

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



KARACİĞER (HEP3B), PROSTAT (PC3) VE MEME (MCF7)  
KANSERİ HÜCRE HATLARINDA TGF- $\beta$  VE TNF- $\alpha$   
SİTOKİNLERİNİN TÜMÖR İLİŞKİLİ CAIX VE CAXII  
EKSPRESYONUNA ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLİNAY SELÇUK

BALIKESİR, ARALIK - 2011

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Gülinay SELÇUK tarafından hazırlanan “KARACİĞER (HEP3B), PROSTAT (PC3) VE MEME (MCF7) KANSERİ HÜCRE HATLARINDA TGF- $\beta$  VE TNF- $\alpha$  SİTOKİNLERİNİN TÜMÖR İLİŞKİLİ CAIX VE CAXII EKSPRESYONUNA ETKİLERİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 15.11.2011 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği /oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

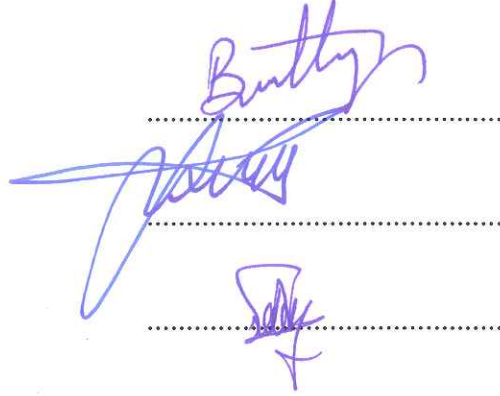
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Üye  
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Üye  
Prof. Dr. Nevin ERENŞOY

The image shows three handwritten signatures in blue ink, each placed above a horizontal dotted line. The first signature is the most prominent and appears to be 'Hatice Yildirim'. The second signature is less legible but appears to be 'Feray Köçkar'. The third signature is also less legible but appears to be 'Nevin Erenşoy'.

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Hilmi NAMLI

.....

**Bu tez Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
2011/16 ve TÜBİTAK 110T044 numaralı araştırma projeleri tarafından  
desteklenmiştir.**



## ÖZET

**KARACİĞER (HEP3B), PROSTAT (PC3) VE MEME (MCF7) KANSERİ  
HÜCRE HATLARINDA TGF- $\beta$  VE TNF- $\alpha$  SİTOKİNLERİNİN TÜMÖR  
İLİŞKİLİ CAIX VE CAXII EKSPRESYONUNA ETKİLERİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GÜLİNAY SELÇUK  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. HATİCE YILDIRIM)  
BALIKESİR, ARALIK - 2011**

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle de bir halk sorunu durumundadır. Anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve yayılması olarak tanımlanan kanser vücuttaki tüm doku ve organları etkilemektedir. Çinko içeren karbonik anhidraz enzimleri, gaz değişimi, iyon transportu ve asit-baz dengesinin sağlanması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli rol oynayan enzimlerdir. Memelilerde bulunan ve enzimatik olarak aktif olan 15 farklı CA izoenzimi tespit edilmiştir ve bu enzimlerin görevi canlılarda CO<sub>2</sub> molekülünün hidrasyonunu ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonunun dehidrasyonunu katalizlemektir. CAIX izoenzimi tümörlü hücrelerin hücre içi ve hücre dışı pH düzenlenmesini sağlayarak hipoksik ve asidik koşullara adaptasyonunu sağlar. Özellikle katı tümörlerdeki CAIX ekspresyonu, tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermesi nedeniyle bu enzimin biyobelirteç olarak kullanılmasına izin vermektedir. CAXII izoenzimi tümörlü hücrelerde aktivitelerini gösteren buna bağlı olarak da kanserle ilişkili olan izoenzimdir. CAXII izoenziminin varlığı ilk olarak renal kanserde bulunmuş, daha sonra ise diğer kanser türlerindeki ekspresyonları da belirlenmiştir. Buna göre pankreas, prostat, testis, akciğer, beyin, normal endometrium hücreleri, over hücreleri ve epididimis kanalı hücrelerinde CAXII ekspresyonu görülmektedir.

Çalışmamız kapsamında, üç farklı hücre hattında iki farklı sitokinin CAIX ve CAXII gen ekspresyonu üzerine etkileri hem mRNA hem de protein düzeyinde gösterilmiştir. 72 saat sonunda, 10, 100, 200, 500 u/ml TNF- $\alpha$  uygulanan PC3 hücrelerinde CAIX ekspresyonu incelendiğinde; CAIX'un ekspresyonunda, hem protein hem de mRNA düzeyinde azalış gözlemlendi. Benzer şekilde CAXII ekspresyonunda, hem protein hem de mRNA düzeyinde düşüş belirlenmiştir. Yine 72 saatin sonunda, 10, 100, 200, 500 u/ml TGF- $\beta$  uygulamasının ise PC3 hücrelerindeki CAIX ve CAXII mRNA seviyesinde azalmaya neden olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. MCF7 hücreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, TNF- $\alpha$  uygulaması MCF7 hücrelerinde CAIX mRNA seviyesinde azalmaya neden olduğu ve bu değişimin protein seviyesindeki değişimler ile paralellik gösterdiği bulunmuştur. Hep3B hücreleriyle yapılan çalışmalar sonucunda ise 72 saat zaman aralığında TNF- $\alpha$ 'nın mRNA verileri ile uygun olacak şekilde CAXII protein seviyesinde düşüşe neden olduğu bulunmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Karbonik Anhidraz, CAIX, CAXII, mRNA, HEP3B Hücre Hattı, MCF7 Hücre Hattı, PC3 Hücre Hattı, Ekspresyon, Sitokin.



## ABSTRACT

### EFFECTS OF TGF- $\beta$ AND TNF- $\alpha$ ON THE EXPRESSION OF TUMOUR-RELATED CAIX AND CAXII IN HEP3B (HUMAN HEPATOMA), PC3 (HUMAN PROSTATE CANCER) AND MCF7 (HUMAN BREAST ADENOCARCINOMA) CELL LINES

MSC THESIS

GULINAY SELCUK

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. HATICE YILDIRIM)

BALIKESİR, DECEMBER 2011

Cancer is the one of the most important health problem of today's and because of the high death risk and being so widespread, it has become to public health disease. Cancer is described as uncontrolled cell proliferation and invasion, it effects all the tissues and organs of the body. Zinc containing carbonic anhydrase enzymes have important roles in different physiological processes as gas exchange, ion transport and acid-base balance. There are 15 different enzymatically active CA isoforms in mammalian and the role of these enzyme is catalysis of the hydration of CO<sub>2</sub> molecule and dehydration of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ions. CAIX is related to tumour metabolism, that exerts its biological effects to adaptation of hypoxia and asidification in tumour cells, via its influence on regulation of intracellular and extracellular pH. The expression pattern of CAIX in solid tumours has led to use of CAIX as a biomarker, since it can provide evidence about tumour identification and prognosis. CAXII is a transmembrane enzyme that is associated with tumour because of its expression in tumour cells. Carbonic anhydrase XII was originally identified in human renal cancer cells and after that, expression patterns of the CAXII in other cancer cells has been evaluated. CAXII expression positive regions are pancreas, colon, prostate, ovaries, testicles, lung, brain, normal endometrial cells and epididymis duct cells.

In this study, we have evaluated the effects of two different cytokines on the expression of tumour-related CAXII and CAIX at mRNA and protein levels in three different cell lines. Treatment of PC3 cell line for 10, 100, 200, 500 u/ml TNF- $\alpha$  72 h resulted decrease in CAIX mRNA and protein levels. With same consantrations TGF- $\beta$  treatment, also decrease the CAXII mRNA levels but this decreasing level was not significantly important. Experiments with MCF7 cell line showed that TNF- $\alpha$  treatment decreased mRNA and protein levels of CAIX. Hep3B cells treated with TNF- $\alpha$  for 72 h also showed that mRNA levels of CAXII decreased in paralel to protein levels of CAXII.

**KEYWORDS:** Carbonic Anhydrase, CAIX, CAXII, mRNA, HEP3B Cell Line, MCF7 Cell Line, PC3 Cell Line, Expression, Cytokine.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Kanser Nedir?.....	2
1.2 Hücre Siklusu .....	3
1.2.1 Hücre Döngüsü ve Sinyal İletimi.....	4
1.2.2 Hücre Döngüsü Kontrolü ve Kontrol Noktaları .....	5
1.2.3 Siklinler.....	6
1.2.3.1 Proto-onkogenler.....	8
1.2.3.2 RAS Proto-onkogeni .....	9
1.2.3.3 Siklin D1 ve Siklin E .....	9
1.3 Tümör Baskılayıcı Genler .....	10
1.3.1 p53 Tümör Baskılayıcı Gen.....	11
1.3.2 RB1 .....	12
1.4 Bir Hücre Neden Kanser Hücresine Dönüşür?.....	13
1.5 Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri .....	14
1.6 Kanseri Meydana Getiren Etkenler .....	16
1.7 Karbonik Anhidrazlar.....	17
1.7.1 Alfa Karbonik Anhidrazlar .....	20
1.7.2 CAIX ve CAXII.....	21
1.8 Sitokinler .....	25
1.8.1 TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor - Beta).....	26
1.8.2 TNF- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor - Alpha).....	28
1.9 Amaç .....	30
2. MATERYAL VE METOD .....	31
2.1 Çalışmalarda Kullanılan Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu .....	31
2.2 Hücre Kültürü Teknikleri .....	31
2.2.1 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması .....	31
2.2.2 FCS Hazırlanması .....	31
2.2.3 PBS Tampon Çözeltilisinin Hazırlanması .....	32
2.2.4 Hücre Soylarının Başlatılması .....	32
2.2.5 Hücrelerin Büyütülmesi.....	32
2.2.6 Hücrelerin Pasajlanması .....	32
2.2.7 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı .....	33
2.2.8 Hücrelerin Sıvı Azotta Saklanması.....	33
2.2.9 Serum Açlığının Oluşturulması ve Sitokin Uygulaması.....	34
2.3 RNA İlişkili Teknikler.....	34
2.3.1 Total RNA İzolasyonu .....	34
2.3.2 Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonları (RT-PCR) .....	35



2.3.3	cDNA Sentezi (RT) .....	35
2.3.4	Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR) ve Optimizasyonları .....	35
2.3.5	Real Time PZR Analizleri .....	36
2.3.6	Primer Tasarımı .....	37
2.4	Protein İlişkili Teknikler .....	38
2.4.1	Western Blot Analizi .....	38
2.4.1.1	LB Kullanılarak Protein Ekstraktlarının Hazırlanması .....	38
2.4.1.2	SDS Page.....	39
2.4.1.3	Western Blot.....	39
2.4.1.4	Proteinlerin Belirlenmesi .....	39
2.5	İstatistiksel Analiz .....	40
<b>3.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>41</b>
3.1	mRNA Düzeyinde Ekspresyon Çalışmaları .....	41
3.1.1	Hep3B Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkileri....	41
3.1.2	MCF7 Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkileri ....	44
3.1.3	PC3 Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkileri .....	47
3.2	Protein Düzeyinde Ekspresyon Analizi.....	49
3.2.1	Hep3B Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkileri....	50
3.2.2	PC3 Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkileri .....	51
3.2.3	MCF7 Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkileri ....	52
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>62</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1: Hücre Siklusu.....	3
Şekil 2:Balkanlar ve Türkiye genelinde teşhis edilen kanser dağılımı .....	17
Şekil 3:Karbonik Anhidraz ailesi Üyelerinin Hücredeki Dağılımı .....	21
Şekil 4:CAXII izoenziminin yapısı ve bölümleri.....	24
Şekil 5:CAIX izoenziminin yapısı ve bölümleri.....	24
Şekil 6:TGF-Beta yolağı .....	27
Şekil 7:TNF-Alfa yolağı .....	29
Şekil 8:Hemositometre lamı.....	33
Şekil 9:Çalışmada kullanılan hücre hatları .....	34
Şekil 10:Hep3B hücre hattında TNF-Alfa'nın CAIX ekspresyonuna etkisi.....	42
Şekil 11:Hep3B hücre hattında TNF-Alfa'nın CAXII ekspresyonuna etkisi ...	43
Şekil 12:Hep3B hücre hattında TGF-Beta'nın CAIX ekspresyonuna etkisi ....	43
Şekil 13:Hep3B hücre hattında TGF-Beta'nın CAXII ekspresyonuna etkisi ...	44
Şekil 14:MCF7 hücre hattında TNF-Alfa'nın CAIX ekspresyonuna etkisi.....	45
Şekil 15: MCF7 hücre hattında TNF-Alfa'nın CAXII ekspresyonuna etkisi ...	45
Şekil 16: MCF7 hücre hattında TGF-Beta'nın CAIX ekspresyonuna etkisi ....	46
Şekil 17: MCF7 hücre hattında TGF-Beta'nın CAXII ekspresyonuna etkisi ...	46
Şekil 18: PC3 hücre hattında TNF-Alfa'nın CAIX ekspresyonuna etkisi .....	47
Şekil 19: PC3 hücre hattında TNF-Alfa'nın CAXII ekspresyonuna etkisi.....	48
Şekil 20: PC3 hücre hattında TGF - $\beta$ 'nın CAIX ekspresyonuna etkisi .....	48
Şekil 21: PC3 hücre hattında TGF - $\beta$ 'nın CAXII ekspresyonuna etkisi .....	49
Şekil 22: HEP3B-TGF uygulamasının protein ekspresyon seviyesi.....	50
Şekil 23: HEP3B-TNF uygulamasının protein ekspresyon seviyesi.....	50
Şekil 24: HEP3B hücre hattında Western Blot Görüntüleri.....	51
Şekil 25: PC3-TGF uygulamasının protein ekspresyon seviyesi .....	51
Şekil 26: PC3-TNF uygulamasının protein ekspresyon seviyesi.....	52
Şekil 27: PC3 hücre hattında Western Blot Görüntüleri.....	52
Şekil 28:MCF7 hücrelerinin Protein Ekspresyon seviyesi etkileri .....	53
Şekil 29:MCF7 hücrelerinin Western Blot görüntüsü .....	53

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 1:Kullanılan spesifik primerlerin dizileri ve uzunlukları.....	36
Tablo 2:Real Time PCR için Kullanılan Program .....	37
Tablo 3:Western Blot için kullanılan solusyonlar.....	38
Tablo 4:Hep3B hücre hattında yapılan tüm Real Time PCR Analizleri.....	57
Tablo 5:Hep3B hücre hattında yapılan tüm Western Blot Analizleri.....	58
Tablo 6:PC3 hücre hattında yapılan tüm Real Time Analizleri.....	59
Tablo 7:PC3 hücre hattında yapılan tüm Western Blot Analizleri .....	59
Tablo 8:MCF7 hücre hattında yapılan tüm Real Time PCR Analizleri.....	60
Tablo 9:MCF7 hücre hattında yapılan tüm Western Blot Analizleri.....	61

## 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
CDKs	:	Siklin Bağımlı Kinazlar
GTP	:	Guanozintrifosfat
RB	:	Retinoblastoma
pRB	:	Retinoblastoma proteini
RCC	:	Böbrek Hücre Karsinoması (Renal Cell Carcinoma)
ATP	:	Adenozintrifosfat
bp	:	Baz çifti (Base pair)
Kb	:	Kilo baz
cDNA	:	Komplementer DNA (Complementary DNA)
CO <sub>2</sub>	:	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
EtBr	:	Etidyum Bromid
TGF	:	Transforme edici büyüme faktörü
TNF	:	Tümör nekroz faktör
IL	:	İnterlökin
IFN	:	İnterferon
gDNA	:	Genomik DNA
TF	:	Transkripsiyon Faktörü
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen peroksit
FBS	:	Doğmamış dana serumu (Fetal Bovine Serum)
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleikasit (Messenger Ribonucleic acid)
MAPK	:	Mitojen aktive protein kinaz
JAK	:	Janus Kinaz (Janus Kinase)
O <sub>2</sub>	:	Oksijen molekülü
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RNA	:	Ribonükleikasit
RT-PCR	:	Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Taq	:	Thermus aquaticus
UV	:	Ultra viole



## ÖNSÖZ

Canım Kardeşim Nilay Selçuk'a...

Hayat masalımın tek kahramanı Babam Hüseyin SELÇUK'a...

Arkadaşım, Sırdaşım, Yoldaşım, Annem Şahinaz Şahika Selçuk'a...

Hayatım boyunca bana verdikleri sonsuz, tarifsiz, emsalsiz sevgi ve destekten dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, deneyimleriyle beni yönlendiren, değerli zamanımı ayıran, her türlü konuda sabırla dinleyerek, destekleyen danışman hocam Yrd. Doç Dr. Hatice YILDIRIM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ders ve laboratuvar aşamasında deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım, Prof. Dr. Feray KÖÇKAR ve Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam için gerekli, laboratuvar imkanlarını sağlayan BÜTAM Müdürlüğü'ne ve bu merkezde görev alan diğer çalışanlara teşekkür ederim.

Çalışmamda deneyimlerini, özveri ve desteğini esirgemeyen Dr. Rahşan ILIKÇI SAĞKAN'a teşekkür ederim.

Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Röntgen Laboratuvarı'nda Western Analizlerini görüntüleme de yardım, destek ve rehberliklerini esirgemeyen Radyoloji Teknikerleri Ayşen DOĞAN ve Yunus YILMAZ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımı yürütürken deneyimlerinden yararlandığım Araş. Gör. Meltem ALPER'e sabır ve sevgi dolu öğretmenliği için, Araş. Gör. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU'na bizlerden yardımlarını ve desteğini esirgemediği için çok teşekkür ederim.

Zincirin son halkaları Merve KARAMAN'a bu meşakkatli yolda bana sabırla katlandığı için ve Serhad ONAT'a istemsiz olarak kesintisiz neşe kaynağımız olduğu için çok teşekkür ederim...

Yol arkadaşlarım, Tuğşen AYDEMİR, Derya OKUYAN, Esra TOKAY, Feyzullah TOKAY ve canım arkadaşım Kerem TOKAY'a sonsuz sevgi ve teşekkürler...

## 1. GİRİŞ

Şehirleri bir süre boyunca kuşatan, savunması zayıf olanları ele geçiren, fakat geride hala fethedilmemiş direniş adaları bırakan bir ortaçağ ordusu gibi bilimciler, tamamen, kendi yöntemlerinin işlediği sorunları ele alırlar. Pratiğini yaptığımız bilim kendi yöntemleri ve kavramlarının elverişli olduğu sorunları çözer ve başarılı bilimciler sadece çözülmesi muhtemel sorunlar önermeyi kısa sürede öğrenirler. Görece kolay olan sorunlarla uğraşlarındaki kuşku vermeyen başarılarına işaret edip, sonra da, aynı yöntemlerin daha zor olanlar üzerinde sonunda zafer kazanacağına bizi ikna ederler. Eğer DNA dizisinin belirlenmesi protein yapısı hakkındaki bilginin hücrede nasıl saklandığı sorununu çözmüşse, o zaman bazı moleküllerin yapısının belirlenmesi, belki de DNA'nın kendisi, sosyal yapıya ilişkin bilginin beyinde nasıl depolandığı sorununu kuşkusuz çözecektir.

Elbette, protein yapısına ilişkin bilginin tamamı DNA dizisinde depolanmaz; çünkü polipeptitlerin katlanıp proteinlere dönüşmesi tamamen onların aminoasit dizileriyle belirlenmez. Bu gerçek yaygın olarak göz ardı edilir, çünkü normal hücrelerin fizyolojik koşulları altındaki katlanma emsalsiz bir olaydır. Bununla birlikte, hücreler normal dışı durumlara sahip olduğunda ya da insan genleri sıvı kültürde büyüyen mikroorganizmalara konulduğunda, katlanma süreci farklı ürünler verebilir; çünkü bir proteinin “doğru” olan nihai yapısı, dışsal koşullar elverişli olmadığında oluşmayacak olan, doğru katlanma ara-moleküllerinin meydana gelmesine bağlıdır. Aslında, protein katlanması kurallarının ne olduğunu bilmemekteyiz; bu yüzden şu ana dek hiç kimse bir polipeptitteki aminoasit dizilimini alıp molekülün katlanmasını tahmin edecek bir bilgisayar programı yazmayı başaramamıştır. Hatta, proteindeki bölgelerin alfa-heliksler ve beta-pileliler gibi belli başlı yapısal sınıflara katlanmasını son derece kaba biçimde karakterize etmeye çalışan programların güvenilirliği %75'ten fazla değildir. Buradaki güçlük, onlardan yapılmış olsa bile, bir proteinin, aminoasitlerden ibaret bir sicim olmamasıdır. Kısmi katlanma sürecinde değişen kendine has titreşimsel ve üç boyutlu sterik özelliklere sahip, benzersiz bir moleküldür o. Sonuç olarak serbest enerjiyi düşüren süreç, hareketli bir hedefi kovalamaktadır. Moleküler biyologlar



protein yapısının saptanmasına ilişkin bu ihmale genellikle dikkati çekmezler, onun yerine DNA'nın proteinleri yaptığı mistik dönüşümünü tekrarlayıp dururlar[1]. İşte bu durumun dışında kalan gizemin nedenleri arasında bugün bilim dünyasının ayağına hala takılmaya devam eden ana problem KANSER'dir.

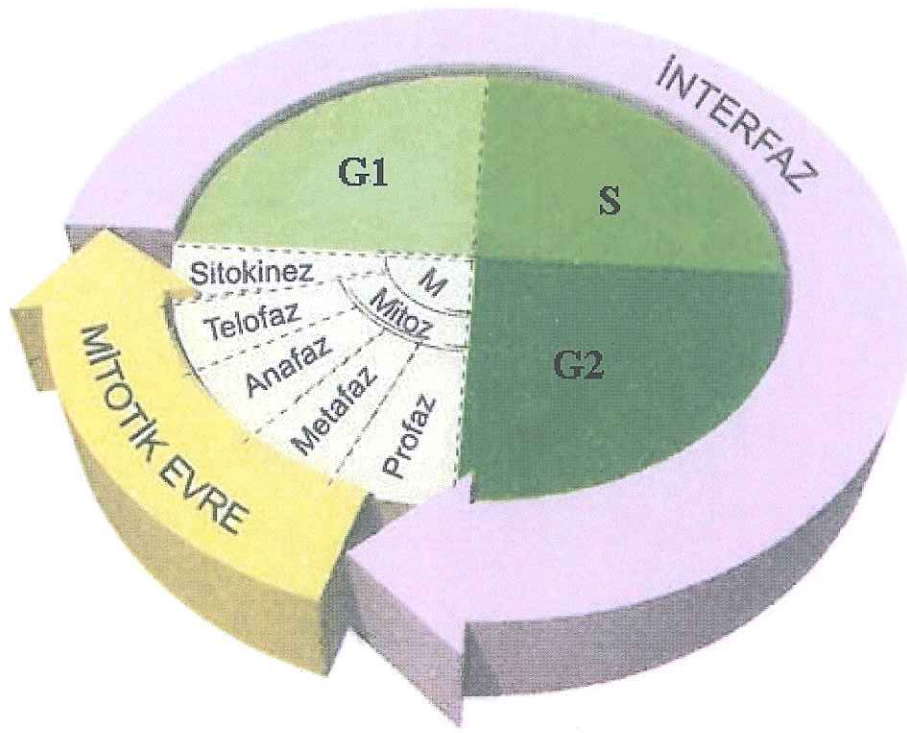
## 1.1 Kanser Nedir?

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Günde vücudumuzda (DNA'da) yaklaşık 10.000 mutasyon olmasına rağmen bağışıklık sistemimiz her milisaniye vücudumuzu tarar ve kanserli hücreleri yok eder. Sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Fakat bu yetenekleri de sınırlıdır. Sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre ne zaman ve nerede bölünebileceğini bilme yeteneğine sahiptir. Buna karşın kanser hücreleri, bu bilinci kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Kanser hücreleri toplanarak tümörleri oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına **metastaz** adı verilir. Kanserler oluşmaya başladıkları organ ve mikroskop altındaki görünüşlerine göre sınıflandırılırlar. Farklı tipteki kanserler, farklı hızlarda büyürler, farklı yayılma biçimleri gösterirler ve farklı tedavilere cevap verirler [2]. Bu konuda hücre siklusu dikkatle incelenmesi gereken bir döngüdür.



## 1.2 Hücre Siklusu

Normal dokularda çoğalan hücre sayısı organizmanın ihtiyaçlarının bir fonksiyonudur. Azaltılmış hücre çoğalması ya da artmış hücre ölüm hızı herhangi bir aşırı artışı önler [3]. Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazdan geçer ve hem dış, hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler (bir hücreye malign fenotipik özellik kazandıran genler) ve hücre döngüsüne özgü proteinler hücre döngüsü boyunca senkronize bir şekilde aktifleştirilir ve ardından inaktifleştirilir.



Şekil 1: Hücre Siklusu [4].

Siklusta; G0 fazında, hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek için programlanır. G1 fazında ise spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Ayrıca DNA sentezi için gereken birçok enzim sentezlenir. S fazında hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır. G2 fazında ise DNA sentezi durur, RNA ve protein sentezi devam eder. M (mitoz) fazında, protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır [5,6,7].

### 1.2.1 Hücre Döngüsü ve Sinyal İletimi

Bir hücre bölünmesinden diğerine kadar geçen süreçte meydana gelen olaylar hücre döngüsünü oluşturur. Hücre döngüsünün interfaz aşaması, mitotik bölünmeler arasındaki süreçtir. Bu arada, hücre büyür ve DNA' sını kopyalar. G1 sırasında hücre, DNA kopyalaması için gerekli olan enzim ve molekülleri biriktirerek DNA sentezi için hazırlık yapar. G1' i hücrenin kromozomal DNA' sının kopyalandığı S fazı izler. G2 sırasında hücre büyümeye ve bölünmeye hazırlanmaya devam eder. M fazı sırasında, çoğalmış olan kromozomlar yoğunlaştırılır, kardeş kromozomlar zıt kutuplara ayrılır ve hücre ikiye bölünür.

G1'in erken safhalarından ortalarına kadar hücre, ya bir sonraki hücre döngüsüne girme ya da hücre döngüsünden çıkarak sessiz faza girme kararı verir. Devamlı olarak bölünen hücreler, hücre döngüsünden çıkmaz ama G1, S, G2 ve M aşamalarında büyümelerini durdurmaları için gerekli sinyalleri alana dek ilerlerler. Hücre çoğalmayı durdurursa, hücre döngüsünün G0 fazına girer. G0 esnasında hücre, metabolik olarak aktiftir fakat büyümmez ya da bölünmez. Çok hücreli organizmalarda bulunan birçok farklılaşmış hücre, sonsuza dek bu G0 fazında kalabilir. Nöronlar gibi bazı hücreler de asla hücre döngüsüne giriş yapmazlar. Buna zıt olarak, kanser hücrelerinin G0 fazına girebilme yetenekleri yoktur. Bu hücrelerin çoğalma oranının normal çoğalan bir hücreden daha büyük olması da önemli değildir, çünkü uygun zaman ve yerde durağan ve sessiz olamazlar [8].

G0'daki hücreler sıklıkla, dış büyüme sinyallerince hücre döngüsüne yeniden girmeleri yönünde uyarılırlar. Bu sinyaller hücrelere; sinyali plazma zarından sitoplazmada yerleşmiş olan sinyal iletim moleküllerine nakleden büyüme faktörü ve hücre yüzey reseptörlerine tutunmuş hormonlar gibi moleküller tarafından iletilirler. Sitoplazmada yapılan sinyal transferleri genelde yoğun bir protein fosforilasyon akışı ve protein konfigürasyon değişikliklerini kapsamaktadır, böylece sinyal, multiprotein yolağından geçerek çekirdeğe iletilir. Sinyal iletimi, eninde sonunda hücreyi G0'dan çıkarıp hücre döngüsüne geri dönmesi için gerekeni yapan bir gen ifade programını başlatır. Genel olarak kanser hücrelerinin sinyal iletim yolağı kusurludur. Bazen anormal hücre yüzey reseptörleri ya da sitoplazmik sinyal iletim molekülleri çekirdeğe dış büyüme sinyallerinin yokluğunda bile sürekli büyüme sinyalleri



gönderir. Dahası, kanserli hücreler, çevrelerindeki hücrelerden aldıkları dış sinyallere yanıt vermeyebilirler. Bu sinyaller olgunlaşmış dokulardaki hücre çoğalmasını normal olarak inhibe eden sinyallerdir [9].

### 1.2.2 Hücre Döngüsü Kontrolü ve Kontrol Noktaları

Normal hücrelerde, hücre döngüsü süreci sıkı bir şekilde düzenlenmiştir ve her aşamanın tamamlanması, bir sonraki aşamaya geçmeyi başlatmaktadır. Hücre döngüsünde, bir sonraki aşamaya ilerlemeden önce, hücrenin kendi iç dengesini izlediğini ve kontrol ettiği en az üç farklı nokta vardır. Bunlar G1/S, G2/M ve M kontrol noktalarıdır [10].

**G1/S kontrol noktasında** hücre, kendi boyutunu izler ve DNA' sının hasar görüp görmediğine karar verir. Eğer hücre uygun boyuta ulaşmayı başaramamış ya da DNA' sı hasar görmüş ise hücre döngüsündeki ileri aşamalar bu koşullar doğrulanana kadar durdurulur. Eğer hücre boyutu ve DNA bütünlüğü normal ise G1/S kontrol noktası geçirilmiş olur ve hücre S aşamasına ilerler.

İkinci önemli kontrol noktası, mitoz giriş için hücredeki fizyolojik koşulların izlemesinin yapıldığı **G2/M kontrol noktasıdır**. Eğer DNA kopyalaması ya da herhangi bir DNA kusurunun onarımı tamamlanmamış ise bu süreçler tamamlanıncaya kadar hücre döngüsü işlemi durdurulur.

Üçüncü ve en büyük kontrol noktası mitoz sırasında ortaya çıkar **M kontrol noktası** olarak adlandırılır. Bu kontrol noktasında, hem iğ iplikçikleri sisteminin oluşması hem de iğ iplikçiklerinin, sentromere tutunan kinetokorlar ile bağlanması kontrol edilmektedir. Eğer bu iğ iplikçikleri uygun bir biçimde şekillendirilmemiş ya da bağlanmaları uygun olmamış ise mitoz durdurulur [11, 12].



### 1.2.3 Siklinler

Hücre döngüsü kontrol noktalarındaki düzenlenmelere ek olarak, hücre döngüsünün düzenlenmesi sürecinde **siklinler** ve **siklin bağımlı kinazlar (cyclin-dependent kinases; CDKs)** adı altında iki sınıf proteinin daha rolü vardır.

Hücreler hücre döngüsü boyunca belirli durumlarda siklin proteinlerini sentezler ve parçalarlar. Ortamda var olan siklin, spesifik bir CDK' ya bağlanarak CDK/siklin kompleksinin aktivitesini tetikler. CDK/siklin kompleksleri hücre döngüsü boyunca hücre gelişimi için gerekli değişiklikleri sağlayan diğer proteinleri seçici olarak fosforlar ve aktive ederler. Örneğin, G1 aşamasında CDK4/siklin D kompleksleri, S aşamasında DNA replikasyonu için gerekli olan ürünleri (DNA polimeraz  $\delta$  ve DNA ligaz gibi) şifreleyen genlerin transkripsiyonunu tetikleyen proteinleri aktive eder. Bir başka CDK/siklin kompleksi olan CDK1/siklin B çekirdek zarının yıkımı, kromozom yoğunlaşması ve hücre içi iskeletin yeniden organizasyonu gibi mitozun erken olaylarını tetikleyen bazı proteinleri fosforlar. Mitoz siklin B' nin yıkıldığında ve M aşamasının karakteristik protein fosforilasyonları sona erdiğinde tamamlanabilmektedir. Hücrelerde her ne kadar çok sayıda farklı protein kinaz bulunsa da, çok hücre döngüsünün regülasyonundan sorumludur.

Hücre döngüsü kontrol noktalarının her biri, tıpkı hücre döngüsü kontrol moleküllerinin aktivitelerinin düzenlenmesinde olduğu gibi genetik olarak düzenlenirler. Genel olarak hücre döngüsü, ürünleri döngüyü ilerleten ya da baskılayan genlerin karşılıklı etkileşimleri tarafından düzenlenmektedir [10, 13].

Hücre döngüsünü kontrol eden herhangi bir gende oluşan mutasyon ya da yanlış ifade, bir çok yoldan kanserin gelişimine katkıda bulunur. Örneğin, G1/S ya da G2/M kontrol noktalarını kontrol eden genler kusurluysa, hücre DNA hasarını onarmadan döngüde ilerlemeye devam edebilir. Bu durum genlerde daha fazla mutasyon birikmesine ve böylece kontrolsüz çoğalma ve metastaza neden olabilir. Benzer şekilde eğer hücre döngüsünün ilerleyişini kontrol eden siklinleri kodlayan genler uygun olmayan şekilde ifade edilirlerse, hücre belki de döngünün devamı için hazırlanır ve böylece hücre döngüsünden çıkıp G0'a girmeyi başaramayabilir [14].

Eğer DNA replikasyonu, DNA onarımı ya da kromozom düzenlenmesinde hata olursa, hücreler hücre döngüsündeki ilerlemelerini koşullar düzelinceye kadar durdururlar. Bu sayede hücre mutasyon sayısını ve çoğalan hücrelerde biriken kromozomal anormalliklerini azaltır. Eğer DNA hasarı ya da kromozomal hasar onarımı imkansız derecede ciddi ise, hücre ikinci bir savunma hattı kurabilir. Bu sürece apoptoz ya da programlı hücre ölümü adı verilir [15]. Apoptoz; hücrenin genetik olarak kontrol edildiği ve sonunda intihar ettiği bir süreçtir. Apoptoz aynı zamanda normal çok hücreli ve yüksek yapıli canlıların gelişimi sırasında, son yetişkin organizmaya ulaşılana kadar gelişime katkısı olmayan belli hücreleri elemek için de başlatılır. Apoptoz, nekroz gibi diğer hücre ölümü tiplerinden farklılıklar gösterir; konağın bağışıklık sistemi apoptotik bir hücre ölümü ile aktive edilmez ancak bu hücre ölümü nekrotik bir hücre ölümü olsaydı konağın immün sistemi onarılırdı [9, 16]. Apoptoz basamakları hasarlı hücreler ve gelişim sırasında elenen gereksiz hücreler için de aynıdır. Bu basamaklar sırası ile;

- Nükleer DNA parçalara ayrılır.
- Hücre içi yapılar bozulur.
- Hücre apoptotik cisimcikler olarak bilinen küçük küresel yapılar bölünür.
- Apoptotik cisimcikler bağışıklı sisteminin fagositik hücreleri tarafında yutulurlar.

**Kaspazlar** olarak adlandırılan bir grup proteaz, apoptozu başlatan ve hücre için bileşenlerin sindiriminden sorumlu enzimlerdir.

Apoptoz genetik olarak, apoptozu tetikleyen ya da engelleyebilen Bcl2 (B Cell Lymphome-2) ve BAX (Bcl-2-associated X) proteinleri gibi özel gen ürünlerinin düzenlenmesi ile kontrol edilmektedir. Programlanmış hücre ölümü hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak suretiyle, bir sonraki nesle kalıtım yoluyla geçerek ve kansere sebep olabilecek olası genetik mutasyonların da sayısını azaltmaktadır. Hücre döngüsünün kontrol noktalarını düzenleyen bu genler pek çok kanser tipinde mutasyona uğramıştır.



### 1.2.3.1 Proto-onkogenler

Kanser hücrelerinde proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki genel gen kategorisi mutasyona uğrar ya da yanlış ifadelenir.

Proto-onkogenler, ürünleri hücre büyümesini ve bölünmesini ilerleten genlerdir. Bu görevlerini, diğer genlerin ifadelerini uyararak transkripsiyon faktörlerini kodlayarak, hücre bölünmesini uyararak sinyal iletim moleküllerini ya da hücrenin hücre döngüsü boyunca ilerlemesini sağlayan hücre döngüsü düzenleyicilerini kodlayarak yaparlar.

Proto-onkogenler, ürünleri hücre büyümesini ve bölünmesini ilerleten genlerdir. Bu görevlerini, diğer genlerin ifadelerini uyararak transkripsiyon faktörlerini kodlayarak, hücre bölünmesini uyararak sinyal iletim moleküllerini ya da hücrenin hücre döngüsü boyunca ilerlemesini sağlayan hücre döngüsü düzenleyicilerini kodlayarak yaparlar.

Proto-onkogenlerin ürünleri plazma zarında, sitoplazmada ya da çekirdekte bulunabilirler ve aktiviteleri; transkripsiyon, translasyon ve protein modifikasyonu seviyelerinde yapılan düzenlemenin de içinde bulunduğu çok çeşitli yollarla kontrol edilmektedir. Hücreler sessiz döneme girdiklerinde ve bölünmeyi sona erdirdiklerinde, birçok proto-onkogen ürününün ifadesi ile baskılanır. Kanser hücrelerinde böyle bir yolla bir ya da daha fazla proto-onkogen değiştirilmiş olup bunların aktiviteleri normal bir şekilde kontrol edilemez. Bunun nedeni ise, proto-onkogenin mutasyonu sonucu anormal davranan bir proteinin üretilmesi olabilir. Başka durumlarda, proto-onkogenler normal protein ürünleri kodlamasına rağmen aşırı ifade edilir ya da doğru zamanda transkripsiyonel olarak baskılanamazlarsa benzer bir durum ortaya çıkabilir. Bu koşullarda proto-onkogenlerin ürünleri devamlı olarak hücreyi bölünmesi için uyarırlar. Bir proto-onkogen mutasyona uğradığında ya da hatalı ifade edildiğinde ve kanser gelişimine katkıda bulunduğu onkogen olarak adlandırılır [17].

Kontrol edilemeyen hücre bölünmesini uyarabilmesi için sadece bir proto-onkogen allelinin mutasyona uğramış olması yeterlidir. Bu yüzden onkogenler baskın bir kanser fenotipine neden olurlar.



### 1.2.3.2 RAS Proto-onkogeni

İnsan tümörlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan genlerin bazıları *ras* gen ailesindedir. Bu genler insan tümörlerinin %40'ında mutasyona uğramışlardır. Ras gen ailesi hücre zarı ile ilişkilendirilen ve hücre büyümesini ve bölünmesini düzenleyen sinyal iletim moleküllerini kodlar. Ras proteinleri normalde dış büyüme faktörlerine yanıt olarak hücrenin bölünmesini uyaran sinyallerin hücre zarından çekirdeğe geçmesini sağlamaktadır. Ras proteinleri yağ GDP'ye ya da GTP'ye bağlanarak inaktif ya da aktif durum arasında döngüsel bir yapı oluştururlar. Bir hücre büyüme faktörü ile karşılaştığında hücre zarında bulunan büyüme faktörü reseptörleri büyüme faktörüne bağlanır ve büyüme faktörü reseptörünün sitoplazmaya bağlanan kısmı otofosforilasyona uğrar. Bu durum nükleotit değişim faktörleri olarak bilinen proteinlerin plazma zarına yerleşmesine yol açar. Nükleotit değişim faktörleri Ras'ın GDP'yi bırakıp salmasına, GTP'ye bağlanmasına neden olur. Böylece Ras'ın aktivasyonu gerçekleşir. Ras'ın GTP-bağlı aktif formu sitoplazmadaki bir dizi proteinin fosforilasyonu için gerekli sinyali gönderir. Sinyal gönderimi ile gerçekleşen protein fosforilasyonunun son noktası, hücreyi durağanlıktan hücre döngüsüne taşıyan genlerin ifadesini uyaran çekirdek transkripsiyon faktörlerinin aktif hale getirilmesidir.

Ras, sinyallerini çekirdeğe bir kez gönderdiğinde GTP, GDP'ye hidroliz olur ve inaktif forma geçer. Proto-onkogenler Ras'ı onkogene dönüştüren mutasyonları (GTP'yi GDP'ye dönüştüren hidrolizi) engeller. Böylece Ras proteinini sürekli açık konumda tutarak hücreyi sürekli bölünmeye teşvik eder. Normal ve kanser hücrelerindeki Ras proteinlerini aminoasit sekanslarının karşılaştırılması, onkogenik Ras proteinlerinin hem 12. hem de 61. pozisyonlarında tek aminoasit değişimi içerdiğini göstermektedir. Bu aminoasit değişikliklerinden her biri, Ras genindeki tek bir nükleotit değişikliğiyle gerçekleşmektedir [18].

### 1.2.3.3 Siklin D1 ve Siklin E

Siklinler, CDK molekülleri ile kompleksler oluştururlar ve onların aktivitelerini düzenlerler. Oluşturulan CDK/siklin kompleksleri hücre döngüsünün her aşamasında önemli olan düzenleyici moleküllerdir. Birçok siklin geninin kanser

gelişimiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Örneğin, siklin D1' i kodlayan genler; meme, mesane, akciğer ve yemek borusu kanserlerinde çoğaltılmıştır. DNA amplifikasyonu, siklin D1 geninin çoklu kopyalarını yaratır ve bu yüzden bu kanser hücrelerinde normal seviyeden çok daha fazla siklin D1 proteini bulunur. Yüksek seviyelerdeki siklin D1 proteini belki de S fazına kontrolsüz girişlere katkıda bulunmaktadır. Diğer kanserlerde siklin D1, gen çoğalması olmasada fazla miktarda ifade edilmektedir.

Belirli paratiroid tümörlerinde ve B-hücre lenfomalarında siklin D1 geni, translokasyonlar gibi kromozomal anomalilerde de bulunmaktadır. Siklin D1 genindeki bu değişimler belki de anormal gen ifadelerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Benzer olarak, siklin E geni bazı lösemilerde, meme ve kolon kanserlerinde çoğalarak aşırı ifade edilmektedir. Bu anahtar hücre döngüsü düzenleyicilerini aşırı ifadesi ya da periyodik olarak parçalanma kayıpları hücrelerin hücre döngüsüne devam etmeye hazır tutulmalarını sağlar ve hücreler döngüyü terk edemez, G0 hareketsiz aşamasına giremezler ya da hücre farklılaşmasına uğrayamazlar [18].

### 1.3 Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, ürünleri hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen ve apoptoz sürecini başlatan genlerdir. Normal hücrelerde tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinler DNA hasarına ya da dış çevreden büyümeyi bastıran sinyallere yanıt olarak hücre döngüsü sürecini durdurabilmektedir. Tümör baskılayıcı genler mutasyona uğradıklarında ya da inaktive olduklarında hücreler, hücre döngüsü kontrol noktalarına yanıt verme ya da DNA hasarı arttığında ölüm programına geçme yeteneklerini kaybederler. Bu olay hücrenin hücre döngüsünü terk etmesine ve sessiz döneme girmesine engel olur ve mutasyon artışına yol açar. Şu anda bilinen 200' den fazla onkogen ve tümör baskılayıcı gen vardır. Kanser araştırmaları devam ettiği sürece çok daha fazlası keşfedilebilecektir [18-20].



### 1.3.1 p53 Tümör Baskılayıcı Gen

İnsan kanserleri içinde en sık mutasyona uğrayan p53' tür. p53 geni 50'den fazla genin transkripsiyonunu uyaran ya da baskılayan bir transkripsiyon faktörü gibi çalışan çekirdek proteinlerinden birini kodlamaktadır. Normalde p53 proteini sürekli olarak sentezlenir fakat hızla parçalanır ve bu yüzden de hücrelerde çok düşük bir seviyede bulunur. p53 proteini kendisini inaktif formdan aktif formda dönüşümüne neden fosforilasyonunu ve asetilasyonunu engelleyen, Mdm2 (Murine Double Minute 2) olarak adlandırılan bir başka proteine bağlanır. Bir çok olay çekirdek içerisinde aktif p53 proteininin hızlı bir şekilde artışına yol açmaktadır. Bu olaylar arasında; DNA' nın kimyasal hasara uğraması, DNA'nın iyonize radyasyon ile uyarılmasıyla çift iplik kırıklarının meydana gelmesi ya da hücrelerin ultraviyole ışınlarına maruz kalmalarından ötürü meydana gelen DNA - tamir ara ürünlerinin oluşması yer almaktadır. Aktive edilen p53 proteininin artışı, protein fosforilasyonundaki, asetilasyonundaki ve p53 proteini kararlılığındaki artışın sonucudur [19, 20].

#### **p53 proteini, DNA hasarına karşı iki farklı yanıtı başlatmaktadır;**

- DNA onarımı için hücre döngüsünün durdurulması
- DNA onarılmazsa hücrenin apoptoza ve hücre ölümüne yönelmesi

Oluşan her iki tepki de ilişkili genlerin ifadelerinin baskılanması ya da uyarılmasını sağlayan ve bir transkripsiyon faktörü gibi davranan p53 tarafından başlanır.

Normal hücrede p53 proteini hücre döngüsünü bir çok aşamada durdurabilir. G1/S kontrol noktasında hücre döngüsünü durdurabilmek için, aktif p53 proteini, p21 proteinini kodlayan bir genin transkripsiyonunu uyarır. p21 proteini CDK4 /siklin D1 kompleksini inhibe eder ve hücrenin G1 aşamasından S aşamasına geçişini önler. Aktif p53 proteini DNA replikasyon sürecini geciktiren genlerin ifadesini düzenler, böylece S aşaması sırasında DNA hasar onarımı için zaman kazanılmış olur. Eğer DNA hasarı S aşamasında meydana gelirse, aktif p53 diğer genlerin ifadesini düzenleyerek hücrelerin G2/M kontrol noktasında kalmasını sağlar.



Aktif p53 hasarlı bir hücreye apoptoz yoluyla intihar edebilmesi için yol gösterir. Bunu BAX geninin transkripsiyonunu aktive ederek ve Bcl2 geninin transkripsiyonunu baskılayarak gerçekleştirir. Normal hücrelerde BAX proteini Bcl2 proteini ile heterodimer halde bulunur ve hücre yaşamına devam eder. p53'ün BAX gen transkripsiyonunu uyarmasına yanıt olarak BAX protein seviyeleri arttığında BAX homodimerleri oluşur ve bu homodimerler hücrelerin kendi kendilerini yok etmelerine neden olan hücresel değişiklikleri aktive eder. İşlevsel p53 kaybı olan kanser hücrelerinde, hücresel hasara karşı BAX protein seviyeleri artmaz ve apoptoz oluşmayabilir. Böyle hücreler hücre döngüsü kontrol noktalarında tutulamazlar ya da DNA hasarına karşı apoptoza yönelemezler. Sonuç olarak hücreler hücrenin DNA'sını göz önünde bulundurmadan, hücre döngüsü boyunca kontrolsüz bir şekilde ilerlerler. p53'ün eksik olduğu hücrelerde mutasyon oranları yüksektir ve bu hücrelerde kansere neden olan farklı tiplerde mutasyonlar ile kromozomal anomaliler birikir. Genomik bütünlük açısından p53 geninin önemini vurgulamak için bu gene *genomun gardiyanı* adı verilir [13, 21].

### 1.3.2 RB1

RB1 (retinoblastoma1) tümör baskılayıcı gendeki kayıp ya da mutasyon; meme, kemik, akciğer ve mesane gibi kanser türlerini içeren bir çok kanserin gelişimine neden olur. Retinoblastoma proteini (pRB), p53 proteini gibi hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasını kontrol eden bir tümör baskılayıcı proteindir. pRB tüm hücre tiplerinde ve hücre döngüsünün bütün safhalarında çekirdekte bulunmaktadır ancak hücre döngüsü boyunca kendisinin fosforillenme durumuna bağlı olarak farklı aktivite gösterir. Hücreler hücre döngüsünün G0 fazında iken pRB fosforillenmemiştir ve E2F () gibi transkripsiyon faktörlerinden birine bağlanarak, bağlandığı transkripsiyon faktörünü inaktive eder. Hücre, büyüme faktörleri ile uyarıldığında G1 fazına geçer ve S fazına yaklaşır [18, 22]. G1 fazı boyunca pRB; CDK4/ siklin D1 kompleksi tarafından fosforillenir. Fosforillenmiş pRB inaktiftir ve bağladığı düzenleyici proteinleri serbest bırakır. pRB tarafından salınan E2F ve diğer regülatör proteinler serbest kaldıklarında ürünleri G1 fazından S fazına geçiş için gerekli olan otuzdan fazla genin ifade edilmesini uyarır.

Hücreler S, G2 ve M fazlarını geçtikten sonra pRB fosforillenmemiş haline döner ve E2F gibi regülatör proteinlere bağlanarak bir sonraki döngüde bunlara ihtiyaç duyuluncaya kadar tutuklar. Normal dinlenme halinde pRB proteini aktiftir ve S fazına geçişi engeller. Retinoblastoma hücreleri gibi birçok kanser hücresinde RB1 geninin her iki kopyası da hatalı, inaktif ya da yoktur [23].

#### 1.4 Bir Hücre Neden Kanser Hücresine Dönüşür?

Apoptoz, programlı hücre ölümü demektir ve DNA'sında hasar bulunan hücreleri yok eder [24]. Anormal DNA'lı hücreler ya tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş ya da yanlış, eksik veya gereksiz olarak fazla transkript olmuş DNA'dan dolayı oluşur.

Apoptoz normal doku kaybından sorumludur. Yaşlanmış ve yararsız hale gelen normal hücrelerin ortamdaki yok edilmesini sağlar. Apoptoz genetik olarak düzenlenir ve malign hücrelerde bozulabilir. Örneğin p53 tümör baskılayıcı geni apoptozu uyarır. Bcl-2 onkogeni ise apoptozu inhibe eder. Böylece, normal hücre ölümünü yavaşlatarak aşırı hücre birikmesine yol açar [25].

Hücre proliferasyonunu anormal şekilde uyaran genetik bozukluklar, normal proliferasyon mekanizmasından bağımsız olarak oluşur. Reseptörlerin veya sinyal aktarıcı proteinlerin mutasyonları veya aşırı üretimleri hücrelerin büyüme faktörlerinden veya diğer mitotik faktörlerden bağımsız hale gelmesine ve hücrelerin kontrolsüz bölünmesine yol açarlar. Bu gen anomallikleri genellikle dominanttır.

Tümör baskılayıcı genlerdeki anomallikler, hücre siklusunun baskılanmasından sorumlu genlerdir. Bozuklukları halinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir.

Retinoblastoma geni (RB1) bu genler arasında ilk keşfedilen genidir. Ardından, özellikle sık rastlanmayan kalıtsal hastalıklarda etkili baskılayıcı gen anomallikleri de saptanmıştır. Wilm's tümörü (WT1), ailesel polipozis (APC), ailesel melonoma (CDKN20), ailesel meme ve over kanserleri (BRCA-1 ve BRCA-2) diğer tümör baskılayıcı gen anomalliklerine örnek olarak verilebilir.



Elbette p53 tümör baskılayıcı geni birçok kanser türünde etkili olan en önemli genlerden bir tanesidir. Bu genin ürünü olan p53 proteini birçok kompleks aktivitesi olan ve hücre siklusunu baskılayan bir proteindir. Bu protein DNA sarmalının kırıkları gibi DNA lezyonlarını ve ayrıca radyasyon veya kemoterapi ile oluşan DNA hasarını saptayabilir.

DNA lezyonu saptandığında, p53 hücre siklusunu G1 fazında durdurur, böylece hücrenin S fazına girişini önler. Ardından, ya tamir mekanizması proteinlerini ya da apoptoza yol açan proteinlerini indükler. *In vitro* çalışmalar, bazı kemoterapi ajanlarının ve radyasyonun kanser hücrelerinde DNA hasarı oluşturarak ve böylece p53 ile indüklenen apoptoz sayesinde hücreleri öldüklerini göstermiştir. p53 proteininin eksik olduğu fare timositlerinde ve dinlenme halindeki lenfositlerde radyasyonun bu öldürücü etkisi görülmez, hücreler canlılığını sürdürür.

Birçok kanser tipinde mutant p53 tümör baskılayıcı geninin etkili oluşu bulunmuştur. Ayrıca mutant p53, Li-Fraumeni sendromunun karakteristik bulgusudur. Bu sendrom hem yumuşak doku hem de epitel kaynaklı kanserlerin birçok organda görüldüğü ve erken bir yaşta başladığı dominant bir sendromdur [26].

## 1.5 Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Kanser, hücrelerin sürekli birikmesiyle karakterize bir düzen bozukluğudur. Bu durum sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının, normal olarak gerçekleşen hücre kaybıyla dengelenmemesi sonucu gerçekleşir. Bu hücreler invazyon yaparlar ve organizmanın organlarını hasara uğratırlar.

Kanser hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda bölünürler ve yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki sonuçta hücreler devamlı birikir.

Bu dengesizlik hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından dolayıdır.



Kanser hücrelerinin bazı özellikleri şunlardır;

- a) **Klonal orijin:** Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden doğar. Bu klonlar ya bir saha hasarı sonucu (dokunun birden fazla hücresinin karsinojene maruz kalması) ya da bazı genlerdeki kalıtsal defektler sonucu oluşurlar.
- b) **Ölümsüzlük:** Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler ve çok miktarda hücre oluştururlar. Ölümsüzlük mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Hücre diferansiye olurken çoğu normal hücre tipinde telomerler gittikçe kısalır. Fakat kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim, normal olarak hücreler diferansiye olurken programlı bir şekilde azalır. Tamamen diferansiye olmuş bir hücre dinlenme durumuna geçer ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiğinden ölür. Oysa birçok kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonuçta telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır.
- c) **Genetik kararsızlık:** Bu durum DNA tamirindeki ve bazı mutasyonları tanımadaki eksikliklerden dolayıdır ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açar. Kanser hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt veren klonlar oluştururlar. Bu klonların ayrıca yabancı ortamlarda yaşama yeteneği de gittikçe artar ve böylece metastaz yaparlar.
- d) **Kontakt inhibisyonu kaybı:** Kültür ortamında büyüyen normal hücreler, hücrelerin normalde tutunduğu yüzeye yapışamazlarsa bölünemezler. Normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde doldurduklarında da bölünme özelliklerini kaybederler. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını içerse bile bölünmezler.

Kanser hücreleri ise yarı katı bir besiyerinde yüzeye yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye devam edebilirler. Hatta hücre kültüründe birden fazla tabaka oluşsa bile büyümeye devam edebilirler.

- e) **Proliferasyonun büyüme faktörlerinden ve nütrientlerden bağımsız olarak devamlı artışı:** Bu durum kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyümeye devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler.
- f) **Metastaz:** Benign tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücrel proteinlerin kaybı ya da anormalliklerinden, hücrelerarası interaksiyonun bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metalloproteaz gibi bazı enzimlerle (kolejenazlar) bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşir. Sorumlu proteinler keşfedildikçe ve onların mekanizmaları aydınlatıldıkça metastatik süreç daha iyi anlaşılacaktır [2].

## 1.6 Kanser Meydana Getiren Etkenler

Kanserin esas nedeni hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonunun hatalı olması sonucu hücrenin farklılaşmasıdır. DNA replikasyon anormalisine sebep olduğu sanılan birçok faktör mevcuttur ve bunlara predispozan (hazırlayıcı) faktörler denir. Hücre bölünmesi, doku tamiri ve yenilenmesi amacıyla yapılır. Doku tamiri ve yenilenmesini hızlandıran tüm etmenler aslında bir kanser hazırlayıcısı olabilir [27].

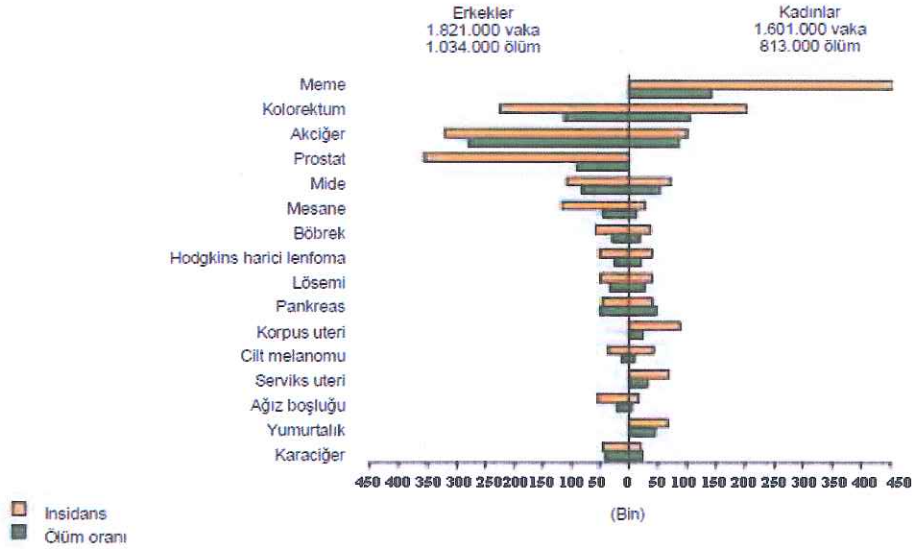
1. X-ışınları, gama ışınları, radyoaktif maddelerden yayılan partikül radyasyonları ve ultraviyole ışınları gibi iyonize edici radyasyonlar kansere zemin hazırlamaktadır ve DNA zincirlerini kopararak mutasyona sebep olmaktadır.



2. Bazı kimyasal maddelerin mutasyon potansiyeli yüksektir. Mutasyona neden olan kimyasal maddelere kanserojen denir. Anilin boya türevleri, sigara dumanındaki çok sayıdaki kimyasal, metilmetakrilat, asbest, silika tozları, kömür ve alçı tozu bunlara örnektir.

Kanser oluşumunda viral faktörlerin etkisi de vardır.örneğin Papilloma virüsü ile rahim kanseri; Epstein-barr virüsü ile Burkitt lenfoması ve nazofaringal karsenoması arasında kesin etkileşimler bulunduğu saptanmıştır [31].

Dünya Sağlık Örgütü 2009 yılı istatistik verilerine göre (şekil 2), kadınlarda en çok meme, kalın bağırsak, akciğer kanserleri; erkeklerde ise en çok akciğer, prostat, mide ve kalın bağırsak kanserleri görülmektedir [28].



Şekil 2: Balkanlar ve Türkiye genelinde teşhis edilen kanser çeşitlerinin dağılımı [28].

## 1.7 Karbonik Anhidrazlar

Karbonik Anhidraz (Karbonat hidrolizaz, karbonat dehidrataz, karbonat anhidraz, karbonik asit anhidraz E.C.4.2.1.1) yapısında  $Zn^{+}$  iyonu bulunduran, prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunan bir metaloenzimdir [29-30].

Karbonik anhidraz enzimleri çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rol oynayan enzimlerdir. İlk olarak sıgır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz

enzimleri, canlılarda CO<sub>2</sub> molekülünün hidrasyonunu ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonunun dehidrasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Bunun dışında karbonik anhidraz metaloenzimleri glukoneogenez, lipogenez, ürogenez, tümör oluşumu ve birçok patojenin büyümesi ve virülansı gibi çok sayıda fizyolojik aşamalarda da yer almaktadırlar.

Karbonik anhidraz enzimlerinin katalizlediği tepkime aşağıda verilmiştir:



Tepkime yüksek karbondioksit konsantrasyonu olan dokularda gerçekleşir.

Karbonik anhidraz grubu enzimler substrat difüzyonu gerçekleştiği sürece alanında en hızlı örneklerdendir. Enzimin farklı formlarının hızı saniyede 10<sup>4</sup> ile 10<sup>6</sup> reaksiyondur [32].

Reaksiyonun tersinir hali 15 kat daha yavaş gerçekleşmektedir. Bu da hücre içi iyon – tuz oranını dengelemektedir [33].

Karbonik anhidraz ilk defa eritrositlerden 1933 yılında [34] saflaştırılmış, daha sonra yapılan yoğun çalışmalarda üç farklı tipte karakterize edilmiştir.

Bunlardan hayvan ve bitki kökenli olanlar sırasıyla α ve β sınıfı içerisinde gruplandırılmışlardır. İzoenzimlerin hepsinde ortak olan nokta aktif bölgelerinde bir çinko (Zn<sup>+2</sup>) iyonu bulundurmalarıdır. İlk tespit edilmiş ve üzerinde en fazla çalışma yapılmış izoenzimleri bünyesinde bulunduran α-sınıfındaki enzimler monomerik yapıdadır. Çok az sayıda prokaryotik α-sınıfı karbonik anhidraz tespit edilmiştir.

α-Sınıfı karbonik anhidrazların katalitik mekanizmasında aktif bölgeden protonun dış çözücü ortamına aktarılmasında His-64 birimi aracı rol oynamaktadır. Proton His-64'e onunla çinko atomu arasındaki su molekülleri aracılığıyla aktarılır. Yapılan çalışmalar Lys-91 ve Tyr-131 birimlerinin de proton transfer mekanizmasında rol aldığını göstermektedir [34, 45]. β-Sınıfındakiler çiftler şeklinde dimerler, tetramerler, heksamerler ve oktamerler halindedirler. Bu sınıfa ait ilk kristal yapı 2000 yılında bildirilmiştir. Önceleri sadece bitkilerde bulunduğu sanılan



bu sınıftaki izoenzimler sonraları alg, bakteri ve arkeon türlerinde de tespit edilmiştir. Bu sınıftaki izoenzimlerde aktif bölgedeki Zn atomu iki sistein ve bir histidin liganıyla bağlanmaktadır. Dizi analizleri bu sınıftaki izoenzimlerde yalnızca beş amino asit biriminin ve aktif bölgede üç çinko liganının, bir aspartat ve bir de arginin birimlerinin korunmuş olduğunu göstermektedir. Yakın zamanda  $\beta$ -sınıfındaki izoenzimlerin iki alt gruba ayrılabilceği savunulmaktadır. Buna sebep olarak aralarındaki yapısal fark ve inhibitörlere karşı verilen cevaptaki farklar gösterilmektedir [40]. Üçüncü sınıf olan  $\gamma$  enzimleri trimer yapıda olup bu sınıfın yapısı aydınlatılmış tek üyesi 1994'te *Methanosarcina thermophila*'dan izole edilmiş izoenzimdir. İzole edilen bu izoenzimin çinko yerine kobalt kullanıldığında daha yüksek hidrataz aktivitesi gösterdiği ve p-nitrofenil asetatla esteraz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Metal bağlanma bölgesinde  $\alpha$ -sınıfındaki gibi üç histidin birimi ligand oluşturmaktadır, ancak bunların ikisi bir monomere, bir tanesi ise bitişikteki monomere aittir. Son zamanlarda *Thalassiosira weissflogii*'den izole edilen karbonik anhidraz TWCA1'in diğer karbonik anhidraz sınıflarından ayrı bir sınıfa ( $\delta$ -sınıfı) ait olduğu bildirilmiştir. TWCA1 diğer sınıflardaki karbonik anhidraz izoenzimlerine yapısal ve aminoasit dizilişi bakımından benzememektedir [45].

Enzim, hidrataz aktivitesi yanında esteraz aktivitesine de sahiptir, ancak fizyolojik açıdan hidrataz aktivitesi önemlidir. Bu sayede organizmanın asit – baz dengesinin düzenlenmesinde önemli rol üstlenir. Bu dengenin bozulduğu durumlarda, örneğin göz içi tansiyonunda, karbonik anhidraz enzim aktivitesine müdahale sıklıkla uygulanan bir tedavi yöntemidir. Bu açıdan karbonik anhidraz inhibitörleri klinik olarak önemli bileşiklerdir [35].

Karbonik anhidraz enzimi birçok fizyolojik olayda rol almaktadır. Bunlar arasında en önemlileri şöyle sıralanabilir:

- 1) Asit-baz dengesi
- 2) Kardiovasküler tonusun regülasyonu
- 3) Sindirim
- 4) Hücre bölümleri arasındaki iyon değişimi

5) Değişik enzimatik reaksiyonlar için gerekli bikarbonatın sağlanması

### 1.7.1 Alfa Karbonik Anhidrazlar

Memelilerde bulunan bu aile 15 farklı izoformla dört grupta incelenmektedir (Şekil 3):

1) Sitoplazmik CAlar (CA-I, CA-II, CA-III, CA-VII ve CA XIII)

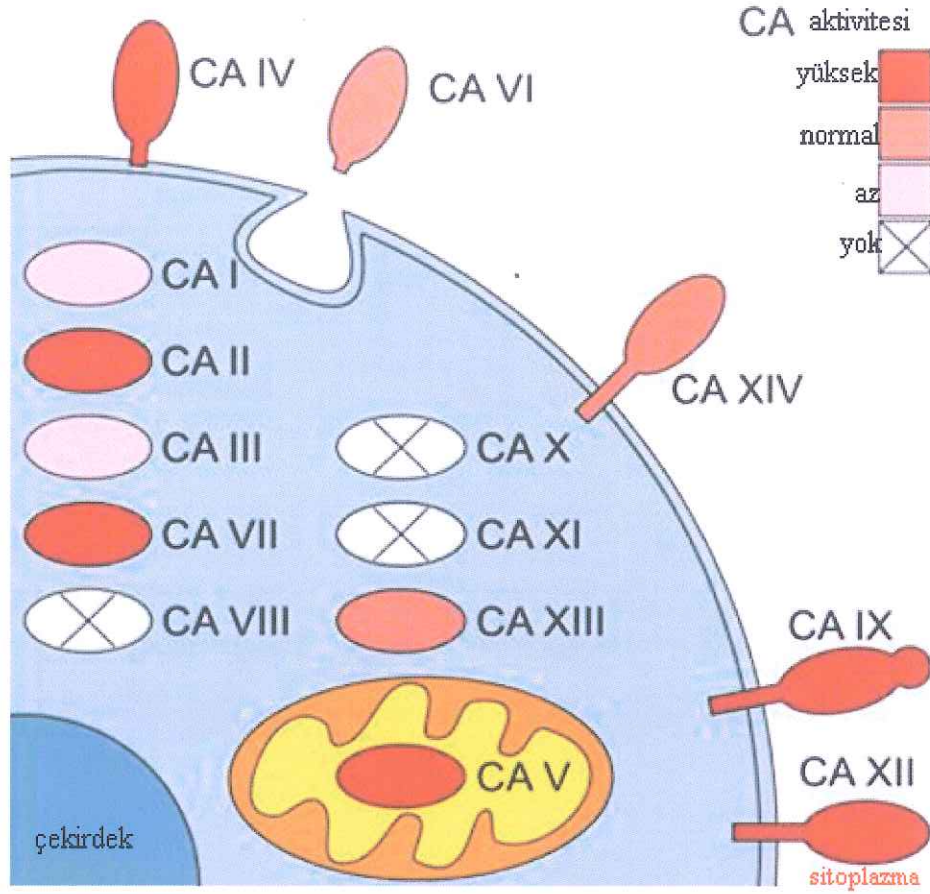
2) Mitokondrial CAlar (CA-VA ve CA-VB)

3) Salgı CAlar (CA-VI)

4) Membrana bağlı CAlar (CA-IV, CA-IX, CA-XII, CA-XIV ve CA-XV)

Bu enzimlerle beraber "katalitik olmayan" CA izoformlarının (CA-VIII, CA-X ve CA-XI) hala fonksiyonları net değildir [36].





Şekil 3: Karbonik Anhidraz ailesi Üyelerinin Hücredeki Dağılımı [37].

### 1.7.2 CAIX ve CAXII

Günümüzün en önemli hastalıklarından birisi olan kanser ile ilişkisi tespit edilmiş olan iki Karbonik Anhidraz izoformu vardır, CAIX ve CAXII.

CAIX, bir 54/58 N-glikozilat transmembran izoformu olarak hücre adezyonuna neden olmaktadır [38].

CAIX özellikle böbreklerle ilgili hücre karsinomlarında (RCC), serviks, over, kolon, baş, boyun karsinomlarında ekspre olmaktadır. Hücre yüzeyinde aktivite göstermesi  $\text{CO}_2$ 'in hidratasyon ve dehidratasyonu sonucunda klorür-anyon değiştiricisi olarak yine hücre zarında yer alması CAIX'un  $\text{HCO}_3^-$  iyonunun tekrar sitoplazmaya taşınmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Membrana bağlı tümör ilişkili CAIX izoenziminin ekstrasellüler asiditeyi kontrol ettiği ve böylece Katepsin B ve matriks metaloproteaz B (MMP-9) gibi hücre yüzey proteazlarının

aktivasyonunu etkilemesi, bu enzimin sadece hypoxia için değil ayrıca kanser terapisi için de önemli olduğunu göstermektedir. Katı tümörlerdeki CAIX ifadesi Karbonik Anhidraz izoformları arasında en iyi gözlenebilendir ve CAIX'un hücrel hipoksiya belirteci olarak kullanılmasına izin vermektedir [39]. İnsan malignant tümörlerinde, yüksek düzeydeki CAIX ifadesi dikkat çekici şekilde serviks kanserlerinde [41] ve böbrek kanserlerinde görülmektedir [38]. Daha düşük düzeydeki ifadesi ise diğer kanser tiplerinde örneğin göğüs kanseri, akciğer kanseri, baş ve boyun kanserlerinde görülmektedir.

CAXII böbrek kanser hücrelerinde %10 olarak ekspre edildiği belirlenmiştir [56, 59]. Klonlanmış olan bu izoenzim yeni von-Hippel-Lindau (VHL) hedefi olarak belirlenmiş ve ekspresyonun VHL'nin doğal tipi tarafından RCC'de güçlüce inhibe edildiği ve ayrıca diğer tümör ilişkili CAIX gibi aynı regülasyona sahip olduğu tespit edilmiştir [42]. Karbonik anhidraz enzimleri canlılarda CO<sub>2</sub> molekülünün hidratasyonunu ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizlemeleri aracılığıyla bu enzimler, hücre membranında ve hücre içindeki değişik bir çok alanda gaz değişimi, iyon transportu ve asit baz dengesinin sağlanması olaylarına katılmaktadırlar [43]. Karbonik anhidraz enzimi, genel olarak metabolik CO<sub>2</sub> transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokularda H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> birikiminde de rol oynamaktadır [46-57]. 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.

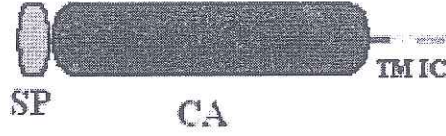
Izoenzimlerin bir kısmı sitozolik formda (CA-I, CA-II ve CA-VII) bulunurken, 4 tanesi ise membrana bağlı (CA-IV, CA-IX, CA-XII ve CA-XIV) olarak bulunmuştur. CA-VI bir salgı enzimi ve CA-V izoenziminin ise bir mitokondriyal enzim olduğu tespit edilmiştir. CAIX ve CAXII izoenzimleri ise kanserle ilişkili olan izoenzimler olarak tespit edilmişlerdir. Ayrıca, bugün henüz sınıflandırılmamış olan NonO/p54<sup>nrb</sup> tanımlanmıştır [44, 54, 57-60].

Asidosis özellikle katı tümörlerin malignant fenotipinin tipik özelliklerindedir. Hücrelerin tamamı karbondioksitin dönüşümlü olarak bikarbonat

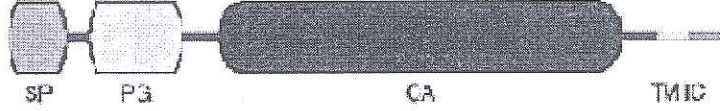


ve protona dönüşümünü katalizleyen karbonik anhidrazlardan birini ekspre ediyor olmaları ile birlikte, özellikle tümör hücreleri transmembran ve HIF1'e bağlı olarak regüle edilen CAIX ve CAXII izoenzimlerini ekspre etmektedir. Chiche ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, tümör hücrelerinde bu enzimlerin ekspresyon seviyelerinin artış gösteriyor olmasının tümör hücrelerine olana avantajları araştırılmıştır [42]. Buna göre hipoksik koşullarda CAIX yada CAXII enzimlerinden en az birini ekspre eden hücre hatlarına karbondioksit yüklemesi sonucunda, hücre dışı ortamın daha asidikleştiği bunun yanında hücre içi ortamın daha alkali hale geldiği gözlenmiştir. Bu durumda her iki CA izoformunun susturulması ile yapılan çalışmalarda tümör hacminin %85 oranında azaldığı gösterilmiştir. Bu nedenle CAIX ve CAXII'nin kombine olarak çalışması ve regülasyonlarının aydınlatılması kanser terapisi açısından oldukça önem arz etmektedir. CAXII, ilk olarak renal kanserlerde mRNA seviyesindeki artış ile belirlenen tümör ilişkili ve membrana bağlı bir enzimdir. Daha sonra CAIX'a benzer olarak diğer kanser türlerindeki ekspresyonları da belirlenmiştir.

CAIX ve CAXII'nin regülasyonlarının da benzer olduğu bilinmektedir. Her iki enzim de hipoksik koşullarda transkripsiyonel seviyede HIF1 tarafından indüklenmekte veya VHL genindeki mutasyonlar bu genlerin indüksiyonuna sebep olmaktadır. Özellikle Wykoff ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, CAIX ve CAXII'nin bazı hücre hatlarında hipoksiya tarafından güçlü bir şekilde kontrol edildiği gösterilmiştir [39]. Bu çalışmada özellikle CAIX promotörü üzerindeki hipoksiya cevap elementinde meydana getirilen mutasyonlarla hipoksik koşullardaki regülasyonun mekanizması daha detaylı olarak belirlenmiştir (Şekil 4). CAXII karakterize edildiğinde yapı olarak CA-IX'a benzerlikleri gözlenmiştir (Şekil 5). Ancak CAIX'dan farklı olarak peptidoglikan bölge bulunmamaktadır. CAXII 39,448 kDa ağırlığında ve 354 aminoasit uzunluğunda bir polipeptidi kodlamaktadır. Enzimin geni kromozom 15' te haritalanmaktadır. 354 aminoasit uzunluğundaki polipeptit bir sinyal dizi, bir CA domaini, kısa bir ekstraselüler dizi, transmembran domaini ve C-terminal sitoplazmik kuyruktan oluşmuştur [61].



Şekil 4: CAXII izoenziminin yapısı ve bölümleri [62].



Şekil 5: CAIX izoenziminin yapısı ve bölümleri [63].

(SP: Sinyal Peptid Bölgesi, TM: Transmembran Bölge, IC: İntrastoplazmik Kuyruklar, CA: Karbonik Anhidraz Aktif Bölgesi)

CAII, bazı normal dokulardaki ekspresyonunun yanı sıra birçok kanserli doku ve hücrelerde de ekspre olmaktadır. Yapılan ilk northern blot çalışmaları sonucunda, böbrek, pankreas, kolon, prostat, over, testis, akciğer ve beyinde tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan RT-PCR analizleri CAXII ekspresyonunun daha yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir. son yapılan immunohistokimya çalışmaları, CAXII' nin özellikle üretken dokularda, örneğin normal endometrium hücrelerinde, over hücrelerinde ve epididimis kanalı hücrelerinde de ekspre olduğu gösterilmiştir. Kolon ve rektum epitelyum hücrelerinde de yoğun CAXII ekspresyonu gözlenirken onikiparmak bağırsağında CAXII ekspresyonu negatif çıkmıştır. Yapılan son çalışmalarda CAXII yüksek bir seviyede glokom hastalarında da göze çarpmaktadır [61]. Bundan dolayı, bu izoenzimin glokom tedavisinde CA-II ve CA-IV izoenzimleri gibi önemli bir hedef olabileceği düşünülmektedir. CAXII izoenziminin karakterizasyonu sonucunda sitozolik CA-I ve CA-IV izoenzimleriyle aynı katalitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [59]. CAIX ve sitozolik CA-II izoenzimlerine göre düşük bir aktiviteye sahiptir ancak yine de kanser tedavisinde önemli bir tümör marker olarak kullanılabilirliği yapılan çalışmalarda gösterilmektedir. Yine CAXII, küçük hücreli akciğer dışı dokularda yüksek dozda ekspresyona uğrayarak prognoz oluşturduğu için kusursuz bir belirteçtir [64].



CAIX ve CAXII izoenzimlerinin asidik tümör mikro çevresinin oluşması ve kanser hücrelerinin invazyonundaki ilişkileri göz önüne alınarak, embriyonik gelişim sırasındaki hücre göçünde de etkili olup olmadığının belirlenmesi ile ilgili çalışmalarda bulunmaktadır. Farklı evrelerdeli, özellikle organogenez evresinin farklı aşamalarındaki fare embriyolarında CAIX ve CAXII ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Buna göre CAIX ekspresyonu oldukça yaygın olarak görülmesine rağmen, farklı dokulardaki ekspresyon seviyeleri farklılık göstermiştir. Buna göre beyin, akciğer, pankreas ve karaciğerde güçlü ekspresyon gözlenirken, böbrek ve midede düşük ekspresyon paterni gözlenmiştir. Embriyonik dokulardaki CAXII ekspresyonu da oldukça yaygın olmasına rağmen, hemen hemen bütün dokulardaki ekspresyonu düşük seviyede olduğu bulunmuştur. CAXII pozitif dokular arasında başlıca beyin, mide, pankreas, karaciğer ve böbrek bulunmaktadır. CAIX ve CAXII izoenzimlerinin insan embriyonik gelişimi sırasındaki ekspresyon seviyelerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonucunda, fare embriyoları ile elde edilen sonuçlardan farklı olduğu gözlenmiştir. Örneğin CAIX' un insan beyin, pankreas, mide ve akciğerdeki ekspresyonları, pankreasın ya da midenin epitelyum hücreleri gibi belirli hücre tipleri ile sınırlandırılmıştır. Yine farelerin embriyonik dokularındaki, böbrek ve bazı organlardaki, CAXII' nin ekspresyonları zayıf ve özellikle yetişkin farelerde bu dokulardaki ekspresyon negatif hale gelirken, insanlarda bu dokulardaki embriyonik aşamadaki CAXII ekspresyonu yetişkin evrede de kaybolmamaktadır. Sonuç olarak tümör ilişkili CAIX ve CAXII enzimlerinin farklı doku ve hücrelerdeki ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi hem tümör ile ilişkili olarak hem de embriyonik gelişim açısından oldukça önemlidir [63].

## 1.8 Sitokinler

Hücrel düzenleyici olarak proteinler olan sitokinler, çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanarak hedeflenen hücrelerin davranışlarını etkileyen moleküllerdir. Her sitokin kendine özgü hücre yüzey reseptörüne bağlanarak, hücre içi sinyal yollarının etkinliğinin değişmesine sebep olur. Bu değişimler diğer moleküller için hücre yüzey reseptörlerinin sayısının artması ya da hücrenin kendi etkilerinin değişmesine neden olabilir. Hücrelerden

sitokinlere gelen yanıt genellikle gen ifadesinin değişimidir. Böylece hücreler yeni fonksiyonlar geliştirebilir ya da proliferere olurlar.

Bugün sitokinler yapısal ve fonksiyonel benzerlikler ile etki mekanizmaları dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır [73]. Sitokinler 6 gruba ayrılmaktadır:

1) **Büyüme faktörleri** (Epidermal büyüme faktörü, EGF; İnsülin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; İnsülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Platelet orjinli büyüme faktörü, PDGF; Nöral büyüme faktörü, NGF; Asidik fibroblast büyüme faktörü, aFGF; Bazik fibroblast büyüme faktörü, bFGF vb.)

2) **Lenfokinler** (İnterlökin-1a, IL-1a; IL-1b; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5 vb.)

3) **Koloni stimüle eden faktörler** (Granülosit/makrofaj koloni stimuli eden factor, GM-CSF; Multi-CSF; Eritropoietin, EPO; Lösemi inhibitor factor, LIF)

4) **Transforme edici büyüme faktörleri** (TGF- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ )

5) **Tümör nekroz faktörleri** (TNF- $\alpha$ ; TNF- $\beta$ )

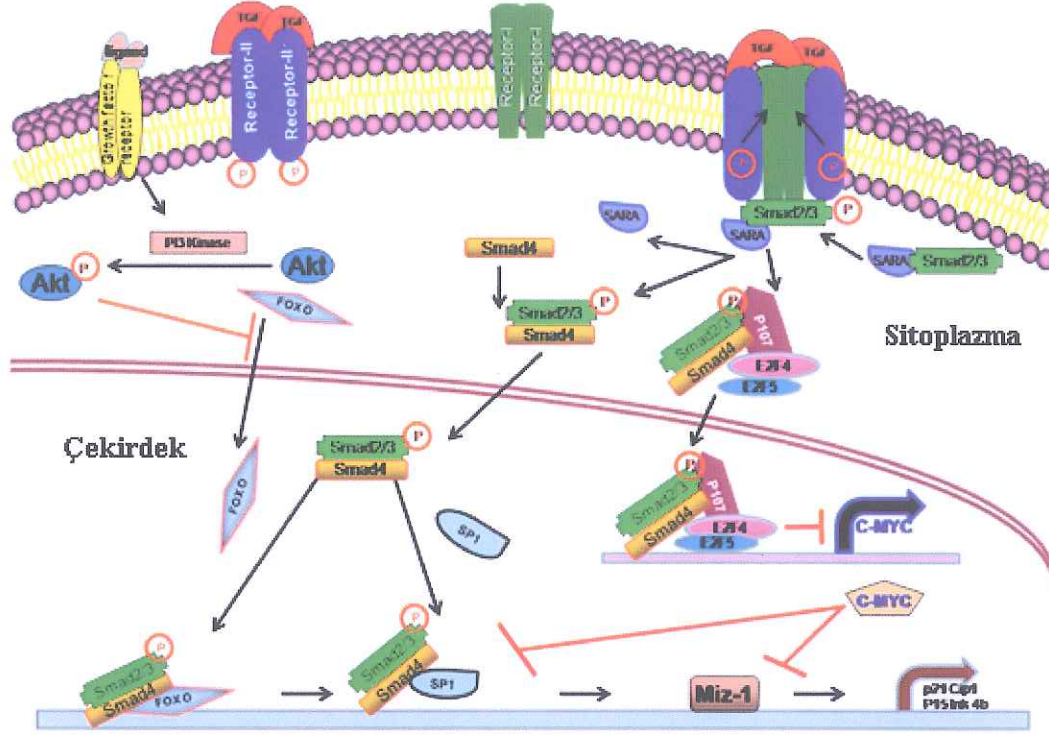
6) **İnterferonlar** (IFN- $\alpha$ ; IFN- $\beta$ ; IFN- $\gamma$ )

Çalışmamızda TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  olmak üzere iki sitokin kullanılmıştır:

### 1.8.1 TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor - Beta)

Pek çok sitokine hücrenin verdiği cevap gen ekspresyon düzeyinde değişimlerle, yeni fonksiyonlar geliştirerek yada proliferasyonla açığa çıkmaktadır. TGF- $\beta$  ailesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi birçok hücrenel süreçte yer alan ve gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstraselüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. Hücre tümör biyolojisinde önemli bir fonksiyonu olan TGF- $\beta$  sitokininin birçok tümör tipinde seviyesinin artış gösterdiği bilinmektedir. İnsanlarda bulunan üç farklı TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) ilk sentezlendiklerinde öncül protein şeklindedir ve oldukça büyük yapıdadırlar. Daha sonra olgun hale gelen TGF- $\beta$  ailesi, BMP (Bone Morphogenetic Protein), Aktivinler ile büyüme ve farklılaşma faktörleri olmak üzere 30'dan fazla üyeye sahiptirler [69].





Şekil 6: TGF- $\beta$  yolağı [69].

TGF- $\beta$  ailesi üyeleri transmembran protein ailesinden olan serin/treonin kinaz aktivitesine sahip, TGF- $\beta$  reseptörlerine bağlanarak hücre hareketlerini başlatırlar (Şekil 6). TGF- $\beta$  reseptör ailesi (TBR) yapısal ve fonksiyonel özellikleri göz önüne alınarak tip I (TBR-I) ve tip II (TBR-II) reseptörler olarak 2 alt gruba ayrılırlar. Bu reseptörler sinyalin SMAD transkripsiyon faktörleri aracılığıyla çekirdeğe ulaşmasını sağlar. TGF- $\beta$  sinyal yolundaki eksiklik yada hasarlar, örneğin SMAD mutasyonları, insanlardaki birçok kanser türü ile ilişki bulunmuştur [74].

Kolorektal kanserde yapılan çalışmalarda, primer tümörde yüksek seviyede TGF- $\beta$  ekspresyonu ileri safhalarla ilişkilidir. TGF- $\beta$  iyi farklılaşmış primer kolon karsinomalarında büyümeyi inhibe edici bir etki gösterirken zayıf diferensiyel olmuş hücrelerin invazyonunu ve proliferasyonunu teşvik eder. TGF- $\beta$  bazı epitelyum ve kanser hücrelerinin büyümesinin inhibisyonuna neden olurken, bazı kanser türlerinde ise TGF- $\beta$  reseptörleri ya da SMAD proteinleri tamamen inaktive olmuştur. Tam tersine, TGF- $\beta$  bazı durumlarda ise kanser hücrelerinin metastaz ve invazyon özelliklerinin artmasına da neden olmaktadır. 2004 yılında Selvemurugan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, fare hücre hatlarında TGF- $\beta$  uygulamasının

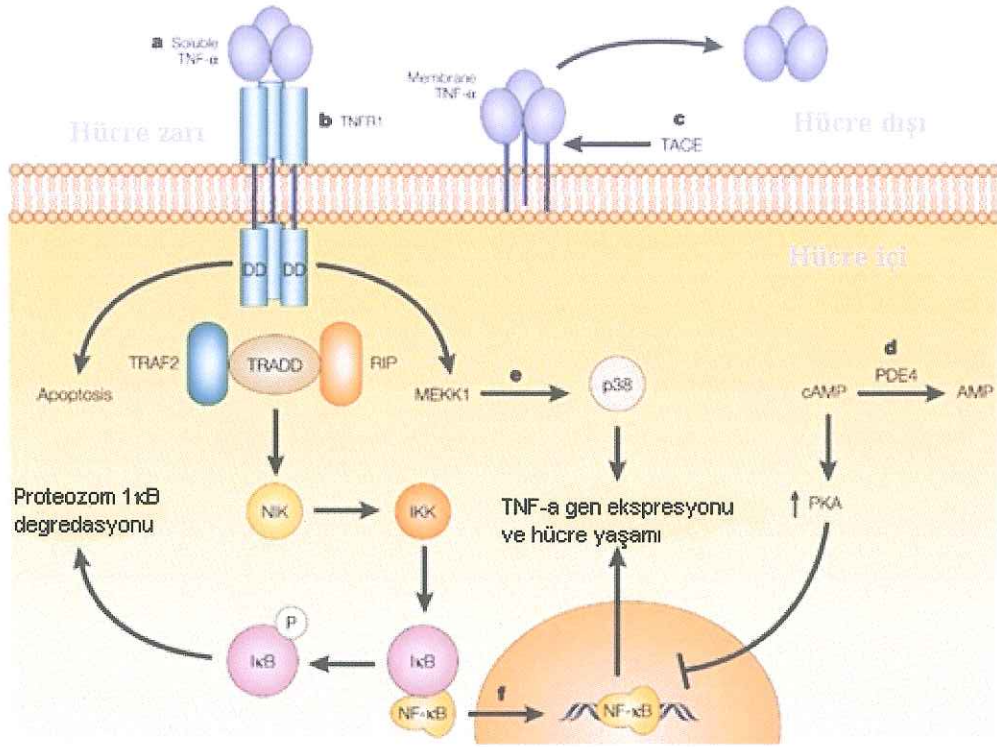
bir çeşit matriks metaloproteinaz olan koolojenaz 3'ün ekspresyonunu stimüle ettiği bulunmuştur [69]. Benzer şekilde, meme kanserlerinin kemiğe metastaz yapmasının araştırıldığı çalışmada, kemik hücrelerinin yetiştirildiği medyum meme kanseri hücrelerine uygulanmıştır. Sonuç olarak, kemik hücrelerinden kaynaklanan ve medyumda bulunan TGF- $\beta$  nedeniyle, memeli hücrelerinde bulunan major adezyon moleküllerinden  $\beta$ 1 ve  $\beta$ 3 integrinlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı buna bağlı olarak meme hücrelerinin göç etme özelliklerinin de arttığı gösterilmiştir [65, 66]. Meme kanserlerinde kemik metastazları en sık görülen komplikasyonlardan olduğu için bu konuda oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Özellikle hipoksik koşulların metastaz ile ilişkisi üzerinde yapılan bir çalışmada, hipoksiya ile indüklenen genlerden olan VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ve CXCR4 (Chemokine Receptor Type 4)'ün transkripsiyonlarının TGF- $\beta$  yolağı aracılığıyla indüklendiği, SMAD7 ve SnoN (Ski-related Novel Protein N) reseptör proteinlerinin ise indüksiyonunun bloke edildiği gösterilmiştir. Böylece TGF- $\beta$  ve hipoksiyanın birlikte etkisi ile, meme kanseri hücrelerinin metastazlarının etkili şekilde önlenebileceği ileri sürülmüştür [67].

### 1.8.2 TNF- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor - Alpha)

TNF- $\alpha$  birçok hücre tipi tarafından salgılanan ve kanserli hücrelerin yıkımını sağlayan bir sitokindir. TNF- $\alpha$  için iki reseptör bulunmaktadır. TNFR1 neredeyse bütün dokularda ekspre olmaktadır ve hem membrana bağlı hem de çözülmüş haldeki trimerik TNF- $\alpha$  ler tarafından aktive edilebilir. TNFR2 ise yalnızca immun sistem hücrelerinde ekspre olur ve membrana bağlı TNF trimerleri tarafından aktive edilir. TNF- $\alpha$  sinyal iletim yolağının aydınlatılması ile birçok veri TNFR1 ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. TNF- $\alpha$  molekülleri trimer halde ligandlarına bağlanır ve bağlanmayı takiben 3 yolak aktive olabilir.

Birincisi, NF- $\kappa$ B'nin (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) aktivasyonu: NF- $\kappa$ B hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, immun cevap ve anti-apoptotik faktörleri de içine alan çeşitli proteinlerin transkripsiyonel regülasyonunda görev alan heterodimerik transkripsiyon faktörüdür.





Şekil 7: TNF- $\alpha$  yolağı [68].

TNF aracılığı ile NF- $\kappa$ B'nin inhibitörünün yıkımı yapılarak NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu sağlanır (Şekil 7). İkincisi ise MAPK (Mitogen-activated protein kinase) yolağının aktivasyonu: TNF, stres ilişkili JNK(c-Jun N-terminal kinase) yolağının güçlü şekilde aktivasyonunu sağlar.

JNK yolağı hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasında yer alır ve genellikle proapoptotik etkilidir. TNF- $\alpha$  ayrıca p38 MAPK ve ERK(Extracellular signal-regulated kinase) yolağlarını da minimal düzeyde aktive eder. Son olarak ise ölüm sinyalinin indüklenmesi: TNF reseptör süper ailesinin ölüm domaini içeren diğer tüm üyeler gibi, TNFR1' de ölüm domaini içerdiği için bu süreçte rol oynamaktadır. Ancak TNF tarafından indüklenen hücre ölümü, TNF- $\alpha$ 'nın inflamatuvar süreçteki önemli görevlerinin yanında yalnızca küçük bir rol üstlenmektedir. TNF- $\alpha$ 'nın ölüm indükleme kapasitesi diğer aile üyeleri ile karşılaştırıldığında oldukça zayıftır ve sıklıkla NF- $\kappa$ B' nin antiapoptotik etkisi tarafından maskelenmektedir [70-73].

## 1.9 Amaç

Çalışmamızda özellikle kanser ilişkili karbonik anhidraz izoenzimleri olan CAIX ve CAXII genlerinin karaciğer, prostat ve meme kanseri hücre hatlarındaki ekspresyon seviyeleri ve bazı sitokinler tarafından gen ekspresyon seviyesinde meydana getirilen değişikliklerin hem mRNA hem de protein seviyesinde belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla;

İlk olarak TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  sitokinlerinin tüm hücre hatlarındaki CAIX ve CAXII mRNA seviyesindeki etkileri real time analiziyle belirlenmiştir.

mRNA seviyesinde etki görülen konsantrasyon ve zaman aralıkları için hücrelerdeki CAIX ve CAXII protein seviyesindeki değişiklikler Western Blot Analiziyle gösterilmiştir.



## **2. MATERYAL VE METOD**

### **2.1 Çalışmalarda Kullanılan Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu**

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, epindorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121°C' de 20 dakika ( 1,02 atm basınçta ) otoklavda steril edildi. Doku Kültürü Laboratuvarı her hafta periyodik olarak temizlendi. Oda kullanılmadığı zamanlarda UV lamba kullanılarak odanın havasının sterilizasyonu sağlandı.

### **2.2 Hücre Kültürü Teknikleri**

#### **2.2.1 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması**

Hücre kültürü medyumunu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine L-Glutamine son konsantrasyonu 0,2 mM ve FCS son konsantrasyonu %10 olacak şekilde ilave edildi. Tüm bileşenler 0,22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

#### **2.2.2 FCS Hazırlanması**

FCS (Fetal Calf Serum) -20°C de saklandı ve taşınması soğuk zincirle yapıldı. Stok serum ilk kullanımdan önce 56°C sıcaklık 30 dakika süre ile inaktive edildi ve tekrar -20°C de saklandı.

### **2.2.3 PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması**

Tablet şeklinde temin edilen PBS (Dulbecco' s phosphate-buffered saline), her tableti 100 ml ddH<sub>2</sub>O ile hazırlandı ve otoklavda steril edildi. 2 - 8°C de saklandı.

### **2.2.4 Hücre Soylarının Başlatılması**

Uzun dönemde sıvı azot içinde saklanan hücre hatlarının büyümesi için sıvı azot tankından çıkarılan hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve hızlıca çözümleri sağlandı. Çözünen hücreler %10' luk FCS içeren medyuma alındı, alt üst edildi ve 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, oluşan pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konuldu.

### **2.2.5 Hücrelerin Büyütülmesi**

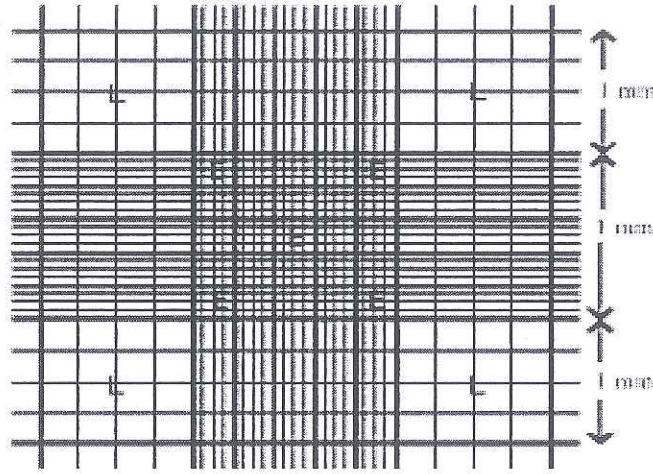
Hücreler 5ml medyumda 25 cm<sup>2</sup> flasklarda, içerisinde 0,2 mM L-Glutamine ve %10 FCS içeren DMEM medyumu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

### **2.2.6 Hücrelerin Pasajlanması**

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 25 cm<sup>2</sup> flasklar için 1 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konuldu.



## 2.2.7 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı



Şekil 8: Hemositometre lamı

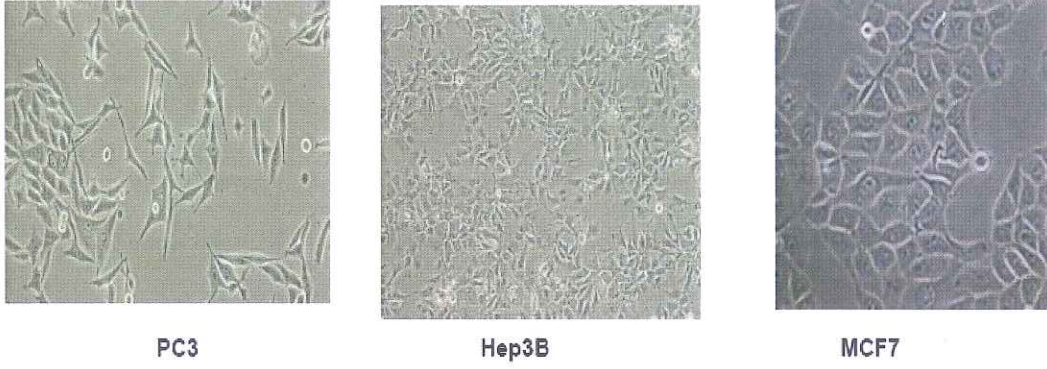
Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1mm<sup>2</sup> alan 0.1 mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre lamı kullanıldı. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 dilusyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı olanlar boyanmadı ve sayım yapıldı.

Süspansiyon mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulundu:

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

## 2.2.8 Hücrelerin Sıvı Azotta Saklanması

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 25 cm<sup>2</sup> flasklar için 1 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet %10 DMSO içeren FCS ile dikkatlice çözüldü ve sıvı azota dayanıklı cryovial tüplerine konularak etiketlendi ve izole edilerek, öncelikle -80 °C derin dondurucuya konuldu, dereceli olarak sıcaklığın düşmesi sağlandıktan sonra sıvı azot içinde uzun dönemli saklandı.



Şekil 9:Çalışmada kullanılan hücre hatları

### 2.2.9 Serum Açlığının Oluşturulması ve Sitokin Uygulaması

Her bir sitokinin spesifik aktivitesi dikkate alınarak steril distile su ile seyreltilmeleri yapılacak ve  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de saklanacaktır. Sitokin uygulamadan önce, serumun tanımlanmamış bir ortam olduğu düşünülürse, sitokin içereceği muhtemeldir. Bu nedenle her bir hücre hattı için serum açlığının oluşturulması amaçlanmıştır. MCF7 ve Hep3B hücreleri için sitokin uygulamasından 24 saat önce, serum içermeyen %0,1 BSA içeren ortama hücreler alınmış ve daha sonra sitokin uygulamaları yapılmıştır. Ancak PC3 hücreleri için serum açlığı spesifik olarak serum konsantrasyonu %10' dan %3'e düşürülerek gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızın bu döneminde hücrelere TGF- $\beta$  uygulaması 10, 100, 200, 500, 1000 u/ml olarak ve TNF- $\alpha$  uygulaması 10, 100, 200, 500, 1000 u/ml olarak 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında gerçekleştirilmiştir. Real Time Analiziyle CAIX ve CAXII mRNA seviyelerinin belirlendikten sonra etki görülen konsantrasyon ve zaman aralıkları için Western Blot Analizi yapılmıştır.

## 2.3 RNA İlişkili Teknikler

### 2.3.1 Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Qiagen RNeasy Mini kit kullanılarak yapıldı. Kısaca, ilk olarak hücrelerin medyumu uzaklaştırıldı ve bir kez soğuk PBS ile yıkandı. Daha



sonra PBS içinde hücreler kazınarak santrifüj tüplerine alındı. 1000 rpm de 5 dakika santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 350-600 µl RLT tamponu içinde (10 µl/ml β-mercaptoethanol içeren) yeniden çözüldü. Lizatın tamamen homojenize olması için vorteks veya 0,9 mm iğne ucu bulunan 1ml' lik şırıngalar kullanıldı. Bu basamakta lizat ya daha sonra kullanılmak amacıyla -80°C' de saklandı ya da RNA izolasyonu için hemen kullanıldı. RNA konsantrasyonu ve saflığı O.D<sub>260</sub> ve O.D<sub>280</sub> spektrofotometrik ölçümleri alınarak belirlendi.

### **2.3.2 Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonları (RT-PCR)**

RT-PCR iki ayrı basamakta yapılmıştır:

1. Reverse-Transkriptaz (RT) kullanılarak cDNA sentezlenmesi
2. Spesifik primerler ve ilk basamakta elde edilen cDNA kullanılarak ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR).

### **2.3.3 cDNA Sentezi (RT)**

cDNA sentezi için 2.1.' de belirtildiği üzere izole edilen total RNA' dan 1µg kullanılmıştır. Kısaca 1µg total RNA, 1µl random primer ve distile su toplam hacim 10 µl olacak şekilde karıştırıldı. Karışım 10 dakika 70°C'de inkübe edildi ve sonra buz üzerine alındı. Karışım üzerine 5xMMLV (Moloney murine leukaemia virus) tampon, dNTP mix (10 mMeach of dATP, dGTP, dTTP and dCTP), RNase inhibitörü (RNAsin®) ve MMLV reverse transcriptase enzimi ilave edilerek 42°C' de 50 dakika inkübe edildi. Sentezlenen cDNA -20°C' de saklandı.

### **2.3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR) ve Optimizasyonları**

İnsan karbonik anhidraz IX, XII için PCR koşulları, daha önceki çalışmalarımızda optimize edildiği için belirlenen koşullar kullanıldı. İnternal kontrol olarak kullanılan İnsan-β-2-mikroglobilin (H-β-2) için PCR koşulları da

laboratuvarımızda birçok çalışmada kullanıldığı için daha önceden optimize edilmiştir. CAIX ve CAXII için primer dizaynı ve PCR koşullarının optimizasyonu yapılmıştır.

Tablo 1: Kullanılan spesifik primerlerin dizileri ve uzunlukları

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'	
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'	
H- $\beta$ -2-forward	20	5'-TTT CTG GCC TGG AGG CTA TC -3'	370
H- $\beta$ -2-reverse	21	5'-CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC-3'	

### 2.3.5 Real Time PZR Analizleri

Real time analizleri için Roche 480 Light Cycler cihazı ve Roche Light cycler SYBR Green kiti kullanıldı. CAIX, CAXII ve insan  $\beta$ -2 mikroglobilin geni real time PCR'ları için optimizasyonlar yapıldıktan sonra, gen ekspresyonu kantitatif miktarları  $C_T$  metodu kullanılarak hesaplandı [72].



Tablo 2: Real Time PCR için Kullanılan Program

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
Soğutma	1		

### 2.3.6 Primer Tasarımı

*CA9* ve *CA12* primer tasarımı için [www.restrictionmapper.org](http://www.restrictionmapper.org), [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ve [www.idtdna.com](http://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 sequences ) bulunan DNA dizileri ile blast yapılarak *CA9* ve *CA12* geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir.

## 2.4 Protein İlişkili Teknikler

### 2.4.1 Western Blot Analizi

#### 2.4.1.1 Laemli Buffer Kullanılarak Protein Ekstraktlarının Hazırlanması

Western blot çalışmaları için 6 well plate kullanıldı. Kısaca, hücrelerinin medyumunu uzaklaştırılarak hücreler bir kez soğuk PBS ile yıkandı, PBS uzaklaştırıldıktan sonra taze hazırlanmış Laemli bufferdan 75 µl direkt hücrelerin üzerine eklenerek ve hücre kazıyıcısı ile hücreler kazınarak ependorfa alındı. Protein ekstraktları 12000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek, bu basamakta direkt SDS PAGE uygulaması için kullanıldı.

Tablo 3: Western Blot için kullanılan solusyonlar

SOLUSYON	İÇERİĞİ
Laemli Tamponu	0.125 M Tris-HCl(pH: 3.8), %4 (w/v) SDS, %10 (v/v) Gliserol, %10 (v/v) β-2-Mercaptoetanol
Bromfenol Mavi	%0.05 (w/v) bromfenol mavi distile su içinde
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



#### 2.4.1.2 SDS Page

Elektroforez aparatları ve cam levhalar su ve %70 etanol ile temizlendi. İlk olarak ayırma jeli hazırlanarak, üst kısmına 3 cm boşluk kalacak şekilde döküldü ve hemen üzerine %90 izopropanol ilave edilerek hava kabarcığı oluşumu engellendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol uzaklaştırılarak ddH<sub>2</sub>O ile yüzey yıkandı ve Whatman 3MM kağıdı ile yüzey kurutuldu. Ardından yığma jeli döküldü. Yığma jelinin polimerizasyonundan sonra, tarak çıkarılarak ve kuyucuklardaki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için yine ince şeritler halinde kesilmiş Whatman 3MM kağıdı kullanıldı. Daha sonra hazırlanan jeller tank içine yerleştirildi. Örneklerin bromophenol blue ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jelin yürütülmesi, 0.1 (w/v) SDS içeren 1X Yürütme Tamponu ile tank doldurularak (orta kısım ve alt kısım) 200 volt ve 126 mA akımda yaklaşık 45-50 dakika yürütüldü.

#### 2.4.1.3 Western Blot

Proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membranlar kullanıldı. Kısaca, jeller cam levhalar arasından çıkarıldı, yığma jeli kesilerek uzaklaştırıldı ve jel transfer buffer içine alınarak dengelemesi için oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Whatman 3MM kağıt ve PVDF membranlar (15 saniye metanolde aktive edilmiş) jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlandı. Bu sırada sünger pedler ve transfer aparatları da transfer buffer içine alındı. Daha sonra sandviç hazırlandı. Bunun için transfer kasedi arasına süngeri Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger olacak şekilde dizildi. Daha sonra kaset, transfer buffer ile dolu olan blot tankına yerleştirilerek 150 volt, 400 mA akımda 75 dakika transfer yapıldı (15 volt akımda 12-18 saatte yapılabilir).

#### 2.4.1.4 Proteinlerin Belirlenmesi

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar 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 inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez yıkama yapılarak membran

yıkandı, bunun için %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS kullanıldı. Sonra membran primer antibody ile 1-1.5 saat oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda inkübe edildi. Primer antibodyler %5 (w/v) yağsız süt tozu (veya %5 (w/v) FBS) ve %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS içinde hazırlandı. Süre sonunda primer antibody çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez yıkama yapılarak membran yıkandı. Daha sonra uygun sekonder antikorlar kullanılarak (10-20 ml horseradish peroxidase-conjugated, anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG ya da anti-goat IgG, 1:2000-1:10000 oranında sulandırılmış, %5 (w/v) yağsız süt tozu (veya %5 (w/v) FBS) ve %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS) 1 saat oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda inkübe edildi. Son basamakta tekrar yukarıda belirtildiği gibi yıkama işlemleri tekrar edilerek proteinlerin belirlenmesi için ECL (Enhanced Chemi-Luminescent) kit kullanıldı. membranlar Kodak X-Ray filmi üzerine alınarak, 10 saniye ile 10 dakika arasında değişen sürelerde, sinyal gücüne bağlı olarak, kasetler içinde bekletildi. Daha sonra film banyo edilerek oluşan bantlar taranarak dansitometrijk analizleri yapıldı.

## 2.5 İstatistiksel Analiz

Deney sonuçlarının istatistiksel analizleri tek yönlü ANOVA testi (Minitab15 versiyonu) kullanılarak gerçekleştirildi.  $P \leq 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi ( $p < 0.05$ ).



### 3. BULGULAR

#### 3.1 mRNA Düzeyinde Ekspresyon Çalışmaları

Çalışmamız kapsamında karaciğer, prostat ve meme kanseri hücre hatlarında ilk olarak CAIX ve CAXII ekspresyonu mRNA seviyesinde belirlenerek farklı sitokinlerin mRNA seviyesindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla deneylerimizin TGF- $\beta$  sitokini uygulanmış hücre hatlarındaki CAIX ve CAXII gen ekspresyon seviyelerinin araştırılması Balıkesir Üniversitesi Bilimler Araştırma Merkezindeki (BÜTAM) Roche Light Cycler 480 Real Time cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yapılan Real time PCR çalışmaları birbirinden bağımsız en az iki tekrar olacak şekilde ve bir PCR uygulamasında her bir deney grubu için en az üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Gen ekspresyon seviyeleri  $C_T$  (delta  $C_T$ ) metodu kullanılarak belirlenmiş ve rölatif kuantifikasyon olarak presente edilmiştir [72].

Buna göre gen ekspresyon seviyeleri internal gen dikkate alınarak hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler tek yönlü ANOVA testi (Minitab15 versiyonu) kullanılarak yapılmıştır.

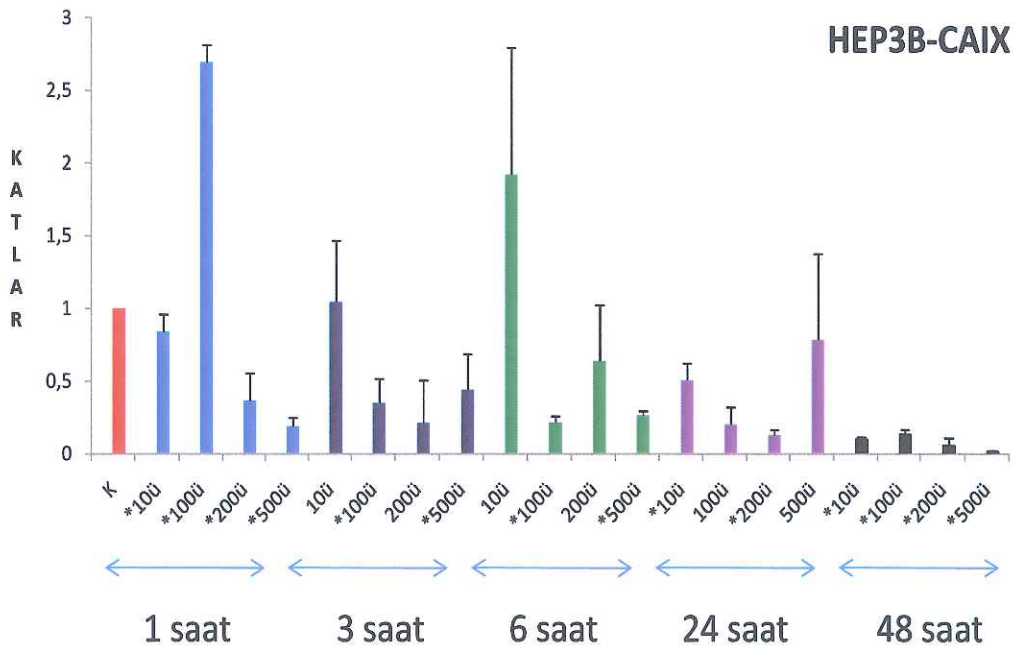
##### 3.1.1 Hep3B Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkilerinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

Hep3B hücrelerine TNF- $\alpha$  sitokini 1, 3, 6, 24 ve 48 saat zaman aralıklarında uygulanmış ve CAIX ve CAXII ekspresyon seviyelerine etkileri analiz edilmiştir. Genel olarak tüm zaman aralıklarında ve konsantrasyonlarda CAIX mRNA seviyesinde azalmaya neden olan TNF- $\alpha$ 'nın özellikle 48 saatte tüm değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 10 ve 11).

CAXII mRNA seviyesinde ise özellikle 1. ve 3. saatte artış gözlenirse de, sonraki zaman aralıklarında bu etki kaybolmuştur. CAIX mRNA seviyesinde düşüş ile paralel olacak şekilde CAXII mRNA seviyesinde 48 saat zaman aralığında gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 11).

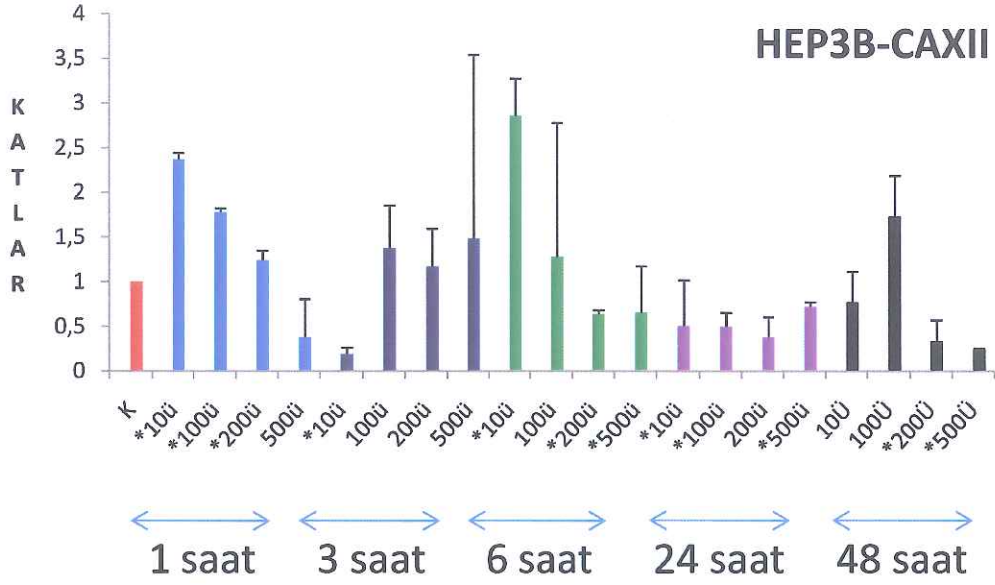
Hücre hattında TGF- $\beta$  sitokini ile yapılan 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında sitokin uygulama sonuçlarına göre ise, genel olarak ekspresyon seviyesinde artış göze çarpmaktadır (Şekil 12 ve 13).

CAIX mRNA seviyesi analiz edildiğinde erken saat dilimlerinde, CAXII mRNA seviyesi analiz edildiğinde ise homojen ve tüm saat uygulamalarında doğru orantılı artış mevcuttur (Şekil 12 ve 13).

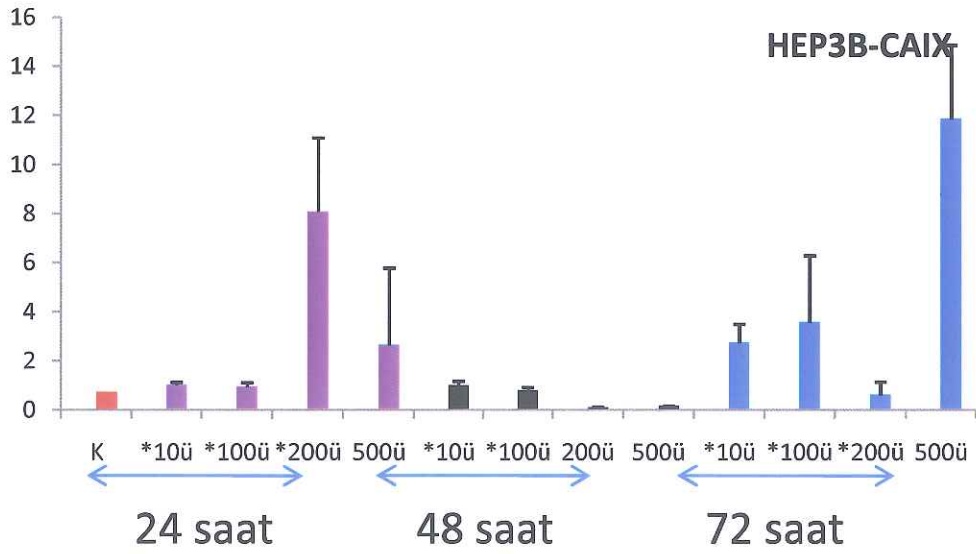


Şekil 10: Hep3B hücre hattında TNF- $\alpha$  sitokininin 1, 3, 6, 24 ve 48 saatlik zaman aralıklarında CAIX ekspresyonuna etkisi

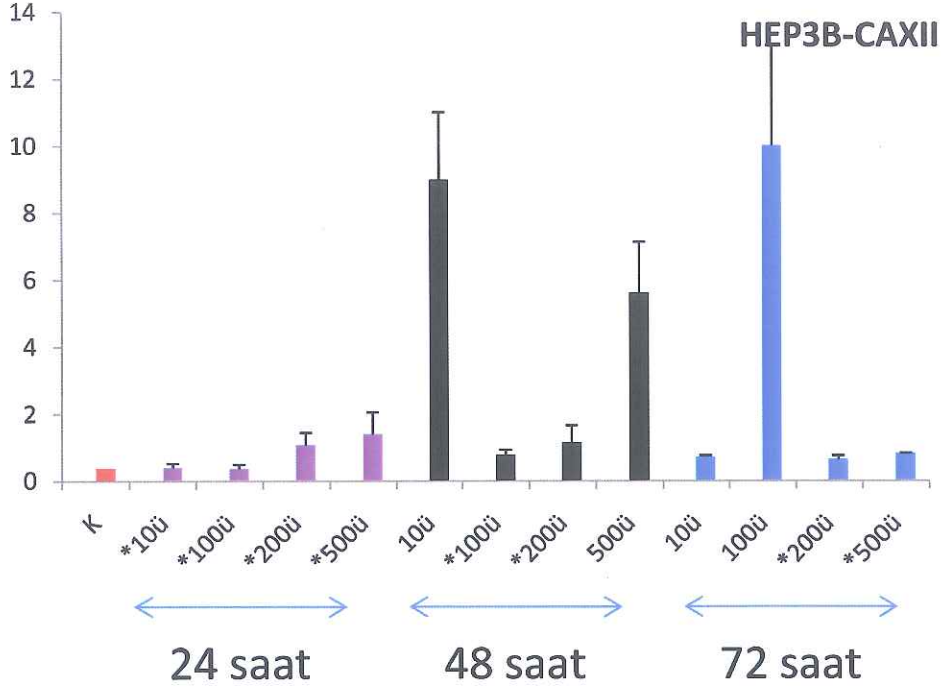




Şekil 11: Hep3B hücre hattında TNF- $\alpha$  sitokininin 1, 3, 6, 24 ve 48 saatlik zaman aralıklarında CAXII ekspresyonuna etkisi



Şekil 12: Hep3B hücre hattında TGF- $\beta$  sitokininin 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında CAIX ekspresyonuna etkisi

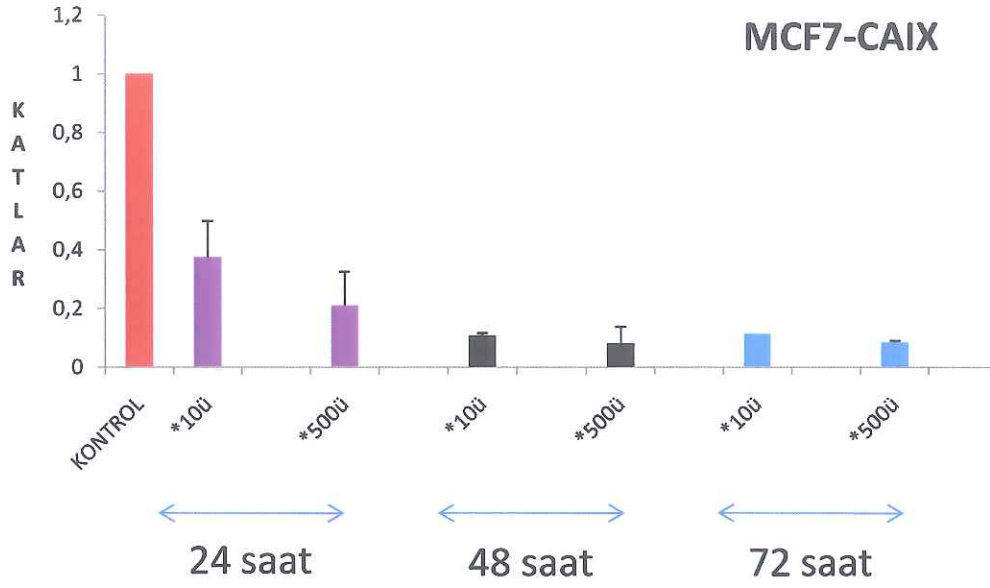


Şekil 13:Hep3B hücre hattında TGF- $\beta$  Sitokininin 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında CAXII ekspresyonu üzerine etkisi

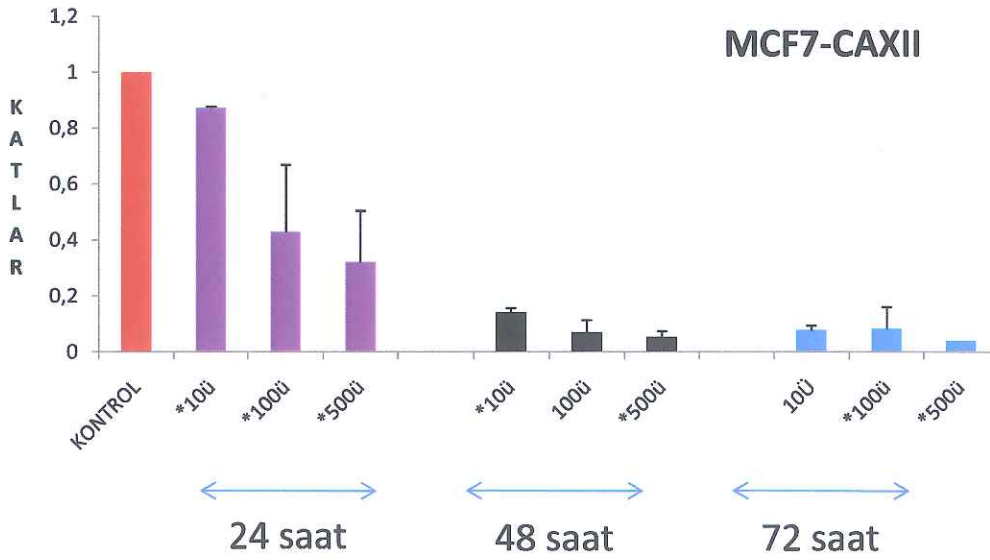
### 3.1.2 MCF7 Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkilerinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

Meme kanseri model hücre hattı MCF7 hücrelerinde TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  uygulaması 10 u/ml ve 500 u/ml olacak şekilde 2 farklı konsantrasyon ve 24, 48, 72 saat olmak üzere üç farklı zaman aralığında yapılmıştır. Çalışılan tüm konsantrasyon ve zaman aralıklarında TNF- $\alpha$  hem CAIX hem de CAXII mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya sebep olmuştur (Şekil 14 ve 15). TGF- $\beta$  ise özellikle 24 ve 48 saatte hem CAIX hem de CAXII mRNA'sında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olurken, 72 saatte bu etki giderek azalmıştır (Şekil 16 ve 17).

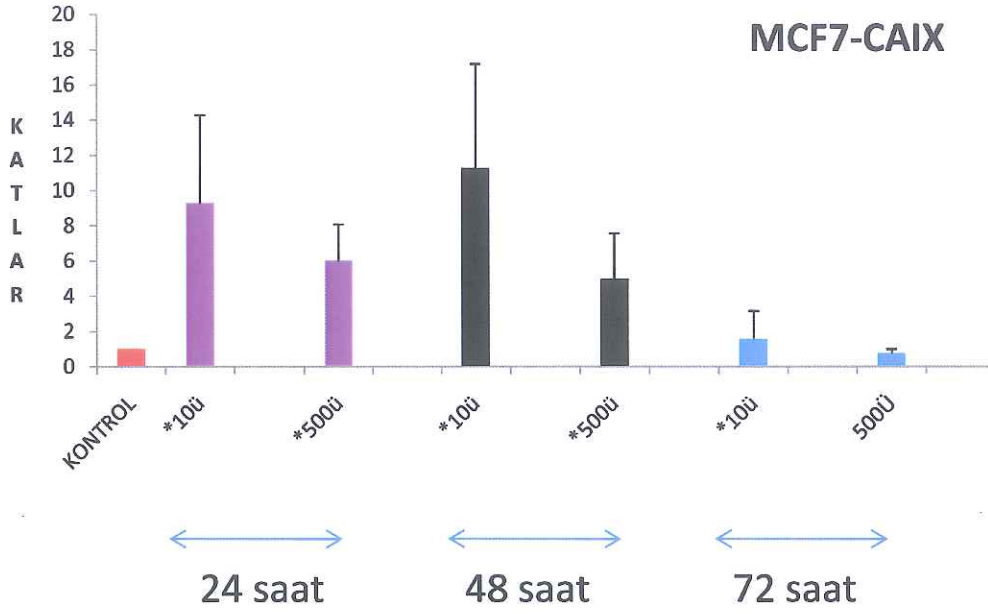




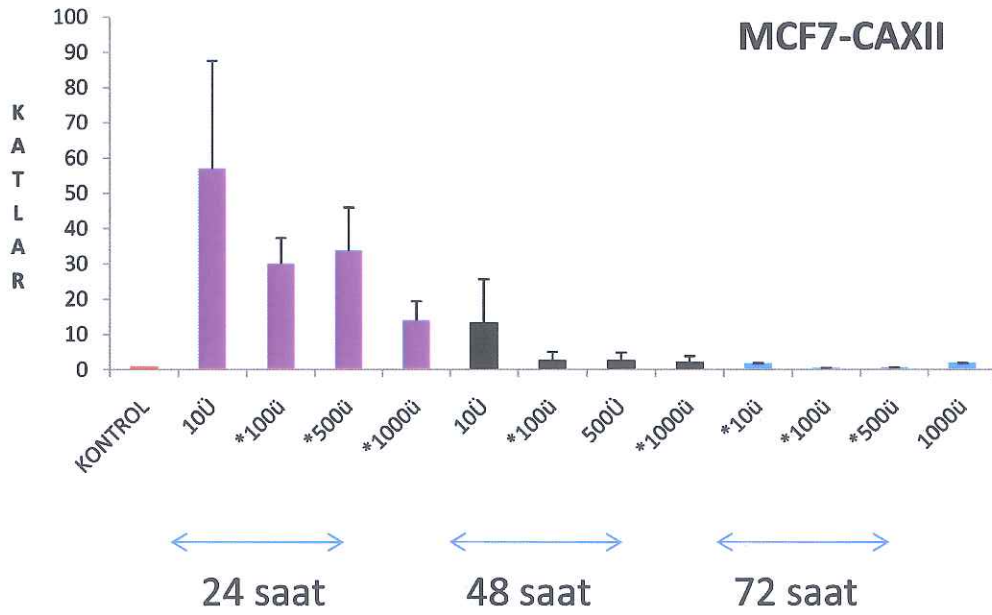
Şekil 14: MCF7 hücre hattında TNF- $\alpha$  sitokinlerinin 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında CAIX ekspresyonuna etkisi



Şekil 15: MCF7 hücre hattında TNF- $\alpha$  sitokininin 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında CAXII ekspresyonuna etkisi



Şekil 16: MCF7 hücre hattında TGF- $\beta$  sitokininin 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında CAIX ekspresyonuna etkisi

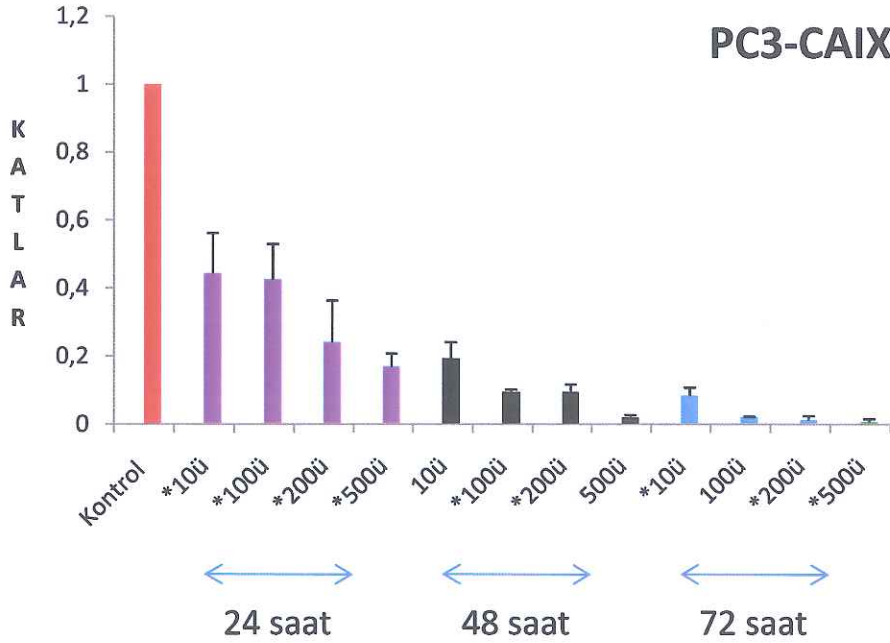


Şekil 17: MCF7 hücre hattında TGF- $\beta$  sitokininin 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında CAXII ekspresyonuna etkisi

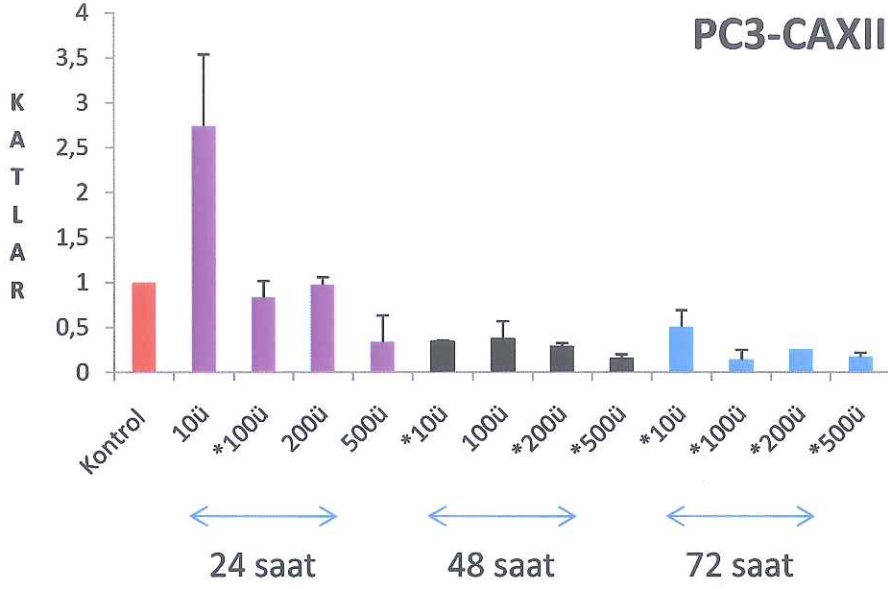


### 3.1.3 PC3 Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkilerinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

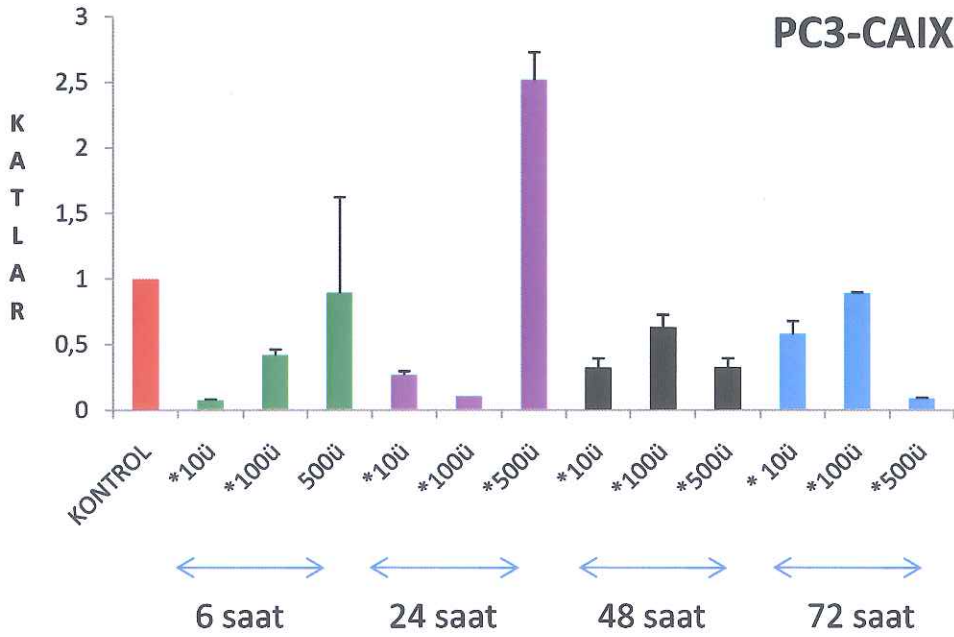
PC3 hücrelerinde 10, 100, 200 ve 500 u/ml TNF alfa uygulamasına bağlı olarak CAIX ve CAXII mRNA seviyesindeki değişiklikler belirlenmiştir. Buna göre TNF- $\alpha$  uygulaması CAIX ve CAXII mRNA seviyesinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 18 ve Şekil 19). TGF- $\beta$  ise 10, 100 ve 500 u/ml olacak şekilde 6, 24, 48 ve 72 saat süresince PC3 hücrelerine uygulanmıştır ve özellikle 6 saat ve 24 saat zaman aralıklarında CAIX mRNA seviyesinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur. CAXII mRNA seviyesindeki etkide CAIX için bulunan etkiye benzer olarak 6 ve 24 saatte azalma şeklinde iken, özellikle 48 saatte CAXII mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 20 ve Şekil 21).



Şekil 18: PC3 hücre hattında TNF- $\alpha$  sitokinlerinin 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında CAIX ekspresyonuna etkisi

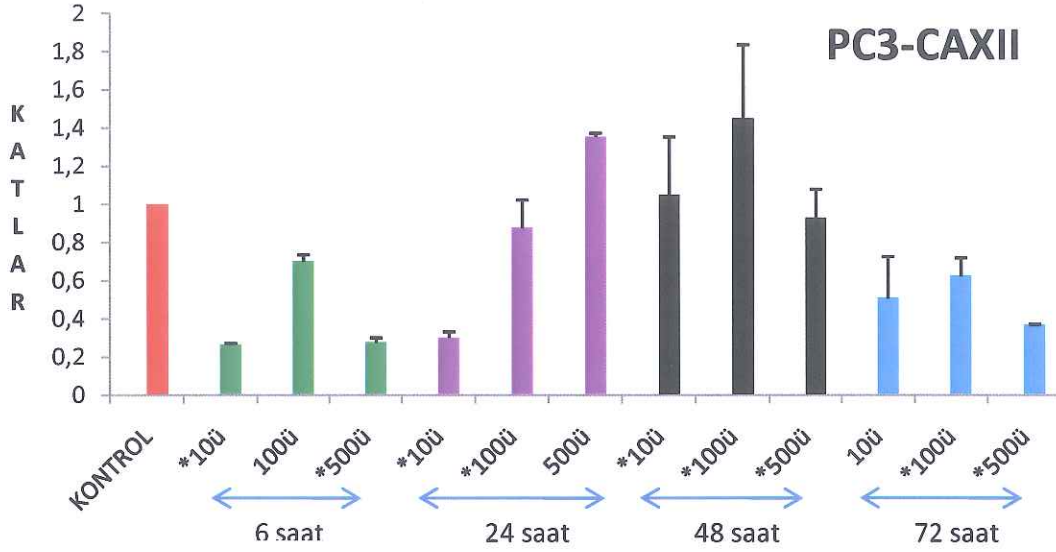


Şekil 19: PC3 hücre hattında TNF- $\alpha$  sitokininin 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında CAXII ekspresyonuna etkisi



Şekil 20: PC3 hücre hattında TGF- $\beta$  sitokininin 6, 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında CAIX ekspresyonuna etkisi





Şekil 21: PC3 hücre hattında TGF- $\beta$  sitokininin 6, 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında CAXII ekspresyonuna etkisi

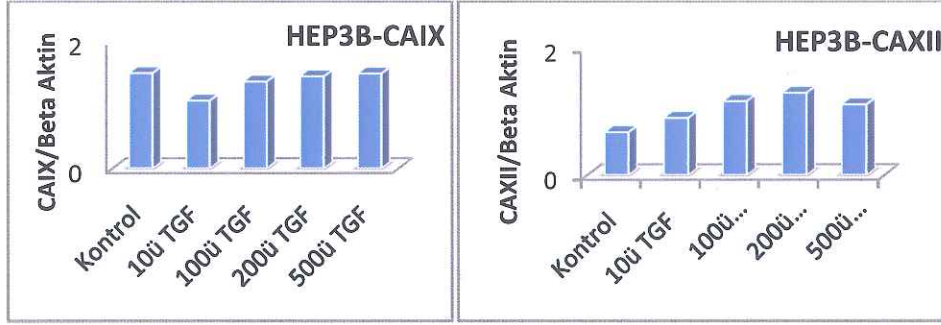
Real Time PCR Analizlerinde kullanılan asteriks işareti (\*) istatistiksel olarak anlamlı bulunan ( $p < 0.05$ ) dozlarda kullanılmıştır.

### 3.2 Protein Düzeyinde Ekspresyon Analizi

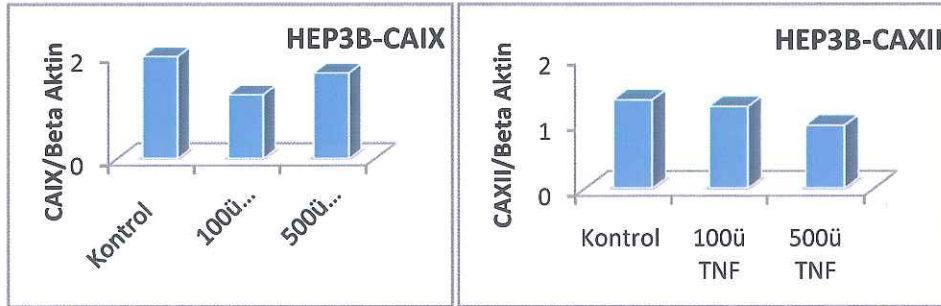
Sitokinlerin hücrelerdeki CAIX ve CAXII protein seviyesine etkilerinin belirlendiği western blot analizleri hücrelere 10, 100, 200 ve 500u/ml TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  uygulaması yapılarak 72 saat zaman aralığında gerçekleştirilmiştir. Sitokin uygulanmış hücrelerden 72 saat sonunda Laemli Tamponu kullanılarak hücre kazıyıcı ile hücre lizatı elde edilmiştir. Elde edilen hücre lizatında protein ölçümleri, Quanti-iT Protein Assay Kit (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) ile Qubit Fluorometer kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SDS Page ve proteinlerin membrana transfer edilmesinden sonra spesifik antikorlar ile inkübe edilerek proteinlerin belirlenmesi sağlandı. Elde edilen bantlar dansitometrik olarak analiz edildi.

### 3.2.1 Hep3B Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkilerinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi

Hep3B hücrelerinde TNF- $\alpha$  uygulaması mRNA seviyesinde 72 saatte CAIX ve CAXII seviyesinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde 100 u/ml ve 500 u/ml TNF- $\alpha$  uygulaması CAIX ve CAXII protein seviyesinde de azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 22). TGF- $\beta$  uygulaması da mRNA seviyesinde belirlenen değişikliklerle paralel olacak şekilde CAIX protein seviyesinde çok anlamlı bir değişiklik oluşturmazken, CAXII protein seviyesinde 72 saatte artışa neden olmuştur (Şekil 23).

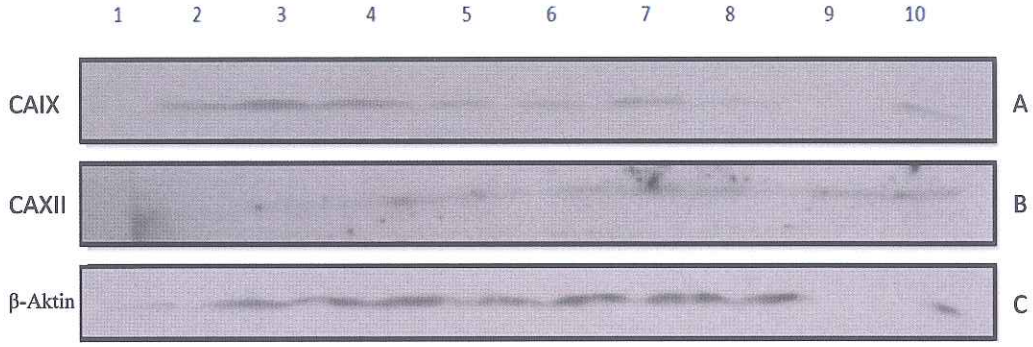


Şekil 22: HEP3B hücrelerine 72 saat TGF- $\beta$  uygulamasının protein ekspresyon seviyesine etkileri



Şekil 23: HEP3B hücrelerine 72 saat TNF- $\alpha$  uygulamasının protein ekspresyon seviyesine etkileri



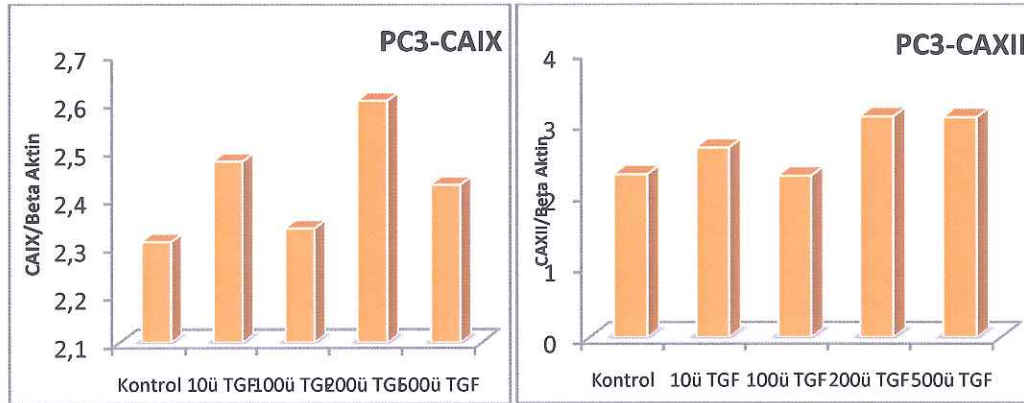


Şekil 24: Hep3B hücre hattında TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin protein seviyesine etkileri-Western Blot Görüntüleri

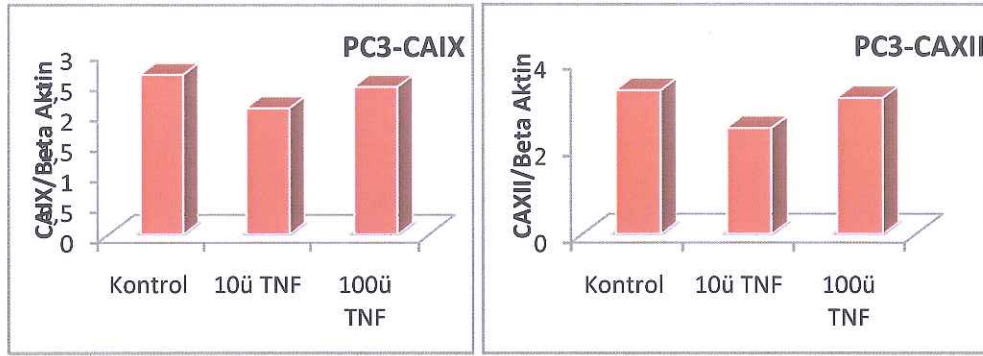
A: CA9 protein seviyesine etkisi B: CAXII C: $\beta$ -Aktin (1: 72 saat kontrol, 2: 10u/ml TGF- $\beta$ , 3: 100u/ml TGF- $\beta$ , 4: 200u/ml TGF- $\beta$ , 5: 500u/ml TGF- $\beta$ , 6: 72 saat kontrol, 7: 10u/ml TNF- $\alpha$ , 8: 100u/ml TNF- $\alpha$ , 9: 200u/ml TNF- $\alpha$ , 10: 500u/ml TNF- $\alpha$ ).

### 3.2.2 PC3 Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkilerinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi

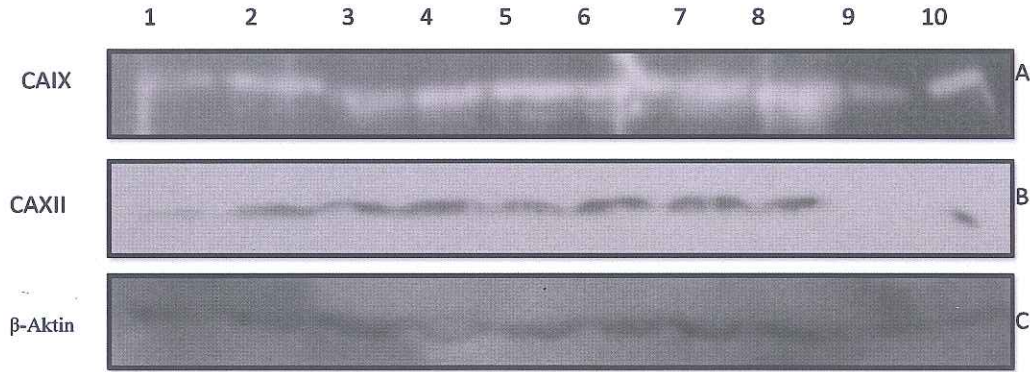
PC3 hücrelerinde TNF- $\alpha$  uygulaması CAIX ve CAXII protein seviyesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 25). TGF- $\beta$  uygulaması ise hem CAIX hem de CAXII protein seviyesinde çalışılan tüm konsantrasyonlarda artışa neden olmuştur (Şekil 26) .



Şekil 25: PC3 hücrelerine 72 saat TGF- $\beta$  uygulamasının protein ekspresyon seviyesine etkileri



Şekil 26: PC3 hücrelerine 72 saat TNF- $\alpha$  uygulamasının protein ekspresyon seviyesine etkileri



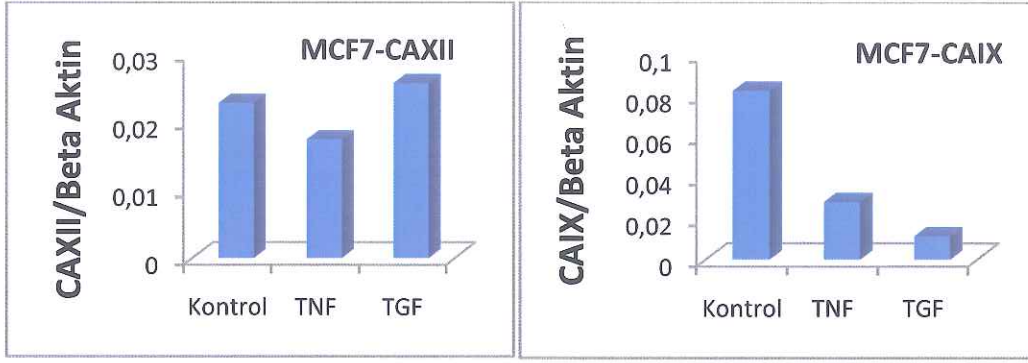
Şekil 27: PC3 hücre hattında TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin protein seviyesine etkileri-Western Blot Görüntüleri

A: CA9, B: CAXII, C: $\beta$ -Aktin (1: 72 saat kontrol, 2: 10u/ml TGF- $\beta$ , 3: 100u/ml TGF- $\beta$ , 4: 200u/ml TGF- $\beta$ , 5: 500u/ml TGF- $\beta$ , 6: 72 saat kontrol, 7: 10u/ml TNF- $\alpha$ , 8: 100u/ml TNF- $\alpha$ , 9: 200u/ml TNF- $\alpha$ , 10: 500u/ml TNF- $\alpha$ ).

### 3.2.3 MCF7 Hücrelerinde TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin Etkilerinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi

MCF7 hücrelerinde ise 200 u/ml TNF- $\alpha$  ve 200 u/ml TGF- $\beta$  uygulaması (Şekil 27) CAIX protein seviyesinde azalmaya neden olurken (Şekil 28), CAXII için özellikle TGF- $\beta$  uygulaması protein seviyesinde artışa neden olmuştur (Şekil 29).





Şekil 28: MCF7 hücrelerine 72 saat 200'er ünite/ml TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin uygulanmasının protein ekspresyon seviyelerine etkileri



Şekil 29: MCF7 hücrelerine 72 saat 200'er ünite/ml TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin uygulanmasını sonucunda CAIX ve CAXII seviyesinde Western Blot görüntüsü

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser gelişimi sürecinde hücreler, pek çok genetik ve epigenetik değişimler geçirirler ve bu değişiklikler anormal fenotip gelişmesine öncülük ederken tümör metabolizması ve mikro çevresini etkiler. Bu şartlar altında kanserin kilometre taşlarından birisi olan hücrelerin düzensiz proliferasyonu ortaya çıkar. Malign transformasyon ve karbonik anhidrazların ekspresyonu arasındaki ilişki tümörle ilişkili CA izoenzimlerinden CAIX ve CAXII'nin keşfine kadar net olarak ortaya çıkarılamamıştı. Son zamanlarda özellikle CAIX ve çeşitli kanserlerle ilişkili olarak yapılan çalışmalar, dikkatleri bu enzim üzerine çekmeyi başarmıştır [3].

Sitokinler genel anlamda, hücrel reaksiyonları düzenleyici özellikleri olan aynı zamanda da gelen uyarılara karşı hücrenin cevabında salgılanarak hedef hücreleri etkileyen biyolojik moleküllerdir. Sitokinlerin tümör metabolizmasında, hücre çoğalması, farklılaşması ve invazyonu gibi kanser açısından önemli olaylardaki rolleri bilinmektedir. Ayrıca kanserde immun tedavide kullanılmaları da sitokin çalışmalarının önemini daha fazla arttırmaktadır. Hem kemoterapiye hem de radyoterapiye dayanıklı böbrek kanserli ve CAIX ekspresyonunun yüksek olduğu bireylerde IL-2 sitokin terapisine olumlu cevap alınmış olması sitokinler ile ilgili çalışmalarında artmasına sebep olmuştur. Farklı sitokinler kullanarak yapılan çalışmalarda, böbrek kanseri hücre hatlarında IL-1- $\beta$  ve IL-4'ün CAIX ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [76].

Buna göre yapılan çalışmamız sonucunda, karaciğer, meme ve prostat kanseri hücre hatlarında TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  sitokinleri ile CAIX ve CAXII ekspresyonu arasındaki ilişki hem mRNA hem de protein seviyesinde belirlenmiştir.

TNF- $\alpha$  sitokininin tümöre direnç özelliği ile nekrotik ya da apoptotik hücre ölümlerini indüklediği bilinmektedir [78]. Buradan yola çıkarak TNF- $\alpha$  sitokiniyle ilgili bulgularımızda genel olarak protein ve mRNA seviyelerinde CAIX ve CAXII ekspresyonunda azalma kesinlik kazanmaktadır.



Prostat ve kolon kanseri hücrelerinde yapılan Microarray Analizleri sonuçlarına göre apoptoz bağlantılı genlerin ekspresyon seviyeleri bu hücre hatlarında azaldığı belirlenmiştir [79,80].

Hep3B hücrelerinde TGF- $\beta$  uygulamasının CAIX mRNA ve protein seviyesinde artışa neden olduğu bilinmektedir [77]. TGF- $\beta$  uygulamasına bağlı olarak CAXII mRNA seviyesindeki artış da bazı zaman aralıklarında homojen olmamakla beraber nettir. Erken saatlerdeki TGF- $\beta$  uygulamasının birçok farklı genin ekspresyon seviyesindeki azalmaya neden olduğunu gösteren mikroarray çalışması elde edilen sonuçlar uygunluk göstermektedir [81].

Hepatoma modeli hücre hattı Hep3B ile yapılan erken saat çalışmaları sonucunda 1, 3 ve 6 saatlik zaman dilimlerinde yapılan 200 ve 500 u/ml TNF- $\alpha$  uygulaması CAIX ekspresyonunda azaltıcı etki yaparken, 100 u/ml TNF- $\alpha$  uygulaması CAXII ekspresyonunu artırıcı etkisi gözlenmiştir.

24 saatlik zaman diliminde yapılan tüm dozlardaki TNF- $\alpha$  uygulamaları CAIX ve CAXII ekspresyonlarını azaltıcı etki yapmıştır. Yine aynı saat diliminde yapılan TGF- $\beta$  uygulaması CAIX ve CAXII için 10 ve 100 u/ml'de azaltıcı, diğer birimlerde ise artırıcı etki yapmaktadır.

48 saatlik zaman diliminde yapılan tüm TNF- $\alpha$  uygulamaları CAIX için azaltıcı, CAXII için 10, 200 ve 500 u/ml dozlarda azaltıcı, 100 u/ml'de ise artırıcı etki yapmaktadır.

72 saatlik zaman diliminde ise 10, 100 ve 500 u/ml TGF- $\beta$  uygulamasının CAIX ekspresyonunu artırıcı etkisi gözlenirken, CAXII için sadece 100 u/ml uygulaması ekspresyonu artırıcı etki yapmıştır (Tablo 4).

TNF- $\alpha$  ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, birçok tümör hücresinde proliferasyonu inhibe ettiği bulunmuştur. Yaklaşık olarak %30-40 civarında tümör hücre serisinin bu molekülle inhibisyonu bilinmektedir [82-83]. TNF- $\alpha$ 'nın tümöre direnç özelliği ve çeşitli nedenlerden dolayı gelişen hücre ölümlerini indüklediği bilinmektedir [78].

TGF- $\beta$  ise çeşitli hücre tiplerinde malin transformasyonu ve tümör progresyonunu destekler. Onkogenlerin baskın olduğu hücrelerin transformasyonu TGF- $\beta$  geninin transkripsiyonunu aktive eder [84-85]. Ayrıca transformasyon meydana geldikten sonra tümör hücre yaşamını, invazyonunu ve metastazını teşvik eder [86].



Tablo 4: Hep3B hücre hattında yapılan tüm Real Time PCR Analizlerinin kontrol değerlere göre yorumu ((↑) artırıcı etki, (↓) azaltıcı etki, (≈) etki yok)

H E P 3 B	SAAT	SİTOKİN ÇEŞİTİ	UYGULANAN DOZ(u/ml)	CAIX	CAXII
	1 saat	TNF- $\alpha$	10	↓	↑
			100	↑	↑
			200	↓	↑
			500	↓	↓
	3 saat	TNF- $\alpha$	10	↑	↓
			100	↓	↑
			200	↓	↑
			500	↓	↑
	6 saat	TNF- $\alpha$	10	↑	↑
100			↓	↑	
200			↓	↓	
500			↓	↓	
24 saat	TNF- $\alpha$	10	↓	↓	
		100	↓	↓	
		200	↓	↓	
		500	↓	↓	
	TGF- $\beta$	10	↓	↓	
		100	↓	↓	
		200	↑	↑	
		500	↑	↑	
48 saat	TNF- $\alpha$	10	↓	↓	
		100	↓	↑	
		200	↓	↓	
		500	↓	↓	
	TGF- $\beta$	10	↓	↑	
		100	↓	↓	
		200	↑	↑	
		500	↑	↑	
72 saat	TGF- $\beta$	10	↑	≈	
		100	↑	↑	
		200	↓	≈	
		500	↑	≈	

Protein analizi sonuçlarının görüldüğü Tablo 5’de, TNF- $\alpha$  uygulamalarından sonraki CAIX ve CAXII protein seviyesinde azalma ile TGF- $\beta$  uygulamalarından sonra CAIX ve CAXII protein seviyelerindeki artış real time analiz sonuçları ile uygunluk göstermektedir.

**Tablo 5:Hep3B hücre hattında yapılan tüm Western Blot Analizlerinin kontrol değerlere göre yorumu (( $\uparrow$ ) arttırıcı etki, ( $\downarrow$ ) azaltıcı etki, ( $\approx$ ) etki yok)**

H E P 3 B	SAAT	SİTOKİN ÇEŞİTİ	UYGULANAN DOZ (u/ml)	CAIX	CAXII
	72 saat	TNF- $\alpha$	100	$\downarrow$	$\downarrow$
			500	$\downarrow$	$\downarrow$
		TGF- $\beta$	10	$\downarrow$	$\uparrow$
			100	$\downarrow$	$\uparrow$
			200	$\downarrow$	$\uparrow$
			500	$\uparrow$	$\uparrow$

Prostat kanseri modeli olarak kullanılan PC3 hücrelerine 72 saatte tüm konsantrasyonlarda TNF- $\alpha$  uygulaması, CAIX ve CAXII ekspresyonunda mRNA ve protein düzeyinde azalmaya neden oldu.

6 saatlik zaman diliminde yapılan 10, 100 ve 500 u/ml TGF- $\beta$  uygulaması CAIX ve CAXII için ekspresyonu azaltıcı etki yapmıştır.

24 saatlik zaman diliminde yapılan 10 ve 100 u/ml TGF- $\beta$  uygulaması CAIX için ekspresyonu azaltıcı, 500 arttırıcı etki yapmıştır. CAXII için ise 100 ve 500 u/ml arttırıcı, 10 u/ml azaltıcı etki yapmıştır. TNF- $\alpha$  uygulaması CAIX için tüm dozlarda azaltıcı, CAXII için 100 ve 500 u/ml’de azaltıcı yönde etkilidir (Tablo 6).

CAIX ve CAXII protein analiz sonuçları değerlendirildiğinde TNF- $\alpha$  uygulamasının yapıldığı tüm konsantrasyonlarda ekspresyon seviyesinde azalma görülmektedir. TGF- $\beta$  uygulaması ise CAIX ve CAXII protein seviyesinde 100 u/ml dışındaki tüm konsantrasyonlarda arttırıcı etki göstermiştir (Tablo 7).

**Tablo 6: PC3 hücre hattında yapılan tüm Real Time Analizlerinin kontrol değere göre yorumu ((↑) artırıcı etki, (↓) azaltıcı etki, (≈) etki yok)**

P C 3	SAAT	SİTOKİN ÇEŞİTİ	UYGULANAN DOZ (u/ml)	CAIX	CAXII	
	6 saat	TGF-β	10	↓	↓	
			100	↓	↓	
			500	↓	↓	
	24 saat	TGF-β	10	↓	↓	
			100	↓	↑	
			500	↑	↑	
		TNF-α	10	↓	↑	
			100	↓	↓	
			200	↓	↑	
48 saat	TGF-β	500	↓	↓		
		10	↓	↑		
		100	↓	↑		
	TNF-α	10	↓	↓		
		100	↓	↓		
		200	↓	↓		
		500	↓	↓		
		72 saat	TGF-β	10	↓	↓
				100	↑	↓
500	↓			↓		
TNF-α	10		↓	↓		
	100		↓	↓		
	200		↓	↓		
500	↓	↓				

**Tablo 7: PC3 hücre hattında yapılan tüm Western Blot Analizlerinin kontrol değere göre yorumu ((↑) artırıcı etki, (↓) azaltıcı etki, (≈) etki yok)**

P C 3	SAAT	SİTOKİN ÇEŞİTİ	UYGULANAN DOZ (u/ml)	CAIX	CAXII
	72 saat	TNF-α	10	↓	↓
			100	↓	↓
		TGF-β	10	↑	↑
			100	↑	↓
			200	↑	↑
			500	↑	↑



MCF-7 hücre hattındaki 24 ve 48 saat real time PCR çalışmalarında CAIX ve CAXII için TGF- $\beta$  ile yapılan tüm deneyler ekspresyon seviyesini arttırıcı, TNF- $\alpha$  ile yapılan tüm deneyler ise azaltıcı yönde etkilidir (Tablo 8).

Western Blot sonuçları ise CAIX ve CAXII'de TNF- $\alpha$  uygulamaları azaltıcı, TGF- $\beta$  uygulaması ise CAIX için azaltıcıyken, CAXII için arttırıcı etkiye sahiptir (Tablo 9).

**Tablo 8: MCF7 hücre hattında yapılan tüm Real Time PCR Analizlerinin kontrol değerlere göre yorumu (( $\uparrow$ ) arttırıcı etki, ( $\downarrow$ ) azaltıcı etki, ( $\approx$ ) etki yok, (-) veri yok )**

M C F 7	SAAT	SİTOKİN ÇEŞİTİ	UYGULANAN DOZ (u/ml)	CAIX	CAXII
	24 saat	TGF- $\beta$	10	$\uparrow$	$\uparrow$
			100	-	$\uparrow$
			500	$\uparrow$	$\uparrow$
			1000	-	$\uparrow$
		TNF- $\alpha$	10	$\downarrow$	$\downarrow$
			100	-	$\downarrow$
	500		$\downarrow$	$\downarrow$	
	48 saat	TGF- $\beta$	10	$\uparrow$	$\uparrow$
			100	-	$\uparrow$
500			$\uparrow$	$\uparrow$	
1000			-	$\uparrow$	
TNF- $\alpha$		10	$\downarrow$	$\downarrow$	
		100	-	$\downarrow$	
	500	$\downarrow$	$\downarrow$		
72 saat	TGF- $\beta$	10	$\uparrow$	$\uparrow$	
		100	-	$\approx$	
		500	$\approx$	$\approx$	
	TNF- $\alpha$	10	$\downarrow$	$\downarrow$	
		100	-	$\downarrow$	
		500	$\downarrow$	$\downarrow$	

**Tablo 9: MCF7 hücre hattında yapılan tüm Western Blot Analizlerinin kontrol değere göre yorumu ((↑) artırıcı etki, (↓) azaltıcı etki, (≈) etki yok)**

MCF7	SAAT	SİTOKİN ÇEŞİTİ	UYGULANAN DOZ (u/ml)	CAIX	CAXII
	72 saat	TNF- $\alpha$	200	↓	↓
		TGF- $\beta$	200	↓	↑

Özet olarak, üç farklı hücre hattında TGFbeta ve TNF alfa sitokinlerinin CAIX ve CAXII gen ekspresyonu üzerine etkileri hem mRNA hem de protein düzeyinde gösterilmiştir. Sitokinlerin hücresel bazda pek çok fizyolojik olayı kontrol ettikleri düşünüldüğünde tümör ilişkili olarak adlandırılan hatta prognostik bir tümör belirteci olarak ifade edilen CAIX ve yine tümör ilişkili CAXII ile etkilerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler literatürdeki eksikliği giderecek ve gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacak niteliktedir...

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Richard, L., *Üçlü Sarmal (The Triple Helix)*.--Gen, Organizma ve Çevre, Tubitak, (1998).
- [2] Barry, B., Lowitz, A., Dennis A., Casciato, F., *Medical Oncology & Principles of Cancer Biology*, (2002).
- [3] Bortner, C. D. & Cidlovski, J. A., "Cellular Mechanisms for the repression of apoptosis", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 259 – 281, (2003).
- [4] <http://www.biyolojiokulu.net/sitem/index.php/ocak> (03.12.2011).
- [5] Kajander, O. A., Karhunen, P.J., Jacobs, H.T., "The Relationship Between Somatic mtDNA Rearrangements", *Human Heart Disease and Aging, Human Molecular Genetics*, 11 (3), 317-324-46, (2002).
- [6] Alberts, B., et al., *Molecular biology of the cell*, 4th ed. New York: Garland-47, (2002).
- [7] Hartwell, L.H., and Karstan, M.B., Cell cycle control and cancer. *Science* 266,1821-28-48, (1994).
- [8] Jacks, T., Weinberg, R. A., " Taking the Study of Cancer Cell Survival to a New Dimension", *Cell*, 111, 923-925, (2002).
- [9] Hengartner M. O., "The biochemistry of apoptosis", *Nature*, 407 (6805), 770, (2000).
- [10] Nurse, P., "Checkpoint pathways come of age" *Cell*, 91,865, (1997).
- [11] Bernards, R., and Weinberg, R. A., "A progression puzzle", *Nature* 418,823, (2002).
- [12] Raff, M., "Cell suicide for beginners", *Nature*, 396,119-22, (1998).



- [13] Sherr, C. J. "Cancer cell cycles" *Science* 274,1672-77, (1996).
- [14] Fearon, E. R., "Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer", *Science*, 278,1043-50, (1997).
- [15] Cavenee, W. K., and White, R.L. "The genetic basic of cancer", *Sci. Am.* (Mar.) 272:72-79, (1995).
- [16] Fink S.L., Cookson B.T., "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells", *Infect Immun.* 73(4): 1907-16, (2005).
- [17] Brown, M. A., "Tumor suppressor genes and human cancer", *Adv. Genet.* 36:45-135, (1997).
- [18] Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., "Genetic instability in colorectal cancer", *Nature* 386:623-27, (1997).
- [19] Compagni, A., and Christofori, G., "Recent advances in research on multistage tumorigenesis", *Brit. J. Cancer* 83:1-5, (2007).
- [20] Vogelstein, B., and Kinzler, K. W., "The multistep nature of cancer", *Trends in Genetics*, 9:138-41, (1993).
- [21] Ames, B. N., Gold, L. S., and Willett, W.C., "The causes and prevention of cancer", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5258-65, (1995).
- [22] Hartwell, L. H., and Kastan, M.B., "Cell cycle control and cancer", *Science* 266:1821-27, (1994).
- [23] Weinberg, R. A., "The retinoblastoma protein and cell cycle control", *Cell* 81:323-30, (1995).
- [24] <http://www.embriyo.org/?part=urun&gorev=oku&id=193>, (03.12.2011).
- [25] Hengartner, M. O., "The Biochemistry of Apoptosis", *Nature* 407: 770 – 776, (2000).

- [26] Strasser, A. Et al., "Apoptosis signaling", *Annu. Rev. Biochem.* 69: 217 – 245, (1999).
- [27] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kanser> (05.12.2011).
- [28] [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237\\_tur\\_p1-104.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237_tur_p1-104.pdf)-71 (01.12.2011).
- [29] [http://en.wikipedia.org/wiki/Carbonic\\_anhydrase-8](http://en.wikipedia.org/wiki/Carbonic_anhydrase-8) (01.12.2011).
- [30] Ozensoy, O., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase IX as Prognostic Marker for Tumor Progression and as a Target for Novel Antitumor Drugs", *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry – Turk J Biochem]* 2007, 32 (3), 130-134, (2007).
- [31] Pfister, H., Fuchs, P. G., Anatomy, taxonomy and evolution of Papillomaviruses. *Intervirology*, 37, 143-149, (1994).
- [32] Lindskog S., "Structure and mechanism of carbonic anhydrase". *Pharmacol. Ther.* 74 (1), 1–20, (1997).
- [33] Thatcher B.J., Doherty A.E., Orvisky E., Martin B.M., Henkin R.I., "Gustin from human parotid saliva is carbonic anhydrase VI". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 (3), 635–41, (1998).
- [34] Tripp B. C., Smith K., Ferry J. G., Minireview: Carbonic anhydrase: New insights for an ancient enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (52), (2001).
- [35] Puscas I., Puscas C., Coltau M., Baican M., Domuta G., The serum of carcinoma patients powerfully activates carbonic anhydrase II, *Experimental Oncology*, 22, 162-16-13, (2000).
- [36] Breton S., "The cellular physiology of carbonic anhydrase" *JOP* 2, 159–64, (2001).

- [37] Silvia Pastorekova & Jan Zwata, Carbonic Anhydrase IX as a target for cancer therapy, Review Article, *Cancer Therapy* Vol2, 245-262, 101, (2004).
- [38] Collier, C., Petrovic, S., "Carbonic anhydrase IX as a target for renal cell carcinoma therapy", *Nephrology Reviews*, volume 3, e5-89, (2011).
- [39] Wykoff, C. C., Beasley, N. J., Watson, P. H., Turner, K. J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G. D., Turley, H., Talks, K. L., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Harris, A.L., "Hypoxia-inducible expression of tumour associated carbonic anhydrases", *Cancer Res.*, 60, 707-72, (2000).
- [40] Pastorekova, S and Pastorek, J. "Cancer related Carbonic anhydrase Isozymes and Their Inhibition", Chapter 9, CRC Press, (2004).
- [41] Woelber, L., Kress, K., Kersten, J. F., Choschzick, M., Kilic, E., Herwig, U., Lindner, C., Schwarz, J., Jaenicke, F., Mahner, S., Milde-Langosch, K., Mueller, V., ve Ihnen, M., "Carbonic anhydrase IX in tumor tissue and sera of patients with primary cervical cancer", *BMC Cancer*, 11, 12-102, (2011).
- [42] 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., Zavada, J., Waheed, A., Sly, W., Lerman, M. I., Stanbridge, E. J., "Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer." *Am J Pathol* 158, 905, (2001).
- [43] Chiche, J., Ilc, K., Laferrière, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, M. N., Brahimi-Horn, M. C., and Pouyssegur, J., "Hypoxia-Inducible Carbonic Anhydrase IX and XII Promote Tumor Cell Growth by Counteracting Acidosis through the Regulation of the Intracellular pH", *Cancer Res.*, 69, 358-103, (2009).
- [44] Karhumaa, P., Kaunisto, K., Parkkila, S., Waheed, A., Pastorekova, S., Pastorek, J., Sly, W.S., Rajaniemi, H., "Expression of the transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in the human male excurrent ducts." *Mol Hum Reprod*, 7, 611, (2001).



- [45] Tripp, B. C., Smith, K., Ferry, J. G.: Minireview: Carbonic anhydrase: New insights for an ancient enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, (2001).
- [46] Kopacek, J., Barathova, M., Dequiet, F., Sepelakova, J., Kettmann, R., Pastorek, J., Pastorekova, S., "MAPK pathway contributes to density-and hypoxia-induced expression of the tumour-associated carbonic anhydrase IX." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1729, 41-77, (2005).
- [47] Robertson, N., Potter, C., Haris, A. L., "The role of carbonic anhydrase IX, in human tumour cell growth, survival and invasion." *Cancer Research* 64, 6160-78, (2004).
- [48] Supuran, C. T., ve Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Curr. Med. Chem.*, 1,61-79, (2001).
- [49] Maren, T. H., "Carbonic anhydrase; Chemistry, physiology and inhibition", *Physiol. Rev.*, 47, 595-80, (1967).
- [50] Leppilampi, M., "Functional and Immunohistological Studies on Cancer Associated Carbonic Anhydrase IX", Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, University of Oulu, (2006).
- [51] Maren, T. H., "The kinetics of  $\text{HCO}_3^-$  synthesis related to fluid secretion, pH control and  $\text{CO}_2$  elimination". *Annu Rev Physiol*, 50,695-82, (1988).
- [52] Chen, J. C., ve Chesler, M., "pH transients evoked by excitatory synaptic transmission are increased by inhibition of extracellular carbonic anhydrase." *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7786, (1992).
- [53] Pastorek, J., Pastorekova, S., Callebaut, I., Mornon, J. P., Zelnik, V., Opavsky, R., Zatovilavaa, M., Liao, S., Portetelle, D., Stanbridge, E. J., Zavada, J., Burny, A., Kettman, R., "Cloning and Characterization of MN, a human tumour-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-heliks DNA binding segment." *Oncogene*, 9, 2877-84, (1994).

- [54] Parkkila, S. ve Parkkila, A. K., "Carbonic anhydrase in the alimentary tract. Roles of the different isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal." *Scand J Gastroenterol*, 31, 305,85, (1996).
- [55] Lindskog, S., "Structure and mechanism of carbonic anhydrase." *Pharmacol ther*, 71-86, (1997).
- [56] Ivanov, S. V., Kuzmin, I., Wei, M. H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B. E., "Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes." *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12596, (1998).
- [57] Chegwidde, W. R., Dodgson, S. J., Spencer, I. M., "In the Carbonic Anhydrase New Horizons", Birkhauser Verlag, Basel, 343-363:88, (2000).
- [58] Wistrand, P. J., "The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO<sub>2</sub> by the human erythrocyte", *Acta Physiol. Scand.*, 343-363, (1981).
- [59] Sly, W. S., ve Hu, P. Y. "Human Carbonic Anhydrases and Carbonic Anhydrase Deficiencies.", *Annu Rev Biochem*, 64, 375, (1995).
- [60] Keha, E. E., "Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu", Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum, (1981).
- [61] Kivela, A. J., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Parkkila, A. K., Bartsova M., Mucha, V., Novak, M., Waheed, A., Sly, W. S., Rajaniemi, H., Pastorekova, S., Pastorek, J., "Expression of von Hippel-Lindau tumour suppressor and tumour-associated carbonic anhydrases IX and XII in normal and neoplastic colorectal mucosa.", *World J Gastroenterol*, 11(17), 2616-2625, (2005).

- [62] Bayram, T., Köpek Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamitlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- [63] Chiche, J., Ilc, K., Laferrie're, J., et all., "Hypoxia-Inducible Carbonic Anhydrase IX and XII Promote Tumor Cell Growth by Counteracting Acidosis through the Regulation of the Intracellular pH ", *Cancer Res.*, 69, 1, (2009).
- [64] Ilie MI, Hofman V, Ortholan C, Ammadi RE, Bonnetaud C, Havet K, Venissac N, Mouroux J, Mazure NM, Pouysségur J, Hofman P., "Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis", *Int J Cancer*, 1, 128 (7), 1614-23, (2011).
- [65] Roman, C., Saha, D., Beauchamp, D., "TGF- $\beta$  and colorectal carcinogenesis", *Microscopy Research and Technique*, 52, 450, (2001).
- [66] Selvamurugan, N., Kwok, S., Alliston, T., Reiss, M., Partridge, N.C., "Transforming growth factor-beta 1 regulation of collagenase-3 expression in osteoblastic cells by cross-talk between the Smad and MAPK signaling pathways and their components, Smad2 and Runx2". *J Biol Chem.*, 279, 19327, (2004).
- [67] Wei, Y. Y., Chen, Y. J., Hsiao, Y. C., Huang, Y. C., Lai, T. H., Tang, C. H., "Osteoblasts-derived TGF-beta1 enhance motility and integrin upregulation through Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human breast cancer cells", *Mol Carcinog.* 47, 526, (2008).
- [68] Michael, A., Frances Rena Bahjat, Emmanuel, A., Theodorakis & Lyle L. Moldawer, *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 736-746, (2003).
- [69] [http://www.biotech.iitm.ac.in/faculty/dk\\_new/research.php.69](http://www.biotech.iitm.ac.in/faculty/dk_new/research.php.69) (01.12.2011).



- [70] Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., "Tumor necrosis factor signaling", *Cell Death Differ*, 10 (1), 45-65, (2003).
- [71] Chen, G., Goeddel, D. V. , "TNF-R1 signalling: a beautiful pathway", *Science*, 296 (5573), 1634,594, (2002).
- [72] Thomas D Schmittgeni & Kenneth J Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nature Protocols*, Vol.3. No.6-100, (2008).
- [73] Koleske, A. J. ve Young, R. A. "An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators", *Nature*, 368, 466, (1994).
- [74] Rasheed, S., Harris, S., Tekkis, P., Turley, H., Silver, A., McDonald, P. J., Talbot, I., Glynne-Jones, R., Northover, J., Guenther, T., "Microvessel Density and Carbonic Anhydrase-IX Expression in the Epithelial Cells with the Highest Proliferative Capacity", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46(4), 497-504, (1998).
- [75] Yıldırım H., "Karbonik Anhidraz IX Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [76] 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).
- [77] Rodriguez-Berriguete G., Fraile B., Paniagua, R., Aller, P., Royuela, M., "Expression of NF- $\kappa$ B-related proteins and their modulation during TNF- $\alpha$ -provoked apoptosis in prostate cancer cells", *Prostate*, doi: 10.1002/pros.21404, (2011).
- [78] Beyaert, R., Fiers, W., "Molecular Mechanisms of Tumor Necrosis Factor-Induced Cytotoxicity What We Do Understand and What We DoNot", *FEBS Lett*, 340, 9-16, (1994).
- [79] He, Z., Zhang, Y., Mehta, S. K., Pierson D. L., Wu, H., Rohde, L. H., "Expression Profile of Apoptosis Related Genes and Radio-sensitivity of Prostate Cancer Cells", *J Radiat Res.*, (Tokyo), (2011).

- [80] Sağkan Ilıkçı, R., "Bazı Sitokinlerin İnsan Kolon Kanseri Hücreleri Üzerinde CAIX İfade Düzeylerine Etkilerinin Belirlenmesi", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [81] Zimonjic, D. B., Zhou, X., Lee, J. S., Ullmannova-Benson, V., Tripathi, V., Thorgeirsson, S. S., Popescu, N. C., "Acquired Genetic and Functional Alterations Associated with Transforming Growth Factor Beta Type1 Resistance in Hep3B Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line", *J Cell Mol Med.*, 13 (9B), 3985-92, (2009).
- [82] Munker, M., Munker, R., Saxton, R. E., Koeffler, H. P., "Effect of Recombinant Monokines, Lymphokines, and other agents on clonal proliferation of human lung cancer cell lines", *Cancer Res.*, 47, 4081-4085, (1987).
- [83] Ruggiero, V., Latham, K., Baglioni, C., "Cytostatic and Cytotoxic activity of Tumor Necrosis Factor on Human Cancer Cells", *J Immunol*, 138, 2711-2717, (1997).
- [84] Birchenall-Roberts, M., Ruscetti, F. W., Kasper, J., Lee, H. D., Friedman, R., et al., "Transcriptional regulation of the transforming growth factor beta 1 promoter by v-src gene products is mediated through the Ap-1 complex", *Mol Cell Biol.*, 10, 4978-4983, (1990).
- [85] Geiser, A., Kim, S., Roberts, A. B., Sporn, M. B., "Characterization of the Mouse transforming growth factor-B1 promoter and activation by the Ha-ras oncogene", *Mol Cell Biol*, 11, 84-92, (1991).
- [86] Roman, C., Saha, D., Beauchamp, D., "TGF-b and colorectal carcinogenesis", *Microscopy Research and Technique*, 52, 450-57, (2001).