

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HIF-1 PROTEİNİNİN KANSER İLAÇLARINA KARŞI DİRENÇ
GELİŞMESİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Nilgün ÇEKİN

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Işmsu KUZU

ANKARA
2007

HIF-1 PROTEİNİNİN KANSER İLAÇLARINA KARŞI DİRENÇ GELİŞMESİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

İnsan kanserlerinde klinik tedavi yöntemlerinin önemli sorunlarından biri kanser ilaçlarına karşı oluşan direnç gelişimidir. Kemoterapi direnci metastatik kanserli hastaların %90'ından fazlasında tedavide başarısız sonuçlar alınmasına yol açmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda direnci oluşturduğu düşünülen çeşitli genler ve mekanizmalar incelenmiştir. Tümör karakterindeki ilaç taşıma proteinleri, apoptozun indüklenmesi, proliferasyonun artması, ilaç-hedef etkileşimindeki değişiklikler, ilaç inaktivasyonu sitotoksik etkenlere karşı direnç oluşmasına sebep olur. Aynı zamanda solid tümörlerde artan metastaz ve agresif fenotiple bağlantılı olan hipoksik morfolojinin, kemoterapi ve radyoterapi direnciyle de ilişkili olduğu ispatlanmıştır. Hipoksik koşullarda aktive olan HIF-1 geni, hücre içerisinde direnç gelişim mekanizmalarında rol alan genler dahil pek çok genin düzenlenmesinde aracı moleküldür. HIF-1 aktivitesi, hipoksik koşullarda seviyesi artan HIF-1 α alt ünitesinin varlığıyla düzenlenir. Yapılan bu çalışmada, pankreas kanseri hücrelerinde HIF-1 α geninin ekspresyon miktarı artırılarak hücre içindeki fenotipik ve genotipik değişikliklerin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için pcDNA/HIF-1 α , panc1 hücrelerine lipofektamin yardımıyla transfekte edildi. HIF-1 α ekspresyonu Revers Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ve Western blot yöntemiyle gözlemlendi. HIF-1 α eksprese eden hücrelerin doksorubisine karşı gösterdikleri proliferasyon farkı ölçüldü ve proliferasyona neden olabilecek sinyal iletim yolları Multipleks RT-PCR ve Western blot yöntemleriyle araştırıldı. Fonksiyonel testlerde ilaçla muamele edilen hücrelerde artan HIF-1 α ekspresyonunun beklenen ölçüde bir direnç arttırmadığı gözlemlendi. Proliferasyona neden olabilecek gen ekspresyonları araştırıldığında HIF-1 α artışının bu genlerin ekspresyonlarını değiştirmedığı belirlendi. HIF-1 α ekspresyon artışının proliferasyonu artırırken kanser ilacına karşı direnç geliştirmemiş olmasının panc1 hücre serisi ve doksorubisin ilacında gerçekleşen farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, HIF-1, İlaç direnci

INVESTIGATION OF THE ROLES OF HIF-1 PROTEIN FOR DRUG RESISTANCE IN CANCER

ABSTRACT

The main problem in cancer treatment is the emergence of resistance to the cytotoxic drugs. Chemotherapy resistance causes treatment failure in over %90 of patients with metastatic cancer. Many studies have been conducted on various genes and mechanisms to solve the drug resistance problem in cancer treatment. Drug transport proteins, induction of apoptosis, increased proliferation rate of the tumor cells, alterations on drug target interactions, drug inactivation are the main mechanisms of resistance to cytotoxic drugs. On the other hand chemotherapy and radiotherapy resistance has been proved to be related with hypoxic morphology, increased metastasis capacity and aggressive behavior for the solid tumors. HIF-1 gene which is active in hypoxia, regulates variety of genes including the genes involved in drug resistance. HIF-1 activity is regulated by HIF-1 α subunit which increases in hypoxic microenvironment. The aim in this study is to observe the phenotypic and genotypic modifications through enhancing expression level of HIF-1 α gene in high rate hypoxic pancreatic cancer cells. For this purpose, pcDNA/HIF-1 α was transfected to panc1 cells by lipofectamine and HIF-1 α expression was demonstrated through Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Western blot techniques. The difference in proliferation rates and the signal transduction pathways related to cell proliferation were examined by Multiplex RT-PCR and Western blot techniques on HIF-1 α expressing panc1 cells treated by doxorubicine. The effect of HIF-1 α overexpression on increasing the proliferation markers could not be demonstrated by functional tests. It has been understood that the expression of the proliferation related genes were not effected by HIF-1 α over expression. The reason for drug resistance progression doesn't affect while proliferation increases is believed to be caused by the change that occur in the medicine.

Keywords: Apoptosis, Drug resistance, HIF-1

TEŞEKKÜR

HIF-1 proteininin kanser ilaçlarına karşı direnç gelişmesindeki rolünün araştırıldığı bu çalışma TÜBİTAK tarafından SBAG-K37(104S249) no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Projenin kurgulanması ve laboratuvar organizasyonu desteği için Sayın Uzm. Dr. Fikret Şahin'e, Laboratuvar imkanlarından faydalanmamızı sağladıkları için Mikrobiyoloji A.B.D.'ye, Laboratuvar çalışmalarındaki teknik desteği için Dr. Djursun Karasartova'ya,
Yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Can Akcalı ve Ar. Gör. Mehmet Taşpınar'a,
Maddi manevi her zaman yanımda olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Işınso Kuzu'ya teşekkür ediyorum.

Ayrıca Manisa'daki ailem annem, babam, ablam ve kardeşime,
Ankara'daki ailem Hale Gültaç Özcan ve Ayşe Yeşbek Kaymaz'a
Hastanedeki ailem İmmünpatoloji ünitesi ve Mikrobiyoloji A.B.D.'ye
Gelecekteki ailem Kürşat Çetin'e sonsuz destekleri için teşekkür ediyorum.

Nilgün Çekin
Ankara, Ağustos 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. Kanserde direnç mekanizmaları	2
2.2. HIF-1	3
2.2.1. HIF-1'in yapısı	3
2.2.2. HIF-1'in oksijen bağımlı düzenlenmesi.....	6
2.2.3. HIF-1'in oksijen bağımsız düzenlenmesi	7
2.2.4. İnsan kanserlerinde HIF-1'in rolü	8
3.MATERYAL VE YÖNTEM	10
3.1. Hücre kültürü.....	10
3.2. RNA İzolasyonu	10
3.3 cDNA Sentezi.....	10
3.4. PZR	10
3.5. HIF-1 Geninin klonlanması	11
3.5.1 Ligasyon	11
3.5.2 Transformasyon	11
3.6. Transfeksiyon	12
3.7. Koloni assay	12
3.8. İlaçla muamele.....	12
3.9. Sitotoksite-proliferasyon testi.....	12
3.10. Multipleks (Semikantitatif) RT-PZR.....	12
3.11. Protein ekstraksiyonu	14
3.12. Western Blot Analizi	14
4.ARAŞTIRMA BULGULARI	15
4.1. HIF-1 α geninin klonlanması	15
4.2. HIF-1 α ekspresyon artışının ispatlanması	15
4.3. Fonksiyonel Testler	16
4.3.1. Proliferasyon Testi.....	16
4.3.2. HIF-1 α ekspresyonun kanser ilaçlarına karşı direnç gelişimindeki rolünün araştırılması	17
4.3.3. Koloni assay	17
4.4. Proliferasyona neden olabilecek gen ekspresyonlarının araştırılması	18
4.4.1. Multipleks PZR yöntemiyle araştırılması	18
4.4.2. Western Blot yöntemiyle araştırılması.....	21
5. TARTIŞMA	23
KAYNAKLAR.....	26
ÖZGEÇMİŞ	31

SİMGELER DİZİNİ

AML	Acute myeloid leukemia
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor translocator
ASO	Allele specific oligonucleotide
Bcl-2	B-cell leukemia-2
Bcl-X _L	X-Linked B-cell leukemia
BCRP	Breast cancer resistance protein
bHLH	Basic-helix-loop-helix
cIAP	Cellular inhibitors of apoptosis
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Ethylene diamine tetracetic acid
EPO	Eritropoietin
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Fetal bovine serum
FIH-1	Factor inhibiting HIF-1
GLUT-1	Glucose transporter protein-1
G3PDH	Glucose-3-phosphate dehydrogenase
GSK 3	Glycogen Synthase Kinase-3
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HRE	HIF-1 response element
HRP	Horse radish peroksidase
IGF-2	Insulin-like growth factor 2
iNOS	İnhibitör Nitrik Oksit Sentaz
IκB	Inhibitor of kappa B
IKK	I{kappa}B Kinase
IL-1	Interleukin-1
kDa	Kilo dalton
LRP	Lung resistance protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDR	Multiple drug resistance
MRP	Multidrug related protein
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromid
NFκB	Nuclear factor-kappa B
NLS	Nuclear localization signal
ODDD	Oxygen dependent degradation domain
PAGE	Poli acrylamid gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Phophotydiminositol 3-OH kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
P-gp	P-glikoprotein
pVHL	Von Hippel –Lindau Protein
RPM	Revolutions per minute
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TAD	Transactivating domain
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
TNF	Tumor necrosis factor
TGFβ 3	Transforming growth factor beta
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XIAP	X-Linked inhibitor of apoptosis protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HIF-1 geni yapısı ve fonksiyonları ilişkisi	4
Şekil 2.2. HIF-1'i uyaran sinyal iletim yolu	5
Şekil 2.3. HIF-1 α ve HIF-1 β 'nin Protein bölgeleri.....	5
Şekil 2.4. HIF-1'in oksijen bağımlı düzenlenmesi	6
Şekil 2.5. HIF-1'in oksijen bağımlı düzenlenmesi ve sonuçları.....	7
Şekil 2.6. Transkripsiyonel olarak HIF-1 tarafından düzenlenen genler	9
Şekil 4.1. Boş ana vektör pcDNA ve bu vektöre klonlanmış HIF-1 DNA'sının jel görüntüsü.....	15
Şekil 4.2. Klonlanan HIF-1 geninin oryantasyon belirleme jel görüntüsü	15
Şekil 4.3. HIF-1 α ekspresyon artışının jel görüntüsü	16
Şekil 4.4. HIF-1 α ekspresyon artışının western blot görüntüsü.....	16
Şekil 4.5. Koloni assay	18
Şekil 4.6. Bax primerinin logaritmik faz belirleme görüntüsü	18
Şekil 4.7. Bax primerinin döngüye sayısına göre Aktin konsantrasyonunun belirlendiği jel görüntüsü	18
Şekil 4.8. Akt Multipleks PZR jel görüntüsü	19
Şekil 4.9. mTOR Multipleks PZR jel görüntüsü	19
Şekil 4.10. cIAP I Multipleks PZR jel görüntüsü.....	19
Şekil 4.11. cIAP II Multipleks PZR jel görüntüsü.....	20
Şekil 4.12. Bcl-2 Multipleks PZR jel görüntüsü.....	20
Şekil 4.13. XIAP Multipleks PZR jel görüntüsü	20
Şekil 4.14. Bax Multipleks PZR jel görüntüsü	21
Şekil 4.13. Akt-1 Western blot görüntüsü	21
Şekil 4.14. P70 ^{S6K} Western blot görüntüsü.....	22
Şekil 4.15. pIKB Western blot görüntüsü.....	22

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Transfekte hücrelerin MTT test sonuçları	17
Çizelge 4.2. Transfekte hücrelerin doksorubisin ile muamele sonrası proliferasyon miktarları.....	17

1. GİRİŞ

Kanser dünyada en yaygın ölüm nedenlerinden biridir. Yılda 10 milyon insanın hayatı bu hastalıktan etkilenmektedir. Tüm kanserlerde 5 yıl hayatta kalma oranı %10'un altındadır ve kemoterapi kanser tedavisinde sürekli kullanılan en önemli tedavi yöntemidir. Bununla birlikte kemoterapiye karşı direnç gelişimi kanser tedavisinin önemli sorunlarından biridir. Son dönemlerde yapılan çalışmalar apoptoz önleyici faktörlerin kanser direncinin oluşumunda çok önemli olduğunu göstermektedir. Dolayısı ile apoptozu önleyici faktörleri ortadan kaldırarak direnci ortadan kaldırmak kanser tedavisinde yeni bir umut ışığı oluşturabilir.

Apoptoz tümör gelişimi boyunca sıkça aksamalar gösteren hayatta kalım ve proliferasyon genlerinin karmaşık ağıyla kontrol edilir. PI3K (Fosfotidilinositol-3-OH Kinaz) /Akt/HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) sinyal iletim yolu çok çeşitli hücrel uyarılarla, proliferasyon, büyüme ve hayatta kalma gibi temel hücrel fonksiyonların düzenlenmesinden sorumludur. Pek çok kemoterapötik ajan apoptozu indükler ve dolayısıyla tümör gelişimi boyunca apoptozda oluşacak aksamalar ilaç direncini geliştirir.

Oksijen eksikliği durumu olan hipoksiya, solid tümörlerin birçok formunun yaygın ortak özelliğidir. (Harris 2002, Brat et al. 2004, Kaur et al.2005) Stromal vasküler sistem gelişen tümöre yeterli miktarda O₂ gönderemediğinde oluşur. Sonuç olarak birçok tümör hipoksiyanın indüklediği hücre ölümünden ve nekrozdan sakınmasına izin veren adaptif genetik değişikliklere maruz kalır. Bu gibi adaptasyonlar da tümörü daha agresif ve geleneksel terapilere dirençli hale getirir. Örneğin başarılı radyoterapi tümör dokusunu harap edebilmek için oksijen radikallerinin oluşumuna dayanır, dolayısıyla düşük oksijenli veya hipoksik bölgeler büyük zararlardan kaçır. Kemoterapi de hipoksik alanlarda daha az etkilidir. Birincisi ilaçların difüzyonu stromal kan damarları ile hipoksik tümör hücreleri arasındaki mesafenin büyük olmasından dolayı azalır. İkincisi hipoksik hücreler daha az oranda hücre bölünmesi gerçekleştirir ve çoğu ilaç bölünen hücreleri hedefler. Hipoksik hücrelerde aynı zamanda MDR-1 ve P-glikoprotein gibi ilaç direnç genlerinin ekspresyonu artar. Sonuç olarak hipoksiya P-53 aracılı apoptosise dirençli, ilacın indüklediği hücre ölümüne daha az yatkın tümörleri oluşturan hücrelerin genetik seçilimini yürütür. (Brown et al. 1998) Bu faktörler tümörarası hipoksiya gelişiminin niçin kuvvetle istenmeyen kanser tedavi sonuçlarıyla ilişkilendirildiğini açıklar. Hipoksik koşullarda hücrenin bu strese toleransını ve adaptasyonunu sağlayan HIF-1'dir. (Lee et al. 2005) Hipoksi artrit, diyabetik retinopati, iskemik kalp hastalıkları, felç ve solid tümörler gibi hastalıklarla ilişkilidir. (Semenza 2000 ve Brown et al. 1998) Solid tümörlerde hipoksinin varlığı radyoterapi ve kemoterapi direnci oluşturması ve artan metastaza yatkınlıkla bağlantılı olduğundan başarılı tedavi yöntemlerinin en büyük engelidir. (Brown 2000)

Temel olarak hipoksi tarafından ekspresyonu kontrol edilen HIF-1 bir çok genin düzenlenmesinde rol alır. (Semenza 1999) Bu genlerden bazıları hücrenin proliferasyonu ve apoptoz ile direkt ilgilidir, bu nedenle ve direkt olarak hücrenin antikanser ilaçlarına karşı cevabını değiştirmektedir. Bu çalışmada HIF-1 gen bölgesinin pankreas tümör hücresinde yüksek oranda eksprese olması sağlanarak fenotipik ve genotipik olarak antikanser ilaçlarına karşı değişikliklerin incelenmesi birincil olarak amaçlanmıştır. HIF-1 artışının bu yolaktaki diğer faktörler üzerinde oluşturduğu değişiklikleri gözlemek de araştırılacak konular arasındadır. Bu amaç için; HIF-1 geni memeli hücre vektörü içerisine klonlanmış, pankreas kanseri hücrelerine transfekte edilmiş, hücrede oluşturduğu ekspresyon değişiklikleri, hücre proliferasyonu ve antikanser ilacına karşı oluşturduğu direnç başlıklarında incelenmiştir. Fonksiyonel değişikliklere sebep olabilecek genetik değişimler, RNA ekspresyonu ve protein translasyonları araştırılmıştır. Anti-apoptotik ilaçlarla muamele edilerek proliferasyonu gözlemlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kanserde direnç mekanizmaları

Sitotoksik ajanlara direnç, insan kanserlerinin klinik tedavisinde en büyük engellerden biridir. Tümörler ilaç taşıma proteinlerinin artışı, ilaç-hedef etkileşimindeki değişiklikler ve apoptoz yeteneğinin azalmasına sebep olacak moleküler değişikliklere maruz kaldıklarında kemoterapiye direnç gösterirler. Bununla birlikte bu değişiklikler, tümörlerde dirençli ve duyarlı hücrelerin ilaç muamelesinde neden hayatta kaldığını ve sonunda ilaç direnci oluşturduklarını açıklamak için yeterli değildir.

Sitotoksik etkenlere karşı tümör hücresinin geliştirdiği birçok ilaç direnç mekanizması bulunur. P-glikoprotein (P-gp) yada multi-drug resistance protein (MDR1) (Gottesman 1993), MDR-related protein, (MRP) (Cole et al. 1992) Breast-cancer resistance protein (BCRP) (Litman et al. 2000) ve lung resistance-related proteinleri (LRP) (Scheffer et al. 2000) gibi ilaç taşıma proteinlerinin aracılık ettiği mekanizma bunlardan ilkidir. Bir diğeri tümör hücrelerinde sitotoksik etkenler ve radyasyon tarafından indüklenen apoptoza dirençle ilgilidir. (Sellers et al. 1999) Bu mekanizmaya karışan hücrel moleküller B-cell leukemia 2, (Bcl-2) Bcl-X_L, A1/Bfl1 gibi antiapoptotik proteinlerin artışı ve p53 proteinindeki mutasyonları kapsar. Transkripsiyon faktörü Nükleer factor kappa Beta (NF-κB)'nin artan aktivitesi, sitotoksik etkenlere ve tümör nekroz faktör (TNF)'e cevaben tümör hücrelerinin kemoterapi direnci kazanmasını sağlayan en önemli mekanizma olarak belirtilmiştir. (Wang et al. 1999)

Bazı durumlarda etkili bir kemoterapi ve hızlı iyileşme için farklı hücrel hedefleri olan, farklı hücre içi mekanizmaya sahip birden çok ilaç kullanılır. Sıklıkla direnç mekanizması bu çoğu farklı yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip, birbiriyle bağlantısız ilaçlara karşı birlikte direnç gösterir. Bu fenomen Çoklu ilaç direnci (Multidrug resistance-MDR) olarak tanımlanır. (Gottesman et al. 1994) Bu direnç hücre içinde ilaç birikimini sınırlandıran, membran lipidlerini etkileyen, ilaçları hücre dışına atışı hızlandıran değişikliklerle sonuçlanır. (Liu et al. 2001) Bu değişiklikler çoğu antikanser ilacının aktive ettiği apoptozu (Lowe et al. 1993), DNA hasarı tamirini, ilaç detoksifikasyonu mekanizmalarını (Synold et al. 2001) ve hücre döngüsündeki değişiklikleri bloke eder. MDR fenotipi MDR1 geninin indüksiyonuyla ilişkilidir ve bu indüksiyon P-glikoprotein (P-gp) nin artışıyla sonuçlanır. P-gp ABC-tüp transporter ailesinin 170 kD'luk bir üyesidir ve enerji bağımlı membran akış pompası olarak fonksiyon yapar. Sitoplazmik konsantrasyonlarını belirli bir seviyede tutmak için geniş çeşitlilikte yapısal olarak ilişiksiz ksenobiyotikleri taşır. (Fardel et al. 1996) Antrasiklinler, vinka alkaloidler, epipodofilotoksinler gibi çeşitli büyüklükteki heterosiklik bileşimleri hücre dışına taşıma yeteneğine sahiptir. P- glikoprotein, ince ve kalın bağırsak, karaciğer, pankreas, böbrek, ovaryum ve testis, hematopoietik sistem ve çocukluk çağı kanserlerini de içeren pek çok insan kanser hücrelerinde artış gösterir. P-gp gibi MRP (MDR bağlantılı protein) de kemoterapötik ilaçları hücre dışına taşır.

MRP ailesi yedi üyedir. (Borst et al. 2000) MRP1 ve MRP2 antrasiklinler, vinka alkaloidlerin hücre dışına taşınmasını sağlarlar. Bununla birlikte sadece MRP1 metotreksatı taşır. Aksine sadece MRP2 platin tuzlarını taşıyabilir. MRP4 proteinlerinin artışı metotreksata karşı hücrel bir direnç oluşturur, oysa MRP5 ekspresyonu merkaptopürin ve thioguanin gibi nükleotid analoglarına karşı direnç sağlar. BCRP'nin artışı metotreksatı, doksorubisin, topotecana direnç ile sonuçlanırken paklitaksel ve vinblastin gibi mikrotübül inhibitörlere direnç oluşturmaz. (Litman et al. 2000)

Apoptoz, ya hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (extrinsic pathway) ya da öncelikle mitokondride gelişen bir dizi hücrel olaylarla (intrinsic pathway) başlatılabilir. Apoptozun tümörigenez ve kanser tedavisi için önemli olduğu gösterilmiştir. Apoptozdaki bozukluklar neoplastik hücrelerin sayısının artmasıyla sonuçlanabilir. Bununla birlikte kemoterapi ve radyoterapinin gerçekleştirdiği tümör hücrelerinin ölümü büyük ölçüde apoptozun aktivasyonu ile gerçekleştiği için, apoptozun inhibisyonu antitümör tedavisine karşı tümör hücrelerini dirençli hale getirir. (Solay et al. 2000) Kemoterapi ve radyoterapiye karşı, tümör hücreleri hayatta kalım proteinlerinin üretimini attırır. Bu proteinler apoptozu baskılayarak hücrelerin ölümden korunmasını sağlarlar. (Wang et al. 1996)

Mitokondrial seviyede gelişmiş olan doğal apoptotik yolak Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir. (Martinou et al. 2001) Bcl-2 ailesinin proteinlerinin fonksiyonu proapoptotik ya da anti-apoptotik olabilir. Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondrial membranın geçirgenliğini değiştirerek etkilerini gösterirler. Proapoptotik uyarımda; mitokondriden sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör, Kaspazın ikinci mitokondri-türevli aktivatörü ve apoptoz proteini bağlayan proteinin direk inhibitörü ve diğer apoptotik faktörler membran geçirgenliğinin artmasının bir sonucu olarak membran arası boşluklardan sitoplazmaya salınım yapar. (Zamzami et al. 2001) Bcl-2 ailesinin, Bcl-X_L, ve A1/BFL 1 gibi anti-apoptotik üyeleri proapoptotik faktörlerin salınımını mitokondriden bloke edebilir. (Degterev et al. 2001) Bcl-2 ve onun homoloğu Bcl-X_L azaltım proteini olarak fonksiyon yaparlar ve kalsinörin, Raf1, GTPase ve Ras gibi proteinlerle etkileşebilirler. (Adams et al. 1998) Onların etkileşiminden doğan sinyal transdüksiyonu NF-AT, p53-BP2 ve NF-κB gibi pek çok antiapoptotik transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu düzenler. Yüksek seviyedeki Bcl-2 ekspresyonu pek çok insan tümörlerinde gözlenen bir durumdur ve Bcl-2 ekspresyon seviyesi agresif malign tümör gelişimi ile ilişkilidir. Bcl-2'nin sitotoksik etkenleri ve TNF-α'nın indüklediği apoptozu bloke ettiği gösterilmiştir, Bcl-2 fonksiyonlarının baskılanması apoptozu başlatır. (Gazitti et al. 2001) NF-κB, Bcl-2 Bcl-X_L benzer olarak siklofosamid, metotreksat, antrasiklin, sitarabin, paklitaksel, ve kortikosteroid gibi çeşitli kemoterapötik ilaçların direncine katkıda bulunur. (Wuchter et al. 1999)

2.2. HIF-1

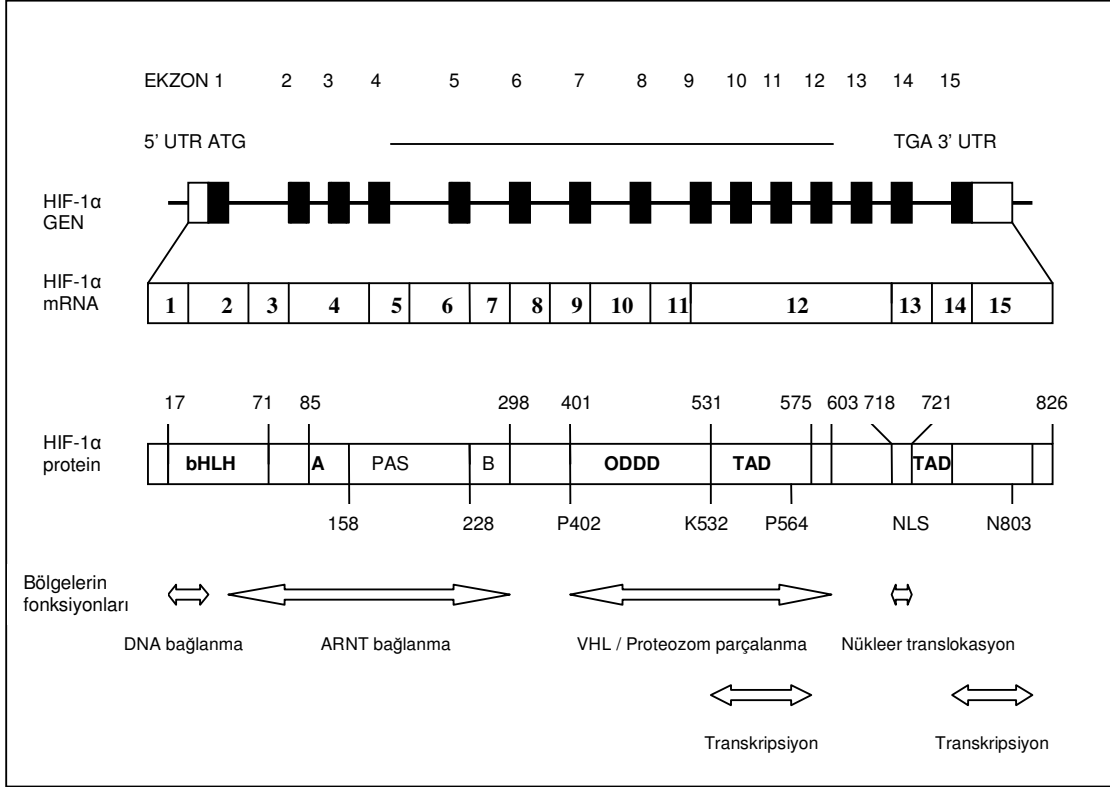
HIF-1 ilk olarak hipoksiye cevaben eritropoietinin (EPO) artmasına sebep olan transkripsiyonel kompleks olarak tanımlanmıştır. Semenza ve Wang 1992'de EPO'nun 3' Hipoksi Response Elementi (HRE) ile oksijene bağımlı şekilde etkileştiği bir çekirdek faktörünü keşfetmişlerdir. Bu DNA-bağlayan kompleksi "Hypoxia-inducible factor 1"ya da "HIF-1" olarak adlandırdılar. Daha sonraki çalışmalar hipoksik koşullar altında HIF-1'in bağlama aktivitesinin çeşitli eritropoietin üretmeyen hücre serilerinde de bulunduğunu göstermiştir. (Wang et al. 1993) Bu durum HIF-1'in hipoksiye cevap olarak gen ekspresyonu aktivitesinde genel bir role sahip olduğunu gösterir. Biyokimyasal saflaştırma kullanılarak, Wang ve Semenza HIF-1'in 120 KDa α-altünitesi ve 91-94 KDa β-altünitesini içeren heterodimerik faktör olduğunu açıklamışlardır. (Wang et al. 1995) Saflaştırılmış protein fragmentlerinin dizilimini kısmen tarandıktan sonra dizilimi veritabanıyla karşılaştırarak HIF-1 cDNA klonladılar. (Wang et al. 1995) Wang ve Semenza'nın çalışmaları HIF-1' in altünitelerinin basic-helix-loop-helix (bHLH) ve PER-ARNT-SIM (PAS) bölgeleri içerdiğini gösterir. HIF-1α altünitesi yeni bir protein iken, HIF-1β altünitesi Aril Hidrokarbon Reseptör Taşıyıcısı (Aryl Hydrocarbon Receptor Translocator ARNT) olarak önceden tanımlanmıştır. (Hoffman et al. 1991) Daha sonra HIF-1α, ARNT (Li et al.1996) ve transkripsiyonel koaktivatör p300/CBP'nin çalışmaları boyunca bağımsız olarak klonlandı. (Arany et al. 1996)

2.2.1. HIF-1'in yapısı

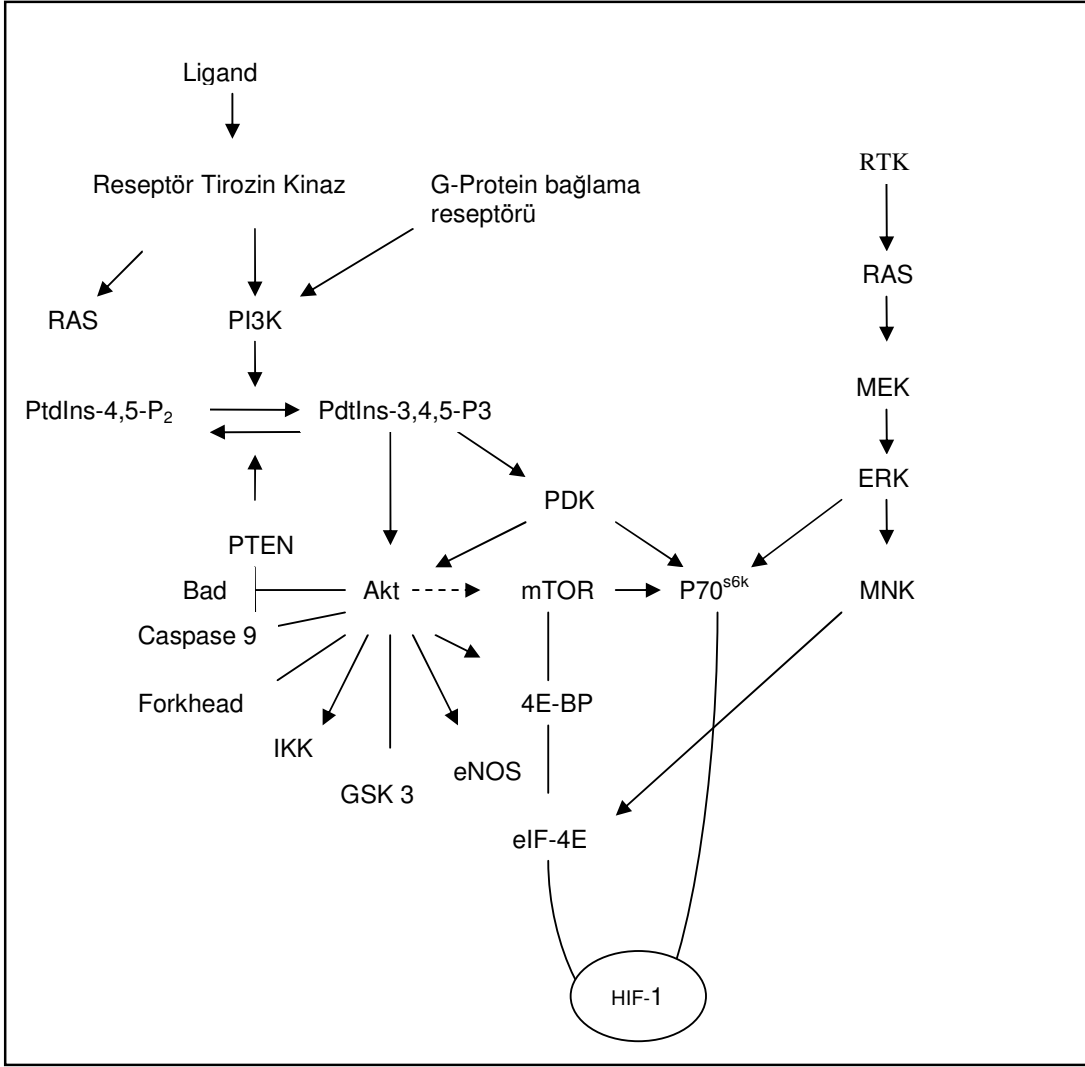
HIF-1 heterodimer yapıdadır. Sürekli eksprese olan HIF-1β ve ekspresyonu sıkıca düzenlenen HIF-1α altünitelerini içerir. HIF-1α 15 ekzon tarafından kodlanan 826-amino asitlik bir proteindir. (Wang et al. 1995) N-ucu bHLH ve PAS bölgelerini içerir. Basic bölgesi DNA bağlanması için gereklidir. HLH-PAS bölgesine ise HIF-1α ve HIF-1β'nin dimerizasyonu için ihtiyaç duyulur. (Jiang et al. 1996) C-ucu iki transaktivasyon bölgesi (TAD) içerir ki N-ucu TAD 531-575 amino asitlerinde ve C-ucu TAD 786-826 aminoasitlerinde lokalizedir. (Jiang et al. 1997) C ucu sonu 718-721 amino asitleri nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içerir. (Kallio et al. 1998) Pro-ser-thr dan zengin oksijen bağımlı parçalanma bölgesi (ODDD) HIF-1α'nın merkezi bölümünde 401-603 aa.'leri arasında lokalizedir ve HIF-1α'nın oksijen-bağımlı parçalanmasından sorumludur. (Huang et al. 1998) (Şekil 2.1.) HIF-1 heterodimeri DNA ana oluğunda yer alan 5'-RCGTG-3' konsensus dizisine bağlanır. (Wang et al. 1993)

Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) protein sentezi PI3K ve ERK mitogen-activated protein kinase (MAPK) sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile düzenlenir. (Şekil 2.2.) 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, p70^{S6k}, aktive eden FRAP hücre

döngüsü gelişimi ve ribosomal 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 fosfatidilinositol 3,4-difosfatı ve fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfatı defosforile eder. Prostat kanserinde PTEN fonksiyon kaybı artan anjiyogenez ile ilişkilendirilir ve hormona cevap vermeyen metastatik hastalıkların gelişiminde kritik olduğu gözlenir. Bununla birlikte, bu bağlantının temelleri tam anlamıyla belirlenmemiştir. HIF-1'in rolü transkripsiyonel aktivatör olarak anjiyogenez, glikolitik enzimler, glikoz taşıyıcılarını transkripsiyonunu düzenlemektedir.

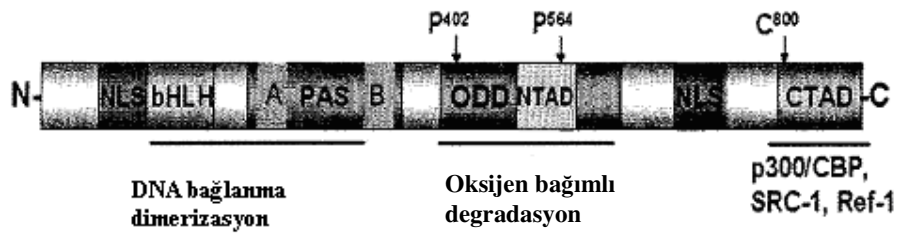


Şekil 2.1. HIF-1 geni yapısı ve fonksiyonları ilişkisi (Park et al. 2004)



Şekil 2.2. HIF-1'i uyaran sinyal iletim yolu (Paez et al. 2003)

HIF-1 α



HIF-1 β (ARNT)

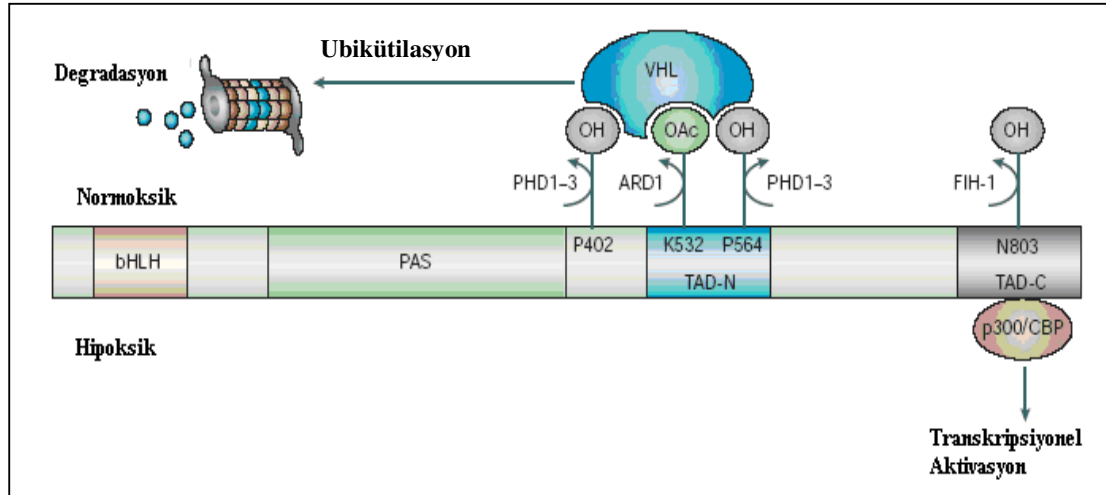


Şekil 2.3. HIF-1 α ve HIF-1 β 'nin Protein bölgeleri. (Wang et al. 1995)

Herhangi bir protein olarak HIF-1 α ekspresyonu protein sentezi ve protein parçalanması oranıyla belirlenir. HIF-1 α 'nın sentezi O₂ bağımsız mekanizmalar yolu ile düzenlenirken, parçalanması ise öncelikle O₂ bağımlı mekanizmalar yolu ile düzenlenir. (Semenza 2003)

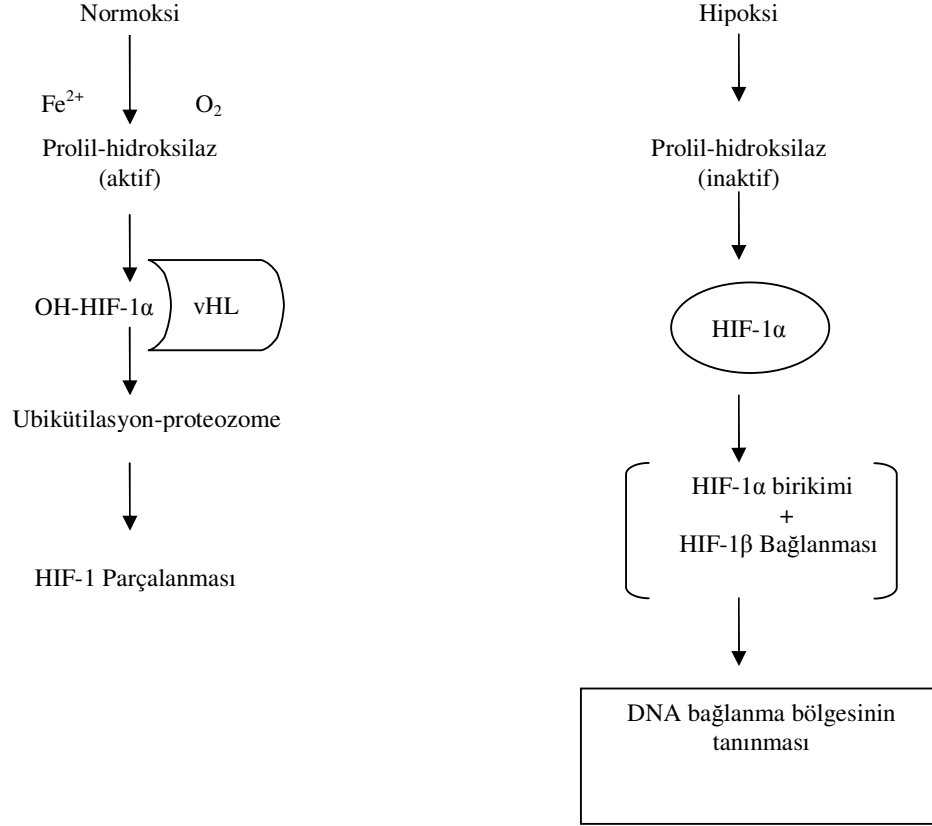
2.2.2. HIF-1 ekspresyonunun oksijen-bağımlı düzenlenmesi

Hücreler O₂ bağımlı transkripsiyon sonrası modifikasyonlar yoluyla azalan O₂ konsantrasyonuna HIF-1 aktivitesini artırarak uyum sağlar. (Şekil 2.5.) Normoksik koşullarda HIF-1-prolin hidroksilazlar HIF-1 α 'yı prolin 402 ve 564 rezidülerinde hidroksiller. (Bruick et al. 2001, Epstein et al. 2001) HIF-1 α ile pVHL tümör baskılayıcı proteinin etkileşimi için Prolin 402 ve 564'ün hidroksilasyonuna ihtiyaç duyulur. (Ivan et al. 2001) E3 ubikütin protein kompleksinin bir parçası olan Von Hippel Lindau tümör baskılayıcı proteini (pVHL) HIF-1 α 'nın modifiye olmuş amino asit rezidülerine direk olarak bağlanır. Bu olay HIF-1 α 'nın ubikütilyasyonu ve proteozomal degradasyonu ile sonuçlanır. Prolin hidroksilasyon enzimatik reaksiyonu moleküler oksijene substrat olarak ihtiyaç duyar ve hipoksi bu hidroksilasyonu sınırlandırır dolayısıyla pVHL'nin bağlanmasını olanaksızlaştırır ve HIF-1 α stabil kalır. HIF-1 α 'nın ARD-1 asetiltransferaz tarafından lizin-532 de asetillenmesi VHL'nin HIF-1 α ile bağlanmasını artırırken, ubikütilyasyonun ve degradasyonun ilerlemesine neden olur. (Jeong et al. 2002) (Şekil 2.4.)



Şekil 2.4. HIF-1' in oksijen bağımlı düzenlenmesi (Semenza 2003)

HIF-1 α 'nın transaktivasyon domain fonksiyonu da FIH-1'in (Factor inhibiting HIF-1) faaliyetiyle O₂ tarafından düzenlenir. (Jiang et al. 1997, Pugh et al. 1997) FIH-1 HIF-1 α 'nın asparajin (Asn)-803 rezidüsünden hidroksilleyerek bu etkiye aracılık eder ki bu HIF-1 α 'nın p300 ve CBP koaktivatörleri ile bağlanmasını önler. (Mahon et al. 2001, Lando et al. 2002) VHL ve P300/CBP ile etkileşen HIF-1 α bölgesinin yapısal analizi gösterir ki bu etkileşimlerin affinitesiyle önemli derecede değişen hidroksilasyon bir moleküler saattir. (Freedman et al 2002, Min et al. 2002) Hidroksilasyon protein-protein düzenlenmesiyle fonksiyon göstermesi bakımından diğer post-translasyonel modifikasyonlarla benzerdir, ama diğer modifikasyonlardan farklı olarak O₂ tarafından düzenlenir. HIF-2 α ekspresyonu ve aktivitesi de prolin-asparajin hidroksilasyonu tarafından düzenlenir.



Şekil 2.5. *HIF-1*' in oksijen bağımlı düzenlenmesi ve sonuçları (Semenza 2001)

2.2.3. HIF-1 ekspresyonunun oksijen-bağımsız düzenlenmesi

İnsanlar, diğer metazoanlar gibi devamlı ve zorunlu O₂ tüketicileridir. Dokuda ne kadar hücre var ise o kadar O₂ tüketilir. Dolayısıyla bir hücre iki hücreye bölündüğünde O₂ tüketimi artar. Büyüme faktörü reseptörlerinden çoğalma ve hayatta kalıma uyum sağlayan temel yollar, ön tedbir olarak süregelen oksijen dengesi için HIF-1α ekspresyonunu da uyarırlar. Çoğalan hücreler artan hücre sayısının sürekli oksijen ihtiyacını karşılamak için ek perfüzyon sağlayacak olan angiogenezi uyaran VEGF eksprese eder. Ayrıca, çoğalan hücreler tercihli olarak ATP oluşturmak için oksidasyon metabolizması yerine glikolitik mekanizmayı kullanırlar. (Brand et al. 1997) Hücre çoğalmasıyla birlikte anjiogenez ve glikolizisin eşlik eden uyarımı HIF-1 aktivasyonu ile sağlanır. Büyüme faktörü uyarımına cevaben artan HIF-1α seviyesi iki ayrı açıdan hipoksiye cevaben artan HIF-1α seviyesinden farklıdır. Birincisi, hipoksi HIF-1α seviyesini her hücrede artırır, büyüme faktörü reseptörleri ise hücre tipine özgü uyarım yapar. İkincisi, hipoksi HIF-1α degradasyonunun azalmasıyla ilişkilidir, oysa büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer sinyal molekülleri MAPK ve PI3K'ın aktivasyonu yoluyla HIF-1α sentezini uyarır. (Semenza 2003)

mTOR fosforilasyonunun bilinen hedefleri protein sentezinin düzenlenleyicileridir. Bununla birlikte bu proteinlerin mTOR tarafından fosforilasyonunun HIF-1α sentezinin artışı için gerekli mi yoksa yeterli mi olduğu bilinmemektedir. Pekçok farklı mRNA'nın translasyonunun bu yolakla düzenlendiği bilinir. mRNA'ların 5'-her türlü proteine dönüştürülemez bölgedeki özgül gen dizileri, mTOR sinyaliyle düzenlenen herhangi özgül mRNA'ların translasyonu belirler. (Semenza 2003)

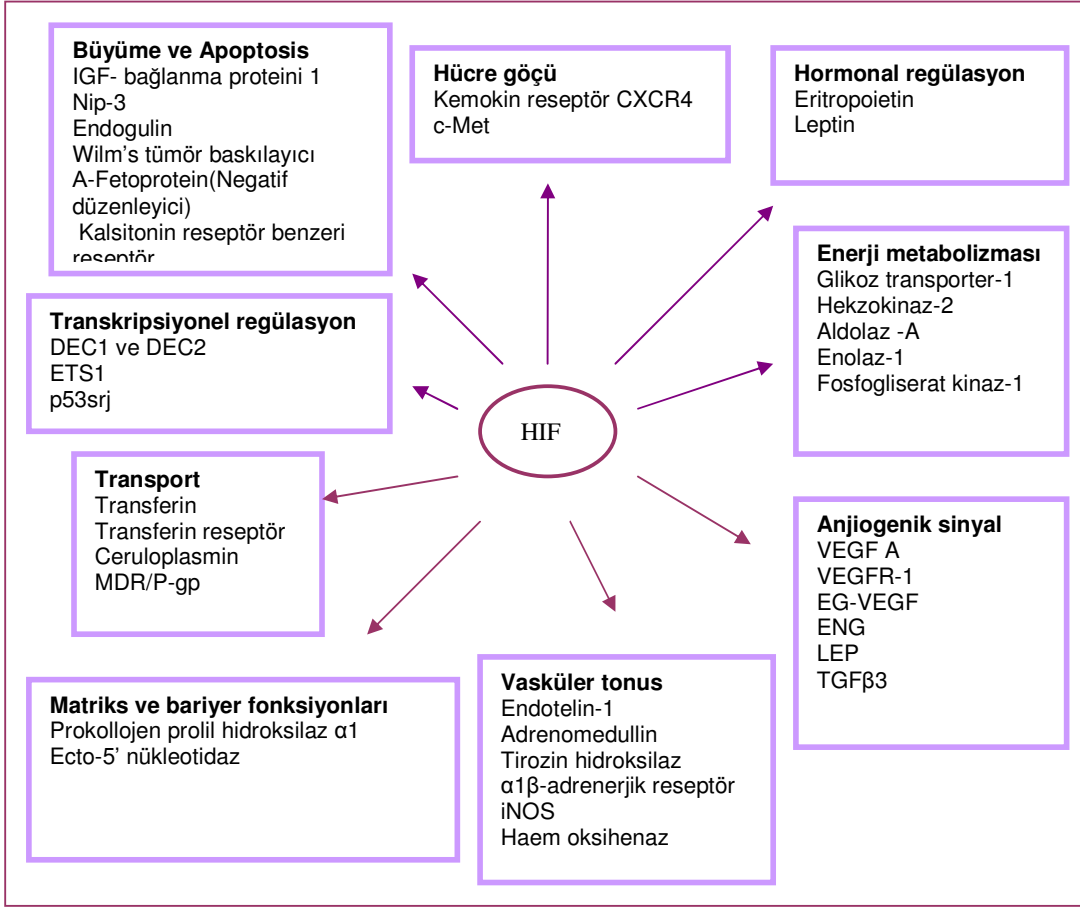
HIF-1α protein ekspresyonunun hipoksik olmayan koşullar altında aşırı derecede kısa yarı ömrü sebebiyle sentez oranlarındaki değişikliklere duyarlı olması olasıdır. HIF-1α sentezindeki etkilere ek olarak, RAF-

MEK-ERK sinyal iletim yolağının aktivasyonu HIF-1 α transaktivasyon domaininin fonksiyonunu harekete geçirdiği gösterilmiştir. (Richard et al. 1999)

2.2.4. İnsan kanserlerinde HIF-1'in rolü

Hipoksik koşullar altında, HIF-1 α HIF-1 β ile ikili oluşturur (Wang et al. 1995) ve bu heterodimer hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için 5'-RCGTG-3' kor bağlanma bölgesine bağlanır. (Wang et al. 1993) Şimdiye kadar memelilerde 100'den fazla olası HIF-1 hedef geni olduğu gösterilmiştir. HIF-1'in hedef genlerinin kodladığı protein ürünleri anjiyogenez/vasküler şekil değişikliği, enerji metabolizması, eritropoez, hücre çoğalması, canlılık, hücre göçü, hormonal regülasyon, transkripsiyonal regülasyonda rol oynar. (Şekil 2.6.) HIF-1'in İskemik kardiovasküler bozukluk, pulmoner hipertansiyon, diabetik retinopati, felç, solid tümör gibi hipoksi ile karakterize olan insan hastalıklarında varlığı gösterilmiştir. (Semenza et al. 2000, Brown 2000)

Solid tümörlerde hızlı hücre çoğalması, tümör kılcallarının ağır yapısal bozuklukları ve bozulmuş küçük kan dolaşımı hipoksik mikroçevre için öncüdür. (Hockel et al. 2001) Tümör hücrelerindeki düşük oksijenin kısmi baskı yaratması radyoterapi ve kemoterapiye direnç ile ilişkilendirilir. (Brown 1999) Tümör hücrelerinin hipoksik koşullara adaptasyonunu sağlayan moleküler mekanizmalar HIF-1'in seviyesini artıran mekanizmalardır. Bir dizi kanıt HIF-1'in tümör gelişimindeki önemli rolünü ortaya koyar. İlk olarak HIF-1 α özafagal, beyin, göğüs, akciğer, ovaryum, servikal, ve kolon kanserlerini içeren çeşitli kanserlerde artar. Servikal karsinomun erken evresinde HIF-1 α artışı hasta ölümüyle ilişkilendirilir. (Birner et al. 2000) Orofaringeal yassı hücre karsinomunda HIF-1 α ekspresyon seviyesi hem radyasyon direnci, hem de hasta ölümüyle ilişkilendirilir. (Aebersold et al 2001) İkinci olarak HIF-1, tümör hücrelerinin hipoksiye adaptasyonuna izin veren glikolitik enzim genleri ve anjiyogenik sinyal genleri gibi hedef genlerin ekspresyonunu artırır. Varolan damar sisteminden yeni kan damarlarının şekillenmesini sağlayan anjiyogenez tümör büyümesi için kritiktir. Yeni damarlanma tümör hücrelerinin hızlıca çoğalmasını sağlayacak oksijen ve besin sağlar. (Carmeliet et al. 2000) VEGF artışının düzenlenmesinin HIF-1 bağımlı olması (Forsythe et al. 1996) anjiyogenik saatin aktivasyonu ve tümör oluşumunu erken evresinde yeni damar oluşumunun uyarılmasıyla sonuçlanır. (Fang et al. 2001) Anjiyogenezin indüklenebilmesi hızlı tümör büyümesi ve metastaz ile bağlantılıdır. (Hanahan et al. 1996) Tümör hücreleri genellikle, düşük oksijen miktarı, yüksek glikoz tüketim oranı, anaerobik glikolizis ile de karakterize edilir. (Wenger 2002) HIF-1 tümör hücrelerinde aldolaz A, Fosfogliserat Kinaz 1, ve Pirüvat Kinaz gibi metabolik enzimlerin aktivasyonu anaerobik glikolizisi gerçekleştirir. (Semenza et al. 1996) Üçüncü olarak, tümördeki hipoksik koşullar hücre ölüm sinyalini aktive eden fizyolojik stres ortamı oluşturur. (Shimizu et al. 1996) Bu arada, hipoksi kanser gelişimine katkıda bulunan ölüm-dirençli hücreleri seçer. (Graeber 1996) HIF-1 tümör büyümesinde hücre ölümünün hipoksik kontrolüne aracılık eder.



Şekil 2.6. Transkripsiyonel olarak HIF-1 tarafından düzenlenen genler(Semenza 2003)

3.MATERYAL VE METOD

3.1.Hücre kültürü

Panc-1 insan pankreas kanseri hücreleri, (John Hopkins Üniversitesi Dr. Gloria Su'nun laboratuvarından hediye edilmiştir.) %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone), %1 L-Glutamine (Hyclone), %1 Penisillin-streptomisin (Hyclone), Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) (GIBCO) besiyerinde yetiştirildi. Hücreler 24'lük standart hücre kültürü platelerinde 1×10^5 sayısında tek tabaka halinde yetiştirildi. 37°C sıcaklıkta ve %5'lik CO₂'li etüvde inkübe edildi.

3.2. RNA izolasyonu

İnkübasyondaki hücrelerden 24 saat sonra Trizol reagent (Invitrogen A.B.D.) ekstraksiyon reaktifi ve reaktifin protokolü kullanılarak total RNA elde edildi. Spektrofotometrede 260/280 dalga boyunda absorbans özeliğine göre RNA konsantrasyonu ölçüldü. Ayrıca %1'lik agaroz jel elektroforezinde, 1XTBE Tamponu (100mM Tris, 100mM Borik asit, 2mM EDTA), etidyum bromid görüntüleme yöntemiyle RNA zincirinin bütünlüğü görüldü. Elde edilen RNA'dan cDNA sentezlendi.

3.3. cDNA Sentezi

Öncelikle Oligo (dt) ve RNA 70 °C sıcaklıkta 10dk. bekletildi. Hemen buza alındı. 5dk. buzda bekletildi. Reaksiyon tamponu ve Revers Transcriptase enzimi eklenerek 39°C'de su banyosunda 1sa. inkübe edildi.

RNA	: 1µg / µl
dNTP	: 2,5mM
Oligo(dt) (Invitrogen A.B.D.)	: 0.5 µg / µl
10X Revers Transcriptase Tampon (Finnzymes Finlandiya)	:2 µl
Revers Transcriptase(RT) (Finnzymes Finlandiya)	:1 U

3.4. PZR

Elde edilen cDNA kalıp olarak ve HIF-1α gen dizilimini çoğaltacak primerler kullanılarak aşağıda belirtilen koşullarda tepkime gerçekleştirildi.

Kalıp DNA	:	30ng
MgCl ₂ (Finnzyme Finlandiya)	:	1,5 mM
dNTP	:	0,2 mM
Proof reading ezyme (Finnzyme Finlandiya)	:	1 ünit
5X PCR Tampon (Finnzyme Finlandiya)	:	10 µl
Reaksiyon Hacmi	:	50µl

<u>İşlem</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>
Ön denatürasyon	98 °C	1dk.
Denatürasyon	98 °C	7sn.
Bağlanma	61 °C	25sn.
Uzama	72 °C	45sn.

PRİMER DİZİLERİ (5'→3')

Primer HIF-1 α / Hind III R AAGCTTTAACTTGATCCAAAGCTCTG
Primer HIF-1 α / Hind III F AAGCTTAGACATCGCGGGGACCGATT

Yapılan PZR örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde, 1XTBE Tamponu, 0,75 μ g/ μ l λ DNA/HindIII (Fermentas Kanada) DNA belirleyicisi kullanılarak etidyum bromid görüntüleme yöntemiyle HIF-1 α geni büyüklüğündeki bant saptandı ve jelden kesilip çıkartıldı. Genemark DNA jel temizleme kiti ve kitin prosedürü kullanılarak jel ve PZR artıklarından arındırıldı.

3.5. HIF-1 Geninin klonlanması

3.5.1. Ligasyon

PZR işleminde kullanılan enzimin özelliği sonucu kesik uç şeklinde bitirilen çoğaltma işlemi nedeniyle yapışkan uç oluşturmak, genin bağlanabilmesini sağlamak için, yine bir polimeraz reaksiyonuyla gen bölgesinin uçları Adenin nükleotidiyle uzatıldı. PZR reaksiyonunda olduğu gibi bir ünite Taq Polimeraz, Reaksiyon tamponu, MgCl₂, dATP, dH₂O ve HIF-1 PZR ürünü konularak 72°C de 10dk., 60 °C de 10dk., 55°C de 10dk., 40°C de 10dk., 37°C de 10dk. bekletildi. Genemark temizleme kiti ve kitin prosedürü kullanılarak temizlendi.

Memeli ekspresyon vektörü olan pcDNA EcoRV restriksiyon enzimiyle kesildi. (Bu enzim DNA'yı blunt end olarak kesmektedir.) HIF-1 α gen bölgesinin uçlarına uygulanan yöntemle plazmidin uçları Timin nükleotidiyle uzatıldı Genemark temizleme kiti ve kitin prosedürü kullanılarak temizlendi. Eklenecek gen bölgesi ve plazmid T4 Ligaz Enzimi ve tamponu (Fermentas Kanada) eklenerek + 4 °C de gece boyu bekletildi.

3.5.2. Transformasyon

Memeli vektörü pcDNA'ya klonlanmış HIF-1 vektörünü çoğaltmak amacı ile pcDNA/HIF-1 vektörü DH5 α , kompetent E.coli'ye transforme edildi. DH5 α , kompetent E.coli bakterisi buza alınarak ligaz ile muamele edilmiş pcDNA/HIF-1 α eklendi. Buzda 20dk. bekletildi. Hemen ardından 37 °C su banyosunda 3dk. çalkalandı. 1,5dk. tekrar buzda bekletilerek ısı şoku uygulanmış oldu. Bu tüpe 1ml. Luria Bertani (LB) broth besiyeri (10g/L casein, 5g/L yeast extract, 5g/L NaCl, 1ml 1N NaOH) (Atlas, 1997) eklendi. 1sa. 37°C su banyosunda 200-300 RPM'de çalkalandı. Ampisilinli katı LB besiyerine (10g/L casein, 5g/L yeast extract, 5g/L NaCl, 1ml 1N NaOH, agar) 250 μ l ve 750 μ l şeklinde iki farklı konsantrasyonda ekildi. 37°C etüvde gece boyu inkübasyona bırakıldı. Aynı anda kontrol olarak boş pcDNA plazmidi transforme edildi. İnkübasyondan alınan plak kontrol plağıyla karşılaştırıldı. Plazmid ekstraksiyonu basamağına geçildi. Plazmid ekstraksiyonu Maniatis Alkaline Lysis prosedürüne göre yapıldı. Ardından Genemark temizleme kiti ve kitin prosedürü kullanılarak temizlendi.

Klonlanıp klonlanmadığını belirlemek için örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezinde, 1X TBE Tamponu ile boş pcDNA plazmidini belirleyici olarak kullanarak yürütüldü. Bu belirlemeden sonra doğru oryantasyonda yerleşmiş gen bölgesini içeren plazmidi de klonlananlar arasından seçmek için PZR yapıldı.

PRİMER DİZİLERİ (5'→3')

Primer Pre7 T GCA GAG CTC TCT GGC TAACT
(pcDNA sekansı içersinde sense primeri)

Primer HIF-1 α R GTA CTG TCC TGT GGT GACTT

(HIF-1 α cDNA'sı içerinden seçilen anti-sense primeri)

Bu işlemden sonra kullanacağımız gen bölgesini içeren plazmid kesinleştirilmiş oldu. Büyük miktarlarda plazmid ekstraksiyonu yapılarak konsantrasyonu arttırıldı. Spektrofotometrede 260nm/280nm dalga boyunda absorbans özelliğine göre DNA konsantrasyonu lld. Dizi analizi yaptırıldı ve mutasyona rastlanmadı. Hücre kültürüne verilmek üzere hücreler yukarıda bahsettiğimiz şekilde hazırlandı.

3.6. Transfeksiyon

Panc-1 insan pankreas kanseri hücreleri % 70 yoğunluğa ulaştıklarında transfeksiyon yapıldı. Klonladığımız plazmidi hücre içine sokabilmek için ExGen 500 Invitro Transfection Reagent (Pure Extreme/Fermentas) ve prosedürü kullanıldı. Kontrol olarak transformasyonla oğalttığımız ana vektör pcDNA boş plazmidini aynı miktarda hücreye transfekte edildi.

3.7. Koloni analizi

Transfekte edilmiş hücreler 42 saatten sonra tripsinize (50mg/ml) edildi. Hücreler tripsinden uzaklaştırıldıktan sonra sayıldı. Yoğunluğuna göre pcDNA transfekte edilmiş ve pcDNA/HIF-1 α transfekte edilmiş hücreler aynı sayıda olacak şekilde 100x20mm'lik platelere 10ml %10 FBS, %1 L-Glutamine, %1 Penisillin-streptomisin, DMEM besiyeri ile birlikte ekildi. Bir gün sonra 0,4mg/ml konsantrasyonunda pcDNA plazmidinde yer alan Higramisin direnç genii sayesinde plazmidi içeren hücreleri seçmek için G418 (Hygramicin B) antibiyotiği eklenir. 40 gün sonra hücreler besiyerinden uzaklaştırılır. PBS ile yıkanır. Metanolde %1'lik Metilen mavisi ile boyanır. 10ml %1'lik metilen mavisi yıkanmış hücrelere dökülür. 5dk. bekletilir. 3 kez PBS ile yıkanır. Kurumaya bırakılır.

3.8. İlaçla Muamele

96'lık hücre kültürü platelerine aynı sayıda konulan panc1 hücrelerine kontrol ve HIF-1 α transfekte edildikten sonra iki farklı dozda doksorubisin uygulandı. Grafikte D1 olarak adlandırılan klinik dozun iki katı yani 2,5mg/L, D2 olarak adlandırılan klinik doz 1,25mg/L dir.

3.9. Sitotoksosite-proliferasyon testi (MTT)

Bu amaçla MTT kullanıldı. MTT solüsyonu 25 mg MTT [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromid] 5ml PBS ile sulandırılarak pH 7,4 olacak şekilde hazırlandı. Transfeksiyonu yapılmış hücreler 72 saat sonra besiyerinden uzaklaştırıldı. 100l besiyerine 10l MTT solüsyonu eklenerek hücrelere verildi. 2 saat bekletildi. Besiyeri uzaklaştırıldı. Lizis solüsyonu %1 SDS, %6 Asetik asit DMSO'da zlerek hazırlandı. 100l lizis solüsyonu hücrelere eklendi. 570/630 dalga boyunda absorbansı lld.

3.10. Multipleks Semikantitatif RT-PZR

pcDNA ve pcDNA/HIF-1 α transfekte edilmiş hücrelerden 42 saat sonra RNA izolasyonu yapıldı. Trizol reagent ekstraksiyon kiti ve kitin protokolü kullanılarak total RNA elde edildi. Daha önce bahsedildiği şekilde elde edilen RNA cDNA'ya dönüştürüldü. Elde edilen cDNA'lar öncelikle HIF-1 α primerleriyle HIF-1 α mRNA ekspresyon miktarı araştırıldı. Bu amaçla aynı şekilde hazırlanan 3 reaksiyon 15, 20 ve 25. termal döngüde gerçekleştirildi. Yapılan PZR rnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde, 1XTBE Tamponu, 0,75 g/l λ DNA/Hind III (Fermentas Kanada) DNA belirleyicisi kullanılarak etidyum bromid görüntüleme yöntemiyle görüntülendi. Hazırladığımız pcDNA/HIF-1 vektörünün HIF-1 mRNA ekspresyonu yaptığını gösterdikten sonra ekspresyon farkı araştırılan genin boyu ile çakışmayacak şekilde, farklı boylarda 4 Aktin primer çifti internal kontrol olarak kullanıldı ve mTOR, Akt, cIAP1, cIAP2, XIAP1, Bax ve Bcl-2 genlerinin

ayrı ayrı ekspresyon farkı yapılan multipleks-PCR ile araştırıldı. Bunun için öncelikle her gen için logaritmik artış fazı belirlendi. Her gen için belirlenen PZR devir sayısında Aktin primerinin konsantrasyonu o döngüye göre değiştirilerek ve araştırılan genin primeriyle multipleks PZR yapıldı. Doğruluğundan emin olmak için reaksiyon her gen için 3 kez tekrar edildi ve çıkan bantların yoğunlukları İmageJ programıyla ölçüldü. İnternal kontrol ile ekspresyon farkı araştırılan genin bant yoğunlukları oranları göz önüne alınarak sonuca varıldı.

Kalıp DNA	: 30ng
MgCl ₂	: 1,5 mM
dNTP	: 0,2 mM
Taq DNA Polimeraz (Biogentek ltd. şti. Türkiye)	: 1 ünit
5X PCR Tampon (Biogentek ltd. şti. Türkiye)	: 10µl
Reaksiyon Hacmi	: 50µl

<u>İşlem</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>
Ön denatürasyon	94 °C	2dk.
Denatürasyon	94 °C	50sn.
Bağlanma	58 °C	50sn.
Uzama	72 °C	10dk.

<u>Primerler</u>	<u>Baz dizilimi</u>
HIF-1 F std 20	TGCTCATCAGTTGCCACTTC
HIF-1 R std 20	GTACTGTCCTGTGGTACTT
Akt1 F std 24	ATGAGCGACGTGGCTAT...
Akt1 R std 25	GAGGCCGTCAGCCACAG...
Aktin F	GGTCAGAAGGATTCTATGTG
Aktin R	GTCCACGTCACACTTCATGATG
Aktin F2	TCTACAATGAGCTGCGTGTG
Aktin R2	CATCACGATGCCAGTGGTAC
mTOR F	GCACATTGACTTTGGGGACT
mTOR R	CGCTTGTTGCCTTTGGTATT
cIAP1 F	GCACATTCATTATCTCCACCTTG
cIAP1 R	CATCATCCTTTGGTCCCAGTTAC
cIAP2 F	CCTCTCAGCCTACTTTTCCTTCTTC
cIAP2 R	CATAGCATTATCCTTCGGTTCCC
XIAP F	TCAGCATCAACTGGCAGGAG
XIAP R	TCTCTTGGGGTTAGGTGAGCATAG
Bcl 2F	CGACGACTTCTCCCGCGCTACCGC
Bcl 2R	CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC
Bax F	CTGCAGAGGATGATTGCCG
Bax R	TGCCACTCGGAAAAAGACCT

Primerlerin çoğalttığı baz dizisinin boyu (Baz çifti)

HIF-1 F-R	796 bç
Akt1 F-R	330 bç
Aktin F-R	725 bç
Aktin F-R2	316 bç
Aktin F2-R	599 bç
Aktin F2-R2	190 bç
mTOR F-R	261 bç
cIAP1 F-R	301 bç
cIAP2 F-R	344 bç
XIAP F-R	422 bç
Bcl-2 F-R	319 bç

3.11. Protein Ekstraksiyonu

Transfeksiyondan 42 saat sonra protein ekstraksiyonu yapıldı. Üremekte olan hücre üzerine Protein Lizis Tampon eklendi ve protein ekstraktı epandorflara toplandı. Pipetaj yapıldı. Buzda en az 30 dk. bekletildi. Her 5 dk.da bir alt üst edilerek karıştırıldı. 12000 RPM'de +4 °C de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kullanılmak üzere ayrıldı.

Protein Lizis Tampon:

Tris pH: 8,0	: 50mM
EDTA	: 5mM
NaCl	: 150mM
NP40	: % 40
Proteinaz İnhibitörü (Roche Almanya)	: 1 tablet

3.12. Western Blot Analizi

Boş plazmid ve pcDNA/HIF-1 α plazmidini transfekte hücrelerden elde edilen total protein, protein yükleme tamponu ile muamele edildi ve 4dk kaynatılarak moleküler düzeyde parçalandı. Hazırlanan bu proteinler %5,6'lık Acrylamid-Bisacrylamid jelinde yürütüldü ve Nitrosellüloz membrana transfer edildi. Öncelikle HIF-1 ekspresyonu farkını gözlemlmek için tavşan poliklonal HIF-1 antikor (Cell Signalling) 1:1000 oranında sulandırılarak kullanıldı. Aynı membran internal kontrol olarak kullanılan aktin tayini içinde kullanıldı. monoklonal Beta-Aktin antikor (Sigma) kontrol olarak 1:1000 oranında sulandırılarak kullanıldı. Birincil antikorun özelliğine göre ikincil antikorlar kullanıldı. Horse Radish Peroksidazı (HRP) takip eden kimyasal luminesans ile muamele edilerek film üzerinde görüntülendi.

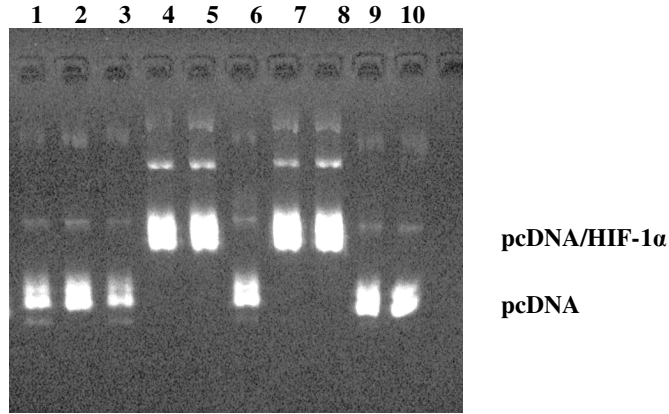
HIF-1 α protein artışı gözlemlendikten sonra aşağıdaki proteinler araştırıldı.

<u>Antikor</u>	<u>Boy</u>	<u>Sulandırılma oranı</u>
Akt antikor (Cell Signalling)	60kDa	1:1000
Phospho-IKB (Cell Signalling)	41 kDa	1:1000
P70-S6K (Cell Signalling)	70,85kDa	1:1000

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

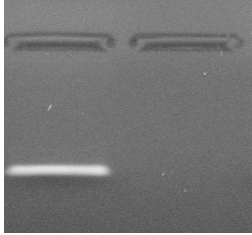
4.1. HIF-1 α geninin klonlanması

Plazmid Ekstraksiyon ürünü agaroz jelde yürütüldü. (Şekil 4.1.) Memeli ekspresyon vektörü ligasyon aşamasında klonlanacak gen bölgesini almadan kendi kendine kapanabilir. (self ligation) Bu durumda iki ürün ortaya çıktı. Bu boş vektör, gen ile bağlanmış vektörden daha az baz çiftine sahip olduğu için jelde daha hızlı ilerlediği gözlemlendi.



Şekil 4.1. Boş ana vektör pcDNA ve bu vektöre klonlanmış HIF-1 DNA sının jel görüntüsü

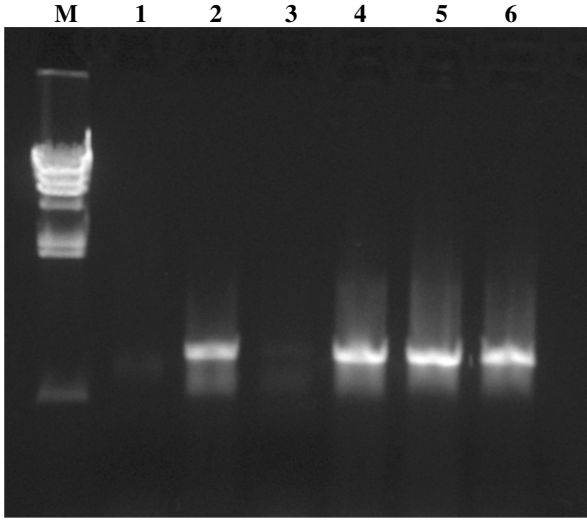
HIF-1 α geninin doğru yöndeki dizilimine uygun primerler ve transformasyondan elde edilen pcDNA/HIF-1 α klonu kalıp olarak kullanılarak yapılan PZR çalışması ürünleri agaroz jelde görüntüldü. pcDNA vektörüne doğru yerleşmiş olan HIF-1 α klonu ürün verirken diğerinde PZR ürünü elde edilmediği gözlemlendi. (Şekil 4.2.)



Şekil 4.2. Klonlanan HIF-1 geninin oryantasyon belirleme jel görüntüsü: Klonlanan plazmid ekstraksiyonu ürünleri ve belirli primerlerle yapılan PZR'da doğru yerleşen HIF-1 α klonunda bant gözlenirken yanlış yerleşen HIF-1 α klonu PZR ürününde bant gözlenmedi.

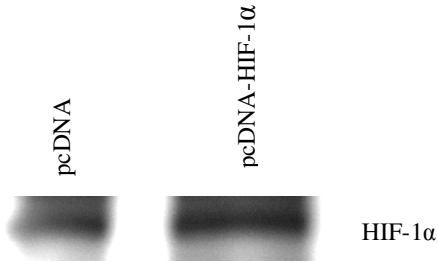
4.2. HIF-1 α ekspresyon artışının ispatlanması

Hücre kültürü, transfeksiyon ve mRNA ekstraksiyonu sonrası elde edilen cDNA'lar kullanılarak farklı döngülerde yapılan PZR çalışmasında HIF-1 α ekspresyon miktarı araştırıldı. pcDNA transfekte hücrelerdeki endojen HIF-1 α ekspresyonu ancak 25. siklusa görülebilecek miktara ulaşırken, pcDNA/HIF-1 α transfekte hücrelerde HIF-1 α ekspresyon miktarı oldukça fazladır ki 15. siklusa dahi yoğun ürün miktarı gözlemlendi. Bu durum 20 ve 25. sikluslarda artarak devam etti. (Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. *HIF-1α* ekspresyon artışının jel görüntüsü M- DNA belirteç, 1- 15. siklusta pcDNA vektörü bulunduran hücredeki *HIF-1* ekspresyonu, 2- 15. siklusta pcDNA-*HIF-1* vektörü bulunduran hücredeki *HIF-1* ekspresyonu, 3- 20. siklusta pcDNA vektörü bulunduran hücredeki *HIF-1* ekspresyonu, 4- 20. siklusta pcDNA-*HIF-1* vektörü bulunduran hücredeki *HIF-1* ekspresyonu, 5- 25. siklusta pcDNA vektörü bulunduran hücredeki *HIF-1* ekspresyonu, 6-25. siklusta pcDNA-*HIF-1* vektörü bulunduran hücredeki *HIF-1* ekspresyonu gösterilmiştir.

Boş pcDNA ve pcDNA/*HIF-1α* vektörü transfekte hücrelerden elde edilen proteinler ile *HIF-1α* protein miktarı araştırılmak üzere western blot analizi yapıldı. Ayrıca eşit miktarda protein kullanıldığını gösterebilmek için Aktin antikoru kullanıldı (internal kontrol). *HIF-1α* ekspresyonunun kontrole göre arttığı gözlemlendi.(Şekil 4.4.)



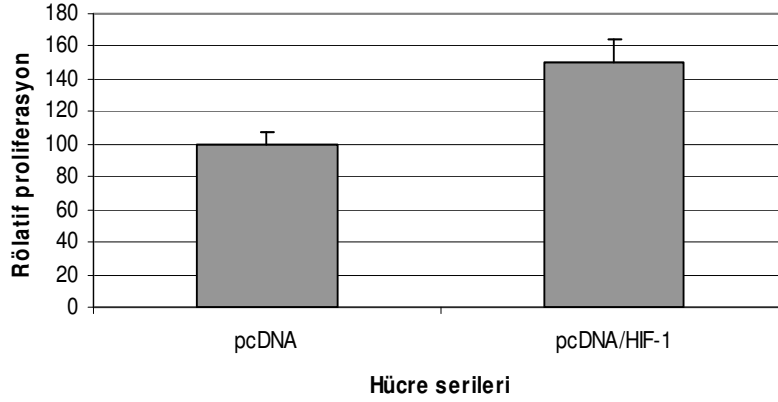
Şekil 4.4. *HIF-1α* ekspresyon artışının western blot görüntüsü

4.3 Fonksiyonel testler

4.3. 1. Proliferasyon testi

HIF-1α ekspresyon artışı gösteren ve boş plazmid transfekte edilmiş aynı sayıdaki panc1 hücrelerine proliferasyon farklarını araştırmak amacıyla MTT test uygulandı. Sonuçlar Çizelge 4.1.'deki diyagramla anlaşıldı. Proliferasyon oranının *HIF-1α* ekspresyonu yapmayan hücrelere göre % 50 arttığı gözlemlendi.

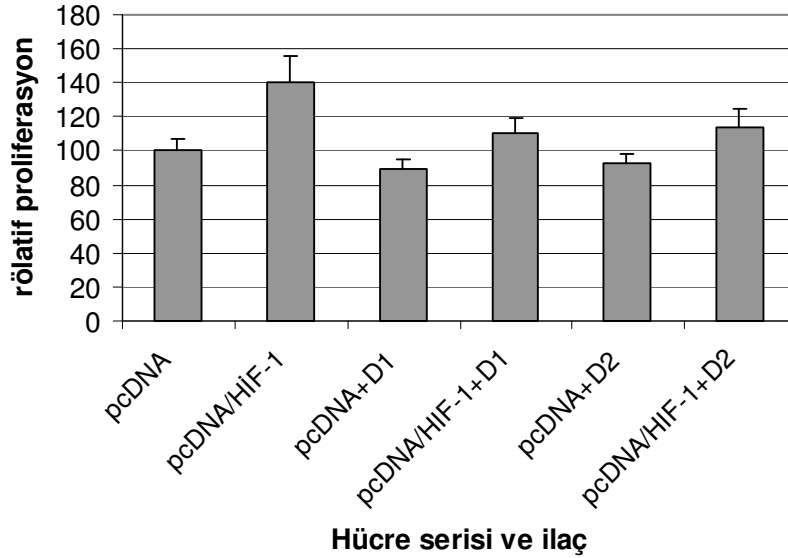
Çizelge 4.1. *Transfekte hücrelerin MTT test sonuçları*



4.3.2. HIF-1 ekspresyonunun kanser ilaçlarına karşı direnç gelişimindeki rolünün araştırılması

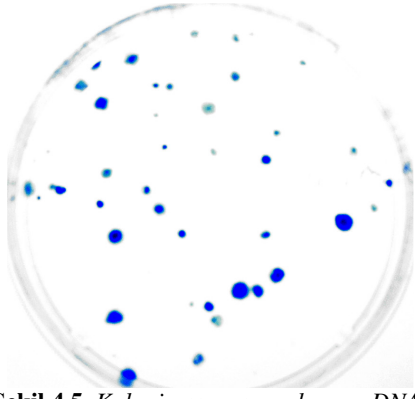
İlaçsız olarak ve iki ayrı konsantrasyonda yapılan deneylerin proliferasyon testi sonucu diagramla anlaşıldığında ilaçla muamelelerin proliferasyona etkisi olmadığı gözlemlendi.

Çizelge 4.2. *Transfekte hücrelerin doksorubisin ile muamele sonrası proliferasyon miktarları*

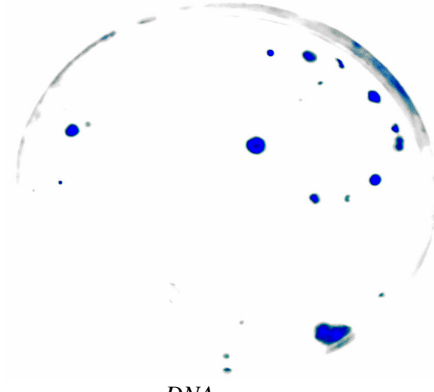


4.3.3. Koloni Assay

pcDNA ve pcDNA/HIF-1 α vektörleriyle transfekte aynı sayıdaki panc1 hücreleri G418 ilacı ile muamele edildiğinde Şekil 4.5. de görüldüğü gibi HIF-1 eksprese edilen hücrelerde daha fazla koloni oluştuğu gözlemlendi.



Şekil 4.5. Koloni assay sonuçları: *pcDNA/HIF-1*

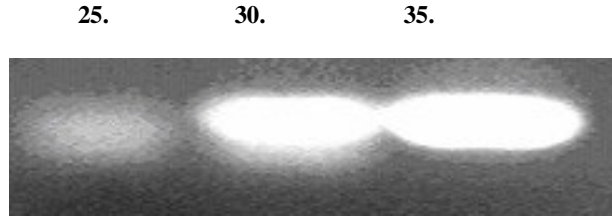


pcDNA

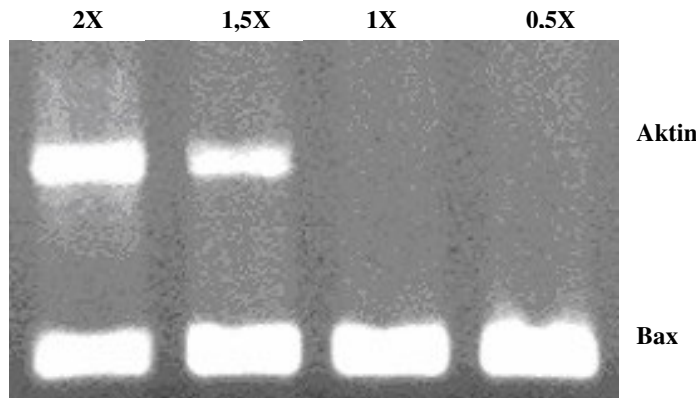
4.4. Proliferasyonu neden olabilecek gen ekspresyonlarının araştırılması

4.4.1. Multipleks PZR yöntemi

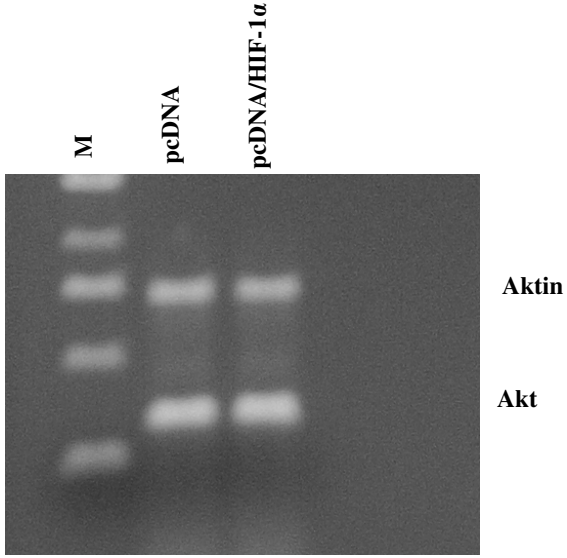
HIF-1 α 'nın etkisine aracılık ettiği düşünülen olası sinyal iletim yolları transfekte hücrelerde multipleks PZR yöntemiyle araştırıldı. Kullanılan primerlerin logaritmik artış fazlarının belirlenmesiyle Aktin primerinin konsantrasyonu belirlenen döngülere göre değiştirildi. Şekil 4.6'de görülen Bax primerinin 25, 30 ve 35. döngülerdeki yoğunluğundan logaritmik fazının 25 ile 30. döngüler arasında olduğu görülmüş bu primerle deneyler 23. döngüde gerçekleştirildi. Şekil 4.7.'de ise 23. döngüde aktin primerlerinin farklı konsantrasyonları denenmiş uygun konsantrasyonu karar verildi. Akt geni için 34., Bcl-2 ve XIAP 29., cIAP1 ve cIAP2 25. ve mTOR 35. döngüde reaksiyonlar gerçekleştirildi. *pcDNA* transfekte hücrelerden elde edilen cDNA kontrol olarak kullanılarak Aktin primerleri ve Akt, mTOR, cIAP1, cIAP2, XIAP, Bax ve Bcl-2 primerleriyle yapılan çalışmada ekspresyon farkı gözlenmedi. (Şekil 4.8-4.14.)



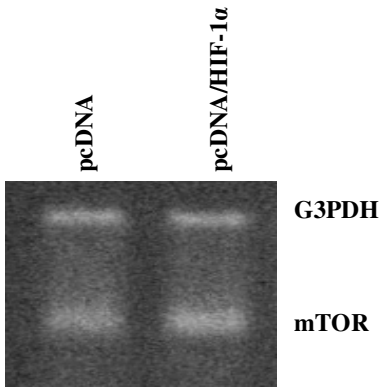
Şekil 4.6. Bax primerinin logaritmik faz belirleme görüntüsü



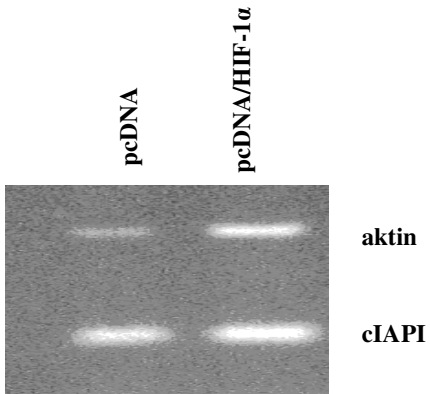
Şekil 4.7. Bax primerinin döngü sayısına göre Aktin konsantrasyonunun belirlendiği jel görüntüsü



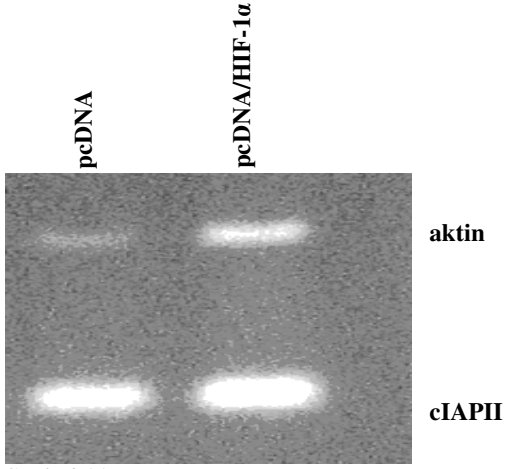
Şekil 4.8. Akt Multipleks PZR jel görüntüsü



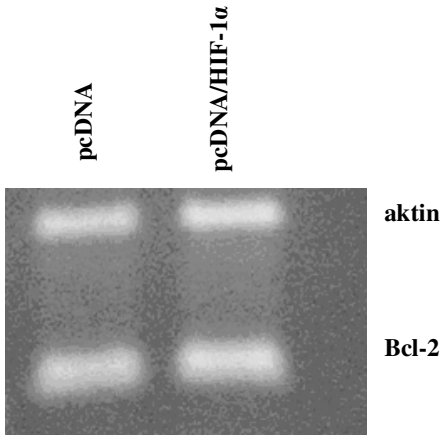
Şekil 4.9. mTOR Multipleks PZR jel görüntüsü



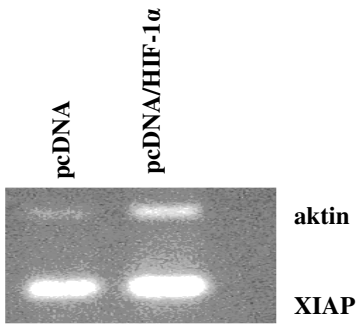
Şekil 4.10. cIAP1 Multipleks PZR jel görüntüsü



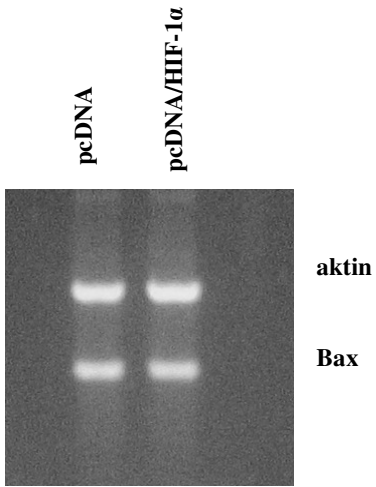
Şekil 4.11. cIAPII multipleks PZR jel görüntüsü



Şekil 4.12. Bcl-2 Multipleks PZR jel görüntüsü



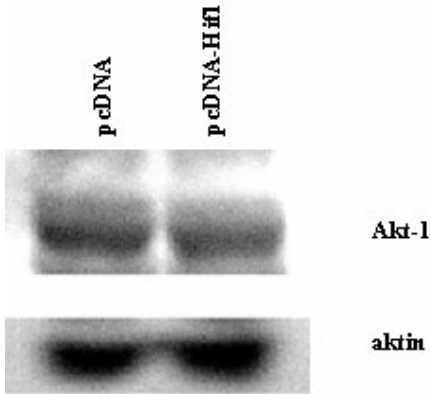
Şekil 4.13. XIAP Multipleks PZR jel görüntüsü



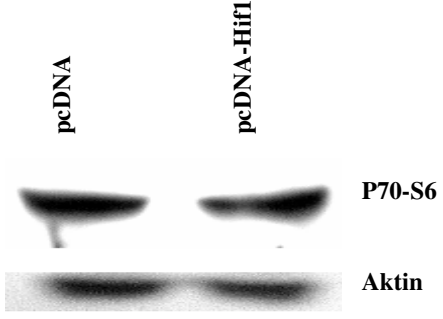
Şekil 4.14. Bax Multipleks PZR jel görüntüsü

4.4.2 Western blot yöntemi

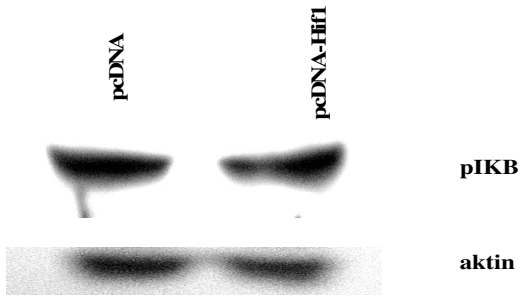
HIF-1 α 'nın etkisine aracılık ettiği düşünülen olası sinyal iletim yolları transfekte hücrelerde aynı zamanda Western blot yöntemiyle araştırıldı. pcDNA ve pcDNA-HIF-1 α eksprese eden Panc1 hücre serilerinin protein ekstraksiyonları kullanılarak ve Akt, p70^{S6K}, pIKB spesifik monoklonal antikorlar ile yapıldı. Aynı membran üzerinde internal kontrol miktar tayini amacı ile aktin spesifik antikorlar ve protein yükleme miktarı için yapılan immunoblot sonucu aktin miktarı gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Akt-1 Western blot görüntüsü



Şekil 4.16. *P-70^{S6K}* Western blot görüntüsü



Şekil 4.17. *pIKB* Western blot görüntüsü

5.TARTIŞMA

Kanser hücreleri otomatik büyüme aktivitesine sahiptir ve hücreleri zayıflatan strese normal hücrelerden daha fazla dirençlidirler. Bu dirençde, hipoksi, sitotoksik sitokinler, ultraviyole ışığı, radyasyon ve anti-kanser ilaçlarını içeren çeşitli stres faktörlerine karşı pek çok savunma sistemlerinden yararlanırlar. Bu stresler arasında hipoksi biyolojik olarak uyarıcı bir sistemdir ve çeşitli hücrelerde apoptozi uyarır. Bununla birlikte kanser hücreleri hipoksiye dirençlidir ve hipoksik koşullar altında HIF-1 α ekspresyonunu uyararak hayatta kalma yeteneği kazanırlar. HIF-1 solid tümörleri damar oluşumunu geliştirerek, büyüme faktörlerinin ekspresyonunu uyararak, apoptozi önleyerek ya da anaerobik mekanizmayı arttırarak hipoksik koşullara karşı hücreleri korumaktadır. Bu adaptasyonların tümöre daha fazla hayatta kalma ve çoğalma yeteneği kazandırması, bu çoğalan tümör hücreleri arasında daha fazla agresif özellikler gösterenlerin ve metastaz yeteneğine sahip olanlarının artmasını sağlamaktadır. Bütün bu özellikleri HIF-1'i kanser tedavisinde hedef molekül haline getirmektedir. Aynı zamanda ilaç etkileşimlerinin hipoksik dokularda başarısız sonuçlanması ve direnç mekanizmasındaki moleküllerin HIF-1 tarafından düzenlenmesi de HIF-1'in buradaki önemini arttırmaktadır.

Pek çok araştırmada HIF-1'in hücredeki etkileri, hücreyi oksijen yetersizliğine maruz bırakarak HIF-1 α seviyesini arttırmak suretiyle incelenmiştir. (Song et al. 2006, Hyun et al. 2004, Xia et al. 2004, Erler et al. 2004) Bu yöntemle hücre içerisindeki pek çok molekül uyarılmış olabilir ve hücre içerisinde farklı değişiklikler meydana gelmiş olmaktadır. Hücreleri HIF-1 α ekspresyon artışına zorlamak, hücre içerisinde özgül gen artışına sebep olur, oluşan değişiklikleri yapılan bu tek ekspresyon artışıyla yorumlamak mümkündür.

İlaç taşıma proteinlerinin aktivasyonu, ilaç inaktivasyon mekanizmaları, DNA hasarı tamiri, hücreleri olumsuz koşullarda yöneltilen apoptozden kaçırın sistemler, ilaç-hedef etkileşimlerinde oluşan bozukluklar ilaç direncinde etkili mekanizmalardır. Bu mekanizmaları oluşturan sinyal iletim yollarının çoğu HIF-1 geni tarafından düzenlenir.

ABC taşıma proteinleri olan MDR-1 ve MDR related protein (MRP) aktif olarak ilaçları hücre dışına taşıır ve özellikle taksanlar, antrasiklinler, vinka alkaloidler gibi doğal hidrofobik ilaçları hedefler. Çoklu ilaç direnci sıklıkla MDR-1'in artışıyla bağlantılıdır ve birçok ilaç dirençli hücre serisinde, bir takım lösemilerde ve solid tümörlerde artış gösterir. Hücreleri toksik etkenlerden koruyan MDR-1'in oluşturduğu direnç hücre içinde ilaç birikimini sınırlandıran, membran lipidlerini etkileyen, ilaçları hücre dışına atışı hızlandıran değişikliklerle sonuçlanır. (Liu et al. 2001) Bu değişiklikler çoğu antikanser ilacının aktive ettiği programlı hücre ölümünü (Lowe et al. 1993), DNA hasarı tamirini, ilaç detoksifiye mekanizmalarını (Synold et al. 2001) ve hücre döngüsündeki değişiklikleri bloke eder. Bununla birlikte MDR-1 geninin promotöründe HIF-1'in bağlanması için gerekli olan HRE dizisinin bulunması MDR-1 geninin hipoksiye cevaben HIF-1 tarafından düzenlendiğini kanıtlamıştır.

Apoptoz çok sayıda iç ve dış sinyallerle düzenlenir, bu sinyaller ikinci haberciler tarafından çoğaltılır ve kaspazları aktive eder. Kaspazların aktivasyonu için iki temel sinyal iletim yolu bulunur. İntrinsik sinyal iletim yolu Bcl-2 proteinleri ile düzenlenirken, ekstrinsik sinyal iletim yolu tümör nekrosiz faktör (TNF) reseptör ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir. İntrinsik apoptotik sinyal iletim yolunun proteinleri aynı homolojiyi paylaşırlar. Bax, Bad, Bak apoptozi ilerletirken, Bcl-X_L, Mcl-1 ve Bcl-2 anti-apoptotiktir. Bcl-2 ailesi üyelerinin kemoterapi cevabının düzenlenmesindeki rolü araştırıldığında Bcl-2 artışının kemoterapinin uyardığı apoptozu baskıladığı ve Bax artışının kanser hücrelerini kemoterapinin indüklediği apoptozu duyarlı hale getirdiği kanıtlanmıştır. Bununla birlikte pek çok çalışma kanserlerde (özellikle lenfomalarda) Bcl-2 ekspresyon artışının kemoterapiye zayıf cevap ile ilişkili olduğunu, bazı çalışmalar ilaç cevabı ile Bcl-2 artışı arasında bir bağ bulunmadığını ve bazıları Bcl-2 ekspresyonunun iyi prognozla ilgili olduğunu kanıtlamıştır. Bu bulgular Bcl-2 ekspresyonunun östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği gibi uygun klinikopatolojik parametrelerle ve daha az agresif ve kemoterapiye duyarlı tümör fenotipiyle ilişkisiyle açıklanabilir. Kaspaz aktivitesinin baskılanması yoluyla apoptozun düzenlenmesinde önemli olan bir diğer molekül cIAP 1, cIAP 2, XIAP ve Survivin moleküllerini içeren Inhibitors of caspase (IAP) ailesidir. IAP'ler direk olarak kaspaz 3, 7, ve 9 gibi kaspazlara bağlanır. Yüksek XIAP ve survivin ekspresyonu AML'de negatif prognostik faktör olarak değerlendirilmiştir. Kemoterapinin uyardığı apoptozu baskılayan bu moleküller aynı zamanda

hipoksiye cevap olarak da salınır. Squamous hücre karsinoma hücrelerinde HIF-1 α ekspresyonu artırıldığında, anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-X_L seviyeleri artarken, pro-apoptotik Bax ve Bak seviyelerinin azaldığı Sasabe ve ark. (2005) tarafından bulunmuştur. İnsan akciğer karsinoma hücrelerinde Bcl-2 ve Bcl-X_L seviyelerinde ve insan kolon kanseri hücrelerinde Bcl-2 seviyesinde hipoksinin tetiklediği artış olduğu bilinmektedir. (Park et al. 2002, Kinoshita et al. 2001) Kılıç ve ark. (2007) hipoksik koşullarda, Ewing sarkoma (A673) hücrelerinde Bcl-2 ve cIPA-1 proteinlerinde artış bulunurken, Rhabdomyosarcoma (A204) ve Ewing sarkoma hücrelerinde XIAP ve cIPA-2 proteinlerinin ekspresyonlarında bir değişiklik gözlemedi.

IkB (Inhibitor of kappa B), NF- κ B'ye bağlanarak sitoplazmadan çekirdeğe geçişini önler ve anti-apoptotik fonksiyonunu durdurur. Fosforile olmuş IkB, NF- κ B'ye bağlanamaz ve proteozomal degradasyona uğrar. Böylece NF- κ B, hücreleri sitotoksik etkenler, TNF, IL-1 ve diğer uyarıların tetiklediği apoptozdan korur. Ayrıca NF- κ B'nin etkilediği diğer anti-apoptotik genler, cellular inhibitors of apoptosis (cIAP) genleri, X-Linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), Bcl-2 homoloğu A1/Bfl-1 ve Bcl-X_L'dir. Phospho-IkB molekülünün HIF-1 artışıyla etkileşimleri bugüne kadar olan çalışmalarda henüz araştırılmamıştır.

Hipoksik koşullarda fosforile olan PI3K/Akt hücre çoğalmasını, hücre göçünü ve apoptoz inhibisyonunu içeren pek çok reseptör tirozin kinaz sinyal iletim yolunun anahtar aracı molekülüdür. Akt protein kinaz, onkogenlerden ve büyüme faktörlerinden gelen sinyalleri aktararak tümör gelişimindeki kritik elementleri kontrol eder. Akt sinyal iletim yolu insan kanserlerinde en sık hiperaktive olan sinyal iletim yollarından biridir ve pek çok hücrel proteinlerin fonksiyonunu düzenler ve fosforile eder. PI3K/Akt'nin hedef molekülleri arasında HIF-1 α , NF- κ B, XIAP, Bad, Frap, p70^{S6k} molekülleri bulunur.

HIF-1 α ekspresyonu PI3K/Akt sinyal iletim yolu tarafından uyarılır. Diğer bir taraftan, Hepatocellular karsinoma hücrelerinde HIF-1 α ekspresyonu küçük interfering RNA ile engellendiğinde fosfo-Akt'nin ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Yani aynı zamanda Akt aktivasyonu tersine HIF-1 α aktivasyonuna bağlıdır. (Tanaka et al. 2006) Yaptığımız bu çalışmada proliferasyon artışına sebep olduğu düşünülen PI3K/Akt sinyal iletim yolunu araştırmamızın sebebi bu yolağın hücre serilerinde ilaç direncini arttırmasıdır ve hipotezimiz olan ilaç direncine sebep olduğu varsayılan apoptotik sinyal iletim yolunu düzenlemesidir.

Doksorubisin antrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Doksorubisinin etkileme mekanizması karmaşıktır ve tam olarak bilinmemektedir. Bilinen doksorubisinin araya girerek DNA ile etkileştiği ve makromoleküler biyosentezi baskıladığıdır. Transkripsiyon için DNA sarmalını açan Topoizomerez 2 enziminin gelişimini baskılar ve replikasyon işlemini durdurur. (Fornari et al. 1994, Momparler et al. 1976)

HIF-1, tümörü oksijen stresinden kurtarmak için damar oluşumunu geliştirir, büyüme faktörlerini uyarır, hücreleri apoptozdan korur. HIF-1 α 'nın çekirdeğe translokasyonu ve transkripsiyonel koaktivatörleriyle etkileşimi VEGF, IGF-2, GLUT-1, Aldolaz, EPO, gibi 100'den fazla genin transkripsiyonunu uyarır. Akakura ve ark. 2001'de yaptıkları bir çalışmada pankreatik kanser hücrelerinin sürekli HIF-1 α eksprese ederek hipoksik koşullarda ve besin eksikliğinde hayatta kalma ve proliferasyon yeteneği geliştirdiğini kanıtlamıştır. HIF-1 α ekspresyon artışı sağlanan panc1 hücre serisinde direnç oluşumunu fenotipik ve genotipik olarak araştırdığımız tez çalışmamızda, transfekte hücrelerde HIF-1 α seviyesinin normal hücrelere göre arttırıldığı Şekil 4.3. ve 4.4.'de gösterilmiştir. Şekil 4.3.'de RNA düzeyinde HIF-1 α transfekte hücrelerde polimeraz zincir reaksiyonunun HIF-1 α transfekte edilmeyen hücrelere göre erken döngülerinde, HIF-1 α DNA bandını gözlememiz HIF-1 α transfekte hücrelerin HIF-1 α ekspresyonunu arttırmayı başardıkları şeklinde değerlendirilmiştir. HIF-1 α transfekte edilmeyen hücrelerde ileriki döngülerde de olsa HIF-1 α DNA'sı bulunması endojen HIF-1 α 'nın varlığını gösterir. Tümör hücreleri yetersiz damar oluşumu nedeniyle hipoksik şartlara uyum sağlamak durumunda oldukları için HIF-1 α ekspresyonu süreklidir.

Şekil 4.4.'de gösterilen HIF-1 α western blot görüntüsünde HIF-1 α transfekte ve kontrol hücrelerinin proteinleri aynı miktarlarda yürütüldüğünde HIF-1 α transfekte hücrelerin proteinlerinde kontrol hücrelerinin proteinine göre daha yoğun bir HIF-1 α protein bandı gözlenmiş, bu bulgu HIF-1 α 'nın protein düzeyinde de artışı şeklinde yorumlanmıştır.

RNA ve protein düzeyinde HIF-1 α ekspresyon artışı ispatlanmış olan hücelere doksorubisin kemoterapötik ilacı ile proliferasyon testi ve proliferasyona neden olabilecek moleküller araştırıldığında, ilaçsız olarak yapılan proliferasyon testinde HIF-1 α ekspresyon artışı olan hücelerde kontrol hücelere göre %50 oranında artış gözlemlendi. Koloni assay deneyi de bu çalışmayı destekler niteliktedir. (Çizelge 4.1., 4.2. , Şekil 4.5.)

HIF-1 α transfekte hüceleri doksorubisin ile muamele ettikten sonra proliferasyon artışı beklenen oranda gözlenmedi. %40-50 olan artış, doksorubisin etkisiyle %33'e düştüğü belirlendi. Bütün bu bulgulara dayanarak HIF-1 α ekspresyonu yapan hücelerin doksorubisine karşı direnç oluşturduğunu söylemek mümkün değildir.

Proliferasyon artışına sebep olabileceği düşünülen anti-apoptotik sinyal iletim yolunda rol alan gen ekspresyon ürünleri, RT-PCR ve Western blot yöntemiyle araştırdığımızda HIF-1 α ekspresyon artışının bu yolda çalıştığımız molekülleri etkilemediği bulundu. (Şekil 4.8.-4.17.) Logaritmik fazda yapılan PZR işleminde, internal kontrol kullanılarak her molekül kendi içinde değerlendirildiğinde HIF-1 α transfekte ve transfekte edilmeyen hücelerde benzer yoğunlukta Bcl-2, Bax, XIAP, cIAP1, cIAP2 ve Phospho-I κ B DNA'sına rastlanması ekspresyon farkı olmadığı şeklinde yorumlandı.

Proliferasyona dolayısıyla direnç gelişimine sebep olduğu düşünülen bu sinyal iletim yollarında HIF-1 α bağımlı bir değişiklik gözlenmemesi proliferasyona yol açabilecek başka yolların varlığıyla ilişkilendirilebilir. Örneğin ilaç taşıma proteini olan MDR-1 proteini, hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve hücre ölümünde rol oynayan tümör baskılayıcı gen olan p53, anti-apoptotik sinyal iletim yollarını aktive eden sinyal dönüştürücüler ve transkripsiyon uyarıcıları (Signal Transducers and Activators of Transcription STAT) gibi ilaç direncinde rol alan ve HIF-1 ile ilişkili olan pek çok gen ileri çalışmalar için kaynak oluşturabilir.

Sonuç olarak fenotipik ilaç direnci araştırmasında, direnç oluşturduğunu kanıtlayacak proliferasyon artışına rastlanmamış olmasını kullanılan antikanser ilacı doksorubisin veya Panc1 hücre serisinde gerçekleşen farklılıklardan kaynaklanmış olabileceğini düşünüyoruz. Önümüzdeki çalışmalarda daha agresif tümörler baz alınarak diğer sinyal iletim yollarında deneyler sürdürülebilir.

KAYNAKLAR

- Adams, J. M., Cory, S. 1998 The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*. 281; 1322-1326.
- Aebersold, D.M., Burri, P., Beer, K.T., Laissue, J., Djonov, V., Greiner, R.H., Semenza, G.L. 2001. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res*. 61(7):2911-6.
- Ambudkar, S.V., Dey, S. , Hryeyna, C.A. , Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M. 1999. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, (39); 361-398.
- Akakura, N., Kobayashi, M., Horiuchi, I., et al. 2001. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 α renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Research*. 61: (6548-6554)
- Ba'rdos, J. I., Ashcroft, M. 2004. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *BioEssays*, (26); 262-269.
- Barkett, M., Gilmore, T., 1999. Control of apoptosis by REL/NF-kappa-B transcription factors. *Oncogene* 18; 6910-6924.
- Belozerov, V. E., Meir, E. V. G. 2005. Hypoxia inducible factor-1:a novel target for cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs*, 16; 901-909.
- Birner, P., Schindl M., Obermair, A., Plank, C., Breitenecker, G., Oberhuber, G. 2000 Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res*. 60(17):4693-6.
- Bonetti, A., Zaninelli, M., Leone, R., Cetto, G.L., Pelosi, G., Biolo S., et al. 1998. Bcl-2 but not p53 expressions is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*, (4); 2331-2336.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., et al. 2000 A family of drug transporters:The multi-drug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst*. 92; 1295-1302.
- Brand, K. A., Hermfisse, U. 1997. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J*. 11(5):388-95.
- Brat, D. J., Castellano-Sanchez A. A., Hunter, S. B., Pecot, M., Cohen, C., Hammond E. H., et al. 2004. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, Express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res*. 64; 920-927.
- Brown, J.M. 2000. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today*. 6(4):157-62.
- Brown, J. M., Giaccia, A. J. 1998. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*. 58(7):1408-16.
- Brown, J. M., 1999. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res*. 59(23):5863-70.
- Bruick, R. K., McKnight, S L. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 294(5545):1337-40. Epub 2001 Oct 11.

- Campos, L., Rouault, J.P., Sabido, O., Oriol, P., Roubi, N., Vasselon, C., et al. 1993. High expressions of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*. (81); 3091-3096.
- Carmeliet, P., Jain, R.K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 407(6801):249-57.
- Clark, A.S., West, K., Streicher, S., Dennis, P.A. 2002. Constitutive and Inducible Akt Activity Promotes Resistance to Chemotherapy, Trastuzumab, or Tamoxifen in Breast Cancer Cells *Molecular Cancer Therapeutics*. 1; 707-717.
- Cole, S. P., Bhradwaj, G., Gerlach, J. H., et al. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 258;1650-1654.
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J. 2001. The channel of death. *J. Cell Biol.* 155;695-698.
- Epstein, A. C., Gladle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J., Ratcliffe, P. J. 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 107(1):43-54.
- Erler, J. T., Cawthorne, C. J., Williams, K. J., Koritzinsky, M., Wouters, B. G., Wilson, C., Miller, C., Demonacos, C., Stratford, I. J., Dive, C. 2004. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol.* 24(7):2875-89.
- Fang, J., Yan, L., Shing, Y., Moses, M. A. 2001. HIF-1 α -mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis. *Cancer Res.* 61(15):5731-5.
- Fornari, F. A., Randolph, J. K., Yalowich, J. C., Ritke, M. K., Gewirtz, D. A. 1994. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol.* 45(4):649-56.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., Semenza, G. L. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 16(9):4604-13.
- Freedman, S. J., Sun, Z. Y., Poy, F., Kung, A. L., Livingston, D. M., Wagner G., Eck, M. J. 2002. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(8):5367-72.
- Gazitti, Y., Liu, Q., Vosele, D., et al. 2001. Bcl-2 antisense oligonucleotide (ASO) enhances apoptosis and cytotoxicity in drug-resistant myeloma cells. *Blood*. 98; 641.
- Gottesman, M. M., Ambudkar, S. V., Ni, B., et al. 1994. Exploiting multidrug resistance to treat cancer. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 59; 677-683.
- Gottesman, M. M., Pastan, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochemistry*, 62; 385-427.
- Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W., Giaccia, A. J. 1996. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 379(6560):88-91.
- Hanahan, D., Folkman, J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 86(3):353-64.
- Harris, A. L. 2002. Hypoxia-a key regulatory factor in tumor growth. *Nat. Rev. Cancer.* 2; 38-47

- Hockel, M., Vaupel, P. 2001. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93(4):266-76.
- Huang, L. E., Gu, J. Schau, M., Bunn, H. F. 1998. Regulation of HIF-1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad Sci USA.* 95; 7987-7992.
- Hyun, J. Y., Chun, Y. S., Kim, T. Y., Kim, H. L., Kim, M. S., Park, J. W. 2004. Hypoxia-inducible factor 1 α - mediated resistance to phenolic anticancer. *Chemotherapy.* 50(3):119-26.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., Kaelin, W. G. Jr. 2001. HIF1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 292(5516):464-8.
- Jeong, W. J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., et al. 2002. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1- mediated acetylation. *Cell.* 111; 709-720.
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., Semenza, G. L. 1996. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 271; 17771-17778.
- Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R., Semenza, G. L. 1997. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 272; 7987-7992.
- Kallio, P. J., Okamat, K., O'Brien, S., et al. 1998. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor 1 α . *J. Biol. Chem.* 273; 6573-6586.
- Kaur, B., Khwaja F. W., Severson, E. A., Matheny, S. L., Brat, D. J., Van Meir, E. G. 2005. Hypoxia and hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncology.* 7(2):134-53.
- Kılıç, M., Kasperczyk, H., Fulda, S., Debatin, K.M. 2006. Role of hypoxia inducible factor 1 α in modulation of apoptosis resistance. *Cancer Res*, Dec 1;66 (23) ; 11263-70.
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., Bruick, R. K. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 16(12):1466-71.
- Lee, S.M., Lee, C.T., Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.S., Yoo, C.G. 2005. Hypoxia confers protection against apoptosis via PI3K/Akt and ERK pathways in lung cancer cells. *Cancer Letters.* 1-8.
- Lowe, S. W., Rulay, H. E., Jacks, T., et al. 1993. p53- dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 74;957-967.
- Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., et al. 2000. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell Science.* 113;2011-2021.
- Liu, Y. Y., Han, T. Y., Giuliano, A. E., et al. 2001. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB Journal.* 15;719-730.
- Mahon, P. C., Hirota, K., Semenza, G. L. 2001. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 15(20):2675-86.
- Martinou, J. C., Gren, D. R. 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2; 63-67.

- Min, J. H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W. G. Jr., Pavletich, N. P. 2002 Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*. 296(5574):1886-9.
- Momparler, R. L., Karon, M., Siegel, S. E., Avila, F. 1976. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res*. 36(8):2891-5.
- Paez, J. G., Sellers, W. R. 2003. PI3K/PTEN/AKT pathway. *Cancer Treat Res*. 115:145-67.
- Park, J-W. 2004. Hypoxia Inducible Factor 1- Related Diseases and Prospective Therapeutic Tools. *Journal of Pharmacological Sciences*, 94; 221-232.
- Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., Ratcliffe, P. J. 1997. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the α subunit. *J Biol Chem*. 272(17):11205-14.
- Richard, D. E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D., Pouyssegur, J. 1999. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*. 274(46):32631-7.
- Scheffer, G. L., Schroeijers, A. B., Izquierdo, M. A., et. al. 2000. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug resistant cancer. *Curr Opin Oncol*. 12;550-556.
- Schmitt, C. A., Rosenthal, C. T. and Lowe, S. W. 2000. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nature Med*, (6); 1029-1035.
- Schumacker, P. T. 2005. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Crit Care Med*, No. 12.
- Sellers, W. R. Fisher, D. E. 1999. Apoptosis in cancer drug targeting. *Journal Clin Invest*. 104;1655-1661.
- Semenza, G. L. 2000. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev*. 14(16):1983-91.
- Semenza, G. L. 2001. HIF-1, O₂, and the PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*. 107; 1-3.
- Semenza, G. L. 1999. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:551-78.
- Semenza, G. L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(10); 721-732.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P., Giallongo, A. 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 271(51):32529-37.
- Semenza, G.L., Wang, G.L. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biology*. 12 (12); 5447-54.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Itoh, Y., Hasegawa, J., Yamabe, K., Otsuki, Y., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. 1996. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res*. 56(9):2161-6.
- Solay, E., Droin, N., Bettaieb, A., et al. 2000. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia*. 14; 1833-1849.
- Song, X., Liu, X., Chi, W., Liu, Y., Wei, L., Wang, X., Yu J. 2006. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 α gene. *Cancer Chemother Pharmacol*. 58(6):776-84.

- Synold, T.W., Dussault, I., Forman, B. M., 2001. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nature Medicine*. 7; 584-590.
- Tanaka, H., Yamamoto, M., Hashimoto, N., Miyakoshi, M., Tamakawa, S., Yoshie, M. Tokusashi, Y., Yokoyama, K., Yaginuma, Y., Ogawa, K. 2006. Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α as an early change in mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Research*. 66(23); 11263-70
- Tanno, S., Yanagawa, N., Habiro, A., Koizumi, K., Nakano, Y., Osanai, M., Mizukami, Y., Okumura, T., Testa, J. R., Kohgo, Y. 2004. Serine/Threonine Kinase AKT Is Frequently Activated in Human Bile Duct Cancer and Is Associated with Increased Radioresistance. *Cancer Research*, 64; 3486-3490.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Baldwin, A. S. 1996 TNF- α and cancer therapy-induced cell death. *Science*. 274; 784-787.
- Wang, G.L., Semenza, G.L. 1993. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem*. 268(29); 21513-8.
- Wang, G. L., Semenza, G. L. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem*. 270; 1230-1237.
- Wouters, B., Beucken, T., Magagnin, M. G. 2004. Targeting hypoxia tolerance in cancer. *Drug Resistance Updates*, 7; 25-40.
- Wuchter, C., Karawajew, L., Ruppert, V., et al. 1999. Clinical significance of CD95, Bcl-2 and Bax expression and CD95 function in adult de novo acute myeloid leukemia in context of P-glycoprotein function, mutation stage, and cytogenetics. *Leukemia* 13; 1943-1953.
- Xia, S., Yu, S. Y., Yuan, X. L., Xu, S. P. 2004. Effects of hypoxia on expression of P-glycoprotein and multidrug resistance protein in human lung adenocarcinoma A549 cell line. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 84(8):663-6.
- Yang, H. H., Ma, M. H., Vescio, R. A., Berenson, J. R. 2003. Overcoming Drug Resistance in Multiple Myeloma: The Emergence of therapeutic Approaches to Induce Apoptosis. *Journal of Clinical Oncology*, 15, 21(22); 4239-47.
- Zamzami, N., Kroemer, G., 2001. The mitochondrion in apoptosis: How Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2; 67-71
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., Simons, J. W., Semenza, G. L. 2000. Modulation Hypoxia-inducible Factor 1 α Expression by the Epidermal Growth Factor/Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/FRAP Pathway in Human Prostate Cancer cells: Implications for Tumor Angiogenesis and Therapeutics

ÖZGEÇMİŞ

Manisa'da 1982 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Manisa'da tamamladı. 2000 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2004 yılında Biyolog ünvanıyla mezun oldu. 2004-2007 yılları arasında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilimdalı'nda Yüksek lisans öğrenimini tamamladı.