



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AKCİĞER KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE HİPOKSI
İNDÜKLENEBİLİR FAKTÖR-1 (HIF-1)
EKSPRESYONUNUN HÜCRENİN OKSİDAN VE ANTI-
OKSİDAN DURUMUYLA İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Duygu MEYDANCI

**Aralık 2014
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE HİPOKSI
İNDÜKLENEBİLİR FAKTÖR-1 (HIF-1) EKSPRESYONUNUN
HÜCRENİN OKSİDAN VE ANTI-OKSİDAN DURUMUYLA İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Duygu MEYDANCI

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Nedim KARAGENÇ

Aralık 2014
DENİZLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Duygu MEYDANCI tarafından Yrd.Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ yönetiminde hazırlanan “Akciğer Kanseri Hücre Dizilerinde Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1 (HIF-1) Ekspresyonunun Hücrenin Oksidan ve Anti-oksidan Durumuyla İlişkisinin Araştırılması” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Gamze GÖKÖZ DOĞU
(Pamukkale Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Hakan AKÇA
(Pamukkale Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
(Pamukkale Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
(Pamukkale Üniversitesi)



Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ
(Pamukkale Üniversitesi)

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

19.1.15 tarih ve 2-9 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Melek BOR-KÜÇÜKATAY

Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Duygu MEYDANCI

İmza :

ÖZET

AKCİĞER KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE HİPOKSİ İNDÜKLENEBİLİR FAKTÖR-1 (HIF-1) EKSPRESYONUNUN HÜCRENİN OKSİDAN VE ANTI-OKSİDAN DURUMUYLA İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MEYDANCI, Duygu
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi AD
Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ

Aralık 2014, 45 Sayfa

Oksijen ökaryotik yaşam için esansiyeldir. İnsanların ve diğer vertebralıların vücut büyüklüklerinin artması, dokulara ve hücrelere yeterli oksijen iletiminin sağlanması ve oksijen homeostazının sürdürülmesi için fizyolojik bir altyapı gerektirir. Azalmış oksijen seviyeleri anlamını taşıyan hipoksi, hem organizmada ve hem hücresele düzeyde çok farklı yanıtların oluşmasına sebep olur. Hipoksiye duyarlı bir transkripsiyon faktör olan hipoksi indüklenabilir faktör 1 alfa (HIF-1 α), çok sayıda genin transkribe edilmesini sağlayarak anjiyogenez ve metastazın başlamasına yol açar. Hipoksinin yanı sıra lipopolisakkarit (LPS) gibi çeşitli inflamatuvar ajanlar da HIF-1 α 'nın eksprese olmasını uyarabilirler. Oksidatif stres karsinogenezde önemli etiyolojik faktörlerden birisidir. Buna karşın paraoksonaz ailesi üyelerinden paraoksonaz 2 (PON2)'nin hücre içi antioksidan olarak görev yaptığı bildirilmiştir. Bu çalışmada tümör anjiyogenezinde önemli rol oynayan hipoksi indüklenabilir faktör 1 (HIF-1) transkripsiyon faktörünün hipoksik ve normoksik koşullarda hücrenin oksidatif durumu ve PON2 ile ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmalar sonucu LPS uygulamasının HIF-1 α ekspresyonunu uyardığı ve hipoksi koşullarında KHDAK hücre hatlarında PON2 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: HIF-1 α , PON2, LPS, Hipoksi

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2013SBE008).

ABSTRACT**INVESTIGATION OF ASSOCIATION OF HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR 1(HIF-1) EXPRESSION WITH OXIDANT AND ANTI-OXIDANT SITUATIONS OF LUNG CANCER CELL LINES.**

MEYDANCI, Duygu
M.Sc. Thesis in Medical Biology
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Nedim KARAGENÇ

December 2014, 45 Pages

Oxygen is essential for the eukariotic life. The increase in body size of humans and other vertebrates requires a physiological infrastructure to provide adequate delivery of oxygen to tissues and cells to maintain oxygen homeostasis. Hypoxia which means decreased oxygen levels causes several responses to be appeared both in organism and cellular grade. Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) that a transcription factor which is sensitive to hypoxia, causes to initiation of angiogenesis and metastasis by providing to transcribe of numerous genes. As well as hypoxia several inflammatory agents such as lipopolysaccharide (LPS) can stimulate to expression of HIF-1 α . Oxidative stress is one of the important etiologic factor in carcinogenesis. In spite of this, it was reported that paraoxonase 2 which is one of the members of paraoxonase family serve as the intracellular anti-oxidant. In this study it was aimed to investigate that PON2 and oxidative condition of the cell in hypoxia and normoxia with HIF-1 α transcription factor that has a role in tumour angiogenesis. As a result of this study is observed that LPS treatment stimulates HIF-1 α expression and increases PON2 expression in NSCLC cell line in under hypoxia conditions.

Keywords: HIF-1 α , PON2, LPS, Hypoxia

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2013SBE008.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden yararlandığım başta tez danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ'e,

Bu tez çalışmamda kullandığım materyallerin temin edilmesinde ve analizlerinde her türlü desteği sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya,

Tez çalışmam sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve kritik yorumlarını paylaşan değerli bölüm hocalarıma ve arkadaşlarım Hakan KÜÇÜKSAYAN ve Çağlar GÖNCÜ'ye,

Ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Amaç	3
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1 Akciğer Kanseri	4
2.2 Metastaz ve Anjiyogenez	5
2.3 Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1 (HIF-1)'in Moleküler Biyolojisi	7
2.3.1 Protein hidroksilasyonu ile HIF- α alt ünitelerinin regülasyonu	7
2.3.2 HIF-1 α ve Kanseri	11
2.4 Reaktif Oksijen/Nitrojen Türleri	12
2.5 Paraoksonazlar.....	13
2.6 Hipotez	15
3. GEREK VE YÖNTEMLER	16
3.1 Hücreler ve Hücre Kültürü	16
3.2 LPS Uygulaması.....	16
3.3 Protein İzolasyonu	17
3.4 Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonlarının Saptanması	17
3.4.1 Kullanılan Solüsyonlar	18
3.5 RNA izolasyonu	19
3.6 cDNA Elde Etme.....	19
3.7 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Çalışması	20
3.8 Oksidatif Stres Belirteci Olan MDA Seviyelerinin Tespiti	20
3.9 Verilerin Değerlendirilmesi	21
4. BULGULAR	22
4.1 Western Blot Çalışması	22
4.2 RT-PCR ile HIF-1 α ve PON2 Gen Ekspresyonlarının Araştırılması.....	25
4.3 MDA Seviyelerinin Tespiti Çalışması	30
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ	37
KAYNAKLAR	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Kanser oluşumu	2
Şekil 2.1 Akciğer kanseri histolojik sınıflandırması	4
Şekil 2.2 Kılcal damar filizlerinin oluşması	6
Şekil 2.3 HIF-1 α 'nın yapısı	8
Şekil 2.4 HIF-1'in normoksi ve hipoksi ile regülasyonu	9
Şekil 2.5 HIF-1 α 'nın regülasyonu	10
Şekil 3.1 Deneyleerde kullanılan hücre hatlarının ışık mikroskobu altında görüntüsü	16
Şekil 3.2 Bradford yöntemi sonucu elde edilen protein konsantrasyonları.	17
Şekil 3.3 450 nm'de MDA konsantrasyonları(pmol/mg) kalibrasyon eğrisi.....	21
Şekil 4.1 A549 hücre hatlarında PON2 ve HIF-1 α protein ekspresyon tayini.	22
Şekil 4.2 A549 hücre dizisinde kontrole oranla protein ekspresyonu değişimi.	23
Şekil 4.3 PC 14 hücre hatlarında PON2 ve HIF-1 α protein ekspresyon tayini.....	23
Şekil 4.4 PC14 hücre dizisinde kontrole oranla protein ekspresyonu değişimi.....	24
Şekil 4.5 H1299 hücre hatlarında PON2 ve HIF-1 α protein ekspresyon tayini.	24
Şekil 4.6 H1299 hücre dizisinde kontrole oranla protein ekspresyonu değişimi.	25
Şekil 4.7 A549 hücre hatlarında HIF-1 α mRNA ekspresyonu.....	26
Şekil 4.8 A549 hücre hatlarında PON2 mRNA ekspresyonunun gösterilmesi.....	26
Şekil 4.9 A549 hücre dizilerinde HIF-1 α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile gösterimi	27
Şekil 4.10 PC 14 hücre hatlarında HIF-1 α mRNA ekspresyonu	27
Şekil 4.11 PC 14 hücre hatlarında PON2 mRNA ekspresyonunun gösterilmesi	28
Şekil 4.12 PC 14 hücre dizilerinde HIF-1 α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile gösterimi.....	28
Şekil 4.13 H1299 hücre hatlarında HIF-1 α mRNA ekspresyonu	29
Şekil 4.14 H1299 hücre hatlarında PON2 mRNA ekspresyonunun gösterilmesi	29
Şekil 4.15 H1299 hücre dizilerinde HIF-1 α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile gösterimi	30
Şekil 4.16 Her hücre grubu için elde edilen MDA miktarları grafiği.	30

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1 cDNA elde etmek için kullanılması gereken miktarlar.	19
Tablo 3.2 cDNA elde etmek için kullanılması gereken miktarlar	20

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aFGF.....	Asidik Fibroblast Büyüme Faktörü
bFGF.....	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
bHLH.....	Bazik Sarmal Dönüş Sarmal
ECM.....	Ekstrasellüler Matriks
EGF.....	Epidermal Büyüme Faktörü
HDL.....	Yüksek Yoğunluklu Protein
HIF-1.....	Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1
HRE.....	Hipoksi Yanıt Elementi
LDL.....	Düşük Yoğunluklu Protein
LPS.....	Lipopolisakkarit
MMP.....	Matriks Metalloproteinazlar
mTOR.....	Memeli Rapamisin Hedefi
NADPH.....	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
ODDD.....	Oksijen Bağımlı Degredasyon Domaini
PDGF.....	Platelet kökenli Büyüme Faktörü
PHD.....	Prolil Hidroksilaz Domain
PON.....	Paraoksonaz
pVHL.....	Von Hippel Lindau Proteini
ROS/RNS.....	Reaktif Oksijen/Nitrojen Türleri
TIMP.....	Matriks Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri
uPAR.....	Ürokinaz Plazminojen Aktivatör Aktivatör Reseptör
VEGF.....	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Kanser, teknolojik gelişmeler büyük bir hızla ilerlemesine rağmen henüz tam olarak aydınlatılamayan ve dünya çapında önemli ölüm oranına sahip bir hastalıktır. Kanser alanında çok sayıda araştırma yapılmakta ve henüz aydınlatılamamış noktaları açıklanmaya çalışılmaktadır.

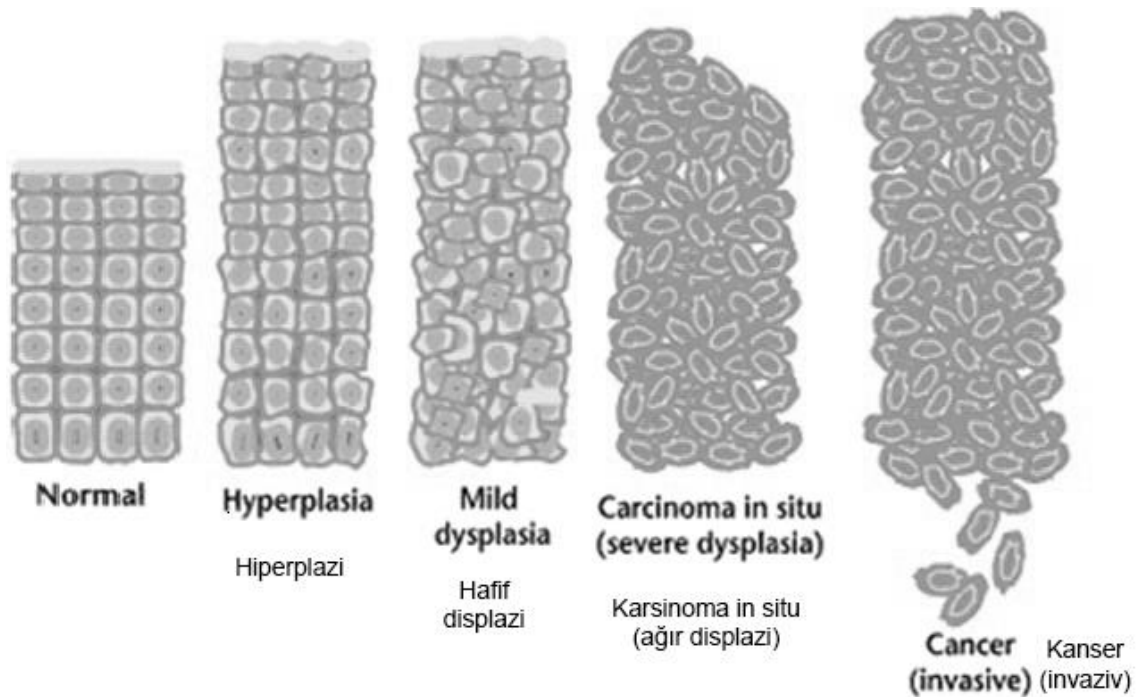
Kanser alanında yapılan araştırmalar normal vücut hücrelerine kıyasla kanser hücrelerinin çok sayıda değişim geçirdiğini göstermektedir. Kanser hücrelerinin geçirdiği bu değişiklikler kanser tipine ve kişiden kişiye göre farklılıklar göstermektedir.

Bilinen kanser risk faktörleri;

- Sigara tüketimi, birçok kanser türünün oluşumuyla direkt olarak ilişkilidir. Bu kanserlerden bazıları; mesane kanseri, akciğer kanseri, pankreas kanseridir.
- Enfeksiyonlar da kanser oluşumuyla ilişkilidir. Virüsler ve bakteriler kanser oluşumuna sebep olabilirler. *Helicobacter pylori* mide kanseri, hepatit B virüsü karaciğer kanserine neden olabilir.
- Radyasyona maruziyet de kanser oluşumuna sebep olabilir. Güneşin ultraviyole ışınlarına uzun süreli maruziyet cilt kanserlerinin oluşumuna sebebiyet verebilir. İyonize radyasyon da lösemi, tiroid, meme kanseri oluşumunda etkilidir (Web_1).

Hücreler vücudun en küçük birimleridir ve bir araya gelerek dokuları oluştururlar. Her hücre, genleri barındırır ve genler; tamir, büyüme ve gelişmeden sorumludur. Hücrenin yaşamı, ölümü, bölünmesi ya da sinir, kas hücresi gibi özelleşmiş görevleri üstlenmesi bu genler tarafından kontrol edilir.

Normal hücrelerin değişiklikler geçirerek kanser hücresine dönüşme süreci karsinogenez olarak adlandırılmaktadır ve Şekil 1.1'de görüldüğü gibi karsinogenez çok adımlı bir süreçtir.



Şekil 1.1 Kanser oluşumu (Web_2)

Genlerde mutasyonların olması, hücrelerde süregelen kontrolün bozulmasına neden olur. Bu durumun oluşması hücrelerin ölmemesine yol açarken, vücudun ihtiyacı olan bu hücreler tümör adı verilen bir kütle oluşumuna sebep olur.

Tümörler iyi huylu (benign) ya da kötü huylu (malign) olabilir. Kötü huylu tümörler çevre dokulara yayılmaya eğilimlidir ve vücudun diğer bölümlerine gidebilirler. İyi huylu tümörler ise yayılmaya eğilimli değildirler.

İyi huylu ve kötü huylu tümörlerin her biri oluştukları hücreye göre adlandırılırlar. Karsinoma, sarkom, lenfoma ve lösemi olarak sınıflandırılırlar. Karsinomalar epitel hücrelerde, sarkoma; kas, kemik kıkırdak doku hücrelerinde oluşur.

Sık görülen bir patolojik özellik olarak hipoksi, azalmış ya da yetersiz oksijen desteği nedeniyle solid tümörlerde yaygın olarak gözlenir. Hipoksik adaptasyonun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan hipoksi indüklenebilir faktör 1 (HIF), inflamatuvar yanıtla da indüklenebilir. Anti-oksidan etkisi olan paraoksanaz enzim (PON) ekspresyonu da inflamatuvar yanıt oluşturan lipopolisakkarit (LPS) ile aktive olmaktadır.

1.1 Amaç

Bu çalışmada akciğer kanseri hücre hatları kullanılarak, tümör anjiyogenezinde önemli bir rol oynayan hipoksi indüklenebilir faktör 1 transkripsiyon faktörünün hipoksik ve normoksik koşullarda hücrenin oksidatif durumuyla ve PON ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

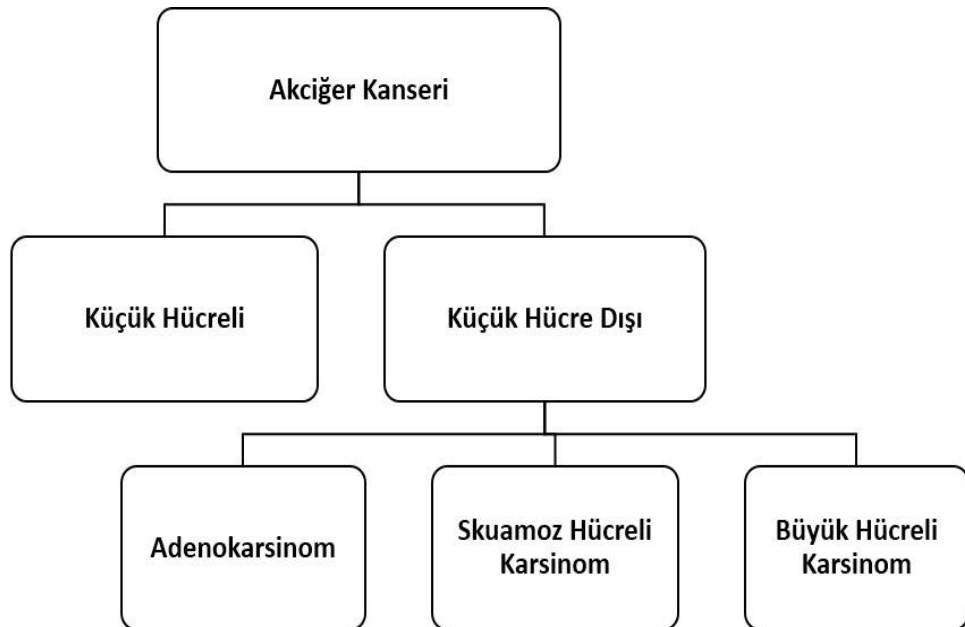
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanserleri tüm dünyada, kadın ve erkek bireylerde kanser ilişkili ölümlerin en önemli nedenidir.

Akciğer kanserinin iki tipi olan küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) farklı şekillerde büyür ve yayılırlar. Bu sınıflandırma tümör hücrelerinin mikroskopik görüntülerine dayanarak yapılır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2004 yılında yaptığı sınıflandırmasına göre, primer akciğer kanserinin dört ana histolojik hücre tipi vardır; adenokarsinom (%38,3), skuamoz hücreli karsinom (%19,7) büyük hücreli karsinom (%5) ve küçük hücreli karsinomdur (%13) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Akciğer kanseri histolojik sınıflandırması

KHAK tüm akciğer kanserlerinin %20'sini kapsar ve vücutta birçok bölgeye metastaz yapabilir. KHAK direkt sigara kullanımı ile ilişkilidir ve sadece %1 oranında sigara içmeyenlerde görülür.

KHDAK akciğer kanserinin daha yaygın olarak görülen tipidir ve tüm akciğer kanserlerinin %80'i oranında görülür. KHDAK tümörde bulunan hücre tiplerine bağlı olarak üç ana tipte görülür.

- Adenokarsinoma
- Skuamoz hücreli karsinom
- Büyük hücreli karsinom

Akciğer kanseri kontrol edilemeyen büyüme, apoptoza direnç, tümör anjiyogenezi, doku invazyonu ve uzak metastaz ile sonuçlanan genetik değişikliklerin kazanılmasıyla adım adım gelişir.

2.2 Metastaz ve Anjiyogenez

Primer bir tümörün malignant bir karakter kazanabilmesi için gerçekleştirmesi gereken en önemli basamaklar olan invazyon ve metastaz süreçleri, hala yeterli seviyede anlaşılmış değildir.

Metastaz, primer tümörün damar ağlarını kullanarak sekonder tümör oluşturmak amacıyla diğer dokulara yayılmasıdır. Kanser hücrelerinin metastatik lezyonlar oluşturabilmeleri için kan ve lenf damarları aracılığıyla taşınmaları esastır.

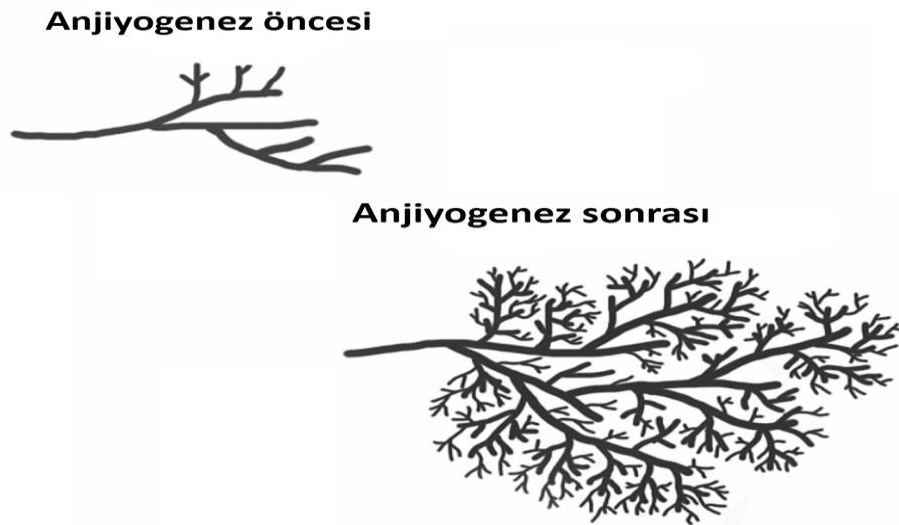
Temel olarak metastaz şu olaylar silsilesinden oluşur:

- * Proteolitik enzimler aracılığıyla ekstrasellüler matriksin (ECM) degradasyonu ve tümör hücrelerinin ECM'den ayrılması.
- * Bazal membran ve stromaya invazyon
- * Kan dolaşımına ya da lenfatik damarlara intravazasyon
- * Kan dolaşımı boyunca taşınma ve bu taşınma süresince hayatta kalma
- * Distal bölgede ekstrasvazasyon ve metastatik lezyonun oluşumu

Anjiyogenez, mevcut damarlardan yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Anjiyogenez sadece kanser hücreleri için gerekli bir mekanizma değildir. Embriyogenez boyunca gelişim için önemlidir. Erişkinlerde yara iyileşmesi ve dişi üreme döngüsü gibi durumlarda çalışır.

Anjiyogenez başlıca kemik iliği kökenli endotel hücre öncülleri tarafından gerçekleştirilir. Endotel hücreleri embriyonik mezodermden oluşur. Kan damarlarının oluşumu bu süreçte başlamaktadır. Bütün kan damarlarının iç yüzeyi tek katlı yassı hücre tabakası olan endotel ile döşelidir. Görevi doku ile kan arasındaki madde alışverişinin sağlanmasıdır. Endotel hücreleri sadece gelişen kan damarlarının iç örtüsünü yenilemek ve onarmakla kalmaz, yeni kan damarı oluşumunda da görevlidir.

Kanser dokularının da normal dokular gibi kan desteğine gereksinim duyması endotel hücre biyolojisine ilginin artmasına neden olmuştur.



Şekil 2.2 Kılcal damar filizlerinin oluşması (WEB_3)

Yeni bir kılcal damar oluşturacak olan endotel hücreleri var olan bir kılcal damarın kenarından uzun yalancı ayaklar uzatıp büyür ve bir tüp şeklindeki kılcal damar filizinin oluşmasını sağlar (Şekil 2.2). Bu işlem, oluşan filiz başka bir kılcal damarla karşılaşmış birleşerek kanın dolaşımını sağlayana kadar devam eder.

Anjiyogenik sinyaller, hem anjiyogenik faktörlerin üretimini kontrol eden genlerin mutasyonlarının bir sonucu oluşabilir; hem de tümör hipoksisi gibi malignant şartlara bir fizyolojik cevap olarak da ortaya çıkar.

Anjiyogenezin inhibe etme ya da indüklemeye yeteneğine sahip çok sayıda faktörün varlığı çok sayıda farklı yolak olduğunu gösterir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) tek olmamakla birlikte tümör vasküler yatağın genişlemesine neden olan primer faktördür.

Anjiyogenez geniş bir inhibitör ve aktivatör ağındaki dengeyle düzenlenir. En önemli düzenleyiciler sitokinler, asidik (aFGF) ve bazik (bFGF) fibroblast büyüme faktörü, VEGF, CXC kemokinler, anjiopietin/TIE ligand-reseptör sistem, anjiyostatin, endostatin gibi peptidler, trombospondin 1, PDGF, EGF ve hipoksi indüklenebilir faktör (HIF-1 α /2 α)'dır.

Anjiyogenez, yara iyileşmesi, doku ya da organ yenilenmesi gibi süreçlerin yanı sıra kanser gibi patolojik süreçlerde de gerçekleşir ve çok sayıda gen, regülatör ve yolak ile düzenlenir. Nitrik oksit sentaz, anjiyogenik ve vasküler büyüme faktörleri (VEGF) gibi çok sayıda gen direkt olarak HIF-1 α tarafından indüklenir.

Anjiyogenezin basamakları çok sayıda hücrede farklı değişiklikler gerektirir. HIF-1 α sinyal yolağının ürokinaz plasminojen aktivator reseptör (uPAR), kollajen proli-4-hidroksilazlar, matriks metalloproteinazlar (MMP) ve matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) gibi faktörleri etkilediği gösterilmiştir (Fukuda vd 2007).

Anjiyogenezin başlaması için gerekli olan en önemli gen VEGF'tir ve bu genin transkribe edilmesi HIF-1 α tarafından indüklenir.

2.3 Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1 (HIF-1)'in Moleküler Biyolojisi

Oksijen ökaryotik yaşam için esansiyeldir. İnsanların ve diğer vertebralıların vücut büyüklüklerinin artması, dokulara yeterli oksijen iletiminin sağlanması ve oksijen homeostazının sürdürülmesi için fizyolojik bir altyapı gerektirir.

Hipoksi ya da oksijen seviyesinin azalması hücresele düzeyde çok sayıda değişikliğin oluşmasıyla sonuçlanır. Hipoksi embriyonik gelişim gibi doğal fizyolojik süreçlerde oluşmasının yanı sıra inflamasyon, solid tümör oluşumu gibi patofizyolojik durumlarda da ortaya çıkar (Lou vd 2010). Kanserlerde tümör büyümesinin önemli bir sonucu olarak hipoksi oluşur ve hipoksi anjiyogenezin de uyarıcısıdır. Hipoksik tümörler belirgin şekilde daha kötü huylu, metastatik radyo ve kemorezistanttır (Airley ve Mobasher 2007). Hipoksi anjiyogenezi, bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi indüklenebilir faktör (HIF) yoluyla uyarır ve HIF sistemi tüm memeli hücrelerde rol oynamaktadır.

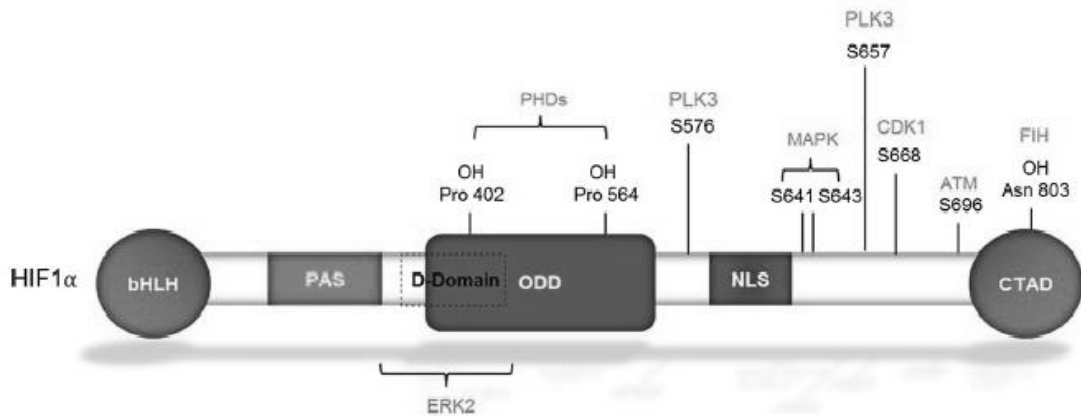
HIF aracılı yollar metabolik adaptasyonu, eritropoiesisi, anjiyogenezi, vasküler tonu, hücre büyümesi ve farklılaşmayı, sağkalımı ve apoptozu ve böylece gelişmede, fizyolojide ve hastalıkta kritik faktörleri etkiler (Maxwell vd 2001).

HIF başlıca, bilinen üç izoformu bulunan, alfa alt ünitesi seviyesinde düzenlenen bir heterodimerik transkripsiyon faktörüdür. Beta alt ünitesi olan HIF- β (aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator – ARNT olarak bilinir) esas olarak eksprese edilir ve nükleusta bulunur. HIF- α alt üniteleri oksijene duyarlıdır ve normoksi koşullarında çok kısa ömürlüdür.

2.3.1 Protein hidroksilasyonu ile HIF- α alt ünitelerinin regülasyonu

Normoksi koşullarında HIF- α alt üniteleri çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Hücreler HIF- α proteinini sentezler ve degrade eder. Bununla birlikte, oksijenin azalan konsantrasyonlarında HIF- α degradasyonu yavaşlar. Bu noktada HIF- α 'ya strese yanıt veren alt ünite denilebilir.

HIF- α 'nın HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α olmak üzere üç temel izoformu bulunur. Hepsi farklı gen bölgesi tarafından kodlanır ve daha sonraki çeşitliliği alternatif promotor işleviyle ve splasys modelleriyle düzenlenir. HIF-1 α ve HIF-2 α benzer domain yapısını paylaşır ve benzer proteolitik regülasyon geçirirler. Bununla birlikte HIF-2 α 'nın doku ekspresyonu daha sınırlıdır (Wiesener 2003). HIF-1 α ve HIF-2 α C-terminal transaktivasyon domaini içerirken HIF-3 α içermez. Her üç izoform oksijen bağımlı degradasyon domaini (ODDD) içerir (Şekil 2.3). HIF-3 α ile ilgili yapılan araştırmalar, HIF-3 α 'yı HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın dominant negatif inhibitörü gibi davrandığını önerir (Makino vd 2001). HIF-1 α ve HIF-2 α benzer hedef genlere sahiptir.



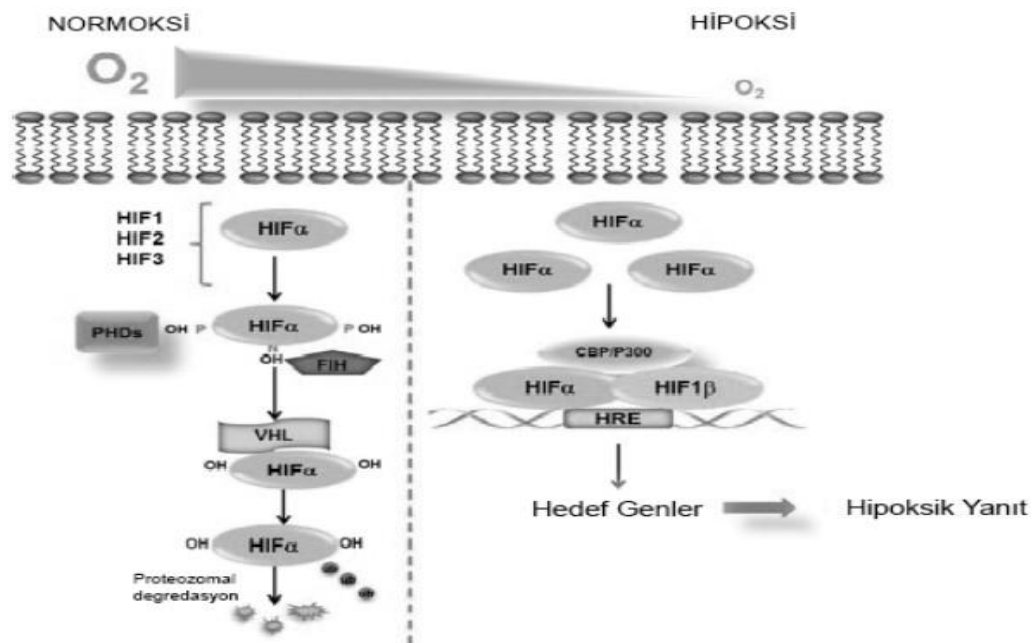
Şekil 2.3 HIF-1 α 'nın yapısı (Ortmann vd 2014)

HIF- α alt ünitelerinin ifadesi hidroksilasyon bağımlı proteosomal degradasyon yoluyla post transkripsiyonel olarak düzenlenir. Ayrıca HIF-1 α , NF- κ B tarafından transkripsiyon seviyesinde ve memeli rapamisin hedef m(TOR) tarafından transkripsiyon seviyesinde düzenlenir (van Uden vd 2011, Rius J vd 2008, Hudson vd 2002, Toschi vd 2008)

HIF-2 α prolin 405 ve 564'den hidroksillenirken, oksijen varlığında prolin hidroksilaz enzimleri (PHD1, PHD2 ve PHD3) HIF-1 α 'nın oksijen bağımlı degradasyon domaininde (ODDD) 402 ve 564 prolin rezidülerinin demir bağımlı hidroksilasyonunu katalizler (Bruick ve McKnight 2001, Weidemann ve Johnson 2008). Bu, HIF-1 α poli ubiquitinlenmesini ve daha sonra 26S proteosom tarafından degradasyonu destekleyen von Hippel Lindau proteini (pVHL) ile hidrojen bağlanmasına olanak sağlar (Jaakkola vd 2001). pVHL, übikitin-proteozom yolağıyla proteolizis için HIF- α 'yı hedefleyen bir E3 übikitin ligaz kompleksinin tanıma bileşenidir (Maxwell vd 1999, Ohh vd 2000). Kompleksin diğer bileşenleri diğer E3 übikitin ligaz komplekslerine de katılan elongin B, elongin C, Rbx1 ve Cul2'dir. Bir prolin-serin-triyonin zengin protein stabilizasyon domaini, HIF- 1 α 'nın 429 ve 608 amino asitleri arasına yerleşmiştir (Salcedo ve Caro

1997) ve alt üniteler dimerizasyon ve DNA bağlanması için gerekli bazik sarmal-dönüş-sarmal (bHLH) ve PER-ARNT-SIM (PAS) domainleri ile görülür

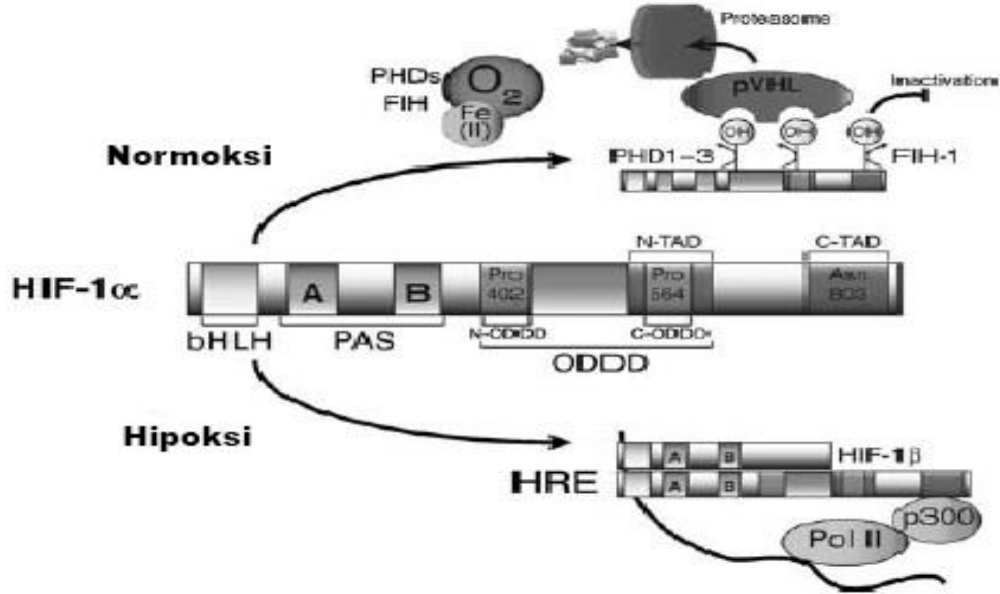
Hipoksik koşullarda prolin hidroksilasyon baskılanır, HIF- α proteini proteozomal yıkımdan kaçır ve birikir. Nükleusa transloke olur ve HIF- 1 β ile dimerize olur. Heterodimerik transaktive kompleks HIF hedef genlerin promotor ya da enhansır sekanslarında bir çekirdek 5'-[A/G]CGTG-3' konsensus sekansı içeren hipoksi yanıt elementine (HRE) bağlanır ve çok sayıda genin ifade edilmesi başlamış olur (Wenger vd 2005)(Şekil 2.4). HIF-1'in hedef genlerinin, oksijen ulaşılabilirliğini geliştirmede (Semenza 2003, 2010, 2012), glukoz metabolizmasını mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan anaerobik glikolize dönüştürmede ve laktik asit fermantasyonunda ve radyasyon sonrası tümör nüksetmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Harada 2007, 2009, 2012, Yeom 2012).



Şekil 2.4 HIF-1'in normoksi ve hipoksi ile regülasyonu (Ortmann vd 2014).

HIF modifiye edici enzimler *Caenorhabditis elegans*'da egl-9'e bağlı olarak tanımlanmıştır ve prolin hidroksilaz domain (PHDler) enzimleri (PHD1-PHD3) olarak adlandırılmıştır (Bruick ve McKnight 2011, Epstein vd 2001). PHD'ler moleküler oksijeni ayıran non-hem Fe(II)- ve 2-oksoglutarat-bağımlı dioksigenazlardır. Bir oksijen atomu prolin rezidüsünde ürün olarak diğer reaktifler CO₂ ve süksinat veren 2-oksoglutaratla HIF- α peptidi içine girer. Hipokside HIF prolini modifiye edilmemiş olarak kalır. Hipoksinin etkileri dimetil-oksaliglisin gibi 2-oksoglutarat analoglarının kullanımı ya da kobalt gibi metal iyonlarıyla Fe(II)'nin yerleşmesi gibi demir şelasyonuyla taklit edilebilir.

PHD aktivitesi α -ketoglutarat ve Fe^{2+} gibi moleküler kofaktörler gerektirir. Oksijen duyarlılığı PHDleri hücrel oksijen seviyeleri için mükemmel sensörler haline getirir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 HIF-1 α 'nın regülasyonu (Weidemann ve Johnson 2008).

HIF- α alt ünitesinin ODDD'i her ikisi de pVHL ile bağımsız olarak etkileşen bir N-terminal (N-ODDD) ve bir C-terminal (C-ODDD) (Huang vd 1998, Pugh vd 1997) bölümü içerir (Masson vd 2001). Dahası HIF-1 α ve HIF-2 α 'da iki transaktivasyon domaini (TAD) tespit edilmiştir: bir N-terminal TAD (C-ODDD ile üst üste gelen) ve bir C-terminal TAD (Jiang vd 1997). ODDD'de prolin modifikasyonu ile HIF- α stabilitesinin regülasyonunun aksine transkripsiyonel aktivite, bir C-terminal asparagin rezidüsünün hidroksilasyonu ile düzenlenir (insan HIF-1 α 'sında Asn 803) (Lando vd 2002). Hidroksilasyon reaksiyonu faktör inhibe eden HIF (FIH) olarak adlandırılan bir asparaginil hidroksilaz tarafından yürütülür ve bu modifikasyon transkripsiyonel koaktivatör p300'ün CH-1 domainiyle HIF- α C-TAD'ın etkileşimini engeller (Hewitson vd 2002, Lando vd 2002). Böylece protein-protein etkileşimine izin veren prolin hidroksilasyonunun tersine, asparaginil hidroksilasyonu protein toplanmasını engeller.

HIF; metabolizma, otofaji, apoptoz, anjiyogenez ve hücre proliferasyonu gibi süreçlerde rol alan çok sayıda hedef geni düzenler (Kim vd 2006, Tracy vd 2007). Birçok kanser tipinde anormal bir HIF aktivitesi görülür. Solid tümörler aşırı derecede hipoksiktir ve bu bölgelerdeki hücreler kemo ve radyoterapiye karşı dirençlidir (Liu vd 2008).

Hipoksiye ek olarak çok sayıda onkogenik ve inflamatuvar stimülasyon, HIF-1 α toplanmasını ve aktivasyonunu up regüle eder (Metzen vd 2003, El Awad vd 2000, Hellwig-Burgel vd 1999). Yakın zamanda, immün yanıtın inflamasyon ve aktivasyonunda HIF-1 α 'in önemli bir rolü olduğu önerilmiştir (Cramer vd 2003, Peyssonau ve Johnson 2004). Çeşitli grupların yaptığı çalışmaların sonuçları, HIF'lerin hipoksi ve inflamasyon koşullarında birleştirici bir rol oynadığının kanıtını sağlamıştır. Sang ve arkadaşları (2003) yaptıkları bir çalışmada HIF-1 aktivitesinin yükselirken kullandığı yolağın fosforilasyonunu, monosit ve makrofajlarda, bakteriyel lipopolisakkaritin (LPS) güçlü bir şekilde indüklediği gözlenmiştir (van der Bruggen vd 1999; Chu vd 2001).

Lipopolisakkaritler bakterilerde endotoksik dış membran olup, fagositler üzerindeki TLR-4 ile etkileşmekte ve sistemik dolaşıma salınan IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α yangısal sitokinlerinin üretimini teşvik etmekte ve inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS/RNS) HIF-1 α regülasyonunun stabilitesinde ve normoksi sürecinde HIF-1 transaktivasyonunda rol oynadığını göstermiştir. Bazı çalışmalar ROS ekspresyonunun hipoksida arttığını gösterirken bazıları azaldığını göstermiştir. Hipoksida artan HIF-1 α ekspresyonunun mitokondriyal aktiviteye (Agani vd 2000) ve belirli bir şekilde ROS oluşumuna katkıda bulunduğu bulunmuştur (Chandel vd 2000, Guzy vd 2005, Schroedl vd 2002). Ancak HIF-1 α 'da azalış görülürken ROS'da artış görülen çalışmalar da mevcuttur (Callapina vd 2005, Wartenberg vd 2003).

2.3.2 HIF-1 α ve Kanser

HIF-1 α tarafından indüklenen çok sayıda gen kanserde normal dokularda olduğundan çok daha yüksek seviyelerde eksprese edilir. Bunlardan en önemlileri VEGF gibi anjiyogenik faktörler ve glukoz metabolizmasındaki enzimlerdir. Kanser metabolizması belirgin şekilde HIF-1 α tarafından indüklenir

HIF aktivasyonu tümörlerin genel özelliğidir. Proliferasyon, hipoksi ve anjiyogenez, oksijen desteğinin sürdürülmesine göre dizayn edilmiş fizyolojik yollarla ilişkilidir.

Tümörlerde HIF aktivasyonunun mekanizması oldukça komplekstir. HIF- α aktivitesi hipoksik tümör mikroçevresinden etkilenebilmektedir. Tümör baskılayıcı genler de hipoksik HIF- α indüksiyonu etkilemektedirler. Bunun yanı sıra büyüme faktörlerinin HIF sistemi üzerinde pozitif bir etkisi bulunmaktadır. İnsülin (Zelzer vd 1998), insülin benzeri büyüme faktörleri (Feldser vd 1999), platelet kökenli büyüme

faktörleri (PDGF) (Richard vd 2000) gibi çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin HIF-1 α protein sentezini indükleyebilmektedir.

Stres granüllerinden salınan radyasyon HIF-1 α mRNA'sının translasyonunu kuvvetlendirerek HIF-1 α 'yı indükleyebilir (Moeller vd 2004). Bu etki in vivoda serbest radikal üretimine bağlıdır.

HIF-1 α aktivasyonu sadece metabolik ya da anjiyogenik yolları ayarlamakla kalmaz, aynı zamanda tümör yayılmasında ve metastazla ilişkilidir. Bunlar karmaşık ve çok adımlı süreçlerdir. Bu adımlar çok sayıda genin ekspresyonunu ve etkileşimi gerektirir.

HIF-1 α tümör progresyonu ve metastazında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca HIF-1 α sadece hipoksik adaptasyonda değil birçok hücre tipinde fizyolojik fonksiyonda önemlidir.

Kanser ve HIF-1 α alanında yapılan çalışmalar göstermiştir ki HIF-1 α , kanser oluşumuna katkıda bulunan esas element olmakla kalmaz, kanser progresyonunda da görev almaktadır.

2.4 Reaktif Oksijen/Nitrojen Türleri

Reaktif oksijen/nitrojen türleri (ROS/RNS) oksijen iyonları (O^{2-}) ve peroksitler (H_2O_2) gibi kimyasal olarak reaktif moleküllerdir ve biyolojik sistemlere faydalı ya da zararlı olabilir. ROS'un faydalı yanlarından biri mitojenik yanıtı uyarabilmesidir. Düşük konstanrasyonlarda olduğunda hücre sel sinyalde görev alırlar. Bunun yanında insan patofizyolojik süreçlerinde önemli rol oynayan ROS, hücrede bir kez üretildiğinde DNA'ya, proteinlere, lipitlere, hücre yapısına ve membrana zarar verebilmektedir.

Daha önceki çalışmalar mitokondrinin oksijen duyarlılığına katkısı olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalara göre, mitokondri orta dereceli (%1,5) hipokside, PHD aktivitesini ve HIF α degradasyonunu baskılayan hücre sel reaktif oksijen türlerinin üretimini uyarır (Kaelin 2005, Klimova ve Chandel 2008). Prolil hidroksilasyonlu HIF α ve intrasellüler ROS arasında ters bir ilişki olduğu farklı araştırma grupları tarafından açıklanmıştır. ROS'un PHD aktivitesini etkileyebildiği sitozolün yanı sıra hipoksi indüklü oksidanlar, mitokondrinin iç membranında da görülürler (Waypa vd 2010). Bu bulgular mitokondrinin PHD aktivitesini düzenlemek için ROS ürettiği fikrini destekler.

ROS migrasyon, apoptoz, vasküler proliferasyonun düzenlenmesi gibi süreçlere katılır. Ayrıca ROS'un anjiyogenezi aktive ettiği de gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalar HIF-1 α arttığında ROS'un azaldığını gösterirken, bazı çalışmalar ise hipokside ROS'un

arttığını göstermiştir. Ayrıca Fe^{+2} ve H_2O_2 gibi ajanlarla ROS'un HIF 1 yolağını etkilediği de bulunmuştur.

ROS, oksijen seviyeleri çok azaldığında PHD aktivitesini düşürür. PHD fosforilasyonunu değiştirerek ya da direk PHDlere bağlanıp oksijene ulaşılabilirliği değiştirerek de HIF yolağını etkilemektedir.

ROS endojen ve eksojen kaynaklı olarak üretilebilir. Sitokrom p450 mekanizması endojen ROS kaynağıdır. Ayrıca hücresele ROSlara makrofajlar örnek verilebilir. Eksojen kaynaklar ise radyasyon, ilaçlar, sigara tüketimi olabilir.

Lipit peroksidasyonu hücresele hasarın iyi açıklanmış bir mekanizmasıdır. Lipit peroksitleri hücrelerde malondialdehit (MDA) gibi reaktif bileşenlerden oluşan oksidatif stres indikatörleridir. Lipit peroksidasyonunun bu aldehitik sekonder ürünleri genel olarak oksidatif stres belirteçleri olarak kabul edillirler.

MDA, proteinlere bağlanma ve stabil eklentiler oluşturma yeteneğine sahiptir ve MDA tarafından gerçekleştirilen bu modifikasyonlar proteinlerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere sebep olabilir.

2.5 Paraoksonazlar

Paraoksonaz (PON) ailesi, PON1, PON2 ve PON3 adları verilen üç farklı genden oluşur. Kromozom 7q21.3–22.1'de lokalizedirler (Rowles vd 1996).

PON'lar %70 oranında nükleik asit benzerliğini paylaşırlar ve bir ana öncüden köken alırlar (Sorenson 1995, Primo-Parmo vd 1996).

Oksidatif stres, karsinogenezde önemli etiyolojik faktörlerden birisidir. Buna karşın PON1, endojen serbest radikal temizleyici sistemler arasında yer aldığından farklı kanserlerin etiyoloji ve önlenmesindeki rolüne ilgi duyulmuştur. Elkıran ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında, serum PON1 aktivitesinin akciğer kanserli hastalarda sağlıklı kişilerden anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Benzer bir vaka-kontrol çalışmasında Lee ve arkadaşları (2005) PON1 geni Q/Q genotipini taşıyan 177 hastada akciğer kanseri gelişme riskinin anlamlı olarak artmış olduğunu göstermiştir.

PON1 bu ailenin en çok çalışılan üyesidir. PON1 proteini genellikle karaciğerde sentezlenir ve plazmaya salgılanır. 43 kDa'luk, esteraz ve laktonaz aktivitesi gösteren yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ilişkili bir enzimdir. Kolesterolü periferel dokulardan karaciğere taşıyan HDL'nin aynı zamanda PON1 vasıtası ile antioksidan gücü olduğu çalışmalarla gösterilmiştir.

PON1'in organofosfat, arilesteraz ve laktonaz aktivitesi olmasının yanında farklı substratları hidrolize etmektedir. Ayrıca antiaterojenik aktiviteye sahiptir ve HDL ve

düşük yoğunluklu proteini (LDL) oksidasyondan korur. lipoproteinlerdeki ve arter hücrelerindeki biyolojik aktif okside lipitleri yok eder (Draganov 2004, Aviram 2004, Su vd 2009).

PON1 lipit metabolizmasında ve ateroskleroz gelişimine karşı korunmada önemli fizyolojik rol oynayan bir enzimdir. Ayrıca vasküler dokuları oksidatif hasardan korumaktadır (Aviram 1999, Durrington vd 2001). Saflaştırılmış PON1 LDL kaynaklı oksidatif hasara karşı koruma sağlar (Aviram vd 1998, Navab vd 2002). Dahası saflaştırılmış tavşan serum PON3'ü bakır indüklü LDL oksidasyonuna karşı PON1'den daha koruyucu olduğu bulunmuştur (Draganov vd 2000).

PON2 birçok dokuda bulunmuş ve anti-oksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. PON2 LDL'yi oksidasyona karşı korur (Rosenblat vd 2003). Böylece PON2'nin bir fonksiyonu hücreleri oksidatif stresten korumak için hücresele anti-oksidan olarak davranmak olabilir. PON1'in tersine PON2'nin paraokson gibi organofosfatları hidrolize etme yeteneği yoktur.

PON3 40 kDa ağırlığında HDL ile ilişkili bir proteindir. Primer olarak karaciğerde sentezlenir. PON ailesinin en son keşfedilen üyesidir. Çeşitli çalışmalar PON3'ün oksidasyona ve inflamasyona karşı koruduğunu gösterir (Draganov vd 2000). PON3 geninde 311 ve 324 pozisyonlarında iki polimorfizm keşfedilmiştir.

Son yıllarda çalışmalar PON2 üzerine yoğunlaşmıştır. PON2 hücre içi bir proteindir ve karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, plasenta, mide, testis, dalak, pankreas, ince bağırsak, iskelet kası, arteriyel duvar hücresi ve makrofajlar gibi birçok dokuda eksprese edilir (Ng vd 2001, Levy vd 2007). Amino asit sekansları birbirine benzemesine karşın, PON2'nin biyolojik fonksiyonları PON1 den farklıdır. PON2 düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu önlediği yapılan çalışmalar sonucu bulunmuştur. Ayrıca PON2 hücrenin intrasellüler oksidatif stresini azaltma yeteneğine sahiptir.

PON2 yaklaşık 43 kDa ağırlığında 355 amino asitlik bir proteini kodlayan dokuz ekzondan oluşur. PON2 geni çok sayıda transkripsiyon başlangıç bölgesi içerir ve PON2'nin farklı mRNA formlarıyla sonuçlanan alternatif birleştirme olabilir (Mochizuki vd 1998).

PON2 geninin 148 ve 311. pozisyonlarında amino asit yer değiştirmesiyle sonuçlanan iki ana polimorfizm tanımlanmıştır (Mochizuki vd 1998).

Yapılan araştırmalar PON2 transkriptlerinin akciğer, kalp, karaciğer, plasenta ve testiste bulunduğunu göstermiştir (Ng vd 2001).

Son yıllarda birçok çalışma oksidatif stres ve PON2 ekspresyonunun artışına odaklanmıştır. Çünkü PON2 hücre içi anti oksidan olarak görev yapmaktadır. İn vitro ve in vivo çok sayıda çalışma PON2 ekspresyonu ve enzimatik aktivitesinin oksidatif stres süresince farklı hücre tiplerinde, hayvan modellerinde ve hiper kolestrolemik hastalarda arttığını göstermiştir (Shih vd 1996 - 1998, Forte vd 2002; Rosenblat vd 2003, 2004). Oksidatif stresi indükleyen çok sayıda ajanla muamele edilmiş fare peritoneal makrofajları (MPMler) PON2 ekspresyonunu ve laktonaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Rosenblat vd 2003). Shiner ve arkadaşları (2004) monosit/makrofaj farklılaşması süresince nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın (NADPH) varlığına bağlı olarak PON2 ekspresyonunda yaklaşık yedi kat artış gözlemlemişlerdir ve bu fenomenin hücrel oksidatif streste artışının ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir (Shiner vd 2006).

PON2 ekspresyonu yüksek kolestrole ve glukoz seviyelerine bağlı oksidatif stres artışıyla karakterize metabolik rahatsızlıklar gibi patolojik durumlarda araştırılmış ve hepatic PON2 mRNA seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (Forte vd 2002).

Çeşitli çalışmalar insan monosit kökenli makrofajlarda (HMDMler) farmasötik bileşiklere yanıt olarak PON2 ekspresyonunda artış gözlemlerken (Rosenblat vd 2004), LPS gibi proinflamatuvar ajanların insan bağırsak Caco-2/15 hücrelerinde PON2 ekspresyonunu düşürdüğünü göstermiştir (Precourt vd 2009).

PON2 over eksprese edilmiş Hela hücrelerinin hidrojen peroksida ya da okside fosfoliplere maruziyetinin, ROS seviyelerini azaltarak intrasellüler oksidatif stresi düşürdüğü, LDL lipit peroksidasyonunu önlediği, hafif okside LDL (MM-LDL) oksidasyonunu geri çevirdiğini ve MM-LDL'nin monosit kemotaksisini indükleme yeteneğini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Ng vd 2001).

2.6 Hipotez

Bu literatür bilgileri ışığında, küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre dizilerinde bu çalışmada HIF-1 α ve PON2 ekspresyonlarının ilişkisinin ortaya çıkarılacağı hipotez edilmiştir.

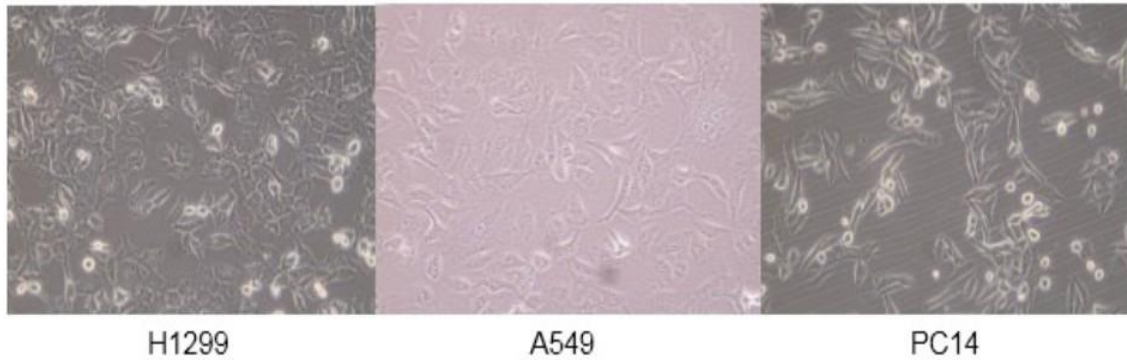
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Hücreler ve Hücre Kültürü

Bu projede insan küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) hücre hatları olan H1299, A549 ve PC14 (Şekil 3.1) kullanılmıştır. Bu hücreler;

- PC 14 → EGFR mutasyonu
- A549 → KRAS mutasyonu
- H1299 → p53 mutasyonu olmak üzere farklı mutasyonlara sahiptir.

A549 hücreleri %10 Fetal Bovine Serum ve % 0,5'lik penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi ortamında, H1299 ve PC14 ise %10 Fetal Bovine Serum ve % 0,5'lik penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besi ortamında inkübe edilmişlerdir. Bu hücreler 37°C'de %1 %5 CO₂ ve %95 N₂ oranlarındaki gaz karışımı ile modüler inkübatör chamber yoluyla hipoksi ortamına maruz bırakıldı. Ayrıca normoksik kontrol grupları da 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava ortamında inkübe edilmiştir.



Şekil 3.1 Deneylerde kullanılan hücre hatlarının ışık mikroskobu altında görüntüsü.

3.2 LPS Uygulaması

1 mg/ml olan ana stoktan 100 µl alınıp serum fizyolojik ile 1000ml'ye tamamlanarak elde edilen ara stok LPS'den 10 µl alınıp her hücre hattı için petrilere

muamele edildi ve inkübatörde 4 saat inkübe edildi. RT-PCR'da kullanılacak 6 kuyucuklu plaklar için uygulanan LPS miktarı 2 µl'dir.

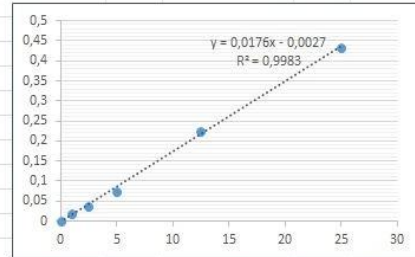
3.3 Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu yapmadan önce hücreler %80 yoğunlukta iken 4 saat hipoksiye maruz bırakıldı ve LPS uygulaması yapıldı. Hipoksi ve normoksi koşulları sonrasında hücrelerin besiyerleri çekilip PBS'le yıkandı ve çektirildi. RIPA tamponu (10 mm Tris-HCl ph:7,5, 150 mm NaCl, 2 mm EDTA, sodyum deoksikolat, %10 SDS, NP 40) petrilere 400'er µl koyulur ve 3-4 dakika buzda bekletildi. Daha sonra hücre kazıyıcı ile kazındı. Lizatlar ependorf tüplerine alındı. Vorteks yapıldı ve yarım saat buzda bekletildikten sonra -80° C'ye kaldırıldı.

Dondur/çöz aşamasında -80°C'den alınan proteinler 37°C'de su banyosunda çözülene kadar beklendi. Çözülünce yarım dakika vorteks yapıldı. Vorteks sonrası tekrar -80°C'de donduruldu ve 37°C'de eriyene kadar tutuldu. Tekrar vorteks yapıldı. Vorteks sonrası her bir ependorf 15-20 kez pipetaj yapıldı ve tekrar vorteks edildi. Daha sonra +4°C 16.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernantantlar yeni ependorflara alındı. Örnekler -80°C'ye kaldırıldı.

3.4 Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonlarının Saptanması

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Bradford Assay	Absorbans 1	Absorbans 2	Abs. Ort.	Ort.-Kor							
2		0	0,382	0,4	0,391							
3		1	0,422	0,399	0,4105							
4		2,5	0,425	0,433	0,429							
5		5	0,465	0,465	0,465							
6		12,5	0,612	0,621	0,6165							
7		25	0,837	0,813	0,825							
8												
9												
10												
11												
12	Örnek	Absorbans 1	Absorbans 2	Abs. Ort.	Ort.-Kor	Sulandırma Faktörü	Conc.	Sul. Fakt. * Conc.	50 ug	75 ug	90 UG	100 ug
13	A549 Kontrol	0,482	0,477	0,4795	0,0885	1000	5,1979	5,197925144	9,6192	14,4288	17,3146	19,2384
14	A549 LPS 4h	0,551	0,561	0,556	0,165	1000	9,5562	9,556203447	5,2322	7,84831	9,41797	10,4644
15	A549 HP 4h	0,514	0,523	0,5185	0,1275	1000	7,4198	7,419792514	6,7387	10,1081	12,1297	13,4775
16	A549 LPS+HP 4h	0,528	0,536	0,532	0,141	1000	8,1889	8,18890045	6,1058	9,15874	10,9905	12,2117
17	PC14 Kontrol	0,487	0,508	0,4975	0,1065	1000	6,2234	6,223402392	8,0342	12,0513	14,4615	16,0684
18	PC14 LPS 4h	0,502	0,528	0,515	0,124	1000	7,2204	7,220394161	6,9248	10,3872	12,4647	13,8497
19	PC14 HP 4h	0,515	0,523	0,519	0,128	1000	7,4483	7,448277994	6,713	10,0694	12,0833	13,4259
20	PC 14 LPS+HP 4h	0,535	0,549	0,542	0,151	1000	8,7586	8,758610032	5,7087	8,563	10,2756	11,4173
21	H1299 Kontrol	0,637	0,726	0,6815	0,2905	1000	16,706	16,7060587	2,9929	4,48939	5,38727	5,98585
22	H1299 LPS 4h	0,471	0,47	0,4705	0,0795	1000	4,6852	4,685186521	10,672	16,0079	19,2095	21,3439
23	H1299 HP 4h	0,673	0,619	0,646	0,255	1000	14,684	14,68358969	3,4052	5,10774	6,12929	6,81032
24	H1299 LPS+HP 4h	0,541	0,551	0,546	0,155	1000	8,9865	8,986493865	5,5639	8,34586	10,015	11,1278



Şekil 3.2 Bradford yöntemi sonucu elde edilen protein konsantrasyonları.

Her bir örnek distile H₂O ile 1/1000 sulandırıldı. Sulandırılan örneklere Bradford reaktifi (BioRad 500-0006) eklendi. Örneklerdeki protein miktarları 25, 12,5, 5, 2,5 ve 1

μg BSA standartlarına karşı tespit edildi. Ölçümler 595 nm dalga boyunda Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı aracılığıyla gerçekleştirildi.

3.4.1 Kullanılan Solüsyonlar

1. Resolving (Ayrıştırma) Tamponu: 1,5 M Tris Base pH:8,8. 1 lt.'si için 181,64 gr Tris Base tartıldı ve distile H₂O ile çözüldü.
2. Stacking (Yükleme) Tamponu: 0,5 M Tris Base pH:6,8. 1 lt.'si için 60,5 gr Tris Base tartıldı ve distile H₂O ile çözüldü.
3. Running (Yürüme) Tamponu: 3,03 gr Tris Base, 14,26 gr Glisin ve 1 gr SDS tartıldı ve distile H₂O ile çözüldü. Solüsyon pH ayarı gerektirmemektedir.
4. Transfer Tamponu: 3,03 gr Tris Base, 14,26 gr Glisin ve 0,5 gr SDS tartıldı ve distile H₂O ile çözüldü. Son olarak üstüne 250 ml metanol eklendi.
5. 1X TBS-T: 20mM Tris Base ve 150mM NaCl çözeltisi hazırlandı 750 ml distile H₂O ile çözüldü. pH: 7,5 olarak ayarlandı ve çözelti distile H₂O ile 1 lt.'ye tamamlandı.
6. SDS yükleme tamponu: Bio Rad 4X Laemli Buffer (100 mM Tris-HCL (pH6,8), %12 betamerkaptoetanol, 2% SDS, 1% Bromofenol blue, 20% gliserol) solüsyonu kullanıldı.
7. %10 Amonyum persülfat (APS): 0,1 gr APS tartıldı ve 1 ml distile H₂O ile çözüldü. Taze hazırlandı ve +4 °C 'de saklandı.
8. Akrilamid/Bisakrilamid (29/0,8): 29 gr Akrilamid ve 0,8 gr Bisakrilamid tartıldı ve 100 ml distile H₂O ile çözüldü. Hazırlandıktan sonra ışık görmeyen bir şişeye filtre ile aktarıldı ve +4 °C 'de saklandı.

RIPA tamponu ile toplanmış lizatlar, 5'er μl 4x Laemli Buffer (62,5 mM Tris-HCl, pH:6,8, %10 gliserol, %1 LDS, %0,005 Bromfenol Mavis) koyulmuş yeni eppendorflara alındı ve Bradford deneyi sonucu hesaplanan 100 μg 'lık miktarlarda koyuldu ve 95°C'de 5 dakika ısıtıldı. Kaynatma sonrası örneklerin tamamı yürüme tamponu (Tris 25 mM, Glisin 190 mM, SDS %0,1) içindeki SDS jele yüklendi. 100 voltta 1 saat elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işleminden sonra transfer tamponu (Metanol, Tris 25 mM, Glisin 190 mM, SDS %0,1) içinde gece boyunca +4°C'de 90 mA akım şiddetinde PVDF membrana (Millipore – 0,45 μm) transfer edildi.

Transfer sonrası membran TBS-T (Tris 20 mM pH:7,5, NaCl 150 mM, %0,1 Tween 20) ile %5lik kuru süt tozu içeren çözeltisinde oda sıcaklığında 2 saat bloklandı. Ardından aynı membran kuru süt içinde çözeltisi içinde 1:500 PON2 (Santa Cruz - mouse), 1:1000 HIF-1 α (Cell Signaling - rabbit) ve GAPDH (Cell Signaling - rabbit)

primer antikorlar ile işaretlendi. 1 saat işaretleme ardından membran TBS-T'de yarım saat yıkandı ve 1 saat boyunca kuru süt çözeltisi içinde sekonder antikor olan HRP (Horseradish Peroksidaz - Cell signaling) ile işaretlendi. TBS-T ile yarım saat yıkandıktan sonra ECL (Enhanced Chemiluminescence – Millipore Luminata Crescendo) ile spesifik protein bantları kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak karanlık odada belirlendi.

3.5 RNA izolasyonu

Trizolle RNA izolasyonu yapmadan önce hücreler %80 yoğunlukta iken 4 saat hipoksiye maruz bırakılmış ve LPS uygulaması yapılmıştır. Hipoksi ve normoksi koşulları sonrasında hücrelerin besiyerleri çekilip 37°C'deki fizyolojik serum ile yıkanıp ve çektirildi. Daha sonra 6 kuyucuklu plaklar 300 µl trizol ile muamele edildi. Ependorflara alındı ve vorteks yapıldı. Homojenize edilen örnekler 5 dakika oda ısısında bekletildi. 60 µl kloroform eklendi. Oda ısısında 2-3 dakika bekletildikten sonra +4°C'de 15 dakika 12.000xg'de santrifüj yapıldı. Üstteki sıvı faz yeni bir tüpe alınıp 150 µl isopropil alkol eklendi. Oda ısısında 10 dakika inkübasyon sonrası +4°C'de 10 dakika 12.000xg'de santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldı ve pellet %75'lik etanolden 300 µl ependorflara eklenerek vorteks yapıldı. +4°C'de 5 dakika 7500 xg'de santrifüj ile etanol de uzaklaştırıldıktan sonra pellet 5-10 dakika kurumaya bırakıldı ve RNA 30-50 µl steril su ile çözüldü. 60°C'de 10 dakika bekletilerek örnekler -80°C'ye kaldırıldı.

3.6 cDNA Elde Etme

cDNA elde etmek için "abm" kiti kullanılmış ve her örnek için Tablo 3.1 ve 3.2'deki miktarlarda karışım hazırlanmıştır.

Tablo 3.1 cDNA elde etmek için kullanılması gereken miktarlar.

Total RNA	10 µl
Oligo (dT) primer	1 µl
dNTP mix	1 µl

Karışım nükleaz içermeyen su ile 14,5 µl'ye tamamlandı. 200 µl'lik ependorf tüplerine dağıtıldı. 65°C'de 5 dakika, buzda 1 dakika inkübasyon sonrası, her bir örnek için tablodaki miktarlarda karışım hazırlanmıştır.

Tablo 3.2 cDNA elde etmek için kullanılması gereken miktarlar

5x RT Buffer	4 µl
RNase OFF ribonükleaz inhibitör	0,5 µl
RTase	1 µl

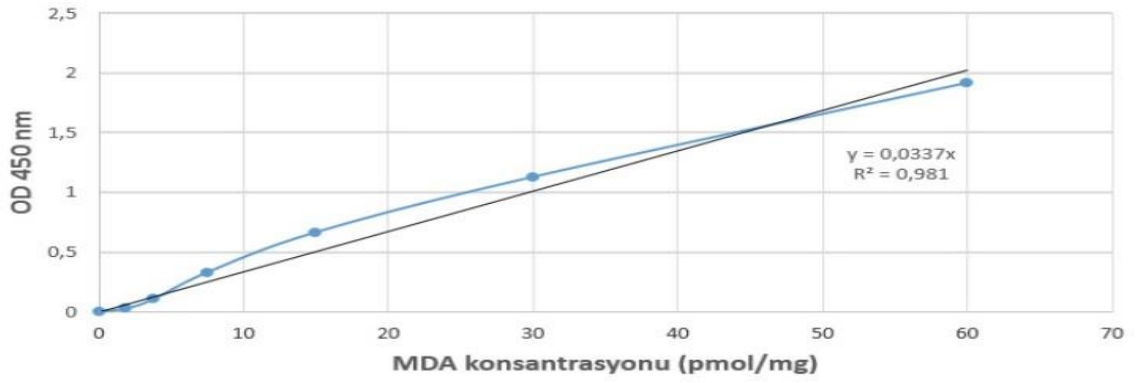
Reaksiyon, termal cycler cihazında 50°C'de 50 dakika, 95°C'de 5 dakika reaksiyon sonrası örnekler -20°C'de saklandı.

3.7 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Çalışması

Taqman prob kullanılarak yapılmıştır. Örnekler 96 kuyucuklu plaklara 2'şer tekrarlı olarak koyulmuştur. Reaksiyon 20 µl hacminde ve her örnek ve gen için çift tekrarlı olarak hazırlandı. Her bir tüpteki reaksiyon; 10 µl TaqMan® Universal Master Mix II'dan, 8 µl RNAz içermeyen H₂O'dan, 1 µl taqman prob ve primer karışımdan ve son olarak cDNA'dan da 1 µl ilave edilerek hazırlandı. Reaksiyon üretici firma tarafından önerilen 95°C'de 10 dk ön denatürasyon, 40 döngü olmak üzere 95°C'de 15 sn, 60 °C'de 1 dk reaksiyon koşullarında StepOnePlus™ Real-Time PCR System cihazında gerçekleştirildi. Sonuçlar, 2- $\Delta\Delta C_t$ formülü ile hesaplanmış ve yorumlanmıştır.

3.8 Oksidatif Stres Belirteci Olan MDA Seviyelerinin Tespiti

MDA tespiti için OxiSelect™ MDA Adduct ELISA Kit (STA-332) kullanıldı. BSA standartları ya da protein örnekler (10 µg/mL) 37°C'de 2 saat 96 kuyucuklu plaklara tutunduruldu. MDA protein eklentiler standart ya da örnekte bir anti-MDA antikorla problandı. Sonrasında HRP konjuge sekonder antikor ile muamele edildi. Bilinmeyen örnekteki MDA protein eklentili içerik, önceden tespit edilen MDA-BSA standartlarından hazırlanan standart bir eğri ile kıyaslanarak tespit edildi.



Şekil 3.3 450 nm'de MDA konsantrasyonları(pmol/mg) kalibrasyon eğrisi.

3.9 Verilerin Değerlendirilmesi

Gerçek zamanlı PCR'dan elde edilen sonuçların istatistiksel analizi student T-test kullanılarak yapılmıştır. Bu test sayesinde gruplarımızın hem kontrol hem de birbirleri arasındaki farkın istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlam taşıyıp taşımadığı test edilmiştir.

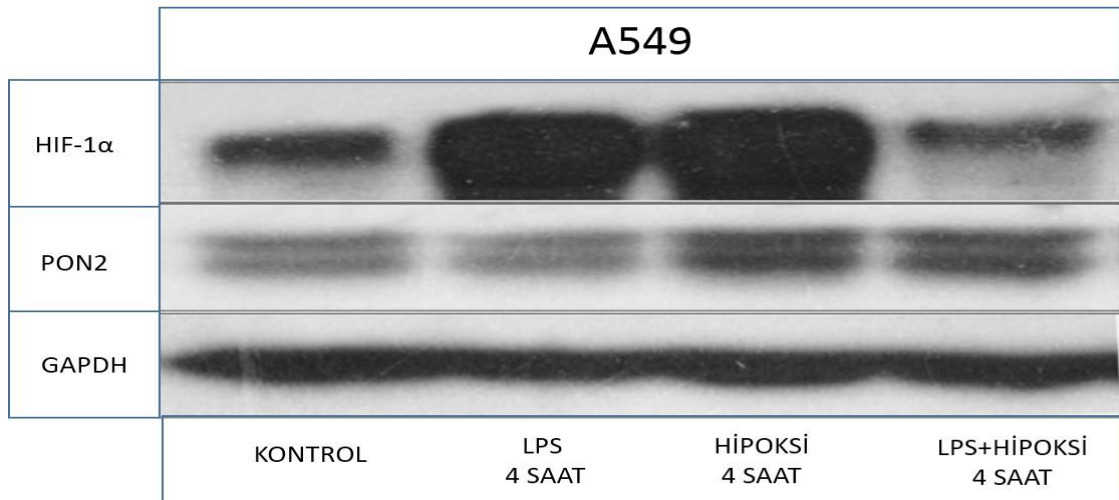
4. BULGULAR

4.1 Western Blot Çalışması

İnsan küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre dizileri olan H1299, A549 ve PC14 RPMI 1640 ve DMEM besi ortamlarında kültüre edildikten sonra kontrol, LPS, hipoksi ve LPS+hipoksi olmak üzere dört gruba ayrılmış ve petrilere ekilmişlerdir. 24 saat normoksi koşullarında hücreler kültüre edildikten sonra serum içermeyen besi ortamına ekilip normal doku kültür şartlarında 24 saat inkübe edilmişlerdir.

Kontrol grubuna hiçbir muamele yapılmazken gereç ve yöntemlerde anlatılan şekilde her hücre dizisi için bir petriye sadece LPS uygulaması yapılmıştır. Kontrol ve LPS grupları dört saat normal doku kültür şartlarında inkübe edilirken hipoksi ve LPS+hipoksi olarak ayrılmış gruplar modüler inkübatör chamber içerisinde öncelikle 7 dakika süreyle %1 O₂ %5 CO₂ ve %94 N₂ karışımı gaza maruz bırakılmıştır. Süre sonunda chamber, normal doku kültür şartlarında 4 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda gereç ve yöntemler kısmında anlatılan şekilde protein izolasyonu ve western blot analizleri yapılmıştır.

A549 hücre hattı; kontrol, LPS, hipoksi ve LPS+hipoksi olmak üzere dört gruba ayrılmıştır ve western sonrası Şekil 4.1'deki görüntüler elde edilmiştir.

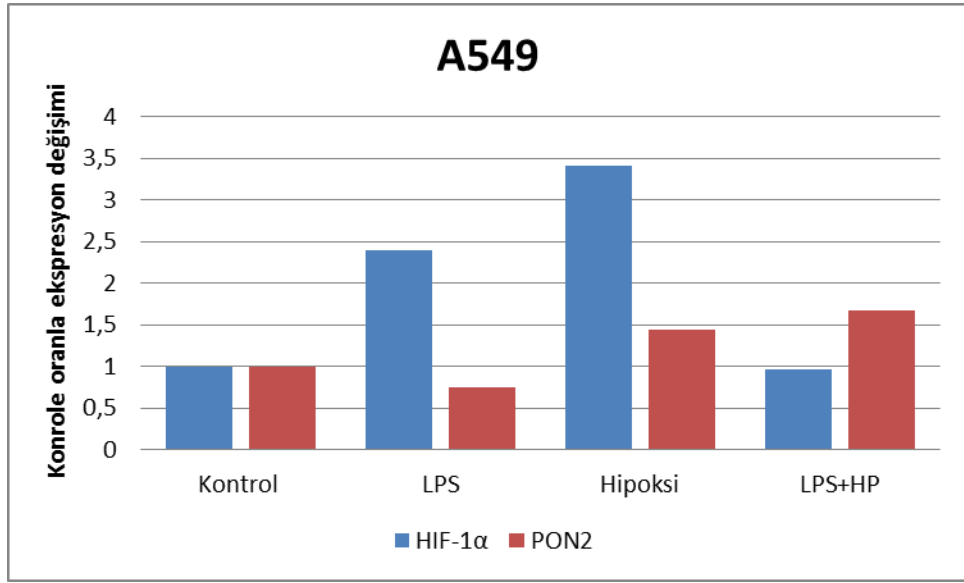


Şekil 4.1 A549 hücre hatlarında PON2 ve HIF-1 α protein ekspresyon tayini.

Buna göre kontrole göre ayrı ayrı 4 saat LPS ve hipoksi uygulanan gruplarda HIF-1 α ekspresyonunda artış gözlenmiştir. LPS ve hipoksi birlikte uygulandığında ise ekspresyon seviyesinde düşüş görülmüştür.

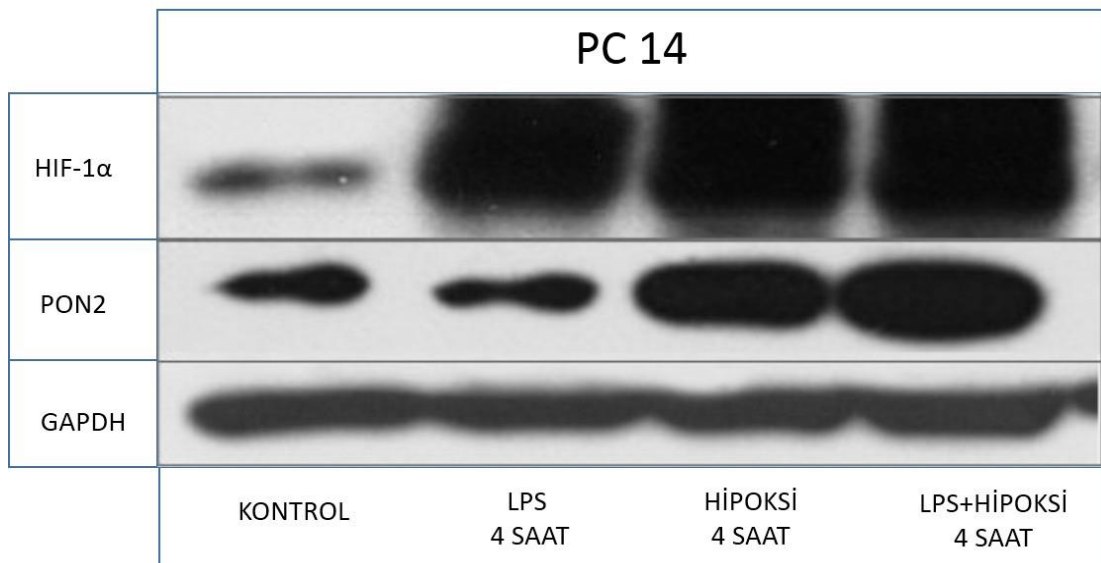
PON2 ekspresyonu için ise kontrole göre LPS'de düşüş, hipoksise ve LPS+HP olan gruplarda artış gözlenmiştir.

Piksel yoğunluklarına göre kontrole oranla ekspresyon değişiklikleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 A549 hücre dizisinde kontrole oranla protein ekspresyonu değişimi.

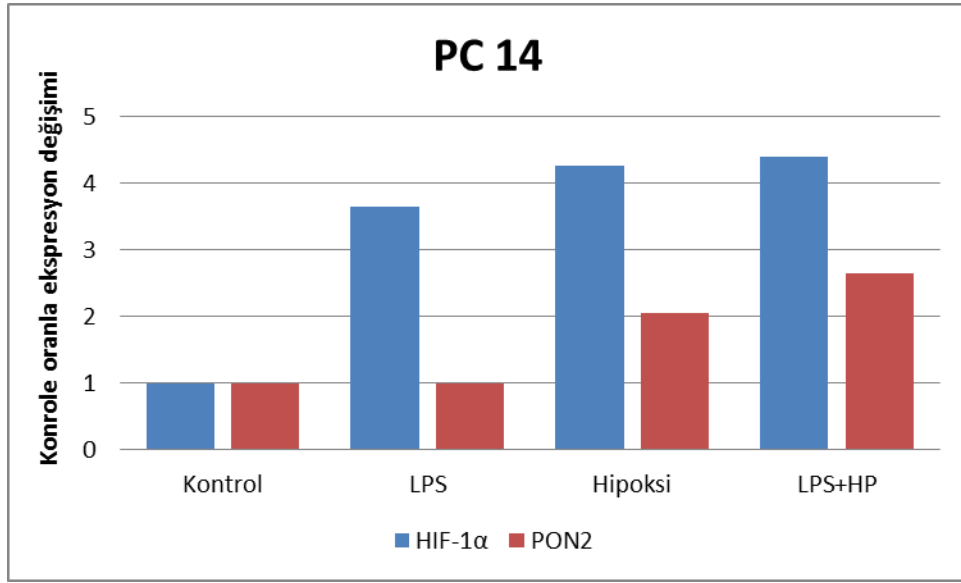
PC14 hücre hattı da dört gruba ayrılmıştır ve western blot sonrası Şekil 4.3'teki görüntüler elde edilmiştir. Buna göre kontrole göre her grupta HIF-1 α ekspresyonunda belirgin bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.3 PC 14 hücre hatlarında PON2 ve HIF-1 α protein ekspresyon tayini.

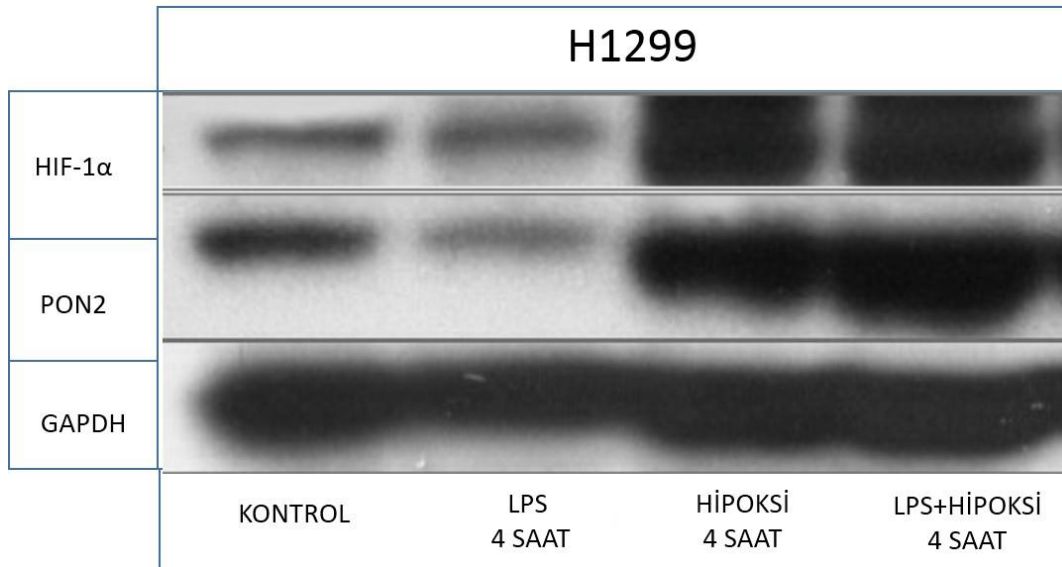
Aynı hücre hattında PON2 ekspresyonu için kontrole göre LPS'de kısmi bir azalış gözlenmiştir ancak LPS'li grubun GAPDH'i de benzer görüntüye sahip olduğundan yüklenen proteinle ilişkili olarak bu görüntünün elde edildiği düşünülmektedir. Hipoksi ve LPS+hipoksi olan gruplarda da PON2 ekspresyonunda belirgin artış gözlenmiştir.

Piksel yoğunluklarına göre kontrole oranla ekspresyon değişiklikleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 PC14 hücre dizisinde kontrole oranla protein ekspresyonu değişimi.

H1299 hücre hattı da dört gruba ayrılmış ve western sonrası Şekil 4.5'teki görüntüler elde edilmiştir.

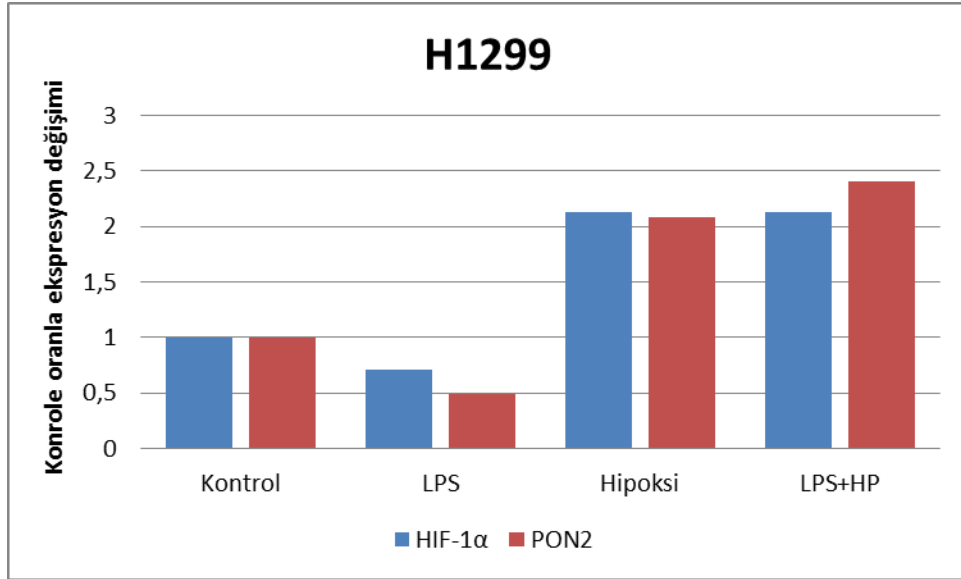


Şekil 4.5 H1299 hücre hatlarında PON2 ve HIF-1α protein ekspresyon tayini.

Kontrole göre LPS muamelesi olan grupta anlamlı bir değişim gözlenmezken hipoksi ve LPS+hipoksi gruplarında HIF-1 α ekspresyonunda belirgin bir artış görölmüştür.

PON2 ekspresyonlarına bakıldığında ise kontrole göre LPS'de düşüş, hipoksi ve LPS+hipoksi gruplarda belirgin artış gözlenmiştir.

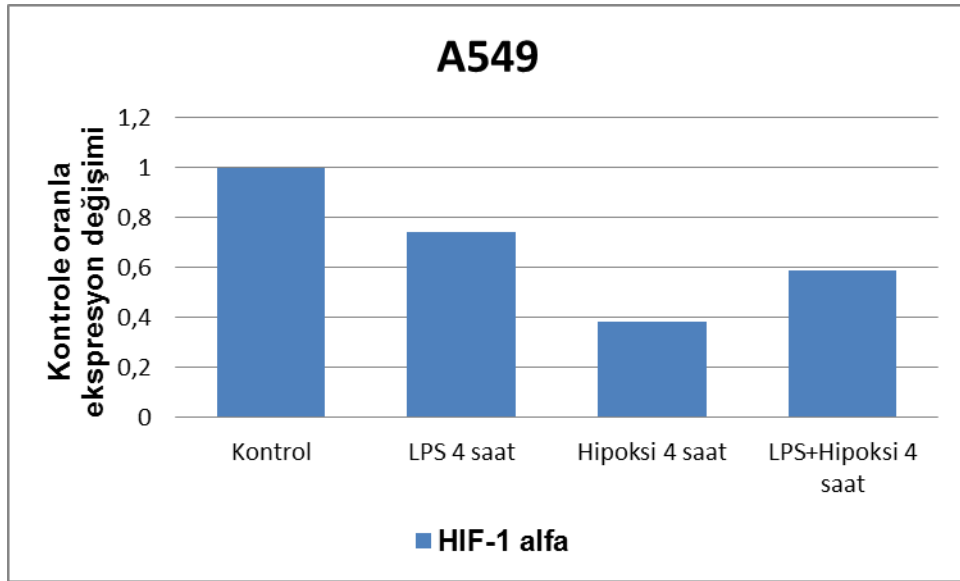
Piksel yoğunluklarına göre kontrole oranla ekspresyon değişiklikleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 H1299 hücre dizisinde kontrole oranla protein ekspresyonu değişimi.

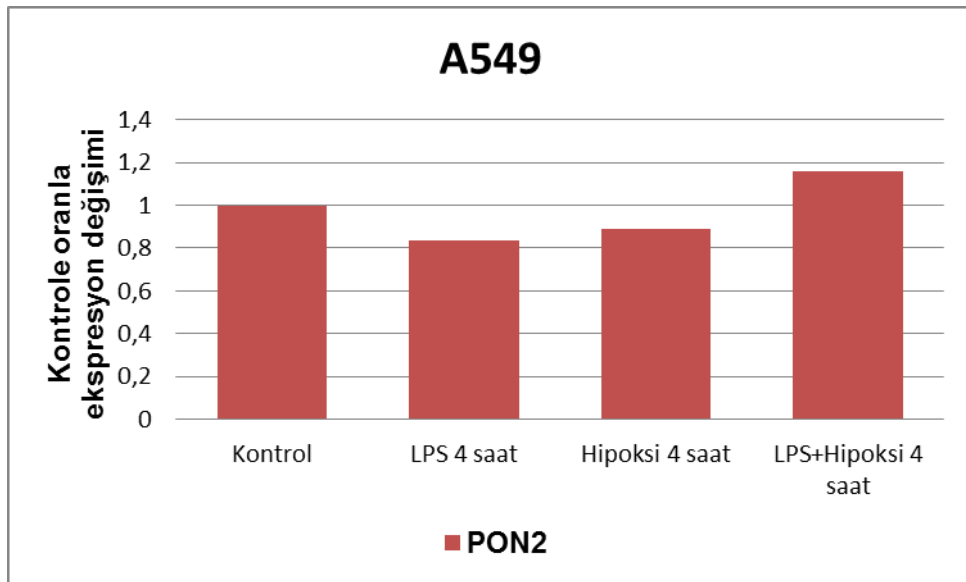
4.2 RT-PCR ile HIF-1 α ve PON2 Gen Ekspresyonlarının Araştırılması

RNA izolasyonu ve cDNA çalışması yapıldıktan sonra her hücre hattının tüm grupları için RT-PCR çalışması yapılmıştır. Her hücre hattı için western blot çalışmasında olduğu gibi dörder grup oluşturulmuş ve her grupta ikişer tekrarlı olarak HIF-1 α ve PON2 gen ekspresyonları araştırılmıştır.



şekil 4.7 A549 h¼cre hatlarında HIF-1 α mRNA ekspresyonu. ($p>0,05$)

Buna g¼re şekil 4.7'de g¼r¼ld¼ę¼ üzere LPS muamelesi yapılmış grubun HIF-1 α mRNA ekspresyon seviyelerinde bir artış g¼zlenmemiřtir. 4 saat hipoksi uygulanan grupta HIF-1 α ekspresyon seviyelerinde d¼ř¼ř g¼zlenmiřtir. 4 saat LPS+Hipoksi uygulaması yapılan grupta ise yalnızca hipoksi uygulanmış gruba kıyasla HIF-1 α ekspresyon seviyelerinde bir artış g¼zlenmiřtir.

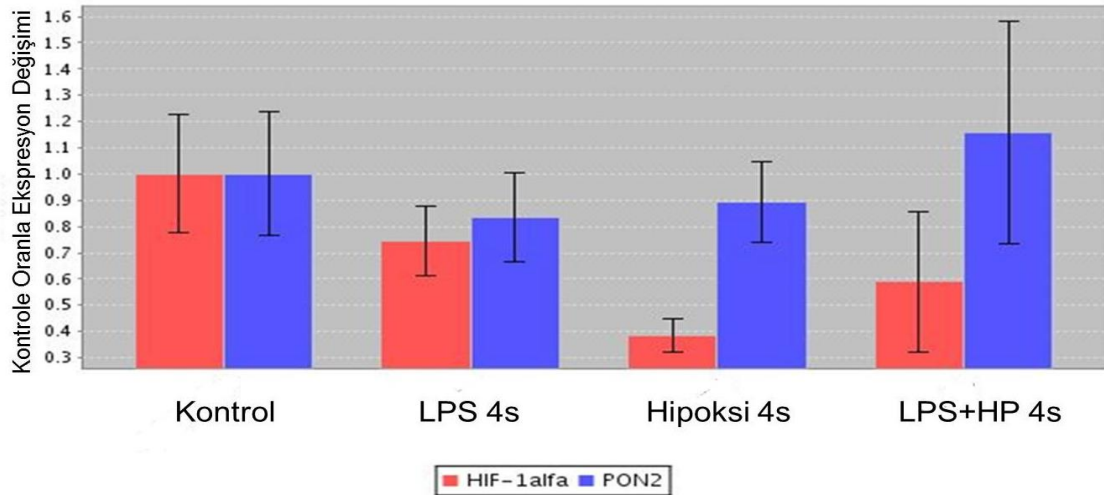


şekil 4.8 A549 h¼cre hatlarında PON2 mRNA ekspresyonunun g¼sterilmesi. ($p>0,05$)

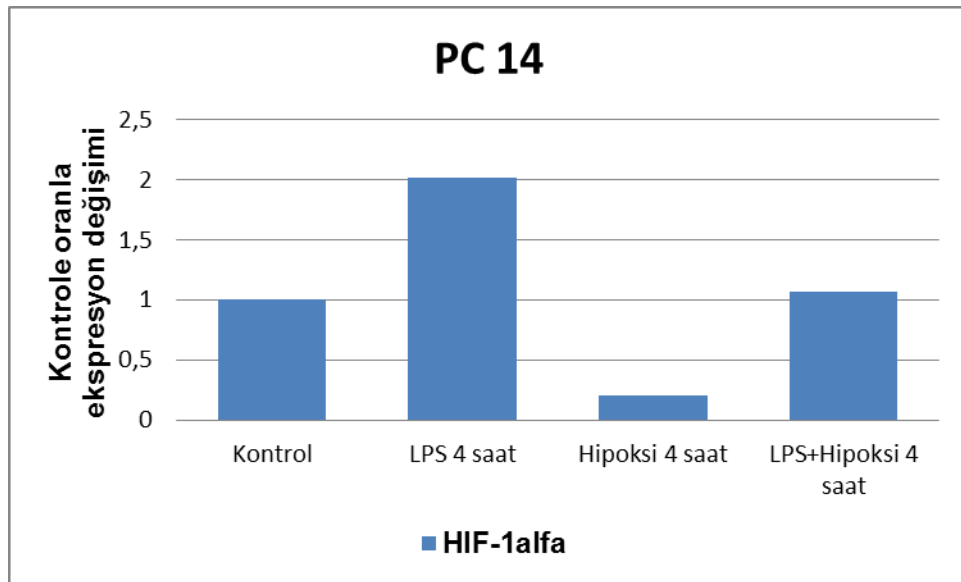
A549 h¼cre hattı i¼in her grupta PON2 mRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında LPS ve hipoksi gruplarında ayrı ayrı kontrole g¼re bir artış

gözlenmezken LPS+hipoksi birlikte uygulandığında PON2 ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.8).

A549 hücre dizilerinde HIF-1 α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR sonrası elde edilen standart sapma grafiği Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



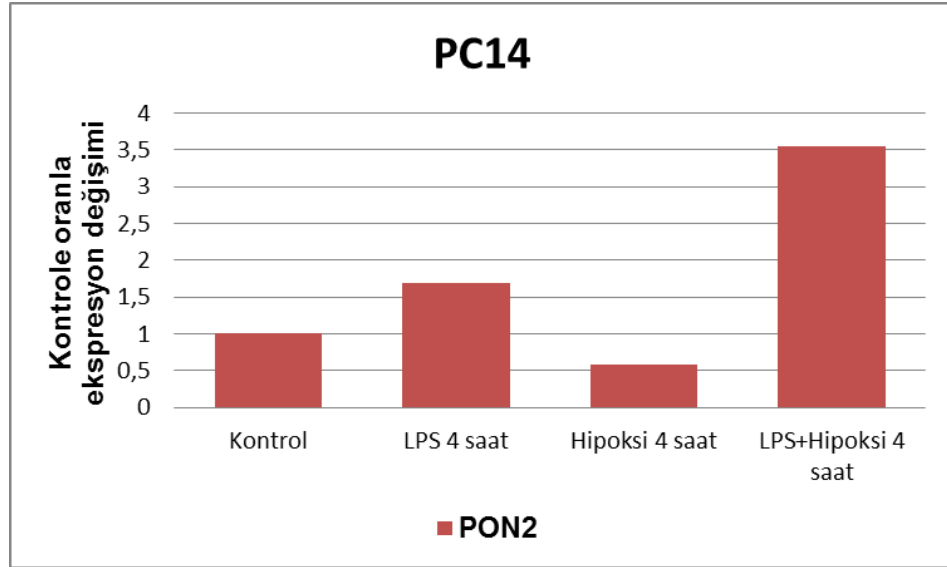
Şekil 4.9 A549 hücre dizilerinde HIF-1 α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile gösterimi ($p>0,05$).



Şekil 4.10 PC 14 hücre hatlarında HIF-1 α mRNA ekspresyonu ($p>0,05$)

Şekil 4.10'da PC14 hücre hatlarında her grup için HIF-1 α mRNA ekspresyonuna bakıldığında LPS uygulanmış olan grupta kontrole göre HIF-1 α ekspresyonunda artış gözlenirken hipoksi olan grupta HIF-1 α ekspresyon seviyelerinde belirgin bir düşüş

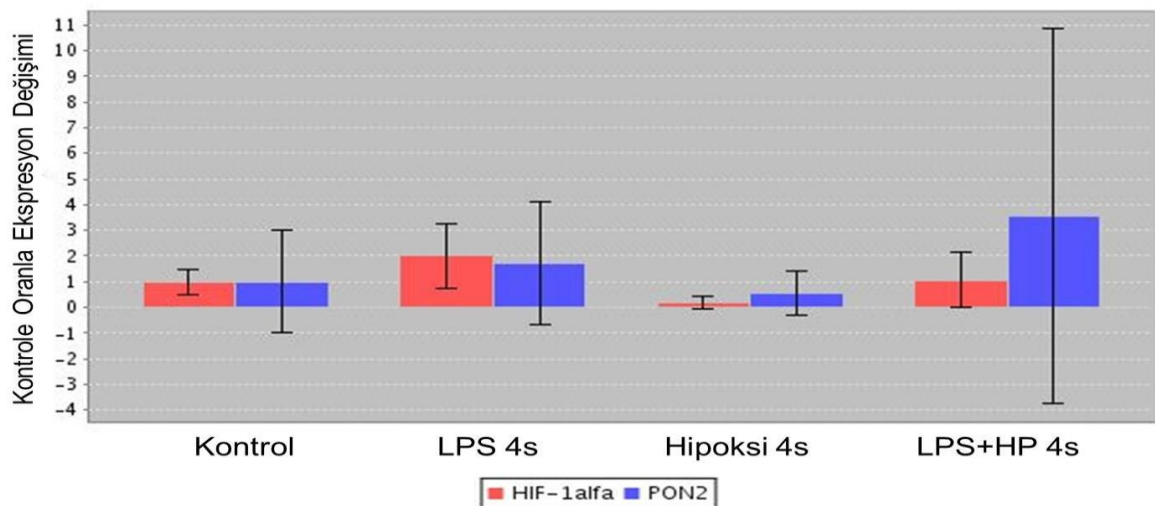
gözlenirken LPS ve hipoksinin birlikte uygulandığı grupta yalnızca hipoksi uygulanan gruba göre artış gözlenmiştir.



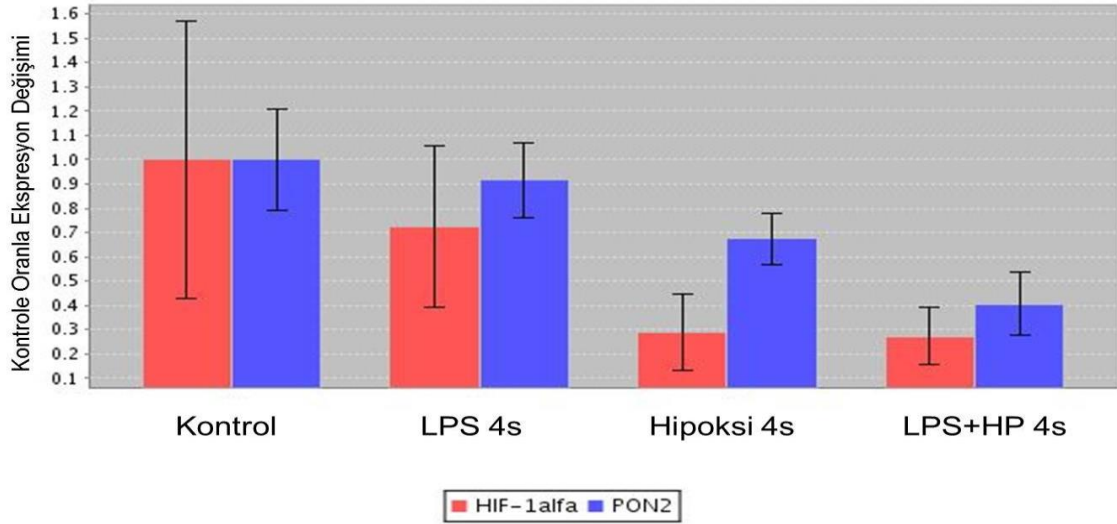
Şekil 4.11 PC 14 hücre hatlarında PON2 mRNA ekspresyonunun gösterilmesi ($p>0,05$)

Şekil 4.11’de her grupta PON2 mRNA ekspresyonlarına bakıldığında kontrole göre LPS ve LPS+hipoksi olan gruplarda belirgin bir artış gözlenirken hipoksi koşullarında PON2 ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir.

PC14 hücre dizilerinde HIF-1 α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR sonrası elde edilen standart sapma grafiği Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



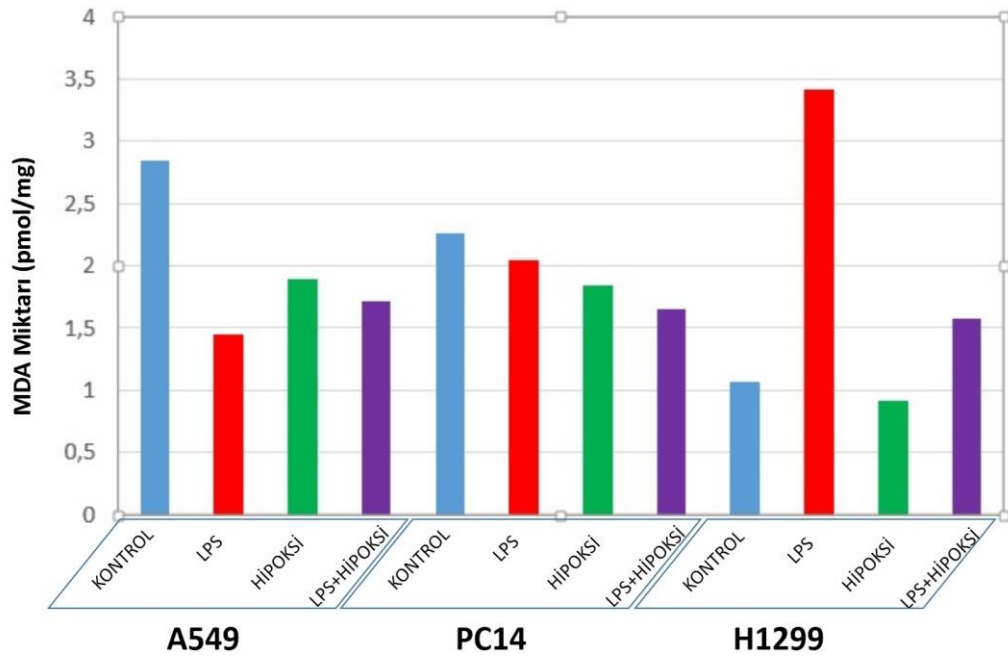
Şekil 4.12 PC 14 hücre dizilerinde HIF-1 α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile gösterimi ($p>0,05$).



Şekil 4.15 H1299 hücre dizilerinde HIF-1α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile gösterimi ($p > 0,05$).

4.3 MDA Seviyelerinin Tespiti Çalışması

MDA seviyelerinin tespiti için OxiSelect™ MDA Adduct ELISA Kit (STA-332) kullanılarak yapılan deneyler sonucunda Şekil 4.16'daki grafik elde edilmiştir.



Şekil 4.16 Her hücre grubu için elde edilen MDA miktarları grafiği.

Şekil 4.16'da görüldüğü gibi A549 ve PC14 hücre dizilerinde, LPS ve hipoksi uygulaması ile kontrole göre MDA seviyelerinde bir azalış gözlenmiştir. H1299 hücre dizisinde ise LPS uygulaması ile kontrole göre MDA seviyesinde artış görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Normal hücrelerin değişiklikler geçirerek kanser hücresine dönüşme süreci karsinogenez olarak adlandırılmaktadır ve karsinogenez çok adımlı bir süreçtir.

Genlerde mutasyonların olması, hücrelerde süregelen kontrolün bozulmasına neden olur. Bu durumun oluşması hücrelerin ölmemesine yol açarken, vücudun ihtiyacı olan bu hücreler tümör adı verilen bir kütle oluşumuna sebep olur.

Tümörler iyi huylu (benign) ya da kötü huylu (malign) olabilir. Kötü huylu tümörler çevre dokulara yayılmaya eğilimlidir ve vücudun diğer bölümlerine gidebilirler. İyi huylu tümörler ise yayılmaya eğilimli değildirler.

Akciğer kanserleri tüm dünyada, kadın ve erkek bireylerde kanser ilişkili ölümlerin en önemli nedenidir. Akciğer kanserinin iki tipi olan küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) farklı şekillerde büyür ve yayılırlar.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2004 yılında yaptığı sınıflandırmasına göre, primer akciğer kanserinin dört ana histolojik hücre tipi vardır; adenokarsinom (%38,3), skuamoz hücreli karsinom (%19,7) büyük hücreli karsinom (%5) ve küçük hücreli karsinomdur (%13).

Akciğer kanseri kontrol edilemeyen büyüme, apoptoza direnç, tümör anjiyogenezi, doku invazyonu ve uzak metastaz ile sonuçlanan genetik değişikliklerin kazanılmasıyla adım adım gelişir

Metastaz, primer tümörün damar ağlarını kullanarak sekonder tümör oluşturmak amacıyla diğer dokulara yayılmasıdır. Kanser hücrelerinin metastatik lezyonlar oluşturabilmeleri için kan ve lenf damarları aracılığıyla taşınmaları esastır.

Anjiyogenez ise mevcut damarlardan yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Anjiyogenez sadece kanser hücreleri için gerekli bir mekanizma değildir. Embriyogenez boyunca gelişim için önemlidir. Erişkinlerde yara iyileşmesi ve dişi üreme döngüsü gibi durumlarda çalışır.

Anjiyogenik sinyaller, hem anjiyogenik faktörlerin üretimini kontrol eden genlerin mutasyonlarının bir sonucu oluşabilir. Hem de tümör hipoksisi gibi malignant şartlara bir fizyolojik cevap olarak da ortaya çıkar. Hipoksi, azalmış ya da yetersiz oksijen desteği nedeniyle solid tümörlerde yaygın olarak gözlenen patolojik bir özellik olarak bilinir

Anjiyogenezin başlaması için gerekli olan en önemli gen VEGF'tir ve bu genin transkribe edilmesi HIF-1 α tarafından indüklenir.

Kanserlerde tümör büyümesinin önemli bir sonucu olarak hipoksi oluşur ve hipoksi anjiyogenezin de uyarıcısıdır. Hipoksi anjiyogenez, bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi indüklenebilir faktör (HIF) yoluyla uyarır ve HIF sistemi tüm memeli hücrelerde rol oynamaktadır

Oksijen ökaryotik yaşam için esansiyeldir. İnsanların ve diğer vertebratların vücut büyüklüklerinin artması, dokulara yeterli oksijen iletiminin sağlanması ve oksijen homeostazının sürdürülmesi için fizyolojik bir altyapı gerektirir

HIF; metabolizma, otofaji, apoptoz, anjiyogenez ve hücre proliferasyonu gibi süreçlerde rol alan çok sayıda hedef geni düzenler (Kim vd 2006, Tracy vd 2007). Birçok kanser tipinde anormal bir HIF aktivitesi görülür. Çeşitli grupların yaptığı çalışmaların sonuçları, HIF'lerin hipoksi ve inflamasyon koşullarında birleştirici bir rol oynadığının kanıtını sağlamıştır. Sang ve arkadaşları (2003) yaptıkları bir çalışmada HIF-1 aktivitesinin yükselirken kullandığı yolağın fosforilasyonunu, monosit ve makrofajlarda, bakteriyel lipopolisakkaritin (LPS) güçlü bir şekilde indüklediği gözlenmiştir (van der Bruggen vd 1999; Chu vd 2001).

Lipopolisakkaritler bakterilerde endotoksik dış membran olup, fagositler üzerindeki TLR-4 ile etkileşmekte ve sistemik dolaşıma salınan IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α yangısal sitokinlerinin üretimini teşvik etmekte ve inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır LPS *E.Coli* dış membranının asıl bileşeni olup inflamasyon yanıt oluşturur.

Bu çalışmamızda yapılan western blot deneylerinde LPS'nin, 4 saat maruziyet sonrası küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre hatları olan PC14 ve A549'da HIF-1 α protein seviyelerini arttırdığı gözlemlenmiştir.

Frede ve arkadaşları (2006), yaptığı çalışmada insan monositik hücre hatları THP-1 ve MonoMac6'da 4 saat LPS maruziyeti sonrası HIF-1 α ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir.

Blouin ve arkadaşlarının (2004) makrofaj kökenli hücre hatları ile yaptığı bir başka çalışmada ise LPS stimülasyonu sonrası HIF-1 α mRNA ve protein seviyelerinin arttığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda HIF-1 α protein seviyelerinde hipoksi maruziyeti sonrası belirgin artış gözlenirken mRNA seviyelerinde aynı belirgin artış gözlenememiştir. Li ve arkadaşlarının (2006) A549 hücre hatları ile yaptıkları çalışmada HIF-1 α mRNA seviyelerinin 4.saat hipoksiden sonra düştüğünü gözlemlemiştir. Protein seviyelerinin araştırılması için yapılan western blot deneyi sonucunda ise 4 saat hipokside, HIF-1 α ekspresyonunda çalışmamıza benzer şekilde artış gözlemlemiştir.

Poitz ve arkadaşlarının (2013) makrofajlarla yaptığı başka bir çalışmada ise çalışmamıza benzer şekilde hipoksi süresince HIF-1 α mRNA seviyelerinin düştüğünü göstermişlerdir. Aynı çalışmada HIF-1 α protein seviyeleri çalışmamızda da görüldüğü üzere 4.saatte belirgin şekilde artmıştır.

RT-PCR deneyleri sonucunda hipoksi maruziyeti sonrasında HIF-1 α mRNA seviyelerinin protein seviyelerine benzer şekilde artış göstermemesinin sebebi olarak 4. saatte mRNA'ların degrade olduğu düşünülmektedir.

Paraoksonaz (PON) ailesi, PON1, PON2 ve PON3 adları verilen üç farklı genden oluşur.

PON1 bu ailenin en çok çalışılan üyesidir PON1 proteini genellikle karaciğerde sentezlenir ve plazmaya salgılanır. 43 kDa'luk, esteraz ve laktonaz aktivitesi gösteren yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ilişkili bir enzimdir.

PON2 birçok dokuda bulunmuş ve anti-oksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. PON2 LDL'yi oksidasyona karşı korur. Böylece PON2'nin bir fonksiyonu hücreleri oksidatif stresten korumak için hücrel anti-oksidan olarak davranmak olabilir.

PON3 40 kDa ağırlığında HDL ile ilişkili bir proteindir. Primer olarak karaciğerde sentezlenir. PON ailesinin en son keşfedilen üyesidir.

Son yıllarda birçok çalışma oksidatif stres ve PON2 ekspresyonunun artışına odaklanmıştır. Çünkü PON2 hücre içi anti oksidan ve anti-inflamatuar olarak görev yapmaktadır. İn vitro ve in vivo çok sayıda çalışma PON2 ekspresyonu ve enzimatik aktivitesinin oksidatif stres süresince farklı hücre tiplerinde, hayvan modellerinde ve hiper kolestolemik hastalarda arttığını göstermiştir (Shih vd 1996 - 1998, Forte vd 2002; Rosenblat vd 2003, 2004, Aviram ve Rosenblat 2005). Oksidatif stresi indükleyen çok sayıda ajanla muamele edilmiş fare peritoneal makrofajları (MPMler)

PON2 ekspresyonunu ve laktonaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Rosenblat vd 2003). Shiner ve arkadaşları (2004) monosit/makrofaj farklılaşması süresince nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın (NADPH) varlığına bağlı olarak PON2 ekspresyonunda yaklaşık yedi kat artış gözlemlenmiştir ve bu fenomenin hücrel oksidatif strese artışının ilişkili olduğunu gözlemlenmiştir (Shiner vd 2006).

PON2 ekspresyonu yüksek kolestrole ve glukoz seviyelerine bağlı oksidatif stres artışıyla karakterize metabolik rahatsızlıklar gibi patolojik durumlarda araştırılmış ve hepatik PON2 mRNA seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (Forte vd 2002).

Çeşitli çalışmalar insan monosit kökenli makrofajlarda (HMDMler) farmasötik bileşiklere yanıt olarak PON2 ekspresyonunda artış gözlemlerken (Rosenblat vd 2004), LPS gibi proinflamatuvar ajanların insan bağırsak Caco-2/15 hücrelerinde PON2 mRNA ekspresyonunu düşürken protein miktarlarında artış olduğunu göstermiştir (Precourt vd 2009).

Çalışmamızda 4 saat LPS uygulanan KHDAK hücre hatlarında PON2 protein seviyelerinde artış gözlemlenmemiştir. Hipoksi maruziyeti ile birlikte LPS uygulandığında ise protein seviyelerinde anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. A549 ve H1299 hücre hatlarında da LPS uygulamasıyla protein seviyelerine benzer şekilde PON2 mRNA seviyelerinde artış gözlemlenmemiştir.

LPS ve hipoksi koşulları hücrelerde oksidatif strese yol açar. Hipoksi olarak tanımlanan oksijen azlığı artmış reaktif oksijen türleri oluşumuyla ilişkilidir.(Behn vd 2007).

Hipoksi koşulları altında reaktif oksijen türlerinin aşırı oluşumu, hücre hasarı ve fonksiyon bozukluğuyla sonuçlanabilir. Ek olarak ROS redoks sensitif sinyal yollarını aktive ederek NF- κ B ve MAPKlarla olduğu gibi ikincil haberci gibi davranabilir (Ji vd 2006).

Çalışmamızda LPS ve hipoksi birlikte uygulandığında ise her üç hücre hattında PON2 protein seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Aynı grubun mRNA seviyelerinde ise benzer artış gözlemlenmemiştir. PON2 protein miktarlarında gözlenen artışın mRNA ekspresyonunda görülmemesi, hipoksiyle ekspres olan PON2 mRNA larının 4 saat inkübasyon süresince protein sentezi işlemine tabi olduğu ve daha sonra mRNAların yıkılmasıyla açıklanabilir. Protein ekspresyonundaki artış bu hipotezi desteklemektedir.

Feingold ve arkadaşlarının (1998) yaptığı çalışmada benzer şekilde 4 saat LPS muamelesi ile PON2 mRNA seviyelerinin düştüğünü göstermişlerdir.

ROS konsantrasyonlarındaki artış hücrel savunma kapasitesinin üzerine çıkarak DNA kırıkları, enzim ve diğer protein hasarları ve lipit peroksidasyonu gibi yollarla hücre hasarına yol açar. Oksidan ve antioksidan durumlar arasındaki

dengelerin bozulması çeşitli patolojik olaylarda göz önüne alınmıştır (Ross 1999). Aşırı ROS üretiminin yol açtığı hasardan korunmak için antioksidan savunma mekanizmalarının yeterli düzeyde olması gerekmektedir.

Çalışmamızda oksidatif stres parametrelerinden olan MDA düzeyleri araştırıldığında, LPS ve hipoksi muameleleriyle KHDAK hücre dizileri olan A549 ve PC14'te MDA seviyelerinde azalış, H1299 hücre dizisinde LPS uygulamasıyla artış görülmüştür. Hipoksi ortamlarında genel olarak lipit peroksidasyon ürünü MDA'nın azalması hipoksi ortamında PON ekspresyonunun artmış olmasıyla açıklanabilir. Ancak LPS uyarısıyla da benzer azalma gözlenmiş olup bu durumun açıklanabilmesi için anti-oksidan enzimlerin araştırılması yardımcı olabilir.

Precourt ve arkadaşları (2009) Caco-2/15 hücre bağırsak hattında demir - askorbat aracılı oluşturulan lipit peroksidasyonunun malondialdehit (MDA) düzeylerini arttırdığını ve PON ekspresyonunu azalttığını, ek olarak PON3 protein miktarı değişmeden PON2 miktarının azaldığını göstermişlerdir. Bu hücrelere troloks gibi güçlü antioksidanlarla pre-inkübasyonu PON ekspresyonlarındaki azalmayı durdurur. LPS aynı hücre hattında PON1 ve PON3 mRNA ekspresyonunu konsantrasyon bağımlı olarak azaltırken PON2 gen ekspresyon miktarını artırır. PON2 deki bu artış 24 saat içinde azalır. Bu sonuçlar bu çalışmadaki bulgularla uyumlu olmamakla birlikte, PON2 mRNA ekspresyonu ve protein ekspresyonu arasındaki rapor edilen değişik sonuçlar yapılacak çalışmalarla aydınlatılabilir. PON2 proteinindeki LPS aracılı artış *E.Coli* aracılı bağırsak inflamasyonlarında bağırsak hücrelerine koruyucu bir etki sunabilir. Aynı çalışmada LPS'nin I- κ B α miktarını azalttığı, NF- κ B/I- κ B α oranını ve TNF- α 'yı (Dumitru vd 2000) arttırdığı dolayısıyla NF- κ B'nin serbest kalarak nükleusa geçmesi ve hedef genleri uyarması ya da durdurmasına sebep olur. Antioksidan ve NF- κ B inhibitörleri PON2 ekspresyonunu korunmasını ve oksidatif strese karşı korunmaya yardımcı olur. TNF- α aynı hücrelerde PON1 ve PON3 ekspresyonunu azaltırken PON2 mRNA ekspresyonunu anlamlı olarak arttırmasına rağmen bu artış PON2 proteininde azalma rapor edilmiştir.

Bu çalışma gösteriyor ki LPS ile oluşturulan inflamatuvar yanıtta PON2 protein ekspresyonu NF- κ B ve/veya TNF- α üzerinden düzenleniyor olabilir.

NF- κ B ve inhibitörü I- κ B inflamasyon gelişiminde önemli bir sinyal molekülüdür. NF- κ B yolağının aktivasyonu proinflamatuvar gen transkripsiyonun artmasıyla ilişkilidir. Gao ve arkadaşları NF- κ B ve I- κ B mRNA ekspresyonlarının ve protein düzeylerinin LPS uygulanmış farelerde (Balb/c) arttığını göstermişlerdir.

Sarada ve arkadaşları HIF-1 α 'nın ekspresyonunun hipoksik koşullarda sıçanlarda arttığını ve bu artış sonucunda nükleer NF- κ B fraksiyonunda önemli bir artışa yol açtığını göstermişlerdir. Buna ek olarak hipoksik sıçanlarda IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerde önemli bir artış gözlemlenmiştir.

Bu çalışmamızda akciğer kanseri hücre hatlarında hipoksi ve LPS uygulamasının HIF-1 α ekspresyonu ve PON2 ekspresyonu araştırılmış ve HIF-1 α ekspresyonu hem LPS hem hipoksi koşullarında artarken PON2 ekspresyonundaki artış yalnızca hipoksi koşullarında gözlenmiştir.

Önceki çalışmalarda hipoksi ve PON2 arasındaki ilişki gösterilmiş olup HIF-1 α ilişkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Hipoksi koşulları ve LPS'nin NF- κ B ve TNF- α ekspresyonlarını arttırdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Dolayısıyla LPS ve hipoksi uygulamasıyla oluşan PON2 mRNA ekspresyonu NF- κ B ve/veya TNF- α yolağı üzerinden düzenlenebilir. Bu sonuçlar PON2 ekspresyonunun HIF-1 α üzerinden değil başka bir mekanizmayla NF- κ B ve/veya TNF- α yolağı üzerinden düzenlendiğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre dizilerinde western blot ve RT-PCR ile LPS uygulaması ve hipoksi maruziyeti durumlarında HIF-1 α ve PON2'nin protein ve mRNA ekspresyonları araştırılmıştır.

Western blot ile elde edilen bulgular LPS'nin tek başına HIF-1 α protein ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Tek başına hipoksi ile de ekspresyonu artan HIF-1 α 'nın, LPS ve hipoksi birlikte uygulandığında da ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir.

LPS'nin PON2 ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldığında tek başına LPS uygulamasında artış gözlenmezken hipoksi ve LPS-hipoksi koşulları birlikte uygulandığında PON2 ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışma PON2 proteininin hipoksi ve inflamatuvar yanıtla regule edildiğini göstermekle birlikte, hipoksi/LPS ve PON2 arasındaki ilişkinin aydınlatılması için bu yollarla ilgili ileri çalışmalar gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

Agani FH, Pichiule P, Chavez JC and LaManna JC 2000. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J. Biol. Chem.* 275:35863–35867.

Airley RE, Mobasher A (2007) Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 53: 233-256.

Aviram M. Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1301-3.

Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B (1998). Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1617–1624

Behn C, Araneda OF, Llanos AJ, Celedón G, González G. Hypoxia-related lipid peroxidation: evidences, implications and approaches. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007 Sep 30;158(2-3):143-50. Epub 2007 Jun 14.

Blouin CC, Page EL, Soucy GM. and Richard DE. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 α . *Blood* 2004 103: 1124-1130.

Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001; 294:1337–40. [PubMed: 11598268]

Callapina M, Zhou J, Schmid T, Kohl R and Brune B 2005. NO restores HIF-1 α hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 39:925–936.

Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, and Schumacker PT 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J. Biol. Chem.* 275:25130–25138.

Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V et al. (2003) HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112, 645–657

Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369:78-88.

Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN: Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000, 275:33435–33442.

Dumitru CD1, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, Patriotis C, Jenkins NA, Copeland NG, Kollias G, Tschlis PN. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell*. 2000 Dec 22;103(7):1071-83.

Elkiran ET, Mar N, Aygen B, Gursu F, Karaoglu A, Koca S. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer* 2007;7:48.

El Awad B, Kreft B, Wolber EM, Hellwig-Burgel T, Metzen E, Fandrey J and Jelkmann W. (2000) Hypoxia and interleukin-1 β stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int*. 58, 43–50

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR et al. *C.elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; 107: 43–54.

Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 139 (1998) 307–315.

Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999; 59: 3915–3918.

Forte TM, Subbanagounder G, Berliner JA, Blanche PJ, Clermont AO, Jia Z et al. Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice. *J Lipid Res* 2002;43:477-85.

Frede S, Stockmann C, Freitag P and Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- κ B. *Biochem. J*. (2006) 396, 517–527.

Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 2007; 129: 111–122.

Gao Xue-jiao et al. Bergein Plays an Anti-Inflammatory Role via the Modulation of MAPK and NF- κ B Signaling Pathways in a Mouse Model of LPS-Induced Mastitis. *Inflammation*: 1-9.

Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, and Schumacker PT. 2005. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell. Metab*. 1:401–408.

Harada H & Hiraoka M, Hypoxia-inducible factor 1 in tumor radioresistance. *Curr Signal Transd Ther* 5, 188–196 (2010).

- Harada H et al. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nat Commun* 3, 783 (2012).
- Harada H et al. Treatment regimen determines whether an HIF-1 inhibitor enhances or inhibits the effect of radiation therapy. *Br J Cancer* 100, 747–757 (2009).
- Harada H et al. Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance. *Oncogene* 26, 7508–7516 (2007).
- Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J and Jelkmann W. (1999) Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* **94**, 1561–1567
- Hudson CC et al. (2002) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22(20):7004–7014
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001; 292:468–72. [PubMed: 11292861]
- Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001; 15: 1312–1314.
- Ji LL, Gómez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1067 (2006), pp. 425–435
- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996; 271(4 Pt 1): C1172–C1180.
- Kaelin WG. (2005). ROS: really involved in oxygen sensing. *Cell Metab.* 1, 357–358.
- Kim J-W et al (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3(3):177–185
- Klimova T, and Chandel NS. (2008). Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ.* 15, 660–666.
- Lee CH, Lee KY, Choe KH, Hong YC, Kim YD, Kang JW, et al. Effects of oxidative DNA damage induced by polycyclic aromatic hydrocarbons and genetic polymorphism of the paraoxonase-1 (PON1) gene on lung cancer. *J Prev Med Pub Health* 2005;38(3):345-50.
- Li QF, Wang XR, Yang Lin H. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3 α expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1 α . *Cell Research* (2006)16: 548-558.
- Liu L et al. (2008) Hypoxia-inducible factor-1 α contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci* 99(1):121–128
- Lou JJ, Chua YL, Chew EH, Gao J, Bushell M et al. (2010) Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein synthesis by DNA damage inducing agents. *PLoS One* 5: e10522.

Makino Y et al. (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414(6863):550–554

Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 293–299.

Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J and Brune B. (2003) Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 α by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol. Biol. Cell* 14, 3470–3481

Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ et al. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 1998;213:149-57.

Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 2004; 5: 429–441.

Navab M, Hama SY, Wagner AC, Hough G, Watson AD, Reddy ST, Van Lenten BJ, Laks H, Fogelman AM (2002) Protective action of HDL-associated PON1 against LDL oxidation. In: Costa LG, Furlong CE (eds) *Paraoxonase (PON1) in health and disease*. Kluwer, Norwell, pp 125–136

Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;276:44444-9.

Ortmann B, Druker J, Rocha S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. ***Cell. Mol. Life Sci.*** 2014 71:3569–3582.

Poitz DM, Augstein A, Hesse K, Christoph M, Ibrahim K, Braun-Dullaeus RC, Strasser RH, Schmeißer. Regulation of the HIF-system in human macrophages – Differential regulation of HIF- α subunits under sustained hypoxia. ***Molecular Immunology*** 57 (2014) 226– 235

Peyssonaux C and Johnson RS. (2004) An unexpected role for hypoxic response: oxygenation and inflammation. *Cell Cycle* 3, 168–171

Precourt LP, Seidman E, Delvin E, Amre D, Deslandres C, Dominguez M et al. Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1628-37.

Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN: The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996, 33:498–507.

Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 26765–26771.

Rius J et al (2008) NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature* 453(7196):807–811

Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:468-74.

Rosenblat M, Hayek T, Hussein K, Aviram M. Decreased macrophage paraoxonase 2 expression in patients with hypercholesterolemia is the result of their increased cellular cholesterol content: effect of atorvastatin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:175-80.

Ross R, Atherosclerosis—an inflammatory disease *N Engl J Med*, 340 (1999), pp. 115–126

Rowles J, Scherer SW, Xi T, Majer M, Nickle DC, Rommens JM, *et al.* Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *J Biol Chem* 1996; 271 : 22376-82.

Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272: 22642-22647.

Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V and Caro J. (2003) MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J. Biol. Chem.* 278, 14013–14019

Sarada S, Himadri P, Mishra C, Geetali P, Ram MS, Ilavazhagan G. Role of oxidative stress and NFkB in hypoxia-induced pulmonary edema. *Exp Biol Med* (Maywood). 2008 Sep;233(9):1088-98. doi: 10.3181/0712-RM-337. Epub 2008 Jul 18.

Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR, and Chandel NS. 2002. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283:L922– L931.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721–732 (2003).

Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29, 625–634 (2010).

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 33, 207–214 (2012).

Shih DM, Gu L, Hama S, Xia Y-R, Navab M, Fogelman AM, *et al.* Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 1996;97:1630–9.

Shih DM, Gu LY, Xia R, Navab M, Li W, Hama S, *et al.* Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394:284-7.

Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. A biphasic U-shape effect of cellular oxidative stress on the macrophage anti-oxidant paraoxonase 2 (PON2) enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349: 1094-9.

Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Camper SA, La Du BN: The genetic mapping and gene structure of mouse paraoxonase/arylesterase. *Genomics* 1995, 30:431–438.

Su ND, Hung ND, Cheon–Ho P, Ree KM, Dai–Eun S. Oxidative inactivation of lactonase activity of purified human paraoxonase 1 (PON1). *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:155–60

Toschi A et al (2008) Differential dependence of hypoxiainducible factors 1 α and 2 α on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem* 283(50):34495–34499

Tracy K et al (2007) BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* 27(17):6229–6242

van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J and Sweder van Asbeck B (1999) Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor α production by human monocytes involves the Raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect. Immun.* 67, 3824–3829

van Uden P et al (2011) Evolutionary conserved regulation of HIF-1 β by NF- κ B. *PLoS Genet* 7(1):e1001285

Vekic J, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Topic A, et al. Association of oxidative stress and PON1 with LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur J Clin Invest* 2007; 37 : 715-23.

Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Putz V, Hescheler J, and Sauer H 2003. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J.* 17:503–505.

Waypa GB, Marks JD, Guzy R, Mungai PT, Schriewer J, Dokic D, and Schumacker PT. (2010). Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 106, 526–535.

Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 alpha. *Cell Death Differ.* 2008; 15:621–7. [PubMed:18259201]

Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G (2005) Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005: re12

Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003; 17: 271–273.

Yeom CJ, Goto Y, Zhu Y, Hiraoka M & Harada H. Microenvironments and cellular characteristics in the micro tumor cords of malignant solid tumors. *Int J Mol Sci* 13, 13949–13965 (2012).

Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J* 1998; 17: 5085–5094.

WEB_1. National Cancer Institute internet sitesi

<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/prevention/overview/patient/page2>

Son gncellenme tarihi 17.04. 2014

WEB_2. Wikipedia internet sitesi

http://en.wikipedia.org/wiki/Carcinogenesis#mediaviewer/File:Cancer_progression_from_NIH.png

Son gncellenme tarihi 10.12.2014

WEB_3. Scientific American internet sitesi

<http://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/files/2013/10/blood-vessels.png>

Son gncellenme tarihi 12.12.2014

ÖZGEÇMİŞ

Duygu MEYDANCI 1985 yılında İstanbul'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2005 - 2007 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu Ağız ve Diş Sağlığı ön lisans bölümünü bitirdi. 2008 - 2012 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2012 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.