

ÖZGÜN ARAŞTIRMA / ORIGINAL ARTICLE

## Akciğer kanseri hücre dizilerinde hipoksi indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) ve paraoksonaz enzim ilişkisinin araştırılması

### *Association of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and paraoxonase enzyme in lung cancer cell lines*

Nedim Karagenc, Duygu Meydanci, Hakan Küçüksayan

#### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada tümör anjiyogenezinde önemli rol oynayan hipoksi indüklenebilir faktör 1 (HIF-1) transkripsiyon faktörünün hipoksik ve normoksik koşullarda paraoksonaz 2 (PON2) ile ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Hipoksiye duyarlı bir transkripsiyon faktör olan HIF-1 $\alpha$  çok sayıda genin transkripsiyonunu sağlayarak anjiyogenez ve metastazın başlamasına yol açar. Hipoksinin yanı sıra lipopolisakkarit (LPS) gibi çeşitli inflamatuvar ajanlar da HIF-1  $\alpha$ 'nın ve PON2 nin ekspresyonunu düzenleyebilirler. Oksidatif stres karsinogenezde önemli etiyolojik faktörlerden birisidir. Paraoksonaz ailesi üyelerinden paraoksonaz 2 (PON2) nin hücre içi antioksidan olarak görev yaptığı bilinmektedir.

**Yöntemler:** H1299, A549 ve PC14 akciğer hücre dizileri normoksi ve hipoksi ortamlarında kültürü yapılarak ve lipopolisakkaritle indüklenerek HIF-1 ve PON2 mRNA ekspresyonları ve western blot tayinleri çalışılmıştır.

**Bulgular:** Çalışma sonucunda LPS uygulamasının HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunu uyardığı ve hipoksi koşullarında akciğer hücre dizilerinde PON2 ekspresyonunun arttığı gözlemlendi.

**Sonuç:** Bu çalışmada PON 2 enzim ekspresyonunun HIF-1 $\alpha$  aracılığıyla hipoksi ve normoksi koşullarında regüle edildiği gözlenmiş olup hipoksi, inflamasyon ve hücrenin oksidatif durumu arasındaki ilişkinin aydınlatılması için ileri çalışmalar gerekebilir.

**Anahtar kelimeler:** HIF-1 $\alpha$ , PON2, LPS, Hipoksi

#### ABSTRACT

**Objective:** In this study, it was aimed to investigate that PON2, in hypoxia and normoxia in relation to HIF-1 $\alpha$  transcription factor that has a role in tumour angiogenesis. Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) is a transcription factor which is sensitive to hypoxia, causes initiation of angiogenesis and metastasis by providing transcription of numerous genes. As well as hypoxia several inflammatory agents such as lipopolysaccharide (LPS) can regulate the expression of HIF-1 $\alpha$  as well as PON2. Oxidative stress is known to have role in cancer. Paraoxonase 2 which is one of the members of paraoxonase family serves as intracellular anti-oxidant.

**Methods:** H1299, A549 ve PC14 non-small cell lung carcinoma cell lines used in this study. Cells were cultured under hypoxia and normoxia conditions with LPS stimulation. HIF-1 $\alpha$  and PON2 mRNA expression levels measured by real-time PCR. Western blot studies were performed for protein expression.

**Results:** In this study, it was observed that LPS treatment stimulates HIF-1 $\alpha$  expression which increases PON2 expression in NSCLC cell line in under hypoxia conditions.

**Conclusion:** This study shows that PON2 is regulated by HIF-1 $\alpha$  in hypoxia and inflammation. The relationship between hypoxia and inflammation and oxidative status of cells requires further studies.

**Key words:** HIF-1 $\alpha$ , PON2, LPS, Hypoxia

#### GİRİŞ

Bu çalışmada akciğer kanseri hücre hatları kullanılarak, tümör anjiyogenezinde önemli bir rol oynayan

yan hipoksi indüklenebilir faktör 1 transkripsiyon faktörünün (HIF-1 $\alpha$ ) hipoksik ve normoksik koşullarda PON 2 enzimiyle ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya AD Denizli, Türkiye

**Yazışma Adresi /Correspondence:** Nedim Karagenc,

Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya AD Denizli, Türkiye Email: nkaragenc@pau.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 16.08.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 18.09.2015

Copyright © Dicle Tıp Dergisi 2015, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Hipoksi ya da oksijen seviyesinin azalması hücresel düzeyde çok sayıda değişikliğin oluşmasıyla sonuçlanır. Hipoksi, embriyonik gelişim gibi doğal fizyolojik süreçlerde oluşmasının yanı sıra inflamasyon, solid tümör oluşumu gibi patofizyolojik durumlarda da ortaya çıkar [1]. HIF-1 $\alpha$  aracılı yollar metabolik adaptasyonu, eritropoezisi, anjiyogenezi, vasküler tonusu, hücre büyümesi ve farklılaşmayı, sağkalımı ve apoptozu etkiler [2]. HIF- $\alpha$  alt üniteleri oksijene duyarlıdır ve normoksi koşullarında çok kısa ömürlüdür. HIF-1 $\alpha$  metabolizma, otofaji, apoptoz, anjiyogenez ve hücre proliferasyonu gibi süreçlerde rol alan çok sayıda hedef geni düzenler [3,4].

Birçok kanser tipinde anormal bir HIF-1 $\alpha$  aktivitesi görülür. Hipoksik tümörler aşırı derecede metastatik ve tedaviye karşı dirençlidirler[5,6]. Hipoksiye ek olarak çok sayıda onkogenik ve inflamatuvar stimülasyon, HIF-1 $\alpha$  toplanmasını ve aktivasyonunu upregüle eder [7,8]. İmmün yanıtın aktivasyonunda HIF-1 $\alpha$ 'in önemli bir rolü olduğu önerilmiştir [9]. Sang ve ark. [10] yaptıkları bir çalışmada HIF-1 aktivitesinin yükselirken kullandığı yolağın fosforilasyonunu, monosit ve makrofajlarda, bakteriyel lipopoliasakkaritin (LPS) güçlü bir şekilde indüklediği gözlenmiştir [11]. Lipopoliasakkaritler bakterilerde endotoksik dış membran olup, fagositler üzerindeki TLR-4 ile etkileşmekte ve sistemik dolaşıma salınan IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$  inflamatuvar sitokinlerinin üretimini teşvik etmekte ve inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS/RNS) HIF-1 $\alpha$  regülasyonunun stabilitesinde ve normoksi sürecinde HIF-1 transaktivasyonunda rol oynadığını göstermiştir. Bazı çalışmalar ROS ekspresyonunun hipokside arttığını gösterirken bazıları azaldığını göstermiştir. Hipokside artan HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun mitokondriyal aktiviteye [12] ve belirli bir şekilde ROS oluşumuna katkıda bulunduğu bulunmuştur [13,14]. Ancak HIF-1 $\alpha$ 'da azalış görülürken ROS'da artış görülen çalışmalar da mevcuttur [15,16].

PON2 hücre içi bir enzimdir ve karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, plasenta, mide, testis, dalak, pankreas, ince bağırsak, iskelet kası, arteriyel duvar hücresi ve makrofajlar gibi birçok dokuda ekspres edilir [17]. PON ailesinin coroner kalp hastalığı, diyabet, osteoporosis, epilepsi gibi birçok patolojik

durumla ilişkisi gösterilmiştir [18,19]. Elkıran ve arkadaşlarının [20] çalışmasında, serum PON1 aktivitesinin akciğer kanserli hastalarda sağlıklı kişilerden anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Benzer bir vaka-kontrol çalışmasında Lee ve arkadaşları [21] PON1 geni Q/Q genotipini taşıyan 177 hastada akciğer kanseri gelişme riskinin anlamlı olarak artmış olduğunu göstermiştir.

PON2 ekspresyonu ve enzimatik aktivitesinin oksidatif stres süresince farklı hücre tiplerinde, hayvan modellerinde ve hiperkolestrolemik hastalarda arttığı gösterilmiştir [22,23]. Çeşitli çalışmalar insan monosit kökenli makrofajlarda farmasötik bileşiklere yanıt olarak PON2 ekspresyonunda artış gözlemlerken [23], LPS gibi proinflamatuvar ajanların insan bağırsak Caco-2/15 hücrelerinde PON2 ekspresyonunu düşürdüğünü göstermiştir [24]. PON2 over ekspres edilmiş Hela hücrelerinin hidrojen peroksida ya da okside fosfolipitlere maruziyetinin, ROS seviyelerini azaltarak intraselüler oksidatif stresi düşürdüğü, LDL lipit peroksidasyonunu önlediği, hafif okside LDL (MM-LDL) oksidasyonunu geri çevirdiğini ve MM-LDL'nin monosit kemotaksisini indüklemeye yeteneğini inhibe ettiği gözlemlenmiştir [17]. Bu çalışmada küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre dizilerinde HIF-1 $\alpha$  ve PON2 ekspresyonları arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

### Hücreler ve Hücre Kültürü

İnsan küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre dizileri olan H1299, A549 ve PC14 RPMI 1640 ve DMEM besi ortamlarında kültüre edildikten sonra kontrol, LPS, hipoksi ve LPS + hipoksi olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. 24 saat normoksi koşullarında hücreler kültüre edildikten sonra serum içermeyen besi ortamına ekilip normal doku kültür şartlarında 24 saat inkübe edilmişlerdir. Kontrol grubuna hiçbir muamele yapılmazken her hücre dizisi için LPS uygulaması yapılmıştır. Kontrol ve LPS grupları dört saat normal doku kültür şartlarında inkübe edilirken hipoksi ve LPS+hipoksi olarak ayrılmış gruplar modüler inkübatör chamber içersinde öncelikle 7 dakika süreyle %1 O<sub>2</sub> %5 CO<sub>2</sub> ve %94 N<sub>2</sub> karışımı gaza maruz bırakılmıştır. Hücreler normal doku kültür şartlarında 4 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda

protein izolasyonu ve western blot analizleri yapılmıştır.

Bu projede insan küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) hücre hatları olan H1299, A549 ve PC14 kullanılmıştır. Bu hücreler; PC 14 EGFR mutasyonu, A549 KRAS mutasyonu, H1299 p53 mutasyonu olmak üzere farklı mutasyonlara sahiptir.

A549 hücreleri %10 Fetal Bovine Serum ve % 0,5'lik penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi ortamında, H1299 ve PC14 ise %10 Fetal Bovine Serum ve % 0,5'lik penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besi ortamında inkübe edilmişlerdir. Bu hücreler 37°C'de %1, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 N<sub>2</sub> oranlarındaki gaz karışımı ile inkübatör chamber'da hipoksi ortamına maruz bırakıldı. Ayrıca normoksik kontrol grupları da 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında inkübe edilmiştir.

### LPS Uygulaması

1 mg/ml olan ana stoktan 100 µl alınıp serum fizyolojik ile 1000ml'ye tamamlanarak elde edilen ara stok LPS'den 10 µl alınıp her hücre hattı için petrilere muamele edilir ve inkübatörde 4 saat inkübe edilir. RT-PCR'da kullanılan 6 kuyucuklu plaklar için uygulanan LPS miktarı 2 µl'dir.

### Protein İzolasyonu ve tayini

Protein izolasyonu yapmadan önce hücreler %80 yoğunlukta iken 4 saat hipoksiye maruz bırakıldı ve LPS uygulaması yapıldı ve hücreler -80°C'de tutuldu. Protein tayini Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı.

### RNA izolasyonu ve cDNA elde etme

Hipoksi ve normoksi koşulları sonrasında hücreler trizol ile muamele edilerek RNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen RNA lardan cDNA elde etmek için abml kiti kullanılmıştır. Reaksiyon, termal cycler cihazında 42°C'de 50 dakika, 95°C'de 5 dakika reaksiyon sonrası örnekler -20°C'de saklandı.

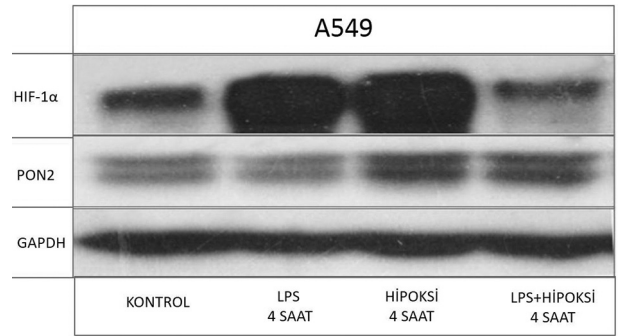
### Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Çalışması

Taqman prob kullanılarak yapılmıştır. Örnekler 96 kuyucuklu plaklara 2'şer tekrarlı olarak koyulmuştur. Reaksiyon 20 µl hacminde ve her örnek ve gen

için çift tekrarlı olarak hazırlandı. Her bir tüpteki reaksiyon; 10 µl TaqMan® Universal Master Mix II'dan, 8 µl RNAz içermeyen H<sub>2</sub>O'dan, 1 µl taqman prob ve primer karışımından ve 1 µl cDNA'dan eklenerek hazırlandı. Reaksiyon üretici firma tarafından önerilen 95°C'de 10 dk ön denatürasyon, 40 döngü olmak üzere 95°C'de 15 sn, 60 0C'de 1 dk reaksiyon koşullarında StepOnePlus™ Real-Time PCR System cihazında gerçekleştirildi.

### BULGULAR

A549 hücre hattı; kontrol, LPS, hipoksi ve LPS+hipoksi olmak üzere dört gruba ayrılmıştır ve western sonrası görüntüler elde edildi (Şekil 1). Buna göre kontrole göre ayrı ayrı 4 saat LPS ve hipoksi uygulanan gruplarda HIF-1α ekspresyonunda artış gözlenmiştir. LPS ve hipoksi birlikte uygulandığında ise ekspresyon seviyesinde düşüş görüldü.



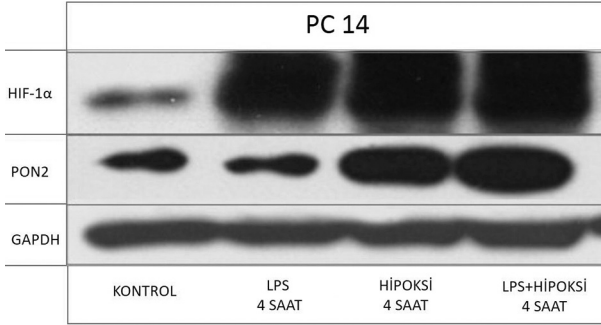
Şekil 1. A549 hücre hatlarında PON2 ve HIF-1α protein ekspresyon tayini

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

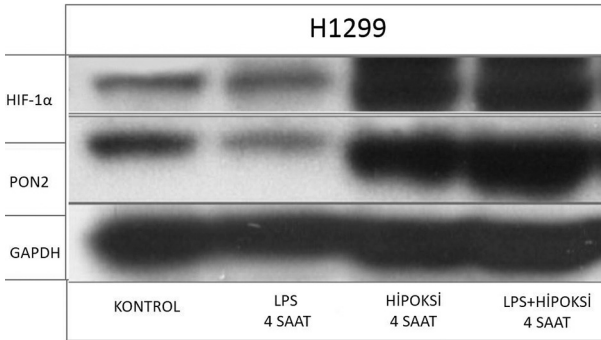
PC14 hücre hattı da dört gruba ayrılmış ve kontrole göre her grupta HIF-1α ekspresyonunda belirgin bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 2). Aynı hücre hattında PON2 ekspresyonu için kontrole göre LPS'de kısmi bir azalış gözlemlendi, ancak LPS'li grubun GAPDH'i de benzer görüntüye sahip olduğundan yüklenen proteinle ilişkili olarak bu görüntünün elde edildiği düşünülmektedir. Hipoksi ve LPS+hipoksi olan gruplarda da PON2 ekspresyonunda belirgin artış gözlemlendi.

H1299 hücre hatlarında PON2 ve HIF-1α protein ekspresyonlarında kontrole göre LPS muamelesi olan grupta anlamlı bir değişim gözlenmezken hipoksi ve LPS+hipoksi gruplarında HIF-1α eks-

presyonunda belirgin bir artış görüldü (şekil 3). PON2 ekspresyonlarına bakıldığında ise kontrole göre LPS'de düşüş, hipoksi ve LPS+hipoksi gruplarda belirgin artış gözlemlendi.



**Şekil 2.** PC 14 hücre hatlarında PON2 ve HIF-1α protein ekspresyon tayini



**Şekil 3.** H1299 hücre hatlarında PON2 ve HIF-1α protein ekspresyon tayini

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

RNA izolasyonu ve cDNA çalışması yapıldıktan sonra her hücre hattının tüm grupları için RT-PCR

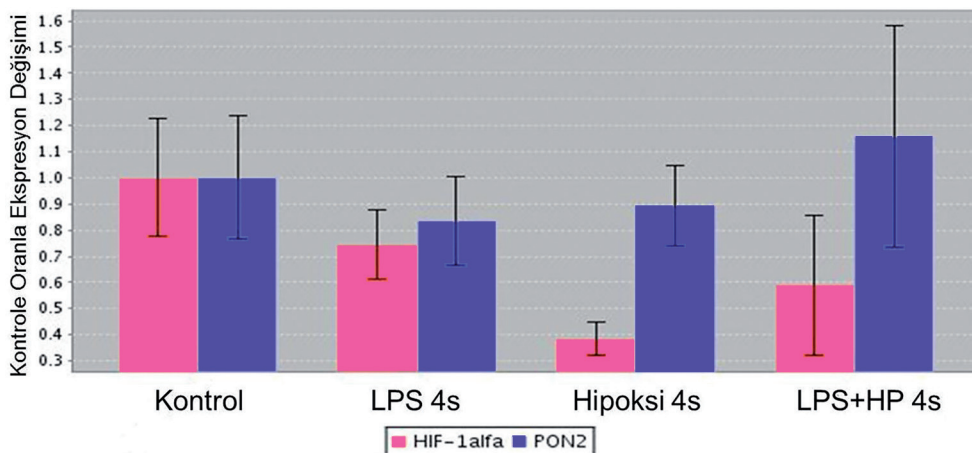
çalışması yapıldı. Her hücre hattı için western blot çalışmasında olduğu gibi dörder grup oluşturulmuş ve her grupta ikişer tekrarlı olarak HIF-1α ve PON2 gen ekspresyonları araştırıldı. Buna göre LPS muamelesi yapılmış grubun HIF-1α mRNA ekspresyon seviyelerinde bir artış gözlenmedi. 4 saat hipoksi uygulanan grupta HIF-1α ekspresyon seviyelerinde düşüş gözlemlendi. 4 saat LPS+Hipoksi uygulaması yapılan grupta ise yalnızca hipoksi uygulanmış gruba kıyasla HIF-1α ekspresyon seviyelerinde bir artış gözlemlendi (Şekil 4).

A549 hücre hattı için her grupta PON2 mRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında LPS ve hipoksi gruplarında ayrı ayrı kontrole göre bir artış gözlenmezken LPS+hipoksi birlikte uygulandığında PON2 ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlendi.

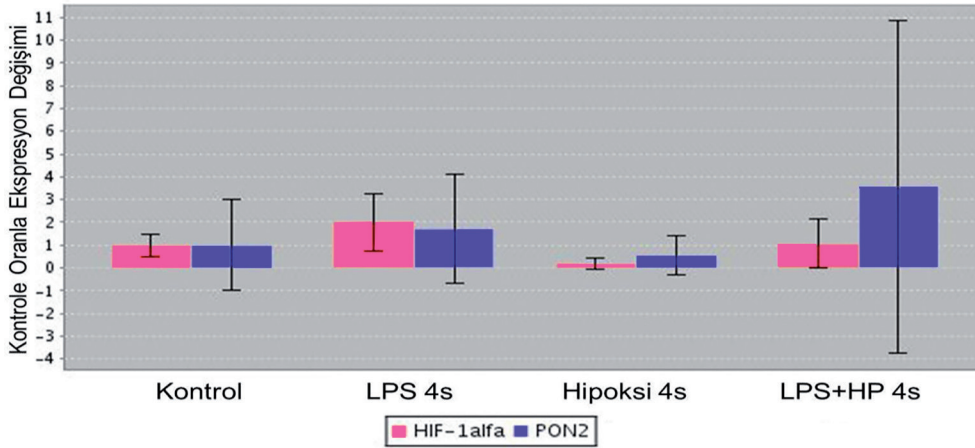
PC14 hücre hatlarında her grup için HIF-1α mRNA ekspresyonuna bakıldığında LPS uygulanan grupta kontrole göre HIF-1α ekspresyonunda artış gözlenirken hipoksi olan grupta HIF-1α ekspresyon seviyelerinde belirgin bir düşüş gözlemlendi. LPS ve hipoksinin birlikte uygulandığı grupta yalnızca hipoksi uygulanan gruba göre artış gözlemlendi (Şekil 5).

Her grupta PON2 mRNA ekspresyonlarına bakıldığında kontrole göre LPS ve LPS+hipoksi olan gruplarda belirgin bir artış gözlenirken hipoksi koşullarında PON2 ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi.

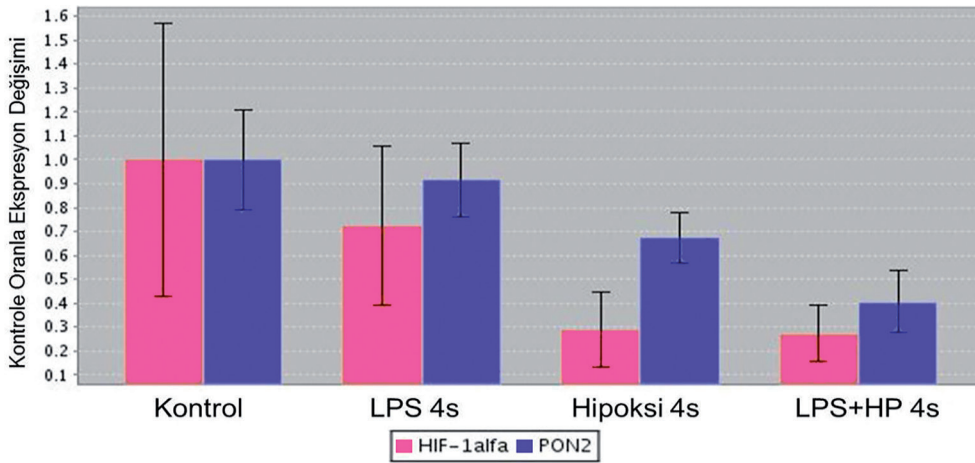
H1299 hücre dizilerinde HIF-1α ve PON2 mRNA ekspresyonlarında hipoksi ve LPS uygulamasıyla düşüş göstermiş olup bu düşüş her ikisinin birlikte uygulandığı grupta artış gösterdi (Şekil 6).



**Şekil 4.** A549 hücre dizilerinde HIF-1α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile gösterimi



**Şekil 5.** PC14 hücre dizilerinde HIF-1α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile gösterimi



**Şekil 6.** H1299 hücre dizilerinde HIF-1α ve PON2 mRNA ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile gösterimi

## TARTIŞMA

Bu çalışmamızda yapılan western blot deneylerinde LPS'nin, 4 saat maruziyet sonrası küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre hatları olan PC14 ve A549'da HIF-1α protein seviyelerini arttırdığı gözlemlenmiştir. Frede ve arkadaşları [23], yaptığı çalışmada insan monositik hücre hatları THP-1 ve Mono-Mac6'da 4 saat LPS maruziyeti sonrası HIF-1α ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Blouin ve arkadaşlarının [26] makrofaj kökenli hücre hatları ile yaptığı bir başka çalışmada ise LPS stimülasyonu sonrası HIF-1α mRNA ve protein seviyelerinin arttığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda HIF-1α protein seviyelerinde hipoksi maruziyeti sonrası belirgin artış gözlenirken mRNA seviyelerinde aynı belirgin artış gözlenmemiştir. Li ve arkadaşlarının [27] A549 hücre hatları ile yaptıkları çalışmada HIF-1α mRNA seviyelerinin 4.saat hipoksiden sonra düştüğünü gözlem-

lemiştirler. Protein seviyelerinin araştırılması için yapılan western blot deneyi sonucunda ise 4 saat hipokside, HIF-1α ekspresyonunda çalışmamıza benzer şekilde artış bulunmuştur. Poitz ve arkadaşlarının [28] makrofajlarla yaptığı başka bir çalışmada ise çalışmamıza benzer şekilde hipoksi süresince HIF-1α mRNA seviyelerinin düştüğünü göstermişlerdir. Aynı çalışmada HIF-1α protein seviyeleri çalışmamızda da görüldüğü üzere 4.saatte belirgin şekilde artmıştır.

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

LPS gibi proinflatuar ajanların insan bağırsak Caco-2/15 hücrelerinde PON2 mRNA ekspresyonunu düşerken protein miktarlarında artış olduğunu göstermiştir [24]. Çalışmamızda 4 saat LPS uygulanan KHDAK hücre hatlarında PON2 protein

seviyelerinde artış gözlemlenmemiştir. Hipoksi maruziyeti ile birlikte LPS uygulandığında ise protein seviyelerinde anlamlı artışlar gözlemlenmiştir.

LPS ve hipoksi koşulları hücrelerde oksidatif strese yol açar. Hipoksi olarak tanımlanan oksijen azlığı artmış reaktif oksijen türleri oluşumuyla ilişkilidir.[29]. Hipoksi koşulları altında reaktif oksijen türlerinin aşırı oluşumu, hücre hasarı ve fonksiyon bozukluğuyla sonuçlanabilir. Ek olarak ROS redoks sensitif sinyal yollarını aktive ederek NF- $\kappa$ B ve MAPKlarla olduğu gibi ikincil haberci gibi davranabilir [30].

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

Feingold ve arkadaşlarının [31] yaptığı çalışmada benzer şekilde 4 saat LPS muamelesi ile PON2 mRNA seviyelerinin düştüğünü göstermişlerdir. Precourt ve arkadaşları [24] Caco-2/15 hücre bağırsak hattında demir-askorbat aracılı oluşturulan lipid peroksidasyonunun malondialdehit (MDA) düzeylerini arttırdığını ve PON ekspresyonunu azalttığını, ek olarak PON3 protein miktarı değişmeden PON2 miktarının azaldığını göstermişlerdir. Bu hücrelerin troloks gibi güçlü antioksidanlarla pre-inkübasyonu PON ekspresyonlarındaki azalmayı durdurur. LPS aynı hücre hattında PON1 ve PON3 mRNA ekspresyonunu konsantrasyon bağımlı olarak azaltırken PON2 gen ekspresyon miktarını artırır. PON2 proteinindeki LPS aracılı artış E.Coli aracılı bağırsak inflamasyonlarında bağırsak hücrelerine koruyucu bir etki sunabilir. Aynı çalışmada LPS'nin I- $\kappa$ B miktarını azalttığı, NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B oranını ve TNF- $\alpha$ 'yı arttırdığı dolayısıyla NF- $\kappa$ B'nin serbest kalarak nükleusa geçmesi ve hedef genleri uyarması ya da durdurmasına sebep olur [32].

Bu çalışma gösteriyor ki LPS ile oluşturulan inflamatuvar yanıtta PON2 protein ekspresyonu NF- $\kappa$ B üzerinden düzenleniyor olabilir.

NF- $\kappa$ B ve I- $\kappa$ B mRNA ekspresyonlarının ve protein düzeylerinin LPS uygulanmış farelerde (Balb/c) arttığı gösterilmiştir [33]. Bu çalışmamızda akciğer kanseri hücre hatlarında hipoksi ve LPS uygulamasının HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu ve PON2 ekspresyonu araştırılmış ve HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu hem LPS hem hipoksi koşullarında artarken PON2 ekspresyonundaki artış yalnızca hipoksi koşullarında gözlenmiştir.

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

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

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

## KAYNAKLAR

1. Lou JJ, Chua YL, Chew EH, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein synthesis by DNA damage inducing agents. *PLoS One* 2010;5: e10522.
2. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:293-299.
3. Kim J-W, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3:177-185.
4. Tracy K, Dibling BC, Spike BT, et al. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* 2007;27:6229-6242.
5. Liu L, Ning X, Sun L, Zhang H, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci* 2008;99:121-128.
6. Airley RE, Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 2007;53:233-256.

7. Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, et al. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 $\alpha$  by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* 2003;14:3470-3481.
8. El Awad B, Kreft B, Wolber EM, et al. Hypoxia and interleukin-1 $\beta$  stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int* 2000;58:43-50.
9. Peyssonaux C, Johnson RS. An unexpected role for hypoxic response: oxygenation and inflammation. *Cell Cycle* 2004;3:168-171.
10. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem* 2003;278:14013-14019.
11. Van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, Sweder van Asbeck, B. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor  $\alpha$  production by human monocytes involves the Raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun* 1999;67, 3824-3829.
12. Agani FHP, Pichiule JC, Chavez, LaManna JC. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J Biol Chem* 2000;275:35863-35867.
13. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem* 2000;275:25130-25138.
14. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 2005;1:401-408.
15. Callapina M, Zhou J, Schmid T, Kohl R, Brune B. NO restores HIF-1- hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2005;39:925-936.
16. Wartenberg MF, Ling C, Muschen M, et al. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J* 2003;17:503-505.
17. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, et al. Paraonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;276:44444-44449.
18. Çevik M.U, Varol S, Yücel Y, ve ark. Serum paraoxonase-1 activities and malondialdehyde levels in patients with epilepsy. *Dicle Med J* 2012;3:557-560.
19. Çavdaroğlu B, Köse N, Başkol G, Demir H. Evaluation of protein and lipid oxidative stress in the patients with postmenopausal osteoporosis. *Dicle Med J* 2014;41:71-77.
20. Elkiran ET, Mar N, Aygen B, et al. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer* 2007;7:48.
21. Lee CH, Lee KY, Choe KH, et al. Effects of oxidative DNA damage induced by polycyclic aromatic hydrocarbons and genetic polymorphism of the paraoxonase-1 (PON1) gene on lung cancer. *J Prev Med Pub Health* 2005;38:345-350.
22. Shih DM, Gu L, Hama S, et al. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 1996;97:1630-1639.
23. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, et al. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:468-474.
24. Precourt LP, Seidman E, Delvin E, et al. Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1628-1637.
25. Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandery J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- $\kappa$ B. *Biochem J* 2006;396:517-527.
26. Blouin CC, Page EL, Soucy GM, Richard DE. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Blood* 2004;103:1124-1130.
27. Li Q F, Wang XR, Yang J, Lin H. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1 $\alpha$ . *Cell Research* 2006;16:548-558.
28. Poitz DM, Augstein A, Hesse K, et al. Regulation of the HIF-system in human macrophages – Differential regulation of HIF- $\alpha$  subunits under sustained hypoxia. *Molecul Immunol* 2014;57:226-235.
29. Behn C, Araneda OF, Llanos AJ, et al. Hypoxia-related lipid peroxidation: evidences, implications and approaches. *Respir Physiol Neurobiol* 2007;30:158:143-150.
30. Ji LL, Gómez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2006;1067:425-435.
31. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998;139:307-315.
32. Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, et al. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 2000;22;103:1071-1083.
33. Gao XJ, Guo MY, Zhang ZC, et al. Bergein Plays an Anti-Inflammatory Role via the Modulation of MAPK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in a Mouse Model of LPS-Induced Mastitis. *Inflammation* 2015;38:1142-1150.