T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLON KANSER HÜCRE HATTINDA KARBONİK ANHİDRAZ IX İNHİBİSYONUNUN EZH2 GENİ VE HİSTON 3 MODİFİKASYONLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

İbrahim KARAKUŞ

TIBBİ BİYOLOJİ AD / KANSER BİYOLOJİSİ DOKTORA PROGRAMI

Ankara, 2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLON KANSER HÜCRE HATTINDA KARBONİK ANHİDRAZ IX İNHİBİSYONUNUN EZH2 GENİ VE HİSTON 3 MODİFİKASYONLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

İbrahim KARAKUŞ

TIBBİ BİYOLOJİ AD/KANSER BİYOLOJİSİ DOKTORA PROGRAMI

Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 5563 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ankara, 2021

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim. 15.06.2021

İbrahim KARAKUŞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince beni hep destekleyen, deneyimlerinden yararlandığım, hoşgörüsü ile yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e en derin minnet ve şükranlarımı sunmak isterim. Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN'a ve eğitimim süresince desteklerini her zaman hissettiğim Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimim ve tez dönemi boyunca birlikte çalıştığım, desteklerini hep hissettiğim bölüm arkadaşlarım Arş. Gör. Beyza Ecem ÖZ BEDİR ve Arş. Gör. Emine TERZİ'ye teşekkür ediyorum. Ayrıca Arş. Gör. Tuğba Kevser UYSAL ve Arş. Gör. Elif ERCAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca hep motive eden Prof. Dr. Doğan YÜCEL hocama, Doç. Dr. Ahmet Cevdet CEYLAN, Doç. Dr. Taha BAHSİ, Dr. Onur BENDER, Moleküler Biyolog Fatma DEMİRCİOĞLU'ya teşekkür ediyorum.

5563 nolu proje ile doktora tezime destek veren Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ediyorum.

Tüm eğitim sürecim ve yaşantım boyunca gösterdiği anlayış, sabır, fedakarlık ve destek için değerli eşime ve her zaman yaşam kaynağım olan çocuklarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

ABSTRACT v

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

TABLOLAR DİZİNİ ix

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Kolon Kanseri 5

2.2. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi 7

2.3. Kolorektal Kanser Sınıflandırması 7

2.4. Kolon Kanserinde Risk Faktörleri 8

2.5. Kolon Kanserinde Teşhis 8

2.6. Kolon Kanserinin Moleküler Temelleri 9

2.6.1. Genomik Kararsızlık 10

2.6.2. Kromozomal Kararsızlık 11

2.6.3. MikroSatellit Kararsızlığı 11

2.6.4. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnaktivasyonu 12

2.6.5. Onkogenlerin Aktivasyonu 12

2.7. Kolon Kanseri ve Epigenetik Mekanizmalar 13

2.7.1. DNA Metilasyonu 13

2.7.2. Histon Modifikasyonları 14

2.7.2.1. Histon Asetilasyonu 16

2.7.2.2. Histon Metilasyonu 17

2.7.2.3. Histon Fosforilasyonu 19

2.7.3. Kromatin Yeniden Düzenleme 19

2.7.4. Kodlama İşlevi Görmeyen RNA'lar 20

2.7.5. EZH2 Geni 20

2.8. Tümör Mikroçevresi ve Hipoksi 22

2.9. HIF1 Rolü 24

2.10. Karbonik Anhidraz Enzim Ailesi 26

2.10.1. Karbonik Anhidraz Enzim Ailesi Üyeleri 26

2.10.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması 27

2.10.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri 28

2.10.4. Tümör İlişkili Karbonik Anhidrazlar 29

2.10.5. Karbonik Anhidraz-IX 30

2.10.6. Karbonik Anhidraz IX ve Epigenetik Mekanizmalarla Olan İlişkisi 32

3. MATERYAL VE YÖNTEM 34

3.1. Materyal 34

3.1.1. Sarf Malzemeler 34

3.1.2. Makine-Teçhizat 34

3.2. Yöntem 35

3.2.1. Hücre Kültürü 35

3.2.2. Hücre Sayımı 36

3.2.3. Hücre Çoğalma ve Canlılık Deneyleri 36

3.2.4. İnhibitör Uygulanması 37
3.2.5. pH Öçümü 38
3.2.6. Total Histon Protein İzolasyonu 39
3.2.7. Histon H3 Modifikasyonları Analizi 40
3.2.8. RNA İzolasyonu 42
3.2.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi 44
3.2.10. Gen Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi 45
3.2.11. İstatistiksel Analiz 46
4. BULGULAR 47
4.1. Hücre Kültürü Sonuçları 47
4.2. Hücre Canlılık Testi ve İnhibisyon Sonuçları 48
4.3. pH Değişimi 50
4.4. Total Histon Protein İzolasyonu 51
4.5. Histon H3 Modifikasyonları Analizi 51
4.6. Gen Ekspresyon Sonuçları 58
4.6.1. Normoksik koşullarda CA IX Enzim İnhibisyonunun Etkisi ... 58
4.6.2. Hipoksik koşullarda CA IX Enzim İnhibisyonunun Etkisi 61
5. TARTIŞMA 65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 70
7. KAYNAKLAR 73
8. EKLER 94
8.1. EK-1. Özgeçmiş 94

ÖZET

Kolon Kanser Hücre Hattında Karbonik Anhidraz IX İnhibisyonunun EZH2 Geni ve Histon 3 Modifikasyonlar Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Kolorektal kanser, yüksek morbidite ve mortalite oranları ile dünya çapında en sık görülen gastrointestinal kanserlerden biridir. Kolorektal kanser malign forma dönüştükçe çeşitli genetik ve moleküler değişiklikler meydana gelmektedir. Anormal metillenmiş genler, DNA anormallikleri ve CpG adacık metilasyon fenotipi gibi genomik ve histon modifikasyonları, gibi epigenomik değişiklikler görülmektedir. Tümör hücreleri değişen mikro ortamın gereksinimlerine uyacak şekilde düzenlemeler gerçekleştirir. Tümörlerin ortak özelliği olan hipoksinin neden olduğu asidozda, CO_2/bikarbonat transportu, pH, CO_2, hemeostasiz, tümörleşme gibi birçok fizyolojik olayın karbonik anhidraz enzim ailesi (CA, EC 4.2.1.1) tarafından katalizlendiği bilinmektedir. Çalışmamızda kullanılan tümör ilişkili CA IX enziminin ekspresyonu farklı karsinom tipleri ile yakından ilişkili olduğundan ve hipoksik ortamda indüklendiğinden, hipoksinin bir belirteci ve prognostik göstergesi olarak gösterilir.

Araştırmamızın temel hedefi, kolon kanseri HT-29 hücre hattında tümör ilişkili CA IX enzim inhibisyonunun CO_2/HCO_3^- tampon sisteminde H^+ iyon derişim etkisinin hücre epigenetik modifikasyonlar üzerindeki etkileşim mekanizmasının aydınlatılmasıdır. Çalışmamızda, CA IX enzim inhibisyon sonucu ortam asidifikasyonun azalması ile birlikte HIF1α ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.01$). Bu durum ile bağlantılı EZH2 gen ekspresyonunun da artması ($p<0.05$) son derece önemlidir. Normoksik koşullarda CA IX enzim inhibisyonu sonrası HT-29 Histon 3 metilasyonunda artış hipoksik koşullarda histon metilasyonunda azalmayı indüklemiştir. Ayrıca, CA IX enzim inhibisyonu normoksik koşullarda HT- 29 hücre hattında asetilasyon seviyelerinde artışı indüklerken hipoksik koşullarda bu durum asetilasyon seviyelerini azaltmıştır.

Anahtar Kelimeler: CA IX, Epigenetik Modifikasyonlar, EZH2, HIF1α, Kolon Kanseri, HT- 29 hücre hattı

ABSTRACT

The Effect of Colon Cancer Cell Line Carbonic Anhydrase IX Inhibition on The gene of EZH2 and Histone 3 Modifications

Colorectal cancer is one of the most common gastrointestinal cancers with high mortality and morbidity rates. Various genetic and molecular changes occur with the malign transformation of these cancers. For example, Genomic histone modifications such as Abnormal methylated genes, DNA abnormalities, cpg islands methylation may occur. Tumour cells modify themselves in order to adapt the changes in their micro environment. It is well known that many physiological events are catalysed by carbonic anhydrase enzyme family (CA, EC 4.2.1.1) such as CO_2/bicarbonate transport, homeostasis, tumour formation which are the common points of tumours. Because the expression of Tumour related CA IX enzyme which was used in this study is related with different type of cancers and induced by hypoxic environment, it is thought to be marker of prognosis.

The aim of this study is investigating the effect of Inhibition of Tumour Related Carbonic Anhydrase IX at Colon Cancer HT 29 Cell Line on CO_2/HCO_3^- buffer system H^+ ion concentration and epigenetic modifications. In this study it was found that the Inhibition of CA IX caused decrease in and related with that decrease in HIF1α expression acidification ($p<0.01$). In conjunction with increase in EZH2 gene expression($p<0.05$) seems to be also important. The increase in methylation of HT-29 Histone 3 after the inhibition of CA IX enzyme under normoxic conditions seems to induce a reduction of histone methylation in hypoxic conditions. Additionally (Moreover), inhibition of CA IX enzyme induces the increase in acetylation under normoxic conditions while it decreases the acetylation under hypoxic conditions.

Keywords: CA IX, Epigenetic Modifications, EZH2, HIF1α, Colon Cancer, HT- 29 Cell lines

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP : Adenozin Difosfat

ATP : Adenozin Trifosfat

CA IX : İnsan eritrosit Karbonik Anhidraz izoenzimi 9

CA : Karbonik Anhidraz enzimi

CRC : Kolorektal Kanser

DNA : Deoksiribonükleik asit

DNMT : DNA Metil Transferaz

E.C. : Enzim kod numarası

HAT : Histon Asetil Transferaz

HDAC : Histon Deasetilaz

HIF : Hipoksi Uyarılabilir Faktör

KDM : Lizin Demetilaz

MCT : Mono-Karboksilat Taşıyıcı

MMP : Matrix Metallo-Proteinase

PRC : Polycomb Repressive Complex

pH_e : Hücre Dışı pH

pH_i : Hücre içi pH

RNA : Ribonükleik asit

TMÇ : Tümör Mikro Çevresi

VEGF : Vascular Eendothelial Growth Factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Alt Sindirim Sistemi 5
Şekil 2.2. Polip Oluşumu 6
Şekil 2.3. Polip Adenokarsinom Dönüşümü 6
Şekil 2.4. Epitel Hücrenin Adenokarsinoma Dönüşümü 10
Şekil 2.5. 5-Metilsitozin.....13
Şekil 2.6. Histon Yapısı ve Nükleozom 15
Şekil 2.7. Histon Modifikasyonları 16
Şekil 2.8. Histon Asetilasyonu 17
Şekil 2.9. Histon Metilasyonu.....18
Şekil 2.10. PRC Çoklu Protein Ailesi 21
Şekil 2.11. HIF-1 ve EZH2 İlişkisi 22
Şekil 2.12. Bikarbonat Tamponu 23
Şekil 2.13. HIF-1α Düzenlenmesi.....25
Şekil 2.14. Karbonik Anhidraz İzoenzim Ailesinin Hücredeki Yerleşimi.....26
Şekil 2.15. CA'lardaki Metal İyon Etkileşimi 27
Şekil 2.16. CA Katalitik Mekanizması 28
Şekil 2.17. Tümör Hücrelerinde Ph Düzenlenmesi.....29
Şekil 2.18. CA IX Enziminin Dimerik Yapısı 31
Şekil 3.1. Hücre Kültürü Plate Düzeni.....37
Şekil 3.2. Hipoksik-Çember.....38
Şekil 3.3. Ph Standardizasyonu.....39
Şekil 3.4. Toplam Histon Protein İzolasyon Basamakları 39
Şekil 3.5. H3 Modifikasyan Hesaplama Formülü 42
Şekil 4.1. Hücre Kültürü Mikroskobi Görüntüleri 47
Şekil 4.2. HT-29 hücre hattında 24. Saat hücre canlılığı (%) 49
Şekil 4.3. HT-29 hücre hattında 48. Saat hücre canlılığı (%) 50
Şekil 4.4. Ph Değişimi.....50
Şekil 4.5. Normoksik Koşullarda CA IX Enzim inhibisyonu Sonucu Gen Ekspresyon Isı Değerleri.....59
Şekil 4.6. Normoksik koşullarda EZH2, HIF1α, CA IX Gen Ekspresyonu Threshold Grafiği 60
Şekil 4.7. Normoksik koşullarda CA IX İnhibisyonunu Sonucu EZH2, HIF1α, CA

IX Gen Ekspresyonu Threshold Grafiği.....61
Şekil 4.8. Hipoksik koşullarda CA IX İnhibisyonunu Sonucu EZH2, HIF1α, CA IX Gen Ekspresyonu Isı Değerleri.....62
Şekil 4.9. Hipoksik koşullarda EZH2, HIF1α, CA IX Gen Ekspresyonu Threshold Grafiği 63
Şekil 4.10. Hipoksik koşullarda CA IX İnhibisyonunu Sonucu EZH2, HIF1α, CA IX Gen Ekspresyonu Threshold Grafiği.....64

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Histolojik Durumlarına Göre Polip Sınıflandırması 7
Tablo 2.2. CRC'de Tedavi Seçenekleri 9
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler 34
Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizatlar 34
Tablo 3.3. HT-29 Hücre Hattının Özellikleri 35
Tablo 3.4. Kullanılan İnhibitörün Özellikleri 37
Tablo 3.5. Örnek Yükleme Sırası 40
Tablo 3.6. H3 Antikor Modfikasyonları ile Kaplı Plaka 41
Tablo 3.7. RNA İzolasyon Kit İçeriği 43
Tablo 3.8. Genomik DNA Giderme Reaksiyon Bileşenleri 44
Tablo 3.9. Ters Transkripsiyon Reaksiyon Bileşenleri 45
Tablo 3.10. RT-PCR Reaksiyonu Bileşenleri.....45
Tablo 3.11. Çalışmada Kullanılan Primerler 46
Tablo 3.12. RT-PCR Reaksiyon Adımları.....46
Tablo 4.1. 24. Saat Değişen Konsantrasyonlarda HT-29 Hücre Canlılık Oranları ...48
Tablo 4.2. 48. Saat Değişen Konsantrasyonlarda HT-29 Hücre Canlılık Oranları ...49
Tablo 4.3. Total Histon Protein Miktarı ve Konsantrasyonları 51
Tablo 4.4. Histon 3 Modifikasyonları OD Değerleri.....52
Tablo 4.5. HT-29 Normoksik-İnhibitörsüz H3 modifikasyonları.....53
Tablo 4.6. HT-29 Normoksik-AZA İnhibitörlü H3 Modifikasyonları 54
Tablo 4.7. HT-29 Hipoksik-İnhibitörsüz H3 Modifikasyonları 55
Tablo 4.8. HT-29 Hipoksik- AZA İnhibitörlü H3 Modifikasyonları 56
Tablo 4.9. HT-29 Normoksik ve Hipoksik ortamda CA IX Enzim İnhibisyonu Sonucu Metilasyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....57
Tablo 4.10. HT-29 Normoksik ve Hipoksik ortamda CA IX Enzim İnhibisyonu Sonucu Asetilasyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....57
Tablo 4.11. HT-29 Normoksik ve Hipoksik ortamda CA IX Enzim İnhibisyonu Sonucu Fosforilasyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....58
Tablo 4.12. Normoksik Koşullarda CA IX Enzim İnhibisyonu Sonucu Gen Ekspresyonu Düzeyleri 59
Tablo 4.13. Hipoksik Koşullarda CA IX Enzim İnhibisyonu Sonucu Gen Ekspresyonu Düzeyleri 62
Tablo 6.1. Çalışma Sonuçları Özet 70

1. GİRİŞ

Kanser, normal hücrelerin aşamalı olarak maligniteye dönüştüğü, genoma verilen hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkan mutasyonlar ile oluşmaktadır. Bu hasar, DNA replikasyonundaki hatalar, DNA'daki kimyasal kararsızlık veya metabolizma sırasında üretilen serbest radikallerin saldırısı gibi birçok endojen sürecin bir sonucu olabilmektedir (1).

Kolorektal kanser (CRC) dünyada en yaygın üçüncü kanser türü olup, sıklık açısından gastrointestinal sistem kanserleri arasında ilk sırada yer almaktadır. CRC insidans ve mortalitesi dünya çapında belirgin değişiklik göstermektedir. Bu coğrafi farklılığın diyet, çevresel faktörler, genetik yatkınlık ve diğer risk faktörlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (2). Kolon kanseri, bağırsak kanserlerinin % 70'ini oluşturur. CRC'lerin yaklaşık % 95'inin adenomatöz poliplerden geliştiği bilinmektedir. Benign formdan malign forma dönüştükçe çeşitli genetik ve moleküler değişiklikler meydana gelmektedir (3). Bu değişikliklerden biri, normal glandüler epitelyal hücreleri invaziv adenokarsinoma dönüştüren kazanılmış genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesidir (4). CRC moleküler mekanizmasında karsinogenez sürecinin yanı sıra kromozomal kararsızlık, mikrosatellit kararsızlığı, yoğun CpG adacık metilasyonu gibi genomik ve epigenomik değişiklikler görülmektedir (5).

Tümör mikroçevresi (TMÇ), tümör oluşum sürecini büyük ölçüde etkiler. Birçok tümörde, hızla çoğalan kanser hücreleri yetersiz oksijen kaynağı olan alanlar oluşturmaktadır (6). Hipoksi, oksijenin doku düzeyinde yeterli homeostazı sürdürmek için yeterli miktarlarda bulunmadığı bir durumdur; bu, düşük kan kaynağı veya kandaki düşük oksijen içeriği (hipoksemi) nedeniyle dokulara yetersiz oksijen verilmesinden kaynaklanabilir (7). Oksijendeki değişiklikleri algılama ve tepki verme yeteneği, hayatta kalma için gereklidir. Oksijen algılama mekanizmaları, hücre ve doku homeostazını sürdürmenin yanı sıra kanser gibi hastalıklarda bulunan kronik düşük oksijen koşullarına uyum sağlamak için geliştirilmiştir (8). Tümör

hipoksisine yanıt olarak, kanser hücreleri, değişen mikro ortamın gereksinimlerine uyacak şekilde gen ekspresyonunu düzenlemektedir (6).

Bu düzenlemenin en önemli sonucu enerji taleplerini sürdürmek için anaerobik glikolize doğru kaymasıdır. Metabolik yoldaki son ürün olan laktatın anaerobik glikoliz ile ortama verilmesi, karbondioksitin (CO_2) birikmesine ve ekstraselüler ortamın asitlenmesine yol açmaktadır (6) böylelikle hipoksik bir ortamın oluşması kaçınılmaz olmaktadır.

Karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1), CO_2 ve bikarbonat arasındaki dönüşümü katalize eden aktif merkezinde çinko (Zn^{+2}) barındıran bir metalloenzimdir (9). Hayatta kalma ve proliferasyonla uyumsuz olan asidik metabolik ürünlerin hücre içi birikimini önlemek için, tümör hücreleri, iyon akışlarını harekete geçirerek pH'ı düzenleyen moleküler mekanizmayı aktive eder. Karbonik anhidraz enzim ailesinin en büyük görevi CO_2 hidratasyonunu katalizlemek olduğu için CA IX, bu mekanizmada HCO_3^- alımının hipoksiye bağlı katalitik bir bileşeni olarak görev yapar (9). Plazma zarı boyunca HCO_3^- taşınmasını sağlar, hücre içi pH'ı (pH_i) nötralize eder ve kanser hücrelerine hipoksik/asidik mikro çevrede hayatta kalma avantajı sağlamaktadır. Kanser dokularında CA IX'un aşırı ekspresyonu, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1α (HIF1α) aracılı transkripsiyon ile düzenlenir ve enzimin, tümör hipoksisinin bir belirteci olduğu kabul edilir (10). Hipoksi, tümör dokularında glikolitik bir geçişi tetikleyerek laktat ve H^+ üretiminin artmasına neden olur. Hipoksi altında, laktata bağlı pH_i'deki değişim oranı, laktat/H+ akışında hipoksiye bağlı bir artış ortaya çıkarmaktadır (11).

DNA ve histon proteinlerine yapılan kimyasal modifikasyonlar, kromatin yapısını ve genom fonksiyonunu modüle eden karmaşık bir düzenleyici ağ oluşturur. (12). Histon asetilasyonunun da pH_i düzenlemede rol oynadığı gösterilmiştir (13). pH_i azaldıkça, histonlar histon deasetilazlar (HDAC) ile deasetile edilirek salınan asetat anyonları ve monokarboksilat taşıyıcılar (MCT) tarafından hücre dışından protonlarla birlikte desteklenir, böylece pHi'deki fazla azalmalar önlenir. HDAC'lerin veya MCT'ların inhibisyonu, asetat atılımını azaltarak pH_i'yı düşürmektedir. Düşük pH'da meydana gelen deasetilasyon böylelikle genom boyunca asetilasyonun yeniden düzenlenmesiyle genomik düzeye yansıtılır (13).

DNA metilasyonu, epigenetik programlamada önemli bir adım teşkil eder. Hipoksinin bir dizi insan kültür hücresinde histon metilasyonunu indüklediği rapor edilmiştir (14).

Hipoksi, hücresel yanıtta kromatini yeniden programlayan histon metilasyonunda hızlı değişikliklere neden olur (14). Histon H3 lizin 4 (H3K4me3) ve lizin 27'de trimetilasyon (H3K27me3), gelişme ve farklılaşma sırasında gen aktivitesini kontrol eder (15). H3K27me3 ün, tümörlerde düşük oksijenli koşullar ve değiştirilmiş mikroçevrede çevresel koşullara yanıtta dinamik olarak değişip değişmediği ile ilgili çok az bilgi vardır. H3K27me3'ün demetilasyonu, oksijen ve 2-oksoglutarat dioksijenaz enzimlerinin aracılık ettiği, hipoksi'nin histon trimetilasyonunu etkileyebileceğini düşündürmektedir (15).

Karbonik anhidraz enzimlerinin prognostik bir belirteç olarak ya da potansiyel bir ilaç hedefi olarak kanserdeki rolü son derece önemli bir araştırma konusudur (16). Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında; pH düzenlemesi ile tümör hücresi proliferasyonu ve sağkalım arasında önemli bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (17). Bu çalışmalarda, CA enzim ailesinin tümör mikroçevresindeki asidifikasyondan sorumlu olması, söz konusu tümör profilerasyon ve sağkalım süreçlerini doğrudan etkilemesi pH etkileşimlerine dayalı anti-kanser tedaviler için önemli bir göstergedir (18).

Son yıllarda gelişen moleküler tekniklerin sağladığı avantajlar sayesinde hipoksiye yanıtta tedavi seçeneği olabilecek birçok yeni molekül tanımlanmış veya önerilmiştir, ancak hepsinin farklı sınırlamalarının olduğu gözlenmiştir (19).

Asidik mikroçevrenin, zayıf bir prognoz ile ilişkili olduğu ve aktif olarak tümör ilerlemesine doğrudan katıldığının bir kanıtıdır (20). Hipoksi, CA IX enziminin ana indükleyicisi olarak tanımlanmıştır, ancak bugüne kadar tümör mikroçevresinin, hücre dışı asidozun CA IX ekspresyonu ve aktivitesi üzerine nasıl bir etkisi olduğu hakkında literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır (21). Hipoksik ve asidik mikro-ortam altındaki birçok katı tümörde CA IX ekspresyonu artmış olduğu gözlenmiştir (22).

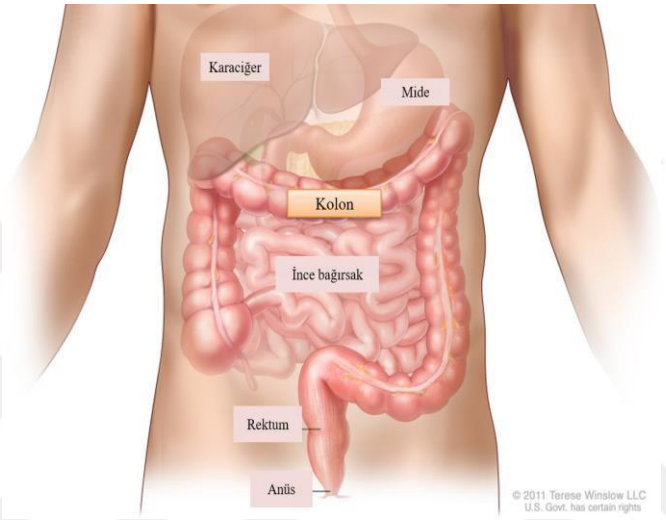
Epigenetik değişikliklerin tümör mikro çevresi, invazyon ve metastaz etkilerinin belirlenmesinin, kanseri yönetmede önemli bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Literatürde epigenetik modifikasyonların hipoksik koşullarda, hücre içi ve hücre dışı pH'dan etkilendiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (23).

Söz konusu bu çalışmamızla epigenetik mekanizmaların, tümör hipoksi belirteci ve pH düzenleyicisi olan CA IX ile ilişkili olduğunu, dolayısıyla bu ilişkinin aydınlatılması gerektiğini düşünmekteyiz. Kolon kanserinde pH düzenlenmesinde CA IX enzim inhibisyonu ile epigenetik modifikasyonlara etkisinin birlikte yer aldığı bir çalışma şu ana kadar bildirilmemiştir. Çalışmamızda hipoksiye yanıt olarak indüklenen CA IX enzim inhibisyonu ile epigenetik modifikasyon düzenleyicilerinden EZH2 geni ekspresyonu, H3K4 metilasyonu, H3K9 metilasyonu, H3K27 metilasyonu, H3K36 metilasyonu, H3K79 metilasyonu, H3K9 asetilasyonu H3K14 asetilasyonu, H3K18 asetilasyonu, H3K56 asetilasyonu, H3ser10 fosforilasyonu, P H3ser28 fosforilasyonu ve Total H3 düzeylerindeki değişim incelenmiştir.Bu yüzden epigenetik mekanizmaların, tümör hipoksi belirteci ve pH düzenleyicisi olan CA IX ile ilişkili olduğunu, dolayısıyla bu ilişkinin aydınlatılması gerektiğini düşünmekteyiz. Kolon kanserinde pH düzenlenmesinde CA IX enzim inhibisyonu ile epigenetik modifikasyonlara etkisinin birlikte yer aldığı bir çalışma ortaya konmamıştır. Çalışmamızda hipoksiye yanıt olarak indüklenen CA IX enzim inhibisyonu ile epigenetik modifikasyon düzenleyicilerinden EZH2 geni ekspresyonu, H3K4 metilasyonu, H3K9 metilasyonu, H3K27 metilasyonu, H3K36 metilasyonu, H3K79 metilasyonu, H3K9 asetilasyonu H3K14 asetilasyonu, H3K18 asetilasyonu, H3K56 asetilasyonu, H3ser10 fosforilasyonu, P H3ser28 fosforilasyonu ve Total H3 düzeylerindeki değişim incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Kanseri

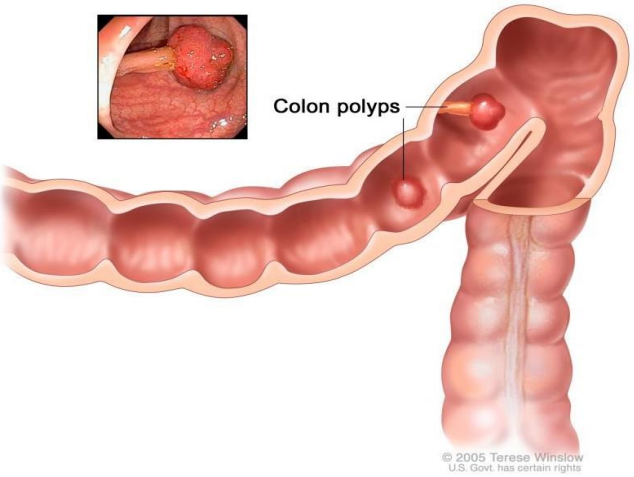
Kolon, kalın bağırsağın ana parçası olup sindirim sisteminin bir parçasıdır. Kolon, yaklaşık 1.5 metre uzunluğundadır. Rektum ve anal kanal birlikte kolonun son kısmını oluşturur ve yaklaşık 15-20 cm uzunluğundadır (Şekil 2.1.) (24).



Şekil 2.1. Alt sindirim sistemi (24)

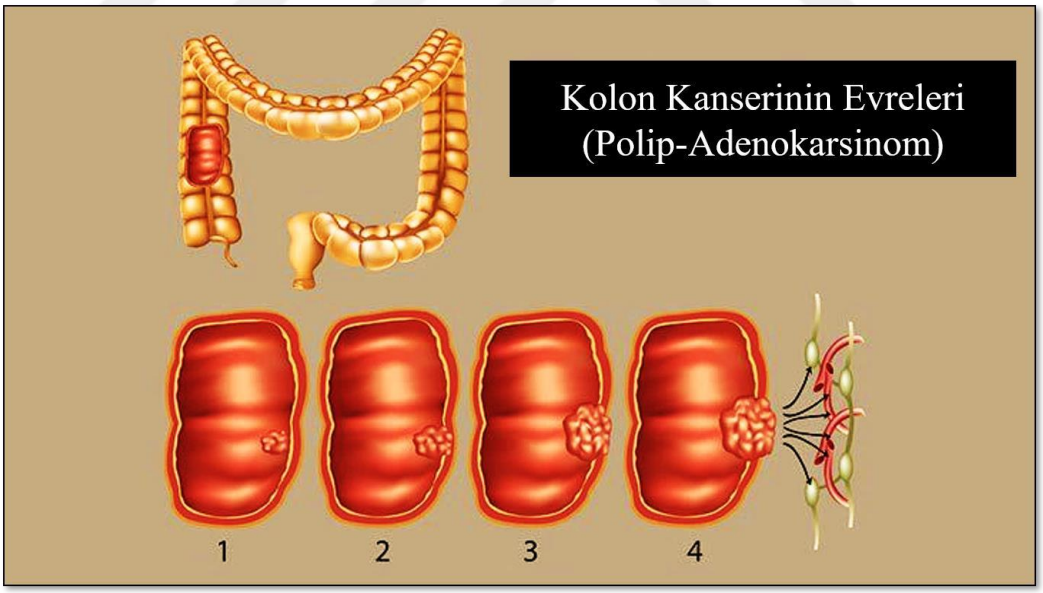
Kolonun temel işlevi, kimüs suyunu, kalan minerallerin ve besinlerin yeniden emilmesini sağlamaktır. Kolon, kalan nişastaları ve proteinleri parçalayabilen çeşitli mikrofloralar içerir. Emilimi kolaylaştırmak için gastrointestinal epitel kript ve villuslardan oluşan bir eksen olarak düzenlenmiştir. Kolon kök hücreleri ve progenitör hücreler, kriptanın dibinde bulunur. Bu pluripotent hücreler kendi kendini yenilemede işlev görür (25,26).

Kolorektal kanser, genellikle mukozal epitel hücrelerinin kanserli olmayan proliferasyonu ile başlamakta ve polip olarak teşhis edilmektedir (Şekil 2.2.). Poliplerin karakterizasyonu kanserli hale gelmeden önce 10-20 yıl boyunca kademeli olarak büyüyebilir. En yaygın görülen polip formu, işlevi kalın bağırsağı kaplayan mukusu üretmek olan granüler hücrelerden kaynaklanan bir adenom veya poliptir (27).



Şekil 2.2. Polip oluşumu (28)

Polip büyüdükçe kanser riski artmasına rağmen, tüm adenomların yaklaşık % 10'u invaziv kansere dönüşür. Bu tür poliplerden kaynaklanan invaziv kanser adenokarsinom olarak bilinir ve tüm CRC'lerin % 96'sını oluşturur (Şekil 2.3.) (29).



Şekil 2.3. Polip Adenokarsinom dönüşümü (30)

Dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen bir nedeni olan CRC, normal kolon epitelinde bir dizi genetik ve epigenetik değişikliğin aşamalı olarak birikmesi sonucunda kolorektal adenomların ve invaziv adenokarsinomların

gelişmesine yol açar. Genetik değişiklikler, CRC'lerin bir alt kümesinde önemli bir role sahip olmasına rağmen, malignitede epigenetik anormalliklerin patofizyolojik katkısı önemli ölçüde dikkat çekmektedir (31).

2.2. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi

CRC üçüncü en yaygın kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin dördüncü en yaygın nedenidir. CRC insidansı yıldan yıla artmakta olup yaş, kronik hastalık geçmişi ve yaşam tarzı gibi kişisel özellikler veya alışkanlıklar ile de ilişkilidir (32).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), GLOBOCAN 2020 verilerine göre, CRC dünyadaki en sık görülen dördüncü kanser iken, tüm kanserlerin % 10'unu, kanserden ölümlerin % 9.4'ünü oluşturmaktadır. Buna göre 1 931 590 yeni CRC vakası görülmüş, 935 173 CRC hastası hayatını kaybetmiştir (33).

2.3. Kolorektal Kanser Sınıflandırılması

Kalıtsal CRC sendromları, genel olarak kolorektal polipoz ile ilişkili olan veya ilişkili olmayan olarak sınıflandırılır. Polipoz durumları ayrıca polip histolojisine göre adenomlar, hamartomlar veya tırtıklı polipler olarak alt gruplara ayrılır (Tablo 2.1.) (34,35).

Tablo 2.1. Histolojik durumlarına göre polip sınıflandırması (34,36)

Ailesel Adenomatöz Polipozis	Hamartomatöz Polipozis	Kalıtsal Olmayan Polipozis	Non-Polipozis
Ailesel adenamatöz polipozis (APC gen mutasyonları)	Cowden sendromu (PTEN gen mutasyonları)	Cronkhite-Canada sendromu	Kalıtımsal non-polipozis kolorektal kanser (Lynch sendromu)
Gardner sendromu		Hiperplastik polipozis	
Turcot sendromu	Juvenil polipozis (SMAD4 gen mutasyonları)	Lemfomatöz polipozis	Muir-Torre sendromu
Zayıflatılmış ailesel adenamatöz polipozis			
MYH bağlantılı polipozis (MYH gen tmutasyonları)	Peutz-Jeghers sendromu (LKB/STK11 gen mutasyonları)	Nodüler lemfoid hiperplazi	

2.4. Kolon Kanserinde Risk Faktörleri

CRC için ana risk faktörü yaş olarak belirtilmiştir (37). 50 yaşından sonra, CRC geliştirme riski belirgin bir şekilde artarken, kalıtsal kanserler dışında 50 yaş altındaki CRC başlangıcı nadir olarak görülmektedir. İnflamatuar bağırsak hastalığı öyküsü olan ülseratif kolitli hastalarda ve Crohn hastalarında CRC riskinin arttığı gözlenmektedir (37,38).

Beslenme ve fiziksel aktivite alışkanlıkları gibi yaşam tarzı da bazı risk faktörleri arasındadır. Hareketsiz bir yaşam tarzı, CRC için bir başka önemli risk faktörü olan obezite ile de ilişkilidir (39). Obezite, proinflamatuar sitokinlerin salgılanması yoluyla CRC gelişimini teşvik edebilmektedir (39-41).

Ayrıca, sigara ve alkol tüketiminin de CRC riskini artırdığı gösterilmiştir (42). Alkol tüketiminin, asetaldehit ve alkol metabolizması enzimlerinin polimorfizmlerine bağlı olarak CRC gelişme riskini artırdığı rapor edilmiştir (42-44).

2.5. Kolon Kanserinde Teşhis

Erken teşhis taramaları ve tedavi seçeneklerindeki son gelişmeler, artan insidans karşısında, gelişmiş ülkelerde CRC mortalitesini azaltmıştır. Genetik testler ve aile öyküsü CRC'nin kalıtsal yatkınlığı olan bireylerde erken tanı ve tedaviye yardımcı olmaktadır (25). CRC teşhis sürecinde belirli ve yaygın bir klinik tablonun olmadığı bilinmektedir. Yaygın olarak görülen alt karın semptomlarının çoğunlukla neoplastik olmayan hastalıklarla ilişkili olduğu saptanmıştır (45). CRC teşhisinin ana belirteci invaziv bir uygulama olan kolonoskopiye dayanmaktadır. Ayrıca non-invaziv gaitada gizli kan ve kan biyobelirteçleri de CRC teşhisinde kullanılmaktadır (45).

CRC için kullanılan yaygın tedavi seçenekleri, kanserin türü ve evresi, tedavinin olası yan etkileri, hastanın tercihleri gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır. Bu kapsamda temel tedavi seçenekleri yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Tablo2.2) (46-53).

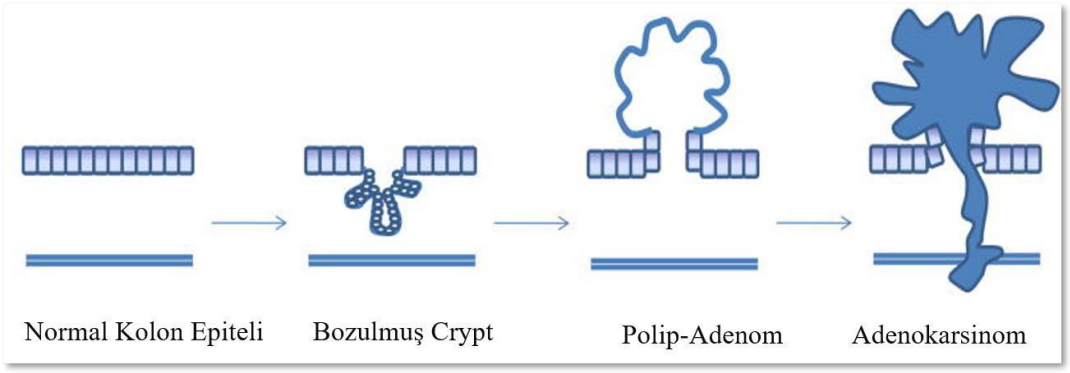
Tablo 2.2. CRC'de Tedavi Seçenekleri

Ameliyat	Laparoskopik cerrahi	
	Rektal kanser için kolostomi	
	Radyofrekans ablasyon (RFA) veya kriyoablasyon	
Radyasyon tedavisi	Harici ışın radyasyon tedavisi	
	Stereotaktik radyasyon tedavisi	
	Brakiterapi	
	İntraoperatif radyasyon tedavisi	
	Diğer radyasyon tedavisi türleri	
Kemoterapi	Floropirimidinler	
	5-Florourasil (5-FU)	
	Kapesitabin	
	Irinotecan	
	Irinotecan	
	Oksaliplatin (Eloksatin)	
	Trifluridin ve tipiracil	
Hedefe yönelik tedavi	VEGF	Bevacizumab
		Ramucirumab
		Ziv-aflibercep
	EGFR	Setuksimab
		Panitumumab
	BRAF	Encorafenib
İmmünoterapi	Kontrol noktası inhibitörleri	
	PD-1 inhibitörleri	
	CTLA-4 İnhibitörleri	
Diğer ilaç tedavileri		

2.6. Kolon Kanserinin Moleküler Temelleri

Kolon kanseri, epitel hücrelerinin adenokarsinomlara dönüştüren genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 4) (54). Genel olarak polip-kanser dönüşümü, poliplerin malign hale uğramadan önce tespit edilmesi ve rezeksiyonu için fırsat sağlamaktadır.

Gen mutasyonları, epigenetik değişiklikler ve lokal inflamatuar değişikliklerin polip → CRC dönüşümü için gerekli çok sayıda moleküler faktörün beraber hareket etmesine neden olmaktadır (55-57). Bu moleküler değişikliklerin temelinde, kolon poliplerinin ve CRC'nin heterojenliğini düzenleyen anormal metillenmiş genler, DNA anormallikleri (örn. Anöploidi, mikro satellit kararsızlığı, vb.) ve CpG adacık metilasyon fenotipi gibi genomik ve epigenomik değişiklikler bulunmaktadır (55).



Şekil 2.4. Epitel hücrenin adenokarsinoma dönüşümü (54).

CRC hücrelerinin gelişimi, proliferatif sinyalleri sürdürme, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçma, apoptoza direnç, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenezi indükleme, göç ve metastazı aktive etme gibi ayırt edici özelliklere sahiptir. Bu ayırt edici özelliklerin temelinde, genetik çeşitliliği üreten genom kararsızlığı ve birden fazla ayırt edici işlevi teşvik eden inflamasyonlar bulunmaktadır (58).

2.6.1. Genomik Kararsızlık

Genomik kararsızlık, tümör oluşum sürecinin erken safhalarında meydana gelen ve kanserle sonuçlanacak bir hücrede tümör baskılayıcı genlerde ve onkojenlerde değişen önemli bir moleküler durum olarak ifade edilir (59).

Genomik kararsızlık, çoğu kanserin ortak özelliğidir. Kalıtsal kanserlerde, genomik dengesizlik, DNA onarım genlerindeki mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir (60).

Genomik kararlılığın kaybı, tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerde değişikliğe giderek hücreleri dönüştürür ve tümör ilerlemesini desteklemektedir (53). Kolon kanserinde tanımlanan 3 baskın genomik kararsızlık biçimi, mikro uydu kararsızlığı, kromozom kararsızlığı ve CpG adacık metilasyonudur. Genomik kararsızlığa ek olarak, epigenetik kararsızlık, tümör baskılayıcı genlerin anormal metilasyonuna neden olur (61).

2.6.2. Kromozomal Kararsızlık

Kromozomal kararsızlık, çoğu CRC'de, kromozom sayısındaki (anöploidi) dengesizlikler ve heterozigotluk kaybı (LOH) ile karakterizedir. Genellikle kromozomal segregasyon, telomer stabilitesi ve DNA hasar tepkisindeki kusurlardan kaynaklanır (62). CRC'lerin% 85'inde kromozomal kararsızlık görülür (55). Kromozomal kararsızlığın altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olmakla beraber mitoz sırasında disfonksiyonel olarak kromozom duplikasyonunu veya ayrılmasını yansıtmaktadır (63,64).

2.6.3. MikroSatellit Kararsızlığı

Kısa Tandem Tekrarları (STR) olarak da bilinen mikrosatellitler, tüm genom boyunca dağılmış küçük (1-6 baz çifti) tekrarlayan DNA uzantılarıdır ve insan genomunun yaklaşık % 3'ünü oluşturur. Tekrarlanan yapıları nedeniyle mikrosatellitler yüksek mutasyon oranına eğilimlidir. Mikrosatellit kararsızlığı kusurlu bir DNA hata onarım (missmatch) sisteminin sonucudur. Mikrosatellit kararsızlık varlığı sporadik kolon, mide, endometriyal ve diğer kanserlerin çoğunda bulunur. CRC'lerin yaklaşık % 15-20'si mikrosatellit kararsızlığı gösterir (65).

DNA Onarım Hataları

DNA onarımı, genomik stabilitenin korunmasında anahtar rol oynayan, oldukça korunmuş bir biyolojik yolaktır. DNA onarım hataları, DNA replikasyonu ve rekombinasyonu sırasında oluşan baz-baz uyumsuzlukları ve insersiyon/delesyon içerir (66). Kolon kanserinin en yaygın şekli olan kalıtsal polipoz olmayan kolon kanseri, eksik DNA hatalı onarımı sendromudur. Germ hattında mutasyona uğradığında bu sendroma yatkınlığa neden olan birçok gen tanımlanmıştır. Bu genler arasında MLH1 (∼% 50), MSH2 (∼% 40) ve MSH6'yı (∼% 10) etkilemektedir (67).

2.6.4. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnaktivasyonu

Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesi/hücre döngüsü ilerlemesi, hücre proliferasyonu, DNA onarım mekanizmaları ve apoptoz indüksiyonu gibi önemli hücresel sinyal işlevlerindeki rollerine göre geniş bir şekilde sınıflandırılabilir (68).

Tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenler kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır (69). Knudson'un "Two-Hit" hipotezine göre kanserde tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı, iki allelin silinmesi veya inaktivasyonu yoluyla meydana gelir. Tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların tek bir hücre düzeyinde resesif olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle, tek bir mutasyon, karsinogeneze neden olmak için yeterli değildir. Tümör baskılayıcı genler, işlevsel olarak beş sınıfa ayrılmaktadır (70):

- Hücre döngüsü aşamalarının ilerlemesini kontrol etmede çok önemli olan hücre içi proteinleri kodlayan genler, (pRB ve p16) (71).
- Hücre proliferasyonunu inhibe eden sinyalleri düzenleyen reseptörleri veya sinyal dönüştürücüleri kodlayan genler (adenomatöz polipoz koli (APC) ve TGF-β) (72).
- DNA hasarı veya kromozom kusurları durumunda hücre döngüsü tutuklanmasını tetiklemede yararlı olan kontrol noktası kontrol proteinlerini kodlayan genler (p16, p14 ve BRCA1) (73).
- Apoptozun uyarılması için yararlı proteinleri kodlayan genler (p53) (74).
- DNA'nın onarımında rol oynayan proteinleri kodlayan genler (MSH2 ve p53) (75).

2.6.5. Onkogenlerin Aktivasyonu

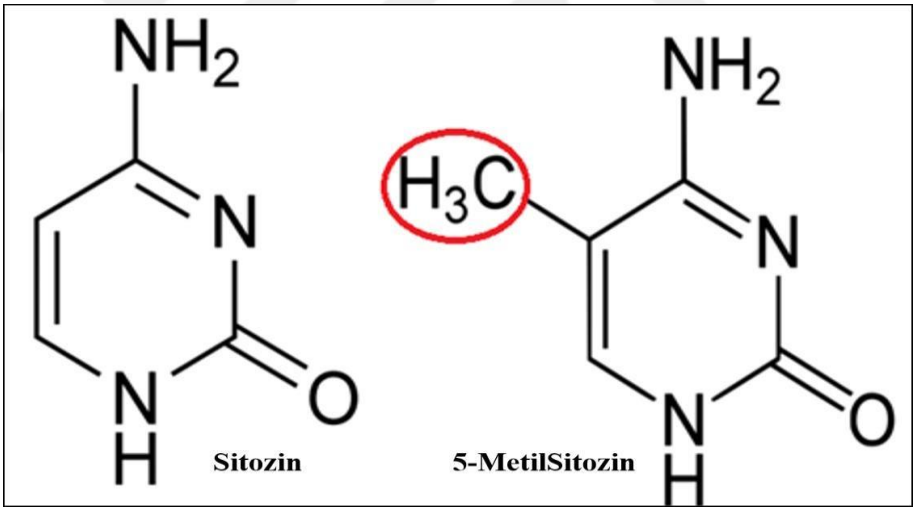
Proto-onkogenler, kanser sürecinin ilk düzenleyici faktörleri olarak tanımlanmıştır (76). Büyüme faktörlerinin sinyallerini iletme görevi görürler. Onkogenler olarak adlandırılan bu genlerin modifikasyonları, kanser hücrelerinin ortaya çıkmasına neden olur. Proto-onkogenlere yol açan aktivasyon süreci, kromozomal translokasyon, nokta mutasyonu ve gen amplifikasyonlarıdır (77).

2.7. Kolon Kanseri ve Epigenetik Mekanizmalar

CRC'de görülen başlıca epigenetik değişikliklerin, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA türleri ile meydana geldiği bilinmektedir (78).

2.7.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, 5-metilsitozin oluşturmak için bir metil grubunun sitozinin C5 konumuna transferini içeren epigenetik bir mekanizmadır (Şekil 2.5.). DNA metilasyonu, genlerin baskılamasında yer alan proteinleri veya transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını inhibe ederek gen ekspresyonunu düzenler. Farklılaşmış hücreler, dokuya özgü gen transkripsiyonunu düzenleyen kararlı bir DNA metilasyon modeli geliştirir (79).



Şekil 2.5. 5-metilsitozin

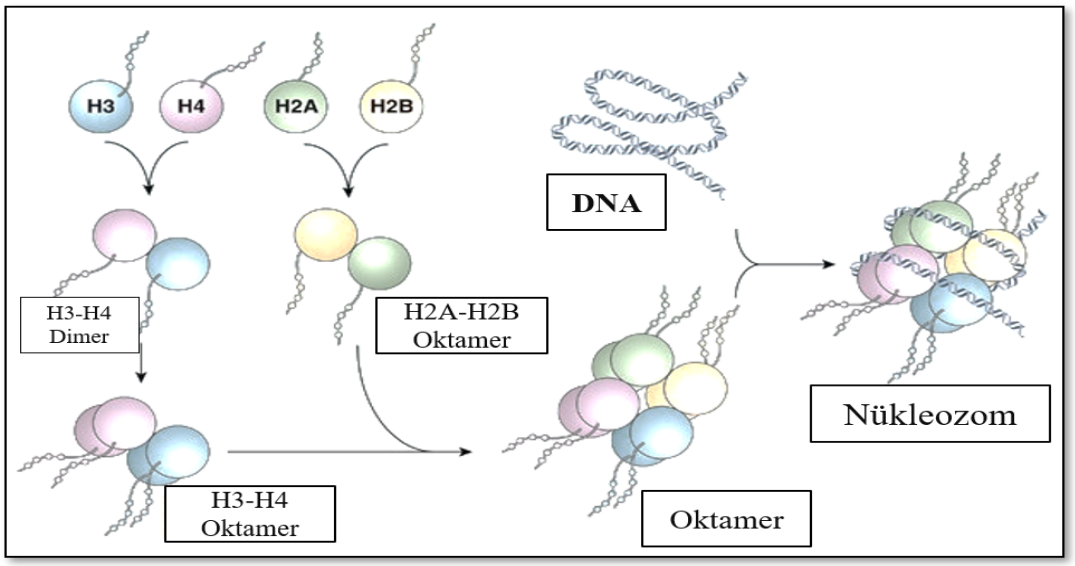
DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ile ilişkilidir (80). CpG adacıkları büyük kümeler halinde yoğunlaşan CG dinükleotidleri içindeki sitozinlere bir metil grubunun eklenmesiyle meydana gelir. DNA metiltransferazlar metilasyon modelinin oluşturulmasından ve sürdürülmesinden sorumludur. Belirli tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, promotör bölgelerindeki hipermetilasyonun bir

sonucu olarak meydana gelir. Farklı kanser türlerinde DNA metilasyonu ile susturulmuş geniş bir gen kümesini varlığını ortaya koymuştur (80).

Tümör hipoksisinin, oksijene bağımlı metilsitosin dioksijenaz ailesinin üyesi olan ten-eleven-translocation (TET) proteinlerinin aktivitesini azaltarak hipermetilasyona neden olduğu gösterilmiştir. DNA demetilasyon işlemini 5-metilsitosin oksidasyonu ile başlatırlar ve özellikle gen promotörlerinde ve arttırıcılarında aktiftirler (81). Mikro-ortamdaki pH_i değişimler, Dnmt3a gibi DNA bağlayıcı proteinde düzenleyici etkiye sahiptir. Asdifikasyonun Dnmt3a'nın katalitik aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (82). Tümör baskılayacı gen promotörlerin hipoksik tümörlerde, proliferasyon, stromal hücre infiltrasyonundan ve tümör özelliklerinden bağımsız olarak belirgin şekilde daha fazla metillenmektedir. Hipermetilasyon olaylarının hücresel kader seçimini etkilediğini göstermektedir. Bu yüzden tümör hipoksisi, DNA metilasyonunun altında yatan yeni bir düzenleyici görevi görür (82).

2.7.2. Histon Modifikasyonları

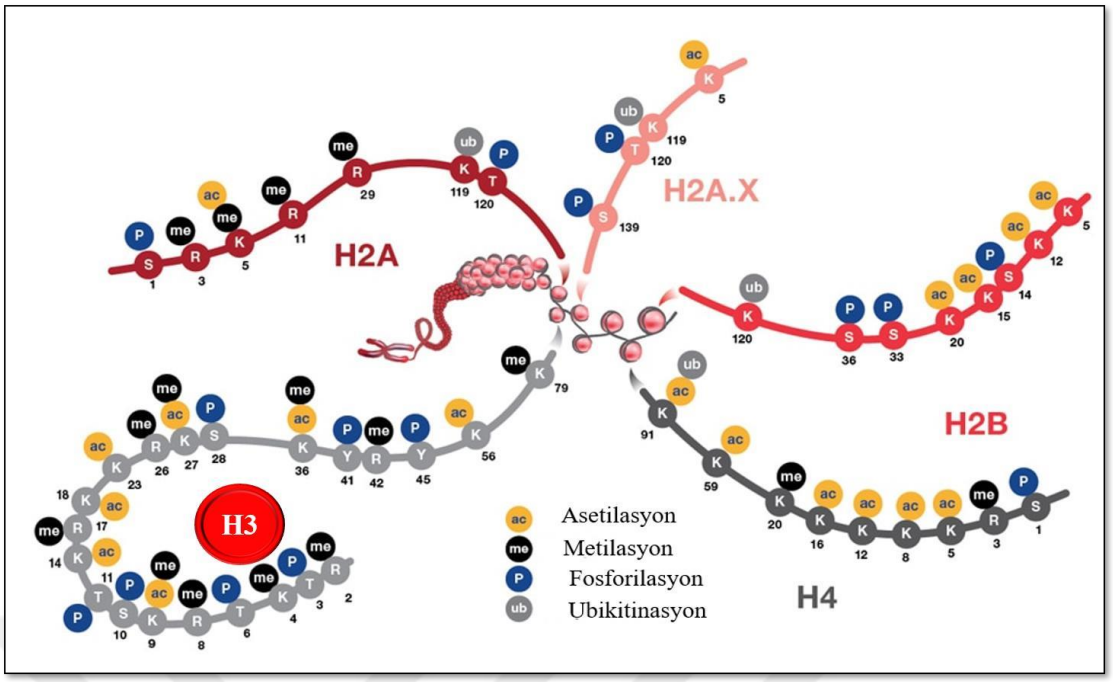
DNA, fonksiyonel birimleri nükleozom olan kromatin olarak paketlenmiş bir şekilde, her nükleozomun etrafına 147 baz DNA çiftiyle sarılmış dört çekirdek histondan (H3, H4, H2A ve H2B) ve bağlayıcı histonlardan (H1 ve H5) oluşan bir oktamer oluşturur (Şekil 2.6.). Çekirdek histonların N-terminal kısmı, çoklu posttranslasyonel modifikasyonlar için yer sağlayan temel bir bölgeye sahiptir (83,84).



Şekil 2.6. Histon yapısı ve nükleozom (84).

DNA'nın kromatin olarak paketlenmesi, DNA kalıbına erişmesi gereken enzimlere (RNA ve DNA polimeraz gibi) karşı bir bariyer sağlarken, aynı zamanda kromatin yapısının enzimatik modifikasyonu yoluyla transkripsiyon ve DNA replikasyonunu da düzenlemektedir (85).

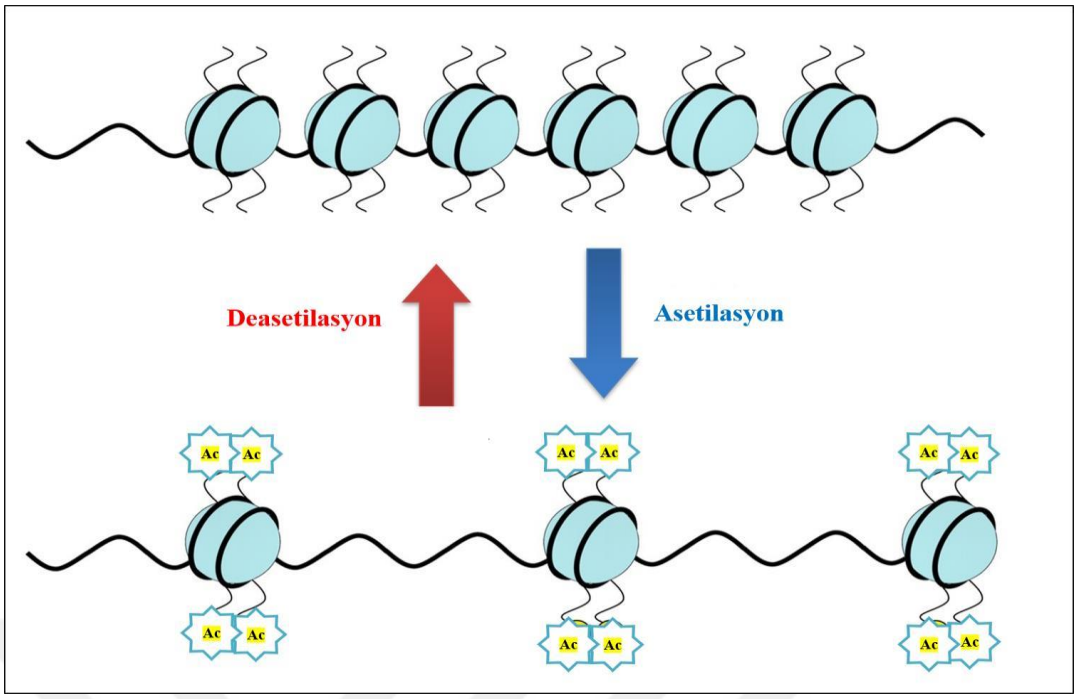
Çekirdek histonların N-terminal kuyruğu, post-translasyonel modifikasyonları, kromatin durumunu, yapısını ve gen ekspresyonunu düzenlemek için önemli araçlardan biridir. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, sumolasyon, biyotinilasyon veya ADP ribozilasyon dahil olmak üzere birçok post-translasyonel modifikasyon içermektedir (Şekil 2.7.). Bu histon modifikasyonlarının genellikle birbirleriyle etkileşim halinde hareket ettiği tespit edilmiştir (74).



Şekil 2.7. Histon modifikasyonları (86)

2.7.2.1. Histon Asetilasyonu

Histon asetilasyonu, asetil koenzimA yapısındaki bir asetil grubunun ($COCH_3$) enzimatik olarak eklenmesi ile meydana gelir (Şekil 2.8.). Histon asetilasyon süreci, kromatin dinamikleri ve transkripsiyon süreçleri ile gen susturma, hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz, farklılaşma, DNA replikasyonu, DNA onarımı, çekirdek içi alım gibi birçok hücresel işleve sahiptir (87). Histon asetilasyonunda yer alan modifiye edici enzimler, histon asetiltransferazlar (HAT) olarak adlandırılır ve histon H3 ve H4 asetilasyonunun kontrolünde kritik bir rol oynarlar. Histon deasetilazler (HDAC), asetil gruplarının histon lizin kalıntılarından hidrolitik olarak uzaklaştırılmasını katalize ederek histon asetilasyonundaki dengesizlik, tümörogenez ve kanser ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (87). Örneğin, H3K27 Asetilasyonu kolon kanserinde artış yönünde değişim gösterir (88). H3K18 asetilasyonu, meme, kolon, akciğer, hepatosellüler, pankreas, prostat ve tiroid kanseri dahil birçok kanser türünün ilerlemesini sağlamada önemli bir rol oynamaktadır (89).

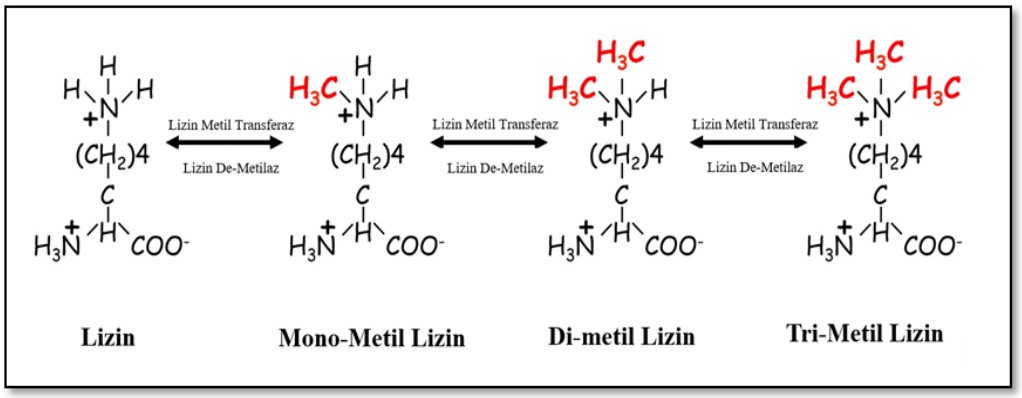


Şekil 2.8. Histon Asetilasyonu (90)

2.7.2.2. Histon Metilasyonu

Histon metilasyonu, histon proteinlerinin çeşitli bölgelerinde, özellikle lizin ve arjinin rezidülerinde meydana gelir (Şekil 2.9.). Transkripsiyonu etkinleştirmek veya bastırmak için çok sayıda pozitif ve negatif düzenleyici tarafından yönetilebilir (91).

Lizin metiltransferazların görevi, lizin demetilazlar ve arginin metiltransferazların aracılık ettiği histon metilasyonu, sindirim sistemi kanserlerinde patolojik süreçleri düzenleyen temel bir mekanizmaya sahip olmasıdır. Belirli koşullarda, bu değiştiricilerin anormal ekspresyonu, ilgili kanserle ilişkili genlerde anormal histon metilasyonuna veya demetilasyonuna yol açmaktadır. Bu durum, sindirim sistemi kanserinin gelişimi sırasında, proliferasyon, metabolik programlama, epitel-mezenkimal geçiş, invazyon ve metastaz gibi farklı süreçlere ve fenotiplere de katkıda bulunduğunu göstermektedir (92).



Şekil 2.9. Histon Metilasyonu (93)

Histon H3 lisin 4 (H3K4) metilasyonu, H3K4 metiltransferaz ve demetilazlar tarafından gen transkripsiyonunun düzenlenmesi için kritik bir epigenetik işaret olarak ortaya çıkmıştır (94). H3K4 tri-metilasyonu yaşlanan hücrelerde gen ifadesini kolaylaştırır (95).

Histon H3 lizin 9'un trimetilasyonu (H3K9me3) ve bazı epigenetik modifikasyonlar ile heterokromatin yapısının oluşumu ve kararlılığını büyük ölçüde kontrol etmektedir (96).

Histon H3 lizin 27 metilasyonu (mono-, di- ve tri-metilasyon) transkripsiyonel baskılamayı indükler ve böylece gen ekspresyon modellerinin kontrol edilmesine katılarak bir metiltransferaz olan EZH2 geni tarafından H3K27me3'ün metilasyonunda epigenetik açıdan önemli bir rol oynar (97).

H3K36 metilasyonu, RNA polimeraz2 C-terminal alanının aktiviteleriyle ilişkili olan bir epigenetik işarettir (98). H3K36 metilasyonu, transkripsiyonel doğruluğu arttırmaktadır (99).

H3K79 metilasyonun transkripsiyonel uzama ve genomik kararlılık arasında işlevsel bir ilişkisi bulunmaktadır (100).

2.7.2.3. Histon Fosforilasyonu

Histon fosforilasyonu, hücre dışı sinyaller, DNA hasarı veya mitoza girme ile indüklenen geçici bir histon modifikasyonudur (101). Bununla birlikte, birçok çalışma, histon fosforilasyonunun, diğer nükleer işlemlere bağlı olarak kromatinin yeniden düzenlenmesinde önemli roller oynadığını da göstermektedir (102). Serin 10 ve serin 28'de fosforile edilmiş histon H3 (H3Ser10 ve H3Ser28), hücrelerde geç-G (2)/M durumunu değerlendirmek için hücre döngüsü belirteçleri olarak kabul edilmiştir (103).

2.7.3. Kromatin Yeniden Düzenleme

Kromatin yeniden düzenleyici proteinler, gate-keeper olarak işlev görürler. Nükleozom DNA'sına erişebilirliğinin önemli bir belirleyicisidirler. Bu nedenle, yeniden düzenleyici proteinlerin anormal ekspresyonu veya epigenetik modülasyonu, kanser hücrelerine, onkojenik fenotiplerin korunması için genomunu yeniden programlama konusunda yetenek kazandırır. Kanser hücreleri, onkojenik avantaj için çok alt birimli yeniden düzenleyici proteomu seçerler (104). Yeniden düzenleyici proteinler nükleozomal yapının yerini alabilir, devreye girebilir ve değiştirebilir. Temel olarak dört yeniden düzenleme ailesi iyi karakterize edilmiştir. Bunlar: SWI/SNF, ISWI, INO80 ve NuRD/Mi-2'dir. Bu protein aileleri şu özelliklere sahiptir (104,105);

- Nükleozom çekirdeği ile etkileşime girme yeteneği,
- Post-translasyonel olarak modifiye edilmiş nükleozomal histon-kuyruk rezidüeleri için afinite,
- ATP hidrolizinden enerjiyi yeniden modelleme işlevlerine yakıt olarak kullanan çekirdek ATPaz aktivitesi ,
- Çeşitli biyokimyasal ve epigenetik değişikliklere tabi olan düzenleyici alanlar
- Protein-protein etkileşimlerini barındıran spesifik protein alanları ve motifleri.

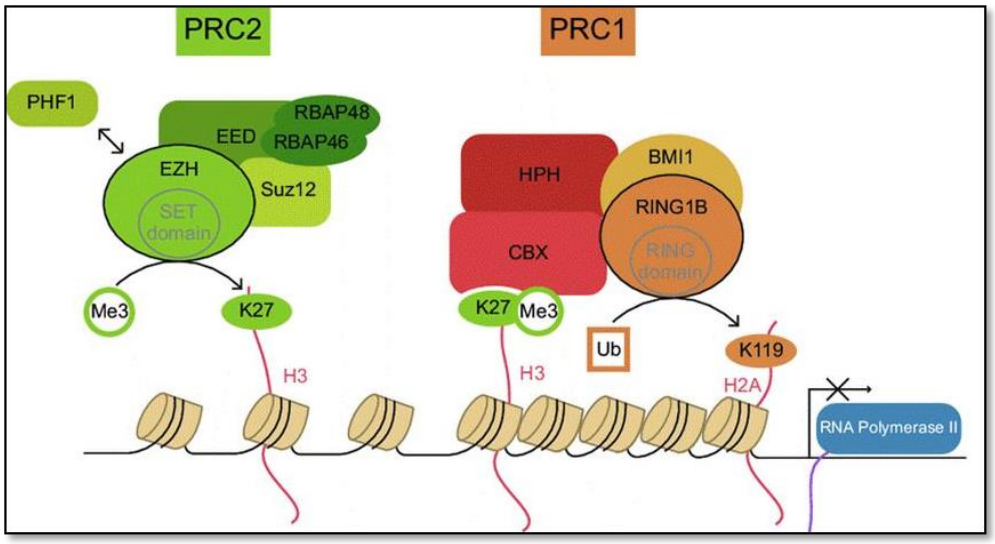
2.7.4. Kodlama İşlevi Görmeyen RNA'lar

Kodlama işlevi görmeyen RNA'lar, fonksiyonel proteinleri kodlamayan ve başlangıçta sadece transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenlediği düşünülen bir RNA kümesidir. Bununla birlikte, yeni çalışmalar, miRNA'ların, piRNA'ların, endojen siRNA'ların ve uzun kodlamayan RNA'ların en yaygın düzenleyici RNA'lar olduğunu göstermiştir. Kodlama işlevi görmeyen RNA'lar (ncRNA), RNA'nın gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki önemli rol oynarlar (106).

2.7.5. EZH2 Geni

Histon modifikasyonlarının, DNA'nın manipülasyonunda ve gen ifadesinde yer alan çoğu biyolojik süreçte temel roller oynadığı açıktır (107). Bu epigenetik değişiklik, olağan genetik değişikliklerden farklıdır çünkü DNA dizisi mutasyonlarla değiştirildiğinde, önceki diziyi geri yüklemek çok zor olmaktadır. Bununla birlikte, epigenetik değişiklikler, DNA metiltransferaz, histon metiltransferaz ve histon deasetilaz gibi enzimleri hedefleyen spesifik inhibitörler tarafından tersine çevrilebilmektedir (108).

Polycomb grubu (PcG) proteinleri, transkripsiyonun epigenetik düzenleyicileri olup mekanik olarak, histon yapısını değiştiren ve hedef genleri susturan Polycomb baskılayıcı kompleksler (PRC) adı verilen multiprotein kompleksleri içinde işlev görürler (109). PcG proteinleri, kromatin yapısını düzenleyerek erken gelişim sırasında belirlenen farklı hücrelerin gen ekspresyon modelini korur. Memelilerde Polycomb baskılayıcı kompleks 1 (PRC1) ve 2 (PRC2) olmak üzere iki ana Polycomb grubu kompleksi vardır (Şekil 2.10). PRC1, kromatini sıkıştırır ve histon H2A'nın mono-ubiquitilasyonunu katalize eder. PRC2 kromatin sıkışmasına katkıda bulunur ve lizin 27'de histon H3'ün metilasyonunu katalize eder. PRC2, farklılaşma, hücre kimliğinin ve çoğalmasının korunması ve kök hücre plastisitesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemlerde yer alır (110).



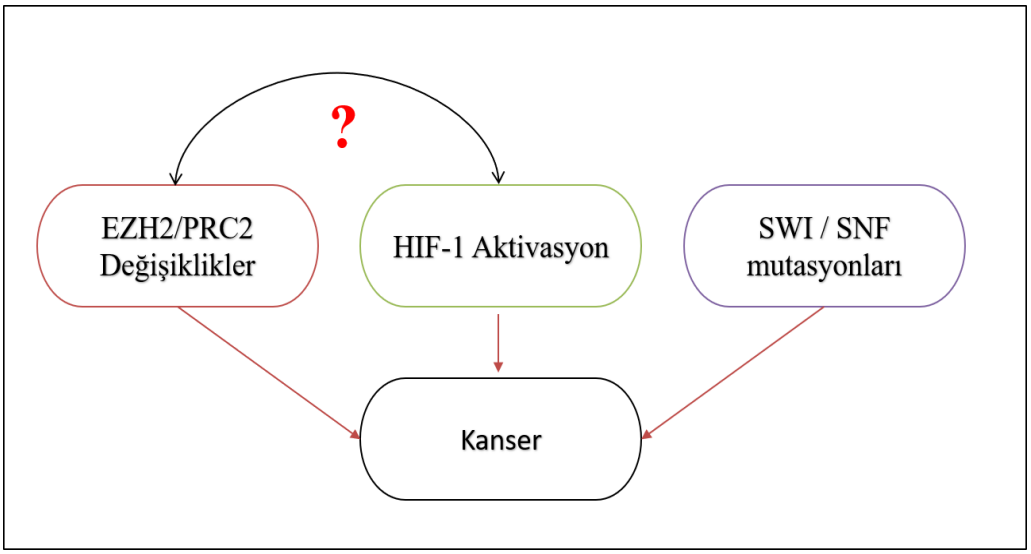
Şekil 2.10. PRC Çoklu Protein Ailesi (111).

EZH2, histon 3 lizin 27'yi metile ederek gen ekspresyonunu baskılayan bir histon metiltransferaz olup polikomb baskılayıcı kompleks 2'nin (PRC2) katalitik alt birimidir. EZH2 aracılı metilasyon, kanserde tümör baskılayıcı genlerin epigenetik susturulması için bağımsız bir mekanizma olarak tanımlanmıştır (112).

EZH2, farklı hücresel değişkenlere bağlı olarak hem bir transkripsiyon baskılayıcı hem de bir transkripsiyonel ko-aktivatör olarak işlev görmektedir. EZH2, kritik gen ekspresyonunu düzenleyerek, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, çoğalmasını, mezenkimal epitelini, hücre göçünü ve ilaç direncini desteklemektedir (113).

EZH2'nin aşırı ekspresyonu, genel sağkalım prognozu (OS) HR (tehlike oranı) = 0,61% 95 CI (0,38–0,84) ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. EZH2'nin aşırı ekspresyonu, CRC'nin iyi bir prognoz belirteci olarak işlev görür (114).

EZH2; HIF-1 expresyon değişiklikleri ve SWI/SNF mutasyonları için olumsuz bir etki sağlayabilmektedir. Kanserin başlangıcı sırasındaki tümör oluşum mekanizması veya tümör ilerlemesi sırasındaki hipoksi, HIF-1 ve EZH2 arasındaki ilişki net açıklanamamıştır (Şekil 2.11.) (115).



Şekil 2.11. HIF-1 ve EZH2 ilişkisi (115)

2.8. Tümör Mikroçevresi ve Hipoksi

Kanser hücreleri, olumsuz şartlar altındaki hücrelerin sağ kalımına imkan sağlayan tümör gelişimi için tümör hücrelerinin metabolik profillerini yeniden düzenlemektedir. Bu düzenlemenin asıl temelinde kanser hücrelerinin yeterli oksijen olsa bile laktat fermantasyonu yoluyla enerji ihtiyaçlarını karşıladıkları için glukoza karşı artmış ilgileri vardır. Bu durum, tamamen işleyen mitokondri varlığında bile gözlemlenir ve Warburg Etkisi olarak bilinir (116).

Tümör hücrelerinin yüksek metabolik aktivitesi, tümör mikro ortamında H^+ iyonlarının birikmesine yol açar. Düzensiz tümör anjiyogenezi, glikolitik metabolizmaya doğru bir kayma ile ilişkili hipoksik bölgelerin gelişimini destekler. Hipoksi altında glikolizin nihai dengesi, ATP'nin parçalanması, laktat üretimi ve H^+ iyonu üretimini sağlayarak, H^+ iyonlarının diğer bir ana kaynağı olan CO_2 hidrasyonunu desteklemektir. Tüm bu olaylar, biyoenerjetik ve biyosentetik ihtiyaçları karşılamak için tümörlerde yüksek oranlarda meydana gelmektedir (117).

Hipoksi, tümör mikro çevresinde yoğun bir asit yükü oluşturan hücresel metabolizmadaki asidozu indüklemekten sorumludur. Hipoksi, bir transkripsiyon faktörü olan HIF1α aktivitesini indükleyerek bunu gerçekleştirmektedir. Tümörlerin ortak özelliği, hipoksinin neden olduğu asidozdur (118).

Glikoliz yoluyla laktik asit üretiminin, katı tümörlerdeki hücre dışı asidozun tek nedeni olmadığı ve karbonik asidin, tümör mikro ortamının asidozunda yüksek oranda rol oynayabileceği öne sürülmüştür (119). Tümör hücrelerinin yüksek metabolik hızı, tümör mikro çevresinde H^+ iyonlarının birikmesine yol açar (117).

Tümör dokularının pHe değeri genellikle asidik bir değeri öngörmektedir (120). Asidik pHe, tümör dokusunun önemli bir özelliğidir, hücre dışı asitleşmenin birincil olarak anaerobik glikolizden laktat salgılanmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Tümör mikroçevresindeki asitlik artışının glikoliz sonucu aşırı derecede üretilen laktik asit birikimi ile olduğu bilinen bir mekanizmadır. Ayrıca CO_2'in tümör mikroçevresinde önemli bir asitlik kaynağı olduğunu ortaya koymaktadır. Tümör mikroçevresinin asidozu, tümör invazyonuna, ilerlemesine ve tedavilere karşı dirence yol açar (121). CO_2 ilişkili her metabolik durum, karbonik anhidraz enzim ailesinin (CA; E.C.4.2.1.1) katkısına işaret etmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda bu enzim ailesinden olan tümör ilişkili CA IX izoenziminin aşırı ekspresyonun hipoksi ile indüklendiği tespit edilmiştir (122).

Vücutta birçok farklı tampon sistemi vardır, asit-baz dengesi için anahtar tampon hücre dışı sıvıda bulunan bikarbonat tampon sistemidir. Bu tampon sistemi dinamik bir dengede bulunan zayıf bir asit (karbonik asit, H_2CO_3) ve onun eşlenik bazını (bikarbonat iyonu, HCO_3^-) içerir (Şekil 2.12.) (123).

$$H^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H_2O + CO_2$$

Şekil 2.12. Bikarbonat tamponu (120)

Mevcut çalışmalar kanserin düzensiz pH'ın, pH sensörleri olarak adlandırılan seçici pH duyarlı proteinlerin yapısını ve işlevini değiştirerek bu spesifik hücre davranışlarını sağladığını göstermektedir (124). Bu moleküler temelin tespiti, pH düzensizliğinin tümörlerin ilerlemesinde ve metastazında nasıl etkileyebileceğini anlamada çok önemlidir. Kanser hücrelerinde metabolik programın değişiklik gösterdiği bir gerçektir. Tümör hücreleri, extracellular matrix (ECM)'i metastazla sonuçlanan pH düzensizliği yoluyla düzenleyebilir veya yeniden programlayabilir

(125). Bu durum, tümörlerde pH düzensizliğinin tümör mikroçevresinde hücre davranışı üzerine yoğunlaşmamıza açmıştır.

Hücre sağkalımı, uygun pH ortamına bağlıdır. Solunum, CO_2 ve laktik asit üretimi nedeniyle, kanser hücreleri sürekli olarak büyük asit-baz akışlarına maruz kalır ve pH dengesi bozulur (126). pH_i'yi uygun bir seviyede tutmak için, hücreler, pH'a duyarlı özel taşıyıcı proteinleri kullanarak H^+ iyonlarının (veya kimyasal eşdeğeri HCO_3^- gibi) trans-membran trafiğini kontrol ederek H^+ iyonları ile proteinlerin iyonlaşma durumunu değiştirirler. Bu hücresel davranış, kanser oluşumu ve metastazdaki etkin süreçler olan proliferasyon, hücre döngüsü, invazyon dahil olmak üzere pH duyarlılığının temelini oluşturmaktadır (126).

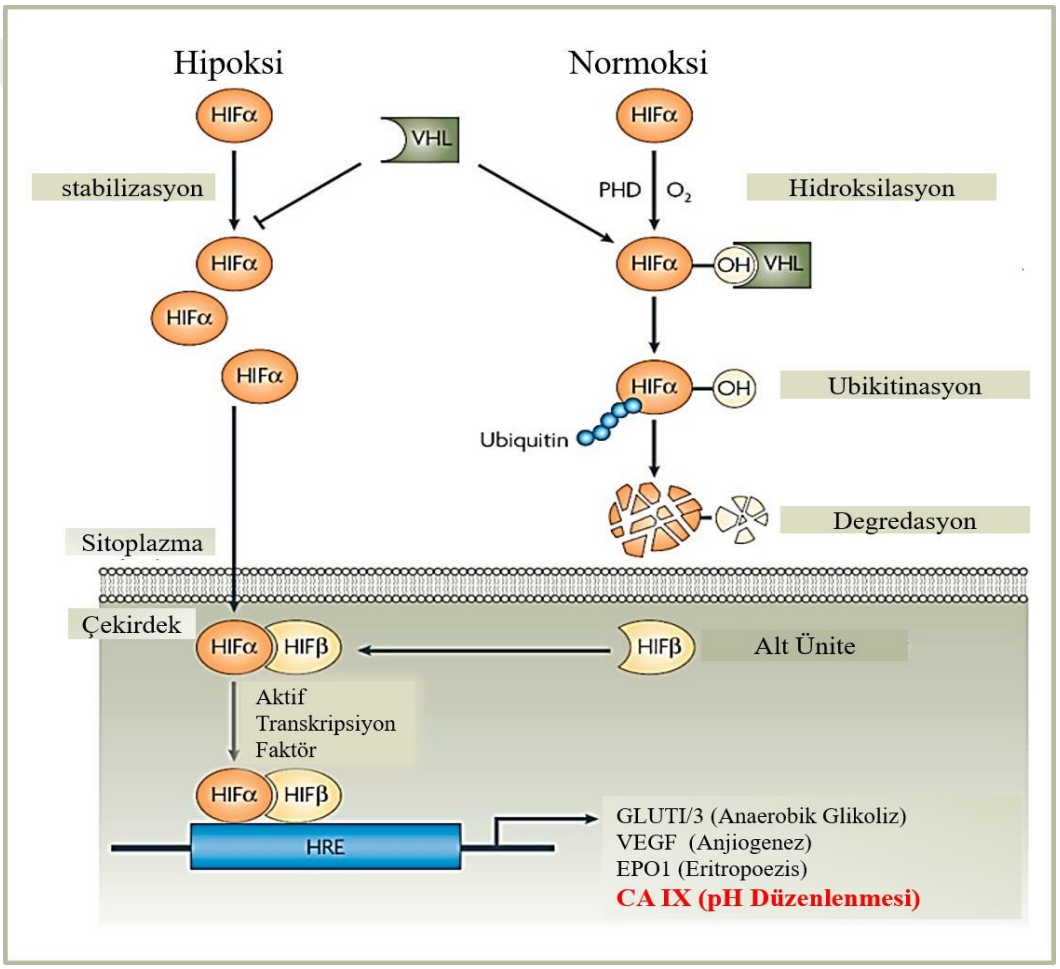
Hücreler, pH_i aktivitesi ile membran proton pompalarını ve taşıyıcıları kontrol ederek pH_i değerini dar bir aralıkta (7.1–7.2) tutar. Bu durum, pH_i'yi korumak için hücreye tamponlama yeteneği kazandırır (127). Bu nedenle normal epitel hücrelere göre artmış pH_i ve düşük pH_e ile ayırt edici özellik kazanır (128). Bu ayırtedici özellik, proliferasyonu, apoptozdan kaçınmayı, metabolik adaptasyonu, göçü ve invazyonu teşvik ederek kanserin ilerlemesini sağlar (129).

2.9. HIF1 Rolü

Tümörlerdeki düşük O_2 seviyeleri hipoksik bölgedeki tümör hücreleri, sağkalım yolaklarını aktive ederek bu düşük oksijen seviyesindeki koşullara adapte olmaya başlar (130). HIF-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu tümör mikro çevredesinde hipoksik hücreler tarafından kullanılan bir yoldur (131). HIF-1, HIF-1α ve HIF-1β alt birimleri olmak üzere iki alt birimden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1α, oksijene duyarlı bir alt birimdir ve ekspresyonu, hipoksik koşullar altında indüklenir (130).

HIF-1α, endotelyal hücre biyolojisinde ve anjiyogenezde önemli bir rol oynamaktadır. HIF-1α yolağının, hem fizyolojik hem de patofizyolojik anjiyogenezde, VEGF gibi diğer proanjiyojenik faktörleri de aktive ederek vaskülatür oluşumundaki temel düzenleyici rolüne sahiptir (132).

Hipoksik koşullar altında oksijen konsantrasyonuna çok duyarlı olan HIF-1α yolağı birçok genin ekspresyonunu düzenleyerek normoksik koşullar altında, prolin hidroksilasyonuna uğrar ve Von Hippel – Lindau proteinine bağlanarak parçalanır. Hipoksik koşullar altında, HIF-1α çekirdeğe geçerek yapısal olarak eksprese edilen HIF-1β ile birleşerek heterodimer halini alır (Şekil 2.12.) (133). Heterodimer daha sonra, tümör hücreleri için hipoksik ortama adaptasyonda çok önemli olan CA IX enzimi de dahil olmak üzere hedef genlerin hipoksiye yanıt veren bölgelerine bağlanır. Bu nedenle CA IX enziminin klinik pratikte yardımcı olabilecek güvenilir bir endojen hipoksik tümör belirteci olarak kullanılması önerilmiştir (134).



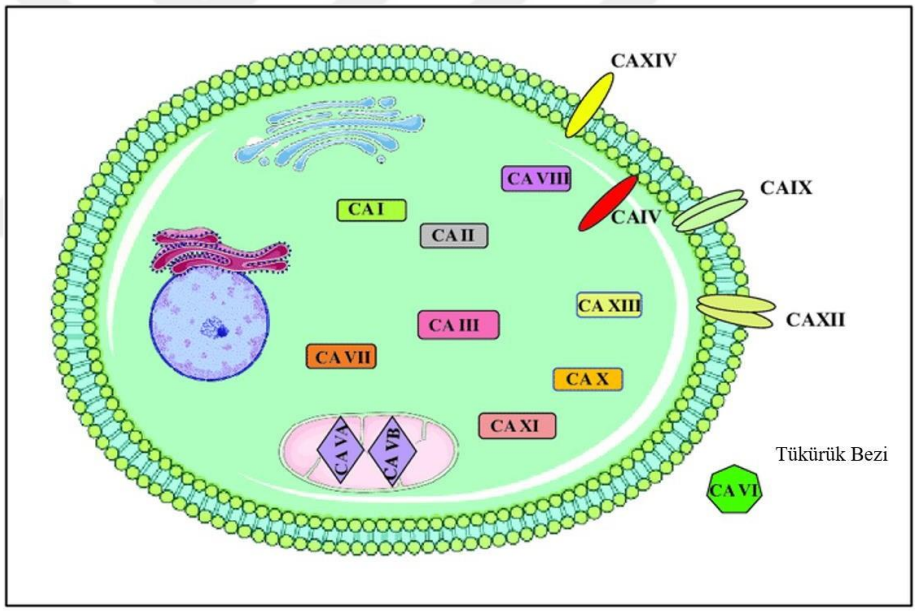
Şekil 2.13. HIF-1α düzenlenmesi (135)

2.10. Karbonik Anhidraz Enzim Ailesi

2.10.1. Karbonik Anhidraz Enzim Ailesi Üyeleri

Karbonik anhidraz enzim ailesi (CA, E.C 4.2.1.1), filogenetik ağacın her yerinde yaygın olarak bulunan ve α-, β-, γ-, δ-, ζ-, η- ve θ- olmak üzere yedi genetik aile tarafından kodlanan enzimlerdir. CA enzimlerinin omurgalılarda 16 tip izoformu bilinmesine karşın bunların tümü α sınıfına aittir (136,137).

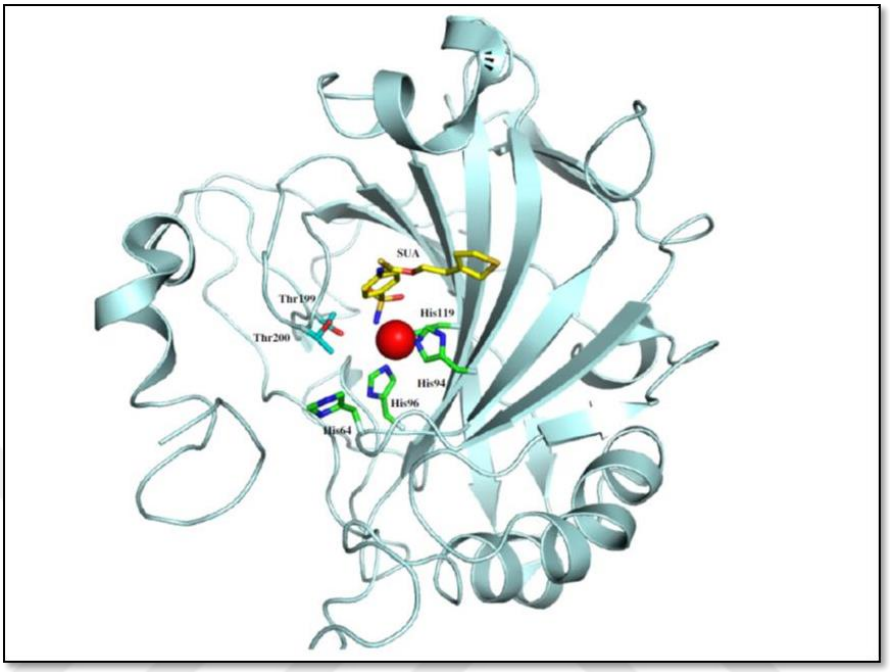
Hücre yerleşimlerinde farklılık göstermekle birlikte CAI, CAII, CAIII, CAVII, CA VIII, CA X, CA XI ve CA XIII Sitoplazmada; CAIV, IX, XII, XIV ve XV, membrana bağlı; CAVA ve VB mitokondride; CAVI ise tükrük bezinde hücre dışında yerleşiktir (Şekil 2.14.) (137).



Şekil 2.14. Karbonik anhidraz izoenzim ailesinin hücredeki yerleşimi (138)

Karbonik anhidraz enzim ailesi CO_2'in tersinir hidrasyonunu katalizleyen çinko-ihtiva eden bir enzimdir ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$). 1933 yılında ilk olarak sığır eritrositlerinde keşfedilen bu enzim, CO_2 taşıma işlevi yanında birçok fizyolojik süreçte rol oynar (139,140).

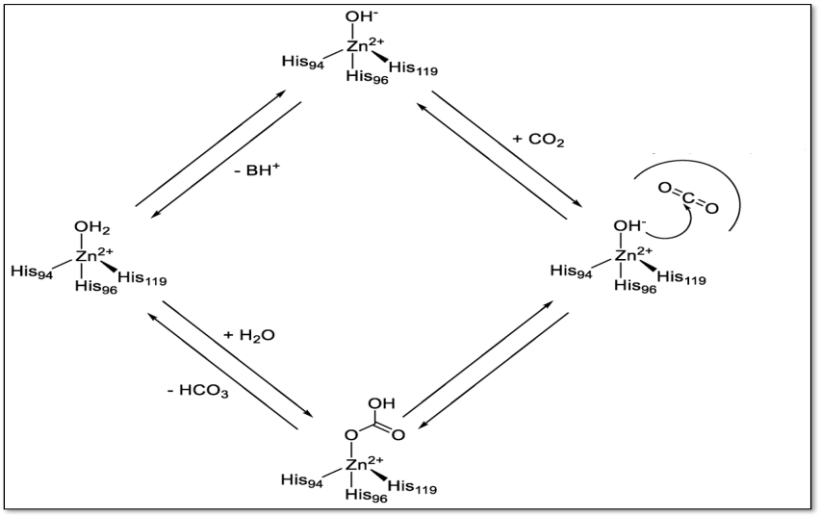
α-, γ - ve δ- CA enzim ailesinde Zn^{+2}, üç histidin kalıntısı ve bir su molekülü/hidroksit iyonu tarafından etkileşime girerek koordine edilir (Şekil 2.14.) (141).



Şekil 2.15. CA'lardaki metal iyon etkileşimi (142)

2.10.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

CA enzim ailesi, hücre lokalizasyonları ve doku dağılımları açısından farklılık göstermektedir. CA izoenzimleri, karbondioksiti bikarbonat iyonuna ve bir protona hidratlayarak reaksiyonu katalizme özelliğine sahiptir. Zn^{+2}-bağlı hidroksit iyonu, bir su molekülü tarafından aktif bölgede enzim-HCO_3 ile birlikte CO_2'e çevrilir (Şekil 2.15.) (143)



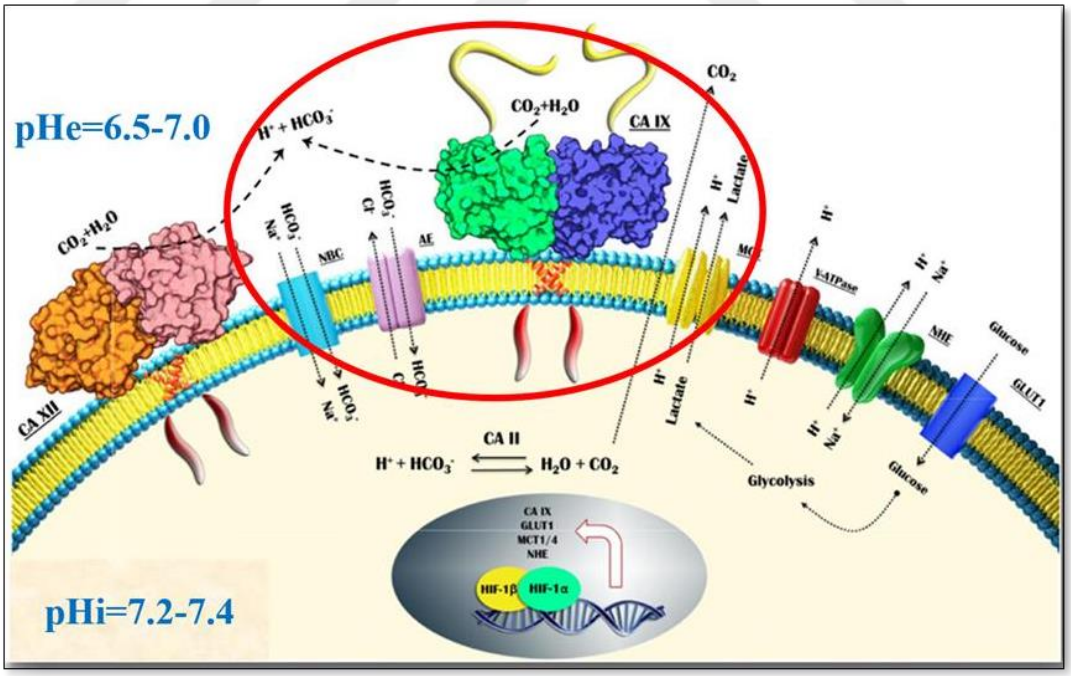
Şekil 2.16. CA katalitik mekanizması (143)

2.10.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

CA enzim inhibisyonu, diüretikler, antiglokomlar, antikonvülsanlar ve antikanser uygulamalarında kullanılmaktadır (144). Sülfonamid/anyon tipi klasik inhibitörlerinden farklı enzim inhibisyon mekanizmaları da bu izoenzimlerin inhibisyonu için tanımlanmıştır. Bu yeni mekanizmalar 1) Çinko bağlayıcılar, enzim aktif bölgesindeki katalitik Zn^{+2} iyonuna bağlanır. Sülfonamidler ve izosterleri, çoğu anyon, ditiokarbamatlar ve bunların izosterleri, karboksilatlar ve hidroksamatlar bu şekilde bağlanır. 2) Çinko-bağlı su molekülü/hidroksit iyonu. Bunlar arasında fenoller, karboksilatlar, poliaminler, 2-tioksokumarinler, sülfokumarinler yer alır. 3) Enzimin aktif bölge girişini engelleyerek enzimin aktivitesini önleyen inhibitörlerdir. Kumarinler ve bunların izosterleri aktivatörlerinin bağlandığı yer ile çakışırak bunu gerçekleştirirler. 4) Karboksilik asit türevi gibi aktif bölge boşluğuna bağlanan bileşikler. 5) İnhibisyon mekanizmasının bilinmediği bileşikler (145). CA inhibitörlerinin spesifik izoformlara karşı seçiciliğini olan CA inhibisyon modelleri yeni farmakolojik ajanlar için daha etkin kullanılmaktadır. Yapılan bu çalışmada, altın nanopartiküller, altın nanorodlar, silika nanopartiküller, poli amidoamin dendrimerler, polioller, fulleren, siklopeptid gibi farklı inhibitörler de kullanılmaktadır (144).

2.10.4. Tümör İlişkili Karbonik Anhidrazlar

Tümörlerin ortak özelliği, hipoksinin neden olduğu asidozdur. Hipoksi, Onkogen aktivasyonu ve dönüşümüne ek olarak, tümör mikro ortamında hücresel metabolizmadaki değişiklik yoluyla asidozu indüklemekten sorumludur (146). İnvaziv kanser hücresi, olumsuz ortama adaptasyonda HIF-1α tarafından düzenlenen moleküller sayesinde tümörün hayatta kalmasını destekler. Bu süreçte transmembran pH düzenleyicileri CA IX ve CA XII izozimleri HIF-1α tarafından uyarılan en önemli enzimlerdir. CA IX, ekspresyonu farklı karsinom tipleri ile yakından ilişkili olduğundan ve hipoksik ortamda indüklendiğinden, hipoksinin bir belirteci ve prognostik göstergesi olarak gösterilir (147). CA enzimi, hücre sağkalımı ve çoğalması için bikarbonat ve proton konsantrasyonlarını düzenleyerek, tümör hücresi pH'sında önemli aracılar olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.16.) (18). Tümör hücrelerinin yüksek metabolik hızından dolayı aşırı CO_2 ve laktik asit üretimi de hücre dışı asitleşmeye katkıda bulunmaktadır. Hücre dışı asidifikasyon durumu fonksiyonel olarak kanser hücrelerinin malign davranışı ile ilişkilendirilmiştir (148).



Şekil 2.17. Tümör hücrelerinde pH düzenlenmesi (149)

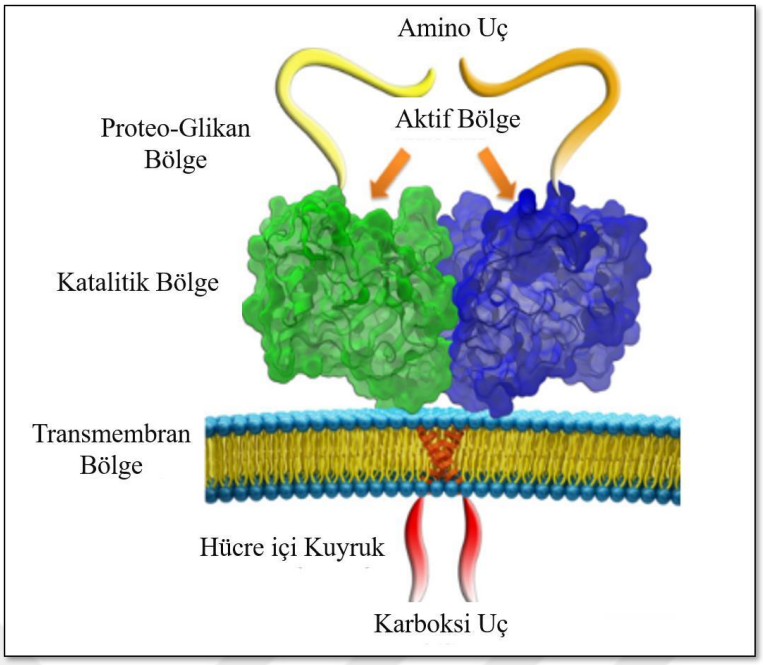
2.10.5. Karbonik Anhidraz IX

Karbonik anhidraz ailesinin bir üyesi ve hipoksi tarafından düzenlenen CA IX, tümör hücrelerinin hipoksi ve asidoza adaptasyonunda anahtar rol oynayan genlerden biridir (150, 151).

CA IX tümör dokularında daha etkin bir ekspresyon düzeyine sahiptir ve çoğu kanser tipinde malignite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (152). CA IX, dimerik bir glikoprotein olup, HIF-1α tarafından hipoksiye yanıtta transkripsiyonel aktivasyonu için gerekli bir HRE elementi içermektedir (153). CA IX normal pH_i korunmasına yardımcı olurken, aynı anda pH_e'ye de katkıda bulunur (154). CA IX, asidik bir mikro-çevre ile bağlantılı olan hücre dışı tümör ortamına bakan transmembran proteinidir. CA IX'un katalitik bölgesinin, düşük pH stabilitesi ve aktivitesi için gerekli olan biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri sergilediği gösterilmiştir (155). CA IX, yapısında mevcut olan negatif olarak yüklü proteoglikan (PG) bölgesinin MCT aktivitesine de yardımcı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (156). Taşıdığı asidik aminoasit bakımından zengin olan proteoglikan bölgesinin, asidik pH değerlerinde CO_2 hidrasyonunu optimize eden tampon görevi gördüğünü rapor edilmiştir (157).

CA IX tümör mikro çevre hipoksisi tarafından aktive edilerek daha yüksek bir transkripsiyon aktivasyonu bakımından farklılıklar göstermektedir (158).

Tümörle ilişkili CA IX'un proteoglikan bölgesi, katı tümörlerin karakteristik asidik pH değerlerinde CO_2 hidrasyonunu optimize eden antrinsik tampon görevi görür. (Şekil 2.18.) (157). Bu izoenzimlerin tümör biyolojisindeki ekspresyon düzeyleri ve fonksiyonel etkilerinin önemi, onları monoklonal antikorlar ile immünoterapi veya enzimatik aktiviteyi inhibe eden bileşikler olarak bir terapötik hedef haline getirmiştir (149). Bu hedefin ana sebebi ise hipoksinin, CA IX izoenzimi için temel indükleyici ajan olarak tanımlanmasıdır (9). CA IX'un proteoglikan bölgesinin asidik pH değerlerinde CO2 hidrasyonunu optimize eden tampon görevi gördüğü rapor edilmiştir (157).



Şekil 2.18. CA IX Enziminin Dimerik Yapısı (149)

CA IX enzimi, tümör hücrelerini hipoksi ve asidozdan koruyan bir sağkalım faktörü olarak işlev görür. Hücre hareketlerini ve invazyonu kolaylaştıran bir invazyon faktör olarak hücre dışı sinyalleri hücre içi yollara ileten ve hücre içi sinyalleri hücre dışı etkilere dönüştüren bir sinyal molekülü olarak işlev görebilir (9). CA IX'un bu özelliği asidik mikroçevre, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) profili, yüksek invazyon yeteneği, apoptoz ve ilaç direncine sahip agresif tümör fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Supuran ve ekibinin yaptığı bu çalışmada, geçici ve kronik olarak asitleştirilmiş ortama (pH 6,7 ± 0,1) maruz kalan melanom, meme ve kolorektal kanser hücrelerinin, standart koşullarda (pH 7,4 ± 0,1) büyüyenlere kıyasla anlamlı derecede artmış bir CA IX ekspresyonu sergilediği gösterilmiştir (21).

Literatürde yapılan bu çalışmada ise, tümör hücre fizyolojisi üzerindeki etkisini araştırmak için CA IX enziminin genom boyu inhibisyonu, temel pH düzenleyici NHE1 ile karşılaştırılmıştır. NHE1'in CA IX tam inhisiyonunun hipoksik koşullardaki tümör hücre büyümesini azalttığı gözlenmiştir (159).

CRC de pro-enflamatuar enzim olan siklooksijenaz-2'nin (COX2) ve CA IX enziminin birlikte inhibe edildikleri çalışmada, CRC hücrelerinin hayatta kalma yeteneklerinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (160).

Tümör hücrelerinde CA IX enzim inhibisyonu ile, pH'ta (pH_i ve pH_e) oluşturulan değişikliğin hücre proliferasyonunu azaltabildiği ve kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebileceği gösterilmiştir (161).

2.10.6. Karbonik Anhidraz IX ve Epigenetik Mekanizmalarla Olan İlişkisi

CA IX, hipoksi tarafından güçlü bir şekilde uyarılır ve aşırı ekspresyonu, kanserde zayıf terapötik sonuç ile ilişkilidir. Hipoksinin, CA IX'un epigenetik regülasyonu yoluyla tümör heterojenitesini teşvik ettiği gösterilmiştir (162).

Kromatin immünopresipitasyonunu kullanarak, eIF2a'ya bağlı translasyonel olarak düzenlenen gen ATF4'ün doğrudan CA IX promotörüne bağlandığı ve transkripsiyonel baskılayıcı histon 3 lizin 27 tri-metilasyon kaybı ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (163).

Hipoksi'nin, histon metilasyonunu indüklediği, oksijen algılama ile kromatin değişimi arasında doğrudan bağlantısı olduğu rapor edilmiştir. Tümöral özelliklerden bağımsız olarak tümör baskılayıcı gen promotörleri hipoksik tümör dokusunda belirgin şekilde daha fazla metillenir (14).

Tümör hipoksisi, 5-metilsitozin oksidasyonu yoluyla DNA de-metilasyonunu katalize eden oksijene bağımlı TET enzimlerinin aktivitesini azaltmaktadır (81). Hipoksiye bağlı pro-fibrotik değişikliklerin, global DNA hipermetilasyonu ve DNMT enzimleri DNMT1 ve DNMT3B'nin artan ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu enzimlerin ekspresyonunun HIF1α tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. DNMT1 ve DNMT3B'nin gen ekspresyon seviyelerinin hipoksi belirteci olan CA IX ile anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur (164).

HIF1α stabilizasyonunun, farklı histon lizin demetilazların ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. HIF-1α, H3K9 ve H3K27 bölgelerini demetile ederek gen transkripsiyonunu artıran KDM3A, KDM4B, KDM4C ve KDM6B'nin ekspresyonunu uyarır (165). KDM3A, KDM3B'nin HIF1α'nın hedefi olduğu ve KDM3A'nın tümör büyümesini arttırdığını bildirilmiştir (166).

Histon demetilaz 6A (KDM6A)'nın, kromatin ve hücre kaderini kontrol etmek için doğrudan oksijeni algıladığı gösterilmiş ve KDM6A kaybının, H3K27 demetilasyonunu önlediği ve hücresel farklılaşmayı bloke ettiğini rapor edilmiştir (167).

Kolon karsinomu hücrelerinde yapılan çalışmada HDAC inhibitörlerinin hücre içi pH'ı düşürdüğü rapor edilmiştir (168). Bu durum, hücrelerin pHi-tamponlama kapasitesini bozabileceğini göstermektedir. pH_i azaldıkça, histonların HDAC'ler ile deasetile edildiğini ve salınan asetat anyonlarının, MCT'ler tarafından hücre dışından protonlarla desteklenerek pH_i'de daha fazla düşüşün önlendiği de rapor edilmiştir (11).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Sarf Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan kullanılan sarf malzemelerin marka ve menşei Tablo 3.1.'de yer almaktadır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Marka	Catalog No	Menşei
Total Histon ekstraksiyon kiti	EpiQuik™, Epigentek	Cat. # OP-0006	ABD
Histon H3 Modifikasyon kiti	EpiQuik™, Epigentek	Cat. # P-3100	ABD
Reverse Transkriptaz Kiti	QuantiNova	205411	Almanya
RT-PCR Kit (Mix)	QuantiNova	208252	Almanya
RNA izolasyon kiti	QIAGEN	217084	Almanya
Fetal Bovin Serum (FBS)	Capricorn	CP17-1756	Almanya
Penisilin-streptomisin	Capricorn	CP17-1828	Almanya
Asetazolamid, CA-IX inhibitörü	Sigma	BCBZ9159	ABD
Hücre Proliferasyon Test Kiti	Cayman Chemical	10008883	ABD

3.1.2 Makine-Teçhizat

Çalışmamızda kullanılan kullanılan makine ve teçhizatların listesi Tablo 3.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan makine ve teçhizatlar

Sarf Malzeme	Marka	Menşei
Laminar flow-Class II	Telstar	Japonya
CO2 İnkübatör	Panasonic	Japonya
pH-metre	Thermo Scientific	ABD
Fluorometre	Thermo Fısher	ABD
Mikroplate okuyucu (Elisa Reader)	Biotek Epoch/2/	ABD)
Mikro Santrifüj	Hettıch	Almanya
Genel amaçlı Santrifüj (Unıversal 320 R**)**	Hettıch	Almanya
Azot Tankı	Thermo Fısher	ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

İnsan kolon kanser hücre hattı HT-29, Ankara Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Fizyoloji laboratuvarından temin edilmiştir. Hücre hatları %10 FBS, %1 penisilinstreptomisin ilave edilmiş, 4,5 glukoz, L-glutamin ve sodyum piruvat içeren hazır DMEM, Cellgro ortamında Tülüce vd. (2016)'da tanımlandığı şekilde kültüre edilmiştir (169).

Tablo 3.3. HT-29 hücre hattının özellikleri

Organizma	İnsan
Doku	Kolon
Morfoloji	Epitel
Hastalık	Kolorektal Adenokarsinom
Yaş	44 Yaşında Yetişkin
Cinsiyet	Kadın
Etnik köken	Kafkas

Sıvı azot tankında bulunan hücreler ekim işlemleri öncesinde benmaride 37 °C'de çözünmeye tabi tutulmuştur. Bu hücreler 15 mL falkonda 10 mL'lik medium eklenerek 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet, 2 mL DMEM ile homojenize edilmiş ve hücre sayısına bağlı olarak 25 cm^2 yüzey alanına sahip flasklara ekilerek son hacim besiyeri ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 37 °C ve %5 CO_2 koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Besiyeri değişimi hücrelerin canlılığı dikkate alınarak 2 günde bir gerçekleştirilmiştir. Hücreler tüm flaskın yüzeyine kapladıktan sonra deneyler için büyüyebilecekleri alan kalmadığı için pasajlama işlemi yapılmıştır.

Flaskta bulunan besiyeri uzaklaştırılarak içinde bulunan artıfaktların giderilmesi için 5 ml PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra tabana yapışık olan hücrelerin ayrılması için 3 mL Tripsin eklenerek etüvde 3 dk inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu işlemden sonra kontrol için invert mikroskopta değerlendirilmiştir. Ardından 7 mL PBS flask üzerine eklenip süspanse edilmiştir. 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. 6 lık well/platelere her

kuyucuğa 10^7 Hücre düşecek şekilde ekim yaıldı. Her plate'te bulunan her kuyucuğa 2 mL besiyeri eklenmiştir. Hücreler 37 °C ve % 5 CO_2 koşullarında inkübasyona 24 saat bırakılmıştır.

3.2.2. Hücre Sayımı

Hücre sayımı deneyde kullanılacak hücre ve inhibitör miktar tayinini belirlemek için yapılmıştır. Bu işlemi gerçekleştirmek için hücre süspansiyonu ve tripan mavisinden 1:1 oranında 10'ar µl alınarak karıştırılarak hazırlanan solüsyondan 10 µl Thoma lamına alınarak sayım işlemi gerçekleştirilmiştir (170).

3.2.3. Hücre Çoğalma ve Canlılık Deneyleri

Hücre canlılık testi WST-1 kit 4- [3- (4-İyodofenil) -2- (4-nitro-fenil) -2H-5-tetrazolio] -1,3-benzensülfonat) kullanılarak 96'lık well-platelerde yapılmıştır. Bu canlılık testinin prensibi hücresel mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından tetrazolyum tuzu olan WST-1'ın formazan kristallerine dönüşmesi esasına dayanır. Canlı hücrelerin sayısı ne kadar fazla ise mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesi o kadar yüksek olur ve bu da oluşan formazan boyası miktarını artırır. Hücre canlılık testi için HT-29 hücreleri 96'lık plakada inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyondan sonra hücrelere sırasıyla 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarda hazırlanan Asetazolamid (AZA) uygulanmıştır. Denemeler, 24 ve 48 saat zaman aralıklarında, normoksik ve hipoksik ortamda tekrarlanmıştır. Kontrol olarak kullanılan kuyucuklara inhibitörler yerine besiyeri eklenmiştir (171).

Her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu ilave edilerek 37 °C 'de 2-4 saat aralığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası 450 nm dalgaboyunda ölçüm yapılarak hücreler için uygun olan inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. Hücrelerin canlılık değerleri hesaplanırken;

$$\%\ canlılık = \frac{inhibitör\ absorbans\ X\ 100}{Kontrol\ absorbans}$$

$$\%\ inhibisyon\ konsantrasyonu\ (IC50) = 100 - \frac{inhibitör\ absorbans\ X\ 100}{Kontrol\ absorbans}$$

formülü kullanılmıştır. İnhibitör konsantrasyonu değerleri grafiğe dönüştürülerek hücrelerin % 50 sini inhibe eden inhibitör dozu (IC_{50}) değeri hesaplanmıştır.

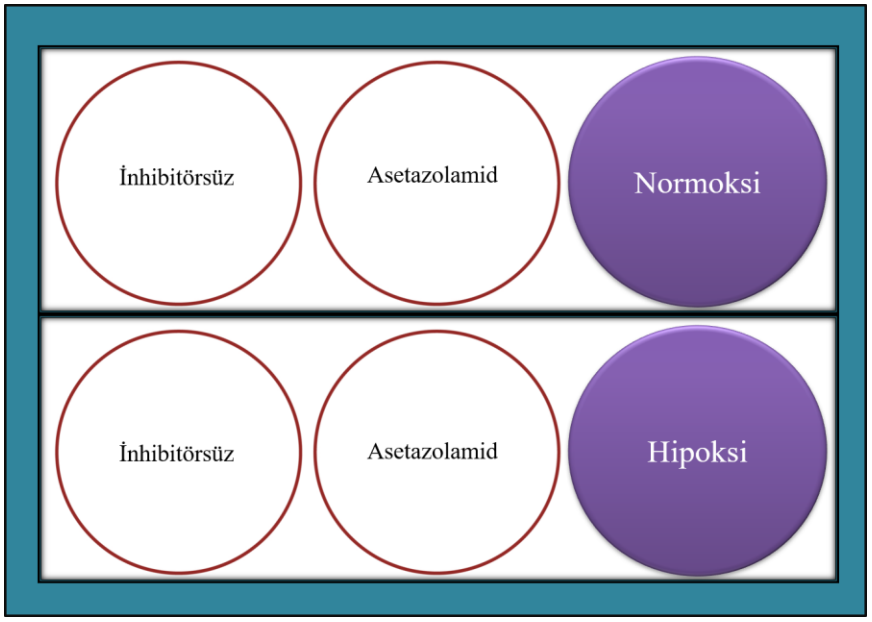
3.2.4. İnhibitör Uygulanması

CA IX enzim inhibisyonu için çalışmada kullanılan AZA diüretik, antiglokom ve antikonvülsan özelliklere sahip bir sülfonamid türevidir.

Tablo 3.4. Kullanılan İnhibitörün Özellikleri (172)

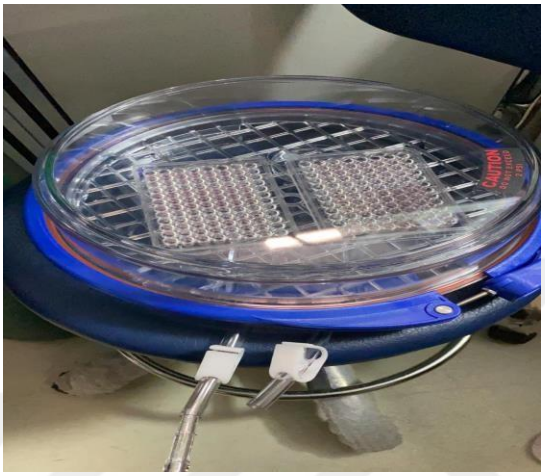
Asetazolamid	
İnhibisyon Tipi	Yarışmalı olmayan inhibisyon
Molekül Formülü	$C_4H_6N_4O_3S_2$
Moleküler Ağırlık	222,3 g / mol
Sinonim	N-(5-Sulfamoyl-1,3,4-tiyadiazol-2-yl) asetamid 5-Asetamido-1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamid
CAS No	59-66-5

Hesaplanan inhibisyon dozları sonrası normoksik ve ve hipoksik koşullarda inhibitörlü ve inhitörsüz olmak üzere kuyucuklara 10^7 hücre/mLdüşecek şekilde ekim gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Hücre kültürü plate düzeni

Normoksi ortam için hücreler 37 °C ve % 5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Hipoksik ortam için hipoksik-Çember (Stemcell Technologies) kullanıldı. Hipoksik-Çember fizyolojik hipoksiyi mimik eden gaz sızdırmaz bir cihazdır. Hipoksi odacığı ve single flowmeter olarak iki parçadan oluşur. Hipoksi odacığı, Hipoksi için gerekli olan %2 O_2, %88 azot (N_2) ve %10 CO_2 içeren bir tüpe bağlıdır.



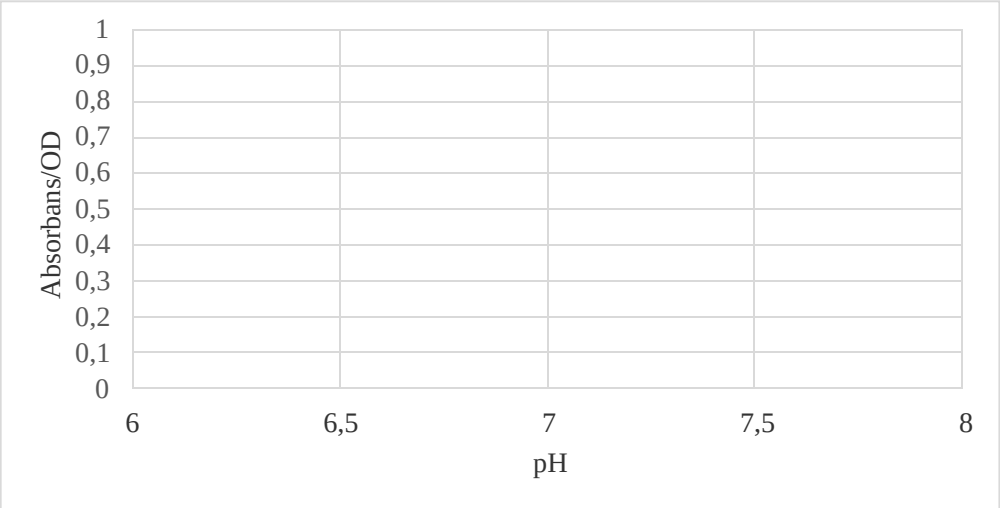
Şekil 3.2. Hipoksik-Çember

Hipoksik-çember orta yerinde bulunan kelepçe ile gevşetilirek açıldı. Tüm yüzeyler sızıntı olmaması için kontrol edilirek deney için hazırlamış olduğumuz plateler çemberin içine yerleştirildi. Kelepçe sıkıştırılarak cihazın arka kısmında bulunan klipsler açıldı. Gaz tüpü açılarak flowmetre yardımı ile 20 litre geçecek şekilde ayarlanarak hipokski odasından 7 dakika boyunca gaz karışımı geçirilmiştir. Bu süre sonunda cihaz tüpten ayırıldı ve çember inkübatöre kaldırıldı (173).

3.2.5. pH Ölçümü

Hipoksi öncesi ve sonrası olarak ortam pH değişiminin doğrulanması için öncelikle pH indikatörü olan Fenol Red ile pH standardizasyonu çalışması yapılarak inhibitör uygulanması işleminin öncesi ve sonrası parametrelerinin kullanımı ile CA-IX enzim inhibisyonunun doğrulanması gerçekleştirilmiştir.

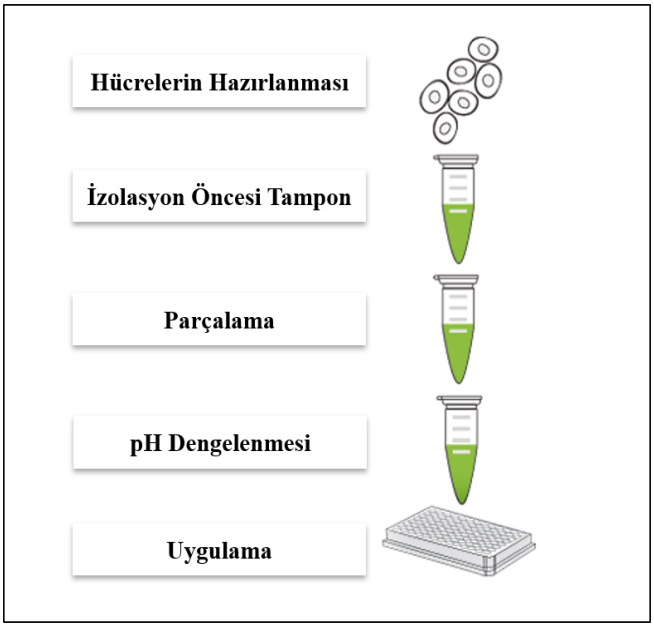
460 nm, 560 nm ve 720 nm farklı dalga boylarında ölçümleri alınarak çalışmanın optimum dalgaboyu 460 nm referans olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.3. pH standardizasyonu

3.2.6. Total Histon Protein İzolasyonu

Çalışmamızda Liu ve grubunun 2019 yılındaki çalışmasına göre enzimatik aktivitenin korunması prensibine dayanan nükleer proteinlerin hücrelerden izole edilmesi için EpiQuik Nükleer Ekstraksiyon Kiti (Epigentek, USA) kullanılmıştır (174). Deneydeki ön parçalama, parçalama ve denge tamponları ile muameleden sonra, toplam çekirdek histonları, hemen kullanım için ekstrakte edildi.



Şekil 3.4. Toplam Histon protein izolasyon basamakları

Hipoksik çember ve inkübatörde bulunan hücreler tripsin ile muamele sonrası, PBS ile yıkanarak medium içerisine alınmıştır ve aşağıdaki işlem basamakları sırasıyla gerçekleştirilmiştir (174);

1. Hücreler 2 mL'lik ependorf tüpler içinde 4°C 1000 rpm de 5 dk santrüfüj edildi.
2. 10X Pre-Lysis Buffer 1:10 oranında distile su ile sulandırıldı.
3. Pre-Lysis Buffer ile 10^7 hücre/ mL süspanse edilderek buzda 10 dk karıştırıldı.
4. 4°C 3000 rpm de 5 dk santrüfüj yapıldı.
5. Supernatan uzaklaştırıldı.
6. hacim Lizis buffer ile yaklaşık 200 µL hücre pelleti buzda 30 dk inkübe edildi.
7. 12.000 rpm de 4°C 5 dk santrüfüj yapılarak süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.
8. İzole edilen protein üzerine 0.3 mL Balance-DTT Buffer eklendi.
9. Kantitatif protein miktar tayini için nanodrop cihazı kullanılmıştır.

3.2.7. Histon H3 Modifikasyonları Analizi

H3 modifikasyonlarının değişim düzeylerini belirlemek için *EpiQuik Histone H3 Modification Multiplex Assay* kiti (Epigentek, USA) kullanılmıştır (175). Her bir histon H3 modifikasyonu, 96' lık plate içerisinde spesifik olarak uygun antikor ile kaplanmış kuyucuklarla hazırlanmıştır (Tablo 3.5.). Örnekler aşağıdaki sırayla plate içindeki kuyucuklara yüklenmiştir.

Tablo 3.5. Örnek yükleme sırası

1. Örnek	HT-29 Normoksik (inhibitörsüz)
2. Örnek	HT-29 Normoksik (inhibitörlü)
3. Örnek	HT-29 Hipoksik (inhibitörsüz)
4. Örnek	HT-29 Hipoksik (inhibitörlü)

Deney protokolü doğrultusunda modifiye edilmiş histon oranları, 450 nm dalga boyunda absorbans yoğunluğu ölçülerek hesaplanmıştır (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. H3 antikor modifikasyonuna sahip 96'lık well plate içeriği

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Assay control 5 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
Assay control 5 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
Assay control 25 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
Assay control 25 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P

Her bir histon H3 modifikasyonunun ölçümünü gerçekleştirmek için aşağıdaıka deney protokolü uygulanmıştır (175);

1. Yıkama Solusyonu (Wash Buffer 1X): 26 mL of WB 10X üzerine 234 mL distile su eklenerek hazırlandı.
2. Antikor Hazırlanması (DA-Detection Antibody) solution: 1:1000 oranında 50 µL DA ile 50 mL WB eklenerek hazırlandı.
3. Kontrol Hazırlanması: Kontrol solüsyonları kontrol 1 ve kontrol 2 olmak üzere aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.
   i. Kontrol 1 (100 ng/µL) 19.0 µL (Antikor) 5 ng/µL (Kontrol Konsantrasyonu)
   ii. Kontrol 2 (100 ng/µL) 3.0 µL (Antikor) 25 ng/µL (Kontrol Konsantrasyonu)
4. Blank kuyucukları: Her bir blank kuyucuğuna 49 µL AB solüsyonu eklendi.
5. Kontrol kuyucukları: kontrol kuyucuklarına 49 µL AB solüsyonu ve sırasıyla, 5 ng/µL ve 25 ng/µL kontrol eklendi.
6. Örnek Kuyucukları: Her bir örnek kuyucuğuna 48 µL AB solüsyonu 2 µL histon ekstraktı eklendi. Deney örnekleri sırayla hazırlanarak plate içindeki kuyucuklara yüklendi.
7. Buharlaşmayı önlemek için 96 lık plate üzeri hava almayacak şekilde film ile kaplandı. Sonra 37 °C de 100 dk inkübasyona bırakıldı.
8. Kuyucuklardaki reaksiyon solüsyonlarını uzaklaştırmak için her bir kuyucuğa 150 µL WB eklenerek yıkama yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
9. Her bir kuyucuğa 50 µL DA (detection antibody) eklendi. Ve alümünyum folyo ile kaplanarak oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı.

10. DA solüsyonu uzaklaştırmak için 150 µL WB solusyonu eklenerek yıkama yapıldı. Bu işlem 4 kez tekrarlandı.
11. Her kuyuya 100 ul DS solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
12. Pozitif kontrol kuyucuklarındaki renk orta maviye döndüğünde enzim reaksiyonunu durdurmak için her kuyucuğa 100 µL SS (stop solüsyon) eklendi.
13. SS eklendikten sonra renk sarıya dönünce ve 450 nm'de mikroplaka okuyucusunda okundu.
14. Mikroplate okuyucudan çıkan değerler aşağıdaki şekilde hesaplandı (Şekil 3.5.) (172).

$$\text{H3 Modifikasyonu (ng/µg protein)} = \frac{\text{(Örnek OD - Blank OD) /Örnek Miktarı}}{\text{(Kontrol OD - Blank OD) /Kontrol miktarı}} \times 1000$$

Şekil 3.5. H3 Modifikasyan hesaplama formülü

3.2.8. RNA İzolasyonu

HIF1-α, EZH2 ve CA-IX genlerinin ekspresyon değişimlerini gözlemek amacıyla normoksik ve hipoksik ortam oluşturulduktan sonra RNA izolasyonu yapılmıştır (176). RNA izolasyonu için miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Kullanılan izolasyon kit prensibi, numunelerin total RNA'sını silika membran ile fenol/guanidin bazlı parçalayarak saflaştırması temeline dayanmaktadır (177). Deney protokolünde kit içeriğine ilave edilen QIAzol Lizis Reaktifinin kullanım amacı, fenol ve guanidin tiyosiyanatın monofazik bir çözeltisi olup dokuların parçalanmasını kolaylaştırmak, RNazları inhibe etmek ve ayrıca hücresel DNA ve proteinlerin çoğunu organik ekstraksiyon yoluyla lizattan çıkarmak içindir (178). Kit protokol esasları Tablo 3.7'de belirtildiği şekilde kullanılmıştır.

Tablo 3.7. RNA izolasyon kit içeriği

Rnaz içermeyen saf su	10 Ml
RNeasy Spin Kolonları	50 adet
Toplama Tüpleri (1.5 mL)	50 adet
Toplama Tüpleri (2 mL)	50 adet
Lizis Tamponu	50 mL
RWT Tamponu	15 mL
RPE Tamponu	11 mL

Normoksik ve hipoksik ortam oluşturulduktan sonra RNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır;

1. RWT ve RPE tamponları konsantre bir formda olduğu için seyreltilmiştir.
2. Peletlenmiş hücreler, tüpe hafifçe vurarak hücre pelletini iyice gevşetiidi. 700 µL QIAzol Lizis Reaktifi eklenerek 2 dk vortekslendi.
3. Homojenat içeren tüp 10 dk oda sıcaklığında inkübe edin. 2 dk ara ile vortekslendi.
4. Homojenatı içeren tüpe 140 µL kloroform eklenerek sıkıca kapatıldı. Tüp 15 saniye kuvvetlice çalkalandı.
5. Homojenat içeren tüp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. 4 °C'de 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi.
7. Santrifüjlemeden sonra, numunede 3 faza oluştu: RNA içeren bir üst, renksiz, sulu faz; beyaz bir ara faz; ve daha düşük, kırmızı, organik bir faz. Sulu fazın hacmi yaklaşık 350 µL.
8. Üst sulu faz yeni bir toplama tüpüne aktarıdı. 525 µL % 100 etanol eklenerek birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırıldı. Santrifüj etmeyin.
9. Oluşan çökelti de dahil olmak üzere 700 µL'ye kadar numune RNeasy Mini spin kolonuna pipetlendi. RNeasy spin kolonu 2 mL'lik toplama tüpüne oturtuldu.
10. 10.000 rpm'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüjlendi. Santrifüj sonrası aşağı inen kısmı atıldı. İşlem bir kez daha tekrarlandı ve alt kısım atıldı.
11. RNeasy Mini spin kolonuna 700 µL Buffer RWT eklendi.
12. 10.000 rpm'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüjlendi. Santrifüj sonrası aşağı inen kısmı atıldı. İşlem bir defa daha tekrarlandı.
13. RNeasy Mini spin kolonuna 500 µL Buffer RPE eklendi.
14. 10.000 rpm'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüjlendi. Bu işlem 2 kez yapıldı.

15. RNeasy Mini spin kolonuna tekrar 500 µL Buffer RPE eklendi. 10.000 rpm'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüjlendi. Santrifüj sonrası aşağı inen kısmı atıldı
16. 1 dakika boyunca tam hızda boş olarak mikrosantrifüjde santrifüjlendi.
17. RNeasy Mini spin kolon yeni bir 1,5 mL toplama tüpüne aktarıldı. 50 µL RNaz içermeyen su doğrudan RNeasy Mini dönel kolon membranına pipetlendi. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
18. Santrifüj sonrası 1,5 mL tüpe inen bölüm total RNA olarak kaldırıldı. RNA'lar kapakları kapatılarak hemen buz üzerine alındı. cDNA sentez basamağına geçildi.

İzole edilen RNA'ların saflık ve miktarları "QIAxpert" cihazı ile 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbsiyon değerlerine (A260nm/A280nm) bağlı olarak hesaplanmıştır (179).

3.2.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Hedef genlerin ekspresyonunun belirlenebilmesi için, öncelikle izole edilen RNA'lar cDNA'ya çevrilmiştir. Bu işlem için "QuantiNova Reverse Transcription Kit" kullanılmıştır (180). cDNA sentezi işlemi öncesi, DNA kontaminasyonunu engellemek için genomik DNA inhibisyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için genomik DNA giderme reaksiyonu temelinde "gDNA Removal Mix" kullanılmıştır (Tablo 3.8.).

Tablo 3.8. Genomik DNA giderme reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim
gDNA uzaklaştırma Mix	2 µL
Kalıp RNA	Değişken
RNAse İçermeyen Su	Değişken
Toplam Hacim	15 µL

Tablo 3.5.'deki RNA izolasyon kit içeriği hazırlandıktan sonra tüpler 45 °C'de 2 dakika inkübe edildikten sonra cDNA sentez basamağına geçirildi ve ters transkripsiyon reaksiyonu için gerekli bileşenler hazırlandı (Tablo3.9).

Tablo 3.9. Ters Transkripsiyon Reaksiyon Bileşenleri

Bileşen	Hacim
Ters Transkripsiyon Enzimi	1 µL
Ters Transkripsiyon Mix	4 µL
Kalıp RNA	15 µL
Toplam Hacim	20 µL

Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirildikten sonra reaksiyon, 3 dakika 25°C'de, 10 dakika 45°C'de ve 5 dakika 85°C'de her bir basamak 1X döngüde olacak şekilde sentez toplamda üç basamakta gerçekleşmiştir.

3.2.10. Gen Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

Gen ekspresyon seviyeleri belirlemede kantitatif real time PCR işlemi için "QuantiNova LNA PCR Assay"protokolü çalışmamızda kullanılmıştır (Tablo 3.7). Normoksik ve hipoksik koşullar altında EZH2, HIF1-α ve CA-IX gen ekspresyon seviyelerini belirleyebilmek için ilgili gen bölgesine bağlı primer ve kilitli nükleik asit probları (locked nucleic acid probes, LNA probes) kullanılmıştır (181). Öncelikle 0.1 mL'lik PCR tüplerine mastermix eklendikten sonra , tüp içeriğine 5 µL cDNA örneği ilave edilerek Rotor Gene Q cihazında reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.10 ve 3.11).

Tablo 3.10. RT-PCR Reaksiyon Bileşenleri

Bileşen	Hacim
2x QuantiNova Probe PCR Master Mix	10 µL
10x Probe PCR Assay	2 µL
RNAse İçermeyen Su	3 µL
Toplam Hacim	15 µL

Tablo 3.11. Çalışmada Kullanılan Primerler

Primerler	Katalog Numarası	Marka/Menşei
HIF1A	UPFH0476121-HS_597202	QuantiNova/Almanya
EZH2	UPFH0128337-HS_249394	QuantiNova/ Almanya
CA9	UPFH1132903-HS_2476193	QuantiNova/ Almanya
GAPDH	UPFH0007663-HS_128711	QuantiNova/ Almanya

Tablo 3.12. RT-PCR Reaksiyon Adımları

Adım	Zaman	Sıcaklık
PCR ilk ısı inaktivasyonu	2 dk	95°C
Denatürasyon	5 sn	95°C
Primerlerin bağlanması ve uzaması	5 sn	60°C
Toplam Döngü Sayısı	40	

3.2.11. İstatistiksel Analiz

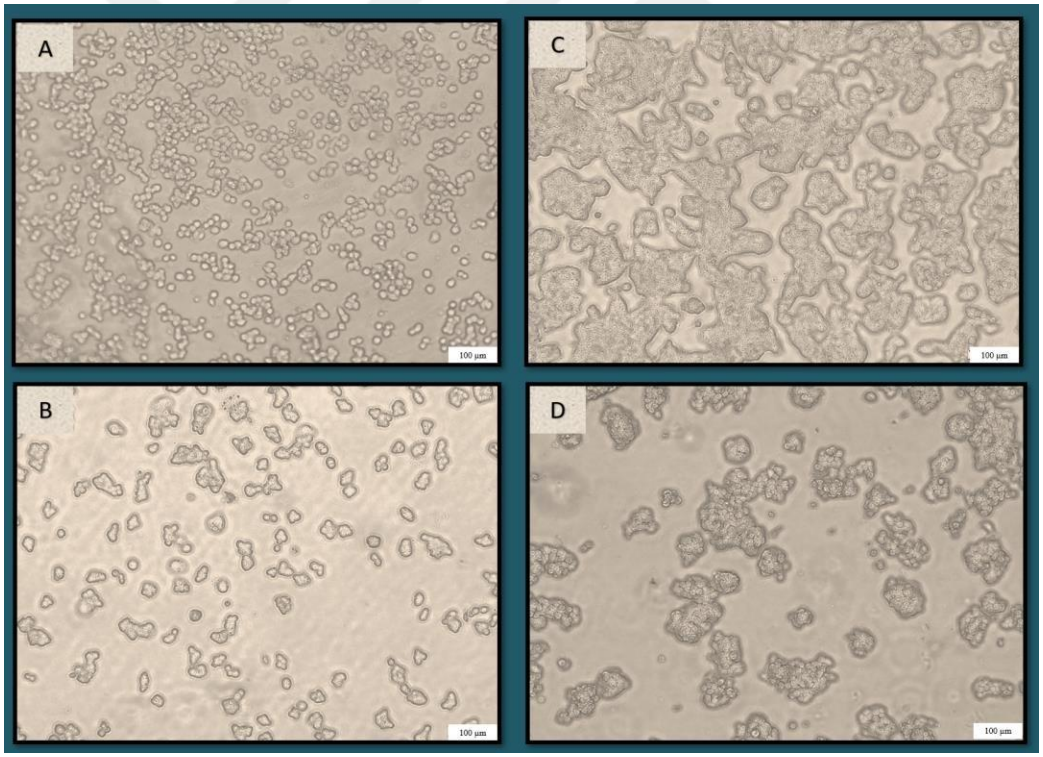
qPCR reaksiyonu sonrasında mRNA ekspresyon düzeyleri delta CT metodu ile, $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ treatment - ΔCT control formülünden fold change= $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri ile hesaplanmıştır. Test ve kontrol grupları arasındaki anlatım değişiminin istatistiki anlamlılığı için p değeri t testi ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Sonuçları

HT-29 hücrelerinin inkübasyon sonrasında invert mikroskopla görüntüleri alınmıştır. Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda CA IX enzim inhibitörü AZA'nın etkisi gösterilmiştir (Şekil 4.1.). Normoksik koşullar altındaki AZA ile HT-29 hücrelerinin inhibisyonu sonucu hücrelerin adhezyon yeteneklerini kaybederek küçük kümeler halinde invaze oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.1-A-B-C-D).

Hipoksik koşullar altında HT-29 hücrelerinin hem inhibitörlü hem hem inhibitörsüz olmak üzere geniş kümeler halinde daha fazla invazyon gösterdikleri gözlemlenmiştir. Hipoksiye maruz bırakılan ve inhibitör uygulanan HT-29 hücrelerinde daha fazla morfolojik değişim meydana gelmiştir.



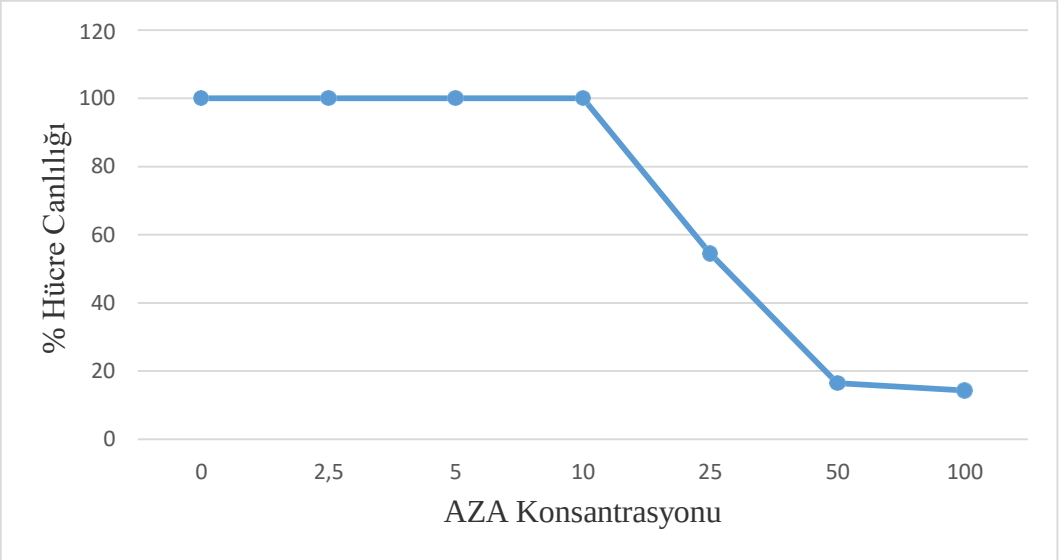
Şekil 4.1. HT-29 Hücre kültürü mikroskobi görüntüleri. A. Normoksik durum (inhibitörsüz), B. Normoksik durum (inhibitörlü), C. Hipoksik durum (inhibitörsüz), D. Hipoksik durum (inhibitörlü)

4.2. Hücre Canlılık Testi ve İnhibisyon Sonuçları

Pozitif kontrol grubuna uygulanan AZA, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM'lik dozlarda 0, 24, 48 saat sürelerle test edilmiştir. Tüm kuyucuklara 10 µl WST1 (Water Soluble Tetrazolium-1) reaktifi ilave edilip 4 saatlik inkübasyonun ardından 450 nm dalga boyunda BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer cihazında ölçüm yapılmıştır (Tablo 4.1.- Tablo 4.2.). Çalışmada CA IX inhibitörü AZA için IC50 değeri hesaplanmıştır. 48. saatte tespit edilen sitotoksisite yüzdeleri ile AZA'in IC50 değeri hesaplanmıştır. AZA için; HT29 hücre hattındaki IC50 değeri 35.2 µM olarak belirlendi.

Tablo 4.1. HT-29 Hücre Hattında 24. Saat Değişen Konsantrasyonlarda Hücre Canlılık Oranları

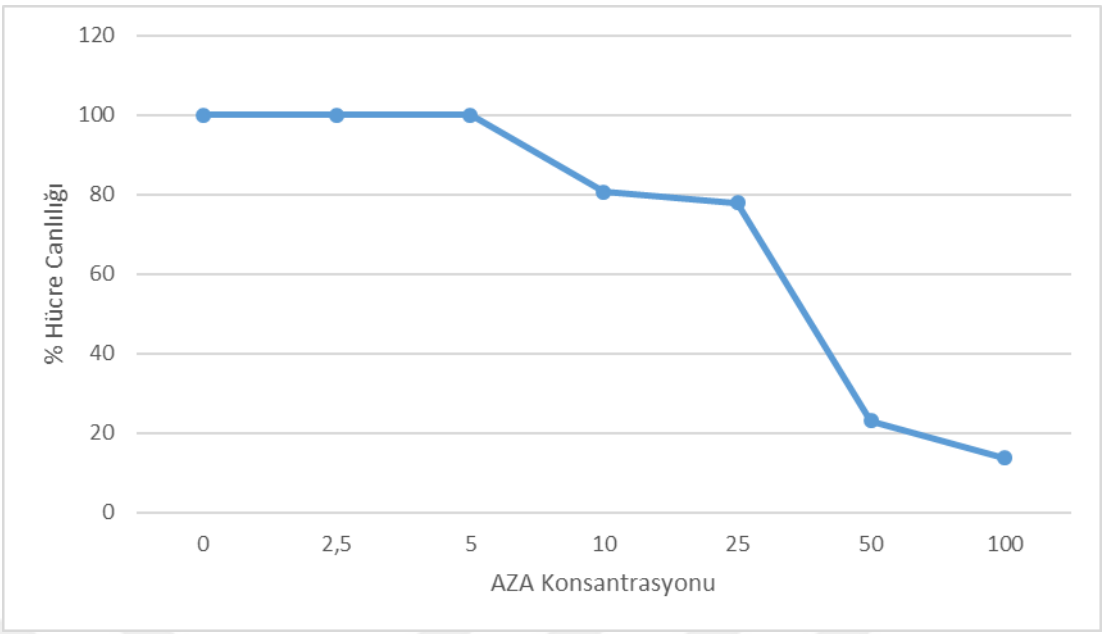
Normoksik 24. Saat Değerleri (AZA)		
Konsantrasyon (µM)	**Canlılık (%)**	**İnhibisyon (%)**
0	100	0
2,5	100	0
5	100	0
10	100	0
25	54,5	45,5
50	16,5	83,5
100	14,3	85,7



Şekil 4.2. HT-29 hücre hattında 24. Saat hücre canlılığı (%)

Tablo 4.2. HT-29 hücre hattında 48. Saat değişen konsantrasyonlarda canlılık oranları

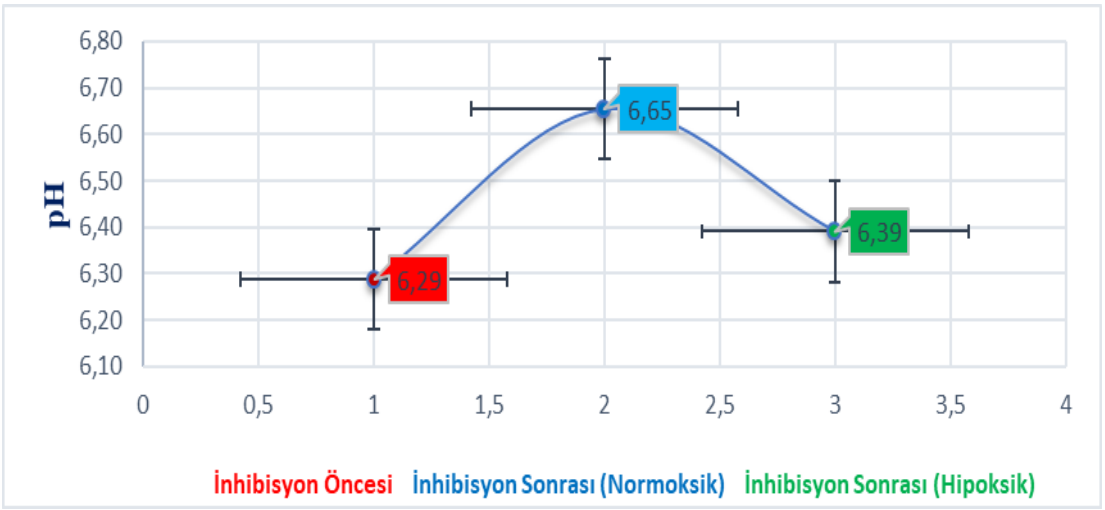
48. Saat Değerleri (AZA)		
Konsantrasyon (µM)	**Canlılık (%)**	**İnhibisyon (%)**
0	100	0
2,5	100	0
5	100	0
10	80,6	19,4
25	77,9	22,1
50	23	77
100	13,6	86,4



Şekil 4.3. HT-29 hücre hattında 48. Saat hücre canlılığı (%)

4.3. pH Değişimi

HT-29 hücre hattına uygulanan AZA inhibisyon öncesi hücrelerin ekstraselüler matriksteki pH değeri 6.29 olurken, CA IX inhibisyonu sonrasında normoksik koşullarda hücrelerin asidifikasyonun azalmasına neden olmuştur (pH-6,65). Benzer şekilde CA IX enzim inhibisyon sonrası hipoksik koşullarda HT-29 hücrelerinde ise asidifikasyonun azaldığı gözlenmiştir (pH-6,39).



Şekil 4.4. pH değişimi

4.4. Total Histon Protein İzolasyonu

HT-29 hücre hattında, total Histon protein izolasyonu gerçekleştirildikten sonra yapılan ölçümlerde normoksik koşullarda AZA inhibitörü uygulanan hücrelerde total histon protein miktarında %23 azalmanın gerçekleştiği tespit edilmiştir. Hipoksik koşullarda ise bu durum, AZA inhibitör uygulanan hücrelerde total histon protein miktarında % 32 artışa neden olmuştur.

Tablo 4.3. Total histon protein miktarı ve konsantrasyonları

Örnek	Konsantrasyon (mg/ mL)	Miktar (ng/kuyucuk)	
HT-29 Normoksik-inhibitörsüz (N-)	2,627	5.254	↓
HT-29 Normoksik-inhibitörlü (N+)	2,016	4.032	
HT-29 Hipoksik-inhibitörsüz (H-)	2,378	4.756	↑
HT-29 Hipoksik-inhibitörlü (H+)	3,162	6.324	

4.5. Histon H3 Modifikasyonları Analizi

Histon H3 Modifikasyon analizi, Histon H3 bir multipleks enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA) ile değerlendirilmiştir. H3 içeriği ile normalize edilen her bir kuyucuk, bağımsız H3 modifikasyonu ölçümünü temsil etmektedir (Tablo 4.4) (175).

Tablo 4.4. 96'lık plate için modifiye edilen antikorların Histon 3 modifikasyon OD değerleri

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Assay control 5 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
0.330	0.291	2.694	2.674	2.125	2.509	2.219	2.179	2.547	2.714	2.362	2.622
Assay control 5 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
0.330	0.272	2.826	2.842	2.778	2.852	2.804	1.778	2.841	2.769	1.776	2.814
Assay control 25 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
1.292	0.480	2.885	2.860	2.822	2.940	2.734	2.944	2.978	2.972	2.321	2.948
Assay control 25 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
1.249	0.273	2.877	2.937	2.911	2.897	3.011	2.938	2.958	2.883	2.925	2.899
Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
2.559	2.906	2.777	2.994	2.939	2.997	3.035	2.767	3.029	3.011	2.879	2.698
Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
2.297	2.800	2.808	2.845	2.774	2.175	2.817	2.794	2.810	2.759	2.694	2.843
Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
2.211	2.627	2.631	2.660	2.604	2.604	2.619	2.561	2.606	2.544	2.551	2.646
Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
2.365	2.835	2.123	2.887	2.551	2.806	2.864	2.803	2.626	2.426	2.544	2.847

Deneysel çalışmalarımızda kontrol grubu olarak AZA inhbitörü uygulanmayan HT-29 hücre hattı kullanılmıştır. İkinci grup ise normoksik koşullarda AZA inhibisyonu uygulanan inhibitörlü HT-29 hücre hattıdır.

Bu gruplar kıyaslandığında AZA inhibisyonu sonucunda normoksik koşullarda HT-29 hücre hattı metilasyon düzeylerinde artış gözlenirken hipoksik koşullarda metilasyon düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir.

Tablo 4.5. HT-29 Normoksik Ortam-inhibitörsüz H3 modifikasyonları (ng/µg protein)

Hücre ortamı	Epigenetik marker	Örnek OD	Kontrol OD (25 ng)	Blank OD	Örnek OD - Blank OD	Örnek Kontrol OD - Blank OD	H3 Modifikasyonu (ng/µg protein)
HT-29 Normoksik (inhibitörsüz)	Total H3	2,559	1,271	0,272	2,287	0,999	10,9
	H3K4me1	2,906	1,271	0,272	2,634	0,999	12,5
	H3K4me2	2,694	1,271	0,272	2,422	0,999	11,5
	H3K4me3	2,777	1,271	0,272	2,505	0,999	11,9
	H3K9me1	2,674	1,271	0,272	2,402	0,999	11,4
	H3K9me2	2,994	1,271	0,272	2,722	0,999	13,0
	H3K9me3	2,125	1,271	0,272	1,853	0,999	8,8
	H3K27me1	2,939	1,271	0,272	2,667	0,999	12,7
	H3K27me2	2,509	1,271	0,272	2,237	0,999	10,7
	H3K27me3	2,997	1,271	0,272	2,725	0,999	13,0
	H3K36me1	2,219	1,271	0,272	1,947	0,999	9,3
	H3K36me2	3,035	1,271	0,272	2,763	0,999	13,2
	H3K36me3	2,179	1,271	0,272	1,907	0,999	9,1
	H3K79me1	2,767	1,271	0,272	2,495	0,999	11,9
	H3K79me2	2,547	1,271	0,272	2,275	0,999	10,8
	H3K79me3	3,029	1,271	0,272	2,757	0,999	13,1
	H3K9ac	2,714	1,271	0,272	2,442	0,999	11,6
	H3K14ac	3,011	1,271	0,272	2,739	0,999	13,0
	H3K18ac	2,362	1,271	0,272	2,090	0,999	10,0
	H3K56ac	2,879	1,271	0,272	2,607	0,999	12,4
	H3ser10P	2,622	1,271	0,272	2,350	0,999	11,2
	H3ser28P	2,698	1,271	0,272	2,426	0,999	11,6

Tablo 4.6. HT-29 Normoksik Ortam- AZA inhibitörlü H3 modifikasyonları (ng/µg protein)

Hücre ortamı	Epigenetik marker	Örnek OD	Kontrol OD (25 ng)	Blank OD	Örnek OD - Blank OD	Örnek Kontrol OD - Blank OD	H3 Modifikasyonu (ng/µg protein)
HT-29 Normoksik (inhibitörlü)	Total H3	2,297	1,271	0,272	2,025	0,999	12,6
	H3K4me1	2,800	1,271	0,272	2,528	0,999	15,7
	H3K4me2	2,826	1,271	0,272	2,554	0,999	15,9
	H3K4me3	2,808	1,271	0,272	2,536	0,999	15,7
	H3K9me1	2,842	1,271	0,272	2,570	0,999	16,0
	H3K9me2	2,845	1,271	0,272	2,573	0,999	16,0
	H3K9me3	2,778	1,271	0,272	2,506	0,999	15,6
	H3K27me1	2,774	1,271	0,272	2,502	0,999	15,5
	H3K27me2	2,852	1,271	0,272	2,580	0,999	16,0
	H3K27me3	2,175	1,271	0,272	1,903	0,999	11,8
	H3K36me1	2,804	1,271	0,272	2,532	0,999	15,7
	H3K36me2	2,817	1,271	0,272	2,545	0,999	15,8
	H3K36me3	1,778	1,271	0,272	1,506	0,999	9,3
	H3K79me1	2,794	1,271	0,272	2,522	0,999	15,7
	H3K79me2	2,841	1,271	0,272	2,569	0,999	15,9
	H3K79me3	2,810	1,271	0,272	2,538	0,999	15,8
	H3K9ac	2,769	1,271	0,272	2,497	0,999	15,5
	H3K14ac	2,759	1,271	0,272	2,487	0,999	15,4
	H3K18ac	1,776	1,271	0,272	1,504	0,999	9,3
	H3K56ac	2,694	1,271	0,272	2,422	0,999	15,0
	H3ser10P	2,814	1,271	0,272	2,542	0,999	15,8
	H3ser28P	2,843	1,271	0,272	2,571	0,999	16,0

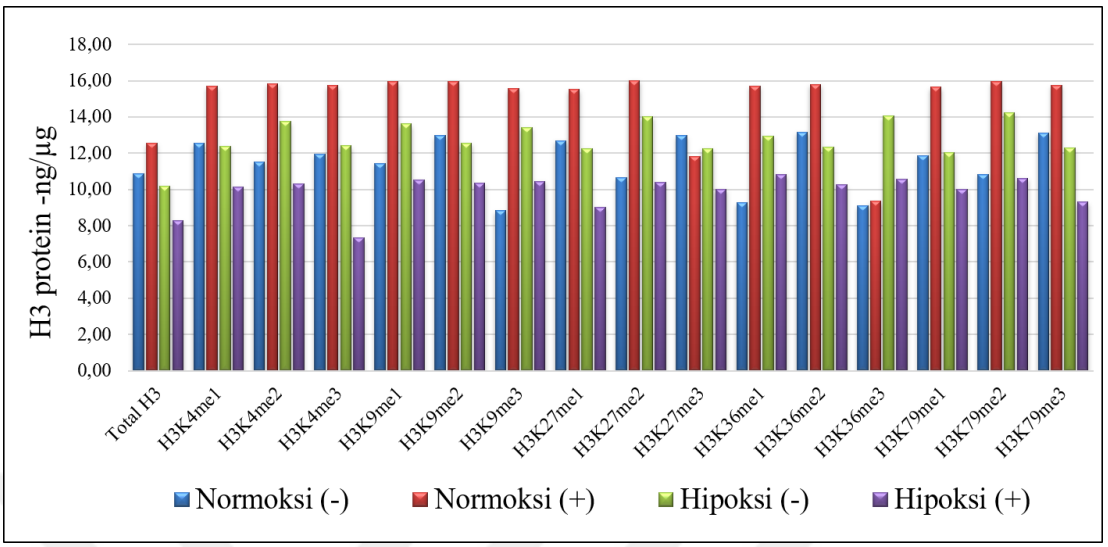
Tablo 4.7. HT-29 Hipoksik Ortam-inhibitörsüz H3 modifikasyonları (ng/µg protein)

Hücre ortamı	Epigenetik marker	Örnek OD	Kontrol OD (25 ng)	Blank OD	Örnek OD - Blank OD	Örnek Kontrol OD - Blank OD	H3 Modifikasyonu (ng/µg protein)
HT-29 Hipoksik (inhibitörsüz)	Total H3	2,211	1,271	0,272	1,939	0,999	10,2
	H3K4me1	2,627	1,271	0,272	2,355	0,999	12,4
	H3K4me2	2,885	1,271	0,272	2,613	0,999	13,7
	H3K4me3	2,631	1,271	0,272	2,359	0,999	12,4
	H3K9me1	2,860	1,271	0,272	2,588	0,999	13,6
	H3K9me2	2,660	1,271	0,272	2,388	0,999	12,6
	H3K9me3	2,822	1,271	0,272	2,550	0,999	13,4
	H3K27me1	2,604	1,271	0,272	2,332	0,999	12,3
	H3K27me2	2,940	1,271	0,272	2,668	0,999	14,0
	H3K27me3	2,604	1,271	0,272	2,332	0,999	12,3
	H3K36me1	2,734	1,271	0,272	2,462	0,999	13,0
	H3K36me2	2,619	1,271	0,272	2,347	0,999	12,3
	H3K36me3	2,944	1,271	0,272	2,672	0,999	14,1
	H3K79me1	2,561	1,271	0,272	2,289	0,999	12,0
	H3K79me2	2,978	1,271	0,272	2,706	0,999	14,2
	H3K79me3	2,606	1,271	0,272	2,334	0,999	12,3
	H3K9ac	2,972	1,271	0,272	2,700	0,999	14,2
	H3K14ac	2,544	1,271	0,272	2,272	0,999	12,0
	H3K18ac	2,321	1,271	0,272	2,049	0,999	10,8
	H3K56ac	2,551	1,271	0,272	2,279	0,999	12,0
	H3ser10P	2,948	1,271	0,272	2,676	0,999	14,1
	H3ser28P	2,646	1,271	0,272	2,374	0,999	12,5

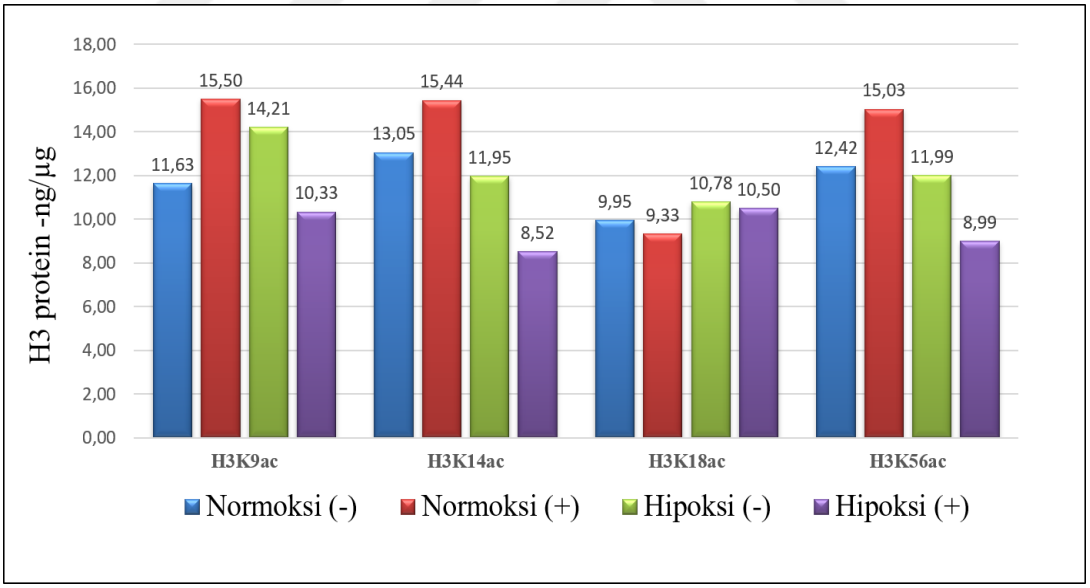
Tablo 4.8. HT-29 Hipoksik ortam - AZA inhibitörlü H3 modifikasyonları (ng/µg protein)

Hücre ortamı	Epigenetik marker	Örnek OD	Kontrol OD (25 ng)	Blank OD	Örnek OD - Blank OD	Örnek Kontrol OD - Blank OD	H3 Modifikasyonu (ng/µg protein)
HT-29 Hipoksik (inhibitörlü)	Total H3	2,365	1,271	0,272	2,093	0,999	8,3
	H3K4me1	2,835	1,271	0,272	2,563	0,999	10,1
	H3K4me2	2,877	1,271	0,272	2,605	0,999	10,3
	H3K4me3	2,123	1,271	0,272	1,851	0,999	7,3
	H3K9me1	2,937	1,271	0,272	2,665	0,999	10,5
	H3K9me2	2,887	1,271	0,272	2,615	0,999	10,3
	H3K9me3	2,911	1,271	0,272	2,639	0,999	10,4
	H3K27me1	2,551	1,271	0,272	2,279	0,999	9,0
	H3K27me2	2,897	1,271	0,272	2,625	0,999	10,4
	H3K27me3	2,806	1,271	0,272	2,534	0,999	10,0
	H3K36me1	3,011	1,271	0,272	2,739	0,999	10,8
	H3K36me2	2,864	1,271	0,272	2,592	0,999	10,3
	H3K36me3	2,938	1,271	0,272	2,666	0,999	10,5
	H3K79me1	2,803	1,271	0,272	2,531	0,999	10,0
	H3K79me2	2,958	1,271	0,272	2,686	0,999	10,6
	H3K79me3	2,626	1,271	0,272	2,354	0,999	9,3
	H3K9ac	2,883	1,271	0,272	2,611	0,999	10,3
	H3K14ac	2,426	1,271	0,272	2,154	0,999	8,5
	H3K18ac	2,925	1,271	0,272	2,653	0,999	10,5
	H3K56ac	2,544	1,271	0,272	2,272	0,999	9,0
	H3ser10P	2,899	1,271	0,272	2,627	0,999	10,4
	H3ser28P	2,847	1,271	0,272	2,575	0,999	10,2

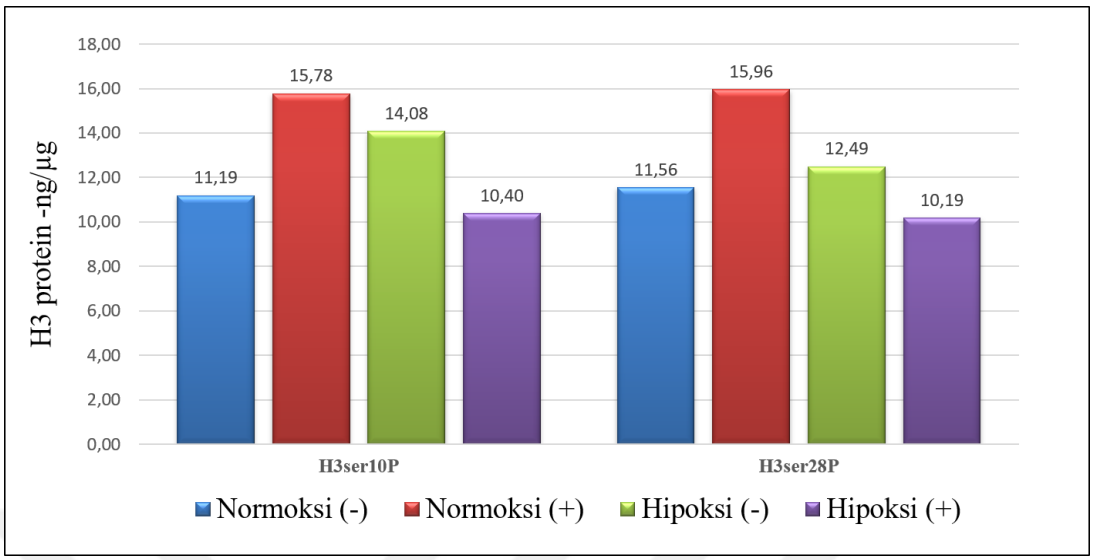
Tablo 4.9. HT-29 Normoksik ve Hipoksik ortamda CA IX Enzim İnhibisyonu Sonucu Metilasyon düzeylerinin karşılaştırılması



Tablo 4.10. HT-29 Normoksik ve Hipoksik ortamda CA IX Enzim İnhibisyonu Sonucu Asetilasyon düzeylerinin karşılaştırılması



Tablo 4.11. HT-29 Normoksik ve Hipoksik ortamda CA IX Enzim İnhibisyonu Sonucu Fosforilasyon düzeylerinin karşılaştırılması



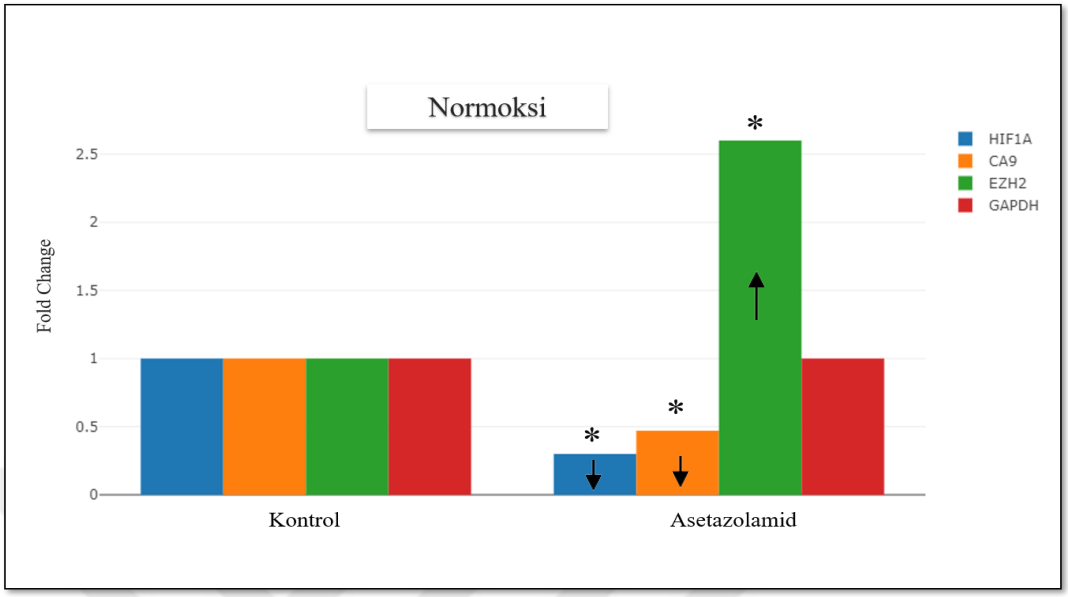
4.6. Gen Ekspresyon Sonuçları

4.6.1. Normoksik Koşullarda CA IX Enzim İnhibisyonunun Etkisi

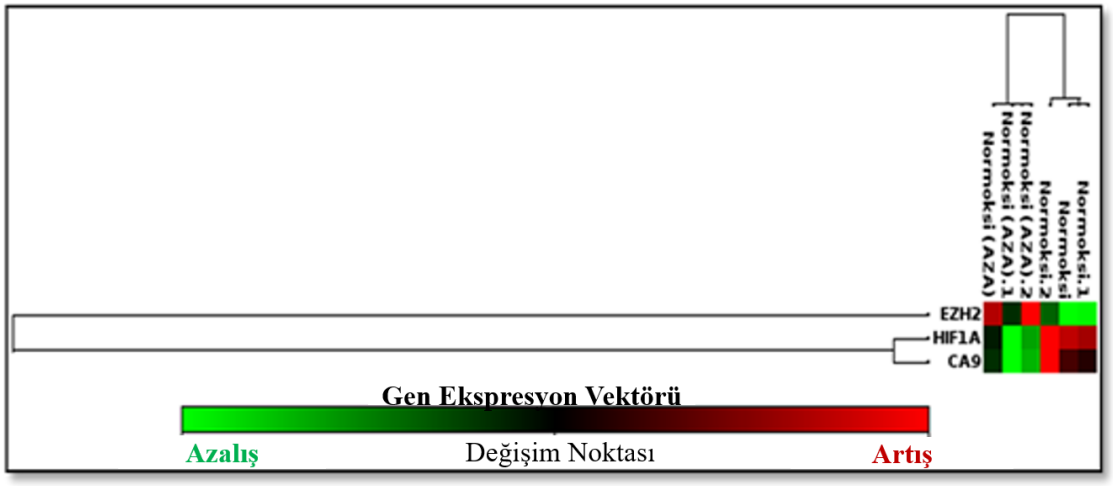
Deneysel çalışmalarımızda kontrol grubu olarak AZA inhbitörü uygulanmayan HT-29 hücre hattı kullanılmıştır. İkinci grup ise normoksik koşullarda AZA inhibisyonu uygulanan inhibitörlü HT-29 hücre hattıdır.

Bu gruplar kıyaslandığında AZA inhibisyonu sonucunda normoksik koşullarda HT-29 hücre hattı CA IX ($p<0.05$) ve HIF1α ($p<0.01$) genlerinin ekspresyonunda düşüş gerçekleşmiştir. Bu durum ile bağlantılı CA IX enzim inhibisynunun EZH2 geninin ekspresyonunu 2.5 kat arttırdığı gözlenmiştir ($P<0.05$) (Tablo 4.12).

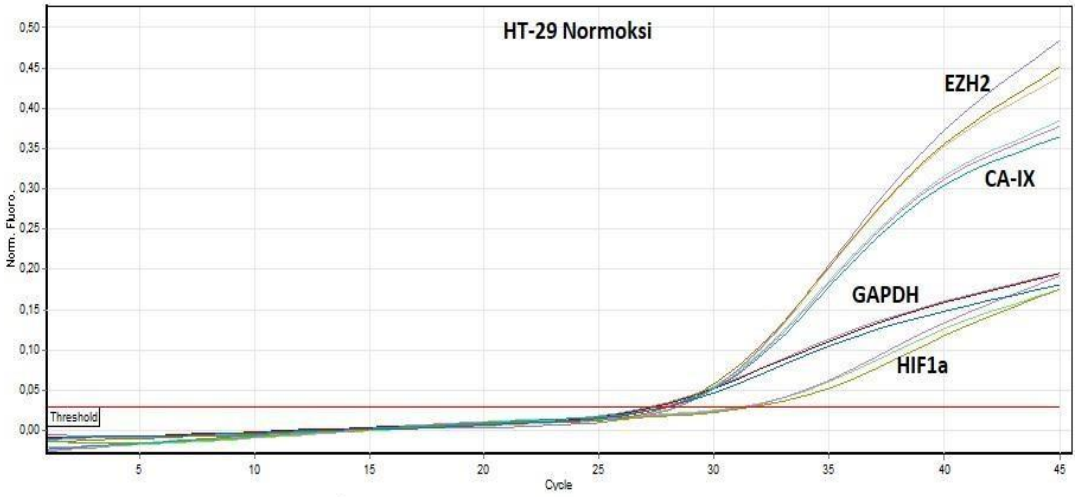
Tablo 4.12. Normoksik koşullarda CA IX İnhibisyonunu Sonucu EZH2, HIF1A, CA IX Gen Ekspresyonu Düzeyleri



Normalleştirilmiş Ct değerlerini ve sonucu birarada göstermek için ısı haritası oluşturulmuştur. Buna göre kırmızı renk kontrol grubu olan ve inhibitör uygulanmayan örneklere göre yüksek ekspresyon temsil ederken yeşil renk daha düşük ekspresyonu temsil etmektedir. Normoksik Koşullarda CA IX İnhibisyonu Sonucu EZH2 ekspresyonunda artış, HIF1A ve CA IX ekspresyonunda azalma meydana gelmiştir.

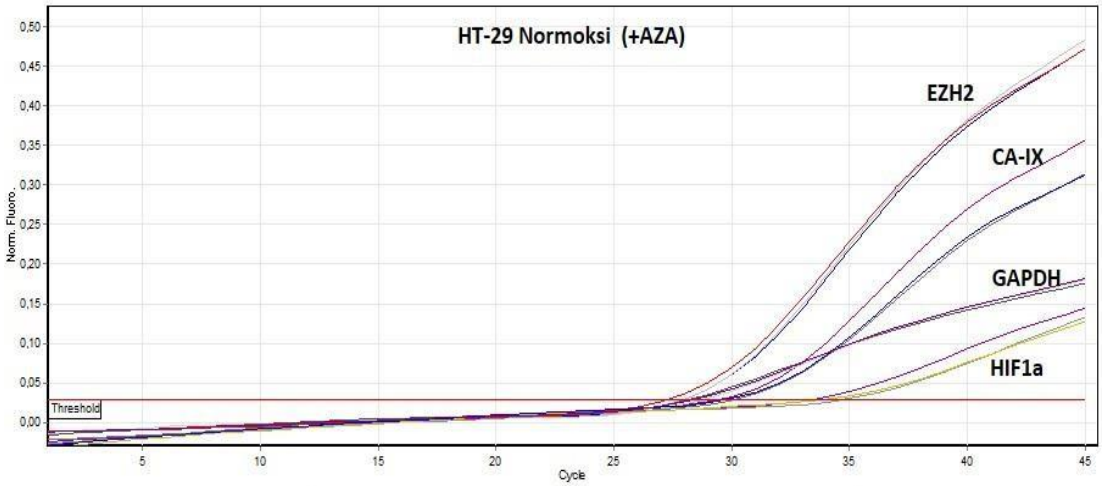


Şekil 4.5. Normoksik Koşullarda CA IX İnhibisyonu Sonucu EZH2, HIF1A, CA IX Gen Ekspresyonu Isı Haritası



Renk	Örnek Adı
	HT-29 Normoksi EZH2 (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi HIF1a (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi CA-IX (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi GAPDH (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi EZH2 (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi HIF1a (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi CA-IX (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi GAPDH (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi EZH2 (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi HIF1a (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi CA-IX (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi GAPDH (3. Teknik Tekrar)

Şekil 4.6. Normoksik koşullarda EZH2, HIF1α, CA IX Gen Ekspresyonu Threshold Grafiği



Renk	Örnek Adı
	HT-29 Normoksi (+AZA) EZH2 (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) HIF1a (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) CA-IX (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) GAPDH (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) EZH2 (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) HIF1a (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) CA-IX (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) GAPDH (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) EZH2 (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) HIF1a (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) CA-IX (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Normoksi (+AZA) GAPDH (3. Teknik Tekrar)

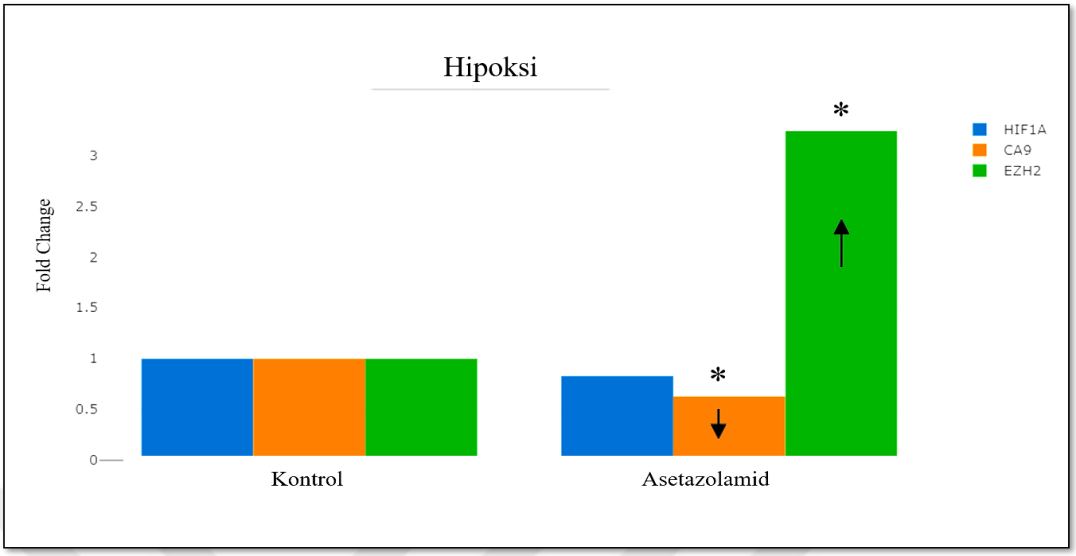
Şekil 4.7. Normoksik koşullarda CA IX İnhibisyonunu Sonucu EZH2, HIF1α, CA IX Gen Ekspresyonu Threshold Grafiği

4.6.2. Hipoksik koşullarda CA IX İnhibisyonunun Etkisi

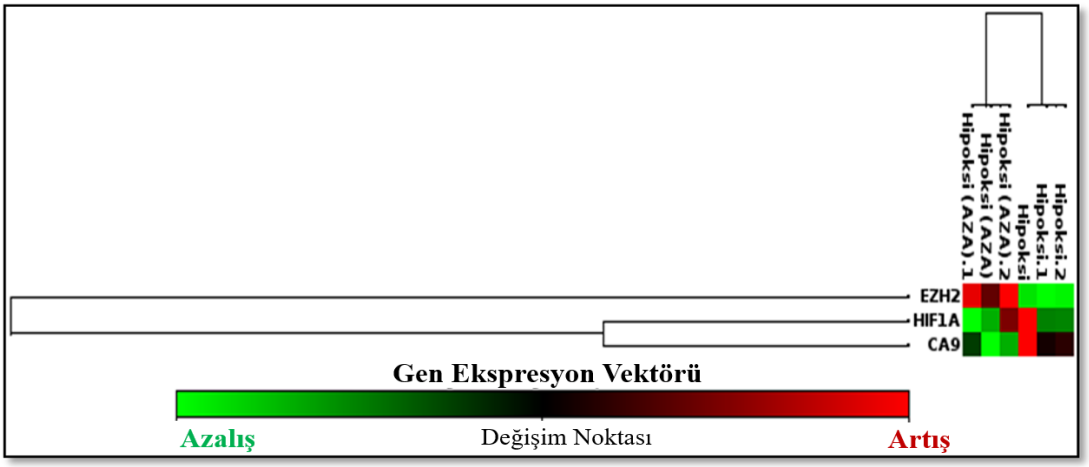
Deneysel çalışmalarımızda kontrol grubu olarak AZA inhbitörü uygulanmayan HT-29 hücre hattı kullanılmıştır. İkinci grup ise hipoksik koşullarda AZA inhibisyonu uygulanan inhibitörlü HT-29 hücre hattıdır.

Bu gruplar karşılaştırıldığında hipoksik koşullarda gerçekleştirilen AZA ile inhibisyon sonucunda CA IX ($p<0.05$) ve HIF1α genlerinin ekspresyonunda anlamlı düşüş gerçekleşmiştir (Tablo 4.13, Şekil 4.8). CA IX inhibisynunun EZH2 geninin ekspresyonunu 3 kattan fazla arttırdığı gözlenmiştir ($P<0.01$) (Tablo 4.13, Şekil 4.8).

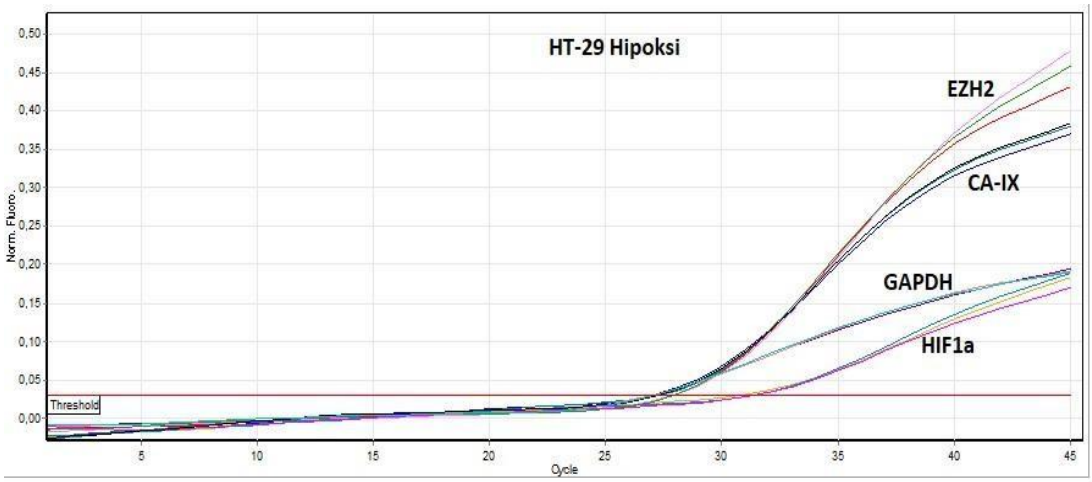
Tablo 4.13. Hipoksik koşullarda CA IX İnhibisyonunu Sonucu EZH2, HIF1α, CA IX Gen Ekspresyonu Düzeyleri



Normalleştirilmiş Ct değerlerini ve sonucu birarada göstermek için ısı haritası oluşturulmuştur. Buna göre kırmızı renk kontrol grubu olan ve inhibitör uygulanmayan örneklerin ortalamasına göre yüksek ekspresyon temsil ederken yeşil renk daha düşük ekspresyonu temsil etmektedir. Hipksik Koşullarda CA IX İnhibisyonu Sonucu EZH2 ekspresyonunda artış, HIF1α ve CA IX ekspresyonunda azalma meydana gelmiştir.

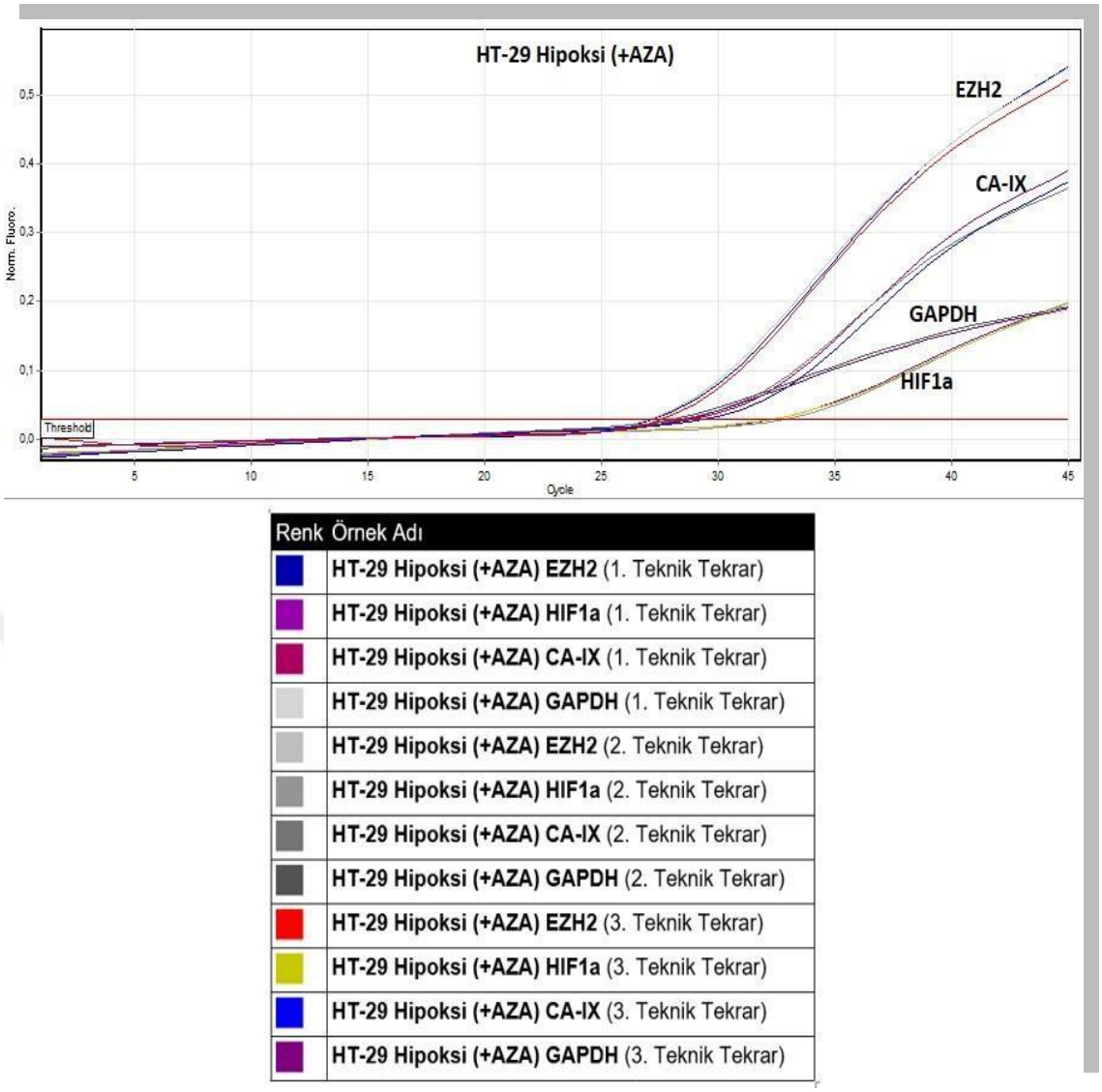


Şekil 4.8. Hipoksik koşullarda CA IX İnhibisyonunu Sonucu EZH2, HIF1α, CA IX Gen Ekspresyonu Isı Değerleri



Renk	Örnek Adı
	HT-29 Hipoksi EZH2 (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi HIF1a (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi CA-IX (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi GAPDH (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi EZH2 (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi HIF1a (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi CA-IX (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi GAPDH (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi EZH2 (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi HIF1a (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi CA-IX (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi GAPDH (3. Teknik Tekrar)

Şekil 4.9. Hipoksik koşullarda EZH2, HIF1α, CA IX Gen Ekspresyonu Threshold Grafiği



Renk	Örnek Adı
	HT-29 Hipoksi (+AZA) EZH2 (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) HIF1a (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) CA-IX (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) GAPDH (1. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) EZH2 (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) HIF1a (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) CA-IX (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) GAPDH (2. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) EZH2 (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) HIF1a (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) CA-IX (3. Teknik Tekrar)
	HT-29 Hipoksi (+AZA) GAPDH (3. Teknik Tekrar)

Şekil 4.10. Hipoksik koşullarda CA IX İnhibisyonunu Sonucu EZH2, HIF1α, CA IX Gen Ekspresyonu Threshold Grafiği

5. TARTIŞMA

Kolon kanserinin klinik/patolojik tablosu iyi anlaşılmakla beraber tümör mikroçevresinin moleküler/genetik mekanizmasında tamamen netlik kazanmamıştır. Özellikle asit-baz dengesinin kolon kanserinde epigenetik işaretçiler üzerindeki moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Kolon kanserinin etiyolojisi oldukça karmaşıktır; Beslenme, çevresel ve genetik gibi birçok faktör etkileşimi söz konusudur. Anormal metillenmiş genler, DNA anormallikleri ve CpG adacık metilasyon fenotipi gibi genomik ve histon modifikasyonları, kodlamayan RNA türlerinde meydana gelen epigenomik değişiklikler görülmektedir. Tümör hücrelerinin çoğalma isteği, enerji tüketimi ile anjiyogenez arasındaki dengesizlik, hipoksik alanlar oluşturur. Oluşan bu hipoksiye yanıt olarak, değişen mikro ortamın gereksinimlerine uyacak şekilde düzenlemeler gerçekleştirir. Bunlardan en önemlisi tümör mikro çevresindeki pH'dır. Hücresel pH dengesinin sürdürülmesi hücre yaşamı için esastır. Tümörlerin ortak özelliği olan hipoksinin neden olduğu asidozda pH düzenleyici sistemler arasında CA enzim ailesinin önemli rol oynadığı bilinmektedir (136).

Histon asetilasyonu, kromatin yeniden düzenlenmesi için önemli bir ön koşuldur olup kromatin yapısının, fonksiyonunun ve dinamiklerinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Asetil gruplarının eklenmesi, nükleozomdaki histon/DNA etkileşimlerini bozar. Aynı veya bitişik nükleozomlardaki histon/histon etkileşimlerini değiştirir (182). Özellikle kromatin yeniden düzenlenmesinde ve gen transkripsiyon sürecinde baskılama/ aktivayonunda asetilasyonun önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Spesifik olarak, histonların ve diğer proteinlerin belirli lizin yan zincirleri üzerinde etkili olan asetiltransferaz enzimleri, transkripsiyonel aktivasyon ile yakından ilişkilidir. Kromatin proteinlerini ve transkripsiyonla ile ilgili faktörleri değiştirerek, birçok genin transkripsiyonunu düzenlenmektedir (183). Tümörleşme sürecinde gen aktivasyon ve baskılanmasının önemli rol oynayan histon lizin asetilasyonu, histonların elektrik yükünü ve dolayısıyla DNA ile etkileşimlerini etkilerken, histon lizin metilasyonu bu elektrostatik bağdan etkilenmez. Bunun yerine dolaylı olarak farklı düzenleyici proteinlerin kromatine toplanmasını ve bağlanmasını etkileyerek transkripsiyonu düzenlenmesinde rol alır (184).

Son derece önemli bir histon metiltransferaz olan EZH2, Polycomb Repressive Complex 2'nin (PRC2) enzimatik alt birimi olup, Histon H3'ün lizin 27'nin trimetilasyonunu katalize ederek transkripsiyonel baskılamaya neden olur (185). Bununla birlikte, EZH2'nin Post-translasyonel modifikasyonlardaki rolü belirsizliğini koruyor. Wan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada EZH2'nin asetiltransferaz olan PCAF (P300/CBP ile ilişkili faktör) tarafından asetillendiği, bir deasetilaz olan SIRT1 tarafından ise deasetillendiği bildirilmiştir (186).

Kanser tedavisinde birçok yeni molekül tanımlama çalışması yürütülmekte olup hipoksiye yanıtın önemli tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir. Asidik mikro-çevre, zayıf bir prognoz ve aktif olarak tümör ilerlemesine katılması ile ilişkilendirilmiştir (20). CA IX enzim inhibisyonunun, katı tümörlerin asidik ortamını tersine çevirdiği ve tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir (22). Epigenetik değişikliklerin tümör mikro çevresi, invazyon ve metastaz etkilerinin belirlenmesinin, kanser biyolojisini yönetmede yüksek bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Literatürde epigenetik modifikasyonların hipoksik koşullarda, hücre içi ve hücre dışı pH'dan etkilendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (23).

CA IX ifadesinin, hipoksik ve asidik mikro-ortam altındaki birçok katı tümörde aşırı eksprese olduğu bilinmektedir. Ancak hipoksi tarafından indüklenen CA IX'un tümör mikroçevresi ve epigenetik modifikasyonlar üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğuna dair belirsizlik bizi bu konudaki soru işaretlerini gidermeye yönlendirmiştir. Çalışmamızda CA IX enzim inhibisyonunun CO_2/HCO_3^- tampon sisteminde hücre içi ve hücre dışı H^+ iyon derişimine etki ederek asit-baz dengesini değiştireceğini ve bu iyonik denge farklılığının hücre epigenetik modifikasyonlar üzerine etki edeceğini belirledik.

CA IX enziminin AZA inhibisyonu ile hücre kültürü pH değerinin artmasına (Şekil 4.4.) hücre proliferasyonun ise azalmasına sebep gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.). Ayrıca hücrelerin biraraya gelerek kümelendiği ve adhezyonunun azaldığı da izlendi. Parks ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada tam genomik CA IX enzim inhibisyonunun hücre içi pH azalmasını, hücre büyümesini ve ilerlemesini durdurması ile benzerlik taşımaktadır (159). Sansone ve arkadaşlarının 2009 yılında CA IX enzim inhibisyon çalışmasında, CRC hücrelerinin hayatta kalma yeteneklerinin kaybolduğunu göstermişlerdir (160). Özellikle hipoksik

koşullarda hücrelerin hem morfolojik değişim göstermesi hem de miktarsal azalışı söz konusu tez sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Koyuncu ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış olduğu çalışmada ise tümör hücrelerinde CA IX enzim inhibisyonunun hücre proliferasyonunu azalttığı ve kanser hücrelerinde ise apoptozu indüklediğini gözlenmektedir (161).

Hipoksi sonucu oluşan metabolik hız ve anjiyogenez, fenotipik çeşitliliğe ve tümör hücresinin kendine özgü gen ekspresyonunu göstermesine neden olur (187). Gen ekspresyonu, histon modifikasyonları, DNA metilasyonu gibi faktörlerden doğrudan etkilenir (187). McBrain ve arkadaşları yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise histon asetilasyonunun hücre içi pH değerini düzenlediğini göstermişlerdir (11).

pHi azaldıkça histon deasetilazlarca deasetillemenin arttığını göstermişlerdir. Bu sırada salınan asetat anyonları, pHi'de daha fazla düşüşü önlemek için hücre dışına protonlarla birlikte çıkarılmaktadır. Bu durum pHi ve pHe'deki değişimde önemli rol alan CA enzim etkinliğinin, histon asetilasyonu ile dolaylı etkileşim kurmuş olduğunu göstergesidir. Benzer şekilde Chakraborty ve ekibi 2019 yılında hipoksinin, HIF yolak ve 2-oksoglutarat antagonisti olan 2-hidroksiglutarat'dan (2-HG) bağımsız bir şekilde histon metilasyonunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir (167). H3K27 histon demetilaz KDM6A/UTX'in oksijene duyarlı olduğunu, ancak paralog KDM6B'nin olmadığını bulmuşlardır. KDM6A kaybı, hipoksi benzeri H3K27 demetilasyonunu önlemiş ve hücresel farklılaşmayı engellemiştir. Bu, hipoksi oluşumunun hücre kaderini kontrol etmek için kromatin düzenleyicilerini doğrudan etkilediğini göstermektedir. Batie ve arkadaşlarının 2019 yılındaki çalışmalarında Hipoksinin, HIF bağımsız bir şekilde histon metilasyonunu uyardığını bildirmişlerdir (14). Hipoksinin bu özelliği, aktif histon metilasyonunda azalma veya artışa sebep olduğunu göstrmektedir. Bu gözlemler CA IX ile asetilasyon ve metilasyon düzeyleri arasındaki ilişkiye yoğunlaşmamıza ve açıklığa kavuşturmamıza sebep olmuştur.

CA IX enzim inhibisyonu sonrası histon 3 modifikasyonlarının değişimini gösterecek çalışmamızda normoksik koşullarda H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 metilasyonunda artış gözlemlenmiştir. Buna karşın hipoksik koşullarda H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 metilasyonunda azalma meydana gelmiştir.

CA IX enzim inhibisyonunun spesifik genlerde baskılayıcı veya uyarıcı rol alabileceği tezimizi desteklemektedir (Tablo 4.9.). Çalışmamızdaki özellikle hipoksi altındaki hücrelerin CA IX enzim inhibisyon sonrası metilasyon düzeylerindeki azalma göstermesi aşırı metillenmiş genlerin tedavisinde CA IX'un doğru aday olabileceğini düşündürmektedir.

Hipoksinin histon asetilasyonunda genel bir azalmaya yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir (188). Bu şartlar altında histon asetilasyonunda bir ko-substrat olan asetil-CoA'da bir azalmanın hücresel metabolizmada önemli değişikliklere neden olabileceği gösterilmektedir (189). Hipoksi belirteci olan CA IX enzim inhibisyonunda normoksik koşullarda asetilasyon seviyelerinde iyileşme görülürken hipoksi koşullarında yetersiz kaldığını görüldü. Hiperasetilasyonun gen transkripsiyonunun aktivasyonu ile ilişkili olduğu ve gen ekspresyonunun artmasına yol açtığı, hipoasetilasyonun ise gen ekspresyonunun bastırılması anlamına geldiği bilinmektedir (190). Bu durumda CA IX enzim inhibisyonunun özellikle yüksek metabolik hız sonucu oluşan tümör mikro çevresindeki oksijen yetersizliği ve asidifikasyonu iyileştirmede göreceli bir iyileşme sağlayacağını düşündürmektedir.

Bu çalışmada CA IX enzim inhibisyonunun normoksik koşullarda histon 3 fosforilasyonunda artışa sebebiyet verirken hipoksik koşullarda fosforilasyonun azaldığı gözlemlenmiştir (Tablo 4.11.). Özellikle fosforilasyon sevisyesindeki düşüşün hipoksi koşullarında promotör bölgesinde hipoksiye yanıt domaini (HRE) bulunan CA IX enziminin aşırı ekspresyonunun inhibisyonuyla gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Özellikle HIF1 yolağı ve EZH2 arasındaki korelasyonunun (112) etkilerinin analiz edilmesi ve belirsizliğin giderilmesi açısından CA IX enzimi ve EZH2 arasında etkileşimin olup olmadığı ve aydınlatılması gerektiğini düşündük. EZH2'nin PRC aracılı tümör baskılayıcı özelliği ve CA IX'un homeostazdaki rolü, bu iki moleküler oyuncuyu birbirine bağlayan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması için zemin hazırlayabilir.

Bu amaçla yapmış olduğumuz çalışmada; CA IX enzim inhibisyonunun sonucu olarak ortam asidifikasyonun azalması ile birlikte HIF1α'nın da ekspresyonunun azaldığını gösterdik ($p<0.01$) (Tablo 4.12.) (Şekil 4.5.) Bu durumun

EZH2 gen ekspresyonunu ise arttırdığını gösterdik ($p<0.05$). Burada CA IX ile EZH2 arasında ters bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Nitekim EZH2'nin bilinen rolü H3K27me3'ün metilasyonunu katalize ederek tümör baskılayıcı gen olarak görev almasıdır. Ancak Yapılan son çaılışmalar EZH2'nin bir transkripsiyonel koaktivatör olarak H3K27me3'ten bağımsız bir işleve sahip olduğunu, kanser başlangıcı, gelişimi ve ilerlemesinde bir onkogen olarak kritik bir rol oynadığını göstermektedir (191). Bu durum asifikasyonun azalması ile birlikte EZH2'nin PRC2'den bağımsız başka yolaklarda rol aldığını desteklemetedir.

Bremer ve arkadaşlarının 2021 yılında yapmış oldukları çalışmada EZH2 gen ekspresyonu ve aktivitesinin kolorektal karsinogenez ile ilişkili olduğunu ve EZH2'nin güçlü ifadesinin, CRC'li hastalarda önemli ölçüde olumlu bir prognoz ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (192). Özellikle tümör fenotipindeki morfolojik küçülme ve adhezyon kaybı bu çalışma ile parelellik göstermektedir.

Hoffmann ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada histon metiltransferaz enzimi olarak görev yapan EZH2 ekspresyonunun H3K27me3 düzenlenmesiyle, tümör ilerlemesinde, metastaz ve immün kontrol noktası blokajına direnç ile ilişkilendirilmiştir (193).

Bir başka çalışmada Liu ve arkadaşları 2016 yılında CRC hastalarında EZH2'nin CRC gelişimi ve hastalığın ilerlemesi ile yakından ilişkili olduğu ve bu nedenle prognozu gösterebilen bir tümör biyobelirteci olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (194).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm bu bulgular CA inhibitörü olan olan AZA'nın, kolon kanserinde CA IX enzim inhibisyonunun CO_2 /HCO_3^- tampon sisteminde hücre içi ve hücre dışı H^+ iyon derişimine etki ederek asit-baz dengesini değiştirdiğini ve bu iyonik denge farklılığının EZH2 geni ekspreyonu ve histon 3 modifikasyonları üzerine etki ettiğini gösterdik. Ancak Tümör hücrelerinde epigenetik mekanizmaların normoksik ve hipoksik koşullarda farklı davranış sergilediklerini de deneysel olarak gösterdik. Çalışmamızdaki HT-29 hücrelerinde CA IX enzim inhibisyonunun histon modifikasyonlarında metilasyon ve asetilasyon düzeylerinde azalma gözlenmiş olması bu bulgularla uyumludur. Ayrıca EZH2 ekspresyonunun artmış olması hem normoksik hem hipoksik koşullarda bu genin farklı ekspresyon paterni sergilediğini hem onkogen hem tümör baskılayıcı gen olarak hareket ettiğini göstermiştir (Tablo 6.1).

Tablo 6.1. Çalışma Sonuçları Özet

Metod	Çalışılan Parametre	Durum	Anlamlılık	Sonuç
RT-PCR	EZH2	Normoksi	(p<0.05)	CA IX enzim inhibisynunun normoksi koşullarda EZH2 geninin ekspresyonunu 2.5 kat arttırdığı gözlenmiştir .
		Hipoksi	(P<0.01)	CA IX enzim inhibisynunun hpoksi koşullarda EZH2 geninin ekspresyonunu 3.24 kat arttırdığı gözlenmiştir .
	HIF1-α	Normoksi	(p<0.01)	AZA inhibisyonu sonucunda normoksik koşullarda HT-29 hücre hattı CA IX ve HIF1α genlerinin ekspresyonunda düşüş gerçekleşmiştir.
		Hipoksi	0.59	AZA inhibisyonu sonucunda hipoksik koşullarda HT-29 hücre hattı CA IX ve HIF1α genlerinin ekspresyonunda düşüş gerçekleşmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
	CA IX	Normoksi	(p<0.05)	AZA inhibisyonu sonucunda normoksik koşullarda HT-29 hücre hattı CA IX ve HIF1α genlerinin ekspresyonunda düşüş gerçekleşmiştir.
		Hipoksi	(p<0.05)	AZA inhibisyonu sonucunda hipoksik koşullarda HT-29 hücre hattı CA IX ve HIF1α genlerinin ekspresyonunda düşüş gerçekleşmiştir.
ELISA	H3 Metilasyon	Normoksi		AZA inhibisyonu sonucunda normoksik koşullarda HT-29 hücre hattı metilasyon düzeylerinde artış gözlenmiştir.

		Hipoksi	AZA inhibisyonu sonucunda hipoksik koşullarda HT-29 hücre hattı metilasyon düzeylerinde azalma gözlenmiştir.
	H3 Asetilasyon	Normoksi	AZA inhibisyonu sonucunda normoksik koşullarda HT-29 hücre hattı asetilasyon düzeylerinde artış gözlenmiştir.
		Hipoksi	AZA inhibisyonu sonucunda hipoksik koşullarda HT-29 hücre hattı metilasyon düzeylerinde azalma gözlenmiştir.
	H3 Fosforilasyon	Normoksi	AZA inhibisyonu sonucunda normoksik koşullarda HT-29 hücre hattı fosforilasyon düzeylerinde artış gözlenmiştir.
		Hipoksi	AZA inhibisyonu sonucunda hipoksik koşullarda HT-29 hücre hattı fosforilasyon düzeylerinde azalma gözlenmiştir.

Çalışmamız kapsamında kolorektal kanser hücre hattı HT-29 kullanılarak CA IX enzim inhibisyonu sonucunda elde etmiş olduğumuz veriler doğrultusunda önerilerimiz aşağıdaki şekildedir;

1. Hücre dışı pH ölçümü ve CA IX enzim inhibisyonu gerçekleştirilmiş olup hem normoksik hem de hipoksik koşullarda, CA IX, HIF1-α, EZH2 ekspresyonları analiz edilmiştir. Çalışmamızda tümör mikro çevre dikkate alındığı için yapılacak yeni çalışmalar ile hücre içi ve hücre dışı pH ile birlikte ölçümlerinin birlikte yer aldığı deney tasarımı gerçekleştirilmelidir.

2. CA IX enzim inhibisyonu ile epigenetik düzenleyiciler arasındaki ilişki histon H3 modifikasyonları total metilasyon düzeyleri ölçülmüştür. Ancak çalışmamız ve literatür taramamız dikkate alındığında metil transferaz DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B değişim düzeyleri ölçülmesinin özellikle tümör mikroçevresi ile epigenetik işaretçileri arasındaki nasıl bir olduğunu aydınlatmada önemli rol oynayacaktır.

3. Benzer şekilde KDM3A, KDM4B, KDM4C, KDM5B, KDM5C ve KDM6A-KDM6B gibi Lizin Demetilaz ailesi üyelerinin aynı anda özellikle CA IX enzim inhibisyonu ve tümör mikroçevresi birlikte çalışıldığı takdirde literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

4. CA IX enzim inhibisyonu ile histon H3 asetilasyon düzeyleri ölçülmüştür. Ancak özellikle hücre içi pH da asetilasyonun düzenleyici rolü, çalışmamız ve literatür

taramamız dikkate alındığında HAT ve HDAC ailesi üyelerininde yer aldığı çalışmaların planlanması, literatüre kazandırılması önem arz etmektedir.

5. Çalışmamız, kolon kanserinde tedaviye yönelik yeni stratejiler ortaya koyması, diğer kanser türlerine uygulanabilirliği ile projemizin yüksek değer taşıdığına inanıyoruz. Literatürdeki veriler ve çalışmamızdaki H3 modifikasyonlarındaki değişim ile ekspresyon değişikliklerinin gözlenmesi CA IX enzim inhibisyonunun tümör ilerlemesinde ve tedavisnde aktif olarak düzenleyici rol alabileceğini güçlü bir şekilde desteklemektedir. Ancak, bu veriler CA IX enzim inhibisyonunun epigenetik mekanizma ile olan ilişkisini açıklamada yeterli değildir. Bu nedenle, tümör mikroçevresinde aktif rol alan proton taşıyıcı MCT, VEGF (Vascular endothelial growth factor) ve MMP (matrix-metalloproteinase) gibi düzenleyici genlerin de yer aldığı hem invitro hem de invivo CA IX ekspresyonunun epigenetik biyobelirteçler ile birlikte incelenmesi halinde bu mekanizma daha anlaşılabilir olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Bertram JS. The molecular biology of cancer. Mol Aspects Med. 2000, Dec;21(6):167-223.

2. Aydın İ, Şehitoğlu İ, Özer E, Yücel AF, Pergel A, Bedir R, Güçer H, Şahin D,, The Evaluation of Patients Operated Due to Colorectal Cancer, Kocatepe Medical Journal 2015,16:102-109.

3. Manne U, Shanmugam C, Katkoori V, Bumpers HL. and Grizzle WE., Development and progression of colorectal neoplasia, Cancer Biomark; 2010, 9(1-6): 235–265.

4. Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med.; 1988, 319:525–532.

5. Canbay E. ve Buğra D. Kolorektal kanser: Genetik ve moleküler biyoloji araştırmaları hasta tedavisine yeterince yansıyor mu?, Ulusal Cerrahi Dergisi; 2011, 127(4): 98-205.

6. Benej M, Pastorekova S, Pastorek J. Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer Subcell Biochem. 2014, (75)199-219.

7. Bhutta BS, Alghoula F, Berim I. Anoxia. [Updated 2021 Feb 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482316/ . 2 Nisan 2021.

8. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. Genes Dev. 2004,18(18):2183-2194.

9. Sedlakova O, Svastova E, Takacova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. Front Physiol. 2014, 4:400.

10. Ambrosio MR, Di Serio C, Danza G, et al. Carbonic anhydrase IX is a marker of hypoxia and correlates with higher Gleason scores and ISUP grading in prostate ancer. Diagn Pathol. 2016, 11(1):45.

11. McBrian MA, Behbahan IS, Ferrari R, et al. Histone acetylation regulates intracellular pH. Mol Cell. 2012;49(2):310–321.

12. Jamali S, Klier M, Ames S. et al. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX facilitates lactate flux in human breast cancer cells by non-catalytic function. Sci Rep 5. 2015, 13605.

13. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. Cell. 2007 Feb 23;128(4):669-81.

14. Batie M, Frost J, Frost M, Wilson JW, Schofield P, Rocha S. Hypoxia induces rapid changes to histone methylation and reprograms chromatin. Science. 2019 Mar 15;363(6432):1222-1226.

15. Prickaerts P, Adriaens ME, Beucken TVD, et al. Hypoxia increases genome-wide bivalent epigenetic marking by specific gain of H3K27me3. Epigenetics Chromatin. 2016, 9:46.

16. Ozensoy Guler O, Supuran CT, Capasso C. Carbonic anhydrase IX as a novel candidate in liquid biopsy. J Enzyme Inhib Med Chem. 2020, 35(1):255-260.

17. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. J Cell Physiol. 2011, Feb;226(2):299-308.

18. Mboge MY, Mahon BP, McKenna R. and Frost SC. Carbonic Anhydrases: Role in pH Control and Cancer, Metabolites 2018, v;8 (1), 19.

19. Sørensen BS, Horsman MR. Tumor Hypoxia: Impact on Radiation Therapy and Molecular Pathways. Front Oncol. 2020, 10:562.

20. Peppicelli S, Bianchini F, Calorini L. Extracellular acidity, a "reappreciated" trait of tumor environment driving malignancy: perspectives in diagnosis and therapy, Cancer Metastasis Rev., 2014, Sep;33(2-3):823-32.

21. Andreucci E, Peppicelli S, Carta F, Brisotto G, Biscontin E, Ruzzolini J, Bianchini F, Biagioni A, Supuran CT, Calorini L. Carbonic anhydrase IX inhibition affects viability of cancer cells adapted to extracellular acidosis. J Mol Med (Berl). 2017, Dec;95(12):1341-1353.

22. Kazokaitė J, Aspatwar A, Parkkila S, Matulis D, An update on anticancer drug development and delivery targeting carbonic anhydrase IX, PeerJ. 2017, 5:e4068.

23. Chano T, Avnet S, Kusuzaki K, et al. Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells. Am J Cancer Res. 2016;6(4):859-875.

24. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Colon Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. 2020 Aug 21. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65880/. 5 Nisan 2021.

25. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. Prz Gastroenterol. 2019, 14(2):89-103.

26. Peifer M. Developmental biology: colon construction. Nature. 2002 Nov 21;420 (6913):274-5, 277.

27. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. Gastroenterology. 1987 Nov;93(5):1009-13.

28. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Colon Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. 2020 Aug 21. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65880/, 2 Nisan 2021.

29. Stewart SL, Wike JM, Kato I, Lewis DR, Michaud F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001. Cancer. 2006, Sep 1;107(5 Suppl):1128-41.

30. Colon Cancer: What Do the Stages Mean?, Kaufman P., Last Updated: November 12, 2018. https://www.everydayhealth.com/colon-cancer/stages-what-they-mean-survival/ 2 Nisan 2021.

31. Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020, 17(2):111-130.

32. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2017, 18(1):197.

33. Ferlay J, Laversanne M, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow, accessed 11 march 2021.

34. Kalady MF, Heald B. Diagnostic Approach to Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. Clin Colon Rectal Surg. 2015, 28(4):205-214.

35. Hisamuddin IM, Yang VW. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. Curr Colorectal Cancer Rep. 2006, 2(2):53-59.

36. Akpınar G. kolon kanserinde apolipoprotein e (apo e) gen polimorfizminin araştırılması Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi, Kocaeli; Kocaeli Üniversitesi, 2006.

37. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2017, 18(1):197.

38. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry J.F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. Gut. 2001, 48:526–535.

39. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: Colorectal and small bowel cancer risk in patients with crohn's disease. Aliment. Pharmacol. Therap. 2006, 23:1097–1104.

40. Robertson DJ. ABC of colorectal cancer. Gastroenterology. 2012, 143:868–869. Martinez-Useros J., Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: Molecular features of adipose tissue. J. Transl. Med. 2016, 14:21.

41. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Levin TR. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: A joint guideline from the American cancer society, the US multi-society task force on colorectal cancer, and the American college of radiology. CA Cancer J. Clin. 2008, 58:130–160.

42. Johns LE., Houlston R.S. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. Am. J. Gastroenterol. 2001, 96:2992–3003.

43. Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. Alcohol Alcoholism. 2004;39:155. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis. JAMA. 2008, 300:2765–2778.

44. Cross AJ, Boca S, Freedman ND, Caporaso NE, Huang WY, Sinha R, Sampson JN, Moore SC. Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. Carcinogenesis. 2014, 35:1516–1522.

45. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. Int. J. Cancer. 2009, 124:2406–2415.

46. Vega P, Valentín F, Cubiella J. Colorectal cancer diagnosis: Pitfalls and opportunities. World J Gastrointest Oncol. 2015, 7(12):422-433.

47. Colorectal Cancer: Types of Treatment. https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/types-treatment . 2 nisan 2021.

48. Chemotherapy for Colorectal Cancer. https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/chemotherapy.html. 2 Nisan 2021.

49. Colorectal Cancer: Types of Treatment. https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer, 3 Nisan 2021.

50. Lawler M, Johnston B, Van Schaeybroeck, Salto-Tellez M, Wilson R, Dunlop M, and Johnston PG. Chapter 74 – Colorectal Cancer. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Dorshow JH, Kastan MB, Tepper JE, eds. Abeloff's Clinical Oncology. 6th ed. Philadelphia, Pa. Elsevier: 2020.

51. Libutti SK, Saltz LB, Willett CG, and Levine RA. Ch 62 - Cancer of the Colon. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 11th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Williams & Wilkins; 2019.

52. Libutti SK, Willett CG, Saltz LB, and Levine RA. Ch 63 - Cancer of the Rectum. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 11th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Williams & Wilkins; 2019.

53. National Cancer Institute. Physician Data Query (PDQ). Colon Cancer Treatment. https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq. 14 Mart 2021.

54. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Colon Cancer. V.1.2020. Accessed at https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf. 23 Ocak 2020.

55. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011, 8(12):686-700.

56. Goldstein NS. Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular-morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification. Am J Clin Pathol. 2006, Jan;125(1):146-53.

57. Noffsinger AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. Annu Rev Pathol. 2009, 4:343-64.

58. Grady WM, Markowitz SD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. Dig Dis Sci. 2015, 60(3):762-772.

59. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011, Mar 4;144(5):646-74.

60. Grady WM. Genomic instability and colorectal cancer. Curr colorectal cancer rep. 2006, 2, 66–71.

61. Negrini S, Gorgoulis V. & Halazonetis T. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 2010, 220–228.

62. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology. 2008, 135(4):1079-1099.

63. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. Gastroenterology. 2010, 138(6):2059-2072.

64. Thompson S.L., Bakhoum S.F., Compton D.A. Mechanisms of chromosomal instability. Curr. Biol. 2010, 20:R285–R295.

65. Vargas-Rondón N, Villegas VE, Rondón-Lagos M. The Role of Chromosomal Instability in Cancer and Therapeutic Responses. Cancers (Basel). 2017, 10(1):4.

66. Nojadeh JN, Behrouz Sharif S, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. EXCLI J. 2018, 17:159-168.

67. Li, GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. Cell Res., 2008,18, 85–98.

68. Päivi Peltomäki, Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer, Human Molecular Genetics, 2001, Volume 10, Issue 7, Pages 735–740.

69. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21662/. 21 Nisan 2021.

70. Joyce C, Rayi A, Kasi A. Tumor-Suppressor Genes. [Updated 2020 Sep 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532243 21 Nisan 2021.

71. Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N, Shin YK. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. Cell Physiol Biochem. 2018;51(6):2647-2693.

72. Leiderman YI, Kiss S, Mukai S. Molecular genetics of RB1--the retinoblastoma gene. Semin Ophthalmol. 2007, Oct-Dec;22(4):247-54.

73. Smith AL, Robin TP, Ford HL. Molecular pathways: targeting the TGF-β pathway for cancer therapy. Clin Cancer Res. 2012. Sep 01;18(17):4514-21.

74. Savage KI, Harkin DP. BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. FEBS J. 2015 Feb;282(4):630-46.

75. Nayak SK, Panesar PS, Kumar H. p53-Induced apoptosis and inhibitors of p53. Curr Med Chem. 2009, 16(21):2627-40.

76. Rahman N, Scott RH. Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. Hum Mol Genet. 2007, Apr 15;16 Spec No 1:R60-6.

77. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, Diakosavvas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. Anticancer Res. 2020, Nov;40(11):6009-6015.

78. Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020, 17(2):111-130.

79. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology. 2013, 38(1):23-38.

80. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. Adv Genet. 2010, 70:27-56.

81. Thienpont B, Steinbacher J, Zhao H, et al. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. Nature. 2016, 537(7618):63-68.

82. Allison B. Norvil, Christopher J. Petell, Lama Alabdi, Lanchen Wu, Sandra Rossie, and Humaira Gowhe, Dnmt3b Methylates DNA by a Noncooperative Mechanism, and Its Activity Is Unaffected by Manipulations at the Predicted Dimer Interface, : Biochemistry 2018, 57, 4312−4324.

83. Zhao Z, Shilatifard A. Epigenetic modifications of histones in cancer. Genome Biol. 2019, 20(1):245.

84. Chen R, Kang R, Fan XG. et al. Release and activity of histone in diseases. Cell Death Dis 2014, 5, e1370.

85. Cramer P, Wolberger C. Proteins: histones and chromatin. Curr Opin Struct Biol. 2011, 21(6):695-697.

86. Epigenetic, Histone modification. https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/epigenetics.html 21 Nisan 2021.

87. Histone modification. https://www.whatisepigenetics.com/histone-modifications/ 21 Nisan 2021.

88. Karczmarski J, Rubel T, Paziewska A, Mikula M, Bujko M, Kober P, Dadlez M, Ostrowski J Histone H3 lysine 27 acetylation is altered in colon cancer. Clin Proteomics 2014, 11(1):24.

89. Hałasa M, Wawruszak A, Przybyszewska A, et al. H3K18Ac as a Marker of Cancer Progression and Potential Target of Anti-Cancer Therapy. Cells. 2019, 8(5):485.

90. Eslaminejad MB, Fani N, Shahhoseini M. Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. Cell J. 2013, 15(1):1-10.

91. Jambhekar A, Dhall A. & Shi Y. Roles and regulation of histone methylation in animal development. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 625–641.

92. Chen Y, Ren B, Yang J, et al. The role of histone methylation in the development of digestive cancers: a potential direction for cancer management. Sig Transduct Target 2020, Ther 5, 143.

93. Levy D. Lysine methylation signaling of non-histone proteins in the nucleus. Cell. Mol. Life Sci. 76, 2019, 2873–2883.

94. Kumar A, Kumari N, Nallabelli N. et al. Pathogenic and Therapeutic Role of H3K4 Family of Methylases and Demethylases in Cancers. Ind J Clin Biochem 2019, 34, 123–132.

95. Cruz C, Della Rosa M, Krueger C, et al. Tri-methylation of histone H3 lysine 4 facilitates gene expression in ageing cells. Elife. 2018, 7:e34081.

96. Fei Chen, Hong Kan, Vince Castranova, Methylation of Lysine 9 of Histone H3: Role of Heterochromatin Modulation and Tumorigenesis, Handbook of Epigenetics, USA., 2011, Chapter 10 - Pages 149-157.

97. Yoo KH, Hennighausen L. EZH2 Methyltransferase and H3K27 Methylation in Breast Cancer. Int J Biol Sci 2012, 8(1):59-65.

98. Suzuki S, Murakami Y, Takahata S. H3K36 methylation state and associated silencing mechanisms. Transcription. 2017, 8(1):26-31.

99. Sen P, Dang W, Donahue G, Dai J, Dorsey J, Cao X, Liu W, Cao K, Perry R, Lee JY, Wasko BM, Carr DT, He C, Robison B, Wagner J, Gregory BD, Kaeberlein M, Kennedy BK, Boeke JD, Berger SL. H3K36 methylation promotes longevity by enhancing transcriptional fidelity. Genes Dev. 2015, Jul 1;29(13):1362-76.

100. Mats Ljungman, Luke Parks, Radhika Hulbatte, Karan Bedi, The role of H3K79 methylation in transcription and the DNA damage response, Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2019, Volume 780, Pages 48-54.

101. Sawicka A, Seiser C. Sensing core histone phosphorylation - a matter of perfect timing. Biochim Biophys Acta. 2014,1839(8):711-718.

102. Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. Epigenetics. 2012, 7(10):1098-1108.

103. Ozawa K. Reduction of phosphorylated histone H3 serine 10 and serine 28 cell cycle marker intensities after DNA damage. Cytometry A. 2008, Jun;73(6):517-27.

104. Sujit N and Rakesh K, Chromatin remodeling in Cancer: A Gateway to regulate gene Transcription, Mol Oncol. 2012, Dec; 6(6): 611–619.

105. Clapier CR, Cairns BR, The biology of chromatin remodeling complexes. Annual Review of Biochemistry. 2009, 78, 273–304.

106. Wei JW, Huang K, Yang C, Kang CS. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). Oncol Rep. 2017, Jan;37(1):3-9.

107. Bannister A, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res 2011, 21, 381–395.

108. Pollock RM, Richon VM . Epigenetic approaches to cancer therapy. Drug Discov Today: Ther Strat 2009, 6: 71–9.

109. Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. Nat Struct Mol Biol 20, 2013, 1147–1155.

110. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature. 2011, 469(7330):343-349.

111. Vissers JH, van Lohuizen M, Citterio E. The emerging role of Polycomb repressors in the response to DNA damage. J Cell Sci. 2012, Sep 1;125 (Pt17): 3939-48.

112. Tan JZ, Yan Y, Wang XX, Jiang Y, Xu HE. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. Acta Pharmacol Sin. 2014 Feb;35(2):161-74.

113. Gan L, Yang Y, Li Q. et al. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. Biomark Res 6, 2018, 10.

114. Vilorio-Marqués L, Martín V, Diez-Tascón C. et al. The role of EZH2 in overall survival of colorectal cancer: a meta-analysis. Sci Rep 7, 2017, 13806.

115. Papale M, Ferretti E, Battaglia G, Bellavia D, Mai A, Tafani M. EZH2, HIF-1, and Their Inhibitors: An Overview on Pediatric Cancers. Front Pediatr. 2018, 6:328.

116. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? [published correction appears in Trends Biochem Sci. 2016, Mar;41(3):287.

117. Corbet C, Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. Nat Rev Cancer. 2017, Oct;17(10):577-593.

118. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouysségur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. J Cell Mol Med. 2010, 14(4):771-794.

119. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouysségur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. J Cell Mol Med. 2010, 14(4):771-794.

120. Warburg O, Posener K, Negelein E. Über den Stoffwechsel der Tumoren (On metabolism of tumors) Biochem Z. 1924;152:319–344.

121. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. Cancer Cell Int. 2013, 13(1):89.

122. Svastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zat'ovicová M, Gibadulinová A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastoreková S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. FEBS Lett. 2004, Nov 19;577(3):439-45.

123. Hamilton PK, Morgan NA, Connolly GM, Maxwell AP. Understanding Acid-Base Disorders. Ulster Med J. 2017, 86(3):161-166.

124. White KA, Grillo-Hill BK, Barber DL. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. J Cell Sci. 2017 Feb 15;130(4):663-669.

125. Asgharzadeh MR, Barar J, Pourseif MM. et al., Molecular machineries of pH dysregulation in tumor microenvironment: potential targets for cancer therapy, Bioimpacts. 2017, 7(2):115–133.

126. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL, Hulikova A. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014, 369(1638):20130099.

127. Damaghi M, Wojtkowiak JW, Gillies RJ. pH sensing and regulation in cancer. Front Physiol. 2013, 4:370.

128. Czowski BJ, Romero-Moreno R, Trull KJ, White KA. Cancer and pH Dynamics: Transcriptional Regulation, Proteostasis, and the Need for New Molecular Tools. Cancers (Basel). 2020, 12(10):2760.

129. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. "Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression", Nat Rev Cancer, 2011, 11:671–7.

130. Masoud GN, Li W. HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta Pharm Sin B. 2015, 5(5):378-389.

131. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. Yale J Biol Med. 2007, 80(2):51-60.

132. Lv X, Li J, Zhang C, et al. The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. Genes Dis. 2016, 4(1):19-24.

133. Berchner-Pfannschmidt U, Frede S, Wotzlaw C, Fandrey J, Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing, European Respiratory Journal 2008, 32: 210-217.

134. Li J, Zhang G, Wang X, Li XF. Is carbonic anhydrase IX a validated target for molecular imaging of cancer and hypoxia?. Future Oncol. 2015, 11(10):1531-1541.

135. Supuran CT. Carbonic Anhydrase Inhibition and the Management of Hypoxic Tumors. Metabolites. 2017, 7(3):48.

136. Supuran CT. Carbonic Anhydrases and Metabolism. Metabolites, 2018, 8(2):25.

137. Ozensoy Guler O, Capasso C, Supuran CT. A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization. J Enzyme Inhib Med Chem. 2016, Oct;31(5):689-94.

138. Singh S, Lomelino CL, Mboge MY, Frost SC, McKenna R. Cancer Drug Development of Carbonic Anhydrase Inhibitors beyond the Active Site. Molecules. 2018, 23(5):1045.

139. Meldrum NN, Roughton FJ W. Nature (Londra) 1933; 80 : 113–142. Henry R P. Annu Rev Physiol. 1996, 58 : 523–538.

140. Smith KS, Jakubzick C, Whittam TS, Ferry JG. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. Proc Natl Acad Sci USA. 1999, 96(26):15184-15189.

141. Supuran CT. Structure and function of carbonic anhydrases. Biochem J 15 July 2016, 473 (14): 2023–2032.

142. Imtaiyaz Hassan M, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. Bioorg Med Chem. 2013 Mar 15;21(6):1570-82.

143. Angeli A, Carta F, Supuran CT. Carbonic Anhydrases: Versatile and Useful Biocatalysts in Chemistry and Biochemistry. Catalysts. 2020, 10(9):1008.

144. Carta F, Dumy P, Supuran CT, Winum JY. Multivalent Carbonic Anhydrases Inhibitors. Int J Mol Sci. 2019, 20(21):5352.

145. Supuran CT. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist?. J Enzyme Inhib Med Chem, 2016, 31(3): 345–360.

146. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouysségur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. J Cell Mol Med. 2010, 14(4):771-794.

147. Ondriskova E, Debreova M, Pastorekova S, Chapter 10 - Tumor-Associated Carbonic Anhydrases IX and XII, Editor(s): Claudiu T. Supuran, Giuseppina De Simone, Carbonic Anhydrases as Biocatalysts, Elsevier, 2015, Pages 169-205.

148. Haapasalo J, Nordfors K, Haapasalo H, Parkkila S. The Expression of Carbonic Anhydrases II, IX and XII in Brain Tumors. Cancers. 2020, 12(7):1723.

149. Nocentini A. and Supuran CT. "Carbonic anhydrase inhibitors as antitumor/antimetastatic agents: a patent review", Expert Opin Ther Pat. 2018, Oct;28(10):729-740.

150. Özensoy Ö, Kanser ilişkili Karbonik anhidraz ıx ve xıı izoenzimlerinin (CA-IX, CA-XII) ekspresyonu, saflaştırılması ve bazı bileşiklere karşı inhibizyon etkilerinin araştırılması, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2006.

151. Strapcova S, Takacova M, Csaderova L, Martinelli P, Lukacikova L, Gal V, Kopacek J, Svastova E. Clinical and Pre-Clinical Evidence of Carbonic Anhydrase IX in Pancreatic Cancer and Its High Expression in Pre-Cancerous Lesions. Cancers (Basel). 2020, Jul 22;12(8):2005.

152. Sang Y, Wang L, Tang JJ, Zhang MF, Zhang MX, Liu X, Zhang RH, Kang TB, Chen MY. Oncogenic roles of carbonic anhydrase IX in human nasopharyngeal carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2014, May 15;7(6):2942-9.

153. Dubois L, Peeters S, Lieuwes NG. et al. "Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeuticeffect of tumor irradiation", Radiotherapy and Oncology, 2011, 99, 424–431.

154. Mboge MY, McKenna R, Frost SC. “Advances in Anti-Cancer Drug Development Targeting Carbonic Anhydrase IX and XII”, Top Anticancer Res., 2015, 5:3–42.

155. Mahon BP, Bhatt A. Socorro L. et al. “The structure of carbonic anhydrase IX is adapted for low-pH catalysis”, Biochemistry. 2016, 55:4642-53.

156. Ames S, Pastorekova S, Becker HM. “The proteoglycan-like domain of carbonic anhydrase IX mediates non-catalytic facilitation of lactate transport in cancer cells”, Oncotarget., 2018, 9(46):27940–57.

157. Innocenti A, Pastorekova S, Pastorek J, Scozzafava A, De Simone G, Supuran, CT. “The proteoglycan region of the tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX acts as anintrinsic buffer optimizing CO2 hydration at acidic pH values characteristic of solid tumors”, Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19: 5825–5828.

158. Rafajová M, Zatovicová M, Kettmann R, Pastorek J, Pastoreková S. Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells. Int J Oncol. 2004 Apr;24(4):995-1004.

159. Parks SK, Cormerais Y, Durivault J, Pouyssegur J. “Genetic disruption of the pHi-regulating proteins Na+/H+ exchanger 1 (SLC9A1) and carbonic anhydrase 9 severely reduces growth of colon cancer cells”, Oncotarget. 2017, Feb 7; 8(6): 10225–10237.

160. Sansone P, Piazzi G. et al.. “Cyclooxygenase-2/carbonic anhydrase-IX up-regulation promotes invasive potential and hypoxia survival in colorectal cancer cells”, J. Cell. Mol. Med. 2009, Vol 13, No 9B, pp. 3876-3887.

161. Koyuncu I, Gonel A, Kocyigit A, Temiz E, Durgun M, Supuran CT. “Selective inhibition of carbonic anhydrase-IX by sulphonamide derivatives induces pH and reactive oxygen species-mediated apoptosis in cervical cancer HeLa cells” J Enzyme Inhib Med Chem., 2018, 33(1):1137–1149.

162. Ledaki I, McIntyre A, Wigfield S, et al. Carbonic anhydrase IX induction defines a heterogeneous cancer cell response to hypoxia and mediates stem cell-like properties and sensitivity to HDAC inhibition. Oncotarget. 2015, 6(23):19413-19427.

163. Van den Beucken T, Koritzinsky M, Niessen H, et al. Hypoxia-induced expression of carbonic anhydrase 9 is dependent on the unfolded protein response. J Biol Chem. 2009, 284(36):24204-24212.

164. Watson CJ, Collier P, Tea I, Neary R, Watson JA, Robinson C, Phelan D, Ledwidge MT, McDonald KM, McCann A, Sharaf O, Baugh JA. Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of myofibroblast-like phenotype. Hum Mol Genet. 2014, Apr 15;23(8):2176-88.

165. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Hypoxia-Inducible Histone Lysine Demethylases: Impact on the Aging Process and Age-Related Diseases. Aging Dis. 2016, 7(2):180-200.

166. D'Oto A, Tian QW, Davidoff AM, Yang J. Histone demethylases and their roles in cancer epigenetics. J Med Oncol Ther. 2016, 1(2):34-40.

167. Chakraborty AA. et al. "Histone demethylase KDM6A directly senses oxygen to control chromatin and cell fate", Science 363, 2019, 1217–1222.

168. Chung YL, Troy H, Kristeleit R, et al. Noninvasive magnetic resonance spectroscopic pharmacodynamic markers of a novel histone deacetylase inhibitor, LAQ824, in human colon carcinoma cells and xenografts. Neoplasia. 2008,10(4):303-313.

169. Tülüce Y, Ahmed BA, Koyuncu İ, Durgun M. The cytotoxic, apoptotic and oxidative effects of carbonic anhydrase IX inhibitor on colorectal cancer cells. J Bioenerg Biomembr. 2018, Apr;50(2):107-116.

170. Louis K.S., Siegel A.C., Levy G.A. Comparison of manual versus automated trypan blue dye exclusion method for cell counting. In: Stoddart M.J., editor. Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. Series Methods in Molecular Biology. Springer Protocols; New York: 2011, pp. 7–12.

171. Yin LM, Wei Y, Wang Y, Xu YD, Yang YQ. Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. Int J Med Sci. 2013, 10(1):68-72.

172. Asetazolamid. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetazolamide. 21 Nisan 2021.

173. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. J Vis Exp. 2011, (54):2899.

174. Liu W, Cui Y, Ren W, Irudayaraj J. Epigenetic biomarker screening by FLIM-FRET for combination therapy in ER+ breast cancer. Clin Epigenetics. 2019, 11(1):16.

175. Peixoto P, Etcheverry A, Aubry M, et al. EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes. Cell Death Dis. 2019, 10(3):205.

176. Brown RAM, Epis MR, Horsham JL, Kabir TD, Richardson KL, Leedman PJ. Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal. BMC Biotechnol. 2018, 18 (1):16.

177. RNA isolation kit. https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/mirna/mirneasy-kits/?catno=217004. 21 Nisan 2021.

178. Peña-Llopis S, Brugarolas J. Simultaneous isolation of high-quality DNA, RNA, miRNA and proteins from tissues for genomic applications. Nat Protoc. 2013, 8(11):2240-2255.

179. Vildmyren I, Cao HJV, Haug LB, Valand IU, Eng Ø, Oterhals Å, Austgulen MH, Halstensen A, Mellgren G, Gudbrandsen OA. Daily Intake of Protein from Cod Residual Material Lowers Serum Concentrations of Nonesterified Fatty Acids in Overweight Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Pilot Study. Mar Drugs. 2018, Jun 5;16(6):197.

180. Browne DJ, Brady JL, Waardenberg AJ, Loiseau C, Doolan DL. An Analytically and Diagnostically Sensitive RNA Extraction and RT-qPCR Protocol for Peripheral Blood Mononuclear Cells. Front Immunol. 2020, 11:402.

181. Senamela T, Kock M, Becker P, Potgieter JJC. Detection of the Janus kinase 2 V617F mutation using a locked nucleic-acid, real-time polymerase chain reaction assay. Afr J Lab Med. 2018, 7(1):658.

182. Koprinarova M, Schnekenburger M, Diederich M. Role of Histone Acetylation in Cell Cycle Regulation. Curr Top Med Chem. 2016, 16(7):732-44.

183. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol Mol Biol Rev. 2000, 64(2):435-459.

184. Alaskhar Alhamwe B, Khalaila R, Wolf J, et al. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. Allergy Asthma Clin Immunol. 2018, 14:39.

185. Li Z, Li M, Wang D, et al. Post-translational modifications of EZH2 in cancer. Cell Biosci. 2020, 10(1):143.

186. Wan J, Zhan J, Li S, et al. PCAF-primed EZH2 acetylation regulates its stability and promotes lung adenocarcinoma progression. Nucleic Acids Res. 2015, 43(7):3591-3604.

187. Miller JL, Grant PA. The role of DNA methylation and histone modifications in transcriptional regulation in humans. Subcell Biochem. 2013, 61:289-317.

188. Kindrick JD, Mole DR. Hypoxic Regulation of Gene Transcription and Chromatin: Cause and Effect. Int J Mol Sci. 2020, 21(21):8320.

189. Platt JL, Salama R, Smythies J, Choudhry H, Davies J, Hughes JR, Ratcliffe PJ, Mole DR. Capture-C reveals preformed chromatin interactions between HIF-binding sites and distant promoters. EMBO Rep. 2016, 17:1410-1421.

190. Gräff J, Tsai L, Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. Nat Rev Neurosci, 2013, 14(2):97–111.

191. Huang J, Gou H, Yao J, et al. The noncanonical role of EZH2 in cancer. Cancer Sci. 2021, 112(4):1376-1382.

192. Bremer SCB, Conradi LC, Mechie NC, Amanzada A, Mavropoulou E, Kitz J, Ghadimi M, Ellenrieder V, Ströbel P, Hessmann E, Gaedcke J, Bohnenberger H. Enhancer of Zeste Homolog 2 in Colorectal Cancer Development and Progression. Digestion. 2021, 102(2):227-235.

193. Hoffmann F, Niebel D, Aymans P. et al. H3K27me3 and EZH2 expression in melanoma: relevance for melanoma progression and response to immune checkpoint blockade. Clin Epigenet, 2020, 12, 24.

194. Liu X, Liu H, Gu L & Zheng H. EZH2 Expression and its Correlation with Clinicopathological Features in Patients with Colorectal Carcinoma. Open Life Sciences, 2016, 11(1), 287-292.