T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELANOM HÜCRE HATTINDA KARBONİK ANHİDRAZ-IX İNHİBİSYONUNUN B-RAF PROTEİNİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Beyza Ecem ÖZ BEDİR

KANSER BİYOLOJİSİ DOKTORA PROGRAMI

Ankara, 2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELANOM HÜCRE HATTINDA KARBONİK ANHİDRAZ-IX İNHİBİSYONUNUN B-RAF PROTEİNİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Beyza Ecem ÖZ BEDİR

KANSER BİYOLOJİSİ DOKTORA PROGRAMI

Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 5529 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu araştırma; TÜBİTAK tarafından 569337 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Kanser 3

2.2. Melanom 3

2.2.1. Melanomun Epidemiyolojisi 3

2.2.2. Melanomun Risk Faktörleri 4

2.2.3. Melanomun Klinik Özellikleri 5

2.2.4. Melanomların Sınıflandırılması 5

2.2.5. Melanomun Tedavisi 6

2.3. Hipoksi ve HIF Yolağı 10

2.4. CA Enzimi 11

2.4.1. CA Enzim Ailesi 11

2.4.2. CA Enziminin Yapısı ve Çalışma Mekanizması 13

2.4.3. CA İnhibitörleri 14

2.4.4. CA-IX Enzimi 18

2.4.5. CA-IX Enzimi ve Kanser Hücresindeki Sinyal İletimi 22

2.4.6. CA-IX Enzimi ve Hipoksi/Asidoz İlişkisi 23

2.5. MAPK Sinyal Yolakları 24

2.5.1. ERK 1/2 Sinyal Yolağı 26

2.5.2. Raf Proteini ve İzoformları 29

2.5.3. B-Raf 29

2.5.4. BRAF Gen Mutasyonları 30
2.5.5. B-Raf İnhibitörleri 31
2.5.6. Melanomda MAPK Sinyal Yolağı 33
3. MATERYAL VE YÖNTEM 35
3.1. Materyal 35
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı 35
3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Maddeler 35
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Antikorlar 36
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 36
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 37
3.2. Yöntem 39
3.2.1. Hücre Kültürü Koşulları 39
3.2.2. Besiyeri Hazırlanması 39
3.2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekimi 39
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması 39
3.2.5. Hücrelerin Dondurulması 40
3.2.6. Hücre Sayımı 40
3.2.7. İnhibitörlerin Hazırlanması ve Uygulanması 41
3.2.8. Hipoksik Ortamın Oluşturulması 41
3.2.9. Hipoksi Öncesi ve Sonrasında Hücre Asiditesinin Ölçülmesi 42
3.2.10. Hücre Canlılığının ve Proliferasyonunun Değerlendirilmesi 42
3.2.11. CA-IX Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi 43
3.2.12. qRT-PCR 45
3.2.13. Western Blot 49
3.2.14. İmmünofloresan 55
3.2.15. İstatistiksel Analiz 57

4. BULGULAR 58

4.1. Normoksik ve Hipoksik Ortamlarda Hücre Asiditesinin Belirlenmesi ... 58

4.2. A375 Melanom Hücrelerinde AZA'nın IC_{50} Değerinin Belirlenmesi 59

4.3. A375 Melanom Hücrelerinde VMF'nin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi.... 64

4.4. A375 Melanom Hücrelerinde İnhibitör Öncesi ve Sonrası Hücre Asiditesinin Belirlenmesi 68

4.5. A375 Melanom Hücrelerinde AZA Uygulamasının CA-IX Düzeyi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi..... 69

4.6. A375 Melanom Hücrelerinde HIF1A Geninin Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi 70

4.7. A375 Melanom Hücrelerinde CA9 Geninin Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi 71

4.8. A375 Melanom Hücrelerinde AZA Uygulamasının Gen Düzeylerine Etkisi..... 72

4.9. Western Blot Analizinin Bulguları..... 74

4.9.1. Western Blot Analizinin HIF-1α Bulguları..... 75

4.9.2. Western Blot Analizinin B-Raf ve p-B-Raf Bulguları 76

4.9.3. Western Blot Analizinin ERK ve p-ERK Bulguları..... 78

4.10.İmmünofloresan Boyama Bulguları 80

5. TARTIŞMA 86

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 94

7. KAYNAKLAR..... 97

8. EKLER 111

EK-1. Özgeçmiş 111

ÖZET

Melanom Hücre Hattında Karbonik Anhidraz-IX İnhibisyonunun B-Raf Proteini Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Melanomda önemli bir biyolojik belirteç olan CA-IX, tümör hücrelerinde yüksek derecede eksprese olan ve inhibisyonu yoğun şekilde çalışılan önemli bir enzimdir. Bu transmembran yapıdaki enzimin IC kuyrukları aracılığıyla karsinogenezde rolleri olan bazı yolakları etkilediği keşfedilmiştir. Hücre dışı sinyallerden hücre içi yanıtlara geçişte önemli olan ve birçok hücresel işlevi düzenleyen MAPK yolağı tümör oluşumu ile de ilişkilidir. CA-IX'un ekspresyonunun, MAPK yolağının bileşenleri tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Bu yolağın mutasyona uğramış BRAFV600E tarafından aktivasyonu melanom büyümesini, hayatta kalmasını ve anjiyogenezi uyarır. CA-IX inhibisyonunun MAPK yolağı üzerindeki etkisi bugüne kadar aydınlatılmamıştır. Bu tez çalışmasında, CA-IX proteininin inhibisyonunun, MAPK yolağında yer alan B-Raf proteini üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Söz konusu çalışmada, AZA ve VMF inhibitörleri BRAFV600E mutasyonu olan A375 melanom hücrelerine uygulanmıştır. Hücre proliferasyonu WST-1 deneyi ile belirlenmiştir. Bu hücrelerde CA9 ve HIF1A ekspresyonları qRT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. CA-IX protein düzeyine AZA inhibitör uygulamasının etkisi ELISA testi ile gösterilmiştir. HIF-1α, CA-IX, B-Raf ve ERK proteinlerinin lokalizasyonları ve ekspresyonları, AZA uygulanmış ve uygulanmamış melanom hücrelerinde immünofloresan boyama ile incelenmiştir. Ayrıca Western Blot analizi ile HIF-1α, B-Raf, p-B-Raf, ERK ve p-ERK proteinleri değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, AZA ile CA-IX inhibisyonunun p-B-Raf ve p-ERK protein düzeylerinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre; AZA uygulamasının MAPK yolağındaki B-Raf proteini üzerine olan inhibisyon etkisi, CA inhibitörlerini bu yolak için potansiyel bir ajan olarak düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: B-Raf proteini, karbonik anhidraz-IX, MAPK, melanom.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Carbonic Anhydrase-IX Inhibition on B-Raf Protein in Melanoma Cell Line

CA-IX, an important biomarker in melanoma, is an crucial enzyme that is highly expressed in tumor cells and its inhibition has been extensively studied. It has been discovered that this transmembrane enzyme affects some pathways that have roles in carcinogenesis via IC tails. The MAPK pathway, which is important in the transition from extracellular signals to intracellular responses and regulates many cellular functions, is also associated with tumor formation. It is known that the expression of CA-IX is regulated by components of the MAPK pathway. Activation of this pathway by mutated BRAFV600E stimulates melanoma growth, survival, and angiogenesis. The effect of CA-IX inhibition on the MAPK pathway has not been determined until now. The main purpose of this study to investigate the effect of inhibition of CA-IX on B-Raf protein which has a critical role in MAPK pathway.

In this study, AZA and VMF inhibitors were treated to A375 melanoma cells which has BRAFV600E mutation. Cell proliferation was determined by WST-1 assay. Furthermore, CA9 and HIF1A expressions in these cells were investigated using qRT-PCR method. Also, the effect of AZA treatment on CA-IX protein levels was demonstrated by ELISA test. The localizations and expressions of HIF-1α, CA-IX, B-Raf and ERK proteins were examined by immunofluorescence in AZA-treated and non-treated melanoma cells. Besides, HIF-1α, B-Raf, p-B-Raf, ERK and p-ERK proteins were examined by Western Blot analysis.

The preliminary results indicate that inhibition of CA-IX by AZA causes decreased p-B-Raf and p-ERK protein levels. According to the results of this study; effect of AZA treatment on B-Raf in the MAPK pathway suggests that CA inhibitors can be considered as a potential agent for this pathway.

Keywords: B-Raf protein, carbonic anhydrase-IX, MAPK, melanoma.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A375	: Malign insan melanom hücre hattı
AE	: Anyon Değiştirici
Anti-CTLA-4	: Anti-sitotoksik T lenfosit antijen-4
Anti-PD-1	: Anti-programlı hücre ölümü proteini-1
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
AZA	: Asetazolamid
B-Raf	: BRAF geninin kodladığı protein
BRAF	: v-raf murin sarkoma viral onkojen homolog B1 geni
BRAFV600E	: 600. amino asitte valinin glutamik asit ile değiştiği mutasyon tipi
BSA	: Sığır serum albümin
CA	: Karbonik anhidraz
CA9	: Karbonik anhidraz-IX geni
CA-IX	: Karbonik anhidraz-IX enzimi
ccRCC	: Berrak hücreli renal hücreli karsinom
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
cDNA	: Komplementer DNA
CO_2	: Karbondioksit
CREB	: 3’-5’ siklik adenozin monofosfat ikincil habercil molekül
Cys	: Sistein
DAB	: Dabrafenib
Dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco tarafından modifiye edilen Eagle Besiyeri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPBS	: Dulbecco'nun fosfat tamponlu salini
ECL	: Enhanced luminol-based chemiluminescent
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
ERK1/2	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2
FBS	: Fetal Sığır Serumu
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
GAP	: GTPaz aktive edici proteinler
GAPDH	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz

GCO	: Global Kanser Gözlemevi
gDNA	: Genomik DNA
GEF	: Guanin nükleotid değişim faktörü
GİB	: Göz içi basıncı
GLUT-1	: Glukoz taşıyıcısı-1
GRB2	: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2
GTP	: Guanozin trifosfat
H^+	: Proton
H_2O	: Su molekülü
HCO_3^-	: Bikarbonat
HeLa	: İnsan servikal karsinom hücre hattı
HIF-1	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-l
HIF1A	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa geni
HIF-1α	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa proteini
HIF-1β	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-beta proteini
HRE	: Hipoksi yanıt elementi
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC	: İntrasitozolik kuyruk
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MCT	: Monokarboksilat taşıyıcılar
MEK	: Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz kinazı
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NBC	: Bikarbonat taşıyıcılar
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NHE	: Na^+/H^+ değiştiricisi
NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
O_2	: Oksijen
OH^-	: Hidroksit iyonu
p-B-Raf	: Fosforile B-Raf
p-ERK1/2	: Fosforile ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2
PG	: Proteoglikan alan
pHi	: İntraselüler pH
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz

qRT-PCR : Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Raf : Rapidly accelerated fibrosarcom
Ras : Rat sarcoma
RCC : Renal hücreli karsinom
RNA : Ribonükleik asid
RNAi : RNA interferans
RTK : Reseptör tirozin kinaz
Sn : Saniye
SH2 : Src homoloji 2
SH3 : Src Homoloji 3
SOS : Son of sevenless
SP : Sinyal peptiti
TM : Transmembran bölge
V- ATPaz : V-tipi H^+ATP
VHL : Von Hippel Lindau
VMF : Vemurafenib
WST-1 : Water-soluble tetrazolium salt
ZBG : Zn^{+2} bağlayıcı grup
Zn^{+2} : Çinko iyonu
α : Alfa
β : Beta
γ : Gama
δ : Delta
ζ : Zeta
η : Eta
θ : Teta
ι : İota
μM : mikromolar
nM : nanomolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Melanom'un ABCDE'si 5
Şekil 2.2. VMF ve DAB'ın etki mekanizmasının gösterimi 9
Şekil 2.3. HIF yolağı 10
Şekil 2.4. CA enzimlerinin katalizlediği reaksiyon 11
Şekil 2.5. CA izoenzimleri ve yerleşimleri 12
Şekil 2.6. CA enziminin aktif bölgesi 13
Şekil 2.7. CA'nın çalışma mekanizması 14
Şekil 2.8. CA'nın sülfonamid ile oluşan tetrahedral geometrisi 15
Şekil 2.9. CA'nın inhibisyon mekanizması 17
Şekil 2.10. AZA'nın kimyasal yapısı 18
Şekil 2.11. CA-IX proteinin yapısı 19
Şekil 2.12. Hipoksik kanser hücrelerinde pH regülasyonunda CA-IX'un rolü. 20
Şekil 2.13. SLC-0111'in kimyasal yapısı 21
Şekil 2.14. Hipoksik tümör hücrelerinde pH düzenlenmesi. 23
Şekil 2.15. MAPK sinyalinde dört ana memeli protein kinaz kaskadının gösterimi. 25
Şekil 2.16. Ras / Raf / MEK / ERK sinyal yolağı 27
Şekil 2.17. ERK yolağının aktivasyonunun biyolojik sonuçları ve hedefleri 28
Şekil 2.18. Raf proteinlerinin yapısı 29
Şekil 3.1. A375 melanom hücre hattının inverted mikroskop görüntüleri. 35
Şekil 3.2. WST-1 testinin çalışma mekanizması 43
Şekil 3.3. ELISA çalışma düzeneği. 44
Şekil 3.4. QIAGEN miRNeasy kiti ile total RNA izolasyonunun gösterimi 46
Şekil 3.5. İki adımlı qRT-PCR Protokolü. 47
Şekil 3.6. qRT-PCR'da çalışma düzeneği 49
Şekil 3.7. A375 melanom hücrelerinin Western Blot öncesi görüntüleri 50
Şekil 3.8. Nanodrop cihazı. 50
Şekil 3.9. Proteinlerin jelde yürütülmesi aşaması. 51
Şekil 3.10. Jelden membrana protein transferinin görüntüsü. 52
Şekil 3.11. Ponceau boyası ile boyanmış membranın görüntüsü. 52
Şekil 3.12. Süt tozu çözeltisi ile bloklanan membranın görüntüsü. 53
Şekil 3.13. Membranın primer antikorla inkübasyon görüntüsü. 53
Şekil 3.14. Görüntüleme cihazı. 55

Şekil 3.15. Floresans mikroskobunun görüntüsü. 56
Şekil 4.1. Fenol kırmızınının absorbansa bağlı pH grafiği. 58
Şekil 4.2. Normoksi 24. saatte farklı konsantrasyonlarda AZA uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi..... 59
Şekil 4.3. Normoksi 48. saatte farklı konsantrasyonlarda AZA uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi..... 60
Şekil 4.4. Hipoksi 24. saatte farklı konsantrasyonlarda AZA uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi 61
Şekil 4.5. Farklı zaman dilimi, ortam ve konsantrasyonlarda AZA uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi..... 62
Şekil 4.6. A375 melanom hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri. 63
Şekil 4.7. A375 melanom hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri. 63
Şekil 4.8. Normoksi 24. saatte farklı konsantrasyonlarda VMF uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi..... 64
Şekil 4.9. Normoksi 48. saatte farklı konsantrasyonlarda VMF uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi..... 65
Şekil 4.10. Hipoksi 24. saatte farklı konsantrasyonlarda VMF uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi..... 66
Şekil 4.11. Farklı zaman dilimi, ortam ve konsantrasyonlarda VMF uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi. 67
Şekil 4.12. A375 melanom hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri. 68
Şekil 4.13. CA-IX standart absorbans-konsantrasyon grafiği..... 69
Şekil 4.14. AZA uygulanmamış ve uygulanmış A375 melanom hücrelerinde CA-IX düzeyinin gösterimi..... 70
Şekil 4.15. CA9 gen ekspresyon düzeylerinin kat artışının gösterimi. 71
Şekil 4.16. HIF1A gen ekspresyon düzeylerinin kat artışının gösterimi 72
Şekil 4.17. CA9 gen ekspresyon düzeylerinin kat artışının gösterimi. 74
Şekil 4.18. Normoksik ve hipoksik ortamlarda Western Blot analizi bant görüntüleri. 75
Şekil 4.19. Normoksik ve hipoksik ortamlarda HIF-1α protein düzeylerinin gösterimi. 75
Şekil 4.20. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizi bant görüntüleri. 76

Şekil 4.21. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde B-Raf protein düzeylerinin karşılaştırılması. 76
Şekil 4.22. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizi bant görüntüleri. 77
Şekil 4.23. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde p-B-Raf protein düzeylerinin karşılaştırılması. 77
Şekil 4.24. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizi bant görüntüleri. 78
Şekil 4.25. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde ERK protein düzeylerinin karşılaştırılması. 78
Şekil 4.26. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizi bant görüntüleri. 79
Şekil 4.27. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde p-ERK protein düzeylerinin karşılaştırılması. 79
Şekil 4.28. İmmünboyama öncesinde hücrelerin inverted mikroskopta görüntüleri. 80
Şekil 4.29. A375 melanom hücrelerinde CA-IX protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi (Bar: 50 μm). 81
Şekil 4.30. A375 melanom hücrelerinde HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi (Bar: 50 μm). 81
Şekil 4.31. A375 melanom hücrelerinde B-Raf protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi (Bar: 50 μm). 82
Şekil 4.32. A375 melanom hücrelerinde ERK protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi (Bar: 50 μm). 82
Şekil 4.33. A375 melanom hücrelerinde CA-IX/ HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi 83
Şekil 4.34. A375 melanom hücrelerinde CA-IX/ HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi 83
Şekil 4.35. A375 melanom hücrelerinde CA-IX/B-Raf protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi 84
Şekil 4.36. A375 melanom hücrelerinde CA-IX/B-Raf protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi 84
Şekil 4.37. A375 melanom hücrelerinde B-Raf/ERK protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi 85

Şekil 4.38. A375 melanom hücrelerinde B-Raf/ERK protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi 85
Şekil 5.1. Deneysel akış planı. 88
Şekil 5.2. Western blot analizlerinin gösterimi 93

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. CA inhibitörlerinin yapıları 16
Tablo 2.2. BRAF mutasyonlarının sınıflandırılması 31
Tablo 3.1. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal maddeler 35
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan antikorlar. 36
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler 36
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlar 37
Tablo 3.5. Western Blot tampon çözeltilerinin içerikleri. 38
Tablo 3.6. gDNA giderme reaksiyon bileşenleri. 47
Tablo 3.7. Ters transkripsiyon reaksiyon bileşenleri. 47
Tablo 3.8. QuantiNova LNA Probu PCR Testleri için reaksiyon karışımı 48
Tablo 3.9. PCR reaksiyonunun aşamaları 48
Tablo 3.10. qRT-PCR'da ilgili genlere ait primerler 49
Tablo 3.11. Blotlama aşamasında kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon 54
Tablo 3.12. Blotlama aşamasında kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyon 54
Tablo 3.13. İmmünofloresan boyamada kullanılan antikorlar ve dilüsyon 56
Tablo 4.1. A375 melanom hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamlarda 58
Tablo 4.2. Normoksi 24. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri. 59
Tablo 4.3. Normoksi 48. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri. 60
Tablo 4.4. Hipoksi 24. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri. 61
Tablo 4.5. Farklı ortam ve zamanlar için hesaplanan IC_{50} değerleri. 62
Tablo 4.6. Normoksi 24. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri. 64
Tablo 4.7. Normoksi 48. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri. 65
Tablo 4.8. Hipoksi 24. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri. 66
Tablo 4.9. Farklı ortam ve zamanlar için hesaplanan IC_{50} değerleri. 67
Tablo 4.10. A375 melanom hücrelerinde inhibitör uygulaması öncesi ve 68
Tablo 4.11. AZA uygulanmamış ve uygulanmış melanom hücrelerinde 69
Tablo 4.12. HIF1A geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri. 70
Tablo 4.13. CA9 geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri. 71
Tablo 4.14. HIF1A geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri. 72
Tablo 4.15. CA9 geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri. 73
Tablo 4.16. HIF1A geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri. 73
Tablo 4.17. CA9 geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri. 74

Tablo 6.1. Çalışma sonuçlarının özeti 96

1. GİRİŞ

Melanom, kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açan genetik mutasyonların birikmesi ile ortaya çıkan bir kanser türüdür ve cilt kanserlerinin en ölümcül şeklidir. Bu kanser türünün insidansı gelişmiş ülkelerde diğer tüm kanser türlerinden daha da hızlı artmaktadır (1-3). Malign melanomların % 50'sinden fazlasında aktif v-raf murin sarkoma viral onkojen homolog B1 (BRAF) mutasyonları mevcuttur. BRAF'taki en yaygın mutasyon ise 600. aminoasitte valinin glutamik asit ile değiştiği BRAF mutasyonu (BRAFV600E)'dur. Bu mutasyon sonucunda mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağı sürekli aktif kalır (4,5).

MAPK'lar, fizyolojik ve patolojik süreçlerde hücre büyümesinin ve sağkalımının anahtar düzenleyicileridir. Anormal MAPK sinyali, insan kanserlerinin gelişimi ve ilerlemesinin yanı sıra kanser tedavisine verilen tepkilerin belirlenmesinde de kritik bir rol oynar (6).

Bu bilginin ışığında araştırmalar, başlangıçta mutant B-Raf proteinini ve ardından aşağı akış efektörleri olan mitojenle aktifleştirilen protein kinaz kinazı (MEK) kinazları hedefleyerek, küçük moleküller yoluyla MAPK yolağının inhibisyonuna odaklandı. Kombinasyon terapileri, melanom hastalarının yanıt oranını ve sağkalım oranını önemli ölçüde değiştirdi. Ancak, genetik ve epigenetik olaylarla MAPK yolağının yeniden aktivasyonu, bu terapinin uzun vadeli etkinliğini sınırladı (1). Bu sebeple melanomda hedefli tedavilere dirençli hastalar için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (2).

MAPK bileşenleri tarafından ekspresyonu aktive edilen Karbonik anhidraz-IX (CA-IX), karbondioksitin (CO_2) bikarbonat (HCO_3^-) ve protona (H^+) hidrasyonunu tersinir bir şekilde katalize eder. CA-IX proteininde bulunan intrasitozolik kuyruk (IC) kalıntılarının fosforillenerek hücre içi sinyal yolaklarını uyarabileceği öne sürülmüştür. Bu enzim karsinogenez ile ilişkilidir ve onkolojide potansiyel bir terapötik hedef olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Preklinik çalışmalar, CA-IX

inhibisyonunun tümör büyümesini geciktirdiğini ve deneysel koşullar altında invazyonu ve metastazı azalttığını ileri sürmüştür (7-10).

Literatürdeki çalışmalar BRAF geninin kodladığı protein (B-Raf) inhibitörlerinin kanser üzerindeki etkilerini detaylıca açıklamaktadır. Ancak CA-IX inhibisyonunun B-Raf proteini üzerine olan etkisi henüz aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada antikanser hedefi olarak önemli bir yere sahip olan CA-IX enziminin inhibisyonunun, MAPK yolağında kritik bir yeri olan B-Raf proteini üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

Bu amaç doğrultusunda, elde edeceğimiz sonuçların bu alanda literatüre katkı sağlayacağını ve melanomda alternatif tedavi yöntemlerine yeni bir bakış açısı getireceğini düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla ortaya çıkan bir hastalıktır ve dünyada ölümlerin ikinci sebebidir. Kanser hücreleri çoğalır ve bulundukları bölgede tümör oluşumuna sebep olur (11,12). Bu hücreleri normal hücrelerden ayıran bazı özellikler vardır. Bu özellikler: büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadan büyüyebilme, sınırsız bölünme potansiyelinin bulunması ve ölümsüzlük, apoptotik sinyallerden kaçabilme, büyümeyi baskılayan sinyallerden kaçabilme, anjiyogenez, invazyon ve metastaz yapabilme, bağışıklık sisteminden kaçabilme, kanserleşmeyi destekleyen inflamasyon, genetik mutasyonlara sahip olma ve enerji metabolizmasını değiştirebilmedir (13). Kanser ayrıca hücre sinyal yolaklarının düzensizliğine sebep olur (14). Onkojenik yolakların düzensizliği ise tümör oluşumu ve kanserin ilerlemesine sebep olabilir. Biyolojik yolaklardaki değişikliklerin onkogeneze nasıl sebep olacağını anlamak, kanser teşhisi ve tedavisi için yeni stratejiler geliştirmeye yardımcı olabilir. Bu onkojenik yolakların özetlenmesi ve karakterizasyonu, kanserlerin patogenezine ilişkin yeni bilgiler sağlayabilmektedir (15). Bu nedenle kanser oluşumuna farklı bir tedavi anlayışı getirmek, bilimde kanser ilişkili sınırsız çalışmaları da beraberinde getirmiştir. Söz konusu çalışma, bu çalışmalardan birisi olup, melanomda gelecek çalışmalara ışık tutacak nitelikte olacaktır.

2.2. Melanom

2.2.1. Melanomun Epidemiyolojisi

Melanositler, cilt ve saç pigmentasyonundan sorumlu hücreler olup nöral krest hücrelerinden köken alır. Bu hücreler cildin epidermisinin bazal tabakasına göç eder. Küçük bir kısmı da uvea, meninksler ve mukozal yüzeylere göç eder. Atipik ve genetik olarak mutasyona uğramış melanositler, malign melanoma neden olur. Derideki melanosit yoğunluğu yaşa, nevüs sayısına, vücut bölgesine ve güneşe maruz kalmaya göre değişir. Aralıklı güneşe maruz kalma, melanom gelişimi için önemli risk faktörlerinden biridir (16,17).

Melanom en agresif ve ölümcül cilt kanseri türüdür. Tüm kutanöz malignitelerin yaklaşık % 5'ini oluşturmasına rağmen, cilt kanserine bağlı ölümlerin büyük çoğunluğundan melanom sorumludur (18). Melanom diğer cilt kanserlerinden daha az yaygın olsa da, daha ölümcüldür ve cilt kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık % 73'ünü oluşturur (19). Ayrıca, akciğer kanseri ve meme kanserinden sonra, melanom, beyin metastazlarının en sık görüldüğü kanser türüdür. Melanom hastalarının % 75 kadarında beyine metastaz görülür. Beyin metastazı olan toplam vakaların % 95'inde ölüm görülmektedir (20). Melanom, % 98'lik bir 5 yıllık sağkalım oranına sahiptir. Ancak ileri veya metastatik melanom teşhisi olan hastalarda bu yüzde önemli ölçüde düşer (19).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) bir parçası olan Global Kanser Gözlemevi (GCO) tarafından yapılan değerlendirmeye göre, melanom insidansı dünya çapında özellikle Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ülkeleri ve ağırlıklı olarak Kafkas nüfusu olan diğer ülkelerde hızlı bir şekilde artmaktadır (19,21). Genel melanom insidansının, Asya ve Afrika popülasyonlarına kıyasla beyaz popülasyonlarda daha yüksek olduğu görülmüştür (17).

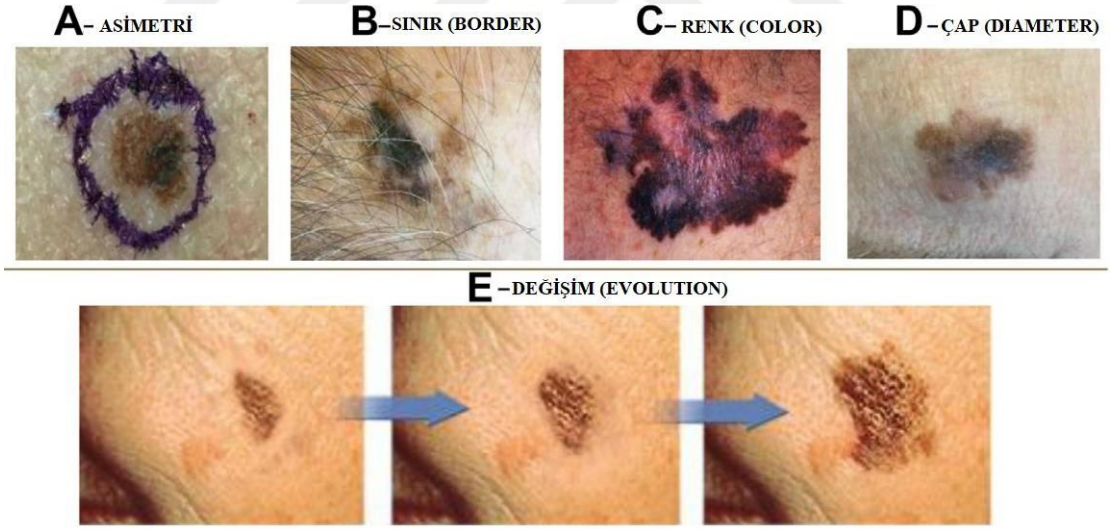
Melanom insidansının 25-50 yaş arasında doğrusal olarak artmasının yanı sıra cinsiyete göre de farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Genel olarak, erkeklerde melanom görülme olasılığı kadınlara göre 1,5 kat daha fazladır (19). Melanom; insidansı, yüksek mortalitesi ve tedavi maliyetleri göz önünde bulundurulduğunda etkisi yüksek sinsi bir tümördür (22,23).

2.2.2. Melanomun Risk Faktörleri

Melanomun yüksek metastatik potansiyeli nedeniyle, melanomla ilişkili risk faktörlerini belirlemek ve bu agresif cilt kanserini teşhis ve tedavi etmek için araştırmalar devam etmektedir. Melanomun gelişimine sebep olan başlıca faktörler arasında yaşam tarzı ve genetik risk faktörleri bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, kapalı alanda bronzlaşma (solaryum), ultraviyole maruziyeti ve ilaçlar modifiye edilebilir risk faktörleri iken genetik, aile öyküsü, sosyo-ekonomik durum, ben (cilt lekeleri), ırk, yaş ve cinsiyet de modifiye edilemez risk faktörleridir (19).

2.2.3. Melanomun Klinik Özellikleri

Melanomun klinik özelliklerine bakıldığında iyi huylu ve kötü huylu lezyonun morfolojisi farklılık göstermektedir. İyi huylu bir lezyonun kötü huylu değişimi, asimetri, düzensiz sınırlar, değişken renk, 6 mm'den büyük çap ve değişim (ABCDE) ile tanımlanmaktadır (Şekil 2.1). ABCDE tanımlamasına göre; A) Lezyonun ortasından aşağı doğru bir çizgi çekilirse ve iki taraf asimetrik ise bu durum melanom için bir uyarı işareti olabilir. B) Melanomun sınırları düzensiz olma eğilimi gösterir. Düzensiz, bulanık veya çentikli kenarlar melanom için şüpheye sebep olabilir. C) İyi huylu (benign) bir ben tek renktir. Eğer deri lezyonu içinde birden fazla renk mevcutsa melanomu işaret edebilir. D) Çapı 6 mm'den büyük olan lekeler melanomu düşündürür. E) Boyutu, şekli veya rengi değişen bir ben veya deri lezyonu melanomla ilgilidir (17). Melanomda tümörün *in situ* döneminde radyal (yanal) bir büyüme gözlenirken invazif (dikey) döneminde neoplastik hücrelerin dermoepidermal bileşkeyi aşarak papiller dermise yayılıp vertikal büyümesi söz konusudur (24).



Şekil 2.1. Melanom'un ABCDE'si (19).

2.2.4. Melanomların Sınıflandırılması

En sık görülen malign melanomlar olan kutanöz melanomlar histolojik olarak 4 alt tipe ayrılırlar (17):

Yüzeyel Yayılan Melanom (% 70): Yüzeyel yayılan melanom en yaygın melanom türüdür. İnvazif büyüme meydana gelmeden önce radyal büyümeye uğrar (17,19). Yüzeyel yayılan melanomlar *de novo* veya nevüs ile birlikte ortaya çıkabilir. En çok kadınların bacaklarının arkasında ve erkeklerin sırtında lokalizedir (25).

Nodüler Melanom (% 15-% 30): Genellikle mavi veya siyah olan ve hızla genişleyen kabarık veya polipoid lezyonlardan kaynaklanır. Radyal bir büyüme fazı yoktur, ancak daha hızlı büyüme ve daha yüksek metastaz oranı ile ilişkili yalnızca invazif bir büyüme fazına sahiptir. Erkeklerde kadınlara göre daha sık rastlanır (19, 25).

Lentigo Maligna Melanom (% 4-% 10): İkinci en yaygın kutanöz melanom türüdür (17). Tipik olarak küçük çil benzeri bir makül olarak başlar. Zamanla büyür, koyulaşır, asimetrik hale gelir ve dikey bir büyüme evresi gösterir. Kronik olarak güneşe maruz kalan cildi olan yaşlı hastalarda daha sık görülür (19).

Akral Lentiginöz Melanom (<% 5): Bu melanom türü, dermal-epidermal bağlantı boyunca tek birimler halinde ve birleşik odaklar olarak bulunan hücrelere sahiptir; bu tür melanom en yaygın olarak akral bölgelerde ortaya çıkar, ancak bazen mukozal bölgelerde ortaya çıkar (26). Tipik olarak, kadın ağırlıklı yaşlı hastaları etkiler. Lezyonlar en sık avuç içi, ayak tabanı, subungual ve bazen mukozal yüzeylerde ortaya çıkar (19,25).

Melanom ayrıca oküler, gastrointestinal, genitoüriner ve nazofaringeal yerler dahil olmak üzere melanositlerin normal olarak oluştuğu herhangi bir kütanöz olmayan bölgede de gelişebilir. Bunlar kutanöz melanomlara göre daha az yaygındır (19).

2.2.5. Melanomun Tedavisi

Güncel terapötik yaklaşımlar arasında melanom tedavisinde kullanılan; cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, immünoterapi, ve hedefe yönelik tedaviler bulunmaktadır. Terapötik strateji, hastanın sağlığına, hastalığın evresine ve tümörün konumuna bağlı olarak tekli ajanları veya kombine tedavileri içerebilir (27).

Cerrahi rezeksiyon

Cerrahi uygulama, klinik olarak negatif bölgesel lenf düğümleri olan primer kutanöz melanomlu hastalar için geçerli son derece önemli standart bir tedavidir (26). Cerrahi işlemler tümörün klinik-patolojik özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Eksizyon, *in situ* melanomlar için 0,5 cm, kalınlığı 2 mm'ye kadar olan tümörler için 1 cm ve 2 mm'den daha kalın tümörler için ise 2 cm'lik güvenlik sınırlarını içerir (28).

Kemoterapi

Metastatik hastalığı olan vakalar için, cerrahi tedavi tek başına iyileştirici olmayacaktır. Bu sebeple ilaç tedavileri bir sonraki başvurulacak adım olarak belirlenir. Literatüre bakıldığında metastatik melanomlu hastalar için tek tedavi seçeneğinin kemoterapi olduğu gözlenmektedir (29).

Melanom için kemoterapi tedavisinde kullanılan Dakarbazin ve Temozolomid son derece önemlidir. Dakarbazin, melanom tedavisi için 1975 yılında Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış, alkilleyici bir ajandır. Diğer tüm kemoterapötik ilaçlar gibi, kanser hücreleri için sağlıklı hücrelere göre çok seçici değildir. Buna rağmen Dakarbazin, metastatik melanom için başlıca tedavi seçeneklerinden biri olmaya devam etmektedir. Diğer bir kemoteraötik ilaç olan Temozolomid ise Dakarbazin analoğu olarak kabul edilmesine rağmen, oral uygulama avantajına sahip olduğu için çalışılmıştır. Bu ilaç, melanomun metastaz yaptığı en yaygın yerlerden biri olan merkezi sinir sistemine ulaşabildiği için melanom tedavisi için önem taşır (21).

Dakarbazin ve Temozolomid gibi standart tedavi ilaçları hala melanom tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Ancak, bu ajanların yeni hedeflenmiş ve daha etkili ilaçlarla birleştirilmesiyle yeni stratejiler geliştirildiği görülmektedir (5).

Metastatik melanomlu hastalar için prognozu büyük ölçüde iyileştirmeyi hedefleyen yeni ilaç keşifleri kemoterapiye olan ilgiyi azalmıştır (29).

İmmünoterapi

Melanom, immün sisteme en duyarlı tümörlerden biridir. Dolayısıyla, T-hücrelerinin, melanomda merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (30). Antitümöral yanıtlarda, T hücrelerinin tümöre özgü antijenleri tanıdığı, aktive olduğu, çoğaldığı ve

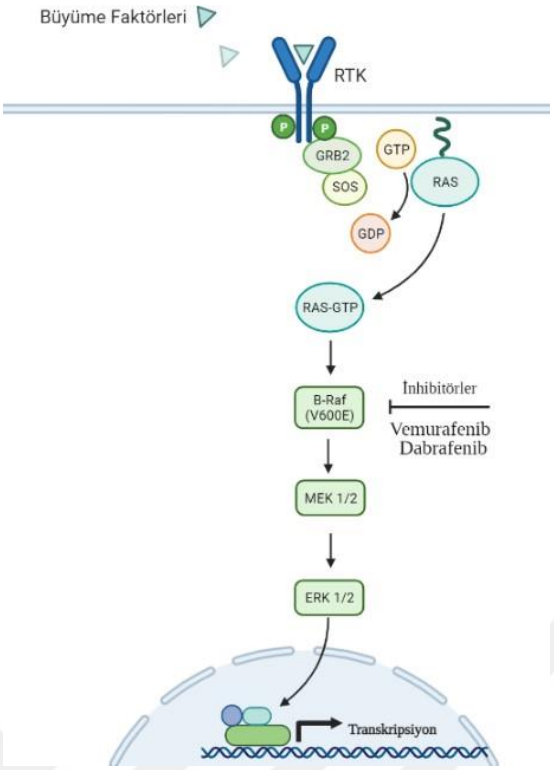
farklılaşarak tümöre özgü antijenleri ifade eden hücreleri yok etme kapasitesini kazandığı bilinmektedir. T hücresinin anti-tümöral tepkilerini sınırlayan uyarıcı ve inhibe edici sinyal yollarına ek olarak, kanser hücreleri, genellikle B7 moleküllerini eksprese etmedikleri için T hücresi tespitinden kaçabilmektedir. Birçok kanser türünde, tümör ve bağışıklık sistemi arasındaki karmaşık etkileşimlerin metastatik uzak bölgelere yayılmasında rol oynadığı bilinmektedir. Bu etkileşimlere dayanarak, immünoterapi, metastatik malign melanomlu hastalar için umut verici bir tedavi seçeneği gibi görünmektedir (27). Cilt kanserlerinin neden olduğu ölümlerin büyük çoğunluğundan sorumlu olan metastatik / rezeke edilemeyen kutanöz melanomlarda FDA onaylı immünoterapilerin ilk ajanları, anti-programlı hücre ölümü proteini-1 (anti-PD-1) ilaçlarını (Nivolumab, Pembrolizumab) ve anti-sitotoksik T lenfosit antijen-4 (anti-CTLA-4) antikorunu (İpilimumab) içermektedir (31).

Hedeflendirilmiş tedavi

Kutanöz melanomların % 60'ından fazlası BRAF geninde bir mutasyon barındırır ve bunların % 80'ninden fazlasında spesifik V600E mutasyonu bulunmaktadır (32). BRAFV600E'ı hedef alan tedaviler, büyümeyi inhibe etmesi, anjiyogenezi önlemesi, invazyon ve metastazı azaltması, tümör hücre ölümünü indüklemesi veya tümör farklılaşmasını teşvik ederek malign tümörlerin ilerlemesini durdurması gibi önemli potansiyele sahiptir. Klinik öncesi çalışmalardan elde edilen kanıtlar, BRAFV600E'ın melanom tedavisinde önemli bir hedef olma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (33).

Ticari adı Zelboraf olan Vemurafenib (VMF) (PLX-4032), 2011 yılında, FDA tarafından onay almış, primer hedefi B-Raf proteini olan ve BRAFV600E mutasyonuna özgü kullanılan bir ilaçtır (34). VMF, mutasyona uğramış BRAF monomerinin ATP bağlayıcı bölgesini bloke ederek MAPK yolunu inhibe eder (Şekil 2.2) (35,36).

Ticari adı Tafinlar olan Dabrafenib (DAB) (GSK2118436) ise 2013 yılında FDA onayı almış primer hedefi B-Raf proteini olan ve BRAF mutasyonu pozitif hastalarda ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) kullanılan bir ilaçtır (Şekil 2.2) (35,36).



Şekil 2.2. VMF ve DAB'ın etki mekanizmasının gösterimi (37).

Hem VMF hem de DAB şu anda BRAFV600 mutasyon pozitif maligniteler için klinik çalışmalarda, adjuvan çalışmalarda ve melanom için farklı ilaçların kombinasyon çalışmalarında test edilmektedir (34).

MEK inhibitörlerinin geliştirilmesi ile BRAF inhibitörlerinin dizaynı önemli bir alana yerleşmiştir. Trametinib kullanımı bu yeni hedefli tedaviler sınıfına aittir ve FDA tarafından tek bir ajan olarak onaylanan sınıfının ilk ilacını temsil etmektedir. BRAF ve MEK inhibitörlerinin kombinasyonu günümüzde BRAF mutasyonu taşıyan melanomlarda tedavinin temelini oluşturmaktadır (21).

Melanomdaki yüksek dirençlilik melanom tedavisi için yeni ve etkili stratejilerin gelişimini hızlandırmıştır. Hedeflenen terapiler, spesifik olarak melanom oluşumu ve ilerleyişinin belirli mekanizmalarını hedef alacak şekilde ortaya çıkmaktadır (5).

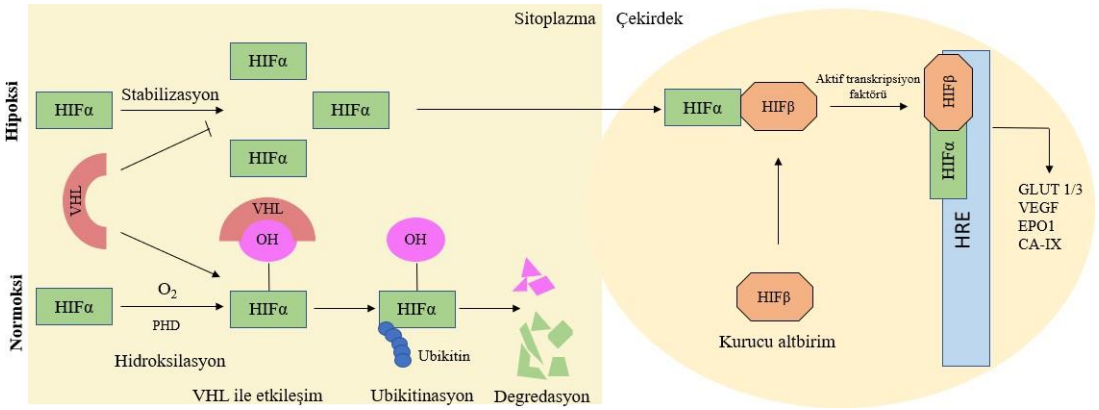
En agresif ve tedaviye dirençli solid tümör tiplerinden biri olan melanom da hipoksiden etkilenmektedir. Hipoksi, melanom hücrelerinin fenotiplerini,

agresifliklerini ve tedavi hassasiyetlerini belirgin şekilde etkilemekte ve mikroçevresinin asidifikasyonu ile kanserin ilerlemesine neden olmaktadır (38).

2.3. Hipoksi ve HIF Yolağı

Normal şartlar altında oksijen (O_2) konsantrasyonu % 2-9 arasındadır. O_2 konsantrasyonunun % 2'den düşük olduğu ortam hipoksi olarak tanımlanır (39). Hipoksi koşul, hızla çoğalan hücrelerin O_2 gereksinimlerini karşılayamadığında meydana gelmektedir (40).

Hipoksi, hipoksi ile indüklenebilir faktör-lα (HIF-lα) ile tetiklenen bir moleküler yolak ile oluşur (41). Hipoksi ile indüklenebilir faktör-l (HIF-1), HIF-1α ve hipoksi ile indüklenebilir faktör-lβ (HIF-1β) olmak üzere iki alt birime sahiptir. HIF-1α ekspresyonu hem hipoksiye bağımlı hem de hipoksiden bağımsız onkojenik sinyallerle kontrol edilmektedir. Hipoksik ortam, HIF-1α'nın hidroksilasyonunu sağlar ve Von Hippel Lindau (VHL)'nin, HIF-1α'ya bağlanmasını önler. Böylece HIF-1α'nın degradasyonu engellenir ve sitoplazmada HIF-1α birikir. Çekirdeğe taşınan HIF-1α, HIF-1β ile HIF-1 oluşturmak üzere heterodimerize olur. HIF-1, hipoksi yanıt elementi (HRE) bölgelerini içeren genlere bağlanır. Böylelikle, pH regülasyonu, hücre proliferasyonu, hücre adezyonu, anjiyogenez ve vasküler olarak yeniden düzenlenme için önemli olan, aynı zamanda CA-IX geninin de bulunduğu birkaç genin transkripsiyonunu indüklemiş olur (Şekil 2.3) (42).



Şekil 2.3. HIF yolağı (43).

CA-IX enziminin ileri düzeydeki ekspresyonu, tümör hipoksisi tarafından düzenlenir (44). Söz konusu CA-IX, hipoksiye en iyi yanıt veren proteinlerden biridir (45). Bu sebeple, CA-IX enzimi tümör hipoksisi için bir belirteç ve prognostik bir gösterge olarak kabul edilmektedir (40,46).

2.4. CA Enzimi

Karbonik anhidraz (CA) (E.C.4.2.1.1), CO_2'nin geri dönüşümlü hidratasyonunu katalizleyen, HCO^-_3 iyonu ve H^+ üreten çinko (Zn^{+2}) içeren bir metalloproteindir (Şekil 2.4) (47).



Şekil 2.4. CA enzimlerinin katalizlediği reaksiyon (47).

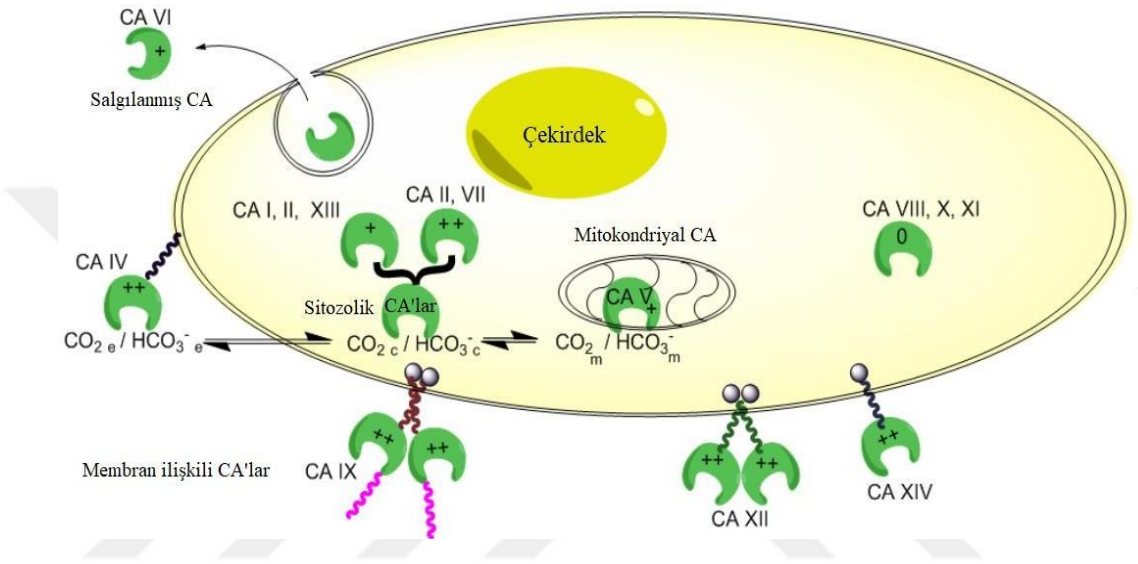
CA'lar birçok organizmada, pH ve CO_2 homoeostazı ile ilgili kritik fizyolojik işlemlerde rol oynar. Glukoneogenez ve lipogenez gibi biyosentetik reaksiyonlar, CO_2/ HCO_3^-'ın respirasyon ve taşınımında, çeşitli dokularda/organlarda elektrolit salgılanmasında, kemik erimesinde, kalsifikasyon ve diğer birçok fizyolojik veya patolojik süreçte görev yapar (48).

2.4.1. CA Enzim Ailesi

CA'lar, Yunan harfleriyle adlandırılmış sekiz farklı genetik aileye sahiptir: α, β, γ, δ, ζ, η, θ ve ι. Son üç sınıf yakın zamanda keşfedilmiştir. Ayrıca, her bir sınıfın üyeleri, farklı biyokimyasal özellikler ile karakterize edilen, spesifik doku veya organlarda yerleşim gösteren protein izoformlarına sahiptir. Hayvanlarda bulunan CA'lar α sınıfına aittir. Bitkiler ve alglerde α, β, γ, δ, θ ve ι sınıfları bulunurken; mantarlar α ve β CA'lara sahiptir. Protozoalar α, β ve/veya η CA'ları bulundururken; bakteriler α, β, γ, ve ι CA'ları kodlar (48,49).

İnsanlarda, farklı hücre lokalizasyonu, katalitik aktivite, farklı inhibitör ve aktivatörlerine karşı duyarlılığı olan 16 farklı CA izoenzimi ve CA ile ilgili protein tanımlanmıştır. Bu izoenzimlerin bazıları sitozolik (CA-I, CA-II, CA-III, CA-VII ve

CA-XIII), bazıları transmembran ilişkili (CA-IV, CA-IX, CA-XII, CA-XIV ve CA-XV) olup ikisi mitokondriyal (CA-VA ve CA-VB) biri de salgılanmış (CA-VI) formdadır. Öte yandan, katalitik olarak aktif olmayan CA ile ilişkili izoenzimler (CARP-VIII, CARP-X ve CA-XI) de sitozolik proteinlerdir (50). Bu izoenzimler, enzim aktivitesi ve CA inhibitörleri ile inhibisyon bakımından farklılık gösterir (Şekil 2.5) (51).



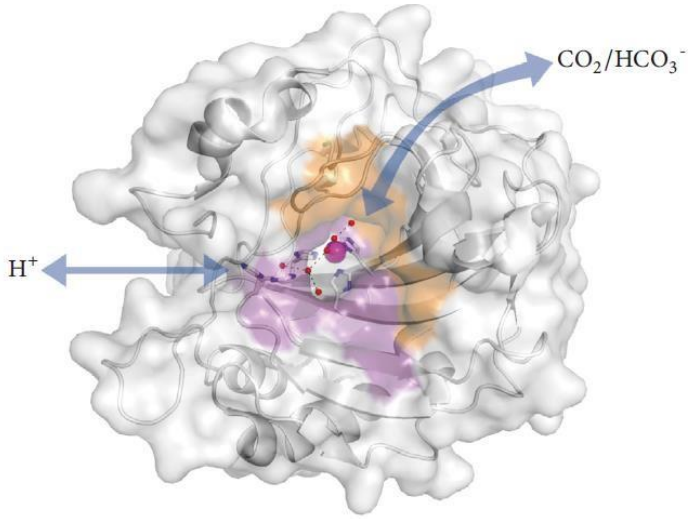
Şekil 2.5. CA izoenzimleri ve yerleşimleri (47).

CA enziminin inhibitörlerinin; diüretikler, antikonvülzan, antiobezite, antiglokom ve daha yakın zamanda antitümör ve antienfektif ajanlar olarak araştırılması son yıllarda önem kazanmıştır (50).

Transmembran izoenzimler olan CA-IX ve CA-XII, tümörle ilişkili proteinlerdir. Bu proteinlerin, çok sayıda katı tümörde aşırı miktarda eksprese edildiği ve kanser hücrelerinin metastatik yayılımında rolleri olduğu bilinmektedir (52). CA-IX, sağlıklı dokularda büyük oranda bulunmazken, CA-XII, normal dokularda bulunur fakat bazı tümör tiplerinde de aşırı eksprese edilir (53). CA enzim ailesinden olan tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII, kanserde yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (8).

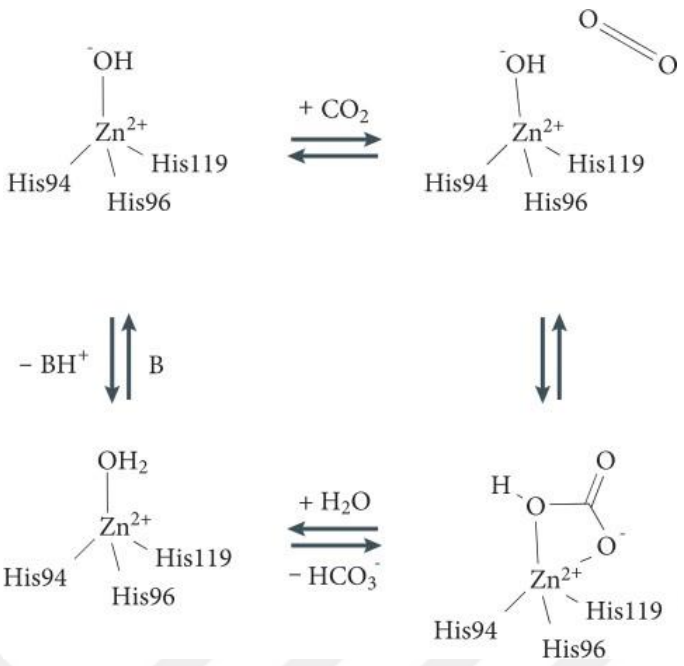
2.4.2. CA Enziminin Yapısı ve Çalışma Mekanizması

CA'lar, aktif alan boşluğu içinde bağlı bir metal iyonuyla katalitik olarak etkili olan metalloenzimlerdir. α-, γ- ve δ-CA'lar Zn^{+2}, üç histidin rezidüsü ve bir su molekülü/hidroksit iyonu ile koordine edilir (Şekil 2.6) (48).



Şekil 2.6. CA enziminin aktif bölgesi (54).
CA-II'nin, aktif bölge kalıntıları His94, His96 ve His119'a bağlı çinko ile gösterimi. Hidrofobik bölge turuncu renkte gösterilirken hidrofilik bölge mor renkte gösterilir. Mavi oklar, hidrofobik bölge boyunca substrat akışını, CO_2 ve HCO_3^-'yi ve hidrofilik bölgeden proton transferini gösterir.

CA'nın aktif bölgesi, hidroksit iyonu (OH^-) ile bağlanmış bir Zn^{+2} iyonu içerir ve aynı katalitik aktiviteyi paylaşır. CA enziminde üç histidin kalıntısı (His 94, His 96 ve His 119) mevcuttur ve yan zincir kalıntıları Zn^{+2} ile koordinat bağları oluşturur. CA'nın aktif bölgesi CO_2 için özel bir cep içerir ve kataliz eyleminin ilk adımı, Zn^{+2} bağlı OH^-'ın CO_2 üzerine nükleofilik saldırısını içerir. Nükleofilik saldırı, Zn^{+2} iyonuna zayıf bir şekilde bağlanan bir HCO_3^- üretir. Bu HCO_3^- iyonu, su (H_2O) molekülü tarafından çıkarılana kadar Zn^{+2} iyonuna bağlı kalır. H_2O molekülü HCO_3^- iyonunu yerinden çıkardığında, bu iyon farklı ağ geçidi kanallarında veya Cl^-/HCO_3^- değiştirici, Na^+/HCO_3^- değiştirici ve çeşitli fizyolojik eylemlerde benzersiz roller oynayan diğer birçok kanal gibi taşıyıcılarda rol oynar. HCO_3^- iyonu salındığında, H_2O molekülü OH^- iyonunu yeniden oluşturmak için Zn^{+2} iyonuna bağlanır (Şekil 2.7) (44).



Şekil 2.7. CA'nın çalışma mekanizması (55).

2.4.3. CA İnhibitörleri

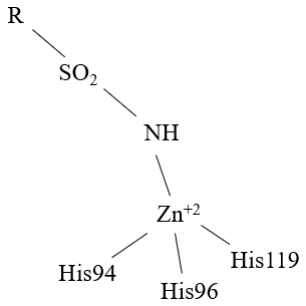
CA inhibitörleri; antiglokom, diüretik, antiobezite ve antitümör ajanlar olarak kullanılmaktadır (48). Bu inhibitörler, klasik olan ve klasik olmayan olmak üzere sınıflandırılır. Metal ile koordinasyonlarına göre farklılık gösteren iki tür klasik CA inhibitörü bulunmaktadır.

Bunlar, tetrahedral eklentiler oluşturan ve doğrudan Zn^{+2}'ya bağlananlar ve trigonal (bipiramidal) eklentiler oluşturan ve Zn^{+2} bağlı H_2O veya OH^- grubuna bağlananlar olmak üzere tanımlanır (42).

Klasik CA İnhibitörleri

Sülfonamidler ve bunların tiyoesterleri, en çok çalışılan CA inhibitörleridir. Sülfonamidler ve türevleri, 1954'ten beri klinikte kullanılan en yaygın CA inhibitörleridir. Bu bileşikler, tetrahedral bir geometri içinde doğrudan Zn^{+2} ile koordine edilen sülfonamid kısmının azotuyla ayrışmış halde CA enzimine bağlanır (Şekil 2.8). Sülfonamidler ve tiyoesterleri, nM-µM aralığında genellikle bağlanma eğilimleri sergileyen güçlü inhibitörlerdir. İnhibitörün bağlanması, enzimin aktif

bölgesindeki hidrofobik ve hidrofilik bölgeleri ile veya her ikisi ile ilave etkileşimler sağlayan kuyruğun yapısından etkilenir (12,56).



Şekil 2.8. CA'nın sülfonamid ile oluşan tetrahedral geometrisi (56).

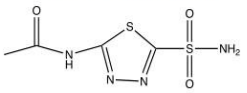
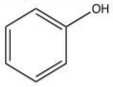
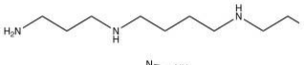
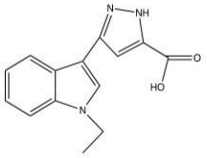
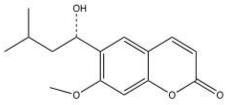
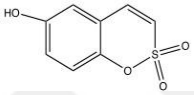
İkinci tip klasik CA inhibitörleri, trigonal-bipiramidal, distorted tetrahedral veya tetrahedral gibi üç farklı tip geometride Zn^{+2}'ye bağlanan metal şelat anyonlar olarak gözlenir. İnorganik anyonların çoğu düşük μM'da inhibisyon sabitiyle zayıf inhibitörlerdir. Bazı izoformlarda metal şelat anyonları düşük nM aralıkta bağlanma affinitesi gösterirler (42).

Klasik olmayan CA inhibitörleri

Son zamanlarda fenoller, poliaminler, karboksilik asitler, kumarinler ve bunların türevleri ile bağlanmış olan klasik olmayan CA inhibitörleri dizayn edilmiştir. Klasik olmayan CA inhibitörlerinin birçoğu doğrudan Zn^{+2}'ye bağlanmaz ve enzimdeki aktif alan boşluğunun girişini engelleyen ve aktif alanın dışına bağlanan Zn^{+2} bağlı su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanması ile farklı bağlanma kombinasyonları içerir. Klasik olmayan CA inhibitörlerinin inhibisyon mekanizmaları hala net olarak bilinmemektedir (42).

Klasik ve klasik olmayan CA inhibitörlerinin adları ve kimyasal yapıları Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. CA inhibitörlerinin yapıları (42).

CA İnhibitörleri	Yapısı
	Klasik CA İnhibitörleri
Sülfonamid (Asetazolamid)	
	Klasik olmayan CA İnhibitörleri
Fenolik (Fenol)	
Poliamin (Spermin)	
Karboksilik Asit	
Kumarinler	
Sülfokumarin	

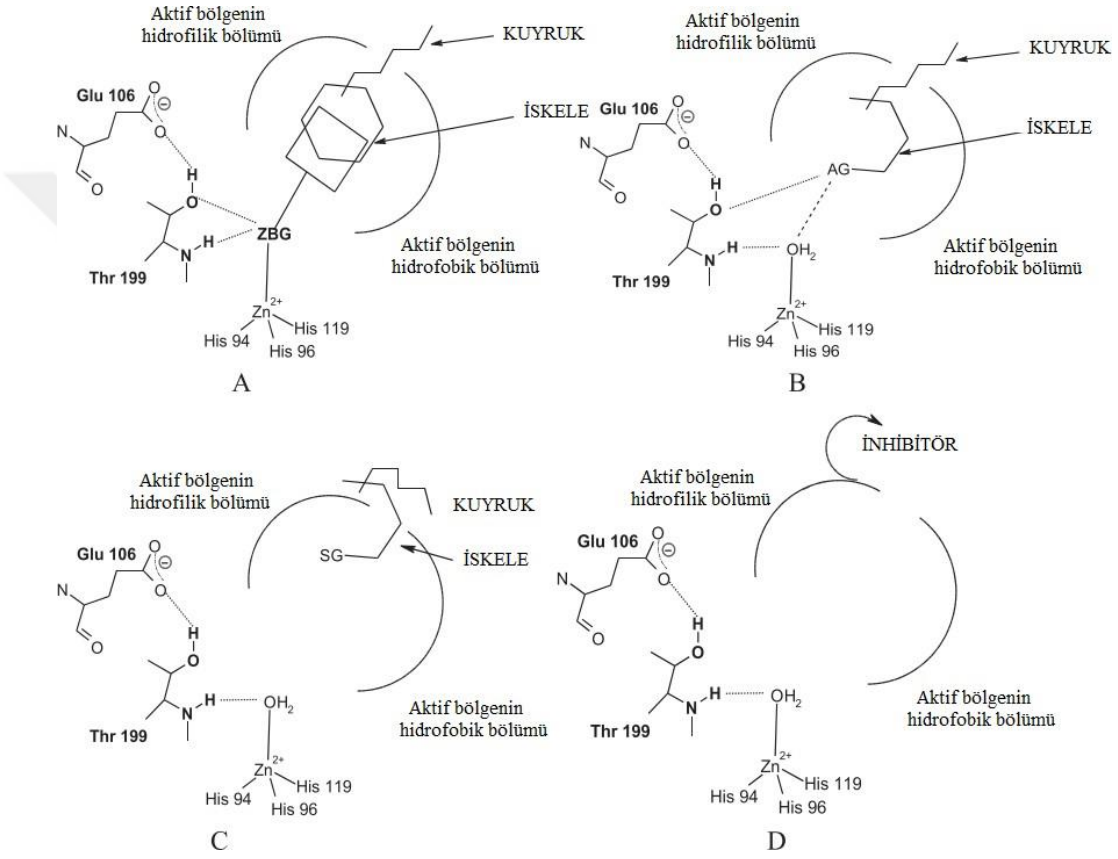
CA inhibitörlerinin inhibisyon mekanızması

Birçok CA inhibitörü, Zn^{+2} metal iyonuna bağlanarak işlev görmektedir (Şekil 2.9 (A)). Zn^{+2} bağlayıcı grup (ZBG) SO_2NH^- içeren sülfonamidler ve bunların izoesterleri (sülfamatlar, sülfamidler) klasik CA inhibitörleri sınıfındadır. Metal iyonuna bağlanan diğer inhibitör sınıfları arasında karboksilatlar; hidroksamatlar; ditiokarbamatlar ve izoesterler de bulunmaktadır (48).

Metal iyonu ile koordineli olarak su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanan ikinci bir CA inhibisyon mekanizması ise Şekil 2.9 (B)'de gösterilmektedir. Bu mekanizmada fenol, X-ışını kristallografisi ile belgelenen ilk inhibitördür. Daha sonra yapısı X-ışını kristallografisi ile aydınlatılan poliamin, ester ve sülfokumarin grupları ortaya çıkarılmıştır (48).

Şekil 2.9 (C)'de gösterilen aktif bölge girişini engelleyen inhibitörler, aktif bölge boşluğunun girişinde metal iyonundan daha uzakta bir konumdadır. Kumarinler ile aydınlatılan bu mekanizma ile kumarin sınıfına benzer bileşiklerin de enzime metal iyonundan daha uzak bir mesafede bağlandığı gösterilmiştir (48).

Daha yakın zamanlarda dördüncü bir CA inhibisyon mekanizması X-ışını kristallografisi ile belgelenmiştir (Şekil 2.9 (D)). Aktif bölge içindeki girişe bitişik bir hidrofobik cepte, aktif bölge boşluğunun dışına bağlanan bir benzoik asit türevi gözlenmiştir. İnhibisyon, proton mekik kalıntısını (His64) dış konformasyonunda bloke ederek elde edilmiş ve bu durum tüm katalitik döngünün çökmesine yol açmıştır (48).

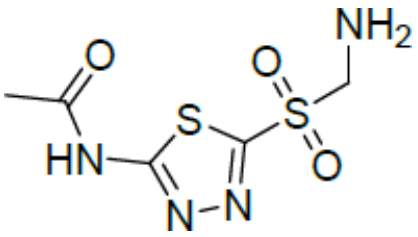


Şekil 2.9. CA'nın inhibisyon mekanizması (48).

Asetazolamid

Asetazolamid (AZA) (5-Asetamido-1,3,4-tiadiazol-2-sülfonamid), klinik olarak kullanılan ilk CA inhibitörüdür (Şekil 2.10) (57). Klasik sülfonamid inhibitörü olan AZA, çoğu insan CA izoformunu kuvvetli bir şekilde inhibe etmektedir (58). Uygulanmasını takiben, idrar hacmi derhal artar ve normal olarak asidik pH'ı (6) alkali hale gelir (yaklaşık 8.2). Böylece artan miktarda HCO_3^-, beraberindeki katyonlar olarak Na^+ ve K^+ ile birlikte idrarla (normalde elimine edilen miktardan 120 kat daha

fazla) elimine edilirken, atılan klorür miktarı azalır (57). AZA, glokomda artmış göz içi basıncının (GİB) tedavisinde, epilepsi, irtifa hastalığı, idiyopatik intrakraniyal hipertansiyon ve kalp yetmezliğinin tedavisi için kullanılabilir (44). Ayrıca AZA, *in vivo* tümör modellerinde CA-IX inhibisyonunda da kullanılmıştır (59).

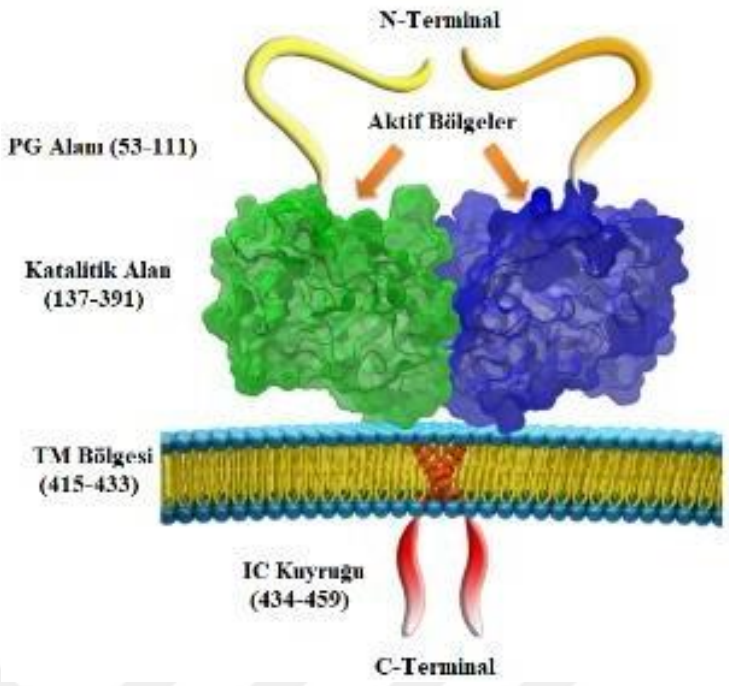


Şekil 2.10. AZA'nın kimyasal yapısı (60).

2.4.4. CA-IX Enzimi

CA-IX, ilk olarak insan servikal karsinom hücre hattında (HeLa) keşfedilmiş ve MN proteini olarak adlandırılmıştır (42). CA-IX enzimi asidozda rol oynayarak kanserin ilerlemesine neden olan ve hipoksi ile indüklenen tümör bağlantılı bir hücre yüzeyi glikoproteinidir. Ayrıca, katalizlediği reaksiyondan ötürü asit-baz dengesi gerektiren tüm biyolojik işlemler için de gerekli bir enzimdir (45).

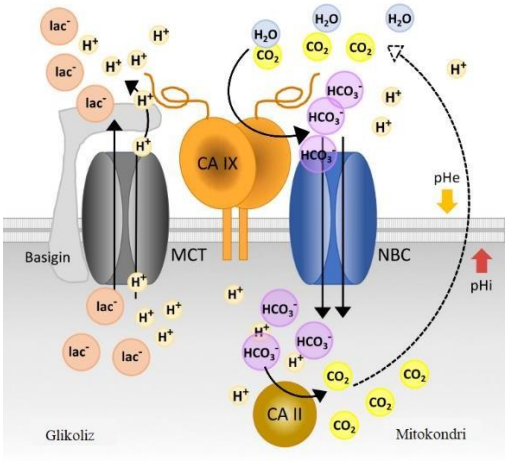
CA-IX enzimi iki benzer Sistein (Cys) kalıntısı arasında intermoleküler disülfit bağına sahip dimerik bir transmembran proteindir. Bu enzimin monomerik yapısında, sinyal peptit (SP), aktif katalitik bölgeleri içeren CA enzim alanı, transmembran bölge (TM) ve IC kuyruğu bulunmaktadır. Ayrıca, N-terminalinde proteoglikan alanı (PG) olarak adlandırılan ek bir alana sahiptir (Şekil 2.11). PG alanı tümörogenezde görevlidir (8,43,47) ve bu alanın varlığı CA-IX enzimine özgüdür. Bu alanın asidik tümör mikroçevresinde hücre adezyonuna ve katalitik aktivitenin korunmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (42). PG alanının fokal adezyon temaslarının kurulmasına ve olgunlaşmasına katkıda bulunduğu için CA-IX enzimi, bir adezyon molekülü olarak da tanımlanabilir (45).



Şekil 2.11. CA-IX proteinin yapısı (52).

CA-IX'un IC kuyruğu, (T443 (Treonin443), S448 (Serin448) ve Y449 (Tirozin449) aminoasit rezidülerinin oluşturduğu üç farklı bağlantı sağlayan fosforilasyon alanına sahiptir. Dikkate değer bir şekilde, Y449'un fosforilasyonu sinyal iletimi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca IC kuyruğunda meydana gelen posttranslasyonel modifikasyonlar tümör mikroçevresinin asidifikasyonuna neden olmaktadır. CA-IX proteininin IC kuyruğuna ait gen bölgesinde meydana gelen delesyon ve hedeflendirilmiş mutagenez ise pH düzenlenmesine yardımcı olarak metastazın ilerlemesine olanak vermektedir (8,61).

CA-IX enziminin aktif bölgesi, hücre dışı boşluğa bakar ve hızlandırılmış CO_2 hidrasyonu ile plazma membranında pH düzenlemesine katkıda bulunur, aynı zamanda hipoksik tümör dokusunda CO_2 difüzyonunu ve H^+ hareketliliğini kolaylaştırır (Şekil 2.12) (45).



Şekil 2.12. Hipoksik kanser hücrelerinde pH regülasyonunda CA-IX'un rolü (45).

Hücre içi pH'ın düzenlenmesinde önemli bir rolü olan CA-IX, tümör hücrelerinin aktif sağkalımını ve metastatik yayılımını desteklemektedir (61). CA-IX ekspresyonu, meme, böbrek, kolon, yumurtalık, baş ve boyun, pankreas ve akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde yukarı yönlü ifade edilir. Bu mekanizmanın varlığı ile CA-IX, hipoksik katı tümörlerin tespiti ve tedavisi için potansiyel bir biyobelirteç olarak işlev görmektedir (47).

CA-IX izoformunun ayrıca 50/54 kDa moleküler ağırlıklı çözülebilir formu da (s-CA-IX) mevcuttur. s-CA-IX, TM ve IC kuyruğunun proteolitik olarak bölünmesinden dolayı tümör hücreleri tarafından vücut sıvısına dökülür. s-CA-IX, renal hücreli karsinom (RCC) hastalarının plazma ve idrar örneklerinde tespit edilmiştir. NSCLC hastalarının plazmasında da yüksek s-CA-IX bildirmiştir. Bu nedenle s-CA-IX, RCC ve NSCLC hastalarının tespiti için klinik bir biyobelirteç olarak görev yapar (42).

Yeni CA-IX inhibitörlerinin, hem *in vitro* hem de *in vivo* klinik öncesi kanser modellerinde, tek başlarına kullanıldığında kanser hücresinde etkin olduğu gözlemlenmiştir (39). Fare ksenograft modellerinde, CA-IX'un farmakolojik inhibisyonunun primer tümör büyümesini ve uzak metastaz eğilimini azalttığı gösterilmiştir (40). CA-IX inhibitörleri, anti-anjiyojenik ilaçların veya kemoterapi ajanlarının etkilerini artırabilir. Literatürde, bu inhibitörlerin, tümörlerin radyoterapiye olan yanıtını daha fazla artırabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (39). CA-IX'un

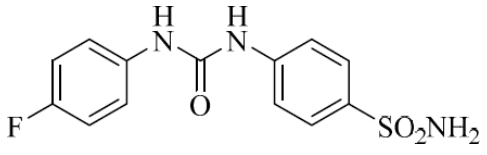
terapötik hedeflendirilmesi, anti-kanser tedavisi için son derece önemli bir strateji olarak önerilmektedir (40).

CA-IX'un tümörlerle güçlü ilişkisi ve normal dokulardaki nadir ekspresyonu bu enzimin klinik kullanımı için son derece önemlidir. CA-IX hedefli tedavi stratejisi üç yönlü değerlendirilmektedir: Monoklonal antikorlar, küçük molekül inhibitörleri ve CA inhibitörleri ile üretilmiş nanopartiküller (62).

Monoklonal antikor olan Girentuximab, Wilex AG tarafından geliştirilmiştir ve metastatik ccRCC (berrak hücreli renal hücreli karsinom) tedavisi için RENCAREX® ticari ismi altında Faz III klinik deneylerinde test edilmektedir (62). Bu antikor, RCC için olası bir anti-tümör hedefi olarak önerilmiştir. Ancak etkinliği yeterli değildir (43).

CA-IX inhibitörlerinin tasarımında yapılan kapsamlı araştırmalar ile bazı preklinik deneylerde ümit verici sonuçlar ortaya çıkmıştır (62). Küçük molekül inhibitörleri adı verilen CA-IX inhibitörlerinin kanser tedavisinde önemli rollere sahip oldukları bilinmektedir. Bugüne kadar SLC-0111 (4-(4 (fluorofenilüreido) benzensülfonamid) ve E7070 (N-(3-kloro-7-indolil)-1,4benzendisülfonamid); en umut verici olan CA-IX inhibitörleri olarak test edilmiştir (42).

SLC-0111, basit, ureido uzantı koluna sahip bir benzensülfonamid türevidir (Şekil 2.13) (42). Tümör ilişkili CA-IX enzimi için seçici bir inhibitör olan ve Faz Ib / II klinik denemelerinde kullanılan SLC-0111, seçici inhibitör aktiviteye sahip bir öncü CA inhibitörü olarak görülmektedir (58). *İn vivo* çalışmalar, SLC-0111'in CA-IX/XII'yi barındıran tümörlerin proliferasyonunu potansiyel olarak inhibe etmiştir. Ayrıca, SLC-0111'in paklitaksel, doksorubisin vb. gibi klinik olarak kullanılan diğer anti-kanser ajanlarla kombinasyon halinde kullanımında da son derece önemli anti-tümör etkileri olduğu gözlemlenmiştir (42).



Şekil 2.13. SLC-0111'in kimyasal yapısı (43).

E7070, Eisai Co., Ltd. (Tokyo, Japonya) tarafından geliştirilmiş ve 2005 yılında klinik çalışmalarla doğrulanan bir CA-IX inhibitörüdür. Bu bileşiğin etkinliği, Faz I klinik çalışmalarında gösterilmiş olup ABD ve Avrupa'da test aşamasında Faz II'ye geçmiştir. Bu inhibitör ayrıca hücre döngüsü ilerlemesini düzenleyen siklin bağımlı kinazları (CDK'ler) inhibe eder. CDK'lerin inhibisyonu, G1/S fazında hücre döngüsü durmasına yol açar, bu da tümör hücresi proliferasyonunu inhibe eder ve apoptoza bağımlı bir şekilde hücre ölümünü aktive eder. E7070, CA-IX ve CA-XII'yi spesifik olarak inhibe eder. Bu, hipoksik tümör hücrelerinde uygun iyon değişimine ve pH düzenlemesine müdahale eder, böylece zayıf bazik anti-kanser ilaçlara karşı kemo-dirençliliği azaltır (42).

CA inhibitörleri ile üretilmiş nanopartiküller, CA-IX'u aşırı eksprese eden hücrelere karşı *in vivo* ve *in vitro* inhibe edici etki gösteren etkili elemanlardır (62).

2.4.5. CA-IX Enzimi ve Kanser Hücresindeki Sinyal İletimi

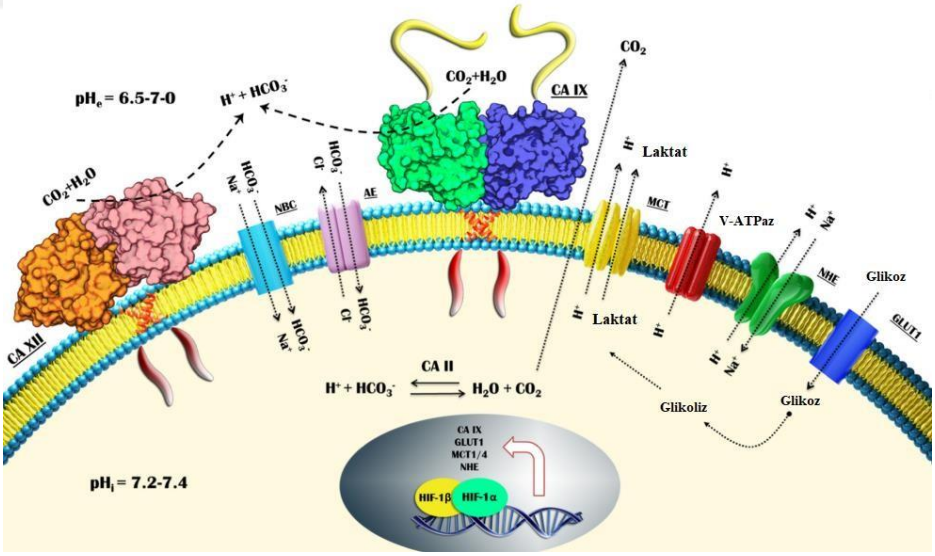
Anoksiden orta dereceli hipoksiye kadar değişen düşük O_2 varlığına en iyi yanıt veren proteinlerden biri CA-IX'dur (45). Hipoksiye ek olarak, CA-IX'un ifadesi fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve MAPK yolakları ile modüle edilir (46). HIF-1α, PI3K ve MAPK yolakları ile iletilen farklı hücre dışı sinyaller ve onkojenik değişiklikler ile normoksik ortamda yukarı doğru düzenlenebilir. PI3K aktivasyonu, HIF-1α proteini seviyesinin artmasına neden olurken, MAPK aktivasyonu, transaktivasyon özelliklerini arttırır. MAPK ve PI3K yolaklarının, HIF-1'e sinyal gönderilmesine aracılık ederek CA9 transkripsiyonunun aktivasyonunda işbirliği yaptığı tespit edilmiştir (8).

CA-IX'un kanserde sinyal iletimindeki rolünün ilginç sonuçları vardır. RCC'de, CA-IX'un IC kuyruğunda bulunan tirozin kalıntısının epidermal büyüme faktörüne (EGF) bağlı bir şekilde fosforlanabileceği gösterilmiştir. Fosforillenmiş CA-IX, PI3K'nın düzenleyici alt birimi ile etkileşime girerek Akt aktivasyonunda rol oynamaktadır. Bu sinyalin de kanser progresyonuna sebep olabileceği öne sürülmektedir (8). CA-IX enziminin IC kuyruğundaki üç farklı amino asit rezidüsünün (Thr443, Ser448 ve Tyr449) fosforillenmesi ise kanserde önemli sinyal mekanizmaları ile olan etkileşimi başlatabilmektedir (61).

2.4.6. CA-IX Enzimi ve Hipoksi/Asidoz İlişkisi

Hipoksi ve asidoz, birçok tümörün belirgin özelliğidir ve normal hücrelere göre tamamen farklı bir metabolik işleyişe neden olur (43). Bu iki durum, kanser tedavisinde öngörülen radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin direnç seviyelerinin artmasına sebep olur (39). Hipoksik kanser fenotipiyle ilişkili olan bir enzim olan CA-IX'un düşük O_2 ortamında kanser hücresinin sağkalımını desteklediği görülmüştür. Bu sebeple bu enzimin solid malignitelerdeki hipoksiyi hedef alan önemli bir biyobelirteç olduğu düşünülmektedir (40,52).

Tümör asidifikasyonu, tümör hücreleri etrafındaki patofizyolojik ortamın ayırt edici bir özelliğidir (63). Mikroçevredeki asidite, sadece tümör biyolojisinin bir atık ürünü değil, metabolik hız da dahil olmak üzere çeşitli süreçleri kontrol eden değerli bir geri bildirim kaynağıdır (64). CA-IX, katalitik aktivitesi sayesinde, asit fazlalığı ile metabolizmada hipoksinin neden olduğu hücre içi ve hücre dışı pH bozulmalarının düzenlenmesini sağlar. CA-IX'un bu rolü pH'ı düzenleme yeteneği sayesinde, kanser hücresinin migrasyonunu ve invazyonunu da kolaylaştırır (Şekil 2.14) (45).



Şekil 2.14. Hipoksik tümör hücrelerinde pH düzenlenmesi (52).

Tümör hücrelerinin yüksek metabolik hızı; laktat, CO_2 ve H^+ da dahil olmak üzere intraselüler pH'ı (pHi) düşürebilen asit metabolitlerin üretiminin artmasına neden olur (40,52). O_2 varlığında bile kanser hücrelerinin glukoz alımı ile laktik asit

ürettiği bu olay “aerobik fermantasyon” ya da “Warburg etkisi” olarak isimlendirilir (65). Birçok kanserin ayırt edici özelliğini oluşturan bu durumda hücreler hipoksiktir, normalden daha asidiktir ve düzensiz bir glukoz metabolizmasına sahiptir (58). pHi çok asidik hale geldiğinde, membran stabilitesi bozulur ve hücre proliferasyonu görülür (40). Hücre içi asitleşmeyi sürdürmek ve azaltmak için, hücreler iyon değiştiricileri, pompaları ve taşıyıcıları içeren karmaşık moleküler mekanizmalarını harekete geçirir. Bu pompalardan biri de hücre dışı ortamı asitleştiren hafif alkali bir pH'ı koruyan CA enzim ailesidir (52).

CA-IX katalitik aktivitesi tarafından lokal olarak oluşturulan hücre dışı asidoz, vasküler hücreler arasındaki hücre-hücre bağlantılarının kopmasına ve hücre dışı matriksin bozunmasına neden olur. Böylece tümör hücrelerinin damar duvarı boyunca geçişi desteklenir (45). Özetle, CA-IX, tümör hücrelerine asidoz ve hipokside hayatta kalma avantajı sağlar. Tümör hücresinin migrasyon, invazyon ve metastaz yapma yeteneğini arttırır (66).

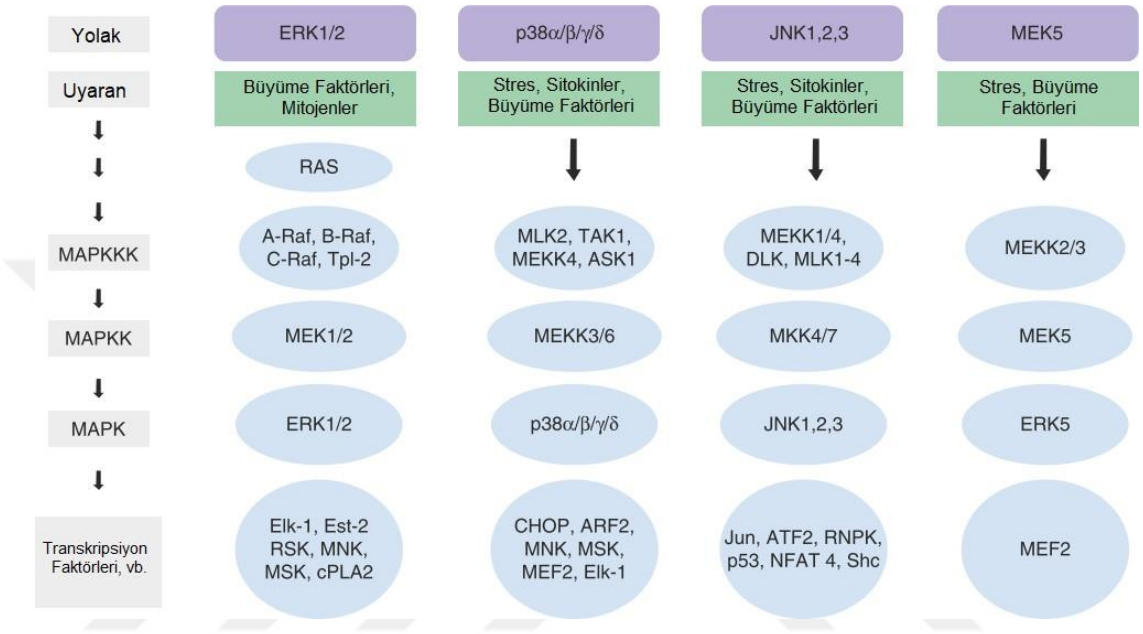
2.5. MAPK Sinyal Yolakları

MAPK yolakları, hücre dışı sinyallerden hücre içi yanıtlara geçişte önemlidir ve birçok hücresel işlevi düzenler (67). MAPK’lar, çevresel ve gelişimsel sinyalleri (büyüme faktörleri veya stres); sağkalım, farklılaşma, yaşlanma gibi uyarlanabilir ve programlanmış yanıtlara dönüştürür (68).

MAPK’ların, G-protein-bağlı reseptörler, reseptör serin/treonin kinazlar, Src ailesi kinazlar ve sitokin reseptörleri dahil olmak üzere çok çeşitli uyaranları vardır. Ligand bağlanması sonrasında enzimatik reaksiyonlar başlar ve MAPK'lar, transkripsiyon faktörleri, nükleer proteinleri, membran taşıyıcıları, hücre iskeleti elemanları ve protein kinazlar dahil olmak üzere çeşitli hücre içi hedefleri fosforile edebilir. MAPK’lar kendi yapılarında veya substratlarında bulunan ikili serin ve treonin kalıntılarını fosforile ederek hedeflerini etkinleştirir veya etkisiz hale getirir (69).

Memeli hücreleri, iyi karakterize edilmiş ve geniş çapta çalışılmış olan dört MAPK ailesine sahiptir. Bu aileler, kısmen protein fosforilasyonu ile kontrol edilen üç protein içerirler. Bu proteinler; MAPK kinaz kinaz (MAPKKK), MAPK kinaz

(MAPKK) ve MAPK'dır. Terminal serin/treonin kinazlar (MAPK'ler); ERK1/2 (Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2), p38 MAPK α, β, γ, δ, c-JUN N-terminal kinazları 1, 2, 3 (JNK 1/2/3) ve MEK5'tir. ERK yolu genel olarak, büyüme faktörü ile uyarılan hücre yüzeyi reseptörleri, JNK, p38 ve MEK5 yolları ise stres ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilir (Şekil 2.15) (70).



Şekil 2.15. MAPK sinyalinde dört ana memeli protein kinaz kaskadının gösterimi (69).

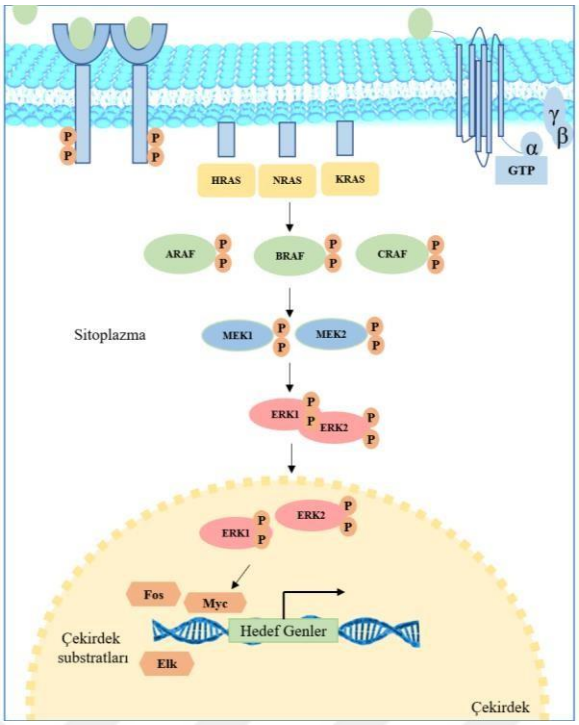
Büyüme faktörleri, mitojen veya hormonlar dahil olmak üzere çeşitli aktivatörlerin bağlanmasına yanıt olarak reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) bir dimer oluşturur ve Rat Sarkoma Protein (Ras)'ın guanozin trifosfata (GTP) bağlayarak aktivasyonunu tetikler (71). Ras, bir GTPaz molekülüdür. Normal hücrelerde, Ras guanozin difosfata (GDP)'ye bağlıdır ve etkisizdir (kapalı durum). Hücre dışı uyaranlar üzerine Ras, GTP'ye bağlanır (açık durum). Daha sonra, fosfatın serbest bırakılması üzerine, anahtar bölgeleri gevşeyerek konformasyonel modifikasyonlara yol açar ve inaktive olur. GDP/GTP'nin döngüsel süreci, guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler) ve GTPaz aktive edici proteinler (GAP'ler) tarafından gerçekleştirilir (72). Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2 (GRB2) fosforile olan reseptöre Src homoloji 2 (SH2) alanı ile bağlanır. Src Homoloji 3 (SH3) alanı ile de son of sevenless (SOS) proteinine bağlanır ve onu aktive eder. SOS, nükleotid değişim faktörü olup Ras GTPaz'ı aktive eder (33,73,74). Ras'ın aktivasyonundan sonra Raf, aktif forma

dönüştüğü yer olan sitozolden hücre membranına alınır (71). Raf, MEK1 ve MEK2'yi aktive etmek için bir MAP kinaz kinaz kinaz (MAPKKK) görevi görür. MEK'ler de efektör ERK1 ve ERK2 kinazlarının aktivasyonunu ve bu kinazların nükleusa translokasyonunu katalize eder. ERK1/ERK2 aktive olduktan sonra, hücre proliferasyonu, sağkalım, farklılaşma, motilite ve anjiyogenez gibi çeşitli hücresel yanıtlarda yer alan çeşitli nükleer ve sitoplazmik efektör genler aktive edilir (75).

2.5.1. ERK 1/2 Sinyal Yolağı

MAPK sinyal yolaklarından önemli bir kaskat reaksiyonu Ras, Raf, MEK ve ERK'den oluşur (Şekil 2.16) (76). Bu yolak, TNFα, Fas ligandı, TRAIL, radyasyon, ozmotik stres, hipoksi, nitrik oksit, hidrojen peroksit, ve kemoterapötik ajanlar gibi çok çeşitli uyaranlara yanıt olarak apoptozu inhibe ederek hücrenin sağkalımını desteklemektedir (6).

Başlangıç noktası, bir transmembran protein olan RTK'nın iki alt biriminin hücre dışı kısmına büyüme faktörü, sitokin veya hormon gibi bir ligandın bağlanmasıdır. Ligand bağlanma, alt birimlerin bir dimer oluşturmasına neden olur ve sitoplazmik alanlarının fosforilasyonuna yol açar (77). Ras proteini, genellikle büyüme faktörleri tarafından aktive edildiğinde, B-Raf hücre zarına alınır. Burada, B-Raf fosforillerenerek kendisiyle (homodimerizasyon) veya C-Raf (heterodimerizasyon) gibi Raf protein ailesinin başka bir üyesi ile dimerize olur (78). Daha sonra MEK proteini aktive olur. Aktive edilmiş MEK'ler ise sinyale yanıt üreten ERK'leri fosforile eder (77). MAPK sinyal yolağının etki gösteren son elemanları ERK1 ve ERK2'dir. ERK fosforilasyonu, hücre proliferasyonunun uyarılmasından sorumlu olan birden fazla substratın aktivasyonu ile sonuçlanır (Şekil 2.16) (79).



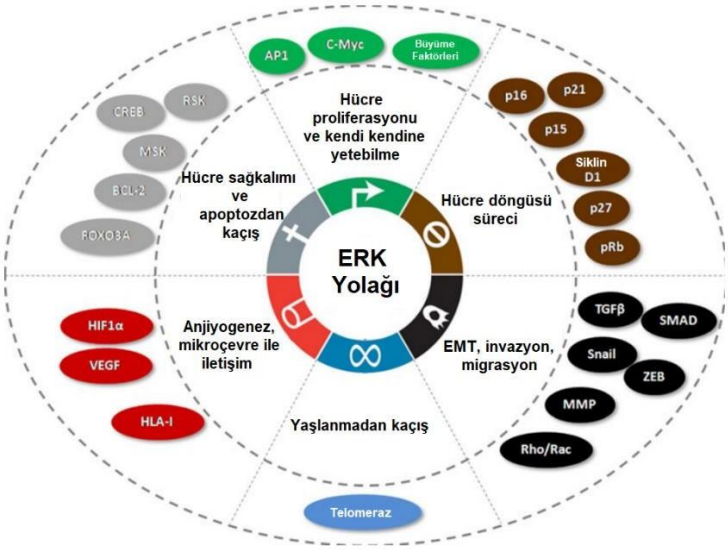
Şekil 2.16. Ras / Raf / MEK / ERK sinyal yolağı (68).

Sitoplazmada bulunduğunda ERK, hücre hareketini ve trafiğini, metabolizmayı, hücre yapışmasını ve diğer yolakların düzenlemesini etkileyen hücre iskeleti proteinlerini fosforilleyerek etkisini gösterir. MAPK/ERK aktivasyonundan sonra ERK, sitoplazmik proteinlerinden ayrılır ve transkripsiyonel regülasyonunu uygulamak için çekirdeğe geçiş yapar. Çekirdekteki aktif ERK, DNA veya p90RSK sentezi ile bağlanan ve hücre döngüsü ilerlemesini destekleyen karbamoil fosfat sentetaz II (CPS II) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna ve aktivasyonuna neden olmaktadır (79). Ayrıca, ERK1/2, 3'-5' siklik adenozin monofosfat ikincil habercil molekül (CREB) gibi transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra c-Myc (temel düzenleyici onkogen) ve nükleer faktör kappa B (NF-κB) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive edebilir. Bu durum, ERK1/2'yi önemli bir anti-tümör hedefi yapar (74). ERK1/2 sinyal yolağında meydana gelen mutasyonlar karsinogenez sürecinde etkili olduğu için özellikle dikkat çekmiştir (80).

Hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre döngüsü regülasyonu, hücre apoptozu ve doku oluşumu gibi hücresel biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde yer alan ERK 1/2 yolağı, tümör oluşumu ile de ilişkilidir. Yumurtalık, kolon, meme ve akciğer kanseri gibi çeşitli insan tümörlerinde yüksek ERK ekspresyonu tespit edilmiştir. ERK/MAPK sinyal yolunun sürekli aktivasyonu, normal hücrelerin tümör

hücrelerine dönüşümünü teşvik ederken, ERK/MAPK sinyal yolunun inhibisyonu, *in vivo* tümör büyümesini inhibe edebilir. Bu nedenle, ERK / MAPK sinyal yolunun artan aktivasyonu, tümörlerin oluşumu ve gelişimi ile bağlantılıdır (81).

ERK yolağı, tüm insan karsinomlarının yaklaşık üçte birinde düzensizdir ve çeşitli insan tümörlerinin gelişiminde rol oynamaktadır. AP-1 ve c-Myc gibi transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek hücresel proliferasyon ve farklılaşmasında rol oynamaktadır. ERK sinyalinin, p16, p15 ve p21 gibi hücre döngüsü belirteçlerinin ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir. Ayrıca E2F1'e bağlı transkripsiyonel aktiviteyi artırarak, döngünün S fazına girmesine sebep olur. ERK yolağı pro-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonunu veya aktivasyonunu baskılayarak ve anti-apoptotik üyelerin ekspresyonunu veya aktivasyonunu indükleyerek sağkalımı desteklemektedir. Ayrıca ERK yolağınının aktivasyonunun, ölüm reseptörleri Fas, TRAIL veya TNF tarafından indüklenen apoptozu da inhibe ettiği bilinmektedir. Ayrıca, ERK yolağı matriks metalloproteinazların (MMP) ekspresyonunu artırarak hücresel invazyon ve migrasyona katkıda bulunur. Bu yolağın en etkin rolünün ise HIF-1α'nın ve VEGF'in ekspresyonunu artırarak anjiyogenezi indükleyebilmesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.17) (82).



Şekil 2.17. ERK yolağının aktivasyonunun biyolojik sonuçları ve hedefleri (82).

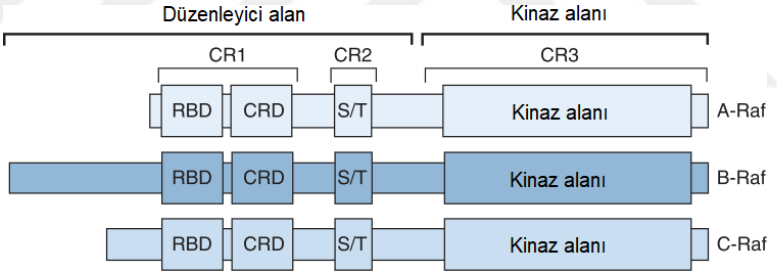
ERK sinyal yolağı, tek yönlü protein kinazlar dizisi olarak ifade edilse de aslında birçok etkileşimle birlikte karmaşık bir sinyal yolağı sistemine sahiptir. Bu

sinyal yolağının önemli düzenleyicileri olan Raf (Rapidly accelerated fibrosarcom) proteinleri, hücre dışı ortamdan hücreye sinyalleri ileterek hücrenin proliferasyonunu, farklılaşmasını, göçünü ve sağkalımını yönetir (70,83).

2.5.2. Raf Proteini ve İzoformları

Raf proteini, MAPK yolağında önemli bir anahtar bileşen olarak kabul edilir ve serin treonin kinazlar sınıfının bir üyesidir. 1980'lerde retroviral onkojenler olarak keşfedilmiştir (84). Raf ailesinin üyeleri: A-Raf, B-Raf ve C-Raf'tır (85).

Tüm Raf ailesi proteinleri; Ras bağlayıcı bir alan (RBD) ve bir sistein açısından zengin alan (CRD) (CR1), serin/treonin kalıntıları açısından zengin bir bölge (CR2) ve karboksi terminal kinaz alanını içerir (CR3) adı verilen üç korunmuş bölge içerir. Her bir protein, bir amino terminal düzenleyici alan ve bir karboksi terminal katalitik alan içeren iki fonksiyonel alana bölünebilir (Şekil 2.18) (86).



Şekil 2.18. Raf proteinlerinin yapısı (86).

2.5.3. B-Raf

B-Raf, bir serin/treonin protein kinazdır ve Ras/Raf/MEK/ERK hücre sinyal yolağında yer alır. Melanom, papiller tiroid karsinom, kolorektal karsinom ve gliomlar gibi katı tümörlerde ve hematolojik malignitelerde ana bir onkojenik bileşen ve potansiyel bir tedavi hedefi olarak ortaya çıkmıştır (87). B-Raf sinyali, hücre bölünmesi ve farklılaşması için son derece önemli bir role sahiptir. BRAF mutasyonlarının aktivasyonu, kontrolsüz büyüme ve tümörojenezle sonuçlanır. Bu sebeple, BRAF'ın "hedefli kanser tedavisi" için önemli olduğu düşünülmektedir (88,89).

Yabanıl tip BRAF geni, insan hücrelerinde büyümeyi, proliferasyonu, farklılaşmayı ve apoptozu düzenleyen ERK/MAPK sinyal yolu içinde aşağı yönde düzenleyici bir faktör olarak görev yapmaktadır. Bu yolak hücrenin normal gelişimi için gereklidir. Ancak BRAF geninde mutasyon oluştuğunda kanser hücresinin proliferasyonunu indükleyen MEK ve ERK aktivasyonu artmaktadır. Bu durum da, kanser gelişimi ve büyümesine sebep olmaktadır (90).

2.5.4. BRAF Gen Mutasyonları

BRAF, melanom, pilositik astrositom, tiroid, over ve kolorektal kanserler gibi bir dizi farklı malignitede RAF ailesinin en mutasyona uğramış üyesi olarak tanımlanır (91).

BRAF gen mutasyonlarının, melanomların % 50'si, tiroid kanserlerinin % 30-% 70'i, seröz düşük dereceli yumurtalık kanserlerinin % 30'u ve kolorektal kanserlerin % 10'u dahil olmak üzere insan kanser türlerinin % 8'inde saptandığı rapor edilmiştir (92).

Tüm BRAF mutasyonlarının % 70-% 88'ini oluşturan en yaygın BRAF mutasyonu, amino asit 600 dizisinde (V600E) Valin yerine Glutamik asit'in yer almasıdır. BRAF'deki diğer mutasyonlar daha seyrek meydana gelir. Bu mutasyonlar, V600K (Valin→Lizin), V600R (Valin→Arjinin), V600M (Valin→Metiyonin) ve V600 olmayan değişiklikleri içerir (93).

İnsan tümörlerinde yaklaşık 200 BRAF gen mutant alleli tanımlanmıştır ve yaklaşık 30 farklı BRAF mutasyonu fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir. BRAF mutasyonları, BRAF aktivitesi üzerindeki etkilerine göre üç sınıfa ayrılabilir (36).

Sınıf I BRAF mutasyonları, insan tümörlerinde açık arayla en yaygın olarak tanımlanan mutasyonlar olarak tespit edilmiştir. Ras sinyalinden bağımsız olarak sinyal verirler. BRAF V600D/E/K/R mutasyonları, BRAF kinaz aktivitesinin güçlü aktivasyonu ve MAPK sinyal yolağının yapısal aktivasyonu ile sonuçlanan bir grup olan Sınıf I mutantlar olarak adlandırılır. Sınıf I (V600) mutantları yüksek yapısal BRAF aktivitesine sahip olur. BRAF inhibitörlerine monomerler olarak yanıt verir (94).

Sınıf II BRAF mutasyonları (G464E/V/R, G469A/V/S, L597Q/R/S/V ve diğerleri) Ras sinyalinden bağımsız olan çok çeşitli alterasyonları temsil eder ve Sınıf I mutasyonlarının aksine, MEK-ERK yolağını aktive etmek için dimerizasyona ihtiyacı vardır ve dimer olarak işlev görür (95).

Sınıf III BRAF mutantları ise yabanıl tip BRAF ile homodimerize olur veya CRAF ile sinyal vermek üzere heterodimerize olur. Bu dimerler, doğal tipteki benzerlerine göre daha düşük kinaz aktivitesine sahiptir. Sınıf III BRAF mutasyonları (ayrıca V600 olmayanlar) Ras bağımlıdır (96). Bu nedenle, Ras sinyalinin bloke edilmesi, Sınıf I veya Sınıf II BRAF mutantlarının aksine, Sınıf III BRAF mutant tümörler için potansiyel bir terapötik strateji olarak düşünülmektedir (Tablo 2.2) (36).

Tablo 2.2. BRAF mutasyonlarının sınıflandırılması (93).

BRAF Sınıfı	BRAF Mutasyonu	Kinaz Aktivitesi	Potansiyel Hedefler
Sınıf I	V600	RAS bağımsız	BRAF inhibitörleri veya BRAF inhibitörleri/MEK inhibitörlerinin kombinasyonu
Sınıf II	V600 Olmayanlar	RAS ve RTK bağımsız	MEK inhibitörleri, ERK inhibitörleri veya BRAF inhibitörlerinin paradoksal engellenmesi
Sınıf III	N581, d594	Kinaz aktivitesi yok, CRAF aktivasyonu var	MEK inhibitörleri + RTK inhibitörleri

2.5.5. B-Raf İnhibitörleri

Hücre proliferasyonu ve sağkalımın uyarılması gibi çoklu hücresel etkilere neden olan BRAF'ın aktive edici mutasyonları, B-Raf proteininin dimerizasyonuna yol açar ve bu durum Raf-MEK-ERK sinyal zincirini aktive eder. Böylece apoptoz inhibe edilirken hücre proliferasyonu da desteklenmiş olur. Bu zincirin sonu, kanser gelişimi ve büyümesi ile sonuçlanır (90). BRAF mutasyonlarının tanımlanması, B-Raf'ı hedef alan inhibitörlerin gelişimini olumlu yönde etkilemiştir (34). Literatürdeki çalışmalar, B-Raf inhibitörlerinin, BRAFV600E mutasyonunun neden olduğu hücre proliferasyonundaki artışı engellediğini göstermektedir (90).

B-Raf inhibitörlerinin kullanılmasındaki ana sınırlamalar, hemen hemen tüm vakalarda direnç gelişimi ve B-Raf inhibisyonu ile ilişkili toksisitedir (5).

VMF ($C_{23}H_{18}ClF_2N_3O_3S$) ve DAB ($C_{23}H_{20}F_3N_5O_2S_2$)'ın ardından 2018'de FDA tarafından onaylanan diğer bir inhibitör Encorafenib ($C_{22}H_{27}ClFN_7O_4S$)'tir. B-

Raf'ın keşfi ve kullanımına paralel olarak B-Raf inhibitörleri, MEK inhibitörlerinin geliştirilmesine sebep olmuştur. İlk MEK inhibitörü olan Trametinib ($C_{26}H_{23}FIN_5O_4$), 2013 yılında ve 2015 yılında ise Kobimetinib ($C_{21}H_{21}F_3IN_3O_2$) FDA tarafından onaylanmıştır. FDA onaylı bir diğer MEK inhibitörü ise Binimetinib ($C_{17}H_{15}BrF_2N_4O_3$)'tir. Mevcut hedefe yönelik tedaviler, B-Raf ve MEK inhibitörlerinin bir kombinasyonunu içerir (97).

BRAFV600 mutasyonuna sahip metastatik/ileri cilt melanomlarına sahip hastaların tedavisi için üç protein kinaz inhibitör protokolü FDA tarafından onaylanmıştır. Buna göre protokol, B-Raf ve MEK1/2 inhibitörlerinin bir kombinasyonunu içermektedir. Bu kombinasyonun üç farklı bileşimi mevcuttur: (i) Encorafenib ve Binimetinib, (ii) VMF ve Cobimetanib ve (iii) DAB ve Trametinib'tir. Bu kombinasyonların, Raf inhibitör monoterapisine kıyasla gelişmiş klinik etkinlik gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu ilaç kombinasyonlarından birinin diğerlerinden daha üstün olup olmadığını belirlemek için çalışmalar devam etmektedir (35,98).

Klinik sonuçtaki iyileşmeye rağmen, Raf-MEK inhibitörü kombinasyonlarına verilen yanıtların değişken olduğu gözlemlenmiştir. Bu yöntemlerle tedavi edilen hastaların çoğunda direnç gelişir. Raf-MEK inhibitör kombinasyonuna direnç mekanizmalarının çoğu, Raf inhibitörünün tek başına kullanımı ile tanımlananlara benzerdir ve inhibitörlerin varlığında ERK sinyalinin geri kazanılması ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (98). Kalıcı yanıtlar için ERK sinyalinin tam ve uzun süreli inhibisyonunun gerekli olduğu düşünülmektedir (99).

Raf inhibitörleri, Raf monomerlerini seçici olarak inhibe etmektedir. VMF, DAB ve Encorafenib inhibitörleri genellikle "B-Raf inhibitörleri" olarak anılırken, aslında B-Raf için seçiciliğe sahip değildirler ve A-Raf ve C-Raf'ı da inhibe edebilecekleri bilinmektedir. Bu inhibitörlerin BRAFV600 mutasyonları olmayan hücrelerde etkisinin farklı ve karmaşık olduğu tespit edilmiştir. Bu ilaçların bir Raf dimer çifti içindeki bir protomere bağlanması, diğer protomerin allosterik transaktivasyonuna neden olurken, aynı zamanda ilacın diğer protomerdeki affinitesini azalttığı sonuçları bilinmektedir. Bu inhibitörlerin, inaktif konformasyonu Raf'a bağlanarak inaktif konformasyondaki ilk protomeri stabilize eder ve partner protomerini, sterik engelleme nedeniyle ilaçla bağlanamayan "aktif" bir konformasyona kaydırır. Bu nedenle, inhibitörün Raf dimerindeki bir protomere

bağlanması, aslında dimerdeki protomerin transaktivasyonu yoluyla Raf sinyalinin paradoksal aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu negatif işbirliği ile Raf dimer sinyalinin tamamen bloke etmek için dimerdeki her iki Raf protomerini bağlayarak çok daha yüksek bir Raf inhibitörü dozu gerektirdiği bilinmektedir. Bu nedenle bu ilaçların Raf'ın dimerler olarak sinyal verdiği tümörlere karşı etkili olmadığı bilinmektedir (100).

Ras/Raf kaynaklı kanserlerin tedavisinde temel zorluk, paradoksal aktivasyon olmaksızın bu yolu inhibe edebilen ilaçların geliştirilmesidir. Sorafenib, SB-590885, GDC-0879, PLX-4720 gibi birinci nesil Raf inhibitörlerinin paradoksal etkisi, ikincil maligniteleri de indüklediği tespit edilmiştir. Birinci nesil Raf inhibitörlerinin ilaç direncinin üstesinden gelmek için, ikinci nesil Raf inhibitörleri VMF, DAB, LGX818, XL281, BI882370 geliştirilerek klinik deneylere tabi tutulmuştur (101). Bu inhibitörler, BRAFV600E melanoma tümörlerinde, monomerik BRAFV600E proteininin güçlü inhibisyonunda önemli etkinliğe sahiptir. Ancak bunlar aynı zamanda Raf proteinlerinin dimerizasyonunu indükleyip BRAF yabanıl tip (WT) hücrelerde paradoksal aktivasyonuna da sebep olmaktadır. Söz konusu bu inhibitörlerin hastaların sağkalımında kısa vadeli bir iyileşme sağladığı rapor edilmiştir (102,103).

Üçüncü nesil RAF inhibitörleri, yapısal ve biyokimyasal olarak iki ana sınıfa ayrılır. İlk grup, RAF'ın monomerik ve dimerik formlarını eşit derecede inhibe eden ve bu nedenle RAF dimerizasyonuna bağlı direncin üstesinden gelmesi beklenen bileşikleri içerir (LY3009120, TAK-632, MLN2480, CCT-196969, CCT-241161, BGB659). Üçüncü nesil RAF inhibitörlerinin ikinci grubu ise değişken terminal sülfonamid ve sülfamid türevli RAF inhibitör bileşikleri olan "paradoks kırıcıları" içermektedir (PLX7904, PLX8394) (98). Bu inhibitörlerin en önemli avantajı ise paradoksal etkinin yoksunluğudur (101,104).

2.5.6. Melanomda MAPK Sinyal Yolağı

Metastatik melanom tedavisindeki en büyük zorluk mevcut tedavi yöntemlerine gösterilen yüksek dirençtir. Melanom hastalarının çoğu hem geleneksel kemoterapiye hem de hedefe yönelik tedaviye karşı son derece dirençlidir. Çalışmalar, MAPK yolaklarının kanser tedavisi için uygulanabilir hedefler olduğunu açıkça

göstermektedir (105). En belirgin ve klinik olarak kullanılan hedef ise ERK yolağıdır. Melanom hastalarının yaklaşık % 50'sinde ERK hiperaktivasyonu mevcut olduğu için, yolağın farmakolojik inhibisyonu son derece önemlidir. Bu yolağın mutasyona uğramış BRAF ile aktivasyonu, melanomda büyüme, sağkalım ve anjiyogenezi uyarmaktadır. Melanomda BRAF mutasyonlarının öneminin keşfedilmesinden sonra, bu konu ile ilgili çalışmalar hız kazanmış ve bu proteinin mutant formunu inhibe eden spesifik kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir (104). Geçtiğimiz on yıl içerisinde değişken kimyasal sınıflara sahip BRAF inhibitörlerinin geliştirilmesinde önemli ölçüde ilerleme kaydedilmiştir. Ancak kanserin doğası gereği oluşan direnç, klinik uygulamaları büyük ölçüde sınırlamaktadır. Direnç problemi ile karşılaşmadan bu yolağı hedefleyen daha spesifik ve güçlü ilaçlara ihtiyaç duyulması araştırmaları daha etkin bileşiklerin sentezine yöneltmiştir (104).

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında B-Raf protein inhibitörlerinin melanom üzerindeki etkileri oldukça kapsamlı açıklanmaktadır. Ayrıca, CA-IX proteininin MAPK yolağı ile ilişkisi açıklanmış olmasına rağmen, bu proteinin inhibe edilmesinin bu yolak üzerindeki etkisini gösteren bir çalışma henüz literatürde mevcut değildir. Bunun sonucu olarak;

Bu çalışmada; "CA-IX inhibisyonunun B-Raf protein yolağı üzerine etkisi vardır" hipotezini test etmek amaçlanmıştır. Bu çalışmada;

- ✓ BRAFV600E mutasyonu taşıyan A375 melanom hücre hattının kültüre edilerek çoğaltılması,

- ✓ Bu hücre hattında CA-IX enziminin AZA ile inhibisyonunun MAPK sinyal yolağının kritik bir düzenleyicisi olan B-Raf proteini üzerine etkisinin incelenmesi, hedeflenmektedir.

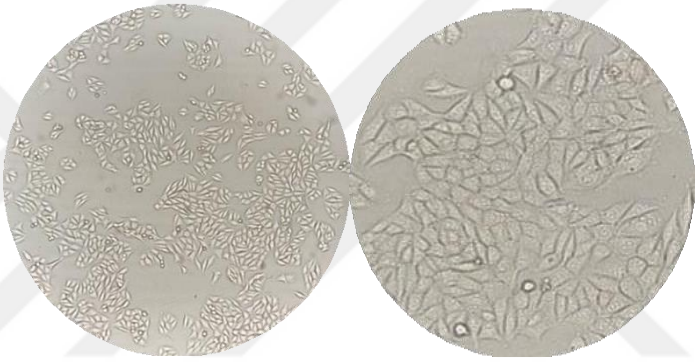
Söz konusu bu etkileşimin açıklanacak olmasının literatüre önemli bir katkı sağlayacağı ve bu proteinlere özgü ilaçların alternatiflerinin geliştirilmesi için önemli bir adım olacağı düşünülmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

Çalışmada, ATCC tarafından ticari olarak üretilmiş A375 melanoma hücre hattı kullanılmıştır. İnsan melanom hücre hattı A375, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya bölümünden temin edilmiştir. A375 hücre hattı, 54 yaşında malign melanomu bulunan bir kadın hastadan elde edilmiş olup, homozigot BRAFV600E mutasyonu taşımaktadır (106) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. A375 melanom hücre hattının inverted mikroskop görüntüleri (4x ve 10x).

3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada hücre kültüründe kullanılan kimyasal maddeler firma adı ve ürün kodu belirtilerek Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal maddeler.

KİMYASAL MADDE	**FİRMA/ÜRÜN KODU**
Dulbecco tarafından modifiye edilen Eagle Besiyeri (DMEM)	Capricorn Scientific / CP17-1913
Fetal Sığır Serumu (FBS)	Capricorn Scientific / CP17-1756
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific / CP17-1828
Dulbecco'nun fosfat tamponlu tuz çözeltisi (DPBS)	Gibco / 1720774
Tripsin-EDTA	Gibco / 25200-056
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Fisher Scientific UK / 1414511

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Antikorlar

Çalışmada kullanılan antikorlar firma adı ve ürün kodu belirtilerek Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan antikorlar.

ANTİKOR	**FİRMA/ÜRÜN KODU**
HIF-1α poliklonal antikoru	Bioss USA / BS-0737R
CA-IX monoklonal antikoru	St.Johns Lab / STJ96978
B-Raf poliklonal antikoru	St.Johns Lab / STJ95353
p-B-Raf poliklonal antikoru	St.Johns Lab / STJ22042
ERK1/ERK2 monoklonal antikoru	Thermo / 13-6200
p-ERK1/ERK2 monoklonal antikoru	St.Johns / STJ91357
β-aktin antikoru	CK-Biotech / CK-Ab10146
Goat-anti-mouse HRP sekonder antikoru	Advansta / R-05072
Goat-anti-rabbit HRP sekonder antikoru	Advansta / R-05071
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Texas Red®)	Abcam / ab6787
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam / ab150077

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler firma adı ve ürün kodu belirtilerek Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

KİMYASAL MADDE	**FİRMA/ÜRÜN KODU**
Asetazolamid (CA inhibitörü)	Sigma / A6011
Vemurafenib (B-Raf inhibitörü)	SelleckChem / S1267
WST-1 Hücre Proliferasyon Test Kiti	Cayman Chemical / 10008883
CA-IX ELISA Kit	Shanghai Coon Koon Biotech / CK-bio-10734
Fenol Kırmızısı	Sigma-Aldrich / 114529
iBlot Transfer Nitroselüloz	Thermo / IB301002
% 4-12 Bis-Tris Jel	Thermo / NP0327BOX
% 10 NP-40	Intron Biotechnology / IBS-BN015
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Intron Biotechnology / PIC001
5X Laemmli tampon	Intron Biotechnology / IBS-BL006
Süt Tozu	Intron Biotechnology / SKI400

Tween20	Intron Biotechnology / IBS-BP058
Pierce™ ECL Western Blotlama Substratı	Thermo / 32106
Formaldehit % 37	Merck / M104002.2500
DAPI	Cayman Chemical / 14285
Tripan Mavisi	Sigma / T8154

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların markası belirtilerek Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlar.

CİHAZ	**MARKA**	**CİHAZ**	**MARKA**
Buzdolabı (+4)	Klimasan	Hipoksik İnkübatör	StemCell Techologies
Derin Dondurucu (-20)	Uğur	Nanodrop	Hangzhou
Derin Dondurucu (-80)	Haier	Dikey Elektroforez	Cleaver Scientific
Azot Tankı	Thermo	Güç Kaynağı	Biorad
Laminar Kabin	Telstar	Manyetik karıştırıcı	IKA
CO_2 inkübatörü	Panasonic	Hassas Terazi	MRC
Inverted Mikroskop	Euromex	pH metre	Thermo
Distile Su Cihazı	ELGA	Dijital Isı Blok	Benchmark
Santrifüj	Hettich	Kuru Blotlama	Invitrogen
Su banyosu	Memmert	Çalkalayıcı	ISOLAB
Otoklav	MRC	Görüntüleme Sistemi	ChemiDoc
Otomatik pipetler	Eppendorf	Inverted Mikroskobu	Olympus
Otomatik pipet tabancası	Eppendorf	Florensans Mikroskop	Olympus
Spektrofotometre	BioTek/Epoch	PCR cihazı	QIAGEN
		QIAcube Connect	QIAGEN

3.1.6. Çalışmada Kullanılan Western Blot Tampon Çözeltilerinin İçerikleri

Çalışmada kullanılan Western Blot tampon çözeltilerinin içerikleri Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.5. Western Blot tampon çözeltilerinin içerikleri.

Lizis Tamponu	50 mM Tris, 150 mM NaCl, %1 NP-40, Proteinaz İnhibitör Faktör
Yürütme Tamponu	NuPAGE Yürütme Tamponu, Distile Su
Transfer Tamponu	Tris, Glisin, Metanol, Distile Su
Süt Tozu Çözeltisi	Süt Tozu (%3), PBS-Tween20

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Koşulları

Hücre kültürü çalışmalarının öncesi ve sonrasında hücre kültürü odası ve laminar kabin UV ışınları ile steril hale getirilerek % 70'lik etanol ile temizlenmiştir. Hücre kültüründe inkübasyon, 37 °C ve % 5 CO_2 içeren inkübatörde gerçekleştirilmiştir. İnkübatörün tabanında bulunan su haznesindeki distile su düzenli aralıklarla değiştirilmiş ve inkübatör kullanım talimatına uygun olacak şekilde temizlenmiştir.

3.2.2. Besiyeri Hazırlanması

A375 melanom hücreleri, % 10 FBS, % 1 Penisilin-Streptomisin içeren yüksek glukozlu DMEM içinde 37 °C'de % 5 CO_2'te çoğaltılmıştır. Hazırlanan besiyeri +4 °C'de saklanmıştır (107).

3.2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekimi

A375 hücrelerinin kryotüpü azot tankından alınmış ve 2 dk 37 °C su banyosunda tutulmuştur. Hücreler falkon tüpe aktarıldıktan sonra üzerine 10 mL DMEM eklenip 800 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılıp pellet yeni besiyeri ile süspanse edilmiştir. Hücreler T25 flasklara ekim sonrası inverted mikroskop ile değerlendirildikten sonra 37 °C % 5 CO_2'li inkübatörde konfluent olana kadar inkübe edilmiştir.

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler inkübasyonları süresince inverted mikroskop ile canlılık, çoğalma ve kontaminasyon açısından her gün değerlendirilmiştir. Hücrelerin canlılıkları iki günde bir besiyeri değiştirilerek kontrol altında tutulmuştur. Besiyeri değiştirme sırasında hücrelerin eski besiyeri tamamen uzaklaştırılarak aynı miktarda yeni besiyeri eklenmiştir.

Hücrelerin pasajlanma işlemi hücrelerin % 80-90 yoğunluğa ulaştığı zaman gerçekleştirilmiştir. Pasajlama öncesinde T25 flasktan eski besiyeri uzaklaştırılıp DPBS ile yıkama işlemi bir kez gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonrasında 37 °C'deki Tripsin-EDTA çözeltisi 2 mL olacak şekilde flask'a eklenmiş ve hücreler inkübatörde 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. Hücrelerin flask tabanından bağlantılarının koptuğuna emin olunduktan sonra Tripsin-EDTA'nın etkisini ortadan kaldırıp nötralize edebilmek amacıyla DMEM eklenmiştir. Daha sonra bu süspansiyon steril falkon tüpe aktarılıp 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Hücre pelleti üzerine besiyeri eklenip homojen oluncaya kadar pipetaj yapılmıştır. Ardından hücrelerin yoğunluğuna göre 2 veya 3 adet T25/T75 flasklara pasajlanmıştır. Pasajlanan hücrelere, toplam hacim 10/15 mL olacak şekilde DMEM eklenmiştir. Pasajlanan hücreler inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.5. Hücrelerin Dondurulması

Pasajlama sonrasında hücreler yaşlandıkları için, her pasajda dondurularak stoklanmıştır. Pasajlanma sırasında kullanılan protokol aynı şekilde uygulanmıştır. Santrifüj sonrası süpernatatı atılan pellet, % 5 DMSO ve % 95 FBS içeren dondurma besiyeri ile süspanse edilip kryotüpe aktarılmıştır. Kryotüpün üzerine hücre hattının adı, dondurulduğu tarih ve pasaj sayısı yazılmıştır. Hücreler bu işlemden zarar görmemeleri için bir saat -20 °C'de muhafaza edildikten sonra bir gece -80 °C'de tutulmuştur. Ertesi gün ise azot tankına kaldırılmıştır.

3.2.6. Hücre Sayımı

Hücrelerin sayımının yapılabilmesi için öncelikle besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra Tripsin-EDTA kullanılarak yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Mikroskopta kontrol edilen hücreler, zeminden ayrılınca besiyeri ile nötralize edilip, 15 mL'lik steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hücreler, 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantı atılıp 10 mL besiyeri içerisinde homojenize edilmiştir. Hücrelerin sayımının yapılabilmesi için hücre çözeltisinden 10 µL alınarak, 1:1 oranında Tripan mavisi solüsyonu ile homojenize edilmiştir. Ardından

10 µL boyanmış numune, Thoma lamı ve lamel arasına konularak mikroskop altında hücre sayımı yapılmıştır.

Hücrelerin canlılık durumları değerlendirilerek sayım yapılmıştır. Tripan mavisi, canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için kullanılan bir boyadır. Ölü hücreler mavi renk boyanırlar. 16 kare bulunan 4 farklı sette canlı hücreler sayılarak ortalaması alınmıştır.

Hücre süspansiyonunun 1 mL'inde bulunan canlı hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Canlı hücre sayısı / mL = Ortalama hücre sayısı x seyreltme faktörü x 10^4

3.2.7. İnhibitörlerin Hazırlanması ve Uygulanması

Çalışmada kullanılan bir CA inhibitörü olan AZA'nın molekül formülü $C_4H_6N_4O_3S_2$ olup molekül ağırlığı 222.25 g/mol'dür. Bu inhibitör ticari olarak satın alındıktan sonra DMSO, metanol, etanol veya amonyum hidroksit (NH4OH) içerisinde çözdürülüp kullanıma hazır hale getirilebilir.

VMF ise bir B-Raf inhibitörüdür ve kapalı formülü $C_{23}H_{18}CIF_2N_3O_3S$ olup molekül ağırlığı 489.92 g/mol'dür. Bu inhibitör de ticari olarak satın alındıktan sonra DMSO, H_2O veya etanol içerisinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilebilir.

Çalışmada kullanılan bu iki inhibitör stok konsantrasyonu 300 µM olacak şekilde hesaplanarak DMSO içerisinde çözdürülmüş ve kullanılmıştır.

3.2.8. Hipoksik Ortamın Oluşturulması

Hücreler, normoksik ortamda çalışmak için, % 5 CO_2 ve 37 °C'de kültüre edilmiştir. Hipoksi çalışmaları için ise "Hipoksik İnkübatör" adı verilen hipoksik ortamı sağlayan bir cihaz ile hücrelerde hipoksik ortam oluşturulmuştur. Bu cihaz % 2 O_2, % 88 N_2 ve % 10 CO_2 içeren bir gaz karışımı ile kullanılmıştır. Hipoksik inkübatörün tabanına 10 mm'lik bir petri kabında 10-20 mL steril distile su yerleştirilmiştir. Hipoksik inkübatörün O-halkasının sızıntıya sebep olup olmayacağı kontrol edildikten sonra cihazın tepsisi düzgün bir şekilde yerleştirilmiştir. Tepsinin

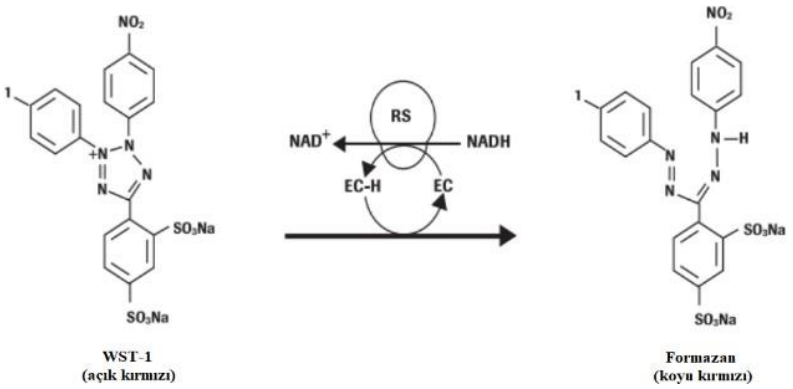
üzerine kültür kabı yerleştirilmiş, hipoksik inkübatörün kapağı kapatılıp kilitlenmiştir. Hipoksik inkübatör ve tüpün bağlantısı sağlandıktan sonra "Single Flow Meter" adı verilen basınç regülatörü de hipoksik inkübatöre bağlanmıştır. Bu regülatör yaklaşık 20 psi basınca ayarlandıktan sonra 4 dk boyunca gaz karışımı cihaza verilmiştir. Ardından iki adet tüp çıkışı bağlantıları çekilerek gaz kaynağı kapatılmış ve tüp uçları kilitlenmiştir. İçerisinde kültür kapları bulunan hipoksik inkübatör daha sonra etüve kaldırılmıştır.

3.2.9. Hipoksi Öncesi ve Sonrasında Hücre Asiditesinin Ölçülmesi

CA-IX, katalitik özelliğinden dolayı pH değişimlerinde rol oynar. Bu özelliğinden yola çıkılarak bir pH indikatörü olan fenol kırmızısı ile pH standardizasyonu çalışması yapılmıştır. Spektrofotometre kullanılarak absorbsiyona bağlı pH grafiği oluşturulmuştur. Bu şekilde A375 melanom hücrelerinde normoksik ve hipoksik ortamlarda pH ölçümü gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. Hücre Canlılığının ve Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

AZA ve VMF'nin, A375 hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonu üzerine olan etkilerini saptayabilmek için suda çözülebilir tetrazolyum tuzu (WST-1) testi uygulanmıştır. WST-1 testleri radyoaktif değildir, hızlıdır ve diğer sitotoksisite testlerinden daha duyarlıdır. Bu testin işleyişi, hücresel mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından tetrazolyum tuzu olan WST-1'in formazana dönüşmesine dayanır (Şekil 3.2). Canlı hücre sayısı ne kadar fazla ise mitokondriyal dehidrogenazların aktivitesi o kadar yüksektir. Bu sebeple formazan boyasının miktarı da o derece fazladır.



Şekil 3.2. WST-1 testinin çalışma mekanizması (108).
(EC = elektron birleştirme reaktifi, RS = mitokondriyal süksinat-tetrazolyum-redüktaz sistemi)

WST-1 kitinin protokolüne uygun olacak şekilde adımlar gerçekleştirilmiştir.

AZA ve VMF'nin hücrelerin % 50'sini öldürdüğü dozu belirlemek amacıyla hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına, her bir kuyucuğa 10^4-10^5 yoğunlukta hücre olacak şekilde 100 µL medium içinde ekilmiştir. Bu hücrelere hem normoksik hem hipoksik ortamlarda olacak şekilde, 24. ve 48. saatlerde 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 µM dozlarda AZA ve VMF inhibitörleri uygulanmıştır. Kontrol olarak kullanılacak olan kuyucuklara ise AZA ve VMF eklenmemiş olup sadece 100 µL medyum eklenmiştir. Ardından, her bir well'e 10 µL WST-1 reaktifi eklenmiştir. Çalkalayıcıda 1 dk yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra, hücreler normoksik ve hipoksik ortamlarında 2-4 saat inkübe edildikten sonra 1 dk rengin homojen olarak dağılması için çalkalayıcıda karıştırılmış ve 450 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

Ölçülen absorbans değerleri;

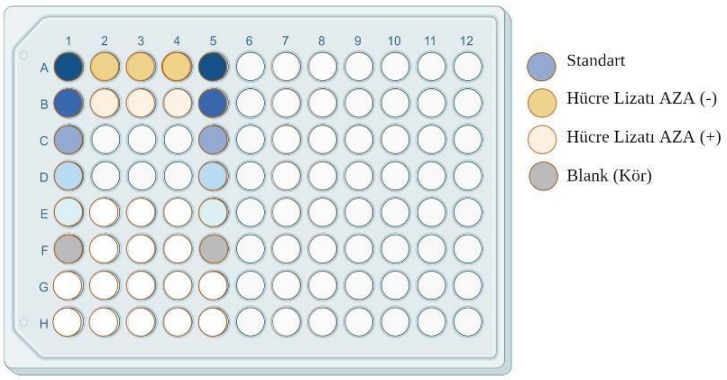
$$\% \text{ Canlılık} = (\text{OrtAbsorbans}_{\text{İlaç}} \text{x} 100 / \text{OrtAbsorbans}_{\text{Kontrol}})$$

$$\% \text{ İnhibisyon konsantrasyonu (IC)} = 100 - (\text{OrtAbsorbans}_{\text{İlaç}} \text{x} 100 / \text{OrtAbsorbans}_{\text{Kontrol}})$$

Formülüne göre hesaplanıp GraphPad Prism 9 programı kullanılarak inhibitörlerin IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

3.2.11. CA-IX Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi

A375 melanom hücrelerinde CA-IX düzeyi hücre lizatından üç tekrar olacak şekilde ELISA (Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi) yöntemi ile ölçülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. ELISA çalışma düzeneği.

Hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiş ve yoğunlukları % 80-90 olana kadar besiyeri değiştirilerek büyütülmüştür. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra inhibitör grubuna AZA eklenerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

CA-IX düzeyi analizi için; önceden soğutulmuş DPBS ile yıkama yapılmıştır. Kültür kuyucuklarının her birine 500 µL Tripsin eklenerek hücreler 5 dk etüvde inkübe edilmiştir. Ardından kültür kuyucuklarındaki hücreler falkonlara inhibitörlü ve inhibitörsüz olacak şekilde toplanarak +4 °C'de 1000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra önceden soğutulmuş DPBS ile üç kez yıkama yapılmıştır. Daha sonra yeniden DPBS eklenip dondur-çöz aşamasına geçilmiştir. Önce -80 °C'de 5 dk bekletilen hücreler daha sonra 37°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Bu süreç üç kez tekrarlanmıştır. Bu döngünün sonunda hücreler +4 °C'de 1500 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak ELISA protokolü uygulanmıştır.

ELISA çalışma düzeneği kurulurken standartlar hazırlanmıştır. Standart solüsyon 1:2 oranında dilüe edilerek 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL ve 1.25 ng/mL olacak şekilde kuyucuklara 50 µL olacak şekilde eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına 40 µL örnek, 10 µL bitotinlenmiş anti-CA-IX antikoru eklenmiştir. Son olarak tüm kuyucuklara 50 µL Streptoavidin HRP eklenmiştir. Kültür kabı 60 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkanıp 50 µL substrat solüsyonu A ve 50 µL substrat solüsyonu B eklendikten sonra 10 dk 37 °C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 50 µL durdurma solüsyonu eklenerek Biotek Epoch Reader Spektrofotometre cihazında 450 nm'de okutulmuştur.

ELISA deneyleri için BT Lab “Human Carbonic Anhydrase IX ELISA Kit” kullanılmıştır. Bu kit Sandviç ELISA metodu ile çalışmaktadır. Bu prensibe göre 96 kuyucuklu kültür kabının tabanı CA-IX antikoru ile kaplıdır. Örnekte bulunan CA-IX bu antikora bağlanır. Üzerine biyotinlenmiş anti CA-IX antikoru eklendikten sonra olarak Streptoavidin HRP eklenir ve inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası eklenen substrat solüsyonu ile ışıma gerçekleşir.

3.2.12. qRT-PCR

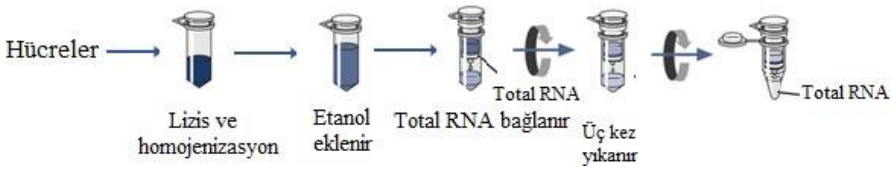
A375 melanom hücrelerinde normoksik/hipoksik ve inhibitörlü/inhibitörsüz olacak şekilde HIF1A ve CA9 gen ekspresyon düzeylerinin analizi için Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) yapılmıştır.

Hücreden Total RNA Eldesi

Total ribonükleik asid (RNA) izolasyonu için QIAGEN miRNeasy kit kullanılmıştır. A375 melanoma hücreleri normoksi/inhibitörsüz, normoksi/AZA, hipoksi/inhibitörsüz ve hipoksi/AZA olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Bu gruplar normoksik ve hipoksik ortamlarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda pasajlama protokolünde uygulandığı gibi hücreler kültür kaplarından kaldırılıp nötralizasyon ve yıkama işlemlerinin ardından RNA izolasyonuna hazır hale getirilmiştir.

RNA izolasyonu için; hücre pelleti falkona hafifçe vurularak çözülmüştür. 700 µL QIAzol Lizis Reaktifi eklenerek 2 dk boyunca vortekslenerek karıştırılmıştır. Homojenat içeren tüp 10 dk boyunca oda sıcaklığında (15-25 °C) inkübe edilip bu sürede 2 dk’da bir vortekslenmiştir. Homojenatı içeren tüpe 140 µL kloroform eklenip tüpün ağzı sıkıca kapatılmıştır. Tüp 15 sn kuvvetlice çalkalanmıştır. Daha sonra bu tüp 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra 4 °C'de 12.000 g'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjlemeden sonra, numune, RNA içeren bir üst, renksiz, sulu faz; beyaz bir ara faz; ve daha düşük, kırmızı, organik bir faz olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Üst sulu faz yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır. 1.5 hacim % 100 etanol eklendikten sonra birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırılmıştır. Bu aşamadan sonraki adımlar QIAcube Connect cihazında gerçekleştirilmiştir. Oluşan çökelti de dahil olmak üzere 700 µL'ye kadar numune, bir RNeasy Mini spin kolonuna

pipetlenmiştir. RNeasy spin kolonu 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş ve kapağı kapatılmıştır. 10.000 rpm'de oda sıcaklığında 15 sn santrifüjlenmiş ve santrifüj sonrası aşağı inen kısım atılmıştır. Numunenin geri kalanı kullanılarak bir önceki adım tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrası aşağı inen kısım atılmıştır. RNeasy mini spin kolonuna 700 µL Buffer RWT eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası aşağı inen kısım atılmıştır. RNeasy mini spin kolonuna 500 µL Buffer RPE eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası aşağı inen kısım atılmıştır. RNeasy Mini spin kolonuna tekrar 500 µL Buffer RPE eklenmiş ve kapağı kapatılmıştır. 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası aşağı inen kısım atılmıştır. 1 dk boyunca tam hızda bir mikrosantrifüjde santrifüjlenmiştir. RNeasy mini spin kolonu yeni bir 1,5 mL toplama tüpüne aktarılmıştır. 30-50 µL RNaz içermeyen su doğrudan RNeasy mini dönel kolon membranına pipetlenmiştir. Kapağı kapatıp RNA'yı ayrıştırmak için 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası 1,5 mL tüpe inen bölüm RNA'dır (Şekil 3.4). Spin kolon atılmış ve RNA'lar kapakları kapatılarak hemen buz üzerine alınmıştır. Komplementer DNA (cDNA) sentez basamağına hiç beklenmeden geçilmiştir.

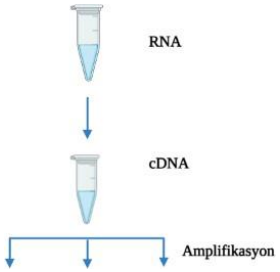


Şekil 3.4. QIAGEN miRNeasy kiti ile total RNA izolasyonunun gösterimi.

cDNA sentezi öncesi QIAxpert cihazıyla RNA'ların miktar tayini yapılmıştır.

cDNA Eldesi

Elde edilen total RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi QuantiNova kiti ile gerçekleştirilmiştir. Bu protokolde öncelikle ters transkripsiyonla cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra QuantiNova LNA Probu PCR (tek tüplü) testi kullanılarak qRT-PCR yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. İki adımlı qRT-PCR Protokolü.

RNA, genomik DNA (gDNA) Removal Mix ve Reverse Transcription Enzyme buz üzerinde çözülmüştür. Reverse Transcription Mix ve RNase-free water oda sıcaklığında (15-25 °C) çözülmüştür. Ayrıca, genomik DNA'nın inhibisyon aşaması için Tablo 3.6'de gösterildiği gibi her bir örnek için karışım hazırlanmıştır.

Tablo 3.6. gDNA giderme reaksiyon bileşenleri.

Bileşen	**Hacim**
gDNA giderme karışımı	2 µL
Kalıp RNA	Değişken
RNaz içermeyen su	Değişken
Toplam Hacim	15 µL

Tüpler 45 °C'de 2 dk inkübe edildikten sonra buzun üzerine yerleştirilmiş ve ters transkripsiyon ana karışımı Tablo 3.7'e göre buz üzerinde hazırlanmıştır.

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

Tüpler bir PCR cihazına yerleştirilmiş ve 25 °C'de 3 dk, 45 °C'de 10 dk, 85 °C'de 5 dk döngü olacak şekilde ayarlanarak reaksiyon başlatılmıştır.

Ters transkripsiyon reaksiyonlarının tamamlandığı tüpler buz üzerine yerleştirilmiş ve qRT-PCR ile devam edilmiştir.

qRT-PCR

2x QuantiNova Probe PCR Master Mix, cDNA örnekleri, 10x QuantiNova LNA Probe PCR Assay Primer ve RNase-free water çözülmüştür. Aşağıdaki Tablo 3.8'a göre mastermix karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3.8. QuantiNova LNA Probu PCR Testleri için reaksiyon karışımı kurulumu.

Bileşen	**Hacim**
2x QuantiNova Probe PCR Master karışımı	10 µL
10x Probe PCR Assay	2 µL
RNaz içermeyen su	3 µL
Toplam Hacim	15 µL

0,1 mL'lik PCR tüplerine 15'er µL mastermix dağıtılmıştır. Daha sonra, üzerine 5'er µL cDNA örnekleri eklenmiştir. En az 2 tüp NTC kontrol olacak şekilde dizayn yapılmıştır. Tüplerin kapakları kapatılıp Rotor Gene Q cihazına yerleştirilmiş ve cihazda Tablo 3.9'daki şekilde PCR reaksiyon ayarlamaları yapılıp çalışma başlatılmıştır.

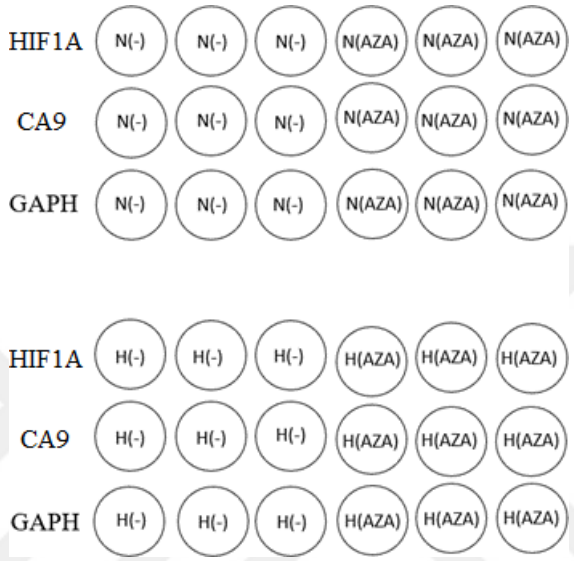
Tablo 3.9. PCR reaksiyonunun aşamaları.

Basamak	**Zaman**	**Isı**
PCR başlangıç ısı aktivasyonu	2 dk	95 °C
Denatürasyon	5 sa	95 °C
Primerlerin bağlanması ve uzama	5 sa	60 °C
Döngü sayısı	45 döngü	

Tablo 3.10'da qRT-PCR'da ilgili genlere ait primerlerin bilgileri yer alırken Şekil 3.6'de üç tekrarlı qRT-PCR çalışma düzeneği gösterilmiştir.

Tablo 3.10. qRT-PCR'da ilgili genlere ait primerler.

Gen adı	Katalog No/ID	GeneGlobe ID
HIF1A	249995	UPFH0476121
CA9	249995	UPFH1132903
GAPDH	249995	UPFH0007663



Şekil 3.6. qRT-PCR'da çalışma düzeneği.

qRT-PCR Analizi

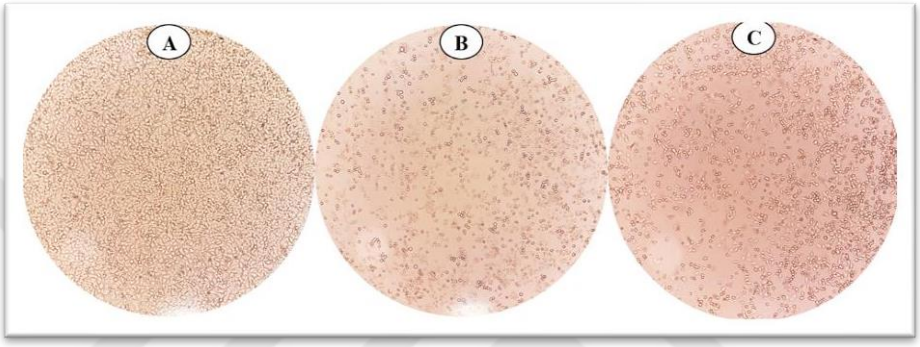
HIF1A ve CA9 genlerinin analizi için Delta-Delta Ct yöntemi kullanılmıştır. Bu yönteme göre söz konusu genlerin ortalama Ct değerlerinden ortalama GAPDH geninin Ct değeri çıkartılarak ortalama ΔCt değerleri belirlenmiştir. İlgili genlerin ΔCt değerlerinden ortalama ΔCt değerleri çıkarılarak ΔΔCt değerleri hesaplanmıştır. Kat değişimlerinin analizi için ise 2^-ΔΔCt değerleri hesaplanmıştır.

3.2.13. Western Blot

Hücre Lizatı Hazırlama

Western Blot analizi için 6 kuyucuklu kültür kaplarında normoksik/hipoksik ve inhibitörsüz/inhibitörlü üretilen A375 melanoma hücrelerinin inhibitörsüz ve

inhibitörlü görüntüleri Şekil 3.7'de gösterilmiştir. Üretilen hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılıp iki kez DPBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama aşamasından sonra % 90-100 konfluent durumuna ulaşmış olan kuyucuğa 100 µL, % 60-70 konfluent durumuna ulaşmış olan kuyucuğa 75 µL lizis tamponu eklenmiştir. Hücreler, hücre kazıyıcısı yardımıyla buz üzerinde kazıyarak çıkarılıp homojenize edilip sonikatörle buz üzerinde üç vuruş yapılmıştır. Daha sonra hücreler 15 dk, 4 °C'de 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrı bir ependorfa alınıp çalışmaya süpernatant ile devam edilmiştir.



Şekil 3.7. A375 melanom hücrelerinin Western Blot öncesi görüntüleri.
A) İnhibitör uygulanmayan A375 melanoma hücrelerinin görüntüsü, B) VMF uygulanan A375 melanoma hücrelerinin görüntüsü, C) AZA uygulanan A375 melanoma hücrelerinin görüntüsü.

Protein Konsantrasyonunun ölçümü

Proteinler jelde yürütülmeden önce örneklerin protein konsantrasyonları Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür. Nanodrop cihazı mikro hacimli spektrofotometredir. Bu cihaz, seyreltmeye gerek kalmadan hızlı, doğru ve tekrarlanabilir mikro hacimde ölçümleri yapabilmektedir (Şekil 3.8) (109).



Şekil 3.8. Nanodrop cihazı.

Proteinlerin Jelde Yürütülmesi

Süpernatant ayrı bir ependorf tüpe alınarak üzerine 2x laemmli sample buffer eklenip vortekslenmiştir. Isıtıcı blokta, 96 °C de 8-10 dk kaynatılıp kısa bir vorteksin ardından spin attırılarak jele yüklemek için hazır hale getirilmiştir. Tank sistemi hazırlanmıştır. % 4-12 Bis-Tris Jel tanka yerleştirilip kaset yardımıyla sıkıştırılmıştır. Yürütme tamponu orta bölmeye dökülerek sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra tüm tank doldurulmuştur. Hazır jelde bulunan kuyucukların üzerindeki kaset çıkarılmış ve enjektör yardımıyla her bir kuyucuk yürütme tamponu ile yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa 20 µL örnek yüklemesi yapılmıştır. Yükleme bittikten sonra tank kapatılıp elektrotlar bağlanmış ve güç kaynağı 100V, 120A olacak şekilde ayarlanarak 100 dk boyunca yürütme işlemi yapılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Proteinlerin jelde yürütülmesi aşaması.

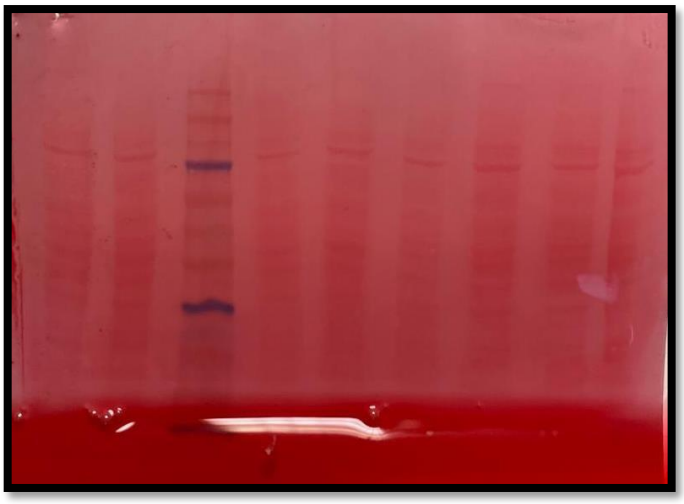
Proteinlerin Jelden Membrana Transferi

Jel tanktan çıkarıldıktan sonra kaset distile su ile yıkanmıştır. Spatul yardımıyla kaset açılıp jelin kullanılmayacak yerleri kesilmiştir. Jel, transfer tamponunun bulunduğu kaba bırakılmıştır. Protein transferi için Iblot Transfer Stack kullanılarak Iblot protokolü uygulanmıştır. 7 dk boyunca blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu blotlama sistemi ile jelden membrana protein transferi yüksek verimlilikle kısa sürede gerçekleştirilmiştir (110) (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Jelden membrana protein transferinin görüntüsü.

Membrana geçen jel, Ponceau S boyası ile boyanarak proteinlerin membrana geçip geçmediği kontrol edilmiştir (Şekil 3.11). 1-2 dk bu boyada bekleyen membran önceden hazırlanan, PBS-Tween20 ile 10-15 dk 1-2 kez yıkanmıştır.



Şekil 3.11. Ponceau boyası ile boyanmış membranın görüntüsü.

Bloklama Aşaması

Membranda bulunan büyük antijenik bölgelerin kapatılması yani bloklanması amacıyla süt tozu çözeltisi kullanılmıştır. Membran süt tozu çözeltisi ile 1 saat oda ısısında çalkalayıcıda (130 rpm) muamele edilmiştir (Şekil 3.12). Membran bloklama sonrası 10-15 dk 1-2 kez PBS-Tween20 ile yıkanmıştır.



Şekil 3.12. Süt tozu çözeltisi ile bloklanan membranın görüntüsü.

Membranın Primer Antikorla Muamelesi

Membran, PBS-Tween20 ile hazırlanmış primer antikor ile gece boyu +4 °C'de çalkalayıcıda (130 rpm) inkübe edilmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Membranın primer antikorla inkübasyon görüntüsü.

Western Blot çalışmasında kullanılan primer antikorların dilüsyon oranları Tablo 3.11'de gösterilmiştir.

Tablo 3.11. Blotlama aşamasında kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon oranları.

Antikor	**Dilusyon Oranı**
HIF-1α poliklonal antikoru	1/1000
B-Raf poliklonal antikoru	1/500
p-B-Raf poliklonal antikoru	1/500
ERK1/ERK2 monoklonal antikoru	1/500
p-ERK1/ERK2 poliklonal antikoru	1/500
β-Aktin antikoru	1/1000

Membranın Sekonder Antikorla Muamelesi

Primer antikorla inkübasyon sonrasında membran, üç kere PBS-Tween20 çözeltisi ile 10-15 dk yıkanmış ve HRP-konjuge sekonder antikor ile çalkalıyıcıda 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir.

Western Blot çalışmasında kullanılan sekonder antikorların dilusyon oranları Tablo 3.12'de gösterilmiştir.

Tablo 3.12. Blotlama aşamasında kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyon oranları.

Antikor	**Dilusyon Oranı**
Goat-anti-mouse HRP sekonder antikoru	1/20000
Goat-anti-rabbit HRP sekonder antikoru	1/20000

Membranın Görüntülenmesi

Sekonder antikorla inkübasyon sonrası membran PBS-Tween20 ile 15-20 dk yıkanmıştır. Görüntüleme yapmadan önce ECL solüsyonu hazırlanarak membranların bulunduğu kaplara eklenmiştir. Membranlar 3 dk karanlıkta bekletildikten sonra ChemiDoc-It2 Imager cihazına yerleştirilmiş ve "5 dakika - 2 saniye - 200,000 milisaniye" zaman ayarı ile görüntüleme yapılmıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Görüntüleme cihazı.

Western Blot Analizi

Western blot uygulamasının ardından ImageJ programı ile analizler yapılmış ve ilgili proteinin β-aktinine oranlama yapılarak değerler normalize edilmiştir. Normalize edilen değerler, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.14. İmmünofloresan

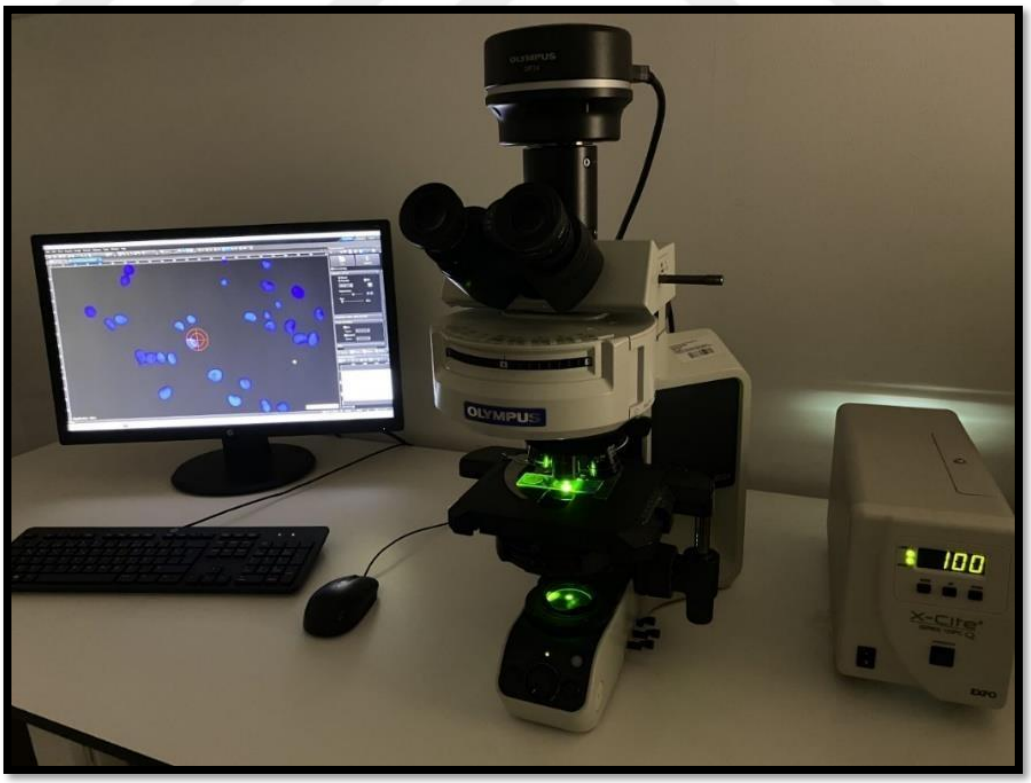
Proteinlerin hücredeki yerleşimlerini ve inhibitör uygulaması sonrası değişimlerini göstermek amacıyla immünofloresan yapılmıştır. Bu yöntem ile CA-IX, HIF-1α, B-Raf ve ERK proteinleri incelenmiştir.

Hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarında lameller üzerine ekilip % 70-80 yoğunluğa ulaşana dek besiyeri değişimleri yapılmıştır. İnhibitör uygulaması yapılacak kuyucuklara AZA eklenip 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler PBS ile üç kez yıkanıp % 4'lük formaldehit ile 15 dk fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra bloklama solüsyonu (% 1 Sığır serum albümin (BSA)), % 0.1 Tween, 0.3 M glisin ve % 10 FBS içeren DPBS) ile 1 saat bloklama yapılmıştır.

Bloklamadan sonra tekrar DPBS ile iki kez yıkanıp lameller lama alınıp primer antikorlar (CA-IX, HIF-1α, B-Raf, ERK) ile bir gece +4 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra DPBS ile yıkanıp sekonder antikorlar (Alexa Fluor® 488 ve Texas Red) ile 1 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan antikorların dilüsyon oranları Tablo 3.13'te verilmiştir. Daha sonra DAPI boyası içeren kapatma medyumu ile kaplanan lamlar floresan mikroskobunda incelenmiştir (Şekil 3.15).

Tablo 3.13. İmmünofloresan boyamada kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları.

Antikor	**Dilüsyon Oranı**
HIF-1α poliklonal antikoru	1:50
CA-IX monoklonal antikoru	1:50
B-Raf poliklonal antikoru	1:50
ERK1/ERK2 monoklonal antikoru	1:50
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Texas Red®)	1:300
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) antikoru	1:300



Şekil 3.15. Floresans mikroskobunun görüntüsü.

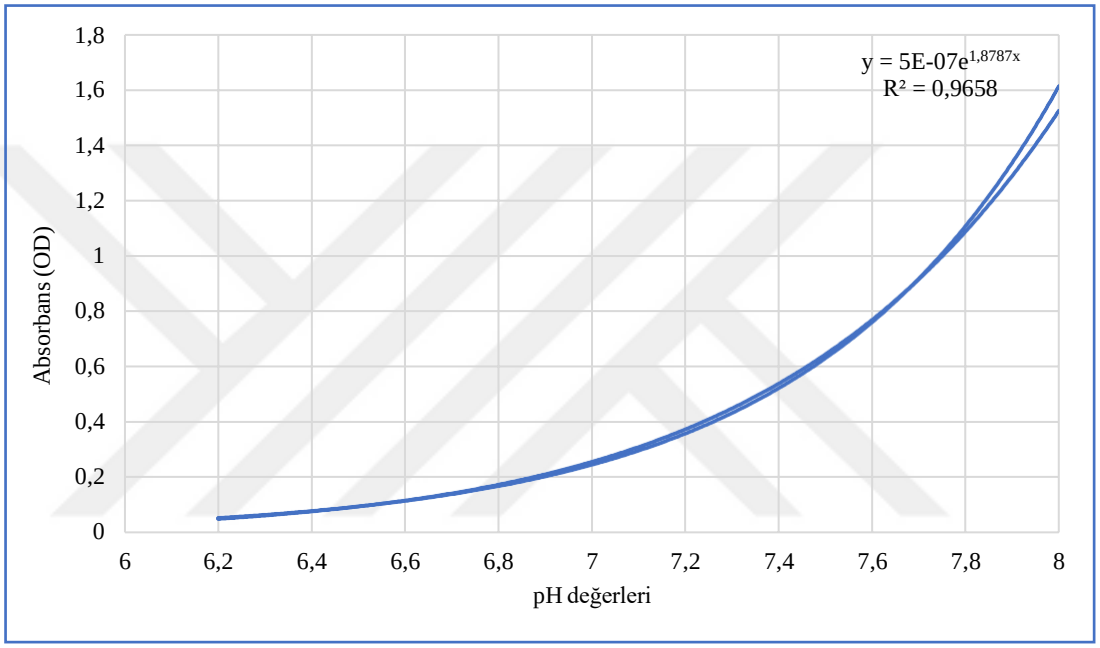
3.2.15. İstatistiksel Analiz

ELISA ve Western Blot çalışmalarının istatistiksel analizlerinde GraphPad Prism 9 programı kullanılmıştır. İkili gruplar Student's t testi, üçlü karşılaştırmalar ise tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır. qRT-PCR çalışmalarında elde edilen sonuçlar ise GeneGlobe programı ile analiz edilmiştir. Testlere uygun grafikler çizilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Normoksik ve Hipoksik Ortamlarda Hücre Asiditesinin Belirlenmesi

Hücre asiditesini belirlemek amacıyla, 6.2-8.0 pH aralığında 460, 560 ve 720 nm'de ölçümleri yapılan fenol kırmızısının absorbansa dayalı üssel bir grafiği oluşturulmuştur. Bu grafik, yaklaşık % 97 doğrulukta olup, spektrofotometrede ölçülen absorbans değerine karşılık gelen pH değerini vermektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Fenol kırmızının absorbansa bağlı pH grafiği.

Normoksik ve hipoksik ortamlarda 24 saat inkübasyona bırakılan A375 melanom hücre hatlarının besiyerlerinin absorbansları Biotek Epoch Reader Spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüş ve pH değerleri fenol-absorbans standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. A375 melanom hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamlarda pH'sı.

A375 Melanom Hücreleri	Normoksi	Hipoksi
Absorbans Değerleri (OD)	0,243	0,175
pH Değerleri	6,96	6,79

4.2. A375 Melanom Hücrelerinde AZA'nın IC_{50} Değerinin Belirlenmesi

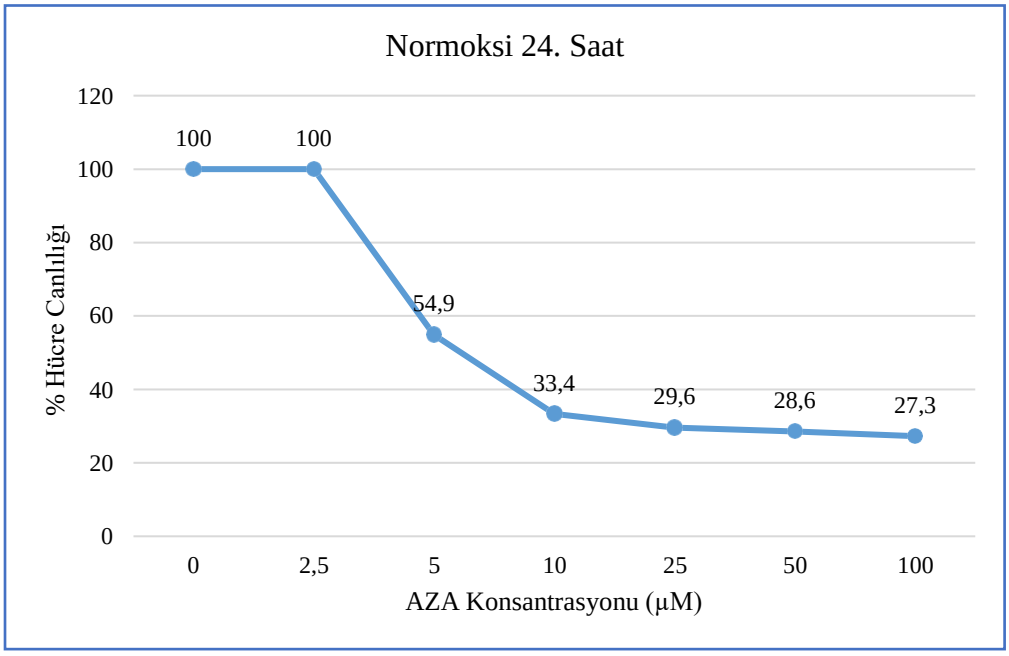
A375 melanom hücrelerine hem normoksik hem de hipoksik ortamlarda olacak şekilde 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 µM dozlarda AZA inhibitörü uygulanmıştır.

Normoksik ortamda 24. saatin sonunda, 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarda uygulanan AZA sonrasında sırasıyla % 100, % 100, % 70,2, % 50,3, % 29,6, % 28,6 ve % 27,3 oranında canlılık gözlenmiştir (Tablo 4.2), (Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Normoksi 24. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

Normoksi 24. saat değerleri (AZA)

Konsantrasyon (µM)	Canlılık (%)	İnhibisyon (%)
0	100	0
2,5	100	0
5	54,9	29,8
10	33,4	49,7
25	29,6	70,4
50	28,6	71,4
100	27,3	72,7



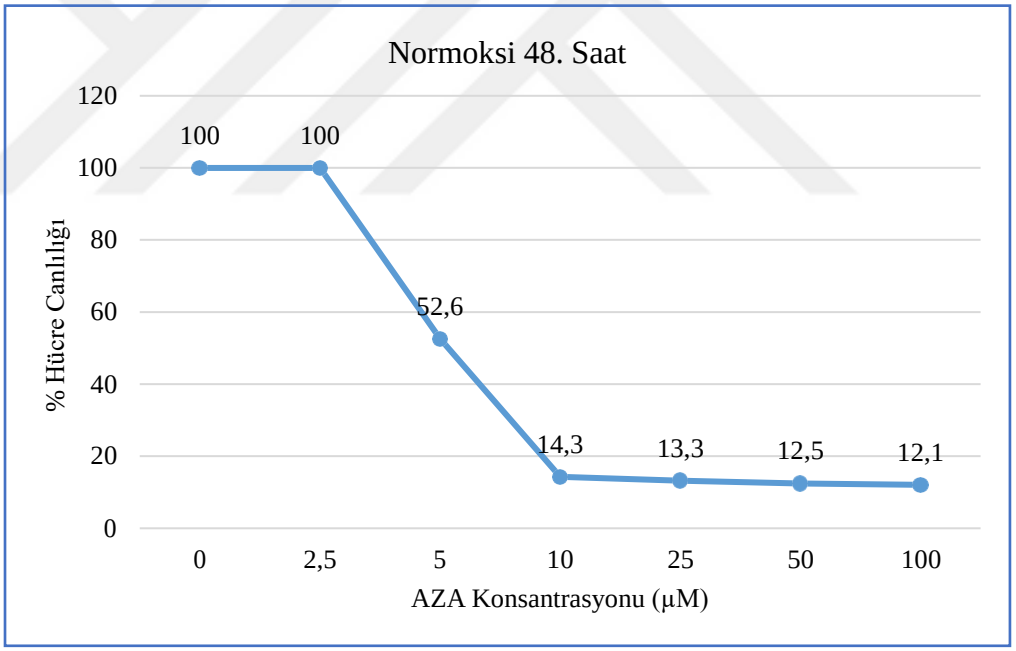
Şekil 4.2. Normoksi 24. saatte farklı konsantrasyonlarda AZA uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi.

Normoksik ortamda 48. saatin sonunda, 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarda uygulanan AZA sonrasında sırasıyla % 100, % 100, % 52,6, % 14,3, % 13,3, % 12,5 ve % 12,1 oranında canlılık gözlenmiştir (Tablo 4.3), (Şekil 4.3).

Tablo 4.3. Normoksi 48. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

Normoksi 48. saat değerleri (AZA)

Konsantrasyon (µM)	Canlılık (%)	İnhibisyon (%)
0	100	0
2,5	100	0
5	52,6	47,4
10	14,3	85,7
25	13,3	86,7
50	12,5	87,5
100	12,1	87,9



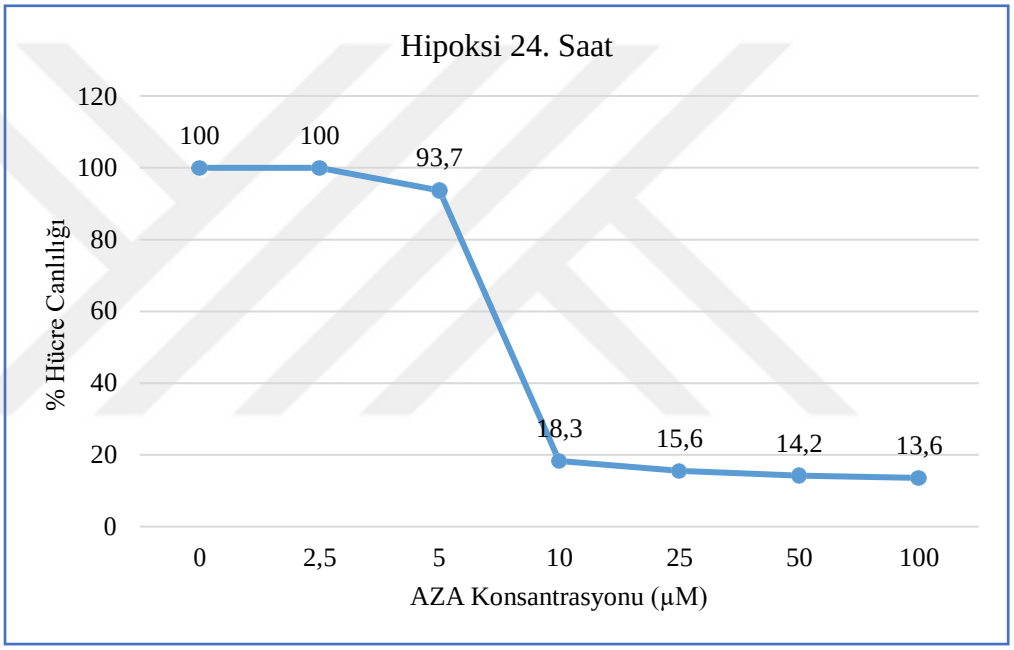
Şekil 4.3. Normoksi 48. saatte farklı konsantrasyonlarda AZA uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi.

Hipoksik ortamda 24. saat sonunda, 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarda uygulanan AZA sonrasında sırasıyla % 100, % 100, % 93,7, % 18,3, % 15,6, % 14,2 ve % 13,6 oranında canlılık gözlenmiştir (Tablo 4.4), (Şekil 4.4).

Tablo 4.4. Hipoksi 24. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

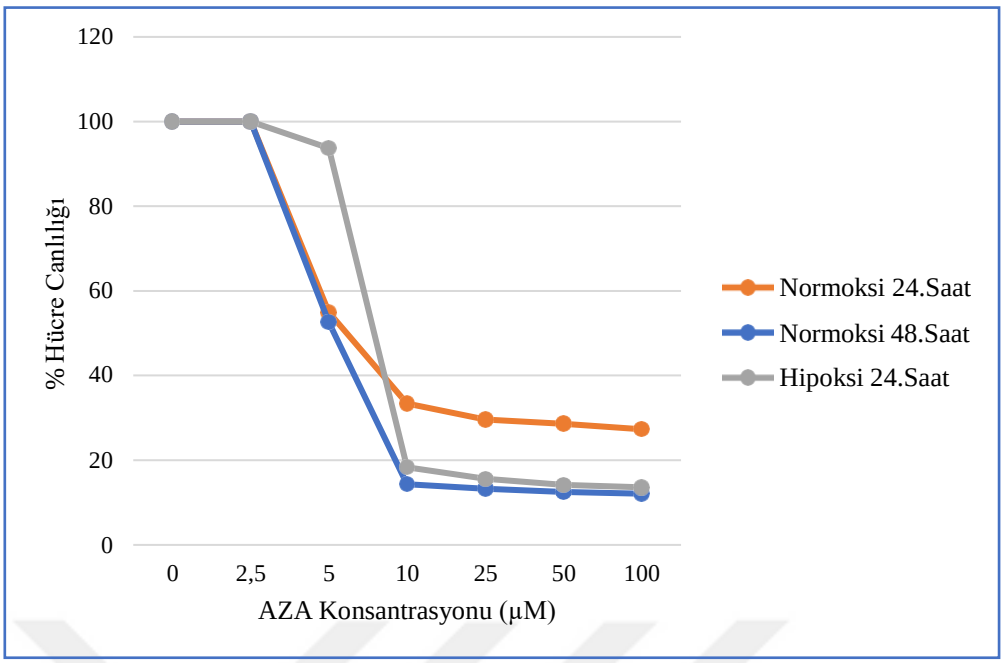
Hipoksi 24. saat değerleri (AZA)

Konsantrasyon (µM)	Canlılık (%)	İnhibisyon (%)
0	100	0
2,5	100	0
5	93,7	6,3
10	18,3	81,7
25	15,6	84,4
50	14,2	85,8
100	13,6	86,4



Şekil 4.4. Hipoksi 24. saatte farklı konsantrasyonlarda AZA uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi.

Farklı zaman dilimi, ortam ve konsantrasyonlarda AZA uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı zaman dilimi, ortam ve konsantrasyonlarda AZA uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi.

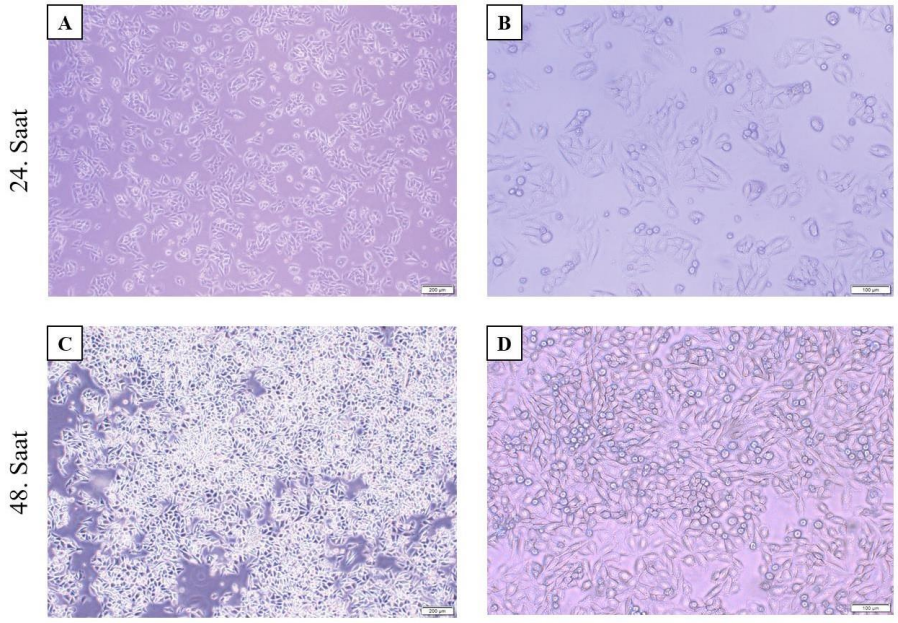
A375 melanom hücrelerinde farklı zaman dilimi ve ortamda uygulanan AZA inhibitörünün uygun dozunu bulabilmek amacıyla GraphPad Prism 9 programına % inhibisyon değerleri girilerek IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Farklı ortam ve zamanlar için hesaplanan IC_{50} değerleri.

Ortam/Zaman	**IC_{50}**
Normoksi/24. Saat	10,7 µM
Normoksi/48. Saat	5,4 µM
Hipoksi/24.Saat	7,8 µM

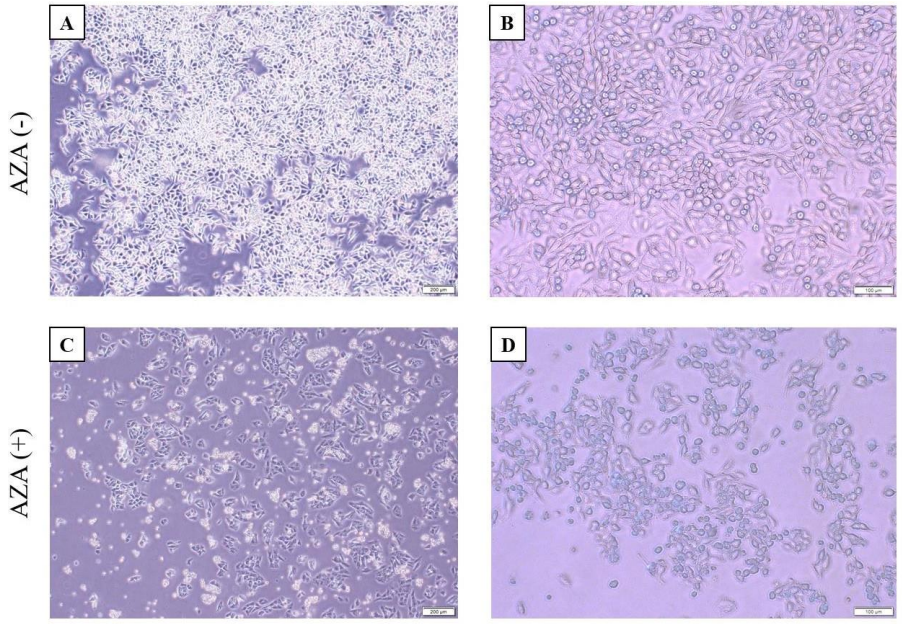
Bu sonuçlara göre AZA'nın A375 melanom hücrelerinde uygulanacak dozu 10,7 µM olarak belirlenmiştir.

A375 melanom hücreleri inhibitör uygulamasından önce ekilip 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. A375 melanom hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri.
A) A375 melanom hücrelerinin 24. saat inverted mikroskop görüntüsü, B) A375 melanom hücrelerinin 24. saat inverted mikroskop görüntüsü, C) A375 melanom hücrelerinin 48. saat inverted mikroskop görüntüsü, D) A375 melanom hücrelerinin 48. saat inverted mikroskop görüntüsü (Bar: A ve C: 200 µm, B ve D: 100 µm).

AZA inhibitör uygulamasının öncesi ve sonrasında hücrelerin görüntüleri inverted mikroskop ile çekilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. A375 melanom hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri.
A) A375 melanom hücrelerinin AZA uygulanmadan önce inverted mikroskop görüntüsü, B) A375 melanom hücrelerinin AZA uygulanmadan önce inverted mikroskop görüntüsü, C) A375 melanom hücrelerinin AZA uygulandıktan 24 saat sonra inverted mikroskop görüntüsü, D) A375 melanom hücrelerinin AZA uygulandıktan 24 saat sonra inverted mikroskop görüntüsü, (Bar: A ve C: 200 µm, B ve D: 100 µm).

4.3. A375 Melanom Hücrelerinde VMF'nin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi

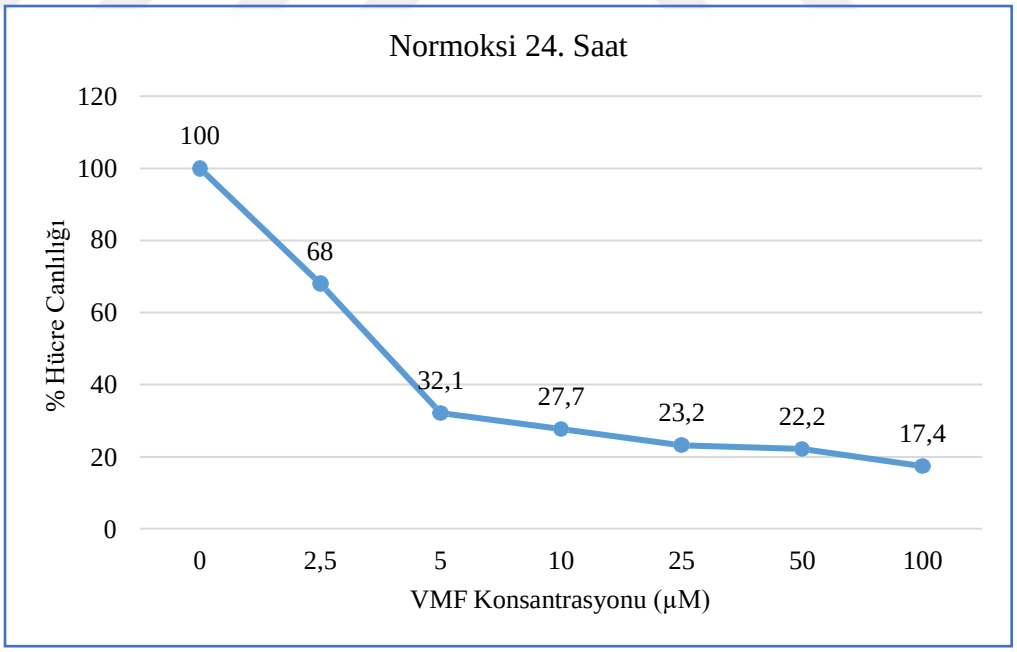
A375 melanom hücrelerine hem normoksik hem de hipoksik ortamlarda olacak şekilde 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 µM dozlarda VMF inhibitörü uygulanmıştır.

Normoksik ortamda 24. saat sonunda, 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarda uygulanan VMF sonrasında sırasıyla % 100, % 68, % 32,1, % 27,7, % 23,2, % 22,2 ve % 17,4 oranında canlılık gözlenmiştir (Tablo 4.6), (Şekil 4.8).

Tablo 4.6. Normoksi 24. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

Normoksi 24. saat değerleri (VMF)

Konsantrasyon (µM)	Canlılık (%)	İnhibisyon (%)
0	100	0
2,5	68	32
5	32,1	67,9
10	27,7	72,3
25	23,2	76,8
50	22,2	77,8
100	17,4	82,6



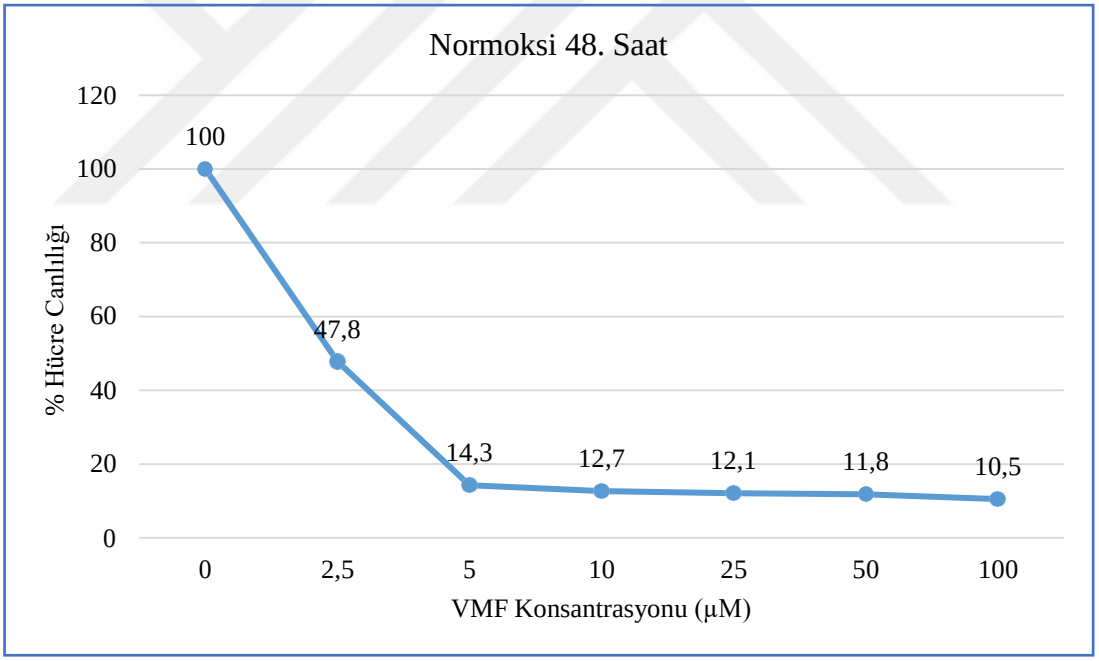
Şekil 4.8. Normoksi 24. saatte farklı konsantrasyonlarda VMF uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi.

Normoksik ortamda 48. saatin sonunda, 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarda uygulanan VMF sonrasında sırasıyla % 100, % 47,8, % 14,3, % 12,7, % 12,1, % 11,8 ve % 10,5 oranında canlılık gözlenmiştir (Tablo 4.7), (Şekil 4.9).

Tablo 4.7. Normoksi 48. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

Normoksi 48. saat değerleri (VMF)

Konsantrasyon (µM)	Canlılık (%)	İnhibisyon (%)
0	100	0
2,5	47,8	52,2
5	14,3	85,7
10	12,7	87,3
25	12,1	87,9
50	11,8	88,2
100	10,5	89,5



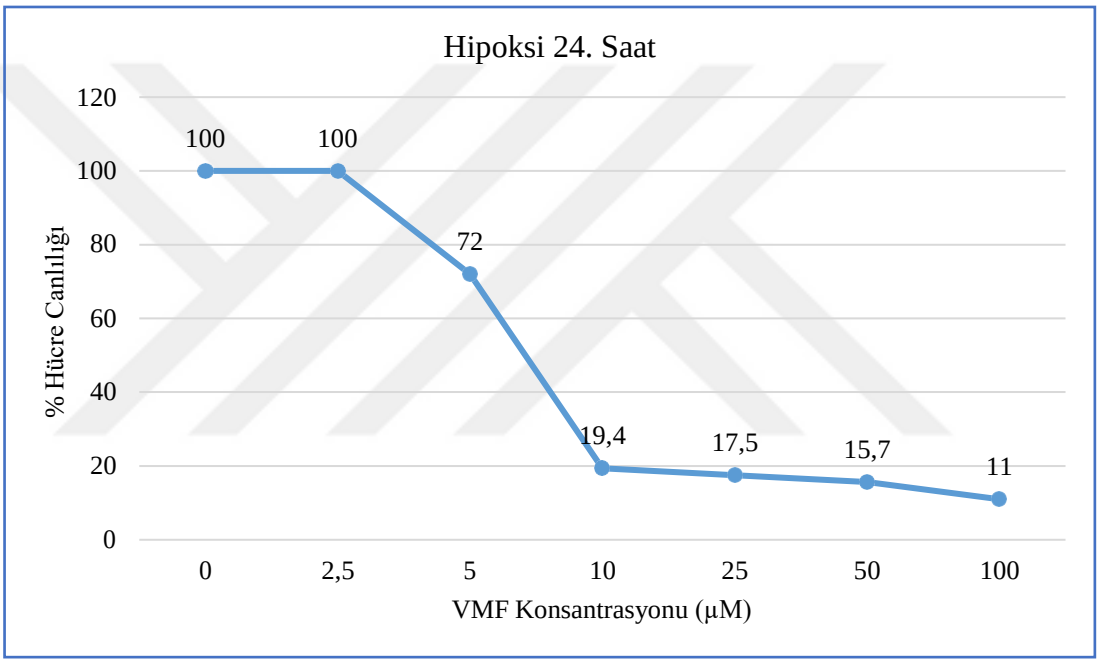
Şekil 4.9. Normoksi 48. saatte farklı konsantrasyonlarda VMF uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi.

Hipoksik ortamda 24. saatin sonunda, 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarda uygulanan VMF sonrasında sırasıyla % 100, % 100, % 72, % 19,4, % 17,5, % 15,7 ve % 11 oranında canlılık gözlenmiştir (Tablo 4.8), (Şekil 4.10).

Tablo 4.8. Hipoksi 24. saatte % canlılık ve % inhibisyon değerleri.

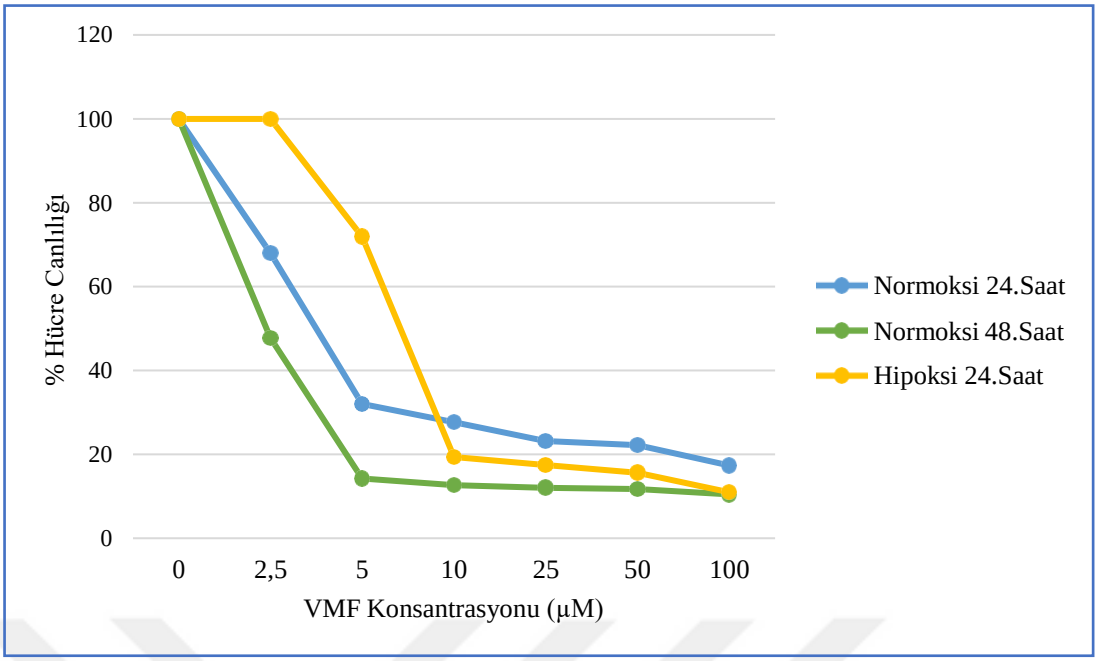
Hipoksi 24. saat değerleri (VMF)

Konsantrasyon (µM)	Canlılık (%)	İnhibisyon (%)
0	100	0
2,5	100	0
5	72	28
10	19,4	80,6
25	17,5	82,5
50	15,7	84,3
100	11	89



Şekil 4.10. Hipoksi 24. saatte farklı konsantrasyonlarda VMF uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi.

Farklı zaman dilimi, ortam ve konsantrasyonlarda VMF uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığı Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı zaman dilimi, ortam ve konsantrasyonlarda VMF uygulaması yapılan A375 melanom hücrelerinde % hücre canlılığının gösterimi.

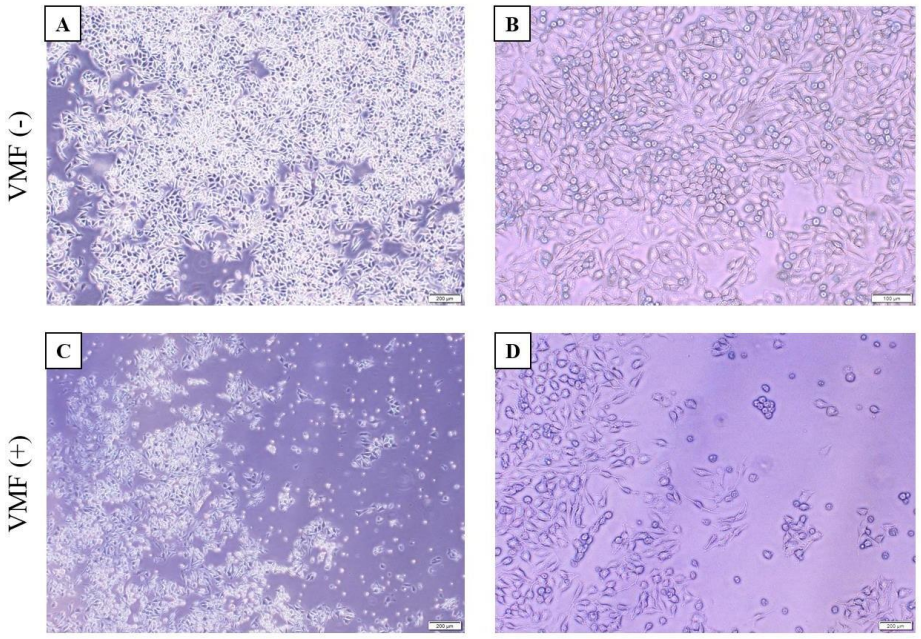
A375 melanom hücrelerine farklı zaman dilimi ve ortamda uygulanan VMF inhibitörünün uygun dozunu bulabilmek amacıyla GraphPad Prism 9 programına % inhibisyon değerleri girilerek IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Farklı ortam ve zamanlar için hesaplanan IC_{50} değerleri.

Ortam/Zaman	**IC_{50}**
Normoksi/24. Saat	4,9 µM
Normoksi/48. Saat	2,5 µM
Hipoksi/24. Saat	6,7 µM

Bu sonuçlara göre VMF'nin A375 melanom hücrelerine uygulanacak dozu 4,9 µM olarak belirlenmiştir.

VMF inhibitör uygulamasının öncesi ve sonrasında hücrelerin görüntüleri inverted mikroskop ile çekilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. A375 melanom hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri. A) A375 melanom hücrelerinin VMF uygulanmadan önce inverted mikroskop görüntüsü, B) A375 melanom hücrelerinin VMF uygulanmadan önce inverted mikroskop görüntüsü, C) A375 melanom hücrelerinin VMF uygulandıktan 24 saat sonra inverted mikroskop görüntüsü, D) A375 melanom hücrelerinin VMF uygulandıktan 24 saat sonra inverted mikroskop görüntüsü (Bar: A ve C: 200 µm, B ve D: 100 µm).

4.4. A375 Melanom Hücrelerinde İnhibitör Öncesi ve Sonrası Hücre Asiditesinin Belirlenmesi

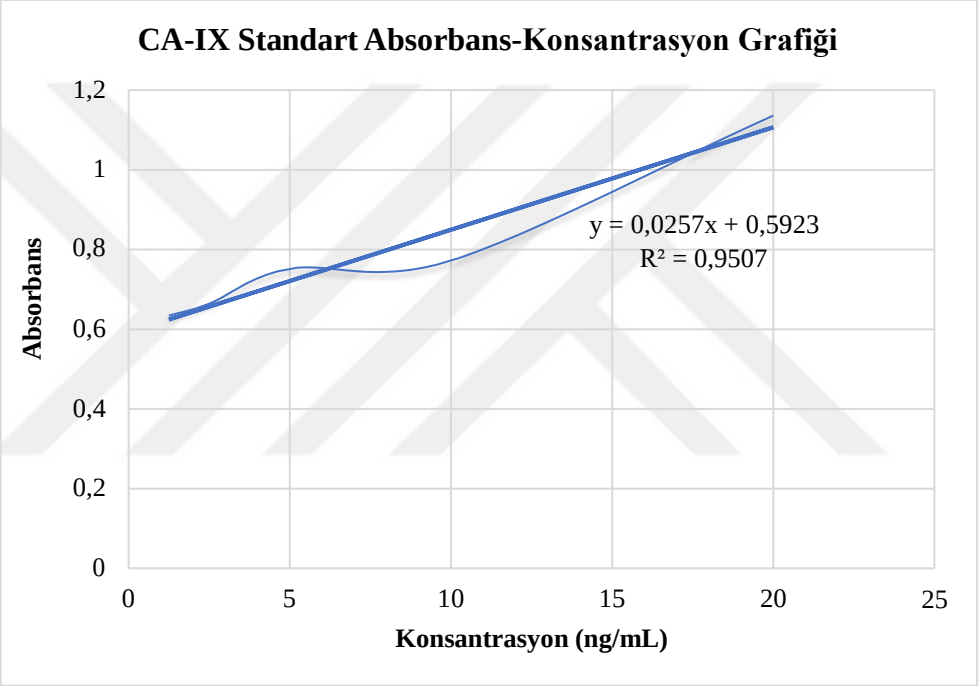
AZA ve VMF inhibitörlerinin melanom hücrelerinin asidifikasyonuna olan etkisini belirlemek amacıyla; normoksik ortamda inhibitörlü ve inhibitörsüz olmak üzere 24 saat inkübasyona bırakılan A375 melanom hücre hatlarının besiyerlerinin absorbansları Biotek Epoch Reader Spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüş ve pH değerleri fenol-absorbans standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. A375 melanom hücrelerinde inhibitör uygulaması öncesi ve sonrası pH değerlerinin gösterimi.

A375 Melanom Hücresi	İnhibitörsüz	AZA	VMF
Absorbans (OD)	0,059	0,063	0,093
pH	6,21	6,25	6,45

4.5. A375 Melanom Hücrelerinde AZA Uygulamasının CA-IX Düzeyi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

A375 melanom hücrelerinde AZA inhibitörünün CA-IX düzeyleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla ELISA testi yapılmıştır. CA-IX ELISA testi için kullanılan kit protokolüne uygun şekilde yapılan ölçümde standartların konsantrasyona bağlı absorbans grafiği çizilmiştir (Şekil 4.13). Bu standart grafiğin denklemine göre hücre lizatının üçlü tekrar ile ölçülen absorbans değerlerinden konsantrasyon verilerine ulaşılmış ve değerlendirme yapılmıştır.



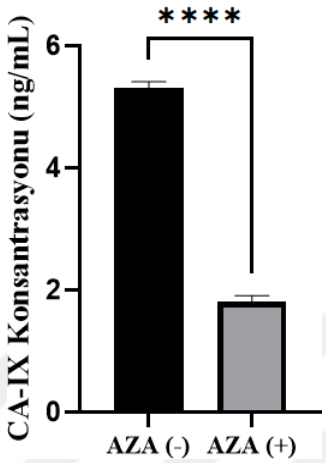
Şekil 4.13. CA-IX standart absorbans-konsantrasyon grafiği.

A375 melanom hücrelerinin AZA uygulanmamış ve uygulanmış durumda absorbans ve CA-IX konsantrasyon değerleri Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11. AZA uygulanmamış ve uygulanmış melanom hücrelerinde absorbans ve CA-IX konsantrasyon değerleri.

İnhibitör Durumu	Absorbans (OD)	Konsantrasyon (ng/mL)
AZA (-)	0,729	**5,31**
AZA (+)	0,639	**1,81**

A375 melanom hücrelerinde CA-IX düzeyi AZA uygulanmamış grupta 5,31 ng/mL iken, AZA uygulanmış grupta 1,81 ng/mL olarak belirlenmiştir. İnhibitör uygulamasının CA-IX düzeyine etkisi Şekil 4.14'te gösterilmiştir. AZA uygulanmış A375 melanom hücrelerinde CA-IX düzeyi düşmüştür ($p<0.0001$).



Şekil 4.14. AZA uygulanmamış ve uygulanmış A375 melanom hücrelerinde CA-IX düzeyinin gösterimi.

4.6. A375 Melanom Hücrelerinde HIF1A Geninin Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi

A375 melanom hücrelerinde hipoksik ortam oluşturulduktan sonra ortamın hipoksisinin doğrulaması için qRT-PCR tekniği kullanılmıştır. HIF1A geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12. HIF1A geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri.

Gen	Ortalama Ct		Delta Ct		2^-Delta Ct		P değeri	Kat değişimi
Durum	N	H	N	H	N	H		
HIF1A	32.49	32.29	5.86	6.12	0.017217	0.014411	0.192162	0.84
GAPDH	26.63	26.18	0.00	0.00	1.000000	1.000000	N/A	1

*Normoksi: N, Hipoksi: H

Normoksik ve hipoksik ortamlarda HIF1A gen ekspresyon düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.7. A375 Melanom Hücrelerinde CA9 Geninin Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi

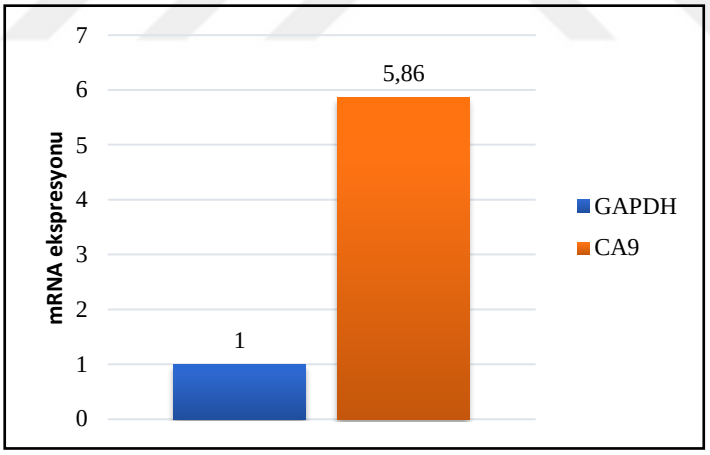
A375 melanom hücrelerinde normoksik ve hipoksik ortamlarda CA9 geninin ekspresyon düzeyleri arasındaki farkı görebilmek amacıyla qRT-PCR tekniği kullanıldı. CA9 geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri Tablo 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4.13. CA9 geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri.

Gen	Ortalama Ct		Delta Ct		2^-Delta Ct		P değeri	Kat değişimi
Durum	N	H	N	H	N	H		
CA9	32.41	29.41	5.78	3.23	0.018199	0.106579	0.002599	5.86
GAPDH	26.63	26.18	0.00	0.00	1.000000	1.000000	N/A	1

*Normoksi: N, Hipoksi: H

Hipoksik ortamda CA9 gen ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. CA9 gen ekspresyon düzeylerinin kat artışının gösterimi.

A375 melanom hücrelerinde hipoksik ortamda HIF1A ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmezken, CA9 ekspresyonu anlamlı şekilde artmıştır.

4.8. A375 Melanom Hücrelerinde AZA Uygulamasının Gen Düzeylerine Etkisi

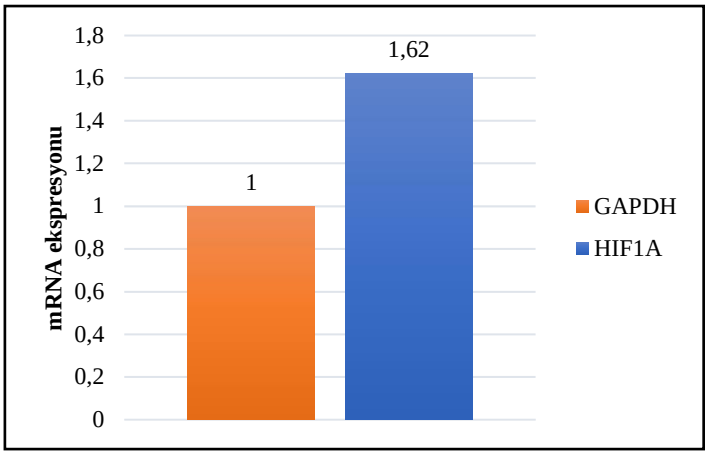
A375 melanom hücrelerinde normoksik ortamda AZA uygulaması yapılmadan önce ve sonra HIF1A geninin ekspresyon düzeyleri arasındaki farkı görebilmek amacıyla qRT-PCR tekniği kullanılmıştır. HIF1A geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri Tablo 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.14. HIF1A geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri.

Gen	Ortalama Ct		Delta Ct		2^-Delta Ct		P değeri	Kat değişimi
Durum	-	AZA	-	AZA	-	AZA		
HIF1A	32.49	32.39	5.86	5.16	0.017217	0.027905	0.035516	1.62
GAPDH	26.63	27.22	0.00	0.00	1.000000	1.000000	N/A	1.00

*(-): İnhibitörsüz, (AZA): AZA uygulaması yapılmış

Normoksik ortamda AZA uygulamasının ardından HIF1A gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.16). Hipoksi yolağında bulunan HIF-1α proteini CA-IX proteininin ekspresyonunun artmasına sebep olurken, bu sonuca göre CA-IX proteininin inhibitörü olan AZA'nın kullanımının HIF1A geninin ekspresyon düzeyini arttırdığı görülmektedir.



Şekil 4.16. HIF1A gen ekspresyon düzeylerinin kat artışının gösterimi.

A375 melanom hücrelerinde normoksik ortamda AZA uygulaması yapılmadan önce ve sonra CA9 geninin ekspresyon düzeyleri arasındaki farkı görebilmek amacıyla

qRT-PCR tekniği kullanılmıştır. CA9 geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri Tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.15. CA9 geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri.

Gen	Ortalama Ct		Delta Ct		2^-Delta Ct		P değeri	Kat değişimi
Durum	-	AZA	-	AZA	-	AZA		
CA9	32.41	33.74	5.78	6.52	0.018199	0.010896	0.413632	0.60
GAPDH	26.63	27.22	0.00	0.00	1.000000	1.000000	N/A	1.00

*(-): İnhibitörsüz, (AZA): AZA uygulaması yapılmış

Normoksik ortamda AZA uygulamasının ardından CA9 gen ekspresyonunda azalış görülmüştür ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Hipoksik ortamda A375 melanom hücrelerinde AZA uygulaması yapılmadan önce ve sonra HIF1A geninin ekspresyon düzeyleri arasındaki farkı görebilmek amacıyla qRT-PCR tekniği kullanılmıştır. HIF1A geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri Tablo 4.16'te verilmiştir.

Tablo 4.16. HIF1A geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri.

Gen	Ortalama Ct		Delta Ct		2^-Delta Ct		P değeri	Kat değişimi
Durum	-	AZA	-	AZA	-	AZA		
HIF1A	32.07	32.29	5.81	6.12	0.017866	0.014411	0.436258	0.81
GAPDH	26.27	26.18	0.00	0.00	1.000000	1.000000	N/A	1.00

*(-): İnhibitörsüz, (AZA): AZA uygulaması yapılmış

Hipoksik ortamda AZA uygulamasının ardından HIF1A gen ekspresyonunda azalış gözlenmiştir ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

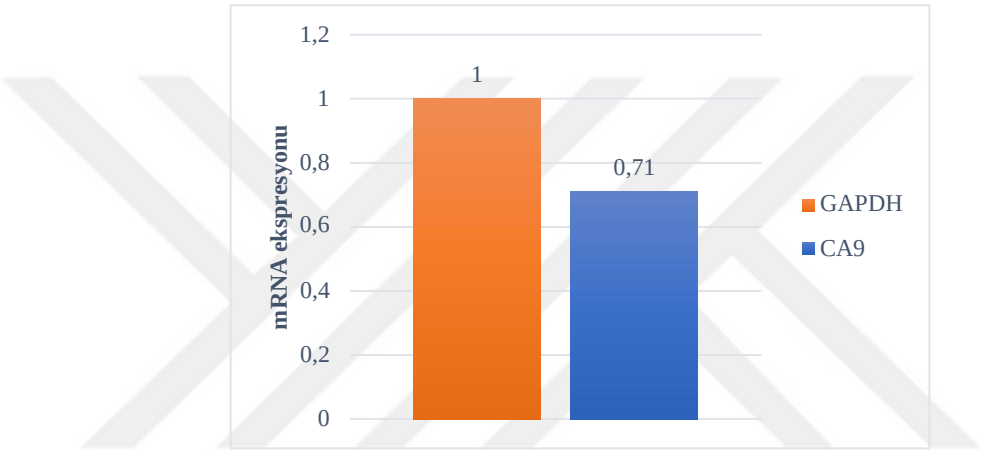
A375 melanom hücrelerinde hipoksik ortamda AZA uygulaması yapılmadan önce ve sonra CA9 geninin ekspresyon düzeyleri arasındaki farkı görebilmek amacıyla qRT-PCR tekniği kullanılmıştır. CA9 geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri Tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.17. CA9 geninin ortalama Ct, Delta Ct ve 2^-Delta Ct değerleri.

Gen	Ortalama Ct		Delta Ct		2^-Delta Ct		P değeri	Kat değişimi
Durum	-	AZA	-	AZA	-	AZA		
CA9	29.01	29.41	2.74	3.23	0.149685	0.106579	0.009519	0.71
GAPDH	26.27	26.18	0.00	0.00	1.000000	1.000000	N/A	1.00

*(-): İnhibitörsüz, (AZA): AZA uygulaması yapılmış

Hipoksik ortamda AZA uygulamasının ardından CA9 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalış göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. CA9 gen ekspresyon düzeylerinin kat artışının gösterimi.

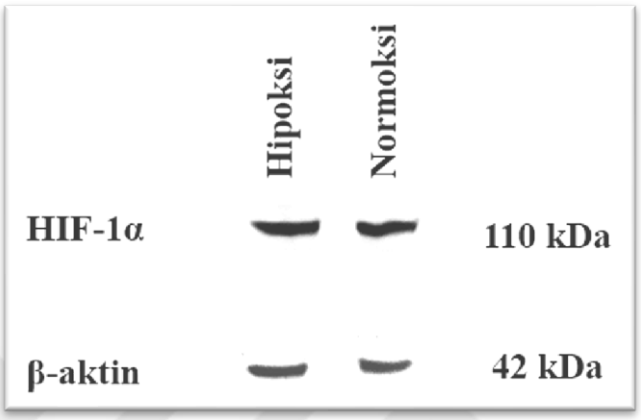
A375 melanom hücrelerinde normoksik ortamda AZA uygulamasını takiben HIF1A ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlenirken, CA9 ekspresyonundaki azalış anlamlı değildir. Hipoksik ortamda ise AZA uygulamasını takiben HIF1A gen ekspresyonunda azalış istatistiksel olarak anlamlı değilken CA9 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalış göstermiştir

4.9. Western Blot Analizinin Bulguları

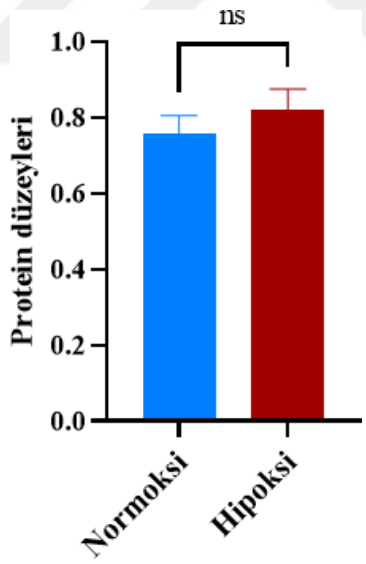
A375 melanom hücrelerinde hipoksik ortamı kontrol etmek amacıyla HIF-1α, B-Raf protein yolağını incelemek amacıyla ise B-Raf, p-B-Raf, ERK ve p-ERK proteinlerine Western Blot analizi yapılmıştır.

4.9.1. Western Blot Analizinin HIF-1α Bulguları

A375 melanom hücrelerinde normoksik ve hipoksik ortamlarda HIF-1α protein düzeyleri incelenmiştir. Normoksik ve hipoksik ortamlarda Western Blot analizinin bant görüntüleri Şekil 4.18'de verilmiştir. Normoksik ve hipoksik ortamlarda HIF-1α protein düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (p=0.2081) (Şekil 4.19).



Şekil 4.18. Normoksik ve hipoksik ortamlarda Western Blot analizi bant görüntüleri.

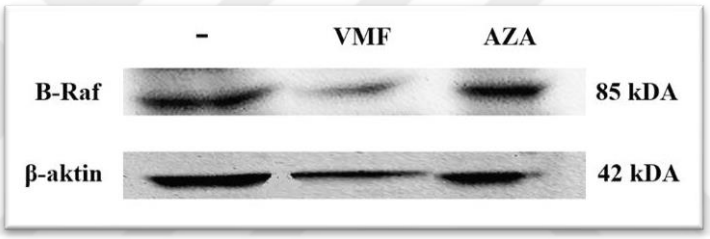


HIF-1α Normalize edilen değerler	Hipoksi	Normoksi
	0,8198	0,7564

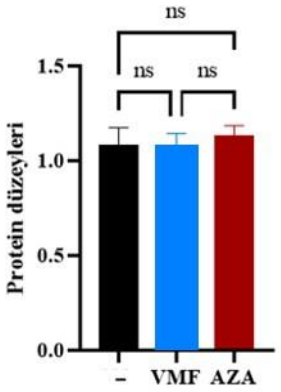
Şekil 4.19. Normoksik ve hipoksik ortamlarda HIF-1α protein düzeylerinin gösterimi. (ns: not significant, istatistiksel olarak anlamlı değil).

4.9.2. Western Blot Analizinin B-Raf ve p-B-Raf Bulguları

A375 melanom hücrelerinde B-Raf protein düzeyleri inhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı olacak şekilde üç farklı grup için incelenmiştir. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizinin bant görüntüleri Şekil 4.20'de verilmiştir. VMF uygulanan melanom hücrelerinde inhibitör uygulanmayan hücrelere göre istatistiksel olarak anlamsız şekilde B-Raf protein düzeyinde azalış görülürken (p=0.9654), AZA uygulanan melanom hücrelerinde inhibitör uygulanmayan hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde B-Raf protein düzeyinde artış gözlemlenmiştir (p=0.7121). Ayrıca, VMF uygulanan melanom hücrelerinde AZA uygulanan melanom hücrelerine kıyasla anlamlı olmayan şekilde B-Raf protein düzeyinde artış vardır (p=0.5692) (Şekil 4.21).



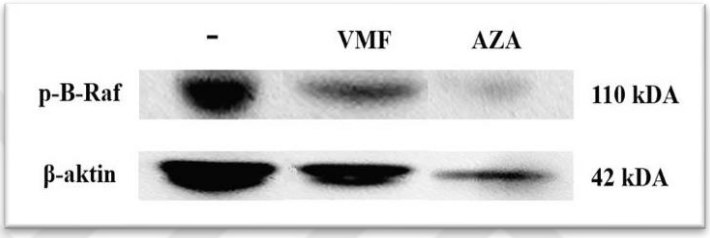
Şekil 4.20. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizi bant görüntüleri.



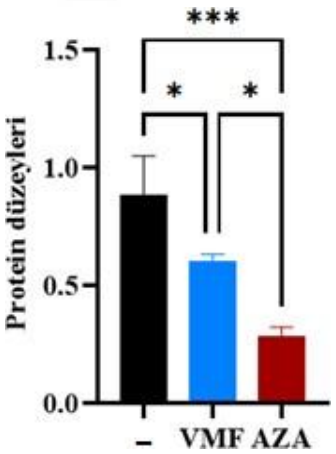
B-Raf Normalize edilen değerler	İnhibitörsüz	VMF	AZA
	1,0858	1,0707	1,133

Şekil 4.21. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde B-Raf protein düzeylerinin karşılaştırılması.
(ns: not significant, istatistiksel olarak anlamlı değil).

A375 melanom hücrelerinde p-B-Raf protein düzeyleri inhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı olacak şekilde üç farklı grup için incelenmiştir. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizinin bant görüntüleri Şekil 4.22'de verilmiştir. VMF ve AZA uygulanan melanom hücrelerinde inhibitör uygulanmayan hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde p-B-Raf protein düzeyinde azalış gözlemlenmiştir (VMF için p=0.032, AZA için p p<0.001). Ayrıca, AZA uygulanan melanom hücrelerinde VMF uygulanan melanom hücrelerine kıyasla anlamlı şekilde p-B-Raf protein düzeyinde azalış söz konusudur (p=0.018) (Şekil 4.23).



Şekil 4.22. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizi bant görüntüleri.

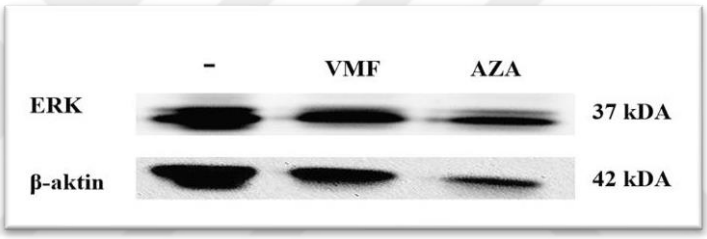


p-B-Raf Normalize edilen değerler	İnhibitörsüz	VMF	AZA
	0,8827	0,6019	0,2831

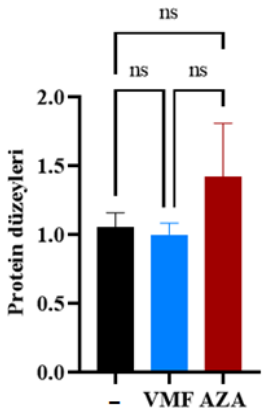
Şekil 4.23. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde p-B-Raf protein düzeylerinin karşılaştırılması.

4.9.3. Western Blot Analizinin ERK ve p-ERK Bulguları

A375 melanom hücrelerinde ERK protein düzeyleri inhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı olacak şekilde üç farklı grup için incelenmiştir. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizinin bant görüntüleri Şekil 4.24'te verilmiştir. VMF uygulanan melanom hücrelerinde inhibitör uygulanmayan hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde ERK protein düzeyinde azalış görülürken (p=0.954), AZA uygulanan melanom hücrelerinde de inhibitör uygulanmayan hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde ERK protein düzeyinde artış gözlemlenmiştir (p=0.227). Ayrıca, VMF uygulanan melanom hücrelerinde AZA uygulanan melanom hücrelerine kıyasla anlamlı olmayan şekilde ERK protein düzeyinde azalış vardır (p=0.157) (Şekil 4.25).



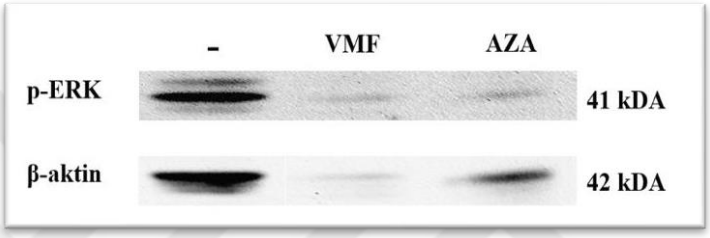
Şekil 4.24. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizi bant görüntüleri.



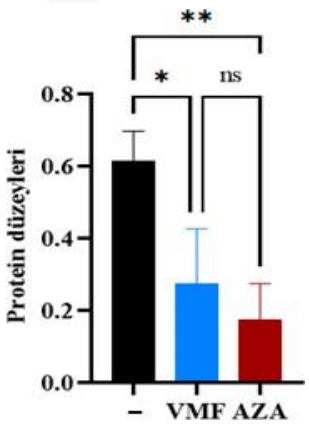
ERK Normalize edilen değerler	İnhibitörsüz	VMF	AZA
	1,0562	0,9994	1,4184

Şekil 4.25. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde ERK protein düzeylerinin karşılaştırılması.
(ns: not significant, istatistiksel olarak anlamlı değil).

A375 melanom hücrelerinde p-ERK protein düzeyleri inhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı olacak şekilde üç farklı grup için incelenmiştir. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizinin bant görüntüleri Şekil 4.26'da verilmiştir. VMF ve AZA uygulanan melanom hücrelerinde inhibitör uygulanmayan hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde p-ERK protein düzeyinde azalış gözlemlenmiştir (VMF için p=0.026, AZA için p=0.008). Ayrıca, AZA uygulanan melanom hücrelerinde VMF uygulanan melanom hücrelerine kıyasla anlamlı olmayan şekilde ERK protein düzeyinde azalış vardır (p=0.581) (Şekil 4.27).



Şekil 4.26. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde Western Blot analizi bant görüntüleri.

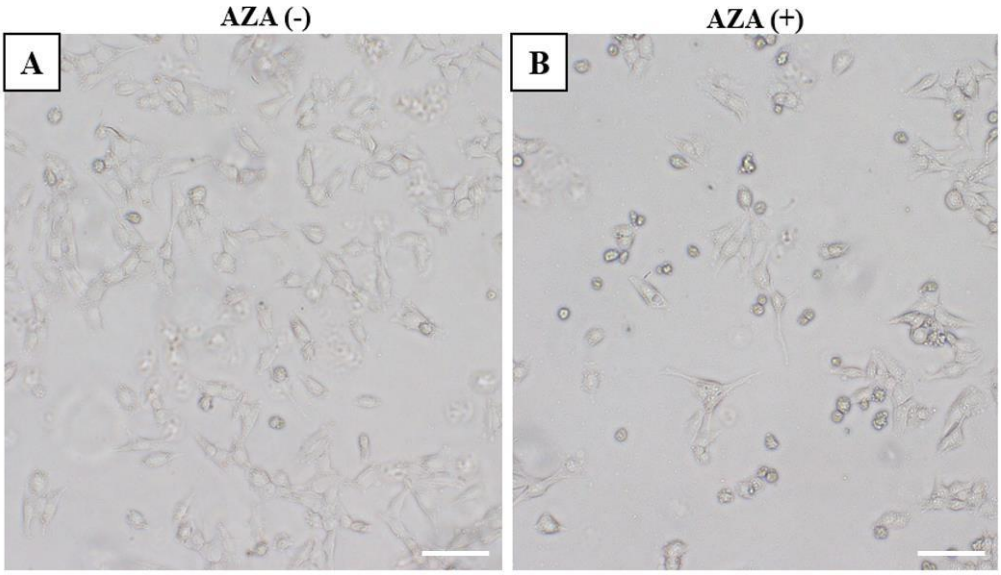


p-ERK Normalize edilen değerler	İnhibitörsüz	VMF	AZA
	0,6136	0,2740	0,1762

Şekil 4.27. İnhibitör uygulanmamış, VMF'li ve AZA'lı A375 melanom hücrelerinde p-ERK protein düzeylerinin karşılaştırılması.
(ns: not significant, istatistiksel olarak anlamlı değil).

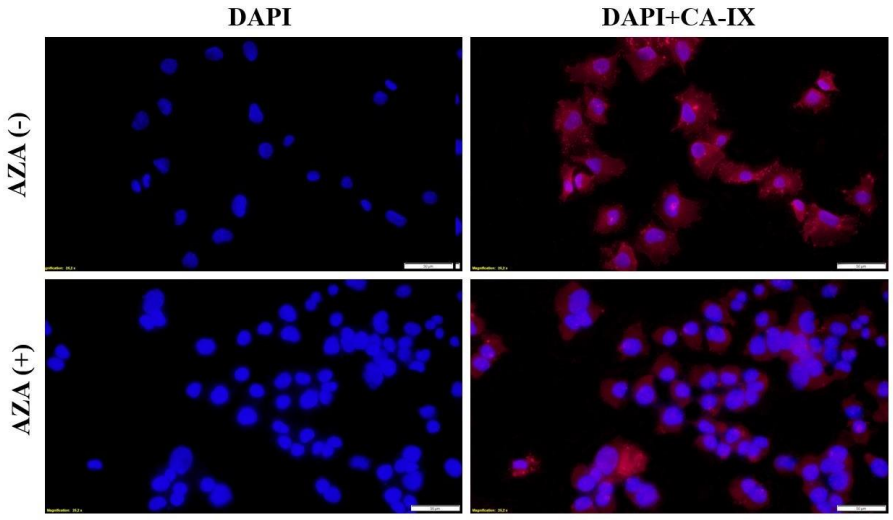
4.10. İmmünofloresan Boyama Bulguları

A375 melanom hücrelerinde AZA inhibitörü uygulanmış ve uygulanmamış gruplarda CA-IX, HIF-1α, B-Raf ve ERK proteinleri immünofloresan yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Melanom hücrelerinde hem bu proteinlerini yerleşimlerini göstermek hem de AZA inhibitörünün bu proteinler üzerine olan etkilerini görmek amaçlanmıştır. İmmünboyama yapılmadan önce hücreler inverted mikroskopta gözlemlenmiş ve 10,7 μM AZA uygulanan hücrelerde Şekil 4.28'te gösterildiği şekilde inhibisyon etki gözlemlenmiştir.



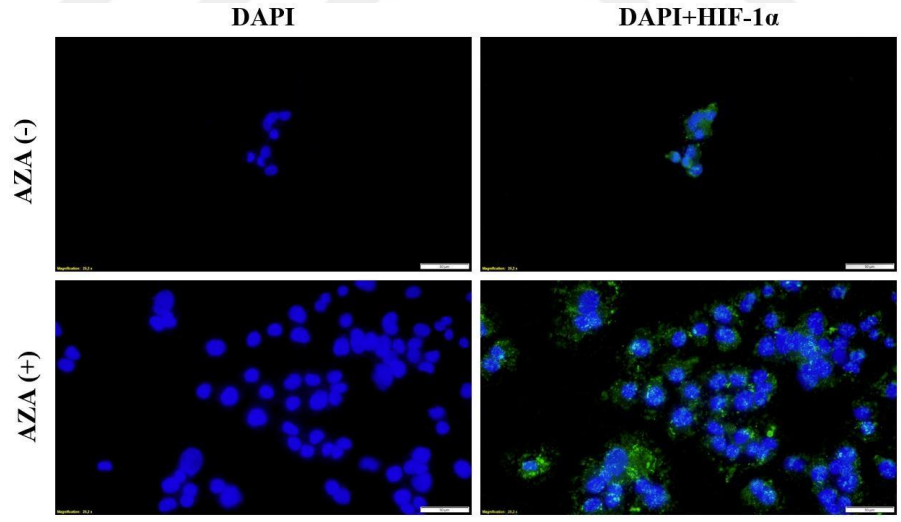
Şekil 4.28. İmmünboyama öncesinde hücrelerin inverted mikroskopta görüntüleri.
A) AZA uygulanmamış A375 melanom hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü
B) AZA uygulanmış A375 melanom hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü
(Bar: A-B: 100 μm).

AZA inhibitörü uygulanmamış ve uygulanmış A375 melanom hücrelerinin CA-IX ekspresyonları Şekil 4.29'da gösterilmiştir. AZA uygulanan melanom hücrelerinin CA-IX immünpozitifliğinde azalma görülmüştür.



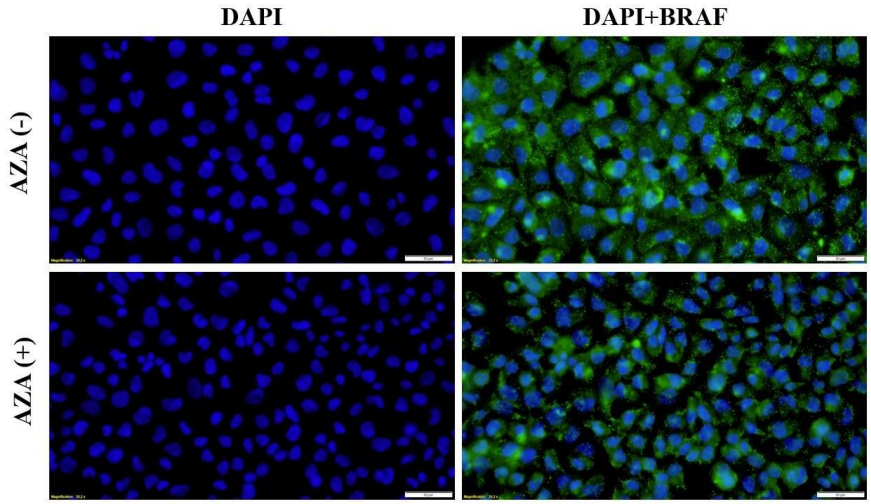
Şekil 4.29. A375 melanom hücrelerinde CA-IX protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi (Bar: 50 µm).

AZA inhibitörü uygulanmamış ve uygulanmış A375 melanom hücrelerinin HIF-1α ekspresyonları Şekil 4.30'da gösterilmiştir. AZA uygulanan melanom hücrelerinin HIF-1α immünpozitifliğinde değişim görülmemiştir.



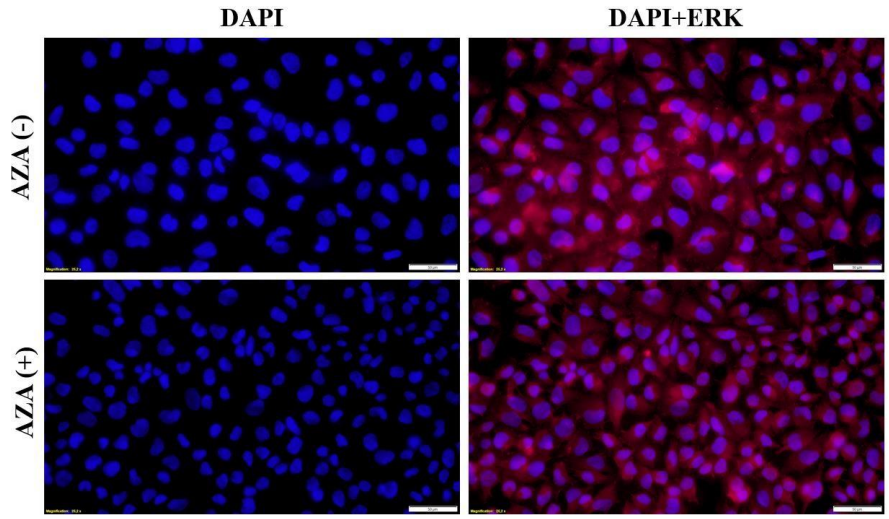
Şekil 4.30. A375 melanom hücrelerinde HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi (Bar: 50 µm).

AZA inhibitörü uygulanmamış ve uygulanmış A375 melanom hücrelerinin B-Raf ekspresyonları Şekil 4.31'de gösterilmiştir. AZA uygulanan melanom hücrelerinin B-Raf immünpozitifliğinde değişim görülmemiştir.



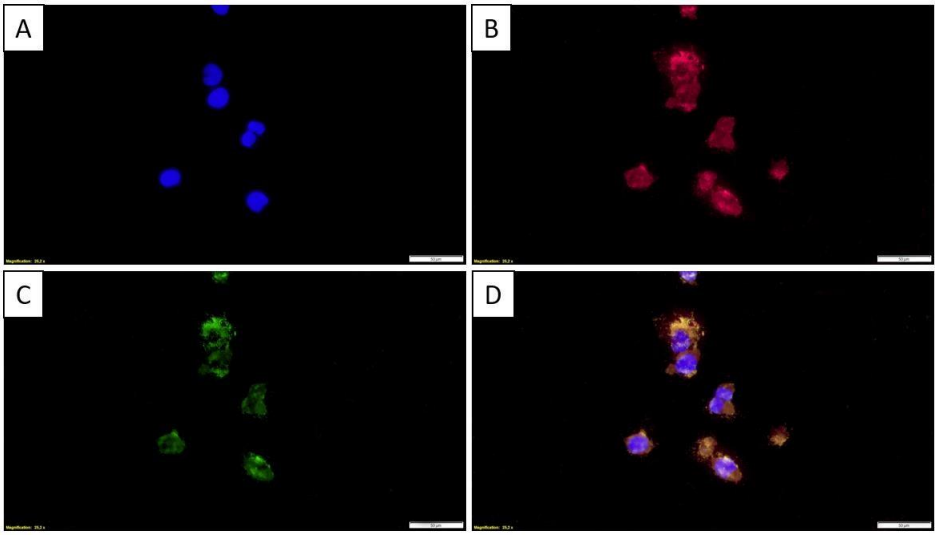
Şekil 4.31. A375 melanom hücrelerinde B-Raf protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi (Bar: 50 μm).

AZA inhibitörü uygulanmamış ve uygulanmış A375 melanom hücrelerinin ERK ekspresyonları Şekil 4.32'de gösterilmiştir. AZA uygulanan melanom hücrelerinin ERK immünpozitifliğinde değişim görülmemiştir.



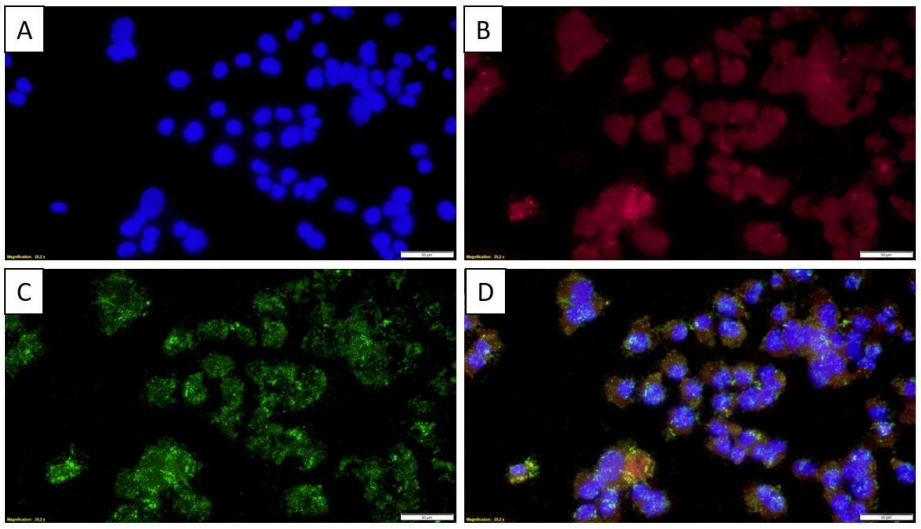
Şekil 4.32. A375 melanom hücrelerinde ERK protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi (Bar: 50 μm).

AZA inhibitörü uygulanmamış A375 melanom hücrelerinin CA-IX/HIF-1α ekspresyonları Şekil 4.33'te gösterilmiştir.



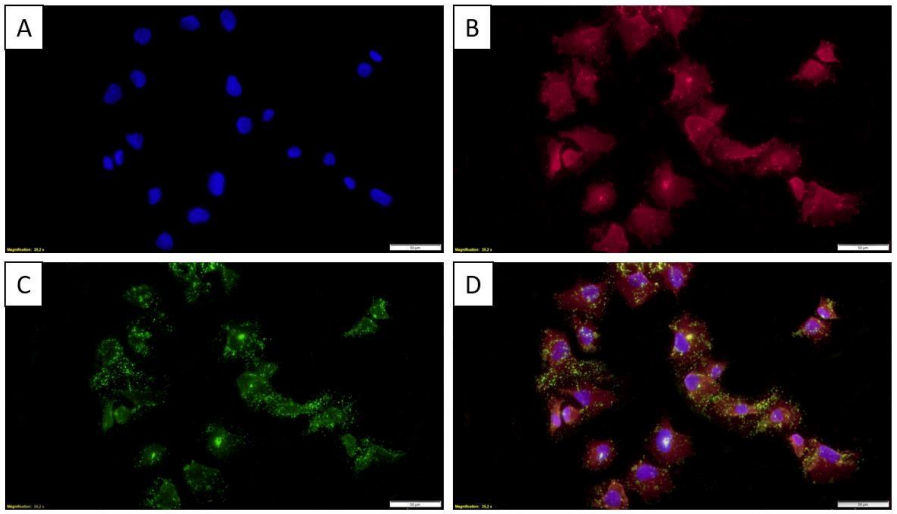
Şekil 4.33. A375 melanom hücrelerinde CA-IX/ HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi.
A) A375 melanom hücrelerinde DAPI boyaması B) CA-IX boyaması (Texas Red®) C) HIF-1α boyaması (Alexa Fluor® 488) D) DAPI/CA-IX/HIF-1α boyaması (Bar: 50 µm).

AZA inhibitörü uygulanmış A375 melanom hücrelerinin CA-IX/HIF-1α ekspresyonları Şekil 4.34'te gösterilmiştir.



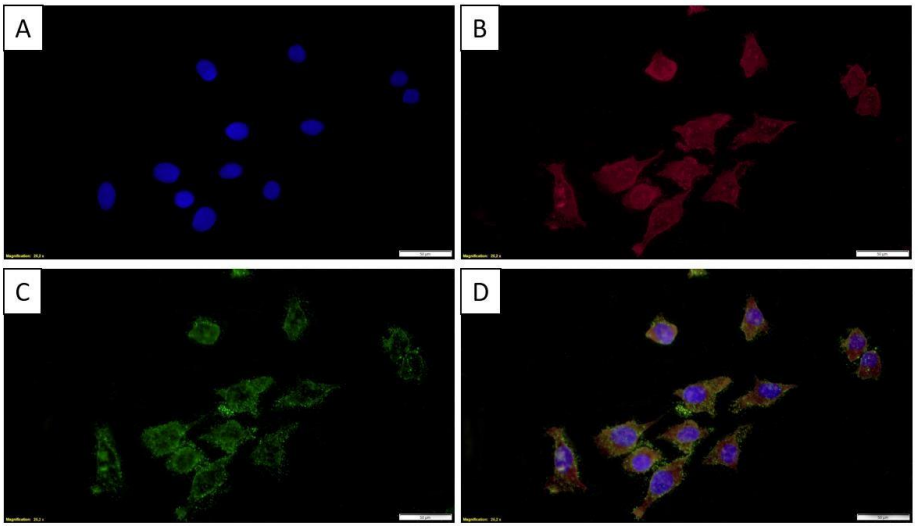
Şekil 4.34. A375 melanom hücrelerinde CA-IX/ HIF-1α protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi.
A) A375 melanom hücrelerinde DAPI boyaması B) CA-IX boyaması (Texas Red®) C) HIF-1α boyaması (Alexa Fluor® 488) D) DAPI/CA-IX/HIF-1α boyaması (Bar: 50 µm).

AZA inhibitörü uygulanmamış A375 melanom hücrelerinin CA-IX/B-Raf ekspresyonları Şekil 4.35'te gösterilmiştir.



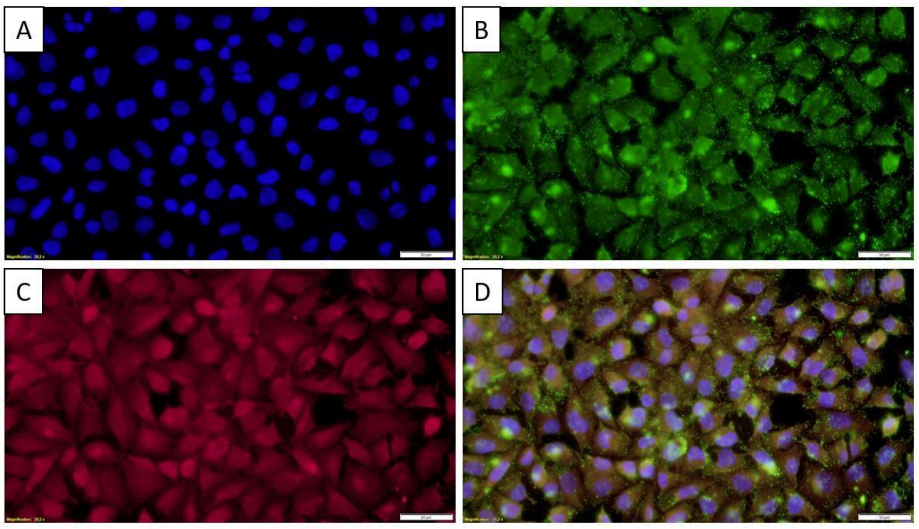
Şekil 4.35. A375 melanom hücrelerinde CA-IX/B-Raf protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi.
A) A375 melanom hücrelerinde DAPI boyaması B) CA-IX boyaması (Texas Red®) C) B-Raf boyaması (Alexa Fluor® 488) D) DAPI/CA-IX/B-Raf boyaması (Bar: 50 µm).

AZA inhibitörü uygulanmış A375 melanom hücrelerinin CA-IX/B-Raf ekspresyonları Şekil 4.36'da gösterilmiştir.



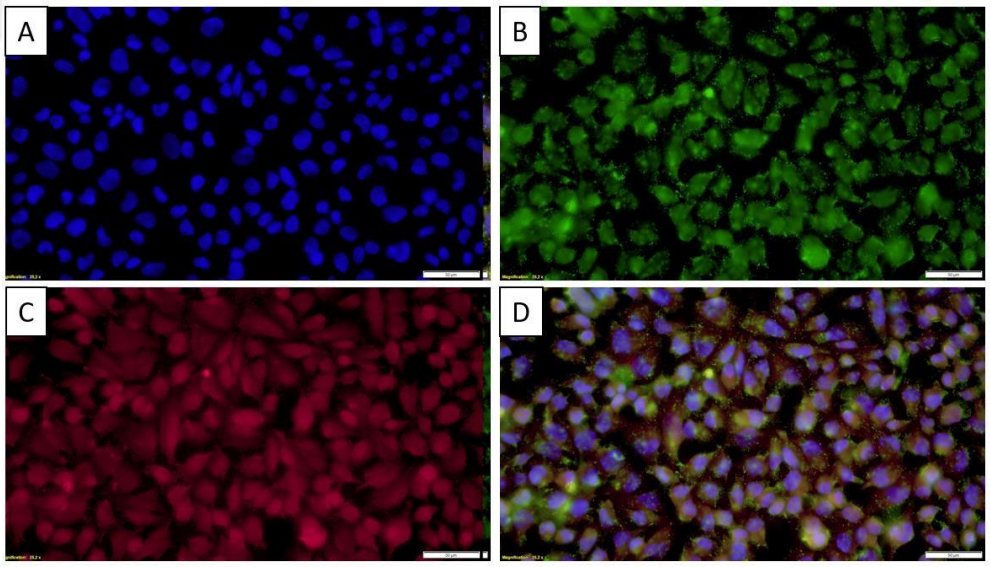
Şekil 4.36. A375 melanom hücrelerinde CA-IX/B-Raf protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi.
A) A375 melanom hücrelerinde DAPI boyaması B) CA-IX boyaması (Texas Red®) C) B-Raf boyaması (Alexa Fluor® 488) D) DAPI/CA-IX/B-Raf boyaması (Bar: 50 µm).

AZA inhibitörü uygulanmamış A375 melanom hücrelerinin B-Raf-ERK ekspresyonları Şekil 4.37'de gösterilmiştir.



Şekil 4.37. A375 melanom hücrelerinde B-Raf/ERK protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi.
A) A375 melanom hücrelerinde DAPI boyaması B) B-Raf boyaması (Texas Red®) C) ERK boyaması (Alexa Fluor® 488) D) DAPI/B-Raf/ERK boyaması (Bar: 50 µm).

AZA inhibitörü uygulanmış A375 melanom hücrelerinin B-Raf-ERK ekspresyonları Şekil 4.38'de gösterilmiştir.



Şekil 4.38. A375 melanom hücrelerinde B-Raf/ERK protein ekspresyonunun immünofloresan ile gösterimi.
A) A375 melanom hücrelerinde DAPI boyaması B) B-Raf boyaması (Texas Red®) C) ERK boyaması (Alexa Fluor® 488) D) DAPI/B-Raf/ERK boyaması (Bar: 50 µm).

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, CA-IX inhibisyonunun MAPK yolağında yer alan ve melanomda anahtar rolü olan B-Raf proteini üzerine etkisi araştırılmıştır. Melanomda en sık görülen genetik değişiklikler MAPK sinyal yolağında bulunmaktadır (111). Bu yolakta bulunan B-Raf proteinini kodlayan gen olan BRAF'a ait onkojenik mutasyonlar, melanomların yaklaşık % 40'ında görülmektedir. En yaygın BRAF mutasyonu ise, melanomda tanımlanan BRAF mutasyonlarının yaklaşık % 75-90'ını oluşturan V600E'dir (112). Melanom tedavisinde MAPK yolağının farmakolojik inhibisyonu oldukça dikkat çekmiş ve BRAFV600E'nin aktif mutant formunu inhibe eden spesifik kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir (111). Bu inhibitörlerden Vemurafenib, BRAFV600E mutasyonu olan melanom hücrelerinde FDA tarafından onaylanan ilk B-Raf inhibitörü olmuştur (5). Melanom hastalarının B-Raf inhibitörleriyle tedavisinde sınırlayıcı faktör; bu hastalarda görülen direnç gelişimidir. Bu sebeple yeni B-Raf inhibitörlerinin arayışı devam etmektedir (113). Son yıllarda CA inhibitörlerinin antitümör ajanlar olarak klinikte uygulamaları söz konusudur (48). CA-IX enzimi kanser tedavisinde önemli bir klinik potansiyele sahip olduğu için bu enzimin inhibisyonu, tümörlerin terapötik hedeflemesi için cazip bir seçenektir (114). Bu bilgiler ışığında "CA inhibisyonunun B-Raf protein yolağı üzerine etkisi vardır" hipotezini test etmek hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasında, melanom hücrelerine CA-IX inhibitörü uygulayarak önemli bir kanser yolağı olan MAPK yolağındaki B-Raf proteini üzerine olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Literatürde, tümör ilişkili CA-IX enziminin inhibisyonunun önemli bir kinaz fonksiyonu olan B-Raf proteini üzerine etkisini gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Bu haliyle söz konusu bu çalışma karsinogenez sürecinde tümör mikroçevresinin kanser etkileşim mekanizmalarının aydınlatılması açısından özgündür.

Çalışmanın ilk aşamasında, normoksik ve hipoksik ortamlarda A375 melanom hücrelerinin ortam asiditesi, absorbansa bağlı pH grafiği kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmanın merkezini oluşturan CA enziminin en önemli fonksiyonu kanser hücrelerinde asidifikasyona sebep olmasıdır. Bu çalışmada da CA-IX enziminin inhibitörü olan AZA uygulaması sonrasında ortam asiditesinin azaldığı tespit edilmiştir. AZA inhibitörü uygulamasının A375 melanom hücrelerinde CA-IX

düzeyini düşürdüğü ELISA testi ile doğrulanmıştır. BRAFV600E mutasyonuna spesifik bir inhibitör olan VMF'nin uygulandığı A375 melanom hücrelerinin asiditesinin de belirgin bir oranda düştüğü gözlemlenmiştir.

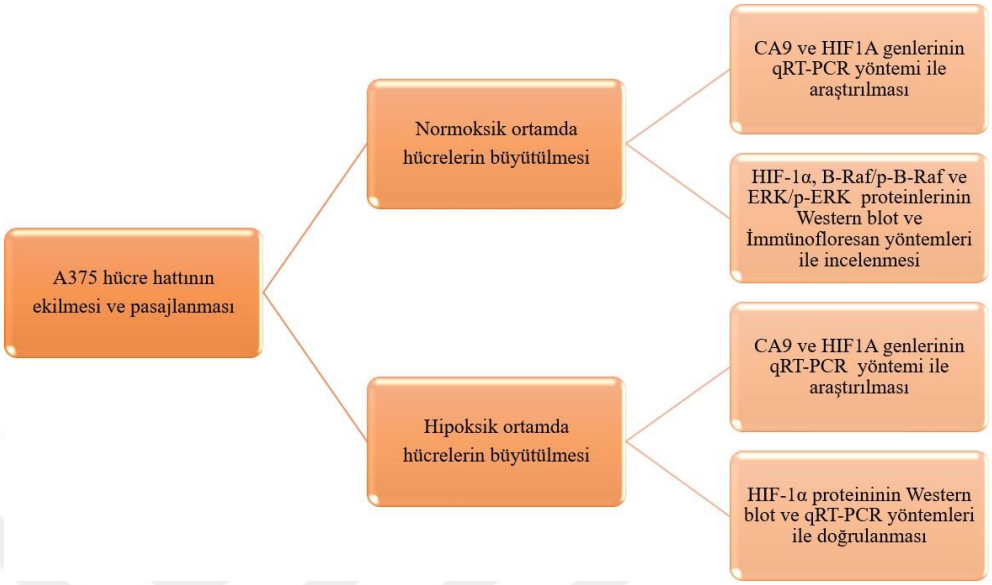
Çalışmanın ikinci aşamasında, A375 melanom hücrelerine uygulanacak olan AZA ve VMF inhibitörlerinin uygun zaman ve dozlarını belirlemek amacıyla WST-1 testi yapılmıştır. Bu optimizasyona göre, normoksik ortamda AZA ve VMF için uygun dozlar 24. saatte tespit edilmiştir.

Çalışmanın gen ekspresyon analizleri kapsamında, A375 melanom hücreleri normoksik/hipoksik ve inhibitörsüz/inhibitörlü (AZA) olmak üzere gruplara ayrılmış ve CA9 ve HIF1A gen ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; normoksik ve hipoksik ortamlarda HIF1A gen ekspresyon düzeyleri arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. Ancak, hipoksik ortamda CA9 gen ekspresyon düzeyleri anlamlı şekilde artmıştır. Normoksik ortamda AZA inhibitörü uygulamasının ardından HIF1A gen ekspresyonu anlamlı şekilde artış gösterirken, CA9 gen ekspresyonunda anlamlı olmayan azalış görülmüştür. Hipoksik ortamda ise AZA uygulamasının ardından HIF1A gen ekspresyonu anlamlı olmayan şekilde azalırken, CA9 gen ekspresyonu anlamlı şekilde azalmıştır.

Çalışmanın immünofloresan boyama aşamasında, AZA uygulanmış ve uygulanmamış A375 melanom hücrelerinde HIF-1α, CA-IX, B-Raf ve ERK proteinlerinin lokalizasyonları ve ekspresyonları incelenmiştir. AZA inhibitörü uygulaması sonrasında HIF-1α protein ekspresyonunda değişim gözlenmezken, CA-IX protein ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Daha sonra normoksik ve hipoksik ortamlarda HIF-1α protein düzeylerini gösterebilmek için Western Blot analizi yapılmıştır.

Bu tez çalışmasının son aşamasında ise, CA-IX inhibisyonunun MAPK yolağındaki B-Raf proteini üzerine olan etkisini göstermek amacıyla B-Raf proteininin total/ fosforile formları ile ERK proteinin total/fosforile formları Western Blot analizi ile değerlendirilmiştir. CA-IX inhibisyonunun total B-Raf ve total ERK proteinleri üzerinde anlamlı düzeyde etkisi görülmemiştir. Ancak AZA ile CA-IX inhibisyonunun pozitif kontrole kıyasla daha anlamlı şekilde p-B-Raf ve p-ERK protein düzeyinde

azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Tez çalışmasının deneysel akış planı şekil 5.1'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. Deneysel akış planı.

Bu tez çalışmasında kullanılan A375 melanom hücre hattının seçilmesinin sebebi; melanom tedavisinde tümör ilişkili CA-IX enziminin potansiyel bir belirteç olduğunun düşünülmesidir (115). Bu bağlamda, A375 melanom hücre hattında bulunan BRAFV600E mutasyonuna spesifik bir inhibitör olan VMF ve CA-IX proteini üzerinde inhibisyon etkisi olan klasik CA inhibitörü olan AZA kullanılmıştır.

Bu çalışmada, A375 melanom hücrelerine WST-1 testi ile yapılan optimizasyon sonrası AZA için 10,7 µM ve VMF için 4,9 µM inhibitör dozu normoksik ortamda belirlenmiştir. Pucciarelli ve ark.larının yaptıkları çalışmada normoksik ve hipoksik ortamlarda, A375 melanom hücreleri için uygulanacak optimize VMF dozu 1 µM olarak bulunmuştur (116). Supuran ve ark.larının yaptıkları çalışmalarda ise CA inhibitörlerinin *in vitro* inhibisyon doz aralığını, lösemi, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, melanom, kolon, CNS, böbrek, prostat ve meme kanseri hücre hatları için 10-35 µM arasında değişmektedir (117).

Tez çalışmasının temelini oluşturan CA-IX enzimi, kanser ile ilişkisi ve metabolizmanın düzenlenmesindeki rolü nedeniyle ilgi çekici bulunmaktadır. Bu

enzimin aktivitesinin inhibisyonu, asit akışını engellemekte ve hücre içi asiditeyi arttırmaktadır (118). CA inhibitörü olan AZA ile inhibisyonun A375 melanom hücrelerinin asidifikasyonuna olan etkisini belirlemek amacıyla; normoksik ortamda hücreler inhibitörlü ve inhibitörsüz olmak üzere 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası inhibitör uygulanmamış hücrelerin besiyerinin pHe'sı 6,21 iken, AZA uygulanmış hücrelerin besiyerinin pHe'sı 6,25 olarak belirlenmiştir. A375 melanom hücrelerine AZA uygulamasının pHe'yi alkalileştirdiği bu çalışmada gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmaya uyumlu olarak, Chafe ve ark.larının çalışmalarında, CA-IX inhibisyonunun, melanom ve meme kanseri hücrelerinin hücre dışı ortamın asiditesini azalttığını göstermişlerdir (119).

Hipoksinin bir sonucu olarak hücrede, enerji talebini sağlamak için anerobik glikolize metabolik bir değişim görülürken laktik asit üretimi de artmaktadır. Bu durum ekstraselüler asidifikasyonun indüklemektedir (120). Söz konusu çalışmada, A375 melanom hücrelerinin hem normoksik hem de hipoksik ortamlarda ekstraselüler pH ölçümleri yapılmıştır. Normoksik ortamda prolifere olan hücrelerin pH'sı ~6,96 iken hipoksik ortamda prolifere olan hücrelerin pH'sının ~6,79 olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, hipoksik ortamda bulunan hücrelerin pH'sı normoksik ortama göre daha asidik bulunmuştur.

Hipoksi, kanser hücrelerinde birbirleriyle ilişkili olan sinyal ağlarını uyarmaktadır (121). Tedaviye dirençli solid tümör tiplerinden biri olan melanom agresif karakterinden dolayı hipoksik ortamdan daha çok etkilenmektedir (116).

Bu çalışmada, BRAFV600E mutasyonu taşıyan melanom hücrelerinde normoksik ve hipoksik ortamlarda HIF1A gen ekspresyon düzeyleri gösterilerek iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Literatürdeki çalışmalar, BRAFV600E mutasyonunun hipoksik ortamda HIF-1α ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (122). Ilie ve ark.larının yaptıkları çalışmada, BRAFV600E mutasyonuna sahip papiller tiroid karsinom hücrelerinde yüksek TIMP-1, HIF-lα, CA-IX ve CA-XII ekspresyon seviyelerinin hipoksik ortamda indüklendiği göstermişlerdir (123). Kumar ve ark.larının yaptıkları çalışmada, hipoksik ortamda BRAFV600E'nin HIF-1α ekspresyonunun ve melanom hücresinin sağkalımının indüklendiğini görülmektedir (124).

Söz konusu çalışmada, melanom hücrelerinde normoksik ortamda da HIF-1α ekspresyonunun varlığı belirlendiği için çalışmanın sonraki basamaklarına normoksik ortamda devam edilmiştir. Kuphal ve ark.larının yaptıkları çalışmada, diğer tümör türlerinin aksine, normoksik ortamda malign melanom hücrelerinde HIF aktivitesinin arttığını ve melanomda asitleşmeye sebep olan glikolitik fenotipi sağladığını göstermişlerdir (125). Zheng ve ark.ları da melanomda normal oksijen seviyelerinde, HIF-1α aktivitesinin arttığını ve tümör hücrelerinin komşu dokulara invazyonunun hızlandığını göstermişlerdir (126).

Bu tez çalışmasında, hipoksik ortamda ise CA9 gen ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.05$). CA-IX'un genellikle hipoksik bölgelerde yukarı yönde düzenlendiği gösterilmiştir. Ayrıca, tümörlerin hipoksik olmayan bölgelerinde de CA-IX ekspresyonu gözlemlenmiştir (127).

Çalışma sonuçlarına göre, normoksik ortamda AZA inhibitörü uygulamasının HIF1A gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı gösterilmiştir ($p<0.05$). CA-IX enziminin AZA ile inhibisyonu tümör mikroçevresindeki asidifikasyonu azaltır (128). HIF1A asidifikasyonu tetiklediği için (129), CA-IX enzimi inhibe edildiğinde tümör mikroçevresindeki asidifikasyonu artırmak için HIF1A'nın ekspresyonunun artmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmada AZA'nın normoksik ortamda melanom hücrelerindeki CA9 gen ekspresyonu üzerine etkisi gösterilmiştir. Normoksik ortamda AZA inhibitörü uygulamasının CA9 gen ekspresyonunda azalışa sebep olduğu ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Güttler ve ark.larının yaptıkları bir çalışmada, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde CA-IX'un bir CA-IX inhibitörü olan SLC-0111 ile inhibisyonunun, CA9'un mRNA ekspresyon seviyesini düşürdüğü görülmektedir (130). Literatürde normoksik ortamda melanom hücrelerinde AZA inhibitörü uygulaması sonrası HIF1A ve CA-IX gen ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

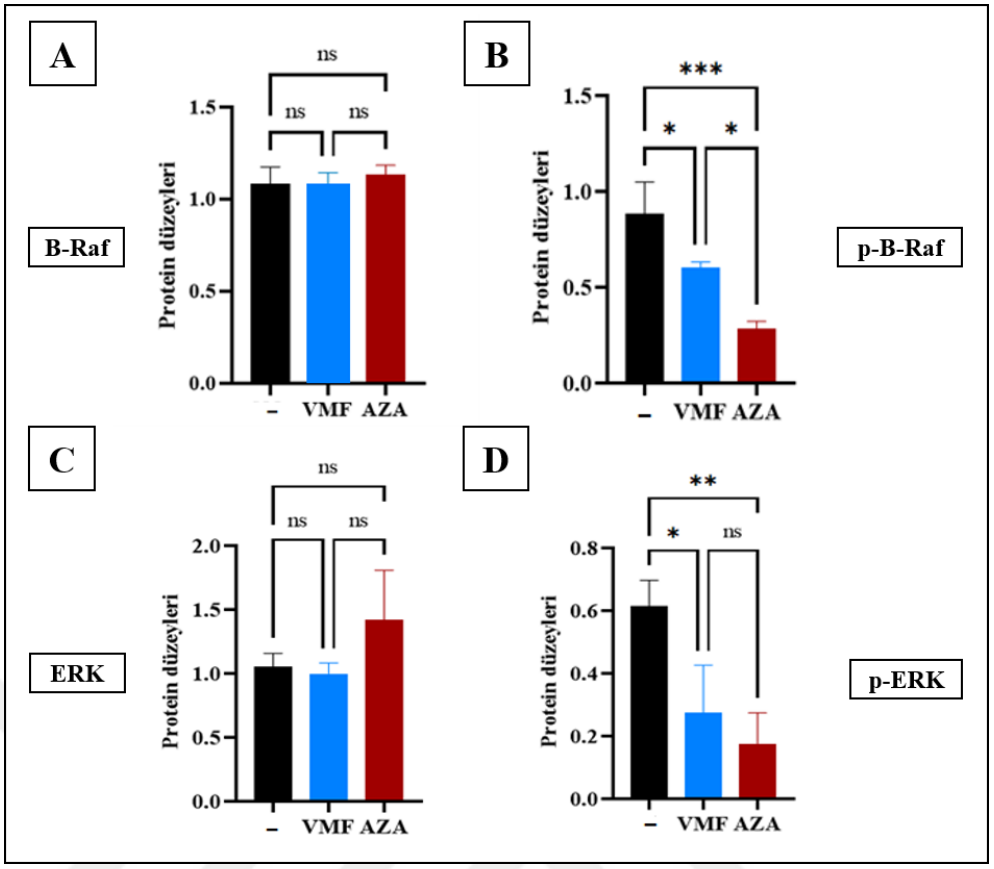
Deneysel çalışmanın bir sonucu olarak, A375 melanom hücrelerinde hipoksik ortamda AZA inhibitörü uygulamasının ardından HIF1A gen ekspresyonunda azalış gözlenmiştir ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Bu çalışmada ayrıca hipoksik ortamda A375 melanoma hücrelerine uygulanan AZA inhibitörünün CA9 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı

gösterilmiştir ($p<0.05$). Said ve ark.larının bir çalışmasında hipoksi altında incelenen glioblastoma hücre hatlarında AZA inhibitörü, hipoksinin neden olduğu CA9 ekspresyonuna karşı inhibe edici özellikler sergilemiştir (131). Literatürde hipoksik ortamda melanom hücrelerinde AZA inhibitörü uygulaması sonrası HIF1A ve CA-IX gen ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Söz konusu çalışmada A375 melanom hücrelerinde CA-IX enzim düzeyleri ölçülmüştür ve CA-IX enzim düzeyi AZA inhibitörü uygulanmamış grupta 5,31 ng/mL iken, AZA inhibitörü uygulanmış grupta 1,81 ng/mL olarak bulunmuştur ($p<0.0001$). AZA inhibitörü uygulanmış A375 melanom hücrelerinde CA-IX enzim düzeyi düşmüştür. Literatürde, melanom hücrelerinde CA-IX enzim inhibitörleri ile ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur. Supuran ve ark.larının yaptıkları çalışmada CA-IX enzim inhibitörü ve proton pompası Lansoprazol kombinasyonunun, insan melanom hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe etmede ve hücre ölümünü indüklemede tekli tedavilerden daha etkili olduğuna dair ilk kanıtı sunulmuştur (132). Andreucci ve ark.ları ise yaptıkları bir çalışmada, CA-IX enzim inhibitörü olan SLC-0111'in mikromolar konsantrasyonda ve normoksik ortamda melanom hücrelerinde kemoterapinin antikanser etkilerini güçlendirebilme yeteneğini göstermişlerdir (133). Puech ve ark.ları ise, CA-IX enzim seviyesi yüksek olan dirençli A375 hücrelerine uygulanan Dakarbazin ve Asetazolamid kombinasyonunun melanom hücrelerinde önemli bir sitotoksisite gösterdiğini belirtmişlerdir (115).

Bu çalışmada önemli bir yeri olan CA-IX enziminin PG alanı, çok sayıda asidik amino asit rezidüsü (Glu ve Asp) nedeniyle bir "tampon" olarak hareket ederek katalitik aktivitede yardımcı olmaktadır. Ayrıca, üç farklı amino asit rezidüsününde (Thr443, Ser448 ve Tyr449) fosforilasyona maruz bırakılan IC kuyruğu, önemli sinyal mekanizmalarına katılmaktadır (61,127). Ekspresyonu hipoksinin kontrolü altında olan CA-IX enzimi, ağırlıklı olarak kronik hipoksik tümör bölgelerinde bulunmakta iken aynı zamanda hafif hipoksik veya hatta normoksik bölgelerde de bulunabilmektedir çünkü CA-IX protein ekspresyonu MAPK bileşenleri tarafından aktive edilebilmektedir (10). Bu bilginin ışığında bu çalışmada CA-IX proteininin inhibisyonunun melanom hücrelerinde aktif rol oynayan MAPK yolağındaki B-Raf proteinin ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında araştırılan MAPK, insan kanserlerinde oldukça dikkat çekici bir yolak olmuştur. Bu önemli yolak, proliferasyon, farklılaşma ve hücre sağkalımı dahil olmak üzere temel hücresel süreçleri düzenlemek için Ras, Raf, MEK ve ERK proteinlerini içeren bir yolak aracılığıyla hücre dışı sinyalleri çekirdeğe iletir (134,135) MAPK yolağının inhibisyonunun CA-IX enzimi üzerine olan etkisi ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Kopacek ve ark.larının yaptıkları çalışmada HeLa hücrelerinde MAPK sinyalinin inhibisyonunun CA9 promotörünün aktivitesinin azalmasına ve hipokside CA-IX protein seviyelerinin azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir (136). Ancak, Pucciarelli ve ark.larının yaptıkları çalışmada hipoksik A375 hücrelerinde Vemurafenib'in, HIF-1α ve CA-IX'un protein ekspresyon seviyelerini etkilemediği ortaya konulmuştur. HIF-1α ve CA-IX'un mRNA ekspresyon seviyelerinde de değişim görülmediği için, HIF-1α ve CA-IX'un transkripsiyonunun Vemurafenib'ten etkilenmediği sonucuna varılmıştır (116). CA aktivasyonun MAPK sinyal yolağı üzerine etkisini gösteren bir tane çalışma literatürde mevcuttur. de Souza ve ark.larının yaptığı bu çalışmada, bir CA aktivatörü olan D-fenilalanin uygulamasının, beyinde hem korteks hem de hippokampusta, ERK sinyal yolağını hızla aktive ettiği gösterilmiştir (137). CA-IX enziminin inhibisyonunun MAPK yolağı üzerine etkisini gösteren çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu anlamda bu çalışma literatürde ilk olma niteliği taşımaktadır. CA-IX protein inhibisyonunun MAPK yolağındaki B-Raf proteini üzerine olan etkisini göstermek amacıyla B-Raf proteininin total ve fosforile formları ile ERK proteinin total ve fosforile formları Western Blot analizi ile değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmada, CA-IX protein inhibisyonunun total B-Raf ve total ERK proteinleri üzerinde anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Ancak CA-IX inhibisyonunun pozitif kontrole kıyasla daha anlamlı şekilde p-B-Raf ve p-ERK protein düzeyinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Western blot analizlerinin gösterimi.
A) A375 melanom hücrelerinde VMF ve AZA inhibitörleri uygulaması sonucu B-Raf protein düzeyleri B) A375 melanom hücrelerinde VMF ve AZA inhibitörleri uygulaması sonucu p-B-Raf protein düzeyleri C) A375 melanom hücrelerinde VMF ve AZA inhibitörleri uygulaması sonucu ERK protein düzeyleri B) A375 melanom hücrelerinde VMF ve AZA inhibitörleri uygulaması sonucu p-ERK protein düzeyleri (ns: not significant, istatistiksel olarak anlamlı değil)

Bir CA inhibitörü olan AZA'nın uygulanmasının, ERK1/2 yolağında yer alan B-Raf ve ERK proteinleri üzerindeki anlamlı inhibisyon etkisi, CA inhibitörlerinin bu yolak için potansiyel bir ajan olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla CA inhibitörleri, melanomda direnç sebebi ile kullanım kısıtlılığı olan B-Raf inhibitörleri için alternatif bir yol oluşturmaktadır. Gelecek çalışmalar, deneysel aşamada olan ve klinikte kullanılan sülfonamid temelli diğer CA inhibitörlerinin de bu yolak üzerindeki etkisini araştırmaya yönelik olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Bu tez çalışmasında, CA-IX inhibisyonunun MAPK yolağında yer alan ve melanomda anahtar rolü olan B-Raf proteini üzerine etkisi araştırılmıştır.

- ✓ BRAFV600E mutasyonu taşıyan A375 melanom hücre hattı kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak BRAFV600E mutasyonuna spesifik bir inhibitör olan VMF ve CA-IX proteini üzerinde inhibisyon etkisi olan AZA kullanılmıştır.

- ✓ A375 melanom hücrelerine 4,9 μM VMF ve 10,7 μM AZA, WST-1 testi ile normoksik ortamda belirlenip 24 saat süre ile uygulanmıştır.

- ✓ Normoksik ve hipoksik ortamlarda A375 melanom hücrelerinin ortam asiditesi, oluşturduğumuz absorbansa bağlı pH grafiğini kullanarak belirlenmiştir.

- ✓ Normoksik ortamda prolifere olan melanoma hücrelerinin pH'sı ~6,96 iken hipoksik ortamda prolifere olan hücrelerin pH'sının ~6,79 olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, hipoksik ortamda bulunan hücrelerin pH'sı normoksik ortamda bulunan hücrelere göre daha asidik bulunmuştur.

- ✓ A375 melanom hücrelerine AZA ve VMF uygulamalarının pHe'yi alkalileştirdiği çalışmada gösterilmiştir.

- ✓ CA-IX düzeyi AZA uygulanmamış grupta 5,31 ng/mL iken, AZA uygulanmış grupta 1,81 ng/mL olarak bulunmuştur. AZA uygulanmış A375 melanom hücrelerinde CA-IX düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüştür ($p<0.0001$) (Tablo 6.1).

- ✓ AZA uygulanmış ve uygulanmamış A375 melanom hücrelerinde immünofloresan ile HIF-1α, CA-IX, B-Raf ve ERK proteinlerinin lokalizasyonları ve ekspresyonları incelenmiştir. AZA uygulaması sonrasında HIF-1α, B-Raf ve ERK proteinlerinin ekspresyonunda değişim gözlenmezken, CA-IX protein ekspresyonunda azalma gözlenmiştir.

- ✓ A375 melanom hücrelerinde normoksik ve hipoksik ortamlarda HIF1A gen ekspresyon düzeyleri gösterilmiş ancak iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Çalışmada, melanom hücrelerinde normoksik ortamda HIF-1α ekspresyonunun varlığı belirlendiği için çalışmanın sonraki basamaklarına normoksik ortamda devam edilmiştir (Tablo 6.1).

- ✓ Melanom hücrelerinde hipoksik ortamda CA9 gen ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.05$) (Tablo 6.1).

- ✓ Normoksik ortamda, A375 melanom hücrelerinde AZA uygulamasının HIF1A gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı gösterilmiştir ($p<0.05$). Normoksik ortamda A375 melanoma hücrelerine AZA uygulamasının CA9 gen ekspresyonunda azalışa sebep olduğu ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$) (Tablo 6.1).

- ✓ Hipoksik ortamda, A375 melanom hücrelerinde AZA uygulamasının HIF1A gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde azalttığı gösterilmiştir ($p>0.05$). Hipoksik ortamda A375 melanoma hücrelerine AZA uygulamasının CA9 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 6.1).

- ✓ Bu tez çalışmasının son aşamasında, CA-IX inhibisyonunun MAPK yolağındaki B-Raf proteini üzerine olan etkisini göstermek amacıyla B-Raf proteininin total ve fosforile formları ile ERK proteinin total ve fosforile formları Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

- ✓ CA-IX inhibisyonunun total B-Raf ve total ERK proteinleri üzerinde anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Ancak AZA ile CA-IX inhibisyonunun pozitif kontrole (VMF) kıyasla daha anlamlı şekilde p-B-Raf ve p-ERK protein düzeyinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Tablo 6.1).

- ✓ B-Raf proteininin, CA enzim ailesinin klasik bir inhibitörü olan AZA tarafından son derece güçlü inhibisyonu dikkat çekicidir. Bu sonuç,

çalışmamızda hedef olarak seçilen ERK1/2 yolağının değerli bir bileşeni olan B-Raf proteinini karsinogenezde önemli bir hedef haline getirmiştir.

- ✓ Bir CA inhibitörü olan AZA'nın uygulanmasının, ERK1/2 yolağında yer alan B-Raf ve ERK proteinleri üzerindeki anlamlı inhibisyon etkisi, CA inhibitörlerinin bu yolak için potansiyel bir ajan olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

- ✓ Çalışmanın önemli bir sonucu olarak, CA inhibitörleri, melanomda kullanım kısıtlılığı olan B-Raf inhibitörleri için alternatif bir yol oluşturmaktadır.

- ✓ Gelecek çalışmalar için deneysel aşamada olan ve klinikte kullanılan sülfonamid temelli diğer CA inhibitörlerinin de bu yolak üzerindeki etkisinin araştırılması önerilmektedir.

Tablo 6.1. Çalışma sonuçlarının özeti.

Test adı	Parametre	Anlamlılık düzeyi	Sonuç
ELISA	CA-IX	$p<0.0001$	▪ AZA (+) hücrelerde CA-IX konsantrasyonu azalmıştır.
qPCR	CA9, HIF1A	HIF1A için; $p>0.05$ CA9 için; $p<0.05$ HIF1A için; $p<0.05$ (AZA) (N) CA9 için; $p>0.05$ (AZA) (N) HIF1A için; $p>0.05$ (AZA) (H) CA9 için; $p<0.05$ (AZA) (H)	▪ Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF1A arasında fark bulunmamıştır. ▪ Hipoksik koşullarda CA9 anlamlı şekilde artmıştır. ▪ Normoksik koşullarda AZA uygulanan grupta HIF1A artışı anlamlıdır. ▪ Normoksik koşullarda AZA uygulanan grupta CA9 düşüşü anlamsızdır. ▪ Hipoksik koşullarda AZA uygulanan grupta HIF1A azalışı anlamsızdır. ▪ Hipoksik koşullarda AZA uygulanan grupta CA9 azalışı anlamlıdır.
Western Blot	HIF-1α, mTOR, p-mTOR, 4E-BP1, p-4E-BP1	HIF-1α için; $p>0.05$ B-Raf için; $p>0.05$ p-B-Raf için; $p<0.05$ (+AZA) p-B-Raf için; $p<0.05$ (+VMF) ERK için; $p>0.05$ p-ERK için; $p<0.05$ (+AZA) p-ERK için; $p<0.05$ (+VMF)	▪ Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF-1α için fark bulunmamıştır. ▪ B-Raf için fark bulunmamıştır. ▪ p-B-Raf için AZA ve VMF uygulanan grupta anlamlı düşüş görülmüştür. ▪ ERK için fark bulunmamıştır. ▪ p-ERK için AZA ve VMF uygulanan grupta anlamlı düşüş görülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Savoia P, Fava P, Casoni F, Cremona O. Targeting the ERK signaling pathway in melanoma, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6):1-37.

2. Jenkins RW, Fisher DE. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond, *Journal of Investigative Dermatology*, 2020, 141(1):23-31.

3. Böhme I, Bosserhoff AK. Acidic tumor microenvironment in human melanoma, *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2016, 29(5):508-23.

4. Alqathama A. BRAF in malignant melanoma progression and metastasis: potentials and challenges, *American Journal of Cancer Research*, 2020, 10(4):1103-14.

5. Mishra H, Mishra PK, Ekielski A, Jaggi M, Iqbal Z, Talegaonkar S. Melanoma treatment : from conventional to nanotechnology, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2018, 144(12):2283-2302

6. Low HB, Zhang Y. Regulatory roles of MAPK phosphatases in cancer. *Immune Network*, 2016, 16(2):85-98.

7. Awadallah FM, El-Waei TA, Hanna MM, Abbas SE, Ceruso M, Oz BE, Guler OO. Supuran CT. Synthesis, carbonic anhydrase inhibition and cytotoxic activity of novel chromone-based sulfonamide derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 96:425-35.

8. Pastorekova S, Kopacek J, Pastorek J. Carbonic Anhydrase Inhibitors and the Management of Cancer, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2007, 7(9):865-78.

9. Thiry A, Supuran CT, Masereel B, Dogné J-M. Recent developments of carbonic anhydrase inhibitors as potential anticancer drugs, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51(11):3051-6.

10. Becker HM. Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer, *British Journal of Cancer*, 2020, 122(2):157-67.

11. Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular, *Journal of Cancer Research and Practice*, 2017, 4(4):127-9.

12. Tülüce Y. The cytotoxic , apoptotic and oxidative effects of carbonic anhydrase IX inhibitor on colorectal cancer cells, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2018, 50(2):107-116.

13. Baran Y. Kanser Moleküler Biyolojisi, 1. Baskı. Ankara, Genç Ofset, 2018: 1–11.

14. Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies, *Nature*, 2006, 439(7074):353-7.

15. Li F, Wu T, Xu Y, Dong Q, Xiao J, Xu Y, et al. A comprehensive overview of oncogenic pathways in human cancer, *Briefings in Bioinformatics*, 2020, 21(3):957-69.

16. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation, *Nature*, 2007, 445(7130):843-50.

17. Chopra A, Sharma R, Rao UNM. Pathology of Melanoma. *Surgical Clinics of North America*, 2020, 100(1):43-59.

18. Dimitriou F, Krattinger R, Ramelyte E, Barysch MJ, Micaletto S, Dummer R, Goldinger SM. The World of Melanoma: Epidemiologic, Genetic, and Anatomic Differences of Melanoma Across the Globe, *Current Oncology Reports*, 2018, 24;20(11):87.

19. Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma, S*urgical Clinics of North America*, 2020 ;100(1):1-12.

20. Nicholas S, Mathios D, Jackson C, Lim M. Metastatic melanoma to the brain: Surgery and radiation is still the standard of care, *Current Treatment Options in Oncology*, 2013, 14(2):264-79.

21. Kuryk L, Bertinato L, Staniszewska M, Pancer K, Wieczorek M, Salmaso S, Caliceti P, Garofalo M. From conventional therapies to immunotherapy: Melanoma treatment in review, *Cancers (Basel)*, 2020, 12(10):3057.

22. Forsea A-M. Melanoma Epidemiology and Early Detection in Europe: Diversity and Disparities, *Dermatology Practical & Conceptual*, 2020, 10(3):e2020033.

23. Hodorogea A, Calinescu A, Antohe M, Balaban M, Nedelcu RI, Turcu G, Ion DA, Badarau IA, Popescu CE, Popescu R, Popp C, Cioplea M, Nichita L, Hulea I, Brinzea A. Epithelial-Mesenchymal Transition in Skin Cancers: A Review, *Analytical cellular pathology*, 2019, 2019.

24. Baykal C, Ekinci AP. Malign Melanom: Risk Faktörleri ve Temel Klinik Özellikler. *Turk Dermatoloji Dergisi*, 2015, 9(1):1-7.

25. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification, *In Vivo*, 2014, 28(6):1005-11.

26. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, Herlyn M, Marchetti MA, McArthur G, Ribas A, Roesch A, Hauschild A. Melanoma, *Nature Reviews Disease Primers*, 2015, 1:1-20.

27. Domingues B, Lopes J, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and Therapy*, 2018, 7: 35-49.

28. van Zeijl MCT, van den Eertwegh AJ, Haanen JB, Wouters MWJM. (Neo)adjuvant systemic therapy for melanoma, *European Journal of Surgical Oncology*, 2017, 43(3):534-43.

29. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*, 2019, 20(11):1366-79.

30. Leonardi GC, Candido S, Falzone L, Spandidos DA, Libra M. Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution (Review). *International Journal of Oncology*, 2020, 57(3):609-18.

31. Lugowska, I., Teterycz, P., Rutkowski P. Immunotherapy of Melanoma, *Contemporary Oncology*, 2018, 22(1A):61-67.

32. Hawryluk EB, Tsao H. Melanoma: Clinical features and genomic insights, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2014, 4(9): a015388.

33. Inamdar GS, Madhunapantula SV, Robertson GP. Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochemical Pharmacology*. 2010, 80(5):624-37.

34. Hertzman Johansson C, Egyhazi Brage S. BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 142(2):176-82.

35. Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacological Research*, 2019, 144:19-50.

36. Zaman A, Wu W, Bivona TG. Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future, *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8):1197.

37. Chowdhary M, Patel KR, Danish HH, Lawson DH, Khan MK. BRAF inhibitors and radiotherapy for melanoma brain metastases: Potential advantages and disadvantages of combination therapy, *OncoTargets and Therapy*, 2016, 9:7149-59.

38. Pucciarelli D, Lengger N, Takáčová M, Csaderova L, Bartosova M, Breiteneder H, et al. Hypoxia increases the heterogeneity of melanoma cell populations and affects the response to vemurafenib, *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13(4):3281-8.

39. Ward C, Meehan J, Gray M, Kunkler IH, Langdon SP, Argyle DJ. Carbonic anhydrase IX (CAIX), cancer, and radiation responsiveness, *Metabolites*, 2018, 8(1).

40. Lau J, Lin KS, Bénard F. Past, present, and future: Development of theranostic agents targeting carbonic anhydrase IX, *Theranostics*, 2017, 7(17):4322-39.

41. Chu CY, Jin YT, Zhang W, Yu J, Yang HP, Wang HY, et al. CA IX is upregulated in CoCl2-induced hypoxia and associated with cell invasive potential and a poor prognosis of breast cancer, *International Journal of Oncology*, 2016, 48(1):271-80.

42. Singh S, Lomelino CL, Mboge MY, Frost SC, McKenna R. Cancer drug development of carbonic anhydrase inhibitors beyond the active site, *Molecules*, 2018, 23(5).

43. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibition and the management of hypoxic tumors, *Metabolites*, 2017, 16;7(3):48.

44. Kumar S, Rulhania S, Jaswal S, Monga V. Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors, *European Journal of Medicinal*

Chemistry, 2021, 1;209:112923

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

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

47. Zamanova S, Shabana AM, Mondal UK, Ilies MA. Carbonic anhydrases as disease markers, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2019, 29(7):509-533.

48. Supuran CT. Structure and function of carbonic anhydrases, *Biochemical Journal*, 2016, 473(14):2023-32.

49. Ozensoy Guler O, Capasso C, Supuran CT. A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016, 31(5):689-94.

50. Akocak S, Lolak N, Vullo D, Durgun M, Supuran CT. Synthesis and biological evaluation of histamine Schiff bases as carbonic anhydrase I, II, IV, VII, and IX activators, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2017, 32(1):1305-12.

51. Waheed A, Sly WS. Carbonic anhydrase XII functions in health and disease, *Gene*, 2017, 623:33-40.

52. Nocentini A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors as antitumor/antimetastatic agents: a patent review (2008–2018), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2018, 28(10):729-40.

53. Corbet C, Feron O. Tumour acidosis: From the passenger to the driver's seat. *Nature Reviews Cancer*, 2017, 17(10):577-93.

54. Lomelino CL, Andring JT, McKenna R. Crystallography and Its Impact on Carbonic Anhydrase Research, *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 2018: 9419521.

55. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors

and activators, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, 7(2):168-81.

56. Lomelino C, McKenna R. Carbonic anhydrase inhibitors: a review on the progress of patent literature (2011–2016), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2016, 26(8):947-56.

57. Carta F, Supuran CT. Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory action: a patent and literature review (2005 – 2013), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2013, 23(6):681-91.

58. Angeli A, Carta F, Nocentini A, Winum JY, Zalubovskis R, Akdemir A, Onnis V, Eldehna WM, Capasso C, De Simone G, Monti SM, Carradori S, Donald WA, Dedhar S, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors targeting metabolism and tumor microenvironment, *Metabolites*, 2020, 10(10):1-21.

59. Mcintyre A, Harris AL. The Role of pH Regulation in Cancer Progression, *Recent Results in Cancer Research*, 2016, 207:93-134.

60. Supuran CT, Altamimi ASA, Carta F. Carbonic anhydrase inhibition and the management of glaucoma: a literature and patent review 2013-2019, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2019, 29(10):781-92.

61. Supuran CT, Alterio V, Di Fiore A, D' Ambrosio K, Carta F, Monti SM, De Simone G. Inhibition of carbonic anhydrase IX targets primary tumors, metastases, and cancer stem cells: Three for the price of one, *Medicinal Research Reviews*, 2018, 38(6):1799-836.

62. Supuran CT, Winum J-Y. Carbonic anhydrase IX inhibitors in cancer therapy: an update, *Future Medicinal Chemistry*, 2015, 7(11):1407-14.

63. Parks SK, Cormerais Y, Pouysségur J. Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology, *The Journal of Physiology*, 2017, 595(8):2439-50.

64. Swietach P. What is pH regulation, and why do cancer cells need it?, *Cancer and Metastasis Reviews*, 2019, 38(1): 5-15.

65. Schwartz L, Supuran C, Alfarouk K. The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2017, 17(2):164-170.

66. Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target

for cancer therapy: From biology to clinical use, *Seminars in Cancer Biology*, 2015, 31:52-64.

67. Lake D, Corrêa SAL, Müller J. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(23):4397-413.

68. García-Gómez R, Bustelo XR, Crespo P. Protein–Protein Interactions: Emerging Oncotargets in the RAS-ERK Pathway, *Trends in Cancer*, 2018, 4(9):616-33.

69. Zlobin A, Bloodworth JC, Osipo C. Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling. *Predictive Biomarkers in Oncology*, 2019, 213-221.

70. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer, *Oncogene*, 2007, 26(22):3291-310.

71. Cheng Y, Zhang G, Li G. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy, *Cancer and Metastasis Reviews*, 2013, 32(3-4):567-84.

72. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2012, 16(1):103-19.

73. Buday L, Vas V. Novel regulation of Ras proteins by direct tyrosine phosphorylation and dephosphorylation, *Cancer and Metastasis Reviews*, 2020, 39(4):1067-73.

74. Braicu C, Buse M, Busuioc C, Drula R, Gulei D, Raduly L, Rusu A, Irimie A, Atanasov AG, Slaby O, Ionescu C, Berindan-Neagoe I. A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer, *Cancers (Basel)*, 2019, 11(10):1-25.

75. Najafi M, Ahmadi A, Mortezaee K. Extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signaling as a target for cancer therapy: an updated review, *Cell Biology International*, 2019, 43(11):1206-22.

76. Li L, Zhao GD, Shi Z, Qi LL, Zhou LY, Fu ZX. The Ras / Raf / MEK / ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC, *Oncology Letters*, 2016, 12(5):3045-3050.

77. McCain J. The MAPK (ERK) pathway: Investigational combinations for the treatment of BRAF- mutated metastatic melanoma, *Physical Therapy*, 2013, 38(2):96-108.

78. Weeraratna AT. RAF around the Edges-The Paradox of BRAF Inhibitors. *The New England Journal of Medicine*, 2012, 366(3):271-3.

79. Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective, *Cancer*, 2014, 120(22):3446-56.

80. Kidger AM, Sipthorp J, Cook SJ. ERK1/2 inhibitors: New weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway, *Pharmacology & Therapeutics*, 2018, 187:45-60.

81. Guo Y, Pan W, Liu S, Shen Z, Xu Y, Hu L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 19(3):1997-2007.

82. Neuzillet C, Hammel P, Tijeras-Raballand A, Couvelard A, Raymond E. Targeting the Ras-ERK pathway in pancreatic adenocarcinoma, *Cancer and Metastasis Reviews*, 2013, 32(1-2):147-62.

83. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond, *Nature Reviews Cancer*, 2014, 14(7):455-67.

84. Ammar UM, Abdel-Maksoud MS, Oh CH. Recent advances of RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma) inhibitors as anti-cancer agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 158:144-66.

85. Wang JQ, Mao L, City K, Street H, City K. The ERK pathway: molecular mechanisms and treatment of depression, *Molecular Neurobiology*, 2019, 56(9):6197-205.

86. Terrell EM, Morrison DK. Ras-mediated activation of the Raf family kinases, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2019, 9(1):a033746.

87. Pakneshan S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AKY. Clinicopathological relevance of BRAF mutations in human cancer. *Pathology*, 2013, 45(4):346-56.

88. Man RJ, Zhang YL, Jiang AQ, Zhu HL. A patent review of RAF kinase inhibitors (2010–2018), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2019, 29(9):675-88.

89. Ross JS, Wang K, Chmielecki J, Gay L, Johnson A, Chudnovsky J, Yelensky R, Lipson D, Ali SM, Elvin JA, Vergilio JA, Roels S, Miller VA, Nakamura BN, Gray A, Wong MK, Stephens PJ. The distribution of BRAF gene fusions in solid tumors and response to targeted therapy. *International Journal of Cancer*, 2016, 138(4):881-90.

90. Croce L, Coperchini F, Magri F, Chiovato L, Rotondi M. The multifaceted anti-cancer effects of BRAF-inhibitors, *Oncotarget*, 2019, 10(61):6623-40.

91. Cicenas J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, Tarvydas R, Staniute G, Kalyan K, Meskinyte-Kausiliene E, Stankevicius V, Valius M. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma, *Medical Oncology*, 2017, 34(2):1-11.

92. Mandalà M, Voit C. Targeting BRAF in melanoma: Biological and clinical challenges. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2013, 87(3):239-55.

93. Cohen J V., Sullivan RJ. Developments in the space of new MAPK pathway inhibitors for BRAF-mutant melanoma, *Clinical Cancer Research*, 2019, 25(19):5735-42.

94. Dankner M, Rose AAN, Rajkumar S, Siegel PM, Watson IR. Classifying BRAF alterations in cancer: New rational therapeutic strategies for actionable mutations, *Oncogene*, 2018, 37(24):3183-99.

95. Frisone D, Friedlaender A, Malapelle U, Banna G, Addeo A. A BRAF new world. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2020, 12(12): 3729.

96. Khaliq M, Fallahi-Sichani M. Epigenetic mechanisms of escape from BRAF oncogene dependency. *Cancers (Basel)*. 2019, 11(10):16-22.

97. Patel H, Yacoub N, Mishra R, White A, Yuan L, Alanazi S, Garrett JT. Current advances in the treatment of braf-mutant melanoma, *Cancers (Basel)*, 2020, 12(2):15-20.

98. Karoulia Z, Gavathiotis E, Poulikakos PI. New perspectives for targeting RAF

kinase in human cancer, *Nature Reviews Cancer*, 2017, 17(11):676-91.

99. Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: Promises and challenges, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014, 13(12):928-42.

100. Yaeger R, Corcoran RB, Kettering S, Hospital G, Medical H. Targeting alterations in the RAF-MEK pathway, *Cancer Discovery*, 2019, 9(3):329-41.

101. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy, *Cells*, 2020, 13;9(1):198.

102. Cotto-Rios XM, Agianian B, Gitego N, Zacharioudakis E, Giricz O, Wu Y, Zou Y, Verma A, Poulikakos PI, Gavathiotis E. Inhibitors of BRAF dimers using an allosteric site, *Nature Communications*, 2020, 11: 4370.

103. Peng S Bin, Henry JR, Kaufman MD, Lu WP, Smith BD, Vogeti S, Rutkoski TJ, Wise S, Chun L, Zhang Y, Horn RDV, Yin T, Zhang X, Yadav V, Chen SH, Gong X, Ma X, Webster Y, Buchanan S, Mochalkin I, Huber L, Kays L, Donoho GP, Walgren J, McCann D, Patel P, Conti I, Plowman GD, Starling JJ, Flynn DL. Inhibition of RAF Isoforms and Active Dimers by LY3009120 Leads to Anti-tumor Activities in RAS or BRAF Mutant Cancers. *Cancer Cell*, 2015, 28(3):384-98.

104. Agianian B, Gavathiotis E. Current Insights of BRAF Inhibitors in Cancer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(14):5775-93.

105. Lee S, Rauch J, Kolch W. Targeting MAPK signaling in cancer: Mechanisms of drug resistance and sensitivity, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3):1-29.

106. ATCC. A375 Melanoma Cell Line. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1619.aspx. 10.03.2021.

107. Peng X, Wang Z, Liu Y, Peng X, Liu Y, Zhu S, Zhang Z, Qiu Y, Jin M, Wang R, Zhang Q, Kong D. Oxyfadichalcone C inhibits melanoma A375 cell proliferation and metastasis via suppressing PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways, *Life Sciences*, 2018, 206:35-44.

108. Merck. WST-1 Assay. https://www.sigmaaldrich.com/technical-

documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html. 15.04.2021.

109. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop™ Lite Spectrophotometer. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-LITE-PR#/ND-LITE-PR. 18.04.2021.

110. Selectscience. iBlot® 7-Minute Blotting System. https://www.selectscience.net/products/iblot-7-minute-blotting-system/?prodID=171803#tab-2. 19.04.2021.

111. Wellbrock C. MAPK pathway inhibition in melanoma: Resistance three ways, *Biochemical Society Transactions*, 2014, 42(4):727-32.

112. Welsh SJ, Rizos H, Scolyer RA, Long G V. ScienceDirect Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma : Where to next ?, *European Journal of Cancer*. 2016, 62:76-85.

113. Iams WT, Sosman JA, Chandra S. Novel Targeted Therapies for Metastatic Melanoma, *Cancer Journal*, 2017, 23(1):54-58.

114. Ditte Z, Ditte P, Labudova M, Simko V, Iuliano F, Zatovicova M, Csaderova L, Pastorekova S, Pastorek J. Carnosine inhibits carbonic anhydrase IX-mediated extracellular acidosis and suppresses growth of HeLa tumor xenografts, *BMC Cancer*, 2014, 14(1):1-13.

115. Clémentine Puech, Chatard M, Felder-Flesch D, Prevot N, Perek N. Umbelliferone Decreases Intracellular pH and Sensitizes Melanoma Cell Line A375 to Dacarbazin. Comparison with Acetazolamide, *Current Molecular Pharmacology*, 2018, 11(2):133-139.

116. Pucciarelli D, Lengger N, Takáčová M, Csaderova L, Bartosova M, Breiteneder H, et al. Hypoxia increases the heterogeneity of melanoma cell populations and affects the response to vemurafenib, *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13(4):3281-8.

117. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors as emerging agents for the treatment and imaging of hypoxic tumors, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2018, 27(12):963-70.

118. Swietach P, Patiar S, Supuran CT, Harris AL, Vaughan-Jones RD. The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths, *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(30):20299-310.

119. Chafe SC, McDonald PC, Saberi S, Nemirovsky O, Venkateswaran G, Burugu S, Gao D, Delaidelli A, Kyle AH, Baker JHE, Gillespie JA, Bashashati A, Minchinton AI, Zhou Y, Shah SP, Dedhar S. Targeting hypoxia-induced carbonic anhydrase IX enhances immune-checkpoint blockade locally and systemically, *Cancer Immunology Research*, 2019, 7(7):1064-78.

120. Thews O, Riemann A. Tumor pH and metastasis: a malignant process beyond hypoxia. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2019, 38(1-2):113-29.

121. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy, *Hypoxia*, 2015, 11;3:83-92.

122. Pucciarelli D, Lengger N, Takacova M, Csaderova L, Bartosova M, Breiteneder H, Pastorekova S, Hafner C. Anti-chondroitin sulfate proteoglycan 4-specific antibodies modify the effects of vemurafenib on melanoma cells differentially in normoxia and hypoxia, *International Journal of Oncology*, 2015, 47(1):81-90.

123. Ilie MI, Lassalle S, Long-Mira E, Hofman V, Zangari J, Bénaim G, Bozec A, Guevara N, Haudebourg J, Birtwisle-Peyrottes I, Santini J, Brest P, Hofman P. In papillary thyroid carcinoma, TIMP-1 expression correlates with BRAF V600E mutation status and together with hypoxia-related proteins predicts aggressive behavior, *Virchows Archiv*, 2013, 463(3):437-44

124. Kumar SM, Yu H, Edwards R, Chen L, Kazianis S, Brafford P, Acs G, Herlyn M, Xu X. Mutant V600E BRAF Increases Hypoxia Inducible Factor-1 A Expression in Melanoma, *Cancer Research*, 2007, 67(7):3177-84.

125. Kuphal S, Winklmeier A, Warnecke C, Bosserhoff AK. Constitutive HIF-1 activity in malignant melanoma, *European Journal of Cancer*, 2010, 46(6):1159-69.

126. Zheng Y, Chen H, Zhao Y, Zhang X, Liu J, Pan Y, et al. Knockdown of

FBXO22 inhibits melanoma cell migration, invasion and angiogenesis via the HIF-1α/VEGF pathway, *Investigational New Drugs*, 2020, 38(1):20-8.

127. Tafreshi NK, Lloyd MC, Bui MM, Gillies RJ, Morse DL. Carbonic anhydrase IX as an imaging and therapeutic target for tumors and metastases, *Sub-Cellular Biochemistry*, 2014, 75: 221-254.

128. Dubois L, Peeters S, Lieuwes NG, Geusens N, Thiry A, Wigfield S, et al. Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation, *Radiotherapy and Oncology*, 2011, 99(3):424-31.

129. Monti E, B. Gariboldi M. HIF-1 as a Target for Cancer Chemotherapy, Chemosensitization and Chemoprevention. *Current Molecular Pharmacology*, 2011, 4(1):62-77.

130. Güttler A, Theuerkorn K, Riemann A, Wichmann H, Kessler J, Thews O, Bache M, Vordermark D. Cellular and radiobiological effects of carbonic anhydrase IX in human breast cancer cells, *Oncology Reports*, 2019, 41(4):2585-94.

131. Said HM, Hagemann C, Carta F, Katzer A, Polat B, Staab A, Scozzafava A, Anacker J, Vince GH, Flentje M, Supuran CT. Hypoxia induced CA9 inhibitory targeting by two different sulfonamide derivatives including Acetazolamide in human Glioblastoma, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(13):3949-57.

132. Federici C, Lugini L, Marino ML, Carta F, Iessi E, Azzarito T, Supuran CT, Fais S. Lansoprazole and carbonic anhydrase IX inhibitors sinergize against human melanoma cells, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016, 31(1):119-125.

133. Andreucci E, Ruzzolini J, Peppicelli S, Bianchini F, Laurenzana A, Carta F. The carbonic anhydrase IX inhibitor SLC-0111 sensitises cancer cells to conventional chemotherapy. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2019, 34(1):117-23.

134. Kolch W. Meaningful relationships : the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, *Biochemical Journal*, 2000, 351(2):289-305.

135. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis, *IUBMB Life*, 2006, 58(11):621-31.

136. Kopacek J, Barathova M, Dequiedt F, Sepelakova J, Kettmann R, Pastorek J, Pastorekova S. MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 25;1729(1):41-9.

137. de Souza LC, Provensi G, Vullo D, Carta F, Scozzafava A, Costa A, Schmidt SD, Passani MB, Supuran CT, Blandina P. Carbonic anhydrase activation enhances object recognition memory in mice through phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase in the cortex and the hippocampus, *Neuropharmacology*, 2017, 15;118:148-156.