

## Kolon Kanserinde EGF Sitokininin İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Geninin mRNA Ekspresyon Seviyesine Etkisi

Derya Okuyan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Veterinerlik / Susurluk Tarım ve Orman Meslek Yüksekokulu, Bandırma Onyedli Eylül Üniversitesi, Türkiye

\*([dokuyan@bandirma.edu.tr](mailto:dokuyan@bandirma.edu.tr))

**Özet** – Karbonik anhidraz enzim ailesinin üyeleri karbondioksitin bikarbonat iyonuna geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyerek dokulardaki CO<sub>2</sub> taşınımını, pH dengesini, solunum reaksiyonlarını, iyon dengesini, biyolojik reaksiyonları ve kemik oluşumu gibi birçok önemli süreci katalizleyen ailenin kasa spesifik üyesi olan Karbonik Anhidraz III (CAIII)'ün kolon kanser modeli HT-29 hücre hattında EGF etkili mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyesi analiz edilmiştir. Özellikle hücrenin hayatta kalması, büyümesi, invazyonu ve proliferasyonu gibi önemli mekanizmaları regüle eden EGF sitokininin CAIII mRNA seviyesini düşürdüğü bu çalışma ile belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler** – Karbonik Anhidraz, CAIII, Kolon Kanseri, HT-29, EGF, Sitokin

### I. GİRİŞ

Sitokinler hücreler arası düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Belli bir sitokin çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanır fakat aynı biyolojik etkiyi gösterir. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar. Şöyle ki; belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücreler arası sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücreler reseptörlerine bağlanırlar. Diğer sitokinler daha lokalize olmuş etkiler gösterirler. Bunlar otokrin (bir hücre tarafından salgılanan sitokinin aynı hücre üzerine etkisi) ve parakrin (belli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin yakındaki komşu hücreye etkisi) etkilerdir [1]. Sitokinler hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolü, hematopoez ve bağışıklık sisteminin regülasyonu, yaraların iyileşmesi, kemik formasyonu ve hücreler arası metabolizmanın değiştirilmesi gibi biyolojik olaylarda rol oynamaktadır [2].

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR); HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) ve HER4 (ErbB4) içeren ErbB reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesinin bir üyesidir. EGFR, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve Transforming büyüme faktörü  $\alpha$  (TGF $\alpha$ )

dahil olmak üzere çeşitli ligandların bağlanmasıyla aktive edilen tek zincirli bir transmembran glikoproteindir [3]. EGFR'nin hücrenin hayatta kalması, büyümesi, invazyonu ve proliferasyonu ile ilişkili sinyal ağlarını aktive ettiği göz önüne alındığında, EGFR'nin hiperaktivasyonunun ciddi anormalliklere sebep vererek birçok kanserde yaygın olması şaşırtıcı değildir. Bu, EGFR'nin terapötik bir hedef olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmasına yol açmıştır. EGFR'nin onkojenik hale geldiği mekanizmalar, esas olarak yapısal olarak aktif varyantlara yol açan genomik lokustaki amplifikasyon ve nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. EGF'nin aşırı ifadesi, transkripsiyonel regülasyonu, EGFR'nin etkilediği birçok genin transkripsiyonel regülasyonu gibi önemli araştırma konularının altı çizilmiştir [4].

İnsan Karbonik Anhidraz III geni (CAIII), karbonik anhidraz ailesinin diğer üyelerinden düşük CO<sub>2</sub> hidrataz aktivitesi ve sülfanamid inhibitörlerine karşı direnç gösterme özellikleriyle ayrılır. 8.kromozomun q22 bölgesine lokalize olan CAIII geni kasa spesifiklik göstererek erkeklerde ve fetüslerde yüksek seviyelerde ifade olmaktadır. Son yıllarda yapılan CAIII ün kanser ile olan ilişkisi üzerinde durulmaktadır. CAIII özellikle Karaciğer karsinomda (HCC) hücre içi veya hücre dışı

asidifikasyon aracılığıyla, FAK sinyal yolu üzerinden hücrelerin invazyonunu arttırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir ve CAIII ekspresyonunun önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Hücrelerin metastas ve invazyon kabiliyetlerini arttırdığı gösterilmiştir [5].

Liteartürde CAIII ve EGF ile ilgili herhangi bir çalışma yoktur. Bu çalışma CAIII'ün mRNA düzeyindeki regülasyonuna EGF sitokininin etkisini belirlemek üzerinedir.

## II. MATERYAL VE YÖNTEM

### A. Hücre Kültürü

Ana başlıkların detaylandırılması için 2. seviye ve 3. seviye başlıklar kullanılabilir. İnsan kolon karsinom (HT-29) hücre hattı 15 ml medyuma 75 cm<sup>2</sup> flasklarda, içerisinde 0,2mM L-Glutamine ve %10 FCS içeren DMEM medyumunda haftada 2 kez rutin pasaj yaparak büyütülmüştür. Hücrelere 10ng EGF uygulanarak 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında hücre pelletleri toplanarak -80°C'de depolanmıştır.

### B. RT-PCR ve Q-PCR

Hücre pelletlerinden RNA izolasyonları yapıldıktan sonra miktarı belirlenen RNA örneklerinden 1000 ng olacak şekilde RNA kalıbı kullanılarak RT-PCR yapılmıştır.

CAIII ve H-β-2 Mikroglobulin için optimize edilen şartlarda PCR yapılmıştır. PCR reaksiyonları 50µl hacimde yapılmıştır. Kalıp olarak yaklaşık CAIII için 4µl ve H-β-2 Mikroglobulin için 1µl cDNA kullanılmıştır. Her bir primer son konsantrasyonu 2 ng, 1X Tampon (Fermentas)(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 (v/v) Triton X-100), 200mM her bir dNTP ve 2,5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanılmıştır. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 2mM olarak kullanılmıştır. PCR sonuçları agaroz jelde görüntülenerek DNA bantları H-β-2 Mikroglobulin bantları ile normalize edilmiştir.

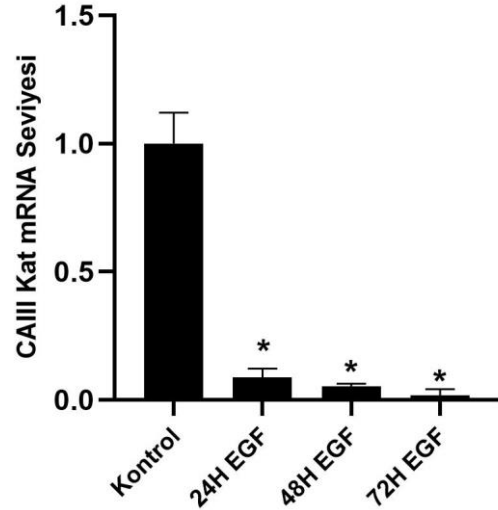
### C. İstatiksel Analiz

Deney sonuçlarının istatistiksel analizleri tek yönlü ANOVA testi (Minitab15 versiyonu) kullanılarak gerçekleştirildi. P ≤ 0.05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

## III. BULGULAR

HT-29 hücre hattında EGF etkili CAIII mRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde elde edilen

analiz sonuçlarına göre 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında CAIII'ün mRNA seviyesindeki ifadesi düşmüştür. Şekil 1'de gösterilmekte olan veriler doğrultusunda kontrol grubuna kıyasla özellikle geç zamanda CAIII'ün mRNA düzeyindeki ifadesi maksimum düzeyde baskılanmaktadır.



Şekil 1. HT-29 Hücre hattında EGF etkili CAIII kat mRNA seviyesi

## IV. TARTIŞMA

Karbonik anhidraz enzim ailesinin üyeleri karbondioksitin bikarbonat iyonuna geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyerek dokulardaki CO<sub>2</sub> taşınımını, pH dengesini, solunum reaksiyonlarını, iyon dengesini, biyolojik reaksiyonları ve kemik oluşumu gibi birçok önemli süreci katalizlerler [6]. Kasa spesifik olan CAIII'ün kanserle olan ilişkisi çok net aydınlatılmamıştır. Literatür taraması yapıldığında bu konuyla ilgili çok sınırlı bilgi bulunmaktadır. Yine CAIII'ün transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar hemen hemen yoktur.

Karbonik anhidraz ve EGF ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, EGF'nin renal karsinom hücre hattı olan SKRC-01 hücrelerinde CAIX fosforilasyonunu uyardığını belirlenmiştir. CAIX'in sitoplazmik bölgesinde EGF reseptör kinazının hedefi olan tirozin domainine sahip olduğu ve fosforile edildiğinde PI3 kinaz sinyal yolağının aktive edildiği gösterilmiştir. Ayrıca yine renal karsinom hücre hattı olan ve de CAIX'ü ifade etmeyen SKRC-17 hücre hattında yapılan çalışmalarda, CAIX'ün ekspresyonunun EGF ifadesini daha da arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum, EGF'nin EGF

sinyal yolundan bağımsız olarak CAIX ile ifade olduğunu ifade etmektedir [7]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada EGFR, HIF-1a ve CAIX ekspresyon seviyelerine bakılarak tümör nekrozunun boyutu da değerlendirilmiştir. Karbonik anhidraz ailesinin hipoksik markör gen olmasından dolayı yapılan çalışmada perinökleer CAIX ve yüksek Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1a (Hif1a) ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu; artmış EGFR ve membranöz CAIX ekspresyonunun doğrudan kötü prognoz ile ilişkili olmadığı bulunmuştur [8]. Ancak yapılan kapsamlı çalışmada EGFR, HIF-1a ve CAIX arasında yakından ilişki olduğu ve EGFR sinyalinin CAIX üzerinden hipoksiye hücrel yanıtı geliştirerek hayatta kalma faktörü olarak işlev gördüğü belirlenmiştir [9]. Watson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CAXII ve EGF'in meme karsinomunda prognostik karakterle ilişkili olduğu, özellikle invazyonik karakteri regüle ederek kanserleşme sürecinde aktif rol oynadığını belirlemişlerdir [10]. Kallio ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise insan renal karsinom hücre hatları Caki-1 ve A-498, insan hepatosellüler karsinom hücre hattı HepG2, insan meme kanseri hücre hattı MCF7 ve insan glioblastoma hücre hattı U373 kullanılmıştır. Bu hücre hatlarına EGF uygulandığında Hif1a ve CAXII'nin ekspresyon seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. CAXII'nin ekspresyon seviyesindeki bu artış hipoksik yanıt oluşumunda önemli olmakla beraber, hücre içi sinyal yollarını regüle ederek hücreyi apoptotik süreçten korumaktadır [11]. Ancak CAIII ve EGF ile ilgili literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma ile CAIII ve EGF arasındaki regülasyon ortaya konmuştur.

## V. SONUÇLAR

Sonuç olarak, HT-29 hücre hattında EGF sitokini etkili CAIII mRNA ekspresyon seviyesinin inhibe olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Bandırma Onyedü Eylül Üniversitesi BAP-22-1003-002 nolu proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

[1] Kuby, J. (1992) Immunology. WH Freeman and Co., New York, 304-306

- [2] Cross, F., Roberts, J., Wentraub, H., Simple and complex cell cycles. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5: 341-395, 1989.
- [3] Purba, E.; Saita, E.; Maruyama, I. Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The 'Rotation Model'. *Cells* 2017, 6, 13.
- [4] Zandi, R.; Larsen, A.B.; Andersen, P.; Stockhausen, M.T.; Poulsen, H.S. Mechanisms for oncogenic activation of the epi-dermal growth factor receptor. *Cell. Signal.* 2007, 19, 2013-2023.
- [5] Dai H. Y., Hong, C. C., Liang, S. C., Yan, M. D., Lai, G. M., Cheng, A. L., and Chuang S.E., (2008). Carbonic Anhydrase III Promotes Transformation and Invasion Capability in Hepatoma Cells Through FAK Signaling Pathway. *MOLECULAR CARCINOGENESIS*, 47, 956-963.
- [6] Chegwidde, W. and Carter, N., (2000). Introduction to the carbonic anhydrases. In: Chegwidde WR, Carter ND and Edwards YH (eds), *The carbonic anhydrases*. New Horizons, Birkhauser Verlag, 13-28.
- [7] Dorai, T., Sawczuk, I. S., Pastorek, J., Wiernik, P. H., Dutcher, J. P., (2005). The Role of Carbonic Anhydrase IX Overexpression in Kidney Cancer. *Eur J Can.*, 41-2935.
- [8] Swinson, D. E., Jones, J. L., Cox, G., Richardson, D., Harris, A. L., & O'Byrne, K. J. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in non small cell lung cancer: Relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *International journal of cancer*, 111(1), 43-50.
- [9] Swinson, D. E., Jones, J. L., Richardson, D., Cox, G., Edwards, J. G., & O'Byrne, K. J. (2002). Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables. *Lung cancer*, 37(3), 235-240.
- [10] Watson, P. H., Chia, S. K., Wykoff, C. C., Han, C., Leek, R. D., Sly, W. S., & Harris, A. L. (2003). Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. *British journal of cancer*, 88(7), 1065-1070.
- [11] Kallio, H., Martinez, A. R., Hilvo, M., Hyrskyluoto, A., & Parkkila, S. (2010). Cancer-associated carbonic anhydrases IX and XII: effect of growth factors on gene expression in human cancer cell lines. *J. Cancer Mol*, 5, 73-78.