T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RENAL KANSER HÜCRE HATTINDA (CAKI-2) KARBONİK ANHİDRAZ-IX ENZİM İNHİBİSYONUNUN mTOR PROTEİNİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Emine TERZİ

KANSER BİYOLOJİSİ DOKTORA PROGRAMI

Ankara, 2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RENAL KANSER HÜCRE HATTINDA (CAKI-2) KARBONİK ANHİDRAZ-IX ENZİM İNHİBİSYONUNUN mTOR PROTEİNİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Emine TERZİ

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Bu araştırma; Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 569337 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 5530 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ankara, 2021

TEŞEKKÜR

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında eğitimime başladığım ilk günden beri beni her anlamda destekleyen, yüksek lisanstan bu yana her zaman beni takdir eden bir öğrencisi olarak değil meslektaşı olarak gören danışman hocam sayın Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER'e,

Eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca desteklerini hiçbir konuda esirgemeyen anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN ve engin bilgilerinden her zaman faydalandığım kıymetli hocam sayın Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e, proje yazım süresince bize yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Doğan AŞIK'a, desteklerinden dolayı Prof. Dr. Özgür ŞAHİN'e ve Prof. Dr. Doğan YÜCEL'e,

Doktora eğitimim boyunca beni "2211-E Doğrudan Yurt İçi Doktora Burs Programı" ile destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na ve 569337 no'lu proje ile doktora tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı'na ,

Bu tezin ortaya çıkmasında en az benim kadar emeği olan, bu süreçte ilk günden beri beni yalnız bırakmayan canım arkadaşım Arş. Gör. Beyza Ecem ÖZ BEDİR, bölüm arkadaşlarım Arş. Gör. Elif ERCAN ve Arş. Gör Tuğba Kevser UYSAL, doktora tez çalışmalarımız sırasında desteklerini esirgemeyen sayın İbrahim KARAKUŞ ve tezimin başladığı ilk günden beri manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım dostum Dr. Ceren SELVİ'ye, laboratuvar konusunda desteklerini esirgemeyen Dr. Cansu ŞAHİN'e,

Tez çalışmalarım sırasında hep yanımda olan, koşulsuz şartsız bana her durumda destek veren, beni her anlamıyla yetiştirmiş, bilgilendirmiş canım annem Tülay TERZİ'ye, hep yanımda olan sevgili babam Coşkun TERZİ'ye ve canım kardeşim Vahap TERZİ'ye,

Sonsuz teşekkürlerimle…

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT… ..... **iv**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ… ..... **v**

ŞEKİLLER DİZİNİ… ..... **viii**

TABLOLAR DİZİNİ… ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Kanser 3

2.1.1. Kanserin Karakteristik Özellikleri 3

2.1.2. Renal Hücreli Karsinom (RCC) 4

2.2. Warburg Etkisi ve Hipoksi 11

2.2.1. Warburg Etkisi… 11

2.2.2. Hipoksi 12

2.3. Karbonik Anhidraz Enzimi 14

2.3.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı ve Mekanizması 14

2.3.2. Karbonik Anhidraz Enzim Ailesi ve Fizyolojik Önemi 16

2.3.3. Karbonik Anhidraz IX 18

2.3.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri 19

2.3.5. Kanser/CA-IX İlişkisi ve CA-IX İnhibisyonunun Klinik Önemi 22

2.4. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı 24

2.4.1. Rapamisinin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi (mTOR) 26

2.4.2. mTOR Protein İnhibitörleri 30

2.4.3. Renal Kanser ve mTOR Sinyal Yolağı 34

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER **36**

3.1. Materyal 36
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 36
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar 37
3.2. Yöntemler 38
3.2.1. Hücre Kültürü 38
3.2.2. İnhibitörlerin Hazırlanması ve Uygulanması 41
3.2.3. WST-1 Hücre Canlılık Testi 42
3.2.4. Hipoksik Ortam Oluşturulması 44
3.2.5. İnhibitör Uygulaması Öncesi ve Sonrası CA-IX İnhibisyonunun Doğrulanması 44
3.2.6. CA-IX İnhibisyonunun ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi 45
3.2.7. Real Time PCR 47
3.2.8. Western Blot Analizi 52
3.2.9. İmmünofloresan Boyama 58
3.2.10. İstatistiksel Analizler 59
4. BULGULAR 60
4.1. CAKI-2 Hücrelerinin Mikroskopta Görüntülenmesi 60
4.2. Sitotoksik Etkinin WST-1 Testi ile belirlenmesi 61
4.2.1. AZA'nın CAKI-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi 61
4.2.2. RAPA'nın CAKI-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi 66
4.3. İnhibitör Uygulaması Önce ve Sonrası CA-IX İnhibisyonunun Doğrulanması… 71
4.4. Normoksik ve Hipoksik Koşulların HIF1-α ve CA-IX Gen Düzeylerine Olan Etkisi 73
4.5. AZA Uygulanmasının CA-IX Üzerine Olan Etkisi 74
4.6. Western Blot Analizlerine Ait Bulgular 76
4.6.1. HIF1-α Protein Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi 76

4.6.2. mTOR ve pmTOR Protein Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi 78
4.6.3. 4E-BP1 ve p-4E-BP1 Protein Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi 81
4.7. İmmünofloresan Boyama… 84
5. TARTIŞMA 92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER… 99
7. KAYNAKLAR 102
8. EKLER…..... 112
EK.1. ÖZGEÇMİŞ FORMU…..... 112

ÖZET

Renal Kanser Hücre Hattında (CAKI-2) Karbonik Anhidraz-IX Enzim İnhibisyonunun mTOR Proteini Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Karbonik anhidraz (CA) karbondioksit/bikarbonatın'ın (CO_2/HCO_3^-) dönüşümünü katalizler. CA enzim ailesi içerisinde tümörle ilişkisi gösterilen izoenzimlerden biri CA-IX'dur. CA-IX'un tümörlü dokularda ekspresyonu artmaktadır ayrıca intrasellüler kuyruklarının (IC) fosforillenmesinin kanser ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı; hücre proliferasyonu, sağkalımı ve farklılaşmasında görevli bir sinyal iletim yoludur. Bu etkilerini S6K1 ve 4EBP1 proteinlerinin aktivasyonu aracılığıyla gösterir. mTOR'un aktivitesi kanser hücrelerinde yüksektir ve en yüksek ifade edildiği kanser türlerinden biri de renal kanserlerdir. Renal kanserlerin en yaygın histolojik tipi ise berrak hücreli renal karsinomdur. Bu çalışmada amaçlanan, CA-IX inhibisyonunun, tümorogenez sürecinde etkili olduğu bilinen mTOR yolağı üzerine olan etkisini belirlemektir.

Bu amaçla çalışmada CAKI-2 insan berrak hücreli renal karsinoma hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan inhibitörler olan Rapamisin ve Asetazolamid'in bu hücre hatları üzerindeki etkin dozunu belirlemek için WST-1 sitotoksisite testi yapılmıştır. Hipoksik ortam oluşturulmuş ve kontrolü Real Time PCR ve Western Blot yöntemleri ile yapılmıştır. CA-IX inhibisyonunun mTOR yolağı üzerine olan etkisini belirlemek için Western blot ve immünofloresan boyama çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmanın sonucunda AZA'nın mTOR sinyal yolağında inhibisyon etkisine neden olduğu gösterilmiştir. Ancak bu etki istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$).Bu inhibisyon etkisinin gösterilmiş olması ileriki çalışmalar için öncü nitelik taşımaktadır. Elde edilen sonuçlar kanser tedavisinde kullanılacak yeni ilaç uygulamaları için son derece önemli bir katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Asetazolamid, renal kanser, CA-IX, hipoksi, mTOR

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Carbonic anhydrase-IX Inhibition on mTOR Protein in Renal Cancer Cell Line (CAKI-2)

Carbonic anhydrase (CA) catalyzes the conversion of carbon dioxide / bicarbonate (CO_2 / HCO_3^-). CA-IX is one of the isoenzymes in the CA enzyme family, which has been shown to be associated with tumor development. Expression of CA-IX increases in tumorous tissues. It is known that phosphorylation of intracellular tails (IC) of CA-IX is associated with cancer.

PI3K/Akt/mTOR is a signal transduction pathway which is involved in cell proliferation, survival and differentiation. It shows these effects through the activation of S6K1 and 4EBP1 proteins. The activity of mTOR is high in cancer cells and one of the cancer types with the highest expression is renal cancers. The most common histological type of renal cancers is clear cell renal carcinoma. In this study our aim is to assess the effect of CA-IX inhibition on the mTOR pathway, which is known to be effective in the tumorigenesis process.

For this purpose, CAKI-2 human clear cell renal carcinoma cell line was used in our study. The WST-1 cytotoxicity test was performed to determine the effective dose of Rapamycin and Acetazolamide, which are the inhibitors we used in our study, on these cell lines. A hypoxic environment was created and its control was verified by Real Time PCR and Western blot methods. Western blot and immunoflourescence staining studies were conducted to determine the effect of CA-IX inhibition on the mTOR pathway.

As a result of the study, it has been shown that AZA has an inhibititory effect on the mTOR signal pathway. However, this effect was found to be statistically insignificant ($p > 0.05$).The demonstration of this inhibition effect is a pioneer for future studies. The results of the study can make an extremely important contribution to new drug applications to be used in cancer treatment.

Keywords: Acetazolamide, renal cancer, CA-IX, hypoxia, mTOR

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Santigrat Derece

µL : Mikrolitre

µM : Mikromolar

4EBP1 : Ökaryotik Translasyon Başlama Faktörü 4E-Bağlayıcı Protein 1

Å : Angström

Akt : Protein Kinaz B

ATP : Adenozin Tri Fosfat

AZA : Asetazolamid

CA : Karbonik Anhidraz Enzimi

CA-IX : Karbonik Anhidraz IX İzoenzimi

CAKI : İnsan Berrak Hücreli Renal Karsinom Hücre Hattı

CCI-779 : Temsirolimus

ccRCC : Berrak Hücreli Renal Karsinom

cDNA : Komplementer DNA

chRCC : Kromofob Renal Karsinom

CO_2 : Karbondioksit

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik Asit

E.C. : Enzim Kod Numarası

ECL : Enhanced Luminol Based Chemiluminescent

ECM : Ekstrasellüler Matriks

EGF : Epidermal Büyüme Faktörü

eIF4E : Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4E

FBS : Fetal Bovin Serum

FKBP12 : FK506 bağlayıcı protein

G : Gram

GAPDH : Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz

gDNA : Genomik DNA

GLUT : Glukoz Taşıyıcısı

H_2O : Su

HCO_3^- : Bikarbonat

HER-2 : İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

HIF : Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör

His : Histidin

HRE : Hipoksi Cevap Elementi

Hsp70 : Isı Şok Proteini 70

IC : İntrasitoplazmik Kuyruk

IC_{50} : Enzimin % 50'sini İnhibe Eden İnhibitör Konsantrasyonu

IFN-α : İnterferon-α

IGFR : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü

IL-2 : İnterlökin-2

L : Litre

M : Molarite

mL : Mililitre

MMP : Matriks Metalloproteinaz

mTOR : Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi

Nm : Nanometre

OH^- : Hidroksit iyonu

p-4EBP1 : Fosforile 4EBP1

PBS : Fosfat Tamponlu Tuz

PDK1 : Fosfoinozitid Bağımlı Kinaz-1

PG : Proteoglikan Benzeri Alan

PI3K : Fosfatidilinositol-3-kinaz

PK° : Protein Kinaz C

p-mTOR : Fosforile mTOR

pRCC : Papiller Renal Karsinom

PTEN : Fosfataz ve Tensin Homoloğu

RAD001 : Everolimus

RAPA : Rapamisin

Ras : Rat Sarkoma Proteini

RCC : Renal Hücre Karsinomu

RNA : Ribonükleik Asit

rpm : Dakikadaki Devir Sayısı

S6K1 : Ribozomal Protein S6 Kinaz Beta-1

TM : Transmembran Segment

TNM : Tümör, Lenf Nodu, Metastaz Evrelemesi

Tyr : Tirozin

VEGFR : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VHL : von Hippel Lindau Proteini

WST-1 : Suda Çözülebilir Tetrazolyum Tuzu

Zn^{+2} : Çinko

α : alfa

β : Beta

γ : Gama

δ : Delta

ζ : Zeta

η : Eta

θ : Teta

ι : İota

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanserin karakteristik özellikleri..... 4
Şekil 2.2. Renal kanser histolojik alt tipleri. 8
Şekil 2.3. Tipik alveolar, solid ve mikrokistik model gösteren berrak hücreli böbrek hücreli karsinom 9
Şekil 2.4. Warburg etkisi 12
Şekil 2.5. HIF-1α transkripsiyon faktörünün, hipoksik tümörlerde aerobik glikoliz, anjiyogenez, eritropoez ve pH düzenlemesinde rol alan proteinlerin aşırı ekspresyonunu düzenlediği mekanizma..... 13
Şekil 2.6. CA'nın katalizlediği reaksiyon. 14
Şekil 2.7. α-CA'ların katalitik, inhibisyon ve aktivasyon mekanizması…..... 15
Şekil 2.8. CA'ların metabolizmadaki yerleşimi 17
Şekil. 2.9. CA-IX izoenziminin yapısı..... 18
Şekil 2.10. CA inhibisyon mekanizmaları… 21
Şekil 2.11. Asetazolamid'in kimyasal yapısı..... 21
Şekil 2.12. SLC-0111'in yapısı 23
Şekil 2.13. PI3K / AKT sinyal yolağı… 26
Şekil 2.14. PI3-K / Akt / mTOR sinyal kaskadı… 29
Şekil. 2.15. mTOR kompleksinin bileşenleri…..... 30
Şekil 2.16. mTOR'un domain yapısı 31
Şekil 3.1. Thoma lamı ile hücre sayımı… 40
Şekil 3.2. Rapamisinin moleküler yapısı 41
Şekil 3.3. Asetazolamidin moleküler yapısı 41
Şekil 3.4. Bir tetrazolyum tuzu WST-1'in Formazana dönüşümü…..... 43
Şekil 3.5. Fenol Kırmızısı içeren besi ortamının absorbans spektrumları… 45
Şekil 3.6. Sandwich ELISA prensibi 46

Şekil 3.7. QIAcube connect cihazı…. 49

Şekil 3.8. iBlot transfer cihazı….55

Şekil 3.9. Kuru blotlama sistemi 56

Şekil 4.1. CAKI-2 hücrelerinin genel görüntüsü… 60

Şekil 4.2. CAKI-2 hücrelerinin genel görüntüsü… 60

Şekil 4.3. AZA ile normoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik… 62

Şekil 4.4. AZA ile hipoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik 63

Şekil 4.5. AZA ile normoksik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik… 64

Şekil 4.6. Farklı zaman dilimi, koşul ve konsantrasyonlarda AZA uygulaması yapılan CAKI-2 hücre hattında % hücre canlılığının gösterimi 65

Şekil 4.7. AZA uygulaması öncesi ve sonrası CAKI-2 hücre hattına ait görüntüler…66

Şekil 4.8. RAPA ile normoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik…. 67

Şekil 4.9. RAPA ile hipoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik…. 68

Şekil 4.10. RAPA ile normoksik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik…. 69

Şekil 4.11. Farklı zaman dilimi, koşul ve konsantrasyonlarda RAPA uygulaması yapılan CAKI-2 hücre hattında % hücre canlılığının gösterimi 70

Şekil 4.12. RAPA uygulaması öncesi ve sonrası CAKI-2 hücre hattına ait görüntüler… 71

Şekil 4.13. Fenol red kullanılarak oluşturulan absorbsiyona bağlı pH grafiği… 72

Şekil 4.14. qPCR analizi için yapılan plate dizaynı 73

Şekil 4.15. CA-IX seviyelerinin ölçümü için oluşturulmuş standart grafik.....75

Şekil 4.16. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 Hücrelerinde CA-IX konsantrasyonları 76

Şekil 4.17. Normoksik ve hipoksik koşullarda CAKI-2 hücrelerinde HIF1-α proteinine ait bant görüntüleri 77

Şekil 4.18. CAKI-2 hücrelerinde hipoksik ve normoksik koşullarda HIF1-α Western Blot Analizin Karşılaştırmalı Grafiği 77
Şekil 4.19. CAKI-2 hücrelerinde mTOR proteinine ait bant görüntüleri 78
Şekil 4.20. CAKI-2 hücrelerinde p-mTOR proteinine ait bant görüntüleri… 78
Şekil 4.21. CAKI-2 hücrelerinin mTOR Western Blot Analizinin karşılaştırmalı grafiği… 79
Şekil 4.22. CAKI-2 hücrelerinin p-mTOR Western Blot analizinin karşılaştırmalı grafiği 80
Şekil 4.23. CAKI-2 hücrelerinde 4E-BP1 proteinine ait bant görüntüleri… 81
Şekil 4.24. CAKI-2 hücrelerinde p-4E-BP1 proteinine ait bant görüntüleri 81
Şekil 4.25. CAKI-2 hücrelerinin 4E-BP1 Western Blot Analizinin karşılaştırmalı grafiği 82
Şekil 4.26. CAKI-2 hücrelerinin p-4E-BP1 Western Blot Analizinin karşılaştırmalı grafiği 83
Şekil 4.27. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan boyanması ile gösterimi 85
Şekil 4.28. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX protein ekspresyonunun immünofloresan boyanması ile gösterimi 86
Şekil 4.29. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde mTOR protein ekspresyonunun immünofloresan boyanması ile gösterimi 87
Şekil 4.30. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde 4E-BP1 protein ekspresyonunun immünofloresan boyanması ile gösterimi 88
Şekil 4.31. AZA uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX/ HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi 89
Şekil 4.32. AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX/ HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi 89
Şekil 4.33. AZA uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX/ mTOR protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi 90
Şekil 4.34. AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX/ mTOR protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi 90
Şekil 4.35. AZA uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde mTOR/4E-BP1 protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi 91
Şekil 4.36. AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde mTOR/4E-BP1 protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi 91

Şekil 5.1. Deneysel akış planı… 93
Şekil 5.2. Western blot analizlerinin gösterimi..... 97

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (UICC), renal kanserde TNM evreleme sistemi 6
Tablo 2.2. Renal kanserde Fuhrman evreleme sistemi 7
Tablo 2.3. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) renal kanser alt tipleri 7
Tablo 2.4. pH düzenlenmesini hedefleyen CA-IX hedefli klinik denemeler 24
Tablo 2.5. Klinik çalışmalarda mTOR inhibitörleri 34
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar 37
Tablo.3.2. Kullanılan hücre hattı ve özellikleri 38
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan inhibitörlerin özellikleri 42
Tablo 3.4. Human Carbonic Anhydrase IX ELISA kit içeriği… 46
Tablo 3.5. miRNeasy mini kit içeriği 48
Tablo 3.6. Genomik DNA giderme reaksiyon bileşenleri 50
Tablo 3.7. Ters transkripsiyon reaksiyon bileşenleri… 50
Tablo 3.8. qPCR reaksiyonu için gerekli bileşenler 51
Tablo 3.9. Çalışmada kullanılan primerler… 51
Tablo 3.10. qPCR reaksiyonu için gerekli adımlar 52
Tablo 3.11. Lizis tamponunun içeriği 53
Tablo 3.12. Running buffer içeriği 54
Tablo 3.13. Blotlama solüsyonu içeriği… 55
Tablo 3.14. Çalışmada kullanılan primer antikorlar… 57
Tablo 3.15. Çalışmada kullanılan sekonder antikorlar… 57
Tablo 3.16. İmmünositokimyada kullanılan primer antikorlar 59
Tablo 3.17. İmmünositokimyada kullanılan sekonder antikorlar 59
Tablo 4.1. AZA ile normoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri… 62
Tablo 4.2. AZA ile hipoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri 63
Tablo 4.3. AZA ile normoksik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri 64
Tablo 4.4. AZA'nın CAKI-2 hücreleri için hesaplanan IC_{50} değerleri 65

Tablo 4.5. RAPA ile normoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri 67
Tablo 4.6. RAPA ile hipoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri..... 68
Tablo 4.7. RAPA ile normoksik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri 69
Tablo 4.8. RAPA'nın CAKI-2 hücreleri için hesaplanan IC_{50} değerleri… 70
Tablo 4.9. Oluşturulan standart grafiğe göre normoksik ve hipoksik ortamdaki pH değerleri 72
Tablo 4.10. Oluşturulan standart grafiğe göre inhibitörsüz, AZA ve RAPA uygulanan ortamdaki pH değerleri..... 73
Tablo 4.11. HIF1-α qPCR analizine ait veriler..... 74
Tablo 4.12. CA-IX qPCR analizine ait veriler..... 74
Tablo 4.13. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerine Ait Absorbans ve konsantrasyon değerleri..... 75

Tablo 6.1. Tez çalışmasına ait özet bilgiler..... 101

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve bölünmesi sebebiyle ortaya çıkan hastalık durumudur (1). Kanser; tütün, kimyasallar, ve radyasyon gibi birçok dış faktör ve kalıtsal mutasyonlar, hormonlar gibi iç faktörler nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Ayrıca beslenme faktörleri, fiziksel aktivite eksikliği, obezite ve çevresel kirleticiler dahil birçok etkenin kanser riskini artırdığı bilinmektedir. Bu faktörler, insan vücudunda karsinogenezi başlatmak veya teşvik etmek için birlikte hareket etmektedir (2, 3). Böbrek hücrelerinde başlayan kanser renal hücre karsinomu (RCC) olarak adlandırılmaktadır. Renal kanserlerin en sık görülen alt tipi berrak hücreli renal karsinomdur (ccRCC) (4). Geçtiğimiz on yıl, RCC biyolojisinin anlaşılmasında ilerlemelere tanık olmuştur. Moleküler olarak hedeflenmiş ve antianjiyojenik ajanlar, ileri RCC'li hastalar için umut verici hale gelmiştir. İleri RCC'li hastaların genel sağkalımı son on yılda önemli ölçüde iyileşmiş olsa da, hastaların büyük çoğunluğu hala kullanılan mevcut ajanların terapötik etkinliğinin sınırlı olmasından dolayı hayatını kaybetmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı RCC tedavisinde yeni hedefler belirlemek önemli hale gelmiştir (5).

Karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1), karbondioksit (CO_2) ve bikarbonatın (HCO_3^-) tersine çevrilebilir hidrasyonunu ve dehidrasyonunu katalize eden birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli bir rol oynayan çinko içeren bir metaloenzimdir (6). CA-IX, normal dokularda sınırlı bir dağılıma sahip olan, ancak birçok tümörde aşırı eksprese edilen tümör ile ilişkili bir CA izoenzimi ve ümit verici bir ilaç hedefidir. CA-IX çekirdekte ve sitoplazmadaki sinyalizasyonu etkileyebilir. CA-IX'un intrasellüler kuyruklarının (IC) fosforile edildiğinde, bazı kanserle ilişkili sinyal yolaklarının transdüksiyonuna katılabileceği gösterilmiştir (7). Bu yolaklardan biri de PI3K / AKT / mTOR sinyal yolağıdır.

Rapamisinin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) ve fosfatidilinositol-3-kinaz/protein kinaz B/ mTOR (PI3K/AKT/mTOR) sinyalizasyonu, protein sentezi, hücre büyümesi, metabolizma, hayatta kalma, katabolizma ve otofaji dahil olmak üzere birçok temel hücre işleminin düzenlenmesi için kritiktir. mTOR, insanlarda MTOR geni tarafından kodlanan PI3K ailesine ait 289-kDa'lık bir serin /

treonin protein kinazdır. Düzensiz mTOR sinyali birçok kanser türünde görülmektedir (8).

Literatürdeki çalışmalar mTOR inhibitörlerinin kanser üzerindeki etkilerini detaylıca açıklamaktadır. Ayrıca, CA-IX'un mTOR ile ilişkisini gösteren çalışmalar olmasına rağmen literatürde CA-IX inhibitörlerinin mTOR üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırmamızda CA-IX inhibisyonunun karsinogenez sürecinde mTOR yolağına olan etkileri incelenmiştir.

Karsinogenez sürecinde önemli rolleri olan PI3K/Akt/mTOR yolağı üzerinde CA-IX inhibisyonunun etkilerinin aydınlatılması, ileriki çalışmalar için öncü nitelik taşıyacaktır. Çalışmadan elde edilecek sonuçların kanser tedavisinde kullanılacak yeni ilaç uygulamaları için son derece önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, kontrolsüz bölünme ve metastaz terimlerini barındıran bir hastalıktır (9). Kanser hücrelerinin büyük bir kısmı epitelyal kökenlidir. Bu kanser türleri karsinom olarak adlandırılır ve kanser ile ilişkili ölümlerin % 80'ini oluştururlar. Epitel hücresinden köken almayan kanserler ise; yumuşak doku hücrelerinden köken alan sarkomlar, hematopoietik kökenli lösemiler, lenfoid kökenli lenfomalar, santral ve periferal sinir sistemi hücreleri kökenli nöroektodermal tümörler olarak gruplandırılmaktadır (9, 10).

Yapılan çalışmalar kanserin ana sebebinin DNA'da meydana gelen çoklu genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesi olduğunu ve bu değişikliklerin kanser hücrelerinin sağkalımına sebep olduğunu göstermiştir (11).

2.1.1. Kanserin Karakteristik Özellikleri

Kanser hücreleri, bazı karakteristik özelliklere sahiptir. Bu özellikler Hanahan ve Weinberg tarafından tanımlanmıştır (12). Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünü yöneten sekiz ortak özelliği Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bu özellikler;

1. Bölünmeyi sürdürme,
2. Büyümelerini durdurabilecek inhibitör sinyallere direnç gösterme,
3. Programlanmış hücre ölümlerine karşı koyma,
4. Tümörlere besin sağlamak için kan damarlarının oluşumunu teşvik etme (Anjiyogenez),
5. Sınırsız çoğalma,
6. İnvazyon ve metastaz,
7. Anormal metabolik yollar,
8. İmmün sistemi işgal etme. (13).



Şekil 2.1. Kanserin karakteristik özellikleri (14).

Tümör oluşumu sırasında hücrede; hücreye glukoz alımında ve glukozun aerobik glikoliz ile kullanımında artış, oksidatif fosforilasyonda azalma, hipoksik alanların artışı ve asidoz gibi metabolik değişimler meydana gelir (9).

Kanser hücreleri, normal hücrelere göre daha fazla proliferasyon ve sağkalım kabiliyetine sahiptir. Kanser hücreleri, proliferasyon için besin maddelerine ihtiyaç duyar. Bu nedenle, glukoz, lipidler, amino asitler ve diğer ara ürünlerin alımı ile ilgili işlemler hızla büyüyen tümörlerde artış gösterirler (15).

2.1.2. Renal Hücreli Karsinom (RCC)

RCC, renal tübüler epitel hücrelerinden kaynaklanan ve tüm birincil renal neoplazilerin % 85'ini kapsayan kanser türüdür (16). RCC, böbrek kanseri olan hastaların yaklaşık % 90'ında tespit edilir ve ürogenital kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahip olan bir kanserdir (17). Her yıl dünya çapında yaklaşık 270.000

yeni RCC vakası ve 116.000 RCC'ye bağlı ölüm rapor edilmektedir. RCC görülme sıklığı dünyanın farklı yerlerinde büyük farklılıklar gösterir. En yüksek insidans Kuzey Amerika ve Çek Cumhuriyeti'nde görülmektedir. Yaş, ırk ve cinsiyet gibi faktörlerde bu hastalıkta rol oynar. RCC, 60 yaşın üzerindeki erkeklerde daha yaygındır ve en yüksek insidans, 60-80 yaş aralığındadır.(16, 18).

RCC'nin erken klinik belirtileri çeşitlidir. RCC'li bireylerin sadece % 10'u hematüri, ağrı ve palpe edilebilir abdominal kitle bulguları gösterirler. Bu bireyler çoğunlukla ilerlemiş hastalığa sahiptir. RCC'li bireylerin % 40'ından fazlası bu üç semptomun hiçbirini göstermez. Genitoüriner bir malignite barındırdığından şüphelenilmeyen hastalarda RCC'nin % 60'ı fazlası tesadüfen tespit edilir. RCC'ye yatkınlık oluşturan kalıtsal sendromlara sahip bireyler ve uzun süreli diyaliz hastaları, RCC gelişimi açısından yüksek risk altındadır. Sigara kullanımı, obezite ve hipertansiyon RCC için önemli risk faktörleridir (19).

Kalıtsal RCC'lerin büyük çoğunluğunda, von Hippel Lindau (VHL) genetik değişikliği söz konusudur. VHL geninde meydana gelen mutasyon, heterozigotluk kaybı ve promotor bölgesinin metilasyonu renal hücre kanseri patogenezi için önemlidir. Ayrıca, hastaların prognozunun kötüleşmesine sebep olan başka genetik değişikliklerde meydana gelebilir. Bazı RCC'ler mTOR yolağındaki mutasyonlarla karakterize edilir ve bu kanserler metabolik RCC'ler olarak tanımlanırlar.

RCC'de metastatik vakalar cerrahiyi takiben biyolojik ilaçlar veya kemoterapi ile tedavi edilir. Son yıllarda, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapinin ileri RCC'ye karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Anjiyogenez ve mTOR yollarını hedefleyen seçilmiş tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler), RCC hastaların sağkalımını önemli ölçüde iyileştirmiştir. Bununla birlikte, güvenilir biyobelirteçlerin kısıtlılığı, hangi ilaç tedavisinin hastalar için en yüksek yararı sağlayacağını tahmin etmeyi zorlaştırmaktadır. Ayrıca, RCC'lerin büyük bir kısmı tedaviye direnç geliştirir. RCC'nin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında yeterli bilgi henüz mevcut değildir. Bu nedenle, hastalığın tüm evrelerinde biyobelirteçlerin ve tedavinin izlenmesine yönelik yeni araçların keşfedilmesi zorunludur (20, 21).

Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (UICC), RCC'nin evrelendirmesi için TNM evreleme sistemini kullanmaktadır. TNM evreleme sistemi, primer tümörün (T)

lokal genişlemesini, bölgesel lenf düğümlerinin (N) tutulumunu ve uzak metastazların (M) varlığını gösterir (Tablo 2.1) (19, 22).

Tablo 2.1. Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (UICC), Renal Kanserde TNM evreleme sistemi (22).

IUCC Renal Kanser TNM Evrelendirmesi			
T-Primer Tümör			
TX	Primer tümör değerlendirilemez		
T0	Primer tümör için kanıt yoktur		
T1	Tümör boyutu 7 cm veya daha küçük, böbrekle sınırlı		
	T1a Tümör 4 cm veya daha küçük		
	T1b Tümör 4 cm'den büyük 7 cm'den küçük		
T2	Tümör boyutu 7 cm'den daha büyük, böbrekle sınırlı		
	T2a Tümör 7-10 cm arasında		
	T2b Tümör boyutu 10 cm'den daha büyük, böbrekle sınırlı		
T3	Tümör ana damarlara veya periferik dokulara uzanır, ancak ipsilateral adrenal bezin içine veya Gerota fasiyanın ötesine geçmez		
	T3a Tümör renal venlere veya segmental dallarına uzanır. Pelvikaliseal sistemi istila eder ancak Gerota fasyasının ötesine geçmez		
	T3b Tümör diyaframın altında vena kavaya uzanır		
	T3c Tümör, diyaframın üzerinden vena kavaya uzanır veya vena cava duvarını işgal eder		
T4	Tümör Gerota fasyasının ötesine yayılır		
N-Bölgesel Lenf Nodları			
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez		
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur		
N1	Bölgesel lenf nodlarında metastaz vardır		
M-Uzak Metastaz			
M0	Uzak metastaz yoktur		
M1	Uzak metastaz vardır		
pTNM Patolojik Sınıflandırması			
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2	N0	M0
Evre III	T3	N0	M0
	T1,T2,T3	N1	M0
Evre IV	T4	N0,N1	M0
	T1,T2,T3,T4	N0,N1	M1

Ayrıca RCC'lerde nükleus yapılarının temel alındığı Furhman evreleme sistemi de sınıflandırma için kullanılmaktadır. Fuhrman evreleme sisteminde çekirdek görünürlüğü ve büyüklüğü ışık mikroskobu altında değerlendirilir. Bu evreleme sistemine göre RCC, dört sınıfa ayrılabilir. Evrenin artması kötü prognozla ilişkilidir (23) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Renal kanserde fuhrman evreleme sistemi (24).

Fuhrman Derecesi	Nükleer Morfoloji ve Boyut	Nükleus Morfolojisi
I	Yuvarlak ve tek tip, normal nükleer membranlı yaklaşık 10 µm boyutunda	Yok
II	15 µm boyutlu, hemen hemen düzensiz nükleer membranlı	Belirgin değil
III	20 µm boyutlu, düzensiz nükleer membranlı	Belirli
IV	20 µm boyutlu düzensiz nükleer membranlı,pleomorfik, kümelenmiş kromatinli	Çok belirgin

RCC'lerin histolojik sınıflandırması, son derece önemlidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2016) ve Union Internationale Contre le Cancer (UICC, 2017) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre, RCC 16 alt tipte sınıflandırılmıştır (Tablo 2.3). Bu sınıflandırma tümör histolojisine, kromozomal değişikliklere ve moleküler yolaklara göre yapılmıştır. RCC'nin en yaygın üç alt tipi;

i) vakaların yaklaşık % 75'ini oluşturan berrak hücreli RCC (ccRCC),

ii) vakaların yaklaşık % 10'unu temsil eden papiller RCC (pRCC) ve

iii) vakaların yaklaşık % 5'ini temsil eden kromofob RCC'dir (chRCC) (20,22)

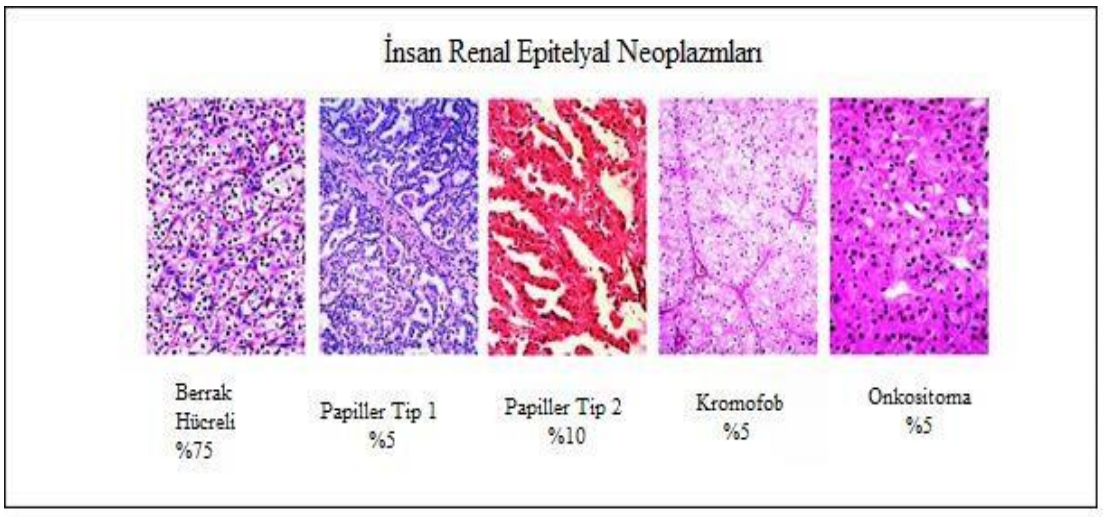
Tablo 2.3. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) renal kanser alt tipleri (22).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Renal Kanserlerin Sınıflandırılması (2016)
❖ Berrak Hücreli Renal Karsinom ❖ Düşük Malignant Potansiyelli Multiköler Kistik Renal Neoplasm ❖ Papiller Renal Hücre Karsinomu ❖ Herediter Leimyoma ve Renal Hücre Karsinomu İlişkili Renal Hücre Karsinomu ❖ Kromofob Renal Hücre Karsinomu ❖ Toplama Kanalı Karsinomu ❖ Renal Medüller Karsinoma ❖ MIT (Mikrofitalmi İşkili Transkripsiyon Faktörü)Ailesi Translokasyonlu Renal Hücreli Karsinom ❖ Süksinat Dehidrogenaz Eksikliği Olan Renal Hücreli Karsinom ❖ Müsinöz Tübüler İğsi Hücreli Karsinomlar ❖ Tübülokistik Renal Hücre Karsinomu ❖ Kazanılmış Kistik Hastalıkla İlişkili Renal Hücreli Karsinom ❖ Berrak Hücreli Papiller Renal Karsinom ❖ Sınıflandırılmamış Renal Hücre Karsinomu ❖ Papiller Adenoma ❖ Onkositoma

Papiller Karsinom (pRCC): Vakaların yaklaşık % 10'unu temsil eden ikinci en yaygın histolojik RCC alt tipidir. Sporadik olarak veya ailesel olarak ortaya çıkabilir. Histolojik bulgular iğ şeklinde düzenlenmiş hücreleri özellikle de büyük lezyonlarda olası iç kanama alanları ve kistik değişiklikleri içerir. Tip 1 ve Tip 2 olarak adlandırılan 2 farklı alt türe ayrılır. Lokalize papiller böbrek kanseri genellikle ameliyatla tedavi edilir. Papiller böbrek kanseri metastaz yaparsa, genellikle kan damarı bloke edici ajanlarla tedavi edilir. Hücreler mikroskopta, fibröz çekirdeğe sahip tek bir kübik hücre tabakasıyla kaplı karmaşık tübüller ve papiller yapılar şeklinde görülür (Şekil 2.2.) (25, 26).

Kromofob RCC: Kromofob RCC, tüm kötü huylu renal epitel tümörlerinin yaklaşık % 5'ini temsil eder. Bu alt tip, ccRCC'den daha az agresiftir ve RCC'ler arasında en iyi prognozu taşır. Metastaz, vakaların sadece % 7'sinde görülür. Mikroskopide, bu tümör retiküle sitoplazmalı ve perinükleer halelerle büyük soluk hücreler sunar (Şekil 2.2) (25).

Berrak Hücreli Renal Karsinom (ccRCC): Renal Karsinomların en yaygın görülen tipidir. Berrak hücreli RCC, proksimal kıvrımlı tübül epitelinden (renal korteks) kaynaklanır ve ağırlıklı olarak genişleyen bir büyüme paterni sunar (Şekil 2.2) (25).



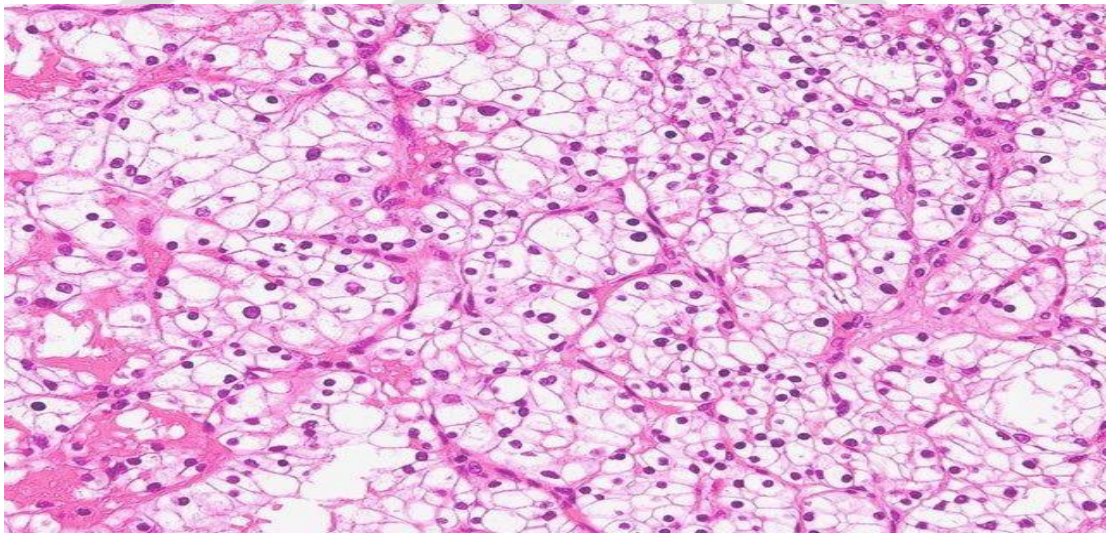
Şekil 2.2. Renal kanser histolojik alt tipleri (27).

2.1.2.1. Berrak Hücreli Renal Karsinom (ccRCC)

Tüm RCC'lerin % 70-75'ini temsil eden en yaygın varyanttır. Berrak hücreli karsinomların çoğu (% 95) sporadiktir ve kalan % 5, kalıtsal sendromlarla (VHL hastalığı, tüberoskleroz) ilişkilidir. ccRCC yetişkinlerde çocuklardan daha yaygındır. Çocukluk ve genç erişkin böbrek kanseri vakalarının % 2-6'sını oluşturur (25, 28).

Makroskopik olarak, değişken derecelerde iç nekroz, kanama ve kistik dejenerasyon ile katı, sarımsı bir lezyondur. Bu tür bulgular en sık büyük hacimli, hızlı büyüyen tümörlerde görülür. Tümör kalsifikasyonları da bulunabilir (25).

Mikroskopik olarak bu tür lezyonlar, lipid ve glikojen bakımından zengin sitoplazmik içeriklerinden dolayı berrak hücreler sunar. Görüntüleme bulguları, nekroz, kanama, kist ve kalsifikasyonlara bağlı hipervaskülarize ve heterojen lezyonları tanımlayan bu tür histopatolojik özelliklerle uyumludur (Şekil 2.3). Nekroz, genellikle 4 cm'den büyük lezyonlarda daha yaygındır. Nekrozun ortaya çıkma oranı ve derecesi de yüksek dereceli tümör histolojisi ile ilişkilendirilmiştir (25).



Şekil 2.3. Tipik alveolar, solid ve mikrokistik model gösteren berrak hücreli böbrek hücreli karsinom. (H&E, × 200) (29).

Genel olarak, ccRCC'ler sporadik tümörlerdir, ancak VHL hastalığı olan hastalarda da sendromiktir. ccRCC, delesyonlar veya dengesiz translokasyonlar nedeniyle kromozom 3'ün kısa kolunun kaybı ile karakterize edilir (30).

ccRCC'li hastalarda semptomlar; idrarda kan, ağrı, kilo kaybı, yorgunluk hissi, ateş ve kitle oluşumudur. Hastalar bazen belirgin semptomları göstermezler. Semptomları olmayan kişilerin tümörleri; X-Ray, BT veya MRI gibi görüntüleme testleri ile görüntülenebilir (31).

ccRCC'li kişiler için tedavi seçenekleri, cerrahi tedavi ve immünoterapidir. Uygulanacak tedavi, tümörün büyüklüğüne bağlı olarak değişim gösterir.

Cerrahi Tedavi: Erken evre ccRCC'de, böbreğin bir kısmı çıkarılır. ccRCC böbreğin ortasındaysa veya tümör büyükse, bazen böbreğin tamamı çıkarılmalıdır. Hastalığın ileri evrelerinde böbreğin çıkarılması bazı hastalarda uygun olabilir (31).

İmmünoterapi: İmmünoterapi, vücudun bağışıklık sisteminin kanser hücreleriyle savaşmasına yardımcı olur. İnterferon-α (IFN-α) ve interlökin-2 (IL-2) kullanan immünoterapiler RCC'de umut verici anti-tümör aktivite gösterir. RCC, immünojenik bir tümör olarak sınıflandırılır. İmmünojenisitesine rağmen, RCC hücrelerini etkin bir şekilde ortadan kaldırabilen yalnızca birkaç CD8+ sitotoksik-T-lenfosit (CTL) izole edilmiştir. Bu, şimdiye kadar tanımlanmış olan RCC ile ilişkili az sayıdaki antijen ile uyumludur ve bu nedenle, bu hastalardaki aday aşıların denemelerini sınırlandırmaktadır. Dendritik hücre kullanılan tümör immünoterapisinin RCC'de kötü huylu tümörler için terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca löseminin tedavisi için geliştirilen miyeloablatif olmayan kök hücre nakli, RCC'ye karşı etkilidir (31).

Hedefli Terapi: Hedefe yönelik terapide, kanser hücrelerinin büyümeleri, bölünmeleri ve metastazına yardımcı olan etmenler hedeflenir. Tirozin kinaz inhibitörleri Sunitinib ve Pazopanib, vasküler endoltelyal büyüme faktörünü (VEGFR) inhibe ederek etki ettikleri için metastatik ccRCC'de kullanılmaktadır. mTOR inhibitörleri olan Rapamisin Everolimus ve Temsirolimus metastatik ccRCC için onaylanmıştır (32).

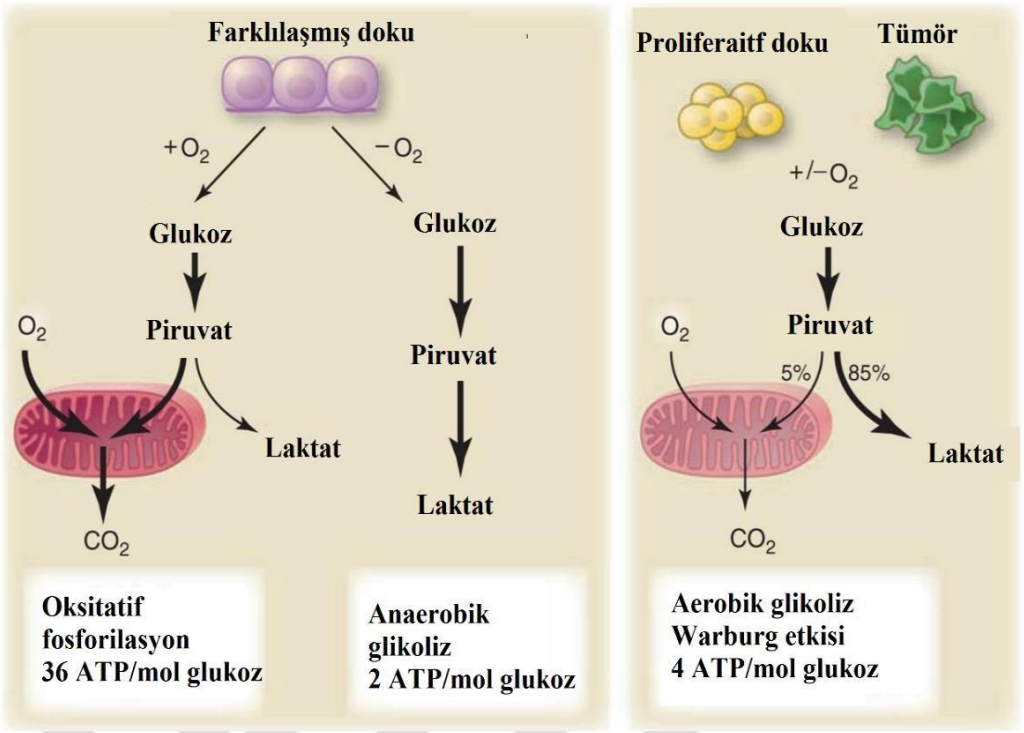
Ayrıca, ccRCC'de böbrek rezeksiyonunu içermeyen başka tedavi yöntemleri de kullanılabilir. Radyasyon tedavisi,termal ablasyon, tümör hücrelerini dondurmak ve öldürmek için sıvı nitrojen kullanan kriyocerrahi bu yöntemlere örnek olarak verilebilir (28).

2.2. Warburg Etkisi ve Hipoksi

2.2.1. Warburg Etkisi

Hücreler, hücresel aktivitelerini yerine getirebilmek için enerjiye, bu enerjiyi üretmek için ise besine ihtiyaç duyarlar. Kanser hücreleri oldukça aktif oldukları için normalden daha fazla besin kaynağına ihtiyaç duyarlar. Kanser hücrelerinin "özel" bir metabolizmaları vardır (11).

Sağlıklı hücrelerde, hücreye alınan glukoz, sitozolde piruvata kadar yıkılır ardından sitrik asit döngüsüne girer. Kanser hücrelerinde ise, durum daha farklıdır çünkü bu hücrelerin içinde bulunduğu hipoksik koşullarda, laktat dehidrogenaz ile piruvatın laktata dönüşümü katalize edilir. Fosfoinozitid bağımlı kinaz-1'in (PDK1) piruvat dehidrogenazı inhibe etmesi sonucu piruvatın mitokondriye taşınması gerçekleşmez. Kanser hücreleri glukoz taşıyıcılarının (GLUT) ifadelerini ve hücre içine glukoz alımını arttırarak sağkalımlarını sürdürürler. Glukoz hücreye 100 kat daha fazla alınıp hızlı şekilde tüketilir. Tüketilen glukozun az bir kısmı oksidatif fosforilasyon ile ATP'ye çevrilir. Büyük kısmı laktata dönüşüp hücrenin protein, nükleik asit ve lipit sentezi için kullanılır. Bu durum Warburg etkisi olarak adlandırılır (Şekil 2.4) (9). Warburg etkisi ile hücre bölünmesi ve lokal basınç artar. Bu artan basınç, metastatik yayılımda kritik bir rol oynar. Laktik asit oluşumu hücre dışı asidite ve immün sistemin aktivasyonuna katkıda bulunur (33). Sonuç olarak asidifikasyon hücre göçünü destekler ve matriks degredasyonunu sağlayan proteazların aktivasyonuna yol açar (34).



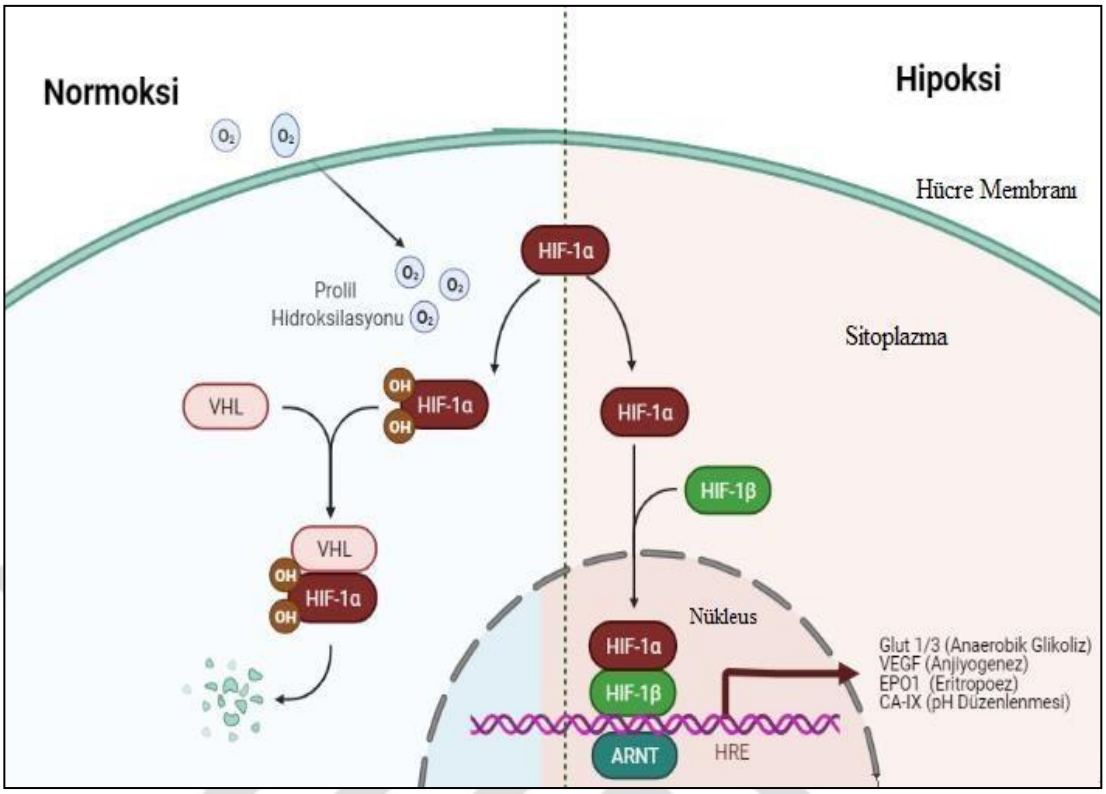
Şekil 2.4. Warburg Etkisi. Oksijen varlığında hücreler önce glikoliz yoluyla glukozu piruvata metabolize eder ve daha sonra oksidatif fosforilasyon ile piruvatı CO_2'ye oksitler. Oksijen sınırlayıcı olduğunda ise hücreler glikoliz tarafından üretilen piruvatı, laktata dönütürür ve oksidatif fosforilasyondan uzaklaşır (anaerobik glikoliz). Warburg etkisinde ise kanser hücreleri oksijenin mevcut olup olmadığına bakmaksızın glukozu laktata dönüştürme eğilimindedirler (aerobik glikoliz) (35).

2.2.2. Hipoksi

Hipoksi metabolizmadaki moleküler makinenin bir parçası olup kanserin ilerlemesine ve metastazına katkıda bulunan bir faktör olarak tanımlanmıştır (36).

Hipoksinin hücrede meydana getirdiği degişiklikler, hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) ile moleküler düzeyde belirlenir. HIF'ler (1 ve 2) oksijene bağımlı α alt birimleri ile çalışırlar. Bu alt birimler oksijen gerektiren prolil hidroksilazlar ile modifiye edilmişlerdir ve normoksik koşullar altında Von Hippel Lindau (pVHL) tümör baskılayıcı protein tarafından proteazomda degradasyona uğrarlar. Ancak hipoksik ortamda degredasyona uğramazlar ve aktive edilirler. ß alt birimi ile dimerizasyonun ardından, HIF transkripsiyon faktörleri, çok sayıda genin düzenleyici bölgelerinde hipoksi-cevap elementlerine bağlanır, transkripsiyonunu aktive eder (10).

.



Şekil 2.5. HIF-1α transkripsiyon faktörünün, hipoksik tümörlerde aerobik glikoliz, anjiyogenez, eritropoez ve pH düzenlemesinde rol alan proteinlerin aşırı ekspresyonunu düzenlediği mekanizma. (37).

Tümör hipoksisi sınırlı miktarda düşük oksijen basıncına ($p0_2$) (<10 mm Hg O_2) sahip tümör alanları olarak tanımlanabilir. Tümörlerin hipoksiye cevabı iki yönlü bir mekanizmadır:

1. Perfüzyonun arttırılması; böylece hipoksinin azaltılması için yeni kan damarları oluşturulur.

2. Tümör metabolizmasının hücre ölümüne direnç göstermesi ve proliferasyonu sürdürmesi.

HIF hedefleri, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve VEGF reseptörleri gibi anjiyogenez ile ilgili bileşenleri kodlayan genleri, heksokinaz 2, laktat dehidrogenaz gibi glikolitik yolak enzimlerinin genlerini, glukoz taşıyıcıları (GLUT-1, GLUT-3) ve karbonik Anhidraz IX (CA-IX) gibi genleri içerir (Şekil 2.5). HIF aracılı hipoksiye cevap, eritropoezi, vasküler yeniden şekillenme ve plastisiteyi, hücre

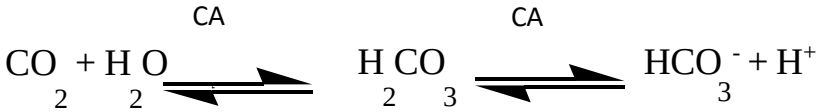
çoğalmasını düzenleyen genleri, hücre yapışmasını, hücre matriks metabolizmasını, pH regülasyonunu vb. içeren genleri koordineli ve geçici olarak düzenler.

Hipoksi, kanserin ilerlemesi, metastaz ve kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapiye direnç ile açıkça ilişkilendirilmiştir (10).

Hipoksi ve asidoz birçok tümörün belirgin özellikleridir ve normal hücrelere göre tamamen farklı bir metabolizmaya yol açar. Kanser gelişiminde önemli iki CA izoformu olan CA-IX ve CA-XII, tümörlerde bulunur. Bu izoformların inhibisyonu, primer tümörlerin metastazlarının bozulmasına neden olur ve kanser kök hücrelerinin popülasyonunu azaltır (37).

2.3. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbondioksit (CO_2), metabolik oksidatif süreçte üretilir ve hızlı bir şekilde çözünen ürünlere dönüştürülür (38). Karbonik anhidraz'lar (CA, EC 4.2.1.1), karbondioksit'in (CO_2) bikarbonat (HCO_3^-) ve protona (H^+) geri dönüşümlü reaksiyonunu katalize eden çinko (Zn^{+2}) içeren metalloenzimlerdir (Şekil 2.6) (39).



Şekil 2.6. CA'nın katalizlediği reaksiyon.

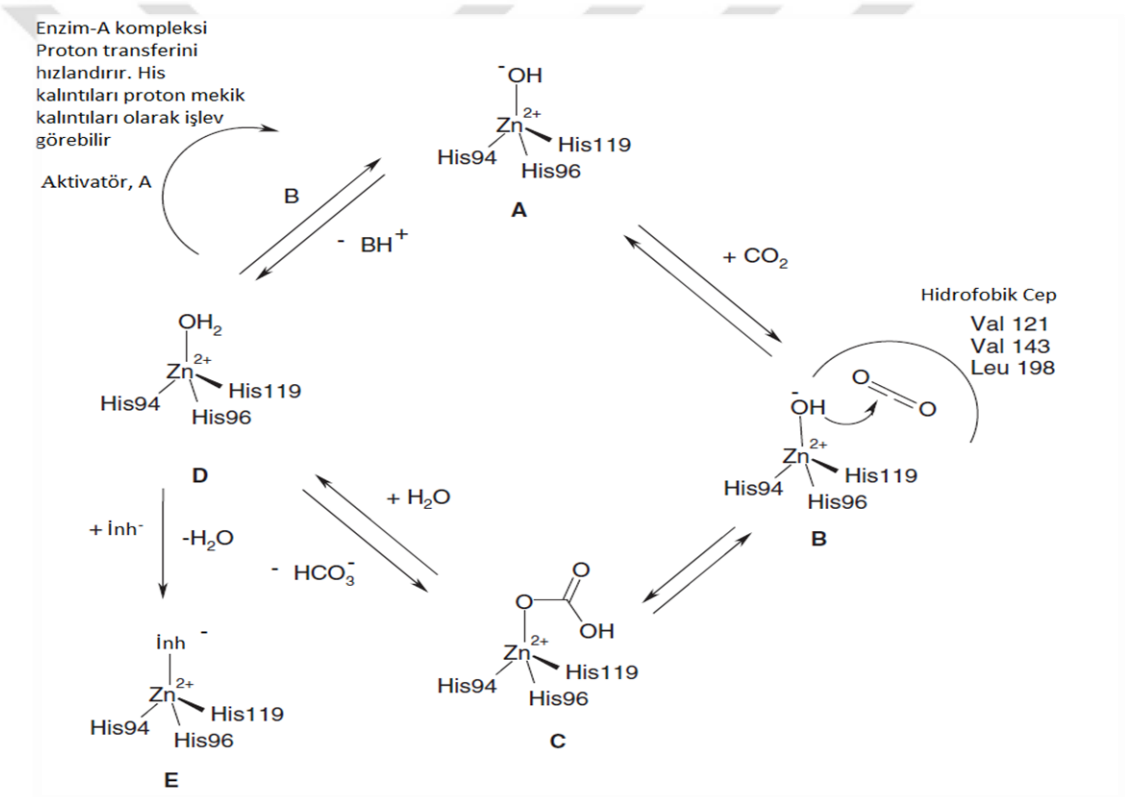
CA'lar; pH regülasyonu, elektrolit salgılanması lipogenez, glukoneogenez ve üreojenez gibi çeşitli metabolik yollarda önemli fizyolojik etkilere sahiptir (40).

2.3.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı ve Mekanizması

CA'lar, aktif bölgeye bağlı bir metal iyonuyla katalitik olarak etki gösteren metalloenzimlerdir (41). Aktif bölgesi, 15 Å derinliğinde bir katalitik yarık ile konik biçimdedir. CA'nın aktif bölgesi, hidrofobik ve hidrofilik kısımlara sahiptir. Hidrofobik kısmı, substratı ve ürün girişini/çıkışını destekleyecek şekilde

konumlanırken; hidrofilik kısmı, verimli proton transferini sağlamaktadır. Aktif merkez, metali koordine eden bir su molekülü / hidroksit (OH^-) iyonu yanında, ligand olarak üç histidin rezidüsü (His94, His96, His119) içerir. CA aktif bölgesinde Zn^{+2} bulunur (41, 42).

CA'nın substratı olan CO_2, Zn^{+2} iyonunun yakınındaki hidrofobik bir cepte bulunur. CO_2, Zn^{+2} tarafından yönlendirilen hidroksit türlerinin nükleofilik saldırısı HCO_3^- haline dönüştürülür. HCO_3^-'ın, Zn^{+2}'ya bağlanması oldukça kararsız olduğu için bikarbonat çözeltide serbest bir su (H_2O) molekülüyle reaksiyona girer. Daha sonra, Zn^{+2} koordineli sudan tampona bir proton transferi gerçekleşir (Şekil 2.7)(41).



Şekil 2.7. α-CA'ların katalitik, inhibisyon ve aktivasyon mekanizması (41).

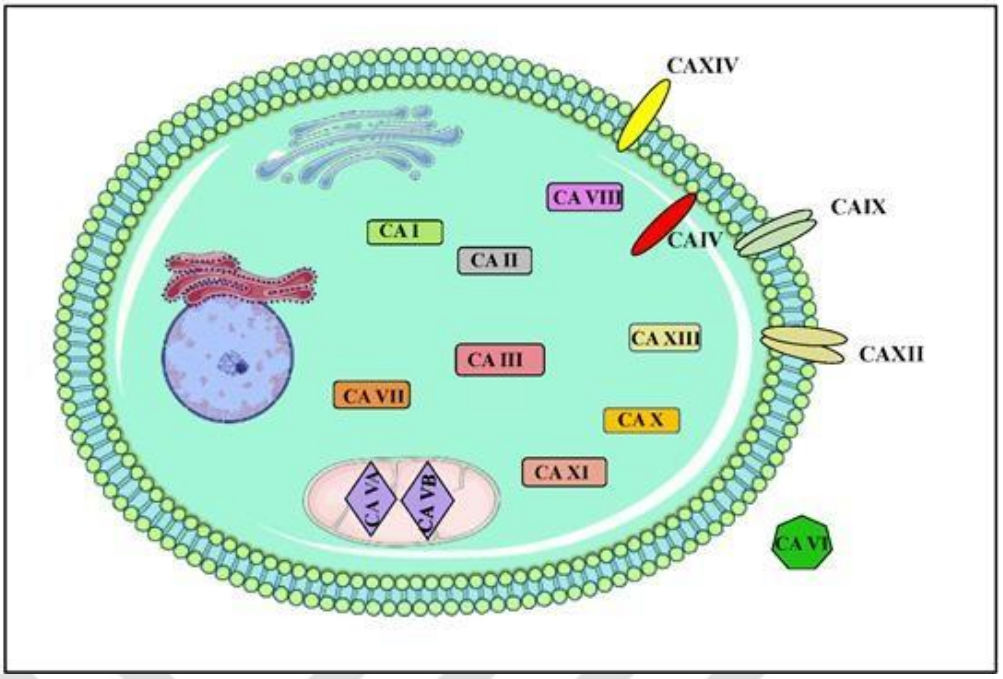
2.3.2. Karbonik Anhidraz Enzim Ailesi ve Fizyolojik Önemi

CA'lar, birçok organizmada pH ve CO_2 homoeostazı ile ilgili kritik fizyolojik işlemlerde rol oynar. Glukoneogenez, lipogenez, üreojenez gibi biyosentetik reaksiyonlar, CO_2/HCO_3^- respirasyon ve taşınımı, çeşitli dokularda ve organlarda elektrolit salgılanması, kemik erimesi, kalsifikasyon ve diğer birçok fizyolojik veya patolojik süreçlerde görev yaparlar (41).

Bugüne kadar bilinen CA enzimatik aileleri, alfa (α-), beta (β-), gama (γ-), delta (δ-) zeta (ζ-), eta (η-), teta (θ-) ve iota (ι-) CA'lardır (43).

α-CA'lar omurgalılarda, protozoalarda, alglerde, yeşil bitkilerin sitoplazmasında ve birçok Gram negatif bakteride bulunur. β -CA'lar hem Gram negatif hem de pozitif bakterilerde, mono ve di-kotiledonların kloroplastlarında ve ayrıca birçok mantar ve bazı Arkelerde bulunur. γ -CA'lar Archaea'da, siyanobakterilerde ve çoğu bakteri türünde bulunur. δ- ve ζ-CA'lar sadece deniz diatomlarında bulunurken, η-CA'lar protozoalarda mevcuttur (41).

İnsanlarda eksprese edilen toplam 16 adet α-CA izoformu vardır. Bunların 12'si katalitik olarak aktif izoformlardır. Bu izoformlar hücresel dağılım, fizyoloji ve fonksiyon bakımından farklılık gösterir. 16 izoformun 8'i sitoplazmada (CA I, II, III, VII, VIII, X, XI ve XIII), 2'si mitokondride (CA VA ve VB), 4'ü membrana bağlıdır (CA IV, IX, XII ve XIV). 1'i ise salgılanır (CA VI) (Şekil 2.8) (44, 45).



Şekil 2.8. CA'ların metabolizmadaki yerleşimi. (42).

Bu CA izoformlarından CA-IX ve CA-XII, kanser ilerlemesi ve metastaz sürecinde yer alan izoenzimler olup kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. CA-IX ve CA-XII, glukozun oksidatif fosforilasyonunun bozulduğu hipoksik tümörler içindeki pH düzenlemesi ve metabolik işlemlere katılır (40).

CA-XII, transmembran bir izoenzim olup Tureci ve arkadaşları bu izoenzimi otolog antikorlarla serolojik ekspresyon taraması yaparak insan böbrek hücreli karsinomunda tanımlamışlardır (10). CA-XII ekspresyonu, renal hücreli karsinomlarda, kolorektal, meme, mesane glioblastomlarında ve baş boyun kanserlerinde gözlenmiştir (46). Yapılan araştırmalar, CA-XII'nin kemodirençliliğe dahil olduğunu, tümör hücresi invazyonunu ve metastazını desteklediğini göstermiştir (36).

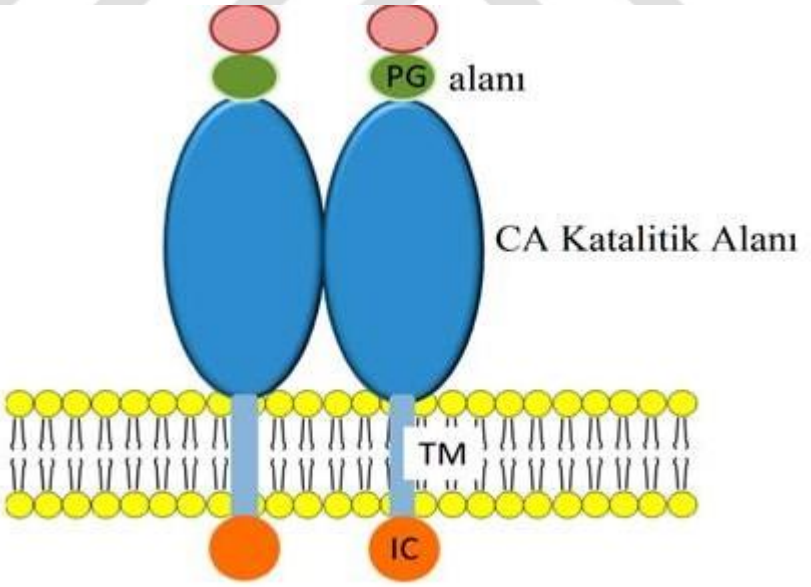
Literatürde CA-IX, CA-XII'ye kıyasla daha fazla dikkat çekmiştir. Bu, durum CA-IX'un kanser için daha uygun bir hedef olduğunu göstermektedir (46, 47).

2.3.3. Karbonik Anhidraz IX (CA-IX)

CA-IX, plazma membranını kapsayan 459 amino asitlik 58/54 kDa bir proteindir. CA ailesinin önemli bir üyesi olan CA-IX ilk önce HeLa hücrelerinin antijeni olarak tanımlanmıştır. CA-IX proteini, 9p12-13 kromozomal lokusu üzerine yerleştirilmiş CA9 geninden üretilir (47, 48)

CA-IX, tümörogenez ile ilişkili olan bir CA izoenzimidir. CA-IX ekspresyonu, HIF-1 yoluyla indüklenir. Bu nedenle, CA-IX, hipoksinin belirteci ve prognostik bir göstergesi olarak görev yapabilir. CA-IX ekspresyonu, uterus, serviks, böbrek, özofagus, akciğer, meme, kolon, beyin karsinomlarında görülmektedir (39).

CA-IX, N-terminal proteoglikan benzeri (PG) alan, hücre dışı bir CA katalitik alan, transmembran segment (TM) ve intrasitoplazmatik kuyruğa (IC) sahiptir (36) (Şekil 2.9).



Şekil. 2.9. CA-IX izoenziminin yapısı (49).

Hücre modelleri ile yapılan çalışmalar, CA-IX'un pH düzenleyici işlevi olduğunu hipoksik koşullarda ve kanser hücrelerinin sağkalım için gerekli olan hafif alkali hücre içi pH'sının korunmasına yardımcı olduğunu göstermiştir (50).

CA-IX'un proteoglikan bölgesi, kanserin intravazasyon ve ekstravazasyon aşamalarında kanser hücrelerinin damar lümenine girmesine yardımcı olur. Ayrıca, CA-IX katalitik aktivitesinin neden olduğu hücre dışı asidoz, vasküler hücreler arasındaki hücre-hücre bağlantılarının kopmasına neden olur böylece tümör hücrelerinin damar duvarı boyunca geçişi kolaylaşır.

CA-IX ekspresyonu, hipoksi ile indüklenir. Bu durum, kanser hücresinin hayatta kalmasına ve çoğalmasına izin verir. Büyüyen tümörde CA-IX, kanser hücrelerini hipoksiden ve hücre içi asitleşmeden korur. Hücre dışı asidozu artırarak, anjiyojenez, ekstrasellüler matriks (ECM) degradasyonu, epitelyal-mezenkimal dönüşüm, invazivlik, tümör-stroma çapraz iletişimi ve sinyalizasyona katkıda bulunur. Metastazın başlangıcı CA-IX aracılı pH regülasyonu ile düzenlenir. Metastazın yayılması, hücrelerin hipoksi ve asidozdan korunmasında CA- IX rol oynar. CA-IX tüm bu rollerinden dolayı kanserde önemli bir hedeftir (50).

CA-IX, bugüne kadar böbrek kanserinde tanımlanan en önemli moleküler belirteçlerden biridir. CA-IX, RCC'de yüksek oranda olarak eksprese edilir.

CA-IX'un kanser hücrelerinde birçok sinyal yolu ve mekanizma ile etkileşime girebildiği gösterilmiştir. (51). Renal karsinom hücrelerinde, CA-IX'un hücre içi kuyruğunda bulunan tirozin kalıntısının epidermal büyüme faktörüne (EGF) bağlı bir şekilde fosforillenebileceği gösterilmiştir. Fosforlanmış CA-IX, PI3K'nın düzenleyici alt birimi ile etkileşime girebilir ve Akt aktivasyonuna katkıda bulunabilir (10). CA-IX' un sinyal iletim aktivitesi, 449 pozisyonundaki tirozin (Tyr449) kalıntısı fosforile edildiğinde aktive edilir. Bu rezidü PI3K/ Akt kinaz yolağının sinyal iletimi ile ilgilidir. Ayrıca EGF ile indüklenen fosforilasyon, Akt kinazı aktive etmek için CA IX ve PI3K arasındaki çapraz iletişime aracılık eder (36, 46).

2.3.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

CA enzim ailesinin literatüre en büyük katkısı bu enzimin inhibitörlerinin ve aktivatörlerinin biyomedikal uygulamalardaki öneminden kaynaklanır. CA inhibitörleri, *in vivo* görüntüleme ajanları, intratümoral pH modülatörleri ve fizyolojik streslere maruz kalan tümör hücrelerinin proliferasyonunu engelleyen ilaçlar olarak

araştırılmışlardır. (10). Son 10 yılda literatürdeki araştırmalar ile CA inhibitörlerinin diüretikler, antiglokom, antikonvülsan, antiobezite ve antikanser ajanları olarak değerlendirilmesi bu enzim ailesinin inhibisyon çalışmalarını son derece önemli kılmıştır (38).

CA aktivitesi, sülfonamidler ve bunların türevleri tarafından etkili bir şekilde inhibe edilebilir. CA izoformların, en yaygın kullanılan CA inhibitörleri sınıfı olan sülfonamidler ile inhibe edilmesi, önemli fizyolojik sonuçlara neden olur (38).

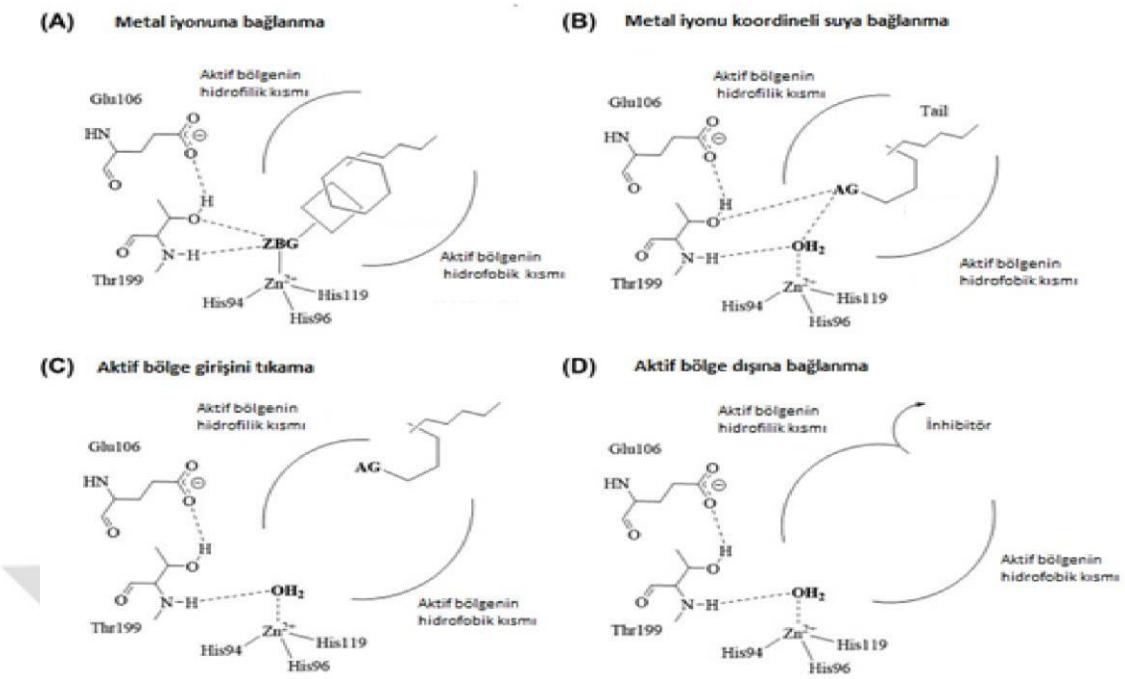
CA enzim inhibisyonu, Zn^{+2} iyonuna tetrahedral geometride bağlanan veya trigonal bipiramidal geometriler oluşturan inhibitörlerle gerçekleştirilir. Ancak, son on yılda çok sayıda yeni CA inhibisyon mekanizmaları bildirilmiş ve çinko bağlayıcıların dışında keşfedilen yeni inhibitör sınıfları belirlenmiştir.

Klasik CA enzim inhibitörleri olan sülfonamidler ve sülfonamidlerin izoesterleri (sülfamatlar, sülfamitler),enzim aktif bölgesindeki hidrofobik/hidrofilik gruplar ile etkileşime girebilen bir yapıyı ve CA enzim ailesinin en değişken bölgesi olan aktif bölge boşluğunun çıkışına doğru bağlanan kuyrukları içerir (Şekil 2.10).

Metal iyonuna bağlanan diğer inhibitör sınıfları karboksilatları; hidroksamatlar; ditiyokarbamatlar ve izoesterlerini kapsar (Şekil 2.10).

Metal iyonuna bağlanma dışında, OH^{-} bağlanan ikinci bir CA inhibisyon mekanizması mevcuttur. Bu inhibitörler, metal iyonuyla koordine edilmiş hidrojen bağlı güçlü nükleofil karakterde bir bağlayıcı grup içerir. Fenol, söz konusu bu mekanizmanın X-ışını kristalografisi ile belgelendiği ilk inhibitördür. Diğer inhibitörler ise poliaminler, esterler ve sülfokumarinlerdir. Bunların dışında, metal iyonundan daha uzakta konumlandırılmış, aktif bölge boşluğunun girişinde, aktif bölge girişini tıkayan bir inhibisyon mekanizması daha mevcuttur. Bu inhibisyon tipi kumarinler için keşfedilmiştir (Şekil 2.10).

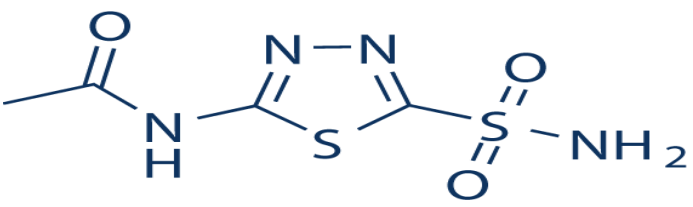
Farklı bir CA inhibisyon mekanizması da X-ışını kristalografisi ile belgelenmiştir. Bu inhibisyon, His64 rezidüsü ile dış konformasyonun bloke edilmesiyle sağlanır ve tüm katalitik aktivitenin çökmesine neden olur (Şekil 2.10) (41).



Şekil 2.10. CA inhibisyon mekanizmaları (41).

2.3.4.1. Asetazolamid (AZA)

Asetazolamid, (5-asetamido-1,3,4-tiadiazol-2 sülfonamid) (AZA), sülfonamidlerin keşfedilen ilk diüretik ajanıdır (Şekil 2.11). 1956 yılından beri klinik olarak kullanılmaktadır.(40). AZA esas olarak glokom hastalığında ortaya çıkan göz içi basıncını düşürmek için kullanılan bir ilaç olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, idrar HCO_3^- atılımını artırıp idrar pH'ını yükseltir. Bu özellikleri nedeniyle; metabolik alkaloz, uyku apnesi, yüksek irtifa eritropoezi gibi hastalık durumları için bazı potansiyel klinik faydalarının olduğu gösterilmiştir (52).



Şekil 2.11. Asetazolamid'in kimyasal yapısı (53).

2.3.5. Kanser/CA-IX İlişkisi ve CA-IX İnhibisyonunun Klinik Önemi

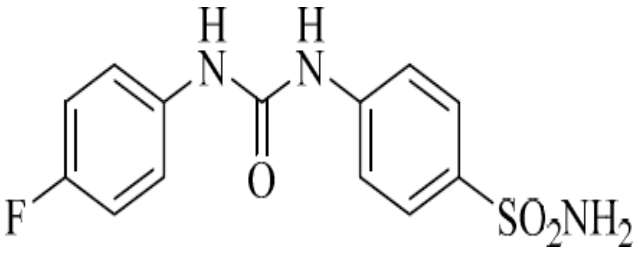
Kanser terapisinde CA inhibitörlerinin uygulamaları için üç potansiyel tanımlandığı bilinmektedir:

1) Tümör hücrelerinin sağkalımını önlemek amacıyla tek başına CA inhibitörleri ile tedavi sağlanması,

2) Kemoterapötiklerin alımlarını ve etkinliklerini arttırmak için kombine tedavi olarak verilmesi,

3) Tümör hücrelerini seçici olarak hedef alan terapötik olarak modifiye edilmiş inhibitörlerle tedavi edilmesidir (10).

CA-IX enziminin kanser tanı ve tedavisi için önemli olduğu verilerle desteklenmiştir. CA-IX, birçok kanser türünde yüksek düzeyde eksprese edilir. Aynı zamanda CA-IX kanser hücrelerinin proliferasyonu ve asidozis üzerinde önemli roller oynamaktadır. Bu durum CA-IX enziminin tümör sağkalımı ile ilişkisini ortaya koyan önemli bir terapötik hedef olduğunun kanıtıdır. Küçük moleküller, CA-IX aktivitesini hedef alan monoklonal antikorlar gibi ajanlar, kanserde terapötik olarak olumlu sonuçlar verir ve yan etkileri en aza indirir. CA-IX'u hedef alan küçük moleküller tasarlamak ve geliştirmek antikanser ilaçların dizaynı için büyük umut vericidir. Ancak tüm bu sonuçlara rağmen CA inhibitörlerinin kullanımı henüz kanser tedavisi için klinik olarak onaylanmamıştır (38 ,42). Literatüre bakıldığında küçük bir molekül olan CA-IX inhibitörü SLC-0111, Faz Ib/II klinik çalışmalarındadır ve metastatik, solid tümör tedavisi için geliştirilmiştir. *İn vivo* çalışmalar, SLC-0111'in CA-IX eksprese eden tümörlerin büyümesini potansiyel olarak inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca, SLC-0111'in paklitaksel, doksorubisin gibi diğer anti-kanser ajanlarla kombinasyon halinde kullanılmasının önemli anti-tümör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (37)(Şekil 2.12).



Şekil 2.12. SLC-0111'in yapısı (37).

Yeni CA-IX inhibitörlerinin, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak klinik öncesi kanser modellerinde kullanıldığında hücre canlılığını, tümör oluşumunu, tümör migrasyonu, invazyonu ve metastatik büyümeyi olumsuz yönde etkilediği bildirilmektedir (38). Bu çalışmalarda CA-IX'un sülfonamidler veya kumarinler ile inhibe edilmesinin, metastazı engellediği ve kanser kök hücre popülasyonunu azalttığı anlaşılmıştır (38, 51).

CA-IX'un bir anti-kanser ajanı olarak hedeflenmesi, CA tabanlı anti-kanser ilaçları geliştirmek için son derece önemlidir. CA-IX için geliştirilen monoklonal antikorlardan bazıları proteoglikan bölgesini hedeflerken, bazıları da spesifik olarak katalitik bölgeyi hedefler. CA-IX monoklonal antikoru olan Girentixumab, metastatik olmayan RCC'nin tedavisi için klinik deneylere giren Faz III aşamasındaki ilk CA-IX inhibitörü olarak tespit edilmiştir. Girentixumab, tümör hücrelerinde eksprese edilen CA-IX'a spesifik olarak bağlanan ve antijene bağlı hücresel sitotoksisite (ADCC) immün tepkisini tetikleyen monoklonal antikor içerir. Ayrıca Naturel Killer (NK) hücrelerinin üretimini indükleyerek tümör hücresinin ölümüne neden olur. Bu ilacın anti-tümör etki gösterdiği ve tümör hacmini azalttığı kanıtlanmıştır (Tablo 2.4) (36).

Ayrıca radyonüklitlerle bağlanmış monoklonal antikorlarla yapılan deneylerin Faz I klinik denemelerinde olduğu çalışmalar mevcuttur. Radyoaktif I124 etiketli cG250 kimerik antikor renal kanserlerde CA-IX'a karşı hedeflenen bir ilaç olarak dizayn edilmiştir. Radyoaktif olarak işaretlenmiş cG250, yüksek CA-IX ekspresyonu gösteren kanser hücrelerinde zıt bir immün yanıt oluşturmuştur. cG250'nin, I131 ile etiketlendiği bir başka monoklonal antikor radyonüklid konjugatı ise ileri renal karsinomalı hastaların tedavisi için Faz II klinik deneylerini başarıyla tamamladığı rapor edilmiştir (Tablo 2.4) (42).

Tablo 2.4. pH düzenlenmesinde CA-IX'u hedefleyen klinik denemeler (45).

Hedef	Bileşik	Marka Adı	Kullanıldığı Alan	Faz Çalışması
CA-IX	cg250	Girentixumab	Böbrek Kanseri	Faz III
CA-IX	124I-cG250	Girentixumab	Görüntüleme	Faz III
CA-IX	3ee9-MMAE	BAY-79-4620	Solid Tümörler	Faz I
CA-IX	SLC-0111		Solid Tümörler	Faz I
CA-IX	DTP348		Solid Tümörler	Faz I

CA-IX inhibisyonunun kanserin radyasyona olan tepkisini etkileyebileceği gösterilmiştir. CA-IX gen susturulmasının hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde radyoaktif-dirençli S fazındaki hücre sayısını azaltarak tümör hücrelerini radyasyona duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir. CA-IX inhibitörlerinin, radyasyona bağlı apoptozu artırarak, RCC'yi radyasyona duyarlı hale getirdiği belirtilmiştir (54). CA-IX inhibitörlerinin yine benzer şekilde meme kanseri modelinde radyasyon duyarlılığını artırıp ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (55). Ksenograft modellerini kullanan diğer klinik veriler, yüksek CA-IX düzeyleri ifade eden tümörlerin radyasyona daha az yanıt verdiğini, ancak CA-IX enzim inhibitörlerinin tümör radyasyon duyarlılığını önemli ölçüde artırabildiğini göstermiştir (51).

2.4. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı kanser için ana düzenleyici olarak düşünülebilecek en önemli hücre içi sinyal yollarından biridir. Bu yolak, hücre büyümesini, hareketliliğini, sağkalımını, metabolizmasını ve anjiyogenezi düzenleyip, tümör gelişimine katkıda bulunur (56).

PI3K, plazma membranındaki fosfatidilinositol (PtdIns) lipidlerinin inositol halkasının 3-hidroksil grubunun fosforile edilmesiyle aktive edilen lipid kinazlar ailesinin bir üyesi olarak literatürde tanımlanmıştır. PI3K, yapısal olarak 3 sınıfa ayrılır: sınıf I, II ve III. Sınıf I PI3K'lar sınıf IA ve sınıf IB PI3K'lardan oluşarak p85 düzenleyici alt birim ve p110 katalitik alt biriminden meydana gelir. Sınıf IA PI3K, insan kanserinde en açık şekilde gösterilen tiptir. p85 düzenleyici alt birimi, tirozin

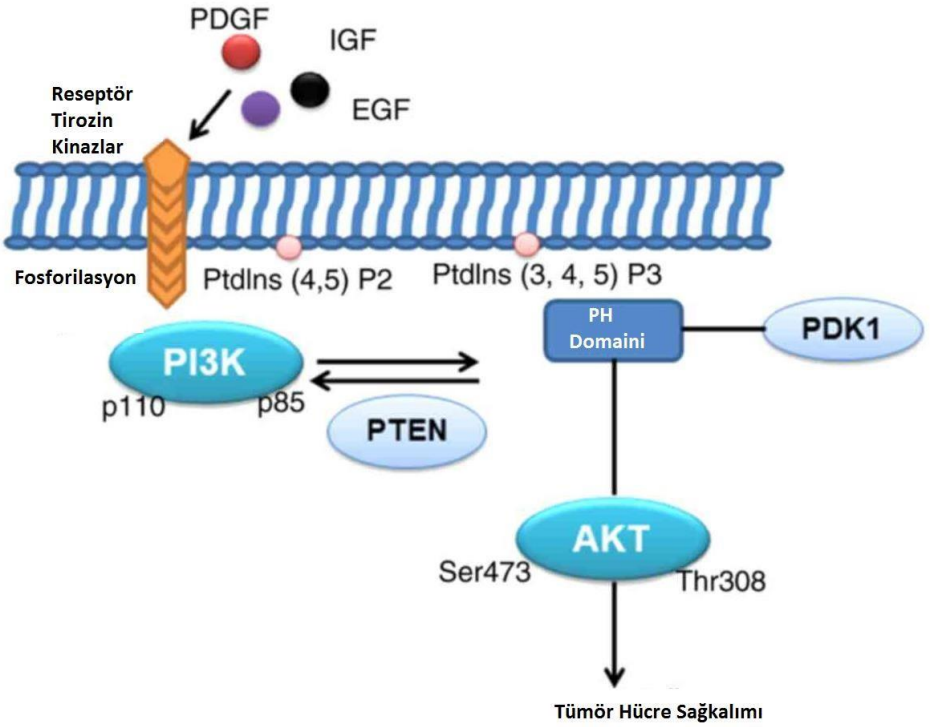
kinaza bağlı reseptörler, protein kinaz C (PKC), Src homoloji 2 alan içeren protein tirozin fosfataz 1 (SHP1), Rac, Rho, hormonal reseptörler, Src ve mutasyona uğramış Ras gibi transmembran ve intrasellüler proteinlere bağlanarak p110 proteininin aktivasyonuna neden olur (Şekil 2.13) (56).

Sınıf I PI3K, ikinci haberci olan Fosfotidilinozitol 3,4,5 tri fosfatı (PtdIns (3,4,5) P3) üretir. PtdIns (3,4,5) P3 Akt ve PDK1 dahil hedef proteinlere bağlanır. Bu bağlanma Akt (Protein Kinaz B)'yi hücre membranına yönlendirir ve PDK1, Thr308'den fosforillenerek aktive olur. PTEN, PtdIns (3,4,5) P3'ü, fosfotidilinozitol 4,5 di fosfata (PtdIns (4,5) P2) dönüştürdüğü için Akt aktivasyonunun negatif bir düzenleyicisidir ve hücre membranında Akt birikiminin azalmasına yol açar (Şekil 2.12) (56, 57).

PI3K / Akt sinyali yukarı yönde HER-2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) ve IGFR (insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü) gibi büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ekspresyonu veya aktivasyonu tarafından düzenlenirken, PI3K'daki mutasyonlar, AKT mutasyonları/amplifikasyonları gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla düzensizleştirilir.

Kanserlerde PI3K amplifikasyonu / mutasyonu, fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) fonksiyon kaybı, Akt aşırı ekspresyonu, ribozomal protein S6 kinaz beta-1 (S6K1) ve ökaryotik translasyon başlama faktörü 4E-bağlayıcı protein 1 (4EBP1) aşırı ekspresyonu gibi birden fazla deregülasyon bildirilmiştir (58).

PI3K sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olan PTEN, mutasyon, heterozigotluk kaybı, metilasyon, düzenleyici mikroRNA'nın anormal ekspresyonu ve protein kararsızlığı dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla downregüle edilir (58).



Şekil 2.13. PI3K / Akt sinyal yolağı (57).

2.4.1. Rapamisinin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi (mTOR)

mTOR hücre büyümesi, proliferasyon, sağkalım, otofaji, metabolizma, farklılaşma ve hücre iskeleti organizasyonu dahil olmak üzere çok çeşitli fonksiyonları düzenleyen bir protein kinazdır. Ayrıca bu protein büyüme faktörü ile etkinleştirilen ve besin algılayan yolların temel bir düzenleyicisi olarak hareket eder.

mTOR sinyal yolu, memeli metabolizması ve fizyolojisinde kritik rollere sahiptir. Diyabet, obezite ve kanser gibi birçok patofizyolojik durumda rol oynar. mTOR aktivitesi, meme, prostat, akciğer, karaciğer ve böbrek karsinomlarında sıklıkla düzensizdir. mTOR yolağının yukarı regülasyonu, anjiyojenez, glikolitik metabolizma, lipid metabolizması, kanser hücresi göçü ve otofajinin baskılanması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla tümör büyümesini ve ilerlemesini destekleyebilir (59, 60).

mTOR sinyal yolağının kanserlerin neredeyse % 30'unda düzensiz olduğu gösterilmiştir (61).

mTOR, hücre büyümesi ve bölünmesinin ana düzenleyicisidir. mTOR, tümör hücrelerinin büyümesine, metastaz yapmasına teşvik eden sinyaller gönderir. Bunlar arasında, PI3K/Akt yolağı, mTORC'un ana aktivatörüdür ve bu yoldaki gen mutasyonları, malign tümörlere yol açabilir. mTOR, tümör hücrelerinin büyümesini, sağkalımını ve proliferasyonunu sürdürmek için tümörlerde her zaman uyarılır ve tümör hücresi biyolojisinde anahtar bir rol oynar (62).

mTOR yolağı, uygun enerji kaynağı ile aktive olur. Metabolizmaya giren besinlerin yetersizliği, mTOR aktivasyonunu inhibe eder. Tümör hücreleri, büyüme ve bölünme ihtiyaçlarına cevap vermek için protein, lipit ve nükleotidlere gereksinim duyar. Bu nedenle, mTOR yolağının anormal aktivitesi genellikle tümörlerde meydana gelir (63).

Ayrıca, mTOR sinyal yolağının, tümör hücrelerinin otofajisini ve apoptozunu düzenleyerek tümörlerin oluşumunu destekleyebileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. mTOR, otofajinin anahtar sinyal düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. mTOR spesifik inhibitörler, rapamisin veya besin yoksunluğu ile mTOR inhibisyonu, otofajinin aktivasyonunu indükler (64).

mTOR, mTORC1 ve mTORC2 olarak adlandırılan iki fonksiyonel ve yapısal farklı kompleksin katalitik alt birimidir.

mTORC1; büyüme faktörleri, kemokinler, besinler (glikoz, amino asitler) ve yüksek ATP tarafından uyarılır. Aktif S6K1 ve translasyon inhibitörü ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E-BP1 dahil olmak üzere protein sentez mekanizmasının bileşenlerini fosforile eder (Şekil 2.14) (60).

mTORC1; mTOR, mTOR düzenleyici proteini raptor, rapamisinin kompleks alt birimi LST8'in hedefi mLST8 ve iki negatif düzenleyici protein olan 40 kDa'lık prolin bakımından zengin Akt substratı PRAS40 ve DEP alanı içeren mTOR etkileşimli protein DEPTOR'dan oluşur. Raptor, mTOR aktivitesini düzenler ve mTORC1 substratlarını almak için bir iskele görevi görür. Son çalışmalar, mTORC1 aktivitesinin raptorun fosforilasyon durumu ile düzenlenebileceğini ileri sürmüştür. mTORC1'in bir başka alt birimi olan, mTOR'un kinaz alanına bağlandığı ve mTOR kinaz aktivitesini pozitif olarak düzenlediği düşünülen mLST8, raptor ve mTOR

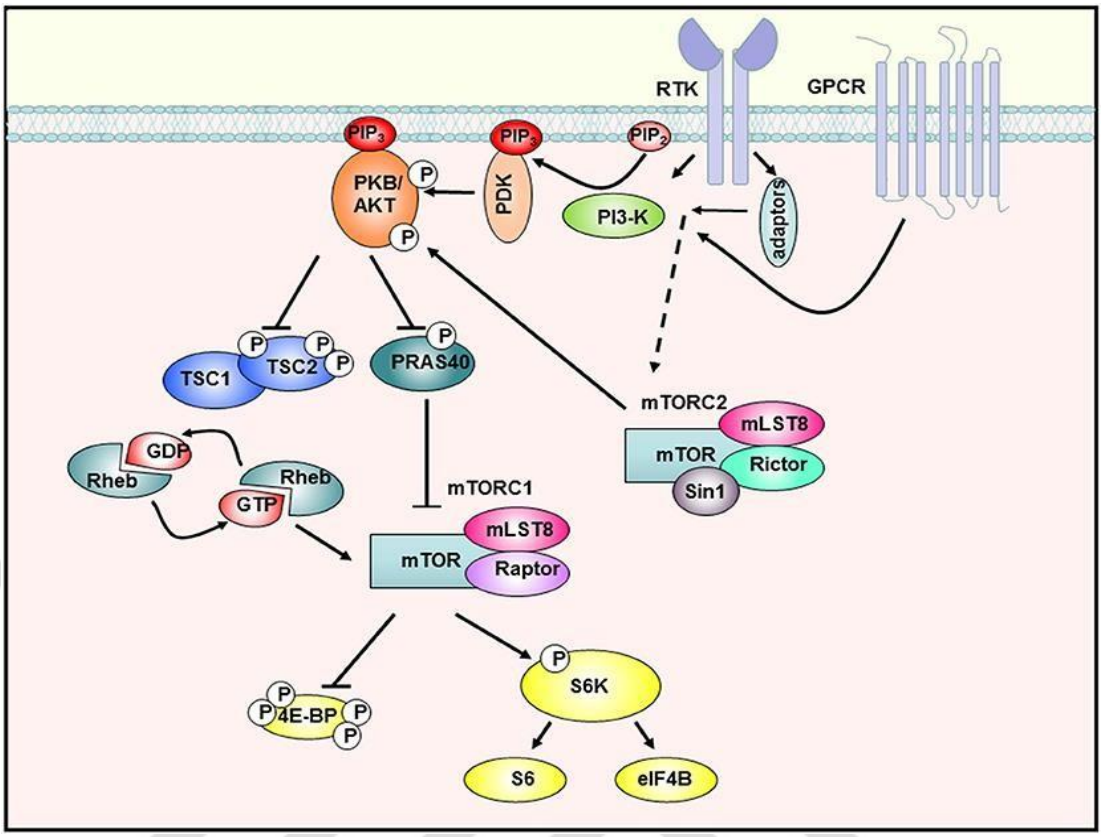
arasında besin ve rapamisine duyarlı etkileşimi sürdürmek için gerekli görünmektedir. Yapılan çalışmalar, mLST8'in mTOR'un iki mTOR kompleksi arasında taşınması için önemli olabileceği ve memeli hücrelerindeki bu komplekslerin dinamik dengesi ile tutarlı olabileceği önerisine yol açmıştır. mTORC1'in diğer bir alt birimi olan PRAS40, raptor aracılığıyla mTORC1 ile birleşir ve aktivitesini inhibe eder. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, DEPTOR'u mTOR ile etkileşen bir protein olarak tanımlamıştır. DEPTOR, hem mTORC1 hem de mTORC2 ile etkileşime girerek faaliyetlerini olumsuz yönde düzenler (Şekil 2.15) (58).

S6K1 ve 4EBP1'in fosforilasyon durumu, mTORC1 aktivitesini *in vivo* değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Ek olarak, mTORC1 ayrıca, eEF2 (ökaryotik uzama faktörü 2) kinaz, ODC (ornitin dekarboksilaz), glikojen sentaz, HIF-1 αgibi proteinleri de düzenler. mTORC1, S6K1'i T389'da ve 4E-BP1'de birden fazla kalıntıda fosforile eder (58).

S6K1'in mTORC1 tarafından fosforilasyonu, protein ve nükleotid sentezini artırır. S6K1, ribozomal protein S6'yı (RPS6) (40S ribozomal alt biriminin bir bileşeni) fosforile ederek ribozom biyogenezinde yer alan mRNA'ların aktif translasyonuna yol açar (59).

4EBP1, iyi karakterize edilmiş başka bir mTORC1 hedefidir. 4EBP1, eIF4E'yi (ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E) bağlayarak ve inaktive ederek protein translasyonunun başlamasını inhibe eder. mTORC1, eIF4E'nin 4EBP1'den ayrışmasını teşvik etmek için 4EBP1'i fosforile ederek, 4EBP1'in eIF4E'ye bağlı translasyon başlangıcı üzerindeki önleyici etkisini hafifletir (58).

mTOR aşağı akım efektörleri olan S6K1, 4EBP1 ve eIF4E, hücresel dönüşümde rol oynar ve bunların aşırı ekspresyonu, kanser prognozu ile ilişkilidir. Birçok kanser türünde S6K1, 4EBP1 ve eIF4E'ün aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (58).



Şekil 2.14. PI3-K / Akt / mTOR sinyal kaskadı. mTORC1 kompleksini tamamen aktive ettikten sonra S6K-1 veya 4E-BP1'i fosforile ederek ilgili proteinlerin translasyonunu aktifleştirir (65).

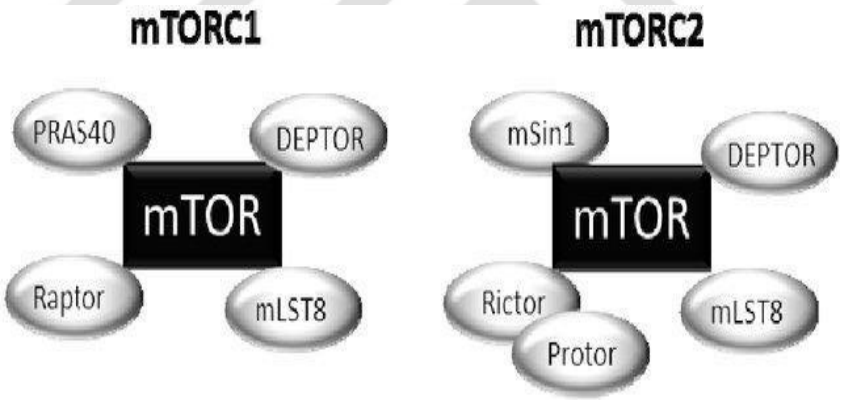
mTORC2, mTOR, MTOR Kompleksi 2' nin Rapamisine duyarsız memeli rapamisin hedefinin eşi rictor, LST8'in hedefi mLST8, mitojenle aktive olan protein kinaz ile ilişkili protein 1 (mSin1), yeni tanımlanan Protor, ısı şoku proteini 70 (Hsp70) ve DEP alanı içeren mTOR etkileşimli protein DEPTOR bileşenlerini içerir. Rictor, özel bir mTOR ile ilişkili proteindir. mLST8, her iki mTOR kompleksinin stabil bir bileşenidir. mSin1, mTORC2'nin bütünlüğü ve AKT Ser473 fosforilasyonuna yönelik mTOR aktivitesi için önemli olan mTORC2'nin temel bir alt birimidir. Protor-1, diğer mTORC2 alt birimlerinin komplekse montajı için gerekli olmasa da, rictor ile etkileşime girer. Bir ısı şoku proteini olan Hsp70, mTORC2'nin bazal koşullar altında ve ısı şokunu takiben uygun oluşumu ve kinaz aktivitesi için gereklidir. DEPTOR, hem mTORC1 hem de mTORC2'nin negatif bir düzenleyicisidir (Şekil 2.15) (58).

mTORC2, Akt'yi Ser 473 üzerinden fosforile eder. mTORC2 aktivitesini kontrol eden mekanizmalar, PI3K / Akt sinyallemesini içerebilmesine rağmen, şu anda

net değildir. Ayrıca, mTORC1, ribozom biyogenezinin aktivasyonu ve otofaji aracılı ribozom döngüsünün inhibisyonu yoluyla dolaylı olarak mTORC2'yi kontrol eder.

mTORC2, Akt aracılığıyla hücre sağkalımını / metabolizmasını düzenler ve aktin lifleri, protein kinaz C (PKC) aracılığıyla hücre iskeleti regülasyonu yoluyla hücre büyümesinin kontrolünde yer alır (60).

mTORC2, mTORC1'den farklı alt tabakalara sahiptir. Spesifik bir inhibitörün bulunmaması nedeniyle, mTORC2'nin kontrolü hakkında mTORC1'inkinden çok daha az şey bilinmektedir. mTOR sinyallemesine bağlı birçok onkojenik yol, onkojenler veya tümör baskılayıcılar göz önüne alındığında, mTORC1 fonksiyonunun tüm insan tümörlerinin % 70'ine kadarında upregüle olduğu tahmin edilmektedir. mTORC2 için eşdeğer bilgi mevcut değildir, ancak PI3K / PTEN ile bağlantıları, tümör hücrelerinde de aktive edildiğini göstermektedir. Bu, kanser tedavisi için mTOR'u hedeflemede çok yüksek bir ilgi uyandırmıştır (66).



Şekil. 2.15. mTOR kompleksinin bileşenleri (58).

2.4.2. mTOR Protein İnhibitörleri

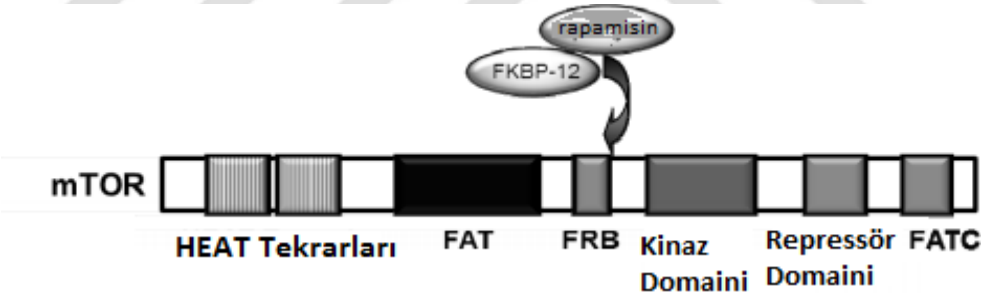
mTOR aktivitesi, kanser dahil olmak üzere birçok hastalıkta düzensizdir. Bu inhibitörler, ilerlemiş renal hücreli karsinom dahil olmak üzere bazı kanser türlerinin tedavisi için onaylanmıştır. Bazı mTOR inhibitörleri insan kanserini tedavi etmek için onaylanmış olsa da, klinik deneylerde daha fazla mTOR inhibitörü değerlendirilmektedir (60).

mTOR inhibitörleri iki sınıfa ayrılabilir: mTORC1'in allosterik inhibitörleri olan rapamisin/rapamisin analogları ve mTOR kinaz inhibitörleri olan küçük moleküller/ dual PI3K-mTOR inhibitörleri (58).

Rapamisin (RAPA)

Streptomyces hygroscopicus bakterisinden keşfedilen bir antibiyotik olan Rapamisin (sirolimus), tanımlanan ilk mTOR inhibitörüdür. Rapamisin başlangıçta antifungal, immünosupresif ve antiproliferatif bir ajan olarak tanımlanmıştır.

Rapamisin 12-kDa FK506 bağlayıcı protein (FKBP12) ile mTOR'un FKBP12 / rapamisin bağlama (FRB) alanına bağlanarak bir işlev kazanç kompleksi oluşturur (Şekil 2.16). Rapamisin / FKBP12 kompleksi RAPTOR'un mTORC1'den ayrılmasına, mTORC1 ile substratları arasındaki etkileşimin bozulmasına neden olur. Bu nedenle rapamisin, oldukça seçici bir mTORC1 allosterik inhibitörüdür. mTORC1 rapamisine duyarlı iken mTORC2 ise rapamisine dirençlidir (59, 60).



Şekil 2.16. mTOR'un domain yapısı. (58).

Rapamisin, 1999 yılında renal allogreft reddinin önlenmesi için FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmıştır. Daha sonraki çalışmalar, rapamisinin ayrıca glioblastoma, küçük hücreli akciğer kanseri, osteosarkom, pankreas kanseri, meme kanseri, prostat kanseri ve B-hücreli lenfoma gibi farklı tümör hücre hatlarının büyümesini yavaşlatan veya durduran bir ajan olabileceği açıklanmıştır (58).

Rapamisin ayrıca HIF-1'in transkripsiyonel hedefleri olan VEGF'i negatif olarak düzenler. Ayrıca vasküler gelişim ve kanser ilerlemesine katkıda bulunur (61).

Rapamisinin çözünürlük ve farmakokinetik özelliklerindeki sınırlamalar, iki suda çözünür bileşik temsirolimus (CCI-779) ve everolimus (RAD001) içeren analoglarının (rapaloglar) geliştirilmesine yol açmıştır. Temsirolimus, hem intravenöz hem de oral formülasyonlarda bulunan bir rapamisin ester türevidir. 2007 yılında, FDA tarafından ileri evre (metastatik) renal hücreli karsinomun tedavisi için onaylanmıştır. Avrupa'da temsirolimus ayrıca mantle hücreli lenfoma tedavisi için de onaylanmıştır. Şu anda temsirolimus, çeşitli katı ve hematolojik tümörlerde tek bir ajan olarak veya diğer ilaçlarla birlikte kombinasyon halinde kullanılmaktadır (Tablo 2.5).

Everolimus ise ilerlemiş böbrek karsinomu, rezeke edilemeyen nöroendokrin pankreas tümörleri ve gelişmiş östrojen reseptörü pozitif / HER2 negatif dahil olmak üzere çeşitli malignant hastalıkların tedavisi için FDA tarafından onaylanmış bir oral rapamisin analoğudur. Everolimus şu anda tek bir ajan olarak veya çeşitli kanser türlerinin tedavisi için ek tedavilerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır (Tablo 2.5) (59).

Rapamisin ve analogları olan temsirolimus, everolimus ve deforolimus şu anda kanser tedavisi için klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir. Klinik öncesi çalışmalarda, çeşitli kanserlerde antiproliferatif aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (58).

ATP Yarışmalı mTOR inhibitörleri

mTOR'u tam olarak inhibe etmek için, hem mTORC1 hem de mTORC2'yi hedeflemek üzere bir dizi ATP yarışmalı mTOR inhibitörü geliştirilmiştir. mTOR sinyal yoluna bağımlı olan tümörler bu tür inhibitörlere duyarlı olabilir. Rapalogların aksine, ATP yarışmalı mTOR inhibitörleri sadece hücre büyümesini durdurmakla kalmaz, aynı zamanda apoptozu da indükler.

MLN0128 (aynı zamanda INK128, sapanisertib, TAK-228 olarak da adlandırılır), güçlü *in vitro* ve *in vivo* anti-tümör etkilerine sahip bir pan-mTOR inhibitörüdür. Kemik ve yumuşak doku sarkomu, meme kanseri gibi katı tümörler için klinik denemelere tabi tutulmuştur. MLN0128, rapamisine veya kemoterapiye dirençli tümörlerde bile etkili bir ajandır.

PP242 ve PP30 iki aktif bölge inhibitörüdür ve mTOR'un insülinle uyarılan fosforilasyonunu Ser473 rezidüsünden inhibe eder. Bu inhibitörlerin mTOR, protein sentezi ve hücre proliferasyonu üzerinde güçlü inhibisyon etkilerine sahip olduğu bildirilmiştir. PP242; lösemi, mide ve kolon kanseri gibi çeşitli kanser türleri üzerinde ümit verici bir anti-kanser aktivitesine sahip mTOR'un bir başka seçici ATP-rekabetçi inhibitörüdür (Tablo 2.5).

Hem AZD2014 hem de analog AZD8055, iki ATP yarışmalı mTORC1 / 2 inhibitörü, östrojen reseptörü (ER) pozitif meme kanserinin tedavisinde oldukça etkilidir. Ayrıca AZD2014 ve AZD8055, endokrin tedaviye, rapaloglara ve paklitaksele karşı kazanılmış dirençle meme kanserini baskılayabilir (Tablo 2.5) (59).

Hem mTORC1 hem de mTORC2'yi doğrudan inhibe eden bir başka seçici ATP yarışmalı mTOR inhibitörü olan Torin1, hücre büyümesini ve proliferasyonunu rapamisine göre daha etkili bir şekilde inhibe ediyor gibi görünmektedir. Birkaç seçici mTOR inhibitörü geliştirilme aşamasındadır ve bu ajanların hiperaktif PI3K / mTOR yolağından etkilenen kanserlerin tedavisinde etkinliğini değerlendirmek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Tüm bunların yanında dual PI3K/mTOR inhibitörleri de geliştirilmektedir. Bu inhibitör sınıfı, katı tümörlerin ve gliomaların tedavisi için faz I klinik denemelerden geçen XL-765'i (Sanofi-Aventis / Exelixis Inc) ve ilerlemiş katı tümörlerin ve metastatik meme kanserinin tedavisi için faz I / II denemelerinde olan PI-103 ve NVP-BEZ235 (Novartis AG)'i içermektedir. Bu bileşiklerin, hem mTORC1 hem de mTORC2'yi inhibe ederek PI3K-mTOR aktivitesini rapamisine göre daha etkili bir şekilde önlediği bildirilmiştir. Dual PI3K-mTOR inhibitörleri halen faz I / II klinik denemelerdedir (Tablo 2.5)

Tablo 2.5. Klinik Çalışmalarda mTOR İnhibitörleri (58).

mTOR İnhibitörleri	Etki Mekanizması
Rapamisin ve Analogları	
Deforolimus	FKBP12'ye bağlanma Kısmi mTORC1 inhibitörü Hücre tipine özgü mTORC2 inhibitörü
Everolimus	FKBP12'ye bağlanma Kısmi mTORC1 inhibitörü Hücre tipine özgü mTORC2 inhibitörü
Sirolimus	FKBP12'ye bağlanma Kısmi mTORC1 inhibitörü Hücre tipine özgü mTORC2 inhibitörü
Temsirolimus	FKBP12'ye bağlanma Kısmi mTORC1 inhibitörü Hücre tipine özgü mTORC2 inhibitörü
Küçük Molekül İnihibitörleri	
AZD8055	mTOR ATP yarışmalı inhibitörü
Ku-0063794	Spesifik mTORC1 ve mTORC2 inhibitörü
PP242	mTOR Kinaz İnhibitörü
PP30	mTOR Kinaz İnhibitörü
Torin1	mTOR Kinaz İnhibitörü
WYE-354	mTOR ATP yarışmalı inhibitörü
mTOR ve PI3K Dual İnhibitörleri	
NVP-BEZ235	mTOR ve PI3K ATP yarışmalı inhibitörü
PI-103	mTOR ve PI3K ATP yarışmalı inhibitörü
PKI-179,PKI-587	mTOR ve PI3K ATP yarışmalı inhibitörü
XL765	mTOR ve PI3K ATP yarışmalı inhibitörü

2.4.3. Renal Kanser ve mTOR Sinyal Yolağı

Son on yılda, RCC patogenezinde yer alan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması ile terapötik müdahale için spesifik hedefler belirlenmiştir. VEGF yolağı reseptörünün veya tirozin kinaz aktivitesinin blokajı ile inhibisyonu, ileri RCC'li çoğu hasta için birincil terapötik müdahaledir.

mTOR küçük moleküler inhibitörlerle hedeflenmesi ise ileri RCC'li hastalarda önemli bir klinik aktivite gösterdiği ikinci moleküler hedeftir. ccRCC'de mTOR sinyal yolağına yönelik hedefli tedavi için, tedavi stratejileri öncü konumdadır ve birçok ilaç ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından yetkilendirilmiştir. Bu onaylı ilaçlar arasında temsirolimus ve everolimus, mTORC1 aktivasyonunu kısmen inhibe eden ve faz III Global ARCC çalışmasının sonuçlarına göre ilerlemiş ccRCC hastalarında hayatta kalma faydalarına yol açan rapaloglardır. Metastatik renal hücreli karsinom (mRCC) için temsirolimus ve everolimus, FDA tarafından yetkilendirilmiş tek mTOR inhibitörleridir. Klinik veriler, mTOR inhibitörlerinin, olumsuz olaylar uygun şekilde

ele alındığı sürece cRCC'yi etkili bir şekilde tedavi edebileceğini göstermiştir. AZD8055, LN0128 ve OSI-027 dahil mTORC1/2 inhibitörleri, ccRCC'nin klinik çalışmalarında rapaloglardan daha fazla etkinlik potansiyeline sahip gibi görünmektedir.

Onkolojide terapötik ajanlar olarak mTOR sinyal inhibitörlerinin kullanılmasındaki ilerleme, klasik mTOR inhibitörü rapamisinin, mTOR'un etkilerinin sadece bir kısmını inhibe ettiği gerçeği dahil olmak üzere, birkaç geri besleme döngüsünün varlığı; ve mTOR'un normal fizyolojideki önemi gibi bir dizi faktör ile sınırlandırılmıştır. Her ne kadar rapamisin mTOR'a karşı oldukça seçici bir inhibitör olsa da, mTORC'in tüm faaliyetlerini tamamen engellemez ve mTORC2'yi sadece bazı hücrelerde inhibe eder. Her iki mTOR'un aktivitesinin inhibe edilmesindeki yüksek verime rağmen, ATP-yarışmalı mTOR inhibitörleri kansere karşı savaşta potansiyel olarak çeşitli nedenlerden dolayı hala oldukça etkisizdir. Tüm bu nedenlerden dolayı mTOR'u inhibe edebilecek yeni potansiyel ajanların bulunması kanser tedavisi adına umut vaat edebilir.

Literatürdeki çalışmalar mTOR proteinlerinin inhibitörlerinin kanser üzerindeki etkilerini detaylıca açıklamaktadır. Buna ek olarak CA-IX'un mTOR ile ilişkisini gösteren çalışmalar olmasına rağmen literatürde CA-IX inhibitörünün mTOR üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada amaçlanan, CA-IX inhibisyonunun karsinogenez sürecinde mTOR yolağındaki etkilerinin incelenmesidir. mTOR yolağının CA-IX ekspresyonu ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu ilişkinin CA-IX inhibisyonu ile açıklanacak olması literatüre büyük bir katkı sağlayacak ve bu proteinlere özgü ilaçların alternatiflerinin geliştirilmesi için önemli bir adım olacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan hücre hattı İnsan Berrak Hücreli Renal Karsinom Hücre Hattı Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Gnetik bölümünden temin edilmiştir.

İnsan Berrak Hücreli Renal Karsinom Hücre Hattı (CAKI-2) hücre hattının besi ortamı Low Glucose DMEM (Diagnovum, D823), Fetal Bovin Serum (FBS, sıcaklık inaktif, Capricorn, CP17-1756), penisilin-streptomisin (Capricorn, CP17-1828) ve non-esansiyel aminoasit (Biowest, MS00LD2019) ile hazır hale getirilmiştir.

Hücrelerin pasajlanma ve dondurma işlemleri için Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (Gibco, 1720774), Tripsin-EDTA (Gibco, 25200-056) ve dimetil sülfoksit (DMSO, Fisher Chemical, 1414511) kullanılmıştır.

Hücrelere uygulanacak olan inhibitörler mTOR inhibitörü olan Rapamisin (Cayman Chemical, 1-800-364-9897) ve CA-IX inhibitörü olan Asetazolamid'dir (Sigma, BCBZ9159).

Uygulanan inhibitörler sonrası hücrelerde canlılığı test etmek ve uygun inhibitör dozlarını belirlemek için suda çözülebilir tetrazolyum tuzu (WST-1) kiti (Cayman Chemical, 10008883), CA-IX aktivitesini belirlemek için ise CA-IX ELISA (ShanghaiCoon Koon Biotech Co., Ltd., 202004) kiti kullanılmıştır.

Western Blot çalışmalarında ise; HIF-1α Poliklonal Antikoru (Bioss USA, BS-0737R), Ras Monokolonal Antikoru (Bioss USA, BSM-52871R), mTOR Poliklonal Antikoru (St. John's Laboratory, STJ29884-100), p-mTOR (Ser2448) Monoklonal Antikoru (610302), 4E-BP1 Monoklonal Antikoru (St. John's Laboratory, STJ97805-100), p-4E-BP1 (S659 Poliklonal Antikoru (St. John's Laboratory, STJ97805-100), Goat Anti Mouse HRP Sekonder Antikoru (Advansta,R-05071-500) ve Goat Anti Rabbit HRP Sekonder Antikoru (Advansta,R-05072-500) kullanılmıştır.

İmmünositokimya çalışmaları için HIF-1α Poliklonal Antikoru (Bioss USA, BS-0737R), CA-IX Monoklonal Antikoru (St. John's Laboratory, STJ96978-100), mTOR Poliklonal Antikoru (St. John's Laboratory, STJ29884-100), 4E-BP1 Monoklonal Antikoru (St. John's Laboratory, STJ97805-100), Goat anti Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam, ab150077) ve Goat Anti-Mouse IgG H&L (Texas Red ®) (Abcam, ab6787) antikorları kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar Tablo 3.1'de yer almaktadır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar.

Cihaz Adı	Marka
Buzdolabı (+4 C˚)	Klimasan
Dondurucu (-20 C˚)	Uğur
Dondurucu (-80 C˚)	Haier
Azot Tankı	Thermo
Hassas Terazi	MRC
Otomatik Pipetler	Eppendorf
Manyetik Karıştırıcı	IKA
Vorteks	Isolab
pH Metre	Thermo
Inverted Mikroskop	Euromex
Laminar Flow Kabin	TelStar
İnkübatör	Panasonic
Su Banyosu	Memmert
Santrifüj	Hettich
Güç Kaynağı	BioRad
Kuru Blotlama Sistemi	İnvitrogen
Spektrofotometre-Elisa Okuyucu	BioTek
Hipoksik İnkübatör	StemCell Technologies
Dikey Elektroforez	Cleaver Scientific

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

CAKI-2; böbrek dokusundan izole edilen berrak hücreli renal karsinom hücre hattıdır (Tablo 3.2.). Bu hücre hattı % 10 FBS, % 1 Penicillin-Streptomycin, % 1 non-esansiyel aminoasit içeren Low Glucose DMEM besiyeri (medium) kullanılarak 37 C° sıcaklık ve %5 CO_2 içeren koşullarda muhafaza edilmiştir (67).

Tablo.3.2. Kullanılan hücre hattı ve özellikleri (68).

Kullanılan Hücre Hattı ve Özellikleri	
Hücre Adı	CAKI-2
Organizma	İnsan
Morfoloji	Epitelyal
Büyüme Özelliği	Adherent
Doku	Böbrek
Hastalık	Berrak Hücreli Renal Karsinom
Klinik Bilgi	69 yaş, Erkek, Kafkas

3.2.1.1. Hücrelerin Ekimi

Hücreler ekim işlemleri öncesinde azot tankından çıkarıldıktan su banyosunda 37 C°'de çözdürülmüştür. Çözülmüş olan hücreler 50 mL'lik steril falkonda toplanarak üzerine 10 mL medium eklenmiş 800 rpm'de 5 dakika (dk) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet, 2 mL besiyeri ile homojenize edilmiş ve hücre sayısına bağlı olarak 25 cm^2 (T25) boyutundaki flasklara ekilerek son hacim besiyeri ile 10 mL'e tamamlanmıştır. 37 C° ve % 5 CO_2 koşullarında inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.2. Besiyeri Değişimi

Hücrelerin canlılıklarını koruyabilmesi için her 2 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücreler tüm flaskın yüzeyine yayıldığında (% 80-90 yoğunluğa ulaştıklarında) büyüyebilecekleri alan kalmadığı için pasajlama işlemi yapılmıştır.

3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlama işlemine flasktaki besiyeri uzaklaştırılarak başlanmıştır. Ardından flaskın içinde bulunan artıkların uzaklaştırılması için 5 mL PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra PBS çekilerek 3 mL Tripsin eklenmiş ve hücreler, etüvde 3 dk inkübasyona maruz bırakılmıştır. Tripsin ile flask tabanına yapışık olan hücrelerin ayrılması sağlanmıştır. Hücreler etüvden çıkarıldıktan sonra flask tabanından ayrılıp ayrılmadığının kontrolü için mikroskopta bakılmıştır. Etüvden çıkarılan flaskta hücrelerin olduğu duvara doğru pipet yardımı ile çek-bırak yapılarak hücrelerin akması sağlanmıştır. Sonrasında pipet yardımıyla flaskın tabanına doğru 5 defa yavaşça çek-bırak yapılmıştır. Ardından 7 mL PBS flask üzerine eklenip ve süspanse edilmiştir. 2000 rpm'de 10dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pelletin üzerine medium eklenmiş ve flasklara bölünmüştür. Son hacim 10 mL olacak şekilde medium eklenmiştir. Hücreler 37 C° ve % 5 CO_2 koşullarında inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması

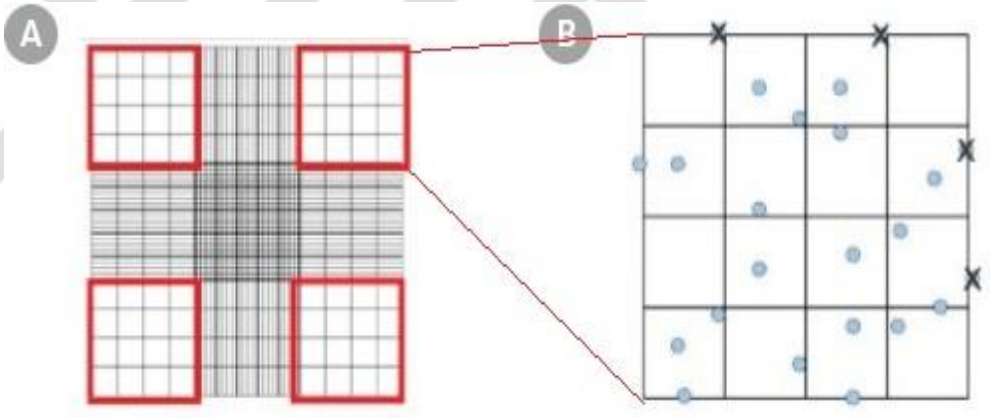
Dondurma işlemi için öncelikle flaskta bulunan medium çekilmiştir. PBS ile yıkama yapılmıştır. Flaskta bulunan hücreler 3 mL Tripsin ile kaldırılmış, daha sonra 5 mL besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Hücreler 50'lik steril falkonda toplanıp, 500 rpm, 20 C˚, 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, 5 ml PBS eklenmiş ve 500 rpm, 20 C˚, 5 dk tekrar santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, tüpte kalan pellet % 95 FBS, % 5 DMSO içeren dondurma solüsyonu ile homojenize edilmiş ve kryotüpler içine 1 mL hacimde olacak şekilde alınmıştır. Tüpler hazırlandıktan sonra -20 C˚'de 1 saat, -80 C˚'de bir gece bekletilmiş ve ardından azot tankına kaldırılmıştır.

3.2.1.5 Hücre Sayımı

Hücre sayımı canlı ve ölü hücrelerin sayısını belirlemek için yapılmıştır. Bu işlemi gerçekleştirmek için hücre süspansiyonu ve tripan mavisinden 1:1 oranında 10'ar µL alınarak karıştırılmış daha sonra bu karışımdan 10 µL Thoma lamına alınarak sayım işlemi gerçekleştirilmiştir.

Thoma lamında hücreler 16 adet büyük karede 40X objektifte sayılarak hücre sayımı gerçekleştirilir. Hücreler sayılırken; AxSFx10000 formülünden hesaplanılır. Burada A=16 büyük karede sayılan hücre adedi, SF=Seyreltme faktörü, 10000 ise 1 mL süspansiyondaki hücre sayısını bulabilmek için kullanılan sabittir (Şekil 3.1). Hücre sayımında canlı olan hücreler içlerine boyayı alamayacaklarından dolayı şeffaf renkte gözükürler.



Şekil 3.1. Thoma lamı ile hücre sayımı. (A) kırmızı renkli dört seti ve (B) sayım için kullanılması gereken setlerden birinin içindeki 16 kareyi gösteren hemositometre diyagramı. (69).

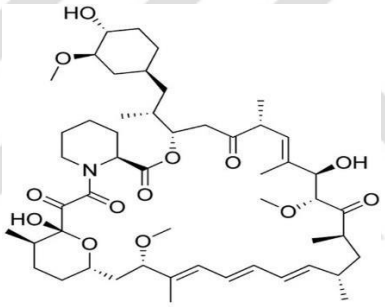
3.2.1.6. Hücre Lizatı Hazırlama

Hücre lizatı hazırlamak için öncelikle hücreler PBS ile yıkanmış sonrasında ise lizis tamponu ile müdahale edilmiştir. Lizis tamponu hazırlanıp pH'ı 6.0 olarak ayarlanmıştır.

Hücrelere lizis tamponu ile müdahale edildikten sonra hücreler santrifüj edilmiştir santrifüj edilmiştir (+4^{0}C, 13000rpm, 13-15 dk). Süpernatant kısmı alınmış ve iki kez PBS ile yıkanmıştır.

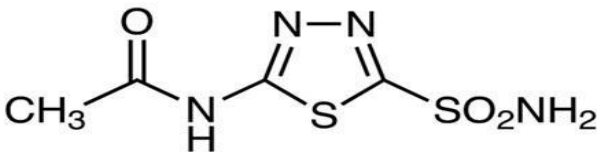
3.2.2. İnhibitörlerin Hazırlanması ve Uygulanması

Rapamisin (RAPA), *Streptomyces hygroscopicus* bakterisinden keşfedilen bir makrolid antibiyotiktir ve tanımlanan ilk mTOR inhibitörüdür. FK506 bağlayıcı protein (FKBP12) ile mTOR'un FKBP12 / rapamisin bağlama (FRB) alanına bağlanarak inhibisyonu gerçekleştirir. Rapamisinin hücre büyümesini kontrol edici özellikleri hem *in vitro* hem de *in vivo* malignitelerde belgelenmiştir ve bu inhibitör ile kanser hastalarında çok sayıda klinik deney yapılmıştır (60) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Rapamisinin moleküler yapısı (70).

Asetazolamid (AZA) ise diüretik, antiglokom ve antikonvülsan özelliklere sahip bir sülfonamid türevidir. Karbonik anhidrazın yarışmalı olmayan bir inhibitörüdür (71) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Asetazolamidin moleküler yapısı (72).

Çalışmada kullanılacak olan inhibitörler mTOR inhibitörü olan RAPA ve CA-IX inhibitörü olan AZA'dır. RAPA, Cayman Chemical, AZA ise Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir (Tablo 3.3).

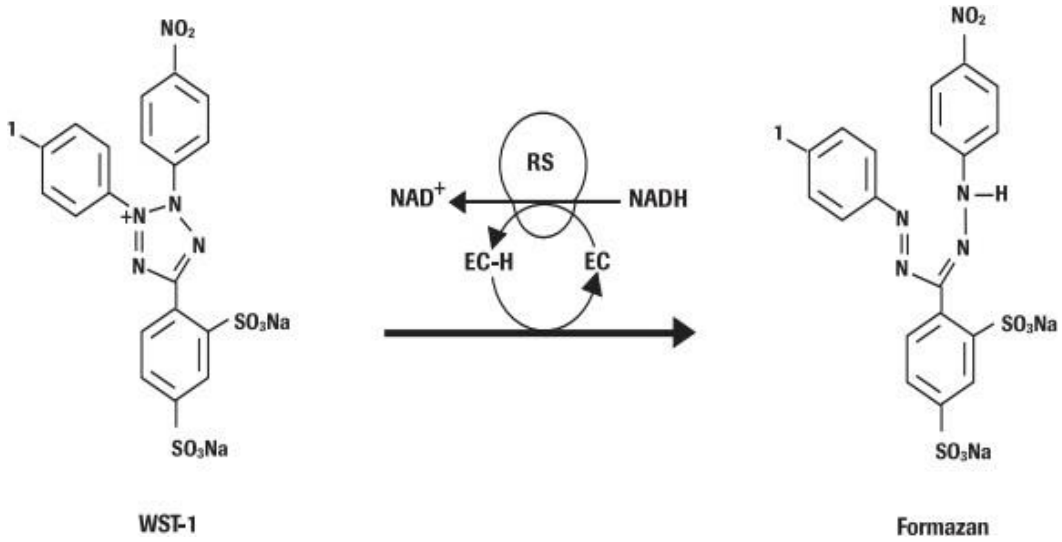
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan inhibitörlerin özellikleri.

İnhibitör Adı	Kapalı Formülü	Moleküler Ağırlığı	Çözünürlük
Rapamisin	$C_{51}H_{79}NO_{13}$	914.2 g/mol	DMSO, etanol veya dimetilformamid (DMF)
Asetazolamid	$C_4H_6N_4O_3S_2$	222.25 g/mol	DMSO, metanol, etanol veya amonyum hidroksit (NH4OH)

Çalışmada kullanılan inhibitörler konsantrasyonu 300 µM olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürülerek stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Daha sonra 24 ve 48 saat aralıklarla; 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 µM'lık konsantrasyonlarda hazırlanıp test edilmiştir.

3.2.3. WST-1 Hücre Canlılık Testi

Bir hücre canlılık testi olan WST-1, 96'lık well-platelerde hücrelerin çoğaltılıp canlılığının spektrofotometrik olarak ölçülmesi için yapılır. Bu canlılık testinin prensibi hücresel mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından tetrazolyum tuzu olan WST-1'ın formazan kristallerine dönüşmesi esasına dayanır (Şekil 3.4). Canlı hücrelerin sayısı ne kadar fazla ise mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesi o kadar yüksek olur ve bu da oluşan formazan boyası miktarını artırır (73).



Şekil 3.4. Bir tetrazolyum tuzu WST-1'in Formazana dönüşümü.

Hücre canlılık testi için CAKI-2 hücreleri 96'lık platelere ekilip inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyondan sonra hücrelere sırasıyla 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarda hazırlanan RAPA ve AZA ile müdahale edilmiştir. Deney 24, 48 ve 72. saat zaman aralıklarında ayrıca hem normoksik hem de hipoksik ortamda tekrarlanmıştır. Kontrol olarak kullanılacak kuyucuklara inhibitörler yerine medium eklenmiştir.

Her bir kuyucuğa 10 µL WST-1 solüsyonu ilave edilip 37 °C 'de 2-4 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası 450 nm dalgaboyunda ölçüm yapılarak hücreler için uygun olan inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir.

Hücrelerin canlılık değerleri hesaplanırken;

% Canlılık=(Ort.absorbans$inhibit$ör $\times 100$) ÷ Ort.absorbans$kontrol$ formülü kullanılmıştır.

İnhibisyon konsantrasyonu hesaplanırken;

% İnhibisyon Konsantrasyonu (IC) $= 100 -$ ((Ort.absorbans$inhibit$ör $\times$ 100) ÷ Ort.absorbans$kontrol$) formülü kullanılmıştır.

Sonrasında bulunan inhibitör konsantrasyonu değerleri Graphpad Prism 9.1.0 programına girilerek grafiğe dönüştürülmüş ve hücrelerin % 50sini inhibe eden inhibitör dozu (IC_{50}) değeri hesaplanmıştır.

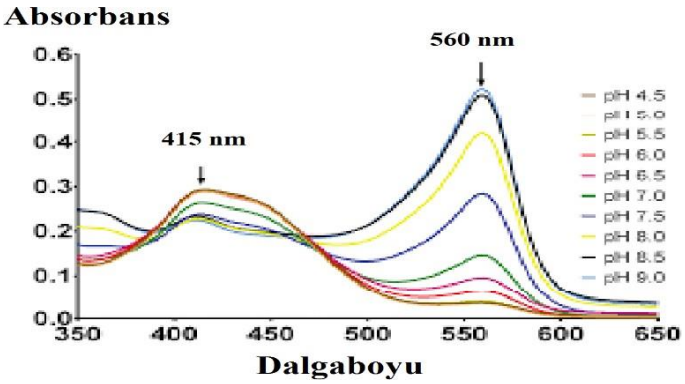
3.2.4. Hipoksik Ortam Oluşturulması

Hipoksik ortam oluşturmak için Stemcell Technologies firmasına ait hipoksik inkübatör kullanılmıştır. Hipoksik inkübatör fizyolojik hipoksiyi mimik eden gaz sızdırmaz bir cihazdır. Hipoksi odacığı ve single flowmeter adı verilen iki parçadan oluşur. Hipoksi odacığı, hipoksi için gerekli olan % 2 O_2, % 88 azot (N_2) ve % 10 CO_2 içeren bir tüpe bağlıdır. Single flowmeter ise hipoksi odacığı içindeki gaz akışının hassas bir şekilde kontrolüne izin verir.

Cihaz açılırken orta yerinde bulunan kelepçe gevşetilir ve cihazın içinde bulunan tepsi çıkarılır. Cihazın tabanına ortamı nemlendirmek için petri kabı ile distile su yerleştirilir. Tüm yüzeyler sızıntı olmaması için kontrol edilir. Tepsiler tekrar cihazın içine yerleştirilir tepsinin üzerine ise flasklar konulur. Kelepçe sıkıştırılarak cihaz kapatılır. Sonrasında cihazın arka kısmında bulunan klipsler açılır. Gaz tüpü açılarak flowmetre yardımı ile 20 psi basınca ayarlanarak hipoksi odasından 4 dk boyunca gaz karışımı geçirilir. Bu süre sonunda cihaz tüpten ayrılır, arka kısmında bulunan klipsler sıkıştırılır ve inkübatöre kaldırılır (74, 75).

3.2.5. İnhibitör Uygulaması Öncesi ve Sonrası CA-IX İnhibisyonunun Doğrulanması

Hipoksi öncesi/sonrası ortam pH değişiminin doğrulanması ve inhibitör uygulaması öncesi/sonrası CA-IX inhibisyonunun doğrulanması için bir pH indikatörü olan Fenol Kırmızısı ile pH standardizasyonu çalışması yapılmıştır. Spektrofotometre kullanılarak absorbiyona bağlı pH grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.5). Ölçüm 460, 560 ve 720 nm olmak üzere üç farklı dalgaboyunda yapılmıştır. Çalışmada 460 nm dalgaboyu referans olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.5. Fenol kırmızısı içeren besi ortamının absorbans spektrumları (76).

3.2.6. CA-IX İnhibisyonunun ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

CAKI-2 hücre hattında AZA'nın CA-IX düzeyinde neden olduğu değişimi belirlemek için ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile ölçüm yapılmıştır. Ölçümler hücre lizatından 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Bunun için hücreler öncelikle 6 kuyucuklu well platelere ekilmiş ve % 80-90 yoğunluğa gelmeleri beklenmiştir. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştıktan sonra AZA ile muamele edilmiştir.

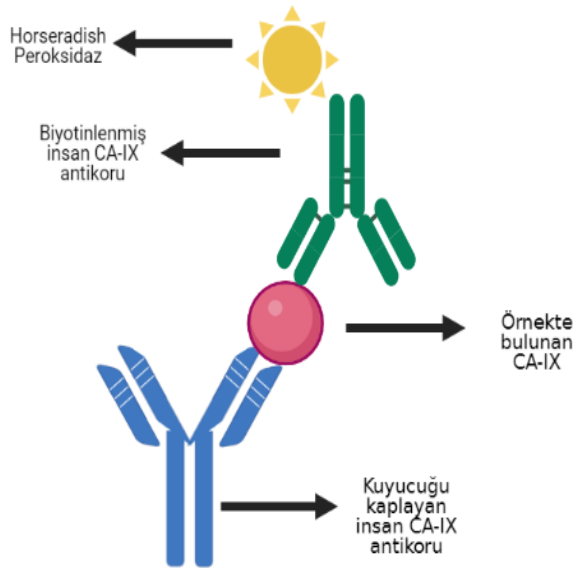
Hücre lizatından ölçüm için öncelikle hücrelerin besiyerleri çekilmiştir. Hücreler daha sonra soğuk PBS ile yıkanmıştır. Hücreler tripsin ile kaldırılmış ve 2529 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet 3 kez soğuk PBS ile yıkanmış ve süspanse edilmiştir. Hücrelerin lizis işlemi için sırasıyla -80 °C ve 37 °C'de 3'er kez don çöz işlemi yapılmıştır. Daha sonra 3057 rpm 4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlar kullanılmıştır.

ELISA deneyleri için Sandwich ELISA temeline dayanan BT Lab marka Human Carbonic Anhydrase IX ELISA Kit (E2273Ha) kullanılmıştır (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Human Carbonic Anhydrase IX ELISA Kit İçeriği (77).

Bileşenler
Standart solüsyon 40 ng/mL
Antikor kaplı ELISA plate
Standart sulandırıcı
Streptavidin HRP
Substrat solüsyon A
Substrat solüsyon B
Yıkama Tamponu (25x)
Biyotinlenmiş CA-IX antikoru
Durdurma solüsyonu

Kit içerisinde insan CA-IX antikoru ile kaplı plateler bulunmaktadır. Numune eklendiğinde numune içerisindeki CA-IX oyuklar üzerine kaplanmış antikorlara bağlanmaktadır. Kuyucuklara daha sonra biyotinlenmiş insan CA-IX antikoru eklenir ve örnekteki CA-IX'a bağlanır. Ardından Streptavidin-Horseradish Peroksidaz eklenerek inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası substrat solüsyonu eklenir ve örneklerin konulduğu kuyucuklarda CA-IX miktarı ile orantılı olarak renk gelişir.



Şekil 3.6. Sandwich ELISA Prensibi (78).

ELISA protokolü için öncelikle standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözelti 20 ng/mL standart stok solüsyon oluşturmak için 120µL standardı (40 ng /mL) 120µL standart seyrelticiyi içerir. Standart stok solüsyonu 1: 2 oranında dilüe edilerek sırasıyla ile 10 ng/mL, 5ng/mL, 2.5ng/mL ve 1.25ng/mL standart çözeltiler elde edilmiştir. Standart koyulacak olan kuyucuklara tüm standartlar 50 µL olarak eklenmiştir. Örneklerin konulacağı kuyucuklara 40 µL numune eklenmiş daha sonra 10µL biyotinlenmiş anti-CA-IX antikoru eklenmiştir. Ardından tüm kuyucuklara 50µL Streptavidin-HRP eklenmiş ve 37 ° C'de 60 dk inkübasyon yapılmıştır.

İnkübasyon sonrası kuyucuklar 5 kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 50µL substrat solüsyonu A ve 50µL substrat solüsyonu B eklenmiş. 37 ° C'de karanlıkta 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50µL durdurma solüsyonu eklenmiş ve ardından Epoch Microplate Reader cihazında 450 nm'de okuma yapılmıştır.

3.2.7. Real Time PCR

Normoksik ve hiposik ortam oluştuktan sonra HIF1A ve CA9 ekspresyon değişimlerini gözlemek amacıyla Real Time PCR yapılmıştır.

3.2.7.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyon işleminde "Qiagen miRNeasy Mini Kit" kullanılmıştır (Tablo 3.5). CAKI-2 hücre hattı 6 kuyucuklu platelere ekilmiştir. Normoksik ve hipoksik koşullar altında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüm besiyerleri uzaklaştırılmış, hücreler PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra tripsin ile muamele edilerek hücreler kaldırılmış, PBS ile nötralizasyon yapılmıştır. Daha sonra tekrar yıkama yapılarak 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş süpernatant kısmı atılarak pellet kısmı kullanılmıştır.

Tablo 3.5. miRNeasy Mini Kit İçeriği (79).

miRNeasy Mini Kit İçeriği
RNeasy Spin Kolonları
Toplama Tüpleri (1.5 mL)
Toplama Tüpleri (2 mL)
RLT Tamponu
RW1 Tmponu
RPE Tamponu
RNAz İçermeyen Su

RNA izolasyonu için gerçekleştirilen işlemler sırasıyla aşağıdaki gibidir;

1. Pelletlenmiş hücreler için, tüpe hafifçe vurarak hücre pelleti gevşetilmiştir. 700 µL lizis tamponu eklenerek 2 dk boyunca güçlü vorteks yapılmıştır.

2. Homojenat içeren tüp 10 dk boyunca oda sıcaklığında (15–25 ° C) inkübe edilmiş ve 2 dk'da bir vortekslenmiştir.

3. Homojenatı içeren tüpe 140 µL kloroform eklenmiş ve 15 saniye (sn) kuvvetlice çalkalanmıştır.

4. Homojenat içeren tüp 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

5. 4 ° C'de 12.000 x g'de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjlemeden sonra, numune 3 faza ayrılmıştır: RNA içeren bir üst, renksiz, sulu faz; beyaz bir ara faz; ve daha düşük, kırmızı, organik bir faz.

6. Üst sulu fazı yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve 525 µL % 100 etanol eklenerek birkaç kez yukarı ve aşağı pipetlenerek karıştırılmıştır.

Protokolün 6. adımından sonrası "QIAcube Connect" cihazı tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7).

7. RNeasy spin kolonu 2 mL’lik toplama tüpüne oturtulmuş ve 10.000 rpm’de oda sıcaklığında 15 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası aşağı inen kısmı atılmıştır.

8. 7. adım tekrarlanmıştır.

9. RNeasy Mini spin kolonuna 700 µL RWT tamponu eklenmiştir. 10.000 rpm 'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası aşağı inen kısmı atılmıştır.

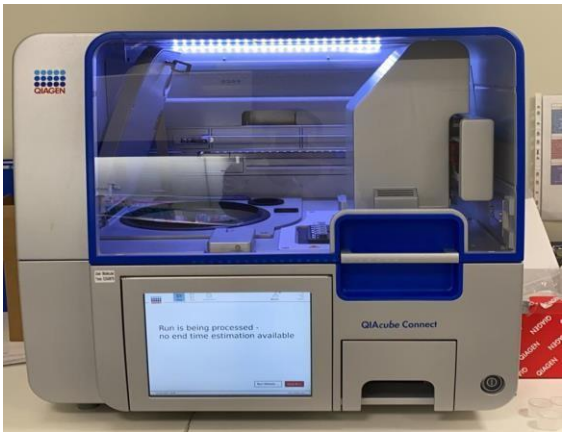
10. RNeasy Mini spin kolonuna 500 µL RPE tamponu eklenmiştir. Kapağı yavaşça kapatın ve W8000 x g'de (W10.000 rpm) 15 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası aşağı inen kısmı atılmıştır.

11. RNeasy Mini spin kolonuna tekrar 500 µl RPE tamponu eklenmiştir. W8000 x g'de (W10.000 rpm) 15 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası aşağı inen kısmı atılmıştır.

12. 1 dakika boyunca tam hızda bir mikrosantrifüjde santrifüj yapılmıştır.

13. RNeasy Mini spin kolonunu yeni bir 1,5 mL toplama tüpüne aktarılmıştır. 30–50 µL RNaz içermeyen suyu doğrudan RNeasy Mini dönel kolon membranına pipetlenmiştir ve RNA'yı ayrıştırmak için W8000 x g'de (W10.000 rpm) 1 dk santrifüj yapılmıştır.

14. Santrifüj sonrası 1,5 mL tüpe inen bölüm RNA’dır. Spin kolon atılmıştır. RNA’lar kapakları kapatılarak hemen buz üzerine alınmış ve cDNA sentez basamağına geçilmiştir.



Şekil 3.7. QIAcube Connect cihazı (80).

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

3.2.7.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Hedef genlerin ekspresyonunun belirlenebilmesi için ilk adımda izole edilen RNA'lar cDNA'ya çevrilmiştir. Bu işlem için "QuantiNova Reverse Transcription Kit" kullanılmıştır. cDNA sentezi işlemi öncesinde DNA kontaminasyonundan kurtulmak için genomik DNA inhibisyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için genomik DNA giderme reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve "gDNA Removal Mix" kullanılmıştır (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Genomik DNA giderme reaksiyon bileşenleri.

Bileşen	**Hacim**
gDNA Giderme Karışımı	2 µL
Kalıp RNA	Değişken
RNaz İçermeyen Su	Değişken
Toplam Hacim	15 µL

Tablo 3.6.'daki karışım hazırlandıktan sonra tüpler 45 °C'de 2 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra cDNA sentez basamağına geçilmiş ve ters transkripsiyon reaksiyonu için gerekli bileşenler hazırlanmıştır (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Ters transkripsiyon reaksiyon bileşenleri.

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

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

3.2.7.3. Gen Ekspresyon Seviyesinin q-PCR ile Belirlenmesi

q-PCR işlemi için " QuantiNova LNA PCR Assay" kullanılmıştır. Normoksik ve hipoksik koşullar altında HIF1A ve CA9 ekspresyon seviyelerini belirleyebilmek için ilgili gen bölgesine bağlı primer ve kilitli nükleik asit probları (locked nucleic acid probes, LNA probes) kullanılmıştır. Öncelikle 0.1 mL'lik PCR tüplerine mastermix dağıtılmıştır. Sonrasında üzerlerine 5'er µL cDNA örneği eklenerek Rotor Gene Q cihazında reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.8) (Tablo 3.9) (Tablo 3.10).

Tablo 3.8. qPCR reaksiyonu için gerekli bileşenler.

Bileşen	**Hacim**
2x QuantiNova Probe PCR Master Karışımı	10 µL
10x Probe PCR Assay	2 µL
RNaz İçermeyen Su	3 µL
Toplam Hacim	15 µL

Tablo 3.9. Çalışmada kullanılan primerler.

Çalışmada Kullanılan Primerler	**Katalog Numarası**
HIF1A	UPFH0476121
CA9	UPFH1132903
GAPDH	UPFH0007663

.

Tablo 3.10. qPCR reaksiyonu için gerekli adımlar.

Adım	Zaman	Derece
PCR başlangıç ısı aktivasyonu	2 dk	95 °C
Denatürasyon	5 s	95 °C
Primerlerin bağlanması ve uzaması	5 s	60 °C
Toplam Döngü Sayısı	45	

HIF1A ve CA9 mRNA ekspresyon düzeyleri delta CT metodu ile, ΔΔCT = ΔCT ilgili gen- ΔCT kontrol formülünden kat değişimi=$2^{-\Delta\Delta CT}$ ile hesaplanmıştır.

3.2.8. Western Blot Analizi

3.2.8.1. Hücrelerin Lizis Edilmesi ve Protein Analizi

Hücreler western blot analizi için öncelikle 6 kuyucuklu platelere ekilmiş ve % 80-90 yoğunluğa gelmeleri beklenmiştir. Hücreler bu yoğunluğa ulaşınca lizis edilmişlerdir. Bunun için öncelikle hücrelerin mediumları çekilmiştir. Hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde lizis tamponu eklenmiş ve scraper yardımı ile kazınmıştır (Tablo 3.11). Bu işlemden sonra hücreler sonikatör ile parçalanmıştır. Tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra 4 °C'de 13000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen pellet atılıp süpernatant kullanılmıştır.

Tablo 3.11. Lizis tamponunun içeriği.

Lizis Tamponu	
50mM Tris	0,6 gr
150 µM NaCl	0,87 gr
% 1 NP-40 (Deterjan)	1 m
Proteinaz inhibitor faktör (taze eklenmeli)	1 mL

3.2.8.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein konsantrasyonu Nanodrop ile belirlenmiştir. Nanodrop ölçümü için süpernatant örneklerinden 2 µL alınıp ölçüm yapılmıştır. Kör olarak lizis buffer kullanılmıştır.

3.2.8.3. Protein Örneklerinin Hazırlanması

Ayrı bir ependorf tüpe süpernatant alınarak üzerine ticari olarak satın alınan Laemmli Sample Buffer (2x) eşit hacimde eklenmiş ve vortekslenmiştir. Bu karışım protein denatürasyonunu sağlamak için ısıtıcı blokta, 96^{o}C de 8-10 dk kaynatılmış ve kısa bir vorteksin ardından spin attırılarak jele yüklemek için hazır hale getirilmiştir.

3.2.8.4. Elektroforezde Yürütme İşlemi

Elektroforezde yürütme işlemi için ticari olarak satın alınan Novex % 4-12 Bis-Tris Gel hazır jel kullanılmıştır. Jel paketinden nazikçe çıkarılmış, distile su ile dikkatli bir şekilde birkaç kez yıkanmıştır. Jelin aşağı kısmında bulunan elektrik bantı o bölgeye dokunmadan nazikçe çıkarılmıştır. Jel tanka yerleştirilmiş ve tankın arka bölmesine destek konulup kaset yardımıyla sıkıştırılmıştır. Ardından hazırlanan running buffer orta bölmeye dökülerek sızıntı olup olmadığı kontrol edilmiştir (Tablo 3.12). Sızıntı olmadığı gözlemlendikten sonra running buffer ile doldurulmuştur. Her bir kuyucuğa örneklerden 20 µL olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Yükleme

bittikten sonra tank kapatılıp, elektrotlar bağlanmış ve güç kaynağı 100 V, 120A olacak şekilde ayarlanarak 100 dk boyunca yürütme işlemi yapılmıştır.

Tablo 3.12. Running buffer içeriği.

Running Buffer (10x)	
NuPAGE Running Buffer (Ticari) (20x)	40 mL
Distile su	760 mL

3.2.8.5. iBlot Yöntemi ile Örneklerin Jelden Membrana Aktarılması

Jel tanktan çıkarıldıktan sonra kaset distile su ile yıkanmıştır. Spatül yardımıyla kenarlardan çıtlatılarak kaset açılmış jelin kullanılmayacak yerleri kesilmiştir. Jel, blotlama solüsyonu bulunan kaba çalkalayarak bırakılmıştır (Tablo 3.13). Daha sonra protein transferi için iBlot kuru blotlama sistemi kullanılarak iBlot protokolü uygulanmıştır. iBlot transfer cihazı örneklerin jelden membrana kuru blotlama ile geçmesini sağlar (Şekil 3.8). Bu cihaz yüksek verimli protein transferi gerçekleştirir. Etkinliği ıslak ve yarı kuru transfer yöntemlerinden daha yüksektir. Proteinleri 7 dk'da jelden membrana geçirir (81).

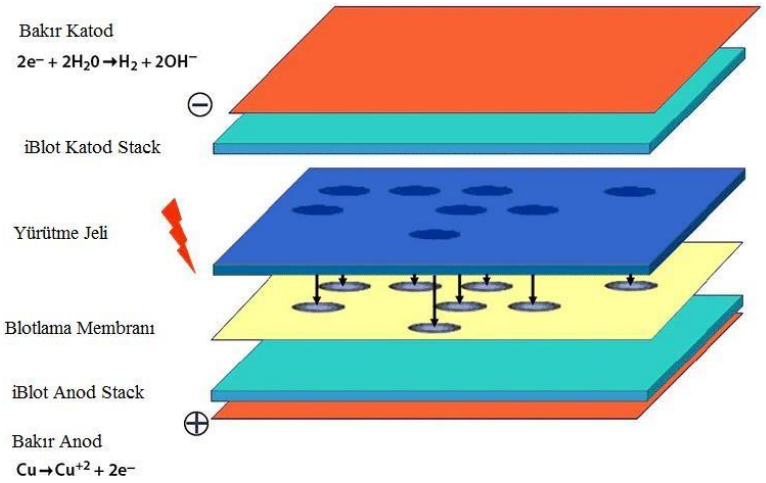
Tablo 3.13. Blotlama solüsyonu içeriği.

Blotlama solüsyonu	
Tris	3,025 gr
Glisin	14,4 gr
Metanol	200 mL

iBlot transfer cihazında membrana protein aktarımı için olarak adlandırılan bu cihaza özel sarf malzemeler kullanılmaktadır. Bunlar tek kullanımlık sarf malzemelerdir. iBlot Transfer Stacks proteinlerin kuru blotlamasını gerçekleştirmek için PVDF veya nitroselüloz transfer membranları, naylon bir transfer membranına sahiptir. Ayrıca iBlot Transfer Stacks, proteinlerin hızlı, güvenilir transferine izin vermek için bir bakır elektrot ve jel matrisinde uygun katot ve anot tamponları içerir (Şekil 3.9) (82).



Şekil 3.8. iBlot transfer cihazı (83).



Şekil 3.9. Kuru blotlama sistemi (84).

3.2.8.6. Membranı Bloklama

Membrana geçen jel, Ponceau S boyası ile boyanarak membrana geçip geçmediği kontrol edilmiştir. 1-2 dk boyada bekleyen membran önceden hazırlanan 1-2 defa berraklaşana kadar, PBS-Tween ile yıkanmıştır. Daha sonra bloklama işlemi için süt tozu çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 10 mL PBS-Tween 20 çözeltisine % 3-5 oranında süt tozu eklenmiş ve 1 saat oda ısısında shakerda (130 rpm) inkübe edilmiştir (süt tozu ile muamele edilmesinin sebebi; büyük antijenik bölgelerin kapatılarak gereksiz bağlanmaların önüne geçilmesidir). Membran bloklama sonrası 10-15 dk 1-2 kez PBS Tween ile yıkanmıştır.

3.2.8.7. Membrana Primer Antikorla Muamele

Membran belirlenen dilüsyon oranlarında hazırlanmış primer HIF1-α, mTOR, p-mTOR, 4E-BP1 ve p-4EBP1 antikorları ile gece boyu +4^oC'de çalkalayıcıda inkübe edilmiştir (Tablo 3.14).

Tablo 3.14. Çalışmada kullanılan primer antikorlar.

Antikor Adı	Marka/Seri No	Kaynak	Klonalite	Dilüsyon Oranı
β-Aktin	Bioss/bsm-52871R	Rabbit	Monoklonal	1:1000
HIF1-α	Bioss/bsm-0737R	Rabbit	Poliklonal	1:1000
p-mTOR	BioLegend/610302	Mouse	Monoklonal	1:1000
mTOR	St.Johns/STJ29884	Rabbit	Poliklonal	1:1500
4E-BP1	St.Johns/STJ97805	Mouse	Monoklonal	1:500
p-4E-BP1	St.Johns/STJ90778	Rabbit	Poliklonal	1:500

3.2.8.8. Membrana Sekonder Antikorla Muamele

Primer antikorla bir gecelik inkübasyon sonrasında membran, 3 kere PBS-Tween çözeltisi ile 10-15 dakika yıkanmıştır. Örnekler bu yıkamanın sonrasında HRP-konjuge sekonder antikorlar 1 saat çalkalayıcıda oda ısısında inkübe edilmiştir (Tablo 3.15). İşlem bittikten sonra membran PBS-Tween ile 15-20 dk yıkanmıştır.

Tablo 3.15. Çalışmada kullanılan sekonder antikorlar.

Antikor Adı	Marka/Seri No	Kaynak	Dilüsyon Oranı
Goat anti Rabbit	Advansta/R-05071-500	Rabbit	1:20000
Goat anti Mouse	Abcam/R-05072-500	Mouse	1:20000

3.2.8.9. Membranı Görüntüleme

Görüntüleme yapmadan önce Enhanced luminol based chemiluminescent (ECL) solüsyonu hazırlanmış ve membrana bununla muamele edilmiştir. ECL solüsyonu ile muamele edilen membran 3 dk karanlıkta bekletilmiş ve görüntüleme yapılmıştır. Görüntüleme UVP ChemiDoc-It2 görüntüleme cihazı ile "5 minutes-2 seconds-200.000 miliseconds" zaman ayarı seçilerek yapılmıştır.

3.2.8.10. Western Blot Sonuçlarının Analizi

Western blot analizinin sonunda oluşan bantlar Image J programı ile analiz edilmiştir. Program bilgisayara kurulduktan sonra analizi yapılacak olan Western

görüntüsü seçilmiştir. Bant dikdörtgen içerisine alınmış, analiz kısmından jel sekmesi seçilmiş ve ilk bandı seç tıklanmıştır. Bant seçimi bittikten sonra, analiz kısmından jel sekmesi seçilmiş ve plot lines seçilerek her bir banda ait plot oluşması sağlanmıştır. Sonra programın menüsünde bulunan düz çizgi seçilerek oluşan plotların sınırları belirlenmiştir. Plotların içine tıklanıldığı zaman yan tarafta sırasıyla rakamlar görülmüştür. Rakamlar Graphpad Prism 9.1.0 programına aktarılarak analizleri ve grafik çizimleri yapılmıştır.

3.2.10. İmmünofloresan Boyama

HIF-1α, CA-IX, mTOR ve 4EBP1 proteinlerinin hücre içindeki yerleşimlerini belirlemek amacıyla İmmünofloresan boyama yapılmıştır. Bu proteinlerin inhibitör uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücre hattında yerleşimlerinin farklı olup olmadığının belirlenmesi amacı ile anti-HIF-1α, anti-CA-IX, anti-mTOR, anti-4EBP1 antikorları kullanılmıştır. İnhibitör uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücreleri 6 kuyucuklu flasklara ekilmiştir. Her kuyucuğun tabanına lameller yerleştirilmiş ve hücrelerin bu lameller üzerinde çoğalması sağlanmıştır. Besiyerleri çekilen hücreler 1 kez PBS ile yıkanmıştır.

Konfluent hale gelen hücreler % 4'lük formaldehit ile 10 dk fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından kuyucuklar 2 kez PBS ile yıkanmış ardından %1 BSA (Bovine Serum Albumin), % 0.1 Tween, 0.3 M glisin ve % 10 FBS içeren PBS ile oda sıcaklığında 2 saat bekletilerek bloklama yapılmıştır. Bloklamanın ardından primer antikor eklenerek 4ºC'de bir gece, ardından sekonder antikor ile 1 saat inkübe edilmiştir (Tablo 3.16) (Tablo 3.17). Sekonder antikor aşamasında FITC ve Texas red ile konjuge sekonder antikorlar kullanılmıştır. Sekonder antikorla bir saat inkübasyonun ardından nükleer DAPI boyası içeren kapatma medyumu ile kaplanan lamlar floresan mikroskopta incelenmiştir.

Tablo 3.16. İmmünofloresan boyamada kullanılan primer antikorlar.

Antikor Adı	Marka/Seri No	Kaynak	Klonalite	Dilüsyon Oranı
HIF1-α	Bioss/bsm-0737R	Rabbit	Poliklonal	1:50
CA-IX	St.Johns/STJ96978	Mouse	Monoklonal	1:50
mTOR	St.Johns/STJ29884	Rabbit	Poliklonal	1:50
4E-BP1	St.Johns/STJ97805	Mouse	Monoklonal	1:50

Tablo 3.17. İmmünofloresan boyamada kullanılan sekonder antikorlar.

Antikor Adı	Marka/Seri No	Kaynak	Dilüsyon Oranı
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam/ ab150077	Rabbit	1:300
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Texas Red ®)	Abcam/ ab6787	Mouse	1:300

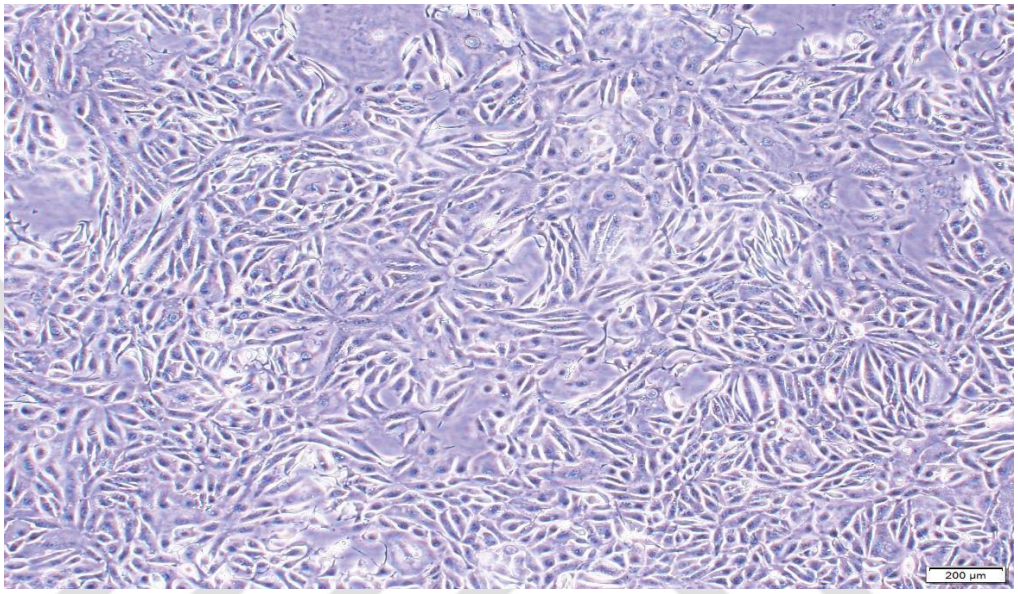
3.2.10. İstatistiksel Analizler

Western Blot analizleri ve ELISA testi sonrası istatistik GraphPad Prism 5.0 programında yapılmıştır. İkili karşılaştırmalar için Student's t testi, üçlü karşılaştırmalar için ise one-way ANOVA testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir. Real Time PCR analizleri GeneGlobe programı ile yapılmış. Student's t testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

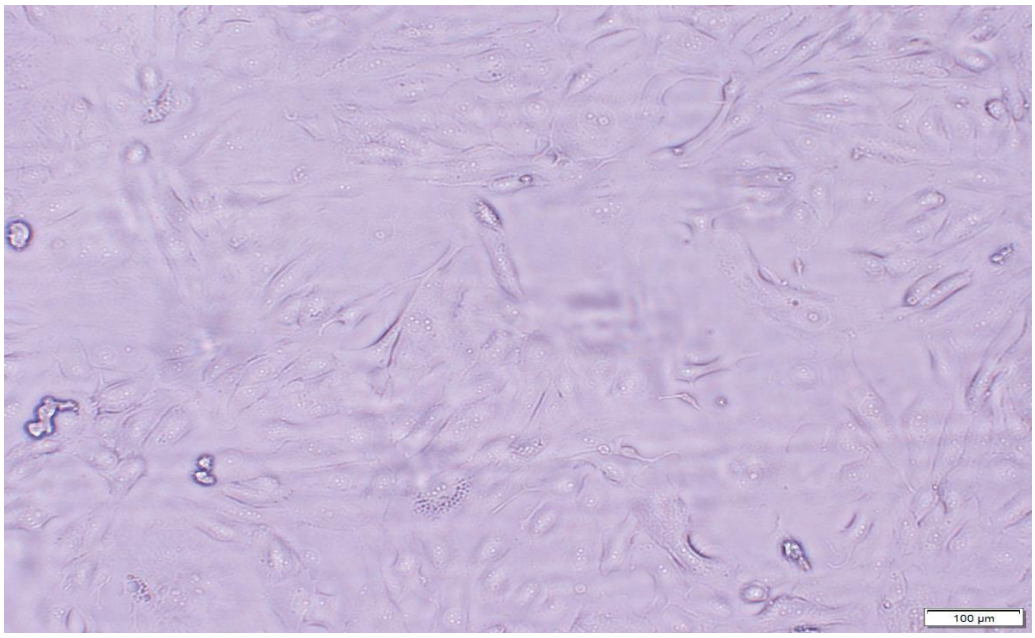
4. BULGULAR

4.1. CAKI-2 Hücrelerinin Mikroskopta Görüntülenmesi

CAKI-2 hücre hattı % 80-90 oranında yoğunluğa ulaştıktan sonra x4 ve x10'luk objektiflerde fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 4.1. CAKI-2 hücrelerinin genel görüntüsü (Bar: 200 µM).



Şekil 4.2. CAKI-2 hücrelerinin genel görüntüsü (Bar: 100 µM).

4.2. Sitotoksik Etkinin WST-1 Testi ile belirlenmesi

AZA ve RAPA'nın sitotoksik etkisinin belirlenmesi için WST-1 testi uygulanmıştır. Bunun için öncelikle 96 kuyucuklu plateler içerisine CAKI-2 hücreleri ekilmiştir. Hücreler uygun yoğunluğa ulaştıktan sonra AZA ve RAPA hücrelere sırasıyla uygulanmıştır. İnhibitör uygulamasından sonra 24. ve 48. saatlerde örneklere WST-1 reaktifi konularak ölçüm yapılmış ve IC_{50} değeri belirlenmiştir.

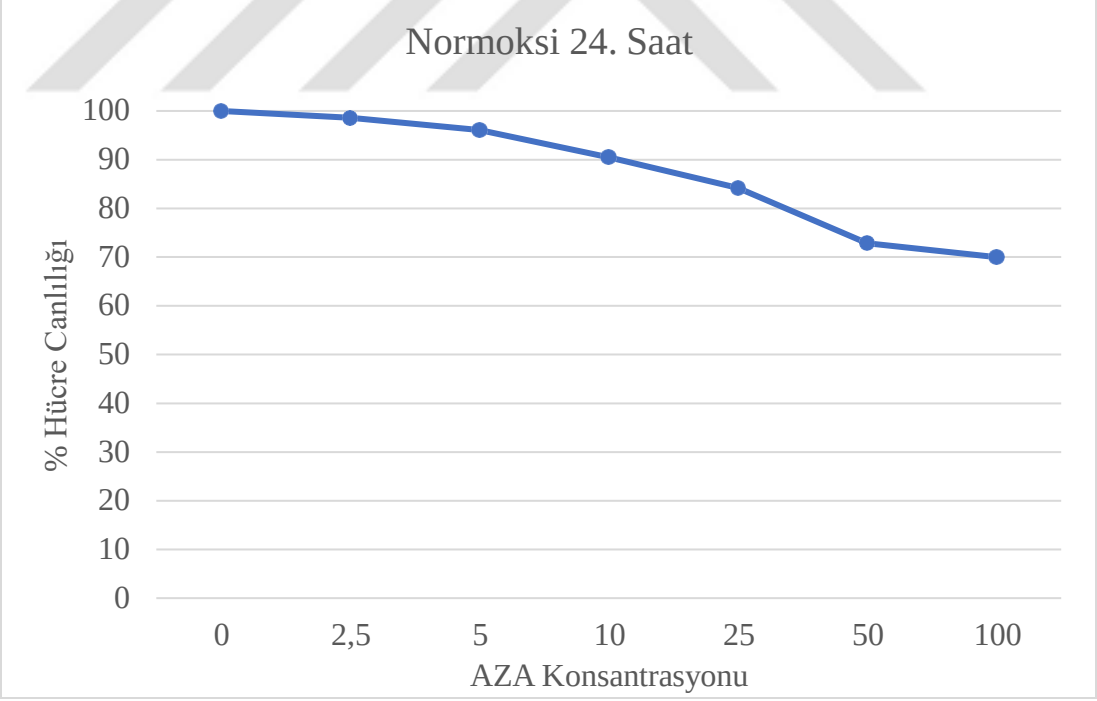
4.2.1. AZA'nın CAKI-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

AZA'nın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 ve 1 µM konsantrasyonlarında hücrelere muamele edilmiştir. Sonrasında 24 saat normoksi, 24 saat hipoksi ve 48 saat normoksi koşullarında inkübasyona bırakılmıştır.

Normoksik ortamda 24 saat AZA ile muamele edilen hücreler için 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 ve 1 µM konsantrasyonlarında sırasıyla canlılık oranları % 100, % 98,6, % 96,1, % 90,5, % 84,2, % 72,8, % 70 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1) (Şekil 4.3)

Tablo 4.1. AZA ile normoksik koşullarda 24 Saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

Normoksi 24. Saat Değerleri (AZA)		
Konsantrasyon	**Canlılık (%)**	**İnhibisyon (%)**
0	100	0
2,5	98,6	1,4
5	96,1	3,9
10	90,5	9,5
25	84,2	15,8
50	72,8	27,2
100	70	30

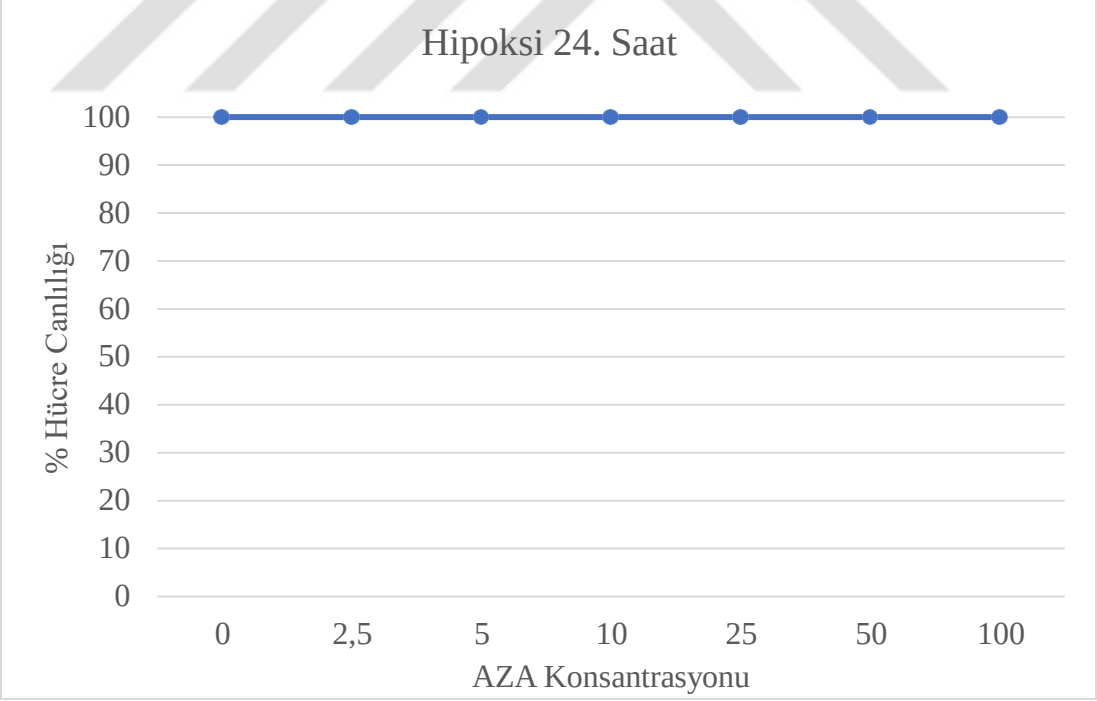


Şekil 4.3. AZA ile normoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik.

Hipoksik ortamda 24 saat AZA ile muamele edilen hücreler için 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 ve 1 µM konsantrasyonlarında canlılık oranları bütün hücreler için % 100 olarak bulunmuştur (Tablo 4.2) (Şekil 4.4).

Tablo 4.2. AZA ile hipoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

Hipoksi 24. Saat Değerleri (AZA)		
Konsantrasyon	**Canlılık (%)**	**İnhibisyon (%)**
0	100	0
2,5	100	0
5	100	0
10	100	0
25	100	0
50	100	0
100	100	0

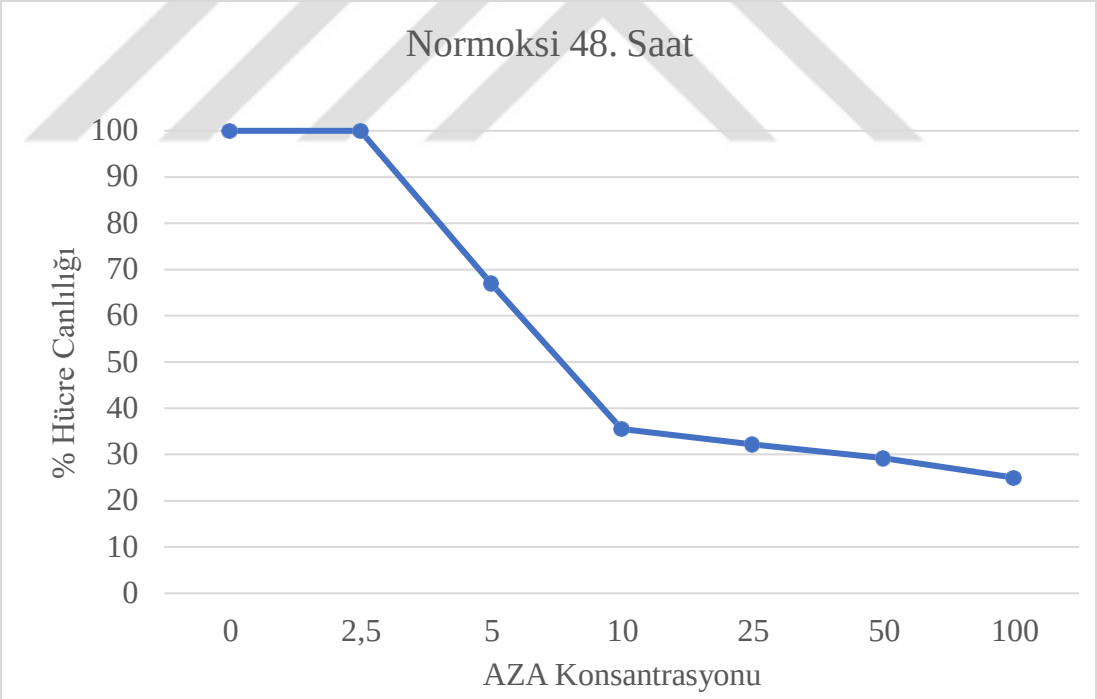


Şekil 4.4. AZA ile hipoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik.

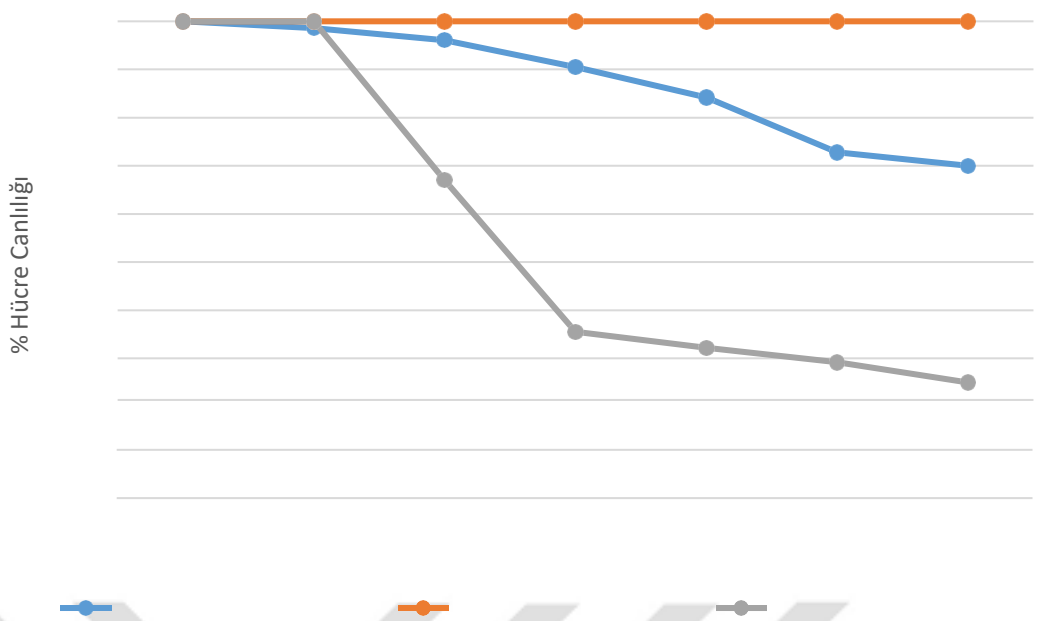
Normoksik ortamda 48 saat AZA ile muamele edilen hücreler için 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 ve 1 µM konsantrasyonlarında canlılık oranları sırasıyla % 100, % 100, % 67, % 35,5, % 32,2, % 29,2, % 25 olarak bulunmuştur. (Tablo 4.3) (Şekil 4.5).

Tablo 4.3. AZA ile normoksik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon Değerleri.

Normoksi 48. Saat Değerleri (AZA)		
Konsantrasyon	**Canlılık (%)**	**İnhibisyon (%)**
0	100	0
2,5	100	0
5	67	33
10	35,5	64,5
25	32,2	67,8
50	29,2	70,8
100	25	75



Şekil 4.5. AZA ile normoksik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik.



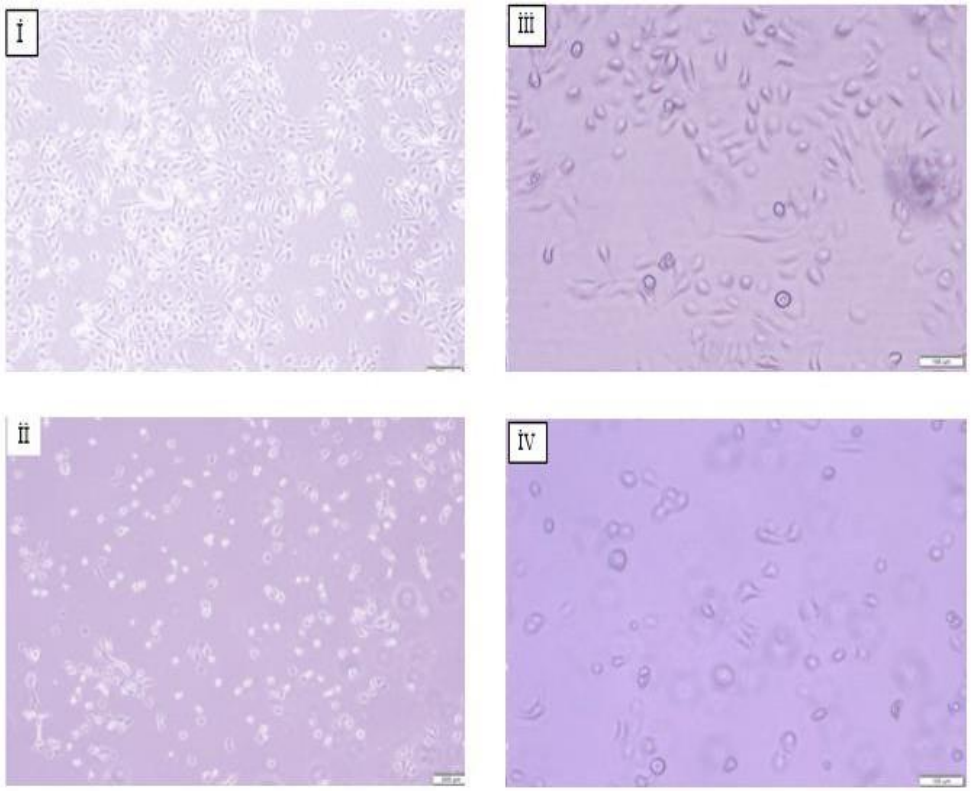
Şekil 4.6. Farklı zaman dilimi, koşul ve konsantrasyonlarda AZA ygulaması yapılan CAKI-2 hücre hattında % hücre canlılığının gösterimi.

AZA CAKI-2 hücreleri üzerinde değişen ortam koşulları altında IC_{50} değerleri GraphPad Prism 9.1.0 programında hesaplanmış ve Tablo 4.4.'te sunulmuştur. CAKI-2 hücre hattı için uygulanacak olan AZA konsantrasyonu 8.65 µM olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.4. AZA'nın CAKI-2 hücreleri için hesaplanan IC_{50} Değerleri.

Ortam/Zaman	IC50 (µM)
Normoksi-24 AZA	275.6
Normoksi-48 AZA	8,65
Hipoksi-24 AZA	Belirlenemedi

AZA'nın hücreler üzerindeki etkisini gözlemlemek amacı ile fotoğrafları inverted mikroskop ile çekilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. AZA uygulaması öncesi ve sonrası CAKI-2 hücre hattına ait görüntüler. i) CAKI-2 hücre hattının AZA uygulanmadan önce görüntüsü (Bar: 200 µM) ii) CAKI-2 hücre hattının AZA uygulanmadan önce görüntüsü (Bar: 100 µM) iii)) CAKI-2 hücre hattının AZA uygulandıktan 48 saat sonra görüntüsü (Bar: 200 µM) iv) CAKI-2 hücre hattının AZA uygulandıktan 48 saat sonra görüntüsü (Bar: 100 µM).

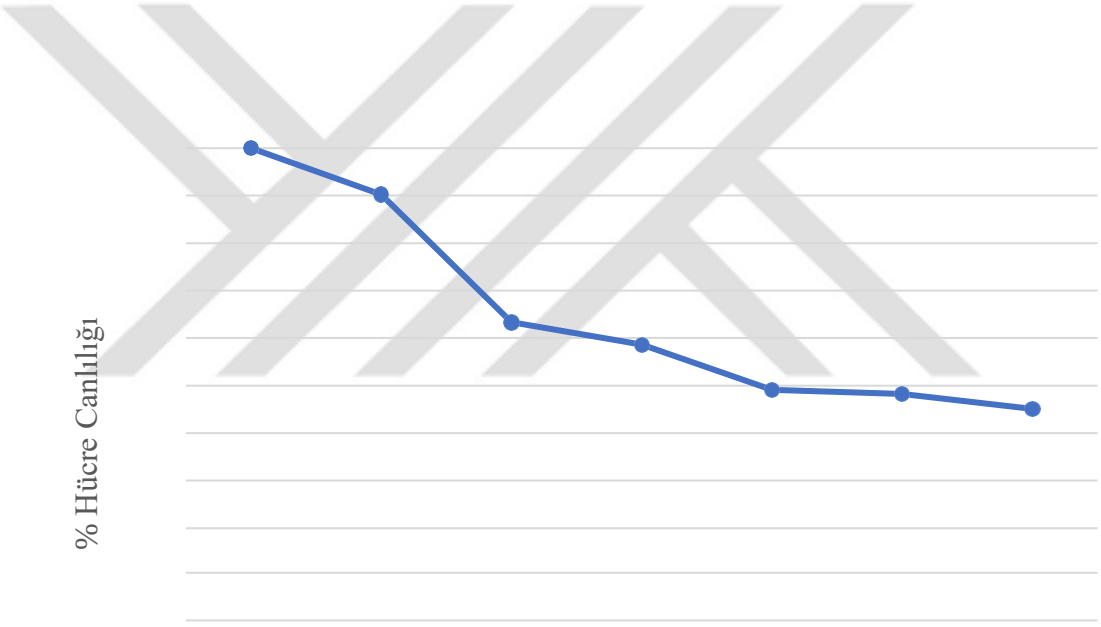
4.2.2. RAPA'nın CAKI-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

RAPA'nın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 ve 1 µM konsantrasyonlarında hücrelere muamele edilmiştir. Sonrasında 24 saat normoksi, 24 saat hipoksi ve 48 saat normoksi koşullarında inkübasyona bırakılmıştır.

Normoksik ortamda 24 saat RAPA ile muamele edilen hücreler için 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 ve 1 µM konsantrasyonlarında sırasıyla canlılık oranları % 100, % 90,2, % 63,3, % 58,6, % 49,1, % 48,2 ve % 45,1 olarak bulunmuştur (Tablo 4.5) (Şekil 4.8).

Tablo 4.5. RAPA ile normoksik koşullarda 24 Saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

Normoksi 24. Saat Değerleri (RAPA)		
Konsantrasyon	**Canlılık (%)**	**İnhibisyon (%)**
0	100	0
2,5	90,2	9,8
5	63,3	36,7
10	58,6	41,4
25	49,1	50,9
50	48,2	51,8
100	45,1	54,9

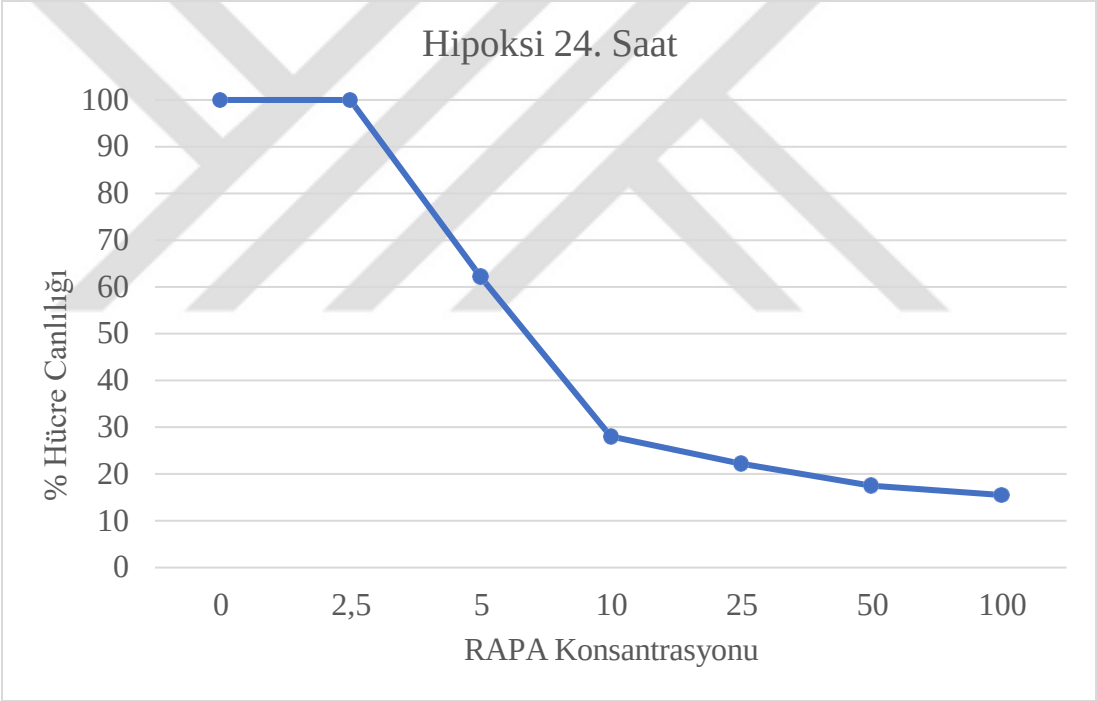


Şekil 4.8. RAPA ile normoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik.

Hipoksik ortamda 24 saat RAPA ile muamele edilen hücreler için 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 ve 1 µM konsantrasyonlarında canlılık oranları sırasıyla % 100, % 100, % 62,2, % 28, % 22,2, % 17,5, % 15,5 olarak bulunmuştur (Tablo 4.6) (Şekil 4.9).

Tablo 4.6. RAPA ile hipoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

Hipoksi 24. Saat Değerleri (RAPA)		
Konsantrasyon	**Canlılık (%)**	**İnhibisyon (%)**
0	100	0
2,5	100	0
5	62,2	37,8
10	28	72
25	22,2	77,8
50	17,5	82,5
100	15,5	84,5

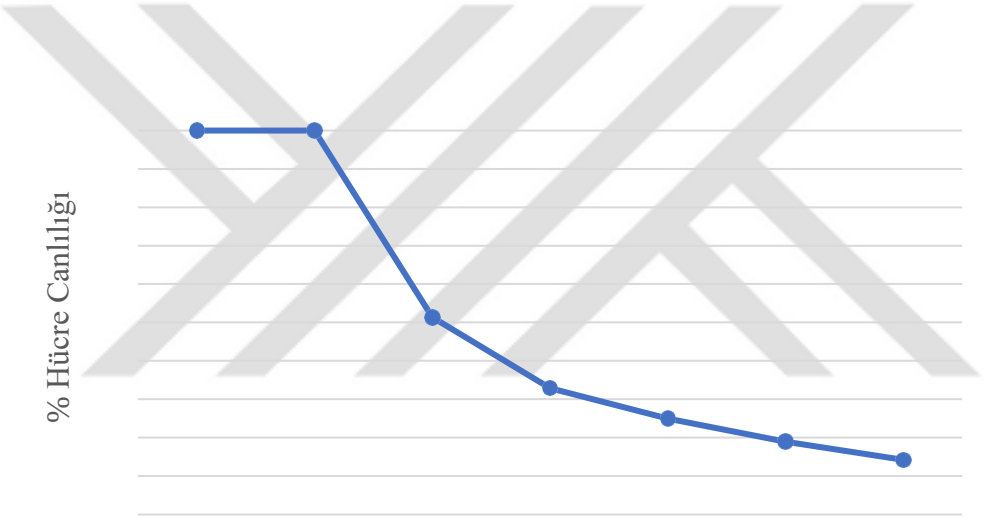


Şekil 4.9. RAPA ile hipoksik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik.

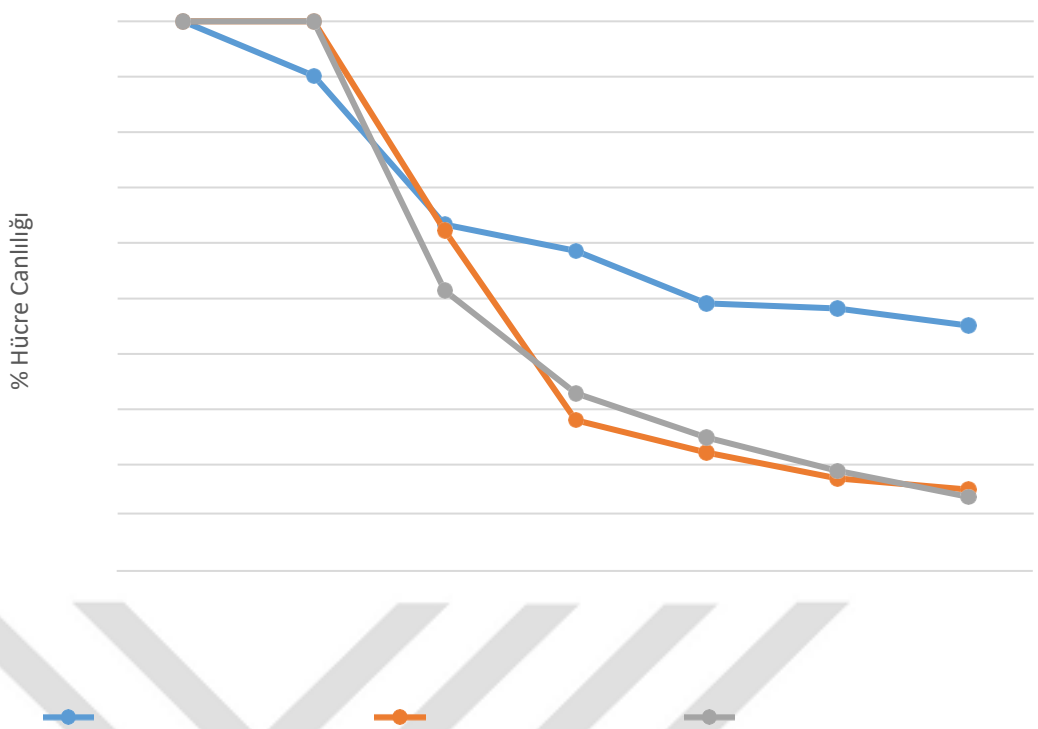
Normoksik ortamda 48 saat RAPA ile muamele edilen hücreler için 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 ve 1 µM konsantrasyonlarında canlılık oranları sırasıyla % 100, % 100, % 51,4, % 32,9, % 24,9, % 18,9 ve % 14,2 olarak bulunmuştur (Tablo 4.7) (Şekil 4.10).

Tablo 4.7. RAPA ile normoksik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

Normoksi 48. Saat Değerleri (RAPA)		
Konsantrasyon	**Canlılık (%)**	**İnhibisyon (%)**
0	100	0
2,5	100	0
5	51,4	48,6
10	32,9	67,1
25	24,9	75,1
50	18,9	81,1
100	14,2	85,8



Şekil 4.10. RAPA ile normoksik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılan CAKI-2 hücrelerinin % canlılık değerlerine ait grafik.



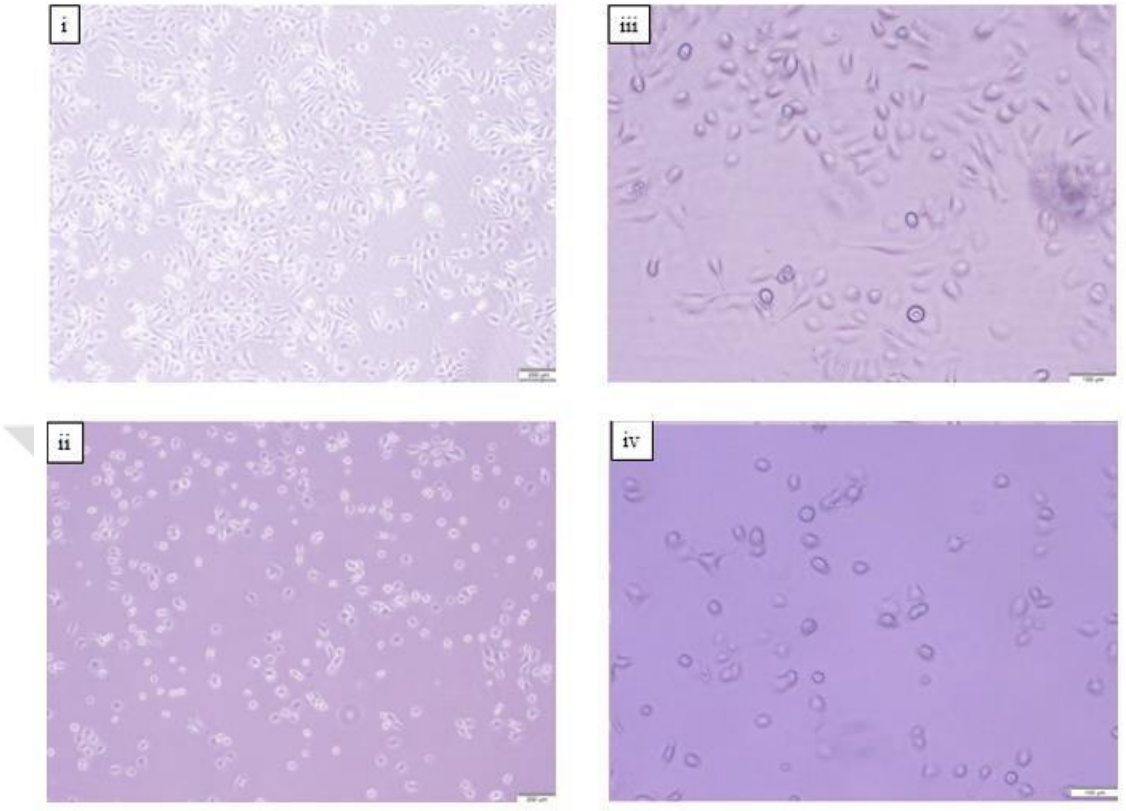
Şekil 4.11. Farklı zaman dilimi, koşul ve konsantrasyonlarda RAPA uygulaması yapılan CAKI-2 hücre hattında % hücre canlılığının gösterimi.

RAPA'nın CAKI-2 hücreleri üzerinde değişen ortam koşulları altında IC_{50} değerleri GraphPad Prism 9.1.0 programında hesaplanmış ve Tablo 4.8.'de sunulmuştur. CAKI-2 hücre hattı için uygulanacak olan RAPA konsantrasyonu 7,98 µM olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.8. RAPA'nın CAKI-2 hücreleri için hesaplanan IC_{50} Değerleri.

Ortam/Zaman	IC50 (µM)
Normoksi-24 RAPA	36,75
Normoksi-48 RAPA	7,98
Hipoksi-24 RAPA	7,81

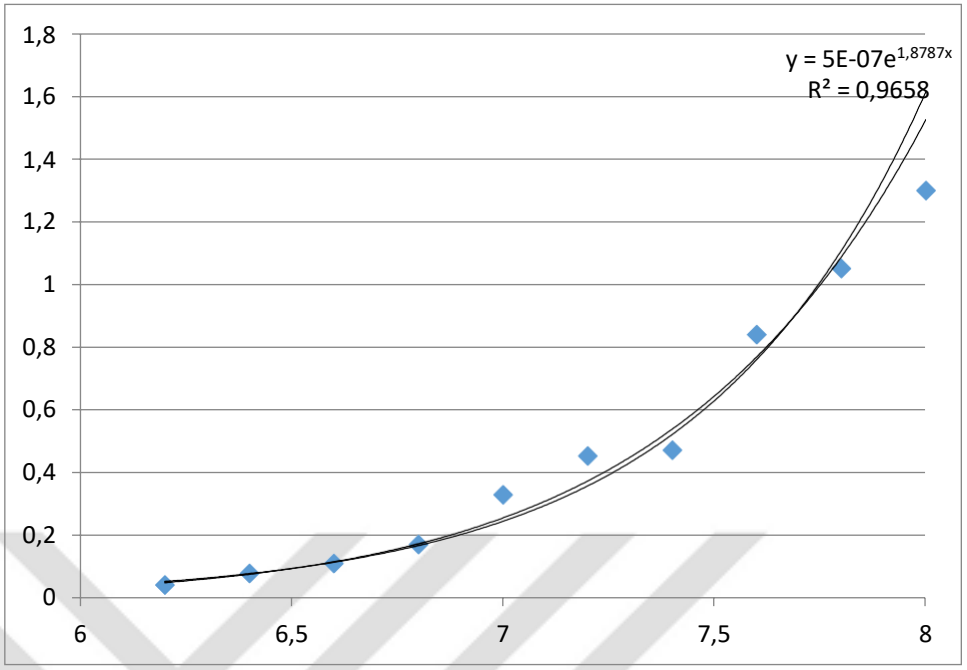
RAPA'nın hücreler üzerindeki etkisini gözlemlemek amacı ile fotoğrafları inverted mikroskop ile çekilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. RAPA uygulaması öncesi ve sonrası CAKI-2 hücre hattına ait görüntüler. i) CAKI-2 hücre hattının RAPA uygulanmadan önce görüntüsü (Bar: 200 µM) ii) CAKI-2 hücre hattının RAPA uygulanmadan önce görüntüsü (Bar: 100 µM) iii) CAKI-2 hücre hattının RAPA uygulandıktan 48 saat sonra görüntüsü (Bar: 200 µM) iv) CAKI-2 hücre hattının RAPA uygulandıktan 48 saat sonra görüntüsü (Bar: 100 µM).

4.3. İnhibitör Uygulaması Öncesi ve Sonrası CA-IX İnhibisyonunun Doğrulanması

Hipoksi öncesi/sonrası ortam pH değişiminin doğrulanması ve inhibitör uygulaması öncesi/sonrası CA-IX inhibisyonunun doğrulanması için bir pH indikatörü olan Fenol kırmızısı ile pH standardizasyonu çalışması yapılmıştır. Spektrofotometre kullanılarak absorbiyona bağlı pH grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.13). Ölçüm 460, 560 ve 720 nm olmak üzere üç farklı dalgaboyunda yapılmıştır. Çalışmada 460 nm dalgaboyu referans olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.13. Fenol red kullanılarak oluşturulan absorbsiyona bağlı pH grafiği

Oluşturduğumuz standart grafiğe göre normoksik ve hipoksik koşullarda pH ölçümü yapıldığında ortam pH'sının normoksik ortamda 7.0 iken hipoksik ortamda 6.3'e düştüğü gözlemlenmiştir (Tablo 4.9). Bu durum bize hipoksik ortamda CA-IX ekspresyonunun artmasından dolayı ortamdaki asidifikasyonun azaldığını gösterebilir.

Tablo 4.9. Oluşturulan standart grafiğe göre normoksik ve hipoksik ortamdaki pH Değerleri.

CAKI-2	Normoksi	Hipoksi
Absorbans Değerleri (OD)	0,26	0,074
pH Değerleri	7	6,3

Ayrıca oluşturulan standart grafik kullanılarak hücrelerin AZA, RAPA uygulanmış ve inhibitör uygulanmamış hallerinin pH değerleri karşılaştırılmıştır. İnhibitör uygulanmayan hücrelerde pH 6,93; AZA ve RAPA uygulananlarda ise sırasıyla 7,27 ve 6,43 olarak bulunmuştur (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Oluşturulan standart grafiğe göre inhibitörsüz, AZA ve RAPA uygulanan ortamdaki pH Değerleri.

CAKI-2	İnhibitörsüz	AZA	RAPA
Absorbans Değerleri (OD)	0,226	0,429	0,089
pH Değerleri	6,93	7,27	6,43

4.4. Normoksik ve Hipoksik Koşulların HIF1-α ve CA-IX Gen Düzeylerine Olan Etkisi

Normoksik ve hipoksik koşullar altında CAKI-2 hücre hattında HIF1A ve CA9 gen ekspresyonlarını belirlemek için qPCR analizi yapılmıştır. Bu analiz sırasında kontrol olarak GAPDH kullanılmıştır. Analiz 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Plate dizaynı şekil 4.14'deki gibidir.

HIF1A	**CAKI (H)**	HIF1A	**CAKI (H)**	HIF1A	**CAKI (N)**	HIF1A
CA9	**CAKI (H)**	CA9	**CAKI (H)**	CA9	**CAKI (N)**	CA9
GAPDH	**CAKI (H)**	GAPDH	**CAKI (H)**	GAPDH	**CAKI (N)**	GAPDH
HIF1A	**CAKI (H)**	HIF1A	**CAKI (N)**	HIF1A	**CAKI (N)**	HIF1A
CA9	**CAKI (H)**	CA9	**CAKI (N)**	CA9	**CAKI (N)**	CA9
GAPDH	**CAKI (H)**	GAPDH	**CAKI (N)**	GAPDH	**CAKI (N)**	GAPDH

Şekil 4.14. qPCR analizi için yapılan plate dizaynı (N=Normoksi, H=Hipoksi).

Analiz sonucunda hem normoksik hem de hipoksik koşullar altında CAKI-2 hücre hattında HIF1A mRNA seviyelerine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. HIF1A qPCR analizine ait veriler Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11. HIF1A qPCR analizine ait veriler.

Gen	Ortalama Ct		Delta Ct (ΔCt)		2^(ΔΔCt)		p Değeri	Kat Değişimi
Ortam	Normoksik	Hipoksik	Normoksik	Hipoksik	Normoksik	Hipoksik		
HIF1A	40.00	38.60	7.06	9.16	0.007512	0.001748	0.567176	0.23
GAPDH	32.94	29.44	0.00	0.00	1.000000	1.000000	N/A	1

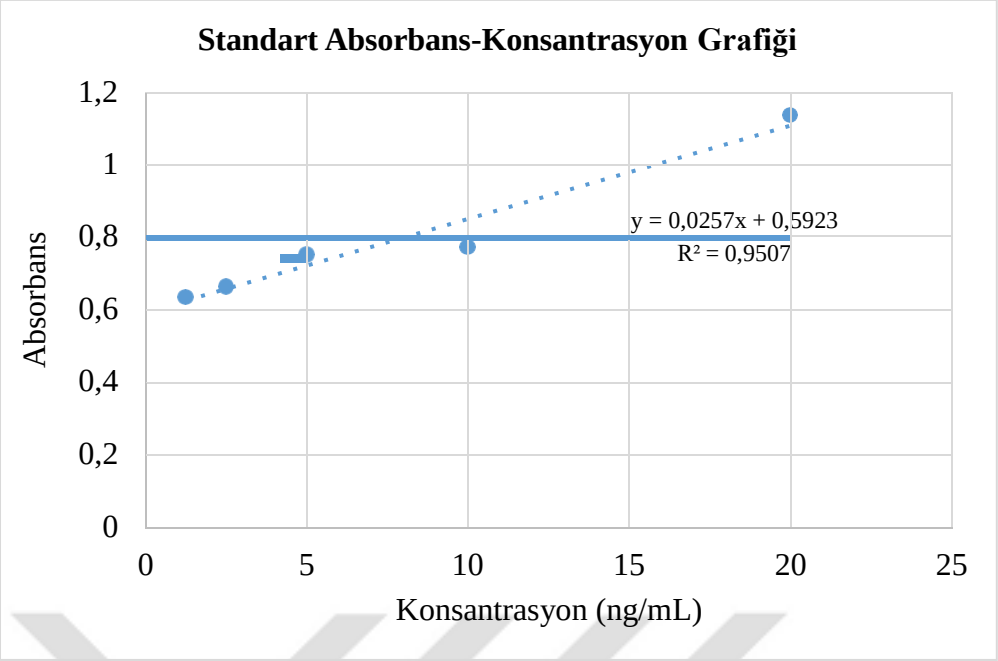
Analiz sonucunda hem normoksik hem de hipoksik koşullar altında CAKI-2 hücre hattında CA9 mRNA seviyelerine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. CA9 qPCR analizine ait veriler Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12. CA9 qPCR analizine ait veriler.

Gen	Ortalama Ct		Delta Ct (ΔCt)		2^(ΔΔCt)		p Değeri	Kat Değişimi
Ortam	Normoksik	Hipoksik	Normoksik	Hipoksik	Normoksik	Hipoksik		
CA9	40.00	38.16	7.06	8.72	0.007512	0.002371	0.844538	0.32
GAPDH	32.94	29.44	0.00	0.00	1.000000	1.000000	N/A	1

4.5. AZA Uygulanmasının CA-IX Üzerine Olan Etkisi

CAKI-2 hücrelerinde AZA uygulanmasının CA-IX üzerine olan etkisinin belirlenmesi için ELISA testi yapılmıştır. Ölçümler hücre lizatından 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. CA-IX seviyelerinin ölçülebilmesi için kit içinden çıkan standart solüsyonlar ile standart absorbans/konsantrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.15). Daha sonra AZA uygulanan ve uygulanmayan hücrelerdeki absorbans değerleri ölçülerek standart grafiğe göre hesaplanıp CA-IX düzeylerindeki değişim belirlenmiştir (Tablo 4.13).

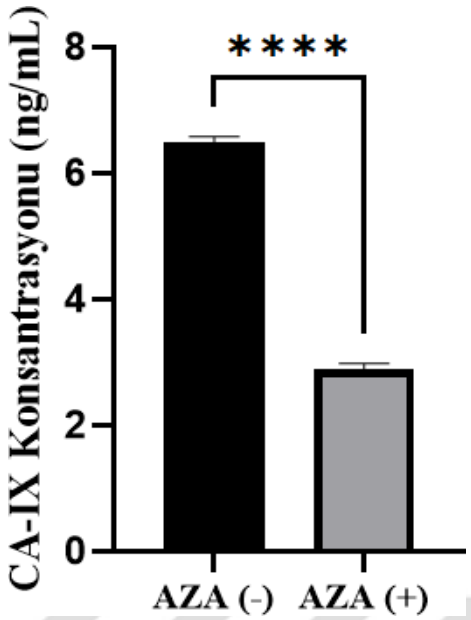


Şekil 4.15. CA-IX seviyelerinin ölçümü için oluşturulmuş standart grafik.

Tablo 4.13. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerine ait absorbans ve konsantrasyon değerleri.

Hücre Hattı	OD	Konsantrasyon (ng/mL)
AZA Uygulanmayan CAKI-2 Hücre Hattı	0,759	6,48
AZA Uygulanan CAKI-2 Hücre Hattı	0,651	2,88

Standart grafiğe göre olan yapılan ölçümler sonucu AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde CA-IX konsantrasyonu 6.48 ng/mL olarak, AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde ise 2,88 ng/mL olarak bulunmuştur ($p<0.0001$) (Şekil 4.16).

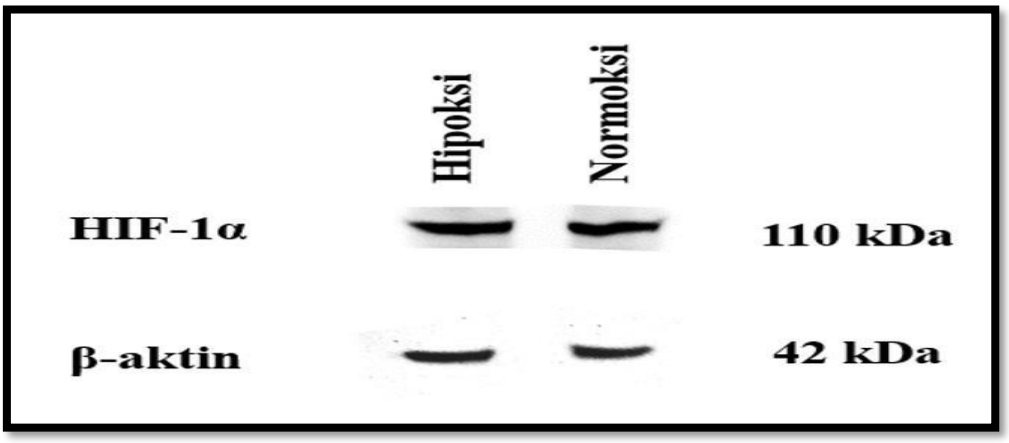


Şekil 4.16. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX konsantrasyonları.

4.6. Western Blot Analizlerine Ait Bulgular

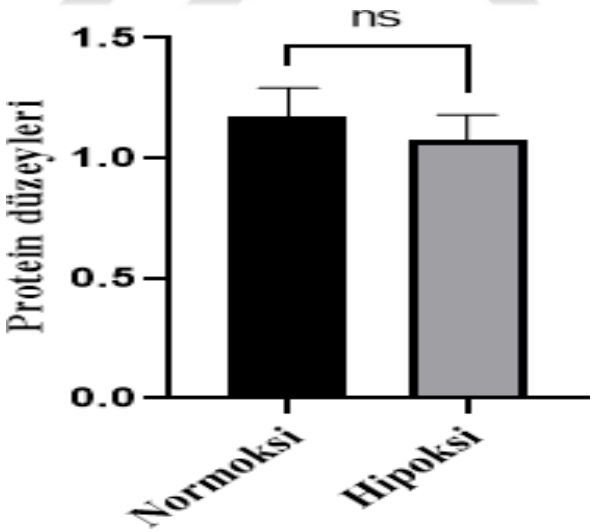
4.6.1. HIF1-α Protein Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

Normoksik ve hipoksik koşullardaki CAKI-2 hücrelerinde HIF1-α protein düzeyleri Western Blot analizi ile belirlenmiştir. Protein seviyelerinin değerlendirilmesinde ImageJ programı kullanılmıştır. Protein ekspresyonları kontrol olarak kullanılan β-Aktin ile normalize edilmiştir. Proteinlere ait bant görüntüleri şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. Normoksik ve hipoksik koşullarda CAKI-2 hücrelerinde HIF1-α proteinine ait bant görüntüleri.

Western Blot analizinden elde edilen veriler Graphpad Prism 9.1.0 programında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Normoksik ve hipoksik koşullar altında HIF1-α protein seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.18).

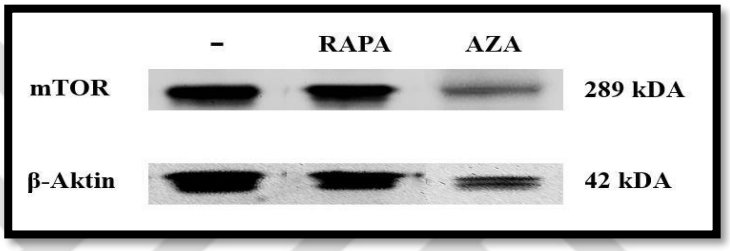


HIF1α'ya ait Normalizasyon Verileri		
HIF1α	**Hipoksi**	**Normoksi**
	1,07643	1,17198627

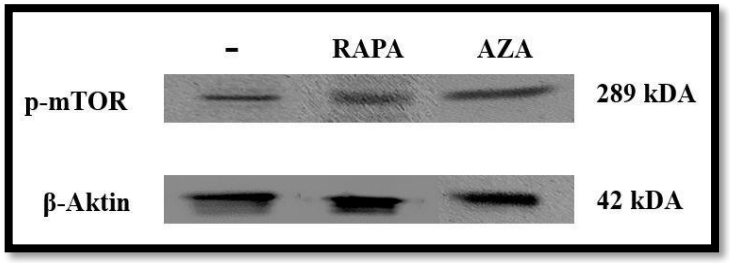
Şekil 4.18. CAKI-2 hücrelerinde hipoksik ve normoksik koşullarda HIF1-α western blot analizin karşılaştırmalı grafiği (ns;not-significant;istatistiksel olarak anlamlı değil).

4.6.2. mTOR ve p-mTOR Protein Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

CAKI-2 hücrelerinde mTOR VE p-mTOR protein düzeyleri Western Blot analizi ile belirlenmiştir. mTOR aktive olduğunda fosforillenirler. Bu sebeple bu çalışmada bu mTOR'un aktifleşip aktifleşmediğini göstermek amacıyla p-mTOR'a (fosforile) bakılmıştır. Protein seviyelerinin değerlendirilmesinde ImageJ programı kullanılmıştır. Protein ekspresyonları kontrol olarak kullanılan β-Aktin ile normalize edilmiştir. Proteinlere ait bant görüntüleri şekil 4.19 ve 4.20'de verilmiştir.

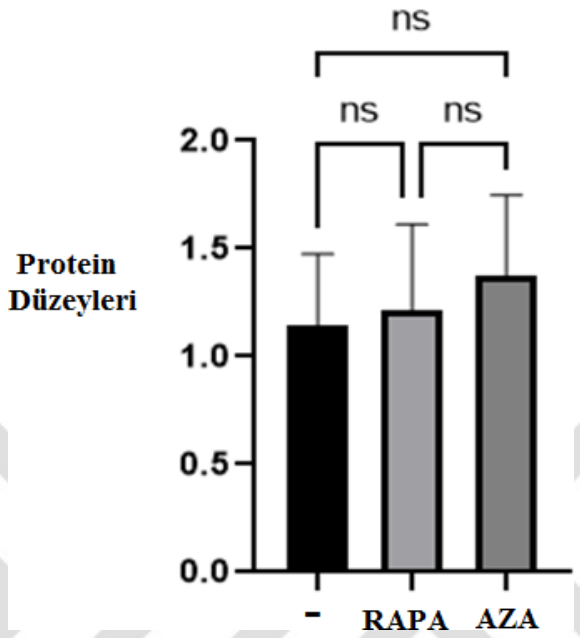


Şekil 4.19. CAKI-2 hücrelerinde mTOR proteinine ait bant görüntüleri.



Şekil 4.20. CAKI-2 hücrelerinde p-mTOR proteinine ait bant görüntüleri.

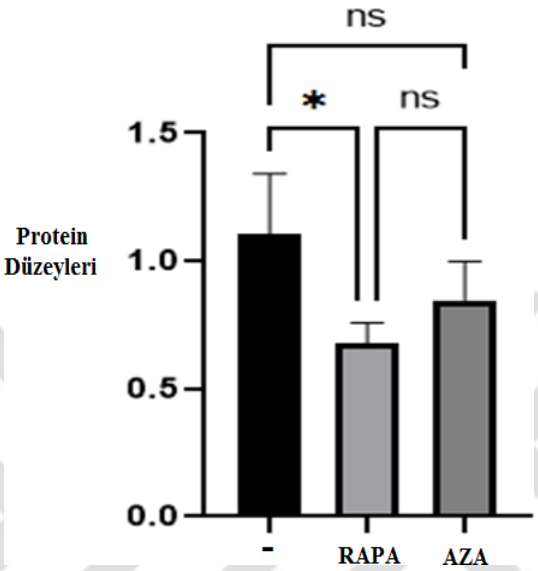
Western Blot analizinden elde edilen veriler Graphpad Prism 9.1.0 programında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. mTOR protein seviyeleri açısından üç grup arasında da anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.21).



m-TOR'a ait Normalizasyon Verileri			
m-TOR	**İnhibitörsüz**	**RAPA**	**AZA**
	1,1450158	1,2154295	1,37185

Şekil 4.21. CAKI-2 hücrelerinin mTOR western blot analizinin karşılaştırmalı grafiği (ns; not-significant;istatistiksel olarak anlamlı değil).

p-mTOR protein seviyeleri açısından inhibitörsüz grup ve RAPA uygulanan grup karşılaştırıldığında RAPA uygulanan grupta anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$). İnhibitörsüz ve AZA uygulanan grup karşılaştırıldığında ise AZA uygulanan grupta protein seviyelerinde düşüş görülmüştür. Ancak bu düşüş anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.22).

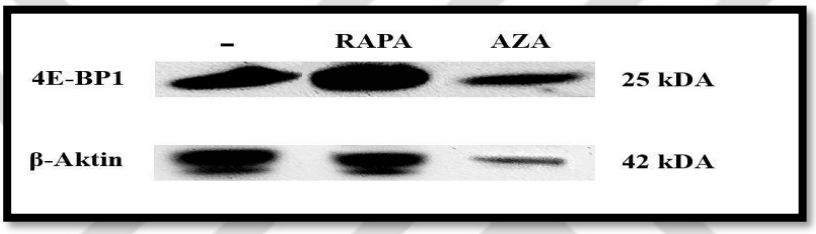


p-m-TOR'a ait Normalizasyon Verileri			
p-mTOR	**İnhibitörsüz**	**RAPA**	**AZA**
	1,104493	0,73087633	0,84635

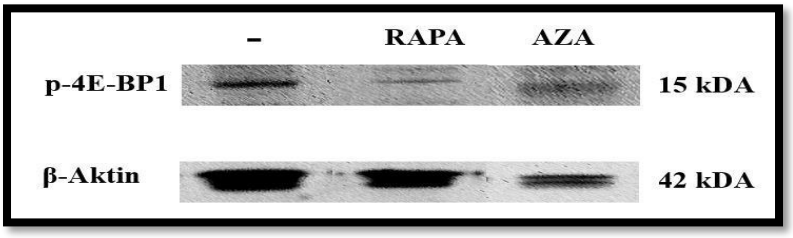
Şekil 4.22. CAKI-2 hücrelerinin p-mTOR western blot analizinin karşılaştırmalı grafiği (ns;not-significant;istatistiksel olarak anlamlı değil).

4.6.3. 4E-BP1 ve p-4E-BP1 Protein Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

CAKI-2 hücrelerinde 4E-BP1 ve p-4E-BP1 protein düzeyleri Western Blot analizi ile belirlenmiştir. Çalışmada 4E-BP1'in aktifleşip aktifleşmediğini göstermek amacıyla p-4EBP1'e (fosforile) bakılmıştır. Protein seviyelerinin değerlendirilmesinde ImageJ programı kullanılmıştır. Protein ekspresyonları kontrol olarak kullanılan β-Aktin ile normalize edilmiştir. Proteinlere ait bant görüntüleri şekil 4.23 ve 4.24'de verilmiştir.

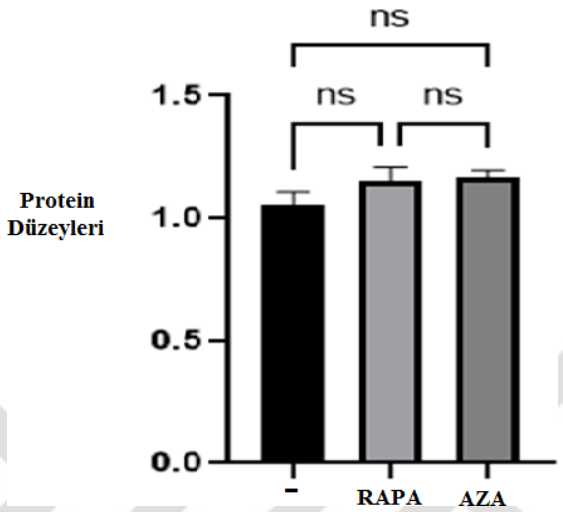


Şekil 4.23. CAKI-2 hücrelerinde 4E-BP1 proteinine ait bant görüntüleri.



Şekil 4.24. CAKI-2 hücrelerinde p-4E-BP1 proteinine ait bant görüntüleri.

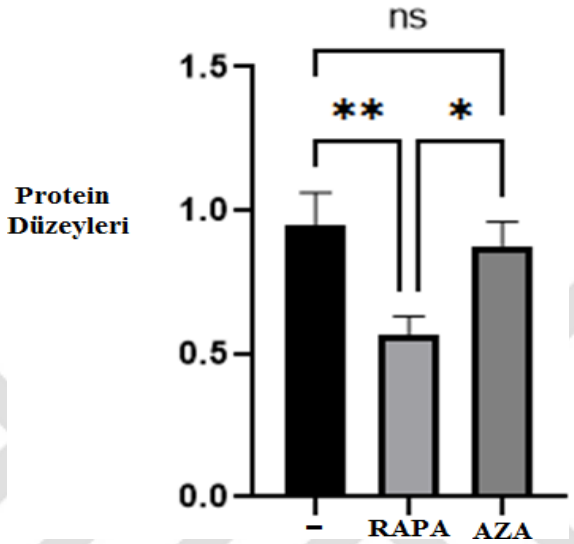
Western Blot analizinden elde edilen veriler Graphpad Prism 9.1.0 programında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. 4E-BP1 protein seviyeleri açısından üç grup arasında da anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.25).



4EBP1'e ait Normalizasyon Verileri			
4EBP1	**İnhibitörsüz**	**RAPA**	**AZA**
	1,0530907	1,15359713	1,23362

Şekil 4.25. CAKI-2 hücrelerinin 4E-BP1 western blot analizinin karşılaştırmalı grafiği (ns;not-significant;istatistiksel olarak anlamlı değil).

p-4E-BP1 protein seviyeleri açısından inhibitörsüz grup ve RAPA uygulanan grup karşılaştırıldığında RAPA uygulanan grupta anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$). İnhibitörsüz ve AZA uygulanan grup karşılaştırıldığında ise AZA uygulanan grupta protein seviyelerinde düşüş görülmüştür. Ancak bu düşüş anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.26).



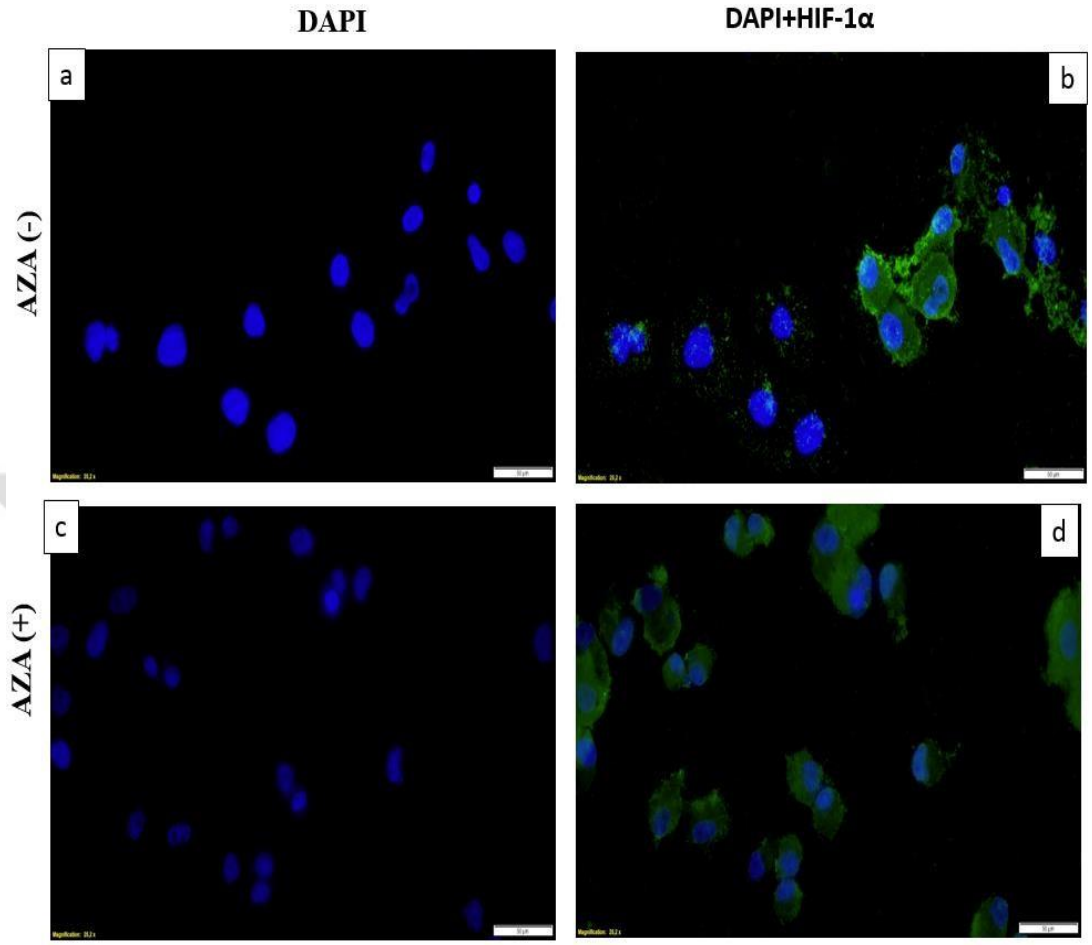
p-4EBP1'e ait Normalizasyon Verileri			
p-4EBP1	**İnhibitörsüz**	**RAPA**	**AZA**
	0,9454623	0,56516867	0,87717

Şekil 4.26. CAKI-2 hücrelerinin p-4E-BP1 western blot analizinin karşılaştırmalı grafiği (ns;not-significant;istatistiksel olarak anlamlı değil).

4.7. İmmünofloresan Boyama Bulguları

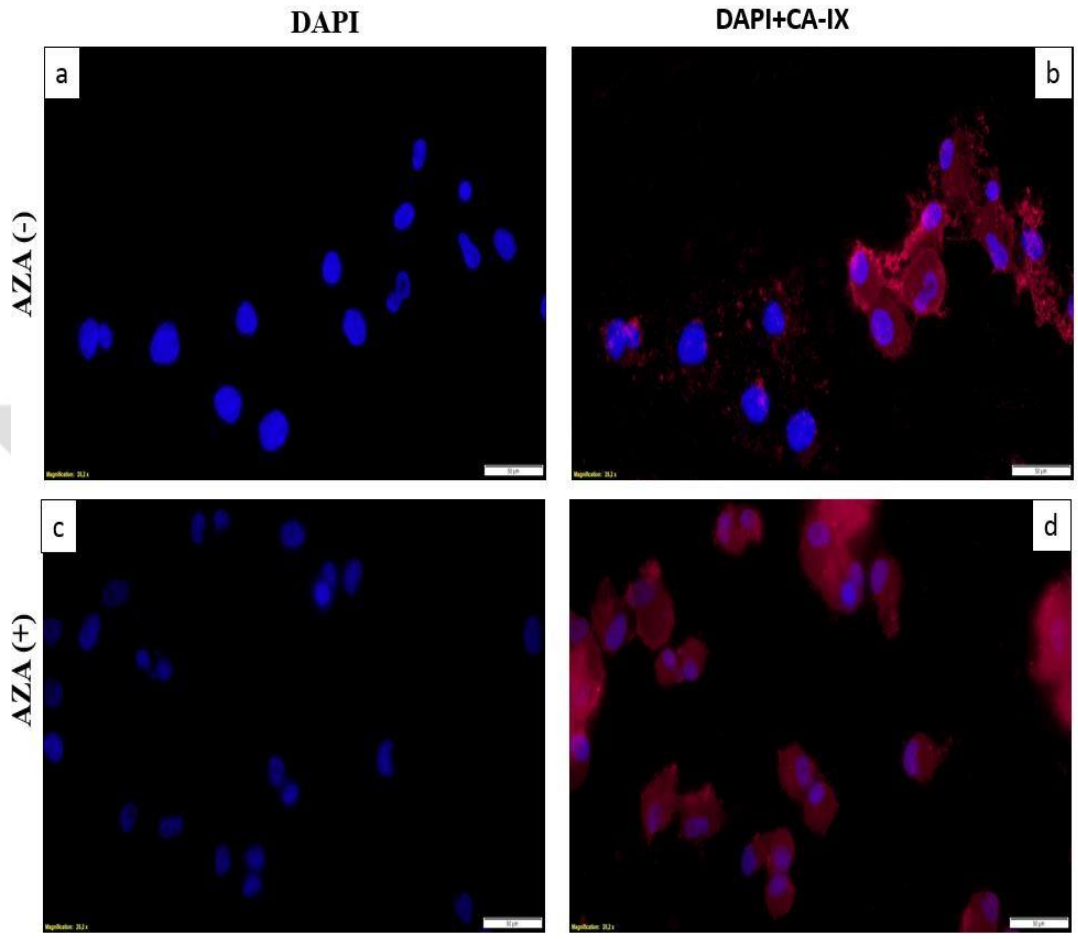
Yapmış olduğumuz çalışmada AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücre hatlarında HIF-1α, CA-IX, mTOR ve 4EBP1 proteinlerinin hücre içindeki yerleşimlerini belirlemek ve AZA'nın hücreler üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla İmmünofloresan boyama yapılmıştır. Bu amaçla bu proteinlere spesifik antikorlarla hücrelere muamele edilip bu proteinlerin varlıkları gösterilmiş ve AZA'nın etkisi belirlenmiştir.

AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde HIF-1α immünpozitifliğinde azalma görülmüştür (Şekil 4.27).



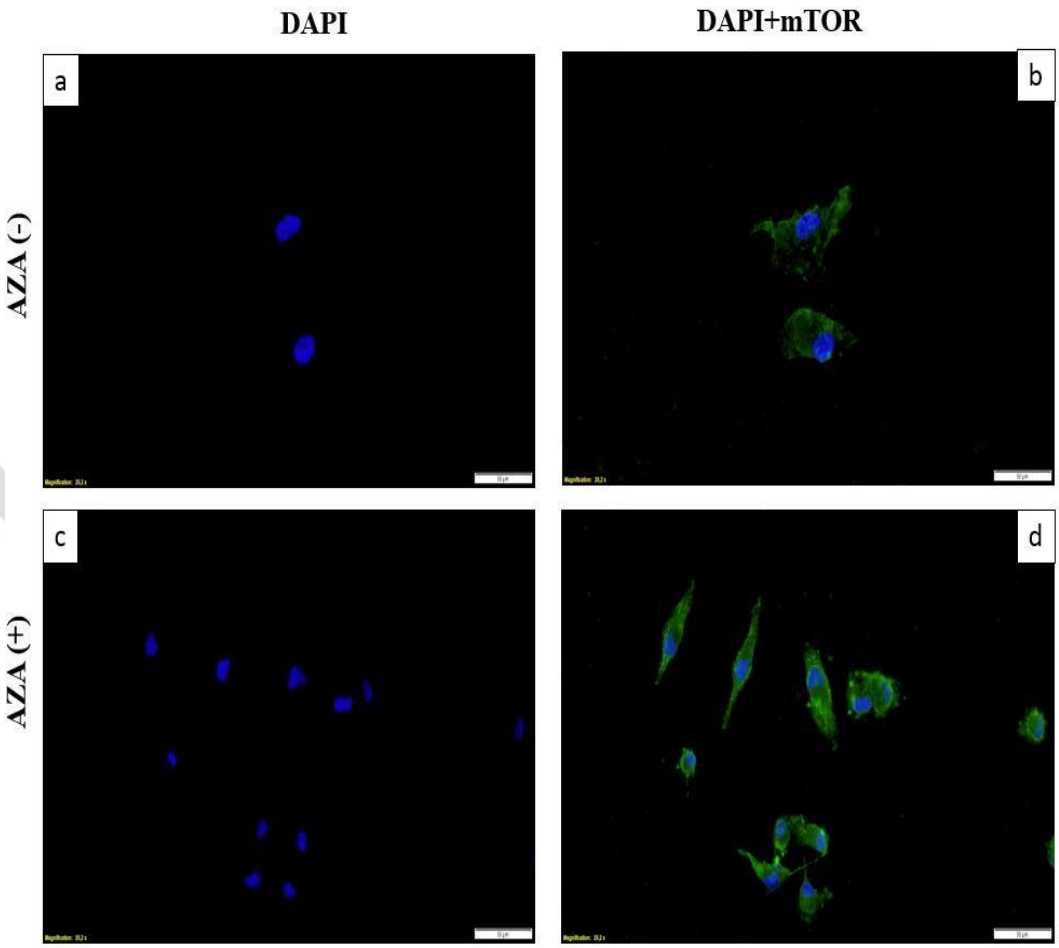
Şekil 4.27. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan boyanması ile gösterimi. a.)AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde DAPI boyaması (Bar: 50 μM) b.) AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde HIF-1α boyaması (Alexa Fluor® 488) (Bar: 50 μM) C) AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde DAPI boyaması (Bar: 50 μM) D) AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde HIF-1α boyaması (Alexa Fluor® 488) (Bar: 50 μM)

AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX immünpozitifliğinde azalma görülmüştür (Şekil 4.28).



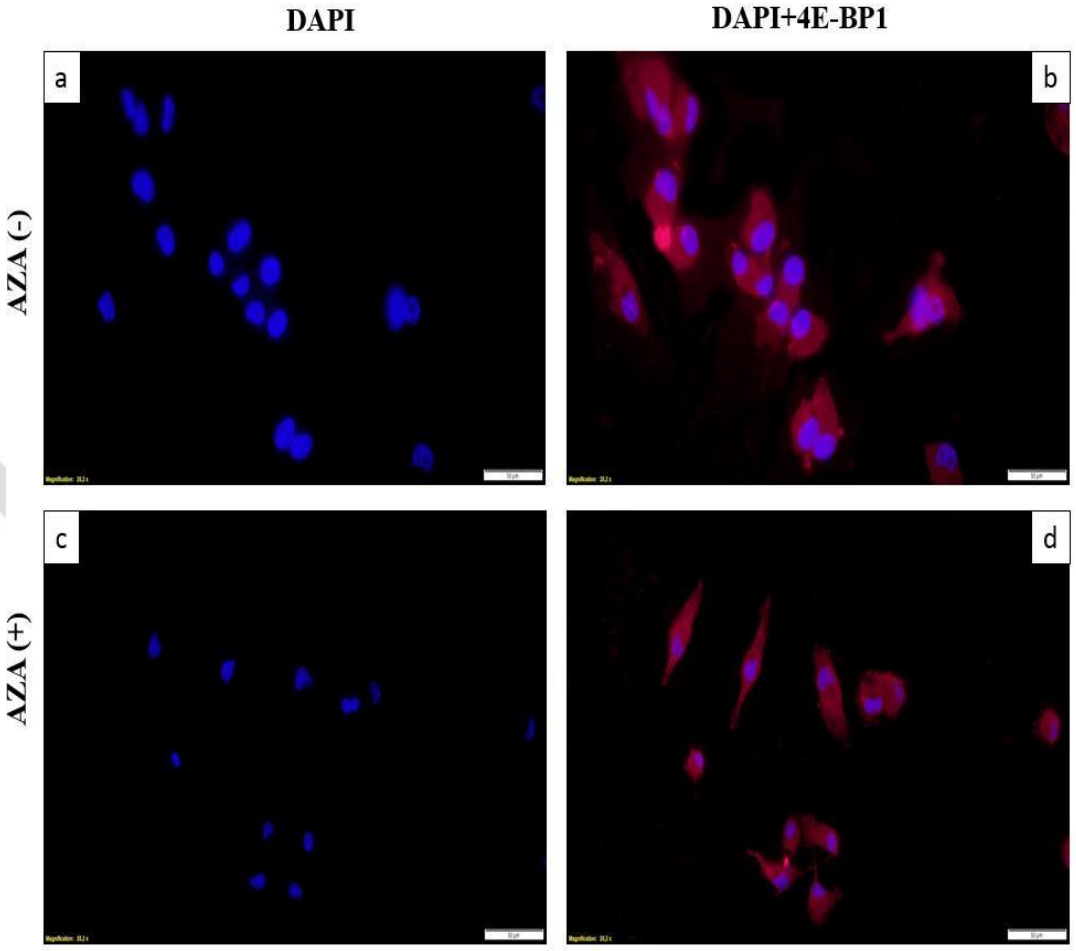
Şekil 4.28. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX protein ekspresyonunun immünofloresan boyanması ile gösterimi. a.)AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde DAPI boyaması (Bar: 50 μM) b.) AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde CA-IX boyaması (Texas Red®) (Bar: 50 μM) C) AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde DAPI boyaması (Bar: 50 μM) D) AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde CA-IX boyaması (Texas Red®) (Bar: 50 μM)

AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde mTOR immünpozitifliğinde değişim görülmemiştir (Şekil 4.29).



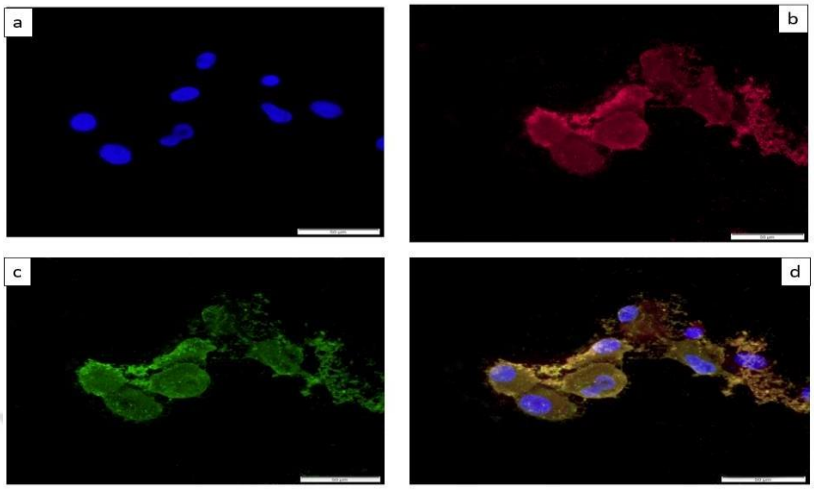
Şekil 4.29. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde mTOR protein ekspresyonunun immünofloresan boyanması ile gösterimi. a.)AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde DAPI boyaması (Bar: 50 μM) b.) AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde mTOR boyaması (Alexa Fluor® 488) (Bar: 50 μM) C) AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde DAPI boyaması (Bar: 50 μM) D) AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde mTOR boyaması (Alexa Fluor® 488) (Bar: 50 μM).

AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde 4E-BP1 immünpozitifliğinde değişim görülmemiştir (Şekil 4.30).



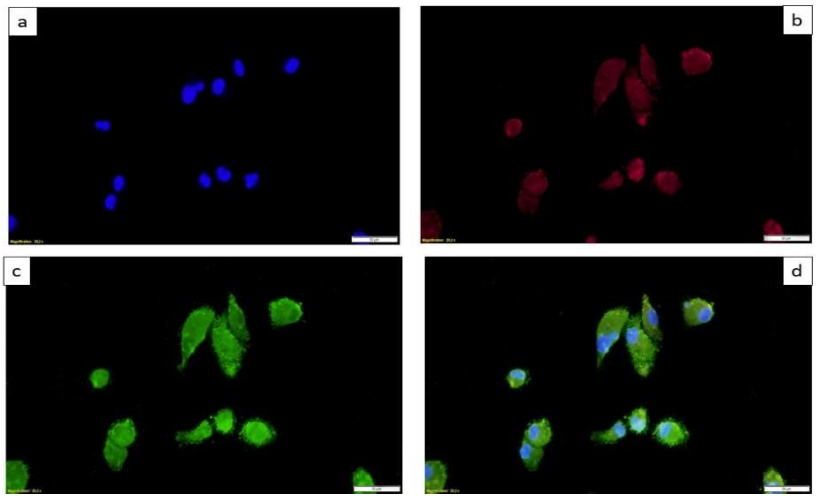
Şekil 4.30. AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde 4E-BP1 protein ekspresyonunun immünofloresan boyanması ile gösterimi. a.)AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde DAPI boyaması (Bar: 50 μM) b.) AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde 4E-BP1 boyaması (Texas Red®) (Bar: 50 μM) C) AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde DAPI boyaması (Bar: 50 μM) D) AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde 4E-BP1 boyaması (Texas Red®) (Bar: 50 μM).

AZA inhibitörü uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinin CA-IX/HIF-1α ekspresyonları Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



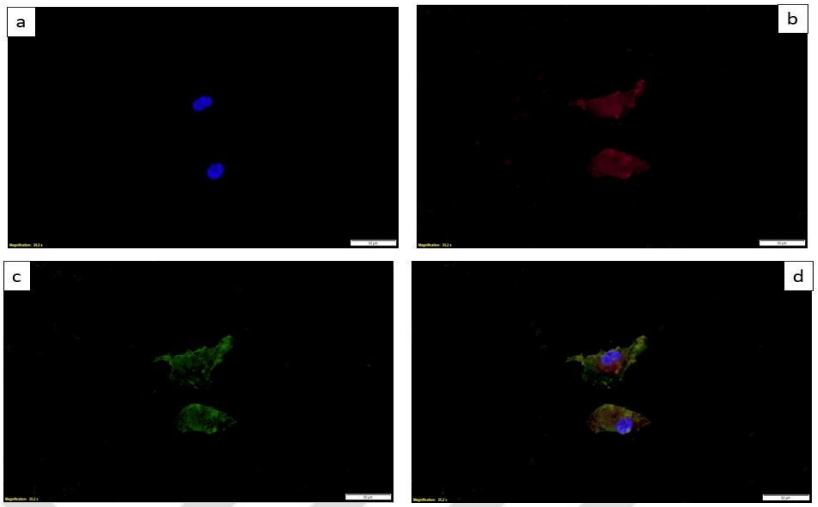
Şekil 4.31. AZA uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX/ HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi. a) DAPI boyaması (Bar: 50 µM) b) CA-IX boyaması (Texas Red®) (Bar: 50 µM) c) HIF-1α boyaması (Alexa Fluor® 488) (Bar: 50 µM) d) DAPI/CA-IX/ HIF-1α boyaması (Bar: 50 µM).

AZA inhibitörü uygulanmış CAKI-2 hücrelerinin CA-IX/HIF-1α ekspresyonları Şekil 4.32'de gösterilmiştir.



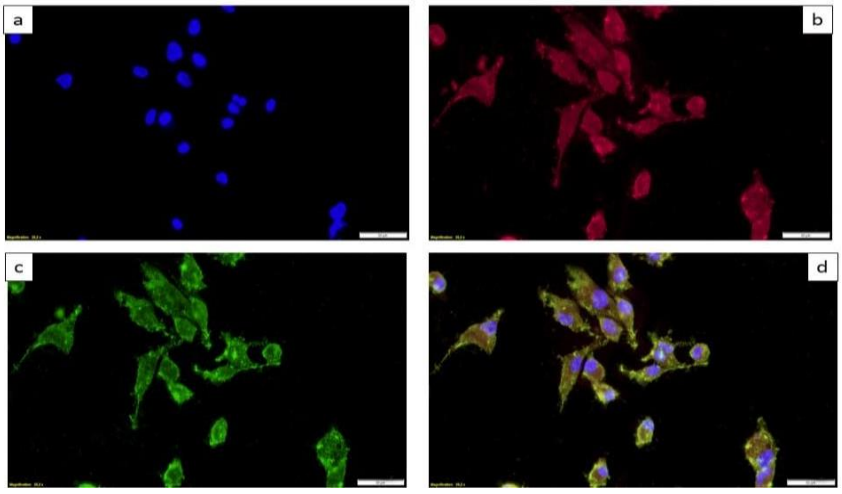
Şekil 4.32. AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX/ HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi. a) DAPI boyaması (Bar: 50 µM) b) CA-IX boyaması (Texas Red®)(Bar: 50 µM) c) HIF-1α boyaması (Alexa Fluor® 488) (Bar: 50 µM) d) DAPI/CA-IX/ HIF-1α boyaması (Bar: 50 µM).

AZA inhibitörü uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinin CA-IX/mTOR ekspresyonları Şekil 4.33'de gösterilmiştir.



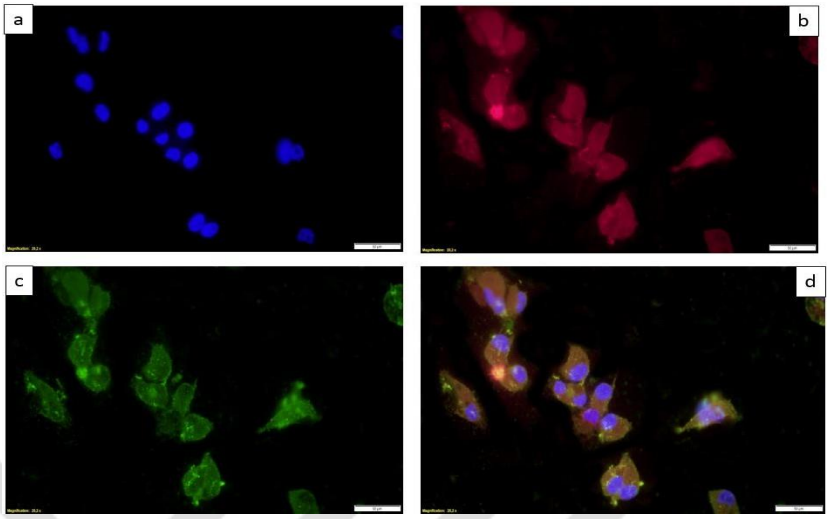
Şekil 4.33. AZA uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX/ mTOR protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi. a) DAPI boyaması (Bar: 50 µM) b) CA-IX boyaması (Texas Red®) (Bar: 50 µM) c) mTOR boyaması (Alexa Fluor® 488) (Bar: 50 µM) d) DAPI/CA-IX/ mTOR boyaması (Bar: 50 µM).

AZA inhibitörü uygulanmış CAKI-2 hücrelerinin CA-IX/mTOR ekspresyonları Şekil 4.34'de gösterilmiştir.



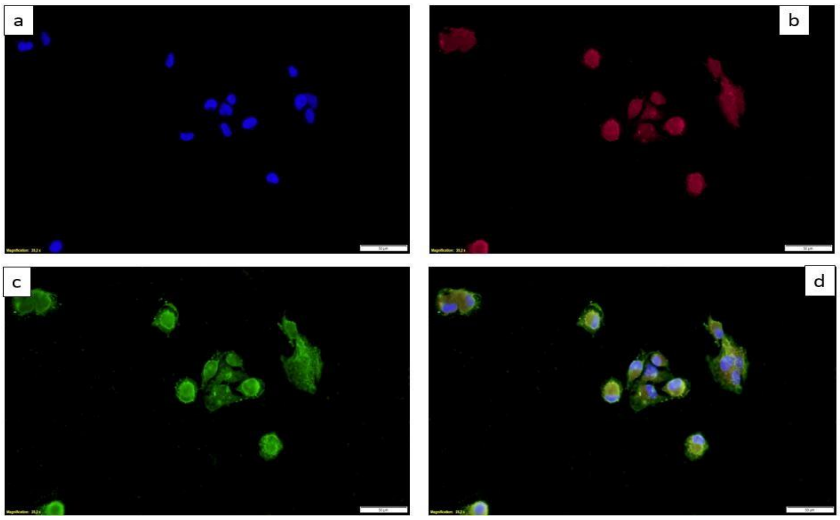
Şekil 4.34. AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX/ mTOR protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi. a) DAPI boyaması (Bar: 50 µM) b) CA-IX boyaması (Texas Red®)(Bar: 50 µM) c) mTOR boyaması (Alexa Fluor® 488) (Bar: 50 µM) d) DAPI/CA-IX/ mTOR boyaması .

AZA inhibitörü uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinin mTOR/4E-BP1 ekspresyonları Şekil 4.35'de gösterilmiştir.



Şekil 4.35. AZA uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde mTOR/4E-BP1 protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi. a) DAPI boyaması (Bar: 50 µM) b) 4E-BP1 boyaması (Texas Red®) (Bar: 50 µM) c) mTOR boyaması (Alexa Fluor® 488) (Bar: 50 µM) d) DAPI/4E-BP1/ mTOR boyaması (Bar: 50 µM).

AZA inhibitörü uygulanmış CAKI-2 hücrelerinin mTOR/4E-BP1 ekspresyonları Şekil 4.36'da gösterilmiştir.



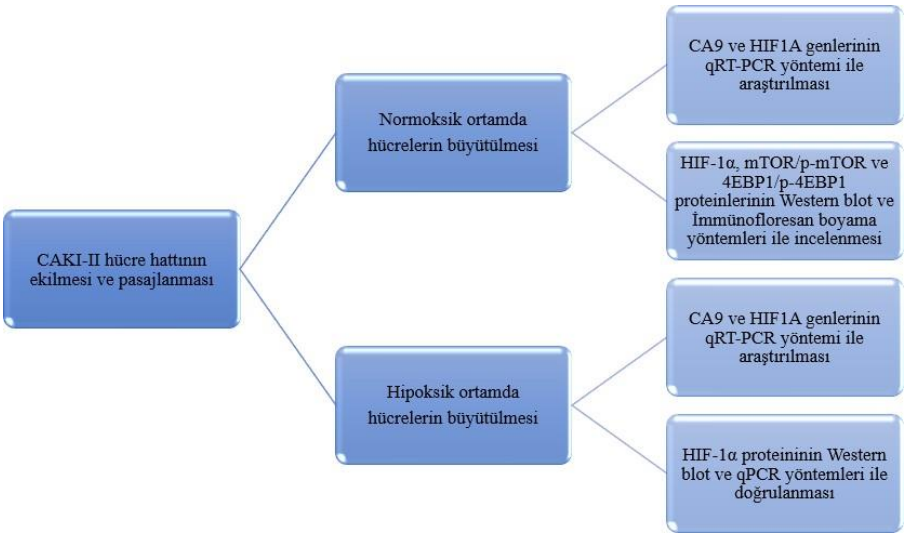
Şekil 4.36. AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde mTOR/4E-BP1 protein ekspresyonunun immünofloresan boyama ile gösterimi. a) DAPI boyaması (Bar: 50 µM) b) 4E-BP1 boyaması(Texas Red®)(Bar: 50 µM) c) mTOR boyaması (Alexa Fluor® 488) (Bar: 50 µM) d) DAPI/4E-BP1/ mTOR boyaması (Bar: 50 µM).

5. TARTIŞMA

Hipoksiye bağlı bir transmembran protein olan CA-IX, kanserde yüksek oranda ifade edilir. CA-IX, hücre içi pH'ın nötralizasyonu için HCO_3^- ve hücre dışı ortamın asitleştirilmesi için H^+ sağlar (85). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, CA-IX proteininin karsinogenezde hücreler arası iletişim süreçlerinin düzenlenmesindeki rolüne odaklanmıştır (86). CA-IX'un, IC rezidülerinin fosforillenmesinin hücre içi sinyal yolaklarını uyarabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (87,88). PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı; karsinogenezde hücre proliferasyonu, sağkalımı ve farklılaşmasında görev alan bir sinyal iletim yoludur. mTOR karsinogenez sürecinde aktif bir protein olarak görev yapmaktadır (89). Etkilerini S6K1 ve 4-EBP1 proteinlerinin aktivasyonu aracılığıyla gösterir (90,91). mTOR karsinogenez sürecinde önemli bir hedef haline gelmiştir. Bu proteine özgü inhibitörler kanser tedavisi için kullanılmakla birlikte direnç ve sitotoksisite gibi dezavantajları mevcuttur. mTOR proteinine özgü inhibitörlerin kullanım kısıtlılığından dolayı CA inhibitörü kullanmak bu proteinleri inhibe edebilmek adına bir alternatif olabilir (66).

Bu çalışmada, bir CA-IX inhibitörü olan AZA'nın, tümorogenez sürecinde etkili olduğu bilinen mTOR proteini üzerine olan etkisini belirlemek amaçlanmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda CA-IX'un, mTOR ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ancak CA-IX inhibisyonunun mTOR üzerine olan etkisi açık değildir. Bu çalışmanın amacı "CA-IX inhibisyonunun mTOR proteini üzerine etkisi vardır" hipotezini test etmektir.

Çalışmada sırasıyla hücre kültürü, WST-1, hipoksik ortam oluşturma, qPCR, absorbansa bağlı pH grafiğinden asidite belirleme, ELISA, Western blot ve immünositokimya deneyleri yapılmıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Deneysel akış planı.

Hücre kültürü çalışmalarında, CAKI-2 insan berrak hücreli renal karsinoma hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattının tercih edilmesinin sebebi yüksek oranda CA-IX ve mTOR ekspresyonuna sahip olmasıdır. CA-IX, RCC'de ekspresyon gösteren bir belirteçtir. CA-IX'un ccRCC'de görülen ekspresyonu ilk olarak Liao ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir (92). Bui ve arkadaşları ise ccRCC'de yüksek CA-IX ekspresyonu bulmuş ve bu ekspresyonun hastalık evresi arttıkça azaldığını göstermişlerdir (93). Genega ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, CA-IX ekspresyonunun, ccRCC'de diğer renal tümör tiplerine göre daha fazla olduğunu ve bu ekpresyonun tümör evresi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (94).

PI3K / AKT / mTOR sinyal yolağı RCC'de sıklıkla araştırılmıştır. Bu sinyalin ileri evre RCC'lerde aktivesi artar. mTOR sinyal yolunun bileşenlerinin genetik değişiklikleri, RCC'de sıklıkla gözlenir. ccRCC'lerin % 28'i, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağını aktive edici mutasyonlara sahiptir (95). Allosterik mTOR inhibitörleri olan Temsirolimus ve Everolimus ilerlemiş RCC tedavisinde iyi sonuçlar göstermiştir ve metastatik RCC tedavisi için birinci ve ikinci basamak tedavi olarak onaylanmıştır (89).

Çalışmada kullanılan inhibitörler olan AZA ve RAPA'nın CAKI-2 hücreleri üzerindeki etkin dozunu bulabilmek için WST-1 testi yapılmıştır. En etkin doz AZA için 8,65 µM, RAPA için 7,98 µM olarak bulunmuştur. Parkkila ve ark.ları yaptıkları çalışmada AZA uygulayıp CAKI-2 hücre hatlarının invazyon kapasitesini incelemiştir. Yaptıkları araştırmanın sonucunda CAKI-2 hücrelerinin 10 µM AZA tedavisine yüksek oranda yanıt verdiğini görülmüştür (96). Koike ve ark.ları yaptıkları çalışmada RAPA'nın CAKI-1 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerini belirlemişler ve etkin dozu 10 µM olarak bulmuşlardır (97).

Çalışmada normoksik ve hipoksik koşullar altında CAKI-2 hücre hattında HIF1A ve CA9 gen ekspresyonlarını belirlemek için qPCR analizi yapılmıştır. Bunun için öncelikle hücreler % 2 O_2, % 88 N_2 ve % 10 CO_2 içeren hipoksik inkübatöre konulmuştur. qPCR analizi sonucunda hem normoksik hem de hipoksik koşullar altında CAKI-2 hücre hattında hem HIF1A hem de CA9 mRNA seviyelerine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Hipoksinin bir sonucu olarak hücresel işlevler sürdürülemez ve hücreler ölür (98). Çalışmada renal kanser hücrelerinin hipoksik koşullar altındaki davranışlarının nasıl olacağını gözlemlenmek istenmiştir. Ancak hem hipoksik hem de normoksik koşullar altında HIF1A ekspresyonları açısından bir farklılık saptanmamıştır. CA böbreklerde CO_2'nin hidratasyonunu sağlayarak son derece önemli bir asidifikasyonu sağlar. ccRCC'de ise ortam bu asidifikasyonunda üzerinde oksijensiz bir ortama sahiptir. Dolayısıyla bu hücreler kendi doğaları gereği hipoksiktir. Kanser hücreleri doğaları gereği hipoksik ortamda olduğu için çalışmalarımızın devamında hipoksi uygulamamaya karar verilmiştir.

Hipoksi öncesi/sonrası ortam pH değişiminin doğrulanması ve inhibitör uygulaması öncesi/sonrası CA-IX inhibisyonunun doğrulanması için bir pH indikatörü olan Fenol kırmızısı ile pH standardizasyonu çalışması yapılmıştır. Absorbiyona bağlı pH grafiği oluşturulmuştur. Ölçüm 460, 560 ve 720 nm olmak üzere üç farklı dalgaboyunda yapılmıştır. Çalışmada ortam pH'sının normoksik ortamda 7.0 iken hipoksik ortamda 6.3'e düştüğü gözlemlenmiştir. Hipoksik ortamda daha düşük bir pH değeri bulunmuştur. Sørensen ve ark.ları hipoksi ve düşük pH'ın tümör mikroçevresinin karakteristik özellikleri olduğunu belirtmiştir. Bu iki durumun hipoksi, glikoliz ve laktik asit oluşumunu uyardığını, bunun da pH'da düşüşe neden

olduğunu göstermiştir (99). Yapılan çalışmalarda, hücre dışı pH'ın, hipoksiyle ilişkili gen ekspresyonunu büyük ölçüde etkilediğini, düşük ekstrasellüler pH'nın hipoksinin indüklediği gen ekspresyonunu düzenlediğini göstermişlerdir (100, 101)

CAKI-2 hücrelerinde inhibitör uygulanmadığı durumda pH değeri 6.93; AZA uygulandığında 7,27; RAPA uygulandığında ise 6,43 olarak bulunmuştur. AZA uygulamasının ortamdaki pH değerini yükselttiği görülmektedir. CA-IX, kanser hücrelerinde bir proton pompası olarak görev görmektedir. Bu izoenzim protonları hücre dışına pompalayarak ektrasellüler pH'ı düşürüp, intrasellüler pH'ı yükseltmektedir (102). AZA bir CA inhibitörü olduğu için CA-IX'u inhibe ederek bu sebeple ekstrasellüler pH'yı yükselmektedir. Liu ve ark.ları da bu bulgularla paralel olarak AZA yüklü nanopartiküller kullandıklarında CA-IX ekspresyonunun engellendiğini ve ekstrasellüler pH'nın yükseldiğini gözlemlemişlerdir (103).

RAPA uygulandığında ise pH değerinde düşüş görülmüştür. Literatürde RAPA ve kanser hücrelerinde ekstrasellüler pH üzerine yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak RAPA'nın bir mTOR inhibitörü, mTOR'un ise HIF-1α'nın düzenleyici proteinlerinden biri olduğu bilinmektedir. Ayrıca Hudson ve ark.ları yaptıkları bir çalışmada RAPA'nın HIF-1α'nın birikimini inhibe ettiğini göstermiştir (104). HIF-1α ekpresyonu hipoksi ve dolayısıyla düşük ekstrasellüler pH ile ilişkili olduğu için RAPA uygulamasının ekstrasellüler pH'da yükselmeye neden olması beklenmektedir. Ancak çalışmada bu bilgilerin aksine RAPA uygulamasının ortam pH'ında düşüşe neden olduğunu gösterilmiştir. Ancak bunu hangi yolaklar aracılığıyla meydana geldiği çalışmada belirtilmemiştir.

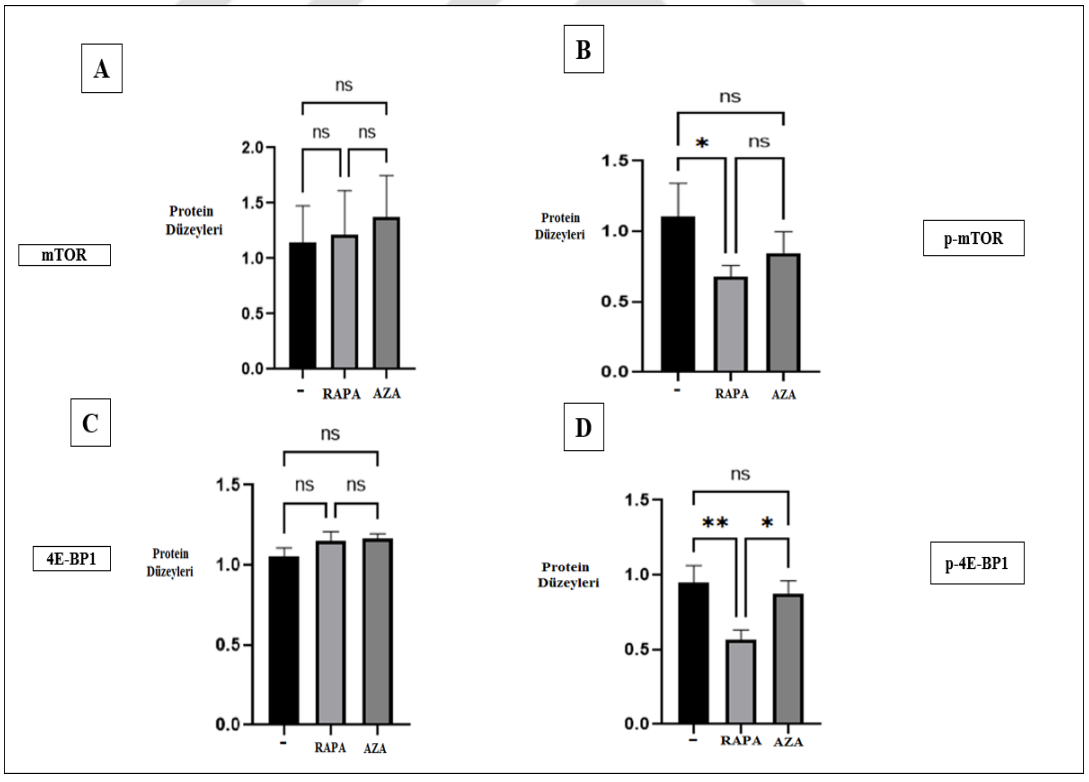
CAKI-2 hücre hattında AZA'nın CA-IX düzeyinde neden olduğu değişimi belirlemek için ELISA yöntemi ile ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçüm sonucunda AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde CA-IX konsantrasyonu 6.48 ng/mL, AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde ise 2,88 ng/mL olarak bulunmuştur ($p<0.0001$). Böylece AZA uygulamasının CAKI-2 hücrelerinde CA-IX konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir. AZA, klinik olarak kullanılan sülfonamid bazlı CA inhibitörü olduğu için (105) AZA uygulaması yapıldıktan sonra CA-IX konsantrasyonlarında görülen düşüş beklenilen bir sonuçtur.

Literatürde CA-IX ve mTOR ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. CA-IX'un nazofaringeal karsinomda mTOR yolağını aktive ettiği Sang ve ark.ları tarafından gösterilmiştir (48). Peppicelli ve ark.ları yaptıkları çalışmada CA-IX inhibitörü SLC-0111'in, melanomda mTOR yolunu inhibe edebileceğini belirtmişlerdir (106). Hulikova ve ark.ları yüksek intrasellüler CA aktivitesine sahip kanser hücresinde, S6 kinaz fosforilasyonuyla mTORC1 yolağının inhibisyonuna neden olabileceğini belirtmiştir (107). CA-IX inhibisyonunun ise mTOR inhibitörlerinin etkinliğini arttırdığı Faes ve ark.ları tarafından yapılan çalışmada ortaya konmuştur (108). Lock ve ark.ları ise CA-IX'un ekspresyonunun RNA interferans teknolojisi ile inhibe edilmesinin mTOR ekspresyonunu azalttığını belirtmiştir (109).

Bu çalışmanın literatürde yapılan diğer çalışmalardan farkı, CA-IX'un AZA ile inhibisyonunun mTOR protein yolağı üzerine etkisinin gösterilmesidir. Çalışmada protein analizleri Western Blot ve immünositokimya yöntemleri ile yapılmıştır. Western Blot için seçilen antikorlar HIF-1α, CA-IX, mTOR ve 4E-BP1'e özgüdür. mTOR ve 4EBP1 proteinleri aktive olduklarında fosforillenirler. Bu sebeple bu çalışmada bu proteinlerin aktifleşip aktifleşmediğini göstermek amacıyla p-mTOR ve p-4E-BP1 (fosforile) primer antikorları kullanılmıştır. Bu proteinlerin hem total hem de fosforile halleri arasında değişimlere bakılarak yolak üzerindeki etkilerine bakılmıştır. HIF-1α, CA-IX, mTOR ve 4E-BP1 proteinlerinin hücre içindeki yerleşimlerini belirlemek amacıyla immünositokimya yapılmıştır. Bu proteinlerin inhibitör uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücre hattında yerleşimlerinin farklı olup olmadığının belirlenmesi amacı ile HIF-1α, CA-IX, mTOR, 4E-BP1 antikorları kullanılmıştır. Western blot analiz sonuçları incelendiğinde Normoksik ve hipoksik koşullar altında HIF1-α protein seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

mTOR protein seviyeleri açısından inhibitör uygulanmayan, AZA ve RAPA uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). p-mTOR protein seviyeleri açısından inhibitörsüz grup ve RAPA uygulanan grup karşılaştırıldığında RAPA uygulanan grupta anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$). İnhibitörsüz ve AZA uygulanan grup karşılaştırıldığında ise AZA uygulanan grupta protein seviyelerinde düşüş görülmüştür. Ancak bu düşüş anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 5.2).

4E-BP1 protein seviyeleri açısından inhibitör uygulanmayan, AZA ve RAPA uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$). p-4E-BP1 protein seviyeleri açısından inhibitörsüz grup ve RAPA uygulanan grup karşılaştırıldığında RAPA uygulanan grupta anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$). İnhibitörsüz ve AZA uygulanan grup karşılaştırıldığında ise AZA uygulanan grupta protein seviyelerinde düşüş görülmüştür. Ancak bu düşüş anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Western blot analizlerinin gösterimi. A)CAKI-2 hücrelerinde RAPA ve AZA uygulanması sonucu mTOR protein düzeyleri B) CAKI-2 hücrelerinde RAPA ve AZA uygulanması sonucu p-mTOR protein düzeyleri C) CAKI-2 hücrelerinde RAPA ve AZA uygulanması sonucu 4E-BP1 protein düzeyleri D) CAKI-2 hücrelerinde RAPA ve AZA uygulanması sonucu P-4E-BP1 protein düzeyleri.

Çalışmanın sonucunda mTOR yolağının CA-IX ekspresyonu ile ilişkili olduğu ve AZA uygulamasının mTOR yolağında inhibisyon etkisine neden olduğu gösterilmiştir. Bu inhibisyon etkisinin gösterilmesi daha sonra yapılacak olan çalışmalar için literatüre büyük bir katkı sağlayabilir ve mTOR yolağına özgü ilaçların alternatiflerinin geliştirilmesi için önemli bir adım olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmanın sonucunda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- Çalışmada CAKI-2 berrak hücreli renal karsinom hücre hatlarında CA-IX'un AZA ile inhibisyonunun mTOR protein yolağı üzerine olan etkisi incelenmiştir.

- AZA ve pozitif kontrol olarak kullanılan RAPA'nın sitotoksik etkisinin belirlenmesi için WST-1 testi uygulanmıştır. En etkin doz AZA için 8,65 µM, RAPA için 7,98 µM olarak bulunmuştur.

- Normoksik ve hipoksik koşullar altında CAKI-2 hücre hattında HIF1-α ve CA-IX gen ekspresyonlarını belirlemek için qPCR analizi yapılmıştır. Bu sebeple hücreler % 2 O_2, % 88 N_2 ve % 10 CO_2 içeren hipoksik inkübatöre konulmuştur.

- qPCR analizi sonucunda hem normoksik hem de hipoksik koşullar altında CAKI-2 hücre hattında hem HIF1A hem de CA9 mRNA seviyelerine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 6.1).

- Hipoksi öncesi/sonrası ortam pH değişiminin doğrulanması ve inhibitör uygulaması öncesi/sonrası CA-IX inhibisyonunun doğrulanması için absorbiyona bağlı pH grafiği oluşturulmuştur. Ortam pH'sının normoksik ortamda 7.0 iken hipoksik ortamda 6.3'e düştüğü gözlemlenmiştir.

- CAKI-2 hücrelerinde inhibitör uygulanmadığı durumda pH değeri 6.93; AZA uygulandığında 7,27; RAPA uygulandığında ise 6,43 olarak bulunmuştur.

- CAKI-2 hücre hattında AZA'nın CA-IX düzeyinde neden olduğu değişimi belirlemek için ELISA yöntemi ile ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçüm sonucunda AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde CA-IX konsantrasyonu 6.48 ng/mL, AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde ise 2,88 ng/mL olarak bulunmuştur ($p<0.0001$) (Tablo 6.1).

- İnhibitör uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücre hattında HIF-1α, CA-IX, mTOR ve 4E-BP1 proteinlerinin hücre içindeki yerleşimlerini belirlemek amacıyla immünofloresan boyama yapılmıştır.

- CA-IX'un AZA ile inhibisyonunun mTOR protein yolağı üzerine etkisi Western Blot ile gösterilmiştir. Western Blot için seçilen antikorlar HIF-1α, CA-IX, mTOR, 4E-BP1, p-mTOR ve 4E-BP1'e özgüdür.

- Western blot analiz sonuçları incelendiğinde Normoksik ve hipoksik koşullar altında HIF1-α protein seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 6.1).

- mTOR protein seviyeleri açısından inhibitör uygulanmayan, AZA ve RAPA uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 6.1).

- p-mTOR protein seviyeleri açısından inhibitörsüz grup ve RAPA uygulanan grup karşılaştırıldığında RAPA uygulanan grupta anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$). İnhibitörsüz ve AZA uygulanan grup karşılaştırıldığında ise AZA uygulanan grupta protein seviyelerinde düşüş görülmüştür. Ancak bu düşüş anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 6.1).

- 4E-BP1 protein seviyeleri açısından inhibitör uygulanmayan, AZA ve RAPA uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 6.1).

- p-4E-BP1 protein seviyeleri açısından inhibitörsüz grup ve RAPA uygulanan grup karşılaştırıldığında RAPA uygulanan grupta anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$). İnhibitörsüz ve AZA uygulanan grup karşılaştırıldığında ise AZA uygulanan grupta protein seviyelerinde düşüş görülmüştür. Ancak bu düşüş anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 6.1).

- Çalışmanın sonucunda CAKI-2 hücrelerinde CA-IX'un AZA ile inhibisyonunun mTOR protein yolağında inhibisyon etkisine sahip olduğu gösterilmiştir.

- Bu ilişkinin aydınlatılmış olması ileriki çalışmalar için öncü nitelik taşımaktadır.

- Elde edilen sonuçlar kanser tedavisinde kullanılacak yeni ilaç uygulamaları için son derece önemli bir katkı sağlayabilir.

Tablo 6.1. Tez çalışmasına ait özet bilgiler.

Test adı	Parametre	Anlamlılık düzeyi	Sonuç
ELISA	CA-IX	$p<0.0001$	• AZA (+) hücrelerde CA-IX konsantrasyonu azalmıştır.
qPCR	CA9, HIF1A	$p>0.05$	• Normoksik ve hipoksik koşullarda CA9 ve HIF1A arasında fark bulunmamıştır.
Western Blot	HIF-1α, mTOR, p-mTOR, 4E-BP1, p-4E-BP1	HIF-1α için; $p>0.05$ mTOR için; $p>0.05$ p-mTOR için; $p>0.05$ (+AZA) p-mTOR için; $p<0.05$ (+RAPA) 4E-BP1 için; $p>0.05$ p-4E-BP1 için; $p>0.05$ (+AZA) p-4E-BP1 için; $p<0.05$ (+RAPA)	• Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF-1α için fark bulunmamıştır. • mTOR için fark bulunmamıştır. • p-mTOR için RAPA uygulanan grupta anlamlı düşüş görülürken, AZA uygulanan grupta ki düşüş anlamsızdır. • 4E-BP1 için fark bulunmamıştır. • p-4E-BP1 için RAPA uygulanan grupta anlamlı düşüş görülürken, AZA uygulanan grupta ki düşüş anlamsızdır.

7. KAYNAKLAR

1. Medical News Today. What to know about cancer. https://www.medicalnewstoday.com/articles/323648. 9 Mart 2021.

2. Mathur G. Cancer: an overview, *Acad J Cancer Res.*, 2015,8(1):1–9.

3. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes, *Pharm Res.*, 2008, 25(9):2200–2200.

4.Johns Hopkins Medicine. Kidney (Renal) Cancer: Introduction https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/kidney-renal-cancer-introduction. 9 Mart 2021.

5. Philips GK, Atkins MB. New Agents and New Targets for Renal Cell Carcinoma, A*m Soc Clin Oncol Educ B*, 2014,34:e222–7.

6. Kumar S, Rulhania S, Jaswal S, Monga V. Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors, *Eur J Med Chem*., 2021, 209:112923.

7. Langella E, Buonanno M, De Simone G, Monti SM. Intrinsically disordered features of carbonic anhydrase IX proteoglycan-like domain, *Cell Mol Life Sci*., 2021,78(5):2059–67.

8. Popova NV, Jücker M. The Role of mTOR Signaling as a Therapeutic Target in Cancer, *Int J Mol Sci*., 2021,22(4):1743.

9. Gedik ME, Doğan AL. Kanser Hücresinin Sağlıklı Hücrelerden Temel Farkları. İçinde. Baran Y (editör). Kanser Moleküler Biyolojisi, 1.Baskı. Ankara, Genç Ofset, 2018: 27-41

10. Pastorekova S, Kopacek J, Pastorek J. Carbonic Anhydrase Inhibitors and the Management of Cancer, *Curr Top Med Chem*., 2007,865–78.

11. Kiraz Y, Baran Y. Kanser Nedir?. İçinde. Baran Y (editör). Kanser Moleküler Biyolojisi, 1.Baskı. Ankara, Genç Ofset, 2018: 1-11.

12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell,* 2011,144:646-674.

13. Schwartz L, Supuran C, Alfarouk K. The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry,* 2017,7:164–70.

14. A Bucket Full of Science. The Biological Hallmarks of Cancer: What makes a cancer cell, cancerous? https://a bucketfullofscience.wordpress.com/2017/01/23/ the-biological-hallmarks-of-cancer-what-makes-a-cancer-cell-cancerous/. 9 Mart 2021.

15. Parks SK, Cormerais Y, Pouysségur J. Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology, *J Physiol.,* 2017,595(8):2439–50.

16. Nabi S, Kessler ER, Bernard B, Flaig TW, Lam ET. Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology, *F1000Research.,* 2018,7:307.

17. Vasudev NS, Selby PJ, Banks RE. Renal cancer biomarkers: the promise of personalized care, *BMC Med.,* 2012,10(1):112.

18. Randall JM, Millard F, Kurzrock R. Molecular aberrations, targeted therapy, and renal cell carcinoma: current state-of-the-art, *Cancer Metastasis Rev.,* 2014, 33(4):1109–24.

19. Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer Biomarkers,* 2011,9:461–73.

20. di Martino S, De Luca G, Grassi L, Federici G, Alfonsi R, Signore M, et al. Renal cancer: new models and approach for personalizing therapy. *J Exp Clin Cancer Res.,* 2018,37(1):217.

21. Cowey CL, Rathmell WK. VHL gene mutations in renal cell carcinoma: Role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Curr Oncol Rep*., 2009, 11(2):94–101.

22. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.,* 2019, 30(5):706–20.

23. Cebeci OÖ, Özkan TA, Eruyar AT. Renal Hücreli Kanserde Fuhrman Çekirdek Derecelendirme Sistemine Güncel Bakış, *Üroonkoloji Bülteni,* 2014,13(3):157–60.

24. Guo, J, Ma, J, Sun, Y, Qin, S, Ye, D, Zhou, J, He, Z, Cheng, X, Bi F, Cao, D., Chen, Y., Huang, Y., Liang, H., Liang, J., Liu, J., Liu, W., Pan, Y., Shu, Y., Song,

J., Wang, W., Wang, X., Wu, X., Xie, X., Yao, X., Yu, S., Zhang, Y., Zhou, A. Chinese guidelines on the management of renal cell carcinoma, *Ann Transl Med.*, 2015,3(19).

25. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings, *Radiol Bras.*, 2015,48(3):166–74.

26. Eyas M. Hattab, Liang Cheng JNE. Neoplasms of the Kidney. Ming Zhou, Cristina Magi-Galluzzi GP (eds). *Genitourinary Pathology*, 1st ed. Churchill Livingstone, 2007:281–340.

27. Bottaro DP, Linehan WM. Multifocal Renal Cancer: Genetic Basis and Its Medical Relevance, *Clin Cancer Res.*, 2005,11(20):7206–8.

28. National Cancer Institute. Clear Cell Renal Cell Carcinoma. https://www.cancer.gov/pediatric-adult-rare-tumor/rare-tumors/rare-kidney-tumors/clear-cell-renal-cell-carcinoma. 15 Mart 2021.

29. Yasuhiro Sakai , Naoki Kanomata, Hiroe Itami, Kazuyoshi Kajimoto, Toshiko Sakuma CO. Signet-ring cell carcinoma of the stomach metastasizing to renal cell carcinoma: a case report and review of the literature, *Kobe J Med Sci.*, 2010;55(6):E122-31.

30. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Kidney: Clear cell renal cell carcinoma. http://atlasgeneticsoncology.org/ Tumors/ClearCellRenalCCID5020.html. 15 Mart 2021.

31. Itsumi M, Tatsugami K. Immunotherapy for Renal Cell Carcinoma, *Clin Dev Immunol.*, 2010,2010:1–8.

32. Padala SA, Kallam A. *Clear Cell Renal Carcinoma,* In: StatPearls [Internet]. Treasure Island, StatPearls Publishing, 2020.

33. Schwartz L, Supuran C, Alfarouk K. The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer, *Anticancer Agents Med Chem.*, 2017,17(2):164–70.

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

35. Crossfit. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell

Proliferation.https://www.crossfit.com/essentials/understanding-the-warburg-effect-the-metabolic-requirements-of-cell-proliferation. 1 Nisan 2021.

36.Nocentini A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors as antitumor/antimetastatic agents: a patent review (2008–2018), *Expert Opin Ther Pat*., 2018,28(10):729–40.

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

38. Supuran CT. Carbonic Anhydrases and Metabolism, *Metabolites*, 2018, 21;8(2):25.

39. Takacova M, Holotnakova T, Barathova M, Pastorekova S, Kopacek J, Pastorek J. Src induces expression of carbonic anhydrase IX via hypoxia-inducible factor 1, *Oncol Rep.,* 2010,23(3):869-74.

40. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas, *Expert Opin Ther Pat.*, 2018, 28(10):709–12.

41. Supuran CT. Structure and function of carbonic anhydrases, *Biochem J.*, 2016,473(14):2023–32.

42. Singh S, Lomelino C, Mboge M, Frost S, McKenna R. Cancer Drug Development of Carbonic Anhydrase Inhibitors beyond the Active Site, *Molecules,* 2018, 23(5):1045.

43. 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):255–60.

44. Kumar S, Rulhania S, Jaswal S, Monga V. Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. Eur J Med Chem., 2021, 209: 112923.

45. McIntyre A, Harris AL. The Role of pH Regulation in Cancer Progression. Recent Results, *Cancer Res.*, 2016,207:93-134.

46. Mboge M, Mahon B, McKenna R, Frost S. Carbonic Anhydrases: Role in pH Control and Cancer, *Metabolites*, 2018,8(1):19.

47. Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use, *Semin Cancer Biol*, 2015.

48. 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.* 2014,7(6):2942-9.

49. Ng H, Lu A, Lin G, Qin L, Yang Z, The Potential of Liposomes with Carbonic Anhydrase IX to Deliver Anticancer Ingredients to Cancer Cells in Vivo, *Int J Mol Sci.* 2014,16(1):230–55.

50. Pastorekova S, Gillies RJ. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond, *Cancer Metastasis Rev.*, 2019,38(1–2):65–77.

51. Ward C, Meehan J, Gray M, Kunkler I, Langdon S, Argyle D. Carbonic Anhydrase IX (CAIX), Cancer, and Radiation Responsiveness, *Metabolites,* 2018,8(1):13.

52. Kassamali R, Sica DA. Acetazolamide, *Cardiol Rev.*,2011,19(6):276–8.

53. Selleckchem. Acetazolamide. https://www.sellechchem.com/products/acetazolamide.html. 1 Nisan 2021.

54. Duivenvoorden WC, Hopmans SN, Gallino D, Farrell T, Gerdes C, Glennie D LH and PJ. Inhibition of carbonic anhydrase IX (CA9) sensitizes renal cell carcinoma to ionizing radiation, *Oncol Rep.*, 2015,34:1968–76.

55. Meehan J, Ward C, Turnbull A, Bukowski-Wills J, Finch AJ, Jarman EJ, et al. Inhibition of pH regulation as a therapeutic strategy in hypoxic human breast cancer cells, *Oncotarget,* 2017,8(26):42857–75.

56. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials, *Mol Cancer.,* 2019,18(1):26.

57. Shi X, Wang J, Lei Y, Cong C, Tan D, Zhou X. Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review), *Mol Med Rep.*, 2019.

58. Pópulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer, *Int J Mol Sci*., 2012,13(2):1886–918.

59. Hua H, Kong Q, Zhang H, Wang J, Luo T, Jiang Y. Targeting mTOR for cancer therapy, *J Hematol Oncol*., 2019,12(1):71.

60. Chiarini F, Evangelisti C, McCubrey JA, Martelli AM. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer, *Trends Pharmacol Sci.*, 2015, 36(2):124–35.

61. Tian T, Li X, Zhang J. mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy, *Int J Mol Sci*., 2019,20(3):755.

62. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease, *Cell*, 2017,169(2):361–71.

63. Waickman AT, Powell JD. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function, *Immunol Rev.*, 2012,249(1):43–58.

64. Zou Z, Tao T, Li H, Zhu X. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges, *Cell Biosci.*, 2020,10(1):31.

65. Buerger C. Epidermal mTORC1 Signaling Contributes to the Pathogenesis of Psoriasis and Could Serve as a Therapeutic Target, *Front Immunol.*, 2018, 30:9.

66. Xie J, Wang X, Proud CG. mTOR inhibitors in cancer therapy, *F1000Research*, 2016,5:2078.

67. Wohlrab C, Kuiper C, Vissers MC, Phillips E, Robinson BA, Dachs GU. Ascorbate modulates the hypoxic pathway by increasing intracellular activity of the HIF hydroxylases in renal cell carcinoma cells, *Hypoxia*, 2019,7:17–31.

68. ATCC. Caki-2 (ATCC® HTB-47™). https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-47.aspx?geo_country=tr. 5 Nisan 2021

69. StemCell Technologies. How to Count Cells with a Hemocytometer https://www.stemcell.com/how-to-count-cells-with-a-hemocytometer.html.5 Nisan 2021

70. StemCell Technologies. Rapamycin. https://www.stemcell.com/how-to-count-cells-with-a-hemocytometer.html.5 Nisan 2021.

71. PubChem. Acetazolamide.https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compouns/Acetazzolamide. 5 Nisan 2021.

72. Tcichemicals. Molecular Structure of Acetazolamide.https://www.tcichemicals.com/OP/en/p/A2598. 5 Nisan 2021.

73. SigmaAldrich. Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability. https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html. 9 Nisan 2021.

74. StemCell Technologies. Single flowmeter. https://www.stemcell.com/single-flow-meter.html. 10 Nisan 2021.

75. StemCell Technologies.Hypoxia Chamber. https://www.stemcell.com/hypoxia incubator-chamber.html. 10 Nisan 2021

76. Biotek. Using Phenol Red to Assess pH in Tissue Culture Media https://www.biotek.com/assets/tech_resources/PhenolRedBasicsApp_Note.pdf. 10 Nisan 2021.

77.BTLab. Human Carbonic Anhydrase 9 Elisa Kit. http://www.bt-laboratory.com/product/human-carbonic-anhydrase-9-elisa-kit/.15 Nisan 2021.

78.https://app.biorender.com/illustrations/edit/6069ea81b9176800a4fceb32. 20 Nisan 2021.

79. Qiagen. miRNeasy Mini Kit.https://www.qiagen.com/tr/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en. 20 Nisan 2021

80. Qiagen. Qıacube Connect. https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/instruments-equipment/qiacube-connect/. 20 Nisan 2021.

81. ThermoFisher. iBlot 2 Dry Blotting System. https://www.thermofisher.com/tr/en/ /life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/western-blotting/transfer-proteins-western-blot/iblot-dry-blotting-system.html. 25 Nisan 2021.

82. ThermoFisher. iBlot™ Transfer Stack, PVDF, regular size. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IB401031#/IB401031. 25 Nisan 2021.

83.ThermoFisher. Invitrogen™ iBlot™ 2 Gel Transfer Device. https://www.fishersci.no/shop/products/iblot-2-gel-transfer-device/15217995. 25 Nisan 2021

84. ThermoFisher. Western Blotting Transfer Methods. https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/western-blot-transfer-methods.html. 25 Nisan 2021.

85. Yang JS, Lin CW, Hsieh YH, Chien MH, Chuang CY, Yang SF. Overexpression of carbonic anhydrase IX induces cell motility by activating matrix metalloproteinase-9 in human oral squamous cell carcinoma cells, *Oncotarget*, 2017,8(47):83088–99.

86. Dorai T, Sawczuk IS, Pastorek J, Wiernik PH, Dutcher JP. The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer, *Eur J Cancer.*, 2005, 41(18):2935–47.

87. Thiry A, Supuran CT, Masereel B, Dogné J-M. Recent Developments of Carbonic Anhydrase Inhibitors as Potential Anticancer Drugs, *J Med Chem.*, 2008,51(11):3051–6.

88. Pastorekova S, Kopacek J, Pastorek J. Carbonic Anhydrase Inhibitors and the Management of Cancer, *Curr Top Med Chem.*, 2007,7(9):865–78.

89. Battelli C, Cho DC. mTOR inhibitors in renal cell carcinoma, *Therapy*, 2011,8(4):359–67.

90. Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer, *Biochem Pharmacol.*, 2014,90(3):197–207.

91. Huang C-I, Wang C-C, Tai T-S, Hwang T-Z, Yang C-C, Hsu C-M, et al. eIF4E and 4EBP1 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma recurrence after definitive surgery and adjuvant radiotherapy, *PLoS One*, 2019,14(11):e0225537.

92. Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J SE. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney, *Cancer Res.*, 1997,57(14):2827–31.

93. Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, Horvath S, Leibovich BC, Chopra S, Liao SY, Stanbridge E, Lerman MI, Palotie A, Figlin

RA BA. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy, *Clin Cancer Res*., 2003,9(2):801–12.

94. Genega EM, Ghebremichael M, Najarian R, Fu Y, Wang Y, Argani P, et al. Carbonic Anhydrase IX Expression in Renal Neoplasms, *Am J Clin Pathol.*, 2010,134(6):873–9.

95. Faes S, Demartines N, Dormond O. Mechanistic Target of Rapamycin Inhibitors in Renal Cell Carcinoma: Potential, Limitations, and Perspectives, *Front Cell Dev Biol.*, 2021.

96. Parkkila S, Rajaniemi H, Parkkila A-K, Kivela J, Waheed A, Pastorekova S, et al. Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro, *Proc Natl Acad Sci.*, 2000,97(5):2220–4.

97. Koike H, Nitta T, Sekine Y, Arai S, Furuya Y, Nomura M, et al. YM155 reverses rapamycin resistance in renal cancer by decreasing survivin, *J Cancer Res Clin Oncol*., 2014,140(10):1705–13.

98. Sendoel A, Hengartner MO. Apoptotic Cell Death Under Hypoxia. *Physiology*, 2014,9(3):168–76.

99. Sørensen BS, Busk M, Overgaard J, Horsman MR, Alsner J. Simultaneous Hypoxia and Low Extracellular pH Suppress Overall Metabolic Rate and Protein Synthesis In Vitro, *PLoS One*, 2015,10(8):e0134955.

100. Sørensen BS, Alsner J, Overgaard J, Horsman MR. Hypoxia induced expression of endogenous markers in vitro is highly influenced by Ph, *Radiother Oncol.*, 2007,83(3):362–6.

101. Sørensen BS, Hao J, Overgaard J, Vorum H, Honoré B, Alsner J, et al. Influence of oxygen concentration and pH on expression of hypoxia induced genes, *Radiother Oncol*., 2005,76(2):187–93.

102. Reber F, Gersch U, Funk RH. Blockers of carbonic anhydrase can cause increase of retinal capillary diameter, decrease of extracellular and increase of intracellular pH in rat retinal organ culture, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*., 2003 ,241(2):140–8.

103. Liu S, Luo X, Liu S, Xu P, Wang J, Hu Y. Acetazolamide-Loaded pH-Responsive Nanoparticles Alleviating Tumor Acidosis to Enhance Chemotherapy Effects, *Macromol Biosci.*, 2019,19(2):1800366.

104. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, et al. Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1α Expression and Function by the Mammalian Target of Rapamycin, *Mol Cell Biol*., 2002,22(20):7004–14.

105. Tafreshi NK, Lloyd MC, Bui MM, Gillies RJ, Morse DL. Carbonic Anhydrase IX as an Imaging and Therapeutic Target for Tumors and Metastases, *Subsell Biochem*, 2014,75:221–54.

106. Peppicelli S, Andreucci E, Ruzzolini J, Bianchini F, Nediani C, Supuran CT, et al. The Carbonic Anhydrase IX inhibitor SLC-0111 as emerging agent against the mesenchymal stem cell-derived pro-survival effects on melanoma cells, *J Enzyme Inhib Med Chem*., 2020,35(1):1185–93.

107.Hulikova A, Aveyard N, Harris AL, Vaughan-Jones RD, Swietach P. Intracellular Carbonic Anhydrase Activity Sensitizes Cancer Cell pH Signaling to Dynamic Changes in CO2 Partial Pressure, *J Biol Chem.*, 2014,289(37):25418–30.

108. Faes S, Planche A, Uldry E, Santoro T, Pythoud C, Stehle J-C, et al. Targeting carbonic anhydrase IX improves the anti-cancer efficacy of mTOR inhibitors, *Oncotarget*, 2016,7(24):36666–80.

109. Lock FE, McDonald PC, Lou Y, Serrano I, Chafe SC, Ostlund C, et al. Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche, *Oncogene.*, 2013,32(44):5210–9