

Atf İçin: Okuyan, D., Türkoğlu, A. S. ve Köçkar, F. (2023). Kolon Kanserinde IL-6 Sitokinin Karbonik anhidraz III Gen İfadesi Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(1), 102-111.

To Cite: Okuyan, D., Türkoğlu, A. S. & Köçkar, F. (2023). Investigation of the Effect of IL-6 Cytokine on Carbonic Anhydrase III Gene Expression in Colon Cancer. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(1), 102-111.

Kolon Kanserinde IL-6 Sitokinin Karbonik anhidraz III Gen İfadesi Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Derya OKUYAN^{1*}, Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU², Feray KÖÇKAR²

Öne Çıkanlar:

- Karbonik Anhidraz III
- Kolon kanseri
- IL-6

Anahtar Kelimeler:

- Karbonik anhidraz III
- Kolon kanseri
- IL-6

ÖZET:

Yüksek IL-6 seviyeleri, birçok kanser türünde agresif tümör büyümesi ve tedaviye yanıt ile ilişkilidir. Dolaşımdaki IL-6 düzeyi yüksek olan hastalar genellikle kötü prognoz ve daha kısa sağkalm ile ilişkilendirilirken, daha düşük bir IL-6 düzeyi tedaviye daha iyi yanıt ile ilişkilidir. Kolorektal kanser (KRK)'in IL-6 ile regüle olduğu ve KRK hastalarında serum IL-6 seviyesinin arttığı, bu artışında tümör boyutuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Organizmalarda uygun asit-baz dengesini sağlamada önemli rol oynayan hidrataz aktivitesine sahip olan CAIII bu görevinin dışında reaktif oksijen radikallerinin yok edilmesi ile oksidatif stresin neden olduğu hasardan hücreleri korumada, ayrıca glikolitik ara ürünlerinden oksaloasetatin ve sitratın hızlı dönüşümünü kolaylaştırarak bunların yağ asit metabolizmasına katılmasını da sağlamaktadır. Son yapılan çalışmalarda ise CAIII'ün ve kanser ilişkisi üzerinde durulmaktadır. Karaciğer karsinomda (HCC), CAIII ekspresyonunun önemli derecede azaldığı ve hücrelerin invazyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Kolon kanserinde ise CAIII ifadesinin MEK-1 ve PI3K yolları yoluyla baskılandığı da tespit edilmiştir. Prostat kanserinde de hipoksik yolun regülatör proteini olan HIF1- α 'nın doğrudan CAIII promotörüne bağlandığı ve kanser sürecinde aktif rol oynadığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda IL-6 sitokinin CAIII geni üzerindeki regülasyonu 2 farklı basamakta değerlendirilmiştir. 500 U IL-6 sitokini uygulanan HT-29 hücrelerinde CAIII mRNA seviyesi Real Time PCR ile değerlendirilmiş ve yine 500 U IL-6 uygulanan HT-29 hücrelerinden elde edilen protein ekstraktlarının kullanıldığı western blot tekniği ile CAIII protein seviyesi üzerindeki etkisi tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada IL-6 etkili CAIII regülasyonunda CAIII'ün hem mRNA hem de protein düzeyindeki ifadesinin, IL-6 muamelesi görmemiş kontrol grubu hücrelerine kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. Buna göre; IL-6 sitokininin kanser ilgili bir protein olan CA3 üzerindeki düzenleyici etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Investigation of the Effect of IL-6 Cytokine on Carbonic Anhydrase III Gene Expression in Colon Cancer

Highlights:

- Carbonic anhydrase III
- Colon cancer
- IL-6

Keywords:

- Carbonic anhydrase III
- Colon cancer
- IL-6

ABSTRACT:

High IL-6 levels are associated with aggressive tumor growth and response to therapy in many types of cancer. Patients with high circulating IL-6 levels are generally associated with poorer prognosis and shorter survival, while a lower IL-6 level is associated with better response to treatment. Studies conducted in recent years emphasize that colorectal cancer (CRC) is regulated by IL-6, serum IL-6 level is increased in CRC patients and this increase is correlated with tumor size.

Having hydratase activity, which plays an important role in maintaining the proper acid-base balance in organisms, CA3 also protects cells from damage caused by oxidative stress by destroying reactive oxygen radicals, and also facilitates the rapid conversion of glycolytic intermediates oxaloacetate and citrate, enabling them to participate in fatty acid metabolism. Recent studies have focused on the relationship between CAIII and cancer. It has been determined that CAIII increases the invasion of cells and the expression of CAIII is significantly decreased in Liver carcinoma (HCC). It has also been determined that CAIII expression is suppressed through MEK-1 and PI3K pathways in colon cancer cell line HT-29 cells. Finally, it has been shown that HIF1- α , the regulatory protein of the hypoxic pathway in prostate cancer, directly binds to the CAIII promoter.

In our study, the regulation of IL-6 cytokine on the CAIII gene was evaluated in 2 different steps. The effect of CAIII mRNA levels and protein levels were determined by Real Time PCR and Western blot analysis, respectively. The sample in which total RNAs and protein obtained from HT-29 cells treated with 500 U of IL-6 cytokine were used for both analysis.

It was determined that the expression of CAIII at both mRNA and protein levels were decreased by the effective regulation of IL-6. In conclusion, this study elucidates the regulatory effect of IL-6 cytokine on cancer-related protein CA3 gene regulation.

¹ Derya OKUYAN (Orcid ID: 0000-0001-6758-8556), Bandırma Onyedü Eylül Üniversitesi, Susurluk Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı, Bandırma, Türkiye

² Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU (Orcid ID: 0000-0003-1754-0700), Feray KÖÇKAR (Orcid ID: 0000-0003-2572-8391), Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Balıkesir, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Derya OKUYAN, e-mail: dokuyan@bandirma.edu.tr

GİRİŞ

Sitokinler, bağışıklık, iltihaplanma, embriyonik gelişim, rejenerasyon, anjiyogenez, metabolizma, obezite, yaşlanma gibi yaşamsal ve hastalık gelişimi gibi birçok önemli süreçte görev almaktadır. Birçok farklı işlevlerinin arasında inflamasyondaki rolleri, özellikle hastalık gelişiminde ve tedavisinde dikkat çekici özellikler kazanmalarına neden olmuştur (Balkwill ve Mantovani, 2001; Hirano, 1998). İnflamasyon, homeostaz ve yara iyileşmesi gibi rejeneratif süreçlerde rol alan sitokinler, akut faz reaksiyonlarında ve patojenlere karşı bağışıklık sisteminin regüle olmasında da rol oynar (Acosta, 2008; Campisi, 2005; Coussens ve Werb, 2002; Grivennikov ve ark., 2010; Ishihara ve Hirano, 2002; Kuilman ve ark., 2008; Mantovani ve ark., 2008; Murakami ve ark., 2013). Ayrıca kanser gelişiminde de aktif olarak regüle olurlar (Atsumi ve ark., 2014; Kuilman ve ark., 2008; Mantovani ve ark., 2008).

İnterlökin-6 (IL-6), tümör hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre türleri tarafından üretilen ve salgılanan inflamatuvar sitokindir (Dethlefsen ve ark., 2013; Waldner ve ark., 2012). Malign hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında rol oynarken kolorektal kanser, meme kanseri, prostat kanseri, yumurtalık kanseri, pankreas kanseri, akciğer kanseri, renal hücreli karsinom, rahim ağzı kanseri ve çoklu miyelom başta olmak üzere birçok kanser türünde yüksek seviyede ifade olmaktadır (Altundag ve ark., 2005; Chang, 2013; Culig ve Pühr, 2012; Dethlefsen ve ark., 2013; Macciò ve Madeddu, 2013; Miura ve ark., 2015; Singh ve ark., 2015; Wei ve ark., 2003). Yüksek IL-6 seviyeleri, birçok kanser türünde agresif tümör büyümesi ve tedavilere yanıt ile ilişkilidir. Dolaşımdaki IL-6 düzeyi yüksek olan hastalar genellikle kötü prognoz ve daha kısa sağkalım ile ilişkilendirilirken, daha düşük bir IL-6 düzeyi tedaviye daha iyi yanıt ile ilişkilidir (Chen ve ark., 2013; Guo ve ark., 2012; Shibayama ve ark., 2014; Wu ve ark., 2013). IL-6/STAT-3 sinyal yolağının aktivasyonu ile kanser hücrelerinde birçok hayatta kalma sinyal yolu aktif hale gelir ve tümör oluşumu regüle edilir (Mihara ve ark., 2012). IL-6, apoptozun inhibisyonu, hayatta kalmanın desteklenmesi, proliferasyon, anjiyogenez, invazivlik ve metastaz gibi kanserleşme sürecindeki hemen hemen tüm mekanizmaları regüle eder (Chang ve ark., 2013; Grivennikov ve ark., 2009; Jourdan ve ark., 2003; Lin ve ark., 2001; Mauer ve ark., 2015; Oh ve ark., 2013; Wegiel ve ark., 2008; Wei ve ark., 2003; White ve ark., 2015; Yeoh ve ark., 2009; Zou ve ark., 2015).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kolorektal kanser (KRK)'in IL-6 ile regüle olduğu üzerinde durmaktadır. Öyle ki KRK hastalarında serum IL-6 seviyesinin arttığı ve bu artışında tümör boyutuyla korele olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Kaminska ve arkadaşları, TNF, IL-8, IL-6 ve VEGF'nin serum düzeylerinin KRK'nin klinik prognozu hakkında önemli bulgular sunduğunu belirtmişlerdir (Kaminska ve ark., 2005). Schneider ve ark. ise, IL-6'nın bazı kolorektal karsinom hücrelerinin ankradan bağımsız büyümesini indüklediğini göstermişlerdir. Ayrıca bunlara ek olarak, IL-6'nın, Bcl-xl ekspresyonunun aktivasyonu yoluyla KRK hücrelerinin Fas aracılı apoptozun önlediği belirtilmiştir (Schneider ve ark., 2000; Yuan ve ark., 2004).

Karbonik Anhidraz III (CAIII) aktif bölgesinde çinko (Zn²⁺) iyonu bulunan, karbondioksit (CO₂) ve bikarbonat (HCO₃⁻)'ın geri dönüşümlü reaksiyonu katalizleyen, karbonik anhidraz (Karbonat Hidroliyz E.C.4.2.2.1.) ailesinin bir üyesidir (Imtaiyaz ve ark., 2013). İnsan CAIII geni (NM_005181) 8q22 pozisyonunda lokalize olmuş, 10.3 kb uzunluğuna sahip, 6 intron ve 7 ekzon içeren bir gendir (Carter ve ark., 1979). Karbonik anhidraz ailesinin diğer sitozolik proteinlerinden CAI ve CAII'ye gen yapısı bakımından oldukça benzerlik göstermektedir. Ancak bütün enzimler içinde en düşük aktiviteye sahip olanıdır. Bunlara ek olarak sülfonamid inhibitörlerinin çoğuna direnç göstermektedir (Koester ve ark., 1981; Sanyal ve ark., 1982; Tashian ve ark., 1980).

CAIII'ün farklı fizyolojik görevleri vardır. Glikoliz basamağının ara ürünü olan oksaloasetat ve sitratın dönüşümünü kolaylaştıran CAIII, bu moleküllerin yağ asit metabolizmasına girmesini sağlar (Feng ve ark., 2016; Kim ve ark., 2004). Karaciğer ve iskelet kasındaki oksidatif stres hasarlarının önlenmesinde görev alan CAIII, reaktif oksijen radikallerinin yok edilmesinde de aktif olarak rol oynamaktadır. Hidrataz aktivitesine sahip olan CAIII, hücre içi pH'yı regüle. Ayrıca, hücreleri oksidatif stres hasarlarından koruyabildiği için antioksidan aktivite de göstermektedir (Cabiscol ve ark., 1995; Raisanen ve ark., 1999).

Yapılan çalışmalar CAIII'ün kanser ile olan ilişkisine dikkat çekmektedir. Özellikle karaciğer kanserinde (HCC) hücre içi/ hücre dışı asidifikasyon mekanizmasıyla, FAK sinyal yolu üzerinden hücreleri invazyona yönlendirmektedir. Bu süreçte CAIII ekspresyonunun önemli derecede azaldığı hücrelerin ise metastaz ve invazyon kabiliyetlerini arttırdığı gösterilmiştir (Dai ve ark., 2008). Ayrıca Türkoğlu ve ark. yaptıkları çalışma ile kolon kanseri hücre hattı olan HT-29 hücrelerinde TGF- β etkili CAIII ifadesinin MEK-1 ve PI3K yolları yoluyla baskılandığı, aynı etkinin delesyon protomorf konstraklarında yapılan transfeksiyon çalışmalarında da TGF- β sitokininin CAIII regülasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak hem kolon kanseri hem de osteosarkom hücrelerinde hücrelerde ROS'u artıran TGF- β , hücreyi ROS'tan koruma mekanizmasında rol oynayan CAIII ekspresyonunda azalmaya neden olarak karsinogenez sürecine katkıda bulunmuştur (Türkoğlu ve ark., 2019).

Okuyan D. ve ark. yaptığı bir başka çalışmada ise hipoksik durumda mRNA düzeyinde CAIII ekspresyonunun zamana bağlı olarak arttığı ve hücre modeli bazında değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Özellikle androjenden bağımsız prostat kanseri hücre modeli olan PC3 hücre hattında hipoksik durumda CAIII mRNA seviyesi maksimum seviyede ifade olurken, bu etkinin protein düzeyinde arttığı da bulunmuştur. EMSA analizi ile HIF1- α 'nın doğrudan CAIII promotörüne bağlandığı ve hipoksik şartlarda CAIII promotöründeki HIF1- α bölgeleri üzerinden regüle ettiği gösterilmiştir (Okuyan ve ark., 2020)

Tüm bu çalışmalar ışığında mevcut çalışmamızda özellikle kanser gelişim sırasında apoptozun inhibisyonu, hayatta kalmanın desteklenmesi, proliferasyon, anjiyogenez, invazivlik ve metastaz karakterler gibi önemli basamakları regüle eden IL-6 sitokinin özellikle oksidatif stres ve pH dengesi üzerinden kanser gelişim mekanizmasında dikkat çeken bir gen olan CAIII geninin regülasyonuna etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla kolon kanserinde IL-6 sitokin muamelesinin CAIII gen ifadesi üzerindeki etkisi mRNA, protein ve transkripsiyonel aktiviteye etkisi için promoter regülasyonu çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Hücre Kültürü

Kolon kanseri hücre hattı (HT-29) hücre kültüründe %10 FCS (Fetal Calf Serum) ve 2 mM L-Glutamin (Hyclone) içeren DMEM (Sigma, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) içerisinde rutin pasaj ile çoğaltılmıştır. Hücreler 37°C'de 5 % (v/v) CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir (Okuyan ve ark., 2020).

MTT Deneyi

Hücre canlılığı, sarı tetrazol deneyi olan MTT ile belirlenmiştir. MTT çalışmaları Türkoğlu ve arkadaşlarının anlattığı şekilde yapılmıştır (Türkoğlu ve ark., 2020). Kısaca, hücreler 96 kuyulu plakalara (göz başına 5x10³ hücre) ekildi. Hücreler, IL-6 sitotoksitesini ölçmek için 500 U/mL IL-6 ve kontrol grubu olarak IL-6 uygulanmamış şekilde 1-72 saat inkübe edilmiştir. Uygulamadan 24, 48 ve 72 saat sonrasında son konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde her kuyuya stok MTT solüsyonu eklenmiş ve 4 saat 37°C, %5 CO₂ 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyulardan pipet yardımıyla medyum çekilmiş ve 0.004 M HCl içeren izopropanol ile kristaller çözülmüş ve 550 nm'de

absorbans alınmıştır Muamele edilmemiş hücrelerin ortak OD değerleri, her zaman noktasında IL-6 ile muamele edilmiş her hücre grubundaki OD değeri ile oranlanmıştır. Deney en az üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analizleri

RNA izolasyonu, kit talimatlarına göre GeneJET™ RNA Saflaştırma Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak HT-29 hücrelerinden ele edilmiştir. Ayrıca IL-6 etkisinin belirlenmesi amacıyla 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında 500 U/mL IL-6 eklenmiş deney ve kontrol grubu oluşturulmuştur. Hücrelerden RNA izolasyonları sonrası RNA kontrolleri yapıldıktan sonra cDNA eldesi basamağına geçilmiştir. Bu amaçla 1 mikrogram toplam RNA, primer (100 pmol) olarak Revert Aid Reverse Transkriptaz (200 U) ve oligo(dT) kullanılarak komplementer DNA sentezlenmiştir (Fermentas).

RT-PCR, 1 µl cDNA ve Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanılarak 50 µl toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. İnsan CAIII geni için reaksiyon koşulları, 94oC'de 3 dakika (94oC'de 30 sn, 55oC'de 30 sn, 72oC'de 30 sn), 35 döngü ve 72oC'de 10 dakikadır. İnternal kontrol olarak insan β-2-mikroglobulin kullanılmış ve RT-PCR şartları 55oC bağlanma sıcaklığı ve 22 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerler; CAIII için, ileri 5'-TGG GAA GAC CTG CCG AGT TGT ATT TGA TG-'3 ve geri 5'-TTG ATA GGC TGT GAG GTC GCC AGT TGC-3'; B-2 için, ileri 5'-TCC CTG GAG AAG AGC TAC GA-'3 ve geri 5'-AAG AAA GGG TGT AAC GCA AC-'3 PCR ürünleri, %1 (a/h) agaroz jeli üzerinde yürütülerek boyut fraksiyonlarına göre ayrılmıştır. Gel-Doc analiz sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır ve dansitometrik analiz ImageJ yazılımı ile yapılarak normalizatör gen olan β-2-mikroglobulin ile CAIII kıyaslanarak kat analizi yapılmıştır. Deneyler istatistiksel olarak analiz edilmesi için 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Okuyan ve ark., 2020).

Western Blot Analizi

RNA deneylerine benzer şekilde protein deneyleri için hücreler 25cm² flasklara sayılarak alındı ve sitokin uygulaması 24, 48 ve 72 saat dilimleri için yapılmıştır. Sitokin uygulanmayan gruplar kontrol grubuna IL-6 sitokinin sulandırırken kullanılan su aynı hacimde uygulanmıştır. Flasklardan uygun zaman dilimleri sonrası pellet haline getirilen hücrelere protein ekstraktlarının hazırlanması için hücrelere RIPA tamponu ile uygulanmıştır. Örnekler %10 (a/h) poliakrilamid jeller kullanılarak boyut fraksiyonlarına göre ayrılmış, ardından Immobilon-P PVDF membrana (Millipore, Burlington, MA, ABD) transfer edilmiştir. İnsan CAIII (CA3 Polyclonal Antibody- PA5-25977, Pierce Antibody) ve β-Aktin (β-Aktin Monoclonal Antibody- A2228, Sigma-Aldrich) spesifik antikoları kullanılarak membranlar etiketlenmiştir. Etiketleme işlemi sonunda spesifik bantların kemilüminesans saptama kiti (Pierce Chemical Co., Dallas, TX, ABD) aracılığıyla ışınması ve X-ışınına duyarlı filme (Kodak, Rochester, NY, ABD) basılmasıyla görünür hale getirilmiştir. β-Aktin ve CAIII'ün nispi protein ekspresyonunun kantitatif analizi için Image J yazılımı kullanılmıştır. Deneyler 3 tekrar kurulmuştur (Turkoglu ve ark., 2019).

İstatistiksel analiz

Standart sapmalar ve p değerleri Mini Tab. 14 yazılımı kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel analiz için çiftler arasında One-way Anova analizi uygulanmıştır.

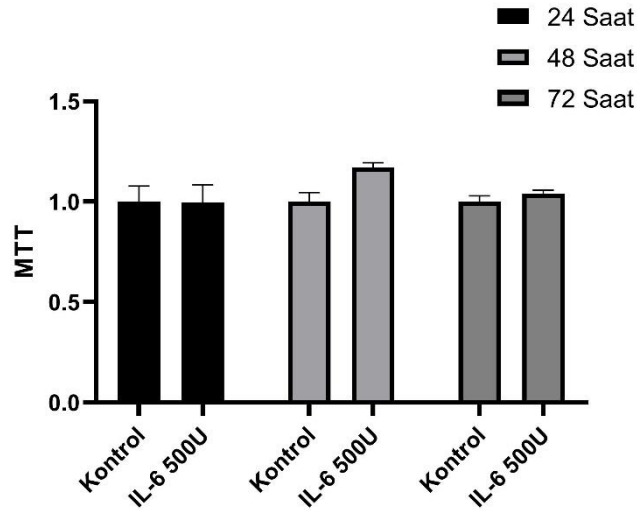
BULGULAR VE TARTIŞMA

IL-6'in Hücre Canlılığına Etkisi

Hücre canlılığını belirleme amacıyla yapılan MTT deneylerinde 96 kuyulu plakanın her kuyusuna HT-29 hücreleri ekildikten sonra IL-6 etkisini belirlemek amacıyla 500 U/mL IL-6 eklenmiş ve eklenmemiş olmak üzere 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında sonuçlar elde edilmiştir.

Bu sonuçlar ışığında elde edilen bulgular Şekil 1’de gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde maksimum dozda uygulanan IL-6 sitokinin HT-29 hücrelerine sitotoksik bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Jiumao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IL-6’in HT-29 hücre hattında 24 saatte hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ancak Xiao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise IL-6’in HT-29 hücre hattında 48 saat ve sonraki zaman aralıklarında kontrol grubuna oranla hücre proliferasyonunun azaldığı; iki çalışmada da sitotoksik etkisinin görülmediği belirtilmiştir (Jiumao ve ark., 2015).



Şekil 1. HT-29 hücre hattında IL-6 sitokininin sitotoksik etkisinin test edilmesi; MTT sonuçları

IL-6 etkili CAIII geninin mRNA ve Protein ifadesi

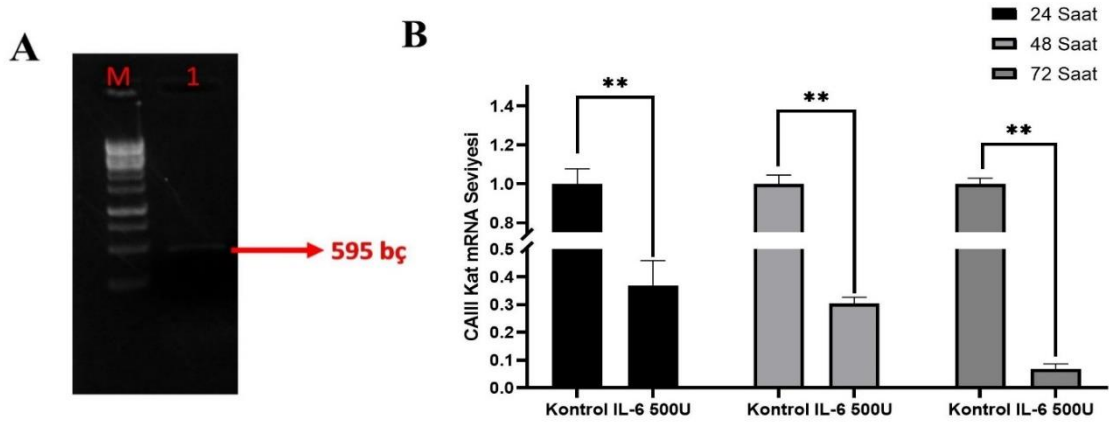
Öncelikle mRNA çalışmalarında kullanılacak olan CAIII genine spesifik olarak sentezlettirilen primerlerin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Real Time çalışmalarında bu primerler kullanıldığında doğru büyüklükte ve tek bant verdiği PCR sonrası ürünlerin agaroz jelde yürütülmesi ile kontrol edilmiştir (Şekil 2A).

IL-6 sitokininin CAIII geni üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla HT-29 hücrelerine 500 U/mL IL-6 sitokini uygulanmış ve 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında RNA izolasyonları ve c-DNA sentezleri tamamlanmıştır. Zaman bağımlı etkinin gözlemlenebilmesi için mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyesi için PCR tekniği uygulanmış ve sonuç olarak CAIII’ün IL-6 etkili ifadesinde zamana bağlı olarak mRNA seviyesindeki ekspresyonun azaldığı, özellikle de 72 saat zaman diliminde kontrol grubuna kıyasla maksimum azalışın ortaya çıktığı gözlenmektedir. Elde edilen sonuçlar Şekil 2B’de gösterilmektedir.

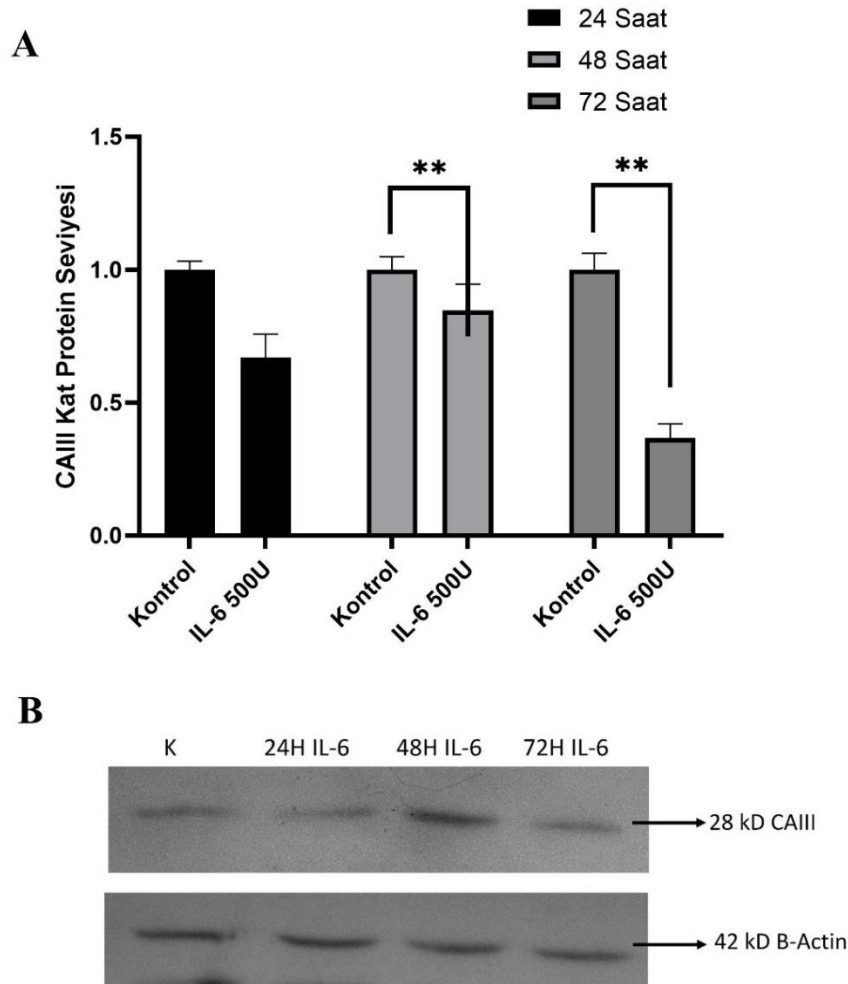
Aynı etkinin protein düzeyindeki etkisinin belirlenebilmesi için HT-29 hücre hatlarında 500 U/mL IL-6 uygulanmış, zaman bağımlı olarak 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarındaki deney gruplarından RIPA tamponu ile protein ekstraktları oluşturuldu. CAIII spesifik antikor kullanılarak elde edilen Western Blot görüntüleri β -Actin spesifik antikorla elde edilen görüntülerle normalize edilmiştir. Western Blot deney sonuçları ve sonuçların densometrik analizleri Şekil 3A ve 3B’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında CAIII protein ifadesinin yine zamana bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir.

Kolon kanserinin biyolojisi hakkında daha derin bir kavrayış elde etmek için bir yaklaşım, kanser hastalarında potansiyel tanı ve prognostik belirteçler olarak büyük ilgi gören dolaşımdaki sitokinlerin ve sitokin reseptörlerinin değerlendirilmesidir. Kolon kanserinde önemli bir sitokin, pleiotropik özellikleri ile interlökin-6’dır (IL-6). IL-6, aktive edilmiş monosit, makrofaj veya tümör hücresinden salgılandıktan

sonra hedef hücreler üzerinde etkili olabilir.



Şekil 2. A: CAIII bölgesine spesifik primerlerin PCR ile çoğaltılması sonrası ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü, B: HT-29 hücre hattında IL-6 sitokinin CAIII mRNA seviyesine etkisi; Real Time PCR sonucu



Şekil 3. A/B: HT-29 hücre hattında IL-6 etkili CAIII protein seviyesine etkisi; Western Blot görüntüsü

IL-6 önce zara bağlı IL-6 reseptörüne bağlanır (IL-6R; esas olarak hepatositler, nötrofiller, monositler/makrofajlar ve bazı lenfositlerde eksprese edilir). IL-6 ve IL-6R'nin bu kompleksi, sinyal ileten membran proteini gp130 ile birleşerek dimerizasyonunu ve sinyalleşmenin başlamasını indükler. (Heinrich ve ark., 2003; Lust ve ark., 1992; Rose-John ve ark., 2007).

Günümüzde IL-6, glioma, lenfoma, melanomun yanı sıra meme, yumurtalık, pankreas, prostat, böbrek ve kolorektal kanser dahil olmak üzere çeşitli insan kanseri türlerinde önemli bir tümör teşvik

edici faktör olarak kabul edilmektedir. Çeşitli çalışmalar, hastaların serumunda ve tümör dokusunun kendisinde IL-6 seviyelerinin yükseldiği, kolorektal kanserli hastalarda IL-6 ekspresyonunun arttığı ve kanser hücrelerinde IL-6 yoluyla önemli onkojenik yolların aktive edildiği gösterilmiştir (Chung ve Chang, 2003; Galizia ve ark., 2002; Komoda ve ark., 1998).

Kolon kanseri HT-29 hücrelerinde kansere bağlı sitokin TGF- β 'nin karbonik anhidraz (CA) III gen ekspresyonu üzerindeki etkisi Türkoğlu ve ark. tarafından aydınlatılmıştır. HT-29 ile osteosarkom hücre hattı Saos-2 hücreleri ile yapılan çalışmada CAIII'ün TGF- β etkili regülasyonunun mitojenle aktive olan protein kinaz/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (MAPK/ERK) ve fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) yolları aracılığıyla azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar ışığında TGF- β 'nin, kanser hücrelerinin kendisini korumasını önlemek için CAIII gen ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir (Türkoğlu ve ark., 2019).

Bazı CA üyelerinin (CAIX, CAXII), HIF1- α tarafından kuvvetli bir şekilde Karaciğer kanserinde yukarı regüle edildiği gösterilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde, PCa'da CAIII'ün transkripsiyonel regülasyonu ile çalışmalar ise Okuyan D ve ark tarafından 2020 yılında aydınlatılmıştır. Bu çalışmada tarafımızca CAIII'nin hipoksi ile düzenlenen bir gen olduğu ve hipoksik durumdaki prostat kanseri tümörlerinin hedeflenmesi için değerli olduğunu gösterilmiştir (Okuyan ve ark., 2020).

SONUÇ

Bu çalışma ile IL-6 sitokinin CAIII geni üzerindeki regülasyonu 2 farklı basamakta değerlendirilmiştir. HT-29 hücrelerine uygulanan 500 U/mL IL-6 sitokininin CAIII mRNA ve protein ifadesine etkisi belirlenmiştir. IL-6 sitokini etkili CAIII regülasyonunda kanserle ilişkili bir gen olan CAIII'ün hem mRNA hem de protein düzeyindeki ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından "BAP2018/116" kodlu proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olması yoktur.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır.

KAYNAKLAR

- Acosta, J. C., O'Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., Gil, J. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133(6), 1006-1018.
- Altundag, O., Altundag, K., & Gunduz, E. (2004). Interleukin-6 and C-reactive protein in metastatic renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology*, 23(5), 1044-1044.
- Atsumi, T., Singh, R., Sabharwal, L., Bando, H., Meng, J., Arima, Y., Murakami, M. (2014). Inflammation Amplifier, a New Paradigm in Cancer Biology. *Cancer research*, 74(1), 8-14.
- Becker, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Lehr, H. A., Galle, P. R., ... & Neurath, M. F. (2005). IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle*, 4(2), 220-223.
- Brozek, W., Bises, G., Girsch, T., Cross, H. S., Kaiser, H. E., & Peterlik, M. (2005). Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumour progression. *European journal of cancer*, 41(15), 2347-2354.
- Brozek, W., Bises, G., Fabjani, G., Cross, H. S., & Peterlik, M. (2008). Clone-specific expression, transcriptional regulation, and action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells. *BMC cancer*, 8(1), 1-9.
- Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow?. *The lancet*, 357(9255), 539-545.

- Cabiscol, E., & Levine, R. L. (1995). Carbonic Anhydrase III. OXIDATIVE MODIFICATION IN VIVO AND LOSS OF PHOSPHATASE ACTIVITY DURING AGING*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), 14742-14747.
- Carter, N., Jeffery, S., Shiels, A., Edwards, Y., Tipler, T., & Hopkinson, D. A. (1979). Characterization of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle. *Biochemical Genetics*, 17, 837-854.
- Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120(4), 513-522.
- Chang, C. H., Hsiao, C. F., Yeh, Y. M., Chang, G. C., Tsai, Y. H., Chen, Y. M. & Su, W. C. (2013). Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *International journal of cancer*, 132(9), 1977-1985.
- Chen, M. F., Chen, P. T., Lu, M. S., Lin, P. Y., Chen, W. C., & Lee, K. D. (2013). IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Molecular cancer*, 12(1), 1-12.
- Chung, Y. C., & Chang, Y. F. (2003). Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*, 83(4), 222-226.
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867.
- Culig, Z., & Pühr, M. (2012). Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 360(1-2), 52-58.
- Dai, H. Y., Hong, C. C., Liang, S. C., Yan, M. D., Lai, G. M., Cheng, A. L., & Chuang, S. E. (2008). Carbonic anhydrase III promotes transformation and invasion capability in hepatoma cells through FAK signaling pathway. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 47(12), 956-963.
- Dethlefsen, C., Højfeldt, G., & Hojman, P. (2013). The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 138(3), 657-664.
- Feng, H. Z., & Jin, J. P. (2016). Carbonic anhydrase III is expressed in mouse skeletal muscles independent of fiber type-specific myofilament protein isoforms and plays a role in fatigue resistance. *Frontiers in Physiology*, 7, 597.
- Galizia, G., Orditura, M., Romano, C., Lieto, E., Castellano, P., Pelosio, L. & De Vita, F. (2002). Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. *Clinical immunology*, 102(2), 169-178.
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G. Y., Vallabhapurapu, S. & Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell*, 15(2), 103-113.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z., & Zhang, Z. (2012). Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer treatment reviews*, 38(7), 904-910.
- Hassan, M. I., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F., & Sly, W. S. (2013). Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(6), 1570-1582.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical journal*, 374(1), 1-20.
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *International reviews of immunology*, 16(3-4), 249-284.
- Hsu, C. P., & Chung, Y. C. (2006). Influence of interleukin-6 on the invasiveness of human colorectal carcinoma. *Anticancer research*, 26(6B), 4607-4614.
- Ishihara, K., & Hirano, T. (2002). IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(4-5), 357-368.
- Jourdan, M., Veyrone, J. L., Vos, J. D., Redal, N., Couderc, G., & Klein, B. (2003). A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. *Oncogene*, 22(19), 2950-2959.

- Kaminska, J., Nowacki, M. P., Kowalska, M., Rysinska, A., Chwalinski, M., Fuksiewicz, M. & Chechlinska, M. (2005). Clinical significance of serum cytokine measurements in untreated colorectal cancer patients: soluble tumor necrosis factor receptor type I—an independent prognostic factor. *Tumor biology*, 26(4), 186-194.
- Kim, G., Lee, T. H., Wetzel, P., Geers, C., Robinson, M. A., Myers, T. G., ... & Levine, R. L. (2004). Carbonic anhydrase III is not required in the mouse for normal growth, development, and life span. *Molecular and cellular biology*, 24(22), 9942-9947.
- Knüpfer, H., & Preiss, R. (2010). Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients—a summary of published results. *International journal of colorectal disease*, 25, 135-140.
- Koester, M. K., Pullan, L. M., & Noltmann, E. A. (1981). The p-nitrophenyl phosphatase activity of muscle carbonic anhydrase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 211(2), 632-642.
- Komoda, H., Tanaka, Y., Honda, M., Matsuo, Y., Hazama, K., & Takao, T. (1998). Interleukin-6 levels in colorectal cancer tissues. *World journal of surgery*, 22, 895-898.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., ... & Peeper, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133(6), 1019-1031.
- Lin, J., Li, Q., Chen, H., Lin, H., Lai, Z., & Peng, J. (2015). Hedyotis diffusa Willd. extract suppresses proliferation and induces apoptosis via IL-6-inducible STAT3 pathway inactivation in human colorectal cancer cells. *Oncology Letters*, 9(4), 1962-1970.
- Lin, M. T., Juan, C. Y., Chang, K. J., Chen, W. J., & Kuo, M. L. (2001). IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene mcl-1. *Carcinogenesis*, 22(12), 1947-1953.
- Lust, J. A., Donovan, K. A., Kline, M. P., Greipp, P. R., Kyle, R. A., & Maihle, N. J. (1992). Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine*, 4(2), 96-100.
- Macciò, A., & Madeddu, C. (2013). The role of interleukin-6 in the evolution of ovarian cancer: clinical and prognostic implications—a review. *Journal of molecular medicine*, 91, 1355-1368.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *nature*, 454(7203), 436-444.
- Mauer, J., Denson, J. L., & Brüning, J. C. (2015). Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends in immunology*, 36(2), 92-101.
- Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical science*, 122(4), 143-159.
- Miura, T., Mitsunaga, S., Ikeda, M., Shimizu, S., Ohno, I., Takahashi, H., ... & Ochiai, A. (2015). Characterization of patients with advanced pancreatic cancer and high serum interleukin-6 levels. *Pancreas*, 44(5), 756-763.
- Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., ... & Hirano, T. (2013). Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell reports*, 3(3), 946-959.
- Nikiteas, N. I., Tzanakis, N., Gazouli, M., Rallis, G., Daniilidis, K., Theodoropoulos, G., ... & Peros, G. (2005). Serum IL-6, TNF α and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: prognostic implications. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(11), 1639.
- Oh, K., Lee, O. Y., Shon, S. Y., Nam, O., Ryu, P. M., Seo, M. W., & Lee, D. S. (2013). A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. *Breast cancer research*, 15(5), 1-16.
- Okuyan, D., Turkoglu, S. A., & Kockar, F. (2020). Carbonic anhydrase III is a new target of HIF1 α in prostate cancer model. *Gene*, 762, 145034.
- Räisänen, S. R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Härkönen, P. L., & Kalervo Väänänen, H. (1999). Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *The FASEB Journal*, 13(3), 513-522.
- Rose-John, S., Waetzig, G. H., Scheller, J., Grötzinger, J., & Seeger, D. (2007). The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets*, 11(5), 613-624.

- Sansone, P., Storci, G., Tavolari, S., Guarnieri, T., Giovannini, C., Taffurelli, M., ... & Bonafè, M. (2007). IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *The Journal of clinical investigation*, 117(12), 3988-4002.
- Sanyal, G., Swenson, E. R., Pessah, N. I., & Maren, T. H. (1982). The carbon dioxide hydration activity of skeletal muscle carbonic anhydrase. Inhibition by sulfonamides and anions. *Molecular pharmacology*, 22(1), 211-220.
- Schneider, M. R., Hoeflich, A., Fischer, J. R., Wolf, E., Sordat, B., & Lahm, H. (2000). Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer letters*, 151(1), 31-38.
- Shibayama, O., Yoshiuchi, K., Inagaki, M., Matsuoka, Y., Yoshikawa, E., Sugawara, Y., ... & Uchitomi, Y. (2014). Association between adjuvant regional radiotherapy and cognitive function in breast cancer patients treated with conservation therapy. *Cancer medicine*, 3(3), 702-709.
- Singh, U., Shevra, C. R., Singh, S., Singh, N., Kumar, S., & Rai, M. (2015). Interleukin-6 and interleukin-4 levels in multiple myeloma and correlation of interleukin-6 with β 2 microglobulin and serum creatinine. *Clin Cancer Investig J*, 4, 211-5.
- Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., & Goodman, M. (1980). Evolutionary diversity in the structure and activity of carbonic anhydrase. In *Protides of the Biological Fluids, Colloq* (Vol. 28, pp. 153-156).
- Turkoglu, S. A., Okuyan, D., & Kockar, F. (2019). TGF- β downregulates CAIII expression via MAPK and PI3K signaling pathways in colon carcinoma and osteosarcoma cells. *Archives of Biological Sciences*, 71(3), 393-401.
- Türkoğlu, S. A., Dayi, G., & Köçkar, F. (2020). Upregulation of PSMD4 gene by hypoxia in prostate cancer cells. *Turkish Journal of Biology*, 44(5), 275-283.
- Ueda, T., Shimada, E., & Urakawa, T. (1994). Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *Journal of gastroenterology*, 29, 423-429.
- Waldner, M. J., Foersch, S., & Neurath, M. F. (2012). Interleukin-6-a key regulator of colorectal cancer development. *International journal of biological sciences*, 8(9), 1248.
- Wegiel, B., Bjartell, A., Culig, Z., & Persson, J. L. (2008). Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *International journal of cancer*, 122(7), 1521-1529.
- Wei, L. H., Kuo, M. L., Chen, C. A., Chou, C. H., Lai, K. B., Lee, C. N., & Hsieh, C. Y. (2003). Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*, 22(10), 1517-1527.
- White, J. P., Puppa, M. J., Gao, S., Sato, S., Welle, S. L., & Carson, J. A. (2013). Muscle mTORC1 suppression by IL-6 during cancer cachexia: a role for AMPK. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 304(10), E1042-E1052.
- Wu, C. T., Chen, M. F., Chen, W. C., & Hsieh, C. C. (2013). The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer. *Radiation oncology*, 8, 1-11.
- Yeoh, G. C., Ernst, M., Rose-John, S., Akhurst, B., Payne, C., Long, S., & Matthews, V. B. (2007). Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation. *Hepatology*, 45(2), 486-494.
- Yuan, H., Liddle, F. J., Mahajan, S., & Frank, D. A. (2004). IL-6-induced survival of colorectal carcinoma cells is inhibited by butyrate through down-regulation of the IL-6 receptor. *Carcinogenesis*, 25(11), 2247-2255.
- Zou, M., Zhang, X., & Xu, C. (2016). IL6-induced metastasis modulators p-STAT3, MMP-2 and MMP-9 are targets of 3, 3'-diindolylmethane in ovarian cancer cells. *Cellular oncology*, 39, 47-57.