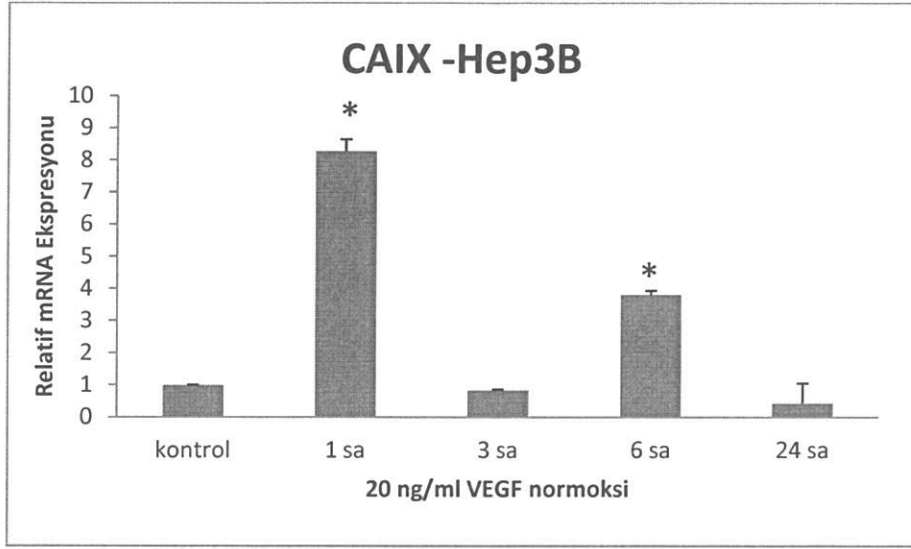
gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.13). Buna göre cDNA'ların çalışır olduğu tespit edilmiştir. Çalışmayan kuyularda tekrar cDNA sentezi yapılarak tekrar cDNA'ların kaliteleri kontrol edilmiştir.



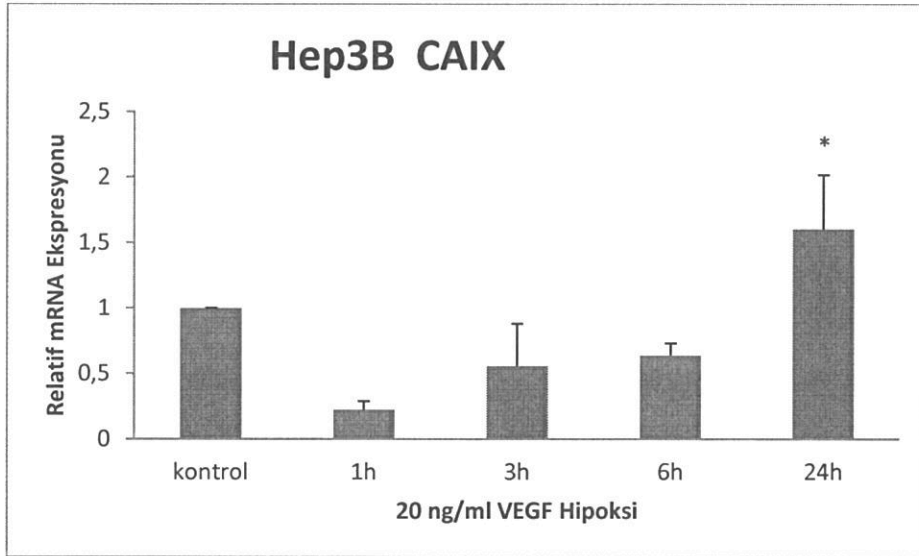
Şekil 3.13: Yapılan cDNA'ların insan β -2 mikroglobülin primerleri ile klasik PZR sonucu jel elektroforez görüntüsü.

Kontrolü sağlanan ve çalıştığı anlaşılan cDNA'lar realtime PZR reaksiyonları üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Normalizasyon amaçlı insan β -mikroglobulin primerleri de her reaksiyon için ikili olarak çalışıldı. Elde edilen Ct değerleri kullanılarak delta Ct değerleri hesaplanarak mRNA analizleri gerçekleştirildi.

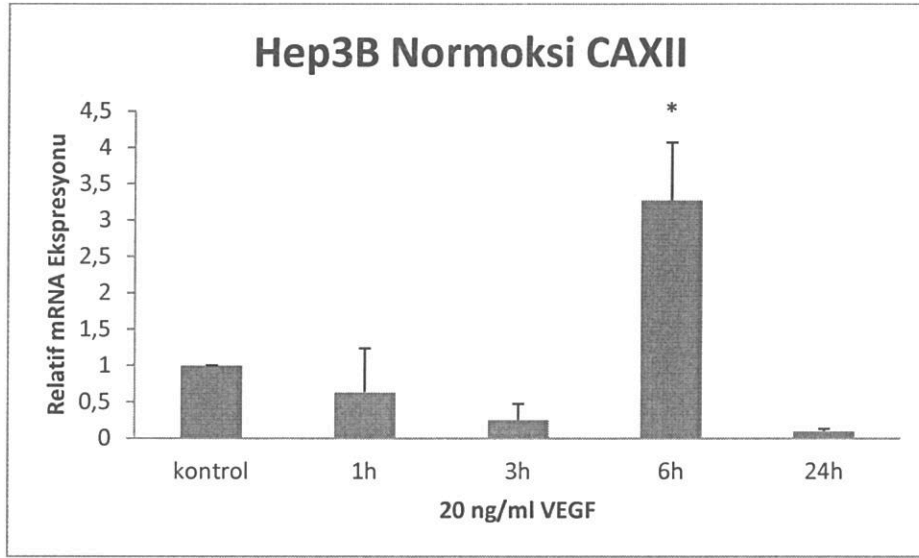
Öncelikli olarak 20 ng/ml VEGF₁₆₅ CAIX mRNA üzerinde Hep3B hücrelerinde etkileri değerlendirilmiştir. Hep3B hücrelerine normoksik koşullarda VEGF₁₆₅ sitokini 1 saat, 3 saat, 6 saat ve 24 saat zaman aralıklarında uygulanmış ve CAIX ekspresyon seviyelerine etkileri analiz edilmiştir. VEGF₁₆₅ sitokini 1 saat, 6 saat ve 24 saatte kontrol grubuna göre CAIX mRNA seviyesinde anlamlı artma bulunmuştur(Şekil 3.14). Hep3B hücre hattına hipoksik koşullarda VEGF₁₆₅ uygulandığında özellikle 24 saatte CAIX mRNA seviyesinde artış gözlenmiştir(Şekil 3.15).



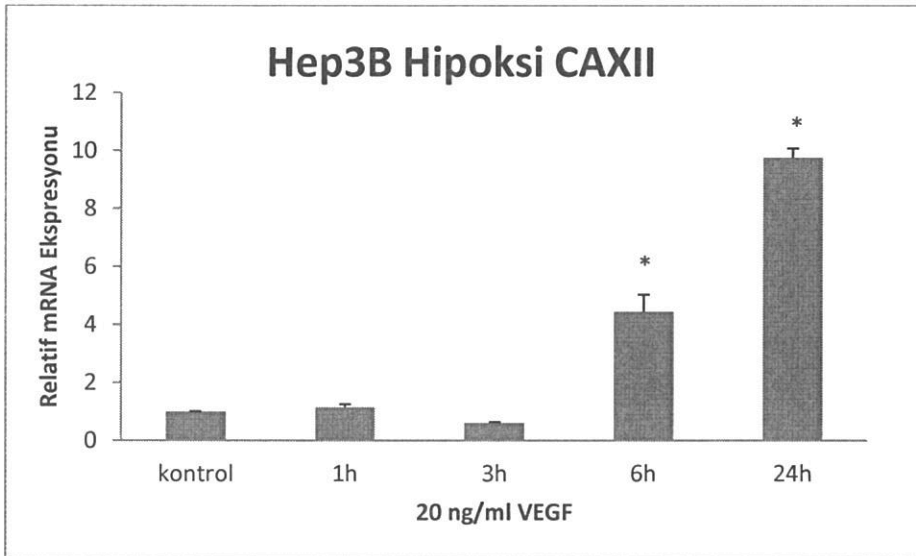
Şekil 3.14: Hep3B hücre hattında normoksi koşullarında VEGF₁₆₅ sitokininin 1, 3, 6 ve 24 saatlik zaman aralıklarında CAIX ekspresyonuna etkisi ($p \leq 0,05$)



Şekil 3.15: Hep3B hücre hattında hipoksi koşullarında VEGF₁₆₅ sitokininin 1, 3, 6, 24 saatlik zaman aralıklarında CAIX ekspresyonuna etkisi ($p \leq 0,05$).



Şekil 3.16: Hep3B hücre hattında normoksi koşullarında VEGF₁₆₅ sitokininin 1, 3, 6 ve 24 saatlik zaman aralıklarında CAXII ekspresyonuna etkisi ($p \leq 0,05$).



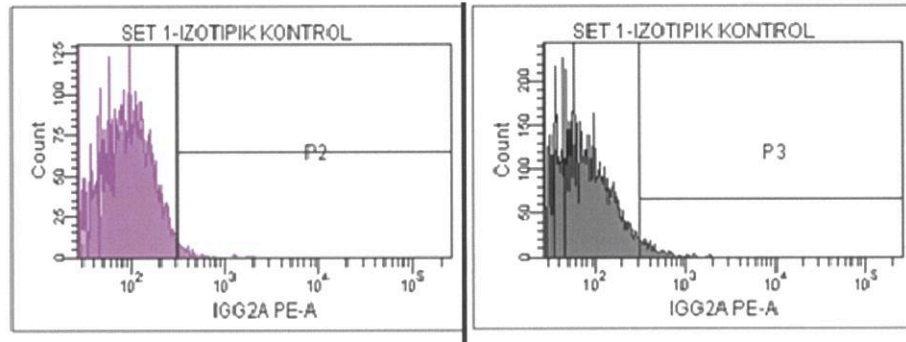
Şekil 3.17: Hep3B hücre hattında hipoksi koşullarında VEGF₁₆₅ sitokininin 1, 3, 6 ve 24 saatlik zaman aralıklarında CAXII ekspresyonuna etkisi ($p \leq 0,05$)

Hep3B hücre hattına VEGF₁₆₅ sitokini uygulandıktan sonra hipoksi ve normoksi durumunda CAIX mRNA seviyelerine bakıldığında; CAXII mRNA seviyelerinde özellikle 6 saatte normoksidede anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 3.16).

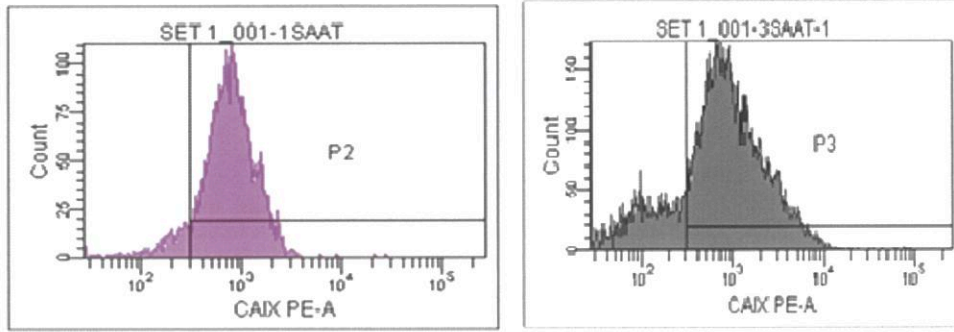
Hipoksik koşullarda normoksik koşullara paralel olarak CAXII mRNA seviyesine bakıldığında 6 ve 24 saatte anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil.3.17).

3.3.2. Hep3B Hücre Hattında VEGF₁₆₅ sitokininin CAIX protein düzeyine etkisinin Akış sitometri DeneYleri ile belirlenmesi

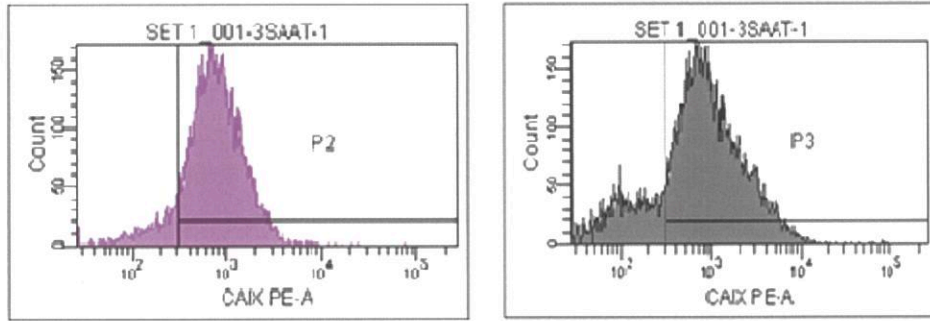
VEGF₁₆₅ uygulmasının membrana bağlı olarak bulunan CAIX protein seviyesine etkileri akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Çalışmada bölüm 2.2.10'da anlatıldığı üzere 20ng/ml VEGF₁₆₅ uygulaması yapılmış ve 3 zaman aralığında 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Hep3B hücreleri, fikoeritritin-etiketli monoklonal CAIX antikoru ile işaretlenerek, CAIX protein seviyesindeki değişim akış sitometri ile analiz edildi. Akış sitometri analizleri Gülhane Askeri Tıp Fakóltesi İmmunoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sitokin uygulaması yapılmamış olan kontrol grubu deneye dahil edilmiştir (Şekil 3.18). 20 ng/ml VEGF₁₆₅ uygulanmış hücrelerdeki CAIX protein seviyesi ile karşılaştırılmıştır (Şekil 3. 19, Şekil 3. 20, Şekil 3. 21).



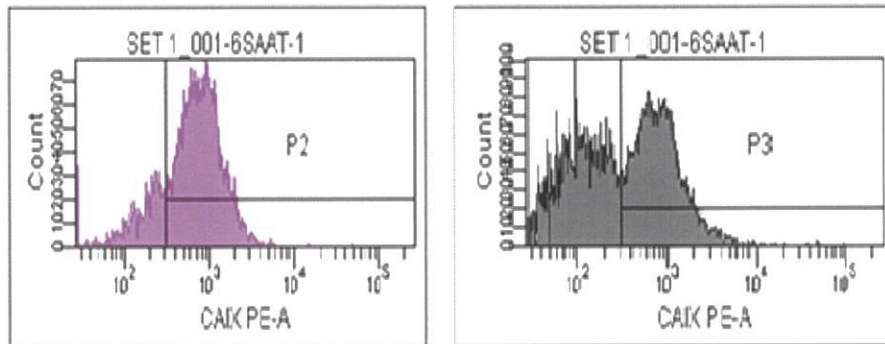
Şekil 3.18: Akış sitometri Hep3B hücre hattı kontrol grupları



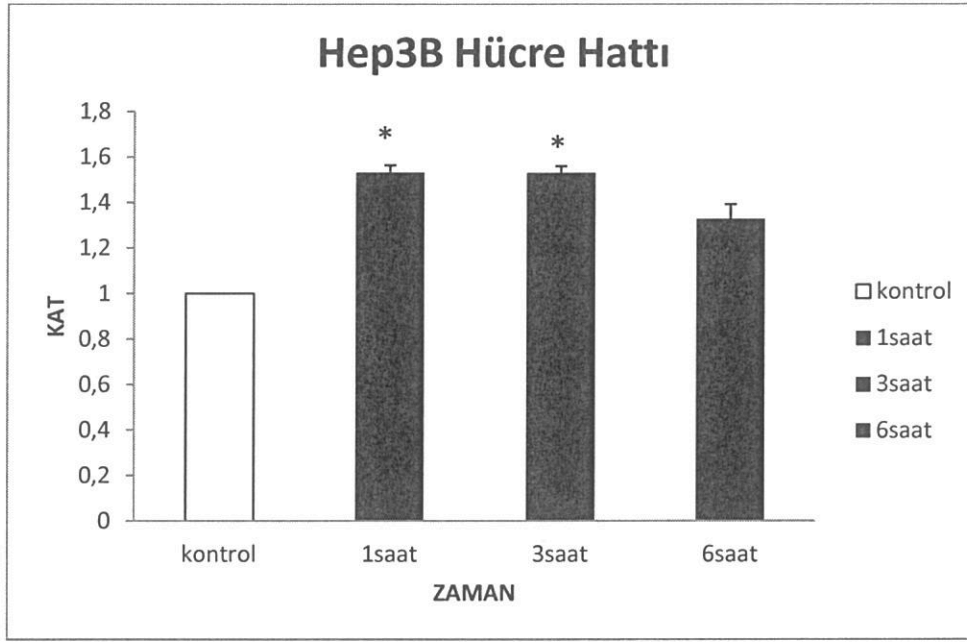
Şekil 3.19: Akış sitometri 1 saat VEGF₁₆₅ uygulanmış Hep3B hücreleri



Şekil 3.20: Akış sitometri 3 saat VEGF₁₆₅ uygulanmış Hep3B hücreleri.



Şekil 3.21: Akış sitometri 6 saat VEGF₁₆₅ uygulanmış Hep3B hücreleri



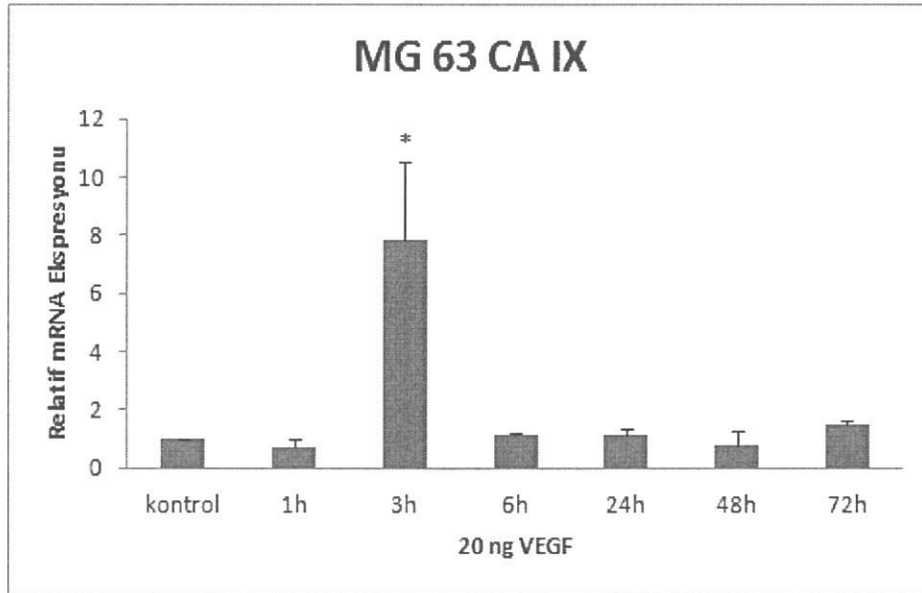
Şekil 3.22: Hep3B hücrelerinde 1, 3 ve 6 saat VEGF₁₆₅ uygulamasının CAIX protein seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$).

Hep3B hücre hattına 20 ng/ml VEGF₁₆₅ sitokini uygulandığında 1 saat ve 3 saatin sonunda CAIX protein seviyesinde anlamlı artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.22).

3.3.3. VEGF₁₆₅ Sitokinin CAIX proteinine farklı doku modeli olarak kemik kanser hücreleri Saos-2 ve MG-63 hücre hattında ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

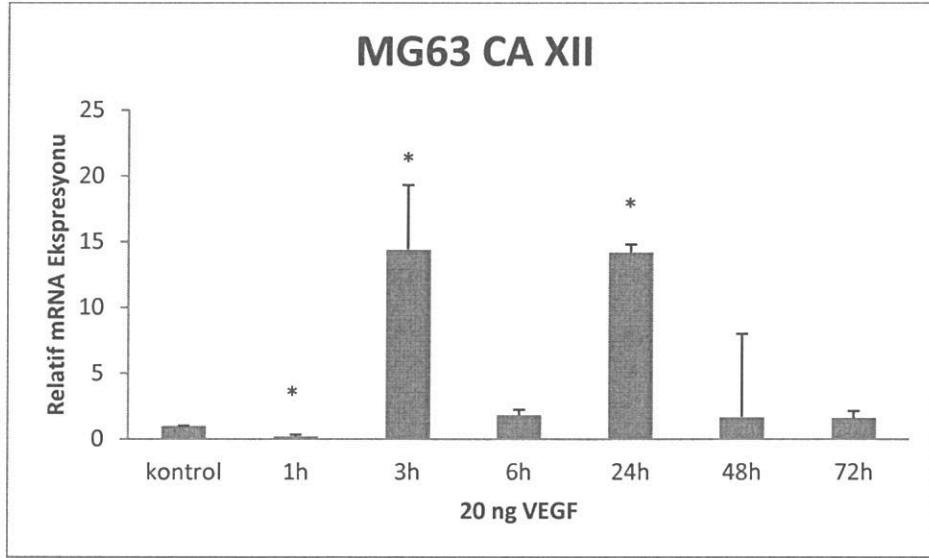
VEGF₁₆₅ sitokininin Saos-2 ve MG-63 hücreleri Bölüm 2.2.2.1.6 belirtildiği üzere büyütülmüştür. 2 milyon hücre olacak tarzda küçük flasklara hücreler 24 saat öncesinden konuldu. Saos-2 ve MG-63 hücrelerinde normoksi koşullarında sitokin uygulaması oluşturulmuştur. Saos-2 ve MG-63 hücrelerinde son konsantrasyon 20 ng/ml VEGF₁₆₅ ve Saos-2 ve MG-63 hücrelerine VEGF₁₆₅ sitokini farklı zaman aralıklarında (1saat, 3 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat) aralıklarında uygulanmış ve CAIX ve CAXII ekspresyon seviyelerine etkileri analiz edilmiştir.

RNA izolasyonu Bölüm 2.2.3.1'da belirtildiği üzere gerçekleştirildi. RNA'ların kalitesi RNA jeli kullanılarak kontrol edildi. Bunun için Bölüm 2.2.3.3'te belirtildiği üzere RNA jeli hazırlandı. RNA'ların konsantrasyonu Bölüm 2.2.3.2 belirtildiği üzere belirlenmiştir. Revers transkripsiyon reaksiyonu Bölüm 2.2.3.4.'te anlatıldığı üzere 1000 ng RNA olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'ların validasyonu için klasik RT-PZR reaksiyonu insan beta mikroglobulin primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnsan β -mikroglobulin primerleri aynı zamanda real time reaksiyonunda normalizasyon amaçlı kullanılmıştır. RT-PZR ve real time PZR'da kullanılan primer bilgileri Tablo 2.7 belirtilmektedir.



Şekil 3.23: MG-63 hücrelerinde 1saat, 3 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat VEGF₁₆₅ uygulamasının CAIX mRNA seviyesindeki etkileri.($p \leq 0,05$)

MG-63 hücre hattına 20 ng/ml VEGF₁₆₅ uygulandığında 3 saatte CAIX mRNA seviyesinde artış istatistiki olarak anlamlıdır (Şekil 3.23). CAXII mRNA seviyesi 3 saat ve 24 saatte artış istatistiki olarak anlamlıdır (Şekil 3.24).

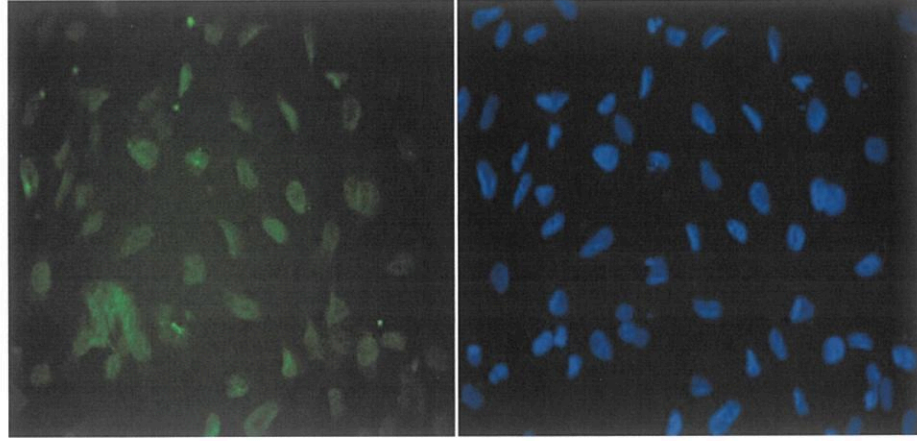


Şekil 3.24: MG-63 hücrelerinde 1, 3, 6, 24 48 ve 72 saat VEGF₁₆₅ uygulamasının CAXII mRNA seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$).

3.3. Anjiogenez katkıda bulunan faktörlerden VEGF₁₆₅'in farklı zaman aralıklarında, normal oksijen ve hipoksik koşullar altındaki Saos-2 Hücrelerinde CAIX ve CAXII mRNA ve protein seviyesine etkileri

3.3.1. VEGF₁₆₅'in farklı zaman aralıklarında, normal oksijen ve hipoksik koşullar altındaki Saos-2 Hücrelerinde CAIX ve CAXII mRNA seviyesine etkileri

Hep3B hücrelerine uygulanan VEGF₁₆₅ sitokininin etkisi farklı bir doku modeli olan osteosarkom modelinde Saos-2 hücrelerinde araştırılmıştır. Öncelikli olarak Saos-2 hücrelerinde CAIX proteininin ifade olup olmadığının gösterilmesi için, CAIX antikorunu immunoflorasans tekniği kullanılarak gösterilmiştir. Bu teknik Saos-2 hücrelerinde Bölüm 2.4'de açıklandığı üzere gerçekleştirilmiştir. Hücre nükleuslarına spesifik DAPI boyaması ile hücreler eş zamanlı olarak boyanmıştır. Şekil 3.25 da Saos-2 hücrelerinde CA-IX proteininin oldukça yüksek ifade olduğu görülebilir. Ayrıca CAIX proteininin genellikle zar yerleşimli olarak membran çevresinde lokalize olduğu görülmektedir.

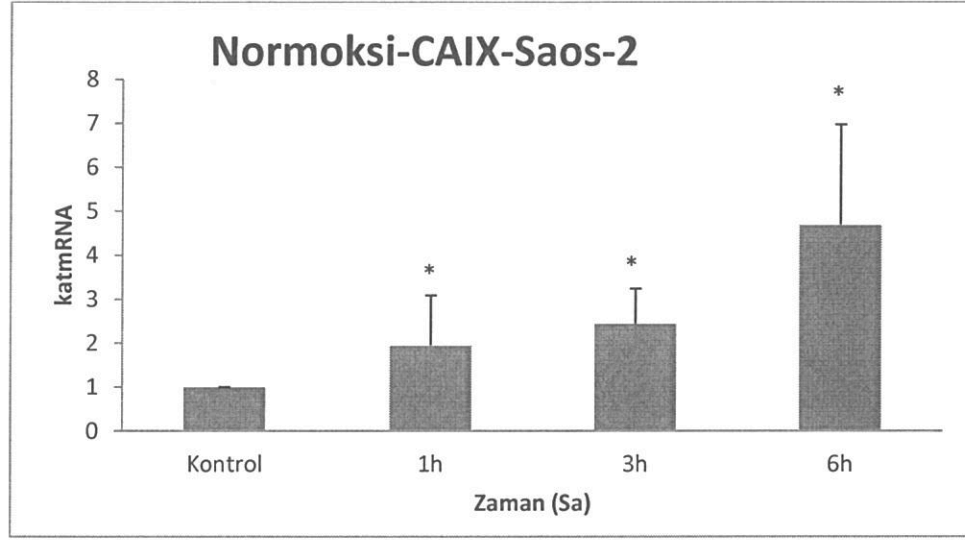


Şekil 3.25: Saos-2 hücrelerinde CAIX proteinin immunoflorasans tekniği ile gösterilmesi

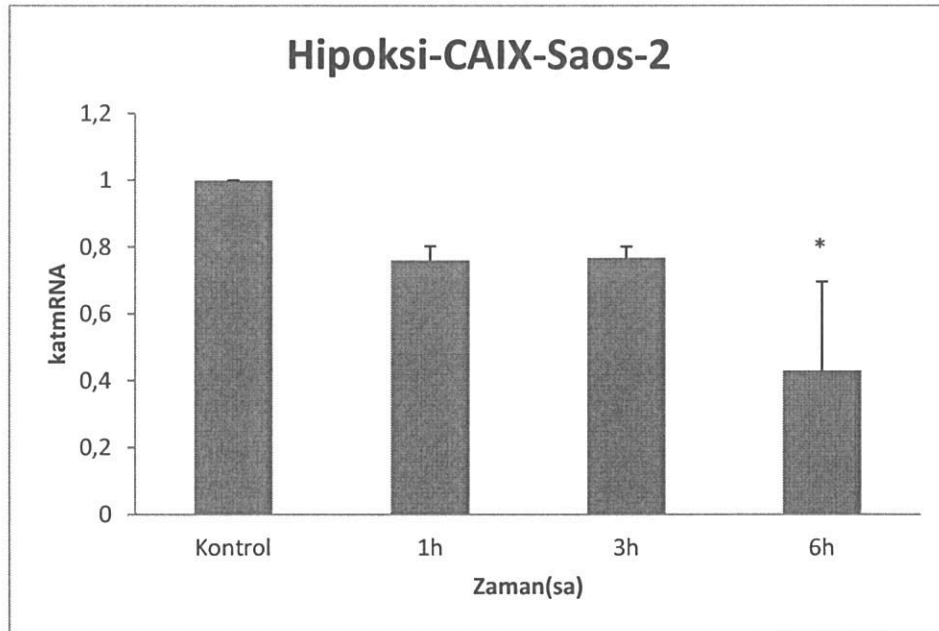
Saos-2 hücre hattına 20 ng/ml son konsantrasyonda VEGF₁₆₅ sitokini uygulanmış, normal oksijen koşullarında, 1, 3 ve 6, saat CAIX mRNA düzeyi, bakılmış bunun sonucunda, Saos-2 hücre hattına 20 ng/ml VEGF₁₆₅ uygulandığında tüm saat dilimlerinde CAIX mRNA seviyesindeki artış istatistiki olarak anlamlıdır.(Şekil 3.26).

Buna göre erken saat dilimlerinde VEGF₁₆₅ sitokini, CAIX ve CAXII mRNA'larına artış sebepe olduğu görülmektedir (Şekil 3.26, Şekil 3.27, Şekil 3.28 ve Şekil 3.29) Oysaki daha geç zaman dilimlerinde bu artışın devam edip etmediği ile ilgili VEGF₁₆₅ sitokini, 24 saat, 48 saat ve 72 saatte uygulanmış ve hiç uygulanmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre CAIX da artış spesifik 48 saatte istatistiki anlamlı bulunmuş ve aynı artışın CAXII için de korele olduğu anlaşılmıştır (Şekil 3. 30, Şekil 3.31,Şekil 3.32).

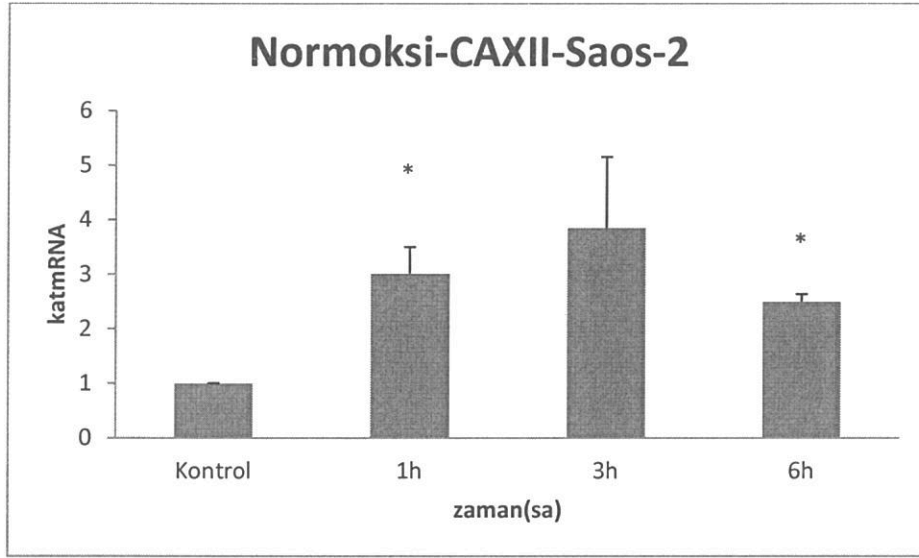
Hipoksik koşullarda VEGF₁₆₅ sitokinin CAIX ve CAXII mRNA düzeylerine etkileri yukarıda anlatıldığı üzere ilk önce 1 saat, 3 saat, ve 6 saat de değerlendirilmiştir. Erken saat cevap haricinde CAIX ve CAXII'nin 24 saat, 48 saat ve 72 saat gibi geç dönem etkileri ayrıca belirlenmiştir.(Şekil 3.31 ve Şekil 3.33) Saos-2 hücre hattına 20 ng/ml VEGF₁₆₅ uygulandığında hipoksik koşullarda 6 saatte CAIX mRNA seviyesindeki azalış istatistiki olarak anlamlıdır (Şekil 3.27). Diğer zaman dilimlerinde önemli bir artışa rastlanmamıştır.



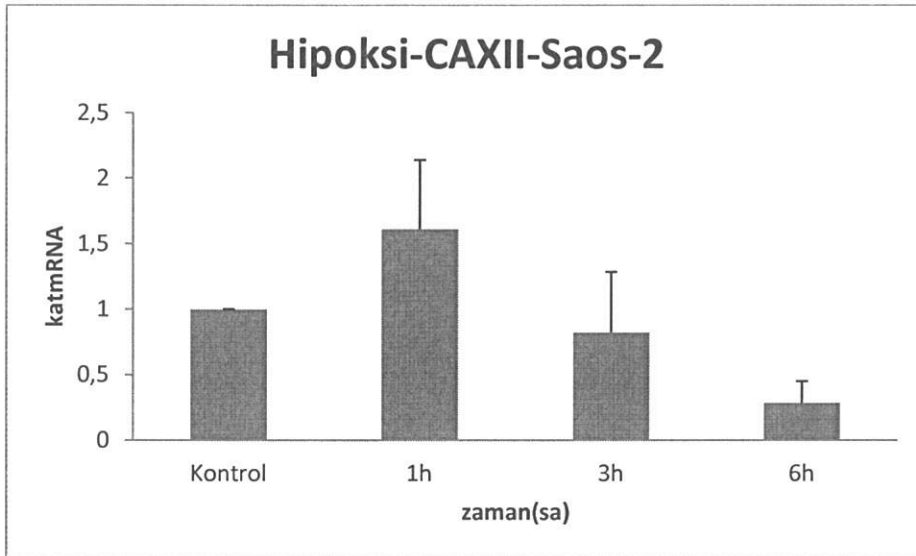
Şekil 3.26: Saos-2 hücre hattında VEGF₁₆₅ sitokininin 1, 3 ve 6 saatlik zaman aralıklarında, normoksi koşullarında CAIX ekspresyonuna etkisi. ($p \leq 0,05$)



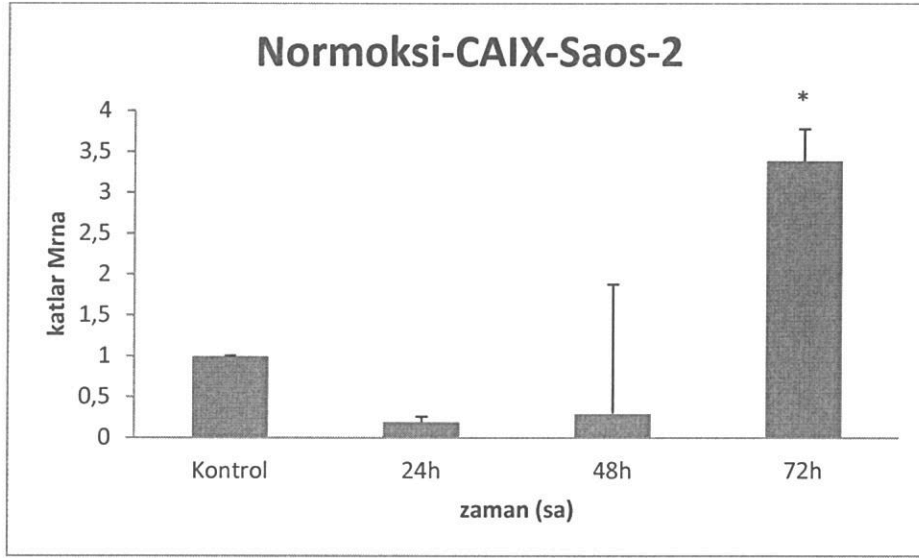
Şekil 3.27: Saos-2 hücre hattına VEGF₁₆₅ sitokininin 1, 3 ve 6 saatlik zaman aralıklarında, hipoksi koşullarında CAIX ekspresyonuna etkisi.



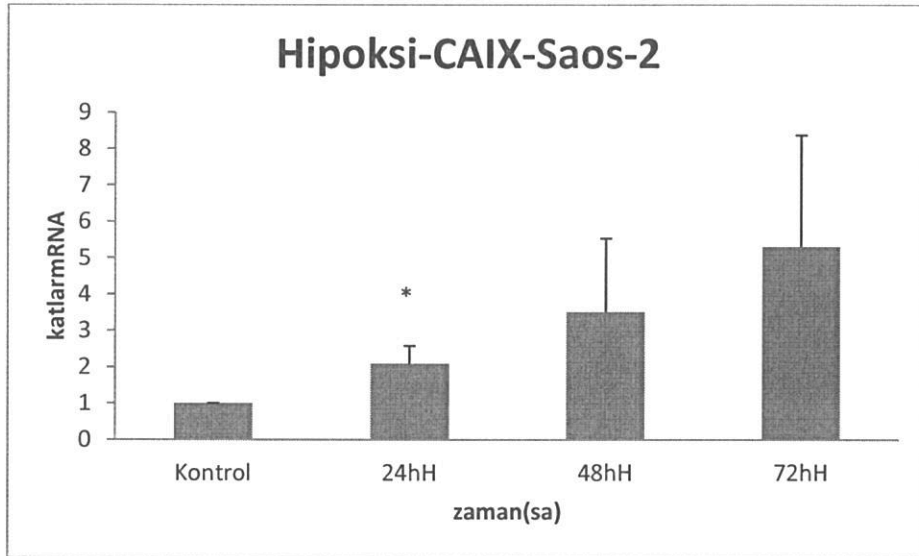
Şekil 3.28: Saos-2 hücre hattına VEGF₁₆₅ sitokininin 1, 3 ve 6 saatlik zaman aralıklarında, normoksi koşullarında CAXII ekspresyonuna etkisi.



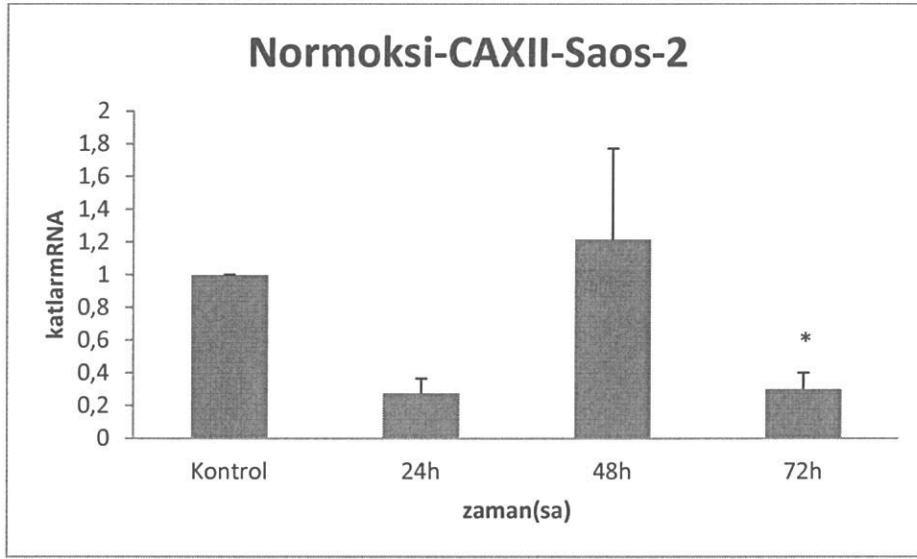
Şekil 3.29: Saos-2 hücre hattına VEGF₁₆₅ sitokininin 1, 3 ve 6 saatlik zaman aralıklarında, hipoksi koşullarında CAXII ekspresyonuna etkisi.



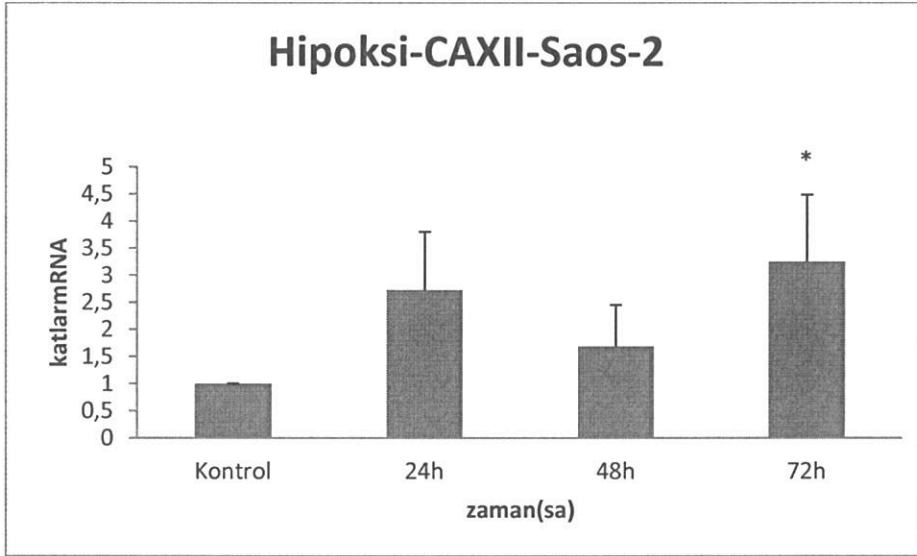
Şekil 3.30: Saos-2 hücre hattına VEGF₁₆₅ sitokininin 24, 48 ve72 saatlik zaman aralıklarında, normoksi koşullarında CAIX ekspresyonuna etkisi.



Şekil 3.31: Saos-2 hücre hattına VEGF₁₆₅ sitokininin 24, 48 ve72 saatlik zaman aralıklarında, hipoksi koşullarında CAIX ekspresyonuna etkisi.



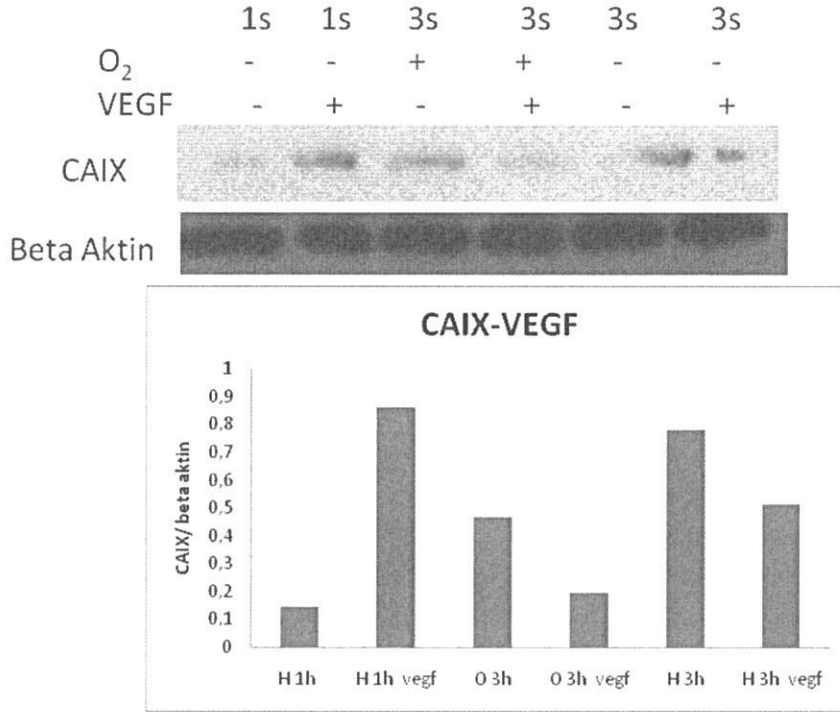
Şekil 3.32: Saos-2 hücre hattına VEGF₁₆₅ sitokininin 24, 48 ve72 saatlik zaman aralıklarında, normoksi koşullarında CAXII ekspresyonuna etkisi.



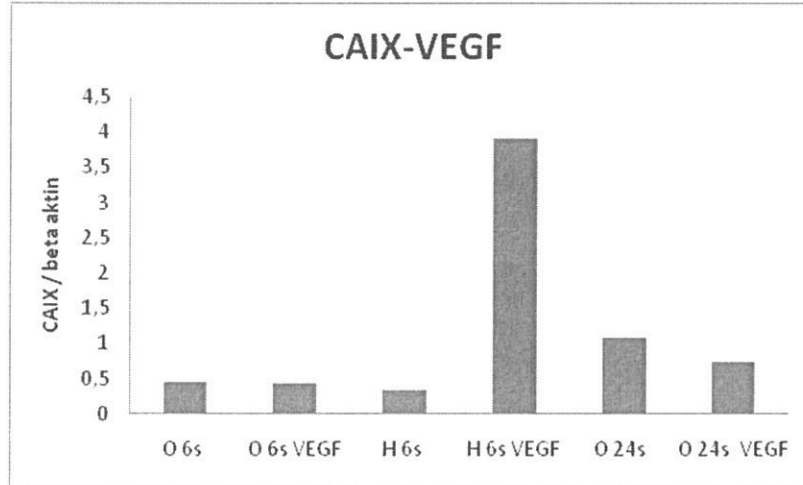
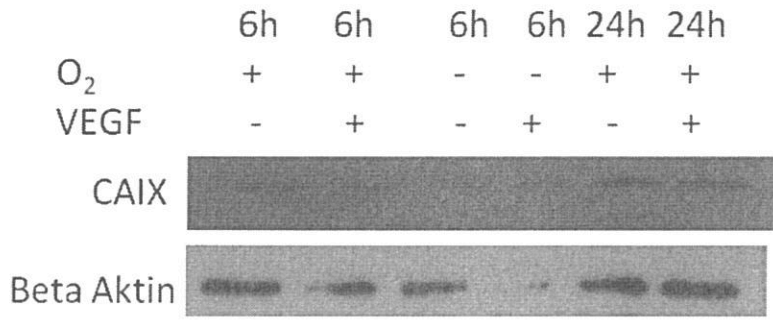
Şekil 3.33: Saos-2 hücre hattına VEGF₁₆₅ sitokininin 24, 48 ve72 saatlik zaman aralıklarında, hipoksi koşullarında CAXII ekspresyonuna etkisi.

3.3.2. VEGF₁₆₅ Uygulanmış Saos-2 Hücre Hattında Westernblot Uygulamaları

Son konsantrasyon 20 ng/ml olacak şekilde VEGF₁₆₅ sitokini uygulanmış Saos-2 hücre hattından CAIX protein seviyeleri western blotting ile gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda Şekil 3.34’de hipoksik koşullarda 20 ng/ml VEGF₁₆₅ sitokin uygulandığında 1 saat, 3 saat ve 6 saatin sonunda CAIX protein seviyesinde artış anlamlıdır (Şekil 3.34 ve Şekil 3.35).



Şekil 3.34: VEGF₁₆₅ uygulanmış Saos-2 hücre hattında CAIX protein seviyeleri (1 ve 3 saat)



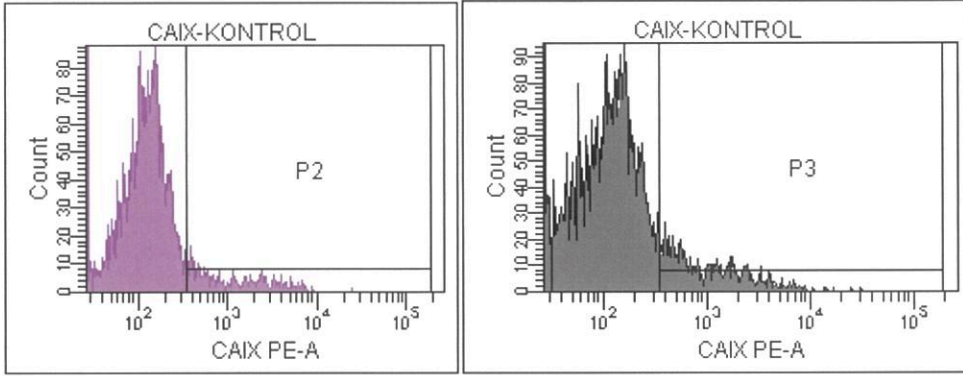
Şekil 3.35: VEGF₁₆₅ uygulanmış Saos-2 hücre hattında CAIX protein seviyeleri (6 ve 24 saat)

3.3.3. Saos-2 Hücre Hattında Flowsitometri deney sonuçları

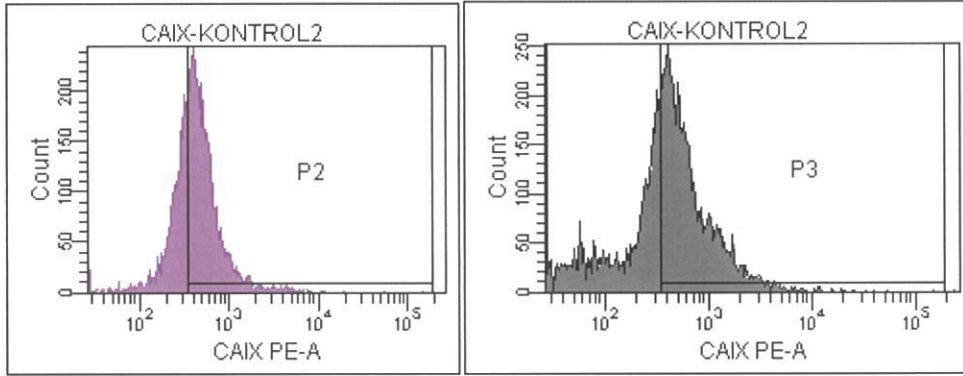
CAIX mRNA seviyesinde görülen artışın protein seviyesinde korele olup olmadığının belirlenmesi amacıyla akış (flow) sitometri analizi yapıldı. Akış sitometri kısa sürede kantitatif sonuç verebilen hızlı ve çok duyarlı bir hücre sayımı yöntemidir. Membrana bağlı bir protein olan CAIX proteininin ifadesi bu metodla değerlendirilebilir.

Bölüm 2.1.10'da anlatıldığı şekilde Saos-2 hücreleri 6 çukurlu plakalara ekildi. Çalışmada hipoksik ve normoksik koşullarda 20 ng/ml VEGF₁₆₅ uygulaması yapılmış Saos-2 hücreleri, fikoeritritin-etiketli monoklonal CAIX antikoruna ile işaretlenerek, CAIX protein seviyesindeki değişim akış sitometri ile analiz edildi.

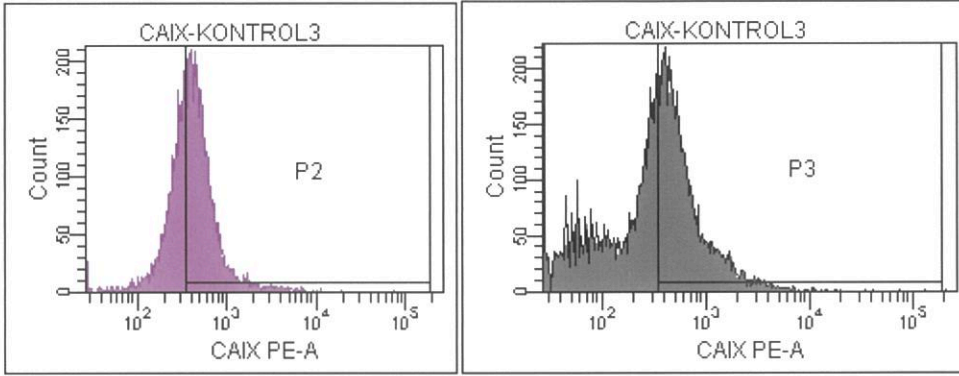
Buna göre sitokin uygulaması yapılmamış olan kontrol grubu (%100)(Şekil 3.36, Şekil 3.37, Şekil 3.38, Şekil 3.40,) ile 20 ng/ml VEGF₁₆₅ uygulanmış (Şekil 3.39, Şekil 3.41, Şekil 3.42) hücrelerdeki CAIX protein seviyesi bakılmıştır. Saos-2 hücre hattına 20 ng/ml VEGF₁₆₅ sitokini uygulandığında 6 saat in sonunda hipoksik koşullarda CAIX protein seviyesinde anlamlı artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.43).



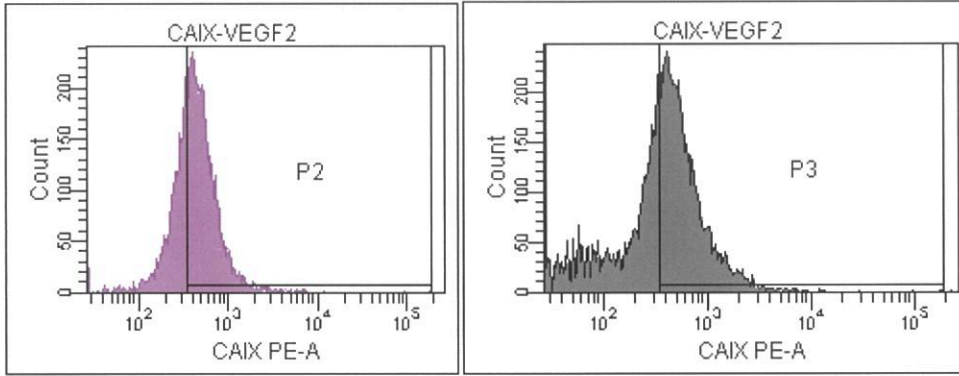
Şekil 3.36: Akış sitometri Saos-2 hücre hattı normoksi kontrol grupları



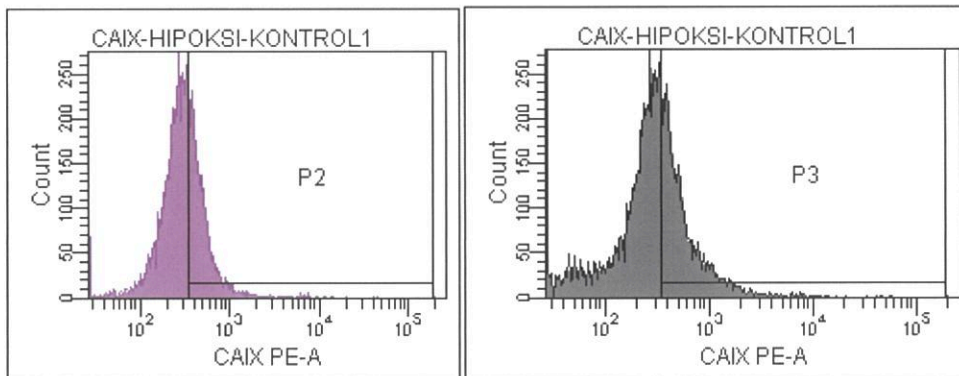
Şekil 3.37: Akış sitometri Saos-2 hücre hattı normoksi kontrol grupları



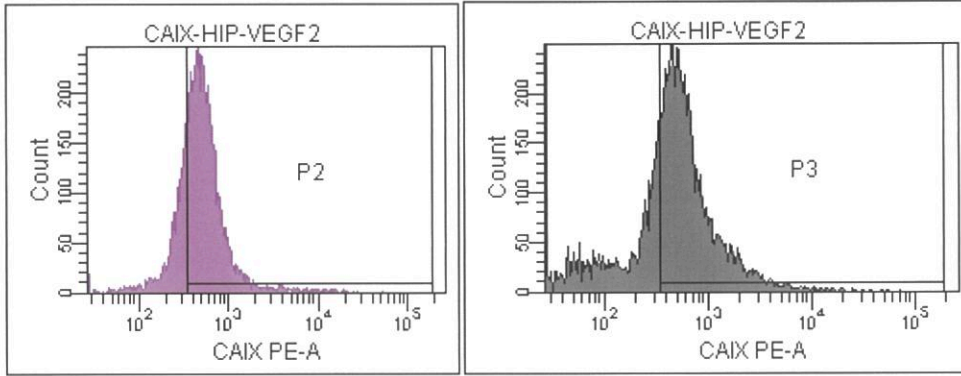
Şekil 3.38: Akış sitometri Saos-2 hücre hattı normoksi kontrol grupları



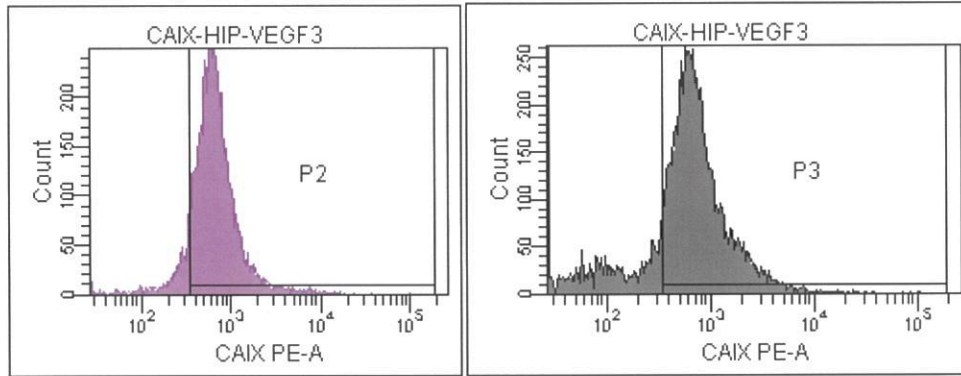
Şekil 3.39: Akış sitometri VEGF165 uygulanmış Saos-2 hücre hattı hipoksi



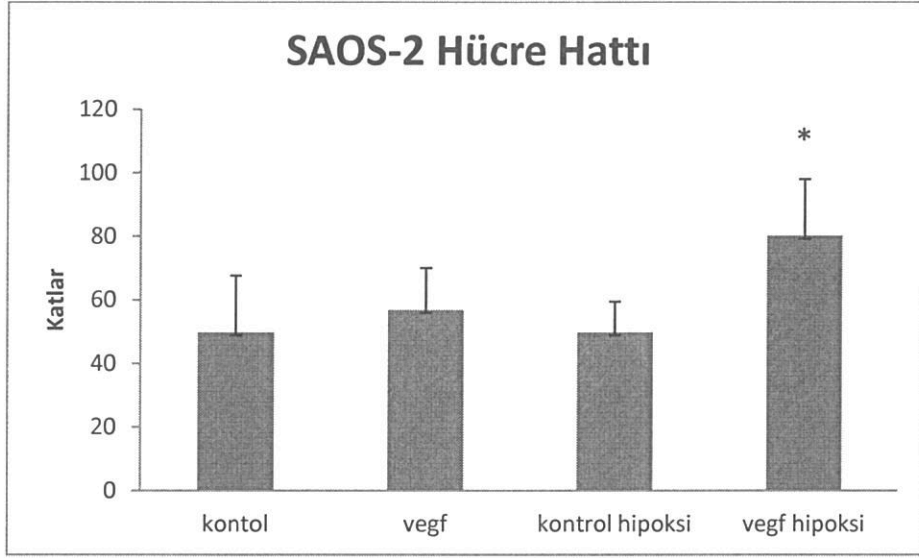
Şekil 3.40: Akış sitometri Saos-2 hücre hattı hipoksi kontrol grupları



Şekil 3.41: Akış sitometri VEGF₁₆₅ uygulanmış Saos-2 hücre hattı hipoksi grupları



Şekil 3.42: Akış sitometri VEGF₁₆₅ uygulanmış Saos-2 hücre hattı hipoksi grupları



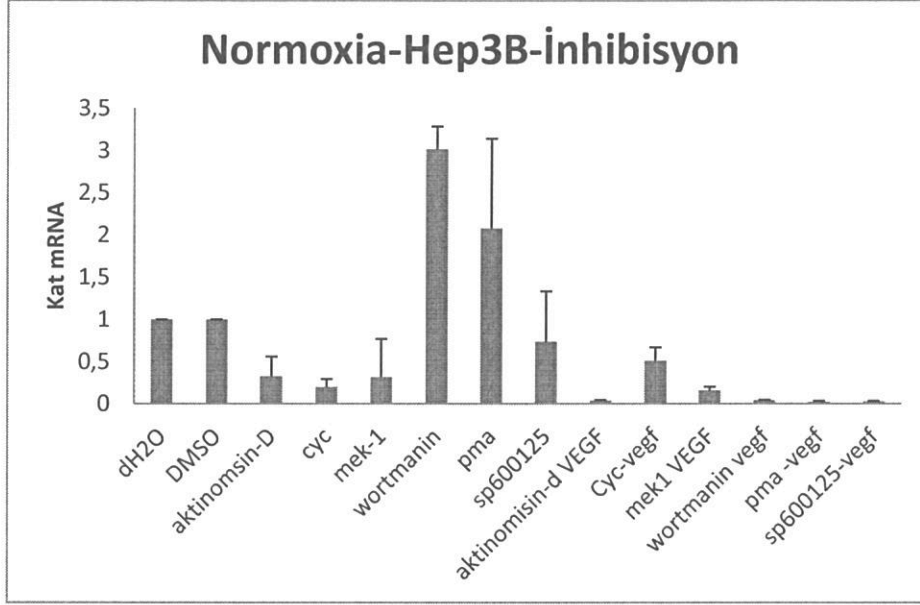
Şekil 3.43: Saos-2 hücrelerinde 6 saat VEGF₁₆₅ uygulamasının CAIX protein seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$)

3.4. İnhibisyon Deneyi Sonuçları

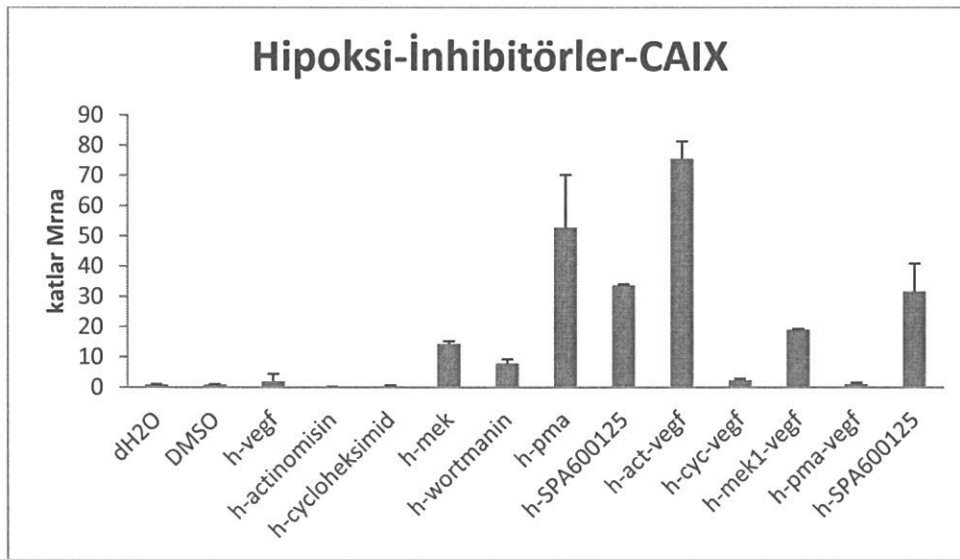
Deney bölüm 2.3.1.'de anlatıldığı gibi kuruldu. İlk gün Hep3B hücreler sayılarak her bir küçük flask için 2.000.000 olacak şekilde hücreler flaslara konuldu. Sitokin deneyleri için DMEM ve BSA'lı medyumda 1 gece bekletildi. Ertesi gün hücrelerde bir sorun olup olmadığı mikroskopta kontrol edildi ve daha sonra uygun konsantrasyonda inhibitör uygulandı. (Kullanılan inhibitöre göre Kontrol grubu DMSO veya su) 1 saat beklendi. 1 saat sonunda uygun konsantrasyonda sitokin uygulandı. 6 saat beklendi. 6 saat sonunda medyum uzaklaştırıldı. Herbir flaska 2 ml Tripsin EDTA eklendi. 3 dakika etüvde bekletildi. Üzerine %10 FCS içeren DMEM medyumdan 6 ml konuldu. RNA analizi için falkona konulup çökürülür. Üsteki süpernatant dökülür. Hücre pelletleri, RNA ve protein için ayrılmış olarak -80'e kaldırıldı. Protein sentezi inhibitörü olan sikloheksimid son konsantrasyonu 10 µg/ml olarak belirlendi. Sikloheksimid suda çözüldü. MEK1 protein kinazları inhibe eden bir kimyasaldır. MEK1, DMSO içerisinde çözüldü. Çalışmada son konsantrasyonu küçük flasklar için 10 µM olarak belirlendi. Wortmanin yaygın olarak kullanılan Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) inhibitörüdür. Wortmanin DMSO içerisinde çözüldü. Çalışma son konsantrasyonu küçük flasklar için 1 µM olarak belirlendi.

Normal oksijen koşullarında (Şekil 3.44) transkripsiyon inhibitörü Aktinomis D beklenildiği üzere mRNA ifadesini azalttığı gözlenmiştir. Protein sentezi inhibitörü siklohegzimid ve VEGF₁₆₅/siklohegzimid uygulaması VEGF₁₆₅'in transkripsiyonu aktive ederek mRNA düzeyinde artışa neden olduğu gözlenmiştir. MEK1 ve MEK1/VEGF₁₆₅ uygulamasının VEGF₁₆₅ artışını bloke ettiği anlaşılabilir. Aynı durum wortmanin ve wortmanin/VEGF₁₆₅, PMA ve PMA/VEGF₁₆₅ ve SP600125 ve SP600125/VEGF₁₆₅ uygulamasında görülmektedir. Buradan normoksik koşullarda VEGF₁₆₅ cevabının MEK1, JNK ve PI3K yoluyla gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

Düşük oksijen koşullarında (Şekil 3.45) transkripsiyon inhibitörü Aktinomis D beklenildiği üzere mRNA ifadesini azalttığı gözlenmiştir. Akt/VEGF₁₆₅ uygulamasının VEGF₁₆₅'in hipoksik koşullar altında çok fazla CAIX mRNA düzeyini arttırdığı görülmektedir. Sadece MEK1, wortmanin, PMA ve SP600125'in hipoksik cevabın daha artmasına neden olduğunu göstermektedir. Yalnız, MEK1/VEGF₁₆₅, wortmanin/VEGF₁₆₅, PMA/VEGF₁₆₅ ve SP600125/VEGF₁₆₅ uygulamasının VEGF₁₆₅ artışını bloke ettiği anlaşılmaktadır. Buradan hipoksik koşullarda da VEGF₁₆₅ cevabının MEK1, JNK ve PI3K yoluyla gerçekleştiği anlaşılmaktadır.



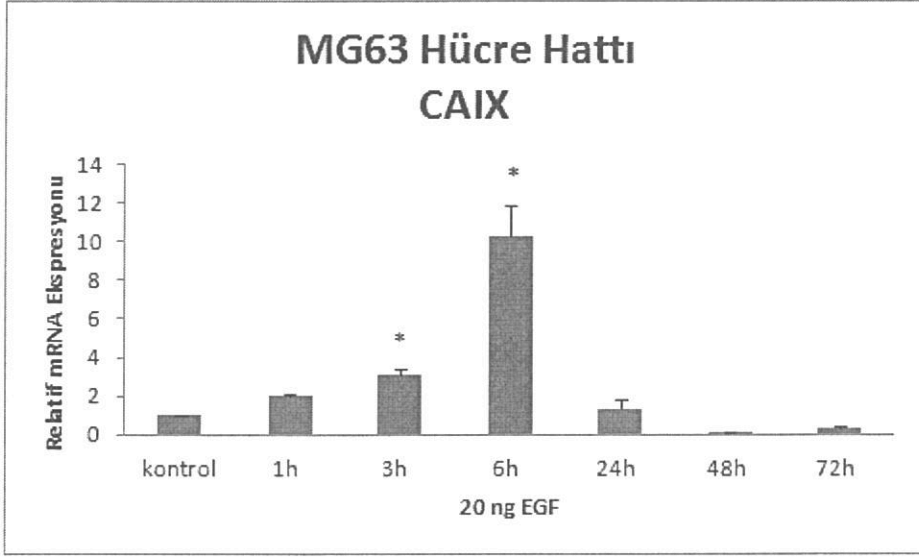
Şekil 3.44: Hep3B hücre hattına normoksi çeşitli inhibitörler uygulandığında CAIX ekspresyonuna etkileri.



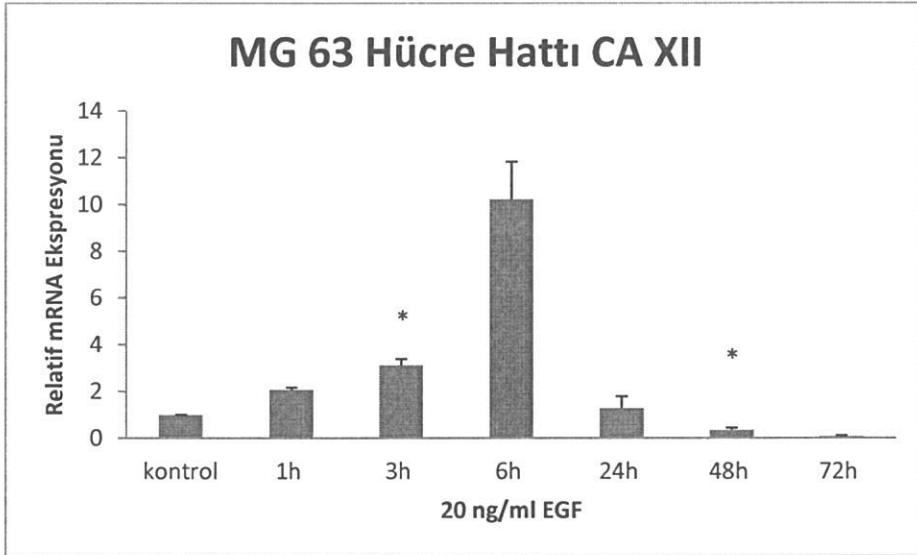
Şekil 3.45: Hep3B hücre hattına hipoksi çeşitli inhibitörler uygulandığında CAIX ekspresyonuna etkileri.

3.3 Epidermal growth faktörünün (EGF) CAIX ve CAXII mRNA üzerine etkilerinin belirlenmesi

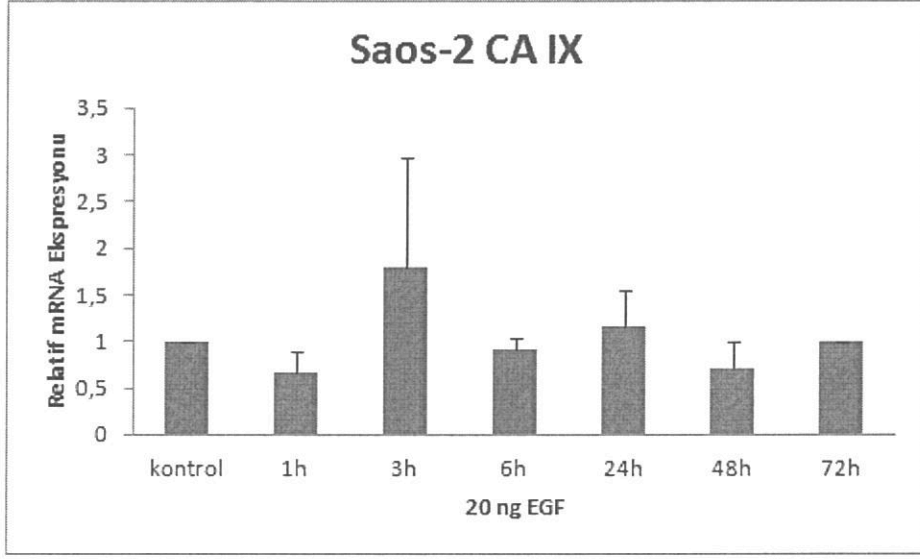
Epidermal growth faktörünün CAIX ve CAXII mRNA üzerine etkilerinin belirlenmesi Epidermal growth factor CAIX ve CAXII mRNA üzerine etkileri osteosarkom modeli hücrelerinde belirlenmiştir. Öncelikli olarak MG-63 hücrelerin daha sonra da Saos-2 hücrelerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneyler sadece normal oksijen koşullarında gerçekleştirilmiştir. MG-63 hücre hattına 20 ng/ml EGF uygulandığında 3 ve 6 saatte CAXII mRNA seviyesinde artış vardır. 3 saatteki artış istatistiki olarak anlamlıdır. MG-63 hücre hattına 20 ng/ml EGF uygulandığında 3 ve 6 saatte CAIX mRNA seviyesinde artış istatistiki olarak anlamlıdır. Saos-2 hücre hattına 20 ng/ml EGF uygulandığında 3 saatte CAIX mRNA seviyesinde yine artış gözlenirken bu artış istatistiki olarak anlamlı değildir. MG-63 hücre hattına 20 ng/ml EGF uygulandığında 3 ve 6 saatte CAIX mRNA seviyesinde artış istatistiki olarak anlamlıdır (Şekil 3.46). MG-63 hücre hattına 20 ng/ml EGF uygulandığında 3 ve 6 saatte CAXII mRNA seviyesinde artış vardır. 3 saatteki artış istatistiki olarak anlamlıdır (Şekil 3.47). Saos-2 hücre hattına 20 ng/ml EGF uygulandığında CAIX seviyesinde herhangi anlamlı bir artış görülmemiştir (Şekil 3.48). Saos-2 hücre hattına 20 ng/ml EGF uygulandığında 3 ve 72 saatte CAXII mRNA seviyesinde yine artış gözlenirken bu artış istatistiki olarak anlamlıdır (Şekil 3.49).



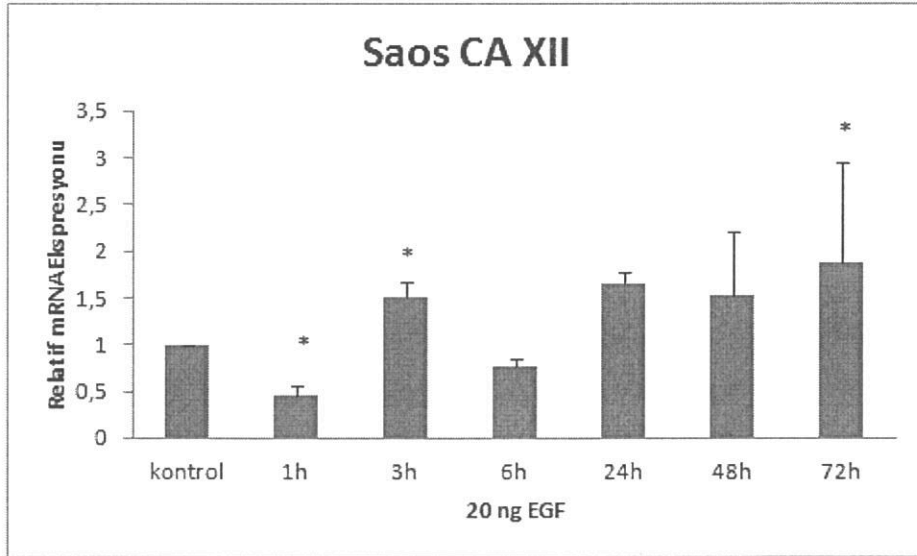
Şekil 3.46: MG-63 hücrelerinde 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat EGF uygulamasının CAIX mRNA seviyesindeki etkileri.($p \leq 0,05$)



Şekil 3.47: MG-63 hücrelerinde 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat EGF uygulamasının CA XII mRNA seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$)



Şekil 3.48: Saos-2 hücrelerinde 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat EGF uygulamasının CAIX mRNA seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$)



Şekil 3.49: Saos-2 hücrelerinde 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat EGF uygulamasının CAXII mRNA seviyesindeki etkileri ($p \leq 0,05$)

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karbonik anhidraz enzimleri çeşitli fizyolojik ve patolojik proseslerde önemli rol oynayan enzimlerdir. Bu enzimler karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizleyerek hücre membranında ve hücre içindeki değişik birçok alanda önemli görevler üstlenmişlerdir. 14 farklı CA izoenzimi vardır ve bunlardan kanser ile ilişkisi tespit edilmiş olan CAIX, genellikle katı tümörlü hücrelerde aktivite gösterir. CAIX'un ekspresyonu bir çok kanser türünde hastalık süreci ile ilişkilidir. Kanser ile ilişkili olan CAIX geninin regülasyonunun aydınlatılması, kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olacaktır. CAIX geni hipoksiada regüle olan bir genidir. Pek çok çalışmada özellikle hipoksi belirteci olarak CAIX bilinmektedir. Aynı şekilde CAIX pek çok kanser türlerinde ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir. İlk olarak böbrek hücreli karsinomada, meme kanserinde, akciğer kanserinde akciğer, kolon kanserinde CAIX 'un ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [57, 58, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 73]. CAIX 'un kanserle ilgili bir protein olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle CAIX ile ilgili çalışmalar oldukça önemlidir. Özellikle hipoksik durumlarda artan bu genin ekspresyonunu azaltmaya yönelik pekçok terapötik yaklaşımlar gündemdedir. CAIX gibi CAXII de membrana bağlı bir CA üyesidir. Ve aynı şekilde CAXII'nde hipoksik durumlarda arttığı rapor edilmiştir. [73, 74]. Yalnız CAIX ile CAXII'nin birbirleriyle ilişkisi konusunda literatürdeki bilgiler oldukça sınırlıdır. Çalışmamızda CAIX ve CAXII'nin farklı sitokinlerle regülasyonu konu alınmıştır. Öncelikli olarak hipoksiyle regüle olmasından dolayı gen ifadeleri hem normal oksijen koşullarında hemde düşük oksijen koşullarında yapılmıştır. Düşük oksijen koşullarında hipoksik model olarak kimyasal indüklenmiş hipoksiya modeli kullanılmıştır. Bu model çeşitli kimyasallarla uygulanabildiği gibi özellikle 150mM CoCl₂ eşliğinde çalışmamızda kullanılmıştır. CoCl₂ bu hipoksik etkiyi hipoksiya da ana regülatuar olan HIF1 α degradasyonunu engelleyerek yapar. HIF1 α 'yı degrade eden prolin hidroksilazların CoCl₂ spesifik inhibitörüdür[45].

Çalışmamızda model hücremiz insan hepatoma hücresi (Hep3B)'dir. Hep3B hücresinde CAIX ekspresyonu ilk olarak çalışma grubumuz tarafından gösterilmiştir[105, 106]. CAXII'nin de Hep3B hücrelerinin üzerinde iyi ekspre olduğu gösterilmektedir. CAIX ve CAXII'nin hangi nedenlerle ekspre olduğu ve birbiri arasındaki ilişki şu ana kadar rapor edilmemiştir. Çalışmamızda öncelikli olarak CAIX ve CAXII'nin kullandığımız model hücrelerdeki mRNA düzeyindeki ifadelerine bakılarak hangisinin daha fazla olduğu incelenmiştir. Buna göre Hep3B hücrelerinde CAXII'nin daha fazla mRNA düzeyinde ifade olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda uyguladığımız tüm sitokin deneylerine farklı model hücre hatları eklenmiş ,bu hücre hatlarında ki bu hücre hatları osteosarkom hücre hatlarıdır. SaoS-2 ve MG63 hücre hatlarında da hem CAIX hem de CAXII mRNA seviyelerine bakılmıştır. Çalışmamızda CAIX üzerinde Hep3B hücrelerinde farklı sitokinlerin etkileri öncelikle değerlendirilmiştir. Kullanılan sitokinler TNF α , TGF β ve VEGF165'tir. Bu sitokinlerin pekçok kanser türünde etkisi olduğuna dair detaylı çalışma olsada bunların Hep3B hücrelerinde normal oksijen koşullarında ve düşük oksijen koşullarında sitotoksik etkileri konusunda çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu yüzden biz öncelikli olarak bu sitokinlerin hipoksik durumlarda hücreler üzerinde etkisini araştırmak üzere MTT testi yapıldı.

Canlılarda bulunan seçici bazı moleküller bunlar sitokinler/ faktörler/ moleküller olabilir doğal olarak kanser hücrelerini öldürebilirler ve kanser oluşmasını engelleyici potansiyele sahiptirler [88, 89]. TNF- α kanserde iki zıt etki göstermektedir. TNF- α tümör mikroçevresinde endojen tümör arttırıcı etki gösterir çünkü TNF- α kanser hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını, invazyon, metastaz ve tümör anjiogenezini uyarır [90]. Hepatoselüler (HCC) kanser dünyada en yaygın 10 kanserden birisidir. Geçmişteki çalışmalar göstermiştir ki, TNF- α preneoplastik fazdan önce oval hücre proliferasyonunu sağlayarak karaciğer kanserinin gelişimine katkıda bulunur [91]. Bu yüzden TNF- α ve hepatoselüler kanser arasındaki ilişkinin aydınlatılması önemlidir. Hem protümör ve hem de antitümör rolü olduğu bilinen TNF- α 'nın Hep3B karaciğer hücrelerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmamız sonucunda özellikle, 24 saatte hem hipoksik hem de normoksik ortamda sitokin sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Normal oksijen koşullarında 48 ve 72 saatte sitokin proliferatif etkisi ortadan kalmış, ancak hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkisi görülmemiştir.

Hipoksiyada ise 48 saatte proliferatif etki devam etmesine rağmen yalnızca 500 U/ml TNF- α uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 72 saatte ise sitokin bu etkisi tamamen kaybolmuş ve sitotoksik etki göstererek hücrelerin ölümüne sebep olmuştur. Genel olarak kanserli hücrelerin yıkımında görev aldığı bilinen TNF- α , insan karaciğer hücrelerindeki (Hep3B) iki yönlü (protümör ve antitümör) etkisinin gösterildiği çalışmamız, TNF- α farklı hücrelerde, farklı doz ve zaman aralıklarında etkilerinin farklı olabileceğini göstermektedir. Hücre proliferasyonundaki artışın sebebinin, sitokinin protümör özelliği nedeniyle meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. TNF- α 'nın isimlendirilmesi, hücre ölümünü yapmasından kaynaklanmasına rağmen, TNF- α 'nın protümör özelliği, transkripsiyon faktörü NF- κ B'yı aktive ederek gösterilmiştir [92]. Birçok normal hücre NF- κ B transaktivasyona bağlı olarak TNF- α tarafından öldürülmemektedir. NF- κ B inhibe olduğu zaman TNF- α bağlı hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Öte yandan TNF- α , NF- κ B'yı aktivasyonunda sırasıyla, I κ B kinaz kompleksi fosforilasyonuna ve sonuç olarak I κ B α 'nın degradasyona neden olur ve NF- κ B serbest bırakır ve NF- κ B aktive olur. Mdr2 (p-glyco-protein 2)-eksik farelerde, TNF- α NF- κ B'yı aktive ederek HCC oluşumunu başlattığı görülmüştür [93]. Ayrıca, Kou ve arkadaşları, TNF- α cevabın serum varlığı ve yokluğunun bile değiştiğini, TNF- α , yüksek dozlarda serum açlığı indüklenmiş apoptozu arttırdığı fakat düşük dozlarda, apoptozu yavaşlattığını bulmuşlardır [94]. Bizim çalışmamız, TNF- α 'nın özellikle hipoksik koşullarda hücre proliferasyonunu normal oksijen koşullarına göre daha fazla arttırdığını göstermektedir. Hipoksik koşullar hücre proliferasyonunu tetikleyen tümör saldırganlığını ve hasta yaşam süresini kısaltması açısından önemli olduğu düşünüldüğünde, TNF- α 'nın proliferatif etkisinin artması sürpriz değildir.

Sonuç olarak pleiotropik bir sitokin olan TNF- α 'nın sadece inflamasyon için değil hepatosellüler kanserin gelişimi ve kanser hücrelerindeki mikroçevreye bağlı olarak etkisinin sürekli bir varyasyon gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu sonuçların TNF- α 'nın hepatosellüler kanseri için önemli olduğu ve etkinin detaylı araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bazı sitokinlerin tümörlere karşı bağışıklık sisteminin aracı molekülleri gibi çalıştıkları gibi, kanser patogeneziinde önemli oldukları bilinmektedir. Sitokinler bu gibi durumlarda patogenezi ile ilgili genlerin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu

arttırarak yada azaltarak etkili olurlar. VEGF₁₆₅ anjiogenez olayının regülasyonunda anahtar bir role sahip bir sitokindir. VEGF₁₆₅'de hipoksi durumlarında HIF-1'e bağlı olarak kontrol edilen bir gendir. Hem CAIX hem de VEGF₁₆₅ her ikisinde hipoksik durumlarda indüklenen genlerdir. Ancak, VEGF₁₆₅'nin CAIX gen ekspresyonu etkileyip etkilemediği konusunda ayrıntılı bilgi yoktur. VEGF₁₆₅ sitokininin CAIX geni üzerindeki etkilerinin araştırılmış olduğu bu çalışmada, öncelikle farklı sitokinlerin kullanılan ana modelimiz, Hep3B hücreleri üzerinde sitotoksite deneyleri yapılmıştır. Sitotoksite deneylerinde VEGF₁₆₅, TNF- α ve TGF- β sitokinleri kullanılmıştır.

Yaptığımız çalışmada Hep3B hücre hattında CAIX ve CAXII mRNA'larının hipoksik koşullar altında normoksik koşullara göre mRNA seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda ana konu VEGF₁₆₅ sitokininin CAIX ekspresyonuna etkisini araştırmak olmuştur. Farklı dozlar taranarak çalışmada 20ng/ μ l doz kullanılmaya karar verilmiştir. 20ng/ μ l VEGF₁₆₅ farklı zaman aralıklarında uygulandı. Farklı zaman uygulamalarının nedeni bazı sitokinlerin etkisini erken saatlerde bazılarının ise geç saatlerde göstermesidir. Çalışmada kullandığımız VEGF₁₆₅ sitokininin özellikle Hep3B hücrelerinde normoksiyada ve hipoksiadaki zamana bağlı olarak mRNA düzeyinde artmaya neden olduğu gözlenmiştir. Aynı etkinin protein seviyesinde olup olmadığı araştırılmıştır. Flow sitometre deneyi ile protein düzeyinde artış doğrulanmıştır. CAIX bir membran proteini olduğu için fikoeritrin ile kolayca boyanmış ve flow sitometri deneyi yapılmıştır. Yine CAIX un flow sitometri ile gösterildiği yine grubumuz tarafından daha önce yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Aynı zamanda bu etki farklı modellerde de araştırılmış, VEGF₁₆₅'in farklı zaman aralıklarında CAIX mRNA seviyesinde etkisine baktığımızda osteosarkom modellerinde Hep3B hücre hattı gibi benzer mRNA seviyesinde artış gösterilmiş, aynı zamanda CAXII seviyesinde artış gözlenmiştir. Bu artış protein düzeyinde artış ile korelasyon göstermektedir. Saos-2 hücrelerinde protein seviyesinde ki artış western blot analiziyle de gösterilmiştir. Yine farklı bir osteosarkom modeli olan MG63' tede VEGF₁₆₅'in CAIX üzerinde etkisi mRNA düzeyinde doğrulanmıştır. MG63 hücre hattında yine VEGF₁₆₅'in CAXII nin üzerinde etkisi gözlenmiştir.

Sonuç olarak VEGF₁₆₅ uygulanmış Hep3B, Saos-2, MG63 hücre hatlarında CAIX üzerinde Mrna ve protein seviyesinde arttığı gözlemlendi. Bu etki aynı zamanda hipoksiyada regüle olan CAIX içinde benzer bir şekilde devam etmektedir. Bu etki dokuya spesifik değildir. Hem karaciğer kanser hücre hattında hemde kemik kanseri hücre hatlarında gösterilmiştir.

Sitokinler etkilerini hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Bir sitokin hücre yüzey reseptörlerine bağlanır, ve hücre içinde sinyal yollarını aktive ederek etki gösterir. Kanserde ve bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde sitokin kullanılması bu sitokin çalışmalarının önemini daha fazla arttırmaktadır. Kemoterapiye ve radyoterapiye dirençli böbrek kanseri hastalarında ve CAIX ekspresyonunun yüksek olduğu bireylerde IL-2 sitokin tedavisi olumlu yanıt vermiştir. Bu durum sitokin çalışmalarının artmasına neden olmuştur. IL-1 ve IL-4'ün kullanıldığı böbrek kanseri hücre hattı çalışmalarında, CAIX ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir [95] VEGF'in VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 olmak üzere 3 reseptörü vardır. VEGF'in beş ayrı izoformu vardır. Biz çalışmamızda VEGF₁₆₅'i kullandık. VEGF₁₆₅ hem VEGFR1 hemde VEGFR2 'ye bağlanır. VEGFR2 tirozin kinaz ailesine ait bir reseptördür. Tirozin kinazlar aktive olduğunda protein kinazlar tarafından hücre protein fosforilasyonunu kaskadını başlatırlar. Burada hücre protein kaskadı ERK1/2, AKT1, ve p38 MAPK tır. ERK1/2 tirozin ve tirozin kinazdır ve sitoplazmada öncelikle MEK1/2 aktive eder. Daha sonra nükleusa yer değiştirir ve erken cevap genlerinin transkripsiyonunu stimüle eder [96-100]. AKT1 (genellikle protein kinase B (PKB) olarak isimlendirilir.) bir serin ve treonin kinazdır ve hedefi PI3K'dır. MEK1/2, ERK1/2 ve PI3K/AKT1 sinyal yolları ağırlıklı hücre regülasyonu, hayatta kalma, proliferasyon ve migrasyondan sorumlu olan yollarıdır.[101-102]. p38 MAPK serin ve treonin kinazdır MEK3/6 tarafından aktive edilir. p38 MAPK aktivasyonu çevresel stres ve inflamatuvar sitokinler tarafından başlatılır [103]. ERK1/2, AKT1'in aktivasyonu, ve p38 MAPK endotelial FGF2 ve VEGFA stimülasyonu hücre proliferasyonunda ve farklılaşmasında önemli rol oynar. VEGF sitokin ekspresyonu tümörlü dokudaki hipoksi, pH dengesizliği, besin yetersizliği, serbest radikallerin artması ile oluşmaktadır. Biz yaptığımız bu çalışmada VEGF sitokin hangi yolk üzerinde CAIX ekspresyonunu etkilediğini bulmak amacıyla inhibisyon çalışmaları yapıldı. Çeşitli farklı yolk inhibitörleri; MEK-1 inhibitörü yani MAP Kinaz yolağı

inhibitörü, Fosfoinositid 3-kinaz (PI3Ks) inhibitörü, JNK-1,-2, and -3 inhibitörü, protein sentezi inhibitörü kullanıldı. Hep3B hücrelerine uygulanan inhibitörlerden, MEK-1, CAIX mRNA seviyesinde düşüşe neden olmuştur. Fakat hiçbir sitokinin uygulanmadığı hipoksi durumunda MEK-1 inhibitörü uygulandığında CAIX seviyesinde önemli artış olması araştırılmalıdır.

Çalışmanın son basamağında kullanılan sitokine EGF özellikle MG63 hücrelerine dahil edilmiştir. EGF özellikle tirozin kinazlarla çalışan ve hücre proliferasyonunda çok önemli olan bir sitokindir. Kansere ilgili olan CAIX ve CAXII'nin üzerinde etkileri önemlidir. Ve buna göre EGF'nin CAIX ve CAXII'nin üzerinde artış gösterdiği bulundu.

Sonuç olarak CAIX'un farklı sitokinlerle regülasyonu kontrol edildiği bu tez çalışmasında, CAIX'un VEGF₁₆₅ sitokini ile uygulama sonrası hem karaciğer hemde osteosarkom hücre modelinde, hem mRNA hemde protein düzeyinde arttığı ilk defa gösterilmiştir. Bu çalışmalar özellikle kanser tanı ve tedavisinde CAIX ve CAXII'nin etkisi açısından genişletilmelidir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Roskoski J. R., “Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression”, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 62 179–213, (2007).
- [2] Mettouchi, A., “The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis”, *Cell Adhesion & Migration*, 6:6, 528–534, (2012).
- [3] Dvorak, H. F., “Angiogenesis: update”, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3: 1835–1842, (2005).
- [4] Coultas, L., Chawengsaksophak, K., Rossant J., “Endothelial cells and VEGF in vascular development”, *Nature*, 438:937–45, (2005).
- [5] Aghi, M., Chiocca, E.A., “Contribution of bone marrow-derived cells to blood vessels in ischemic tissues and tumors”, *Mol Ther*, 12:994–1005, (2005).
- [6] Carmeliet P, Jain R K. “Molecular Mechanisms And Clinical Applications of Angiogenesis”, *Nature*, 473 2011, 298-307, (2011).
- [7] Christopher, J. D., “Embryonic and Adult Vasculogenesis”, *Birth Defects Research*, (Part C) 69:73–82, (2003).
- [8] Hanahan, D., Folkman, J., “Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis”, *Cell*, 86:353–364, (1996).
- [9] Senger, D.R., Asch, B.B., Smith, B.D., Perruzzi, C.A., Dvorak, H.F., “A secreted phosphoprotein marker for neoplastic transformation of both epithelial and fibroblastic cells”, *Nature*, 302:714–715, (1983).
- [10] Connolly, D.T., Heuvelman, D.M., Nelson, R., Olander J.V., Eppley B.L., Delfino, J.J., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M., Feder, J., “Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis, *J Clin Invest*, 84:1470–1478, (1989a).
- [11] Connolly, D.T., Olander, J.V., Heuvelman, D., Nelson, R., Monsell, R., Siegel, N., Haymore, B.L., Leimgruber, R., Feder, J., “Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells”, *J Biol Chem*, 264:20017–20024, (1989b).
- [12] Cornali, E., Zietz, C., Benelli, R., Weninger, W., Masiello, L., Breier, G., Tschachler, E., Albin, A., Sturzl, M., “Vascular endothelial growth factor regulates

angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma", *Am J Pathol*, 149: 1851–1869, (1996).

[13] Zachary, I., Glik, G., "Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family", *Centre for Cardiovascular Biology and Medicine*, 16;49(3):568-81. (2000)

[14] Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., Ferrara, N., "Dual regulation of vascularendothelial growth factor bioavailability bygenetic and proteolytic mechanisms". *J Biol Chem*. 267:26031–26037, (1992).

[15] Keyt, B. A., Nguyen, H. V., Berleau, L.T., Duarte, C.M., Park, J., Chen, H., Ferrara, N., "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis", *J Biol Chem*. 271: 5638–5646, (1996).

[16] Boocock, C. A., Charnock-Jones, D. S., Sharkey, A. M., McLaren, J., Barker, P. J., Wright, K. A., Twentyman, P. R., Smith, S. K., "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma", *J Natl Cancer Inst*, 87:506–516, (1995).

[17] Roberts, E., Cossigny D. A. F., Quan G. M. Y., "The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Prostate Cancer to the Skeleton", *Hindawi Publishing Corporation Prostate Cancer*, Article ID 418340, (2013).

[18] Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Manseau, E. J., Dvorak, H. F., Senger, D. R., "Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas", *Am J Pathol*, 143:1255–1262, (1993a).

[19] Ellis, L. M., Takahashi, Y., Fenoglio, C. J., Cleary, K. R., Bucana, C. D., Evans, D. B., "Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma", *Eur J Cancer*, 34: 337–340, (1998).

[20] Zhao, J., Roth, J., Bode-Lesniewska, B., Pfaltz, M., Heitz, P. U., Komminoth, P., "Combined comparative genomic hybridization and genomic microarray for detection of gene amplifications in pulmonary artery intimal sarcomas and adrenocortical tumors", *Genes Chromosomes Cancer*, 34:48–57, (2002).

[21] Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E., "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis", *Nature*, 359:843–845, (1992).

- [22] Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L. W., Neufeld, G., Levi, B. Z., “Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor”, *J Biol Chem*, 271:736–741, (1996).
- [23] Mueller, M. D., Vigne, J. L., Minchenko, A., Lebovic, D. I., Leitman, D. C., Taylor, R. N., “Regulation of Angiogenesis Inhibition in Cancer Therapy vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:10972–10977, (2000).
- [24] Grünewald, F. S., Prota, A. E., Giese, A., Ballmer-Hofer, K., “Structure–function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling”, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1804, 567–580., (2010).
- [25] Otrock, Z. K., Makarem, J. A., Shamseddine, A. I., “Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors:”, *Review ‘Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 38 258–268, (2007).
- [26] Zachary, I., Glik, G., “Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family”, *Cardiovascular Research.*, 49, 568–581, (2001).
- [27] Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J. and Claesson, W. L., “VEGF receptor signaling in control of vascular function”, *Nature Reviews Volume*, 359-371, (2006).
- [28] Gaur, U., Aggarwal, B.B., Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily”. *Biochemical Pharmacology*, 66: 1403–1408, (2003).
- [29] Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Tamimoto, Y., Kimoto, Y., Uchino, A., To, K., Harashima, S., Hatta, N., Harada, M., “Mechanisms for Cytotoxic Effects of Anti–Tumor Necrosis Factor Agents on Transmembrane Tumor Necrosis Factor–Expressing Cells Comparison Among Infliximab, Etanercept, and Adalimumab”, *Arthritis & Rheumatism*, 58:1248–1257, (2008)
- [30] Horiuchi, T., Mitoma, S., Harashima, H., T. and Terufumi Shimoda, H., “Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents”, *Rheumatology*, 49:1215–1228, (2010).
- [31] Pócsik, E., Duda, E., Wallach, D., “Phosphorylation of the 26 kDa TNF precursor in monocytic cells and in transfected HeLa cells”, *Journal Inflamm.*, 45(3):152-60. (1995).
- [32] DasGupta, S., Murumkar, R. P., Giridhar, R., Ram Yadav, M., “ Current perspective of TACE inhibitors: A review”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17 :444–459, (2009).

- [33] Rana, K.V., “Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme: Implications for ocular inflammatory diseases”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42, 7,1076–1079, (2010).
- [34] Horiuchi, K., “A Brief History of Tumor Necrosis Factor α – converting Enzyme: An Overview of Ectodomain Shedding”, *The Keio Journal of Medicine*, 62 (1): 29–36, (2013).
- [35] Hansen, R., Thomson, J. M., El-Omar, E. M., Hold, G. L., “The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease”, *J Gastroenterol*, 45:266–276. (2010).
- [36] Vendrell, J., Chacón, M. R., “Tweak: a new player in obesity and diabetes”, *Front. Immunol.*, 30;4:488, (2013).
- [37] Lambertsen, K.L., Biber, K., Finsen, B., “Inflammatory cytokines in experimental and human stroke”, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32, 1677–1698, (2012).
- [38] Tolide-ie, H., Tabatabaee, H. R., Kamali-Sarvestani E., “Association between Tumor Necrosis Factor- α -308 G/A Polymorphism and Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis”, *Iranian Journal of Medical Sciences*, 39(1): 2–10, (2014).
- [39] Kingsley, D. M., “The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms”, *Genes Dev.*, 8, 133-146. (1994).
- [40] Massagué, J., “How cells read TGF- β signals”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1, 169-178. (2000).
- [41] Roberts, A. B. and Wakefield, L. M. (2003) “The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8621-8623.
- [42] Muraoka-Cook, R. S., Dumont, N. and Arteaga, C. L., “Dual role of transforming growth factor β in mammary tumorigenesis and metastatic progression”, *Clin. Cancer Res.*, 11, 937s-943s., (2005).
- [43] Krstic, J., Santibanez, J. F., “Transforming Growth Factor-Beta and Matrix Metalloproteinases: Functional Interactions in Tumor Stroma-Infiltrating Myeloid Cells”. *The Scientific World Journal*. Article ID 521754,14, (2014).
- [44] Sedlakova, O., Svastova, E., Takacova, M., Kopacek, J., Pastorek, J., “Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors”, doi: 10.3389/fphys.2013.00400, (2014).
- [45] Aydoğan, Türkoğlu S., “İnsan Adamts-1 Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu”, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, (63-64) (2012).

- [46] Wang, Q., Hub, D., Rui, Y., Jianga, A., Liua, Z., Huanga, L., “Prognosis value of HIF-1 α expression in patients with non-small cell lung cancer”, *Gene*, 39537; No. of pages: 6; 4C., (2014).
- [47] Smallbone, K., Gatenby, R. A., Gillies, R. J., Maini P. K., Gavaghan. D. J., “Metabolic changes during carcinogenesis: Potential impact on invasiveness”. *Journal of Theoretical Biology* 244 (2007) 703–713
- [48] Fang, S.J., Gillies, D.R., Gatenby, A.R. “Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression”, *Seminars in Cancer Biology*, 18,330-337 (2008)
- [49] Schutter, H.D., Landuyt, W., Verbeken, E., Goethals, L., Hermans, R., Nuyts, S., “The prognostic value of the hypoxia marker CAIX and GLUT1 and the cytokines VEGF and IL6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy + chemotherapy”, *BMC Cancer*, 5:42, (2005).
- [50] Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani F., Leung, S. W., Koos, R. D., Semenza G. L., “Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-inducible Factor 1”, *Molecular and Cellular Biology*., 4604-4613, (1996).
- [51] Kim, S. J., Rabbani, Z.N., Dewhirst M. W., Vujasković, Z., Vollmer, R. T., Schreiber, E. G., Oosterwijk, E., Kelley, M. J., “Expression of HIF-1 α , CAIX, VEGF and MMP in surgically resected non-small cell lung cancer”, *Lung Cancer*, 49, 325-335, (2005).
- [52] Saarnio, J., “Distribution Of Carbonic Anhydrase IX, MN/CA IX, In Normal And Neoplastic Gastrointestinal And Hepatobiliary Tissues”, PH. D. Thesis Departments of Surgery, Anatomy and Cell Biology and Pathology, Oulu University (2000)
- [53] Maren, T. H., “Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition.”, *Physiol. Rev.*, 47,595, (1967).
- [54] Leppilampi, M., “Functional and immunohistological studies on cancer associated carbonic anhydrase IX”, ISSN 0355-3221, Oulu University PRESS (2006)
- [55] Hewett-Emmett D. and Tashian R.E., “Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the CA α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families”. *Mol Phylogenet Evol.*, 5: 50-77. (1996).
- [56] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Juvonen, T., Waheed, A., Sly, W.S., Saarnio, J., Kaunisto, K., Kellokumpu, S., Rajaniemi, H., “Membrane-bound carbonic anhydrase IV is expressed in the luminal plasma membrane of the human gallbladder epithelium”, *Hepatology*., 24: 1104-1108, (1996).

- [57] Ivanov, S., Liao, S.Y., Ivanova, A., Danilkovitch-Miagkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., “Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer”, *Am J Pathol.*, 158:905–19, (2001).
- [58] Chrastina, A., Zavada, J., Parkkila, S., Kaluz, S., Kaluzova, M., Rajcani, J., et al. “Biodistribution and pharmacokinetics of 125I-labeled monoclonal antibody M75 specific for carbonic anhydrase IX, an intrinsic marker of hypoxia, in nude mice xenografted with human colorectal carcinoma”. *Int J Cancer.*;105:873–81, (2003).
- [59] Pastorek, J., Pastorekova, S., Callebaut, I., Mornon, J.P., Zelnik, V., Opavsky, R., “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, (1994).
- [60] Opavsky, R., Pastorekova, S., Zelnik, V., Gibadulinova, A., Stanbridge, E.J., Zavada, J., “Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships”, *Genomics.*, 33:480–7, (1996).
- [61] Pastoreková, S., Zavadová, Z., Kostal, M., Babusikova, O. and Závada, J., “A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system”, *Virology*, 187: 620-626. (1992).
- [62] Pastoreková, S., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Opavský, R., Zelnik, V., Saarnio, J. and Pastorek, J., “Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts”, *Gastroenterology*, 112: 398-408, (1997).
- [63] Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Waheed, A., Casey, M. C., Zhou, Z. Y., Pastoreková, S., Pastorek, J., Karttunen, T., Haukipuro, K., Kairaluoma, M. I. and Sly, W. S., “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. (1998b).
- [64] Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Haukipuro, K., Pastoreková, S., Pastorek, J., Kairaluoma, M. I. and Karttunen, T.J., “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, (1998a).
- [65] Liao, S.Y., et al. “ Identification of the Mn antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas”., *Am. J. Pathol.*, 145 3598–609, (1994).
- [66] Liao, S.Y., et al., “Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic

biomarker of clear cell carcinoma of the kidney”, *Cancer Res.*, 57 (14) 2827–2831. (1997).

[67] Chia, S.K., et al., “Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma, *J. Clin. Oncol.* 19 (16) 3660–3668, (2001).

[68] Pastoreková, S., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Opavský, R., Zelnik, V., Saarnio, J. and Pastorek, J. “Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts”, *Gastroenterology*, 112: 398-408, (1997).

[69] Ivanov, S., Liao, S.Y., Ivanova, A., Danilkovitch-Miagkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., Merrill, M. J., Proescholdt, M. A., Oldfield, E.H., Lee, J., Závada, J., Waheed, A., Sly, W., Lerman, M. I. and Stanbridge, E.J., “Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer”. *Am J Pathol.*, 158: 905-919, (2001).

[70] Haapasalo, J. A., Nordfors, K. M., Hilvo, M., Rantala, I. J., Soini, Y., Parkkila, A. K., Pastoreková, S., Pastorek, J., Parkkila, S. M., Haapasalo, H. K., “Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis”, *Clin. Cancer Res.*, 12 (2) 473–477, (2006).

[71] Måseide, K., Kandel, R. A., Bell, R. S., Catton, C. N., O'Sullivan, B., Wunder, J. S., Pintilie, M., Hedley, D., Hill, R. P., “Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma”, *Clin. Cancer Res.*, 10 (13) 4464–4471, (2004).

[72] Loncaster, J.A., Harris, A. L., Davidson, S. E., Logue, J. P., Hunter, R. D., Wycoff, C. C., Pastorek, J., Ratcliffe, P. J., Stratford, I. J., West, C. M., “Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix”, *Cancer Res.*, 61 (17) 6394–6399. (2001)

[73] Jonathan, R. A., Wijffels, K. I., Peeters, W., Wilde, P.C., Marres, H.A., Merckx, M. A., Oosterwijk, E., Kogel, A. J., Kaanders, J. H., “The prognostic value of endogenous hypoxia-related markers for head and neck squamous cell carcinomas treated with Arcon”, *Radiother. Oncol.* ,79 (3) 288–297, (2006).

[74] Bui, M. H., Seligson, D., Han K. R., Pantuck, A. J., Dorey, F. J., Huang, Y., Horvath, S., Leibovich, B. C., Chopra, S., Liao, S. Y., Stanbridge, E., Lerman, M. I., Palotie, A., Figlin, R. A., Belldegrun, A. S., “Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy”, *Clin. Cancer Res.* , 802–819, (2003).

[75] Kopacek, J., Barathova, M., Dequiedt, F., Sepelakova, J., Kettmann, R., Pastorek, J., Pastorekova, S., “MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX”. *Biochimica et Biophysica Acta.* , 1729 41– 49, (2005).

- [76] Kaluz, S., Kaluzová, M., Liao, S. Y., Lermanc, M., Stanbridge, E. J., “Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? ”, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1795, 162–172, (2009).
- [77] Turner, K. J., Crew, J. P., Wykoff, C. C., Watson, P. H., Poulson, R., Pastorek, J., Ratcliffe, P. J., Cranston, D. and Haris, A. L., “The hypoxia-inducible genes VEGF and CAIX are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer”, *British Journal of Cancer*, 86, 1276-1282, (2002).
- [78] Kaluz, S., Kaluzova, M., Opavsky, R., Pastorekova, S., Gibadulinova, A., Dequiedti, F., Kettmann, R. and Pastorek, J., “Transcriptional Regulation of the *MN/CAIX* Gene Coding for the Tumor-associated Carbonic Anhydrase”. *The Journal of Biological Chemistry* , 274 . 32588–32595, (1999).
- [79] Turner, K. J., Crew, J. P., Wykoff, C. C., Watson, P. H., R Poulson, J Pastörek, PJ Ratcliffe, D Crantson, AL Haris., “The Hypoxia -inducible genes VEGF and CA9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer”. *British Journal of Cancer*, 86,1276-1282, (2002).
- [80] Syrjanen, L., Luukkaala, T., Leppilampi, M., Kallioinen, M., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, S.W., Kartunnen, T., “Expression of cancer-related carbonic anhydrases IX and XII in normal skin and skin neoplasm”. 10.1111/apm.12251,(2014).
- [81] Bernet, H. D., Sheng, S., Charn, H.T., Waheed, A., Sly, W.S., Lin C. Y., Liu C. Y., Katzenelenbogen, S. B., “Estrogen Reseptor Regulation of Carbonic Anyhidrase XII though a Distal Enhancer in Breast Cancer”. *Canser Resarch.*, 68:3505-35152008
- [82] Tureci, Ö., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Gottert, E., Seitz, G., Parkkila, A. K., Shahi, G. N., Grubbi, H. J., Pfreundschuh, M., Sly, W. S., “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. USA*, Vol. 95, pp. 7608–7613, (1998).
- [83] Ulmasov, B., Waheed, A., Shah, G. N., Grubb, J. H., Sly, W. S., Tu, C., Silverman, D. N., “Purification and kinetic analysis of recombinant CA XII, a membrane carbonic anhydrase overexpressed in certain cancers”, *PNAS* , .97 ;26,14212–14217 (2000).
- [84] Watson, P. H., Chia, S. K., Wykoff, C. C., Han, C., Leek, R. D., Sly, W. S., Gatter, K. C., Ratcliffe, P. and Harris, A. L., “Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma”, *British Journal of Cancer*, 88, 1065 – 1070, (2003).
- [85] Franchi, M., Vullo, D., Lallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Supuran C T. (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.* Vol 18(4) pp 333-338,

[86] Türeci, Ö., Sahin, U., Vollmar, E. *et al.*, "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. USA*, 95, 7608–7613, (1998).

[87] Drummond, F. J., Sowden, J., Morrison, K., Edwards, Y. H., "Colon carbonic anhydrase 1: transactivation of gene expression by the homeodomain protein Cdx2. *FEBS Letters.*, 423; 218-222, (1998).

[88] Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., Millhorn, D.E., "Cobalt inhibits the interaction between Hypoxia-inducible Faktor-a and von Hippel-Lindau protein by Direct Binding to Hypoxia-Inducible Factor", *The Journal of Biological Chemistry.* 278;18;15911-15916, (2003).

[89] Gaur, U. B., Aggarwal, B., "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily", *Biochemical Pharmacology.* 66: 1403–1408, (2003).

[90] Bradley, J. R., "TNF-mediated inflammatory disease". *Journal Pathology.*, 214(2):149-60, (2008).

[91] Julia, B., Cordero, J., Macagno, P., Rhoda, K., Stefanatos, Strathdee, K. E., Cagan, R. L., Vidal, M., "Oncogenic Ras Diverts a Host TNF Tumor Suppressor Activity into Tumor Promotor"., *Dev. Cell.* ,15;18(6):999-1011, (2010).

[92] Knight, B., Yeoh, G. C., Husk, K. L., Ly, T., Abraham, L. J., Yu, C., "Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice". *Journal Exp. Med.*, 192:1809–1818, (2000).

[93] Liu Z, Hsu H, Goeddel D V, Karin M.1996. "Dissection of TNF Receptor 1 Effector Functions: JNK Activation Is Not Linked to Apoptosis While NF- κ B Activation Prevents Cell Death. 87, 565–576

[94] Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S. , "NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer", *Nature*, 431:461–466, (2004).

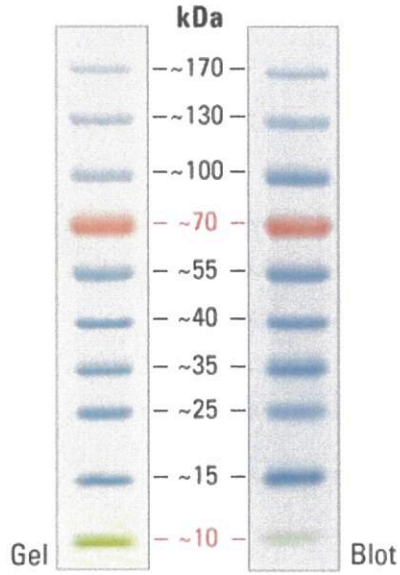
[95] Kou, X., Jing, Y., Deng, W., Sun, K., Han, Z., Ye, F., Yu, G., Fan, Q., Gao, L., Zhao, Q., Zhao, X., Li, R., Wei, L., Wu, M., "Tumor necrosis factor- α attenuates starvation-induced apoptosis through upregulation of ferritin heavy chain in hepatocellular carcinoma cells". *BMC Cancer*, 13:438, (2013).

[96] Abolhassani, M., Chiao, J. W., "Antiproliferative Effect of a Prostatic Cell-derived Activity on the Human Androgen-dependent Prostatic Carcinoma Cell Line LNCaP", *J Interferon Cytokine Res.*, 15 (2), 179-85, (1995).

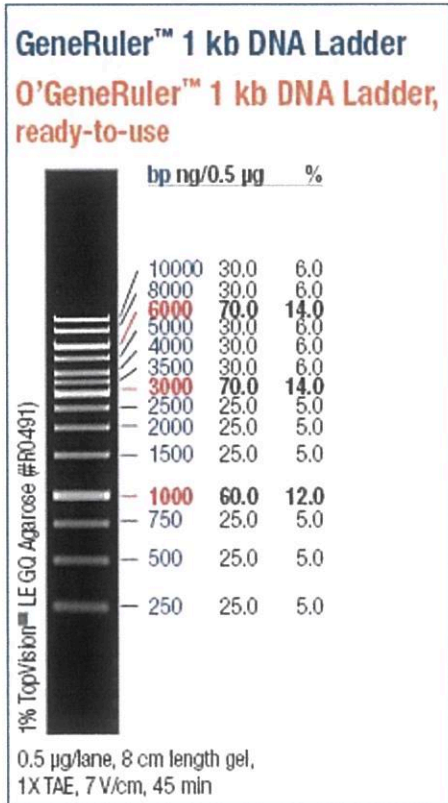
- [97] Cobb, M.H., “MAP kinase pathways. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 71:479–500, (1999).
- [98] Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L. “VEGF-receptor signal transduction”, *Trends in Biochemical Sciences*, 28:488–494, (2003).
- [99] Gille, H., Kowalski, J., Yu, L., Chen, H., Pisabarro, M.T., Davis-Smyth, T., Ferrara, N., “A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration”, *EMBO Journal*, 19:4064–4073, (2000).
- [100] Davis, R. J., “The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway”, *Journal of Biological Chemistry*, 268:14553–14556, (1993).
- [101] Blumer, K.J., Johnson, G.L., “Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways”, *Trends in Biochemical Sciences*, 19:236–240, (1994).
- [102] Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., Huot, J., “ p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells”, *Oncogene*, 15:2169–2177, (1997).
- [103] Vivanco, I., Sawyers, C. L., “The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer”, *Nature Review Cancer*, 2:489–501, (2002).
- [104] Kyriakis, J. M., Avruch, J., “Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines”. *Bioessays*, 18:567–577, (1996).
- [105] Yıldırım, H., Köçkar F., “TGF- β regulates tumor-associated carbonic anhydrase IX gene expression in Hep3B cells”, *Cell Biology International*, 33:1002–1007, (2009).
- [106] Yıldırım, H., Köçkar F., “Bazı Sitokinlerin Hep3B Hücrelerinde CA9 Ekspresyonuna Etkilerinin Belirlenmesi”, *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2 (2): 79-84, (2009).

EKLER

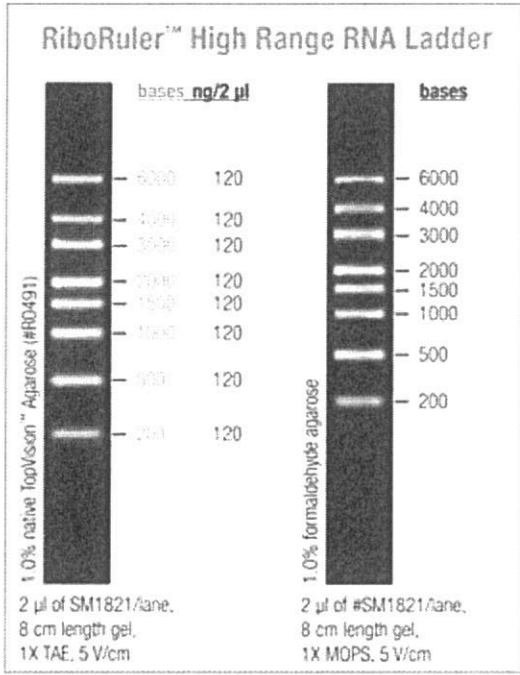
6. EKLER



Şekil 5.1 Protein büyüklük belirteci



Şekil 5.2 Fermantas 1kb DNA belirteci



Şekil 5.3:RNA büyüklük belirteci.