

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEMOGLOBİN SEVİYESİ YÜKSEK BİREYLERDE HİPOKSİ
İLE İNDÜKLENEN FAKTÖR (HIF)-1 GEN POLİMORFİZMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Muhammet Yusuf TEPEBAŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 3780-YL2-13 proje numarası ile
desteklenmiştir.
Tez. No: 124**

ISPARTA-2014

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/07/2014

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

Üye : Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR

ONAY: Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

.....
Enstitü Müdürü

BEYAN

“Hemoglobin Seviyesi Yüksek Bireylerde Hipoksi ile İndüklenen Faktör (HIF-1) Gen Polimorfizminin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Muhammet Yusuf TEPEBAŞI

İmza

Danışman

Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e,

Danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve tecrübesiyle her zaman destek olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na,

Göstermiş olduğu destek için değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR'a,

İstatistiki analizlerimde bilgi ve tecrübesi ile destek olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU'na,

Çalışmalarında yardım ve desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN'e,

Tıbbi Biyoloji AD asistan arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarımdan Muhammed ERDOĞAN ve Murat AKTEPE'ye,

Çalışmalarımı destekleyen SDÜ BAP Koordinasyon Birimine ve SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsüne,

Hayatım boyunca bana destek olan aileme, hayatıma anlam ve değer katan sevgili eşim Gülsüm YAVUZ TEPEBAŞI'ya teşekkür ederim.

Isparta, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. HIF-1	3
2.2. HIF-1'in Yapısı	4
2.3. HIF-1 α ve β Alt Üniteleri	6
2.4. HIF-1 α Stabilizasyonunun Moleküler Mekanizması	7
2.4.1. HIF-1 α Proteininin Oksijen Seviyeleri ile Düzenlenmesi	7
2.4.2. HIF-1 α 'nın Normoksik Şartlar Altında Stabilizasyonu.....	8
2.5. HIF-1 α Protein Sentezi	9
2.6. HIF-1'in Hedef Genleri	10
2.6.1. Anjiogenez.....	12
2.6.2. Hücre Çoğalması/Hayatta Kalma	13
2.6.3. Glikoz Metabolizması.....	13
2.6.4. Demir Metabolizması	14
2.7. HIF-1 Hedefli Terapiler.....	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	16
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	17
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	18
3.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	19
3.4. <i>HIF-1</i> α Polimorfizmlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması.....	20
3.4.1. <i>HIF-1</i> α Promotor Bölgelerinin Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	20
3.4.2. PCR Koşulları.....	21
3.4.3. PCR Ürünlerinin Kontrolü.....	23
3.4.4. Enzim Kesim Reaksiyonu	23

3.4.5. Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü.....	24
3.4.5.1. <i>HIF-1 α</i> C111A Polimorfizminin Enzim Kesimi Sonrası Değerlendirilmesi	24
3.4.5.2. <i>HIF-1 α</i> C1772T Polimorfizminin Enzim Kesimi Sonrası Değerlendirilmesi	25
3.4.5.3. <i>HIF-1 α</i> G1790A Polimorfizminin Enzim Kesimi Sonrası Değerlendirilmesi	26
3.4.6. İstatistiksel Analizler	27
3.4.6.1. Gruplar Arası Farklılıklar	27
3.4.6.2. Genotip ve Allel Frekansları	27
3.4.6.3. Hardy-Weinberg Dengesi Testi	27
3.4.6.4. Genetik İlişkilendirme Analizi Testi	28
4. BULGULAR	29
4.1. Vaka ve Kontrol Gruplarının Temel Karakteristikleri	30
4.2. <i>HIF-1 α</i> C111A Polimorfizmi Bulguları	31
4.2.1. <i>HIF-1 α</i> C111A Genotip ve Allel Frekansları	32
4.2.2. <i>HIF-1 α</i> C111A Polimorfizminin Hastalık ile İlişkisi	33
4.3. <i>HIF-1 α</i> C1772T Polimorfizmi Bulguları	34
4.3.1. <i>HIF-1 α</i> C1772T Genotip ve Allel Frekansları	35
4.3.2. <i>HIF-1 α</i> C1772T Polimorfizminin Hastalık ile ilişkisi.....	36
4.4. <i>HIF-1 α</i> G1790A Polimorfizmi Bulguları.....	38
4.4.1. <i>HIF-1 α</i> G1790A Genotip ve Allel Frekansları.....	39
4.4.2. <i>HIF-1 α</i> G1790A Polimorfizminin Hastalık ile İlişkisi.....	40
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	46
ÖZET.....	47
ABSTRACT	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ.....	59
BEYAN.....	60

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

EPO	: Eritropoetin
ATP	: Adenozintrifosfat
DNA	: Deoksiribonükleikasit
HIF	: Hipoksi inducible factor
KDa	: Kilodalton
PTEN	: Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
ADM	: Adrenomedullin
ALDA	: Aldolase A
ALDC	: Aldolase C
AMF	: Otokrin motilite faktörü
MDA	: Malon Dialdehit
CATHD	: Katepsin D
EG-VEGF	: Endocrine gland-derived VEGF
VEGF	: Vasküler endotelyal growth faktör
ENG	: Endoglin
ET1	: Endotelin-1
ENO1	: Enolaze 1
FN1	: Fibronektin 1
GLUT1	: Glukose transporter 1
GLUT3	: Glukose transporter 3
GAPDH	: Gliseraldehit-3-P-dehidrogenaz
HK1	: Hekzokinaz 1
IGF2	: İnsulin-like growth factor 2
IGF-BP	: IGF-faktor-binding-protein
KRT	: Keratin
LDHA	: Laktat dehidrogenaz
LEP	: Leptin

LRP1	: LDL-receptor-related protein 1
MDR1	: Multidrug resistance 1
MMP2	: Matriks metalloproteinaz 2
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PFKFB3	: 6-fosfofurukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bipfosfataz-3
PFKL	: Fosfofuruktokinaz L
PGK	: Fosfogliserat kinaz
PAI	: Plasminojen aktivator inhibitor
PKM	: Pirüvat kinaz M
TGF	: Transforming growth faktör
TPI	: Tiroz fosfat izomeraz
UPAR	: Ürokinaz plazminojen aktivatör resptör
VIM	: Vimentin
VEGFR2	: VEGF receptor-2

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: HIF-1'in hedef genleri	11
Tablo 2: <i>HIF-1</i> α C111A, C1772T ve G1790A için master mix hazırlanması.....	22
Tablo 3: <i>HIF-1</i> α C111A polimorfizmi için PCR şartları	22
Tablo 4: <i>HIF-1</i> α C1772T ve G1790A polimorfizmi için PCR şartları.....	23
Tablo 5: Restriksiyon Enzim Karışımının Hazırlanması.	24
Tablo 6: Hasta ve kontrol gruplarının temel karakteristikleri ve gruplar arasındaki sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında bağımsız iki grup arası farkların t testi değerleri.....	30
Tablo 7: <i>HIF1</i> α C111A Polimorfizminin Temel Karakteristikleri	31
Tablo 8: <i>HIF-1</i> α C111A polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarında genotip frekansları, allel frekansları ve Hardy-Weinberg dengesi testi.....	32
Tablo 9: <i>HIF-1</i> α C111A polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (A risk alleli).	33
Tablo 10: <i>HIF-1</i> α C111A polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (C risk alleli)	33
Tablo 11: <i>HIF-1</i> α C1772T Polimorfizminin Temel Karakteristikleri	34
Tablo 12: <i>HIF-1</i> α C1772T polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarında genotip frekansları, allel frekansları ve Hardy-Weinberg dengesi testi.....	36
Tablo 13: <i>HIF-1</i> α C1772T polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (T risk alleli).	37
Tablo 14: <i>HIF-1</i> α C1772T polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (C risk alleli).	37
Tablo 15: <i>HIF-1</i> α G1790A Polimorfizminin Temel Karakteristikleri	38
Tablo 16: <i>HIF-1</i> α G1790A polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarında genotip frekansları, allel frekansları ve Hardy-Weinberg dengesi testi.....	40
Tablo 17: <i>HIF-1</i> α G1790A polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (A risk alleli).....	41
Tablo 18: <i>HIF-1</i> α G1790A polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (G risk alleli).....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: <i>HIF-1</i> geninin yapısı ve fonksiyonları	4
Şekil 2: <i>HIF-1</i> 'i uyaran sinyal iletim yolu.....	5
Şekil 3: <i>HIF-1</i> α 'nın yapısı	6
Şekil 4: <i>HIF-1</i> β 'nın yapısı.....	6
Şekil 5: <i>HIF-1</i> α proteini'nin Pirozil hidrosilaz ve Proteozomal Parçalanma ile Düzenlenmesi.....	8
Şekil 6: IGF ve TGF gibi büyüme faktörlerinin PI3K or MAPK yoluyla oksijenden bağımsız olarak <i>HIF-1</i> α sentezini arttırması.....	9
Şekil 7: <i>HIF-1</i> α 'nın VEGF üzerine etkisi.....	12
Şekil 8: <i>HIF-1</i> α 'nın Glikoz metabolizması üzerine etkisi	14
Şekil 9: <i>HIF-1</i> α gen bölgesi üzerinde C111A için amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın harfler primer dizilerini ifade etmektedir.	20
Şekil 10: <i>HIF-1</i> α gen bölgesi üzerinde C1772T ve G1790A için amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın harfler primer dizilerini ifade etmektedir.....	20
Şekil 11: <i>HIF-1</i> α C111A için restriksiyon enzim kesim şematik örnekleme.....	25
Şekil 12: <i>HIF-1</i> α C1772T (rs11549465) Polimorfizmi için rs11549465 numaralı nükleotit değişim gösterimi	25
Şekil 13: <i>HIF-1</i> α C1772T için restriksiyon enzim kesim şematik örnekleme	26
Şekil 14: <i>HIF-1</i> α G1790A (rs11549467) Polimorfizmi için rs11549467 numaralı nükleotit değişim gösterimi..	26
Şekil 15: <i>HIF-1</i> α G1790A için restriksiyon enzim kesim şematik örnekleme.....	27

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: <i>HIF-1</i> α C111A Polimorfizmine Ait Jel Elektroforez Görüntüsü.....	31
Resim 2: <i>HIF-1</i> α C1772T Polimorfizmine Ait Jel Elektroforez Görüntüsü	34
Resim 3: <i>HIF-1</i> α G1790A Polimorfizmine Ait Jel Elektroforezi Görüntüsü	38

1. GİRİŞ

Oksijen, organizmanın birçok hücresi için metabolik aktiviteler için zorunlu olan ATP'nin yeterli miktarda üretilmesinde gereklidir. Hipoksi veya oksijen yokluğu kalp, akciğer, anemi ve dolaşım problemlerine ait bozuklukları içeren çeşitli şartlara bağlı olarak insan doku ve hücrelerinde meydana gelir. Şiddetine bağlı olarak, doku ve hücrelerde kalıcı hasar oluşturabilir (1).

Ancak, hipoksi insan fizyolojisi ve gelişiminde de önemli ve faydalı bir rol oynayabilir. Bu gerçeklik embriyonal gelişimin ayrılmaz bir parçasıdır. Mekanizmalar tam olarak bilinmemesine rağmen, oksijen basıncı nöral tüp kapanması, apoptoza aracılık etme ve gebelik boyunca uygun morfolojik gelişim ile ilgilidir (2). Bu bulgular, genetik işaretlere ek olarak hipoksi gibi çevresel şartlarında embriyonik gelişimde sinyal göstergesi olarak değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur (3, 4).

Birçok organizma hipoksik koşullara uyum sağlayacak mekanizmalar geliştirmiştir. Değişen oksijen seviyeleri, belirli hemeostatik düzenleyici genlerin aktivasyonu veya baskılanması ile sonuçlanabilir ve değişen çevresel şartlarda hücre ve dokuların hayatta kalması sağlanır. Hipoksik şartlar tarafından aktive edilen *HIF-1* geni bunlardan biridir ve doku büyümesi ile damarlanmayı kontrol etmek için diğer transkripsiyon faktörleri ve enzimlerle ilişkiye girebilmektedir (5,6).

Temel olarak hipoksi tarafından ekspresyonu kontrol edilen *HIF-1* birçok genin düzenlenmesinde rol alır (7). Bu proteinin etki ettiği mekanizmalar, çok sayıda genin transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücrelerin dediferansiyasyonu, vaskülarizasyon, otokrin büyüme faktörü üretimi, proliferasyon, invazyon ve metastaz, metabolik yeniden programlanma, tümör büyümesinin artması olarak sıralanabilir (8, 9).

İnsanlardaki kalıtsal genetik kusurlar (mutasyonlar), kimyasalları aktive eden ve detoksifiye eden enzimlerin yapısını ve ifade edilme düzeyini (karsinojen metabolizmasını) etkileyen kişisel genetik farklılıklar, DNA hasarının onarım kapasitesini etkileyen polimorfik/genetik değişiklikler, kanser riskini arttırabilen başlıca genetik faktörlerdir. Toplumda polimorfizmlere mutasyonlardan daha sık rastlanır ve toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipi ya

da gen seçenekleri polimorfizm olarak tanımlanır. İnsan genomunda en çok görünen genetik çeşitlilik, tek nükleotit polimorfizmleridir. Genomda binlerce aday polimorfik genin bulunması ve genomunda bu farklılıkları taşıyan kişilerin kanser gelişimine olan duyarlılıklarını etkileyebilecek olması pek çok araştırmacıyı bu çalışma alanına yönlendirmektedir. İnsan genom proje çalışmalarıyla tüm genomdaki genlerin ve nükleotit dizilerinin belirlenmesinden sonra, genlerin ifade edilme düzeyleri ve ifade edilen gen ürünlerinin yapı ve işlevindeki farklılıklarını belirleme çalışmaları hız kazanmıştır (10).

Bu tez çalışmasıyla, hemoglobin düzeyi ortalama 17,72 g/dl olan 209 vaka grubunda ve hemoglobin düzeyi ortalama 15,1 g/dl olan 100 kontrol grubunda *HIF-1* α geninin 2. ekzonunda bulunan C111A ve 12. ekzonunda bulunan C1772T ve G1790A nükleotitlerinde meydana gelen polimorfizmleri ve sonuçta sırası ile 28. kodonda serinden tirozin, 582. kodonda prolinden serin ve 588. kodonda alaninden treonin aminoasitine dönüşümünün araştırılması amaçlanmaktadır.

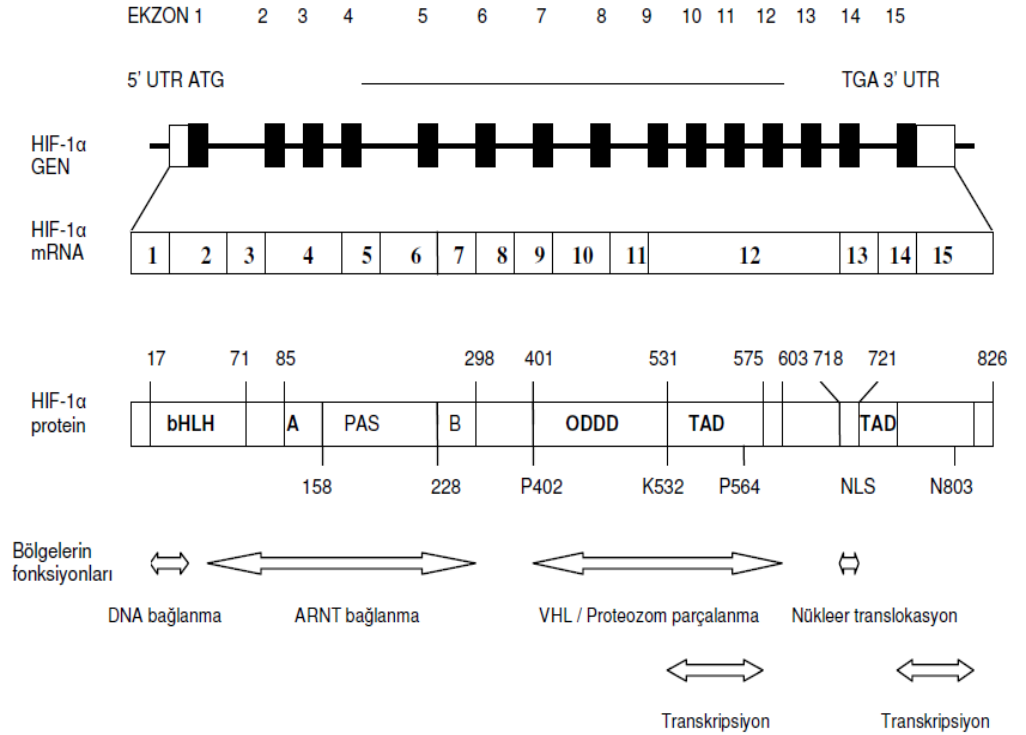
2. GENEL BİLGİLER

2.1. HIF-1

HIF-1 ilk olarak hipoksiye cevaben eritropoietinin (EPO) artmasına sebep olan transkripsiyonel kompleks olarak tanımlanmıştır. Semenza ve Wang 1992'de EPO'nun 3' Hipoksi Response Elementi (HRE) ile oksijene bağımlı şekilde etkileştiği bir çekirdek faktörünü keşfetmişlerdir. Bu DNA bağlayan kompleksi "Hypoxia-inducible factor 1"ya da 'HIF-1'olarak adlandırmışlardır. Daha sonraki çalışmalar hipoksik koşullar altında HIF-1'in bağlama aktivitesinin çeşitli eritropoetin üretmeyen hücre serilerinde de bulunduğunu göstermiştir (11). Bu durum HIF-1'in hipoksiye cevap olarak gen ekspresyonu aktivitesinde genel bir role sahip olduğunu göstermiştir. Biyokimyasal saflaştırma kullanılarak, Wang ve Semenza HIF-1'in 120 KDa β -altünitesi ve 91-94 KDa α -altünitesini içeren heterodimerik faktör olduğunu açıklamışlardır (12). Yapılan çalışmalarda HIF-1' in altünitelerinin basic-helix-loop-helix (bHLH) ve PER-ARNT-SIM (PAS) bölgeleri içerdiğini ortaya koymuştur. HIF-1 α altünitesi yeni bir protein iken, HIF-1 β altünitesi Aril Hidrokarbon Reseptör Taşıyıcısı (Aryl Hydrocarbon Receptor Translocator ARNT) olarak önceden tanımlanmıştır. Daha sonra HIF-1 α , ARNT ve transkripsiyonel koaktivatör p300/CBP çalışmalar boyunca bağımsız olarak klonlanmıştır (13,14).

2.2. HIF-1'in Yapısı

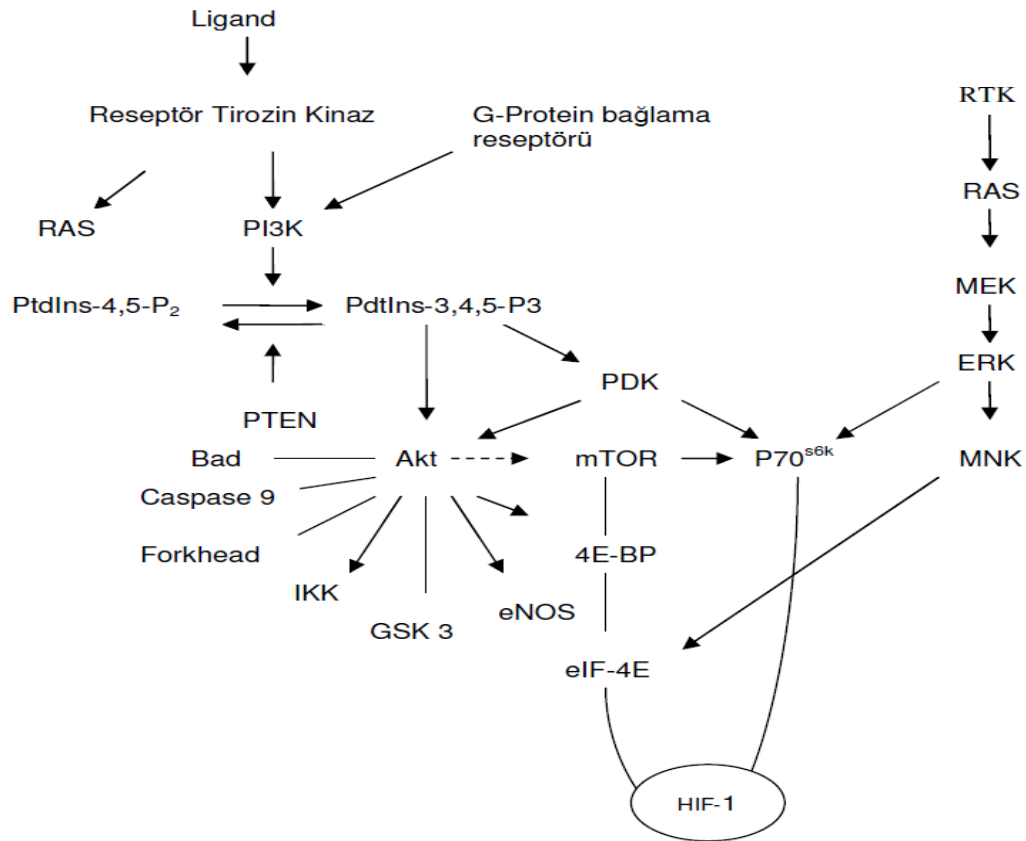
HIF-1, heterodimer yapıdadır. Sürekli eksprese olan HIF-1 β ve ekspresyonu sıkıca düzenlenen HIF-1 α altünitelerini içerir. HIF-1 α 15 ekzon tarafından kodlanan 826-aminoasitlik bir proteindir (12). N-ucu bHLH ve PAS bölgelerini içerir. Basic bölgesi DNA bağlanması için gereklidir. HLH-PAS bölgesine ise HIF-1 α ve HIF-1 β 'nin dimerizasyonu için ihtiyaç duyulur (15). C-ucu iki transaktivasyon bölgesi (TAD) içerir ki N-ucu TAD 531-575 aminoasitlerinde ve C-ucu TAD 786-826 aminoasitlerinde lokalizedir (16). Karbon ucunun sonunda bulunan 718-721 aminoasitleri nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içerir (17). Pro-ser-thr den zengin oksijen bağımlı parçalanma bölgesi (ODDD) HIF-1 α 'nın merkezi bölümünde 401-603 aa.'leri arasında lokalizedir ve HIF-1 α 'nın oksijen-bağımlı parçalanmasından sorumludur (18). HIF-1 heterodimeri DNA ana oluğunda yer alan 5'-RCGTG-3' konsensus dizisine bağlanır (11) (Şekil 1).



Şekil 1: *HIF-1* geninin yapısı ve fonksiyonları (19)

Hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF-1) protein sentezi PI3K ve ERK mitogen-activated protein kinase (MAPK) sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile

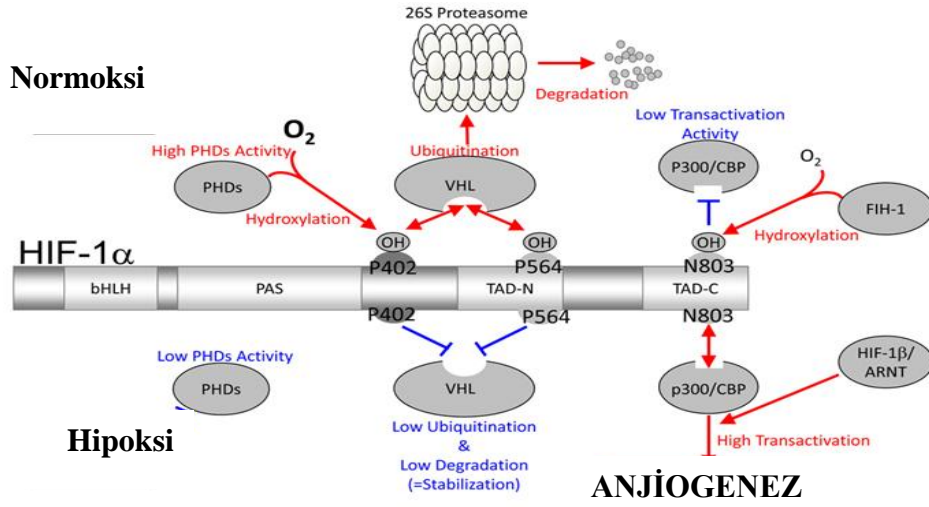
düzenlenir (Şekil 2). PI3K Reseptör Tirozin Kinaz ve G-protein bağımlı reseptörlerin aldığı uyarılarla aktive olur. PI3K fosfotidilinositol-4-fosfatı ve fosfotidilinositol-4,5-fosfatı sırasıyla fosfotidilinositol-3,4-fosfata ve fosfotidilinositol-3,4,5-fosfata dönüşümünü katalizler. Bu ürünler fosfotidilinositol-bağımlı kinaz-1'in allosterik aktivatörüdür ve Akt'yi (protein kinaz B) fosforile eder ve aktivasyonunu sağlar. Akt'nin hedefleri, apoptoz inhibitörü olan BAD, p70s6k'ı aktive eden FRAP hücre döngüsü gelişimi ve ribozomal biyogenez için ihtiyaç duyulan moleküllerdir. Bu bulgular PI3K/Akt yolağının hücre çoğalmasını uyarması ve hücre ölümünü inhibe etmesiyle nitelendirilir. Bu yolak PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) tarafından negatif olarak düzenlenir. PTEN fosfotidilinositol 3,4-difosfatı ve fosfotidilinositol 3,4,5-trifosfatı defosforile eder. Temel olarak HIF-1'in rolü transkripsiyonel aktivatör olarak anjiyogenez, glikolitik enzimler, glikoz taşıyıcılarının transkripsiyonunu düzenlemektir (Şekil 2).



Şekil 2: *HIF-1* i uyaran sinyal iletim yolu (20)

2.3. HIF-1 α ve β Alt Üniteleri

HIF-1, α alt birimi ve β bölgesi olarak bilinen Aril Hidrokarbon Nükleer Reseptör Translokator (ARNT)'den meydana gelen heteromerik transkripsiyon faktörüdür (12). Her bir alt birim bHLH-PAS (Per/Arnt/Sim) ailesine aittir. Oksijen seviyeleri, HIF-1 α 'nın protein stabilizasyonunu, hücre içi lokalizasyonunu ve transkripsiyonunu etkileyebilir (Şekil 3). Oysa β (ARNT) alt birimi (Şekil 4) yapısal olarak ifade edilir ve oksijen seviyelerinden etkilenmez (13). HIF-1 α alt birimi β (ARNT) alt birimi ile birleşerek transkripsiyonel faktör olarak rol oynar. Her bir alt birim PAS-A ve PAS-B olarak tanımlanan PAS alanları içerir. bHLH ve PAS bölgeleri α ve β bölgeleri arasında heterodimer oluşumu ve DNA bağlanması için gereklidir (14-21). HIF-1 α TAD-N ve TAD-C (N- ve C- transaktivasyon alanları) inhibitör alanlarla köprü kuran bölgeleri içerir (21). TAD-N oksijen bağımlı parçalanma (ODD) bölgesi ile örtüşür. TAD-C P300/CBP koaktivatörü ile etkileşir ve HIF aktivitesi için gereklidir (22).



Şekil 3: HIF-1 α 'nın Yapısı (23)



Şekil 4: HIF-1 β 'nin Yapısı (24)

2.4. HIF-1 α Stabilizasyonunun Moleküler Mekanizması

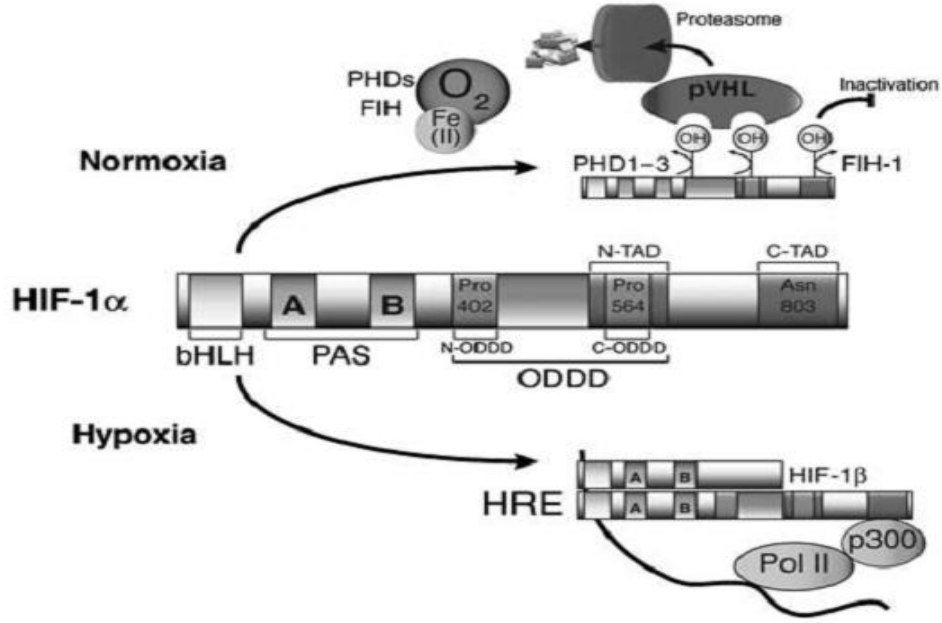
2.4.1. HIF-1 α Proteininin Oksijen Seviyeleri ile Düzenlenmesi

HIF-1 α proteini normoksik durumda pVHL aracılı ubiquitin-proteazom süreci yoluyla hızlı bir şekilde bozunmaya maruz kalır. Oysa hipoksik şartlar altında bozunma süreci engellenir ve HIF-1 α proteini ortamda birikir (25, 26). pVHL ile HIF-1 α 'nın ilişkisi, pirolil hidroksilaz (PHD) veya HIF pirolil hidroksilaz'ın (HPH) aracılılık ettiği prolin rezidülerinin post-translasyonel translasyonu ile tetiklenir. HIF-1 α hidroksilasyon için iki bölüm içerir, ODD alanlarının içerisinde Pro 402 ve 564 ve her bölümde korunmuş LXXLAP motifi içerir (27). Hidroksiprolin rezidüleri pVHL'nin hidrofobik çekirdeği içerisinde gömülü olarak gelir ve von Hippel-Lindau tümör supresör proteini ubiquitin-ligaz protein kompleksinin bir parçasıdır (28, 29). HPH ve PHD ailesinin üç paraloğu keşfedilmiş ve şu şekilde isimlendirilmiştir (30); HPH-1/PHD3, HPH-2/PHD-2 ve HPH-3/PHD-1. HIF'in normoksik şartlarda hidroksilasyonundan HPH-2/PHD-2 sorumlu iken HPH-3/PHD-1 nükleusta, HPH-2/PHD-2 stoplazmada bulunur (31, 32).

Pirolil hidroksilaz, 2-oksoglutarat ve oksijen gerektiren dioksijenazdır. Bu enzim prolin rezidüsüne bir oksijen atomunu transfer eder ve ikinci oksijen atomu 2-oksoglutarat üreten süksinat ile reaksiyona girer. HIF-1 α için PHD aktivitesinin oksijen konsantrasyonuna bağlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle PHD oksijen sensörü olarak tanımlanmıştır (33, 34).

HIF-1 α nın ODD alanları ile ilişkili başka bir protein ARD1 asetil transferazdır (35). ARD-1'nin maya homologu düşük ökaryot ve bakterilerde protein N-asetiltransferaz (NAT) ekspresyonu için gereklidir ancak işlevi memeli hücrelerinde tanımlanmamıştır (36, 37). ARD-1 Ac-CoA'dan bir asetil grubu aktararak HIF-1 α 'nın ODD bölgesinde Lys-532 rezidüsünden asetillemediği rapor edilmiştir (38). ARD'nin azalmış ifadesi nedeni ile hipoksik etkiye maruz kalma zamanındaki artışa bağlı olarak HIF-1 α 'nın asetilasyon düzeyi azalır. ARD-1 ile Lys-532 arasındaki setilasyon HIF-1 α 'nın proteozomal bozunması için çok önemlidir. ARD-1 ile aktive edilmemiş mutant bir K532R stabilize edilerek ve pVHL ile etkileşiminin azaldığı gösterilmiştir (35). İlginç bir şekilde daha önce Lys

532'nin normoksik koşullar altında HIF-1 α bozulması için önemli olduğu bildirilmiştir (39). HIF-1 α 'nın nasıl asetillendiği belli olmamasına rağmen HIF-1 α 'nın stabilizasyonunda azalmaya yol açar. HIF-1 α 'nın yapısal değişimi onun pVHL ile ekileşimini ve proteozomal parçalanmasını arttırabilir (Şekil 5).



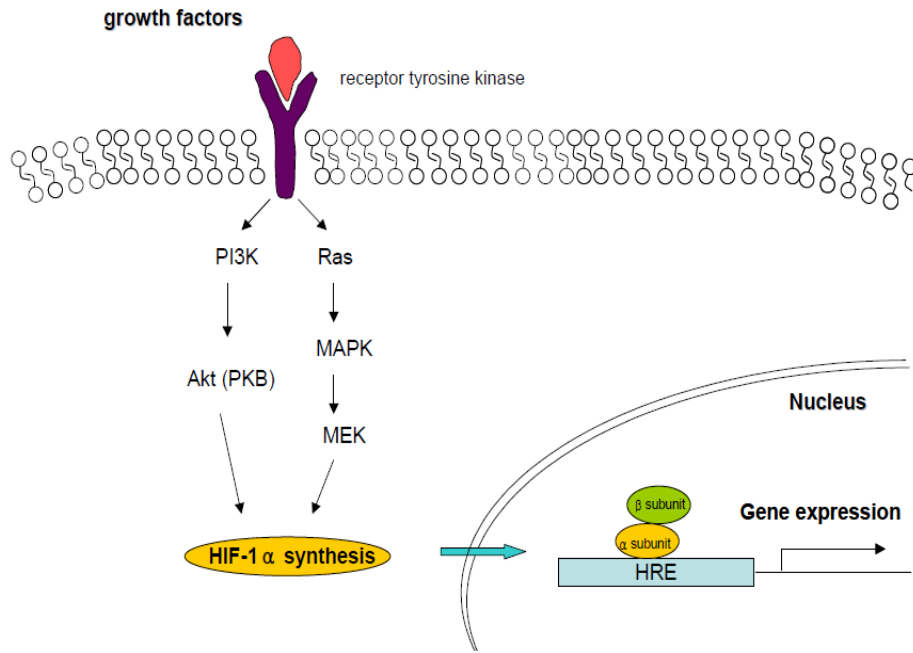
Şekil 5: HIF-1 α proteini'nin Pirozil hidrosilaz ve proteozomal parçalanma ile düzenlenmesi (39)

2.4.2. HIF-1 α 'nın Normoksik Şartlar Altında Stabilizasyonu

Birçok büyüme faktörü ve sitokinlerin; örneğin insülin, insülin benzeri büyüme faktörleri, transforming growth faktör, trombosit türevi büyüme faktörü, epidermal growth faktör, interlökin-1 β 'da dahil olmak üzere normoksik şartlar altında HIF-1 α 'yı stabilize ettiği bilinmektedir (40-46). Bu faktörlerin HIF-1 α 'yı nasıl stabilize ettiği tam olarak bilinmemesine rağmen ortak bir hücresel kinaz yolu içeriyor olabilecekleri düşünülmektedir. Nitrik oksit'in normoksik şartlar altında HIF-1 α 'yı stabilize ettiği rapor edilmiştir (47, 48).

2.5. HIF-1 α Protein Sentezi

Büyüme faktörleri hipoksiye bakılmaksızın protein translasyonuna neden olur. Oysa hipoksi HIF-1 α 'nın bozunmasındaki azalma ile ilişkilidir. Böylece HIF-1 α 'nın normoksik şartlar altında bozunması oksijen sensörü aracılığıyla gerçekleşebilir. Muhtemelen büyüme faktörü reseptörü tirozin kinaza bağlanarak fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) yollarını aktive eder (49-53). Daha sonra PI3K protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen Akt'yi aktive eder. MAPK yolunda büyüme faktörü Ras ve diğer basamakları aktive eder. HIF-1 α sentezinin rolüne ek olarak MAPK yolağı HIF'in transkripsiyonal aktivitesinide artırır. Bu etki, ERK ile P300'ün fosforilasyonundan kaynaklanmaktadır (54-57) (Şekil 6).



Şekil 6: IGF ve TGF gibi büyüme faktörlerinin PI3K or MAPK yoluyla oksijenden bağımsız olarak HIF-1 α sentezini artırması (50)

2.6. HIF-1'in Hedef Genleri

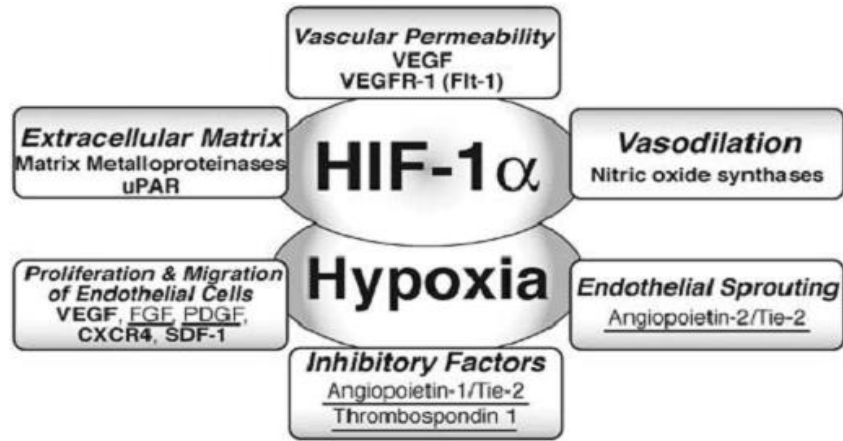
HIF-1 oksijenle düzenlenen gen ifadelerinin ana düzenleyicisi olarak rol oynar. Aşağı yukarı 60'dan fazla hedef gen tanımlanmıştır. HIF-1'in hedef genleri özellikle anjiogenik faktörleri kodlayan kanserle ilişkili genler, proliferasyon/hayatta kalma, glikoz taşıyıcıları ve glikolitik enzimlerle ilgili genlerdir (58) (Tablo. 1).

Tablo 1: *HIF-1*'in hedef genleri (58)

Fonksiyon	Gen
Hücre Proliferasyonu	Siklin G2, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, WAF-1, TGF- α , TGF- β 3
Hücrenin Hayatta kalması	ADM, EPO, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, NOS2, TGF- α , VEGF
Apoptozis	NIP3, NIX, RTP801
Motilite	ANF/GPI, c-MET, LRP1, TGF- α
Sitoskeletal Yapı	KRT14, KRT18, KRT19, VIM
Hüce Adezyonu	MIC2
Eriropoezis	EPO
Anjiogenez	EG-VEGF, ENG, LEP, LRP1, TGF- β 3, VEGF
Damar Tonusu	α 1B-adrenergik receptor, ADM, ET1, Hem oxygenase-1, NOS2
Transkripsiyonal Düzenleme	DEC1, DEC2, ETS-1, NUR77
pH regülasyonu	Karbonik anhidraz 9
HIF-1 aktivitesinin Düzenlenmesi	P35srj
Epitelyal Hemeostaz	Intestinal trefoil factor
İlaç Rezistansı	MDR1
Nükleotit metabolizması	Adenylate kinase 3, Ecto-5'-nucleotidase
Demir Metabolizması	Seruloplasmin, Transferrin, Transeferrin receptor
Glukoz Metabolizması	HK1, HK2, AMF/GPI, ENO1, GLUT1, GAPDH, LDHA, PFKBF3, PFKL, PGK1, PKM, TPI,ALDA, ALDC
Ekstraselüler Matris Metabolizması	CATHD, Collagen type V (α 1), FN1, MMP2, PAI1, Prolyl-4-hydroxylase α (1), UPAR
Enerji Metabolizması	LEP
Aminoasit Metabolizması	Transglutaminase 2

2.6.1. Anjiogenez

Patolojik veya fizyolojik şekilde düşük oksijen basıncına sahip olan (hipoksik) avasküler tümör veya stroma hücreleri çeşitli pro-anjiogenik genlerin indüksiyonu ve oksijen algılama mekanizmalarının sonucu olarak anjiogenezi tetikler (59-61). Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) önemli hedef genlerden biridir, özellikle hipoksik ve avasküler alanın içerisindeki öncül endotelyal hücreleri uyarır. VEGF en güçlü endotele özgü mitojendir ve anjiogeneze doğrudan katıldığı bilinmektedir (62-66). Bu growth faktör reseptörü VEGFR ile etkileşime girer. Özellikle endotel hücrelerinde ifade edilir ve endotel hücrelerinin çoğalmasını uyarır (67-70). Ayrıca hipoksi VEGF mRNA'nın ve proteinin ifadesini artırır. Yani hipoksinin VEGF ekspresyonunu upregülasyon yoluyla artırarak anjiogenezi uyardığı gösterilmiştir (71). Anjiogenezin indüksiyonu vasküler yoğunlukta bir artışa yol açar ve dolayısıyla oksijen difüzyon mesafesinde bir azalmaya neden olur. Bununla birlikte patofizyolojik şartlar altında lokal kan akımı, HIF-1 hedef genlerin hepsini içeren NO, CO, Endotelin-1, adrenomedülin veya $\alpha 1 \beta$ adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu ile damar tonüsü değiştirilerek kontrol edilir (72-77). Bu nedenle HIF-1, muhtemelen damar olgunlaşmasında yer alan ilave hedef genleri de işe alarak VEGF indüksiyonundan daha karmaşık mekanizmalarla anjiogeneze katkıda bulunur (78) (Şekil 7).



Şekil 7: HIF-1 α 'nın VEGF üzerine etkisi (78)

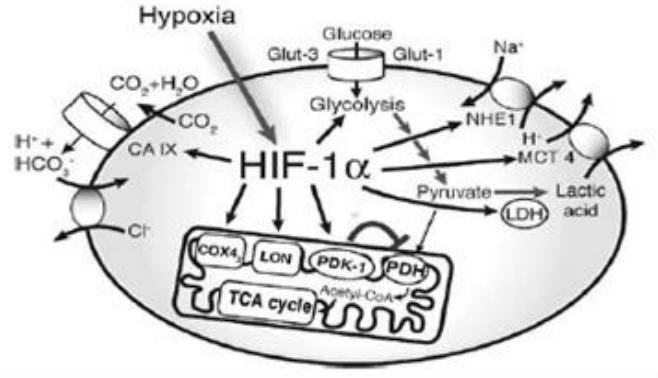
2.6.2. Hücre Çoğalması/Hayatta Kalma

Hipoksi kaynaklı büyüme faktörlerinin hücrenin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını geliştirdiği bilinmektedir. Çeşitli büyüme faktörleri özellikle insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2) ve transforming growth faktör- α (TGF- α) aynı zamanda HIF-1 hedef genleridir. Bu faktörlerin aynı kökenden olan kendi reseptörlerine bağlanması, insülin-like growth faktör 1 reseptörü (IGFIR) ve epidermal growth faktör reseptörü hem HIF-1'in ekspresyonunu hem hücrenin çoğalması ve hayatta kalmasını sağlayan sinyal transdüksiyon yollarını aktive eder (79). Hücre dışı büyüme faktörlerine cevap olarak hücre çoğalmasını düzenleyen mitojen aktive edilmiş protein kinazların p42/p44'ün HIF-1 α 'yı fosforile ettiği ve HIF-1 hedef genlerinin transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (80). Fosfatidilinositol 3-OH (PI3K) aktivitesi, hipoksik koşullar altında bazı hücre tiplerinde artar (81). PI3K, birçok tirozin kinaz sinyal yollarının en önemli araçlarından biridir ve hücre proliferasyonu ve apoptozun bastırılmasının düzenlenmesinde yer almaktadır. PI3K yolu fosfoinosid fosfataz (PTEN) tarafından inhibe edilir ve PTEN'deki mutasyonlar HIF-1 aktivasyonundaki cevabı geliştirir (82). PTEN hücre proliferasyonunu ve büyümesini düzenler ve glioblastom, endometrial tümörler ve prostat kanserini içeren bazı insan kanserlerinde mutasyona veya delesyona uğramıştır (83). Bu nedenle HIF-1 kanser süreci için kritik olan otokrin sinyal yoluna katkıda bulunmaktadır.

2.6.3. Glikoz Metabolizması

Hipoksik şartlar altında hücreler oksijenden bağımsız metabolik yola girerler ve ATP üretiminin birincil mekanizması olarak glikolizisi kullanırlar (84, 85). Glikolizis her glukoz molekülü için yalnızca 2 ATP molekülü sağlar. Aksine TCA siklusu 38 ATP sağlamaktadır. Glikoliz ve glikoz alımını içeren birçok gen HIF-1'in hedef geni olarak tanımlanmıştır (86) (Şekil 8). HIF-1 hem glikolitik yoldaki bütün enzimlerin, hem de hücresel glikoz alımına aracılık eden GLUT-1 ve GLUT-3 glikoz transporturlarının ifadesini düzenler (87). Anaerobik glikoliz sonucunda laktat üretiminde artış ve pH seviyelerinde düşme meydana gelir. Böylece yeterli glukoz miktarına rağmen bu ATP kaynağı belirli ölçülerde sınırlandırılmış olur. Transmembran karbonik anhidrazın HIF-1'in hedef genlerinden biri olduğu rapor

edilmiştir (88). Aslında artan glikolizis çoğalan hücreler için normal bir tepkidir ve aynı zamanda göç eden hücreler de enerji kaynağı olarak bu yolu kullanır (89). Glikolitik yolun ara metabolitleri, stres altında hücrelerin yaşaması ve büyümesi için gerekli olan glisin, serin, pürin, pirimidin ve fosfolipidlerin sentezi için gerekli prekürsörleri sağlar (90).



Şekil 8: *HIF-1* α 'nın Glikoz metabolizması üzerine etkisi (89)

2.6.4. Demir Metabolizması

Hipoksinin eritroid dokulara demir taşınımını sağlayan transferrinin ekspresyonunu arttırdığı ortaya konmuştur (91). Transferrin reseptörü, hücresel transferinin alımını sağlayan hipoksi ile indüklenen HIF-1'in hedef genidir (92). Seruloplasminin de HIF-1'in hedef geni olduğu bildirilmiştir (93, 94). Ayrıca seruloplasmin bir ferooksidaz olarak da bilinir ferrik demiri ferröz duruma geçirmek için gereklidir. Yalnız ferrik demir transferrin tarafından bağlanabilir ve hipoksik seruloplasmin indüksiyonu eritroid dokuya yeterli demir desteği sağlamak için gereklidir (95).

2.7. HIF-1 Hedefli Terapiler

HIF-1 α 'nın birçok insan kanserinde aşırı derecede eksprese edildiği bulunmuştur (96, 97). *HIF-1* α 'nın aşırı ekspresyonu ve hasta ölümleri arasındaki anlamlı ilişki beyin, meme, rahim ağzı, orofarinks, yumurtalık ve rahim kanserlerinde gösterilmiş fakat baş boyun kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri için rapor edilmemiştir (98, 99). Yani *HIF-1* α 'nın aşırı ekspresyonunun etkisi kanser tipine bağlıdır. HIF-1 α 'nın etkisinin bloke edilmesi kanser sürecinin durdurulmasında yardımcı olabilir (100). Son çalışmalar HIF-1 α 'nın kemoterapi ve radyasyon direncine aracılık ettiğini gösteren kanıtlar sağlamıştır (101, 102). HIF-1 α aktivitesinin inhibisyonu, HIF-1 α 'nın kendisini veya HIF-1 α ile ilgili proteinleri bloke etmek için geliştirilmiş olan anti-anjiogenik terapilerin kombinasyonunun önemli bir bileşenini temsil edebilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan 2013/3484 sayılı kararı ile etik kurul izni alınarak Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Tıbbi Biyokimya Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Poliklinik ve Servis hastalarından tanıya bakılmaksızın 17 ve üzeri yaşa sahip ve tam kan sayımı sonucunda, hemoglobin seyiyesi 17g/dl ve üzerinde bulunan 209 adet vaka ve 100 adet kontrol kanı tanıya bakılmaksızın alınmış ve EDTA'lı tüplerde +4°C'de saklanmıştır.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Beckman Coulter LH 750 Tam Kan Sayım Cihazı
- PCR tüpü (Corning 3745)
- Eppendorf Tüpü (Corning 3622)
- Mavi Pipet Ucu (Boeco 1-200-80-2)
- Sarı Pipet Ucu (Boeco 1-110-81-1)
- DNA Saklama Kutusu (Biosigma N40.4111)
- Tüp Sporu (LP N40.4005)
- Mikrosantrifüj (Heraus Biofuge D-37520, Germany)
- Otoklav (Hirayama HVE-50, Japan)
- Etüv (Binder, Türkiye)
- Buzdolabı (Arçelik-8188 NF, Türkiye)
- Derin Dondurucu (Beko 8460T, Türkiye)
- Kar Makinası (Hoshizaki FM-120EE, EU)
- Bidistile Su Cihazı (Millipore Simlicity 185, France)
- Su Banyosu (Termal Laboratuvar Aletleri 820-3, Türkiye)
- Laminar Hava Kabini (ESCO, Türkiye)
- Vorteks (Nüve NM 110, Türkiye)
- Termal Cyclers (Peqlab Primus 96, Germany)
- Hassas Terazı (Shimadzu AX 200, Japan)
- Mikrodalga Fırın (Beko MD 1505, China)
- Manyetik Karıştırıcı (IKA RH-KT/C, Brazil)
- Elektroforez Tankı (Scie-plas V-GEL, UK)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Consort EV215, Belgium)
- Transillüminatör (Ultra Lum. Inc., Türkiye)
- PCR cihazı

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Etidyum Bromid (Sigma E-1510)
- GeneJet Whole Blood Genomik DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific K0781-K0782)
- Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific Recombinant EP 0402)
- Agaroz (Prona Biomax PR 134527)
- dNTP Mix (Promega U1515)
- 10xPCR Buffer (Thermo Scientific 166526)
- Bidistile Su (Sigma W-3500)
- Molekuler weight marker DNA (Thermo Scientific SM0371)
- 6x DNA Loading (Thermo Scientific R0611)
- Restriksiyon Enzimi

HIF-1 α C111A için *BglII* (Recombinant)

HIF-1 α C1772T için *HphI* (Recombinant)

HIF-1 α G1790A için *AclI* (Recombinant)

- Primerler

HIF-1 α C111A polimorfizmi için

Forward Primer : 5'-GGA TAA GTT CTG AAC GTCGA-3'

Reverse Primer : 5'-ATC CAG AAGTTT CCT CAC AC-3'

HIF-1 α C1772T ve G1790A polimorfizmi için

Forward Primer : 5'-AAG GTG TGG CCA TTG TAAAAA CTC-3'

Reverse Primer : 5'-GCA CTAGTA GTT TCT TTA TGT ATG-3'

3.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

1. 1,5 ml'lik ependorf tüplere 200 µl kan örneği kondu ve üzerine 20µl Proteinaz K solüsyonu eklendi. Vorteksenerek homojenize edildi.
2. Üzerine 400µl lizis solüsyonu eklendi homojen süspansiyon elde etmek için vortekslendi.
3. Su banyosu 56 °C' ye ısıtıldı ve numuneler 10 dakika arada bir vorteksenerek inkübe edildi.
4. Üzerlerine 200µl etanol ilave edilerek pipetle karıştırıldı.
5. Hazırlanan karışım spin kolona aktarıldı.
6. 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Süzülen solüsyonu içeren toplama tüpü atıldı ve yeni bir toplama tüpünün içerisine kolon yerleştirildi.
8. 500 µl Wash Buffer (WB) 1 (Etanol ilaveli) kolona ilave edilerek 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
9. Toplama tüpüne süzülen kısım atıldı ve spin kolon tekrar toplama tüpünün içerisine yerleştirildi.
10. 500 µl Wash Buffer (WB) 2 (Etanol ilaveli) spin kolona ilave edildi. 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
11. Spin kolon 1,5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi ve genomik DNA'nın elute edilebilmesi için kolon membranının merkezine 200 µl Elution Buffer eklendi.
12. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilerek 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Spin kolon atıldı ve örnekler PCR aşamasında kullanılmak üzere -20 derecede saklandı.

3.4. *HIF-1* α Polimorfizmlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması

3.4.1. *HIF-1* α Promotor Bölgelerinin Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri

HIF-1 α polimorfizmlerinin gözlemlendiği bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Primerler uluslararası yayınlarda doğrulanmıştır.

***HIF-1* α C111A polimorfizmi için;**

Forward Primer: 5'-GGA TAA GTT CTG AAC GTC GA-3'

Reverse Primer: 5'-ATC CAG AAG TTT CCT CAC AC-3'

HIF-1 α C111A polimorfizmi için amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi şekil 9'da gösterilmiştir.

```
GGATAAGTTCTGAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCGAGATGCAGCCAGAT
CTCGGCGAAGTAAAGAATCTGAAGTTTTTATGAGCTTGCTCATCAGTTG
CCACTTCCACATAATGTGAGTTCGCATCTTGATAAGGCCTCTGTGATGAG
GCTTACCATCAGCTATTTGCGTGTGAGGAACTTCTGGAT
```

Şekil 9: *HIF-1* α gen bölgesi üzerinde C111A için amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın harfler primer dizilerini ifade etmektedir.

***HIF-1* α C1772T ve G1790A polimorfizmi için;**

Forward Primer : 5'-AAG GTG TGG CCA TTG TAAAAA CTC-3'

Reverse Primer : 5'-GCA CTAGTA GTT TCT TTA TGT ATG-3'

HIF-1 α C1772T ve G1790A için amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi şekil 10'da gösterilmiştir.

```
AAGGTGTGGCCATTGTAAAACTCATGTATTTGCTGTTTTAAAGGACAC
AGATTTAGACTTGGAGATGTTAGCTCCCTATATCCCAATGGATGATGACC
TCCAGTTACGTTCCCTTCGATCAGTTGTCACCATTAGAAAGCAGTTCCGCA
AGCCCTGAAAGCGCAAGTCCTCAAAGCACAGTTACAGTATTCCAGCAGA
CTCAAATACAAGAACCTACTGCTAATGCCACCACTACCACTGCCACCACT
GATGAATTA AAAACAGTGACAAAAGACCGTATGGAAGACATTA AAATAT
TGATTGCATCTCCATCTCCTACCCACATACATAAAGAACTACTAGTGC
```

Şekil 10: *HIF-1* α gen bölgesi üzerinde C1772T ve G1790A için amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın harfler primer dizilerini ifade etmektedir

3.4.2. PCR Koşulları

Toplam PCR hacmi 25 µl olacak şekilde Tablo 2'deki bileşenler sırası ile 0.5 ml'lik tüplere ilave edildi. PCR karışımının hazırlama işlemleri buz üzerinde ve steril kabin içerisinde yapıldı.

C111A polimorfizmi için HIF-1 Forward primer, 20,2 nmol olarak lyofilize formda gönderilmiştir. Üzerine 202 µl dH₂O eklendi ve 100 pmol stok primer elde edildi. 90 µl dH₂O üzerine 10 µl stok primerden eklenerek 10 pmol/µl primerler hazırlandı.

C111A polimorfizmi için HIF-1 Reverse primer, 21,9 nmol olarak lyofilize formda gönderilmiştir. Üzerine 219 dH₂O eklendi. 100 pmol stok primer elde edildi. 90 µl dH₂O üzerine 10 µl stok primerden eklenerek 10 pmol/µl primer hazırlandı.

C1772T ve G1790A polimorfizmleri için HIF-1 α Forward primer 20,17 nmol olarak lyofilize formda gönderilmiştir. Üzerine 202 µl dH₂O eklendi. 100pmol stok primer elde edildi. 90 µl dH₂O üzerine 10 µl stok primerden eklenerek 10 pmol/µl primer hazırlandı.

C1772T ve G1790A polimorfizmleri için HIF-1 α Reverse primer 21,86 nmol olarak lyofilize formda gönderilmiştir. Üzerine 219 µl dH₂O eklendi. 100 pmol stok primer elde edildi. 90 µl dH₂O üzerine 10 µl stok primerden eklenerek 10 pmol/µl primer hazırlandı.

Her bir dNTP den 25 µl alınarak üzerine 900 µl dH₂O ilave edildi ve 1.000 µl'lik dNTP karışımı hazırlandı. Taq polimeraz eklendikten sonra hiç vakit kaybetmeden tüp içine konulan bileşenlerin iyice karışması için pipetaj yapıldı ve böylece master mix hazırlanmış oldu. Tablo 2'de bir bireye ait PCR master miksi için hesaplama örneği verilmiştir.

0.2 ml'lik PCR tüplerine 21 µl reaksiyon karışımı dağıtılarak, her bir tüpe 4 µl DNA ilave edildi. Tüpler hızlı santrifüj yapıldıktan sonra PCR cihazına yerleştirildi. C111A için PCR basamakları Tablo 3'de C1772T ve G1790A için PCR basamakları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 2: *HIF-1* α C111A, C1772T ve G1790A için master mix hazırlanması

	1x
10x Buffer	2.5 μ l
dNTP mix	2.0 μ l
MgCl ₂	1.5 μ l
Forward Primer (10 pmol)	2.5 μ l
Reverse Primer (10 pmol)	2.5 μ l
Taq DNA Polimeraz (5U/ μ l)	0.5 μ l
dH ₂ O	9.5 μ l
DNA (30ng)	4.0 μ l
TOPLAM	25 μl

Tablo 3: *HIF-1* α C111A Polimorfizmi için PCR şartları

Initialization Step (İlk Denatürasyon)	95°C	5 dakika	
Denaturasyon Step (Denatürasyon)	95°C	30 saniye	30 siklus
Annealing Step (Primer Bağlanma)	60°C	30 saniye	
Extension Step (Uzama)	72°C	30 saniye	
Final Elongation (Son Uzama)	72°C	5 dakika	

Tablo 4: *HIF-1 α* C1772T ve G1790A polimorfizmi için PCR şartları

Initialization Step (İlk Denatürasyon)	95°C	5 dakika	
Denaturasyon Step (Denatürasyon)	95°C	45 saniye	30 siklus
Annealing Step (Primer Bağlanma)	61°C	45 saniye	
Extension Step (Uzama)	72°C	45 saniye	
Final Elongation (Son Uzama)	72°C	5 dakika	

3.4.3. PCR Ürünlerinin Kontrolü

PCR ürünlerinin amplifikasyonunu kontrol etmek amacı ile PCR tüpünden alınan 8 µl örnek 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jelde 100 voltta 30 dakika yürütüldü. PCR ürünü oluşumu gözlenen örnekler +4°C'de enzim kesim reaksiyonu için saklandı. Amplifikasyonun gerçekleşmediği örneklerde ise yeniden PCR yapıldı. Bazı kuyucuklarda ise DNA gözlemlenemediğinden ilgili numuneler için tekrar DNA izolasyonu ve PCR yapıldı.

3.4.4. Enzim Kesim Reaksiyonu

HIF-1 α C111A polimorfizm bölgesi için *BglII*, *HIF-1 α* C1772T için *HphI* ve *HIF-1 α* G1790A için *AclI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim reaksiyonları gerçekleştirildi. Restriksiyon enzim karışımı Tablo 5' deki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 5: Restriksiyon Enzim Karışımının Hazırlanması

	1x
PCR ürünü	16 µl
dH ₂ O	28 µl
10x NE Buffer	5 µl
Restriksiyon Enzimi	1 µl
TOPLAM	50 µL

Restriksiyon enzim karışımından her bir örnek için 34 µl elde edildi. Enzim kesimi için toplam hasta sayısı kadar hazırlanan HIF-1 enzim kesim karışımı vortekslendi ve hızlı santrifüj yapıldı. Her bir tüpe 34 µl restriksiyon enzim karışımından dağıtıldı. Kan örneklerinden elde edilmiş olan PCR ürünlerinden 16'şar µl PCR ürünü bu karışım üzerine ayrı ayrı eklendi ve hızlı santrifüj yapılarak 37°C'lik etüvde 30 dakika inkübe edildi.

3.4.5. Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü

%3'lük agaroz jel hazırlandı ve restriksiyon enzimi ile kesilen PCR ürününden yaklaşık 8 µl ve yükleme tamponundan 2 µl alınarak karıştırılıp agaroz jeldeki kuyucuklara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri, DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar transsliminatör cihazında değerlendirildi ve fotoğraflandı.

3.4.5.1. *HIF-1* α C111A Polimorfizminin Enzim Kesimi Sonrası Değerlendirilmesi

PCR ürünü: 187 bp

Restriksiyon enzimi: *BglII*

Enzim Kesim Sonucu:

CC homozigot normal: 143+44 bp

AA homozigot polimorfik: 187 bp

CA heterozigot: 187+143+44 bp

	CC	AA	CA
187 bp		—————	—————
143 bp	—————		—————
44 bp	—————		—————

Şekil 11: *HIF-1 α* C111A için restriksiyon enzim kesim şematik örnekleme

3.4.5.2. *HIF-1 α* C1772T Polimorfizminin Enzim Kesimi Sonrası Değerlendirilmesi

HIF-1 α C1772T polimorfizminin enzim kesim bölgesi şekil 12’de gösterilmiştir.

GTTACGTTCCCTTCGATCAGTTGTCA[C/T]CATTAGAAAGCAGTTCCGCAAG CC

Şekil 12: *HIF-1 α* C1772T (rs11549465) Polimorfizmi için rs11549465 numaralı nükleotit değişim gösterimi (103)

PCR ürünü: 346 bp







Restriksiyon enzimi: *HphI*

Enzim Kesim Sonucu:

CC homozigot normal: 228+118 bp

TT homozigot polimorfik: 346 bp

CT heterozigot: 346+228+118 bp

	CC	TT	CT
346 bp			
228 bp			
118 bp			

Şekil 13: *HIF-1* α C1772T için restriksiyon enzim kesim şematik örnekleme

3.4.5.3. *HIF-1* α G1790A Polimorfizminin Enzim Kesimi Sonrası Değerlendirilmesi

HIF-1 α C1772T polimorfizminin enzim kesim bölgesi şekil 14'de gösterilmiştir.

GTTGTCACCATTAGAAAGCAGTTCC[A/G]CAAGCCCTGAAAGCGCAAGTCA

Şekil 14: *HIF-1* α G1790A (rs11549467) Polimorfizmi için rs11549467 numaralı nükleotit değişim gösterimi (104)

PCR ürünü: 346 bp

Restriksiyon enzimi: *AclI*

Enzim Kesim Sonucu:

GG homozigot normal: 201+145 bp

AA homozigot polimorfik: 346 bp

GA heterozigot: 346+201+145 bp

	GG	AA	GA
346 bp		—————	—————
201 bp	—————		—————
145 bp	—————		—————

Şekil 15: *HIF-1 α* G1790A için restriksiyon enzim kesim şematik örnekleme

3.4.6. İstatistiksel Analizler

3.4.6.1. Gruplar Arası Farklılıklar

Sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında bağımsız iki grup arası farkların t testi (independent samples "t" test) IBM SPSS Statistics 20 Programı kullanılarak değerlendirilmiştir. İki yönlü $p < 0.05$ düzeyindeki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.4.6.2. Genotip ve Allel Frekansları

Genotip ve allel frekansları elektroforetik band görünümüne göre değerlendirilmiştir. Allel frekansları allel sayımı ile hesaplanmıştır. Genotipler hem sayı ve hem de yüzde olarak belirtildi. Bütün vakalardaki muhtemel üç genotip ve allel frekansları (p ve q) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Allel frekansı (p)} = ((2 \times \text{homozigot}) + \text{heterozigot}) / (2 \times N)$$

N= Toplam birey sayısı

3.4.6.3. Hardy-Weinberg Dengesi Testi

Bütün örneklerin Hardy-Weinberg dengesinden (HWE) sapmaları test edildi. HWE testi aşağıdaki temel varsayımlara göre yapıldı; birincisi kayda değer mutasyon

yoktur, tüm genotiplere sahip bireyler çiftleşebilme yeteneğindedirler ve dolayısıyla da genlerini aktarabilme yeteneğine sahiptirler, endojen populasyon içersine diğer populasyon gruplarından değişken allel frekanslı bireylerin kayda değer göçü yoktur. İkincisi, populasyon çok büyüktür ve ilgili lokus dikkate alındığında rastgele çiftleşmeler vardır. HWE üç muhtemel genotipin iki terimli (binomial) açılımı ile ilişkili olup olmadığını araştırır:

$$(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2$$

Eşitlik beklenen sayıları hesaplamada kullanılır ve daha sonra chi-square testi serbestlik derecesine (serbestlik derecesi = genotiplerin sayısı – allellerin sayısı) göre beklenen sayılar ile gözlenen sayıları karşılaştırır.

HWE analizi online program kullanılarak yapıldı (105). HWE analizi pearson's goodness-of-fit-chi-square (serbestlik derecesi =1), Log-likelihood ratio chi-square (serbestlik derecesi=1) ve exact testi için P değerini hesaplar. HWE programı aynı zamanda populasyonda heterozigotluk seviyesini tanımlayarak akrabalık derecesini belirten değeri gösteren F değerini de hesaplar.

3.4.6.4. Genetik İlişkilendirme Analizi Testi

Değişkenler ile hastalık riski arasındaki ilişkiyi belirlemede odds oranları (OR), %95 güvenlik aralığında (CI) Institute of Human Genetics tarafından sağlanan online erişim programı (105) ile belirlendi.

Bu programa göre allel 1 wild tip allel ve allel 2 polimorfik olan alleldir. Aşağıdaki eşitlikler kullanılarak OR'ler hesaplanmaktadır.

Heterozigotluk: (Vaka_12 x Kontrol_11) / (Vaka_11 x Kontrol_12)

Homozigotluk: (Vaka_22 x Kontrol_11) / (Vaka_11 x Kontrol_22)

Allel positivitesi: ((Vaka_12 + Vaka_22) x Kontrol_11) / (Vaka_11 x (Kontrol_12 + Kontrol_22))

Armitage's common trend: (Vaka_12xKontrol_11 / N01 + Vaka_22 x Kontrol_12 / N12 + 4x (Vaka_22xKontrol_11 / N02)) / (Vaka_11xKontrol_12/ N01 + Vaka_12xKontrol_22/N12 + 4x (Vaka_22xKontrol_11xVaka_11xKontrol_22) x 0.5 / N02)

4. BULGULAR

Bu çalışmada, hemoglobin düzeyi 17 g/dl ve üzeri olan hastalardan toplanan örneklerde *HIF-1 α* gen polimorfizmi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Polikliniklerine müracet eden hastalardan tanıya bakılmaksızın hemoglobin değeri sonucu 17 g/dl ve üzeri olan hastalardan örnekler toplanmış ve yine tanıya bakılmaksızın hemoglobin değeri normal sınırlarda olan hastalardan kontrol grubuna ait kanlar alınarak PCR-RFLP yöntemi ile *HIF-1 α* C111A, C1772T ve G1790A polimorfizmlerinin allel ve genotipik tayinleri yapılmıştır.

Çalışmamızda hemoglobin düzeyi 17 g/dl ve üzerinde bulunan 209 adet kan alınmış ve hemoglobin değerinin ortalama 17,7 g/dl, yaş ortalamasının da 41,4 olduğu tesbit edilmiştir. Çalışmamız kontrol grubu olarak hemoglobin değerinin ortalama 15,1 yaş ortalamasının ise 47 olduğu 100 adet kan alınarak yapılmıştır.

Allel frekansları belirlenen *HIF-1 α* C111A, C1772T ve G1790A genotipleri istatistiki olarak Hardy-Weinberg Dengesi ve İlişkilendirme Testi ile değerlendirilmiştir.

4.1. Vaka ve Kontrol Gruplarının Temel Karakteristikleri

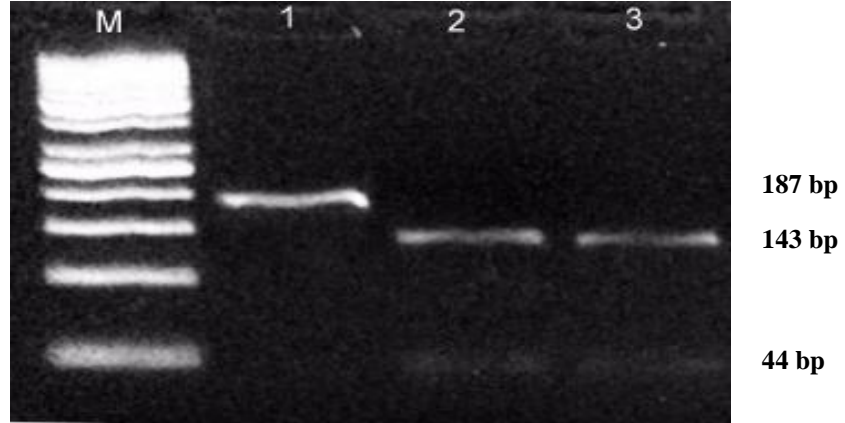
Hasta ve kontrol grubunun yaş ve hemoglobin sürekli değişkenlerinin özellikleri ve istatistiksel değerlendirilmesi tablo da görülmektedir. Hasta ve kontrol grubunda hem yaş ($t = -2,80$, $p < 0,005$) ve hem de hemoglobin konsantrasyonları ($t = 30,50$, $p < 0,0001$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (Tablo 6).

Tablo 6: Vaka ve kontrol gruplarının temel karakteristikleri ve gruplar arasındaki sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında bağımsız iki grup arası farkların t testi değerleri

Değişken	Vaka durumu	N	Ortalama	SD	SE	t değeri	Ortalama farkları	P
Yaş (yıl)	Vaka	206	41,47	17,35	1,20	-2,80	-5,61	0,005
	Kontrol	100	47,08	14,48	1,45			
Hemoglobin (g/dL)	Vaka	206	17,73	0,67	0,05	30,50	2,61	0,000
	Kontrol	100	15,11	0,78	0,07			

4.2. *HIF-1 α* C111A Polimorfizmi Bulguları

Hemoglobin düzeyi ortalama 17,7 g/dl olan 209 hasta ve 15,1 g/dl olan 100 kontrol grubuna ait numune *HIF-1 α* geninde yer alan C111A polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge PCR ile çoğaltılmış ve *BglIII* restriksiyon enzimi kullanılarak amplifikasyon ürününün kesimi gerçekleştirilmiştir.



Resim 1: *HIF-1 α* C111A Polimorfizmine Ait Jel Elektroforez Görüntüsü

PCR ürünü: 187 bp

Restriksiyon enzimi: *BglIII*

CC homozigot normal: 143+44 bp

AA homozigot polimorfik: 187 bp

CA heterozigot: 187+143+44 bp

Tablo 7: *HIF1 α* C111A Polimorfizminin Temel Karakteristikleri

Vaka durumu	Genotip	N	Hemoglobin (g/dL) ± SD	SE	t değeri	Ortalama farkları	P
Vaka	CC	209	17,73±0,67	0,05	-	-	-
	CA	0	-	-	-	-	-
	AA	0	-	-	-	-	-
Kontrol	CC	100	15,11±0,78	0,07	-	-	-
	CA	0	-	-	-	-	-
	AA	0	-	-	-	-	-

HIF-1 α C111A için 209 vaka grubunda AA homozigot polimorfik 0, CA heterozigot 0 ve CC homozigot normal 209 olarak bulunmuştur. 100 kontrol grubunda AA homozigot polimorfik 0, CA heterozigot 0 ve CC homozigot normal 100 olarak bulundu (Tablo 7).

4.2.1. *HIF-1 α* C111A Genotip ve Allel Frekansları

Tablo 8’de kontrol ve vaka gruplarındaki genotip ve allel dağılımlarını göstermektedir. Genotip frekansları sırasıyla CC, CA ve AA için vaka grubunda %100, %0,0 ve %0,0 olarak kontrol grubunda ise %100, %0,0 ve %0,0 olarak bulundu. CA ve AA genotipleri her iki grupta da görülmedi.

Pearson’s goodness of fit chi square, log likelihood ratio chi square or P exact testi olmak üzere üç test kullanımı ile yapılan HWE analizinde (Tablo 8) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Akralılık sabiti değeri vaka ve kontrol grubunda 0,000 olarak bulundu.

Tablo 8: *HIF-1 α* C111A polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarında genotip frekansları, allel frekansları ve Hardy-Weinberg dengesi testi

	Vaka (n=209)	Kontrol (n=100)
Genotip frekansları		
CC	209 (%100)	100 (%100)
CA	0 (%0)	0 (%0)
AA	0 (%0)	0 (%0)
Allel frekansları		
C alleli	1,00	1,00
A alleli	0,00	0,00
Hardy-Weinberg dengesi testi		
F-inbreeding coefficient	0,000	0,000
P-Pearson's goodness of fit χ^2 (DF=1)	1	1
P-Log likelihood ratio χ^2 (DF=1)	1	1
P Exact test	1	1

4.2.2. *HIF-1* α C111A Polimorfizminin Hastalık ile İlişkisi

HIF-1 α C111A polimorfizminin muhtemel hastalık ile ilişkisi değerlendirilerek OR'leri hesaplandı. Tablo 9'da A risk faktörü olarak Tablo 10'da ise C risk faktörü olarak değerlendirme yapılmıştır. Tabloya göre C111A polimorfizminin hastalık riski üzerine her hangi bir etkisi görülmemektedir.

Tablo 9: *HIF-1* α C111A polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (A risk alleli)

C111A Hb Yüksekliği ilişkisi	OR	%95 CI	X ²	P
C'ye göre A	0,479	0,009-24,23	-	1,000
CC'ye göre CA	0,480	0,009-24,35	-	1,000
CC'ye göre AA	0,480	0,009-24,35	-	1,000
CC'ye göre CA +AA	0,480	0,009-24,35	-	1,000
Armitage's trend test	-		-	-

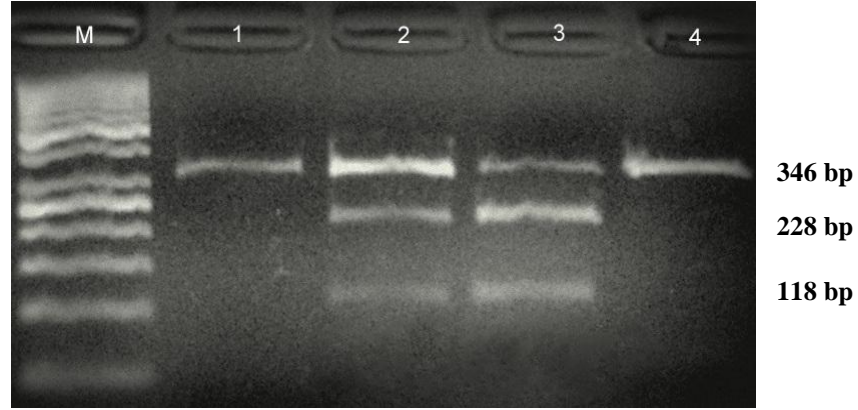
Tablo 10: *HIF-1* α C111A polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (C risk alleli)

C111A Hb Yüksekliği ilişkisi	OR	%95 CI	X ²	P
A'ye göre C	2,087	0,041-105,573	-	1,000
AA'ye göre CA	1,000	0,004-255,600	-	1,000
AA'ye göre CC	2,085	0,004-105,816	-	1,000
CA + CC'ye göre AA	2,085	0,004-105,816	-	1,000
Armitage's trend test	-		-	-

Laboratuvar çalışmaları sonucunda, *HIF-1* α C111A polimorfizmi açısından elde edilen veriler ışığında her bir bireye ait kan örnekleri allel frekansı ve genotipleri açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilememiştir.

4.3. *HIF-1* α C1772T Polimorfizmi Bulguları

Hemoglobin düzeyi ortalama 17,7 g/dl olan 209 hasta ve 15,1 g/dl olan 100 kontrol grubuna ait numune *HIF-1* α geninin promotor bölgesinde yer alan C1772T polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge PCR ile çoğaltılmış ve *HphI* restriksiyon enzimi kullanılarak amplifikasyon ürününün kesimi gerçekleştirilmiştir.



Resim 2: *HIF-1* α C1772T Polimorfizmine Ait Jel Elektroferez Görüntüsü

PCR ürünü: 346 bp

Restriksiyon enzimi: *HphI*

Enzim Kesim Sonucu:

CC homozigot normal: 228+118 bp

TT homozigot polimorfik: 346 bp

CT heterozigot: 346+228+118 bp

Tablo 11: *HIF-1* α C1772T Polimorfizminin Temel Karakteristikleri

Vaka durumu	Genotip	N	Hemoglobin (g/dL) \pm SD	SE	t değeri	Ortalama farkları	P
Vaka	TT	96	17,67 \pm 0,67	0,07	-1,061	0,099	0,290
	CT	113	17,78 \pm 0,66	0,06			
	CC	0	-	-	-	-	-
Kontrol	TT	54	15,14 \pm 0,84	0,11	0,336	0,053	0,737
	CT	46	15,08 \pm 0,71	0,10			
	CC	0	-	-	-	-	-

HIF-1 α C1772T için 209 vaka grubunda TT homozigot polimorfik 96, CT heterozigot 113 ve CC homozigot normal 0 olarak bulunmuştur. 100 kontrol grubunda TT homozigot polimorfik 54, CT heterozigot 46 ve CC homozigot normal 0 olarak bulundu (Tablo 11).

4.3.1. *HIF-1 α* C1772T Genotip ve Allel Frekansları

Tablo 12’de kontrol ve vaka gruplarındaki genotip ve allel dağılımlarını göstermektedir. Genotip frekansları sırasıyla CC, CT ve TT için vaka grubunda %0, %54,16 ve %45,94 olarak kontrol grubunda ise %0, %44,00 ve %66,00 olarak bulundu. CC genotipi her iki grupta görülmezken T alleli frekansları her iki grupta yüksek bulundu. C alleli ve CT genotip frekansları vaka grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Pearson’s goodness of fit chi square, log likelihood ratio chi square or P exact testi olmak üzere üç test kullanımı ile yapılan HWE analizinde (Tablo 12) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.05$). Aynı zamanda akrabalık sabiti F değeri de belirlendi. Akrabalık sabiti değeri vaka ve kontrol grubunda sırasıyla 0,370049 ve 0,25000 olarak bulundu.

Tablo 12: *HIF-1* α C1772T polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarında genotip frekansları, allel frekansları ve Hardy-Weinberg dengesi testi

	Vaka (n=209)	Kontrol (n=100)
Genotip frekansları		
CC	0 (%0)	0 (%0)
CT	113(% 54,06)	44 (% 44,00)
TT	96 (%45,94)	56 (% 56,00)
Allel frekansları		
C alleli	0,270	0,200
T alleli	0,730	0,800
Hardy-Weinberg dengesi testi		
F-inbreeding coefficient	0,370	0,250
P-Pearson's goodness of fit χ^2 (DF=1)	0,000	0,009
P-Log likelihood ratio χ^2 (DF=1)	0,000	0,001
P Exact test	0,000	0,006

4.3.2. *HIF-1* α C1772T Polimorfizminin Hastalık ile İlişkisi

HIF-1 α C1772T polimorfizminin muhtemel hastalık ile ilişkisi değerlendirilerek OR'leri hesaplandı. Tablo 13'de T risk faktörü olarak Tablo 14'de ise C risk faktörü olarak değerlendirme yapılmıştır.

Allelik seviyede T ve C allelinin hastalık riski üzerine etkileri değerlendirildiğinde C allelinin hastalık riskini artırdığı gözlenmektedir (OR=1.842, CI: 0.99-2.19, p=0.049). T allelinin ise hastalık üzerine koruyucu etkisi olduğu görülmektedir (OR=0.675, CI: 0.45-1.00), p=0.049). Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre C alleli hastalık riskini anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir (p<0,05). C allelinin hastalık riski üzerine etkisi heterozigot ve resesif modellerde (TT'ye göre CC + CT) daha güçlü olarak ortaya çıkmaktadır (OR=1,77, CI: 1,11-2,82, p=0.017).

Tablo 13: *HIF-1* α C1772T polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (T risk alleli)

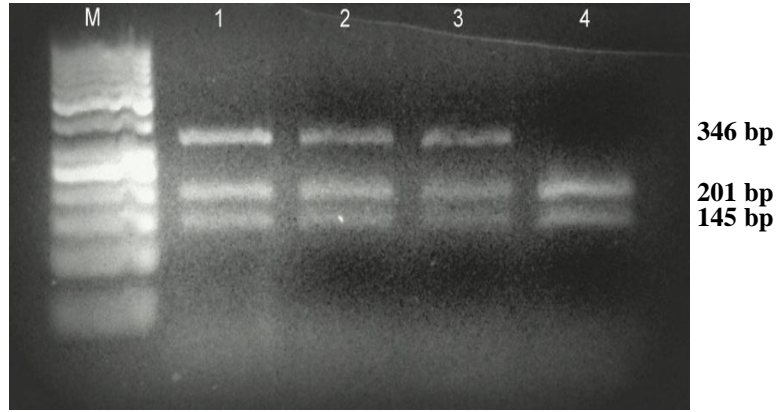
C1772T Hb	OR	%95 CI	X²	P
Yüksekliği ilişkisi				
C'ye göre T	0,675	0,45-1,00	3,84	0,049
CC'ye göre CT	2,551	0,05-130,52	-	1,000
CC'ye göre TT	1,451	0,028-74,05	-	1,000
CC'ye göre CT +TT	1,896	0,037-96,20	-	1,000
Armitage's trend test	0,605		5,72	0,017

Tablo 14: *HIF-1* α C1772T polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (C risk alleli)

C1772T Hb	OR	%95 CI	X²	P
Yüksekliği ilişkisi				
T'ye göre C	1,842	0,99-2,19	3,84	0,049
TT'ye göre CT	1,766	1,11-2,82	5,71	0,017
TT'ye göre CC	0,389	0,01-35,16	-	1,000
CT + CC'ye göre TT	1,766	1,11-2,82	5,71	0,017
Armitage's trend test	1,766		5,71	0,017

4.4. *HIF-1 α* G1790A Polimorfizmi Bulguları

Hemoglobin düzeyi ortalama 17,7 g/dl olan 209 hasta ve 15,1 g/dl olan 100 kontrol grubuna ait numune *HIF-1 α* geninde yer alan G1790A polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge PCR ile çoğaltılmış ve *AciI* restriksiyon enzimi kullanılarak amplifikasyon ürününün kesimi gerçekleştirilmiştir.



Resim 3: *HIF-1 α* G1790A Polimorfizmine Ait Jel Elektroforezi Görüntüsü

PCR ürünü: 346 bp

Restriksiyon enzimi: *AciI*

Enzim Kesim Sonucu:

GG homozigot normal: 201+145 bp

AA homozigot polimorfik: 346 bp

GA heterozigot: 346+201+145 bp

Tablo 15: *HIF-1 α* G1790A Polimorfizminin Temel Karakteristikleri

Vaka durumu	Genotip	N	Hemoglobin (g/dL) ± SD	SE	t değeri	Ortalama farkları	P
Vaka	GG	200	17,71±0,66	0,05	1,269	-0,287	0,206
	GA	9	18,00±0,74	0,24			
	AA	0	-	-			
Kontrol	GG	100	15,11±0,78	0,078	-	-	-
	GA	0	-	-	-	-	-
	AA	0	-	-	-	-	-

HIF-1 α G1790A için 209 vaka grubunda AA homozigot polimorfik 0, GA heterozigot 9 ve GG homozigot normal 200 olarak bulunmuştur. 100 kontrol grubunda AA homozigot polimorfik 0, GA heterozigot 0 ve GG homozigot normal 100 olarak bulundu (Tablo 15).

4.4.1. *HIF-1 α* G1790A Genotip ve Allel Frekansları

Tablo 16 kontrol ve vaka gruplarındaki genotip ve allel dağılımlarını göstermektedir. Genotip frekansları sırasıyla GG, GA ve AA için vaka grubunda %95,69, %04,31 ve %0,00 olarak kontrol grubunda ise %100, %0.00 ve %0,00 olarak bulundu. AA genotipi her iki grupta görülmezken GA genotipi sadece vaka grubunda bulundu. G alleli frekansları her iki grupta yüksek bulunurken A alleli ve GA genotip frekansları sadece vaka grubunda olduğu gözlemlendi.

Pearson's goodness of fit chi square, log likelihood ratio chi square or P exact testi olmak üzere üç test kullanımı ile yapılan HWE analizinde (Tablo 16) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Aynı zamanda akrabalık sabiti F değeri de belirlendi. Akrabalık sabiti değeri vaka ve kontrol grubunda sırasıyla 0,022 ve 0,000 olarak bulundu.

Tablo 16: *HIF-1 α* G1790A polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarında genotip frekansları, allel frekansları ve Hardy-Weinberg dengesi testi

	Kontrol (n=100)	Vaka (n=209)
Genotip frekansları		
GG	100 (% 100)	200 (% 95,69)
GA	0 (% 0,00)	9 (% 4,31)
AA	0 (% 0,00)	0 (% 0,00)
Allel frekansları		
G alleli	1,00	0,978
A alleli	0,00	0,022
Hardy-Weinberg dengesi testi		
F-inbreeding coefficient	0,000	0,022
P-Pearson's goodness of fit χ^2 (DF=1)	1	0,750
P-Log likelihood ratio χ^2 (DF=1)	1	0,656
P Exact test	1	1,000

4.4.2. *HIF-1 α* G1790A Polimorfizminin Hastalık ile İlişkisi

HIF-1 α G1790A polimorfizminin muhtemel hastalık ile ilişkisi değerlendirilerek OR'leri hesaplandı. Tablo 17'de A risk faktörü olarak Tablo 18'de ise G risk faktörü olarak değerlendirme yapılmıştır.

Allelik seviyede G ve A allelinin hastalık riski üzerine etkileri değerlendirildiğinde A allelinin hastalık riskini artırdığı gözlenmektedir (OR=9,303, CI: 0,539-160,637, p=0.035). G allelinin ise hastalık üzerine koruyucu etkisi olduğu görülmektedir (OR=0,107, CI: 0.006-1,856, p=0.035), Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre A alleli hastalık riskini anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir (p<0,05). A allelinin hastalık riskini artırıcı etkisi heterozigot (GG'ye göre GA) ve dominant modellerde (AA + GA'ye göre GG) istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir (OR=9,524, CI: 0549-165,285, p=0.035). Fakat gruplar arası istatistiksel değerlendirmede anlamlı farklılık yoktur.

Tablo 17: *HIF-1* α G1790A polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (A risk alleli)

G1790A Hb	OR	%95 CI	X²	P
Yüksekligi ilişkisi				
G'ye göre A	9,303	0,539-160,637	2,437	0,035
GG'ye göre GA	9,524	0,549-165,285	4,44	0,035
GG'ye göre AA	0,501	0,010-25,447	-	1,000
GG'ye göre GA +AA	9,524	0,549-165,285	4,44	0,035
Armitage's trend test	2,218		2,218	0,035

Tablo 18: *HIF-1* α G1790A polimorfizminin hemoglobin yüksekliği ilişkisi için Odds Ratios (ORs) (G risk alleli)

G1790A Hb	OR	%95 CI	X²	P
Yüksekligi ilişkisi				
A'ye göre G	0,107	0,006-1,856	4,37	0,049
AA'ye göre GA	19,00	0,150- 2409,756	-	1
AA'ye göre GG	1,995	0,039-101,281	-	1
GA + GG'ye göre AA	2,085	0,04-105,816	-	1
Armitage's trend test	0,516		4,44	0,035

5. TARTIŞMA

HIF-1 α, hipoksik şartlara uyum sağlamak için gerekli çok sayıda genin transkripsiyonunu teşvik etmek için oksijen yetersizliğinde aktif bir şekilde anahtar rol oynayan transkripsiyon faktörüdür. *HIF-1 α* polimorfizmleri, hipoksi ile ilgili hastalıkların ortaya çıkması veya ilerlemesi ile ilişkilerin belirlenmesi için yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Çalışmalarda birçok polimorfizm arasından en çok C111A, C1772T ve G1790A polimorfizmleri çalışılmıştır. Ayrıca iki polimorfizm C1772T ve G1790A sırası ile 582. kodonda prolinden serine, 588. kodonda alaninden treonine değişimi gerçekleştirir ve aminoasit dizilimi değişir. C1772T ve G1790A'nın kanserin değişik tiplerinde veya spesifik bazı hastalıklarda (örneğin TipII diabet ve İskemik kalp hastalığı) önemli olduğu daha öce yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Georgia Chachami et al. (106), yılında yapmış olduğu çalışmada, hipoksi ile tetiklenen ve önemli transkripsiyon faktörü olan *HIF-1 α*'nın osteonekroza genetik yatkınlıkta rol oynayıp oynamadığını değerlendirmişlerdir. Bunun için, 63 kontrol grubu ve 134 osteonekrozlu hasta grubunda bilinen üç *HIF-1 α* polimorfizmlerinin (C111A, C1772T ve G1790A) Yunan toplumunda osteonekrozla ilişkisini analiz etmişlerdir. Genotip analizi, PCR-RFLP kullanılarak gerçekleştirilmiş ve ayrıca nadir alleller sekanslanmıştır. C111A, C1772T ve G1790A allel frekansı osteonekrozlu hastalar ile kontrol hastaları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Sonuç olarak *HIF-1 α* genindeki missens mutasyonun osteonekroz gelişimi açısından önemli olmadığı ortaya konulmuştur.

Martin Ollerenshaw et al. (107), *HIF-1* geninin 12. ekzonunda bulunan C1772T ve G1790A polimorfizmlerinin sırasıyla 582. kodonda prolinden serin, 588. kodonda alaninden treonin aminoasitine değişimini incelemişlerdir. Çalışma, 160 renal cell ca (RCC)'lı hasta grubu ve 162 kontrol grubu üzerinde yapılmıştır. Normal sağlıklı kontrollere göre RCC hastalarında hem C/C1772 hemde G/A1790 genotip sıklığında oldukça anlamlı bir artış görülmüştür. Kontrollerle hasta grubu karşılaştırıldığında GG ve CT genotiplerinde bir azalma görülmüştür. Sonuç olarak, bu bulguların *HIF-1 α* gen polimorfizmine sahip olanlarda RCC yatkınlığı olabileceği gösterilmiştir.

Mario Fernando Mun˜oz-Guerra et al. (108), 12. ekzon da bulunan C1772T ve G1790A tek n˘kleotit polimorfizmlerinin oral skuamoz h˘creli karsinomda erken prognoz ˘zerine etkilerini araştırmışlardır. ˘alışmada 139 sağlıklı g˘n˘ll˘lerden elde edilen DNA ˘rneği ve 74 oral skuamoz h˘creli kanserli hastalardan elde edilmiş DNA ˘rnekleri kullanılmış ve PCR-RFLP metotları ile ˘alışılmıştır. G1790A ile ilgili olarak GA heterozigot ve AA homozigot varyant genotiplerinin sıklığı hastalarda sağlıklı g˘n˘ll˘lerden anlamlı olarak y˘ksek bulunmuştur. C1772T genotip farklılığı hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık g˘stermemiştir. Sonu˘ olarak, G1790A polimorfizminin oral skuamoz h˘creli kanserlerin erken prognozunun bir g˘stergesi olabileceği ortaya konmuştur.

Cindy H. Chau et al. (109), ˘alışmada androjene bağımlı olamayan prostat kanserli 196 hasta grubu ve 196 sağlıklı kontrol grubunda 12. ekzonda *HIF-1 α* geninde bulunan C1772T ve G1790A polimorfizmleri araştırılmıştır. 196 hastada C1772T i˘in *HIF-1 α* genotip dağılımı 161 C/C, 29 C/T ve 6 T/T, kontrol grubunda ise 179 C/C, 14 C/T ve 3 T/T olarak bulunmuştur. Sonu˘ olarak, *HIF-1 α* C1772T polimorfizminin androjene bağımlı olmayan prostat kanserli hastalarda duyarlılığı arttırdığı ve bu hastalığın ilerlemesi veya metastazına katkısı olabileceğini d˘ř˘nd˘rm˘ştir.

Birgitte Mayland Havelund et al. (110), rektal kanserli hastalarda kemoradyoterapi cevabı ˘zerine *HIF-1 α* genindeki C1772T ve G1790A n˘kleotitlerindeki polimorfizmlerin tahmini etkisini araştırmışlardır. 2002 ve 2005 yılları arasında 65 hasta ve 2005 ve 2009 yılları arasında 203 kemoradyoterapi alan hasta grubunda yapılan ˘alışma sonucunda *HIF-1 α* C1772T ve G1790A polimorfizmlerinin t˘m˘r˘n kemoradyoterapiye cevabında hi˘bir korelasyon g˘sterilememiştir.

Andika C. Putra et al. (111), akciğer kanserli hastalarda *HIF-1 α* varyantlarının C1772T (P582S) ve G1790A (A588T) transkripsiyonel etkinliğini araştırmışlardır. ˘alışma toplamda 83 akciğer kanserli hasta grubu (42 Adenokarsinom, 30 skuamoz h˘creli karsinom, 4 adenoskuamoz h˘creli karsinom ve 7 k˘˘k h˘creli akciğer karsinom) ve 110 sağlıklı kontrol grubu kullanılarak yapılmıştır. Sonu˘ olarak akciğer kanserli grupla sağlıklı kontrol grubu arasında

C1772T ve G1790A için genotip frekansları açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

F. Mera-Mene'ndez et al. (112), 121 glottik kanserli hasta ve 124 sağlıklı gönüllüde *HIF-1 α* geninde C1772T ve G1790A nükleotit polimorfizmi ile klinik patoloji arasındaki ilişkiyi PCR-RFLP metodu kullanarak araştırmışlardır. Sonuç olarak ilerlemiş tümörlerin TT (p=0,036) polimorfizmi ile ilişkili olduğunu ve TT - GA varyantlarının lenf nodu metastazı ile ilişkisini ortaya koymuşlardır.

Pei-Ching Hsiao et al. (113), *HIF-1 α* genin de bulunan C1772T ve G1790A tek nükleotit polimorfizmleri hepatoselüler karsinoma yatkınlık ve klinik patoloji açısından değerlendirilmiştir. Çalışmada 347 sağlıklı kontrol grubu ve hepatoselüler karsinomlu 102 hasta grubu PCR-RFLP yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, G1790A heterozigotlar GG genotipleri ile karşılaştırıldığında hepatoselüler karsinom için daha yüksek bir risk taşıdığı gösterilmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak *HIF-1 α* G1790A daki genetik polimorfizmin hepatoselüler karsinoma genetik yatkınlığın saptanması için önemli bir faktör olduğu vurgulanmıştır.

Isil Apaydin ve ark. (114), Türk toplumunda sporadik meme kanserlerinin gelişiminde *HIF-1 α* geninde kodlanan C111A, C1772T ve G1790A polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışma, 102 meme kanserli hasta grubu ve 102 sağlıklı gönüllü kontrol grubu ile PCR-RFLP ve DNA sekanslaması yapılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, *HIF-1 α* C1772T ve G1790A polimorfizmlerinin dağılımı açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. *HIF-1 α* C111A polimorfizmi açısından CA ve AA genotipleri çalışılan hem hasta hem kontrol grubunda bulunamamıştır.

Biz çalışmamızda, *HIF-1 α* geninde bulunan C111A, C1772T ve G1790A nükleotitlerinde meydana gelen polimorfizmlerin hemoglobin düzeyleri 17g/dl ve üzerinde olan hastalarla ilişkisini araştırmayı amaçladık. *HIF-1 α* geninde meydana gelen polimorfizmle ilgili yapılan çalışmalara ait literatür araştırmalarımız sonucu hemoglobin yüksekliği ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlamadık. *HIF-1 α*'nın yapılan daha önceki çalışmalarda hipoksiye cevaben artmış olduğu ortaya konulduğundan ve hipoksi sonucunda da hemoglobin konsantrasyonunda artış meydana geldiğinden çalışmamızın bilimsel açıdan anlamlı ve farklı olduğu kanaatindeyiz.

Yapmayı hedeflediğimiz daha sonraki çalışmalarımızda, spesifik hasta grupları ile çalışarak *HIF-1 α* geninde C111A, C1772T ve G1790A nükleotit polimorfizmlerine ait değerlendirmeler yapmayı hedeflemekteyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Polikliniklerine müracat eden ve herhangi bir tanıya bakılmaksızın hemoglobin düzeyi 17 g/dl ve üzeri olan hastalardan alınan kan örnekleri ile yapmış olduğumuz çalışma sonucunda, HIF-1 α geni üzerinde bulunan C111A, C1772T ve G1790A nükleotitlerindeki polimorfizmi araştırdık.

Elde ettiğimiz veriler ışığında, C111A nükleotitinde herhangi bir polimorfizm gözlemleyemedik ve ilgili literatürlere baktığımızda bu nükleotide ait polimorfizmin gözlemlenemediğini gördük. C1772T ile yapmış olduğumuz çalışma sonucunda istatistiksel değerlendirmeye göre C allelinin hastalık riskini anlamlı olarak artırdığı T allelinin ise koruyucu etkisi olduğunu belirledik. İlgili literatür ışığında koruyucu allelin C, hastalık riskini arttırmanın ise T olması gerektiğinden anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. G1790A polimorfizmi ile yapmış olduğumuz çalışmada ise, istatistiksel değerlendirme sonucunda A allelinin hemoglobin düzeyi 17 g/dl ve üzerinde olan vaka grubunda anlamlı olarak artmış olduğunu ve hastalıklarla ilişkili olabileceğini ortaya koyduk.

İleride yapılacak olan çalışmaların spesifik hasta grupları ile (örneğin akciğer kanseri, renal cell ca) yapılması ve bu hastalara ait hemoglobin düzeylerinin belirlenerek, hemoglobin yüksekliği ile spesifik hastalıklarda *HIF-1 α* polimorfizminin ilişkisinin değerlendirilmesinin anlamlı sonuçlar vereceği kanatındeyiz.

ÖZET

Hemoglobin Seviyesi Yüksek Bireylerde Hipoksi İle İndüklenen Faktör (HIF)-1 Gen Polimorfizminin Araştırılması

HIF-1 ilk olarak, hipoksiye cevaben eritropoietinin (EPO) seviyelerinin artmasına sebep olan transkripsiyonel kompleks olarak tanımlanmıştır. Sonraki çalışmalar, hipoksik koşullar altında HIF-1 aktivitesinin çeşitli eritropoietin üretmeyen hücre serilerinde de bulunduğunu göstermiştir. Bu durum, HIF-1'in hipoksiye cevap olarak gen ekspresyonu aktivitesinde genel bir role sahip olduğunu ortaya koymuştur. HIF-1 heterodimer yapıdadır. HIF-1, sürekli eksprese olan HIF-1 β ve hipoksi ile ilişkili HIF-1 α alt ünitelerini içerir. Yapılan çalışmalarda HIF-1'in hedef genlerinin kodladığı protein ürünlerinin, anjiyogenez/vasküler şekil değişikliği, glukoz metabolizması, eritropoez, hücre çoğalması, canlılık, hücre göçü, hormonal regülasyon, transkripsiyonel regülasyonda rol oynadığı gösterilmiştir. *HIF-1 α* geninde DNA sekans değişimlerinin de tümör anjiogenezi, ilerlemesi ve metastazı, iskemik kardiovasküler bozukluk ve diyabetik retinopati gibi hipoksi ile karakterize olan insan hastalıkları ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Biz çalışmamızda, hemoglobin düzeyi 17 g/dl ve üzerinde olan hastalarda *HIF-1 α* geni üzerinde 12. ezonda bulunan C1772T ve G1790A tek nükeotit polimorfizmlerini ve 2. ekzonda bulunan C111A polimorfizmini PCR-RFLP yöntemini kullanarak araştırdık. Bu üç polimorfizm sırası ile 28. kodonda serinden tirozine, 582. kodonda proliden serine ve 588. kodonda alaninden proline değişim ile sonuçlanmaktadır.

Çalışmamız sonucunda, *HIF-1 α* genine ait C1772T ve G1790A nükleotitlerinde polimorfizm görülürken, C111A nükleotidine ait polimorfizme rastlayamadık.

Anahtar Kelimeler: HIF-1 α , Hipoksi, Polimorfizm, Hemoglobin

ABSTRACT

Hypoxia-inducible factor (*HIF*)-1 gene polymorphism in patients with high levels of hemoglobin research

HIF-1 has firstly defined as a transcriptional complex which increases EPO levels as a response to hypoxia. Subsequent studies have shown that, in hypoxic conditions, HIF-1 activity also occurs in the cells which don't produce EPO. This situation proved that HIF-1 has a general role on the gene activity as a result of hypoxia. HIF-1 has a heterodimer structure. It includes the HIF-1 beta subunit which is expressed continuously and the HIF-1 alpha subunit which is related with hypoxia. In several studies, it has shown that protein products of the genes which HIF-1 targets, have roles on angiogenesis/vascular shape change, glucose metabolism, erythropoiesis, cell proliferation, viability, cell migration, hormonal regulation and transcriptional regulation. It has determined that DNA sequence changes on *HIF-1 alpha* gene is also related with tumor angiogenesis, progress and metastasis, ischemic cardiovascular disorder and diabetic retinopathy.

In our study, we have researched the C1772T and G179A one nucleotide polymorphisms on the exon 12 and C111A polymorphism on the exon 2 of the *HIF-1 alpha* gene using PCR-RFLP method, on the patients whom they have equal or greater than 17 g/dl hemoglobin levels. This three polymorphism respectively result changes from serine to tyrosine on codon 28, from proline to serine on codon 582, and from alanine to proline on codon 588.

As a result, we have found the polymorphisms on C1772T and G1790A, but not on C111A.

Keywords: HIF-1 α , Hypoxia, Polymorphism, Hemoglobin

KAYNAKLAR

1. Semenza, GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000; 88: 1474-1480.
2. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 1997; 277: 1669-1672.
3. Chen EY, FujinagaM, GiacciaAJ. Hypoxicmicroenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development. *Teratology.* 1999; 60: 215-225.
4. Iver NV, Kotch LE, Agani F, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 1998; 12: 149-162.
5. Carmeliet P, Dor Y, Herbert J, et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature.* 1998; 394: 485-490.
6. Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, et al. 5'- AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumormicroenvironments. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 5336-5347.
7. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999; 15: 551-578.
8. Patiar S, Harris AL. Role of hypoxia-inducible factor-1 α as a cancer therapy target. *Endocrine-Related Cancer* 2006; 13: 61-75.
9. Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Cancer Lett* 2007; 12: 853-859.
10. Ekmekçi A, Konaç E, H. Önen Hİ. Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *Marmara Medical Journal* 2008; 21: 282-295.
11. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 21513-21518.
12. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 1230-1237.
13. Li H, Ko HP, Whitlock JP. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of ARNT and HIF 1 alpha. *J Biol Chem* 1996; 271: 21262-21267.

14. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12969-12973.
15. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor1. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 17771-17778.
16. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza, GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor1 alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J. Biol. Chem* 1997; 4: 7987-7992.
17. Kallio PJ, Okamat K, O'Brien S, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor 1 alpha 1998; 17: 6573-6586.
18. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of HIF-1 is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad Sci USA.* 1998; 95: 7987-7992.
19. Park JW. Hypoxia Inducible Factor 1- Related Diseases and Prospective Therapeutic Tools. *Journal of Pharmacological Sciences* 2004; 94: 221-232.
20. Paez JG, Sellers WR. PI3K/PTEN/AKT pathway. *Cancer Treat Res.* 2003; 115:145-167.
21. Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem* 2002; 277: 38723-38730.
22. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain. *Science* 2002; 295:858-861
23. Hiroshi Harada. Gene Therapy Strategy for Tumour Hypoxia. *Science* 2011; 2: 953-978.
24. Cambridge University Press 2005; 7; 6-15.
25. Huang LE, Arany Z, Livingston DM. Bunn HF. Activation of HIF depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996; 271: 32253-32259.
26. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, Mcguire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5667-5672.

27. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 2001; 20: 5197-5206.
28. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 by pVHL. *Nature* 2002; 417: 975-978.
29. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: Hydroxyproline recognition in signalling. *Science* 2002; 296: 1886-1889.
30. Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS. Sequence determinants in hypoxia inducible factor-1 for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 2002; 277: 39792-39800.
31. Metzén E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I. Intracellular localization of human HIF-1 α hydroxylases: Implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 2003; 116: 1319-1326.
32. Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Vinals F, Gothie E, Roux D, Pages G, Pouyssegur J. Signaling angiogenesis Via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1171-1178.
33. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzén E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; 107: 43-54.
34. Jewell UR, Kveitkova 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.
35. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; 111: 709-720.
36. Tribioli C, Mancini M, Plassart E, Bione S, Rivella S, Sala C, Torri G, Toniolo D. Isolation of new genes in distal Xq28: transcriptional map and identification of a human homologue of the ARD1 N-acetyl transferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Human Mol Genet* 1994; 3: 1061-1067.
37. Ingram AK, Cross GA, Horn D. Genetic manipulation indicates that ARD1 is an essential N-acetyltransferase in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 111: 309-317.

38. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; 111: 709-720.
39. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 2000; 19: 4298-4309.
40. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. *EMBO J* 1998; 17: 5085-5094.
41. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999; 59: 3915-3918.
42. Hellwig-Bürgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; 94: 1561-1567.
43. 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.
44. Görlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells. Role of the p22phox-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; 89: 47-54.
45. Haddad JJ, Land SC. A non-hypoxic ROS-sensitive pathway mediates TNF- α -dependent regulation of HIF-1 α . *FEBS Lett* 2001; 505: 269-274.
46. Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Brgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor-1 α by insulin and interleukin-1 involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 2002; 512: 157-162.
47. Palmer LA, Gaston B, Johns RA. Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 1197-1203.
48. Sogawa K, Numayamatsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujiikuriyama Y. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7368-7373.
49. Zhong H. Modulation of HIF-1 α expression by the epidermal growth factor/PI3K/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60: 1541-1545.

50. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1- mediated gene expression. *Genes Dev* 2000; 14: 391-396.
51. Laughner E. HRE2 signaling increases the rate of HIF-1 α synthesis: novel mechanism for HIF-1 mediated VEGF expression. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3995-4004.
52. Fukuda R. Insulin like growth factor 1 induces HIF-1-mediated VEGF expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 38205-38211.
53. Hellwig-Bürgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; 94: 1561-1567.
54. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of HIF. *Genes Dev* 2002; 16: 1466-1471.
55. Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, Caro J. Carboxylterminal transactivation activity of hypoxia inducible factor 1 is governed by a VHL protein independent, hydroxylationregulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2984-2992.
56. Hewitson KS, Mcneil LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM. Hypoxia inducible factor asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 2002; 277: 26351-26355.
57. Mahon PC, Hirota K, Semeza GL. FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1 and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001; 15: 2675-2686.
58. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732.
59. Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 1996; 76: 839-885.
60. Giordano FJ, Johnson RS. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 35-40.
61. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; 8: 62-67.

62. An FQ, Matsuda M, Fujii H, Matsumoto Y. Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 153-160.
63. Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 139-145.
64. Harris AL. von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. *Oncologist* 2000; 5: 32-36.
65. Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 2000; 6: 1047-1052.
66. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 16: 49: 507-521.
67. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999; 13: 9-22.
68. Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 139-145.
69. Harris AL. von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. *Oncologist* 2000; 5 Suppl 1: 32-36.
70. Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 2000; 6: 1047-1052.
71. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen-a review. *Placenta* 2000; 21: 16-24.
72. Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 1995; 182: 1683-1693.
73. Eckhart AD, Yang N, Xin X, Faber JE. Characterization of the alpha1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9487-9492.
74. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272: 5375-5381.

75. Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 894-899.
76. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998; 274: 212-219.
77. Nguyen SV, Claycomb WC. Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 382-386.
78. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16: 1151-1162.
79. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732.
80. Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Vinals F, Gothie E, Roux D, Pages G, Pouyssegur J. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1171-1178.
81. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276: 9519-9525.
82. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1 mediated gene expression. *Genes Dev* 2000; 14: 391-396.
83. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47.
84. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 68-72.
85. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3436-3444.
86. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16: 1151-1162.
87. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276: 9519-9525.

88. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60: 7075-7083.
89. Mazurek S, Boschek CB, Eigenbrodt E. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. *J Bioenerg Biomembr* 1997; 29: 315-330.
90. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47.
91. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 1997; 272: 20055-20062.
92. Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1999; 274: 24142-24146.
93. Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 1999; 274: 24147-24152.
94. Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* 2000; 275: 21048-21054.
95. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16: 1151-1162.
96. Zhong H. Modulation of HIF-1 α expression by the epidermal growth factor/PI3K/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60: 1541-1545.
97. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157: 411-421.
98. Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 1527-1533.
99. Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggle S, Harris AL. Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in head

and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* 2002; 62: 2493-2497.

100. Lando D, Gorman JJ, Whitelaw ML, Peet DJ. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur J Biochem* 2003; 270: 781-790.

101. Aebbersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 2911-2916.

102. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 2003; 22: 3213-3220.

103. <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1>. EriGim tarihi: 23 Temmuz 2014.

104. <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>. EriGim tarihi: 23 Temmuz 2014.

105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.tr>. EriGim tarihi: 23 Temmuz 2014.

106. Chachami C, Kalousi A, Papatheodorou L, Lyberopoulou A, Nasikas V, Tanitomo K, Simos G, Malizos KN, Georgatsou E. An Association Study between Hypoxia Inducible Faktor 1 alpha Polimorphisms and Osteonekrozis. *Journal* 2013; 8: 7967.

107. Ollerenshaw M, Page T, Hammonds J, Demaine A. Polimorphisms in the hypoxia inducible factor-1 gene are associated with renal cell carcinoma phenotype. *Cancer genetics and cytogenetics* 2004; 153: 122-126.

108. Muñoz-Guerra MF, Fernández-Contreras ME, Moreno AL, Martín ID. Polymorphisms in the Hypoxia Inducible Factor 1- α and the Impact on the Prognosis of Early Stages of Oral Cancer. *Society of Surgical Oncology* 2009; 16: 2351-2358.

109. Chau CH, Permenter MG, Steinberg SM, Retter AS, Dahut VL, Price DK, Figg VD. Polymorphism in the Hypoxia-Inducible Factor 1 α Gene May Confer Susceptibility to Androgen-Independent Prostate Cancer. *Cancer Biology & Therapy* 2005; 4: 1222-1225.

110. Havelund BM, Spindler KG, Ploen J, Andersen RF, Jakobsen A. Single nucleotide polymorphisms in the HIF-1 α gene and chemoradiotherapy of locally advanced rectal cancer. *Oncology Letters* 2012; 4: 1056-1060.

111. Putra AC, Tanimoto K, Arifin M, Hiyama K. Hypoxia-inducible factor-1 α polymorphisms are associated with genetic aberrations in lung cancer. *Respirology* 2011; 16: 796-802.

112. Mera-Mene'ndez F, Hinojar-Gutie'rrez A, Guijarro Rojas M, Garc'ı'a de Gregorio J, Mera-Mene'ndez E, Sa'nchez JJ, Quintanilla M, Cerezo L, Gamallo C. Polymorphisms in HIF-1 alpha affect presence of lymph node metastasis and can influence tumor size in squamous-cell carcinoma of the glottic larynx. *Clin Transl Oncol* 2013; 15: 358–363.

113. Hsiao P, Chen M, Su S, Ueng K, Chen Y, Hsieh Y, Liu Y, Tsai H, Yang S. Hypoxia Inducible Factor-1 α Gene Polymorphism G1790A and Its Interaction With Tobacco and Alcohol Consumptions Increase Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 2010; 102: 163–169.

114. Apaydin I, Konac E, Onen HI, Akbaba M, Tekin E, Ekmaekci A. Single Nucleotide Polymorphisms in the Hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF-1 α) Gene in Human Sporadic Breast Cancer. *Archives of Medical Research* 2008; 39: 338-345.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı: Muhammet Yusuf	Soyadı: TEPEBAŞI
Doğ. Yeri: Kahramanmaraş	Doğ. Tarihi: 26.04.1974
Uyruğu: T.C.	Tel: 546 6493785
Email: muhammettepebasi@sdu.edu.tr	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi	Devam ediyor
Lisans	Uludağ Üniversitesi	1996
Lise	Bursa Cumhuriyet Lisesi	1991

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süresi
Bakteriyolog	Süleyman Demirel Üniversitesi Hastanesi	13 yıl

Yabancı Dilleri	KPDS/ÜDS Puanı	
İngilizce	65	

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

Muhammet Yusuf TEPEBAŞI

İmza

Danışman

Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU

İmza