



MAKÜ FEBED
ISSN Online: 1309-2243
<http://dergipark.gov.tr/makufebed>
DOI: 10.29048/makufebed.336876

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 8(Ek Sayı 1): 245-251 (2017)
The Journal of Graduate School of Natural and Applied Sciences of Mehmet Akif Ersoy University 8(Supplementary Issue 1): 245-251 (2017)

Araştırma Makalesi / Research Paper

Meme Kanseri Hücrelerinde Zamana Bağlı HIF-2 α İfadesi Değişiminin Analizi

Muzaffer DÜKEL^{1*}, Kevin D. BROWN²

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Burdur
² Florida Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gainesville, Florida

Geliş Tarihi (Received): 06.09.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 16.11.2017

✉ *Sorumlu Yazar (Corresponding author)*: mdukel@mehmetakif.edu.tr*

☎ +90 248 2133063 📠 +90 248 2133099

ÖZ

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan kanser türüdür ve Türkiye’de gözlemlenen vaka sayısı her geçen gün artmaktadır. Meme kanserinin içinde yer aldığı birçok kanser türünde, kanserli doku kan damarlarından uzak bölgelerde büyürken oksijen eksikliğine maruz kalır. Hipoksiya olarak adlandırılan bu duruma karşı dokular Hipoksi ile indüklenbilir faktör (HIF) transkripsiyon faktörlerinin ifade artışı ile cevap verirler. HIF transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle kanserli hücreler, damar gelişimini uyararak farklı doku ve organlara göç ederler. Bu nedenle HIF transkripsiyon faktörlerinin hipoksiya sürecindeki değişiminin bilinmesi önemlidir. HIF-2 α hipoksik koşullar altında ifadesi artan bir transkripsiyon faktörüdür ve farklı kanser türlerinde ifade düzeyi değişiklik göstermektedir. Bu çalışmanın amacı farklı meme kanseri ve normal meme epiteli hücrelerinde farklı sürelerde hipoksiya uygulamasının HIF-2 α ifadesinin değişimi üzerinde etkisinin araştırılmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, hipoksiya, HIF-2 α

Analysis of Time-Dependent Alteration of HIF-2 α Expression in Breast Cancer Cells

ABSTRACT

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer type in women and the number of cases observed in Turkey has increased day by day. In many types of cancer including breast cancer, tumor tissues are exposed to oxygen deficiency while growing in areas distant from blood vessels. Against this condition, known as hypoxia, tissues respond via increasing the expression of transcription factors called Hypoxia inducible factor (HIF). By the effect of HIF transcription factors, cancer cells migrate to different tissues and organs by stimulating vascular development. Therefore, it is important to know the change of HIF transcription factors in hypoxia process. HIF-2 α is a transcription factor, which is over expressed during hypoxic conditions and have varies the level of expression in different cancer types. The aim of this study is that to investigate the effect of time dependent hypoxia exposure on HIF-2 α expression in different breast cancer cells and normal breast epithelial cells.

Keywords: Breast cancer, hypoxia, HIF-2 α

GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en çok görülen ve ölüm oranı en yüksek kanser türüdür (Jemal ve ark., 2011). Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de meme kanseri kadınlarda en sık rastlanılan kanser türüdür (Özmen, 2009). Meme kanseri, diğer kanser türlerinde olduğu gibi birçok kompleks moleküler ve epigenetik mekanizmanın etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Sitogenetik ve moleküler genetik çalışmaları meme kanserinin birçok onkogendeki ifade değişimi, tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyon veya ifade kaybının birlikte etkisi ile ortaya çıktığını göstermektedir. (Beckmann ve ark., 1997). Birçok tümörün oluşum ve büyümesi sürecinde, kan damarlarından uzakta kalan tümör dokuları hipoksiya olarak adlandırılan düşük oksijen koşullarına maruz kalırlar (Vaupel ve Mayer, 2007). Tümörler bu durumu anjiyojenik faktörleri ve damar gelişimini uyaracak gen ifadelerini uyararak çözerler (Burroughs ve ark., 2013). Tümörlerin hipoksik koşullara karşı hücrel yanıtı, Hypoxia inducible factor (HIF) olarak adlandırılan transkripsiyon faktörlerinin ifade artışı ile sağlanır (Calzada ve del Peso, 2007).

HIF proteinleri heterodimer yapıda helix-loop-helix PAS (Per-ARNT-Sim) bölgesi içerir ve sürekli olarak ifade edilen β alt ünitesi (HIF- β /ARNT) ile ifadesi oksijen bağımlı olarak kontrol edilen α alt ünitelerinden oluşur. α alt üniteleri (HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α) mRNA seviyesinde sürekli olarak ifade edilir ve translasyonu gerçekleşir (Ke ve Costa, 2006). Ancak sentezlenen proteinlerin ömrü çok kısadır ve bu proteinler özel prolin bölgelerinin oksijen bağımlı hidroksilasyonları aracılığı ile sürekli olarak parçalanırlar (Shah ve ark., 2015). Yapısal ve fonksiyonel benzerlikler gösteren HIF- α alt ünitelerinin farklı dokularda ifade düzeylerinin farklılık gösterdiği düşünülmektedir. HIF-1 α ’nın epitelyal, HIF-2 α ’nın endotelial hücrelerde baskın olarak ifade edildiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. HIF-3 α izoformu ise fazla çalışılmamıştır ancak akciğer alveolar epitel hücrelerinde yüksek ifade edildiği bilinmektedir (Bardos ve Ashcroft, 2005; Ke ve Costa, 2006; Li ve ark., 2006).

HIF-2 α yapısal olarak büyük oranda HIF-1 α ile benzerlik göstermektedir ve hipoksik yanıtın oluşumunda görev aldığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (Hu ve ark., 2003). Meme, rahim ağzı, kolon, baş-boyun, akciğer, lösemi, deri, ovaryum ve prostat kanserlerinde HIF-2 α ifadesinin arttığı farklı çalışmalar ile gösterilmiştir (Keith ve ark., 2011). Zhong ve ark. (1999) çalışmalarında kanser hücrelerinde değişmiş glikoz metabolizması ve hipoksik koşullara karşı geliştirilen hücrel yanıtın kanser tedavisi ve biyolojisinin temelini oluşturduğunu ifade etmiştir. Yapılan birçok çalışmada HIF-2 α ’nın hem tümör

oluşumu hem de metastaz sürecinde aktif rol alan onkogenlerin ifadesinin düzenlenmesinde rol aldığı ve bu durumun kanser çeşidine göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Keith ve ark., 2011). HIF- α izoformlarının kanser tedavisi için gelecek vadeden hedefler olduğu, özellikle kanser kök hücrelerinin gelişim ve büyümelerinin durdurulması için HIF-2 α inhibisyonunun çok önemli olduğu farklı çalışmalarda ifade edilmiştir (Semenza, 2003; Burroughs ve ark., 2013). Bu çalışma kapsamında 2 farklı meme kanseri ve 1 adet normal meme epitel hücrelerinde farklı sürelerde uygulanan hipoksik stresin HIF-2 α ifadesini nasıl etkilediğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Hücre Kültürü ve Hipoksiya Uygulaması

SKBr3 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatları ile HMEC primer insan meme epitel hücreleri American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) temin edildi. Bütün hücre hatları %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ilave edilmiş, 4,5 glukoz, L-glutamin ve sodyum piruvat içeren hazır Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM, Cellgro) ortamında Dükel ve ark. (2016)’da tanımlandığı şekilde kültüre edildi. Bütün hücre grupları %5 CO₂ ve 37 °C’de hücre kültür etüvünde steril şartlarda kültüre edildi. Hipoksiya uygulaması için bütün hücreler %1 O₂, %5 CO₂ ve %94 N₂ ortamında 4, 8, 12, 18, 24 ve 48 saat boyunca 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler toplandı ve analiz için hücre peletleri elde edildi.

RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu TRIzol reaktifi kullanılarak ve üretici firma (Invitrogen, Carlsbad, CA) tarafından sağlanan protokole uygun olarak gerçekleştirildi. 1 ml TRIzol hücre peletinin üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edildi. Örnekler 200 μ l kloroform eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 4°C’de 15 dk. boyunca 12000 rpm’de santrifüj edilerek, tüpün içerisinde en üste kalan şeffaf renkli kısım yeni ependorf tüpüne aktarıldı. 500 μ l izopropanol eklendi, 8 dk. 12000 rpm’de santrifüj edildi, süpernatant kısmı uzaklaştırılarak ve RNA peleti 1 ml %75 etanol ile yıkandı. Pelet üzerine 50 μ l nükleaz içermeyen su eklendi ve 10 dk. boyunca 55 °C’de ısıtıldı. Daha sonra spektrofotometrede 2 μ l RNA/78 μ l dH₂O olacak şekilde sulandırma yapılarak RNA konsantrasyonları belirlendi.

cDNA Sentezi ve Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi

Applied Biosystems High Capacity RNA'dan cDNA'ya kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bütün örnekler için RNA konsantrasyonlarına bağlı olarak en fazla 1 μ g RNA içerecek şekilde reaksiyon kurularak üretici firma tarafından sağlanan protokol takip edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. RT-PCR reaksiyonları için Promega GoTaq Green Master Mix kullanıldı ve RT-PCR reaksiyonu üretici firma tarafından sağlanan kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Her bir analiz için 12.5 μ l GoTaq reaksiyon karışımı, 5 μ l (5 μ M) reverse-forward primer karışımı, 2,5 μ l cDNA ve 5 μ l ddH₂O olmak üzere 25 μ l reaksiyon kuruldu. Kullanılan primerlerin dizileri şu şekildedir: HIF-2 α Forward: 5'-GAACAGCAAGAGCAGGTTCC-3', HIF-2 α Reverse: 5'-AGAGAGTGAAGCTGGTGGGA-3'; CAIX Forward: 5'-GTCTCGCTTGAAGAAATCG-3', CAIX Reverse: 5'-AGAGGGTGTGGAGCTGCTTA-3'; α -aktin Forward: 5'-GCACAGAGCCTCGCCTT-3', α -aktin Reverse: 5'-GTTGTCGACGACGAGCG-3' olmak üzere belirtilen primerler kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulup, etidyum bromür (10 mg/ml) ile boyanarak. ImageQuart 300 (Austin, TX) cihazı ile ultraviyole ışık altında görüntülendi ve jel fotoğrafları çekildi.

İmmünoelot Analizi

İmmünoelot analizi Brown ve ark. (2000)'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Öncelikle kültüre edilmiş hücreler tripsin ile muamele edilerek toplandı ve sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu (125 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA ve %1 SDS) uygulanarak hücreler parçalandı. Hücre ekstratları 5 dk kaynatılıp, 1 dakika süreyle ultrasonik parçalayıcıya maruz bırakıldı ve 5 dk 14000 rpm'de santrifüj edildi. Protein konsantrasyonu bicinchoinic acid assay (BCA) protein testi uygulanarak belirlendi. Elektroforezden önce hücre ekstraktı eşit hacimde SDS tampon çözeltisi (150 mM Tris-HCl, pH 6.8, % 10b-mercaptoethanol, %20 gliserol, %3 SDS, %0.01 bromfenol blue, %0.01 pyronin-Y) eklenerek örnekler seyreltildi ve 2 dakika kaynatıldı. SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi gerçekleştirildi ve daha sonra

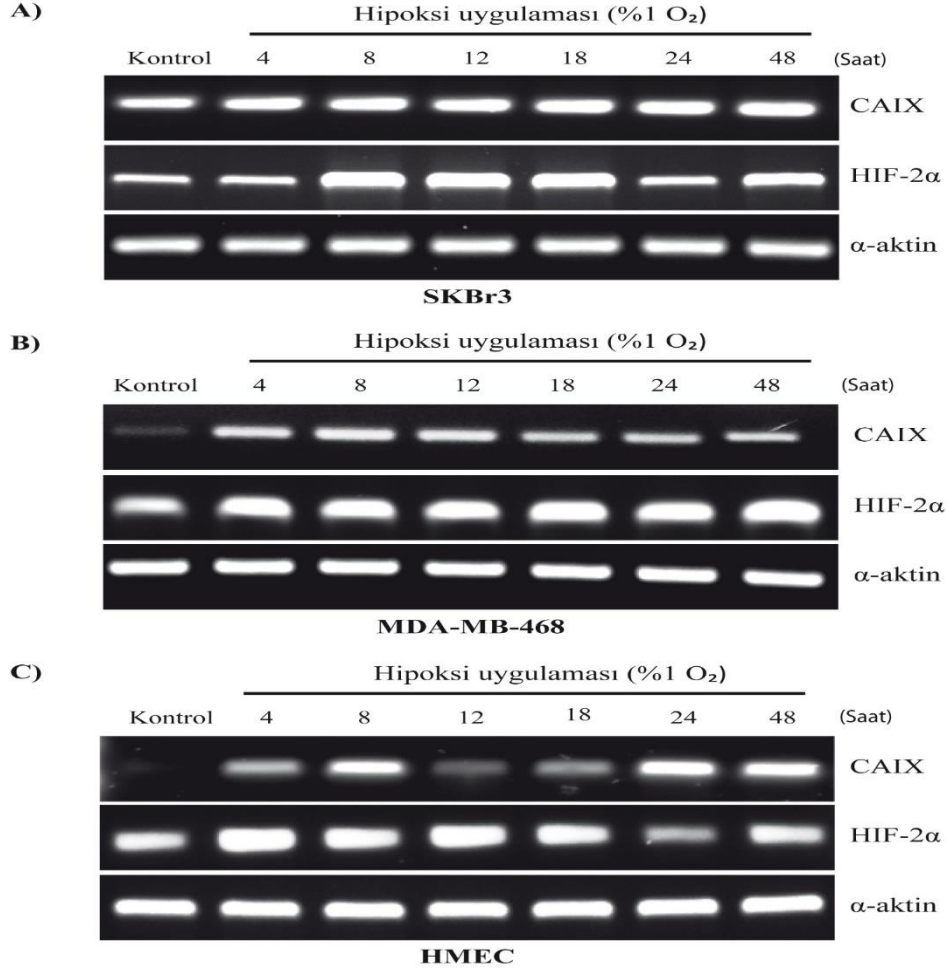
yürütülen protein bantları nitroselüloz membranlara aktarıldı. Nitroselüloz membranlar anti-HIF-2 α (1:1000, NB100-122 Novus), anti α -aktin (1:8000, ab5694 ABCAM) ve Anti-CAIX (1:3000, ab15086 ABCAM) ile inkübe edildi. İkinci antikor (1:5000, 7074 Cell Signaling) ile muameleden sonra proteinlerin varlığı kemilüminesans yöntemi ile belirlenip, X-ray filmine aktarıldı (Brown ve ark., 2000).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Farklı Zamanlı Hipoksiya Uygulamasının HIF-2 α mRNA İfade Değişimine Etkisi

İlk aşamada SKBr3, MDA-MB-468 ve HMEC hücreleri kültüre edildi. Her hücre grubu için 1 adet kontrol grubu normal koşullar altında kültüre edildi. Hipoksi uygulaması bütün hücre gruplarında aynı koşullarda ve 4, 8, 16, 18, 24 ve 48 saat olacak şekilde yapıldı. Hipoksi uygulamasının takibinde, mRNA sentezi için materyal ve yöntem kısmında açıklandığı şekilde total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi gerçekleştirildi. RT-PCR reaksiyonları için primerler dizayn edildi ve sipariş edildi. Çalışma kapsamında kullanılan primerlerin materyal ve yöntem kısmında sunulmuştur. Hipoksik koşulların doğru uygulandığını test etmek için *HIF-2 α* ya ek olarak karbonik anhidraz 9 (*CAIX*) gen ifadesinin değişimi de analiz edilmiştir.

Şekil 1 incelendiğinde α -aktin bantları bütün hücre ve deney gruplarında aynıdır ve sentezlenen mRNA seviyelerinin eşit olduğunu göstermektedir. Meme kanseri ve normal meme epiteli hücrelerinde hipoksi uygulamasının HIF-2 α mRNA ifadesini uyardığı net bir şekilde gözlenmektedir. CAIX ifadesinin yine bütün gruplarda hipoksi uygulamasını takiben yükseldiği görülmektedir. HMEC hücre grubunda hipoksi uygulaması sonrası en yoğun mRNA ifade artışı 4 ve 12 saatlerde gözlenirken (Şekil 1C), MDA-MB-468 hücrelerinde mRNA ifade artışının hipoksi uygulamasını takiben sürekli olarak aynı seviyede kaldığı (Şekil 1B) ve SKBr3 hücrelerinde ise 8, 12 ve 18. saatlerde en yoğun olarak gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 1A).



Şekil 1. Meme kanseri hücrelerinde farklı zamanlı hipoksi uygulamasının HIF-2 α ve CAIX mRNA ifadesi değişimi. α -aktin kontrol olarak kullanılmıştır (deney 3 kez tekrar edilmiştir).

Bobarykina ve ark. (1999) meme kanseri hücreleri SKBr3, MDA-MB468 ve BT549 da hipoksi uygulamasının HIF-2 α mRNA ifadesini düşürdüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmada sadece 18 saatlik hipoksi uygulaması yapılmıştır, farklı zamanlı bir uygulama yapılmamıştır. Çalışmamız da ise bu çalışmada sunulan verilerin aksine hipoksi uygulamasının HIF-2 α mRNA ifadesini hem normal meme epiteli hem de meme kanseri hücrelerinde arttırdığı gözlenmiştir. Hu ve ark. (2003) normal (HUVECs ve HUVEC-Ls) ve transforme olmuş hücreler (HEK293, HepG2, Hep3B) ile yaptığı çalışmasında HIF-1 α mRNA ifadesinin hipoksik koşullarda değişmediğini, HIF-2 α mRNA ifadesinin ise hipoksik koşullarda daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada nöroblastoma hücrelerinde farklı zamanlı hipoksi uygulamasının HIF-2 α mRNA ifadesini uyardığı gösterilmiştir (Hamidian ve ark., 2015). Kemik kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada kanser hücrelerinde, normal hücrelere kıyasla HIF-2 α mRNA seviyesinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Sandlund ve ark., 2009).

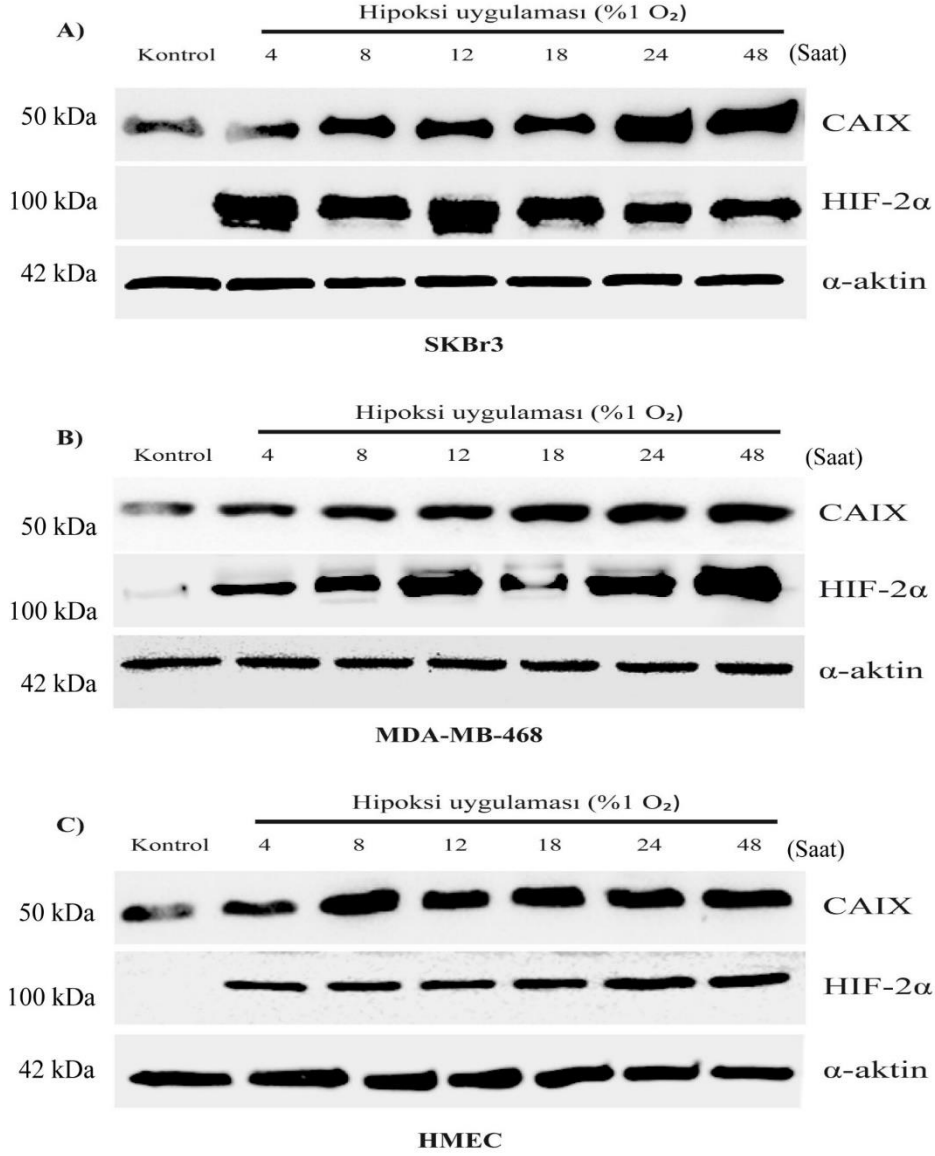
Literatürde sunulan çalışmalar incelendiğinde genel olarak HIF-2 α mRNA ifadesinin hipoksi uygulamasını takiben arttığı belirtilmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen veriler literatür çalışmaları ile uyumludur ve çalışmamız kapsamında farklı zamanlı hipoksi uygulamasının HIF-2 α ve CAIX mRNA ifadesinin değişimi gösterilmiştir.

Hipoksi Uygulamasının HIF-2 α Protein Düzeyine Etkisi

Farklı zamanlı hipoksi uygulamasının mRNA düzeyini nasıl etkilediğini belirledikten sonra ikinci aşamada, protein miktarının nasıl değiştiği analiz edildi. mRNA analizinde olduğu gibi bütün hücreler için normal koşullarda kültüre edilen 1 adet kontrol grubu ve 4, 8, 16, 18, 24 ve 48 hipoksi uygulanmış gruplar oluşturuldu. Protein izolasyonu ve SDS poliakrilamid jel elektroforezini takiben proteinler nitroselüloz membranlar üzerine transfer edildi. Kontrol olarak α -aktin kullanıldı. Görün-

Meme Kanseri Hücrelerinde Zamana Bağlı HIF-2 α İfadesi Değişiminin Analizi

tüler filme aktarıldı ve Adobe Photoshop programı yardımı ile düzenlendi.



Şekil 2. Meme kanseri hücrelerinde farklı zamanlı hipoksi uygulamasının HIF-2 α ve CAIX protein ifadesi değişimi. α -aktin kontrol olarak kullanılmıştır (deney 3 kez tekrar edilmiştir)

İmmüno blot analizi göstermektedir ki farklı zamanlı hipoksi uygulamasının mRNA ve protein ifadesi düzeylerine etkisi farklıdır. Şekil 2 incelendiğinde SKBr3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hipoksi uygulaması HIF-2 α protein seviyesini, normal meme epiteli hücresi HMEC'e kıyasla daha yoğun olarak uyarmıştır. HMEC hücre grubunda HIF-2 α protein ifadesi normal koşullarda belirlenemezken, hipoksi uygulaması sonrası artış göstermiştir (Şekil 2C). Ancak zamansal hipoksi uygulamasına rağmen, HIF-2 α protein seviyesinin HMEC hücre grubunda büyük oranda sabit kaldığı tespit edilmiştir. CAIX protein ifadesi ise bu hücre grubu için 4 saatlik hipoksi uygulaması dışında, uygulanan hipoksi süresinin uzunluğuyla doğru orantılı olarak artış göster-

diği tespit edilmiştir (Şekil 2C). Hem SKBr3 hem de MDA-MB-468 hücre grubunda hipoksi uygulamasının HMEC hücre grubuna kıyasla HIF-2 α protein seviyesini daha yoğun olarak uyardığı görülmüştür (Şekil 2A, 2B ve 2C). CAIX ifadesindeki artışın ise meme kanseri hücre grupları ile normal meme epiteli hücrelerinde hipoksi uygulamasının takibinde benzer olarak ifade artışına uğradığı belirlenmiştir. En yoğun HIF-2 α protein ifadesi SKBr3 hücreleri için 12 saatlik hipoksi uygulaması sonrası, MDA-MB-468 hücre grubunda ise 48 saatlik uygulama sonrası gözlenmiştir (Şekil 2A, B).

Liu ve ark. (2016) HIF-1 α ve HIF-2 α ifade artışının troid kanseri gelişim sürecinde klinik açıdan önemli olduğunu

ve potansiyel biyo belirteç adayı olduğunu ifade etmişlerdir. Wang ve Yuan (2016) HIF-2 α 'nın meme kanseri hücrelerinde CoCl₂ aracılı hücre göçü ve invazyonunu uyardığını göstermişlerdir. Bu iki çalışma HIF-2 α ifadesinin kanser gelişimi sürecindeki önemini işaret etmektedir. Bizde çalışmamızda meme kanserinde farklı zamanlı hipoksi uygulamasının HIF-2 α ifadesini nasıl etkilediğini belirledik. Bu kapsamda hipoksik koşullarda hem mRNA hem de protein düzeyinde ifadesinin hangi sürelerde ne miktarda arttığının bilinmesi önemlidir. Meme kanseri gelişimi sürecinde hipoksik koşullar altına yapılacak in vivo çalışmalar için uygulama sürelerinin belirlenmesi için referans olacaktır. Çalışmamız daha ileriki çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Cavadas ve ark. (2015) MCF7 meme kanseri hücre hattında hipoksi uygulamasının HIF-2 α protein ifadesini değiştirmedini ifade etmiştir. Mide kanseri hastaları ile yapılan bir çalışmada, mide kanseri dokusunda HIF-2 α mRNA ve protein ifadesinin normal dokulardakine kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2015). Diğer bir çalışmada akciğer kanseri hücrelerinde farklı zamanlı hipoksi uygulamasının hem HIF-2 α mRNA hem de protein ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (Uchida ve ark., 2004). Bu çalışma kapsamında SKBr3 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde HIF-2 α protein seviyesinin normal meme epiteli hücresi HMEC'e kıyasla hipoksi koşullarında daha yüksek ifade edildiği gösterilmiştir. Sunulan veriler literatürdeki diğer çalışmaları desteklemektedir ve meme kanseri sürecinde HIF-2 α ifadesinin önemini işaret etmesi bakımından önemlidir.

SONUÇLAR

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde HIF-2 α 'nın kanser gelişimi için önemli olduğu ve birçok kanser türünde ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Meme kanserinde HIF-2 α ifadesinin arttığı bilinmektedir. Ancak farklı hücre hatlarında hipoksiye yanıt elemanları farklı ifade düzeyleri sergileyebilmektedir (Cavadas ve ark., 2015). HIF- α proteinlerinin kanser tedavisi için potansiyel hedefler olduğu bilinmektedir ve bu konuda araştırmalar devam etmektedir (Burroughs ve ark., 2013). Ancak farklı kanser türlerinde HIF- α genlerinin ifadeleri değişiklik göstermektedir (Bobarykina ve ark., 1999; Uchida ve ark., 2004; Liu ve ark., 2016). Ayrıca hipoksiye maruz kalma süresi protein ve mRNA düzeyinde HIF- α genlerini değişik oranlarda etkilemektedir (Cavadas ve ark., 2015). Bu nedenle farklı süreli hipoksi uygulamasının kanser ve normal epitel hücrelerinde HIF- α genlerini nasıl etkilediğinin bilinmesi önemlidir.

Bu çalışma kapsamında; ilk defa iki farklı meme kanseri ve bir normal meme epiteli hücresinde 4, 8, 12, 18, 24 ve 48 saatlik hipoksi uygulamasının HIF-2 α mRNA ve protein ifadesini nasıl etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca kontrol olarak hipoksik koşullarda ifade artışına uğrayan CAIX gen ifadesinin aynı hücre gruplarında değişik zamanlı hipoksi uygulaması sonrası nasıl değiştiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın devamında meme kanseri hastalarında HIF-2 α ifadesinin değişimi analiz edilerek genin potansiyel biyo belirteç özellikleri analiz edilebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 2214-A yurt dışı doktora sırası araştırma bursu ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Bardos, J.I., Ashcroft, M. (2005). Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochimica et Biophysica Acta* 1755(2): 107–120.
- Beckmann, M.W., Niederacher, D., Schnurch, H. G., Gusteron, B. A., Bender, H. G. (1997). Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine* 75(6): 429–439.
- Bobarykina, A.I., Minchenko, D.O., Opentanova, I. L., Kovtun, O.O., Komisarenko, S.V, Esumi, H., Minchenko, O.H. (1999). HIF-1 α , HIF-2 α and VHL mRNA expression in different cell lines during hypoxia. *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal* 78(2): 62–72.
- Brown, K.D., Lataxes, T.A., Shangary, S., Mannino, J.L., Giardina, J.F., Chen, J., Baskaran, R. (2000). Ionizing radiation exposure results in up-regulation of Ku70 via a p53/ataxia-telangiectasia-mutated protein-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 275(9): 6651–6656.
- Burroughs, S.K., Kaluz, S., Wang, D., Wang, K., Van Meir, E.G., Wang, B. (2013). Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics. *Future Medicinal Chemistry* 5(5): 553–572.
- Calzada, M.J., del Peso, L. (2007). Hypoxia-inducible factors and cancer. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 9(5): 278–289.
- Cavadas, M.A. S., Mesnieres, M., Crifo, B., Manresa, M.C., Selfridge, A.C., Scholz, C.C., Taylor, C.T. (2015). REST mediates resolution of HIF-dependent gene expression in prolonged hypoxia. *Scientific Reports* 5(17851): 1-12.
- Dükel, M., Streiffeld, W.S., Tang, T.C.C., Backman, L.R.F., Ai, L., May, W.S., Brown, K.D. (2016). The Breast Cancer Tumor Suppressor TRIM29 Is Expressed via ATM-dependent Signaling in Response to Hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry* 291(41): 21541–21552.
- Hamidian, A., von Stedingk, K., Munksgaard Thoren, M., Mohlin, S., Pahlman, S. (2015). Differential regulation of HIF-1 α and HIF-2 α in neuroblastoma: Estrogen-related receptor alpha (ERR α) regulates HIF2A tran-

- scription and correlates to poor outcome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 461(3): 560–567.
- Hu, C.J., Wang, L.Y., Chodosh, L.A., Keith, B., Simon, M.C. (2003). Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology* 23(24): 9361–9374.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics. *American Cancer Society* 61: 69-90.
- Ke, Q., Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology* 70(5): 1469–1480.
- Keith, B., Johnson, R.S., Simon, M.C. (2011). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nature Reviews Cancer* 12(1): 9–22.
- Li, Q.F., Wang, X.R., Yang, Y.W., Lin, H. (2006). Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3 α expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1 α . *Cell Research* 16(6): 548–558.
- Li, N., Wang, H.X., Qin, C., Wang, X.H., & Han, F.Y. (2015). Relationship between clinicopathological features and HIF-2 α in gastric adenocarcinoma. *Genetics and Molecular Research* 14(1): 1404–1413.
- Liu, Y.M., Ying, S.P., Huang, Y.R., Pan, Y., Chen, W.J., Ni, L.Q., Liang, Y. (2016). Expression of HIF-1 α and HIF-2 α correlates to biological and clinical significance in papillary thyroid carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology* 14: 30.
- Özmen, V. (2009). Breast Cancer in the World and Turkey. *J. Breast Health* 4: 7-12.
- Sandlund, J., Ljungberg, B., Wikstrom, P., Grankvist, K., Lindh, G., Rasmuson, T. (2009). Hypoxia-inducible factor-2 α mRNA expression in human renal cell carcinoma. *Acta Oncologica* 48(6): 909–914.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3(10): 721–732.
- Shah, T., Krishnamachary, B., Wildes, F., Mironchik, Y., Kakad, S.M., Jacob, D., Artemov, D., Bhujwalla, Z.M. (2015). HIF isoforms have divergent effects on invasion, metastasis, metabolism and formation of lipid droplets. *Oncotarget* 6(29): 28104–28119.
- Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M.A., Mounier, R., Couette, S., Clottes, E., Clerici, C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *The Journal of Biological Chemistry* 279(15): 14871–14878.
- Vaupel, P., Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Reviews* 26(2): 225–239.
- Wang, J.-G., Yuan, L. (2016). HIF-2 α /Notch3 pathway mediates CoCl₂-induced migration and invasion in human breast cancer MCF-7 cells. *Acta physiologica Sinica* 68(6): 783–789.
- Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Simons, J.W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Research* 59(22): 5830–5835.
-