

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

**BAZI SİTOKİNLERİN İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE CAIX
İFADE DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Rahşan İLİKÇİ SAĞKAN

Balıkesir, Haziran-2009

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

BAZI SİTOKİNLERİN İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE CAIX
İFADE DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Rahşan İLİKÇİ SAĞKAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

İkinci Danışman: Prof. Dr. Ali ŞENGÜL

Sınav Tarihi: 30.06.2009

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (Danışman-BAÜ)

Prof. Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN (EÜ)

Prof. Dr. Leyla AÇIK (GÜ)

Prof. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (BAÜ)

Balıkesir, Haziran-2009

“Bu doktora alışması Balıkesir Üniversitesi 2008 / 15 No’lu Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.”

ÖZET

BAZI SİTOKİNLERİN İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE CAIX İFADE DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Rahşan ILIKÇI SAĞKAN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

(Doktora Tezi / Tez Danışmanı: Doç.Dr. Feray KÖÇKAR)
(İkinci Danışman: Prof. Dr. Ali ŞENGÜL)

Balıkesir, 2009

Karbonik anhidrazlar (CA), karbon dioksitin hidratasyonunu geri dönüşümlü olarak katalize ederler. Transmembran protein CAIX, CA ailesinin tümörle ilişkili bir üyesidir. CAIX ekspresyonu, bazı tümör hücreleri oldukça yüksek ekspresyon düzeyinde iken, normal dokularda oldukça sınırlıdır. CAIX, hipoksi, malin hücre invazyonu ve hücre proliferasyonunun regülasyonunda önemli rol oynarlar.

Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda TNF α , TGF β , IL1 α ve bu sitokinlerin ikili kombinasyonları uygulanmış HT-29 kolon karsinoma hücrelerinde CAIX protein ve mRNA ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. CAIX protein ekspresyonu, CAIX-FITC monoklonal antikor kullanılarak akış sitometrisinde saptanmıştır ve “gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu”, mRNA ekspresyon seviyeleri için kullanılmıştır. Buna ilaveten, bu sitokinlerin etkisi, HT-29 hücrelerinde akış sitometri kullanılarak, propidyum iyodid ile hücre döngüsü, “AnnexinV-FITC apoptozis saptama kiti” ile hücre canlılığı, nekroz ve apoptozis, araştırılmıştır.

TNF α uygulanmış HT-29 hücreleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, mRNA ve protein seviyesinde CAIX ekspresyonunda, zamana bağlı olarak istatistiksel olarak önemli bir azalışa neden olmuştur. TNF α ,-IL1 α , TNF α -TGF β ikili kombinasyonları, HT-29 hücrelerinde sinerjistik etkiyle CAIX ekspresyon seviyesinde daha fazla bir düşüşe sebep olmuştur. Buna ilaveten, tek başına TNF α ve kombinasyonlarının hücre döngüsü analizi, hücrelerin G0/G1 tutuklandıklarını ve hücre canlılığında azalış, hücre nekrozunda artışı göstermiştir. Diğer taraftan, TGF β uygulaması, CAIX protein ve mRNA seviyesinde artışla sonuçlanmıştır. Fakat hücre döngüsü, hücre canlılığı ve nekroz/apoptozis üzerinde bir değişim gözlenmemiştir. Benzer şekilde, IL1 α ve IL1 α -TGF β kombinasyonu uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX ekspresyonu ve hücre döngüsü analizinde anlamlı bir etki bulunmamıştır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: CAIX, ekspresyon, sitokin, TNF α , IL1 α ,TGF β , hücre döngüsü, hücre canlılığı, akış sitometrisi, Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF SOME CYTOKINES ON CAIX EXPRESSION LEVELS IN HUMAN COLUMN CANCER CELLS

Rahşan ILIKÇI SAĞKAN

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(PhD. Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Feray KÖÇKAR)

(CoSupervisor: Prof. Dr. Ali ŞENGÜL)

Balikesir-Turkey, 2009

The carbonic anhydrases (CAs) catalyze the reversible hydration of carbon dioxide. CAIX, transmembrane protein is a tumor associated member of the CA family. CAIX expression is very limited in normal tissue whereas some tumor cells exhibit very high expression. CAIX play important roles in hypoxia, malignant cell invasion and the regulation of cell proliferation.

In this study the CAIX protein and mRNA expression levels in HT-29 colon carcinoma cells treated with different concentrations of TNF α , TGF β , IL1 α and double combinations of these cytokines were investigated. CA IX protein expression was detected by CAIX-FITC monoclonal antibody by flow cytometry and Real time Polymerase Chain Reaction was used for mRNA expression levels. In addition, the effect of these cytokines was investigated in cell cycle by propidium iodide, cell viability, necrosis and apoptosis by “AnnexinV-FITC apoptosis detection kit” in using flow cytometry in HT-29 cells.

TNF α led to statistically significant decrease in CAIX expression protein and mRNA level in time-dependent manner in HT-29 cells compared to control cells. Double combinations of TNF α /IL1 α and TNF α /TGF β caused more decrease in CAIX expression level suggesting their synergistic effect in HT-29 cells. In addition, cell cycle analysis of TNF α in single and combinations showed G0/G1 arrest and decrease of cell viability, the increase cell necrosis. On the otherhand, TGF β result in increase in CAIX mRNA level and protein level but no change in cell cycle, cell viability and necrosis/apoptosis. Similarly, no significant effect in CAIX expression and cell cycle analysis was observed in IL1 α and combinations of IL1 α /TGF β treated HT-29 cell.

KEY WORDS: CAIX, expression, cytokines, TNF α , IL1 α , TGF β , cell cycle, cell viability, flow cytometry, Real time Polymerase Chain Reaction

İÇİNDEKİLER	Sayfa No:
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEYWORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİTESİ	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖNSÖZ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 Kanserde Karbonik Anhidrazların Önemi	1
1.2 Karbonik Anhidrazların Fonksiyonları	3
1.3 Karbonik Anhidrazlar(CA) ve Sınıflandırılmaları	4
1.3.1 Sitoplazmada Bulunan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	5
1.3.2 Mitokondriyal Karbonik Anhidrazlar	7
1.3.3 Farklı Vücut Sıvılarına Salgılanan Karbonik Anhidrazlar	7
1.3.4 Karbonik Anhidraz İlişkili Proteinler	8
1.3.5 Membrana Bağlı Karbonik Anhidrazlar	8
1.3.5.1 Karbonik Anhidraz IX (CA IX)	9
1.3.5.1.a Karbonik Anhidraz IX (CA IX) Tanımlanması ve Genel Yapısı	9
1.3.5.1.b CA IX'un Normal Dokularda Ekspresyonu	10
1.3.5.1.c CAIX'un Tümörlü Dokulardaki Ekspresyonu	11
1.3.5.1.d İnsan CA9 Geninin Regülasyonu	12
1.3.5.1.e CA IX, Tümör Metabolizması ve Sitokinler	15

1.4 Sitokinler	19
1.4.1 Tumor Nekrozis Faktör Alfa	19
1.4.2 Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta	21
1.4.3 İnterlökin-1 Ailesi	23
1.5 Kolorektal Kanser	24
1.6 Çalışmanın Amacı	27
2. MATERYAL VE YÖNTEM	28
2.1 Materyal	28
2.1.1 Hücre Serisi	28
2.1.3 Sitokinler	28
2.1.4 QiaAmp RNA Blood Mini Kit	28
2.1.5 Quantitect Reverse Transcription cDNA Kit	29
2.1.6 Primerler	29
2.1.7 Antikorlar	29
2.1.8 DNA Prep Kit	29
2.1.9 AnnexinV-FITC Kit	29
2.1.10 Kimyasallar	30
2.1.1.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	31
2.1.1.2 Formaldehit Jel Elektroforez Solusyonları	33
2.2 Yöntem	34
2.2.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu	34
2.2.2 Hücre Kültürü Yöntemleri	34
2.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı	34
2.2.2.2 Hücre Kültürü Besi Ortamının Hazırlanması	34

2.2.2.3 FBS Hazırlanması	35
2.2.2.4 PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması	35
2.2.2.5 HT-29 Monolayer Hücre Kültürünün Hazırlanması	35
2.2.3 HT-29 Monolayer Hücre Kültürüne Sitokin Uygulanması	35
2.2.4 Gerçek Zamanlı PZR Çalışmaları	36
2.2.4.1 Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu	37
2.2.4.2 RNA Ürününün Spektrofotometrik Ölçümü	37
2.2.4.3 Formaldehit (FA) Jel Elektroforezi	37
2.2.4.3.1 1,2%FA Jel Hazırlanması	37
2.2.4.4 RNA Örneklerinin Hazırlanması	37
2.2.4.5 Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi	37
2.2.4.6 Gerçek Zamanlı PZR Analizi ile <i>CA9</i> Gen İfadesinin İncelenmesi	38
2.2.5 Hücre Döngüsünün Akış Sitometride İncelenmesi	38
2.2.6 Apoptozun Akış Sitometride AnnexinV Bağlanması ile İncelenmesi	38
2.2.7 Floresan Mikroskop Analizi	40
2.2.8 CA IX Ekspresyonunun Akış Sitometrik Analizi	40
2.3 İstatistiksel Analiz	41
3. BULGULAR	42
3.1 Genel Deneysel Strateji	42
3.1.1 Akış Sitometrik Analizlerin Tasarımı	43
3.1.2. Gerçek Zamanlı PZR Analizlerin Tasarımı	45
3.2 TNF α 'nın HT-29 Hücrelerinde CA9 mRNA ve Protein Düzeyindeki Ekspresyon Seviyelerinin ve Hücre Döngüsü, Apoptozis Üzerinde Etkilerinin Belirlenmesi	48
3.2.1 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 24 saat TNF α Uygulaması	48
3.2.2 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 48 Saat TNF α Uygulaması	55

3.2.3	HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 72 saat TNF α Uygulaması	60
3.3	TGF β 'nın HT-29 Hücrelerinde CA9 mRNA ve Protein Düzeyindeki Ekspresyon Seviyelerinin ve Hücre Döngüsü, Apoptozis Üzerinde Etkilerinin Belirlenmesi	61
3.3.1	HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 24 Saat TGF β Uygulaması	61
3.3.2	HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 48 Saat TGF β Uygulaması	72
3.3.3	HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 72 Saat TGF β Uygulaması	76
3.4	IL1 α 'nın HT-29 Hücrelerinde CAIX Protein Düzeyindeki Ekspresyon Seviyesinin ve Hücre Döngüsü, Apoptozis Üzerinde Etkilerinin Belirlenmesi	80
3.4.1	HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 24 Saat IL1 α Uygulaması	80
3.4.2	HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 48 Saat IL1 α Uygulaması	83
3.4.3	HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 72 Saat IL1 α Uygulaması	86
3.5	Farklı Sitokin Kombinasyonlarının HT-29 Hücrelerinde CA9 mRNA ve Protein Düzeyindeki Ekspresyon Seviyelerinin ve Hücre Döngüsü, Apoptozis Üzerinde Etkilerinin Belirlenmesi	89
3.5.1	HT-29 Hücrelerinde Farklı Sitokin Kombinasyonlarının 24 Saat Uygulaması	89
3.5.2	HT-29 Hücrelerinde Farklı Sitokin Kombinasyonlarının 48 Saat Uygulaması	95
3.5.3	HT-29 Hücrelerinde Farklı Sitokin Kombinasyonlarının 72 Saat Uygulaması	100
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	105
5.	KAYNAKLAR	114

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
CA	Karbonik anhidraz
CARP	Karbonik ahidraz ilişkili protein
HRE	Hipoksi yanıt elemanı
HIF	Hipoksi indükleyen faktör
HBS	HIF bağlanma bölgesi
RCC	Böbrek hücre karsinoması
VHL	Von Hippel Lindau tümör supresör geni
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
TNF α	Tümör nekrozis faktör alfa
TNF-R	Tümör nekrozis faktör reseptörü
DD	Ölüm domaini
FADD	Fas-bağımlı ölüm domaini
TRADD	TNF-R bağımlı ölüm domaini
TGF β	Transforme edici büyüme faktörü beta
T β -R	Transforme edici büyüme faktörü beta-reseptörü
IL1 α	İnterlökin 1 alfa
COX	Sitokrom c oksidaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
PZR	Polimeraz zincir raksiyonu
NF κ B	Nükleer faktör kappa
ECM	Ekstraselüler matriks
EC	Enzim kod numarası
CAIX	Karbonik Anhidraz IX izoenzimi
CA9	Karbonik anhidraz 9 geni
HPNCC	Kalıtıl polipozis olmayan kolorektal kanser
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
FBS	Fötal sığır serumu
HÜKÜK	Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu
PE	Fikoeritrin-phycoerythrin
PI	Propidyum iyodid-
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
SPSS	Statistics program for social and science
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
TBP	TATA bağlanma proteini

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No:

Şekil 1.1 CA izozimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik olarak gösterimi	5
Şekil 1.2 CA IX yapısının şematik gösterimi	10
Şekil 1.3 Normal ve hipoksik koşullarda CA9 geninin regülasyonu	14
Şekil 1.4 HIF-1 aracılığıyla gelişen metabolik değişimler	18
Şekil 1.5 TNF- α ile indüklenmiş apoptozisin sinyal iletimi	20
Şekil 1.6 TNF- α ile indüklenmiş NF-KB aktivasyonu	21
Şekil 1.7 Hücre proliferasyonunun TGF β ile kontrolü	23
Şekil 1.8 IL1'in malin hücrelerin farklı kompartmanlarındaki etkileri	24
Şekil 3.1 Akış sitometride CAIX ekspresyonu için optimizasyon çalışması	43
Şekil 3.2 Gerçek zamanlı PZR analizi	46
Şekil 3.3 En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 24 saat sonundaki morfolojik görüntüsü (A:Kontrol, B:1000U)	48
Şekil 3.4 Canlı popülasyonda, 24 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	49
Şekil 3.5 Total popülasyonda, 24 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	50
Şekil 3.6 24 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	51
Şekil 3.7 TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde apoptotik ve nekrotik hücrelerin immun floresan mikroskopta çekilmiş görüntüleri	52
Şekil 3.8 En yüksek TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CA9 RNA ekspresyonunun kat azalışı	52
Şekil 3.9 En yüksek TNF- α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29	54

hücrelerinin 48 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	
Şekil 3.10 Canlı popülasyonda, 48 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	55
Şekil 3.11 Total popülasyonda, 48 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	56
Şekil 3.12 48 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	57
Şekil 3.13 En yüksek TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CA9 RNA ekspresyonunun kat azalışı	58
Şekil 3.14 En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 72 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	59
Şekil 3.15 Canlı popülasyonda, 72 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	60
Şekil 3.16 Total popülasyonda, 72 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	61
Şekil 3.17 72 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	62
Şekil 3.18 En yüksek TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CA9 RNA ekspresyonunun kat azalışı	63
Şekil 3.19 En yüksek TGF β konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 24 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	65
Şekil 3.20 Canlı popülasyonda, 24 saat sonundaki TGF β uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	66
Şekil 3.21 Total popülasyonda, 24 saat sonundaki TGF β uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	67
Şekil 3.22 24 saat sonundaki TGF β uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	68
Şekil 3.23 En yüksek TGF β konsantrasyonu uygulanmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CA9 RNA ekspresyonunun kat azalışı	69
Şekil 3.24 En yüksek TGF β konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 48 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	70
Şekil 3.25 48 saat sonundaki TGF β uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	71

Şekil 3.26	48 saat sonundaki TGF β uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	72
Şekil 3.27	En yüksek TGF- β konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 72 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	74
Şekil 3.28	72 saat sonundaki TGF β uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	75
Şekil 3.29	72 saat sonundaki TGF β uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	76
Şekil 3.30	En yüksek IL-1 α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 24 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	78
Şekil 3.31	24 saat sonundaki IL-1 α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	79
Şekil 3.32	24 saat sonundaki IL-1 α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	80
Şekil 3.33	En yüksek IL-1 α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 48 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	81
Şekil 3.34	48 saat sonundaki IL-1 α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	82
Şekil 3.35	48 saat sonundaki IL-1 α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	83
Şekil 3.36	En yüksek IL-1 α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 72 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	84
Şekil 3.37	72 saat sonundaki IL1 α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	85
Şekil 3.38	72 saat sonundaki IL-1 α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi etkisi	86
Şekil 3.39	Farklı sitokin kombinasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 24 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	88
Şekil 3.40	24 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	89
Şekil 3.41	24 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	90
Şekil 3.42	24 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları	91

Şekil 3.43 Farklı sitokin kombinasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 48 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	93
Şekil 3.44 48 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	94
Şekil 3.45 48 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	95
Şekil 3.46 48 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları	96
Şekil 3.47 Farklı sitokin kombinasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 72 saat sonundaki morfolojik görüntüsü	98
Şekil 3.48 72 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi	99
Şekil 3.49 72 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi	100
Şekil 3.50 72 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları	101

ÇİZELGE LİSTESİ	Sayfa No:
Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üreticileri	30
Çizelge 2.2 Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	31
Çizelge 2.3 Formaldehit jeli	32
Çizelge 2.4 Genomik DNA uzaklaştırma	37
Çizelge 2.5 cDNA sentezi	37
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan sitokinler ve konsantrasyonları	42
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan sitokin kombinasyonları ve konsantrasyonları	42
Çizelge 3.3 <i>Ca9</i> mRNA'sı için sentezlenen primerlerle ilgili detaylar	45
Çizelge 3.4 TBP mRNA'sı için sentezlenen primerlerle ilgili detaylar	45
Çizelge 3.5 <i>CA9</i> için gerçek zamanlı PZR reaksiyonu	45
Çizelge 3.6 <i>CA9</i> için gerçek zamanlı PZR koşulları	45
Çizelge 3.7 TBP için gerçek zamanlı PZR reaksiyonu	46
Çizelge 3.8 TBP için gerçek zamanlı PZR koşulları	46
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan sitokinler ve sitokin kombinasyonlarının farklı zaman aralıklarında HT29 hücrelerindeki CAIX ekspresyonu, hücre döngüsü, apoptozis, hücre canlılığı ve nekrozuna olan etkilerinin şematik gösterimi	113

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Feray KÖÇKAR danışmanlığında yürütülmüş ve sonuçlanmıştır. Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni her konuda destekleyen, bilimsel anlamda sonsuz kazanımlar edindiğim değerli hocam Doç. Dr. Feray KÖÇKAR'a ve tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Ali ŞENGÜL'e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmamın hücre kültürü aşamalarını, ŞAP Enstitüsü Hücre ve Virüs Bankası bünyesinde gerçekleştirmemi sağlayan ve bu konuda yardımlarını esirgemeyen bölüm müdürü MS. Şükran YILMAZ'a ve gerçek zamanlı PZR çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Dr. Deniz ÜREN'e ve ATQ firmasına teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde bulunarak bilimsel destek ve ilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Oktay ARSLAN ve Prof. Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a şükranlarımı sunarım.

Tez deneylerimin büyük bölümünü GATA İmmünoloji BD.' da gerçekleştirmemi sağlayan Bölüm hocalarım İmmünoloji BD. Başkanı Doç. Dr. Uğur MUŞABAK ve Doç. Dr. Ali İNAL'a ve özellikle manevi desteklerini tezimin her aşamasında hissettiren laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür etmek isterim.

Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji grubundan Arş. Görevlileri Hatice YILDIRIM, Meltem AYDIN, Sümeyye AYDOĞAN'a uzakları yakınlaştırdıkları için ve Mustafa CAMAŞ'a yazılım konusundaki yardımlarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, bütün eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, bütün sıkıntılı anlarımda yalnız bırakmayan ve beni ayakta tutan sevgili anneme, doktora çalışmamla eş zamanlı olarak dünyaya gözlerini açan sevgili kızıma ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, Haziran 2009

Rahşan ILIKÇI SAĞKAN

1. GİRİŞ

1.1 Kanserde Karbonik Anhidrazların Önemi

Kanser, hücrenin büyümesi ve hücre mitozunu kontrol eden hücre genlerinin mutasyonu veya anormal aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Kanser vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak komşu dokuları işgal etmesi, invazyonu ya da köken aldığı organdan daha uzak bir yere kan-lenf yoluyla yayılması ile ölümcül sonuçlara neden olabilmektedir. Hücreler DNA replikasyonları esnasında meydana gelen bozulmalar nedeniyle yapı değiştirirler. Normal vücut hücre ve dokuları, orijinal büyüklük ve yapılarını korurken, kanser hücreleri saldırgan bir tablo çizerler. Kanser potansiyeli olan hücrelerin en önemli özelliği “onkogen” içermesi ve bulunduğu dokudan tamamen farklı yeni bir hücre olacak şekilde bozulma potansiyeli olmasıdır [1].

Bir kanser hücresi oluştuğunda, vücudun immün sistemi bu yabancı hücreyi tanıır ve parçalar. Bu şekilde vücutta oluşan binlerce kanser hücresi immün sistem tarafından yok edilir. Her hücrede, onkogenlerin aktivasyonunu baskılayan tümör baskılayıcı genler bulunmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin kaybolması veya inaktive olması durumunda, onkogen aktivitesine izin verilmiş olur. Bunu da kanserin oluşumu izler. Vücutta mutasyona uğrayan hücrelerin ancak çok küçük bir kısmı kansere yol açar. İnsan vücudu kanserin oluşma sürecinde çeşitli yollardan direnç geliştirse de dünyada görülen en önemli sağlık problemlerinden birisi olarak karşımıza çıkmaktadır [1].

Kanserin genel anlamda kabul edilen ve bilinen sebepleri; tütün, kimyasallar, radyasyon, infeksiyöz organizmalar, kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, immün şartlar, metabolizmadan kaynaklanan mutasyonlar, beslenme alışkanlığı ve sedenter hayattır. Kansere sebep olan bu faktörler ya birlikte ya da sırayla karsinogenez sürecini başlatırlar.

Geleneksel olarak uygulanan tedavilerde önemli gelişmeler olmasına rağmen yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir. Son yıllarda tümör hücrelerini yok etmek için yeni hedefler ortaya çıkmıştır. Bu hedefler arasında yer alan en önemli enzim ailelerinden biri olan karbonik anhidrazlar, (CA) yeni ilaçların geliştirilmesinde hedef proteinler olarak kanser tedavisinde yer almışlardır [2-4].

Karbonik anhidrazlar (EC 4.2.1.1) yüksek yapılı omurgalılar, bitkiler, algler, bakteriler ve arkeaları da içeren bir dizi organizmada bulunan, çinko içeren metalloenzimlerdir. Bu proteinler, genel olarak CO₂'in geri dönüşümlü olarak hidrasyonunu katalizleyen enzimlerdir. α -CA ailesine dahil 15 farklı CA izoformu vardır. Bu enzimler, kinetikleri, dokulardaki dağılımları, ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar, hücre içindeki lokalizasyonları gibi özellikler bakımından çeşitlilik göstermektedirler. Karbonik anhidrazlar, pH dengesi, iyon transportu, respirasyon, glukoneogenezis, renal asidifikasyon, serebrospinal sıvı oluşumu, kemik rezorpsiyonu gibi biyolojik olaylarda görev alırlar [4, 5]. Bu proteinlerin inhibisyonu ile çeşitli hastalıkların oluşması ve devam etmesi engellenmiş olur.

Kanser ile karbonik anhidrazlar arasındaki ilişki yaklaşık olarak 17 yıldan beri çalışılmaktadır. Bu kapsamda tümör-ilişkili membran karbonik anhidraz izozimleri (CA IX ve CA XII) tanımlanarak klonlanmış ve gen dizileri belirlenmiştir [6-8].

Karbonik anhidraz IX, membrana bağlı bir glikoproteindir. CAIX hipoksik tümörlerde anormal bir ekspresyon profili gösterir. CAIX ekspresyonunun artışı, özofagus, akciğer, böbrek, kolon ve rektum, göğüs, serviks, baş ve boyun ve mesane gibi çeşitli organlardan türeyen karsinomalarda hipoksik koşullar altında gerçekleşir [9]. Bu proteinin prediktif ve prognostik değeri çeşitli klinik çalışmalarda gösterilmiştir [10]. Solid tümörlerde, CAIX'un ekspresyon paterni, CA izoformları arasında eşsiz bir yere sahiptir. Bu nedenle hücrel hipoksizde önemli bir biyobelirteçtir [11-13]. Hücrenin membranında lokalize olması ve tümörlerde anormal bir şekilde ekspre olması ile immunoterapilerinde hedef odağı olmuştur [11].

1.2 Karbonik Anhidrazların Fonksiyonları

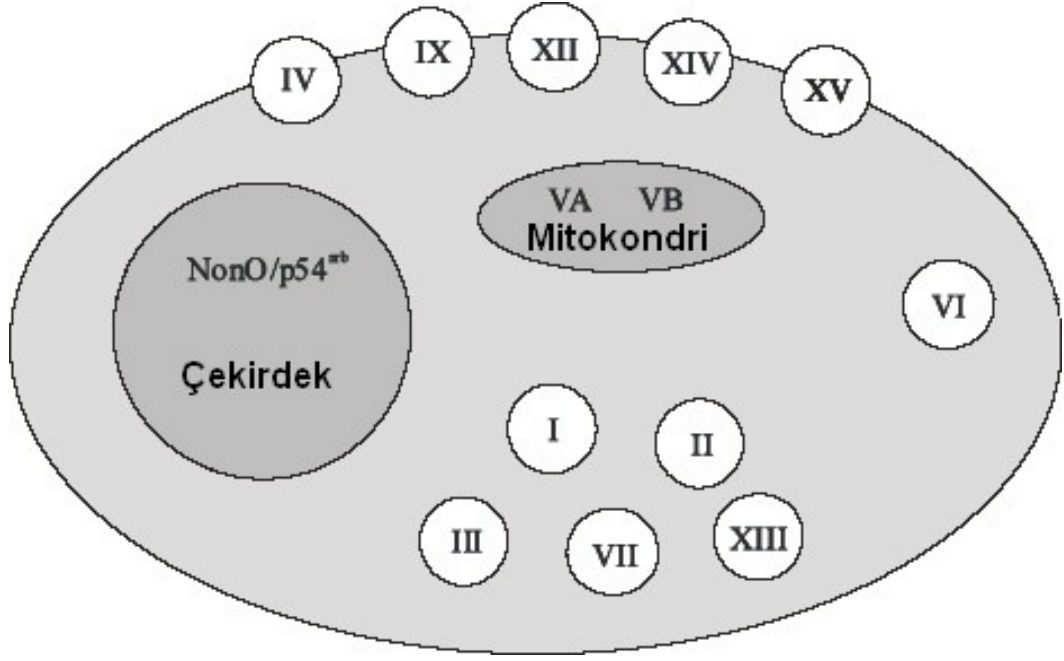
Karbonik anhidrazların en önemli fonksiyonu, CO₂'nin hidratasyonu ile bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını katalizlemektir [14, 15]. Prokaryotlarda, Karbonik Anhidrazlar başlıca iki genel fonksiyonu üstlenmişlerdir. Bunlardan birincisi, organizmada farklı dokular arasında CO₂/bikarbonat transportu ikincisi ise enzimatik reaksiyonlar için CO₂/bikarbonat sağlanması açısından önemlidirler. Sucul fotosentetik organizmalar CO₂ yoğunlaştırma mekanizmalarına sahiptirler ve bu sayede çevredeki CO₂ konsantrasyonundaki düşmelere karşı kendilerini korurlar [14]. Prokaryotik CA'larda çok sayıdaki karboksilasyon ve dekarboksilasyon işlemleri önemli bir biyolojik görev olarak karşımıza çıkmaktadır [14].

Omurgalılarda, CA'ların fizyolojik fonksiyonları uzun yıllardır araştırılmaktadır. CAI, II ve IV genel olarak respirasyonda ve asit/baz dengesinin sağlanmasında görev almaktadır. Gözde CA II, IV ve XII aracılığıyla bikarbonatça zengin sıvımsı salgının üretilmesi karbonik anhidrazların fonksiyonlarına ilişkin yeni bir vizyon kazandırmıştır. Bu durumda bu enzimlerin yanlış işlenmeleri, oküler içindeki basıncın yükselmesine ve glokom denilen hastalığın gelişmesine sebep olmaktadır [16]. Diğer taraftan CAII, osteoklastların farklılaşması ve osteoklastlarda kemik rezorpsiyonu için asit sağlanması gibi kemik gelişimi ile ilgili işlevlerde bulunmaktadır. Ayrıca, pek çok doku ve organda elektrolit sekresyonunda da görev yapmaktadırlar. Şöyleki; koriyoid ağda pH'ın düzenlenmesi ve bikarbonat sağlanması ile CSF oluşumu, duktal hücreler ve asinarda tükürük üretimi, mide paryetal hücrelerinde gastrik asit oluşumu, pankreatik sıvı oluşumu, safra üretimi, intestinal iyon transportunu içermektedir. Karbonik anhidrazlar, tatma duyusu, koklama duyusu, gastrointestinal sistemde aşırı asit ve bazik durumların oluşması, seminal sıvıda pH'ın ve bikarbonat konsantrasyonunun düzenlenmesi, kaslarda ve hücrenin strese cevabı durumlarında da işlev görmektedirler. Bu protein ailesinde CAV, pankreasın beta hücrelerinden insülin salınımındaki sinyal iletimi gibi moleküler sinyal yollarında görev yapmaktadır. CAII ve VA glikoneogenezis, yağ asiti sentezi, pirimidin baz sentezi gibi metabolik olaylarda bikarbonat sağlamakla görev yapmaktadır [17].

Yukarıda belirtilen işlevlerinin yanında, çağımızda en sık görülen hastalıklardan kanserle ilişkili olarak özellikle CAIX, CAXII, CARP VIII gibi izozimler tümörlü dokularda aşırı derecede sentezlenmeleri, onkogeneze ve tümör oluşumundaki üstlendikleri görevlerle özel bir yere sahiptirler. CAIX ve CAXII, antikanser ilaçların geliştirilmesinde bilim adamlarının odaklandığı enzimler arasında önemli bir konumdadır [14]. Karbonik anhidrazlar, sadece kanser için değil glokom hastalığına karşı ilaç üretilmesinde, antiobezite ajanlarının üretilmesinde, antibakteriyal, antifungal ajanlarının geliştirilmesi gibi karbonik anhidrazlarının inhibisyonunu baz alan pek çok farmakolojik ilaç tasarımında kullanılmış ve kullanılmaya devam edilmektedir.

1.3 Karbonik Anhidrazlar (CA) ve Sınıflandırılmaları

Karbonik anhidrazlar, çinko içeren, geri dönüşümlü olarak karbon dioksitin hidratasyonu reaksiyonunu ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3 + \text{H}$) katalizleyen enzimlerdir. Evrimsel açıdan beş gen ailesi (α -, β -, γ -, δ - ve ϵ -) ile temsil edilirler [18]. α -CA lar, hayvanlar ve yeşil alglerde; β -CA lar, bitkiler, düşük ökaryotlar, ve omurgasızlarda; γ -CA lar arkeabakteri ve öbakterilerde bulunurlar. α -CA lar, omurgalılarda dominanttır. α -CA lar, farklı hücre lokalizasyonları, farklı dokularda dağılımları ve fonksiyonları vardır. pH dengesi, iyon transportu, solunum, glukoneogenezis, kemik reabsorpsiyonu, renal asidifikasyon, serebrospinal sıvı ve gastrik asit oluşumu gibi biyolojik olaylarda rol alırlar. Şimdiye kadar memelilerde belirlenen 15 aktif izoenzim Şekil 1.1’de gösterilmektedir. Beş sitoplazmik (CAI, CAII, CAIII, CAVII ve CAXIII), beş membrana bağlı (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV ve CAXV), iki mitokondriyal (CA VA ve CA VB) ve bir salgısal (CA VI) ve henüz sınıflandırılmamış NonO/p54^{nrb} formu vardır [19, 20].



Şekil 1.1 CA izozimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik olarak gösterimi [6].

1.3.1 Sitoplazmada Bulunan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

CAI, CAII, CAIII, CAVII ve CAXIII sitoplazmada bulunan beş karbonik anhidraz üyesidir.

CAI, 30 kDa moleküler ağırlığında sitoplazmik CA izoenzimlerinden biridir. CAI eritrositlerde saptanmıştır ve burada en fazla bulunan proteinlerden biridir. Eritrositlere ilave olarak kalın bağırsak epiteli, kornea epiteli, göz merceği, Langerhans adaları, plasenta ve fetal membranlarda daha düşük seviyede bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, kronik miyeloproliferatif bozukluklarda CAI'in ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [21, 22].

CAII, 30kDa moleküler ağırlığında ve insan CA2 geni, 17 kb uzunluğunda, CA1 ve CA3 genleri gibi 8. kromozom üzerinde lokalize olan ve CA ailesinin en yaygın bulunan bir izoenzimdir. İlk başta eritrositlerde bulunmuştur. CAII, renal tübüllerde ve toplama kanallarında ürin asidifikasyonunda önemlidir [23]. CAII aynı zamanda midede, gastrik pariyetal hücreler tarafından H^+ iyonu sekresyonu ve kemik

resorpsiyonu için osteoklastlardan H^+ iyonlarının tedarik edilmesine yardımcı olurlar. Ayrıca CAII pek çok biyolojik sıvının üretiminde yer alır. CAII, pankreatik kanalının epitelinde bol miktarda bulunurken kolorektal adenokarsinomlarda zayıf bir boyanma gözlenmektedir [24-26]. Pankreatik kanaldan pankreatik sıvıya, karaciğer epitel hücrelerinden safraya ve aynı zamanda tükürük salgısına HCO_3^- salınımını sağlamaktadır. CAII aynı zamanda *choroid plexus*'tan üretilen serebrospinal sıvının pH'ını düzenler. Distal kolonik epitelde elektrolit ve su dengesini sağlar. Öte yandan yağ asidi ve amino asit sentezine de katılırlar. CAII aynı zamanda bikarbonat/klorid taşıyıcılarının anyon değiştirici ailesinin üyeleriyle fonksiyonel ve fizyolojik olarak etkileşime girerek etki göstermektedir [27].

İnsanlarda CAII eksikliği otozomal resesif bir hastalıktır. Bu sendrom, osteoporezis, renal tubuler asidozis ve serebral kalsifikasyon ile bağlantılıdır. CAII katalitik aktivite kaybı, CA2 genindeki farklı mutasyonlardan kaynaklanmaktadır [22, 28].

CAIII, 30kDa moleküler ağırlığında CA2 gen yapısıyla oldukça benzerlik gösteren fakat bütün enzimler içinde düşük aktiviteye sahip bir izoenzimdir. CAIII iskelet kası ve adipositlerde bulunurken, kemirgenlerin karaciğerinde de bol miktarda bulunmaktadır [29]. Bu enzimin görevleriyle ilgili çalışmalar hala devam etmektedir. CAIII üretimi, obez sıçanların karaciğer ve yağ dokusunda normal sıçanlara göre daha düşük aktiviteye sahiptir [30, 31]. Hücreler oksidatif strese karşı hücresel cevapta rol oynar. Doku hasarı esnasında, çizgili kaslardan CAIII ve miyogloblin salgınır. Miyokardiyal infeksiyonlarda miyogloblin salınımı doku hasarında önemli bir belirteçtir fakat miyokardiyal infeksiyonlara spesifik değildir. Bu belirtecin özgünlüğünü artırmak için aynı zamanda CAIII seviyesi de ölçülmektedir. Miyogloblin/CAIII oranı, miyokardiyal infeksiyon geçiren hastalarda önemlidir [32, 33].

Sitoplazmada bulunan CAVII, memelilerde en fazla korunmuş olan izoenzimdir ve geni 16. kromozom üzerinde bulunmaktadır. CAVII mRNA'sı, insan tükürük bezleri, sıçan ve farede akciğer ve beyin nöronlarında bulunduğu gösterilmiştir [27].

CAXIII, son zamanlarda karakterize edilen sitozolik bir izoenzimdir. İnsan dokularından timus, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kolon ve testiste gözlenirken; fare dokularından dalak, akciğer, böbrek, kalp, beyin, iskelet kası ve testiste üretilmektedir. Diğer CA izoenzimleriyle karşılaştırıldığında oldukça geniş bir yayılım göstermektedir. Ayrıca embriyogenezde de rol oynamaktadır [34].

1.3.2 Mitokondriyal Karbonik Anhidrazlar

CAV mitokondriyal matrikste lokalize olması ile CA'lar içerisinde eşsiz bir yere sahiptir. 16. kromozom üzerindedir ve CAV-A ve CAV-B olmak üzere iki farklı izoformu bulunmaktadır. CAV-A karaciğer ve çizgili kaslarda ifade edilirken; CAV-B beyin, kalp, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, bağırsak, testis, çizgili kaslarda ifade edilir. CAV-A, hepatosit mitokondrilerinde glukoneogenesis ve ureagenезде; CAV-B, pankreastan insülin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Mitokondriyal CA'lar, adipozitlerde ve sinir sisteminde de bulunmaktadır [22].

1.3.3 Farklı Vücut Sıvılarına Salgılanan Karbonik Anhidrazlar

Bu grupta bulunan tek enzim CAVI' dır. CAVI, ilk olarak, koyun parotid bezi ve tükürükte 1979'da keşfedilmiştir [35, 36] ve insan tükürüğünden saflaştırılmıştır. CA6 geni, 1. kromozom üzerindedir ve 42 kDa molekül ağırlığındadır. Katalitik domaini transmembran CA'ların hücre dışı CA domainleri ile homoloji göstermektedir. CAVI, tükürük bezlerinde üretilir ve tükürük sıvısına salınır [37]. CAVI, bakteri plağı ve diş minesini arasındaki ince bir protein tabakasında yerleşmiştir. Gastrik mukusta CAVI bulunmaktadır, fakat gastrik yüzey epitel hücrelerinde ifade edilmemektedir ve tükürük orjinli olmalıdır. Bunlara ilave olarak, serum, lakrimal bezler, pankreas, meme bezleri ve sütte CAVI'nın varlığı gösterilmektedir. Bu protein, tükürükte bikarbonat seviyesinin korunmasında önemli rol oynar. Ayrıca, üst gastrointestinal sistemde aşırı asit seviyesini nötralize etmektedir. CAVI'nın kolostrumda aşırı konsantrasyonda bulunması, gelişmekte olan gastrointestinal kanalın gelişme ve olgunlaşma sürecinde önemli rol oynamaktadır [27].

1.3.4 Karbonik Anhidraz İlişkili Proteinler

Ayrıca, yukarıda açıklanan karbonik anhidraz üyeleri dışında Karbonik anhidraz-ilişkili proteinler (CARP) de bulunmaktadır. Bu enzimler CA gen ailesinin üyesi olup katalitik aktivite göstermezler. Biyolojik fonksiyonları da tam olarak bilinmemektedir. CARP'lerin karsinogenezisteki olası fonksiyonlarını belirlemek için çeşitli kanser dokularında karşılaştırmalı ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. CARP VIII ekspresyonu, kolorektal ve akciğer kanserlerinde artış göstermektedir. Ayrıca, kalp kası hücreleri, osteositler, böbrek epitel hücreleri, midede glandular epitel hücreleri, pankreas, meme bezlerinin asinar hücrelerinde üretilmektedir. CARP X, 17. kromozomdan kodlanmaktadır. Bu proteinin mRNA'sına insan merkezi sinir sistemi hücrelerinde saptanmıştır. CA-RP XI, 19. kromozomdan kodlanmaktadır. Bu proteinin ifadesi pankreasta Langerhans adacık hücrelerinde saptanmıştır [38].

1.3.5 Membrana Bağlı Karbonik Anhidrazlar

CAIV membrana bağlı izoenzimlerden ilk olarak keşfedilen izoenzimidir. Molekül ağırlığı 35 kDa'dur ve 17. kromozomda lokalize olmuştur. Bu protein, epitel hücrelerinin apikal plazma membranına bağlanırlar. Gastrointestinal sistemde aşırı ifadesi gözlenirken, ince bağırsağın epitel hücrelerinde düşük seviyede ifade edilir. Safra kesesi ve safra ile ilgili epitel hücrelerinde de ifadesi gözlenmiştir. Aynı zamanda akciğer, böbrek, göz, beyin, çizgili kas, kalp ve karaciğer, erkek üreme hücreleri, pankreasta da saptanmıştır. Otoimmün pankreatitisli hastalarda CAIV serum seviyesi, immün yanıt ile korelasyon göstermektedir [22].

CAXIV, 37.6 kDa molekül ağırlığında transmembran bir izoenzimidir. Geni, 1. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Bu protein ilk olarak fare böbreğinden izole edilmiştir. Farelerde CA14 mRNA'sı kalp, iskelet kası, karaciğer, beyin ve akciğerde bulunurken; insanlarda kalp, beyin, karaciğer, iskelet kası ve daha düşük seviyede ince bağırsak, kolon, böbrek ve mesanede saptanmıştır. Ayrıca hem fare hem de insan beyin nöronal membran ve aksonlarında da gözlenmiştir [39]. Son zamanlarda keşfedilen düşük aktiviteli bir enzimdir [40]. CAIV ile oldukça benzerlik

göstermektedir. En fazla böbrekte üretilmektedir. Beyin ve testis dokularında da ifadesi gözlenmektedir [27].

CAXII, birbirinden bağımsız olarak iki farklı grup tarafından klonlanmış ve karakterize edilmiştir. CA12 geni 15. kromozom üzerinde lokalize olmuştur [8]. cDNA'sı 354 amino asitten oluşmaktadır: sinyal dizisi (29 aa), CA domain (261 aa), ekstraselüler segment, hidrofobik domain (26 aa), hidrofilik C-terminal sitoplazmik kuyruk (29 aa). CA katalitik domainde Zn bağlayan histidin rezidü içermektedir [8].

CA12 mRNA'sının varlığı çeşitli dokularda gösterilmektedir. Böbrek, kolon, pankreas, prostat, yumurtalık, testis, akciğer ve beyinde Northern blot ile gösterilmiştir. RT-PCR analizi ile daha fazla dokuda bulunduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, üreme hücreleri, endometriyum epitel hücrelerinde, uterin serviks, epididimal tüplerin sporadik hücrelerinde bulunmuştur. Duedonum, jejenum ve ileumda ekspresyon gözlenmezken kolon ve rektumun epitel hücrelerinde bu proteinin üretildiği gösterilmiştir. CA XII, CA IX gibi bazı kanserlerde ve bazı tümör hücre serilerinde aşırı derecede ekspre olduğu gösterilmiştir. Glokomlu hastalarda da bu proteinin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır [16]. Çoğu kolorektal tümörde, CA XII'nin anormal ekspresyonu gözlenmiştir [41].

Membrana bağlı kanserle ilişkisi aydınlatılmış üyelerden en önemlilerinden biri CA IX' dur. Tezimizin de amacını oluşturan CA IX'a dair daha detaylı bilgi aşağıda verilmektedir.

1.3.5.1 Karbonik Anhidraz IX (CA IX)

1.3.5.1.a Karbonik Anhidraz IX (CA IX) Tanımlanması ve Genel Yapısı

CA IX, ilk zamanlar tümörle-ilişkili membran antijeni MN olarak tanımlanmıştır ve serviks karsinoma hücre hattı HeLa' da belirlenmiştir [42]. Daha sonra insan CA9 geni klonlanarak dizi analizi yapıp [43], genomik yapısı karakterize edilmiştir [44]. CA9 geni (accession number: NM_001216), 11 ekzon ve 10 intron içermektedir ve kromozom 17 üzerinde lokalizedir (17q21.2) [44, 45].

CA9 cDNA'sı 459 amino asit (aa) büyüklüğünde protein kodlar. Ekstraselüler kısım proteoglikan-benzeri (PG-benzeri) bölge (53-111aa) ve karbonik anhidraz domain (aa 135-391) kodlarken ekzon 1, hem sinyal peptidi hem de proteoglikan-benzeri olan hücre dışı bölgeyi kodlar. Ekzon 2-8 CA domaini için korunmuş aktif bölge, ekzon 10 transmembran kısım, ekzon 11 ise intraselüler bir kuyruk içerir [44].

CA IX, transmembran glikoproteini, elektroforetik olarak 54 ve 58 kDa'luk iki bant verir. Tüm protein yapısal domainlerine göre Şekil 1.4'te gösterildiği şekilde 4 kısımdan oluşmuştur.

- 1) N-terminal sinyal peptid (1-37 aa),
- 2) Hücre dışı kısım (38-414 aa),
- 3) Transmembran kısım (415-434 aa),
- 4) Hücre içi C-terminal kuyruk



Şekil 1.2 CA IX yapısının şematik gösterimi. SP: sinyal peptid bölgesi , PG: proteoglikan bölge, CA karbonik anhidraz aktif bölgesi TM: transmembran bölge, IC: intrastoplazmik kuyruk [7].

1.3.5.1.b CA IX'un Normal Dokularda Ekspresyonu

CA IX, gastrointestinal epitel hücrelerinin bazolateral plazma membranında normal olarak ekspre olur [42, 43, 46]. Bu protein, mide mukozası ve mesanede aşırı

derecede ekspre olur. Bağırsak epitelinde en yoğun ifadesi, duodenum ve jejunumda gözlenirken rektumda gittikçe azalır. Mide epitelinin aksine, bağırsak epitelindeki protein ifadesi, hızlı çoğalan bölgelerde gözlenir. Hücreler, bağırsak villusu boyunca göç ederken farklılaşırlar ve CA IX ekspresyonunu kaybederler. CA IX, hücre proliferasyonunda ve bağırsak epitel hücrelerinin farklılaşmasında rol oynar. Mide, mesane, bağırsak dokularına ek olarak, CA IX ekspresyonu karaciğer safra epitelinde ve pankreatik kanal, erkek üreme organları, vücut kavitelerinin mezotelinde belirlenmiştir [46, 47].

Ayrıca periferik ve merkezi sinir sisteminde de ekspresyon var olmakla birlikte sınırlı seviyededir. Plasentanın amniyotik, koryonik tabakasının mezodermal hücreleri, bağlantı boşluklarında kartilaj dokuda çeşitli derecelerde CAIX ekspresyonu gözlenmektedir. CAIX ekspresyonu bazal hücrelerde infundibulumda ve çevresinde saç foliküler medullasında, mezotel hücrelerde, vücut kavitelerinin sölomik epitelde gözlenir. Viskeral organların epitel hücrelerinde, yüksek seviyede ekspresyonu belirlenmiştir [13].

1.3.5.1.c CAIX'un Tümörlü Dokulardaki Ekspresyonu

Anormal olarak yüksek CA IX ekspresyonu, CA IX-negatif dokulardan orjinlenen çoğu karsinomada gözlenmektedir. CA IX-pozitifliği, serviks, akciğer, renal kanserlerde ekspresyonu yüksektir [48-50]. CA IX pozitif dokulardan orjinlenen tümörlerde CA IX ekspresyonu genellikle yoktur .

Böbrek hücre karsinomasıyla ilişkili olan G250 gen dizisi CAIX ile homoloji göstermektedir [51]. Bu protein, monoklonal antikor (Mab) G250 ile işaretli böbrek karsinoma hücrelerinin yüzeyinde tespit edilmiştir. CAIX aynı zamanda hastalıkların tanısında değerli bir belirteçdir. CA9 gen ekspresyonunun beyin dokusu [52] ya da küçük olmayan hücreli akciğer [53] kanseri için zayıf prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yumuşak doku sarkomlarında da CAIX ekspresyonu, zayıf prognozda karşımıza çıkmaktadır [54]. CAIX' un yüksek ekspresyonu böbrek [55] ve göğüs [56] kanserinde daha iyi bir prognozda karşımıza çıkar.

Özellikle renal hücre karsinomlarında *CA9* ekspresyonu artmaktadır [13, 57]. *CAIX* protein ekspresyonu şeffaf hücreli renal karsinomlarda diagnostik bir belirteç olarak kullanılmaktadır [58, 59].

Kolorektal tümörlerde de artan *CA9* ekspresyonuna bağlı olarak hastalığın diaagnozunda kullanılabilecek belirteçlerden birisidir [13, 60].

Oligodendrogial beyin tümörlerinin büyük çoğunluğunda, *CAIX* ekspresyonu gözlenmektedir ve bu ekspresyon seviyesi yaşamda kalım ile korelasyon göstermektedir. Çeşitli malignansilerde olduğu gibi oligodendrogliyal tümörlerde de patofizyolojik rol oynarlar. Malin beyin tümörlerinin mikroçevresinde asiditeyi düzenlemekle görevlidirler [61].

Küçük olmayan hücreli akciğer kanserinde *CAIX* pozitifliği ve kanserin tekrar ortaya çıkışı korelasyonu tümör akciğer tümör biyolojisi açısından önem taşımaktadır [62].

Tümör karbonik anhidraz 9 ekspresyon seviyesi uterin serviks kanserinde lenf nodu metastazı ile doğru orantılı bir şekilde seyretmektedir [63]. Baş ve boyun karsinomasında, prostat tümörlerinde, ovaryum tümörlerde *CA9* ekspresyonu artış göstermektedir [13]. Melanoma ve meninjiomalarda hipoksik ve nekrotik bölgelerde *CA9* ekspresyonu artar [13, 64, 65]. Glioblastoma hücre serilerinde de *CA9* ekspresyonu gözlenmektedir.

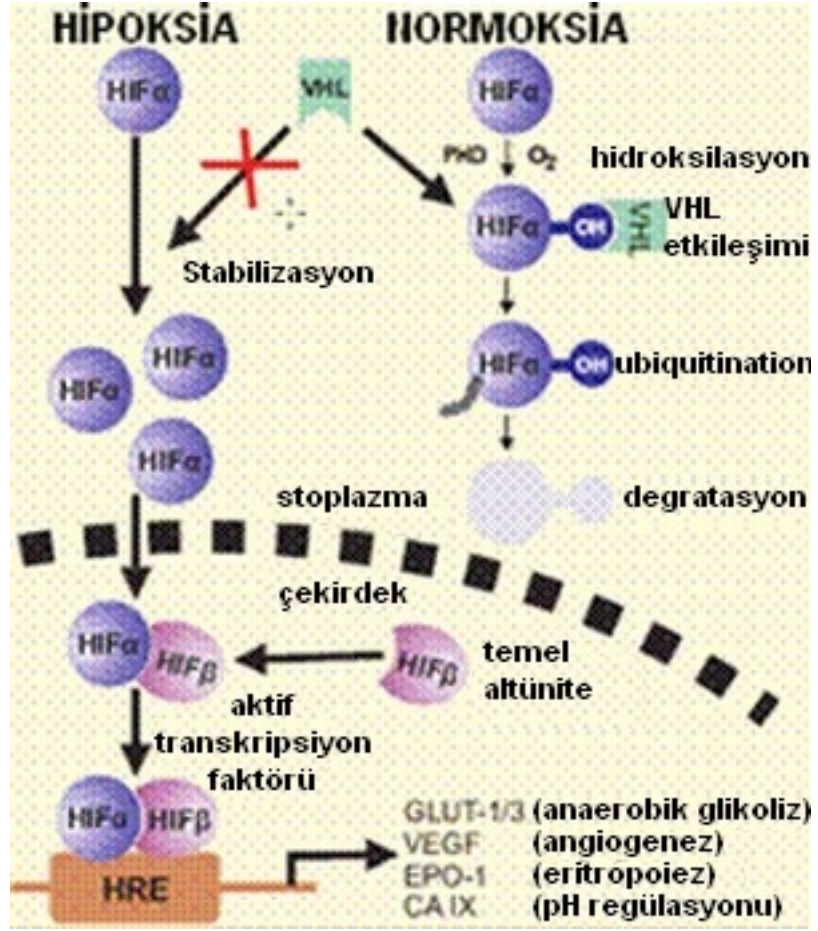
Non-Hodgkin lenfomada *CAIX* ekspresyonu, renal hücre karsinoma, kolorektal karsinoma, küçük olmayan hücreli karsinoma gibi solid tümörlerle karşılaştırıldığında çok düşük seviyededir [12, 59, 60, 66, 67].

1.3.5.1.d İnsan *CA9* Geninin Regülasyonu

CAIX promotörü TATA kutusu içermez fakat AP1, AP2, p53 transkripsiyon faktörleri için konsensus dizileri ve aynı zamanda da 2 konsensus başlangıç element motifi içermektedir [68].

CA9 geninin ekspresyonu normal koşullarda proksimal susturucu elemente bir represör bağlanmasıyla kontrol edilir. CAIX, tümör hücrelerinin çevresinde hipoksi ile indüklenir. Hipoksi yanıt elemanı (HRE), CAIX geninde transkripsiyon başlama bölgesinin yakınlarında bulunur ve bu genin promotörünü regüle eden en önemli elemandır [69]. Şekil 1.3'te gösterildiği gibi HRE, oksijeni regüle eden α -alt ünite ve konstitütif β -alt ünitelerden ibaret olan HIF-1 ile tanınır. HRE'ler *cis-acting* elementlerden oluşmaktadır. *CA9* promotöründe 6 tane fonksiyonel *cis-acting* element bulunmaktadır. Bunlardan 5'i promoter aktivitesini pozitif yönde etkilerken 1 tanesi negatif olarak etkiler [12, 70]. HRE'ler G/ACGTG konsensus dizisi içeren HIF bağlanma bölgesi (HBS) içerir [71]. Merkezi HIF bağlanma bölgesi'deki bir mutasyon *CA9* promotörünü inaktive eder ve HIF-1 α eksikliği olan hücrelerde promoter aktivitesi gözlenmez [11]. Son yapılan çalışmalara rağmen CA9 HRE'si tam olarak karakterize edilememiştir. Hipoksi indükleyen faktör (HIF), bir transkripsiyonel komplekstir ve memeli oksijen homeostazında merkezi rol oynamaktadır [72]. Normal koşullarda HIF-1 α , HIF-1 α yıkımında sonuçlanan von Hippel-Lindau (VHL) tümör supresör proteinini içeren ubiquitin ligaz kompleksi için bir bağlanma bölgesi oluşturan prolin hidrosilazları ile modifiye edilir [73]. Oksijen seviyesi düştüğünde, HIF-1 α , HIF-1 β ile dimer oluşturur ve transkripsiyonel olarak aktif hale gelir. Böylece HRE elementine sahip CAIX, HIF-1 için hedeftir ve hipoksi ile regüle edilir [74]. Diğer taraftan VHL allellerinde meydana gelen mutasyonlar, regülatör HIF yolağını aksatır ve sonuçta kalıtsal VHL bozukluğu ya da sporadik böbrek hücre karsinoması (RCC) gelişir [75]. Tümör hipoksisi, agresif gelişim, metastaz, tedaviye zayıf cevap ile ilişkilidir. CAIX, tümör hücrelerinin çevresinde hipoksi ile indüklenir. Tümör metabolizması ve hipoksik koşullara hücrelerin adaptasyonu ile bağlantılı mikro çevredeki değişiklikler, tümör gelişiminde önemli bileşenleri oluşturmaktadır [76].

VHL gibi tümör supresörlerin yanında başka tümör supresör genlerle de CAIX aktivitesi arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Örneğin; p53 tümör supresör CAIX ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [11].



Şekil 1.3 Normal ve hipoksik koşullarda *CA9* geninin regülasyonu [70].

Diğer regülatör elementlerden *CA9*'u pozitif etkileyenler PR1 (-45;-24) ve PR5'e (-163; -145) SP1/ SP3 faktörleri bağlanır [77-79]. Normoksik ve hipoksik koşullarda SP1/SP3 'ün PR1/PR5'e bağlanmaları konstitütiftir [78, 79]. HIF1'in aktif olduğu koşullar *CA9*'un transkripsiyonu açısından kritiktir ve SP1/SP3 bağlanmasını inhibe eden bir inhibitör "mithramycin" CAIX ekspresyonunu engeller. PR2 (-71;-56) ise AP1 bağlanma bölgesi olarak belirlenmiştir [70, 79]. AP-1 komplekslerinin aktivitesi hipoksik koşullarla indüklenen transkripsiyon faktörlerinin heterodimerlerine bağlıdır [80]. AP-1'in hücre tipine spesifik aktivasyonu, ERK ve MAPK ailesi üyeleri aracılığıyla olmaktadır [80, 81]. PR3 (-101;-85) regülatör element nükleer ekstraktlardan proteinlere bağlanır ve *CA9* promoter aktivitesini pozitif yönde etkiler. PR4 (-134;-110) içerisindeki delesyonlar ve mutasyonlar *CA9* promoter aktivitesini artırır [11].

CA9 ekspresyonunu kontrol eden faktörlerden biri de epigenetik faktörlerdir. CpG adalarındaki metilasyon, histonların posttranslasyonel modifikasyonları gen ekspresyonunun kontrolünde önemli bir role sahiptir [11].

CA9 geninin regülasyonunda iki önemli onkogenik yolak rol oynamaktadır. Artan PI-3K aktivitesi hücre yoğunluğuyla indüklenen CAIX ekspresyonu ile korelasyon gösterir ve PI-3K inhibitörlerinin CAIX ekspresyonu üzerine inhibitör etkisi olduğu bilinmektedir [82, 83]. Aynı zamanda ERK yolağı inhibitörleri de CAIX ekspresyonunu azaltmasına rağmen ERK aktivasyonu ile CAIX ekspresyonu arasında tam bir korelasyon yoktur [68, 82].

1.3.5.1.e CA IX, Tümör Metabolizması ve Sitokinler

Hücrelerin hipoksi koşullarına uyumuyla bağlantılı tümör metabolizması ve mikroçevredeki değişiklikler, tümörün gelişmesinde önemli faktörlerdir. Asidozisle sonuçlanan hipoksik koşullarda, glikolizis ve laktat üretimindeki artış hipoksik hücre ölümüyle ifade edilir. Transmembran karbonik anhidraz izozimleri (CA IX ve CA XII), hücre dışı enzim aktif bölgesi içermektedirler. Karbon dioksitin bikarbonat ve protana hidrasyonunu katalizleyerek hücre içi asidozisi düşürerek tümör içi pH'ı düzenlerler (Şekil 1.4) [84].

Çeşitli klinik çalışmalar tümörlerdeki CAIX seviyesi ile iyi prognoz arasındaki ilişkiyi açıkça ortaya koymaktadır. Ayrıca, CA IX taşıdığı eşsiz N-terminal bölge ile β -katenin ile etkileşime girerek E-kaderin aracılı hücre-hücre adezyonunu bozar ve tümör invazyonunu teşvik eder.

Sitokinler, tümör hücre serilerinde adezyon reseptörlerinin ifadesini modüle ederler. Böylece onların metastatik potansiyellerini etkilerler. İnterferonlar, antiviral, hücre büyümesi, immün modülatör ve antitümöral fonksiyonları regüle eden önemli sitokinlerdir ve çok sayıda hücre proteinini ve interferon indükleyici proteinleri etkiler. Bazı sitokinlerin hücre bölünmesini engelleyici etkileri vardır. Hücre bölünmesini etkileyen sitokinler, büyüme faktörlerinin hücre bölünmesi için aktive

ettiği mekanizmaları inhibe ederler. $IFN\alpha$, $IFN\beta$, $TGF\beta$, $TNF\alpha$ gibi hücre dışı habercilerin ekspresyonunda azalmaya, reseptörlerin inaktive edilmesine yol açabilir veya hücre bölünmesini sağlayacak sinyallerin iletilmesini engelleyebilirler. Bununla birlikte otokrin büyüme faktörlerinin üretiminde düzensizliklere yol açarak hücre bölünmesine yol açan mekanizmalara ket vurabilirler.

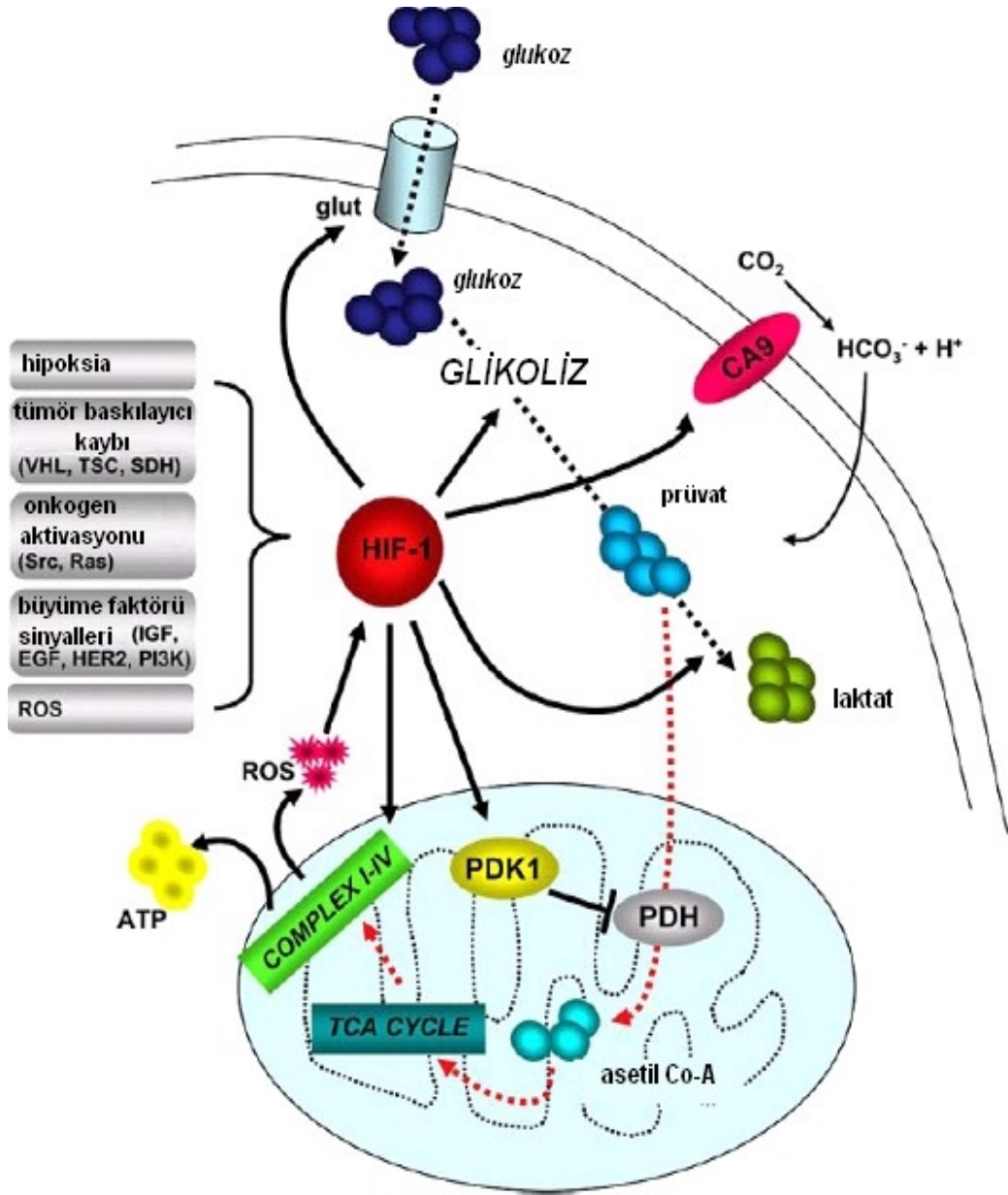
$TGF\beta$, hücre siklusunun ilerlemesini engelleyerek etki gösterir. CA IX ve sitokinlerle ilgili olarak literatürde yapılan çalışmalar özellikle renal karsinomada karşımıza çıkmaktadır. Renal karsinomada CAIX seviyesi yüksek olan hastaların, IL-2 tedavisine, CAIX seviyesi düşük olan hastalara göre daha iyi cevap verdiği Atkins ve ark. tarafından gösterilmiştir [85].

Vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) anjiogeneziste rol aldığı ve malin tümörlerin metastazı ve invazyonuyla ilişkili olduğu bilinmektedir. $HIF1\alpha$, sadece karbonik anhidrazların ekspresyonunda önemli bir regülatör değil aynı zamanda VEGF ekspresyonunda da önemli bir moleküldür [86]. $TNF\alpha$ ve $TGF\beta$ gibi inflamatuvar sitokinlerle indüklenebildiğini Dong Sun ve arkadaşları göstermişlerdir [87]. $TNF\alpha$, önemli bir proinflamatuvar sitokin olmakla birlikte, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptosis gibi hücreysel olayların kontrolünde de rol oynamaktadır [88]

Hipoksik koşullarda, hipoksi indükleyen faktör 1α ($HIF1\alpha$) yoluyla indüklenebilen 50'nin üzerinde gen vardır. Bu genlerin içinde CAIX membran lokalizasyonu ve stabilitesi nedeniyle güvenilir bir hipoksi belirteçidir [89].

CAIX ekspresyonu bazı tümörlerde, metastazla ve kötü prognozla ilişkili olarak aşırı derecede artmaktadır. CA inhibitörlerinden biri olan asetozolamidin invazyonu inhibe ettiği bildirilmiştir. Robertson ve arkadaşları, normal ve hipoksi koşullarında tümörün büyümesi ve sağkalımında önemli bir rolü olan CAIX'un kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olduğunu fakat tümör invazyonunda etkili olmadığını göstermişlerdir [90].

Renal tümör hücrelerinde, farklı sitokinlerin CAIX geninin regülasyonuna olan etkileri araştırılmıştır [91]. CAIX proteininin ekspresyonunun, renal karsinomada ve kolorektal tümörlerde tanı amaçlı belirteç olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. VEGF'in ekspresyonu, göğüs, serviks, kolon ve rektum, özafagus, baş ve boyun, böbrek, over, deri, üriner sistem primer malignansilerinde artar ancak VEGF-A ekspresyonu sadece renal dokularda *CA9* ile korelasyon gösterir [92].



Şekil 1.4 HIF-1 aracılığıyla gelişen metabolik değişimler. HIF-1, ya hipoksik koşullarla ya da tümör supresörlerin kaybı, onkogenlerin aktivasyonu, tümör hücrelerinin yeniden düzenlenmesinde rol alan genlerin transaktivasyonunu etkileyen büyüme faktörü sinyalizasyonu gibi hipoksik olmayan onkogenik olaylarla stabilize olur. Glukoz transporterları (glut) ve glikolitik enzimleri kodlayan genlerin indüksiyonu, glukoz alımını ve laktat oluşumunu sağlar. Aşırı laktat oluşumunun sebep olduğu hücre içi toksik asidozis, hücre dışı bikarbonatın sitozole taşınmasını sağlayan karbonik anhidraz 9 (CA9) ile engellenir. Pürivat dehidrogenaz kinaz I (PDK1), mitokondrideki pürivat dehidrogenaz (PDH) kompleksini inaktive ederek pürivatın asetil-CoA'ya dönüşümü süprese edilir. Sítokrom c oksidaz altüniteleri (COX4-1 ve COX4-2) kompozisyonu, HIF-1 ile düzenlenen mitokondriyal elektron transfer kompleksi IV bileşenleridir. Verimsiz hipoksik mitokondride reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşması HIF-1'i stabilize eder ve ROS üretimi azalır. [84]

1.4 Sitokinler

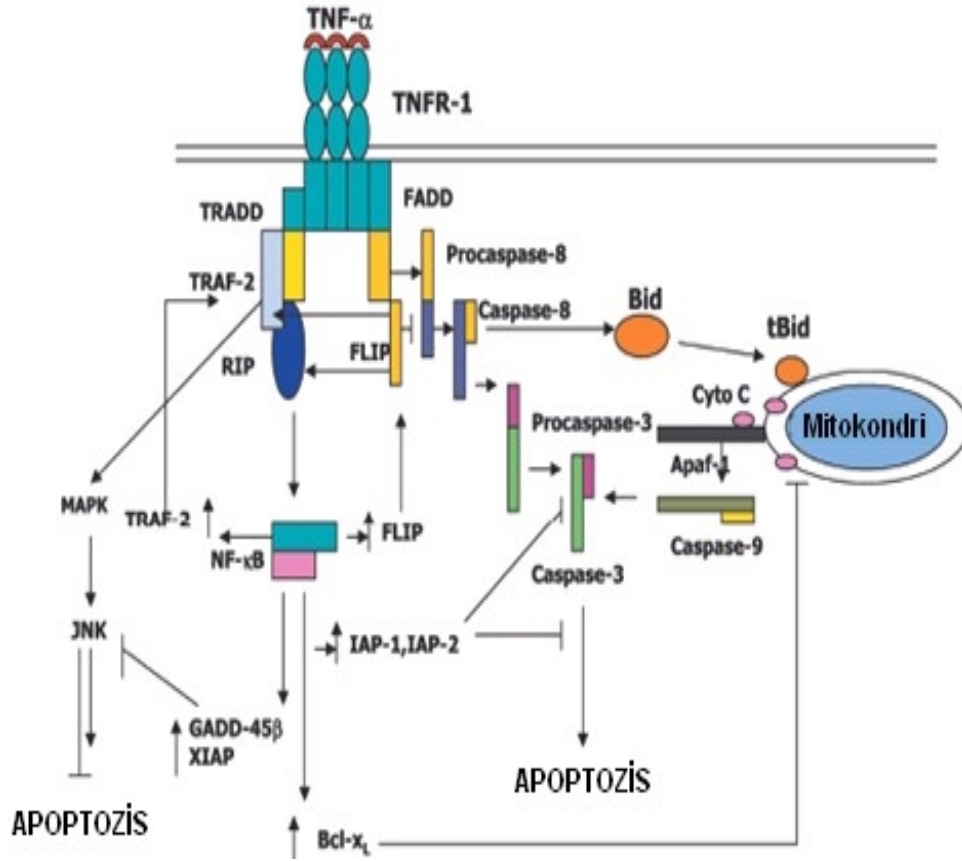
1.4.1 Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TNF α , farklı hücrelerde çeşitli fonksiyonlara sahip pleitropik etkili proinflamatuvar bir sitokindir. Tip 1 ve Tip 2 reseptörlere (TNF-RI ve TNF-RII) bağlanmak suretiyle çeşitli sinyal yollarını aktive eder. Tip I transmembran reseptörler, ekstraselüler membranda sistince zengin 5 tekrar, sitoplazmik kuyrukta ise ölüm domaini (DD) içerirler. TNF-RI ölüm domaini içerirken TNF-RII böyle bir domain içermez. TNF-RII , özellikle hayatta kalma sinyallerini aktifleştirirken TNF-RI hem ölüm hem de hayatta kalma sinyallerini aktifleştirir [93].

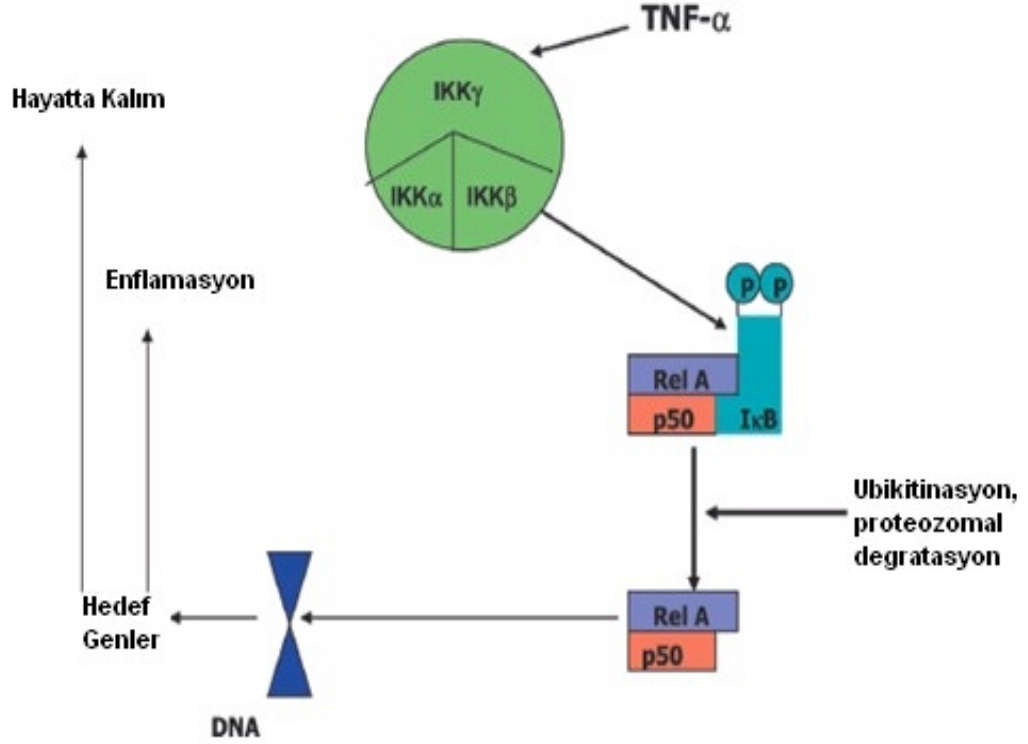
TNF α , immun stimülasyon, infeksiyon ajanlara direnç, tümörlere direnç, uyku düzenlenmesi ve embriyonik gelişim gibi değişik terapötik rollere sahiptir. Diğer taraftan parazitik, bakteriyal ve viral infeksiyonlar TNF α sirkülasyonu nedeniyle daha patojenik ya da öldürücü olurlar. TNF α , özellikle interferonlarla kombinasyonlarında anti-malign hücre sitotoksosite gösterir [94]. TNF α aynı zamanda nekrotik ya da apoptotik hücre ölümünü indükler [95].

Apoptosis, TNF α aracılı TNFRI sinyal yolağının aktifleşmesi ile meydana gelen sitotoksik bir olaydır. TNF α ile indüklenmiş sinyal iletimi Şekil 1.5'te gösterilmiştir. TNF α , reseptörü (TNF-RI) ile trimerizasyon yaparak bağlanır. Çünkü ölüm domainleri (DDs), herhangi bir hücre içi enzim aktivitesine sahip değildirler. Bu bağlanma, bir adaptör molekül olan TNF-R-bağımlı ölüm domaini (TRADD) aktifler. Diğer bir adaptör molekül olan Fas-bağımlı ölüm domaini (FADD), protein-protein etkileşimleriyle prokaspaz-8'i aktifler. Prokaspaz-8, daha sonra otolitik mekanizmayla aktif kaspaz-8 oluşur. Bu enzim sitoplazmaya geçerek efektör kaspaz-3,-6,7'den özellikle kaspaz-3'ü aktifleyerek apoptozisin morfolojik ve biyokimyasal özellikleriyle sonuçlanmasını sağlar. TNFR2, dolaylı olarak sitotoksositeye aracılık eder. Bunu da endojen TNF α salınımı ve TNFR2' nin ototropik ya da paratropik aktivasyonu sağlar [96].

TNF α , aynı zamanda NF κ B aktivasyonu ile hücrenin yaşamda kalmasına öncülük eder. TNF α ile indüklenmiş NF κ B aktivasyonu Şekil 1.6’da gösterilmiştir. NF κ B, Rel ailesinin üyelerinden olup ya homodimer ya da heterodimer şeklindedir. Sitokinler, kemokinler, hücre yüzey reseptörleri, adezyon molekülleri hedef genler arasındadır. Son zamanlarda NF κ B’nin TNF α ile tetiklenmesi ile apoptozisin inhibe edildiği gösterilmiştir [97, 98]. Dolayısıyla, TNF α ’nın önemli biyolojik fonksiyonlarından biri de apoptozisin NF κ B ile supresyonu olmuştur. Bu yoldan pek çok gen indüklenerek apoptozisin inhibisyonu gerçekleşir.



Şekil 1.5 TNF α ile indüklenmiş apoptozisin sinyal iletimi [93].



Şekil 1.6 TNF α ile indüklenmiş NF κ B aktivasyonu [93].

1.4.2 Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta

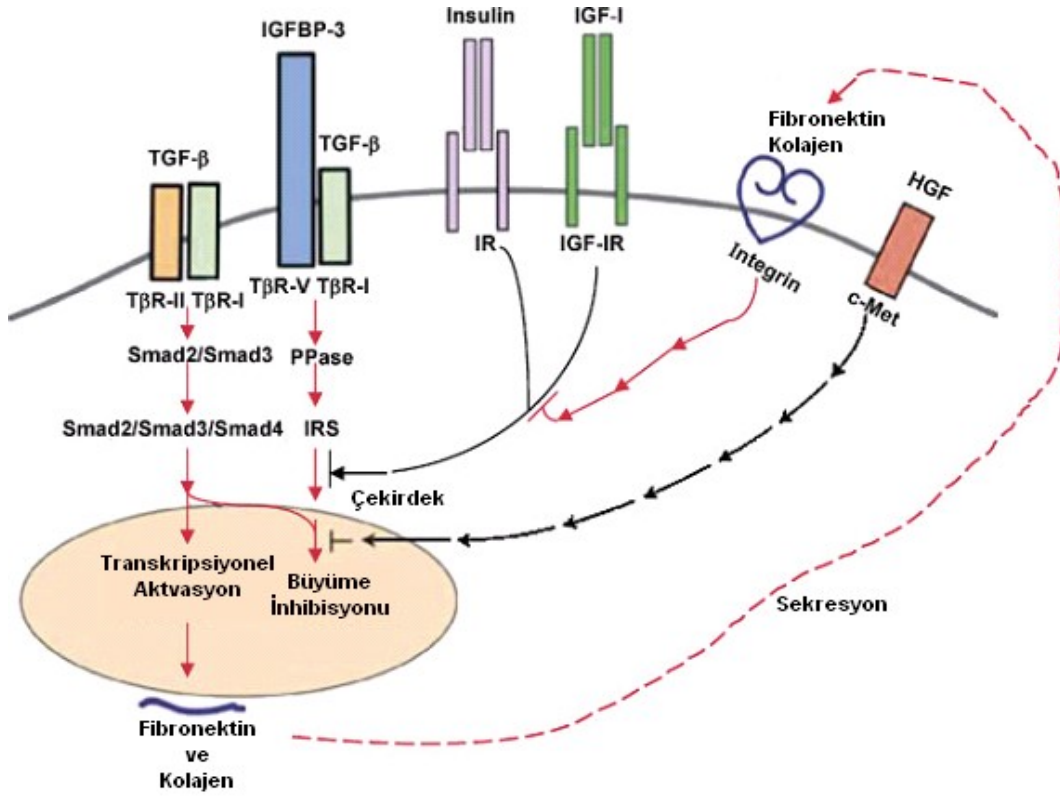
Yapısal olarak homolog dimerik protein ailesidir. Bu aile içinde TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 olarak üç memeli izoformu vardır. Hücre proliferasyonu, hücre dışı (ECM) sentezi, anjiyogenez, immun yanıt, apoptozis ve diferensiasyon gibi pekçok biyolojik olayın regülasyonunda rol oynar [99]. Kanser patogenezi, otoimmun hastalık, doku fibrozisi, diyabet ve diğer hastalıklarda implikasyonları vardır. TGF β izoformları, çeşitli biyolojik aktivitelerini responsif hücrelerde spesifik hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirirler. Çeşitli büyüklükte hücre yüzey reseptörleri (tip1, 2, 3, 4, 5, 6) membrana bağlı proteinler olarak bilinirler. T β R-I ve T β R-II Ser/Thr-spesifik protein kinazlar, TGF β ile indüklenmiş hücresel cevaptan sorumludurlar [100].

TGF β ' nın foksionlarından biri ECM proteinlerinin regülatör proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonudur. Bu transkripsiyonel aktivasyon,

T β R-I/T β R-II heterokompleks aracılı sinyal kaskadı, aracılığıyla olur [100]. Aktive olan T β R-I, Smad 2 ve Smad 3 moleküllerini fosforiller. Smad 2/ Smad 3/ Smad 4 oligomerleri nükleusa geçerek hedef genlerin ekspresyonunu düzenlerler. Diğer bir fonksiyonu ise; hücrel büyüme düzenlemesidir. Epitel hücreleri, endotel hücreleri, embriyonik fibroblastlar ve hematopoietik hücreleri de içeren çoğu hücre çeşitinde büyüme inhibe ederken bazı mezenşimal hücrelerde büyüme düzenler. TGF β , T β R-I /T β R-II/ Smad 2/3/4 kaskadını indükleyerek hedef genlerin ekspresyonunu düzenler. Bu model, Şekil 1.7'de gösterilmiştir [100].

TGF β , tümör oluşumu sürecinde çift etkili rol oynar. Tümorigenezisin ilk safhalarında bir tümör baskılayıcı gibi davranırken; ileri safhalarında tümör aktivatörü gibi davranır [101].

TGF β epitel hücreleri için kuvvetli bir büyüme inhibitörüdür. Karsinoma hücrelerinin çoğunluğunda, TGF- β 'nın T β R-I /T β R-II sinyal yolağını indüklemesiyle meydana gelen transkripsiyonel aktivasyon sağlanır. Bu durumda TGF β 'nın aşırı salgılanması, karsinoma hücrelerinin daha metastatik ve invazif hale gelmesine sebep olur. Epitel ve endotel hücreleri TGF β ile muamele edildiğinde; TGF β 'nın hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak büyüme inhibisyonuna sebep olur [100, 102].



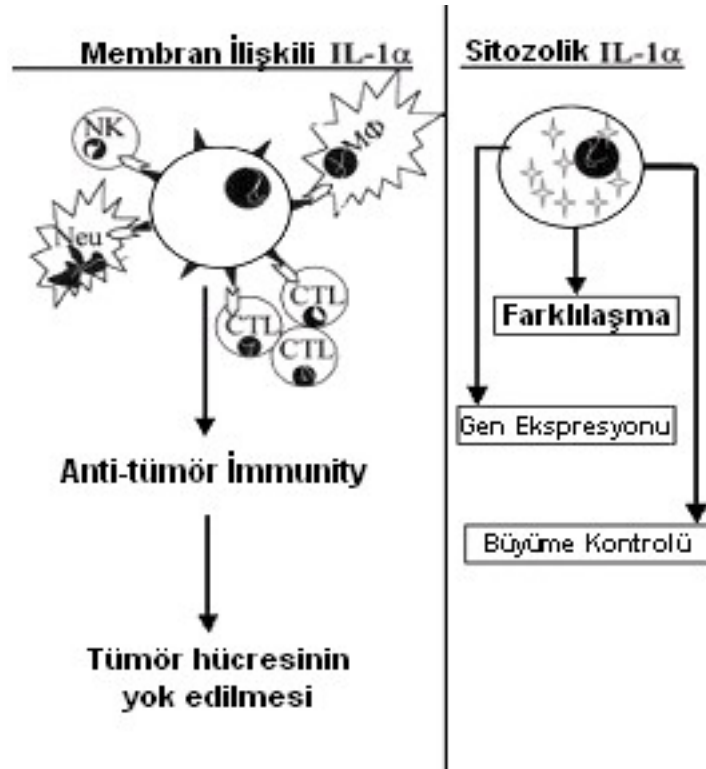
Şekil 1.7 Hücre proliferasyonunun TGFβ ile kontrolü [100]

1.4.3 İnterlökin-1 Ailesi

Bu ailenin IL1 α , IL1 β ve IL1 reseptör antagonisti (IL1Ra) olmak üzere 3 gen ürünü vardır. IL1 α ve IL1 β , 31kDa'luk öncül olarak sentezlenir. Daha sonra proteazlarla işlenerek 17kDa' luk olgun forma dönüşür. IL1 β -dönüştürücü enzim (ICE) ya da kaspaz-1 sistein proteaz, IL1 β ' nın inaktif prekürsörünü işlerken; IL1 α , kalpain ile işlenir. IL1 α , sinyal dizisindeki eksiklik nedeniyle diğer pek çok sitokinden farklıdır. Bu nedenle, endoplazmik retikulum ve Golgi yolağına giremez. Salgı mekanizması, tam olarak anlaşılammıştır. IL1Ra, ise sinyal peptidi içerdiğinden endoplazmik retikulum ve Golgi yolağına salınır [103].

Çoğu hücre, mikroplar ve mikrobiyal ürünler, sitokinler, diğer çevresel etkenlerle aktive olduğunda; IL1 α , IL1 β , IL1Ra salınımı gerçekleşir [104].

Tümör hücrelerinde, öncül IL1 α , membrana bağlı ve sitozolik IL1 α ekspresyonları belirlenmiştir. Kalpaine bağlı süreç meydana geldiğinde, bazı sitokinlerin salınımı gerçekleşir. Şekil 1.8’de gösterildiği gibi sitozolik IL1 α hücre farklılaşması, büyümenin kontrolü ve bir dizi genin ekspresyonunu kontrol eder. Membrana bağlı IL1 α , anti-tümör immunitéyle tümör hücre eradikasyonunu kontrol eder [104].



Şekil 1.8 IL1 α 'nın malin hücrelerin farklı kompartmanlarındaki etkileri [104]

1.5 Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser hem kadınlarda hem de erkeklerde en yaygın görülen kanserler arasında üçüncü sırada yer almaktadır. 2008 yılında yaklaşık olarak 108,070 kişi kolon kanseri, 40,740 kişi ise rektal kansere yakalanmıştır. 2008 yılında tahmini olarak 49,960 ölüm kolon ve rektal kanserden dolayı meydana gelmiştir. Bu oran bütün kanser ölümlerinin % 9'unu oluşturmaktadır. Kolorektal kanserden

dolayı gerçekleşen ölüm oranı, hem kadın hem de erkeklerde son 20 yılda düşüş göstermektedir. Bu düşüş erken teşhis ve tedavi yöntemlerinin gelişmesine bağlı olarak gerçekleşmiştir [105].

Kolorektal kanserin erken safhaları genellikle semptomatik değildir. Bununla birlikte kolorektal kanserin erken safhalarında tarama yapılarak saptanabilmesi önemlidir. Bu hastalık ilerleyen dönemde, rektal kanama, gaitada kan, bağırsak doğasının değişmesi, alt abdomende kramplara sebep olmaktadır. Kolorektal kansere yakalanma riski yaşa bağlı olarak artmaktadır. Teşhis edilmiş vakaların % 90'dan fazlası 50 yaş ve üzeridir [105]. Aynı zamanda bazı kalıtsal genetik mutasyonlar (ailesel adenomatoz polipozis-FAP) ve kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser-HNPCC), bireysel ya da ailesel kolorektal kanser ve/ veya polip öyküsü ya da kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları geçmişi hastalıkla ilişkili risk faktörleri arasındadır. Ayrıca obezite, hareketsizlik, sigara ve alkol tüketimi, aşırı kırmızı et tüketimi, sebze ve meyve tüketimindeki yetersizlik kolorektal kanser riskini artıran faktörler arasındadır [105].

Kolorektal kanserde de diğer kanser türlerinde olduğu gibi erken teşhis çok önemlidir. Erken yapılan teşhis ölüm oranlarının düşmesine sebep olmaktadır. Cerrahi işlemler en yaygın kullanılan tedavi yöntemlerinden biridir. Kemoterapi tek başına ya da cerrahi operasyondan önce ya da sonra çoğu hastada kullanılmaktadır. Son zamanlarda monoklonal antikor tedavisi de kolorektal kanserde kullanılan tedaviler arasına girmiştir [105].

Kolorektal kanserin en yaygın formu, HNPCC yani Lynch sendromudur. Bu hastalık dört yanlış eşleşme tamir geninden birinde meydana gelen gametlerde taşınan mutasyonlar ile ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte çoğu kolorektal kanser, gametlerde taşınan anormallik olmaksızın mikrosatellit kararsızlık göstermektedir. HNPCC prognozu sporadik kanser formlarından daha iyidir. HNPCC'li hastalarda endometrium, ovaryum, mide, ince bağırsak, hepatobiliar sistem, üreter ve renal pelvis gibi bazı ekstrakolonik bölgelerde kanser riskini artırır. Genetik kararsızlık, kolorektal kanserde yaygındır ve karsinogeneziste önemlidir. Bu durum hipoksi gibi tümör mikroçevresindeki stres faktörleriyle tetiklenir. HIF1 α hipoksik koşullara

hücresinin cevabında önemlidir ve hipoksik bölgelerde aşırı derecede ekspresyon olur. Bu transkripsiyon faktörünün ekspresyonundaki artış hücre yaşamı için önemli olan bazı genlerin aktivasyonunu sağlar. HIF1 α 'nın hedef genlerinden CA9, bazı karsinomalarda ekspresyonu artan karbonik anhidraz IX'u kodlar. CAXII ise CA ailesinin hipoksik koşullarla indüklenen diğer bir üyesidir. Kolorektal kanser CA varlığının keşfedildiği ilk kanser türlerinden biridir. Normal intestinal dokularla karşılaştırıldığında tümörlü dokularda CAII ekspresyonu azalırken, CAIX ekspresyonu artar. CAXII ekspresyonu ise genellikle sabittir [106].

2007 yılında 3 farklı kolorektal karsinoma türünde yapılan bir çalışmada CAII ve CAXII mRNA larının *downregüle* olduğu, CAIX mRNA'sının ise *upregüle* olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre özellikle HPNCC'de CAIX hem diagnostik hem de terapötik hedef olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada da yine CAIX mRNA'sının kolorektal karsinomalı hastalarda ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir. Kolorektal kanserde CAIX'un anormal ekspresyonu, kolorektal mukozada proliferasyonu gösteren bir belirteç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bundan dolayı CA9'u hedef alan tedavilere yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır [106].

1.6 Çalışmanın Amacı

CAIX geni, pekçok kanser tipinde oldukça fazla ifade edilmektedir. Bu genin ifadesi, hipoksi ile indüklenebilen HIF-1 transkripsiyon faktörü ile regüle edilir. CAIX, karbondioksitin bikarbonat ve protona hidrasyonunu katalizleyerek tümör çevresinin asidifikasyonunda rol oynamaktadır. Bu protein, tümörlü hücrenin pH dengesinin kontrolünde önemli olduğu için, tanı ve tedavi amaçlı ajanların geliştirilmesinde odak noktası olmuştur.

Bu çalışmada, CAIX ekspresyonunun pozitif olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan HT-29 (kolon karsinoma hücre serisi) hücreleri seçilmiştir. Bu tümör serisi hücreleri üzerinde farklı sitokinlerin farklı konsantrasyon ve inkübasyon aralıkları optimize edilerek deney için en uygun sitokin konsantrasyonu ve inkübasyon süresi belirlendi. Flow sitometri ile apoptozis ve hücre döngüsü çalışması yapılarak hücrelerin hangi safhada ne kadar olduğu ve apoptozise uğrayan hücrelerin oranları belirlendi. Bu işlemleri takiben Real-time-RT-PCR tekniği kullanılarak CAIX geninin ekspresyonu mRNA düzeyinde araştırılacak, böylece tümörle ilişkili olarak seçilen sitokinlerin CAIX geninin ekspresyonunda bir değişiklik yaratıp yaratmadığı konusunda bilgi edinilecektir. Flow sitometrede PE (fikoeritrin) gibi bir florokromla işaretli CAIX monoklonal antikoru kullanılarak protein düzeyinde ekspresyon seviyesi saptandı.

Bu çalışmada, *CA9* geninin farklı sitokinlerle olan ilişkisine bakılarak; bir taraftan kanser tedavisinde en önemli noktalardan birisi olan apoptozis ve hücre döngüsünde meydana gelen değişiklikler ile *CA9* geninin ekspresyonu arasındaki ilişki belirlendi, diğer taraftan da kanser tedavisinde kullanılan immünoterapi için bazı temel noktalar açığa kavuşturuldu.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Hücre Serisi

Bu çalışmada kullanılan “insan kolon karsinoma” (HT-29) hücre serisi Ankara Şap Enstitüsü’nde, Hücre Bankası sorumluluğunda olan ve Avrupa Kültür Koleksiyonları Organizasyonu üyesi olan Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu’ndan (HÜKÜK) sağlandı.

2.1.2 Besi Yerleri ve Serum

Besin ortamı olarak *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Biochrom AG, Almanya) ve serum olarak fetal sığır serumu (FBS, Biochrom AG, Almanya) kullanıldı.

2.1.3 Sitokinler

Çalışmada sitokin olarak, interlökin 1 alfa (IL1 α , Peprotech, İngiltere), tümör nekrozis faktör alfa (TNF α , Peprotech, İngiltere) ve transforme edici büyüme faktörü (TGF β , Peprotech, İngiltere) kullanıldı.

2.1.4 QiaAmp RNA Blood Mini Kit

Hücre vasatından total RNA izolasyonu, QiaAmp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak yapıldı.

2.1.5 Quantitect Reverse Transcription cDNA Kit

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi, Quantitect Reverse Transcription cDNA kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak yapıldı.

2.1.6 Primerler

Çalışmada kullanılan primerler (PrimerDesign, ABD ve Metabion, Almanya) firmaları tarafından tasarlandı.

2.1.7 Antikorlar

İnsan CAIX'unun protein düzeyinde ekspresyonunun akış sitometrik analizi için anti-human karbonik anhidraz IX monoklonal antikor-PE (R&D Systems, İngiltere) kullanıldı. İzotipik kontrol olarak anti-mouse IgG2a-PE (BD Biosciences, ABD) kullanıldı.

2.1.8 DNA Prep Kit

DNA Prep Kit, DNA Prep LPR (%0,1 potasyum siyanid, %0,1 NaN₃, iyonik olmayan deterjanlar, salin, stabilizatör) ve DNA Prep boyama çözeltisi (50 µg/ml propidyum iyodid, RNase, %0,1 NaN₃ , salin, stabilizatör içermektedir.

2.1.9 AnnexinV-FITC Kit

Bu kit, AnnexinV-FITC, 10X'lik konsantre AnnexinV bağlanma tamponu, propidyum iyodid içermektedir. Apoptozisin erken döneminde hücre membranı bütünlüğü korunurken membrandaki fosfolipid asimetrisi kaybolmaktadır. Normal hücrede plazma membranının iç kısmında bulunan fosfatidil serin hücre yüzeyine çıkmaktadır. Annexin V seçici olarak fosfatidil serine bağlanarak apoptozisin erken ve geç döneminde tespitini sağlamaktadır.

2.1.10 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıktadır.

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üreticileri

Kimyasallar	Üretici
Tris Base	Sigma, ABD
NaCl	Sigma, ABD
EDTA	Riedel, Almanya
Borik Asit	Merck, ABD
Na ₂ HPO ₄ ,	Sigma, ABD
NaH ₂ PO ₄	Sigma, ABD
MgCl ₂	Merck, Almanya
Beta-mercaptoetanol	Sigma, ABD
Ampicillin	Sigma, ABD
DMSO	Merck, Almanya
DMEM	Sigma, ABD
FBS	Sigma, ABD
Tripsin-EDTA	Sigma, ABD
L-glutamine	Sigma, ABD
Penisilin-streptomisin	Sigma, ABD

Çizelge 2.1'in devamı

Kimyasallar	Üretici
PBS	Sigma, ABD
Agaroz	Prona, İspanya

2.1.1.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Çizelge 2.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
CO ₂ 'li inkübatör	Heraeus, Almanya
Hava akışlı kabin	Holten, Danimarka
İnverted mikroskop	Olympus IX71, Japonya
-80 °C derin dondurucu	Sanyo, Japonya
Sıvı azot tankı	810 Eterne, İngiltere
Gerçek zamanlı PZR cihazı	Qiagen, Almanya
Işık mikroskop	Olympus CH, Japonya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye

Çizelge 2.2'nin devamı

Kullanılan Gereç	Modeli
Otoklav	Hırayama, Japonya
PH metre	InoLab, Almanya
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1(Comecta Sa.), İspanya
Santrifüj	Eppendorf 5804R, Almanya
Sıcak su banyosu	Memmert, Almanya
Akış sitometrisi cihazı	Beckman Coulter FC500, ABD
UV visible spektrofotometre	Heios α (Unicam), Kanada
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Hassas terazi	Sartorius, Almanya
Otomatik pipetler	Socorex, Çin
Thermocycler	Qiagen, Almanya
Elektroforez sistemi	Innotrain, Almanya
Floresan mikroskop	Nikon, Japonya
Mikro santrifüj	Nüve NF048, Türkiye

2.1.1.2 Formaldehit Jel Elektroforez Çözeltileri

Çizelge 2.3 Formaldehit jeli

Kimyasal Madde	Miktar
Agaroz	1,2 g
10X FA jel tampon	10 ml
RNazsız su ile 100 ml'ye tamamlanır. Mikrodalgada ısıtılarak agaroz eritilir. Su banyosunda soğutulduktan sonra 1,8 ml %37 formaldehit ve 1 µl etidyum bromid eklenir.	

2.2 Yöntem

2.2.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, Ependorf tüpler, santrifüj tüpleri, kültür ortamları 121 °C'de 20 dakika (1.02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

Doku kültürü laboratuvarı her hafta periyodik olarak dezenfektan (Virkon) içeren sıvılarla temizlendi. Oda kullanılmadığı zamanlarda UV lamba kullanılarak odanın sterilizasyonu sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce akışlı kabin açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı.

2.2.2 Hücre Kültürü Yöntemleri

2.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı

2.2.2.2 Hücre Kültürü Besi Ortamının Hazırlanması

Hücre kültürü DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) içine son konsantrasyonu 100 U/ml olacak şekilde penisilin, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde streptomisin, son konsantrasyonu 0,2 mM olacak şekilde L-glutamin ve son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde FBS ilave edildi. Tüm bileşenler 0,22 µm gözenek çaplı steril filtreden süzüldü.

2.2.2.3 FBS Hazırlanması

FBS (fetal bovine serum) -20°C'de saklanır ve taşınması soğuk zincirle yapılır. Stok serum ilk kullanımdan önce 56°C 30 dakika sıcaklık ile inaktive edildi ve -20°C'de saklandı.

2.2.2.4 PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Tablet şeklinde temin edilen PBS (fosfat tampon salin), her tableti 100 ml destile su ile hazırlandı ve otoklav edildi.

2.2.2.5 HT-29 Monolayer Hücre Kültürünün Hazırlanması

T25 cm² hücre kültürü üretme kabında bulunan HT-29 tek tabaka hücre kültürü, önce Ca-Mg içermeyen fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7.2) ile ön yıkama yapıldı ve Tripsin/EDTA (%0.025 tripsin / % 0.02 ethylenediamineteraacetic acid (EDTA) (Biochrom AG, Almanya) solüsyonu ile 37°C inkübatörde tripsinizasyona bırakılarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücreler %10 FBS serum içeren DMEM besi ortamı ile homojenize edilerek T150 cm² hücre üretme kabına aktarılıp pasajlama yoluyla ölçek büyütme işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamada hücreler yine kültür kabı yüzeyini %90-95 kapladığında, tripsinizasyon yapıldı, serumlu besi ortamı ile hücreler homojenize edildi, canlılık kontrolü ve hücre sayımı için 0,9 ml numune alındı. Alınan numune içine 0,1 ml tripan mavisi (Biochrom AG, Almanya) konuldu ve hemasitometre (Bürker, Almanya) kullanılarak ışık mikroskopunda (Olympos CH, Japonya) hücre sayımı yapıldı, hem 150 cm² kültür kabı hacmine pasajlandı hem de çalışmanın devamı için bir kısmı stoklanmak üzere donduruldu. Dondurma işleminde; tripsinizasyonla yüzeyden ayrılıp serumlu besi ortamı ile homojenize edilen hücreler 5 dak. 800 devirde santrifüj edildi. Süpernatant olarak hücre peleti dondurma besi ortamı (%10 DMSO, AppliChem, Almanya ve % 90 FBS) ile homojenize edilerek 2 ml'lik hücre dondurma ampullerine 1-1,5 milyon hücre/ml olacak şekilde 1ml olarak taksim edildi ve koruyucu köpükler içinde -80 °C ye kaldırıldı.

2.2.3 HT-29 Monolayer Hücre Kültürüne Sitokin Uygulanması

HT-29 monolayer hücre kültürü 75 cm² kültür kabının yüzeyini %90-95 oranında kapladıktan sonra tripsinizasyon ile hücreler yüzeyden ayrıldı ve DMEM ile homojenize edildi. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 80000 hücre /cm²'de olacak şekilde 25 cm² lik kültür kaplarına alındı. Uygulanacak sitokinler (TGFβ, TNFα, IL1 α) 100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml son konsantrasyon olacak şekilde kültür kaplarına uygulandı. 24, 48, 72 saat sürelerle 37°C, %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Her bir inkübasyon süresi için sitokin uygulanmamış kontrol grubu oluşturuldu. İnkübasyon süreleri sonunda her bir hücre kültür kabındaki hücrelerin morfolojik görüntüleri dijital kamera ile çekilip kaydedildi. Her bir hücre kültür kabından hücre kazıyıcı kullanılarak yüzeyden ayrıldı ve DMEM ile homojenize edildikten sonra hücre sayımları yapıldı ve hücrelerin canlılıkları incelendi. Buna ek olarak en uygun konsantrasyon belirlendikten sonra en yüksek konsantrasyonda sitokinler arasında ikili kombinasyonlar oluşturularak (1000U/ml IL1α-TNFα, 1000U/ml IL1α-TGFβ, 1000U/ml TNFα-TGFβ) çalışma yukarıdaki şekilde tekrarlandı.

2.2.4 Gerçek Zamanlı PZR Çalışmaları

2.2.4.1 Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu

Hücre kültürü örneklerinden RNA izolasyonları QiaAmp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) hücre kültüründen total RNA izolasyonu yöntemine göre yapıldı. Yaklaşık olarak 3-3,5x10 hücre bulunan süspansiyon 800 rpm' 5 dak. Santrifüj edildi. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Pelet B-merkaptotanol içeren 350µl RLT tampon içinde pipet yardımıyla çözüldü. Lizat QIAshredder spin kolona uygulandı ve 14000 rpm'de santrifüj edildi. Kolon atıldı ve homojenize lizat eşit hacimde % 70'lik etanol içerisinde pipetlenerek karıştırıldı. QIAamp spin kolona uygulanır 15 san.10000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve 700 µl RW1 tampon kolona uygulandı. 15 san. 10000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı üzerine 500µl RPE tampon ilave edildi ve 15 san. 10000 rpm'de kolon yıkandı. Kolona 500µl RPE tampon ilave

edildi 3 dak. 14000 rpm’de santrifüj yapıldı. Kolon 1 dak. daha santrifüj yapılarak etanol tamamen uzaklaştırıldı. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı 50 µl RNase-free water ile 1 dak. 10000 rpm’de elüsyon yapıldı. Elde edilen RNA elüsyonu, 65 C’ de 10 dak. inkübasyona bırakıldıktan sonra 10 dak. buzda bekletildi.

2.2.4.2 RNA Ürününün Spektrofotometrik Ölçümü

RNA izolasyonu sonunda elde edilen elüsyonların 260nm ve 280nm’de absorbansları ölçüldü. A_{260}/A_{280} saflık oranları hesaplandı. RNA konsantrasyonu aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı.

$$C=A_{260} \times 40 \times \text{dilüsyon faktörü}$$

2.2.4.3 Formaldehit (FA) Jel Elektroforezi

Elektroforez tankı %0,5’lik SDS ile yıkandı daha sonra Rnzsız su ile yıkandı. Etanolden geçirildikten sonra kurumaya bırakıldı.

2.2.4.3.1 %1,2 FA Jel Hazırlanması

1,2g agaroz ve 10ml 10x FA jel tampon RNase-free water ile 100ml’ye tamamlandı. Mikrodalga fırında ısıtılarak agaroz eritildi. Su banyosunda soğutulduktan sonra 1,8ml 37% formaldehit ve 1 µl etidyum bromid eklendi, karıştırıldı ve tanka döküldü.

2.2.4.4 RNA Örneklerinin Hazırlanması

1 hacim RNA yükleme tamponu 4 hacim RNA örneği ile karıştırıldı ve 5 dak. 65 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra buz üzerine alındı.

2.2.4.5 Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi

Hücre kültüründen elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlemek için QuantiTect Revers Transkripsiyon kit kullanıldı. RNA örnekleri soğuk blok üzerinde çözüldü. gDNA “Wipeout tampon”, Quantiscript RT, Quantiscript RT Tampon, RT Primer Miks ve RNase free water çözüldü ve hafifçe vurularak karıştırıldı. Çizelge 2.4’te gösterildiği gibi, 2µl 7X gDNA Wipeout Tampon, 7µl su ve üzerine 5µl RNA eklendi ve 42°C’de 2 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Çizelge 2.5’te belirtildiği gibi hemen buz üzerine alınan gDNA’sı uzaklaştırıldı. RNA üzerine 1µl Quantiscript RT, 4µl Quantiscript RT Tampon, 1µl RT Primer Miks eklendi ve Thermal-cycler’a kondu. 42°C 15 dak.,95°C 3 dak. inkübasyona bırakıldı ve inkübasyondan sonra buz üzerine alındı. Elde edilen cDNA’lar -20 °C’de saklandı.

Çizelge 2.4 Genomik DNA uzaklaştırma

	Miktar(µl)		Karışım (µl) + %10
gDNA “Wipeout tampon” , 7X	2	X	
H ₂ O	7		
Toplam	9		
<ul style="list-style-type: none">- 9 µl karışım tüplere dağıtılır.- 5 µl RNA eklenir.- 42°C’de 2 dakika inkübasyona bırakılır. Sonra hemen buz üzerine alınır.			

Çizelge 2.5 cDNA Sentezi

	Miktar(µl)		Karışım (µl) + %10
Quantiscript Revers Transkriptaz	1	X	
Quantiscript RT Tampon	4		
RT Primer Karışımı	1		
Toplam	6		
<ul style="list-style-type: none"> - 6µl miks gDNA'sı uzaklaştırılmış RNA üzerine eklenir. PZR cihazına konur. - 42°C 15' 95°C 3' 4°C ∞ 			

2.2.4.6 Gerçek Zamanlı PZR Analizi ile CA9 Gen İfadesinin İncelenmesi

SYBR green kullanılarak PZR sırasında, ürünün saptanması logaritmik siklus döneminde miktar analizi yapılmasına olanak sağlar. mRNA ekspresyonu real-time RT-PZR tekniği aracılığıyla çalışıldı. cDNA, polimeraz zincir reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldı. Buna ilaveten normalizasyon için referans gen olarak TBP kullanıldı. Kalıp hariç verilen karışım (12,5βl 2X SYBR green karışımı, 1,5βl primer karışımı, 6βl pzs grade su) hazırlandı. Her bir tüpe bu karışımdan 20βl eklendi. Üzerine 5βl cDNA eklendi. Son hacim 25βl'de gerçekleştirildi. PZR tüpleri PZR cihazına konuldu (Rotorgene 3000) ve PZR programı olarak (95 °C 15 dak. 50 döngü için 94°C 2 san., 50 °C 15 san., 72 °C 15 san.) seçildi. PZR tamamlanınca kantitasyona olanak veren yazılım yardımı ile analizler yapıldı (Rotorgene, Version 6.1; Qiagen).

2.2.5 Hücre Döngüsünün Akış Sitometride İncelenmesi

Bu çalışma için COULTER DNA Prep Reagents Kit protokolü kullanıldı. Hücreler 800 rpm'de 5 dakika satrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti son konsantrasyon 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde PBS ile çözüldü. Bu süspansiyonda 200 µl alındı ve üzerine 100µl LPR çözeltisi (<0,1 potasyum siyanid, <0,1 NaN₃, non-iyonik deterjan, salin) ilave edildi, 500µl DNA Prep Stain solusyonu (50µl/ml propidyum iyodid, 4 KU/ml RNase, salin, < 0,1% NaN₃) eklenip vortekslendikten sonra tekrar 500µl DNA prep stain çözeltisi ilave edilip vortekslendi ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra akış sitometride okuma yapılana kadar +4 °C'de bekletildi.

2.2.6 Apoptozun Akış Sitometride AnnexinV Bağlanması ile İncelenmesi

Bu çalışma için ANNEXINV-FITC Kit, Apoptosis Detection Kit protokolü uygulandı. Hücreler 800 rpm'de 5 dakika satrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti son konsantrasyon 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde PBS ile çözüldü. Bu süspansiyondan 200µl alındı ve üzerine 1µl AnnexinV-FITC (25µg/ml), 5µl PI(250µg/ml) ilave edildi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 400µl “AnnexinV bağlama tamponu” eklenip vortekslendi ve 30 dakika içinde akış sitometride okuma yapıldı.

2.2.7 Floresan Mikroskop Analizi

Bu çalışma için AnnexinV-FITC Kit, Apoptosis Detection Kit protokolü uygulandı. Hücreler 800 rpm'de 5 dakika satrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti son konsantrasyon 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde PBS ile çözüldü. Bu süspansiyondan 200µl alındı ve üzerine 1µl AnnexinV-FITC (25µg/ml), 5µl PI (250µg/ml) ilave edilir ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 400µl “AnnexinV binding tampon” eklenip vortekslendi. Daha sonra, lam/lamel arasında hazırlanan immunfloresan boyalarla boyanmış hücrelerin görüntüleri, Nikon marka floresan mikroskopunda apoptotik ve nekrotik hücrelerin fotoğrafları çekildi.

2.2.8 CA IX İfadesinin Akış Sitometrik Analizi

Farklı sitokinlere maruz kalmış ve hiçbir sitokine maruz kalmamış kontrol grubu HT-29 kolon adenokarsinom hücrelerinde farklı zaman periyotlarında (24, 48, 72 saat) CA IX ekspresyonunun akış sitometrik analizi için optimizasyon çalışması yapıldı. Bunun için farklı iki yöntem kullanıldı. İlk olarak, kültüre edilen hücreler flasklardan tripsin ile kaldırıldı. Daha sonra PBS ile 3 kez yıkandı. Son konsantrasyonu 25µg/ml olacak şekilde PE işaretli anti-human carbonic anhydrase IX monoclonal antibody (R&D Systems, England) seyreltildi. PBS ile yıkanmış olan hücelere (1×10^5 hücre) reaksiyonunun son hacmi 200µl olacak şekilde 10µl CAIX antikor ilave edildi. İşaretlenmemiş monoklonal antikorları görüntüleyebilmek için izotip kontrol olarak PE işaretli anti-mouse IgG2A monoclonal antibody kullanıldı. Aynı işlemler bu tüp içinde yapıldı. Hücrelerin antikorlara bağlanması için reaksiyon tüpleri karanlıkta, buz üzerinde 40 dak. inkübasyona bırakıldı. Bağlanmayan PE-konjuge antikorlar hücrelerden PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Hücreler PBS içerisinde hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra akış sitometride okumaya hazır duruma getirildi. CAIX ekspre eden hücrelerinin floresan boyanma yoğunluğu ile CAIX ekspresyonunun yoğunluğu arasında doğrudan bir ilişki vardır. CAIX'un hücre yüzeyindeki ekspresyonu, akış sitometrik analizle 488 nm dalga boylu laser kullanılarak ve 565-605nm'de bir dedektörle emilen floresanın monitörlenmesi ile belirlendi. İkinci olarak, hücreler flasklardan hücre kazıyıcı ile kazıyarak kaldırıldı. Daha sonraki işlemler yukarıda bahsedilen şekilde uygulandıktan sonra hücreler akış sitometrik analize hazır hale getirildi. Hazırlanan örnekler hemen akış sitometride okundu.

2.3 İstatistiksel Analiz

Deney sonuçları, SPSS (Statistics program for social and science) 11.5 istatistik programında tek yönlü ANOVA testi kullanılarak gerçekleştirildi. $P < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1 Genel Deneysel Strateji

Sitokinlerin HT-29 hücreleri üzerine etkileri farklı açılardan değerlendirilmiştir. Her bir sitokin (TGF β ve TNF α , IL1 α) farklı konsantrasyonlar ve inkübasyon zamanları sonucu elde edilen hücre süspansiyonlarındaki, CAIX'un protein düzeyinde ekspresyon seviyeleri akış sitometrik olarak, uygulanan sitokinlerin CA9 mRNA üzerinde etkileri de gerçek zamanlı PZR analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca aynı hücre süspansiyonlarında hücre döngüsü çalışması da yapılarak sitokinlerin hücre döngüsü üzerine etkileri belirlenerek CA9 ile ilişkileri açıklanmaya çalışılmıştır. Hücre süspansiyonları, AnnexinV ve PI floresan boyalarla boyandıktan sonra apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri hem floresan mikroskopta görüntülenmiş hem de akış sitometrik olarak çalışılmıştır.

Bu amaçla, kolon kanserinde tümör modeli olarak seçtiğimiz HT-29 hücreleri yöntemde açıklandığı gibi kültüre alınmıştır. Çalışmamızda TGF β ve TNF α , IL1 α sitokinleri 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda 80000 hücre/cm² hücre üzerine uygulanmıştır. Öncelikle bu sitokinlerin tek başına etkileri değerlendirilmiş ve daha sonra etki görülen dozda ikili kombinasyonlar Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de gösterildiği şekilde oluşturularak detaylandırılmıştır. Çalışmada farklı zaman aralıkları (24, 48 ve 72 saat) kullanılmıştır. Bu işlem sırasında herhangi bir sitokinle muamele olmamış hücreler de çalışmaya dahil edilmiş ve kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hücre süspansiyonu, CAIX protein seviyesi için ve hücre döngüsü ve apoptozis analizleri için ve gerçek zamanlı PZR analizleri için 4'e bölünmüştür.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan sitokinler ve konsantrasyonları

Sitokin	Son Konsantrasyon	Hücre Serisi
TNF α	100U/ml	İnsan kolon karsinoma (HT-29)
	500U/ml	
	1000U /ml	
TGF β	100U/ml	
	500U/ml	
	1000U /ml	
IL1 α	100U/ml	
	500U/ml	
	1000U /ml	

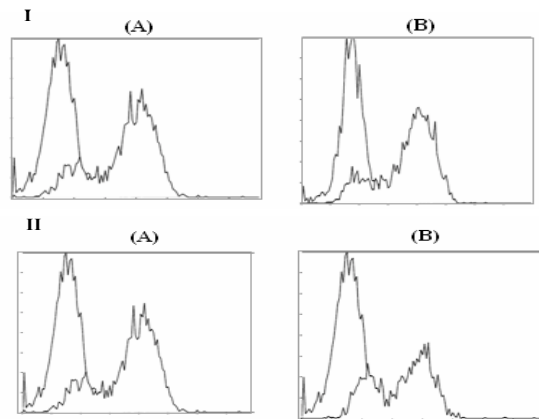
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan sitokin kombinasyonları ve konsantrasyonları

Sitokin Kombinasyonları	Konsantrasyon	Hücre Serisi
IL1 α ve TNF α	1000U /ml	İnsan kolon karsinoma (HT-29)
IL1 α ve TGF β	1000U /ml	
TNF α ve TGF β	1000U /ml	

3.1.1 Akış Sitometrik Analizlerin Tasarımı

Tüm konsantrasyon gruplarından ve zaman aralıklarından elde edilen hücre süspansiyonları akış sitometrik analizler için kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon ve zaman aralığında 3 tekrarlı olacak tarzda çalışılmıştır. Çalışmada akış sitometri cihazı Beckman Coulter FC500 ve analiz programı kullanılarak ve antikor olarak, PE-etiketli CAIX monoklonal antikorunu kullanılmıştır. Öncelikle akış sitometri analizleri optimize edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonları, deneysel

tasarımdan sonra, tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılmış ve her seferinde en az 10000 hücre olacak şekilde akış sitometrede okuma gerçekleştirilmiştir. Aynı hücre süspansiyonu, CAIX protein seviyesi için ve hücre döngüsü ve apoptozis analizleri için her bir deneyde 100000 hücre/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Ancak optimizasyon deneylerinin gerçekleştirildiği TNF α uygulamalarında CAIX pozitifliğinde kontrole göre bir etki görülmemiştir. Yalnız akış sitometrik analizlerde özellikle yüzeye tutunmuş hücrelerin yüzeyden kaldırılması sırasında yüzeyde proteinlerin tripsin-EDTA kullanımı nedeniyle zarar göreceği ve akış sitometredeki pozitifliği etkileyeceği bilinmektedir. Sonucun bu anlamda metodolojik bir problem olabilme ihtimaline karşı, aynı deney seti hücre kazıyıcısı kullanılarak tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.1’de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Akış sitometride CAIX ekspresyonu için optimizasyon çalışması. I. Tripsin EDTA kullanıldıktan sonra elde edilen akış sitometrik histogramlar II. Hücre kazıyıcı kullanılarak elde edilen akış sitometrik histogramlar (A.Kontrol, B. 1000U TNF α)

Hücre döngüsünün değerlendirilmesinde, DNA'ya bağlanan PI boyası kullanıldı. Akış Sitometride okuma yapılırken hazırlanan hücre süspansiyonundan 20000 hücre geçirildi. G0/G1, sentez ve G2/M safhaları hücre yüzdesi olarak hesaplandı. Hücreler, PI boyasına uygun olan FL3 dedektöründe okumaları yapıldı.

AnnexinV deneyinde, FITC işaretli AnnexinV ve PI boyası kullanılmıştır. Sadece AnnexinV bağlayan hücreler, erken apoptotik hücrelerin yüzdesini

vermektedir. Hem AnnexinV hem de PI ile bağlanan hücrelerin yüzdesi geç apoptotik hücreleri göstermektedir. PI ile bağlanan hücreler nekrotik olan hücreleri gösterirken İki boyaya da bağlanmayan hücreler canlı hücrelerin yüzdesini göstermektedir. Bu deneyden elde ettiğimiz sonuçlar dikkate alındığında, apoptotik hücreler açısından kontrol ve sitokin uygulanmış hücreler arasında anlamlı farklar gözleyemediğimiz için PI ile işaretlenen nekrotik hücrelerin yüzdeleri ile canlı hücrelerin yüzdeleri karşılaştırılmıştır.

3.1.2 Gerçek Zamanlı PZR Analizlerin Tasarımı

Akış sitometrik okumalar sonucunda fark görülen sitokin konsantrasyonları ve zaman aralıklarında yapılan hücre kültüründen hücre kazıyıcı kullanılarak elde edilen hücrelerde 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan total RNA izolasyonları yapılarak elde edilen RNA'ların saflığı ve kalitesi yani degrade olup olmadığı RNA jeli kullanılarak ve spektroskopik olarak incelenmiştir. Spektroskopik olarak konsantrasyon tayini de yapılmıştır. Örnek bir RNA jeli görüntüsü, Şekil 3.2' de örnek olarak gösterilmiştir. Bu işlemi takiben cDNA sentezlenerek elde edilen cDNA'larda gerçek zamanlı PZR kullanılarak total RNA ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. *CA9* primerleri, mRNA genebank (NM_001216) bilgisine dayalı olarak "PrimerDesign" tarafından temin edilmiştir. Amplifikasyon ürünü (105bp) üretmek için sens primer "AGCAGAGGTAGCCGAGACT" (pozisyon:1,395) ve antisens primer "ATGAGCAGGACAGGACAGTTA" (pozisyon:1,499) kullanılmıştır. İnsan *CA9* spesifik primerler ve TBP (TATA bağlanma proteini) mRNA'larına özgü primerlerin dizileri ve Tm (erime sıcaklığı), Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te gösterilmiştir. *CA9* ve TBP için gerçek zamanlı PZR reaksiyonu ve koşulları Çizelge 3.5, Çizelge 3.6 , Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8' de gösterilmiştir. Tipik bir gerçek zamanlı PZR analizi, Şekil 3.2' de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyon hesaplamalarında kullanılan Standart eğride, Şekil 3.2' de belirtilmiştir. Ayrıca çoğalan PZR ürününün saflığını kontrol etmek amacıyla elde edilen erime eğrisi Şekil 3.2' de gösterilmiştir. Reaksiyon koşulları denenerek bu koşulların amplifikasyon için uygun olduğuna karar verilmiş ve diğer tüm analizlerde bu döngü koşulları kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR analizi her örnek için eş zamanlı olarak üçlü tekrar edilmiştir.

Çizelge 3.3 *Ca9* mRNA'sı için sentezlenen primerlerle ilgili detaylar

Sense primer	Pozisyon	Tm	GC%
AGCAGAGGTAGCCGAGACT	1,395	57,4	57,9
Antisense primer	Pozisyon	Tm	GC%
ATGAGCAGGACAGGACAGTTA	1,499	56,7	47,6

Çizelge 3.4 TBP mRNA'sı için sentezlenen primerlerle ilgili detaylar

Sense primer	Tm	GC%
CTGTTTAACTTCGCTTCC	52	44,4
Antisense primer	Tm	GC%
CTCTTCTCAGCAACTTCC	54	50

Çizelge 3.5 *CA9* için gerçek zamanlı PZR Reaksiyonu

	Örnek	Negatif Kontrol
SYBR Green mix	12,5µL	12,5µL
dH ₂ O	6µL	11µL
cDNA örnek	5µL	-
Primer Forward ve Primer Reverse karışımı (10pmol)	1,5µL	1,5µL
Toplam	25µL	25µL

Çizelge 3.6 CA9 için gerçek zamanlı PZR Koşulları

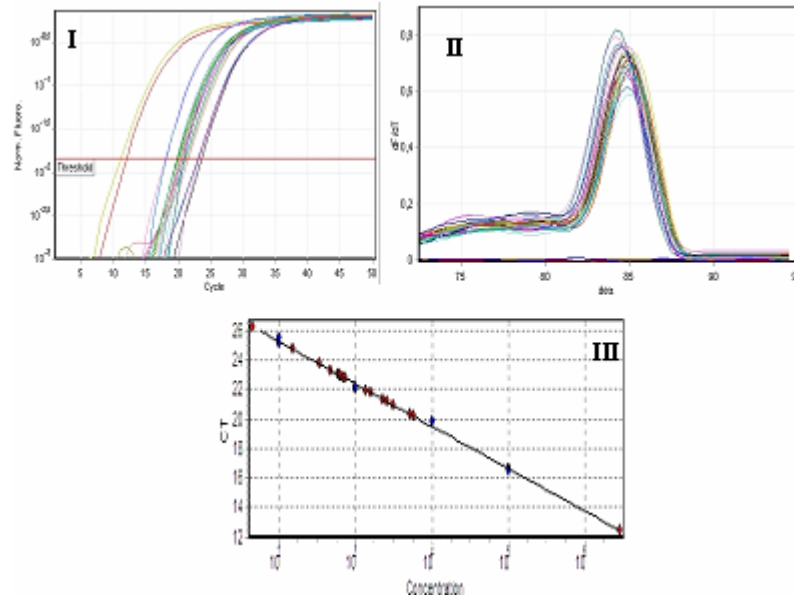
Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95 °C	15 dakika
2	50	94 °C	2 saniye
		57 °C	15 saniye
		72 °C	1 saniye
3	1	72 °C	10 dakika

Çizelge 3.7 TBP için gerçek zamanlı PZR Reaksiyonu

	Örnek	Negatif Kontrol
SYBR Green mix	12,5µL	12,5µL
dH ₂ O	5.5µL	10.5µL
cDNA örnek	5µL	-
Primer Forward (10 pmol)	1µL	1µL
Primer Reverse (10 pmol)	1µL	1µL
Toplam	25µL	25µL

Çizelge 3.8 TBP için gerçek zamanlı PZR Koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95 °C	15 dakika
2	50	94 °C	2 saniye
		52 °C	15 saniye
		72 °C	1 saniye
3	1	72 °C	10 dakika



Şekil 3.2 Gerçek zamanlı PZR analizi. I. Tipik bir amplifikasyon grafiği, II. Eğrime eğrisini gösteren grafik , III. PZR ürününü konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılan örnek bir standart eğri.

3.2 TNF α 'nın HT-29 Hücrelerinde CA9 mRNA ve Protein Düzeyindeki Ekspresyon Seviyelerinin ve Hücre Döngüsü, Apoptozis Üzerinde Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.1 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 24 saat TNF α Uygulaması

24 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml ünite TNF α 'ya maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Fakat kontrol grubu ve en yüksek konsantrasyon olan 1000U/ml uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.3' te gösterilmiştir.

Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz, TNF α konsantrasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2' de açıklandığı gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli insan CAIX antikoru kullanılmıştır.

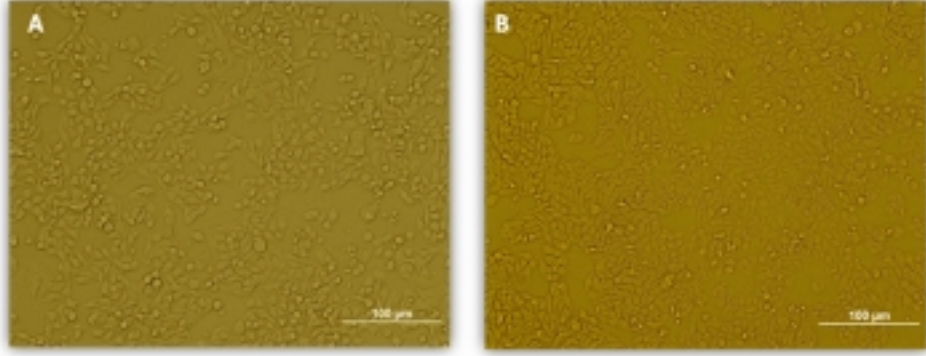
24 saatlik kültürde, farklı TNF α konsantrasyonları (100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml) uygulanan HT-29 kolon hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan optimizasyon çalışması hem canlı

populasyonda hem de total populasyonda yapılmıştır. Bunun nedeni, gözlenebilecek etkinin hücre ölümü ile mi yoksa ekspresyon seviyesinde gerçek azalma olup olmadığını açığa çıkartmak için aynı hücrelerin canlı populasyonuna bakarak da analiz yapılmıştır. Kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml, 1000 U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 101,8, % 99,20, % 78,4 olarak bulunmuştur. En yüksek konsantrasyon olan 1000U/ml uygulaması üçlü olarak tekrar edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Hücreler morfolojik olarak yani büyüklük ve içsel yapılarına göre konumlandırılmıştır. Elde edilen görüntüden canlı populasyon seçilerek kapı alındı. Her deney için en az 10.000 hücre üzerinden inceleme yapıldı. Kontrol ve TNF α uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100 \pm 6,3 ve % 82,2 \pm 7,5 olarak bulunmuştur. Total populasyon seçilerek kapı kapı alındığında; kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100 \pm 11.1 ve % 54,2 \pm 12,6 olarak bulunmuştur ve Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Bu sonuçlara p<0.05 olan değerlerin istatistiksel olarak anlamlılığı düşünüldüğünde, en yüksek sitokin konsantrasyonunda, CAIX ekspresyonunda kontrole göre azalma tespit edilmiştir.

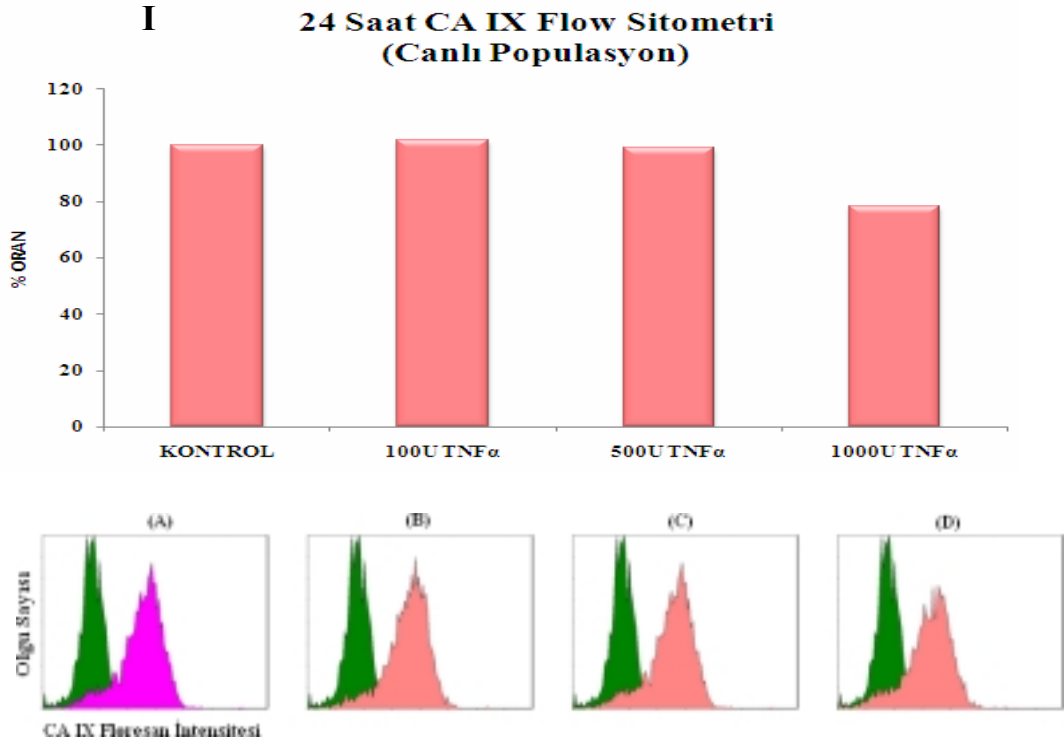
Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak yapılmıştır. 24 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 79,7 \pm 1,41 ve % 88,2 \pm 0,3; Sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 7,4 \pm 1,4 ve % 4,1 \pm 0,1; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 13,2 \pm 0,8 ve % 7,4 \pm 0,7 olarak bulunmuştur. 24 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre TNF α uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Sonuçlar, Şekil 3.6'da gösterilmektedir. Aynı zamanda akış sitometreden elde edilen AnnexinV bulguları, floresan mikroskopta da kontrol amaçlı değerlendirilmiştir. TNF α uygulanmış hücrelerde meydana gelen apoptotik ve nekrotik hücrelerin çekilmiş görüntüleri Şekil 3.7'de örnek olarak gösterilmiştir.

Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 91,1 \pm 1,6 ve % 81,8 \pm 5,2; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %8,5 \pm 1,1 ve 18 \pm 5,1 olarak bulunmuştur. 24 saatlik

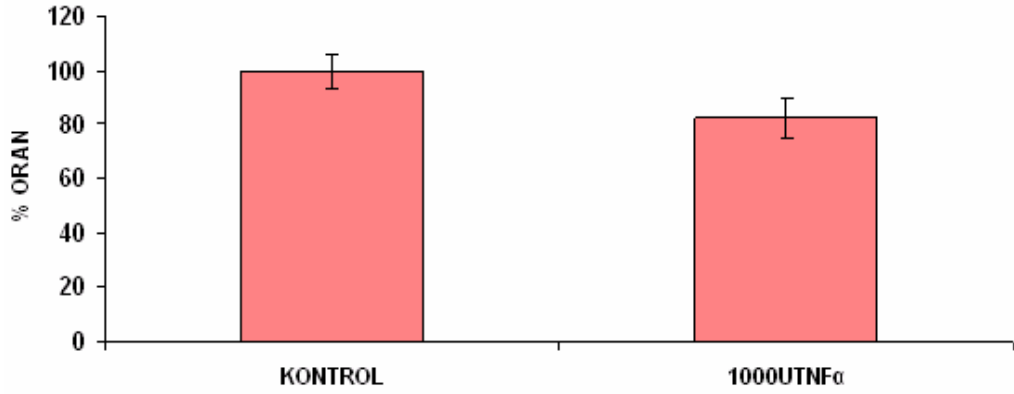
kültürde, kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki *CA9* total RNA ekspresyonunun Gerçek zamanlı PZR ile analizi sonucunda; Şekil 3.8’de gösterildiği gibi 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerde kontrole göre $1,4\pm 0,4$ kat azalış gösterilmiştir.



Şekil 3.3 En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 24 saat sonundaki morfolojik görüntüsü (A:Kontrol, B:1000U).

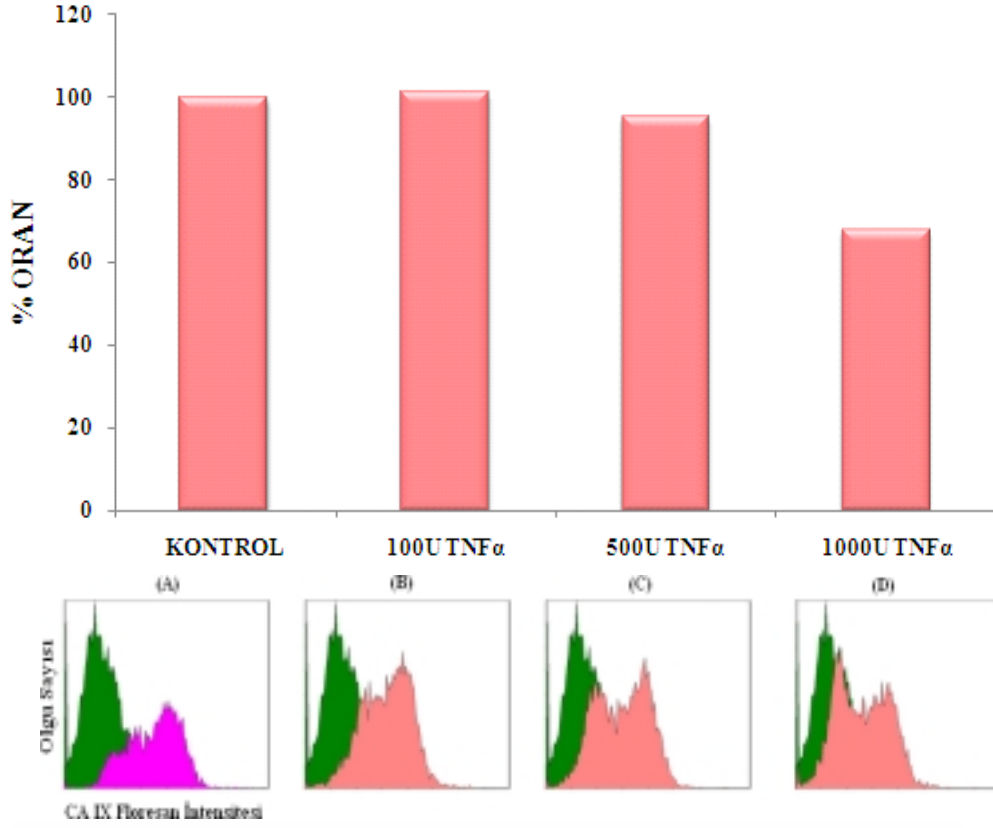


II 24 Saat CAIX Flow Sitometri (Canlı Populasyon)

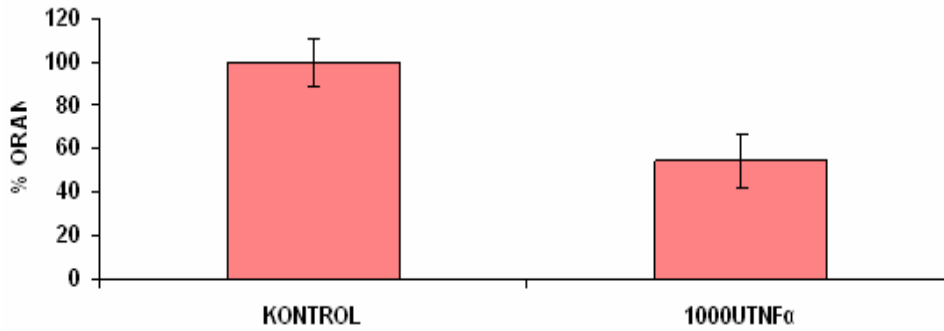


Şekil 3.4 Canlı populasyonda, 24 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Farklı TNF- α konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II**. En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A: Kontrol, B: 1000U). (* p<0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

I 24 Saat CA IX Flow Sitometri (Total Populasyon)

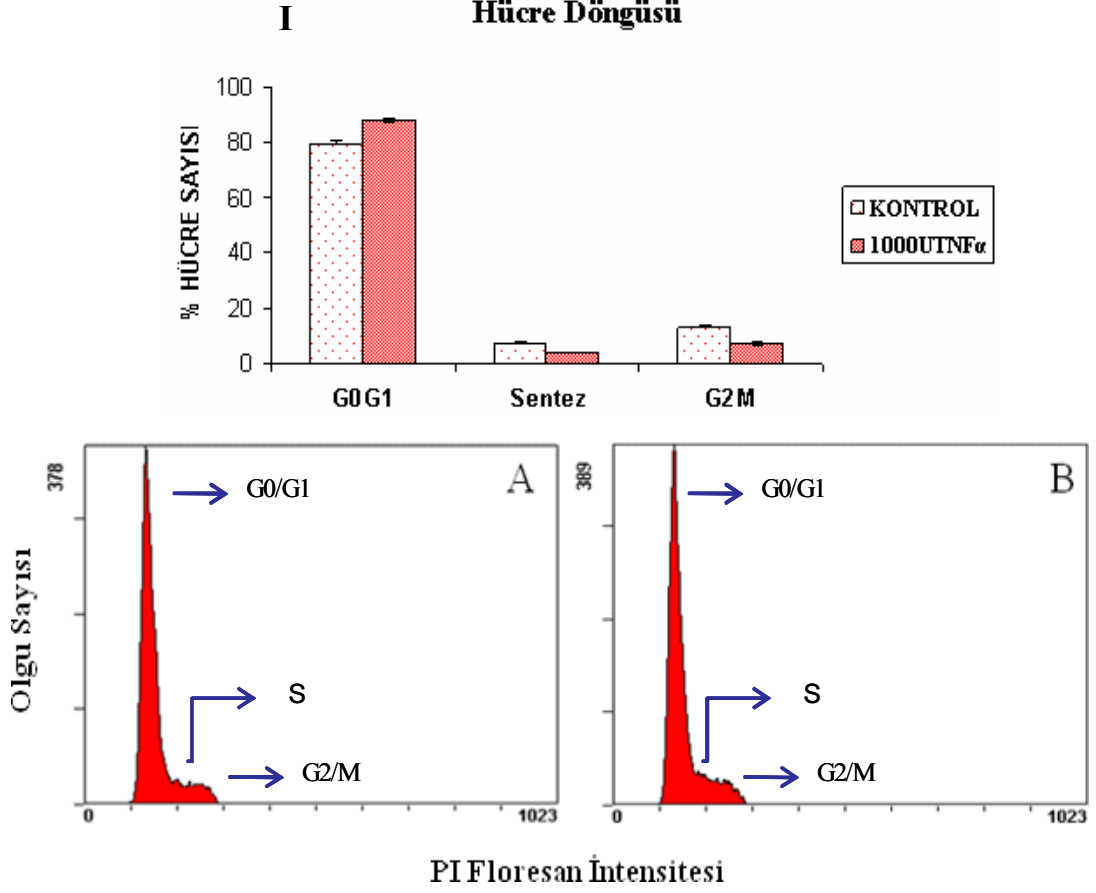


II 24 saat CAIX Flow Sitometri (Total Populasyon)

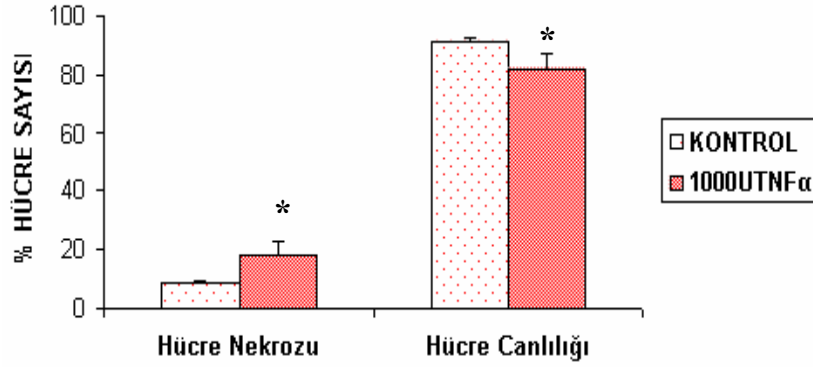


Şekil 3.5 Total populasyonda, 24 saat sonundaki TNFα uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Farklı TNFα konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II**. En yüksek TNFα konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A: Kontrol, B: 1000U). (* p<0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

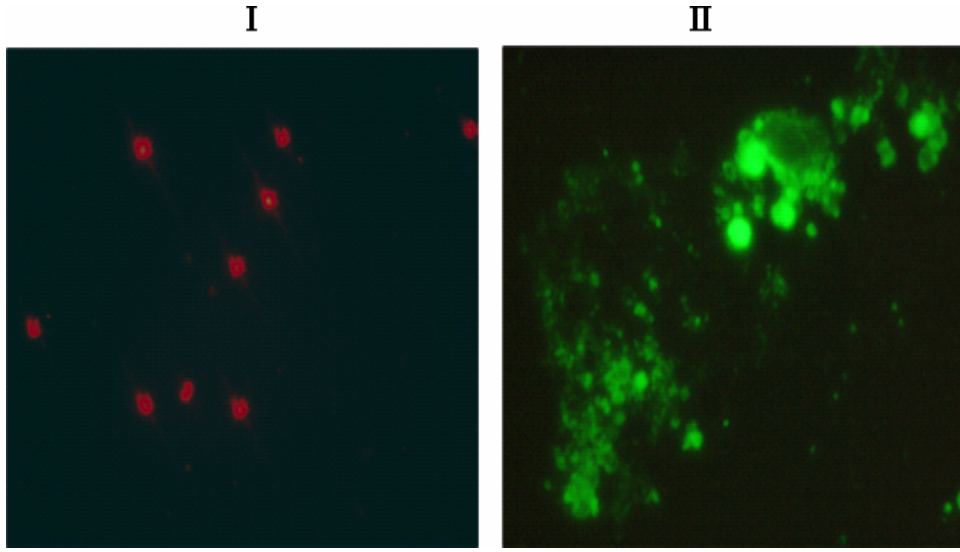
24 Saat Flow Sitometri Hücre Döngüsü



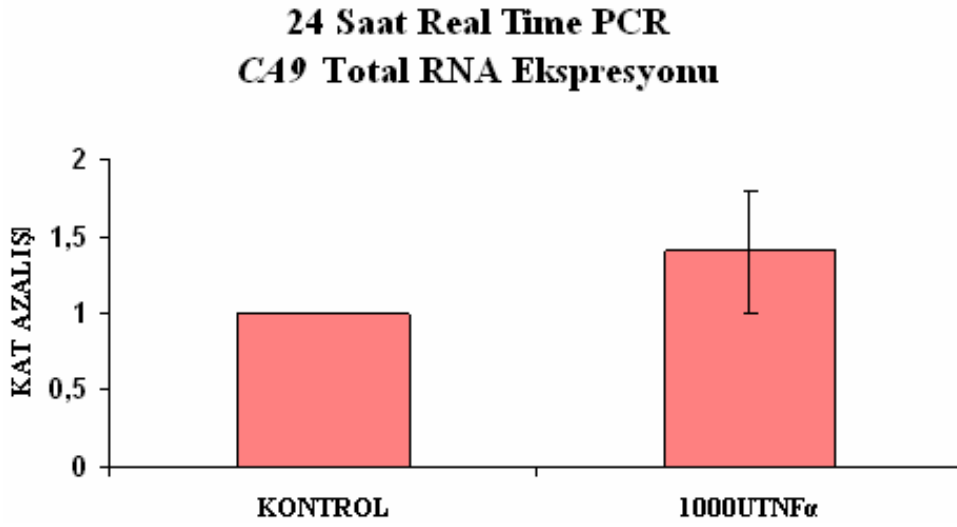
24 Saat Flow Sitometri Hücre Canlılığı ve Hücre Nekrozu



Şekil 3.6 24 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki hücre döngüsü (A:Kontrol, B: 1000U). **II**. En yüksek TNF- α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir. (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)



Şekil 3.7 TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde apoptotik ve nekrotik hücrelerin immün floresan mikroskopta çekilmiş görüntüleri. I. HT-29 hücrelerinde PI ile boyanmış nekrotik hücrelerin görüntüsü II. HT-29 hücrelerinde AnnexinV ile boyanmış apoptotik cisimciklerin görüntüsü.



Şekil 3.8 En yüksek TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CA9 RNA ekspresyonunun kat azalışı (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

3.2.2 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 48 Saat TNF α Uygulaması

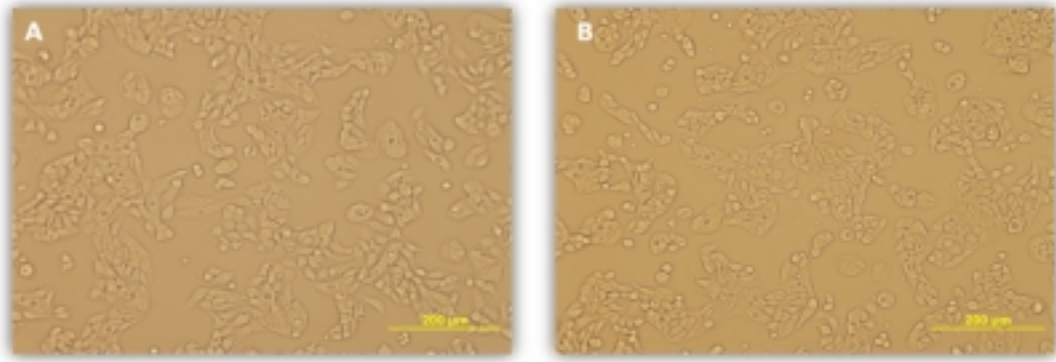
48 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml ünite TNF α 'ya maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve en yüksek konsantrasyon olan 1000U/ml uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.9'da gösterilmiştir.

Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz, TNF α konsantrasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2' de açıklandığı gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli insan CAIX antikoruna kullanılmıştır.

48 saatlik kültürde, farklı TNF α konsantrasyonları (100U/mL, 500U/mL, 1000U/mL) uygulanan HT-29 kolon hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan optimizasyon çalışması hem canlı populasyonda hem de total populasyonda yapılmıştır. Canlı populasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/mL, 500U/mL, 1000U/mL TNF α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 101,9, % 105,9, % 60,0 olarak bulunmuştur. Total populasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 111,7, % 100,4, % 31,5 olarak bulunmuştur. En yüksek konsantrasyon olan 1000U/ml uygulaması üçlü olarak tekrar edilmiştir. Canlı populasyon seçilerek kapı alındığında; kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100 \pm 5,6 ve % 57,2 \pm 12,4 olarak bulunmuştur. Bu analizle ilgili olarak Şekil 3.10'da gösterilen analiz sonuçları, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, sitokin uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonundaki düşüş anlamlı bulunmuştur. Total populasyon seçilerek kapı alındığında; kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100 \pm 2,0 ve % 36,7 \pm 5,2 olarak bulunmuştur. Bu analizle ilgili olarak Şekil 3.11'de gösterilen analiz sonuçları, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, sitokin uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonundaki düşüş kontrole göre anlamlı bulunmuştur.

Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak yapılmıştır ve analiz sonuçları Şekil 3.12'de gösterilmektedir. 48 saatlik kültürde, kontrol ve

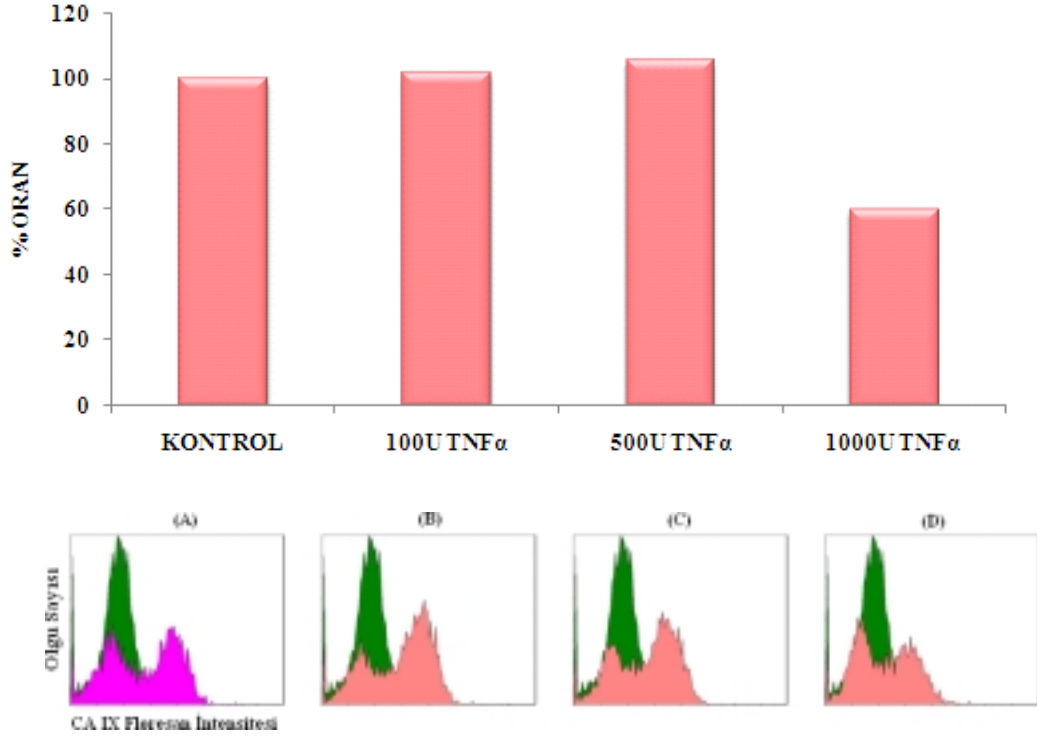
1000U TNF α uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 81,5 \pm 5,0 ve % 85,7 \pm 4,7 Sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 9,0 \pm 3,6 ve % 4,7 \pm 2,9 ; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 9,3 \pm 4,0 ve % 5,4 \pm 1,0 olarak bulunmuştur. 48 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre TNF α uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 90,2 \pm 2,8 ve % 77,7 \pm 3,6 ; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %9,3 \pm 2,5 ve21,9 \pm 3,5 olarak bulunmuştur. 48 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki *CA9* total RNA ekspresyonunun Gerçek zamanlı PZR ile analizi sonucunda; Şekil 3.13'te gösterildiği gibi 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerde kontrole göre 3,5 \pm 0,6 kat azalış bulunmuştur. Bu değerler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde *CA9* RNA düzeyinde en yüksek konsantrasyondaki sitokin uygulamasında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 3.9 En yüksek TNF- α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 48 saat sonundaki morfolojik görüntüsü (A:Kontrol, B:1000U).

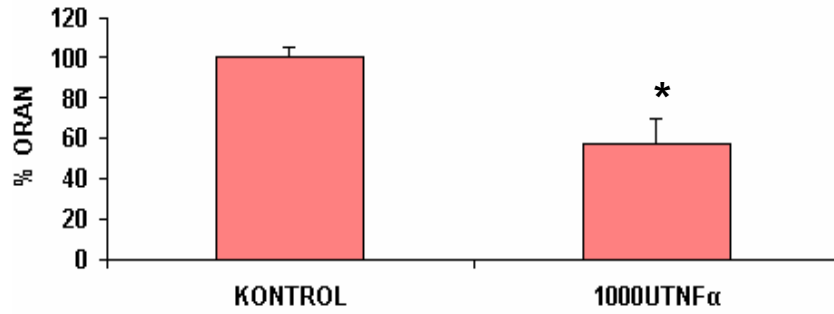
I

48 Saat CA IX Flow Sitometri (Canlı Populasyon)



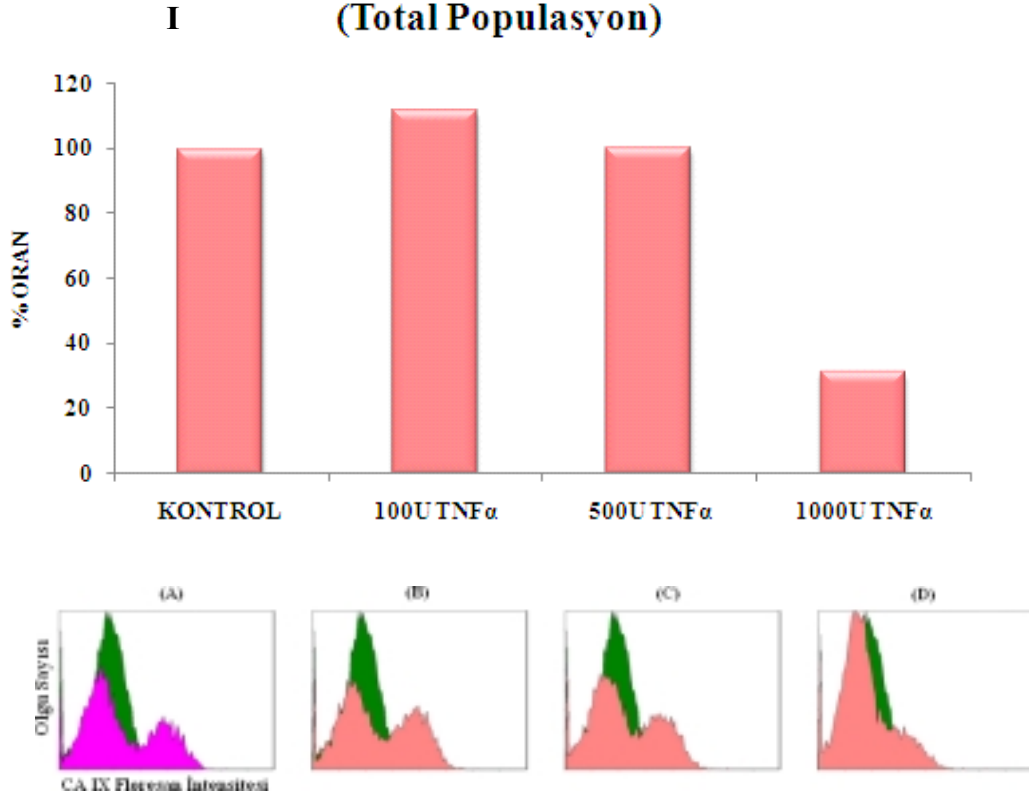
II

48 Saat CAIX Flow Sitometri (Canlı Populasyon)

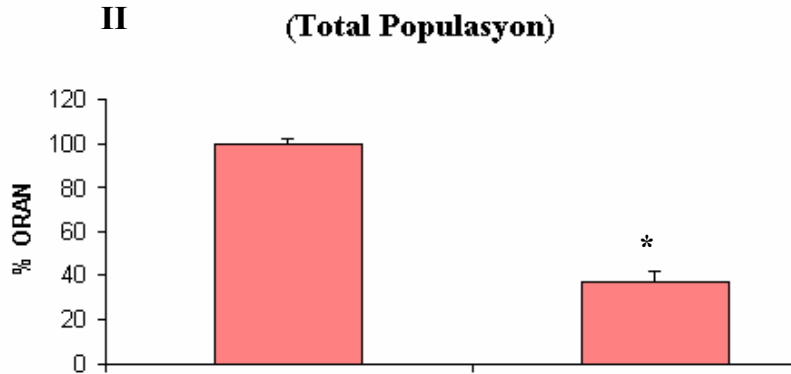


Şekil 3.10 Canlı populasyonda, 48 saat sonundaki TNFα uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi I. Farklı TNF-α konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). II. En yüksek TNFα konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A: Kontrol, B: 1000U). (* p<0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

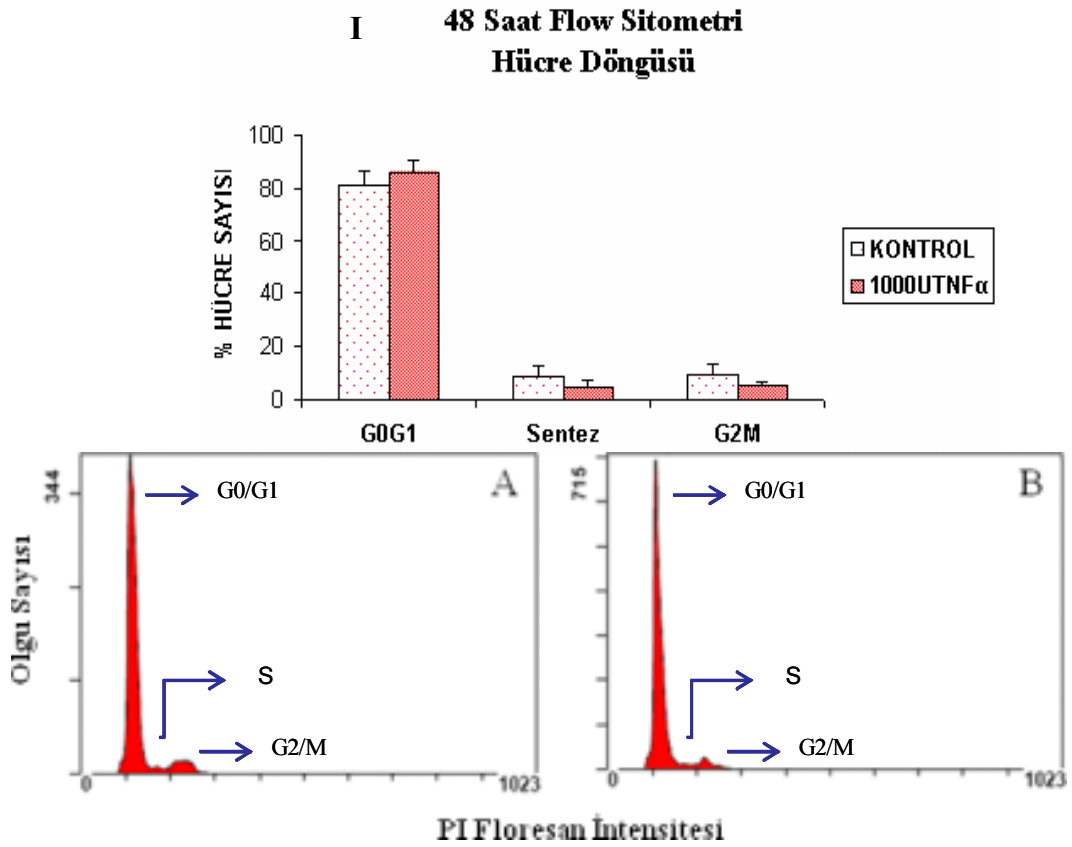
48 Saat CA IX Flow Sitometri (Total Populasyon)



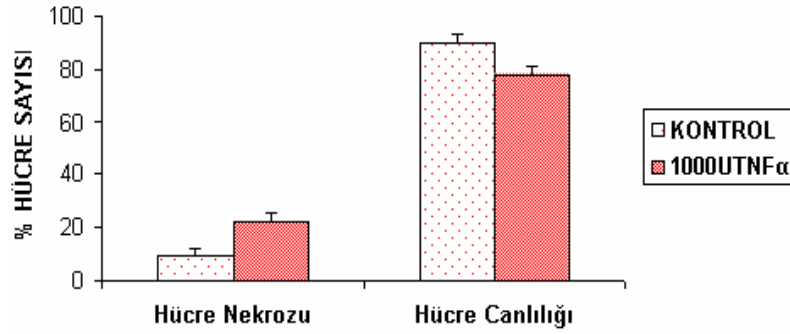
48 Saat CAIX Flow Sitometri (Total Populasyon)



Şekil 3.11 Total populasyonda, 48 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Farklı TNF- α konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II**. En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A: Kontrol, B: 1000U). (* p<0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

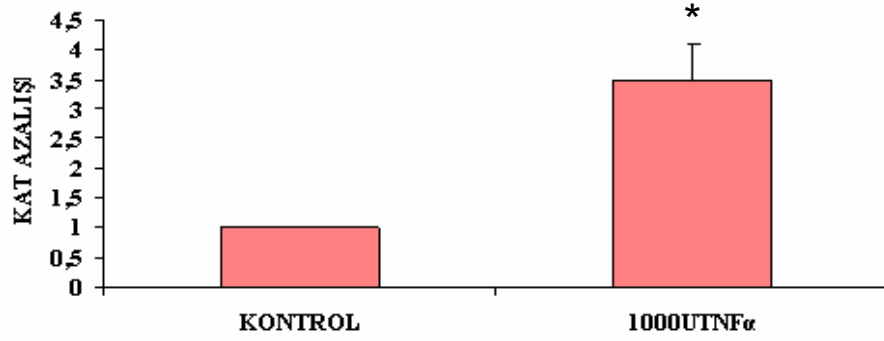


II 48 Saat Flow Sitometri Hücre Canlılığı ve Hücre Nekrozu



Şekil 3.12 48 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki hücre döngüsü (A:Kontrol, B:1000U). **II**. En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir.

48 Saat Real Time PCR CA9 Total RNA Ekspresyonu



Şekil 3.13 En yüksek TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CA9 RNA ekspresyonunun kat azalışı (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

3.2.3 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 72 saat TNF α Uygulaması

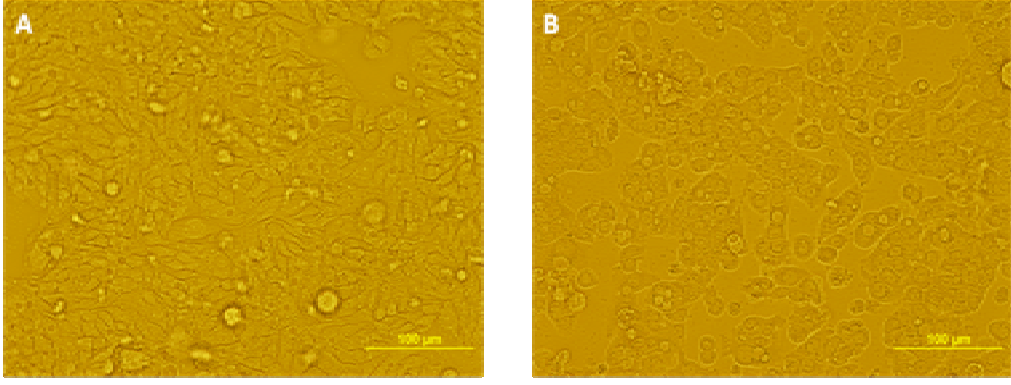
72 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 100, 500 ve 1000 U/ml ünite TNF α 'ya maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve en yüksek konsantrasyon olan 1000 U/ml uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.14'te gösterilmiştir. Morfolojik görüntülerden, en yüksek konsantrasyon olan 1000 U/ml TNF α uygulanmış hücrelerde sayı açısından bir azalma dikkat çekmektedir.

Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz, TNF α konsantrasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2' de açıklandığı gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli insan CAIX antikoru kullanılmıştır.

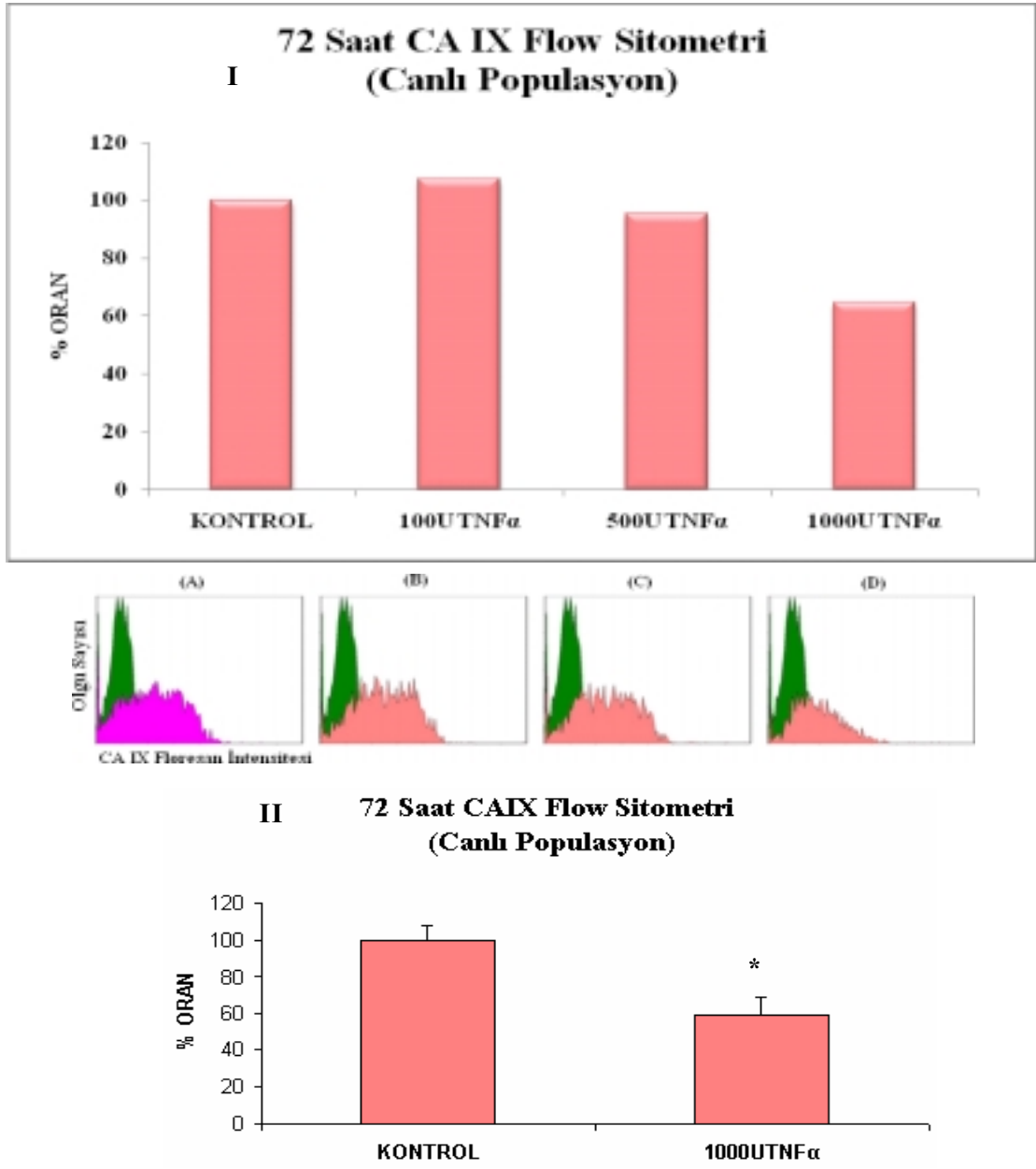
72 saatlik kültürde, farklı TNF α konsantrasyonları (100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml) uygulanan HT-29 kolon hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan optimizasyon çalışması hem canlı populasyonda hem de total populasyonda yapılmıştır. Canlı populasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 107,0, % 95,3, % 64,7 olarak bulunmuştur. Total populasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 100,6, % 100,0, % 24,6 olarak bulunmuştur. Bu

analiz sonuçları, Şekil 3.15'te gösterilmektedir. En yüksek konsantrasyon olan 1000U/ml uygulaması üçlü olarak tekrar edilmiştir. Canlı populasyon seçilerek kapı alındığında; kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100 \pm 7,7 ve % 58,6 \pm 10,2 olarak bulunmuştur. Total populasyon seçilerek kapı alındığında; kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100 \pm 33,9 ve % 22,8 \pm 13,7 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları Şekil 3.16'da gösterilmektedir. Hem canlı hem de total populasyonda yapılan analiz sonuçlarına göre sitokin uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonunda kontrole göre gözlenen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır.

Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak yapılmıştır ve sonuçlar 3.17'de gösterilmiştir. 72 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 79,9 \pm 3,6 ve % 80,3 \pm 1,2 sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 10,6 \pm 0,7 ve % 10,1 \pm 1,1 ; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 9,9 \pm 2,8 ve 9,7 \pm 1,0 olarak bulunmuştur. 72 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre TNF α uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 85,5 \pm 1,3 ve % 79,3 \pm 1,2 ; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %14 \pm 1,3 ve20,3 \pm 1,2 olarak bulunmuştur. 72 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerdeki CA9 total RNA ekspresyonunun gerçek zamanlı PZR ile analizi sonucunda; 1000U/ml TNF α uygulanmış hücrelerde kontrole göre 2,7 \pm 1,4 kat azalış gösterilmiştir. Şekil 3.18'de gösterilen bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır.



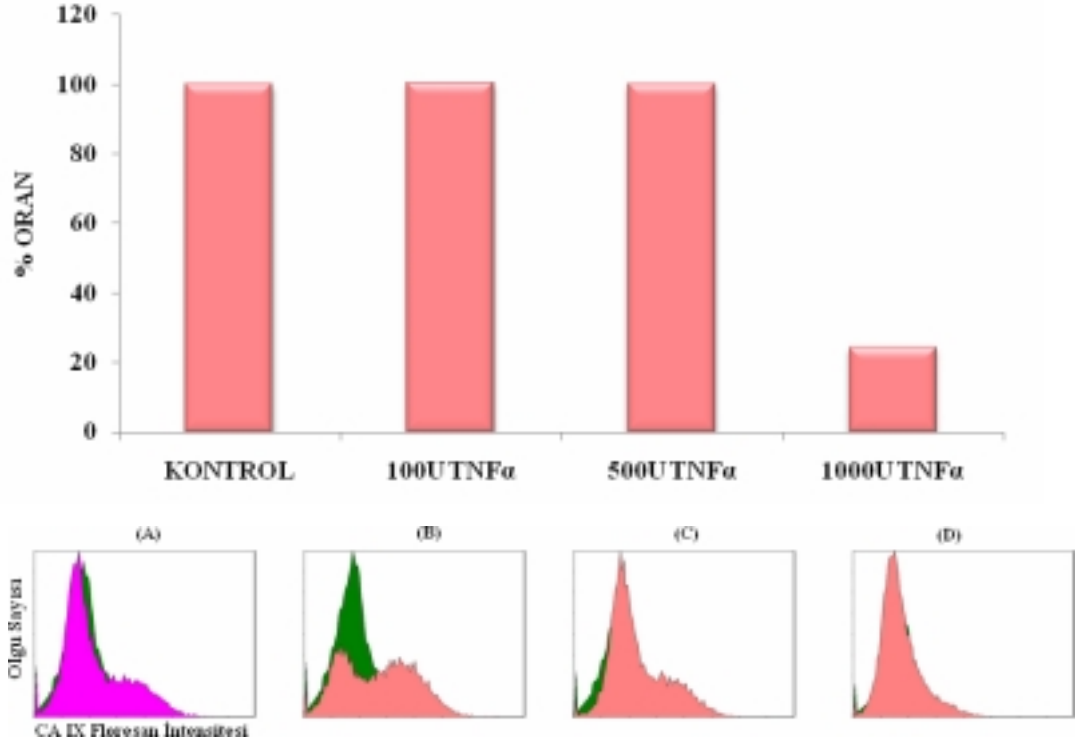
Şekil 3.14 En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 72 saat sonundaki morfolojik görüntüsü (A:Kontrol, B:1000U).



Şekil 3.15 Canlı populasyonda, 72 saat sonundaki TNFα uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Farklı TNFα konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II**. En yüksek TNFα konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A: Kontrol, B: 1000U). (* p<0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

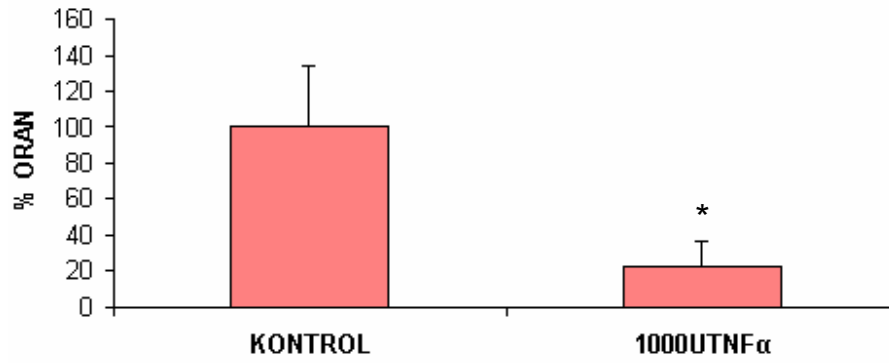
72 Saat CA IX Flow Sitometri (Total Populasyon)

I



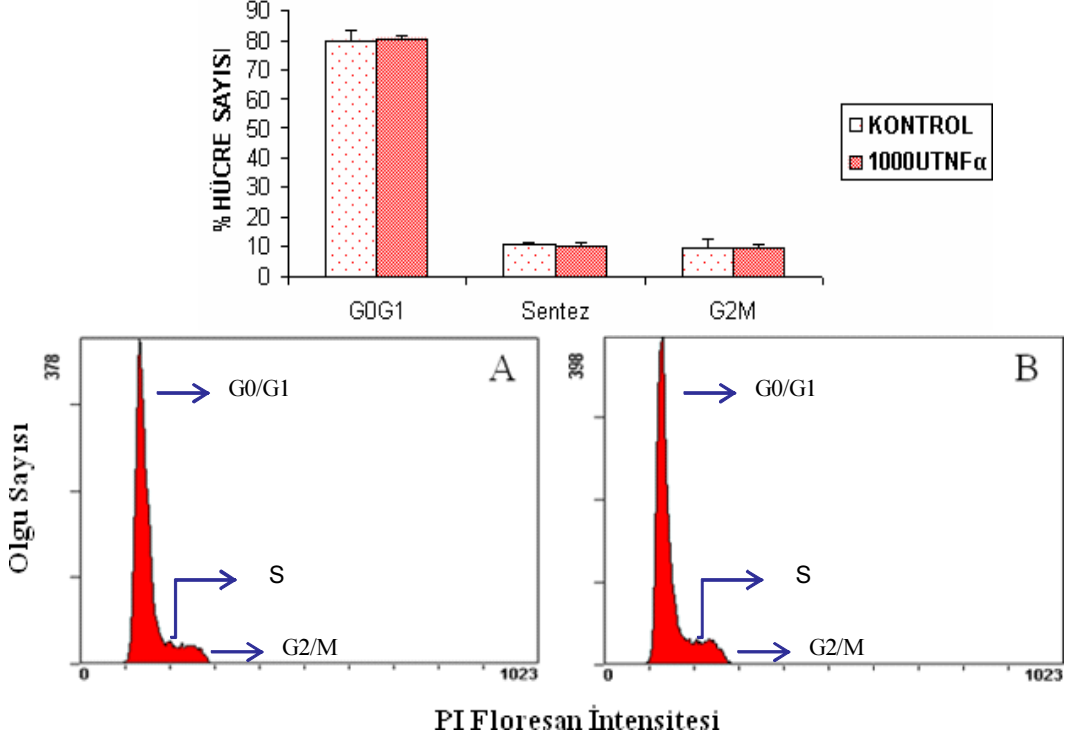
72 Saat Flow Sitometri (Total Populasyon)

II

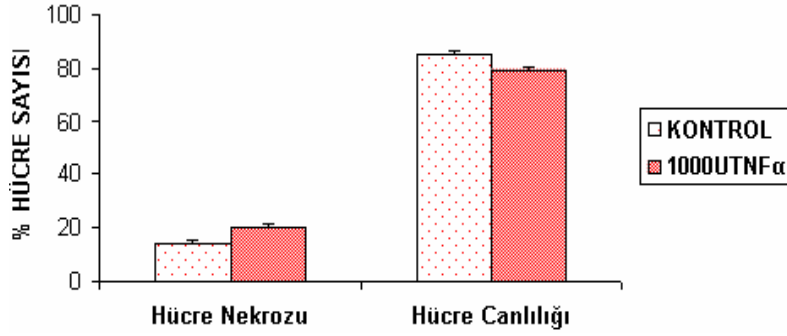


Şekil 3.16 Total populasyonda, 72 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Farklı TNF- α konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II**. En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A: Kontrol, B: 1000U). (* p<0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

I 72 Saat Flow Sitometri Hücre Döngüsü

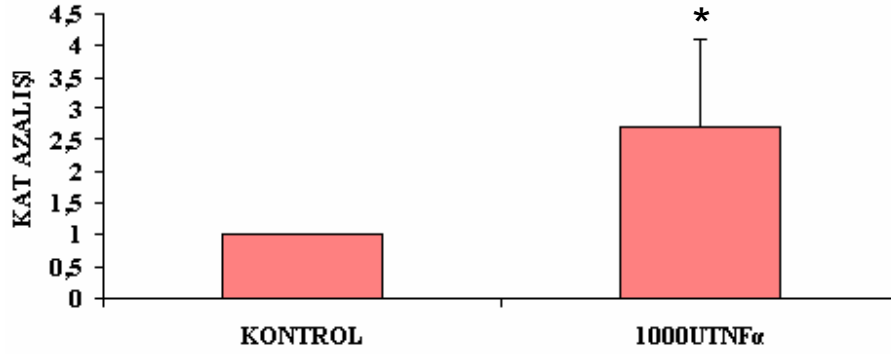


II 72 Saat Flow Sitometri Hücre Canlılığı ve Hücre Nekrozu



Şekil 3.17 72 saat sonundaki TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki hücre döngüsü (A:Kontrol, B: 1000U). **II**. En yüksek TNF α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir.

72 Saat Real Time PCR CA9 Total RNA Ekspresyonu



Şekil 3.18 En yüksek TNF α uygulanmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CA9 RNA ekspresyonunun kat azalışı (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

3.3 TGF β 'nın HT-29 Hücrelerinde CA9 mRNA ve Protein Düzeyindeki Ekspresyon Seviyelerinin ve Hücre Döngüsü, Apoptozis Üzerinde Etkilerinin Belirlenmesi

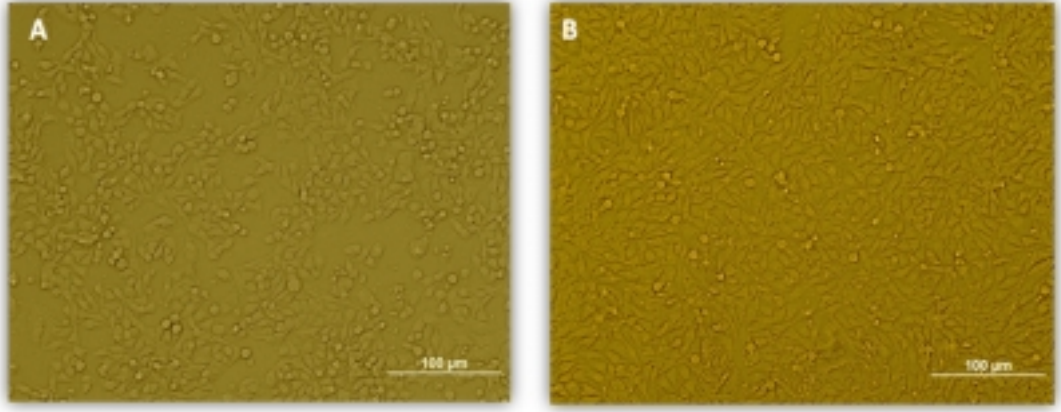
3.3.1 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 24 Saat TGF β Uygulaması

24 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml TGF β 'ya maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 1000U/ml uygulanmış hücrelerin sayısındaki kontrole göre artış Şekil3.19'da gösterilmiştir.

Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz, TGF β konsantrasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2' de açıklandığı gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli insan CAIX antikorunu kullanılmıştır. 24 saatlik kültürde, farklı TGF β konsantrasyonları (100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml) uygulanan HT-29 kolon karsinom hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan optimizasyon çalışması hem canlı popülasyonda hem de total popülasyonda yapılmıştır. Canlı popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml TGF β uygulanmış hücrelerdeki

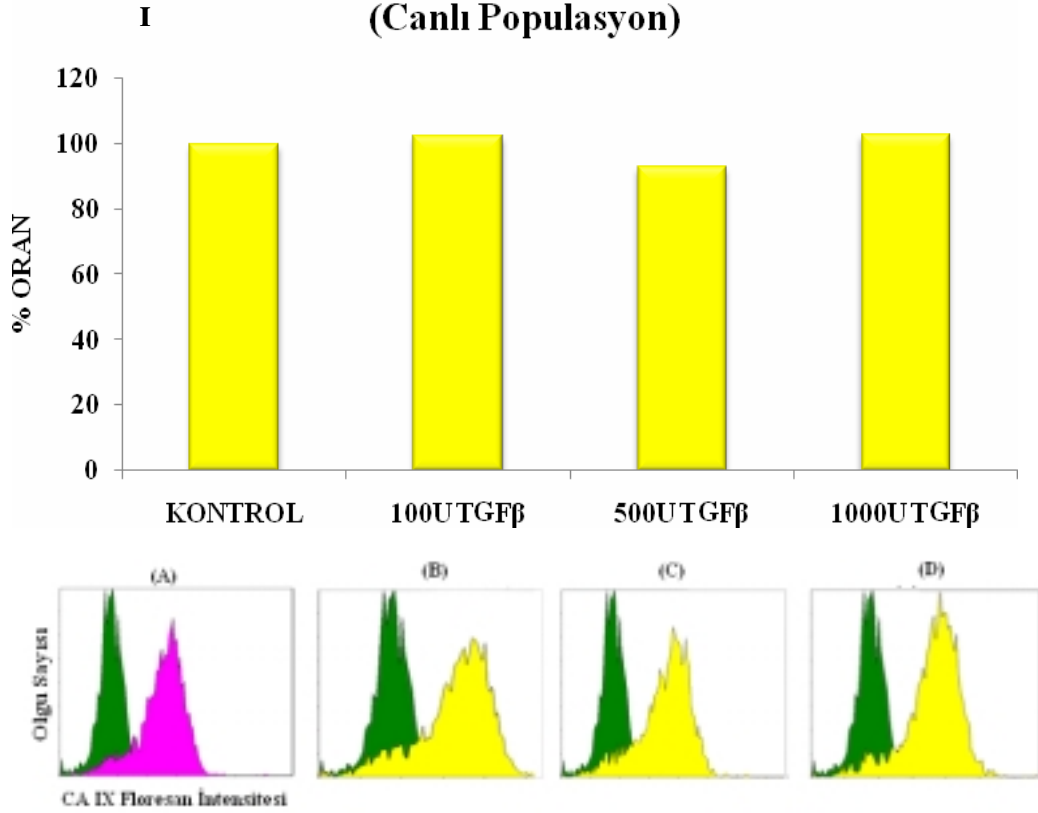
sonuçlar sırasıyla % 102,4, % 94, % 109 olarak bulunmuştur. Total populasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml TGF-β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 92,4, % 88,1, % 118,3 olarak bulunmuştur. En yüksek konsantrasyon olan 1000U/ml uygulaması l olarak tekrar edilmiştir. Canlı populasyon seçilerek kapı alındığında; kontrol ve 1000U TGFβ uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100±11,5 ve % 114,6±5,9 olarak bulunmuştur. Şekil 3.20'de gösterildiği gibi sonuçlarda anlamlı bir fark olmasa da en yüksek konsantrasyonda TGFβ uygulanmış hücrelerde kontrole göre CAIX ekspresyonunda bir artış dikkati çekmektedir. Total populasyon seçilerek kapı alındığında; kontrol ve 1000U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100±15,2 ve % 126,4±13,2 olarak bulunmuştur. Şekil 3.21'de gösterildiği gibi sonuçlarda anlamlı bir fark olmasa da en yüksek konsantrasyonda TGFβ uygulanmış hücrelerde kontrole göre CAIX ekspresyonunda bir artış dikkati çekmektedir.

Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak yapılmıştır. 24 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 75,5±5,0 ve % 76,7±6,6 Sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 9,1±2,0 ve % 9,0±3,4 ; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 15,4±2,7 ve 14,6±4,1 olarak bulunmuştur. 24 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre TGFβ uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 90,8±1,6 ve % 92,4±1,4; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %8,7±1,2 ve 7,3±1,0 olarak bulunmuştur. Hem hücre dengesi hem de AnnexinV analizleri sonuçları Şekil 3.22'de gösterilmektedir. 24 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerdeki CA9 total RNA ekspresyonunun gerçek zamanlı PZR ile analizi sonucunda; 1000U TGFβ uygulanmış hücrelerde kontrole göre 2,4±0,8 kat artış Şekil 3.23'te gösterilmiştir. CA9 RNA düzeyindeki ekspresyonu, en yüksek konsantrasyonda sitokin uygulanmış hücrelerde kontrole göre anlamlı bir artış dikkati çekmektedir.

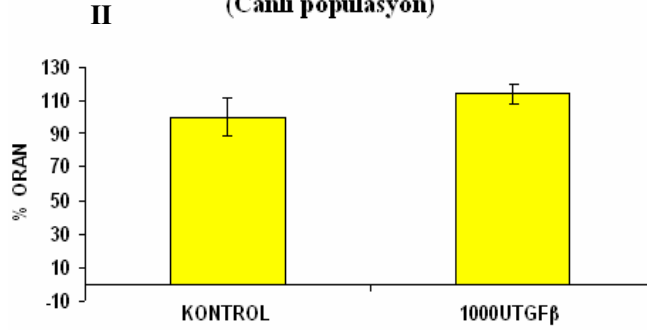


Şekil 3.19 En yüksek TGF β konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 24saat sonundaki morfolojik görüntüsü (A:Kontrol, B:1000U).

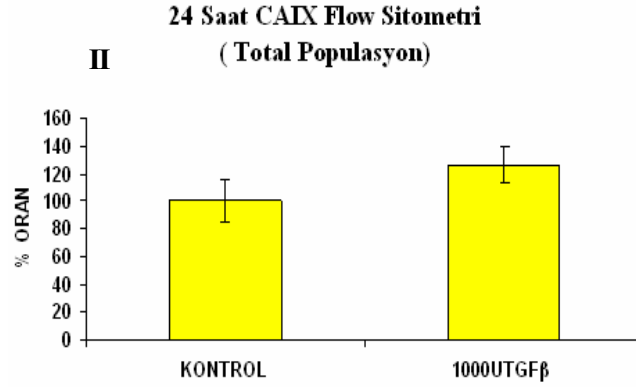
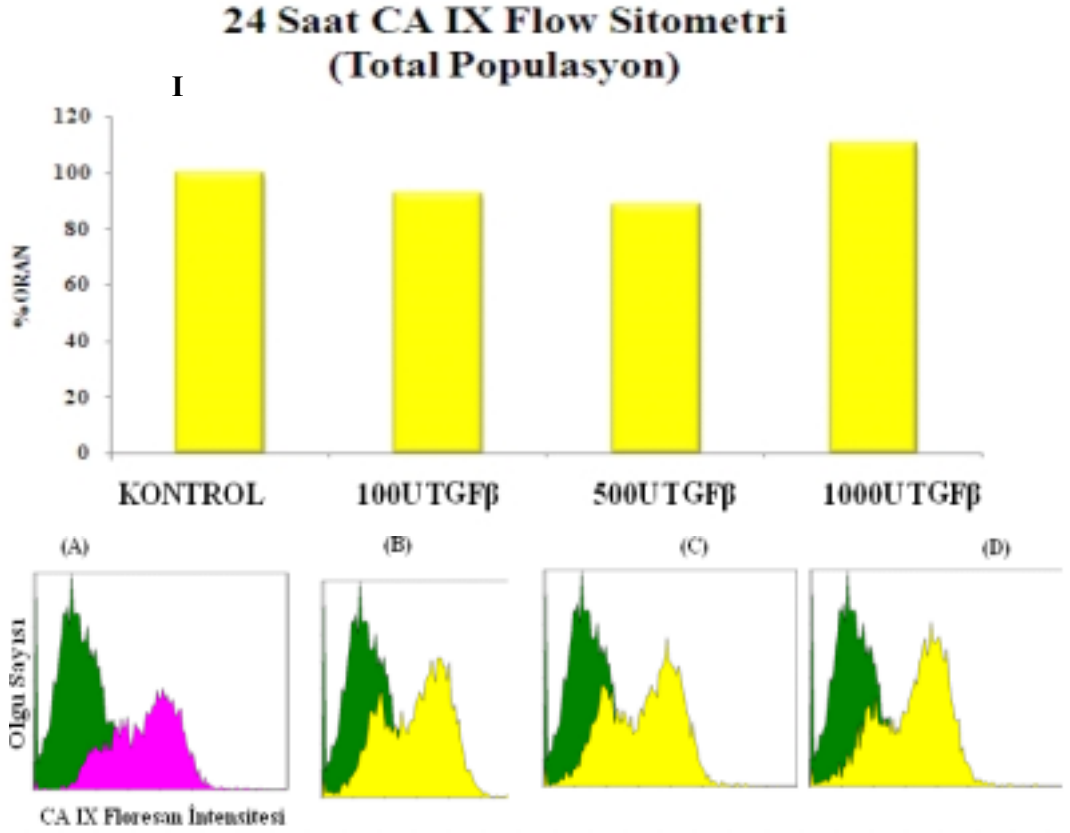
24 Saat CA IX Flow Sitometri (Canlı Populasyon)



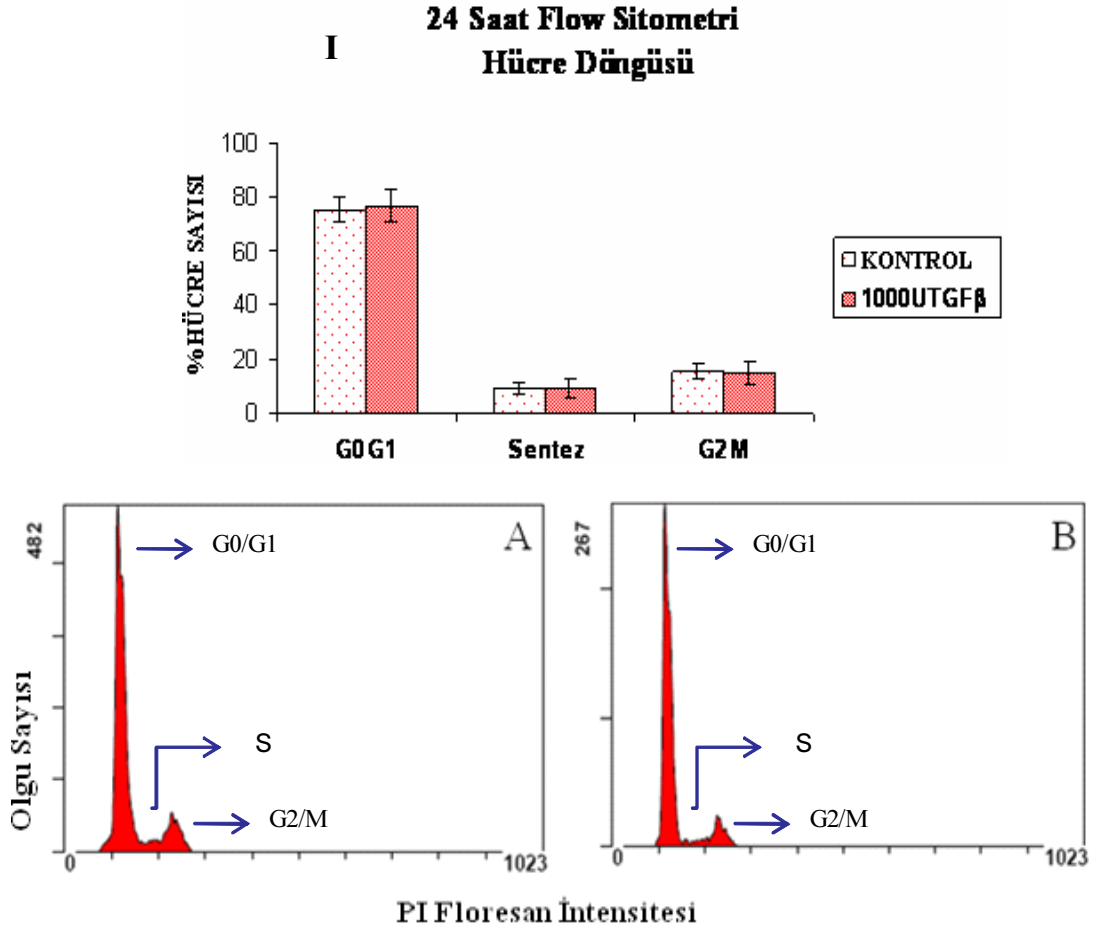
24 Saat CAIX Flow Sitometri (Canlı populasyon)



Şekil 3.20 Canlı populasyonda, 24 saat sonundaki TGFβ uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Farklı TGFβ konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II**. En yüksek TGFβ konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A: Kontrol, B: 1000U).

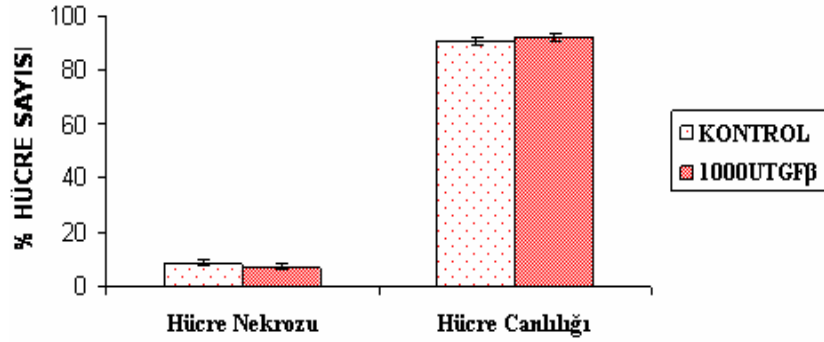


Şekil 3.21 Total populasyonda, 24 saat sonundaki TGF β uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Farklı TGF β konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II**. En yüksek TGF β konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A: Kontrol, B: 1000U).



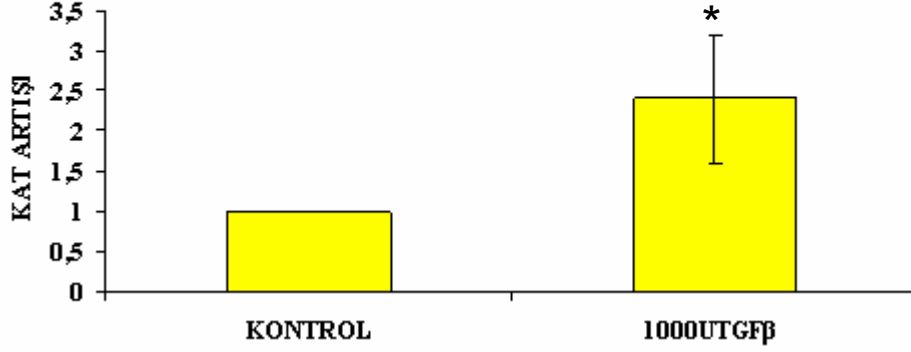
II

**24 Saat Flow Sitometri
Hücre Canlılığı ve Hücre Nekrozu**



Şekil 3.22 24 saat sonundaki TGFβ uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. En yüksek TGFβ konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki hücre döngüsü (A:Kontrol, B: 1000U). **II**. En yüksek TGFβ konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir.

24 Saat Real Time PCR CA9 Total RNA Ekspresyonu



Şekil 3.23 En yüksek TGFβ konsantrasyonu uygulanmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CA9 RNA ekspresyonunun kat artışı (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

3.3.2 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 48 Saat TGFβ Uygulaması

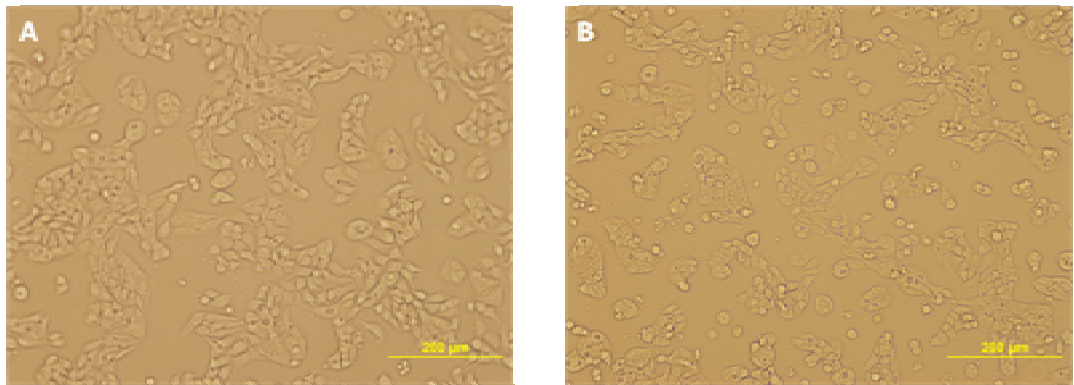
48 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml TGFβ'ya maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve en yüksek konsantrasyon olan 1000 U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.24'te gösterilmiştir.

Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz, TGFβ konsantrasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2'de belirtildiği gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli CAIX antikorunu kullanılmıştır.

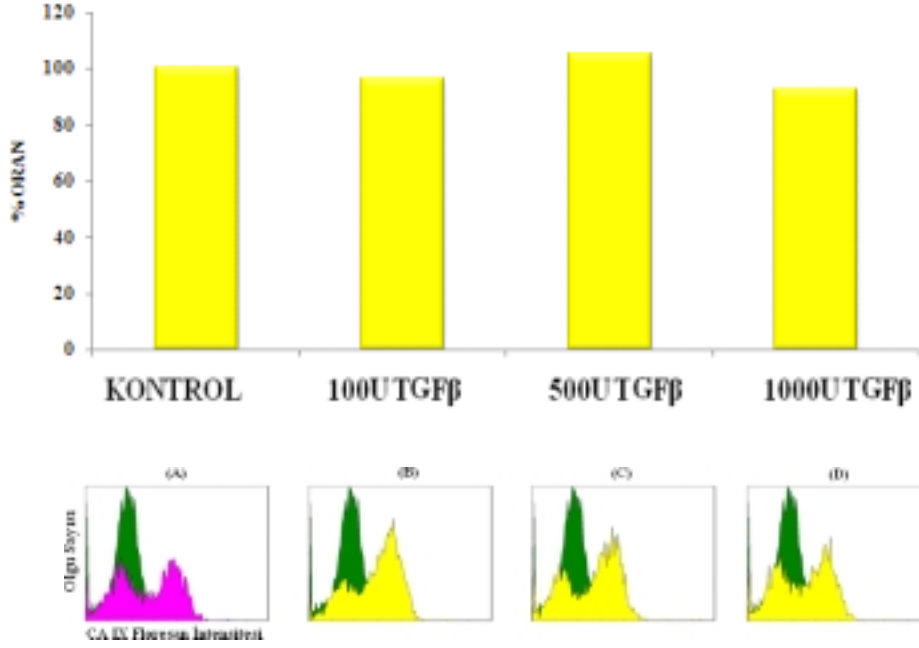
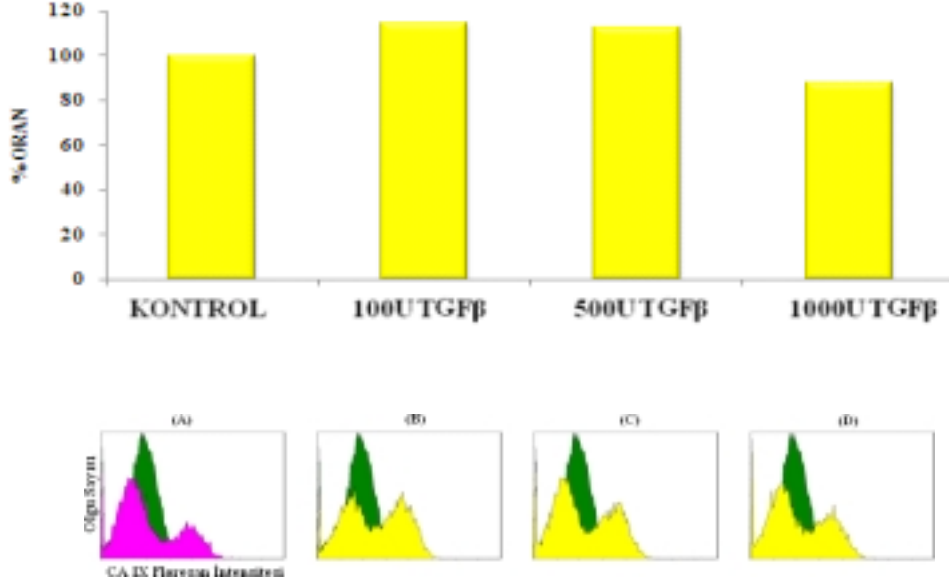
48 saatlik kültürde, farklı TGFβ konsantrasyonları (100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml) uygulanan HT-29 kolon karsinom hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan optimizasyon çalışması hem canlı popülasyonda hem de total popülasyonda yapılmıştır ve sonuçlar Şekil 3.25'te gösterilmektedir. Canlı popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 98,0, % 105,9, % 95,0 olarak bulunmuştur. Total popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml,

1000U/ml TGF β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 110,3, %106,8, %96,5 olarak bulunmuştur. Canlı populasyon seçilerek kapı alındığında; kontrol ve 1000U/ml TGF β uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100 \pm 2,7 ve % 98,0 \pm 3,8 olarak bulunmuştur. Total populasyon seçilerek kapı alındığında; kontrol ve 1000U/ml TGF β uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100 \pm 15,1 ve % 89,0 \pm 16,0 olarak bulunmuştur.

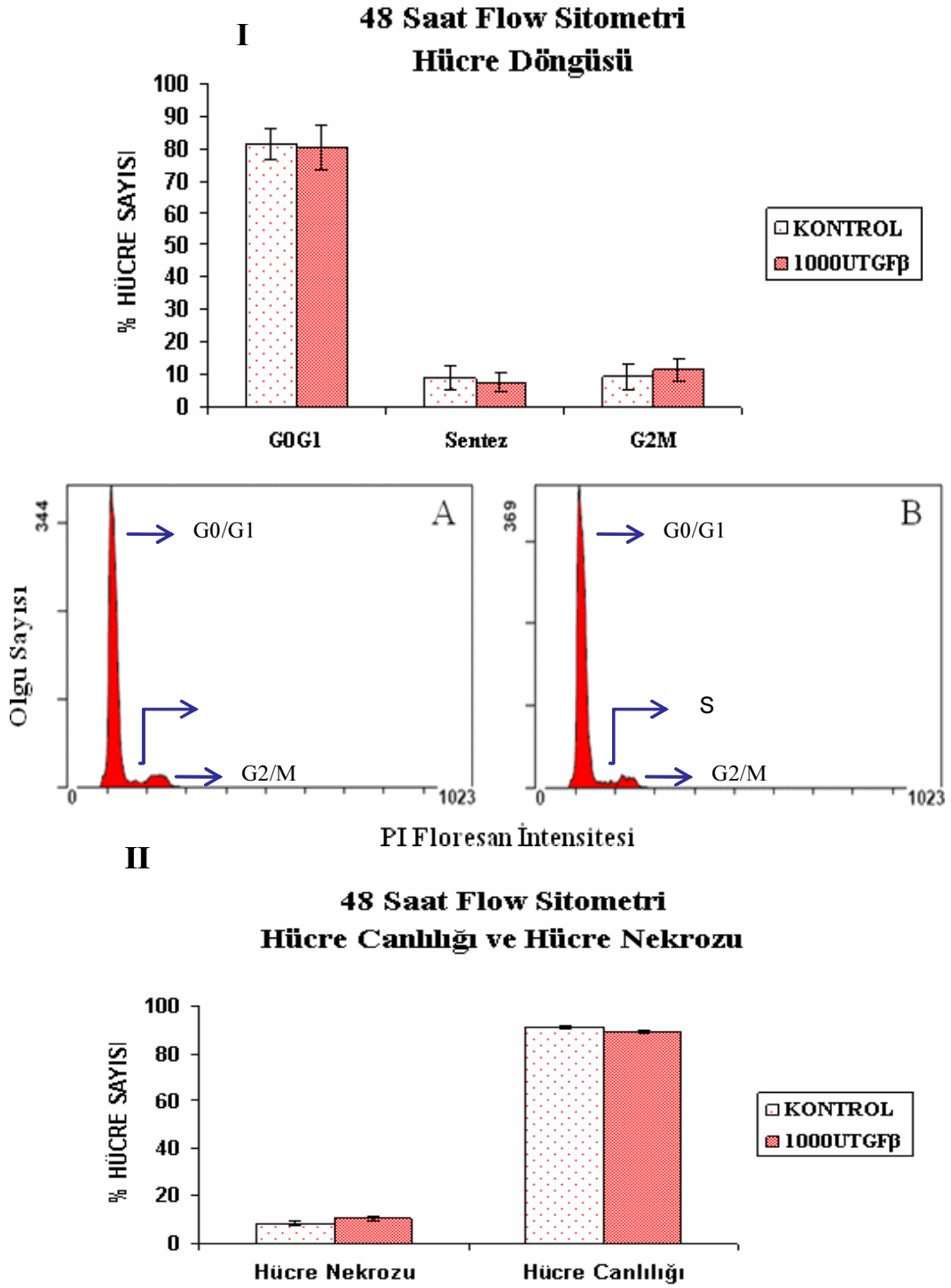
Aynı hücrelerde akış sitometrik olarak yapılan hücre döngüsü analizi sonuçları, Şekil 3.26'da gösterilmektedir. 48 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml TGF β uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 81,5 \pm 5,0 ve % 80,4 \pm 7,0 ; sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 9,0 \pm 3,6 ve % 7,6 \pm 2,9 ; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 9,4 \pm 4,0 ve % 11,4 \pm 3,3 olarak bulunmuştur. 48 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre TGF β uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U/ml TGF β uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 91,2 \pm 1,0 ve % 89,5 \pm 0,6 ; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %8,4 \pm 1,0 ve 10,5 \pm 0,6 olarak bulunmuştur ve sonuçlar Şekil 3.26'da gösterilmiştir.



Şekil 3.24 En yüksek TGF β konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 48 saat sonundaki morfolojik görüntüsü (A:Kontrol, B:1000U).

I**48 Saat CA IX Flow Sitometri
(Canlı Populasyon)****II****48 Saat CA IX Flow Sitometri
(Total Populasyon)**

Şekil 3.25 48 saat sonundaki TGFβ uygulanmış HT-29 hücrelerinde CA IX'un akış sitometrik analizi **I.** Canlı populasyonda, farklı TGFβ konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CA IX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II.** Total populasyonda, farklı TGFβ konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CA IX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U)



Şekil 3.26 48 saat sonundaki TGFβ uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. En yüksek TGFβ konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki hücre döngüsü (A:Kontrol, B: 1000U). **II**. En yüksek TGFβ konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir.

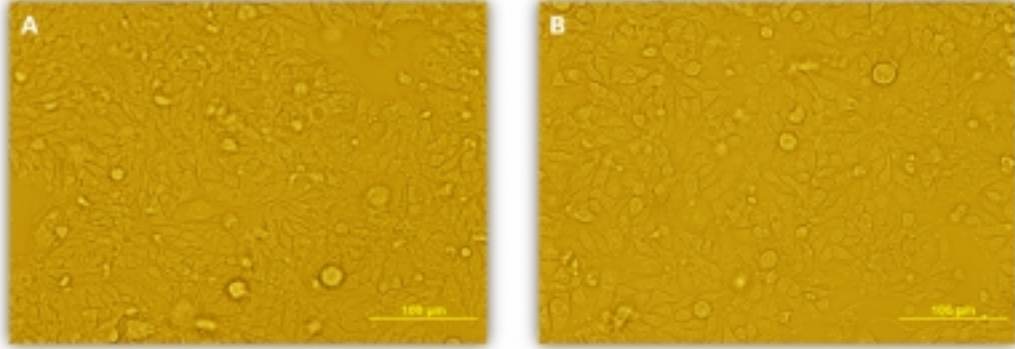
3.3.3 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 72 Saat TGFβ Uygulaması

72 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml TGFβ'ya maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve en yüksek konsantrasyon olan 1000 U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.27'de gösterilmiştir.

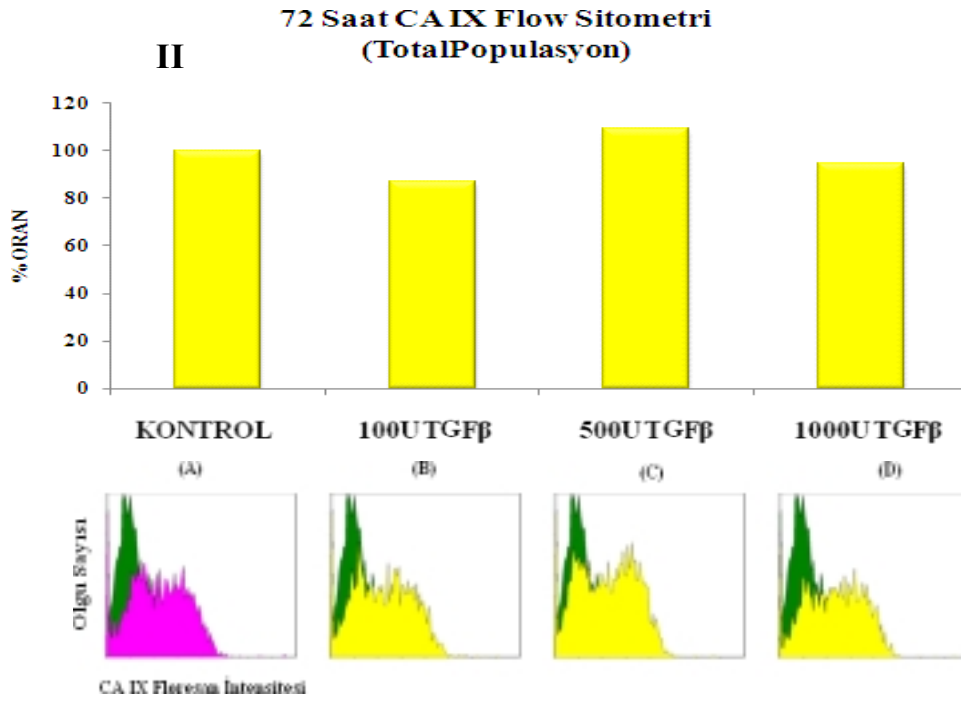
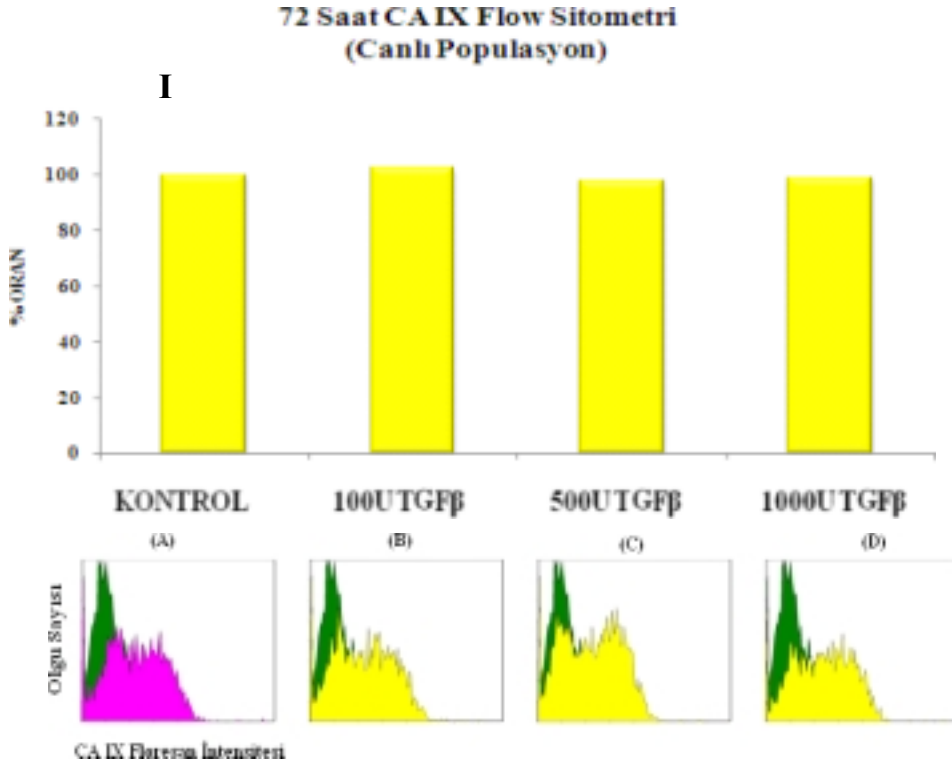
Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz, TGFβ konsantrasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2'de belirtildiği gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli CAIX antikoru kullanılmıştır. 72 saatlik kültürde, farklı TGFβ konsantrasyonları (100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml) uygulanan HT-29 kolon karsinom hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan optimizasyon çalışması hem canlı popülasyonda hem de total popülasyonda yapılmıştır. Canlı popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 102,4, % 90,7, % 98,7 olarak bulunmuştur. Total popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 89, % 104,2, % 90,2 olarak bulunmuştur. Canlı popülasyon seçilerek kapı alındığında; kontrol ve 1000U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100±2,8 ve % 91,0±5,9 olarak bulunmuştur. Total popülasyon seçilerek kapı alındığında; kontrol ve 1000U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu, göreceli olarak % 100±5,4 ve % 94,5±9,0 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları, Şekil 3.28'de gösterildiği gibi Kontrol ve sitokin uygulanmış hücrelerdeki CAIX ekspresyonu açısından bir fark gözlenmemiştir.

Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak hücre döngüsü analizi sonuçları Şekil 3.29'da gösterilmiştir. 72 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml TGFβ uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 81,1±5,8 ve % 81,8±1,8 Sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 8,9±1,6 ve % 9,1±0,8 ; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 9,4±3,6 ve 8,8±0,4 olarak bulunmuştur. 72 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre TGFβ uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki

apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U/ml TGF β uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 86,2 \pm 1,2 ve % 87,3 \pm 3,5 ; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %13,1 \pm 1,0 ve 11,9 \pm 3,8 olarak bulunmuştur. Bu deneyden elde edilen sonuçlar Şekil 3.29'da gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre, hem hücre döngüsü analizinden hemde AnnexinV analizinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde sitokin uygulanmış hücreler ile kontrol grubu arasında bir fark izlenmemiştir.



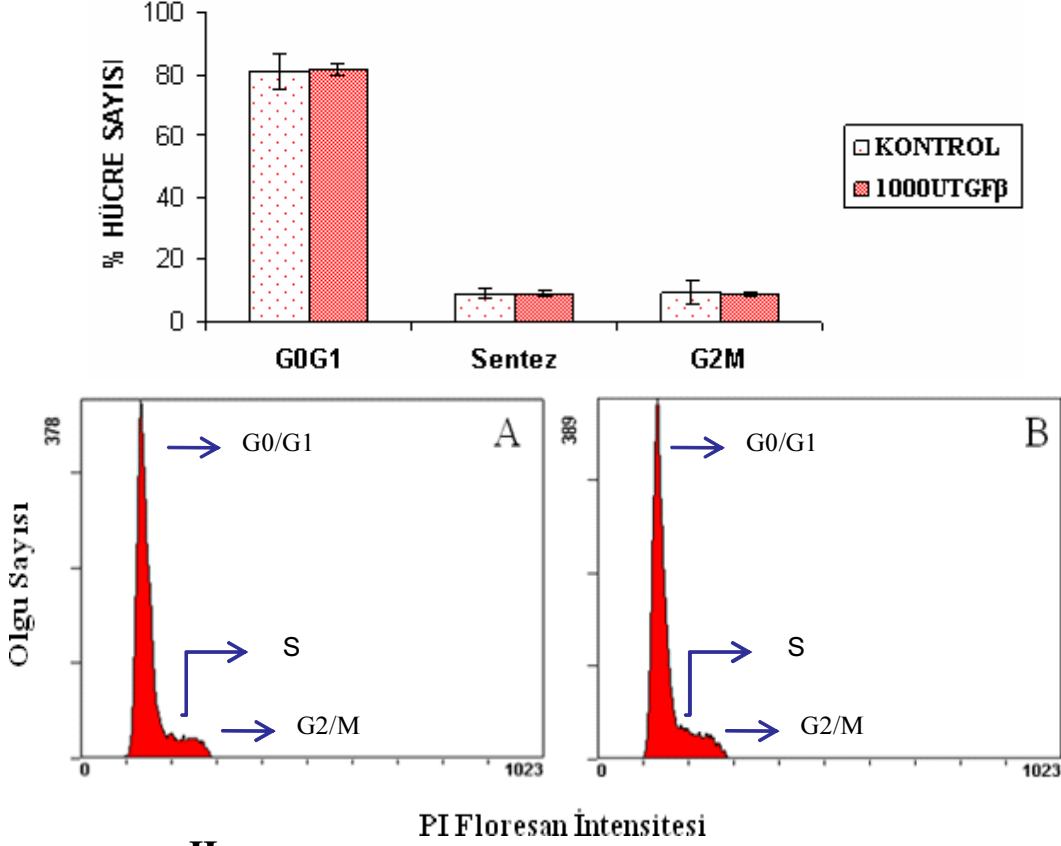
Şekil 3.27 En yüksek TGF- β konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 72 saat sonundaki morfolojik görüntüsü (A:Kontrol, B:1000U).



Şekil 3.28 72 saat sonundaki TGFβ uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I.** Canlı populasyonda, farklı TGFβ konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II.** Total populasyonda, farklı TGFβ konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U)

72 Saat Flow Sitometri

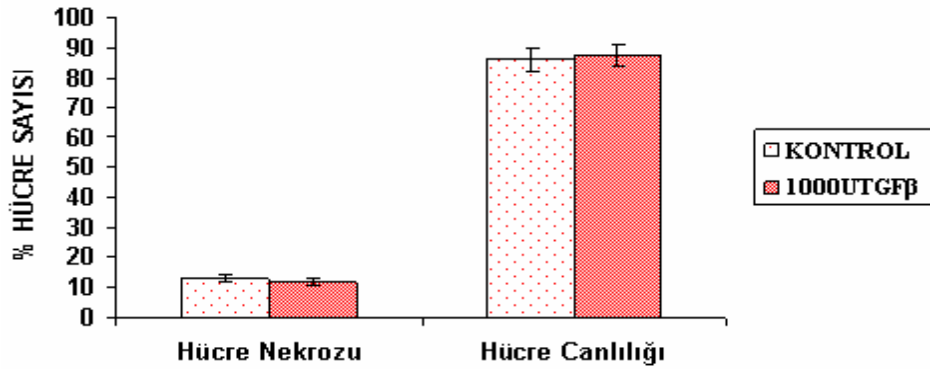
I HÜCRE DÖNGÜSÜ



II

72 Saat Flow Sitometri

HÜCRE CANLILIĞI VE HÜCRE NEKROZU



Şekil 3.29 72 saat sonundaki TGFβ uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. En yüksek TGFβ konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki hücre döngüsü (A:Kontrol, B: 1000U). **II**. En yüksek TGFβ konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir.

3.4 IL1 α 'nın HT-29 Hücrelerinde CAIX Protein Düzeyindeki Ekspresyon Seviyesinin ve Hücre Döngüsü, Apoptozis Üzerinde Etkilerinin Belirlenmesi

3.4.1 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 24 Saat IL1 α Uygulaması

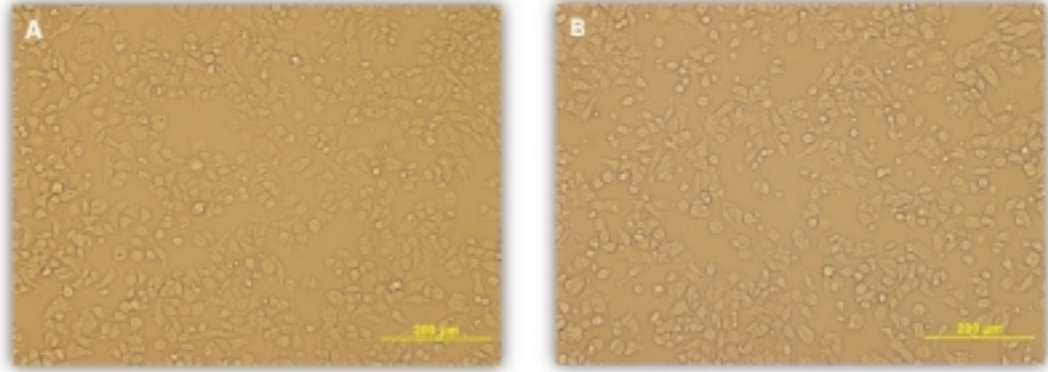
24 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 100, 500 ve 1000 U/ml IL1 α 'ya maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve en yüksek konsantrasyon olan 1000 U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.30'da gösterilmiştir.

Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz, IL1 α konsantrasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2'de belirtildiği gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli CAIX antikoru kullanılmıştır.

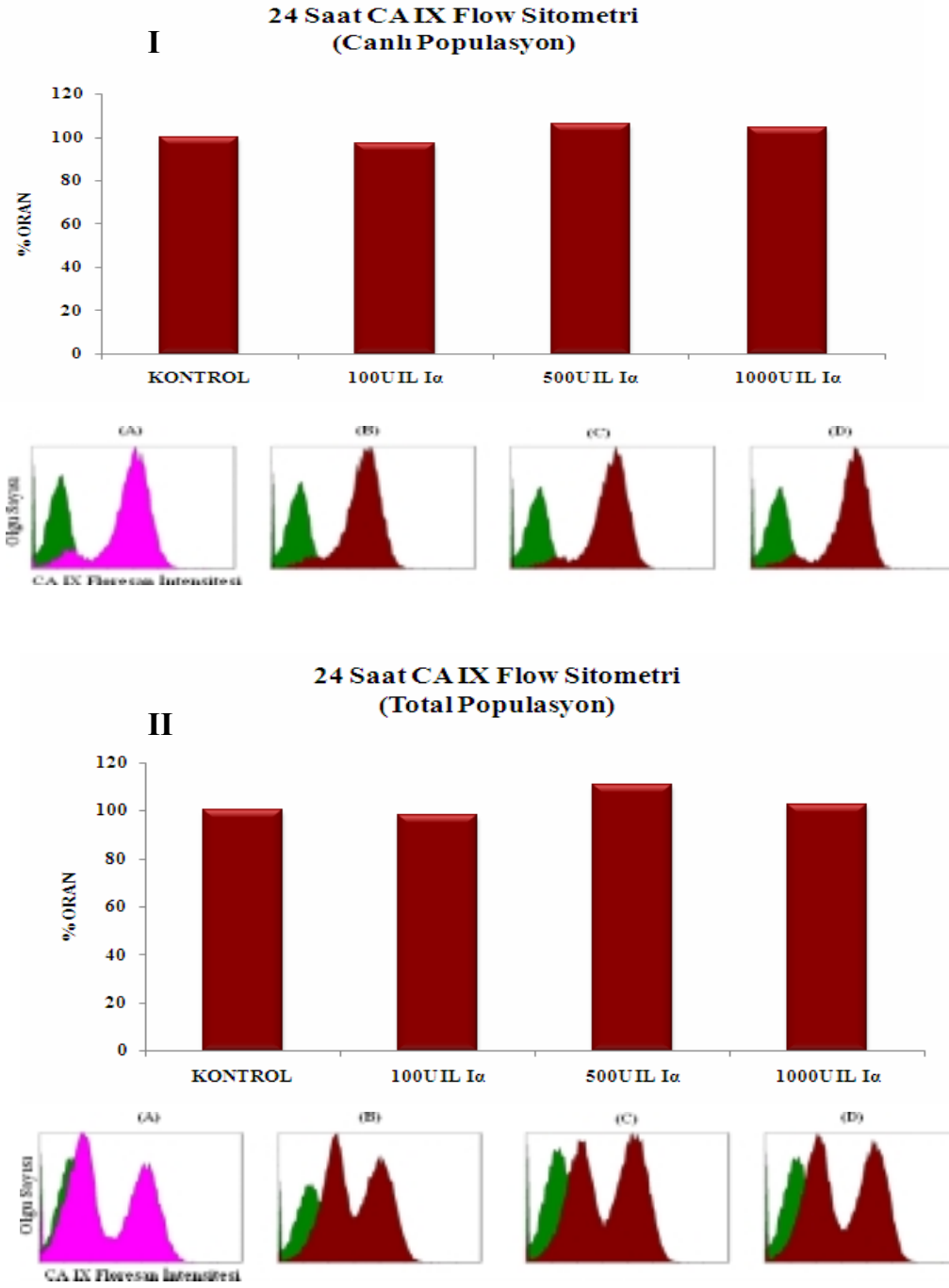
24 saatlik kültürde, farklı IL1 α konsantrasyonları (100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml) uygulanan HT-29 kolon karsinom hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan optimizasyon çalışması hem canlı popülasyonda hem de total popülasyonda yapılmıştır. Canlı popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 97,0, % 106,3, % 104,2 olarak bulunmuştur. Total popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 104,2, % 102,1, % 100,2 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları, Şekil 3.31'de gösterilmektedir.

Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak yapılmıştır. 24 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 80,7 ve % 83,3 Sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 7,3 ve % 6,2; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 12,6 ve 10,8 olarak bulunmuştur. 24 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre IL1 α uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki

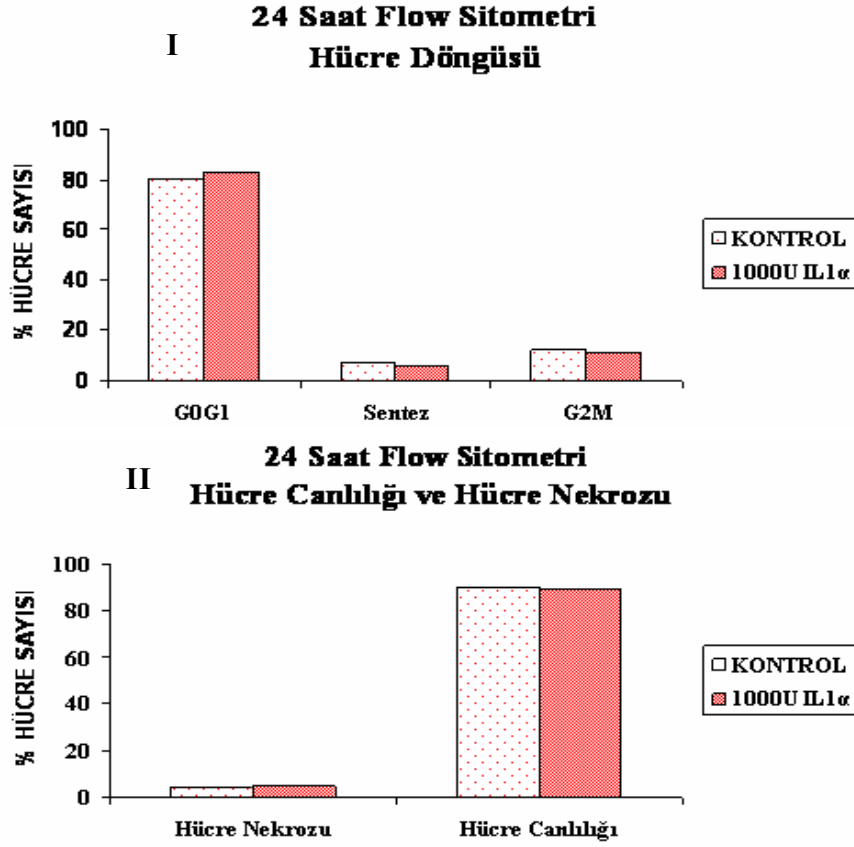
apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 90,2 ve % 89,7 ; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %4,0 ve 4,6 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları, Şekil 3.32’de gösterilmektedir.



Şekil 3.30 En yüksek IL-1 α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 24 saat sonundaki morfolojik görüntüsü (A:Kontrol, B: 1000U).



Şekil 3.31 24 saat sonundaki IL-Iα uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Canlı populasyonda, farklı IL-Iα konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II**. Total populasyonda, farklı IL-Iα konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U)



Şekil 3.32 24 saat sonundaki IL1α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. En yüksek IL1α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki hücre döngüsü (A:Kontrol, B: 1000U). **II**. En yüksek IL1α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir.

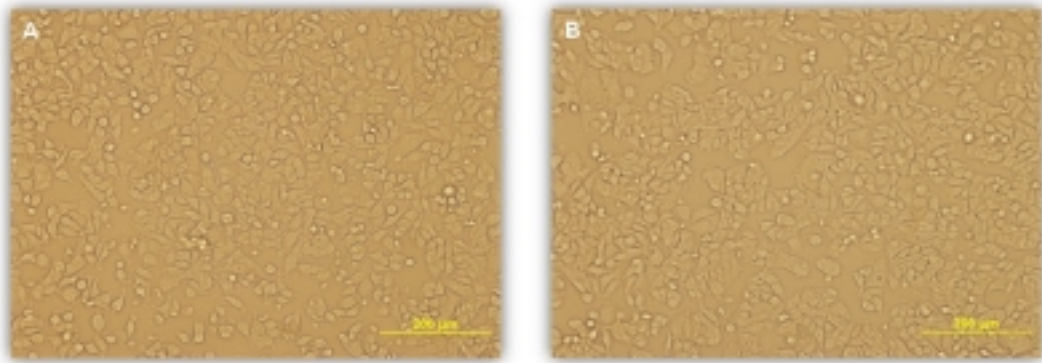
3.4.2 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 48 Saat IL1α Uygulaması

48 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 100, 500 ve 1000 U/ml IL1α'ya maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve en yüksek konsantrasyon olan 1000 U/ml IL1α uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.33'da gösterilmiştir.

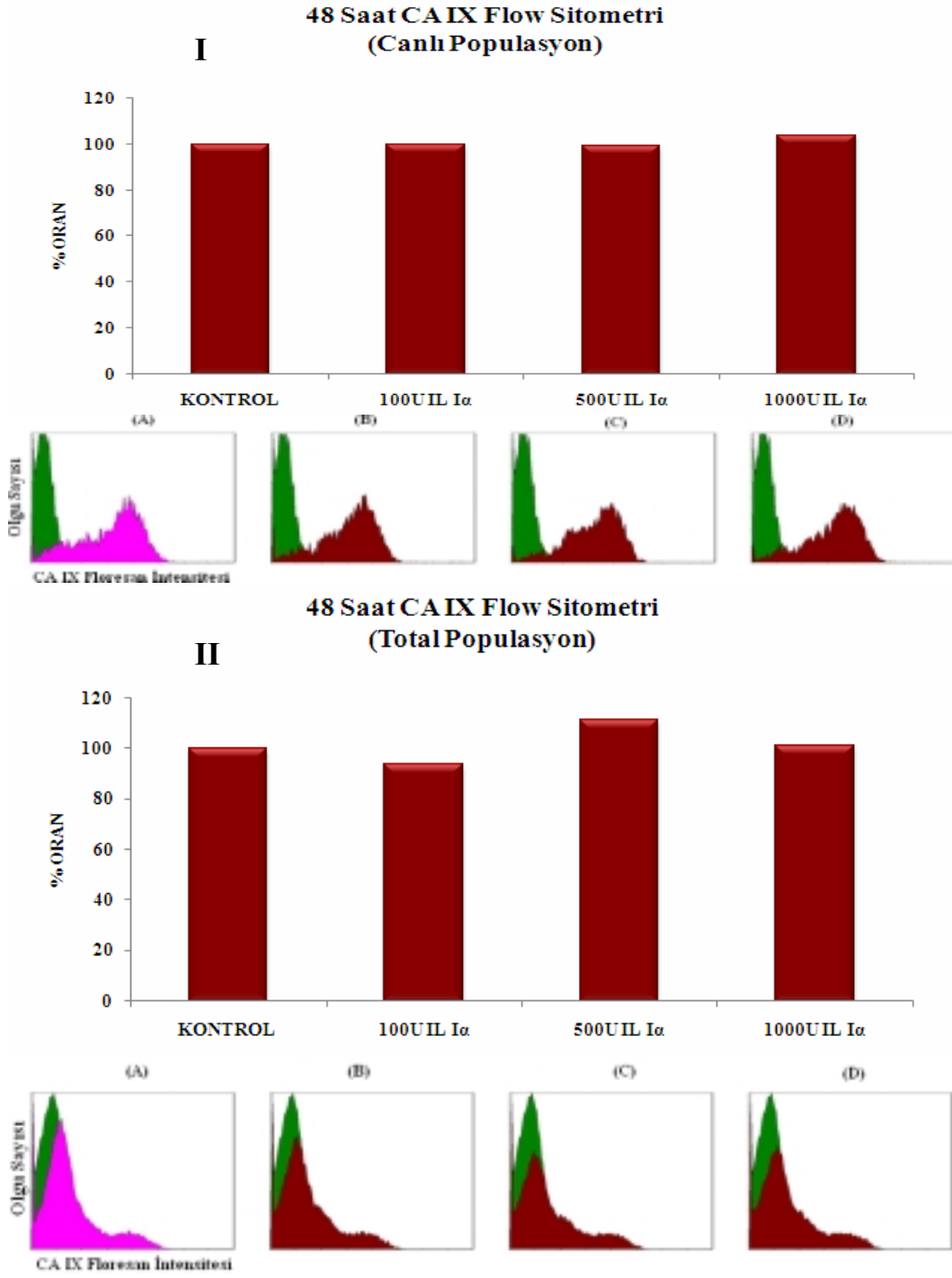
Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz, IL1α konsantrasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2'de belirtildiği gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli CAIX antikoru kullanılmıştır. 48 saatlik kültürde, farklı IL1α konsantrasyonları (100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml) uygulanan

HT-29 kolon karsinom hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan optimizasyon çalışması hem canlı popülasyonda hem de total popülasyonda yapılmıştır. Canlı popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 104,0, % 108,8, % 105,5 olarak bulunmuştur. Total popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 96,0, % 104,9, % 102,6 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları, Şekil 3.34'te gösterilmektedir.

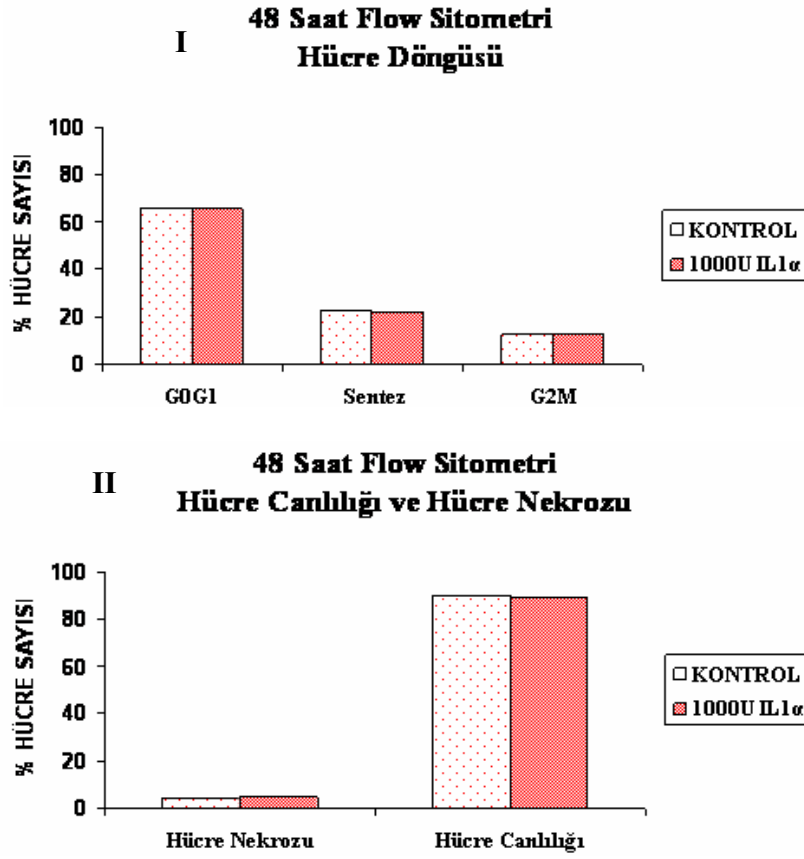
Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak yapılmıştır. 48 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 65,5 ve % 65,6 Sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 22,4 ve % 22,1; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 12,4 ve 12,7 olarak bulunmuştur. 48 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre IL1 α uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 90,1 ve % 87,9 ; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %7,5 ve 8,7 olarak bulunmuştur. Hem hücre döngüsü hem de AnnexinV analizleri sonuçları, Şekil 3.35'te gösterilmektedir.



Şekil 3.33 En yüksek IL-1 α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 48 saat sonundaki morfolojik görüntüsü (A:Kontrol, B: 1000U).



Şekil 3.34 48 saat sonundaki IL-Iα uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I.** Canlı populasyonda, farklı IL-Iα konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II.** Total populasyonda, farklı IL-Iα konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U)



Şekil 3.35 48 saat sonundaki IL1α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. En yüksek IL1α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki hücre döngüsü (A:Kontrol, B: 1000U). **II**. En yüksek IL1α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir.

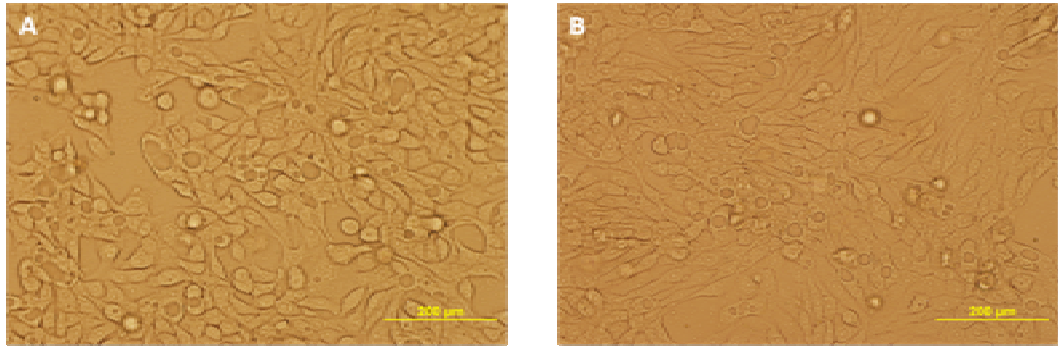
3.4.3 HT-29 Hücrelerinde Farklı Dozlarda 72 Saat IL1α Uygulaması

72 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml IL1α'ya maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve en yüksek konsantrasyon olan 1000 U/ml IL1α uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.36'da gösterilmiştir.

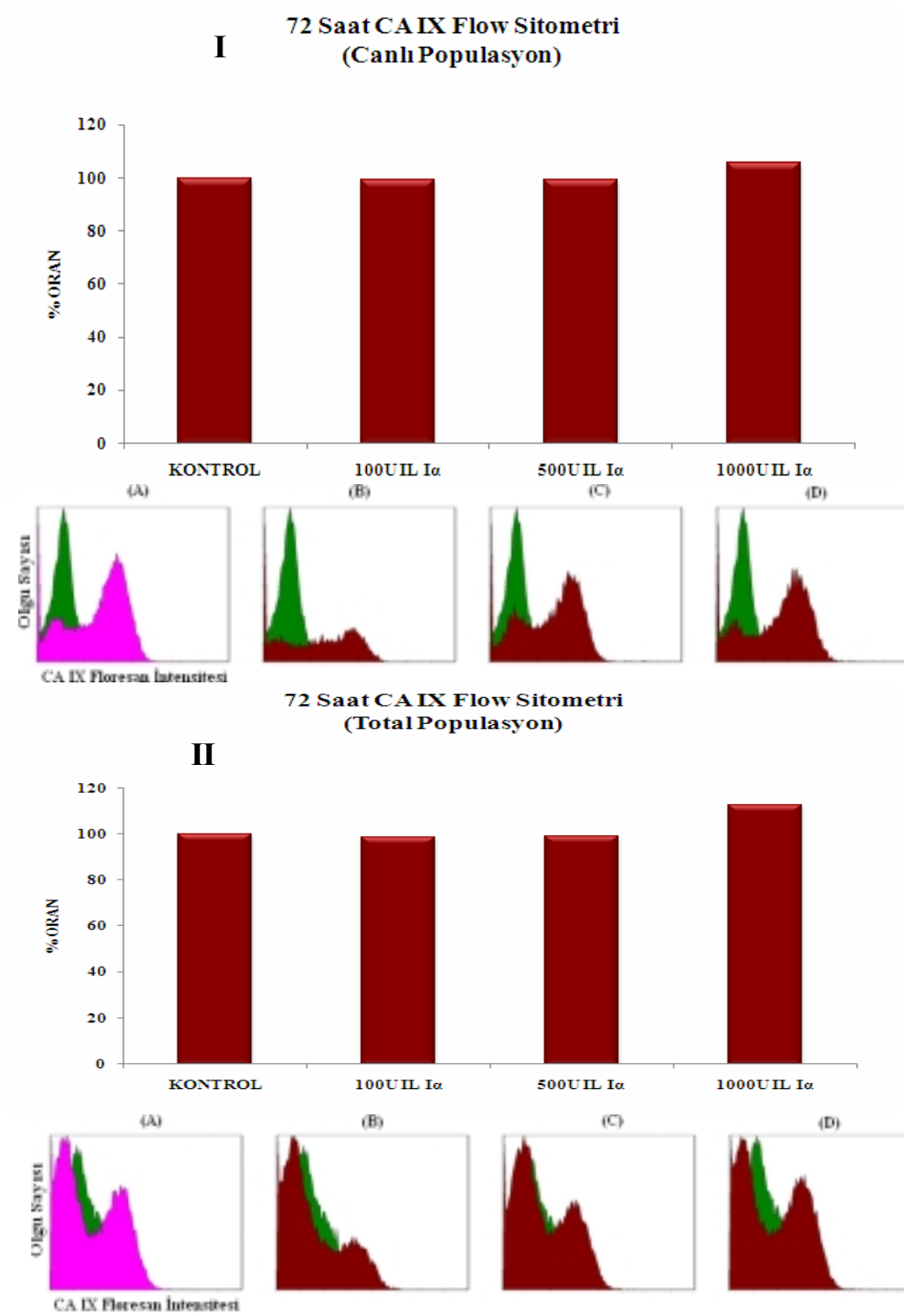
Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz, IL1α konsantrasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2'de belirtildiği gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli CAIX antikorunu kullanılmıştır. 72 saatlik

kültürde, farklı IL1 α konsantrasyonları (100U/ml, 500U/ml, 1000U/ml) uygulanan HT-29 kolon karsinom hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan optimizasyon çalışması hem canlı popülasyonda hem de total popülasyonda yapılmıştır. Canlı popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 89,0, % 99,3, % 112,7 olarak bulunmuştur. Total popülasyonda, kontrole (% 100) göre 100U/ml, 500U/ml ve 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 90,5, % 92,3, % 107,2 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları Şekil 3.37'de gösterilmektedir.

Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak yapılmıştır. 72 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 76,4 ve % 74,8 Sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 10,7 ve % 11,4; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 12,1 ve 14,3 olarak bulunmuştur. 72 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre IL1 α uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U/ml IL1 α uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 84 ve % 84,9 ; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %15 ve %13,9 olarak bulunmuştur. Hem hücre döngüsü hem de AnnexinV analiz sonuçları, Şekil 3.38'de gösterilmektedir.

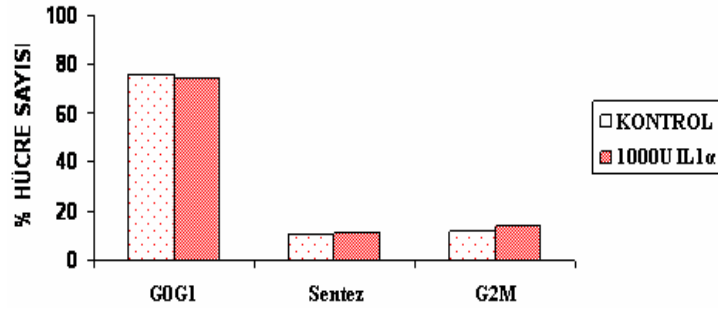


Şekil 3.36 En yüksek IL1 α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 72 saat sonundaki morfolojik görüntüsü (A:Kontrol, B: 1000U).

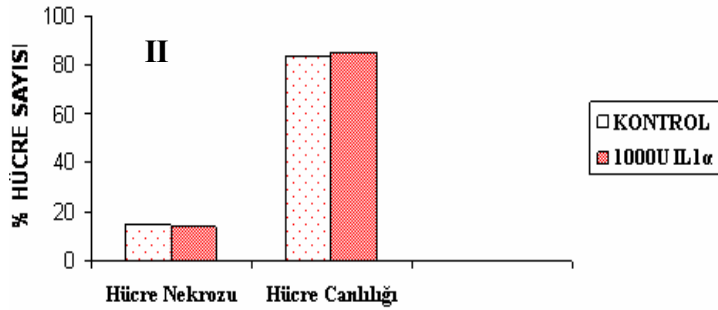


Şekil 3.37 72 saat sonundaki ILIα uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Canlı populasyonda, farklı IL-Iα konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U). **II**. Total populasyonda, farklı IL-Iα konsantrasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CAIX'un akış sitometrik analizi (A:Kontrol, B:100U, C:500U, D:1000U)

I 72 Saat Flow Sitometri Hücre Döngüsü



72 Saat Flow Sitometri Hücre Canlılığı ve Hücre Nekrozu



Şekil 3.38 72 saat sonundaki IL1α uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. En yüksek IL1α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki hücre döngüsü (A:Kontrol, B: 1000U). **II**. En yüksek IL1α konsantrasyonuna maruz kalmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir.

3.5 Farklı Sitokin Kombinasyonlarının HT-29 Hücrelerinde CA9 mRNA ve Protein Düzeyindeki Ekspresyon Seviyelerinin ve Hücre Döngüsü, Apoptozis Üzerinde Etkilerinin Belirlenmesi

3.5.1 HT-29 Hücrelerinde Farklı Sitokin Kombinasyonlarının 24 Saat Uygulaması

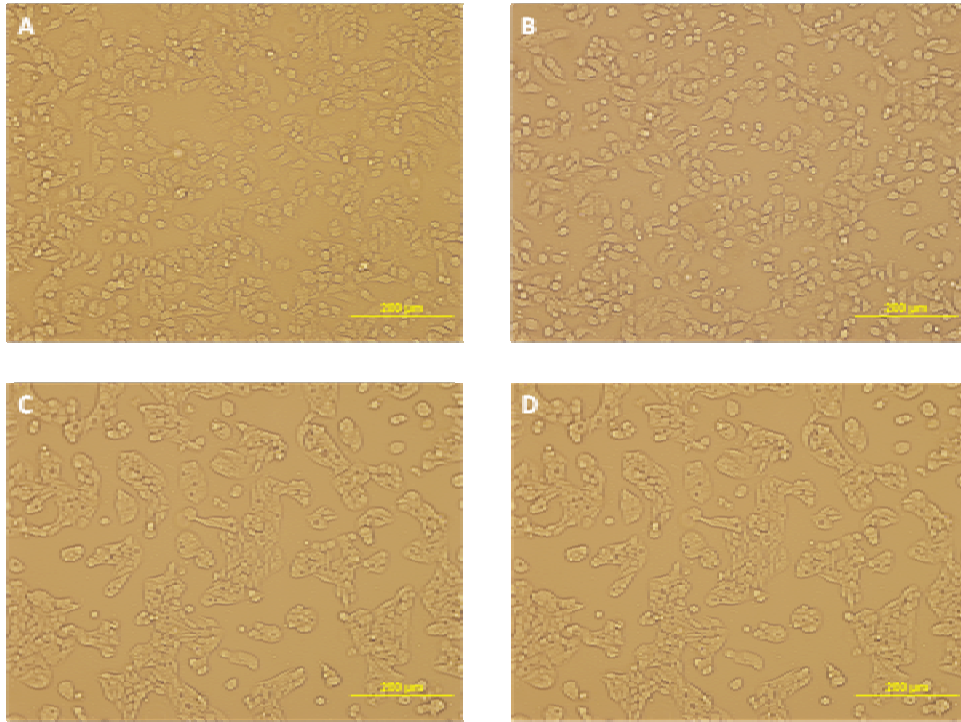
24 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 1000 U/ml farklı sitokin kombinasyonlarına (IL1α ve TNFα, IL1α ve TGFβ, TNFα ve TGFβ) maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve farklı sitokin kombinasyonları

uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.43'te gösterilmektedir. TNF α ve TGF β kombinasyonunda, kontrole göre hücre sayısı açısından bir azalış dikkati çekmektedir.

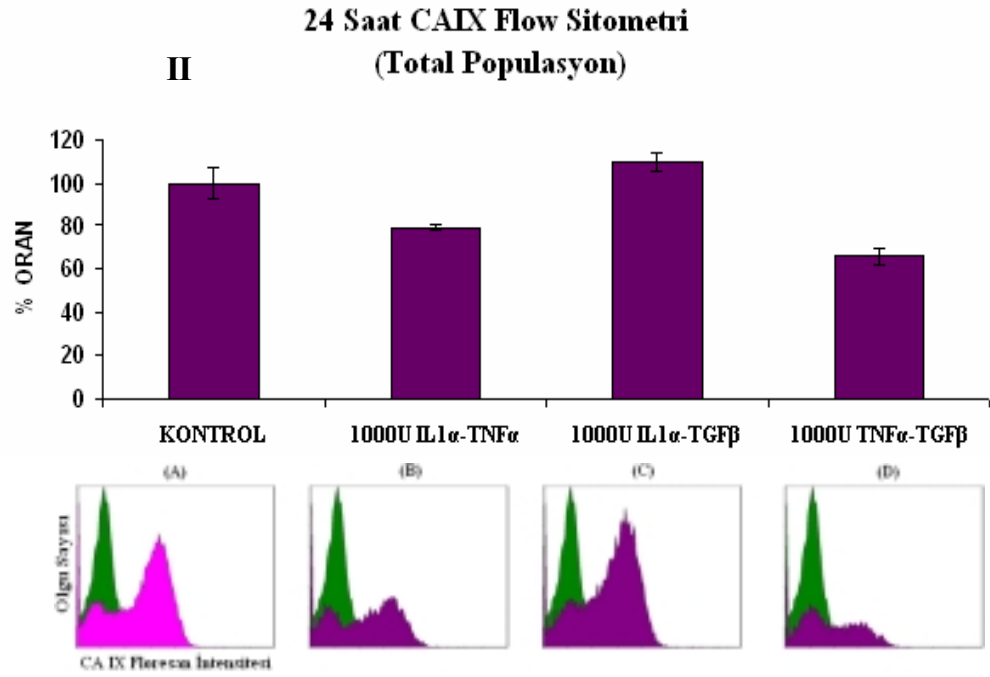
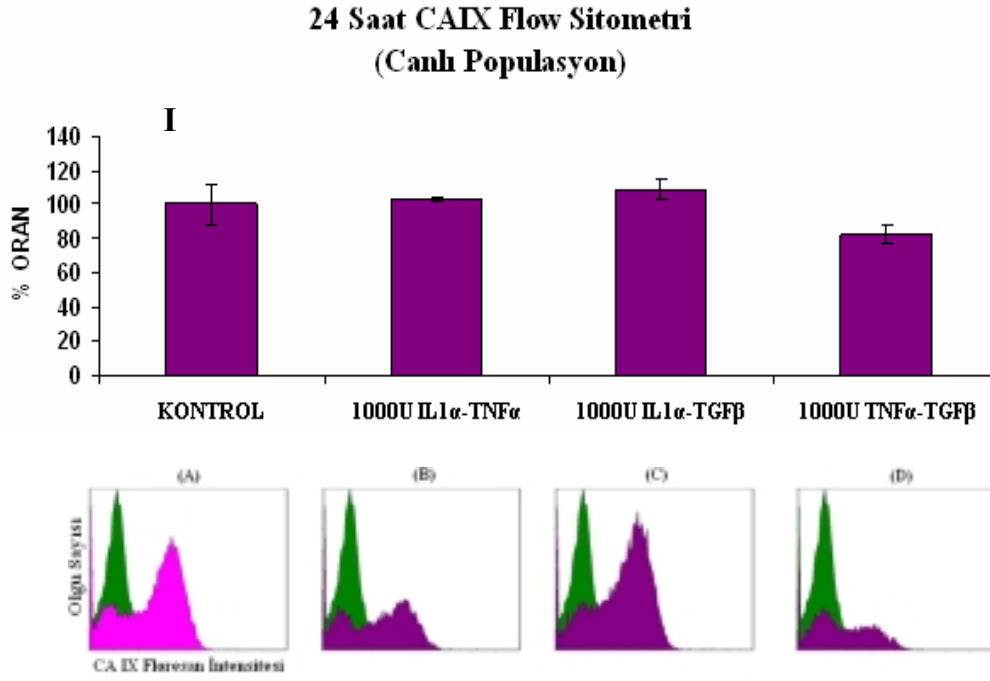
Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz sitokin kombinasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2'de belirtildiği gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli CAIX antikoru kullanılmıştır. 24 saatlik kültürde, farklı sitokin kombinasyonlarının en yüksek konsantrasyonu uygulanan HT-29 kolon hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan analizi hem canlı popülasyonda hem de total popülasyonda yapılmıştır. Canlı popülasyondaki hücrelerden kapı alındığında; Kontrole (% 100 \pm 12,4) göre 1000U/ml IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 103,2 \pm 2,0, % 109,1 \pm 6,5, % 82,3 \pm 5,1 olarak bulunmuştur. Total popülasyondaki hücrelerden kapı alındığında; kontrole (% 100 \pm 7,4) göre 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 78,7 \pm 1,3, % 109,8 \pm 4,2, % 65,5 \pm 3,7 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları Şekil 3.40'ta gösterilmektedir.

Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak yapılmıştır. 24 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 79,7 \pm 1,4 , % 84,9 \pm 0,4 ; % 83,3 \pm 0,8 , % 89,7 \pm 0,7 Sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 7,5 \pm 0,2 , % 4,9 \pm 0,2 ; % 5,8 \pm 0,5 , % 3,1 \pm 0,2 ; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 13,2 \pm 0,8 , % 10,3 \pm 0,2 , % 10,9 \pm 0,2 , % 7,4 \pm 0,4 olarak bulunmuştur. 24 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre 1000U 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 89,5 \pm 0,7 , % 78,2 \pm 5,2 ; % 91,3 \pm 0,7 , % 83,8 \pm 5,7 ; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %9,5 \pm 0,7 , 21,4 \pm 5,3 , % 8,1 \pm 0,7 , % 15,8 \pm 5,5 olarak bulunmuştur. Hem hücre döngüsü hem de AnnexinV analiz sonuçları Şekil 3.41'de gösterilmektedir. 24

saatlik kültürde , kontrol ve 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β ,TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki CA9 RNA ekspresyonunun Gerçek zamanlı PZR ile analizi sonucunda; 1000U/ml IL1 α ve TNF α , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla, kontrole göre 1,3 \pm 0,2 ve 2,4 \pm 0,07 kat azalış gösterilmiştir. Şekil 3.46'da gösterilen TNF α ve TGF β kombinasyonundaki azalış istatistiksel olarak anlamlıdır.

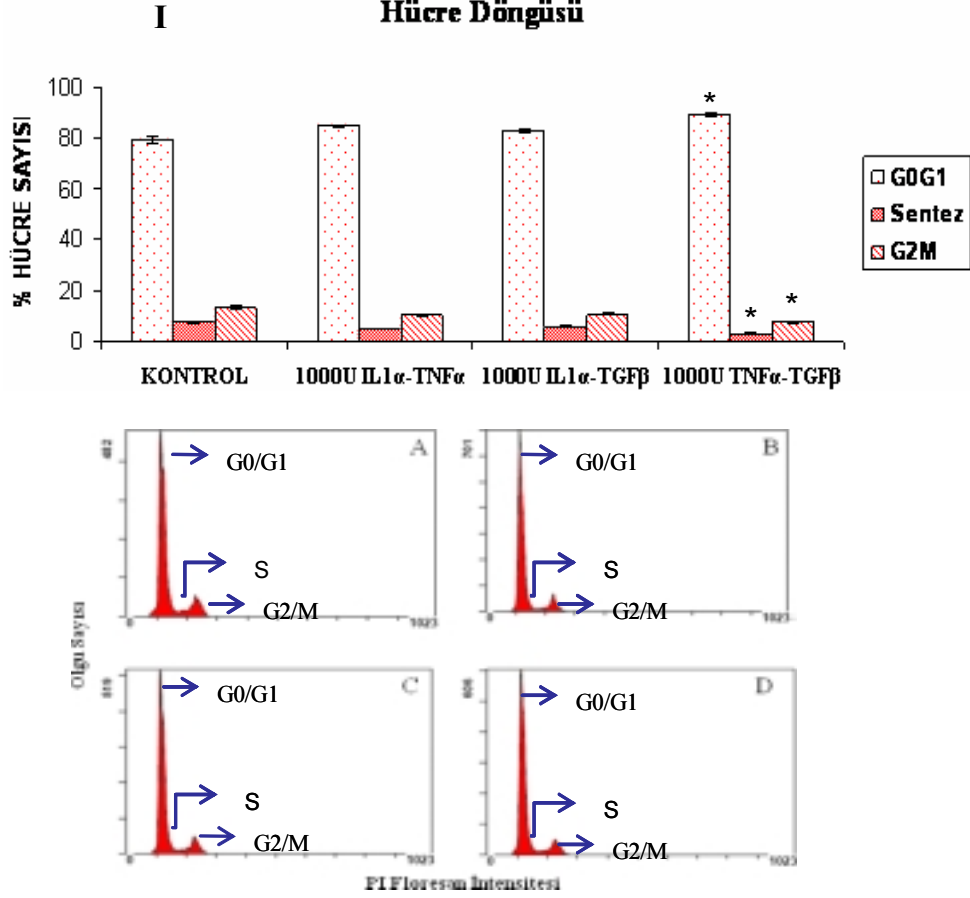


Şekil 3.39 Farklı sitokin kombinasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 24 saat sonundaki morfolojik görüntüsü [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)].

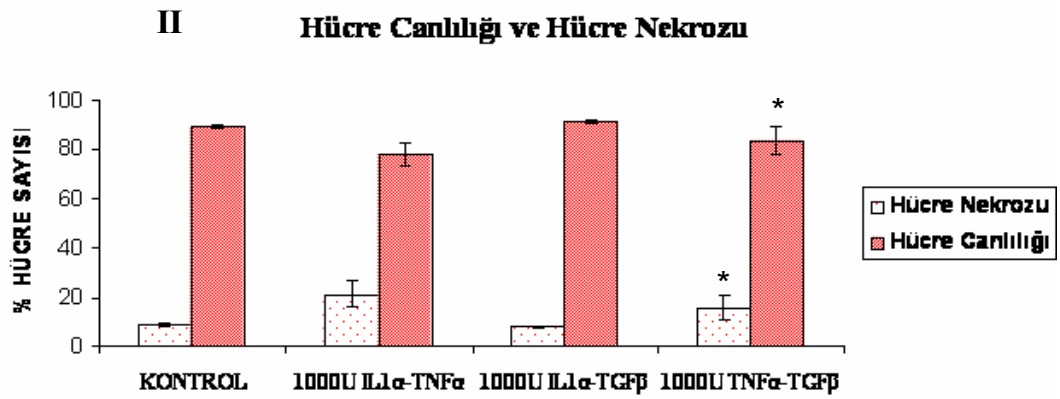


Şekil 3.40 24 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Canlı populasyonda farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CA IX'un akış sitometrik analizi . [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)]. **II**. Total populasyonda farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki CA IX'un akış sitometrik analizi . [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)]. (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

24 Saat Flow Sitometri Hücre Döngüsü

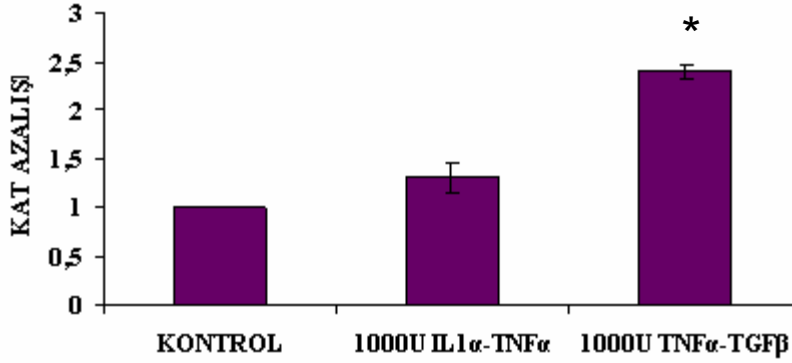


24 Saat Flow Sitometri Hücre Canlılığı ve Hücre Nekrozu



Şekil 3.41 24 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I.** Farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki hücre döngüsü [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)].**II.** Farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 24 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir. [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)]. (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

24 Saat Real time PCR C49 Total RNA Ekspresyonu



Şekil 3.42 24 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları (100U IL1 α ve TNF α ile 1000U TNF α ve TGF β) uygulanmış HT-29 hücrelerinde RNA ekspresyonunun kat azalışı. (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

3.5.2 HT-29 Hücrelerinde Farklı Sitokin Kombinasyonlarının 48 Saat Uygulaması

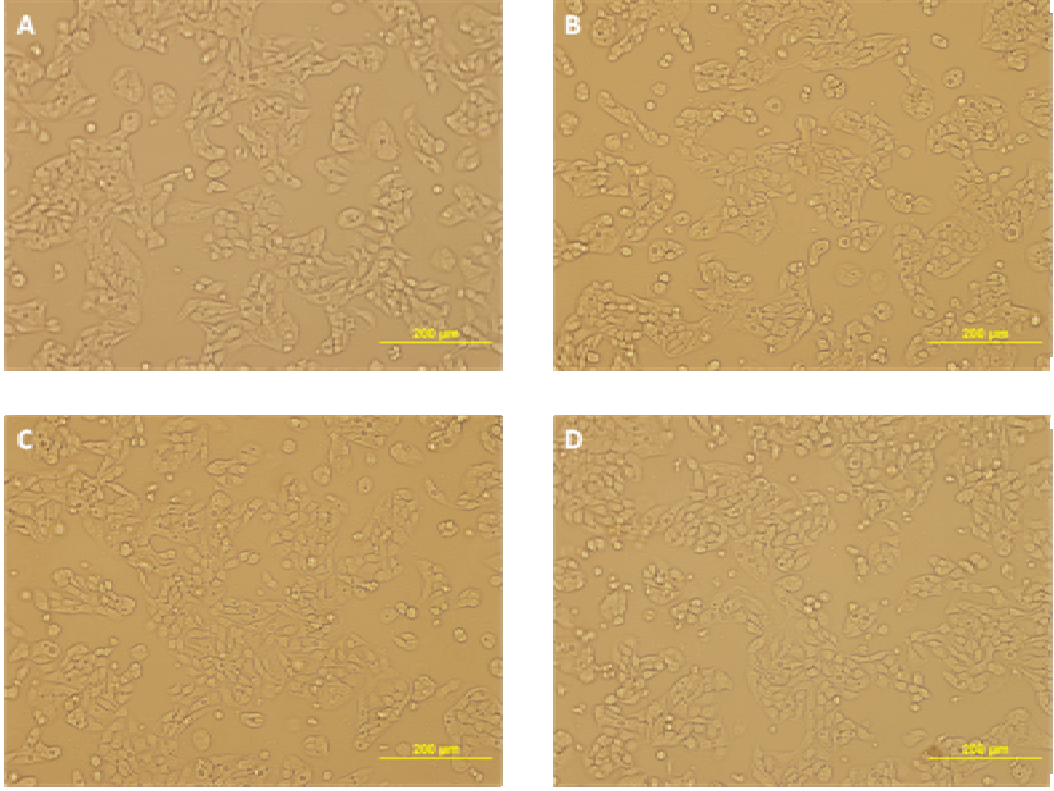
48 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 1000 U/ml farklı sitokin kombinasyonlarına (IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β) maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.43'te gösterilmektedir.

Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz sitokin kombinasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2'de belirtildiği gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli CAIX antikoruna kullanılmıştır. 48 saatlik kültürde, farklı sitokin kombinasyonlarının en yüksek konsantrasyonu uygulanan HT-29 kolon hücrelerinde CAIX'un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan analizi hem canlı popülasyonda hem de total popülasyonda yapılmıştır. Canlı popülasyondaki hücrelerden kapı alındığında; Kontrol (% 100 \pm 3,7) göre 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 92,3 \pm 13,4, % 117,5 \pm 20,4, % 104,1 \pm 24,5 olarak

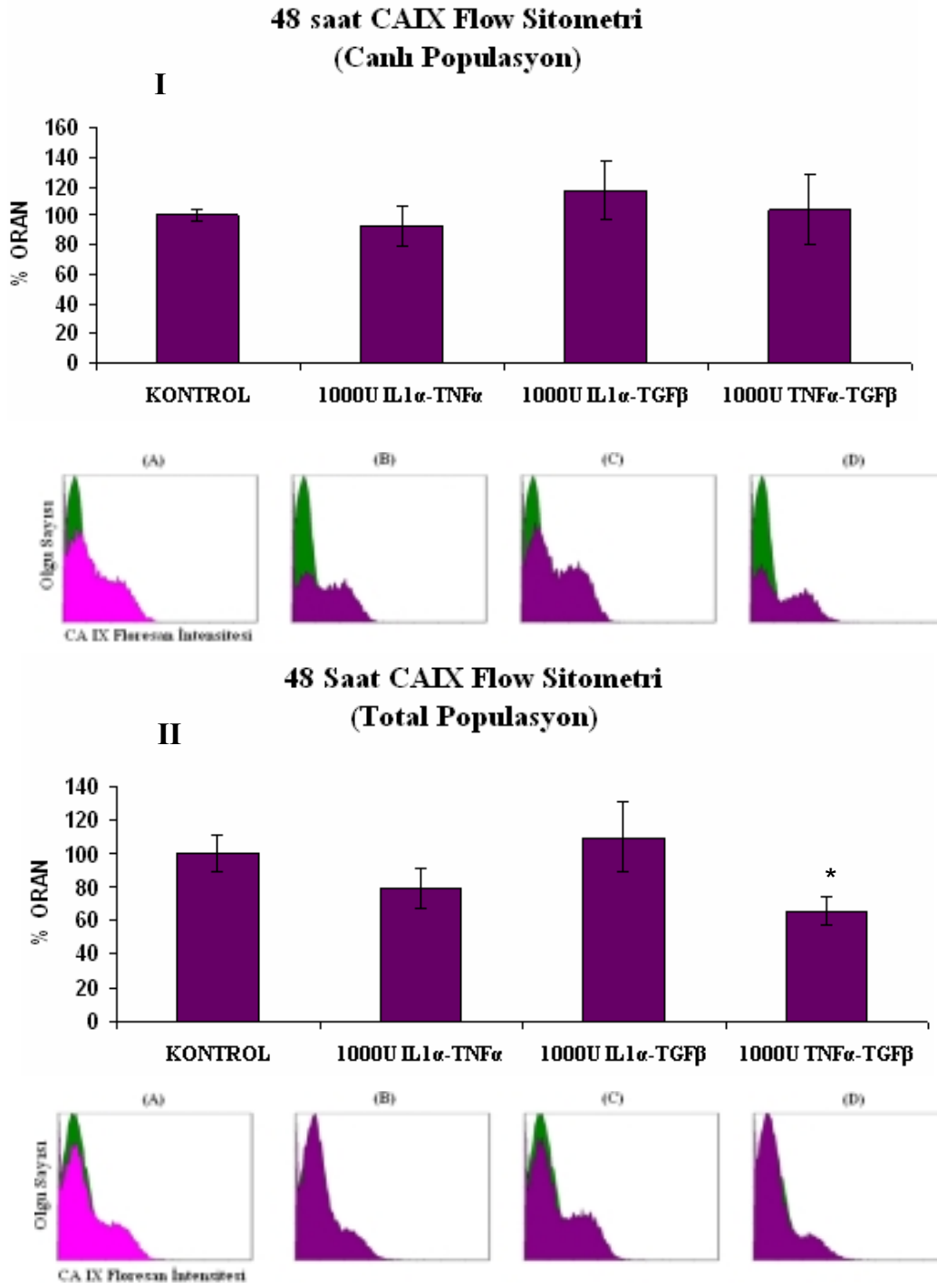
bulunmuştur. Total populasyondaki hücrelerden kapı alındığında; kontrole (% 100±11,5) göre 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β ,TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 66,1±11,9, % 123,5±21,5, % 61,0±8,2 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları, Şekil 3.44'te gösterilmektedir.

Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak yapılmıştır. 48 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β ,TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 87,0±0,7 , % 89,4±0,2 ; % 87,3±4,2 , % 90,5±0,4 Sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 6,5 ±2,8 , % 3,7±1,1 ; % 3,8±0,2 , % 3,2±1,0 ; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 7,2±3,1 , % 6,7±0,8 , % 6,3±0,8 , % 6,3±0,6 olarak bulunmuştur. 48 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre 1000U 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β ,TNF α ve TGF β uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β ,TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 87,5±1,2 , % 73,8±0,7; % 85,7±0,3, % 82,1±4,1 ; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %11,7±1,0 , 25,5±0,2 , % 13,4±0,3 , % 17,4±4,2 olarak bulunmuştur. Hem hücre döngüsü hem de AnnexinV analizlerinden elde edilen sonuçlar, Şekil 3.45'te gösterilmektedir.

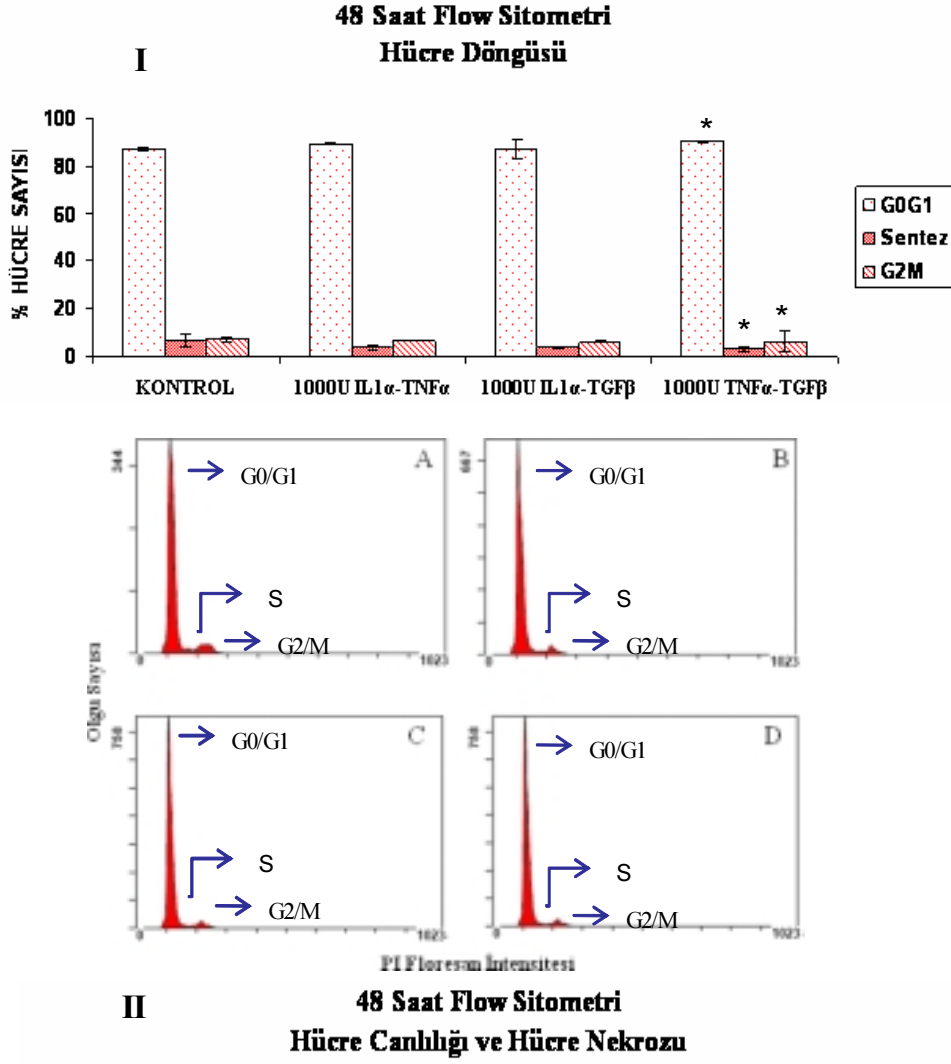
48 saatlik kültürde , kontrol ve 1000U/ml IL1 α ve TNF α , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki CA9 RNA ekspresyonunun Gerçek zamanlı PZR ile analizi sonucunda; 1000U/ml IL1 α ve TNF α , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla, kontrole göre 3,9±1,2 ve 3,4±2,1 kat azalış gösterilmiştir. Şekil 3.46'da gösterilen hem IL1 α ve TNF α hem de TNF α ve TGF β kombinasyonundaki azalış istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 3.43 Farklı sitokin kombinasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 48 saat sonundaki morfolojik görüntüsü [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)].

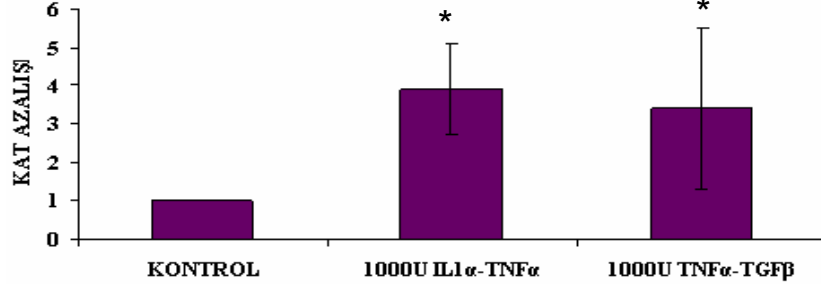


Şekil 3.44 48 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Canlı populasyonda farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CA IX'un akış sitometrik analizi . [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)]. **II**. Total populasyonda farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki CA IX'un akış sitometrik analizi . [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)]. (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)



Şekil 3.45 48 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. Farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki hücre döngüsü [A:Kontrol, B:1000U(IL1α ve TNFα), C:1000U(IL1α ve TGFβ), D:1000U(TNFα ve TGFβ)].**II**. Farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 48 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir. [A:Kontrol, B:1000U(IL1α ve TNFα), C:1000U(IL1α ve TGFβ), D:1000U(TNFα ve TGFβ)]. (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

48 Saat Real Time PCR C49 Total RNA Ekspresyonu



Şekil 3.46 48 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları (100U IL1 α ve TNF α ile 1000U TNF α ve TGF β) uygulanmış HT-29 hücrelerinde RNA ekspresyonunun kat azalışı (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

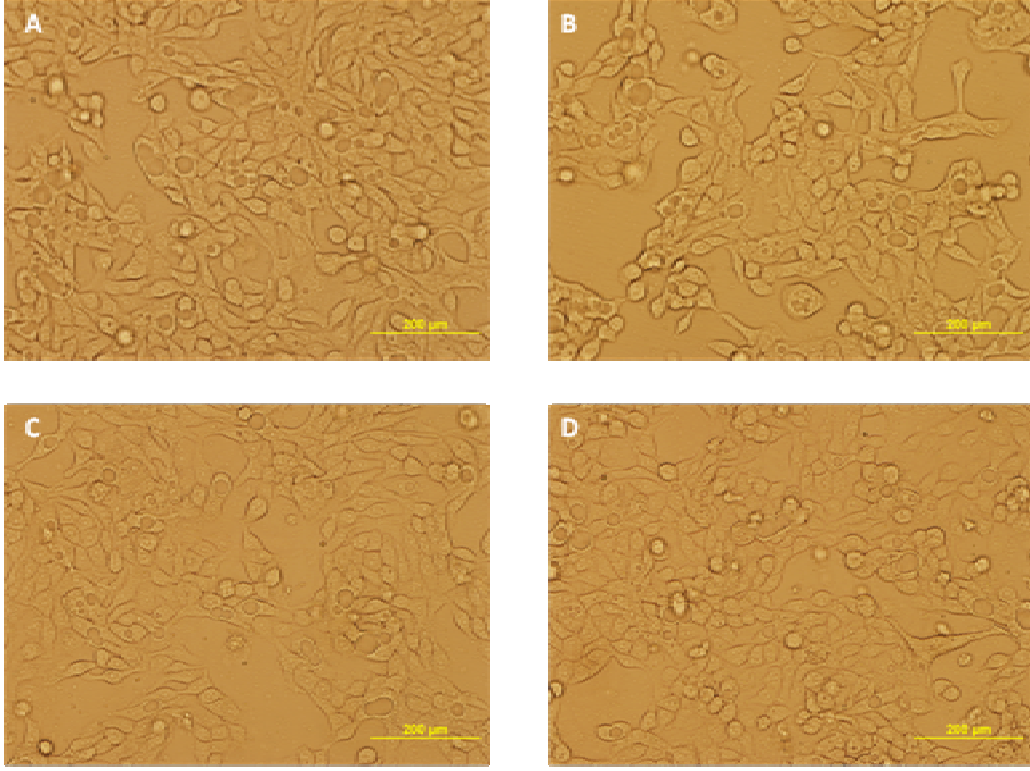
3.5.3 HT-29 Hücrelerinde Farklı Sitokin Kombinasyonlarının 72 Saat Uygulaması

72 saatlik inkübasyon sonunda sitokin uygulanmamış kontrol grubu ve 1000 U/ml farklı sitokin kombinasyonlarına (IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β) maruz kalmış HT-29 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilen morfolojik görüntüleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 3.47’de gösterilmektedir.

Öncelikle, CAIX protein ekspresyonunda fark görebileceğimiz sitokin kombinasyonunu belirleyebilmek için, Bölüm 2’de belirtildiği gibi akış sitometrik analiz yapılmıştır. Bu analizde PE etiketli CAIX antikoruna kullanılmıştır. 48 saatlik kültürde, farklı sitokin kombinasyonlarının en yüksek konsantrasyonu uygulanan HT-29 kolon hücrelerinde CAIX’un protein seviyesindeki ekspresyonunun akış sitometri ile yapılan analizi hem canlı populasyonda hem de total populasyonda yapılmıştır. Canlı populasyon seçilerek kapı alındığında; Kontrole (% 100 \pm 14,0) göre 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla % 83,2 \pm 12,6, % 110,9 \pm 13,8, % 53,2 \pm 13,4 olarak bulunmuştur. Total populasyon seçilerek kapı alındığında; kontrole (% 100 \pm 14,0) göre 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar

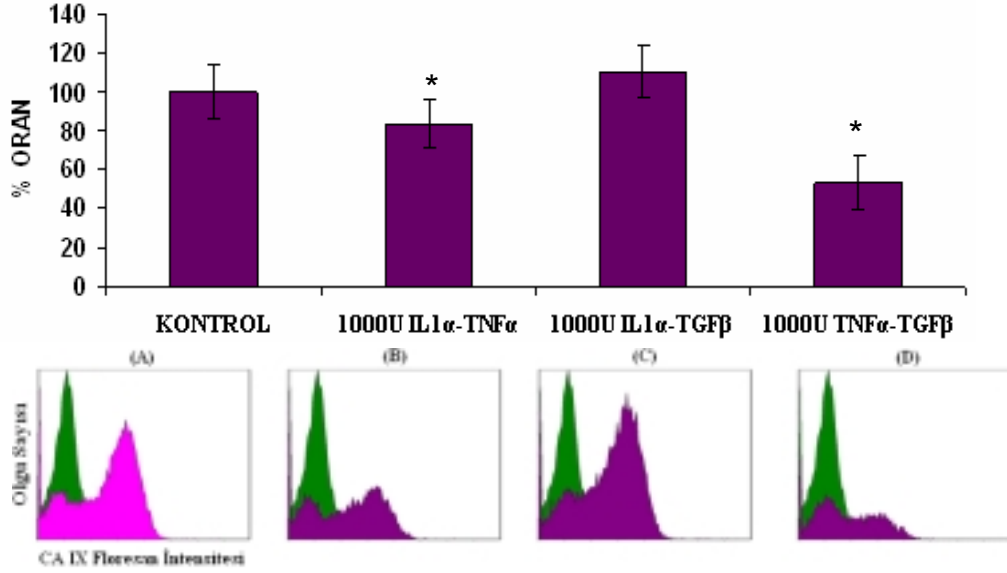
sırasıyla % 47,9±9,5, % 105,3±18,1, % 21,4±6,1 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları Şekil 3.48’de gösterilmektedir.

Aynı hücrelerde hücre döngüsü analizi akış sitometrik olarak yapılmıştır. 72 saatlik kültürde, kontrol ve 1000U 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β ,TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 75,2±1,0 , % 82,0±0,9 ; % 78,9±0,3 , % 86,2±5,8 Sentez fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 10,9 ±0,4 , % 5,9±0,7 ; % 5,8±1,3 , % 5,7±0,7 ; G2/M fazındaki hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla % 13,4±1,2 , % 11,9±0,3 , % 15,1±1,1 , % 11,5±0,2 olarak bulunmuştur. 72 saatlik kültürde yapılan AnnexinV deneyinden elde edilen sonuçlara göre 1000U 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β ,TNF α ve TGF β uygulanmış HT-29 kolon karsinom hücrelerindeki apoptozis ile sitokin uygulanmamış kontrol grubu hücrelerindeki apoptozis arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bu deneyden elde edilen kontrol ve 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β ,TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki canlı hücrelerin yüzdesi sırasıyla % 84,1±0,6 , % 76,8±1,2; % 86,7±0,4, % 75,9±1,5 ; nekrotik hücrelerin yüzdesi sırasıyla %14,8±0,5 , 22,4±1,0 , % 12,7±0,4 , % 20,3±5,8 olarak bulunmuştur. Hem hücre döngüsü hem de AnnexinV analizlerinde elde edilen sonuçlar Şekil 3.49’da gösterilmektedir. 72 saatlik kültürde , kontrol ve 1000U IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki *CA9* total RNA ekspresyonunun Gerçek zamanlı PZR ile analizi sonucunda; 1000U/ml IL1 α ve TNF α , TNF α ve TGF β uygulanmış hücrelerdeki sonuçlar sırasıyla, kontrole göre 15,7±7,9 ve 7±0,14 kat azalış gösterilmiştir. Şekil 3.50’de gösterilen hem IL1 α ve TNF α hem de TNF α ve TGF β kombinasyonundaki azalış istatistiksel olarak anlamlıdır.

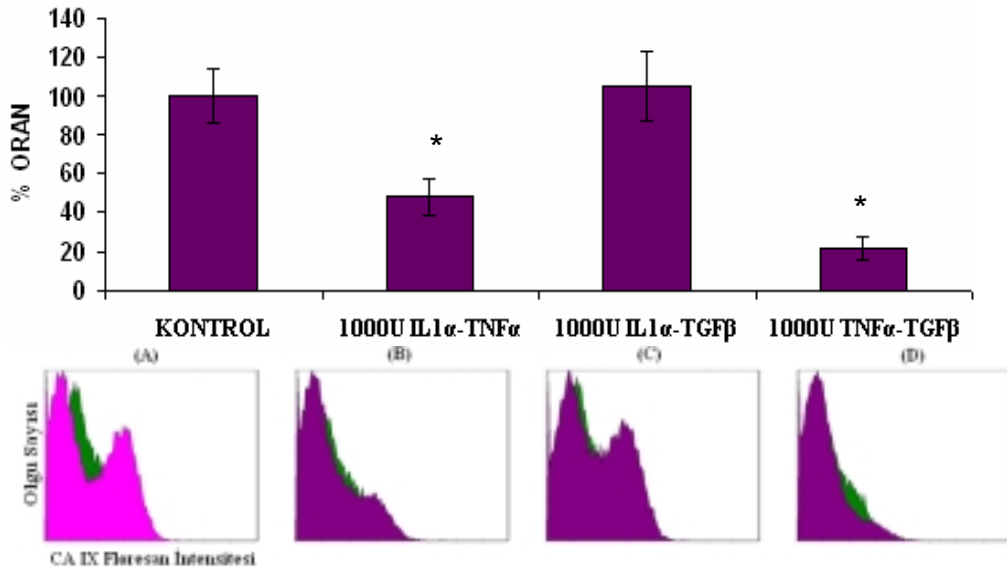


Şekil 3.47 Farklı sitokin kombinasyonlarına maruz kalmış HT-29 hücrelerinin 72 saat sonundaki morfolojik görüntüsü [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)].

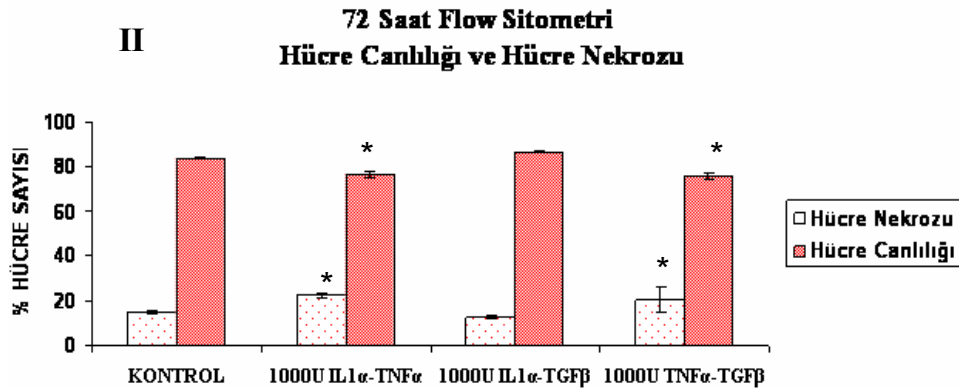
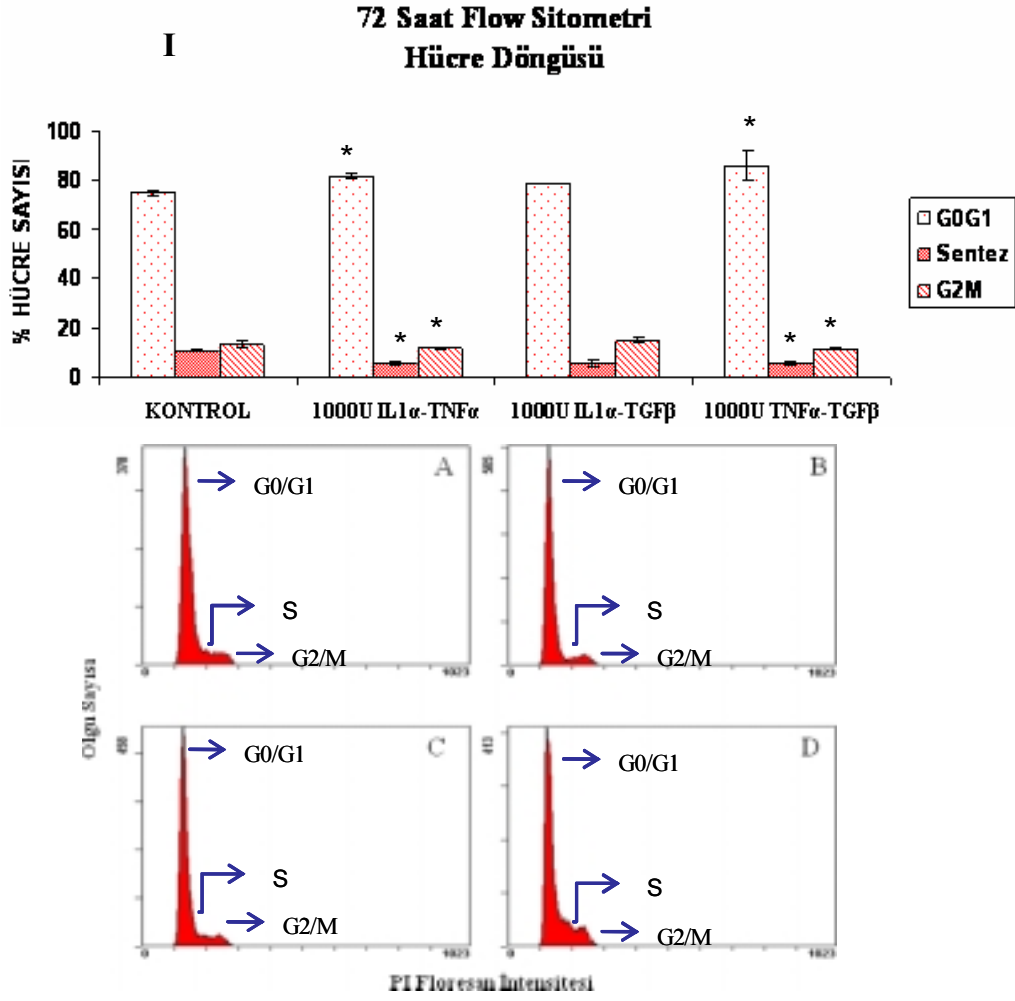
I 72 Saat CAIX Flow Sitometri (Canlı Populasyon)



II 72 Saat CAIX Flow Sitometri (Total Populasyon)

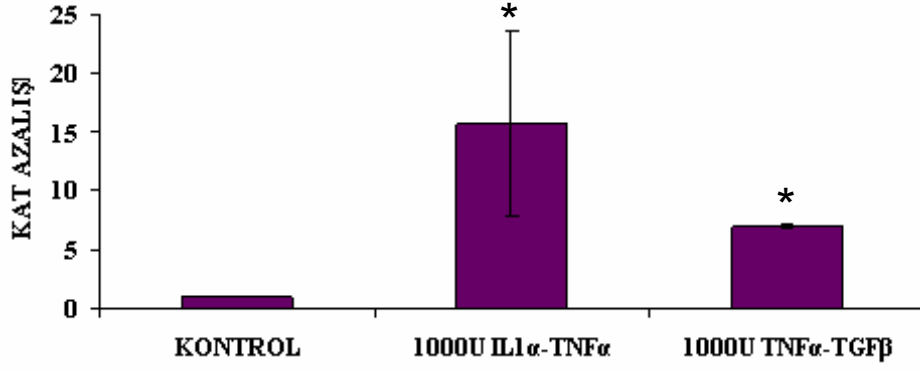


Şekil 3.48 72 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde CAIX'un akış sitometrik analizi **I**. Canlı populasyonda farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CA IX'un akış sitometrik analizi . [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)]. **II**. Total populasyonda farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki CA IX'un akış sitometrik analizi . [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)]. (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)



Şekil 3.49 72 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü ve AnnexinV analizi **I**. Farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki hücre döngüsü [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)].**II**. Farklı sitokin kombinasyonları uygulanmış HT-29 hücrelerinde 72 saat sonundaki hücre canlılığı ve hücre nekrozu AnnexinV deneyi ile gösterilmiştir. [A:Kontrol, B:1000U(IL1 α ve TNF α), C:1000U(IL1 α ve TGF β), D:1000U(TNF α ve TGF β)]. (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

**72 Saat Real Time PCR
C49 Total RNA Ekspresyonu**



Şekil 3.50 72 saat sonundaki farklı sitokin kombinasyonları (100U IL1 α ve TNF α ile 1000U TNF α ve TGF β) uygulanmış HT-29 hücrelerinde RNA ekspresyonunun kat azalışı. (* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır.)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücrelerin hipoksik koşullara adaptasyonu ile birlikte tümör metabolizması ve mikroçevredeki değişimler, tümörün gelişmesi açısından çok önemlidir [107, 108]. Transmembran karbonik anhidraz enzimlerinden CAIX, tümör metabolizması ile ilişkili olarak bilinen en önemli enzimlerdendir. Bu enzim, içerdiği hücre dışı enzim aktif bölgesi ile CO₂'in bikarbonat ve protona hidratasyonu reaksiyonunu katalizler. Ayrıca hücre-hücre adezyonu aracılığı ile de tümör invazyonunda rol oynar. CAIX'un normal dokulardaki ekspresyonu oldukça kısıtlıdır. Bununla birlikte, tümörün hipoksik koşullar ile artan CAIX ekspresyonu çeşitli tümörlerle olan bağlantısını açıkça ortaya koymaktadır [109]. Bu indüksiyon CA9 promotöründe bulunan HRE'ye bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1'in bağlanması ile gerçekleşir. Bu nedenlerden dolayı CAIX, tümör hipoksiyası açısından güçlü bir belirteç olarak dikkati çekmektedir [110]. Ayrıca, prediktif ve prognostik değeri çeşitli klinik çalışmalarda gösterilmektedir [3].

Kanser gelişimi sürecinde hücreler, pek çok genetik ve epigenetik değişimler geçirirler ve bu değişiklikler anormal fenotip gelişmesine öncülük ederken tümör metabolizması ve mikroçevresini etkiler. Bu şartlar altında kanserin kilometre taşlarından birisi olan hücrelerin düzensiz proliferasyonu ortaya çıkar. Malin 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]. Bu bağlamda yapılan çalışmalar sonucunda, kolon kanserinde önemli rol oynayan bazı sitokinler ile CAIX ekspresyonu arasındaki ilişkiye yönelik araştırmaların yetersizliği nedeniyle bu tez araştırması planlanmıştır. Bunun yanında kanserde önemli mekanizmalardan birisi olan apoptozis ve tümör metabolizmasında önemli rol oynayan değişik kontrol noktalarını da içeren hücre döngüsü de çalışmaya dahil edilmiştir.

Kolorektal tümörlerde hücre proliferasyonu ve displazi ile CAIX arasındaki bağlantıya yönelik kanıtlar, Sarnio ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur [111]. Bu çalışmada, kolorektal tümörlerde CAIX ekspresyonu ile nükleer Ki-67 antijeninin ekspresyonunda paralellik göstermektedir [111]. Ki-67 antijeni de kolonda hücre proliferasyonu açısından önemli bir belirteçtir [112]. Ayrıca, Ki-67 immunoreaktif özelliğiyle dikkat çeken hızlı çoğalan hücrelerin bulunduğu bölgelerde CAIX ekspresyonunun varlığını göstermişlerdir [111]. 2001 yılında, Ivanov ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre, artan CAIX protein ekspresyonu şeffaf hücreli böbrek karsinoması [58, 59] ve kolorektal tümörlerde [60, 113] diagnostik bir belirteç olarak kullanılabileceğini desteklemiştir [13]. Bu bulgular dikkate alındığında CAIX'un tümör farklılaşmasında iyi bir indikatör olduğu açıkça söylenemese de bu proteinin hücre büyümesi ile kesin bir ilişkisi vardır, fakat mekanizması daha aydınlatılamamıştır. CAIX'un biyobelirteç olarak kullanılmasının yanında hücre döngüsünün regülasyonunda da aktif görevler üstlenmektedir. Bazı tümör çeşitlerinde, CA bölgesi ve bu molekülün diğer bölgelerinin hücre büyümesinin regülasyonunda yer alması sebebiyle CAIX'un hızlı çoğalan tümör hücrelerindeki ekspresyonu artış göstermektedir [114]. Bizim çalışmamızda, kolon hücreleri G0/G1 evresinde iken CAIX'un kolon hücrelerindeki ifadesinin azalması bu bulguları destekler niteliktedir. Başka bir çalışmada, erken CAIX aracılığıyla gerçekleşen hipoksik cevabın gözlemlendiği normal mukoza ile kolorektal kanserler karşılaştırıldığında, kolorektal kanserlerde artan CAIX ekspresyonu gösterilmiştir [111, 115, 116]. 2003 yılında yapılan bir çalışmada, azalan oksijen miktarına karşı artan CAIX ekspresyonu gözlenen HT-29 kolon karsinoma hücreleri, nude-fare modelinde tümörleştirici potansiyel taşıdığı gösterilmiştir [117]. 2007 yılında yapılan bir çalışmada, HNNPC'de CAIX'un tedavide hedef genler arasında yer alabileceği açıkça ortaya çıkarılmıştır [106]. Bizim çalışmamızda TNF'e karşı kolon hücrelerinin cevabında CAIX ifadesinde azalış bulunmuştur. Bu açıdan bakıldığında da TNF'in içinde bulunduğu tedavi edici kombinasyonlar, tümörün tedavisinde yeni ufuklar açabilir.

Kolorektal kanser dünyada gözlenen üçüncü en yaygın kanser türüdür. Kolon ve rektal kanser, erkeklerde bütün kanserlerin % 9'unu, kadınlarda % 10'unu

oluşturmaktadır. Dünyada her yıl 395.000 kişinin hayatı, kolorektal kanserden dolayı ölümlerle sonuçlanmaktadır [116, 118].

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. Bunun yanında hücrenin ölüm mekanizmalarından apoptozis ve hücre nekrozundaki rolleri ve hücre döngüsüne olan etkileri düşünüldüğünde, bu çalışmanın içinde yer almışlardır. Ayrıca kanserde immütedavide kullanılmaları da sitokin çalışmalarının önemini daha fazla arttırmaktadır. Bu açılarından bakıldığında kolorektal kanserde önemli bir belirteç olan CA9'un regülasyonunda sitokinlerin katkılarının araştırılması amacıyla bu çalışma dizayn edilmiştir. Sitokinlerin hücre döngüsü ve apoptozisteki fonksiyonları dikkate alındığı zaman tez çalışmasına hücre döngüsü ve apoptozis araştırmaları da ilave edilmiştir. Böylece hem CAIX ve sitokinler arasındaki ilişki ortaya çıkarılacak hem de sitokinler, CAIX, hücre döngüsü ve apoptozis olayları arasındaki bağlantılar ortaya çıkarılacaktır.

Bu amaçla kolon kanseri ile ilgili çalışmalarda model olarak kullanılan HT-29 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin çalışmalardaki önemi, kolonik epitelin pek çok özelliğini göstermeleridir. Diğer taraftan bağırsak hücre büyümesine yönelik olarak yapılan araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar [119]. HT-29 kolon karsinoma hücrelerinde G250/MN/CA9 antijen ekspresyonu, flow sitometrik olarak analiz edildiğinde, pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi % 58,0±% 18,1 olarak bulunmuştur [120]. Bu sonuçlar, bizim araştırmamızda HT29 kolon hücrelerinde bulunan CAIX pozitifliği ile korelasyon göstermektedir.

CAIX pozitifliği daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan HT-29 hücrelerinde, tümör biyolojisi açısından önemli üç farklı sitokin (TNF α , TGF β ve IL1 α) çalışmaya tek tek etkileri incelenirken, sitokinlerin sinerjistik ve antogonistik etkilerinin belirlenmesi için, sitokinlerin ikili kombinasyonları (IL1 α ve TNF α , IL1 α ve TGF β , TNF α ve TGF β) da dahil edilmiştir. Bu sitokinlerin, en farklı doz ve farklı

zaman aralıklarında uygulanarak, CAIX'un hem protein hem de mRNA düzeyinde ekspresyonuna olan etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, tümör gelişiminde önemli olan hücre döngüsü ve apoptozis parametreleri de bakılarak CAIX, hücre döngüsü ve apoptoz arasındaki ilişki kolon karsinoma modelinde aydınlatılmaya çalışılmıştır.

IL1 α ve TNF α , proinflamatuvar sitokinlerdir ve inflamasyonla gerçekleşen indüksiyonları pek çok genin ekspresyonunda etkilidir. Karsinogenezin patogeneğinde, aynı zamanda tümörün büyümesi ve yayılmasında IL1 α ve TNF α gibi sitokinler, reaktif oksijen türlerinin üretiminde ve karsinogenezde rol oynayan nötrofilleri çeken kemokinleri indüklerler [121]. Kanser gelişimi ile onkogenlerin ekspresyonu arasındaki bağlantıyı ortaya koyacak pek çok araştırma vardır. Bunun yanında kronik inflamasyon ve sitokin üretimi arasındaki ilişkinin varlığı, karsinogenez sürecinde ilave mekanizmaları da ortaya çıkarmaktadır [122]. Kanserde NF κ B aktivasyonu, çeşitli tümörlerde önemli bir rol oynamaktadır [122]. Ayrıca immün cevapta rol oynayan genlerin düzenlenmesinde de çok önemlidir. Fakat onkogenlerin ekspresyonu ve pro-inflamatuar sitokinler arasındaki ilişki halen tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Bu konudaki bulguların eksikliği sebebiyle bu tez çalışmasında tümörle ilişkili bir gen olan CA9 ile sitokinler arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu konuda daha önceden yapılan bir çalışma olmaması araştırmamızdaki bulguların önemini daha da artırmaktadır.

İnsanlarda, malin hastalıklarda immunterapi potansiyeli uzun yıllardır araştırmacılar için ilgi odağı olmuştur. *In vitro* olarak insan tümörlerini yok etme kapasitesine sahip immün efektör hücreleri tanımlanmıştır [123]. İnsanı da içeren pek çok omurgalı hücresinde, tümörle ilişkili antijenleri tanıyan monoklonal antikolar üretilmiştir [123]. Host cevabının hem aktif hem de pasif olarak artışına yönelik yapılan immunterapiye yönelik güncel yaklaşımlar arasında, interferon ve interleokinlerle immün efektör hücre fonksiyonlarının spesifik olmayan stimülasyonu gerçekleşir. Lenfoid hücreler ve monoklonal antikolarla adaptif tedavi teknik olarak daha mümkündür. Aktive olan immün efektör hücreler tarafından üretilen TNF gibi moleküllerin tümörün hücre proliferasyonunu doğrudan regüle ettiği gösterilmiştir [123]. Pro-inflamatuar sitokinlerin en önemli üyesi olan TNF'in anti-tümör aktivitesine yönelik pek çok çalışma vardır. Rekombinant DNA teknolojisi ile

üretilen TNF α ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, pek çok tümör hücresinde proliferasyonu inhibe ettiği bulunmuştur. Yaklaşık olarak %30-%40 civarında tümör hücre serisinin bu molekülle inhibisyonu gösterilmiştir [124-126]. Endotel hücreleri dışında çoğu diploid transforme olmamış hücrelerde TNF α 'nın anti-proliferatif etkisine direnç geliştirdikleri gözlenmiştir [127, 128]. TNF α 'nın pleiotropik biyolojik etkileri arasında anjiogenezde stimülatör etkisi söylenebilir [127, 129]. Anjiogenezdeki bu etki, endotel hücre proliferasyonundaki inhibitör etkisi ile çelişmektedir. TNF α 'nın anti-tümör etkisi, anti-proliferatif etkisiyle doğrudan ilgili gibi görünse de bu durum oldukça karmaşıktır. Bu molekül ile ilgili olarak pek çok klinik çalışma yapılmıştır. Kolorektal karsinomlarda ve yumuşak doku sarkomlarında faz I denemelerinde tümör regresyonu gözlenmiştir. Hücre fonksiyonlarını düzenleyen TNF α , tümör hücre proliferasyonunu doğrudan etkiler, immun sistemi modüle eder. Bundan dolayı pek çok tümörde terapötik rolü tespit edilmiştir [123].

IL1 α ailesi molekülleri, tümör bölgelerinde yoğun bir şekilde ekspre olmaktadır ve tümörleşmeyi etkileyen potansiyel sitokinlerdir. IL1 α , Tümör invazyonu, malin hücrelerle konakçının immün sistemi arasındaki bağlantının kurulması gibi tümörleşme sürecinde her aşamada etkilidir [104].

TGF β , çeşitli hücre tiplerinde malin transformasyonu ve tümör progresyonunu destekler. TGF β üretimi kolon kanseri de dahil çeşitli kanserlerde yakın komşularıyla kıyaslandığında artış eğilimindedir [130]. Onkogenlerin baskın olduğu hücrelerin transformasyonu TGF β geninin transkripsiyonunu aktive eder [131, 132]. Kolorektal kanserde yapılan çalışmalarda, primer tümörde yüksek seviyede TGF β ekspresyonu ileri safhalarla ilişkilidir. Tümörün büyümesini etkileyen çeşitli mekanizmalar vardır. TGF β tümör immun yaşamı baskılar. TGF β iyi diferensiyeye olmuş primer kolon karsinomalarında büyümeyi inhibe edici bir etki gösterirken zayıf diferensiyeye olmuş hücrelerin invazyonunu ve proliferasyonunu teşvik eder [133]. Karsinogenezde TGF β 'nın divergent etkisi epitel hücrelerinin diferensiyeye durumuna ve proliferatif kapasitesine bağlıdır. Transformasyon meydana geldikten sonra tümör hücre yaşamını, invazyonunu ve metastazını teşvik eder [133].

Spurling ve arkadaşları, 2008 yılında kolon karsinoma hücrelerinde, tıpkı CAIX gibi pek çok kanser türünde ekspre olan Histondeasetilaz 3'ün ekspresyon seviyesine TNF α 'nın etkisini inceledikleri araştırmada; TNF α 'nın Histondeasetilazın ekspresyonunda düşüşe sebep olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, yine bu çalışmada, TNF α 'nın kolon karsinoma hücrelerindeki hücre döngüsüne baktıklarında G0/G1 safhasında hücrelerin tutuklandığını göstermişlerdir [134]. TNF α ve IFN γ kombinasyonunun, HT-29 hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir [119].

HT-29 kolon karsinoma hücrelerinde G250/MN/CA9 antijen ekspresyonu, flow sitometrik olarak analiz edildiğinde, pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi % 58,0 \pm % 18,1 olarak bulunmuştur [120].

Kimerik G250 ile tümörü hedefleyen klinik çalışmalarda, RCC hastalarında radyoimmunoterapide bu antikorun potansiyel kullanımından bahsetmişlerdir. Daha sonraki aşamalarda, bu antikorun sitokinlerle birlikte kombinasyon yapılarak kullanılabileceğini öngörmüşlerdir [135]. Kimerik G250 antikoru ile TNF α 'nın sinerjistik etkisi, RCC hastalarındaki anti-tümör etkisi yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde önemli bir çalışma olmuştur [136].

Öncelikle CAIX ekspresyonunun akış sitometrik olarak analizini yapmak için HT-29 hücreleri Tripsin EDTA yardımıyla flasktan alınıp hücre süspansiyonu hazırlandı. Yapılan okumalarda, sitokin uygulanmış örnekler ile kontrol grubu arasında ekspresyon açısından bir fark gözlenemediği için hücrelerin süspansiyon haline getirmek amaçlı başka yöntemler denenmiştir. İkinci olarak, hücre kazıyıcı ile elde ettiğimiz hücre süspansiyonunda yaptığımız CAIX okumalarında sitokin uyguladığımız örnekler ile kontrol grubu arasında anlamlı farklar bulundu. Bu optimizasyon çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlara göre adherent hücrelerden Tripsin EDTA ile elde edilen hücre süspansiyonundan CAIX ekspresyonun flow sitometrik analizi için uygun olmadığına karar verildi. Adherent hücrelerde, CAIX'un protein düzeyindeki ekspresyonunu flow sitometrik olarak çalışmak için hücre kazıyıcı kullanılarak hücre süspansiyonu hazırlanmasının uygun olabileceğini söyleyebiliriz.

Araştırmamızda ilk olarak, 24, 48 ve 72 saat sonunda, 1000U/ml TNF α ' uygulanan HT-29 hücrelerinde CAIX ekspresyonu incelendiğinde; CAIX'un ekspresyonunda, hem protein hem de mRNA düzeyinde zamana bağlı olarak azalış gözlemlendi. TNF α 'nın CAIX ekspresyonu üzerindeki azaltıcı etkisinin yanında IL1 α ve TGF β ile kombinasyonlarının da ekspresyon üzerindeki etkileri HT-29 kolon hücrelerinde araştırılmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonunda, TNF α -TGF β kombinasyonu, zamana bağlı olarak CAIX ekspresyonunda hem protein hem de mRNA düzeyinde, TNF α 'nın tek başına yaptığı etkiden daha güçlü bir düşüşe sebep olmuştur. Bundan başka, 72 saat sonunda, TNF α -IL1 α kombinasyonu da, CAIX ekspresyonunda hem protein hem de mRNA düzeyinde anlamlı bir düşüşe sebep olmuştur. TNF α ve kombinasyonlarının sebep olduğu bu azalış önemlidir ve ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir. Başka bir çalışmada TNF α 'nın yine tümörle ilişkili histondeasetilaz3 geni üzerinde yarattığı etki ile özdeşleşmektedir [134].

Buna ilaveten, TNF α ve kombinasyonları, bir taraftan kolon hücrelerini hücre döngüsünün G0/G1 evresinde tutuklarken, diğer taraftan hücrelerin nekrozuna sebep olmuştur. Dolayısı ile hücre canlılığı da bundan etkilenmiştir. Bu bulgular literatürdeki çalışmalarla desteklenmektedir [124-126, 134].

İkinci olarak, 24 saat sonunda, 1000U/ml TGF β uygulanan HT-29 hücrelerinde CAIX ekspresyonu incelendiğinde; CAIX'un ekspresyonunda, hem protein hem de mRNA düzeyinde artış gözlemlendi. Bu artış anlamlıdır ve HT-29 hücrelerinde ilk defa bulunmuştur. Aynı çalışma grubumuzdaki, Hatice Yıldırım'ın doktora tezi çalışmasında, Hep3B hücrelerinde TGF β 'nın benzer etkisi bulunmuştur. Bu anlamda iki çalışma bulguları birbirini destekler niteliktedir [137]. TGF β 'nın CAIX ekspresyonu üzerindeki artırıcı etkisinin yanında IL1 α -TGF β kombinasyonun da ekspresyon üzerindeki etkisi HT-29 kolon hücrelerinde araştırılmıştır. Bu kombinasyonun ekspresyon üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. 24 saatte gözlenen bu etki 48 ve 72 saatte gözlenememiştir [133]. TGF β ve IL1 α -TGF β kombinasyonunu, HT-29 kolon hücrelerinde hücre döngünde bir değişim yaratmamıştır. Ayrıca hücrenin canlılığı ve nekrozunda da önemli bir değişim bulunamamıştır.

IL1 α uygulanmış HT-29 hücrelerindeki CAIX ekspresyonunda, kontrol grubuna göre bir fark gözlenmemiştir. IL1 α 'nın HT-29 hücrelerinde hücre döngüsüne, hücre canlılığı ya da hücre nekrozuna etkisi gözlenmemiştir.

Özet olarak bu çalışma ile, kolon adenoma karsinoma hücresi olan HT-29 hücresinde, üç farklı sitokin CAIX gen ekspresyonu üzerine etkileri hem mRNA hemde protein düzeyinde gösterilmiştir. Ayrıca uygulanan sitokinlerin apoptotik ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri de değerlendirilmiştir. Özellikle sitokin kombinasyonlarının sinerjistik yada antogonistik etkileri olduğu da çalışmamızda 3 farklı sitokin kombinasyonu ile gösterilmiştir. Sitokinlerin hücre bazda pek çok fizyolojik olayı kontrol ettikleri düşünüldüğünde tümör ilişkili olarak adlandırılan hatta prognostik bir tümör belirteci olarak ifade edilen CA9 ile etkilerinin belirlenmesi oldukça önemli olmasına rağmen konuyla ilgili literatürdeki bir boşluk göze çarpmaktadır. Bu çalışma bu konuyla ilgili çalışmalar için bir başlangıç niteliğini taşımaktadır.

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan sitokinler ve sitokin kombinasyonlarının farklı zaman aralıklarında HT29 hücrelerindeki CAIX ekspresyonu, hücre döngüsü, apoptozis, hücre canlılığı ve nekrozuna olan etkilerinin şematik gösterimi (↓: Azalış, ↑: Artış, ↔: Değişim yok)

Sitokinler	Saat	CAIX Protein Ekspresyonu	CA9 RNA Ekspresyonu	Hücre Döngüsü	Hücre Canlılığı	Hücre Nekrozu	Apoptozis
TNFα	24	↓	↓	GO/G1 tutuklanma	↓	↑	↔
	48	↓	↓	GO/G1 tutuklanma	↓	↑	↔
	72	↓	↓	GO/G1 tutuklanma	↓	↑	↔
TGFβ	24	↑	↑	↔	↔	↔	↔
	48	↔	↔	↔	↔	↔	↔
	72	↔	↔	↔	↔	↔	↔
IL1α	24	↔	↔	↔	↔	↔	↔
	48	↔	↔	↔	↔	↔	↔
	72	↔	↔	↔	↔	↔	↔
IL1α-TNFα	24	↓	↓	GO/G1 tutuklanma	↓	↑	↔
	48	↓	↓	GO/G1 tutuklanma	↓	↑	↔
	72	↓	↓	GO/G1 tutuklanma	↓	↑	↔
IL1α-TGFβ	24	↔	↔	↔	↔	↔	↔
	48	↔	↔	↔	↔	↔	↔
	72	↔	↔	↔	↔	↔	↔
TNFα-TGFβ	24	↓	↓	GO/G1 tutuklanma	↓	↑	↔
	48	↓	↓	GO/G1 tutuklanma	↓	↑	↔
	72	↓	↓	GO/G1 tutuklanma	↓	↔	↔

5. KAYNAKLAR

- [1] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kanser>.
- [2] Winum, JY., Rami, M., Scozzafava, A., Montero, JL., Supuran, C., "Carbonic Anhydrase IX: A New Druggable Target for the Design of Antitumor Agents", *Med Res Rev*, 28(3), (2008), 445-463.
- [3] Pastorekova, S. and Pastorek, J., Cancer-related carbonic anhydrase isozymes. In: Spuran CT, Scozzafava A, Conway J, editors., *Carbonic anhydrase-Its inhibitors and activators*, Boca Raton (FL), (2004), 253-280.
- [4] Supuran, C., Carbonic anhydrase as drug targets-an overview. *Curr Top Med Chem*, 2007. 7: p. 825-833.
- [5] Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. and Supuran, CT., "Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy", *Expert Opin Ther Pat*, 16(12), (2006), 1627-1664.
- [6] Pastorek, J., Pasterokova, S., Callebaut, I., Mornon, JP., Stanbridge, EJ., Zelnik, V., Opavsky, R., Zatovicova, M., Potetelle, D., "Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and putative helix-loop-helix DNA binding segment", *Oncogene*, 9, (1994), 2788-2888.
- [7] Opavsky, R., Pasterokova, S., Zelnik, V., Gibadulinova, A., Stanbridge, EJ., Zavada, J., Kettman, R., Pastorek, J., "Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: Structure and exon to protein domain relationships", *Genomics*, 33(3), (1996), 480-487.
- [8] Türeci, O., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, s., Göttert, E., Seitz, G., Parkkila, AK., Shah, GN., Grubb, JH., Pfreundschuh, M., Sly, WS., "Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression and chomosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cancers", *Proc Natl Acad Sci*, 95, (1998), 7608-7613.
- [9] Harris, A., "Hypoxia-A key regulatory factor in tumor growth", *Nat Rev Cancer*, 2, (2002), 38-47.

- [10] Potter, CPS. and Harris, AL., "Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer", *Br J Cancer*, 89(1), (2003), 2-7.
- [11] Kaluz, S., et al., "Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show?", *Biochim Biophys Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1795, (2009), 162-172
- [12] Wykoff, C., Beasley, NJ., Watson PH., Turner, KJ., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, GD., Turley, H., Talks, KL., Maxwell, PH., Pugh, CW., Ratcliffe, PJ., Harris, AL., "Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases", *Cancer Res*, 60, (2000), 7075-83.
- [13] Ivanov, S., Liao, SY., Ivanova, A., Danilkovitch-Miaqkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., Merrill, MJ., Proescholdt, MA., Oldfield, EH., Lee, J., Zavada, J., Waheed, A., Sly, W., Lerman, MI., Stanbridge, EJ., "Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer", *Am J Pathol*, 158(3), (2001), 905-919.
- [14] Supuran, C. and Scozzafava, A., "Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry", *Bioorg Med Chem*, 15, (2007), 4336-4350.
- [15] Supuran, CT., Scozzafava, A. and Casini, A., "Carbonic anhydrase inhibitors", *Med Res Rev*, 23(2), (2003),146-189.
- [16] Liao, S.Y., Ivanov, S., Ivanova, A., Ghosh, S., Cote, M.A., Keefe, K., Coca-Prados, M., Stanbridge, E.J., Lerman, M.I., "Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12 (CAXII) in glaucoma", *J Med Genet*, 2003. 40(4): p. 257-261.
- [17] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J., "Carbonic Anhydrase—Its Inhibitors and Activators", *Boca Raton (FL)*, (2004), 351-363.
- [18] Hewett-Emmett, D. and Tashian, R.E., "Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the [alpha]-, [beta]-, and [gamma]-carbonic anhydrase gene families", *Mol Phylogen and Evol*, 5(1), (1996), . 50-77.
- [19] Supuran, C., *Carbonic Anhydrase Inhibitors and Activators*, 2004.
- [20] Almajan, G.L., Innocenti, A., Puccetti, L., Manole, G., Barbuceanu, S., Saramet, I., Scozzafava, A., Supuran, C.T., "Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the cytosolic and tumor-associated carbonic anhydrase isozymes

I, II, and IX with a series of 1,3,4-thiadiazole- and 1,2,4-triazole-thiols", *Bioorg Med Chem Letters*, 15(9), (2005), 2347-2352.

- [21] Bonapace, G., Iuliano, F., Molica, S., Peta, A., Strisciuglio, P., "Cytosolic carbonic anhydrase activity in chronic myeloid disorders with different clinical phenotype", *Biochim Biophys Acta*, 1689(3), (2004), 179-181.
- [22] Hilvo, M., *Expression studies on carbonic anhydrase IX*, Master Thesis, Institute of Medical Department, University of Tampere, Italy, (2005)
- [23] Chegwidde, W. and Carter, N., "Introduction to the carbonic anhydrases. In: *Chegwidden WR, Carter ND and Edwards YH (eds), The carbonic anhydrases*. New Horizons, Birkhauser Verlag, 2000: p. 13-28.
- [24] Parkkila, S., "Significance of pH regulation and carbonic anhydrases in tumor progression and implications for diagnostic and therapeutic approaches", *BJU International*, 101(4), (2008), 16-21.
- [25] Parkkila, S. and 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, (1996), 305-17.
- [26] Gramlich, T., Hennigar, R.A., Spicer, S.S., Schulte, B.A., "Immunohistochemical localization of sodium-potassium-stimulated adenosine triphosphatase and carbonic anhydrase in human colon and colonic neoplasms", *Arch Pathol Lab Med*, 114, (1990), 415-9.
- [27] Leppilampi, M., Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX, Department of Clinical Chemistry & Department of Pathology, Oulu University, Oulu, (2006)
- [28] Leppilampi, M., Parkkila, S., Karttunen, T., Gut, M.O., Gross, G., Sjoblom, M., "Carbonic anhydrase isozyme-II-deficient mice lack the duodenal bicarbonate secretory response to prostaglandin E-2", *Proc Natl Acad Sci*, 102(42), (2005), 15247-15252.
- [29] Kim, S.J., Rabbani, Z.N., Vollmer, R.T., Schreiber, E.G., Oosterwijk, E., Dewhirst, M.W., Vujaskovic, Z., Kelley, M.J., "Carbonic anhydrase IX in early-stage non-small cell lung cancer", *Clin Cancer Res*, 10(23), (2004), 7925-7933.
- [30] Lynch, C.J., Brennan, W.A., Vary, T.C., Carter, N., Dodgson, S.J., "Carbonic anhydrase III in obese Zucker rats", *Am J Physiol*, 264(4 Pt 1), (1993), 621-630.

- [31] Hilvo, M., Rafajova, M., Pastorekova, S., Pastorek, J., Parkkila, S., "Expression of carbonic anhydrase IX in mouse tissues", *J Histochem Cytochem*, 52(10), (2004), 1313-1321.
- [32] Vaananen, H.K, Syrjala, H., Rahkila, P., Vuori, J., Melamies, L.M., Myllyla, V., Takala, T.E., "Serum carbonic anhydrase III and myoglobin concentrations in acute myocardial infarction", *Clin Chem*, 36, (1990), 635-638.
- [33] Beuerle, J.R., Azzay, H.M., Styba, G., Duh, S.H., Christenson, R.H., "Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise and myocardial infarction patients", *Clin Chim Acta*, 295, (2000), 215-228.
- [34] Lethonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivela, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S., "Characterization of CA VIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family", *J Biol Chem*, 279, (2004), 2719-2727.
- [35] Fernley, G., "Secreted carbonic anhydrases", *From Biochemistry and Genetics to Physiology and Clinical Medicine*, (1991), 178-185.
- [36] Fernley, R., Wright, R. and Coghlan, J. "A novel carbonic anhydrase from the ovine parotid gland", *FEBS Lett*, 105, (1979), 299-302.
- [37] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Juvonen, T., Rajaniemi, H., "Distribution of carbonic anhydrase isoenzymes I, II and VI in the human alimentary tract", *Gut*, 35, (1994), 646-50.
- [38] Miyaji, E., Nishimori, I., Taniuchi, K., Takeuchi, T., Ohtsuki, Y., Onishi, S., "Overexpression of carbonic anhydrase-related protein VIII in human colorectal cancer", *J Pathol*, 201(1), (2003), 37-45.
- [39] Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H, Shah GN, Grubb JH, Waheed A, Sly WS., "Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain", *Proc Natl Acad Sci*, 98, (2001), 1918-1923.
- [40] Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., "Characterization CAXV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase", *Biochem J*, 392, (2005), 83-92.

- [41] Kivela, A.J., Saarnio, J., Karttunen, T.J., Kivela, J., Parkkila, A.K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, T.S., Rajaniemi, H., "Differential expression of cytoplasmic carbonic anhydrases, CA I and II, and membrane-associated isozymes, CA IX and XII, in normal mucosa of large intestine and in colorectal tumors", *Digestive Diseases and Sciences*, 46(10), (2001), 2179-2186.
- [42] Pastorekova, S., Zavadova, Z., Kostal, M., Babusikova, O., Zavadova, J., "A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two component system", *Virology*, 187, (1992), 620-6.
- [43] Pastorek, J., Pastorekova, S., Callebaut, I., Mornon, JP., Stanbridge, EJ., Zelnik, V., Opavsky, R., Zatovicova, M., Potetelle, D., "Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and putative helix-loop-helix DNA binding segment", *Oncogene*, 9, (1994), 2788-2888.
- [44] Opavsky, R., Pastorekova, S., Zelnik, V., Gibadulinova, A., Stanbridge, EJ., Zavadova, J., Kettman, R., Pastorek, J., "Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: Structure and exon to protein domain relationships", *Genomics*, 33(3), (1996), 480-487.
- [45] Ivanov, S.V., Kuzmin, I., Wei, M-H., Pack, S., Geil, L., Jhonson, B.E., Stanbridge, E.J., Lerman, M.I., "Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel Lindau transgenes", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, (1998), 12596-12601.
- [46] Pastorekova, S., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Opavsky, R., Zelnik, V., Saarnio, J., Pastorek, J., "Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: Analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts", *Gastroenterology*, 112(2), (1997), 398-408.
- [47] 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., Zavadova, 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. of Pathol.*, 158, (2001), 905-919.
- [48] Dorai, T., Sawczuk, I.S., Pastorek, J., Wiernik, P.H., Dutcher, J.P., "The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer", *Eur J Cancer*, 41(18), (2005), 2935-2947.
- [49] Simi, L., Venturini, G., Melantacchi, F., Gelmini, S., Andreani, M., Janni, A., Pastorekova, S., Supuran, C.T., Pazzagli, M., Orlando, C., "Quantitative analysis of carbonic anhydrase IX mRNA in human non-small cell lung cancer", *Lung Cancer*, 52(1), (2006), 59-66.

- [50] Chrastina, A., Pastorekova, S. and Pastorek, J., "Immunotargeting of human cervical carcinoma xenograft expressing CA IX tumor-associated antigen by I-125-labeled M75 monoclonal antibody", *Neoplasma*, 50(1), (2003), 13-21.
- [51] Grabmaier, K., de Weijert, M., Uemura, H., Schalken, J., Oosterwijk, E., "Renal cell carcinoma-associated G250 methylation and expression: in vivo and in vitro studies", *Urology*, 60(2), (2002), 357-62.
- [52] Haapsalo, J.A., Nordfors, K.M., Hilvo, M., Rantala, I.J., Soini, Y., Parkkila, A.K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Parkkila, S.M., Haapsalo, H.K., "Expression carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis", *Clin Cancer Res.*, 12(2), (2006), 473-7.
- [53] Kim, S.J., Rabbani, Z.N., Dewhirst, M.W., Vujaskovic, Z., Vollmer, R.T., Schreiber, E.G., Oosterwijk, E., Kelley, M.J., "Expression of HIF-1[alpha], CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer", *Lung Cancer*, 49(3), (2005), 325-335.
- [54] Maseide, K., Kandel, R.A., Bell, R.S., Catton, C.N., O'Sullivan, B., Wunder, J.S., Pintilie, M., Hedley, D., Hill, R.P., "Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma", *Clin Cancer Res.*, 10(13), (2004), 464-71.
- [55] Bui, M.H., Visapaa, H., Seligson, D., Kim, H., Han, K.R., Huang, Y., Horvath, S., Stanbridge, E.J., Palotie, A., Figlin, R.A., Belldegrun, A.S., "Prognostic value of carbonic anhydrase IX and KI67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma", *J Urol*, 171 (6), (2004), 2461-2466.
- [56] Watson, P.H., Chia, S.K., Wykoff, C.C., Han, C., Leek, R.D., Sly, W.S., Gatter, K.C., Ratcliffe, P., Harris, A.L., "Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma", *Br J Cancer*, 88(7), (2003), 1065-1070.
- [57] Li, G., Passebosch-faure, K., Feng, G., Lambert, C., Cottier, M., Gentil-Perret, A., Fournel, P., Perol, M., Genin, C., "MN/CA9: a potential gene marker for detection of malignant cells in effusions", *Biomarkers*, 12(2), (2007), 214-220.
- [58] Liao, S., Aurelio, O.N., Jan, K., Zavada, J., Stanbridge, E.J., "Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney", *Cancer Res.*, 57, (1997), 2827-2831.
- [59] Mckiernan, J., Buttyan, R., Bander, N.H., Stifelman, M.D., Katz, A.E., Chen, M.W., Olsson, C.A., Sawczuk, I.S., "Expression of the tumor-associated gene

MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma", *Cancer Res*, 57, 2362-2365.

- [60] Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Haukipuro, K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Kairaluoma, M.I., Karttunen, T.J., "Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation", *Am J Pathol*, 153(1), (1998), 279-285.
- [61] Jarvela, S., Parkkila, S., Bragge, H., Kahkonen, M., Parkkila, A.K., Soini, Y., Pastorekova, S., Pastorek, J., Haapsola, H., "Carbonic anhydrase IX in oligodendroglial brain tumors", *BMC Cancer*, 8(1), (2008), 1471-2407.
- [62] Kim, S.J., et al., "Expression of HIF-1 alpha, CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer", *Lung Cancer*, 49(3), (2005), 325-335.
- [63] Lee, S., Shin, H.J., Han, I.O., Hong, E.K., Park, S.Y., Roh, J.W., Shin, K.H., Kim, T.H., Kim, J.Y., "Tumor carbonic anhydrase 9 expression is associated with the presence of lymph node metastases in uterine cervical cancer", *Cancer Science*, 98(3), (2007), 329-333.
- [64] Milani, M. and Harris, A., "Targetting tumour hypoxia in breast cancer", *Eur J Cancer*, 44, (2008), 2766-2773.
- [65] Goonewardene, H.M., Sowter, H.M. and Harris, A., "Hypoxia-induced pathways in Breast Cancer", *Microscopy Research and Technique*, 59, (2002), 41-48.
- [66] Vermylen, P., Roufosse, C., Burny, A., Verhest, A., Bosschaerts, T., Pastorekova, S., Ninane, V., Sculier, J.P., "Carbonic anhydrase IX antigen differentiates between preneoplastic malignant lesions in non-small cell lung carcinoma", *Eur Respir J*, 14(4), (1999), 806-811.
- [67] Stewart, M., Talks, K., Leek, R., Turley, H., Pezzella, F., Harris, A., Gatter, K., "Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma", *Histopathology*, 40(3), (2002), 253-260.
- [68] Kaluz, S., Kaluzova, M. and Stanbridge, E.J. "The role of extracellular signal-regulated protein kinase in transcriptional regulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX", *J Cell Biochem*, 97(1), (2006), 207-216.
- [69] Wykoff, 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 tumor-associated carbonic anhydrases", *Cancer Res*, 60, (2000), 7075-83.
- [70] Kaluz, S., Kaluzova, M., Opavsky, R., Pastorekova, S., Gibadulinova, A., Dequiedt, F., Kettmann, R., Pastorek, J., "Transcriptional regulation of the MN/CA 9 gene coding for the tumor-associated carbonic anhydrase IX - Identification and characterization of a proximal silencer element", *J Biol Chem*, 274(46), (1999), 32588-32595.
- [71] Kaluz, S., Kaluzova, M. and Stanbridge, E., "Rational design of minimal hypoxia-inducible enhancers", *Biochem Biophys Res Com*, 370(4), (2008), 613-618.
- [72] Semenza, G.L., "Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences", *Biochem Pharmacol*, 59(1), (2000), 47-53.
- [73] Kaelin, J.W., "Proline Hydroxylation and Gene Expression", *Annu Rev Biochem*, 74, (2005), 115-128.
- [74] Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J., "C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation", *Cell*, 107(1), (2001), 43-54.
- [75] Kim, W.K., Kaelin, W.G., "Role of VHL gene mutation in human cancer", *J Clin Oncol*, 22, (2004), 4991-5004.
- [76] Potter, C., Harris, A.L., "Hypoxia Inducible Carbonic Anhydrase IX, Marker of Tumor Hypoxia, Survival Pathway and Therapy Target", *Cell Cycle*, 3(2), (2003), 164-167.
- [77] Grabmaier, K., Weijert, M.C., Verhaegh, G.W., Schalken, J.A., Oosterwijk, E., "Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1 alpha in clear cell renal cell carcinoma", *Oncogene*, 23(33), (2004), 5624-5631.
- [78] Kaluz, S., Kaluzova, M. and Stanbridge, E.J., "Expression of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX is critically dependent on SP1 activity. Identification of a novel type of hypoxia-responsive enhancer", *Cancer Res*, 63(5), (2003), 917-922.
- [79] Kaluzova, M., Pastorekova, S., Savastova, E., Pastorek, J., Stanbridge, E.J., Kaluz, S., "Characterization of the MN/CA 9 promoter proximal region: a role for specificity protein (SP) and activator protein 1 (AP1) factors", *Biochem J*, 359, (2001), 669-677.

- [80] Laderoute, K., "The interaction between HIF-1 and AP-1 transcription factors response to low oxygen,semin", *Cell Dev Biol* , **16**(4-5), (2005), 502-513.
- [81] Michiels, C., Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Piret, J.P., Raes, M., "HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases", *Iubmb Life* , 52(1-2), (2001), 49-53.
- [82] Kopacek, J., Barathova, M., Dequiedt, F., Sepelakova, J., Kettmann, R., Pastorek, J., Pasterokova, S., "MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX", *Biochim Biophys Acta* , 1729(1), (2005), 41-49.
- [83] Kaluz, S., Kaluzova, M., Chrastina, A., Olive, P.L., Pastorekova, S., Pastorek, J., Lerman, M.I., Stanbridge, E.J., "Lowered oxygen tension induces expression of the hypoxia marker MN/carbonic anhydrase IX in the absence of hypoxia-inducible factor 1 alpha stabilization: A role for phosphatidylinositol 3 '-kinase", *Cancer Res*, 62(15), (2002), 4469-4477.
- [84] Kim HL, Sun X, Subjeck JR, Wang XY., "Evaluation of renal cell carcinoma vaccines targeting carbonic anhydrase IX using heat shock protein 110", *Cancer Immunol Immunother*, 56(7), (2007), 1097-1105.
- [85] Atkins, M.B., "High carbonic anhydrase IX expression predicts for renal cancer response to IL-2 therapy", *J Immunother*, 26(6), (2003), 39.
- [86] Driessen, A., Landuyt, W., Pastorekova, S., Moons, J., Goethals, L., Haustermans, K., Naftoux, P., Penninckx, F., Geboes, K., Lerut, T., Ectors, N., "Expression of carbonic anhydrase IX (CA IX), a hypoxia-related protein, rather than vascular-endothelial growth factor (VEGF), a pro-angiogenic factor, correlates with an extremely poor prognosis in esophageal and gastric adenocarcinomas", *Ann Surg*, 243(3), (2006), 334-340.
- [87] Sun, D., Matsune, S., Otori, J., Fukuiwa, T., Ushikai, M., Kuroni, Y., "TNF- α and endotoxin increase hypoxia-induced VEGF production by cultured human nasal fibroblasts in synergistic fashion", *Auris Nasus Larynx*, 32(3), (2005), 243-249.
- [88] Schling, P., et al., "Expression of tumor necrosis factor alpha and its receptors during cellular differentiation", *Cytokine*, 33, (2006), 239-245.
- [89] Potter, C. and Harris, A.L., "Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumor hypoxia, survival pathway and therapy target", *Cell Cycle*, 3(2), (2004), 164-167.

- [90] Robertson, N., Potter, C. and Harris, A.L., "Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion", *Cancer Res*, 64(17), (2004), 6160-6165.
- [91] Blok, V.T., Gelderman, K.A., Tjisma, O.H.M., Daha, M.R., Gorter, A., "Cytokines affect resistance of human renal tumour cells to complement-mediated injury", *Scand J Immunol*, 57, (2003), 591-599.
- [92] Jubb, A.M., Pham, T.Q., Hanby, A.M., Frantz, G.D., Peale, F.V., Wu, T.D., Koeppen, H.W., Hillan, K.J., "Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor 1 alpha and carbonic anhydrase IX in human tumours", *J Clin Pathol*, 57, (2004), 504-512.
- [93] Sudhir, G., "A Decision between life and death during TNF- α -induced signaling", 22(4), (2002).
- [94] Idriss, H., Naismith, JH., "TNF α and TNF Receptor Superfamily: Structure-Function relationship(s)", *Mic Res Tech*, 50, (2000), 184-195.
- [95] Beyaert, R., Fiers, W., "Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity What we do understand and what we do not", *FEBS Lett*, 340, (1994), 9-16.
- [96] Wajant, H., Grell, M., Scheurich, P., "TNF receptor associated factors in cytokine signaling", *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 10(1), (1999), 15-26.
- [97] Arch, R., Thompson, C.B., "4-1BB and OX40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor sub-family that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor κ -B", *Mol Cell Biol*, 18, (1998), 558-65.
- [98] Lee, S., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, KA., Nussenzweig, MC., and Choi, Y., "TRAF2 is essential for JNK but not NF- κ -B activation and regulates lymphocyte proliferation and survival", *Immunity*, 7, (1997), 703-13.
- [99] Roberts, A., "TGF- β signaling from receptors to the nucleus", *Microbes and Infection*, (1999), 1265-1273.
- [100] Huang, S. and Huang, J. "TGF- β Control of Cell Proliferation", *J Cell Biochem*, 96, (2005), 447-462.

- [101] Akhurst, R.J., Derynck, R., "TGF-13 signaling in cancerta double-edged sword", *Trends Cell Biol* , 11(11) , (2001), 44-51.
- [102] Jakowlew, S., "Transforming growth factor-B in cancer and metastasis", *Cancer Met Rev*, 25, (2006), 435-457.
- [103] Apte, R. and Voronov, E., "Is interleukin-1 a good or a bad guy in tumor immunobiology and immunotherapy?", *Immunological Rev*, 222, (2008) , 222-241.
- [104] Apte, R.N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M.R., Reich, E., Carmi, Y., Song, X., Dvozkin, T., Krelin, Y., Voronov, E., "The involvement IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions", *Cancer Met Rev*, 25(3), (2006), 387-408.
- [105] American Society of Cancer, *Cancer facts and figures*, (2008): Atlanta, Georgia.
- [106] Niemela, A., Hynninen, P., Mecklin, JP., Kuopio, T., Aaltonen, L., et al., "CarboEnic Anhydrase IX is Highly Expressed in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(9) , (2007), 1760-1766.
- [107] Hu, M., Polyak, K., "Microenvironmental regulation of cancer development" , *Curr. Opin. Genet. Dev*, 18(1), (2008), 27-34.
- [108] Rademakers, S.E., Span, P.N., Kaanders, H.A.M., J., Sweep, F.C. G. J., van der Kogel, A.J., Bussink, J., "Molecular aspects of tumour hypoxia", *Molecular Oncology*,2, (2008), 41-53.
- [109] Parkkila, S., "Significance of pH regulation and carbonic anhydrases in tumour progression and implications for diagnostic and therapeutic approaches", *BJU International*, 101, (2008), 16-21.
- [110] Pastorekova, S., Pastorek, J., "Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia", *BJU International* , 101(s4), (2008), 8-15.
- [111] Saarnio, J., Parkkila, A.K., Haukipuro, K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Kairaluoma, MI., Karttunen, TJ., "Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CAIX, with potential value as a marker of cell proliferation", *Am J Pathol*, 153, (1998), 279-285.

- [112] Holt, P., Moss, SF., Kapetanakis, AM., Petros, A., Wang, S., "Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen?", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6, (1997), 131-135.
- [113] Saarnio, J., et al., "Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46(4), (1998), 497-504.
- [114] Nogradi, A., "The role of Carbonic Anhydrases in Tumors", *Am J Pathol*, (1998), 153.
- [115] 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-9 expression, angiogenesis and prognosis in rectal cancer", *American Society of Colorectal Surgeons*, (2006).
- [116] Rasheed, S., McDonald, P.J., John, M., Northover, J., Guenther, T., "Angiogenesis and hypoxic factors in colorectal cancer", *Pathology-Research and Practice*, 204, (2008), 501-510.
- [117] Chrastina, A., Zavada, J., Parkkila, S., Kaluz, S., Kaluzova, M., Rajcani, J., Pastorek, J., Pastorekova, S., "Biodistribution and pharmacokinetics of I-125-labeled monoclonal antibody M75 specific for carbonic anhydrase IX, an intrinsic marker of hypoxia, in nude mice xenografted with human colorectal carcinoma", *Int J Cancer*, 105(6), (2003), 873-881.
- [118] Schottenfield, D., "Epidemiology of Colorectal Cancer", *McGraw-Hill Inc.*, (1995), 11-23.
- [119] Evans, M., Jones, DP. and Ziegler, T., "Glutamine Prevents Cytokine-Induced Apoptosis in Human Colonic Epithelial Cells", *Biochemical and Molecular Actions of Nutrients*, (2003), 3065-3071.
- [120] Li, G., Passebosch-Faure, K., Lambert, C., Gentil-Perret, A., Blanc, F., Oosterwijk, E., Mosnier, J.F., Genin, C., Tostain, J., "The Expression of g250/MN/CA9 Antigen by Flow Cytometry: Its Possible Implication for Detection of Micrometastatic renal Cancer Cells", *Clin Cancer Res*, 7(1), (2001), 89-92.
- [121] Dinarello, C., "The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer", *Cancer and Met Rev*, 25, (2006), 307-313.

- [122] Balkwill, F., Charles, KA., Mantovani, A., "Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease", *Cancer Cell*, 1, (2005), 211-217.
- [123] Borden, E., Sondel, PM., "Lymphokines and cytokines as cancer treatment", *Cancer*, 65, (1990), 800-814.
- [124] Munker, M., Munker, R., Saxton, RE., Koeffler, HP., "Effect of recombinant monokines, lymphokines, and other agents on clonal proliferation of human lung cancer cell lines", *Cancer Res*, 47, (1987), 4081-4085.
- [125] Sugarman, B., Aggarwal, BB., Hass, PE., Figari, IS., Palladino, MA., Shepard, HM., "Recombinant human tumor necrosis factor- alpha: Effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro", *Science*, 230, (1985), 943-945.
- [126] Ruggiero, V., Latham, K., Baglioni, C., "Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells", *J Immunol*, 138, (1987), 2711-2717.
- [127] Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallman, R., Gautschi, P., Bohlen, P., "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo", *Proc Natl Acad Sci*, 84, (1987), 5277-5281.
- [128] Sato, N., Goto, T., Haranaka, K., "Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: Morphology modulation, growth inhibition, and cytotoxicity", *JNCI*, 76, (1987), 1113-1121.
- [129] Kehrl, J., Alvarez-Mon, M., Delsing, GA., Fauci, AS., "Lymphoxin is an important T cell-derived growth factor for human B cells", *Science*, 238, (1987), 1144-1146.
- [130] Derynck, R., Goeddel, DV., Ullrich, A., Gutterman, JU., WilliamsRD., Bringman TS., Berger, WH., "Synthesis messenger RNA for transforming growth factor a and b and the epidermal growth factor receptor by human tumors", *Cancer Res*, 47, (1987), 707-712.
- [131] Birchenall-Roberts, M., Ruscetti, FW., Kasper, J., Lee, HD., 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, (1990), 4978-4983.

- [132] Geiser, A., Kim, S., Roberts, AB., Sporn, MB., "Characterization of the mouse transforming growth factor-B1 promoter and activation by the Ha-ras oncogene", *Mol Cell Biol*, 11, (1991), 84-92.
- [133] Roman, C., Saha, D., Beauchamp, D., "TGF-b and colorectal carcinogenesis", *Microscopy Research and Technique*, 52, (2001), 450-457.
- [134] Spurling, C., Godman, CA., Noonan, EJ., Rasmussen, TP., Rosenberg, DW., Giardina, C., "HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. molecular carcinogenesis", 47, (2008), 137-147.
- [135] Liu, Z., Smyth, F.E., Renner, C., Lee, F.T., Oosterwijk, E., Scott, A.M., "Anti-renal cell carcinoma chimeric antibody G250: cytokine enhancement of in vitro anti body-dependent cellular cytotoxicity", *Cancer Immunol Immunother*, 51(3), (2002), 171-177.
- [136] Bauer, S., Oosterwijk, E., Adrian, N., Oosterwijk-Wakka, JC., Fischer, E. et al., "Targeted therapy of Renal Cell Carcinoma: Synergistic Activity of cG250-TNF and IFNgamma", *International Journal of Cancer*, (2009), 1-31.
- [137] Yıldırım, H., Kockar, F., "TGF-B upregulates tumor-associated carbonic anhydrase IX gene expression in Hep3B cells", *Cell Biology International*, (2009), 1-6.