

Hipoksi ve Kanser

Sümeyye Aydoğan Türkoğlu^{1*}, Fatma Poyrazlı², Derya Okuyan³, Feray Köçkar¹

¹Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, Türkiye

²Biyoloji Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, Türkiye

³Laborant ve Veteriner Sağlık Pr., Susurluk Meslek Yüksekokulu, Bandırma Onyedi Eylül Üniversitesi, Bandırma, Türkiye

Makale Tarihiçesi

Gönderim: 02.05.2021

Kabul: 18.08.2021

Yayın: 20.09.2021

Derleme Makale

Öz – Dokudaki gerekli oksijen seviyesinin normal değerinin altına düşmesi hipoksi olarak tanımlanır. Hipoksi katı tümörlerde sık karşılaşılan bir durumdur. Tümör hücreleri yeterli oksijen alamadığında hücre ölümüne gitmeden önce genetik farklılıklar oluşturarak hipoksik duruma adapte olmaktadır. Bazı tümörlerde radyo veya kemoterapötik tedavi direncinin gelişiminde hipoksinin rol oynadığı gösterilmiştir. Birçok klinik çalışma sonucunda tümörün hipoksik olduğu ve hipoksik durumun yükselmesiyle de tümör çapının arttığı gösterilmiştir. Hipoksik hale gelen tümör hücrelerinin, hücre ölüm sinyallerine ve apoptoza karşı duyarlılığının azalması sonucu bölgesel ve sistemik olarak agresif olabilmektedir. Ayrıca hipoksi; tümör proliferasyonu, anjiyogenez ve sistemik metastaz sinyalizasyonunu arttırabilmektedir. Hücrelerdeki hipoksinin moleküler mekanizmasından sorumlu temel protein ailesi HIF (Hipoksi ile İndükelenebilir Faktör) dir. Bugüne kadar, insan hücrelerinde düşük oksijen seviyelerine yanıt olarak üç HIF protein ailesi üyesi tespit edilmiştir. HIF-1, HIF-2 ve HIF-3 olarak isimlendirilen bu heterodimerlerin her birisi, normoksik koşullarda ayrışan α alt birim ve β alt birimden oluşan proteinlerdir. HIF ailesi üyeleri glikoz alımı ve metabolizması, eritropoez, anjiyogenez, hücre proliferasyonu ve apoptoz dahil üzere birçok hücrenel süreçte yer alan genlerin ifadesini düzenleyerek hem oksijen dağıtımını hem de oksijen yoksunluğuna adaptasyonu kolaylaştırır. Bu derleme, HIF' in moleküler çalışma mekanizmasını, hipoksinin biyolojik fonksiyonlarını ve hücre kültürü laboratuvarlarında kullanılan farklı hipoksi modellerini özetlemektedir.

Anahtar Kelimeler – Deneysel hipoksi, HIF, Hipoksi, Kanser, Kimyasal hipoksi

Hypoxia and Cancer

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, University of Balıkesir, Balıkesir, Turkey

²Department of Biology, Faculty of Science, University of Balıkesir, Balıkesir, Turkey

³Veterinary Sciences Pr., Susurluk Vocational School, Onyedi Eylül University, Bandırma, Turkey

Article History

Received: 02.05.2021

Accepted: 18.08.2021

Published: 20.09.2021

Review Article

Abstract – A decrease in the required oxygen level in the tissue below the normal value is defined as hypoxia. Hypoxia is a common condition in solid tumors. When tumor cells can not get enough oxygen, they adapt to the hypoxic state by creating genetic differences before going to cell death. Hypoxia has been shown to play a role in developing radio or chemotherapeutic treatment resistance in some tumors. As a result of many clinical studies, it has been demonstrated that the tumor is hypoxic, and the diameter of the tumor increases with a hypoxic state. As a result of the decreased sensitivity of tumor cells to cell death signals and apoptosis, tumor cells can become regionally and systemically aggressive. Also, hypoxia can increase tumor proliferation, angiogenesis, and systemic metastasis signaling. The main protein family responsible for the molecular mechanism of hypoxia in cells is HIF (Hypoxia Inducible Factor). To date, three HIF family members have been identified in response to low oxygen levels in human cells. Named as HIF-1, HIF-2 and HIF-3, each of these heterodimers consists of α subunit and β subunit decomposing under normoxic conditions. Members of the HIF family facilitate both oxygen delivery and adaptation to oxygen deprivation by regulating the expression of genes involved in many cellular processes, including glucose uptake and metabolism, erythropoiesis, angiogenesis, cell proliferation, and apoptosis. This review summarizes the molecular working mechanism of HIF, the biological functions of hypoxia, and different hypoxia models used in cell culture laboratories.

Keywords – Cancer, Chemical hypoxia, Experimental hypoxia, HIF, Hypoxia

¹ saydogan@balikesir.edu.tr

² fpoyrazli@baun.edu.tr

³ dokuyan@bandirma.edu.tr

⁴ fkoçkar@balikesir.edu.tr

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

1. Giriş

Oksijen, aerobik hücrelerin enerji metabolizmasında önemli bir faktördür. Çoğu anabolik süreç, sinyal yolları ve enzimatik reaksiyonlar, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ve glikolizden üretilen ATP' ye ihtiyaç duyar. Hücreler, hücrel oksijen tedarikini sınırlayan farklı koşullara maruz kaldıklarında, oksidatif metabolizma tehlikeye girer ve ATP' ye bağlı süreçleri etkiler (Mungai, Waypa, Jairaman, Prakriya, Dokic vd., 2011; Wang, Jang, Rue ve Semenza 1995). Dokudaki gerekli oksijen seviyesinin normal değerinin altına düşmesi hipoksi olarak adlandırılır (Selvendiran, Bratasz, Kuppusamy, Tazi, Rivera vd., 2009).

Hipoksi katı tümörlerde sık karşılaşılan bir durumdur. Tümör hücreleri yeterli oksijen alamadığında hücre ölümüne gitmeden önce genetik farklılıklar oluşturarak hipoksik duruma adapte olmaktadır (Çekin, 2007). Bazı tümörlerde radyo veya kemoterapötik tedavi direncinin gelişiminde hipoksinin rol oynadığı gösterilmiştir. Birçok klinik çalışma sonucunda tümörün hipoksik olduğu ve hipoksinin yükselmesiyle de tümör çapının arttığı gösterilmiştir. Apoptoz programlanmış bir hücre ölüm mekanizmasıdır ve zararlı olan hücreleri ortadan kaldırmaktadır. Bu mekanizma birçok dokunun düzgün gelişiminde rol oynamaktadır ayrıca yetişkinlerde organ fonksiyonlarının gelişimi için kritik bir göreve sahiptir. Apoptoz çoğunlukla birçok hücre içi ve hücre dışı sinyal molekülleri vasıtasıyla ya da fizyolojik ve patolojik indükleyiciler aracılığıyla başlayabilmektedir. Hücreler yoğun hipoksi altında ya da anoksi (oksijen eksikliği) sırasında mutasyona uğramış ve hipoksi ile indüklenmiş hücrelerin birikmesini önlemek için apoptoza giderler (Guo, Song, Jiang, Liu, Yu vd., 2006). Ancak, hipoksik hale gelen tümör hücrelerinin, hücre ölüm sinyallerine ve apoptoza karşı duyarlılığının azalması sonucu bölgesel ve sistemik olarak agresif olabilmektedir. Ayrıca hipoksi tümör hücrelerinin proliferasyon, anjiyogenez ve sistemik metastaz sinyalizasyonunu arttırabilmektedir (Selvendiran vd., 2009).

Hücrelerdeki hipoksinin moleküler mekanizmasından sorumlu temel protein HIF' dir. 1992 yılında (Eritropoietin) EPO' nun 3' Hipoksi cevap elementi (HRE; 5-RCGTG-3) ile oksijene bağımlı bir şekilde etkileşen çekirdek faktörü keşfedilmiştir. Bu DNA bağlayan komplekse "Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1" ya da 'HIF-1' olarak isimlendirilmiştir. (Goldberg, Monyer ve Choi, 1988; Semenza, Nejfelt, Chi ve Antonarakis, 1991; Tepebaşı ve Calaboğlu, 2016). Hipoksideki moleküler mekanizmanın genetik cevabı için bir büyüme faktörünü kodlayan EPO geni için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. EPO, kırmızı kan hücrelerin üretimini düzenleyerek, fizyolojik oksijen homeostazının temel belirleyicilerinden biri olan kan oksijen taşıma kapasitesini kontrol eden hematopoietik bir büyüme faktörüdür. Rekombinant EPO, belirli anemi tiplerinin, özellikle kronik böbrek hastalığıyla bağlantılı aneminin tedavisinin temel dayanağı olarak kullanılmıştır. Böbrek ve karaciğer hücreleri tarafından EPO mRNA' sı ve protein üretimi seviyeleri 1.000 kat veya daha fazla artabilir. Bu yanıt, oksijenle düzenlenmiş gen ekspresyonu çalışmaları için ilk odak noktasıydı ve HIF, bu sürecin merkezi transkripsiyon aracısı olarak tanımlanarak keşfedilmiştir. Transkripsiyon faktörü olan HIF-1 α ' nın DNA üzerindeki HRE bölgesine bağlandığı ve bu şekilde hipoksiye cevap vererek gen ekspresyonunda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Baysal, 2016; Çekin 2007; Wang vd., 1995; Rankin ve Giaccia, 2008; Selvendiran vd., 2009).

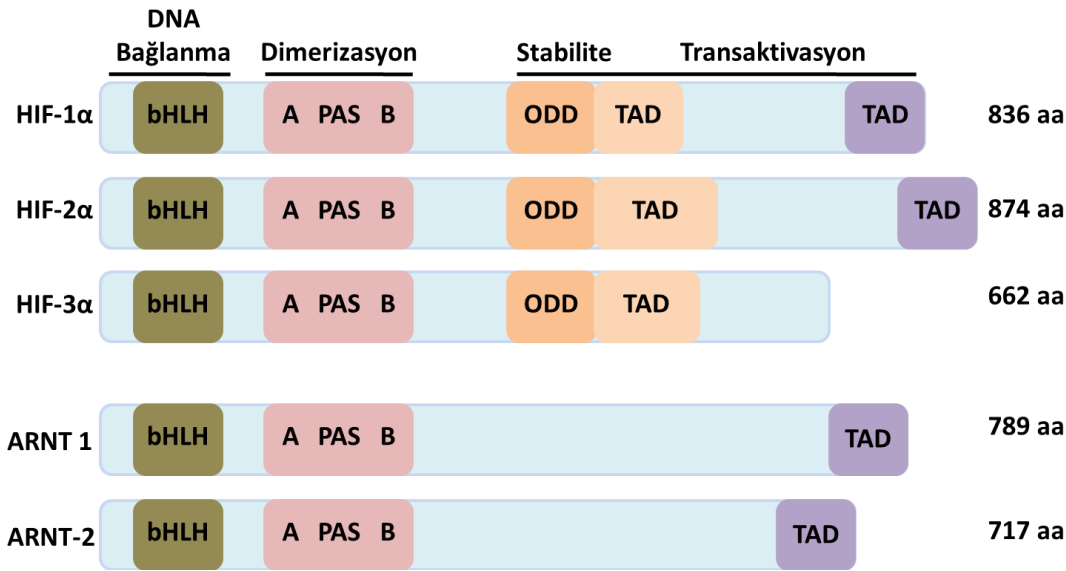
2. HIF Ailesi ve Protein Yapısı

HIF ailesi üyeleri glikoz alımı ve metabolizması, eritropoez, anjiyogenez, hücre proliferasyonu ve apoptoz dahil olmak üzere birçok hücrel süreçte yer alan genlerin ifadesini düzenleyerek hem oksijen dağıtımını hem de oksijen yoksunluğuna adaptasyonu kolaylaştırırlar. Bunlar, oksijene duyarlı ve heterodimerler olarak DNA' ya bağlanan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu proteinleri temel sarmal-döngü-sarmal (basic helix loop helix; bHLH) transkripsiyon faktörlerinin PAS (PER-ARNT (arilhidrokarbon reseptörü nükleer translokator) -SIM) ailesinin üyeleridir. ARNT olarak da bilinirler ve HIF-1' in β alt birimini ifade ederler (Goldberg vd., 1988; Rankin vd., 2008).

Bugüne kadar, insan hücrelerinde düşük oksijen seviyelerine yanıt olarak üç HIF ailesi üyesi tespit edilmiştir. HIF-1, HIF-2 ve HIF-3 olarak isimlendirilen bu heterodimerlerin her birisi, normoksik koşullarda ayrışan α alt

birim ve β alt birimden oluşur (Javan ve Shahbazi, 2017; Rankin vd., 2008; Tameemi, Dale, Jumailyand ve Forsyth, 2019). Hipoksik durum hücrel ve gelişimsel yanıtlara esas olarak HIF1A geni tarafından kodlanan HIF-1 α aracılık eder. Alternatif birleştirme ile üretilen üç HIF-1 α izoformu (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) tanımlanmıştır (Yeo, 2019). Tüm HIF ailesi üyelerinde bulunan bHLH domaini, DNA bağlanmasına ve PAS domain ise dimerizasyonuna aracılık eder. Bu proteinin aktif bölgesi, bir oksijen sensörü olarak işlev gören oksijen bağımlı degradasyon domaini (ODD) içerir. Şekil 1, HIF ailesi üyelerinin domain yapısını göstermektedir. Ek olarak, HIF ailesi üyeleri, hedef gen aktivasyonuna aracılık eden transaktivasyon domaini (TAD) içerir. HIF-1 α ve HIF-2 α , hedef gen aktivasyonuna katkıda bulunan iki TAD bölgesi içerir (Rankin vd., 2008; Torres, Navaa, Ruiz, Quiroz ve Gutierrez, 2017). HIF-1 α alt birimi, bir inhibitör alan ile köprülenmiş TAD-N ve TAD-C (sırasıyla N ve C terminal transaktivasyon alanları) içerir. TAD-N, ODD ile örtüşür ve protein stabilitesi ile ilişkilidir. TAD-C, protein stabilitesinden bağımsız olarak p300/ CBP gibi ortak aktifleştirici ile etkileşime girer ve tam HIF aktivitesi için gereklidir (Lando, Peet, Gorman, Whelan, Whitelaw vd., 2002). Yapılan çalışmalarla, HIF-1' in insan ve fare dokularında her yerde eksprese edildiğini ve oksijen eksikliğinde eritropoez ve glikoliz gibi fizyolojik reaksiyonların sekteye uğramaması için anjiyogenezde de regülatör role sahip olduğu belirlenmiştir (Semenza, 1988).

Üç izoform arasında izoform 1, hem yapısal hem de işlevsel olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve karakterize edilmiştir (Selvendiran vd., 2009). HIF-1 α , kromozom 14q21-24 içinde yer alan HIF1A geni tarafından kodlanan ve 15 ekzondan oluşan bir transkripsiyon faktördür. HIF-1 α , 836 amino asitten oluşur ve moleküler ağırlığı 120 kDa' dır. HIF-1 α , her ikisi de çift sarmal şeklinde düzenlenmiş iki zincirli, alfa zinciri (oksijen tarafından düzenlenir) ve beta zincirinden oluşan bir heterodimerdir. İki nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) vardır, ancak sadece C-terminal konumunda bulunan NLS, çekirdekte HIF-1 α birikiminden sorumludur. N-terminal bölgesinde, HRE aracılığıyla dimerizasyon ve DNA bağlanması için gerekli olan bHLH ve PER-ARNT-SIM A (PAS A) alanları bulunur (Çekin, 2007).



Şekil 1. HIF ailesi üyelerinin domain yapısı (Rankin vd., 2008' den esinlenerek çizilmiştir.)

HIF' ler oksijen yoksunluğunda transkripsiyonel tepkilere aracılık eden transkripsiyon faktörlerinin (bHLH)/PER-ARNT-SIM (PAS) etki alanı ailesinin üyeleridir. Oksijene duyarlı bir HIF- α alt biriminden (HIF-1 α , -2 α veya -3 α) ve bir yapısal HIF- β alt biriminden (ARNT1 ve ARNT2) oluşan heterodimerler olarak DNA' ya bağlanırlar. Tüm HIF ailesi üyelerinde bulunan bHLH ve PAS alanları, sırasıyla DNA bağlanmasına aracılık eder. HIF- α alt birimi özel bir ODD içerir. Ek olarak, HIF ailesi üyeleri, hedef gen aktivasyonuna aracılık eden TAD alanları içerir. HIF-1 α ve HIF-2 α , hedef gen aktivasyonuna katkıda bulunan iki TAD

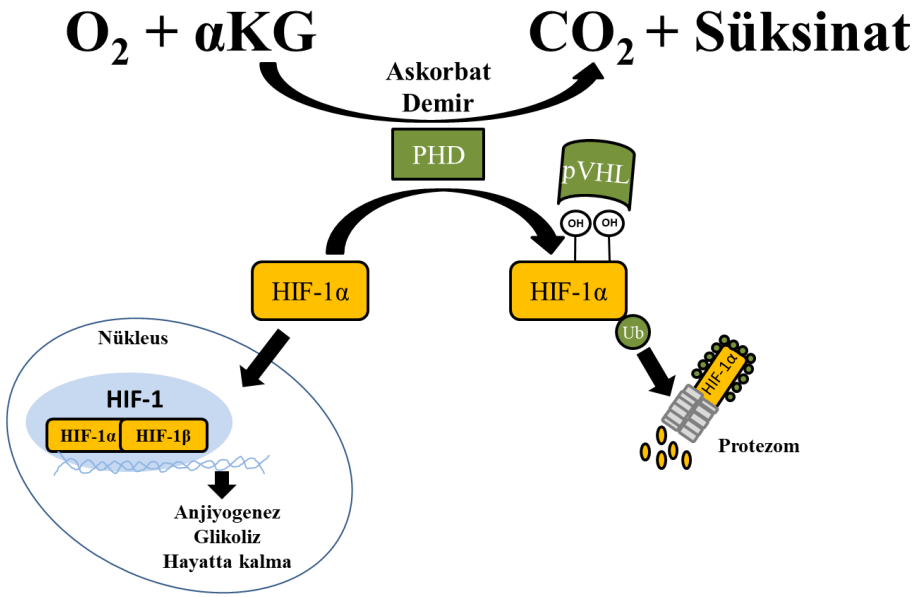
bölgesi bulundurulur. HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın DNA bağlanma ve dimerizasyon domainleri yapısal bir perspektiften benzer olsa da, bu iki formun transaktivasyon domainleri birbirinden farklıdır (Şekil 1). HIF-2 aynı zamanda endotelial PAS proteini, HIF benzeri faktör (HLF), HIF ile ilişkili faktör (HRF) ve 'Per-Arnt-Sim' (PAS) süper ailesi 2' nin (MOP2) üyesi olarak da adlandırılır. HIF-1 ile yaklaşık %48 amino asit sekans homolojisine sahiptir. Başka bir fark ise HIF-1 α 'nın her yerde yaygın bir ifadeye sahip olması, HIF-2 α ifadesinin ise spesifik dokularla daha sınırlı olmasıdır. HIF-1 α 'nın aksine HIF-2 α ekspresyonu, endotel hücreleri, glial hücreler, tip II pnömositler, kardiyomyositler, böbrek fibroblastları, pankreas ve duodenum interstisyel hücreleri ve hepatositleri içeren spesifik hücre tipleriyle sınırlıdır. Genel olarak, iki form hipoksiye farklı biyolojik cevaplar vermektedir (Rankin vd., 2008; Tameemi vd., 2019).

HIF-3 α , sırasıyla HIF-1 α ve HIF-2 α 'ya %57 ve 53 amino asit sekans özdeşliği olan bir bHLH-PAS alanını ve sekans olarak %61 benzer ODD alanını şifreler. Transaktivasyon alanı HIF-3 α 'da mevcut değildir, bu da bu formun baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu anlamına gelir ve HIF-1 α 'nın kendisine bağlanarak transkripsiyonu başlatmasını önler. Bu eylem nedeniyle HIF-3 α , 'inhibitör Per-Arnt-Sim PAS' alanı (IPAS-PAS) olarak da adlandırılır (Rankin vd., 2008; Tameemi vd., 2019). IPAS/HIF-1 α kompleksi HRE bölgesine bağlanamaz. Bu nedenle, IPAS, HIF aracılı hedef gen ekspresyonunu ve HIF-1 α 'nın transkripsiyonel aktivasyonunu inhibe eder. (Lee, Bae, Jeong, Kim ve Kim, 2004). En geç keşfedilen HIF-3, çeşitli dokularda ekspre edilmektedir. İlk olarak IPAS'ın birleşmesi ile HIF-3, keşfedilmiştir (Lee vd., 2004) ve HIF-1 ile dimerize olarak HRE'lere bağlanır (Gu, Moran, Hogenesch, Wartman ve Bradfield 1998). IPAS hiçbir endojen transaktivasyon aktivitesine sahip değildir. HIF-1' in amino terminal bölgesi ile etkileşime girerek, HIF-1' in dominant negatif regülatörü olarak hareket edip DNA'ya bağlanmasını önler (Makino, Cao, Svensson, Bertilsson, Asman vd., 2001). HIF regülasyonunda antagonistik etki gösterdiği düşünülen HIF-3 α , inhibitör görevi gösteren PAS domain proteini (IPAS) üzerinden HIF-1 α 'yı negatif regüle ederek HIF sistemini inhibe eder (Illingworth, Loe-narz, Schofield ve Domene, 2010).

Oksijen seviyeleri, HIF- α alt birimlerinin protein stabilitesini, hücre içi lokalizasyonunu ve transkripsiyonel potansiyelini etkileyebilirken, ARNT alt birimi yapısal olarak çekirdekte eksprese edilir ve aktivitesi hipoksiden etkilenmez. HIF-1 α , bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynamak için ARNT ile dimerleşir. Her alt birim, PAS-A ve PAS-B olarak adlandırılan iki PAS alanını içerir. bHLH ve PAS alanları, α ve β alt birimi arasında heterodimer oluşumu ve DNA bağlanması için gereklidir (Lee vd., 2004).

3. Oksijen Bağımlı HIF Yolu

Hipoksi, hücrelerin veya dokuların yeterli oksijenden yoksun kalmasına neden olan, oksijen dağıtımı ve oksijen tüketimi arasındaki homeostatik dengenin düzensizliğidir (Martin, Diamond, Gronthos, Peet ve Zannettino, 2011). HIF-1, düşük oksijen ortamına hücre adaptasyonunun ana düzenleyicisidir (Dengler ve Espinosa, 2013). Normoksi durumunda, HIF-1 α 'daki ODD domaini içindeki iki prolin rezidüsü üzerinde bulunan prolin hidroksilazlar PHD'ler vonHippel-Lindau (pVHL-tümör baskılayıcı protein) ubiquitinasyonu ve proteazomal bozunmayı tetikler. Hidroksilasyon reaksiyonu, α KG (PHD substrat alfa-ketoglutarat)'nin süksinata dönüşümüyle birleştirilir ve bunun için askorbat ve demir (PHD ko-faktörler) ko-faktör olarak kullanılır. Buna paralel olarak, oksijene bağımlı bir şekilde PHD'lere benzer düzenlenen bir asparajinil hidroksilaz olan HIF' i önleyen faktör (FIH), ko-aktivatör alımını önleyerek normoksideki HIF-1 transkripsiyonel aktiviteyi bastırır. Hipoksi ise, PHD'leri inhibe eder ve HIF-1 α 'yı stabilize eder. Daha sonra çekirdeğe geçer ve yapısal olarak ifade edilen HIF-1 β ile dimerize olur. Şekil 2, HIF-1 α 'nın oksijene bağımlı düzenlenmesini göstermektedir. Aktif HIF-1 kompleksi oluşturur ve glikolitik metabolizmayı, anjiyogenez ve hayatta kalmayı teşvik eden genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Lommarini, Porcelli, Gasparre ve Kurelac, 2017; Maxwell, Wiesener, Chang, Clifford, Vaux vd., 1999).



Şekil 2. HIF-1α' nın oksijene bağımlı düzenlenmesi (Lommarini vd., 2017' den esinlenerek çizilmiştir.)

Normoksi durumunda, iki prolin kalıntısı üzerinde, PHD' ler HIF-1α, pVHL aracılı ubiquitinasyonu ve hidroksilasyon reaksiyonu, αKG' nin süksinata dönüşümüyle birleştirilir ve bu durum için askorbat ile demir içeren ko-faktör gerekir. Hipoksida, hidroksilasyon inhibe edilir ve HIF-1α ile HIF-1β dimerize olarak ilgili transkripsiyon faktörlerine bağlanırlar ve anjiyogenez, glikolitik metabolizma ve hayatta kalmayı destekleyen genleri uyarırlar.

HIF-1α ve HIF-2α yüksek derecede sekans özdeşliği, benzer bir protein yapısı ve birkaç ortak hedefi paylaşmasına rağmen, benzersiz gen regülasyon modellerine aracılık ederler. HIF-1α her yerde eksprese edilirken, HIF-2α yalnızca belirli hücre türleri ve tümör türleri tarafından ifade edilir. HIF-1α, akut hipoksiye yanıtta baskın bir rol oynar, HIF-2α ise kronik hipoksiye yanıtı yönlendirir (Yu, Tang ve Sun 2017).

4. Hipoksi ve Anjiyogenez

Anjiyogenez oldukça karmaşık bir süreç ile gerçekleşir. Vasküler sistem, vaskülogenez ve anjiyogenez olmak üzere iki farklı sistem üzerinden gelişir. Yeni kan damar oluşumuna yetişkinlerde anjiyogenez adı verilirken, embriyonik gelişim safhasındaki kan damarı farklılaşmasına ise vaskülogenez adı verilir. Anjiyogenez sisteminde damardaki endotelial hücrelerin etrafını saran bazal membran, enzimatik reaksiyonlarla degrade olur ve anjiyogenik uyarınları takiben endotelial hücreler komşu stromaya geçer. Ardından hücrelerin farklılaşması, maturasyonu ile başlayan süreçte lümen oluşumunu takiben perisitlerin göçü ve tüplerin kıvrımlarının biraraya gelmesi ile yeni kan damarlarının oluşumu tamamlanmış olur (Redmer, Doraiswamy, Bortnem, Fisher, Jablonka-Shariff vd., 2001; Risau, 1997). Tümörlü dokularda anjiyogenik aktivite baskılanırsa besin gereksinimi ve atık maddelerin uzaklaştırılma döngüleri sağlanamayacağından dolayı tümör büyümesi 1-2 mm ile sınırlı kalır. Anjiyogenez kanser gelişiminde ve kanserin çevre dokulara yayılımında önemli bir mekanizmadır (Bamberger ve Perrett, 2002). Embriyonik dönemdeki damar sistemi gelişirken, burada gerçekleşen birçok olay erişkin bir organizmadaki anjiyogenez durumunda olduğu gibidir. Özellikle bu durum hipoksi durumunda gerçekleşen metabolik cevaplarla birçok yönden benzerlik gösterir (Folkman, 1997; Folkman ve Shing, 1992; Intaglietta, Johnson ve Winslow, 1996). İlk damar sisteminin gelişimi vaskülogenez olarak bilinir. Damarsal ağı oluşturmak üzere öncü endotelial hücreleri farklılaşırlar ve bu işlem hem embriyonik, hemde embriyo dışı mezoderm içerisini kapsar. Oluşan damar ağlarının yayılabilmesi ve değişimleri için yeni kapiller damarların oluşması gereklidir. Yine bu damarsal ağların, tomurcuklanması ve önceden oluşan damar ağının yeniden organize edilerek küçük ve büyük damarları

oluşturması ile süreç ilerlemektedir. Oluşan damarsal yapıların olgunlaşmaları için bazal membran üzerinde salınan çok sayıda faktörün varlığına ve perivasküler hücrelerin yeniden programlanmasına bağlıdır (Konukoğlu ve Turhan, 2005).

HIF, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) reseptörleri FLT-1 (Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1) ve FLK-1 (Fetal liver kinase 1), plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1), trombosit kaynaklı büyüme faktörü B (PDGF-B), matris metaloproteinazlar (MMP-2 ve MMP-9), TIE reseptörü ve anjiyopoyetinler (ANG-1 ve ANG-2) dahil çok sayıda pro-anjiyogenik faktörün ekspresyonunu indükleyebilir. HIF tarafından aktive edilen tüm bu pro-anjiyogenik faktörler arasında, güçlü bir endotelial mitojen olan VEGF-A, birçok insan tümöründe yüksek oranda eksprese edildiği için en dikkate değer proteindir. Hem fizyolojik hem de patofizyolojik anjiyogenezde, HIF-1 α yolağının, VEGF gibi diğer pro-anjiyogenik faktörleri yukarı regüle ederek damar oluşumunun ana düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (Demirer, Ayten ve Taş, 2014; Lugano, Ramachandran ve Dimberg, 2019; Lv, Li, Zhang, Hu, Li vd., 2017).

Damar oluşum kaskadının her adımı HIF-1 tarafından desteklenir. Özellikle, VEGF izoformları (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D) anjiyogeneze katılan birincil faktörlerdir. HIF-1 tarafından başlatılan anjiyogenez sıklıkla VEGF' e bağımlıdır çünkü HIF-1 vasküler endotelial büyüme faktörünün ana uyarıcısıdır (Jozsef Jaszai ve Schmidt, 2019; Ölgün, Bıçak ve Nebioğlu, 2002; Schito, 2018; Zimna ve Kurpisz, 2015). HIF-1 α , endotelial hücre (EC) biyolojisi ve anjiyogenezde önemli bir rol oynar. Tang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada EC hücrelerinden HIF-1 α ' nın susturulması sonucu HIF-1 α kaybının kemotaksis, proliferasyon, yer değiştirme ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere EC' nin anjiyogenez davranışını önlediği gösterilmiştir (Tang, Wang, Esko, Giordano, Huang vd., 2004). HIF-2 α ' nın ise hücre proliferasyonu, göç, kan damarlarının olgunlaşması ve metastaz dahil olmak üzere anjiyogenezin birçok yönünü düzenlediği gösterilmiştir (Befani ve Liakos, 2018).

Tümör anjiyogenez, premalign dönemlerde meydana gelen pro-anjiyogenik sinyallerle meydana gelir (Rundhaug, 2005). Tümör dokularında anjiyogenetik dengeyi çok sayıda faktör bozmaktadır. Bunlar arasında belirli onkogenleri aktive eden veya tümör baskılayıcı genleri inaktive eden genetik mutasyonlar, hipoksi ve asidozis gibi metabolik stresler, ayrıca tümör/lezyonlar içerisindeki immün/inflamatuvar yanıtların etkisi ile anjiyogenetik dengenin bozulması sayılabilir (Carmeliet ve Jain, 2000). Tümör dokusunun invaziv ve metastatik karakter kazanabilmesi için yeni kan damarlarının yapılmasına ihtiyaç vardır. Çünkü yeni kan damarlarıyla doku için gerekli besin maddeleri, oksijen ve büyüme faktörleri sağlanır. Salınan belli faktörlerle tümör hücresi anjiyogenez uyarır. Tümör dokusunun daha fazla büyüebilmesi, invaziv ve metastatik karakter kazanabilmesi için anjiyogenez şarttır (Demirer vd., 2014).

5. Kanserde Hipoksi

Hücrelere ve dokulara yetersiz oksijen gitmesinin bir durumu olan hipoksi, işlevsel olmayan vaskülatörler ve mevcut kaynağı aşırı hızla çoğalan kanser hücreleri nedeniyle neredeyse tüm katı tümör tiplerinde sıklıkla gözlenir. Tümörlerin içindeki hipoksik mikro ortamlar, radyoterapi ve birçok sitotoksik ilacın etkinliğini sınırlar (Yu vd., 2017). Kanser hücrelerinin hızlı çoğalması nedeniyle, tümör, normal damar sistemindeki besin ve oksijen kaynağını hızla tüketir ve hipoksik hale gelir. Hipoksik tümör bölgelerinden anjiyogenik faktörlerin üretimi, tümör kitlesinin vaskülarizasyonunu tetikler. Normal fizyolojik anjiyogenezde olduğu gibi pro- ve anti-anjiyogenik faktörlerin düzenlenmesi, vasküler sızıntıya ve laminer olmayan kan akışına yol açar. Bu da hipoksik tümör bölgeleri ile sonuçlanır. Bu nedenle, katı bir tümör, şiddetli hipoksi ve nekroz alanlarıyla doludur (Eales, Hollinshead ve Tennant, 2016). Patolojik olarak anjiyogenezin en önemli şekli kanserdir. Kanser hücreleri anjiyogenez ile buldukları doku ve ortamdan başka doku ve organlara ulaşımı sağlarlar (Sevimli, Özçelik ve Sevimli, 2015).

Kanser; iltihaplanma, tümör gelişimi ve ilerlemesinde kilit oyuncudur, bu nedenle kronik iltihaplı hastalıkların kansere yakınlık oluşturduğu düşünülmektedir. Crohn hastalığı ve ülseratif koliti içeren İnflamatuvar Bağırsak

Hastalığı (IBD) kronik bir bağırsak hastalığıdır. Bu durumdan etkilenen hastaların kolon kanseri, özellikle Kolit-İlişkili Kolon kanseri (CAC) geliştirme riski daha yüksektir. Hipoksik inflamasyonun önemli olduğu kolon tümör oluşumunda hem HIF-1 α hem de HIF-2 α eksprese edilir (D'Ignazio, Batie ve Rocha, 2017).

Çeşitli çalışmalar, HIF' in karsinogenezde merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. Birincisi, HIF yaygın kanserlerin çoğunda aktive olur. HIF- α ekspresyonu çoğu normal dokuda seviyesi düşük iken, tümörlerde hem HIF-1 α hem de 2 α seviyeleri yükselir, farklı dokulardan gelen habis tümörlerin %54' ü her iki proteini de içerirler. Özellikle kan damarlarına uzak bölgelerde ve nekrotik hücrelerin sınırlarında, muhtemelen en şiddetli hipoksi altındaki hücrelerde aşırı eksprese edilirler. Bu değişikliğin, tümör hücrelerinin hipoksik ortama uyum sağlamasına yardımcı olduğu öne sürülmüştür. İkinci olarak, kültürlenmiş hücrelerde tanımlanan kanser ve HIF hedefleriyle ilişkili genlerin çarpıcı bir uyumu vardır. VEGF ve glikolitik enzimler, normal dokulara göre tümörlerde daha yüksek seviyelerde eksprese edilir (Liu ve Simon, 2004; Talks, Turley, Gatter, Maxwell, Pugh vd., 2000).

HIF-1 α ekspresyonu, oksijenden bağımsız bir şekilde Src ve Ras onkogeninin büyüme faktörleri, sitokinler veya aktivasyonu ile indüklenebilir (Maxwell, Pugh ve Ratcliffe, 2001; Semenza, 2003). Buna, translasyon oranındaki artış aracılık eder. HIF aktivasyonu, hem kemoterapi ve radyoterapiye dirençte bir artış ile hem de artmış bir metastaz potansiyeli ve hasta mortalitesi ile ilişkilidir (Talks vd., 2000). HIF aşırı ekspresyonu genellikle artan ksenograf büyümesi sıklığı ile ilişkilidir. Baskın negatif HIF veya ARNT nakavt formlarının ekspresyonu yoluyla HIF inaktivasyonu, tümör büyümesinin azalmasına yol açar (Liu vd., 2004). Hipoksi, katı tümörlerde sıklıkla görülür ve tümör hücreleri, farklı oksijen eşiklerinde ortaya çıkan, çok sayıda heterojen değişikliğe yol açan farklı sinyal yollarını aktive ederek hayatta kalır. Aslında, kötü huylu büyüme sırasında, hipoksik bölgeler, artan genetik kararsızlık ve tümör metastaz riski ile ilişkili olan daha agresif fenotip ile ilişkilidir (Challapalli, Carroll ve Aboagye, 2017).

Tümör hücreleri HIF' i aktive etmek için farklı yollar geliştirmiştir. Örnekler arasında VHL ve PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, H-RAS ve c-MYC gibi onkogenlerin aktivasyonu ve IGF-1, IGF-2 ve PDGF gibi çeşitli büyüme faktörü yollarının artan aktivitesi yer alır (Maxwell vd., 2001).

6. HIF-1 α ' nın Transkripsiyonel Düzenlenmesi

HIF tarafından transaktivasyonu, HIF-1 α /ARNT' nin hedef genlerin promotorleri ve güçlendiricilerindeki HRE' lere bağlanması ile gerçekleşir. ARNT bir transkripsiyonel aktivasyon alanı içerirken, HIF-1 α ve HIF-2 α iki transaktivasyon alanına, yani N- terminal (NAD) ve C-terminal aktivasyon alanları (CAD) içerir. NAD, ODD alanı ile örtüşür ve CAD, CBP/p300 gibi transkripsiyonel ortak aktifleştiricilerle etkileşime girer. İkincisi bir asparajinil hidroksilaz tarafından CAD da korunmuş amino asitler YDCEVNV/AP' de bir asparajin kalıntısının hidroksilasyonunun inhibisyonundan sonra meydana gelen O₂' ye duyarlı bir etkileşimdir. Aynı zamanda inhibe edici faktör HIF-1 (FIH) olarak da bilinir. PHD' lere benzer FIH, aktivitesi kofaktör olarak O₂ gerektiren bir 2-oksoglutarat bağımlı dioksijenaz süper ailesine aittir. CBP/p300' e ek olarak, HIF; ortak aktifleştirici SRC-1 ve transkripsiyon aracı faktör 2 ile etkileşime girer. Bu etkileşim, HIF-1' in O₂' ye bağlı bir şekilde transaktivasyon potansiyelini artırır ve özellikle düşük miktarda CBP ile sinerjik bir etki üretir. Ayrıca, HRE' lere HIF bağlanması, birçok gen için hipoksik indüksiyon da yeterli değildir. HIF-1 α veya HIF-2 α ile Smad3, HNF4, ATF1/CREB1, AP1 ve Ets-1 gibi diğer transkripsiyon faktörleri arasındaki sinerjik iş birlikleri bulunmaktadır. VEGF promotorunun optimal bir HIF1 α ' ya bağlı indüksiyonu Smad3 varlığında elde edilmiştir (Bracken, Whitelaw ve Peet, 2003; Liu vd., 2004).

HIF-1 α , yalnızca hipoksinin kendisine değil, aynı zamanda büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar, ısı şoku ve besin mevcudiyeti tarafından uyarılmaya da yanıt olarak, mRNA transkripsiyonu ve protein sentezi yoluyla da düzenlenebilir. ERK/MAPK, JAK/STAT ve PI3K/Akt/mTOR olmak üzere üç büyük yol, özellikle kanserde HIF-1 α ' nın transkripsiyonunu ve translasyonunu arttırmada görev yapar (Lommarini vd., 2017).

7. Deneysel Hipoksi Modelleri

7.1. Kimyasal Hipoksi

Hipoksik durumun moleküler mekanizmasında eritropoezi ve dolayısıyla kan O₂ taşıma kapasitesini düzenleyen ve büyüme faktörünü kodlayan EPO geninin transkripsiyonunun fizyolojik düzenleyicileri yada EPO ekspresyonunun indükleyicileri; %1 oksijen (O₂), kobalt klorür (CoCl₂) ve deferoksamin (DFO)' dir. Ayrıca EPO ekspresyonunun inhibitörleri aktinomisin D, sikloheksimid ve 2-aminopurin' dir. EPO ekspresyonu hücre tipine özgüdür, ancak HIF-1 aktivitesinin %1 O₂, CoCl₂ veya deferoksamin ile indüklenmesi, birçok memeli hücre hattında tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada birkaç glikolitik enzimi kodlayan RNA' lar, EPO üreten Hep3B hücrelerinde ve üretmeyen HeLa hücrelerinde %1 O₂, CoCl₂ veya deferoksamin ile indüklenirken, sikloheksimid bunların indüksiyonunu bloke etmiştir ve HIF-1 bağlanma bölgelerini içeren glikolitik gen sekansları, transfeksiyonda hipoksiyle indüklenabilir transkripsiyona aracılık etmiştir (Torres vd., 2017; Wang vd., 1995).

Hücre kültüründeki hipoksi modelleri, hücresele, biyokimyasal ve moleküler seviyelerde hipoksi yanıtının karakterizasyonuna izin vermiştir. Tablo 1, hipoksik koşulları indüklemek için kullanılan kimyasal maddeleri göstermektedir. En yaygın olarak kullanılan kimyasal hipoksi ajanları CoCl₂ ve demir şelatörü DFO' dir (Sanchez ve Cardenas, 2018).

Tablo 1

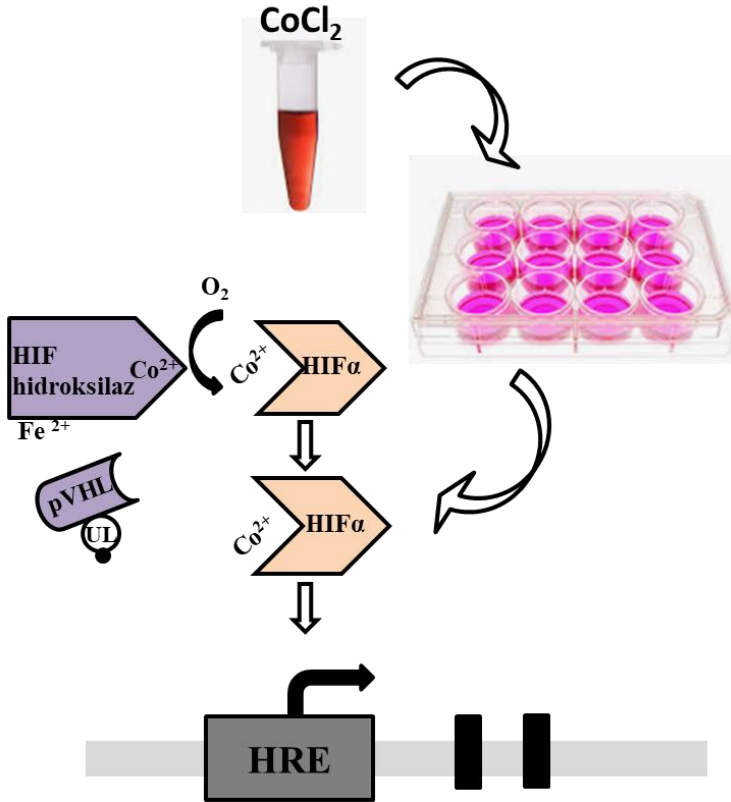
Kimyasal olarak indüklenmiş hipoksi modeli olarak kullanılan bileşikler (Sanchez ve Cardenas, 2018).

İnhibitör tipi	Kullanılan bileşik
Oksoglutaratın analogları	Dimetiloksaloglisin L -Mimosin Etil 3,4-dihidroksibenzoat S956711
Fe ⁺² şelantlar	Deferoksamin 8-Hidroksikinolin M30 HLA-20 VK28
Metaller	Kobalt (Co ⁺²) Nikel (Ni ⁺²) Çinko (Zn ⁺²) Manganez (Mn ⁺²) Vanadyum (V ⁺⁵)
Elektron taşıma zincirinin ayırıcısı	Dinitrofenol Dinitrokrezol Pentaklorofen m-Klorokarbonil siyanür Fenildirazon

7.1.1 CoCl₂ ile Hipoksik Koşul

Doku kültüründe hücelere belirli konsantrasyonlarda CoCl₂ uygulanarak, kimyasal olarak hipoksik durum oluşturulabilmektedir. CoCl₂ ortamdaki prolin hidroksilazlara bağlanır ve prolin hidroksilaz enziminin HIF-1α' yı hidroksillemesini engeller. Hidroksilasyon olmadığı için tümör baskılayıcı protein VHL, HIF-1α'

ya bağlanamaz. HIF-1 α hücrede degrade olmadan aktif hale gelerek birikir ve hedef genlerin transkripsiyonu için promotorlarda bulunan HRE bölgesine bağlanır. (Yuan, Hilliard, Ferguson ve Millhorn, 2003). CoCl₂, normoksik koşullar altında HIF-1 α ve HIF-2 α ' yı güçlü bir şekilde stabilize eder. Düşük oksijen kaynaklı hipoksi ve diğer hipoksi taklitlerinin kullanımı ile karşılaştırıldığında, HIF-1 α ve HIF-2 α ' nın stabilizasyonu birkaç saat sürdürülür. Bu nedenle, bu model kullanıcılara, numunelerini normoksik koşullar altında işlemek ve analiz etmek için daha geniş bir zaman aralığı sağlar. CoCl₂ ile hipoksik koşul oluşturma mekanizmasını göstermektedir (Şekil 3) (Sanchez vd., 2018). Literatürde bu kimyasalın kullanımına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Hatipoğlu, Hirohata, Cilek Ogawa, Miyoshi, vd., 2009; Okuyan, Turkoglu ve Kockar, 2020; Turkoglu ve Kockar, 2016; Turkoglu ve Kockar, 2012).



Şekil 3. CoCl₂ ile hipoksik koşul oluşturma ve mekanizması (Yuan vd., 2003' den esinlenerek çizilmiştir.)

7.1.2 DFO (Deferoksamin - Demir Şelatör) ile Hipoksik Koşul

Demir homeostazi normal hüce metabolizması için önemlidir ve eksikliği ya da fazlalığı birçok hastalık durumuna sebebiyet vermektedir. Elde edilen sonuçlara göre demir, hayvanlarda kolorektal tümörler, adenokarsinoma, hepatomalar, meme tümörleri, sarkomlar ve renal tübüler hücreli karsinom gibi kanserlerin patogenezinde rol oynayan kanserojen yada kofaktörler olarak bilinmektedir. Hemokromatoz demir metabolizması bozukluğudur. Hemokromatoz hastalarının vücutlarında, vücutlarının ihtiyaçlarından daha fazla demir birikir. Hemokromatozdan muzdarip hastalar çeşitli malignitelere karşı belirgin şekilde artan duyarlılık gösterir. Kanser gelişimi yada ilerlemesinde demirin patojenik rolü önemli ölçüde bilinmemektedir. Demir şelatör maddeleri *in-vitro*, *in-vivo* ve klinik çalışmalarda kayda değer önemli anti-tümör aktivitelere sahiptir. (Guo vd., 2006).

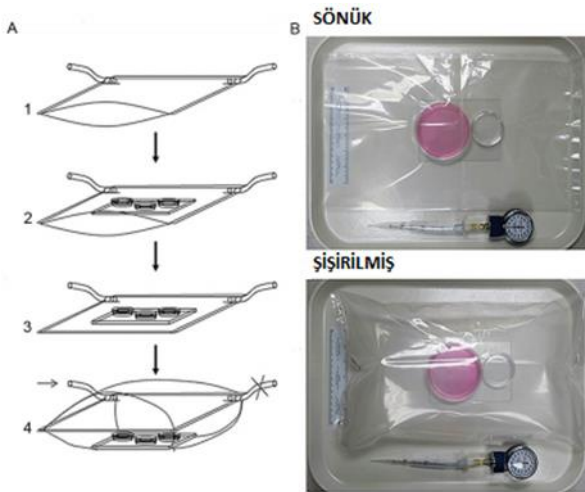
HIF-1 α ' nın proteozomal degradasyonu için hidroksillenmesi gerekmektedir. DFO, prolin hidroksilazları inhibe eder ve bu inhibisyon sonucu, bu süreci durdurmakta ve HIF-1 α ' nın birikimine sebep olmaktadır. DFO, HIF-1 α proteininin birikimini uyararak parçalanmasına engel olmaktadır. Deforoksamin ilacı son konsantrasyonu 100 μ M olacak şekilde hesaplanarak hücelere uygulanmaktadır. Bu ilaçların deneylerde

pekçok kez açılarak kullanımı mümkün olup ekonomik ve kolaydır (Wu ve Yotnda, 2011). DFO ve kobalt HIF-1 α ' yı farklı mekanizmalar yoluyla stabilize etmektedir. DFO, HIF-1 α ' ya özgü prolinin aktivitesi için gerekli demiri şelatlayarak HIF-1 α ' nın hidroksilasyonunu inhibe eder. Bunun aksine, kobalt, translasyon veya bağlanma aşamasında eklendiğinde VHL bağlanmasını önler (Woo, Lee, Park ve Kwon, 2006).

7.2. Fiziksel Hipoksi

Hücre kültürü için hipoksik bir ortam yaratabilen ve koruyabilen güvenilir bir deneysel cihaz gereklidir. Böyle bir amaç için mevcut birkaç model vardır. Biri, %1 O₂, %5 CO₂ ve %94 N₂ içeren düşük O₂ gazı ile doldurulabilen modüler inkübatör odasıdır. Oda, sabit bir şekil ve boyutta katı malzemelerden yapılmıştır ve son yıllarda araştırma laboratuvarlarında en yaygın kullanılan hipoksi odasıdır. Başka bir hipoksi modeli, bir hücre kültürü yetiştirme cihazı kullanmaktır. Bir diğeri ise, sıcaklık ve bağıl nemin yanı sıra O₂ ve CO₂' nin hassas kontrolünü sağlayabilen hipoksi istasyonudur. Uzun vadeli bir hücre kültürü için hipoksik bir ortam sağlar. İkinci ve üçüncü modeller oldukça pahalıdır ve günlük olarak hipoksi deneyleri yapmayan küçük laboratuvarlar için uygun olmayabilir (Wang, Jin ve Zhong, 2014).

Bir diğeri inkübatör bazlı hipoksik koşul ise well plakalarında gerçekleştirilmektedir. Belirli bir miktara ulaşmış hücreler normoksik koşul için %21 hipoksik koşul için %1 O₂ olacak şekilde dengelenir. 16x16 inç boyutunda şişebilen hazneye konular. Hava geçirmez plastik torba alt köşelerine bağlanmış iki gaz bağlantı noktaları ile hazır hale getirilir. Bir cam plaka, kültür kaplarına desteklik sağlamak için içerisine yerleştirilir. Otaklavlanmış su ile ıslatılmış sünger haznenin içine yerleştirilir. Kılıf gaz bağlantısı aracılığıyla yavaşça vakumlanır ve yalıtılmış bir alan oluşturmak için kapatılır. Hazne maksimum kapasitenin hemen hemen %80 dolulukta olacak şekilde belirlenmiş gaz ile, A bağlantı noktasından doldurulur. Şekil 4' de gösterildiği gibi gaz çıkışı olan B bağlantı noktası bir kelepçe ile kontrol edilir. Sızdırmayacak şekilde bağlantı noktalarına bakılarak kelepçeleri ile kapatılır ve hazne 37 °C de inkübasyona bırakılır. Atmosfer basıncını izlemek için monometre kullanılır. Hipoksik koşul için oksijen gazı N₂ ile dengelenir ve %5 CO₂ kullanılır. Gaz doldurulması sırasında gaz akışı 2psi tek kademeli regülatör ile kontrol edilmektedir. Hazne kapasitesinin %80' i doldurulur ve iki bağlantı noktası tamamen kapatılır. Belirli zaman aralıklarında bakılmak için önceden ayarlanmış 37 °C inkübatör içine yerleştirilir (Baysal, 2016; Wang vd., 2014).



Şekil 4. Şişirilebilir kapalı haznede hipoksik koşul modeli (Wang vd., 2014)

8. Sonuçlar

Kanserde, hücrelerinin sürekli ve hızlı çoğalması sebebiyle kanser hücreleri, damar sisteminde bulunan besin ve oksijen kaynağını tüketir. Oksijen seviyesinin normalin altına düşmesi sonucu hipoksik durum oluşur. Tümör hücreleri yeterli oksijen alamadığında hücre ölümüne gitmeden önce genetik farklılıklar oluşturarak hipoksik duruma adapte olmaktadır. Hücrelerde hipoksiden sorumlu olan HIF olarak bilinen protein ailesi

üyeleri özellikle hücre kültürü çalışmalarında kimyasal ve fiziksel olarak indüklenebilmektedir. Bu derleme, HIF'in moleküler çalışma mekanizmasını, hipoksinin biyolojik fonksiyonlarını ve hücre kültürü laboratuvarlarında kullanılan farklı hipoksi modellerini özetlemektedir.

Yazar Katkıları

Sümeyye Aydoğan Türkoğlu: Çalışmanın dizaynı, gerekli tüm literatürün taranmasında ve makalenin yazımında katkı sağlamıştır.

Fatma Poyrazlı: Tüm literatürün taranmasında ve makalenin yazımında katkı sağlamıştır.

Derya Okuyan: Anjiyogenez ve hipoksi bölümünün şekillendirilmesinde katkı sağlamıştır.

Feray Köçkar: Derleme çalışmanın dizaynı ve tüm bölümlerin yeniden gözden geçirilmesinde katkı sağlamıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

- Bamberger, E. S. ve Perrett, C. W. (2002). Angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, 55, 348-359. <https://dx.doi.org/10.1136%2Fmp.55.6.348>
- Baysal, S. (2016). *NonO/p54^{nrb} Promotorunun Klonlanması ve Fonksiyonel Analizi* (Yüksek Lisans Tezi). Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Türkiye. Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Befani, C. ve Liakos, P. (2018). The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 9087–9098. <https://doi.org/10.1002/jcp.26805>
- Bracken, C. P., Whitelaw, M. L. ve Peet, D. J. (2003). The hypoxia-inducible factors: Key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 1376-93 <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-003-2370-y>
- Carmeliet, P. ve Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-57. <https://www.nature.com/articles/35025220>
- Çekin, N. (2007). *HIF-1 Proteininin Kansere İlaçlarına Karşı Direnç Gelişmesindeki Rolünün Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye. Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/nlguncekin>
- Challapalli, A., Carroll, L., Aboagye, E. O. (2017). Molecular mechanisms of hypoxia in cancer. *Clinical and Translational Imaging*, 5, 225–253. <https://doi.org/10.1007/s40336-017-0231-1>
- D'Ignazio, L., Batie M., ve Rocha, S. (2017). Hypoxia and Inflammation in Cancer, Focus on HIF and NF-κB. *Biomedicines*, 5(2), 21. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020021>
- Demirer, E., Ayten, Ö. ve Taş, D. (2014). Anjiyogenez ve Anti-Anjiyogenik Tedaviler. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 5(1), 75-9. <https://doi.org/10.4328/JCAM.1310>
- Dengler, V. L., Galbraith, M. D. ve Espinosa, J. M. (2013). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49, 1-15. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.838205>
- Eales, K. L., Hollinshead K. ve Tennant, D. A. (2016). Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*, 5, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2015.50>
- Folkman, J. (1997). Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. In I.D. Goldberg ve E.M. Rosen (Ed.), *EXS Regulation of Angiogenesis* (pp. 1-8). Erişim adresi: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-9006-9_1
- Folkman, Y. ve Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 10931–10934. <https://www.sciencedirect.com/science/>
- Goldberg, M. P., Monyer, H. ve Choi, D.W. (1988). Hypoxic neuronal injury in vitro depends on extracellular glutamine. *Neuroscience Letters*, 94 (1-2), 52-57. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90269-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90269-8)
- Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L., Bradfield C. A. (1998). Molecular Characterization and Chromosomal Localization of a Third α-Class Hypoxia Inducible Factor Subunit, HIF3α. *Gene Expression*, 7(3), 205-213. <https://www.ingentaconnect.com/>

- Guo, M., Song, L. P., Jiang, Y., Liu, W., Yu, Y. ve Chen, G. Q. (2006). Hypoxiamimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1 α independent mechanisms. *Springer Science Business Media*, 11, 67–77. <https://doi.org/10.1007/s10495-005-3085-3>
- Hatipoglu, O. F., Hirohata, S., Cilek M. Z., Ogawa, H., Miyoshi, T., Obika, M., Demircan, K., Shinohata, R., Kusachi, S. ve Ninomiya, Y. (2009). ADAMTS1 Is a Unique Hypoxic Early Response Gene Expressed by Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 24(284), 16325-16333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001313>
- Illingworth, C. J. R., Loenarz, C., Schofield, C. J. ve Domene, C. (2010). Chemical Basis for the Selectivity of the von Hippel Lindau Tumor Suppressor pVHL for Prolyl-Hydroxylated HIF-1 α . *Biochemistry*, 49(32), 6936-6944. <https://doi.org/10.1021/bi100358t>
- Intaglietta, M., Johnson, P. C. ve Winslow, R. M. (1996). Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovascular Research*, 32(4), 632–643. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(96\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(96)00110-1)
- Javan, B. ve Shahbazi, M. (2017). Hypoxia-inducible tumour-specific promoters as a dual-targeting transcriptional regulation system for cancer gene therapy. *Ecancermedicalscience*, 11, 751. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.751>
- Jozsef Jaszai, J. ve Schmidt, M. H. H. (2019). Trends and Challenges in Tumor Anti-Angiogenic Therapies. *Cells*, 8(9), 1102. <https://doi.org/10.3390/cells8091102>
- Konukoğlu, D. ve Turhan, M. S. (2005). Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Journal Medicine*, 36, 42-48. <https://www.academia.edu/>
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M.L. ve Bruick R.K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes and Development*, 16, 1466–1471. <http://doi.org/10.1101/gad.991402>
- Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H. ve Kim, K. W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Experimental and Molecular Medicine*, 36, 1-12. <https://doi.org/10.1038/emm.2004.1>
- Liu, L. ve Simon, M. C. (2004). Regulation of Transcription and Translation by Hypoxia. *Cancer Biology and Therapy*, 3(6), 492-497. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.6.1010>
- Lommarini, L., Porcelli, A. M., Gasparre, G. ve Kurelac, I. (2017). Non-Canonical Mechanisms Regulating Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7, 286. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00286>
- Lugano, R., Ramachandran, M. ve Dimberg, A. (2019). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 1745–1770. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>
- Ly, X., Li, J., Zhang, C., Hu, T., Li, S., He, S., Yan, H., Tan, Y., Lei, M., Wen, M. ve Zuo, J. (2017). The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genea and Diseases*, 4(1), 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.11.003>
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A. ve Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414, 550–554. <https://www.nature.com/articles/35107085>
- Martin, S. K., Diamond, P., Gronthos, S., Peet, D. J. ve Zannettino, A. C. W. (2011). The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia*, 25, 1533–1542. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2011.122>
- Maxwell, P. H., Pugh, C. W. ve Ratcliffe, P. J. (2001). Activation of the HIF pathway in cancer. *Current Opinion in Genetics Development*, 11(3), 293-9. 36. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00193-3)
- Maxwell, P. H., Wiesener M. S., Chang, G. V., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher E. R. ve Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399, 271–275. <https://www.nature.com/articles/20459>
- Mungai, P. T., Waypa, G. B., Jairaman, A., Prakriya, M., Dokic, D., Ball, M. K., ve Schumacker, P. T. (2011). Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release- activated calcium channels. *Molecular and Cellular Biology*, 31(17), 3531–3545. <https://doi.org/10.1128/MCB.05124-11>
- Okuyan, D., Turkoglu, S. A. ve Kockar F. (2020). Carbonic anhydrase III is a new target of HIF1 α in prostate cancer model. *Gene*, 762, 145034. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145034>

- Ölgen, S., Bıçak, I. ve Nebioğlu, D. (2002). Angiogenesis ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(3), 193-214. <https://pdfs.semanticscholar.org/>
- Rankin, E. B. ve Giaccia, A. J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*, 15(4), 678–685. <https://www.nature.com/articles/cdd200821>
- Redmer, D. A., Doraiswamy, V., Bortnem, B. J., Fisher, K., Jablonka-Shariff, A., Grazul-Bilska, A. T. ve Reynolds, L. P. (2001). Evidence for a Role of Capillary Pericytes in Vascular Growth of the Developing Ovine Corpus Luteum. *Biology of Reproduction*, 65(3), 879-889. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.879>
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 671-674. <https://www.nature.com/articles/386671a0>
- Rundhaug, J. E. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 267-285. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x>
- Sanchez, J. M. ve Cardenas, M. E. C. (2018). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *Journal of Applied Toxicology*, 39, 556–570. <https://doi.org/10.1002/jat.3749>
- Schito, L. (2018). Bridging angiogenesis and immune evasion in the hypoxic tumor microenvironment. *The American Physiological Society*, 315, R1072–R1084. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00209.2018>
- Selvendiran, K., Bratasz, A., Kuppusamy, M. L., Tazi, M. F., Rivera, B. K. ve Kuppusamy P. (2009). Hypoxia induces chemoresistance in ovarian cancer cells by activation of signal transducer and activator of transcription 3. *International Journal of Cancer*, 125(9), 2198–2204. <https://doi.org/10.1002/ijc.24601>
- Semenza, G.L. (1998): Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(5), 588-594. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80016-6](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80016-6)
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 3, 721-32. <https://www.nature.com/articles/nrc1187>
- Semenza, G. L., Neufeld, M. K., Chi, S. M. ve Antonarakis, S. E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), 5680-5684. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5680>
- Sevimli, T., Özçelik, N. ve Sevimli, M. (2015). Tümör anjiyogenezinde mikroRNA (miRNA)' ların rolü. *SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(1), 43-46. <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/>
- Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. ve Adrian, L. H. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American Journal of Pathology*, 157, 411-21. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64554-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64554-3)
- Tameemi, W. A., Dale, T. P., Jumailyand R. M. ve Forsyth N. R. (2019). Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 4. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00004>
- Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F. J., Huang, Y., Gerber, H. P., Ferrara, N. ve Johnson, R. S. (2004). Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell*, 6(5), 485e495. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.026>
- Tepebaşı, M. Y., Calaboğlu, N. Ş. (2016). Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1 α) C111A gen polimorfizmi ile hemogloblin konsantrasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 23(2), 53-59. <https://dergipark.org.tr/en/pub/sdutfd/issue/26473/278673>
- Torres, J. F., Navaa, G. A. M., Ruiz M. C. G., Quiroz, L. E. G. ve Gutierrez, M. (2017). Role of HIF-1 α signaling pathway in osteoarthritis: a systematic review. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 57(2), 162-173. <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2016.07.008>
- Turkoglu, S. A. ve Kockar F. (2012). Expression Of Gapdh, B-Actin And B-2-Microglobulin Genes Under Chemically Induced Hypoxic Conditions In Hep3b And Pc3 Cells. *Journal of Applied Biological Sciences*, 6(3), 1-6. <http://www.jabsonline.org/index.php/jabs/article/view/306>
- Turkoglu, S. A. ve Kockar F. (2016). SP1 and USF differentially regulate ADAMTS1 gene expression under normoxic and hypoxic conditions in hepatoma cells. *Gene*, 575(1), 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.035>
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. ve Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 92(12), 5510-5514. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>

- Wang, R., Jin, F. ve Zhong, H. (2014). A novel experimental hypoxia chamber for cell culture. *American Journal of Cancer Research*, 4(1), 53-60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Woo, K. J., Lee, T. J., Park, J. W. ve Kwon, T. K. (2006). Desferrioxamine, an iron chelator, enhances HIF-1 α accumulation via cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.116>
- Wu, D. ve Yotnda, P. (2011). Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture. *Journal of Visualized Experiments*, 54, e2899. <https://dx.doi.org/10.3791/2899>
- Yeo, E. J. (2019). Hypoxia and aging. *Experimental & Molecular Medicine*, 51, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0233-3>
- Yu, T., Tang, B. ve Sun, X. (2017). Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. *Yonsei Medical Journal*, 58(3), 489-496. <https://doi.org/10.3349/ymj.2017.58.3.489>
- Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T. ve Millhorn, D. E. (2003). Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-inducible Factor- and von Hippel-Lindau 112 Protein by Direct Binding to Hypoxia-inducible Factor- α . *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15911–15916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300463200>
- Zimna, A. ve Kurpisz, M. (2015). Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/549412>