

**HİPOKSİ KOŞULLARDA  
KANSER HÜCRELERİNİN  
GLUKOZ METABOLİZMASI  
VE APOPTOZUNUN İNCELENMESİ**

**Doktora Tezi  
Yüksel ÖĞÜNÇ KEÇECİ  
Eskişehir 2021**

**HİPOKSİ KOŞULLARDA KANSER HÜCRELERİNİN GLUKOZ  
METABOLİZMASI VE APOPTOZUNUN İNCELENMESİ**

**Yüksel ÖĞÜNÇ KEÇECİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof.Dr. Zerrin SELLER**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Mayıs 2021**

*Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1809S298 no.lu ve 1905S059 no.lu projeler kapsamında desteklenmiştir.*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Yüksel ÖĞÜNÇ KEÇECİ'nin "Hipoksi Koşullarda Kanser Hücrelerinin Glukoz Metabolizması ve Apoptozunun İncelenmesi" başlıklı tezi 05/05/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Zerrin SELLER	.....
Üye : Prof. Dr. İlknur DAĞ	.....
Üye : Prof. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU	.....
Üye : Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR	.....
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Seda Mehtap SARI KILIÇASLAN	.....

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN  
Enstitü Müdürü

*Ailem'e...*

## ÖZET

### HİPOKSİ KOŞULLARDA KANSER HÜCRELERİNİN GLUKOZ METABOLİZMASI VE APOPTOZUNUN İNCELENMESİ

Yüksel ÖĞÜNÇ KEÇECİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2021

Danışman: Prof. Dr. Zerrin SELLER

Kanser hücrelerinin birçoğu “*Warburg etkisi*” olarak adlandırılan normoksik koşullar altında bile daha çok hızlandırılmış glikolizle enerji üretmekte ve laktik asit fermantasyonu yapmaktadır. Apoptoz mekanizmasının tetiklenmemesi için yeniden programlanmış metabolizmadan faydalanırlar. Tez kapsamında, insan akciğer karsinoma hücreleri (A549), 5 mM glukoz (Gli 5), 25 mM glukoz (Gli 25) ve 10 mM galaktoz içeren (OKSFOS/aglisemik) normoksik ya da hipoksik ortamda inkübe edilerek, biyoenerjetik yolu ve apoptoz mekanizması incelenmiştir. HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonun 4. saatte maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Hem normoksi hem de hipoksi koşullarda glikolitik hücrelerin OKSFOS hücrelerine göre yaklaşık 20 kat fazla laktat ürettiği ve daha yüksek p-PDH/PDH oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Hipoksi ortamda inkübe edilen hücrelerde metabolik koşullardan bağımsız olarak, sitrat sentaz aktivitesinin normoksi ortama göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Gli 5 ve Gli 25 hücrelerinin normoksi altında ATP üretiminin hipoksideki Gli 5 ve Gli 25 hücrelerine göre daha fazla olduğu görülmüştür. OKSFOS hücreleri ise hipokside daha fazla ATP üretimi sergilemiştir. Hipoksi koşulda aglisemik OKSFOS hücrelerinin erken apoptoz (%15.5 $\pm$ 7.1), kaspaz-3 (%6.1 $\pm$ 0.9), kaspaz-9 (%30.4 $\pm$ 0.9) aktivitesinde ve sitokrom c ekspresyon seviyesinde artış olurken, mitokondriyel membran potansiyelinde (%51.9  $\pm$ 0.4) düşüş tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda HIF-1 $\alpha$  tarafından düzenlenen yeniden metabolik programlamaya rağmen aglisemik ortamda oksidatif fosforilasyonun işlevsel hale geldiği ve apoptozun tetiklendiği belirlenmiştir. Bu veriler terapötik müdahalede hedeflerin belirlenebilmesi açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Warburg etkisi, Hipoksi, HIF-1 $\alpha$ , Apoptoz.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF GLUCOSE METABOLISM AND APOPTOSIS OF CANCER CELLS UNDER HYPOXIA CONDITIONS

Yüksel ÖĞÜNÇ KEÇECİ

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, May 2021

Supervisor: Prof. Dr. Zerrin SELLER

Many of the cancer cells produce energy with accelerated glycolysis and perform lactic acid production even under normoxic conditions called "Warburg effect". They benefit from reprogrammed metabolism so that the apoptosis mechanism is not triggered. In this thesis, human lung carcinoma cells (A549) were incubated in normoxic and hypoxic environment containing 5 mM glucose (Gli 5), 25 mM glucose (Gli 25) and 10 mM galactose (OXPHOS/aglycemic), and the bioenergetic pathway and apoptosis mechanism were investigated. It was determined that HIF-1 $\alpha$  stabilization reached the maximum level at the 4<sup>th</sup> hour. It has been found that glycolytic cells produce approximately 20 times more lactate than OXPHOS cells under both normoxia and hypoxia conditions and have a higher p-PDH/PDH ratio. It has been determined that citrate synthase activity in hypoxia of all metabolic conditions is lower than normoxia. It has been determined that Gli 5 and Gli 25 cells have more ATP production under normoxia than Gli 5 and Gli 25 cells in hypoxia. OXPHOS cells showed more ATP production in hypoxia. In hypoxia condition, aglycemic OXPHOS cells increase in early apoptosis (15.5%  $\pm$  7.1), caspase-3 (6.1%  $\pm$  0.9), caspase-9 (30.4%  $\pm$  0.9) activities and high cytochrome c expression level, while a decrease has been detected in mitochondrial membrane potential (51.9% $\pm$ 0.4). As a result of this study, it was determined that oxidative phosphorylation became functional in aglycemic environment and apoptosis was triggered despite the metabolic programming regulated by HIF-1 $\alpha$ . These data are important in determining targets for therapeutic intervention.

**Keywords:** Warburg effect, Hypoxia, HIF-1 $\alpha$ , Apoptosis.

## TEŞEKKÜR

Bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen, proje süresince ve bilimsel verilerin değerlendirilmesinde büyük katkısı ve emeği olan danışman hocam saygıdeğer Prof. Dr. Zerrin SELLER'e,

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı olanaklarını bizimle paylaşan Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Behiye ŞENEL'e,

Akım sitometri analizlerindeki yardımları için Dr. Şennur GÖRGÜLÜ'ye, istatistiksel analizdeki yardımı için Uzm. Fizikçi Kadri GÜLEÇ'e,

Alanı dışında olmasına rağmen tez çalışmasının hem deneysel hem de yazım aşamasında büyük katkıları ve emeği olan sevgili eşim Mustafa KEÇECİ'ye ve annesinin karnında deneylere eşlik eden, motivasyon kaynağım oğlum Kerem KEÇECİ'ye,

Her zaman olduğu gibi doktora sürecinde de desteklerini esirgemeyen sevgili aileme,

Anadolu Üniversitesi, Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezine (AÜBİBAM) ve tez çalışmasını maddi olarak destekleyen Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (AÜBAP) Komisyonu'na,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı” yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	2
2.1. Normal Hücrelerde Karbonhidrat Metabolizması.....	2
2.1.1. Normal hücrelerde glikoliz (Embden-Meyerhoff yolu) .....	2
2.2. Kanser Hücresinde Karbonhidrat Metabolizması .....	3
2.2.1. Warburg etkisi.....	3
2.2.2. Tümör stroma metabolizması .....	6
2.2.3. Kanser hücrelerinde glikolizin yeniden düzenlenmesi .....	7
2.3. Tümör Hücresi Metabolik Profiline Avantajları .....	9
2.3.1. Hızlı ATP üretimi .....	9
2.3.2. Büyüme için karbon iskeletler .....	10
2.3.3. Fitness optimizasyonu .....	11
2.3.4. ROS'un kontrolü .....	11
2.3.5. Apoptozu karşı koruma mekanizması .....	12
2.3.6. Tümör mikro çevresine uyum.....	13
2.3.7. Salgılanan laktik asidin fonksiyonel rolü .....	14
2.4. Apoptoz .....	15
2.4.1. İçsel ve dışsal apoptotik yollar .....	16
2.4.1.1. İçsel apoptotik yolda mitokondri dış membran geçirgenliği (MMP) .....	17
2.5. Hipoksik Koşullara Kanser Hücrelerinin Adaptasyonu .....	19

2.5.1. Hipoksi.....	19
2.5.1.1. <i>Hipoksi ile indüklenbilir faktör (HIF)</i> .....	20
2.5.1.1.1. <i>HIF'in yapısı</i> .....	20
2.5.1.1.2. <i>HIF-1 <math>\alpha</math>'nın degradasyon yolu ile düzenlenmesi</i> .....	22
<i>pVHL–HIF-1<math>\alpha</math> degradasyon yolağı</i> .....	23
<i>pVHL-bağımsız HIF-1<math>\alpha</math> degradasyon yolağı</i> .....	23
2.5.1.1.3. <i>HIF-1a'nın transkripsiyonel düzenlenmesi</i> .....	26
<i>Normoksi altında HIF-1a transkripsiyon mekanizmaları</i> .....	26
<i>Hipoksi altında HIF-1a transkripsiyon mekanizmaları</i> .....	26
2.5.1.1.4. <i>HIF hedef genleri</i> .....	28
<i>HIF-1a ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesi</i> ..	30
<i>HIF-1a ve apoptozun düzenlenmesi</i> .....	31
3. GEREÇLER .....	33
3.1. Kimyasal Maddeler ve Gereçler .....	33
3.2. Kullanılan Cihazlar .....	36
4. YÖNTEMLER.....	38
4.1. Hücre Kültürü .....	38
4.1.1. 5 mM ve 25 mM glukoz içeren büyüme ortamının hazırlanması .....	38
4.1.2. 10 mM galaktoz içeren büyüme ortamının hazırlanması .....	38
4.1.3. A549 hücrelerinin kültür ortamına alınması.....	38
4.1.4. Hücrelerin pasajlanması .....	39
4.2. Western Blot Analizi.....	39
4.2.1. Total protein lizatı hazırlanması.....	39
4.2.2. Örneklerin jelle yüklenmesi ve jelde yürütülmesi .....	40
4.2.3. Yarı ıslak transfer yöntemiyle proteinlerin membrana aktarılması ..	41
4.2.4. Membranların bloklanması ve antikor eklenmesi .....	41
4.2.5. Birincil ve ikincil antikorların membrandan uzaklaştırılması .....	42
4.3. L-Laktat Analizi .....	44
4.4. Sitrat Sentaz Aktivitesinin Ölçümü.....	44
4.5. ATP Analizi.....	45
4.6. Anneksin V-FITC/PI Yöntemi .....	46
4.7. Mitokondriyal Membran Potansiyel (MMP) Ölçümü.....	46

4.8. Kaspaz-9 Aktivitesinin Belirlenmesi .....	46
4.9. Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi .....	47
4.10. İstatistiksel Analiz .....	47
5. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	48
5.1. Hücre Kültüründe Metabolik Koşulların Oluşturulması .....	48
5.2. HIF-1 $\alpha$ 'nın stabilizasyonu.....	49
5.3. p-PDH/PDH ekspresyonunun değerlendirilmesi .....	52
5.4. L-laktat Analizi .....	55
5.5. Sitrat Sentaz Aktivitesi .....	57
5.6. ATP Analizi.....	58
5.7. Annexin V-FITC/PI ile Apoptoz Tayini.....	62
5.8. Mitokondrial Membran Potansiyelinin (MMP) Belirlenmesi .....	67
5.9. Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi .....	74
5.10. Kaspaz-9 Aktivitesinin Belirlenmesi .....	81
5.11. Apoptotik Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi .....	86
6. SONUÇ .....	97
KAYNAKÇA .....	100
ÖZGEÇMİŞ	

## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 3.1.</b> Kimyasal ve sarf malzemeler .....	33
<b>Tablo 3.2.</b> Kullanılan cihazlar .....	36
<b>Tablo 4.1.</b> Deneysel metabolik ortamlar .....	38
<b>Tablo 4.2.</b> %12'lik ayırıcı jelin hazırlanması .....	40
<b>Tablo 4.3.</b> %5'lik paketleyici jelin hazırlanması .....	40
<b>Tablo 4.4.</b> Reaksiyon karışımının hazırlanması .....	44
<b>Tablo 5.1.</b> 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin apoptoz analizinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı .....	63
<b>Tablo 5.2.</b> 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin apoptoz analizinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı .....	64
<b>Tablo 5.3.</b> 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin MMP analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı .....	68
<b>Tablo 5.4.</b> 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin MMP analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı .....	70
<b>Tablo 5.5.</b> 72 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin MMP analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı .....	72
<b>Tablo 5.6.</b> 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin kaspaz-3 analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı .....	75
<b>Tablo 5.7.</b> 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin kaspaz-3 analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı .....	77
<b>Tablo 5.8.</b> 72 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin kaspaz-3 analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı .....	79
<b>Tablo 5.9.</b> 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin kaspaz-9 analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı .....	82
<b>Tablo 5.10.</b> 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin kaspaz-9 analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı .....	84

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Normal diferansiye ve tümör/çoğalan dokuların enerji metabolizması.....	4
Şekil 2.2. Tümör içi hipoksi ve metabolik simbiyoz.....	6
Şekil 2.3. Kaspazların yapısı.....	16
Şekil 2.4. Apoptotik yollar.....	17
Şekil 2.5. Bcl-2 ailesi proteinleri.....	18
Şekil 2.6. Doğrudan ve dolaylı aktivasyon modeli.....	19
Şekil 2.7. HIF-1 $\alpha$ alan yapıları ve potansiyel işlevleri.....	22
Şekil 2.8. HIF-1 $\alpha$ bozulmasını düzenleyen yollar a) pVHL ve oksijen bağımlı ve b) pVHL'den ve oksijenden bağımsız.....	25
Şekil 2.9. HIF-1 $\alpha$ translasyonunu düzenleyen önemli yollar.....	27
Şekil 2.10. HIF-1 $\alpha$ tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilen hedef genler.....	29
Şekil 2.11. HIF-1 $\alpha$ 'nın glikoliz ve oksidatif fosforilasyon üzerine hedef genleri.....	31
Şekil 4.1. Blotlama sisteminin kurulması.....	41
Şekil 4.2. Western blot yöntemi şematik gösterimi.....	43
Şekil 5.1. Glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin hipoksik (%1 O <sub>2</sub> ) ortamda 2, 4 veya 6 saat inkübasyonu sonrası HIF-1 $\alpha$ protein ekspresyon seviyesi.....	50
Şekil 5.2. Glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin hipoksik (%1 O <sub>2</sub> ) ortamda 2, 4 veya 6 saat inkübasyonu sonrası HIF-1 $\alpha$ protein ekspresyon seviyesine ait dansitometrik analiz sonuçları.....	50
Şekil 5.3. Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin p-PDH ve PDH protein ekspresyon seviyesi.....	52
Şekil 5.4. Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin p-PDH/PDH protein ekspresyon oranının western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	53

<b>Şekil 5.5.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin p-PDH ve PDH protein ekspresyon seviyeleri.....	54
<b>Şekil 5.6.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin p-PDH/PDH protein ekspresyon oranının western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	54
<b>Şekil 5.7</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 72 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin L-laktat analiz sonuçları.....	57
<b>Şekil 5.8.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 72 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin sitrat sentaz aktivitesi analiz sonuçları.....	58
<b>Şekil 5.9.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 72 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin ATP analiz sonuçları.....	60
<b>Şekil 5.10.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları.....	62
<b>Şekil 5.11.</b>	24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre erken apoptotik hücre (%) dağılımı.....	63
<b>Şekil 5.12.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları.....	64
<b>Şekil 5.13.</b>	48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre erken apoptotik hücre (%) dağılımı.....	65
<b>Şekil 5.14.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin MMP analiz sonuçları.....	68
<b>Şekil 5.15.</b>	24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre depolarize MMP (%)	69

	dağılımı.....	
<b>Şekil 5.16.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin MMP analiz sonuçları.....	70
<b>Şekil 5.17</b>	48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre depolarize MMP (%) dağılımı.....	71
<b>Şekil 5.18.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 72 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin MMP analiz sonuçları.....	72
<b>Şekil 5.19.</b>	72 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre depolarize MMP (%) dağılımı.....	73
<b>Şekil 5.20.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin kaspaz-3 analiz sonuçları.....	75
<b>Şekil 5.21.</b>	24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre kaspaz-3 aktivitesi (%) .....	76
<b>Şekil 5.22.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin kaspaz-3 analiz sonuçları.....	77
<b>Şekil 5.23.</b>	48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre kaspaz-3 aktivitesi (%).....	78
<b>Şekil 5.24.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 72 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin kaspaz-3 analiz sonuçları.....	79
<b>Şekil 5.25.</b>	72 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre kaspaz-3 aktivitesi (%).....	80
<b>Şekil 5.26.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin kaspaz-9 analiz sonuçları.....	82
<b>Şekil 5.27.</b>	24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre kaspaz-9 aktivitesi (%).....	83

<b>Şekil 5.28.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin kaspaz-9 analiz sonuçları.....	84
<b>Şekil 5.29.</b>	48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre kaspaz-9 aktivitesi (%)......	85
<b>Şekil 5.30.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bax, Bid, Smac, XIAP ve sitokrom c protein ekspresyonu western bulgular.....	87
<b>Şekil 5.31.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bax, Bid, Smac, XIAP ve sitokrom c protein ekspresyonu western bulguları.....	88
<b>Şekil 5.32.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bax protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	88
<b>Şekil 5.33.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bax protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	89
<b>Şekil 5.34.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bid protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	90
<b>Şekil 5.35.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bid protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	90
<b>Şekil 5.36.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Smac protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	91
<b>Şekil 5.37.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Smac protein	92



	ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	
<b>Şekil 5.38.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin XIAP protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	93
<b>Şekil 5.39.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin XIAP protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	93
<b>Şekil 5.40.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin sitokrom c protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	94
<b>Şekil 5.41.</b>	Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin sitokrom c protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları.....	95

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

4E-BP1	: 4E bağlanma proteini
A549	: İnsan akciğer karsinoma epitelyal hücre hattı
ADM	: Adrenomedullin
ADP	: Adenozin difosfat
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AK3	: Adenilat kinaz 3
AKT	: Aktif serin/treonin-spesifik protein kinaz
ALDA	: Aldolaz A
AMF	: Otokrin motilite faktörü
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: AMP ile aktive edilmiş protein kinaz
ANOVA	: Varyans analizi
AP-1	: Aktivatör protein-1
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ARD1	: Arrest-defective-1
ARNT	: Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin trifosfat
Bad	: Bcl-2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti
Bax	: Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	: B-hücre lenfoma-2
Bcl-xl	: B-hücre lenfoma proteini
BH	: Bcl-2 homoloji bölgeleri
bHLH	: Temel sarmal ilmik sarmal
Bid	: BH3 etkileşim alan ölüm agonisti
Bim	: Bcl-2-benzeri protein 11
BNIP	: Bcl-2 ondokuz kDa etkileşme protein 3
BSA	: Sığır serum albümini
CA9	: Karbonik anhidraz 9
CATHD	: Katepsin D

CD47	: Farklılaşma kümesi 47
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
C-TAD	: C –terminal aktivasyon bölgesi
DD	: Ölüm bölgesi
DEVD	: Aspartik asit-glutamik asit-valin-aspartik asit peptidi
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
DISC	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
eIF-4E	: Ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 4E
EMT	: Epitel-mezenkimal geçiş
ENG	: Endoglin
ENO1	: Enolaz 1
EPO	: Eritropoietin
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
ET1	: Endotelin-1
ETS	: Elektron transport sistemi
FADD	: Fas ilişkili ölüm alanı
FBS	: Fötal Sığır Serum
FITC	: Floresanizasiyanat
FN1	: Fibronektin 1
FOXO4	: Forkhead box protein O4
GAPDH	: Gliseraldehit-3-P-dehidrojenaz
GDH	: Glutamat dehidrojenaz
Gli	: Glikolitik
GLUT	: Glukoz taşıyıcı
GSK3 $\beta$	: Glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$
HepG2	: İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
HIF-1 $\alpha$	: Hipoksi ile indüklenebilen faktör-1 $\alpha$
HK	: Heksokinaz
HRE	: Hipoksi cevap elemanı

HSP90	: Isı şoku proteini 90
IGF2	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGF-BP	: IGF-faktör bağlayıcı protein
ITF	: Bağırsak yonca faktörü
kDa	: Kilodalton
KRT14/18/19	: Keratin 14/18/19
LDH	: Laktat dehidrojenaz
LDHA	: Laktat dehidrojenaz A
LEP	: Leptin
LRP1	: LDL-reseptörü ile ilişkili protein 1
MAPK	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MCT	: Monokarboksilat taşıyıcı
MDR1	: Çoklu ilaç direnci 1
MMP	: Mitokondriyal membran potansiyeli
MMP2	: Matris metaloproteinaz 2
MNK	: MAPK sinyal entegre edici kinaz
mRNA	: Mesajcı RNA
mTOR	: Memeli Rapamysin hedef reseptörü
NAD <sup>+</sup>	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit-hidrojen
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NOS2	: Nitrik oksit sentaz 2
ns	: Non-significant (istatistiksel olarak anlamlı olmayan)
ODDD	: Oksijen bağımlı degradasyon domain
OKSFOS	: Oksidatif fosforilasyon
p değeri	: Anlamlılık değeri
PAI1	: Plazminojen-aktivatör 1
PBS	: Fosfat tamponlu tuz
PC	: Piruvat özel taşıyıcı
PDH	: Piruvat dehidrojenaz
PDHK	: Piruvat dehidrojenaz kinaz
PDK1	: Fosfatidilinozitol bağımlı kinaz 1

PERK	: Protein kinaz RNA (PKR) benzeri endoplazmik retikulum (ER) kinaz
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PFK	: Fosfofruktokinaz
PFKFB3	: 6-fosfofrukto-2-kinaz /fruktoz-2:6-bifosfat-3
PGK 1	: Fosfogliserat kinaz 1
pH	: Hidrojen iyonu derişiminin negatif logaritması
PHD	: Prolil hidroksilaz
PI3K	: Fosfatidilinozitol 3 kinaz
PK	: Piruvat kinaz
PKM	: Piruvat kinaz M
PVDF	: Polivinil florür
pVHL	: von Hippel Lindau proteini
RIPA	: Radyoimünopresipitasyon test tamponu
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPMI 1640	: Roswell Park Memorial Institute 1640 ortamı
S.E.M	: Standart hata
SDH	: Süksinat dehidrojenaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS- PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez
TAD	: Terminal aktivasyon domain
TBS-T	: Tris-Buffered Saline-Tween 20
TCA	: Trikarboksilik asit döngüsü
TEMED	: N, N, N',N'-Tetrametiletildiamin
TGF- $\alpha$	: Dönüştürücü büyüme faktörü- $\alpha$
TGF- $\beta$ 3	: Dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$ 3
TMB	: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptör
TPI	: Triosefosfat izomeraz
TRADD	: TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteini

TRAIL	: TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
Tris-HCl	: Tris-HCl çözeltisi
UPAR	: Ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü
UPR	: Katlanmamış protein cevabı
VDAC	: Gerilime bağlı anyon kanalı
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
VIM	: Vimentin
XIAP	: X'e bağlı apoptoz inhibitör proteini

## 1.GİRİŞ

Normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde bölünmeye devam eder. Kanser hücreleri, programlanmış hücre ölümü veya organizmanın yüksek miktarda farklılaşma kümesi 47 (CD47) üreterek işlevini tamamlamış hücrelerin eliminasyonu olarak bilinen apoptoz mekanizmasını başlatan sinyalleri görmezden gelebilir. Kanser hücreleri, bir tümörü çevreleyen ve besleyen normal hücreleri, molekülleri ve kan damarlarını (tümör mikroçevresi) etkileyebilir (Gatenby ve Gillies, 2004). Örneğin, tümörün büyümesi için gereken oksijen ve besinleri sağlayan kan damarlarının oluşması için normal hücreler indüklenir.

Kanser hücreleri metabolik faaliyetleri sırasında aerobik glikoliz tepkimelerini kullanmaktadır. Glikolizin tetiklenmesi ile birlikte, glukoz laktik aside kadar parçalanır ve tepkimelerin devamında oksijen varlığında bile laktat fermantasyonu gerçekleşmektedir. Bu duruma “Warburg Etkisi” denmektedir (Warburg, 1924; 1925). Bu etki altında kanser hücreleri, oksidatif fosforilasyondan çok daha az enerji üretir ve hücre büyümesi için çok fazla enerjiye ihtiyaç duyduğundan, bu durum paradoksal görünmektedir. Ancak, Warburg etkisi kanser hücrelerine fayda da sağlayabilir, çünkü birçok biyosentetik yol için öncü substratların sentezini sağlamaktadır. Bu öncüler, amino asit öncülerini, NADPH'yi, DNA ve RNA sentezi için riboz şekerleri içermektedir (Coller, 2014). Biyoenerjetik değişikliğin olası bir nedeni, düşük oksijen gerilimi altında hızlı büyümelerini ve çoğalmalarını desteklemek için başka metabolik son ürünler üretme gerekliliği ve toksik ortamlarda veya sitotoksik maddeler nedeniyle ölümden kaçınmak için olası adaptasyondur.

Kanser hücreleri, hipoksik bir ortamda bile hayatta kalmalarına izin veren sayısız genetik ve adaptif değişiklikler geliştirmişlerdir (Harris, 2002; Semenza vd., 2000). Bu adaptif tepkiler, hücrenin hayatta kalmasını destekleyen sinyal yollarının aktivasyonunu içerir ve büyük ölçüde transkripsiyon faktörü hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) tarafından düzenlenir (Semenza vd., 2000). Çoğu durumda HIF-1 apoptozu inhibe ederek hücrenin hayatta kalmasını sağlar (Semenza, 2003; Giaccia vd., 2003). Ancak HIF'in apoptozu indüklediğine dair bulgular da bulunmaktadır (Bacon ve Harris 2004; Greijer ve Van der Wall, 2004). Bu nedenle hipoksi yanıtında HIF-1 hücre tipine ve/veya uyarana bağlı olarak apoptozu teşvik edebilir veya apoptozu karşı koruyabilir (Fulda ve Debatin, 2007).

## **2. KAYNAK BİLGİSİ**

### **2.1. Normal Hücrelerde Karbonhidrat Metabolizması**

Karbonhidratlar diyetimizin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır ve besin yolu ile aldığımız karbonhidratın yaklaşık üçte ikisi bitkisel kaynaklı polisakkarittir. Laktoz ve sukroz gibi disakkaritler ve nişasta gibi polisakkaritler de yiyeceklerimizin bir parçasıdır, ancak glukoz, fruktoz ve galaktoz gibi serbest monosakkarit alımı nispeten azdır (Berg vd., 2006).

Kandaki glukoz konsantrasyonu üç hormon tarafından kontrol edilmektedir. Bu hormonlar; insülin, glukagon ve epinefrindir. Kandaki glukoz konsantrasyonu artması ile birlikte insülin hormonu pankreasın Langerhans adacıklarından salınarak, glukozun karaciğer ve kaslara transferini uyarmaktadır. Hücre içerisine alınan glukoz öncelikle glikoliz metabolizmasında substrat olarak kullanılmaktadır. Hücrenin enerji seviyesinin yüksek olduğu durumlarda ise, glukozun çoğu glikojenez mekanizması ile glikojene dönüştürülür. Sentezlenen glikojen, karaciğerde ve kasta depolanmaktadır.

#### **2.1.1. Normal hücrelerde glikoliz (Embden-Meyerhoff yolu)**

Glikoliz, hayvanlarda ve bitkilerde glukoz katabolizması için evrensel bir yol olup, organizmadaki tüm hücrelerde meydana gelmektedir. Glikoliz tepkimeleri ile bir glukoz molekülü iki pirüvik asit molekülüne dönüştürülür ve salınan enerji ATP ve eşdeğer nikotinamid adenin dinükleotit hidrojen (NADH) şeklinde korunmaktadır. Glikolizin temel işlevi veya amacı, diğer metabolik yollar için enerji ve ara ürünler sağlamaktır. Glikoliz için başlıca glukoz kaynakları, günlük karbonhidratlar ve hücrenel glikojendir. Glikoliz metabolizmasının ilk evresinde ATP enerjisi kullanılmaktadır, ancak son beş tepkime dizisi sonrasında ise ATP üretimi meydana gelmektedir. Sitoplazmada meydana gelen glikolizde (normal hücreler), bir glukoz molekülünün yıkımı ile birlikte 2 ATP ve 2 NADH ve iki piruvat molekülü sentezlenmektedir. Oksijen varlığında, piruvat dehidrojenaz enzim kompleksinin yardımıyla iki piruvat molekülü, iki Asetil-CoA molekülüne dönüştürülmektedir. Asetil-CoA'lar, trikarboksilik asit döngüsünün (TCA) substratı olarak kullanılmak üzere mitokondri matriksine giriş yapar.



## **2.2. Kanser Hücresinde Karbonhidrat Metabolizması**

Kanser, vücuttaki hücrelerin tümör adı verilen hücre yığınlarını oluşturmak üzere kontrolsüz bölünmesinden kaynaklanan bir hastalık durumudur. Vücutta birçok farklı hücre türü ve farklı hücre türlerinden kaynaklanan birçok farklı kanser türü bulunmaktadır (Hatzivassiliou vd., 2005). Kanser hücreleri kontrolsüz çoğalmaya devam edip, belli bir büyüklüğe ulaşan tümör kitlesi metastaz mekanizması ile vücudun diğer organlarına yayılma yeteneğine sahiptir.

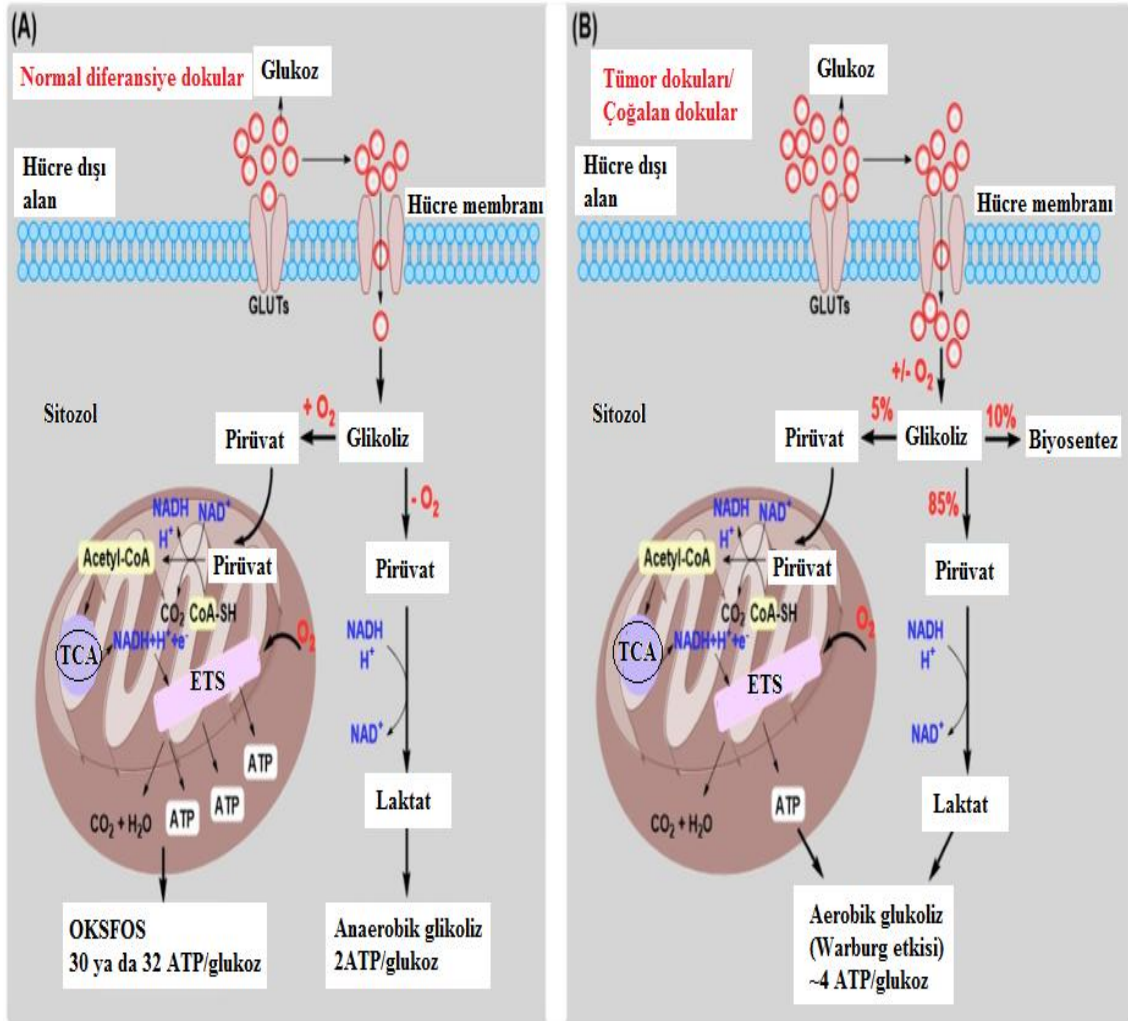
Bir hücrenin deoksiribonükleik asidinin (DNA), risk faktörleri olarak bilinen obezite, ailesel yatkınlık, sigara, yaş ve güneş ışığı gibi bazı faktörlerden zarar gördüğü ve bunun sonucunda hücrenin hasarlı DNA'yı onaramadığı bir durumda, normal programlanmış hücre büyümesini kontrol edememesi kanser oluşumuna neden olmaktadır. Her durumda, tam olarak ne tür bir kanserin geliştiğini ne kadar büyüdüğünü, yayılıp yayılmadığını ve genellikle tedaviye ne kadar iyi yanıt verdiğini bilmek önemlidir.

Kanser hücreleri enerji kaynağı olarak kullandıkları ATP'yi üretmek için "hücre solunum"dan çok verimsiz glikolize "geçiş yaparlar". Oldukça enerji gerektiren dokular olan tümörlerin çok verimsiz enerjiye geçmesi şaşırtıcıdır. Normal hücrelerde gerekenden daha hızlı glikolizden geçerek bu enerji ihtiyacını karşılarlar (Fadaka vd., 2017).

### **2.2.1. Warburg etkisi**

Hızlı büyüyen kanser hücreleri normal hücrelerden daha fazla enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Normal hücrelerin aksine kanser hücreleri ihtiyacı olan enerjinin büyük bir kısmını, ilkel ve verimsiz bir reaksiyon olan aerobik glikoliz tepkimelerinden sağlamaktadır. Otto Warburg'un 1920'lerdeki öncü çalışması, tümör hücrelerinin değişmiş metabolizma sergilediğini ortaya koymuştur. Warburg, normal hücrelerde ve tümör hücrelerinde farklı enerji üretim modlarının göreceli kullanımı arasında önemli bir ayrım olduğunu keşfetmiştir. Normal dokularda glikoliz tepkimeleri sonucunda oluşan pirüvatın çoğu TCA döngüsüne katılır ve oksidatif fosforilasyon yoluyla oksitlenir. Tümörlerde, pirüvat büyük ölçüde laktik aside dönüşerek enerji anaerobik olarak üretilmektedir (Warburg, 1956). Warburg, normal oksijen basıncı koşullarında, normal hücrelerin enerjilerinin çoğunu mitokondriyal solunum yoluyla ürettiğini

gözlemlemiştir. Bunun aksine, kanser hücresi enerjisinin %50'den fazlasını, sitozolde glikoliz yoluyla üretilirken, geri kalanı mitokondriyal solunum zincirinden elde edilmektedir. Kanser hücreleri, önemli ölçüde daha fazla ATP/glukoz (yaklaşık 36 ATP/glukoz) üreten solunum yerine, ATP sentezinin verimsiz glikolitik modunu (2 ATP/glukoz) kullanmaktadır. Buna ek olarak, pirüvatın oksitlenmesi yerine laktata dönüştürüldüğü ve metabolizmadaki bu değişim, mitokondriyal işlevi desteklemek için yeterli oksijen olduğunda bile tümörlerde meydana gelmektedir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Normal diferansiye (A) ve tümör/çoğalan dokuların (B) enerji metabolizması (Fan vd., 2019)

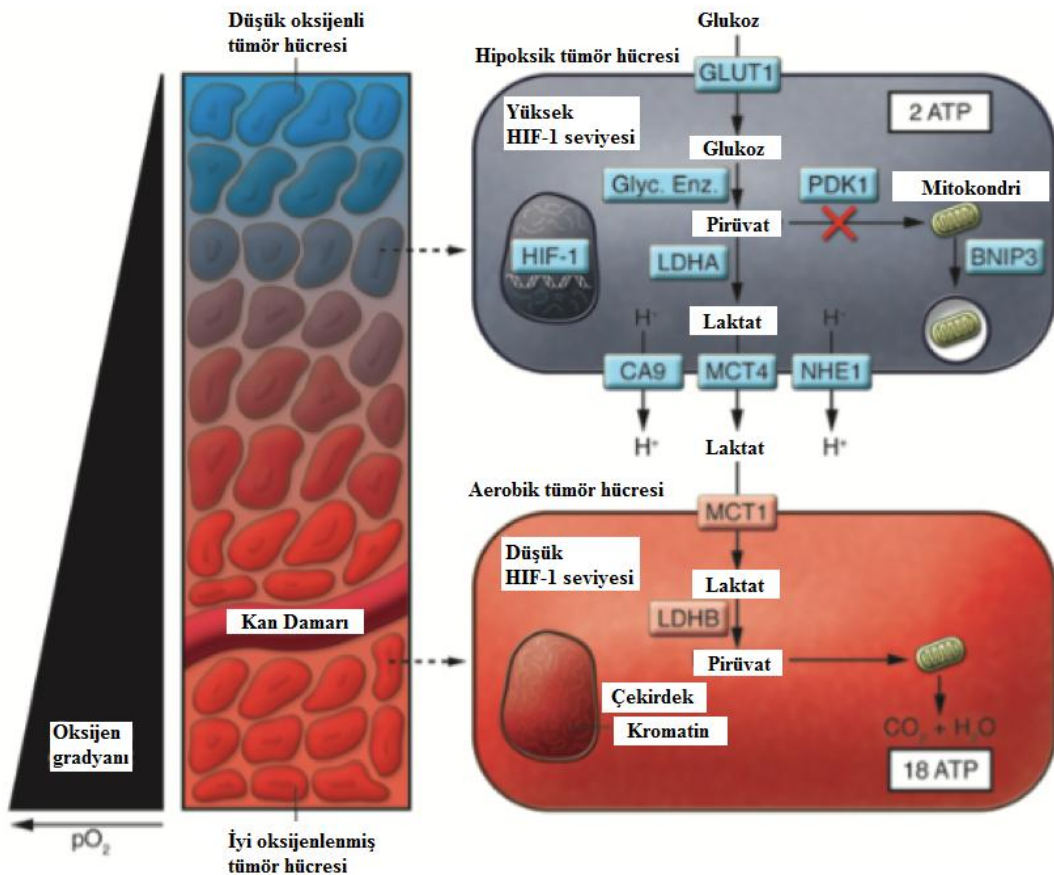
Warburg, kanser hücrelerinde solunumdan aerobik glikolize geçişin kusurlu mitokondriyal solunumu yansıttığını varsaymaktadır. Tümör hücreleri genel olarak oksidatif fosforilasyon mekanizması sırasında özellikle ATP sentaz enziminin  $\beta$ -F1 alt birimi gibi ilgili genlerin ekspresyonunu baskılama eğilimindedir (Simonnet vd., 2002; Lopez-Rios vd., 2007). Ayrıca, *in vivo* tümör büyümesinde glikolitik fenotipin önemini mitokondriyal bileşenlerin seviyelerinin modüle edildiği deneyler ile büyük ölçüde

güçlendirmiştir (Sanchez-Arago vd., 2010). Tümörlerdeki yüksek glikolitik oranları ve mitokondriyal anormalliklerin fonksiyonel önemi ile ilgili bulgular tümörlerdeki ATP miktarının çoğunu glikoliz yolu ile oluşturduğu yönündedir (Coller, 2014).

Bununla birlikte, bu model birkaç nedenden dolayı yeniden değerlendirilmektedir. Birinci olarak, son yapılan deneysel çalışmalar bazı tümör hücre tiplerinde oksidatif metabolizmanın gerçekleştiği gösterilmiştir (Rodriguez-Enriquez vd., 2006; Guppy vd., 2002; Sotgia vd., 2011). Bu çalışmalarda, solunum olayının tümör mitokondrilerinde arttığı belirlenmiştir (Rodriguez-Enriquez vd., 2006; Moreno-Sanchez vd., 2009). Yapılan bir çalışmada, glikoliz metabolizması Warburg'un bulgularıyla tutarlı olarak bazı kanser hücreleri için ATP'nin %50 ila %70'ine katkıda bulunduğu, ancak diğer hücre dizilerinde ise hücre ATP'nin %10'u kadar az olduğu görülmüştür (Moreno-Sanchez vd., 2009). Ayrıca, mitokondriyal aktivitenin ve oksidatif fosforilasyonun tümör büyümesini desteklediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Fogal vd., 2010; Yu vd., 2007). Özellikle, mitokondriyal sitrat taşıyıcısının aşırı ekspresyonunun, ksenograft modellerinde tümör büyümesini artırdığı, glikolizi artıran mitokondriyal sitrat taşıyıcısının inhibisyonunun aslında tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir (Catalina-Rodriguez vd., 2012). Böyle bir modeli destekleyen bazı insan ve kemirgen tümörleri, oldukça spesifik solunum inhibitörlerine neden olduğu ölüme duyarlıdır (Moreno-Sanchez vd., 2009).

Warburg etkisi, bir tümör içindeki bazı hücrelerin laktik asit salgılamaktan ziyade tükettiğini iddia eden araştırmacılar tarafından da yeniden değerlendirilmektedir. Laktik asit geri dönüşümü normal fizyolojik koşullarda meydana gelir, çünkü kasılan iskelet kası karaciğere laktik asit sağlamaktadır. Karaciğer, laktik asidi kan dolaşımına salınan ve kas tarafından kullanılan glukozu geri dönüştürmek için glikoneogenez metabolizmasını kullanmaktadır. Tümör mikro ortamı ise heterojendir, aerobik ve hipoksik bölgeler içerirler ve bu dokularda oksijen gradyanı varlığı kabul edilmiş bir gerçektir. Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi, kan damarını çevreleyen tümör hücreleri iyi oksijenlenirken, kan damarından daha uzakta bulunan tümör hücreleri zayıf bir şekilde oksijenlenir (Semenza, 2008). Son zamanlarda, kanser hücrelerinin hipoksik ve aerobik bölgeleri arasında bir "metabolik simbiyoz" varlığı gösterilmiştir (Semenza, 2008; 2009). Glikoliz yoluyla, hipoksik hücrelerden üretilen laktat salgılanır ve salgılanan bu laktat monokarboksilat taşıyıcıları-1 (MCT1) aracılığıyla aerobik kanser hücreleri tarafından alınır ve LDH-B tarafından piruvata dönüştürülür. Tümör hücrelerinde

pirüvat daha sonra ATP üretmek amacı ile OKSFOS'a maruz kalır. Bu mekanizma ile hipoksik kanser hücresi hayatta kalma için daha fazla glukoz alır. Bir tümör içindeki aerobik hücrelerin yakıt olarak laktik aside dayanması, kesinlikle ona ihtiyaç duyan hipoksik hücreler için mevcut glukozu korumak amaçlıdır (Sonveaux vd., 2008). Bununla birlikte, MCT1 inhibe edildiğinde, aerobik kanser hücreleri laktatı daha fazla alamaz, glukoz için hipoksik kanser hücreleriyle rekabet edemez ve hipoksik kanser hücrelerini yeterli glukoz kullanımından kurtaramaz. Bu nedenle, MCT1 inhibitörü potansiyel olarak hedeflenen bir kemoterapötik ajan olarak hareket edebilir. Glikoliz ve/veya mitokondriyal metabolizma kanser hücrelerini veya komşu stromal hücrelerde katabolizmayı hedefleyen ilaçlar, tümör ilerlemesini ve metastazı inhibe etmede etkili olacaktır (Kalyanaraman, 2017).



Şekil 2.2. Tümör içi hipoksi ve metabolik simbiyoz (Semenza, 2008)

### 2.2.2. Tümör stroma metabolizması

Tümör hücrelerinin yanı sıra konak dokudaki, stroma içindeki hücrelerin de aerobik glikoliz ile enerjilerini sağladıkları öne sürülmüştür. Stromal hücreler, örneğin,

tümör mikro ortamındaki fibroblastlar, malign transformasyonu ve metastazı aktif olarak destekleyebilir (Orimo vd., 2005; Karnoub vd., 2007). Tümör stromasının glikolitik olduğu ve stromal hücrelerin laktat salgılayan MCT eksprese ettiği, buna karşın tümör hücrelerinin oksidatif metabolizma gerçekleştirdiği ve laktat tüketen taşıyıcıları eksprese ettiği hipotezi öne sürülmüştür (Whiteaker-Menezes vd., 2011; Martinez-Outschoom vd., 2011). Önerilen model, tümör büyümesinin daha sonra kanser hücreleri tarafından alınan ve oksidatif fosforilasyon için kullanılan stromal hücreler tarafından sağlanan laktat, ketonlar ve glutamin tarafından tetiklenmesidir. Tümörler tarafından gözlemlenen PET aviditesinin, kanser hücrelerinin kendileri yerine yakındaki stromal ve inflamatuvar hücreler tarafından 2-deoksi-glukoz alımını yansıttığı ileri sürülmüştür (Sotgia vd., 2011). Bu model, ters Warburg etkisi olarak adlandırılmıştır, çünkü artan glikoliz tümör hücrelerinden ziyade çevredeki stromal hücrelerde meydana gelmektedir (Martinez-Outschoom vd., 2011). Bu açıdan kanser, konakçı organizmadan enerji açısından zengin metabolitleri kullanabilen parazitik bir hastalık olarak görülmektedir (Martinez-Outschoom vd., 2010; 2011).

### **2.2.3. Kanser hücrelerinde glikolizin yeniden düzenlenmesi**

Kanser hücreleri, glikolitik akışı düzenleyen mekanizmalardan farklı stratejiler kullanarak kaçmaktadır. Tümörlerde birçok farklı glikolitik enzimin seviyeleri indüklenmektedir. Plazma zarındaki glukoz taşıyıcıları (GLUT1 ve GLUT3) aşırı eksprese edilmekte ve Heksokinaz izoform II (HK II), voltaja bağlı anyonik kanal (VDAC) yoluyla mitokondri ile etkileşime girmektedir. Fosfofruktokinaz (PFK), L- ve P- izoformlarının baskınlığı nedeniyle aşırı aktiftir. Aşırı eksprese edilmiş bir PFKB3, PFK'yi daha da aktive eden daha yüksek fruktoz 2,6-bifosfat seviyelerini korumaktadır. Piruvat kinazın (PK) M2 izoformu, glikolitik akışı düzenler ve hücrenin biyosentetik ihtiyaçlarını karşılamak için metabolit birikimini desteklemektedir. Laktat dehidrojenazın (LDH) M-izoformu aşırı eksprese edilir ve Piruvat özel taşıyıcısı (PC) aracılığıyla mitokondriyal matrikse taşınması azalır. Piruvat dehidrojenaz (PDH) kompleksi, aşırı eksprese edilmiş bir piruvat dehidrojenaz kinazın (PDHK) aracılık ettiği bir fosforilasyona bağlı mekanizmada inhibe edilir. Süksinat dehidrojenazdaki (SDH) mutasyonlar aktivitesini bozar ve bu şekilde mitokondriyal solunum kompleksleri I, III ve IV'ün seviyeleri azalır. Mitokondri ATP sentaz aktivitesi inhibe edici alt biriminin aşırı ekspresyonu nedeniyle kısıtlanır (Diaz-Ruiz vd., 2011).



Kanser hücreleri allosterik olarak glikolizdeki hız kontrol aşamalarını inhibe eden geri besleme mekanizmalarını bozmaktadır. Örneğin, PFK enzimi ATP tarafından inhibe edilir, hücre enerji açısından zengin olduğunda glikoliz azalmalıdır. Ancak glukoz fazla miktarda olduğunda fruktoz 6-fosfattan fruktoz 2,6-bifosfataz ile fruktoz 2,6-bifosfat oluşur ve fruktoz 2,6-bifosfat ATP-aracılı PFK enzim inhibisyonunu geçersiz kılabilir. Tümör hücrelerinde, yüksek seviyelerde glukoz transportu ve heksokinaz aktivitesi PFK'yi allosterik olarak aktive eden yüksek fruktoz 2,6-bifosfat seviyelerine yol açar (Czernin ve Phelps, 2002; Medina ve Owen, 2002; Reske vd., 1997; Bustamante ve Pedersen, 1977; Marin-Hernandez vd., 2006). Kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen spesifik PFK izozimleri, ATP tarafından allosterik inhibisyona daha az duyarlıdır ve fruktoz 2,6-bifosfat tarafından daha güçlü bir şekilde aktive edilir (Vora, 1985). Kanser hücrelerinde de PFK-FBP'leri aşırı eksprese ederek, fruktoz 2,6-bifosfat seviyelerini artırır ve böylece glikolizi tetikleyerek gerçekte var olandan daha yüksek kan şekeri seviyeleri olduğuna dair ipuçları üretirler (Atsumi vd., 2002). Bu farklı aktivasyon mekanizmalarının bir sonucu olarak, PFK enzim aktivite seviyesi kanser hücrelerinde normal dokudan çok daha yüksek bulunmaktadır (Vora vd., 1985).

Kanser hücreleri ve tümörler ayrıca PK enziminin embriyonik izoformunu (PKM2) yeniden eksprese etmektedir (Christofk vd., 2008). PKM2, diğer PK izoformlarından ayırt edilir, çünkü tirozin fosforile peptidlerle birleşerek substratı olan fosfoenolpiruvat için düşük afiniteye sahip bir dimerik forma geçişle sonuçlanır (Christofk vd., 2008; Mazurek vd., 2005). Daha az aktif olan PKM2, glikolitik metabolitlerin serin ve glisin aminoasitleri biyosentetik yolağa saptırılmasına izin vermektedir (Chaneton vd., 2012). Fosforile edilmiş PKM2 hücre çekirdeğine geçerek, histon H3'ü fosforile edebilir ve glikoliz de yer alan genlerin ekspresyonunu indükleyen bir transkripsiyonel ko-aktivatör olarak görev yapabilir (Luo vd., 2011).

Piruvatın tümörlerde salgılanan laktik aside yıkılması, laktik asit ve hücre dışına bir protonu birlikte taşıyan yüksek LDH seviyeleri ve MCT'ler ile ilişkilidir (Magrath vd., 1980; Hao vd., 2010). Burkitt lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanserinde LDH enzim seviyesi yüksek iken yumurtalık, prostat, mide ve servikal karsinomlarında artmış MCT seviyeleri tespit edilmiştir (Magrath vd., 1980; Koukourakis vd., 2003; Chen vd., 2010; Hao vd., 2010; Pinheiro vd., 2009a; 2009b). Piruvatın laktat üretimine ve oksidatif fosforilasyondan uzaklaşması, ayrıca inhibe edici PDK'ların

indüksiyonundan kaynaklanabilen piruvat dehidrojenaz kompleksinin azalmış aktivitesini yansıtmaktadır (Wigfield vd., 2008).

Tümör hücrelerinin yüksek glukoz tüketimi ve artmış laktik asit sekresyonunun tümör büyümesine katkıda bulunduğu dair önemli kanıtlar bulunmaktadır. Tip 2 diyabetli hastalarda yüksek kan şekeri seviyeleri ve pankreas, karaciğer, kolon, gastrointestinal sistem, meme ve endometriyum kanserleri geliştirme riski artmıştır (Giovannuchi vd., 2010). GLUT1 taşıyıcı sistemin, PKM2 enziminin, LDH veya PDK enzimlerinin ekspresyonunun inhibe edilmesi, ksenograft modellerinde azalmış tümör oluşumuna neden olmaktadır (Rastogi vd., 2007; Goldberg ve Sharp, 2012; McFate vd., 2008; Fantin vd., 2006). 6-fosfofrukto-2-kinaz seviyelerinin düşmesi, glikolitik akışı, yumuşak agarda büyümeyi ve farelerde tümör büyümesini baskılamaktadır (Telang, 2006). Mitokondrial H<sup>+</sup>-ATP sentazının β-katalitik alt biriminin knock down olması, daha yüksek bir glikolitik oranla sonuçlanır ve daha agresif bir tümör oluşturan fenotipe neden olduğu görülmüştür (Sanchez-Arago, 2010). Tüm bu çalışmalar, glikolitik fenotipin tümör ilerlemesi için önemini vurgulamaktadır.

Glikolitik akışı azaltmaya yönelik çoklu yaklaşımlar, potansiyel kanser tedavileri olarak kabul edilmektedir. Glikolizi engelleme veya piruvatın oksidatif yollara ve laktata dönüşümünden uzağa yönlendirilmesinin tümör büyümesini engellediğini gösteren önemli veriler bulunmaktadır (Coller, 2014).

### **2.3. Tümör Hücresi Metabolik Profilinin Avantajları**

#### **2.3.1. Hızlı ATP üretimi**

Tümör hücrelerinde daha az verimli bir katabolik yol olan aerobik glikolizin güçlü bir şekilde uyarılmasının birkaç nedeni bulunmaktadır. Bunlardan biri aerobik glikolizin, ATP'yi oksidatif fosforilasyondan daha hızlı sağladığı için avantajlı olmasıdır (Guppy vd., 2002). Bununla birlikte, bazı kanser hücreleri aslında ATP'lerinin önemli bir bölümünü oksidatif fosforilasyondan geri kazanmaktadır (Guppy vd., 2002). ATP seviyelerinin veya ATP'nin çıkarılabileceği hızın aslında hücresel büyümeyi sınırlandırdığı açık değildir (Vander vd., 2009). Hızla bölünen memeli hücrelerinin bile yüksek ATP /ADP oranlarını muhafaza ettiği bulunmuştur (Christofk vd., 2008). Hücrelerin ATP'yi oluşturan katabolik yolları aktive ederek düşük ATP düzeylerini artırmasına izin veren sinyal yolları mevcuttur (Vander vd., 2009). Bu nedenlerden dolayı, hücrelerin hızlı ATP'yi geri kazanmak için aerobik glikolize geçmesinin

gerekçesi yeniden değerlendirilmekte ve Warburg etkisi için başka yorumlar önerilmektedir.

### 2.3.2. Büyüme için karbon iskeletler

Tümör hücrelerinde artan glikoliz, hücre büyümesini desteklemek için yönlendirilebilen sabit bir metabolik ara ürün kaynağı sağlamaktadır (Vander, 2009). Ayrıca, glukoz hücrenin tükettiği iki ana besinden biri olduğu için hücre büyümesi için gerekli olan tüm moleküllerin sağlanması gerekir.

Yağ asidi sentezi için gereken ATP molekülünün beş katı tek bir glukoz molekülü tarafından sağlanırken, pentoz fosfat yolu boyunca gerekli NADPH'yi üretmek için yedi glukoz molekülü gerekir (Vander vd., 2009). Mevcut glukoz tamamen verimli bir şekilde ATP'ye dönüştürülürse, mitokondride yağ asitlerinin sentezi için asetil-CoA sağlayacak herhangi bir glukoz bulunmayacaktır. NADPH, esansiyel olmayan amino asitlerin sentezi için veya nükleotitlerin oluşturulması için gerekli ribozun sentezi için glikolize yönlendirilecektir. Buna ek olarak, her bir glukoz molekülünün tam oksidasyonu, glikolizi geri besleyen ve bloke eden yüksek ATP seviyelerine neden olacaktır (Vander vd., 2009). Hızla çoğalan lenfositlerin oksidatif fosforilasyondan ziyade büyük ölçüde glikolize dayandığı gerçeği, kanser metabolizması fenotipinin, glukozu hızla çoğalmayı ve büyümeyi kolaylaştıracak şekilde mevcut yollar arasında kanalize eden metabolik profil olduğu argümanını destekleyebilir (Lunt ve Vander Heiden, 2011).

Kanser hücrelerinin amacı biyokütlelerini artırmak olsa da tükettikleri glukoz karbonlarının %90'ını salgırlar ve boşa harcarlar (Hume vd., 1978; DeBerardinis vd., 2007; Lunt ve Vander Heiden, 2011). Bu durumun birkaç olası açıklaması bulunmaktadır. Bunlardan biri hücrenin metabolik ara maddelerin, metabolit havuzlarının boyutlarını önemli ölçüde etkilemeden anabolik yollara yönlendirilmesini sağlamak için glikoliz yoluyla yüksek bir akış hızına ihtiyaç duymasındır (Lunt ve Vander Heiden, 2011; Newholme vd., 1985). Diğer bir olası açıklama ise, aslında yüksek düzeyde bir glikolitik akış elde edilmesidir. Piruvatın laktik aside dönüştürülmesiyle elde edilen NAD<sup>+</sup>'in rejenere edilmesini gerektirmektedir (Lunt ve Vander Heiden, 2011). Ayrıca salgılanan laktik asit aslında kaybolmaz. Daha önce açıklandığı gibi, aerobik tümör hücreleri, glikolitik hücreler tarafından salınan hücre



dışı laktik asidi absorbe edebilir, piruvata dönüştürebilir ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon için yakıt olarak kullanılabilir (Sonveaux vd., 2008).

### **2.3.3. Fitness optimizasyonu**

Warburg etkisini, daha basit model organizmalarda var olan bir metabolik yol kullanım modelinin bir uzantısı olarak görmektedir. Büyüme hızı, hücre boyutu ve ribozomal içerik arttıkça, genellikle daha az verimli enerji geri kazanımı ile metabolik yollara doğru ilişkili bir kayma meydana gelmektedir (Molenaar vd., 2009). Bu durum, biri üretilmesi daha pahalı olan, ancak daha fazla ATP üreten ve diğeri ise daha az enzim kullanan ancak daha az enerji üreten iki farklı katabolik yol arasında bir değiş tokuş olarak yorumlanmaktadır. Hücre dışı düşük substrat konsantrasyonlarında, hücre içi substrat miktarı da düşük olacağından verimli bir katabolik yöntem belirlenmelidir. Daha yüksek substrat konsantrasyonlarında, bileşenlerini üretmek için daha az enerji gerektiren katabolik yol daha değerli bir hal almaktadır. Bu nedenle, olası tüm ATP'nin her bir besinden geri kazanılmaması açısından savurgan bir yol gibi görünmesine rağmen yolu oluşturmak için gereken kaynaklar açısından ucuz olabilir ve aslında hücreler besin açısından zengin bir ortamda olduğunda daha arzu edilen yol olabilir. Kendi genomu ve ribozomları olan, zar potansiyelinin koruması gereken mitokondri gibi bir organelde oksidatif fosforilasyonun gerçekleşmesi, kanser hücreleri açısından bakıldığında maliyeti yüksek bir katabolik yoldur. Ancak düşük miktarda besin varlığında ise ATP'yi verimli üretmek için de faydalı bir yoldur. Besin maddeleri bol olduğunda ise glikolizin yoğun süreci tercih edilebilir. Bu nedenle, kaynaklar sınırlayıcı değilse hücreler ucuz ama görünüşte savurgan bir metabolik yolu kullanabilirler (Coller, 2014). Bu görüşlere rağmen, kanser hücrelerinin metabolik fenotipi hakkında hala cevaplanmamış sorular bulunmaktadır. Örneğin, eğer kanser hücresinin fenotipi, hücre büyümesini kolaylaştırmak için tasarlanmışsa, o zaman neden kanser hücre hatları, hücre zarının birim alanı başına daha yüksek glukoz, laktat ve glutamin akışına, daha yüksek heksokinaz aktivitesine ve normal hücrelere göre daha yüksek pentoz fosfat yol aktivitesine sahip olduğu tam olarak açıklanmamıştır (Meadows vd., 2008).

### **2.3.4. ROS'un kontrolü**

Aerobik glikoliz kullanımı, hücrelerin mitokondrinin üretimi ve sürdürülmesinde daha az enerji harcamasına izin verir ve tümör hücrelerini sınırlı oksijen koşullarında

oksidatif fosforilasyon gerçekleştirerek üretilecek Reaktif Oksijen Türlerinden (ROS) korumaktadır. Buna ek olarak, kanser hücreleri tarafından tüketilen hem glukoz hem de glutamin, hücrenin en önemli antioksidanı olan indirgenmiş glutatyonun yenilenmesi için gerekli bir kofaktör olan NADPH'yi oluşturmak üzere metabolize edilebilir (DeBerardinis vd., 2007). Pentoz fosfat yolunun ve ROS detoksifikasyonunun tümör hücresi büyümesindeki önemi, hipoksinin glikosilasyonu ve PFK inhibisyonunu indüklediği ve glikolitik ara ürünlerin pentoz fosfat yolağına yeniden yönlendirilmesine yol açtığı gösterilmiştir (Yi vd., 2012). PFK glikosilasyonunun bloke edilmesi, *in vitro* kanser hücresinin proliferasyonunu azalttığı ve *in vivo* tümör oluşumunu bozduğu bilinmektedir. Bu nedenle, ROS seviyelerinin düşürülmesi ve ROS aracılı hücre ölümüne karşı koruma, bir Warburg etkisi metabolik fenotipinin sağladığı bir avantajdır (Coller, 2014).

### **2.3.5. Apoptoza karşı koruma mekanizması**

ROS seviyelerini kontrol etmenin yanı sıra, kanser hücrelerinin aerobik glikoliz fenotipi, pro-apoptotik faktörlerin mitokondriyal permeabilite geçiş yoluyla mitokondriden salınmasını inhibe ederek onları apoptozdan koruyabilir. Bu geçiş yolunun açılmasındaki kolaylık, oksidatif fosforilasyon sırasında hidrojen iyonları iç mitokondriyal membrandan dışarı aktarılırken oluşan mitokondriyal membran potansiyeline bağlıdır. Kanser hücrelerindeki elektron taşıma zincirindeki düşük akış hızı, daha yüksek membran potansiyeline ve geçiş gözenek açıklığı için daha yüksek bir eşik değerine sahip mitokondri ile sonuçlanır ve böylece apoptozu baskılamaktadır (Michelakis vd., 2010). Kanser hücre mitokondriyelerindeki hiperpolarizasyon sonucunda piruvatın mitokondriye zorlanmasıyla tersine çevrilirse glukoz oksidasyonu artar, mitokondriyal membran potansiyeli azalır ve kanser hücreleri daha fazla hücre ölümüne uğrar (Michelakis vd., 2010). Bu nedenle, aktif elektron taşıma akışı, mitokondri aracılı hücre ölümünü kolaylaştırabilir ve kanser hücreleri kısmen solunumu en aza indirerek canlılığı koruyabilir.

Yüksek glikoliz seviyeleri ayrıca heksokinaz yoluyla apoptoza karşı koruma sağlamaktadır. Heksokinazlar, mitokondrinin dış yüzeyi ile fiziksel olarak etkileşim halinde bulunabilir (Bustamante ve Pedersen, 1977). Bazı tümör hücreleri daha yüksek heksokinaz seviyelerine ve heksokinaz ile mitokondriyal membran arasında daha sıkı bir ilişkiye sahiptir (Bustamante ve Pedersen, 1977; Marin-Hernandez vd., 2006;

Pedersen, 2007). Aktif serin/treonin-spesifik protein kinaz (AKT) ile kolaylaştırılan heksokinazın mitokondriye lokalizasyonu, apoptozu indükleyen faktörlerin salınımını inhibe eder ve apoptozun baskılanmasına neden olur (Gottlob vd., 2001; Pastorino vd., 2005).

### **2.3.6. Tümör mikro çevresine uyum**

Tümör hücrelerinin hipoksik bir ortamda bulunmalarından dolayı aerobik glikolizi seçtikleri belirtilmiştir. Bu modele göre, bir tümör büyüdükçe, hücreler kan damarlarından daha da uzaklaşacak ve  $pO_2$  seviyeleri, kan damarlarından uzaklaştıkça glukoz seviyelerinden daha hızlı düşecektir. Oksijen eksikliği, mitokondriyal solunumu azaltacak ve mitokondriyal ATP'de azalmaya yol açacaktır. Daha düşük ATP seviyelerinin, PFK ve PK'nin allosterik inhibisyonunu hafifletmesi ve glikolizi teşvik etmesi beklenmektedir (Coller, 2014). Hipoksi ortam ayrıca glikoliz ve yeni kan damarlarının büyümesini teşvik edecek olan HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonunu ve aktivitesini indükler. Yeni kan damarları oluşsa bile, katı tümör mikro ortamı yine de düzensiz mikro damar sistemi ve normoksi-hipoksiya döngüleri ile karakterize edilmektedir (Kimura vd., 1996). Aerobik glikoliz, bu ortamdaki hücelere fayda sağlamaya devam edecektir. Bu nedenle, bu modeldeki tümör mikro ortamı, bir aerobik glikoliz metabolik profilini indükler ve daha sonra yüksek glikolitik metabolizmaya sahip tümör hücreleri için seçici bir avantaj sağlar. Aerobik glikoliz, metastaz sırasında da güçlü bir selektif avantaj sağlayacaktır ve aslında, hipoksi ile önceden tedavi edilen hücrelerin metastaz sırasında normoksik benzerlerine göre hayatta kalma olasılığı daha yüksektir (Rofstad ve Danielsen, 1999). Bazı çalışmalar, tümör mikro ortamındaki oksijen seviyelerinin aslında oksidatif fosforilasyondaki hız sınırlayıcı enzimler için bilinen  $K_m$  değerinden daha düşük olup olmadığını sorgulamıştır (Moreno-Sanchez, 2009). Diğerler modeller ise, kanser hücrelerinin, hipoksik koşullara maruz kalmadan önce bile bir glikolitik metabolizmayı aktive ettiğini savunmuştur (Vander Heiden vd., 2009). Buna ek olarak, aerobik glikolizin metabolik profili hipoksik tümörlerle sınırlı değildir (Vander Heiden vd., 2009). Hava yollarında bulunan lösemik hücreler ve akciğer tümörleri, oksijene maruz kalmalarına rağmen oldukça glikolitikdir (Vander Heiden vd., 2009). Ayrıca, tümör mikro ortamı aerobik glikoliz fenotipine sahip hücreler için seçim yapabilmesine rağmen tümör hücreleri, normoksik koşullar altında kültürde metabolik fenotipleri korumaktadır. Bu, HIF-1 $\alpha$ 'nın stabilizasyonunu ve HIF-1 $\alpha$ , onkojenler ve tümör

baskılayıcıların kombinasyonunun gen ekspresyonu üzerindeki kalıcı etkilerini yansıtabilir. Bu nedenle, daha kapsayıcı bir model, hipoksi ve onkojenlerin ve tümör baskılayıcılarının aktivitesini içeren mikro çevresel koşulların bir kombinasyonuna yanıt olarak kanser hücrelerinin, oksijen olduğu zaman bile kararlı ve kalıtsal bir metabolik fenotip elde etmesi olabilir ve tümör ortamında ve metastaz sırasında seçici bir avantaj sağlar.

### **2.3.7. Salgılanan laktik asidin fonksiyonel rolü**

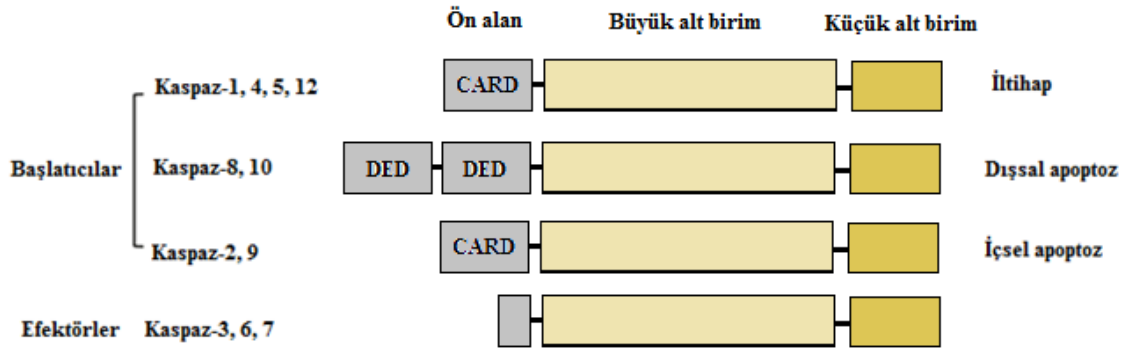
Tümör hücrelerinden salgılanan laktat tümör oluşumunu teşvik etmede önemli bir fonksiyonel role sahiptir. Bu açıklamayı desteklemek için, kanser hücreleri tarafından tüketilen glukozun çoğu laktata dönüştürülür ve yüksek laktat seviyeleri kötü bir tümör prognozu ile ilişkilidir (Hume vd., 1978; DeBerardinis vd., 2007; Lunt ve Vander Heiden, 2011; Brizel vd., 2001). MCT'ler, laktik asidi ve bir hidrojen iyonunu hücre dışına birlikte taşır, bu da yerel çevrenin asitleşmesine neden olur. pH' da meydana gelen düşüş, normal konakçı hücreleri öldürerek kanser hücresi istilasını ve metastazı teşvik edebilir, böylece tümör için alan yaratabilir ve muhtemelen tümörün tüketebileceği besinleri serbest bırakabilir. Düşük bir pH, hücre dışı matriks ve bazal membranlarda proteinleri bozan pH'a duyarlı metaloproteinazları ve/veya katepsinleri aktive ederek invazyon ve metastazı da uyarabilir (Martinez-Zaguilan vd., 1996; Schappack vd., 1991; Rozhin vd., 1994). Ayrıca, daha önce belirtildiği gibi, salgılanan laktik asidi çevreleyen hücrelere besin sağlaması önerilmiştir (Sonveaux vd., 2008). Kanser hücreleri tarafından salgılanan laktatın ayrıca tümör olmayan, stromal hücrelerin beslenmesinde kullanıldığında belirtilmiştir (Rattigan vd., 2012). Dolayısıyla, tümör büyümesini desteklemek için aerobik glikoliz atık ürün metabolitlerinin geri dönüşümüne izin veren metabolik yollar ile bir mikro ekosistem oluşturulmaktadır (Sonveaux vd., 2008; Sotgia vd., 2011; Rattigan vd., 2012). Son olarak, laktik asit salgılanmasının konakçı antikanser immün yanıtını baskılamada rolü olduğu öne sürülmüştür (Fischer vd., 2007). Tümör hücrelerindeki gibi sitotoksik T lenfositlerinin metabolizması yüksek glikoliz oranlarını tetiklemek için laktat salgılanmasını gerektirir. İlerlemiş bir tümörde, mikro ortamdaki yüksek laktat seviyeleri bağışıklık hücrelerinin hücre içi laktatı ihraç etme kabiliyetini engelleyebilir çünkü, salgılama hücre içi ve hücre dışı laktat arasındaki bir konsantrasyon gradyanına bağlıdır. Ortaya çıkan laktat aşırı yüklemesi, T hücrelerinin sitokin salgılama kabiliyetini azaltır böylece, normal

olarak konakçı bağışıklık tepkisi tarafından sağlanan savunmayı azaltır (Fischer vd., 2007).

#### **2.4. Apoptoz**

Apoptoz, morfolojik olarak membran tomurcuklanması, kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması ile karakterize olan programlanmış hücre ölümü şeklindedir. Aşırı apoptoz gözlenmesi dejeneratif bozukluklara neden olurken, yetersiz apoptoz neoplastik hastalıklara neden olmaktadır. Kanser hücreleri apoptozdan kaçarak, hayatta kalma avantajı elde etmeye çalışırlar (Fernald ve Kurokawa, 2013).

Apoptoz mekanizması hücre içerisinde bir çok molekülün aktivasyonuna neden olur. Kaspazlar (Sistein ASPartat proteazlar) apoptotik sürecin önemli sistein proteazlarıdır. Sitoskeletal proteinler, kinazlar ve transkripsiyon faktörleri gibi yüzlerce hayati öneme sahip protein, kaspazlar için substrat görevi görür (Fischer vd., 2003; Lüthi ve Martin, 2007). Kaspazlar, başlatıcı kaspazlar ve efektör kaspazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.3). Başlatıcı ve efektör kaspazlar, küçük ve büyük alt birimden oluşan katalitik bir alan içermektedir. Başlatıcı kaspazlar (örneğin; kaspaz-2, -8 ve -9), dimerizasyonla indüklenen aktivasyon için gerekli olan spesifik bir adaptör protein ile etkileşime giren büyük bir N-terminal bölgeye sahiptir. Başlatıcı kaspazların dimerizasyonu, kaspaz-2 için PIDDom, kaspaz-8 için ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) ve kaspaz-9 için apoptozom gibi spesifik bir protein kompleksi içinde gerçekleşir. Kaspaz-3, -6 ve -7 gibi efektör kaspazlar dimerizasyonla indüklenen aktivasyon için bir adaptör proteine ihtiyaç duymaz. Efektör kaspazlar kendiliğinden dimerize olur, ancak aktivasyonu büyük ve küçük alt birimlerinin aktif bir başlatıcı kaspaz tarafından bölünmesinden sonra olur. Aktif efektör kaspazlar daha sonra apoptozu başlatmak üzere bir seri protein substratını bölerek, hücresel bileşenlerin parçalanmasına neden olur (Fischer vd., 2003; Kurokawa ve Kornbluth, 2009; Lüthi ve Martin, 2007; Taylor vd., 2008).



Şekil 2.3. Kaspazların yapısı

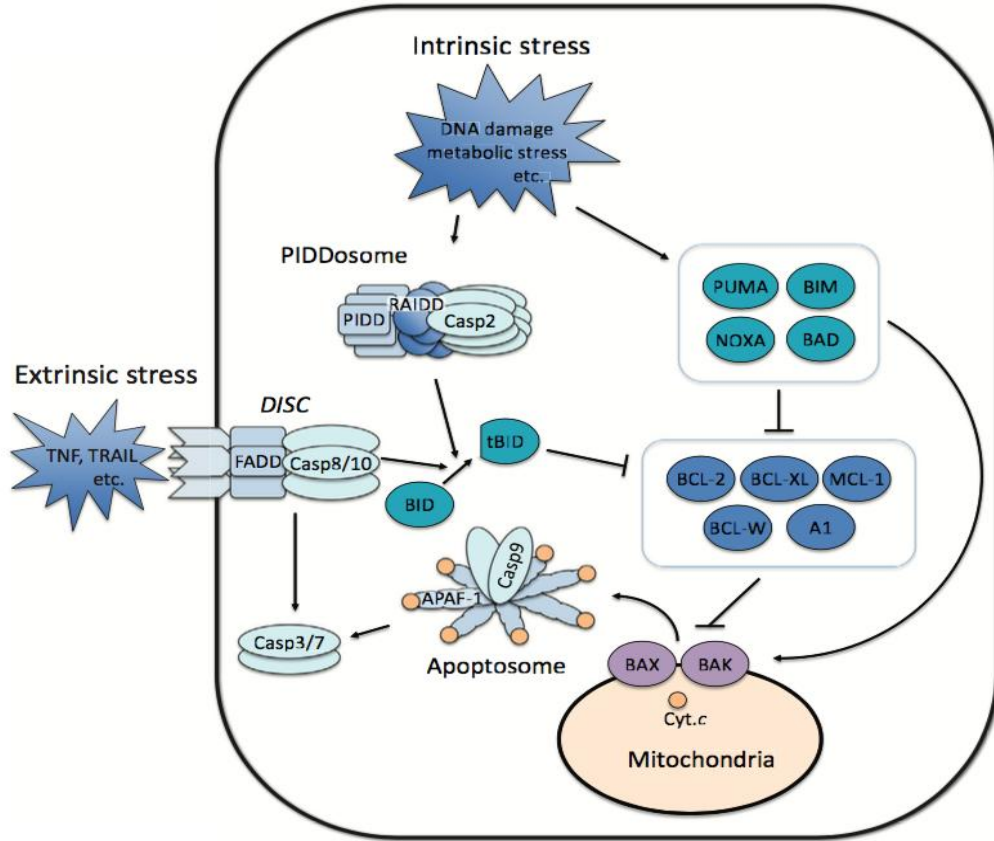
#### 2.4.1. İçsel ve dışsal apoptotik yollar

Hüresel strese bağlı olarak apoptoz, içsel veya dışsal olmak üzere iki yolla başlatılabilir (Şekil 2.4). İçsel apoptotik yolak DNA hasarı ve metabolik stres gibi hücre içi strese yanıt olarak aktive olmaktadır. Dışsal apoptotik yolak ise, tümör nekroz faktörü (TNF) ve TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) gibi ölüm ligandlarının, plazma zarı üzerindeki spesifik TNF-R1 ve TRAIL-R1/R2 gibi ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılır. Yapılan deneysel çalışmalar, içsel ve dışsal apoptotik yolların farklı hüresel uyarılara yanıt olarak indüklendiğini ve sonrasında ise her iki yolağın efektör kaspazlarının, özellikle de kaspaz-3'ün aktivasyonu ile sonuçlandığını göstermiştir (Matsuura vd., 2016).

İçsel apoptotik yolak, mitokondri dış zar geçirgenliğinin (MMP) değişmesine neden olmaktadır. Proapoptotik proteinler mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitoplazmaya salınır. Bu proteinlerden biri, elektron taşıma zincirinin (ETC) bir bileşeni olan sitokrom c proteindir. Sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması sonrasında adaptör protein Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) ile etkileşime geçer (Li vd., 1997). APAF-1 heptomer, sitokrom c ve kofaktör dATP ile birlikte kaspaz aktive edici apoptozom kompleksinin oluşmasına neden olur (Şekil 2.4). Apoptozom daha sonra başlatıcı kaspazın dimerizasyonunu kolaylaştırarak kaspaz-9'u aktif hale geçirir (Acehan vd, 2002; Shi, 2002; Shiozaki vd., 2002).

Dışsal apoptotik yolak, kaspaz-8 veya kaspaz-10'un aktivasyonu ile başlatılır. Ölüm reseptörü, adaptör protein Fas ilişkili ölüm alanı (FADD) ve kaspaz-8'den (veya kaspaz-10) oluşan DISC kompleksinin oluşumu ile aktivasyon başlatılır (Şekil 2.4). Ligand spesifik reseptörüne bağlanması sonrasında, ölüm reseptörünün

oligomerizasyonu indüklenir ve bu durum FADD'ın kaspaz-8'i (veya kaspaz-10) aktive etmesine neden olmaktadır. Kaspaz-8 (veya kaspaz-10) ön alan ve küçük alt birimi arasından kendiliğinden bölünerek, plazma membranına yakın sitoplazmik bölgede aktivasyonu gerçekleşir ve DISC kompleksinden ayrılarak serbest hale geçer.



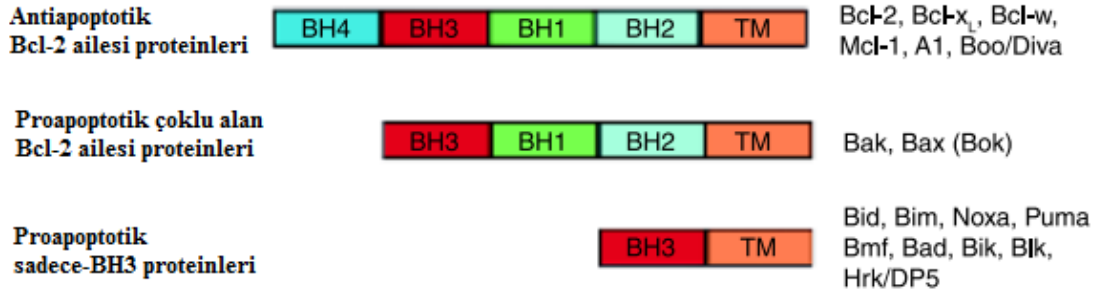
Şekil 2.4. Apoptotik yollar (Matsuura vd., 2016)

#### 2.4.1.1. İçsel apoptotik yolda mitokondri dışı membran geçirgenliği (MMP)

MMP, proapoptotik veya antiapoptotik B hücre lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi proteinleri arasında hassas bir denge ile düzenlenir ve genellikle apoptotik süreçte geri dönüşü olmayan bir nokta olarak kabul edilir. Bcl-2 ailesi proteinleri, Bcl-2 homoloji alanlarının (BH1-4) (Youle ve Strasser, 2008) (Şekil 2.5) varlığı ile karakterize edilmektedir. BH alanlarıyla etkileşime giren proapoptotik Bcl-2 proteinleri MMP'nin oluşumuna neden olurken, antiapoptotik Bcl-2 proteinleri bu etkiyi proapoptotik aile üyeleriyle doğrudan etkileşim yoluyla antagonize etmektedir (Chen vd., 2005; Czabotar vd., 2014; Letai vd., 2002; Tait ve Green, 2010). Apoptotik uyarılara yanıt olarak, Bcl-2 ailesi proteinlerinden olan Bax ve Bak proteinleri, mitokondrial zar üzerinde



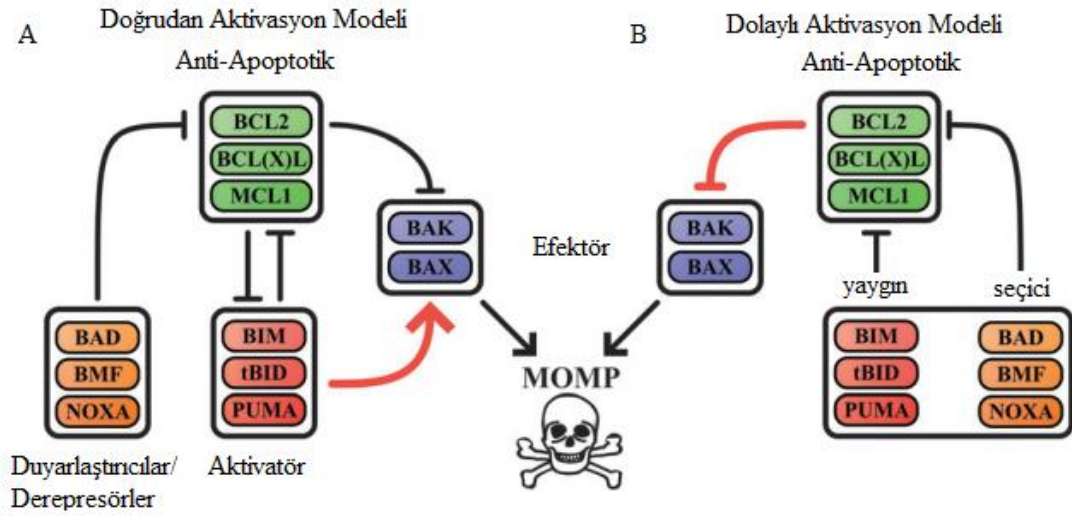
“gözenekler” oluşturmak için oligomerize olarak MMP indüksiyonunda doğrudan ve en kritik rolü oynar (Große vd., 2016; Salvador-Gallego vd., 2016). Bcl-2 ailesi proteinlerinin diğer üyelerinin, Bax/Bak aktivasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak düzenlemesi gerekir.



**Şekil 2.5.** Bcl-2 ailesi proteinleri (Parsons ve Green, 2010)

Bid, Bim, Bad, Noxa ve PUMA proapoptotik Bcl-2 ailesinin diğer üyelerindedir. Bu proapoptotik proteinler yalnızca BH3 bölgesi içerir ve BH3 proteinleri olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.5). Bax ve Bak aktivasyonunun Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından nasıl düzenlendiğini açıklamak için önerilen dolaylı aktivatör modeli ve doğrudan aktivatör-derepresör modeli olmak üzere iki model bulunmaktadır (Chen vd., 2005; Czabotar vd., 2014; Letai vd., 2002; Tait ve Green, 2010) (Şekil 2.6). Dolaylı aktivatör modelinde, antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri, MMP'yi inhibe etmek için Bax ve Bak'ı yapısal olarak bağlar ve inhibe olmasına neden olur. Proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki rekabetçi etkileşim, Bax/Bak ve antiapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki bağlanmayı bozarak, Bax/Bak aktivasyonunu destekler. Doğrudan aktivatör-derepresör modelinde, proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri, doğrudan aktivatörlere ve derepresörlere bölünebilir. Bim gibi doğrudan aktivatörler, aktivasyon için antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinden Bax/Bak salgılamak, Bad gibi derepresörler Bax/Bak aktivasyonuna dolaylı olarak katkıda bulunan antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin işlevini bastırırlar (Şekil 2.6).





Şekil 2.6. Doğrudan ve dolaylı aktivasyon modeli (Lindner, Prehn ve Huber, 2013)

## 2.5. Hipoksik Koşullara Kanser Hücrelerinin Adaptasyonu

### 2.5.1. Hipoksi

Oksijen, hücrelerin gelişmesinde ve büyümesinde önemli bir rol oynar. Memeliler, fizyolojik ortamlarında oksijen homeostazını sürdürmek için moleküler oksijenin yakalanması, bağlanması, taşınması ve verilmesi için doku düzeyinde ihtiyaç duyar (Giaccia vd., 2004).

O<sub>2</sub> seviyeleri, hücresel taleplere yanıt vermek için her aşamada oldukça dar bir aralıkta tutulmalıdır. Bu nedenle, O<sub>2</sub> seviyesini etkileyen vücudun fizyolojik ortamında meydana gelen herhangi bir değişiklik (örneğin patolojik koşullar) hücrelerde de değişikliklere neden olabilir. Benzer şekilde, hücreler organlarından izole edildiğinde ve fizyoksiden farklı O<sub>2</sub> seviyelerindeki kültür koşulları altında tutulduğunda stres indüklenebilir. Fizyoksiden daha yüksek ve düşük O<sub>2</sub> seviyeleri sırasıyla *hiperoksi* ve *hipoksi* olarak tanımlanır (Carreau vd., 2011; Wion vd., 2009).

Hipoksi, hücresel düzeyde çeşitli değişikliklere neden olur. Hipoksi, embriyonik gelişim gibi doğal fizyolojik süreçlerin yanı sıra iltihaplanma ve katı tümör oluşumu gibi patofizyolojik durumlarda da ortaya çıkar (Lou vd., 2010). Hipoksi, kanserlerde tümör büyümesinin önemli bir sonucu olarak ortaya çıkar ve aynı zamanda bir anjiogenez uyarıcısıdır. Hipoksik tümörler önemli ölçüde daha kötü huylu olup, radyoterapi ve kemoterapiye dirençlidir (Airley ve Mobasher, 2007).

### **2.5.1.1. Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF)**

Hipoksik koşullarda, vücutta AMP ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) ve HIF yolları olmak üzere iki ana sinyalleme sistemi devreye girer (Taylor, 2008). Hücre içi ATP seviyesi düştüğünde, AMPK yolu aktive olur, katabolik süreçleri hızlandırır ve anabolik süreçleri inhibe eder. HIF, tüm memeli hücrelerinde hipoksiye hücrel yanıtta anahtar rol oynar (Weidemann ve Johnson, 2008). HIF-1 ilk olarak memeli hücrelerinde eritropoietin (EPO) düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Kandaki oksijen konsantrasyonu azaldığında, EPO böbreğin interstisyel fibroblastlarından hızla salınır böylece eritrosit üretimi artar ve kan yoluyla daha fazla oksijen taşınır. EPO üretimini artıran birçok faktör olmasına rağmen, EPO genine yalnızca hipoksi durumunda bağlanan protein 1992 yılında Semenza ve Wang tarafından tanımlanan HIF-1'dir (Semenza ve Wang, 1992). HIF-1 $\alpha$  hemen hemen tüm hücre tiplerinde sentezlenirken, HIF-2 $\alpha$  ve HIF-3 $\alpha$  belirli dokularda ifade edilir (Kaelin ve Ratcliffe, 2008). HIF-2 $\alpha$ , protein yapısı açısından büyük ölçüde HIF-1 $\alpha$ 'ya benzer. Ancak dokuya özel olarak ifade edildikleri ve farklı işlevleri olduğu bildirilmiştir (Feldser vd., 1999). Örneğin; HIF-1 $\alpha$  her hücrede bulunurken, HIF-2 $\alpha$  fare karaciğerinde tübüler sistemin gelişmesinde ve vasküler endotel hücrelerinin yeniden yapılandırılmasında rol oynar ve burada sıklıkla görülmektedir (Görlach vd., 2001; Harris, 2002; Hes vd., 2005; Hon vd., 2002). İlginç bir şekilde, böbrekte hem HIF-1 $\alpha$  hem de HIF-2 $\alpha$  mevcutken, fazla HIF-2 $\alpha$  böbrek karsinom hücrelerinin çoğalmasına neden olur ve bunun engellenmesi, bu çoğalmayı bastırmak için yeterlidir (Hsiao vd., 2010). Bu nedenlerden dolayı, HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  oldukça benzerdir. Hedef genlerin HIF-1 $\alpha$  ile bir dimer oluşturarak aynı DNA sekanslarına bağlı olmasına rağmen, farklı doku ve hücrel yayılmaya sahip olabilirler ve farklı hedef genleri aktive edebilirler.

HIF aracılı yollar metabolik adaptasyonu, eritropoezi, anjiyogenezi, hücre büyümesini ve farklılaşmasını, hayatta kalma ve apoptozu, dolayısıyla gelişim, fizyoloji ve hastalığıdaki kritik faktörleri etkilemektedir (Maxwell vd., 2001).

#### **2.5.1.1.1. HIF'in yapısı**

HIF- $\alpha$  alt birimleri, normoksi koşulları altında çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Hücreler, HIF- $\alpha$  proteinini sentezler ve bozar. Bununla birlikte, HIF- $\alpha$  bozunması,

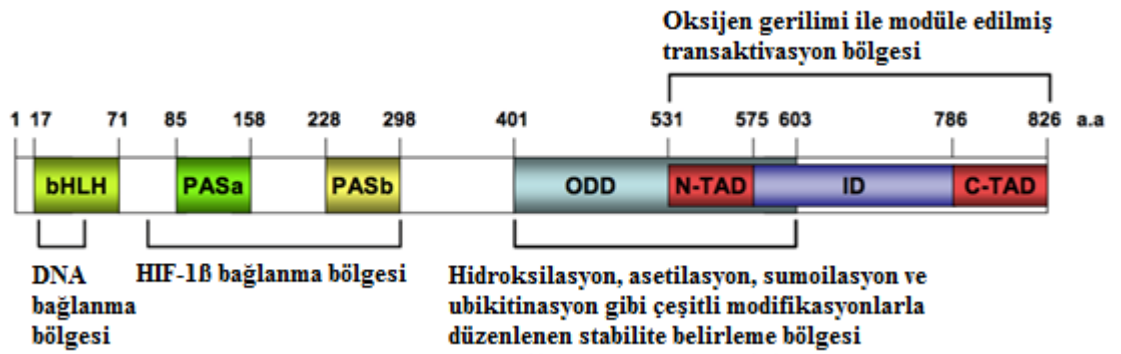
azalan oksijen konsantrasyonlarında yavaşlar. Bu noktada, HIF- $\alpha$  strese duyarlı bir alt birim olarak adlandırılabilir.

HIF- $\alpha$ 'nın üç temel izoformu, yani HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  ve HIF-3 $\alpha$  vardır. Hepsi farklı gen bölgeleri tarafından kodlanır ve sonraki çeşitliliği, alternatif promoter fonksiyonu ve splays patenleri tarafından düzenlenir. HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  benzer alan yapısını paylaşır ve benzer proteolitik düzenlemeye uğrar. Bununla birlikte, HIF-2 $\alpha$ 'nın doku ekspresyonu daha sınırlıdır (Wiesener vd., 2003). HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ , C-terminal transaktivasyon alanını içerirken, HIF-3 $\alpha$  içermemektedir. Üç izoformun tümü, oksijene bağlı bozunma alanı (ODDD) içerir. HIF-3 $\alpha$  üzerine yapılan araştırmalar, HIF-3 $\alpha$ 'nın HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ 'nın baskın bir negatif inhibitörü olarak hareket ettiğini göstermektedir (Makino vd., 2001). HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ , benzer hedef genlere sahiptir. HIF-3 $\alpha$  (IPAS) çeşitli bağlantılara sahip olmasına rağmen, bazı durumlarda HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  aktivitesini inhibe edebilir.

Biyokimyasal saflaştırmayı kullanan Wang ve Semenza, HIF-1'in 120 kDa  $\alpha$ -alt birimi ve 91-94 kDa sub-alt birimi içeren heterodimerik bir faktör olduğunu göstermiştir (Wang vd., 1995). HIF-1'in alt birimlerinin temel sarmal döngü sarmal (bHLH) ve PER-ARNT-SIM (PAS) bölgeleri içerdiği belirtilmektedir. HIF-1 $\alpha$  alt birimi yeni bir protein iken, HIF-1 $\beta$  alt birimi daha önce Aril Hidrokarbon Reseptör Translokator (ARNT) olarak tanımlanmıştır (Hoffman vd., 1991). HIF-1 $\beta$  sürekli olarak eksprese edilirken, HIF-1 $\alpha$ 'nın ekspresyonu sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. HIF- $\alpha$  alt birimleri oksijene duyarlıdır ve normoksi koşulları altında çok kısa ömürlüdür. HIF-1'in nükleer alfa alt birimi yapısal,  $\alpha$  alt birim düzenleyici bileşen olarak işlev görür. HIF-1 $\alpha$  alt birimi normoksik koşullar altında kararsızdır ve daha sonraki bozunma için E3 ubikuitin ligaz kompleksinin bir parçası olan VHL proteininin hedefidir. Hipoksik koşullarda, HIF-1 $\alpha$  proteozomal bozunmadan kaçır, sitozolde birikir ve stabil hale geldikten sonra fosforile olur daha sonra ise heterodimerik bir kompleks oluşturmak için çekirdeğe geçer. Bu kompleks, hipoksi ile indüklenebilir genlerin güçlendirici veya destekleyici bölgesinde 50 baz çiftli bir DNA bağlanma motifi olan hipoksi yanıt elemanları (HRE) ile bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Ivan vd., 2001; Jaakkola vd., 2001; Jain vd., 1998).

HIF-1 $\alpha$ , 15 ekson tarafından kodlanan 826 amino asitli bir proteindir (Wang vd., 1995). N-terminal bHLH ve PAS bölgelerini içerir. DNA bağlanması için temel bölge gereklidir. HLH-PAS bölgesi, HIF-1 $\alpha$  ve HIF-1 $\beta$ 'nin dimerizasyonu için gereklidir

(Jiang vd., 1996). C-terminali iki transaktivasyon bölgesi (TAD) içerir, N-terminal TAD 531-575 amino asitlerinde ve C-terminal TAD 786-826 amino asitlerinde bulunur (Jiang vd., 1997) Uç C terminal amino asitleri 718-721, nükleer lokalizasyon sinyalini (NLS) içerir (Kallio vd., 1998). Pro-ser-thr-zengin oksijene bağımlı bölünme bölgesi (ODDD), 401-603 aa arasında HIF-1 $\alpha$ 'nın orta kısmında lokalizedir ve HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijene bağlı degradasyonundan sorumludur (Huang vd., 1998) (Şekil 2.7) HIF-1 heterodimeri, DNA analogunda bulunan 5'-RCGTG-3' konsensüs sekansına bağlanır (Wang ve Semenza, 1993).



Şekil 2.7. HIF-1 $\alpha$  alan yapıları ve potansiyel işlevleri (Hong vd., 2004)

Hipoksi sırasında HIF-1 aktivitesinin indüksiyonu, çeşitli faktörlere bağlanabilir. HIF-1 $\alpha$  global protein translasyonunda genel bir azalmaya rağmen sürekli olarak hipoksi boyunca transkripsiyon ve translasyona uğrar. Buna ek olarak, çeşitli mekanizmalar oksijene bağımlı bir şekilde HIF-1 $\alpha$  proteininin stabilitesini ve aktivitesini düzenler. Son yıllarda, HIF-1 $\alpha$  düzenlemesi alanında, yerleşik yolların daha net bir şekilde anlaşılmasını sağlayan HIF-1 $\alpha$  seviyelerini kontrol eden mekanizmaları içeren yeni ve bazen tartışmalı bulgular sunulmuştur. HIF-1 protein regülasyonunu iki ana yol ile düzenlenir. Birincisi, proteazomal degradasyonu ki bu iyi karakterize edilmiş bir alandır ve ikincisi, translasyonu ise hala gelişmekte olan ve zaman zaman tartışmalı olan bir alandır.

#### 2.5.1.1.2. HIF-1 $\alpha$ 'nın degradasyon yolu ile düzenlenmesi

Oksijen seviyelerindeki değişikliklere hızlı yanıt verebilmek için hücreler, hipoksi ortamı hem algılama hem de uyum sağlama için oldukça karmaşık bir mekanizma geliştirdiler. HIF-1 $\alpha$  alt biriminin ubikitin-proteazomal degradasyon yoluyla oksijene

bağımlı düzenlenmesi von Hippel Lindau proteini (pVHL) yolu, HIF-2 $\alpha$ 'nın da benzer şekilde düzenlendiğine inanılmasına rağmen, esas olarak HIF-1 $\alpha$ 'ya odaklanarak iyi çalışılmıştır.

### ***pVHL–HIF-1 $\alpha$ degradasyon yolağı***

Aerobik koşullar altında, HIF-1 $\alpha$ , oksijene bağımlı degradasyon (ODD) alanında bulunan iki korunmuş prolin kalıntısında (Pro402 ve Pro564) spesifik prolin hidroksilazlar (PHD1, PHD2 ve PHD3) tarafından hidroksile edilir. Bu reaksiyon oksijen, 2-oksoglutarat ve askorbat gerektirir (Jaakkola vd., 2001). Hipoksik koşullar altında (<5% O<sub>2</sub>), PHD aktivitesi inhibe edilerek, HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonu ile sonuçlanır. PHD'lerin enzimatik inhibisyonuna ek olarak, hipoksi mitokondriyal elektron taşıma zincirinde bozulmalara neden olarak PHD içinde bir kofaktör olan Fe<sup>2+</sup>'nin Fe<sup>3+</sup>'e oksidasyonu ile sitoplazmik ROS seviyelerini yükseltir. Bu değişiklik PHD aktivitesini inhibe eder ve HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonunu destekler. Bu nedenle, mitokondriyal fonksiyonun farmakolojik veya genetik inhibisyonu veya mitokondriyal elektron taşıma zincirinin devre dışı bırakılmasıyla bozulması, hipoksi sırasında HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonunu önemli oranda önler (Hagen vd., 2003; Simon vd., 2006). HIF-1 $\alpha$  hidroksilasyonu, pVHL'nin HIF-1 $\alpha$  ODD'ye bağlanmasını kolaylaştırır (Ohh vd., 2000). pVHL, HIF-1 $\alpha$  poli-ubikitilasyon ve proteazomal bozunmayı yöneten elongin C, elongin B, cullin-2 ve ring-box 1'den oluşan bir E3 ubiquitin ligaz kompleksinin substrat tanıma modülünü oluşturur. HIF-1 $\alpha$ 'nın pVHL tarafından tanınması, Lys532'deki HIF-1 $\alpha$  asetilasyonu ile, esas olarak normoksik koşullar altında işlev gören ARD1 (arrest-defective-1) N-asetiltransferaz tarafından daha da kolaylaştırılır (Jeong vd., 2002). Bununla birlikte, HIF-1 $\alpha$ 'nın ARD1 tarafından asetilasyonu ve önemi tartışmalıdır (Arnesen vd., 2005; Bilton vd., 2005).

### ***pVHL-bağımsız HIF-1 $\alpha$ degradasyon yolağı***

Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar, pVHL'ye bağlı HIF-1 $\alpha$  degradasyonu dışındaki mekanizmaların da HIF-1 $\alpha$  seviyelerini kontrol etmede önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. pVHL ile karşılaştırıldığında, bu yeni yolların düzenlenmesi, oksijen mevcudiyetine daha az ve daha çok kalsiyum veya büyüme faktörlerinin varlığı gibi spesifik hücresel koşullara bağlı görünmektedir.

HIF-1 $\alpha$  protein stabilitesi, moleküler şaperon 90 kDa ısı şok proteinini (HSP90) ve HIF-1 $\alpha$ 'ya bağlanmak için rekabet eden aktive protein kinaz (PK) C (RACK1) reseptörünü içeren, oksijenden bağımsız bir yolla düzenlenir. RACK1, elongin C'yi ve E3 ligaz kompleksinin diğer bileşenlerini HIF-1 $\alpha$ 'ya homodimerize eder ve toplayarak, mekanik olarak pVHL yoluna benzer bir şekilde HIF-1 $\alpha$ 'nın her yerde bulunmasına ve degradasyonuna yol açar. Bu nedenle, 17-(alilamino)-17-demetoksigeldanamisin (17AAG) gibi Hsp90 inhibitörleri, oksijen ve pVHL'den bağımsız HIF-1 $\alpha$  bozulmasına neden olur (Liu vd., 2007).

RACK1 – HIF-1 $\alpha$  bağlanması, RACK1 – HIF-1 $\alpha$  etkileşimini stabilize eden SSAT1'in varlığına bağlıdır (Baek vd., 2007). Hem SSAT1 hem de SSAT2'nin tamamen farklı mekanizmalarla HIF-1 $\alpha$  ubiquitinasyonunu destekler. SSAT2, oksijen ve pVHL'ye bağımlı HIF-1 $\alpha$  bozulmasını teşvik ederken, SSAT1 oksijenden bağımsız, RACK1'e bağımlı HIF-1 $\alpha$  bozulmasını teşvik eder (Koh vd., 2008).

RACK1 yolu, kalsiyum ve kalmodüline bağımlı ve serin / treonine özgü protein fosfataz olan kalsinörin aktivitesi yoluyla kalsiyum tarafından da düzenlenebilir. Kalsinörin A, kalsiyum bağımlı bir şekilde RACK1'i defosforile eder, böylece RACK1 dimerizasyonunu bloke eder ve RACK1 aracılı HIF-1 $\alpha$  degradasyonunu inhibe eder (Liu vd., 2007).

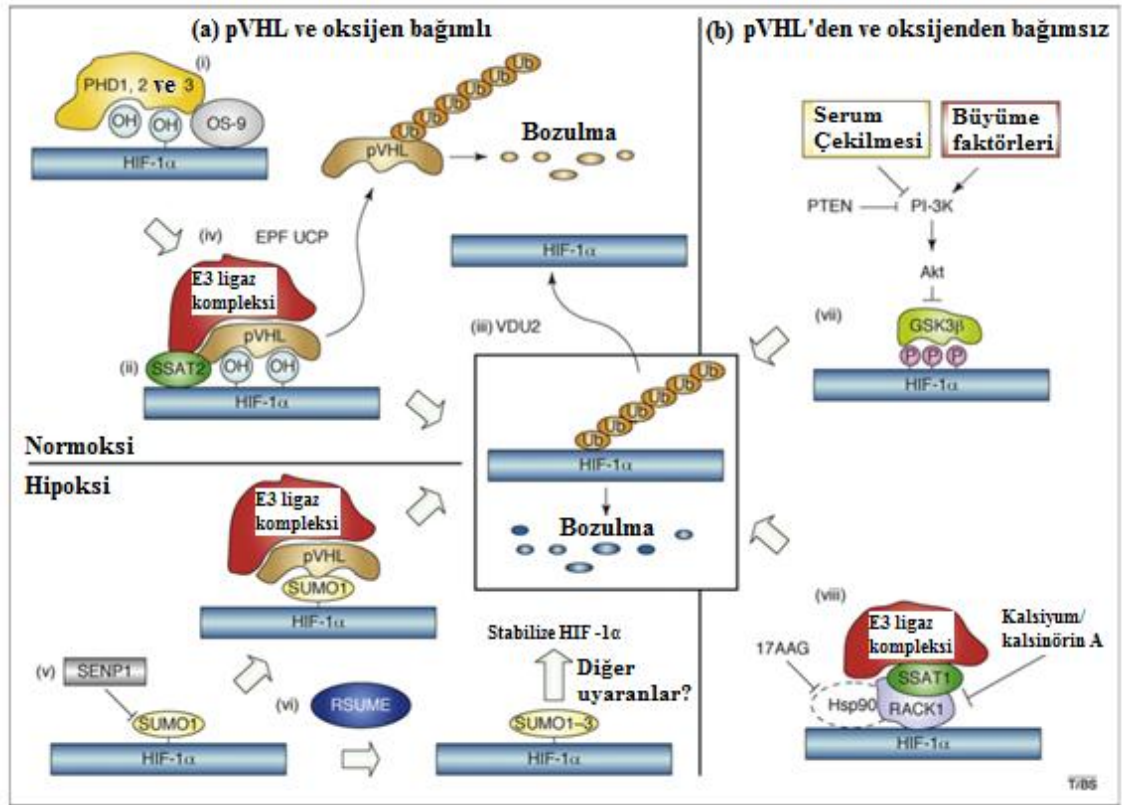
Fosfatidilinozitol 3-kinaz–Akt (PtdIns3K – Akt) sinyalleşmesi, hücre sağkalımı ve ölümü de dahil olmak üzere çeşitli sonuçlara sahip çeşitli sinyal zincirlerini aktive eder (Toker ve Newton, 2000). PtdIns3K-Akt yolu, sadece büyüme faktörlerine yanıt olarak HIF-1 $\alpha$  translasyonunu indükleyerek değil, aynı zamanda HIF-1 $\alpha$  protein degradasyonunun regülasyonu yoluyla da HIF-1 regülasyonu ile karmaşık bir şekilde bağlantılıdır. PtdIns3K yolağının kısa süreli hipoksi ile aktive olabileceği, ancak uzun süreli hipoksi tarafından inhibe edilebileceği öne sürülmüştür (Mottet vd., 2003; Arsham vd., 2002).

İki izoformdan ( $\alpha$  ve  $\beta$ ) oluşan glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), Akt tarafından fosforile edilir ve inaktive edilir. GSK3 $\beta$  aşırı ekspresyonu, prolil-hidroksilasyon ve pVHL'den bağımsız HIF-1 $\alpha$  ubiquitinasyonuna ve GSK3 $\beta$ -aracılı HIF-1 $\alpha$  fosforilasyonu yoluyla proteazomal degradasyona neden olur (Flugel vd., 2007). Benzer şekilde, her ikisi de Akt tarafından negatif olarak düzenlenen fox-head box (FOX)O4'ün veya yapısal olarak aktif FOXO3a'nın aşırı ifadeside, birincisi pVHL'den bağımsız HIF-1 $\alpha$



ubikitinasyonu ve degradasyonunu indükleyerek ve ikincisi, HIF-1 $\alpha$  transaktivasyonunu p300'e bağımlı bir şekilde inhibe ederek HIF-1 $\alpha$ 'yı baskılar (Tang ve Lasky, 2003; Emerling vd., 2008). Bu nedenle, uzun süreli hipoksi PtdIns3K yolunu inhibe ederek, GSK3 $\beta$  ve belki de FOXO4 ve FOXO3a aktivitesinin artmasına yol açar ve daha sonra HIF-1 $\alpha$  seviyelerinin ve aktivitenin azalmasına neden olabilir (Mottet vd., 2003).

Özetle, HIF-1 $\alpha$  protein seviyelerinin degradasyon yoluyla düzenlenmesi karmaşıktır, çok sayıda yol ve düzenleyici faktör içerir ve HIF-1 $\alpha$ 'nın yapısal proteazomal bağımlı, ubikitinden bağımsız degradasyonunu gibi henüz anlaşılmayan kısımlar vardır (Kong vd., 2007; Jariel-Encontre vd., 2008). pVHL yolunun aracılık ettiği gibi bazı süreçler oksijenle düzenlenir, ancak RACK1 veya GSK3 $\beta$  gibi yeni tanımlanan mekanizmaların çoğu diğer fizyolojik uyarılar tarafından düzenleniyor gibi görünmektedir (Şekil 2.8) Bu yolların daha net bir şekilde anlaşılmasını sağlamak için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Koh vd., 2008).



Şekil 2.8. HIF-1 bozulmasını düzenleyen yollar a) pVHL ve oksijen bağımlı b) pVHL'den ve oksijenden bağımsız (Koh vd., 2008)

### **2.5.1.1.3. HIF-1 $\alpha$ 'nın translasyonel düzenlemesi**

HIF-1 $\alpha$  degradasyonu hakkında çok şey bilinmesine rağmen, özellikle hipoksi sırasında HIF-1 $\alpha$  sentezi hakkındaki bilgiler önemli ölçüde geride kalmıştır. Hipoksi sırasında HIF-1 $\alpha$  sentezi, büyük ölçüde transkripsiyondan ziyade translasyon düzeyinde düzenlenir (Laughner vd., 2001; Galban vd., 2008) ve bu süreçteki çeşitli mekanizmalara Şekil 2.5.'de yer verilmiştir.

#### ***Normoksi altında HIF-1 $\alpha$ translasyon mekanizmaları***

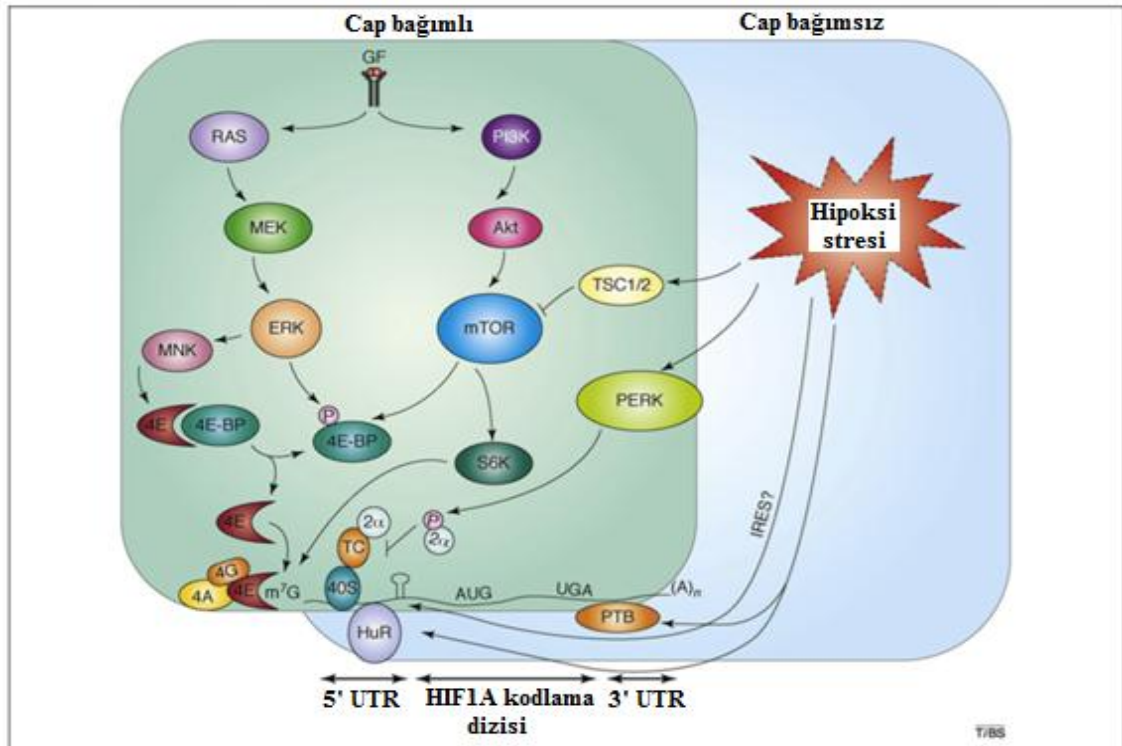
Normoksik koşullarda çeşitli onkoproteinler, büyüme faktörleri ve sitokinler HIF-1 $\alpha$  protein translasyonunu düzenler (Semenza vd., 2003). Belirli bağlamlarda, HIF-1 $\alpha$  protein indüksiyonu, rapamisin (mTOR) ve mitojenle aktive edilen PK (MAPK) yollarının PtdIns3K-Akt memeli hedefinin aktivasyonuna bağlıdır (Laughner vd., 2001; Zhou vd., 2006). Bu yollar, ökaryotik başlatma faktörü (eIF) 4E bağlayıcı proteinleri (4E-BP1, 4E-BP2 ve 4E-BP3) ve ribozomal kinaz S6K'yı translasyonel baskılayıcılar fosforile eder (Reiling ve Sabatini, 2006). eIF4E, eIF4F kompleksinin mRNA'nın 5'cap yapılarına bağlanmasına aracılık eden bir mRNA başlık bağlama proteindir. Hipofosforile edilmiş 4E-BP1, eIF4E'ye yüksek afinite ile bağlanarak, eIF4F kompleksi oluşumunu ve translasyonun başlamasını önler. mTOR ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazın (ERK) aktivasyonu, 4E-BP1'i birkaç bölgesinden fosforile ederek protein sentezini teşvik eder, dolayısıyla eIF4E için afinitesini azaltır ve eIF4F kompleksinin oluşumunu ve ardından kapağa bağlı translasyonu sağlar (Sonenberg ve Hinnebusch, 2007). İkinci bir substratın, S6K'nın mTOR ve ERK tarafından fosforilasyonu, ribosomal protein S6 eIF4B ve ökaryotik uzama faktörü 2 kinaz (eEF2K) dahil olmak üzere translasyon mekanizmasının bileşenlerini fosforile ederek translasyonu kontrol eder (Ruvinsky vd., 2005). Ek olarak, MAPK yolu, eIF4E fosforilasyonunun rolü iyi anlaşılmamış olmasına rağmen, eIF4E'yi fosforile eden MAPK sinyal entegre edici kinazları (MNK) da aktive edebilir.

#### ***Hipoksi altında HIF-1 $\alpha$ translasyon mekanizmaları***

Hipoksi stres sırasında enerji tüketimini azaltmanın bir yolu olarak genel protein translasyonunun kesilmesine yol açar. Hipoksi sırasında translasyonunun inhibisyonu en az iki ayrı yolla düzenlenir (Koumenis ve Wouters, 2006; Liu vd., 2006). İlk yol,



katlanmamış protein yanıtı (UPR)'dir. Oksijen konsantrasyonu  $<1\%$  olduğu zaman, hızla (1-2 saat) aktive olur ve endoplazmik retikülüm (ER) kinaz PKR benzeri ER kinazı (PERK) uyarır, translasyonun başlamasının önemli bir düzenleyicisi olan eIF2a'ı fosforile eder (Harding vd., 1999). Bu modifikasyon, translasyonun başlaması için gerekli olan 40S ribozom bağlayıcı eIF2-GTP-met-tRNA üçlü kompleksinin birleşmesini önler. mTOR tarafından kontrol edilen ikinci yol, uzun süreli hipoksi ile aktive olur ve eIF4F kompleksini bozarak translasyonu inhibe eder (Koritzinsky vd., 2006). Hipoksi veya besin ve enerji stresi koşulları altında, mTOR aktivitesi REDD1 (gelişim ve DNA hasarı yanıtlarında düzenlenir) ve yumrulu skleroz (tuberous sclerosis) (TSC)1-TSC2 kompleksi yoluyla inhibe edilir ve 4E-BP1 hipofosforilasyonuna neden olur ve sonra eIF4F kompleksinin ayrılması ile devam eder. Hipoksi ayrıca, eEF2'yi fosforile eden, böylece ribozom bağlanmasını inhibe eden ve translasyonu durduran eEF2 kinazın AMP ile aktive olan protein kinaz veya mTOR'a bağlı fosforilasyon yoluyla translasyon uzamasını da bastırır (Reiling ve Sabatini, 2006). Bu nedenle, oksijen yoksunluğunun seviyesi ve süresi, her biri farklı gen ekspresyon modellerini harekete geçiren translasyon inhibisyonu için spesifik mekanizmaları belirliyor gibi görünmektedir.

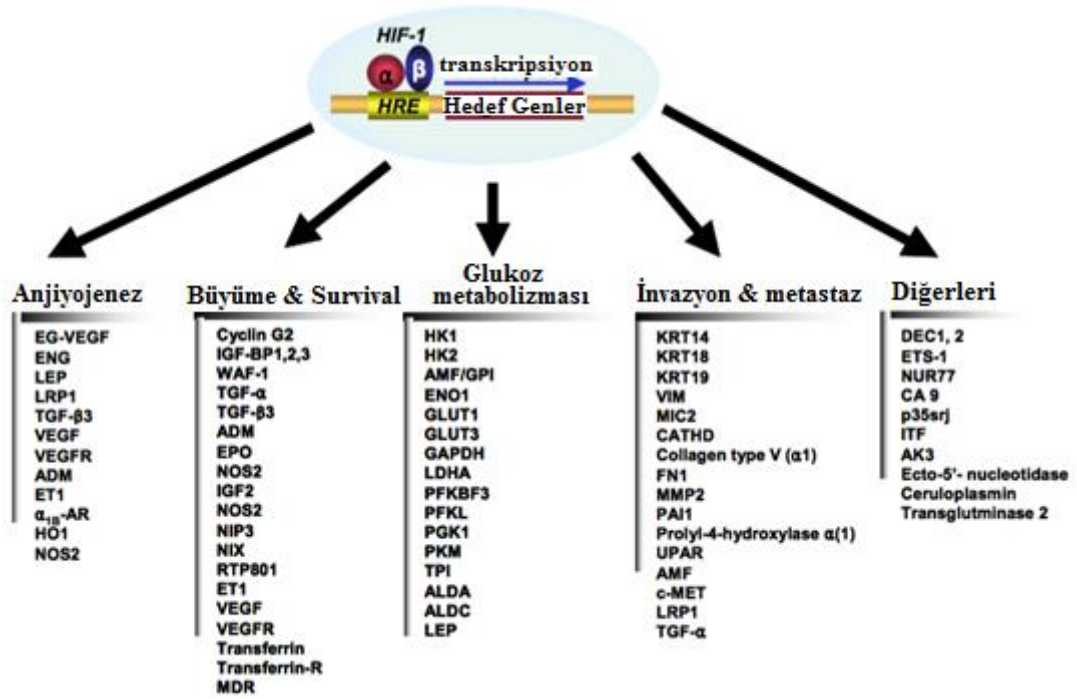


Şekil 2.9. HIF-1 $\alpha$  translasyonunu düzenleyen önemli yollar (Koh vd., 2008)

#### **2.5.1.1.4. HIF hedef genleri**

HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijenle aktive olan prolin hidroksilazlar (PHD) tarafından hidroksile olduğu ve normoksik koşullar altında ubiquitin-proteazom yolu ile hızla bozunduğu anlaşılmıştır. Ancak hipoksik koşullar altında, PHD aktivitesi inhibe olur ve HIF-1 $\alpha$  birikir daha sonra çekirdeğe yer değiştirir ve HIF-1 $\beta$  ile heterodimerize olur (Semenza, 2010; Huang vd., 2003). Bir transkripsiyonel faktör olarak heterodimer HIF-1, hedef genlerin transkripsiyonel aktivitesini aktive etmek için 5'-(A/G) CGTG-3' adlı hipoksi cevap elemanı (HRE) konsensüs sekansını tanır ve bağlanır (Wenger vd., 1997).

Tümör metastazı, anjiyogenez, enerji metabolizması, hücre farklılaşması ve apoptozda fonksiyonel olarak rol oynadığı gösterilen 100'den fazla doğrudan hedef HIF-1 geni ortaya çıkarılmıştır (Liao vd., 2009; Wenger vd., 2005). Metastaz, tümör ilerlemesinde kritik bir adımdır ve insan ölümlerinde yüksek ölüm oranına neden olur. Artan kanıtlar, tümör hücresi metastazında HIF-1 işlevine işaret etmektedir. Bunlar arasında, doğrudan HIF-1 tarafından düzenlenen en önemli transkripsiyon faktörü olan TWIST'in hipoksi aracılı epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ve kanser metastazı için gerekli olduğu belirtilmektedir (Yang vd., 2008). Anjiyogenez, ilerleyen tümör patagonezinde önemli rol oynar. HIF-1'in, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu aktive ederek anjiyogenik tepkiyi uyardığı bilinmektedir.



Şekil 2.10. HIF-1α tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilen hedef genler (Hong vd., 2004)

Solid tümör büyümesi, oksijen ve besin ihtiyacını sağlayan limitli damar oluşumuna bağlıdır. Tümör hipoksisi genellikle kan damarlarında 100–200 µm uzaklıktadır ve bu bölgedeki oksijen ve besin eksikliğine adapte olamayan hücreler genellikle apoptoza uğrarlar veya nekroza giderler. Ancak buna rağmen, hipoksi bu hücrelere lokal adaptasyon alanı sağlayarak kemoresistansı olan tümör fenotipi oluşturarak tümör büyümesini destekler (Zhou vd., 2006). Klinik çalışmalara göre hipoksik doku alanlarının (O<sub>2</sub> gerilimi olan bölgeler < 2.5 mmHg) tekrarlanma sıklığı lokal ileri evre solid patofizyom tümörünün ilgili faktörünün patofizyolojik özelliklerine dayanmaktadır. Meme kanseri, uterin serviks, vulva, baş ve boyun, prostat, rektum, pankreas, akciğer, beyin tümörü, yumuşak doku sarkoması, non-Hodgkin lenfoma, malignant melanoma, metastatik karaciğer tümörü ve renal hücre kanseri gibi kötü huylu tümörlerde buna benzer durumlar sıklıkla görülmüştür. Yapılan çalışmalar %50-60 oranında bölgesel olarak ilerleme kaydetmiş tümörler, tümör kütlelerinin içinde heterojen olarak dağılmış hipoksik ve/veya anoksik davranış sergilediklerini göstermektedir (Vaupel ve Mayer, 2007).

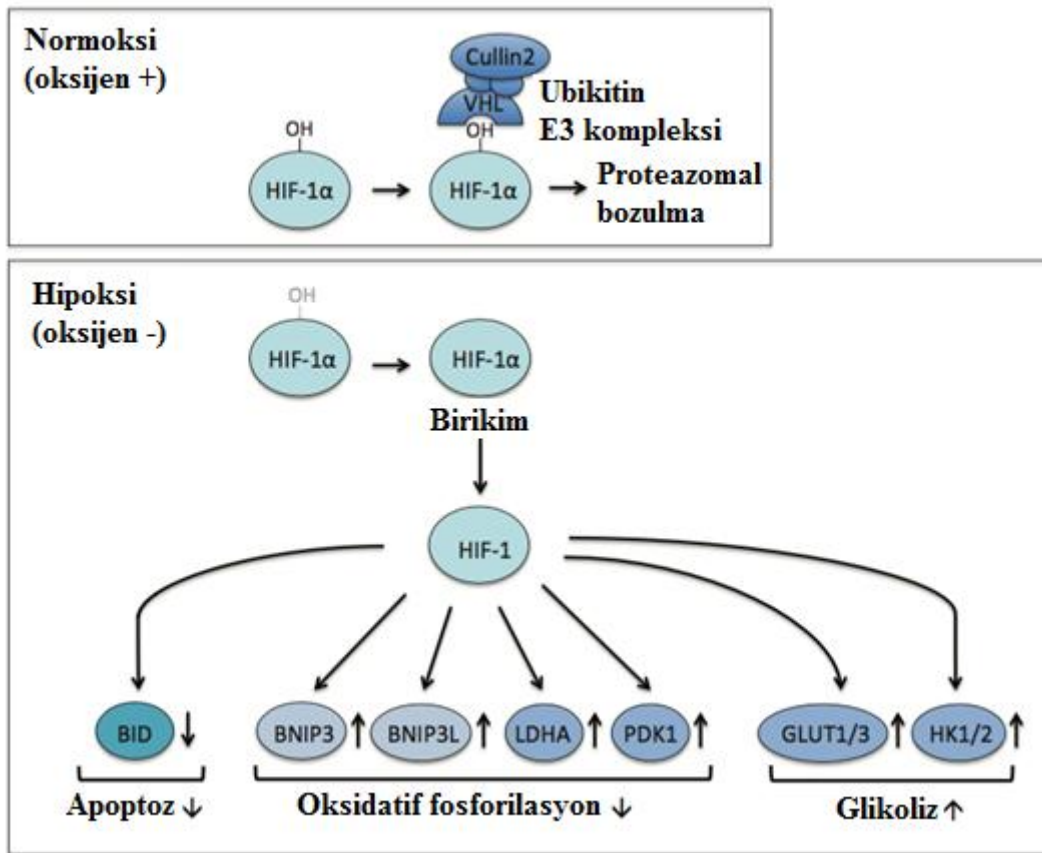
Bazı insan kanserlerinde, muhtemelen intratümöral hipoksi veya genetik alterasyonlar sonucu HIF-1α ve HIF-2α'nın aşırı ekspresyonu bulunmuştur (Sodhi vd., 2000; Brusselmans vd., 2001). Tümör büyüklüğü artarken, tümör kütlelerinin içerisi

yeterli kan damarı oluşturuluncaya kadar giderek hipoksikleşir. Tümör içerisindeki hipoksik koşullar HIF-1 stabilitesini ve aktivitesini artırabilir (Bahadori vd., 2010, Sodhi vd., 2000). İmmunohistokimyasal analizler normal dokularda olmamasına karşılık; benign tümörlerde saptanabilir miktarlarda, malign tümörlerde artmış miktarlarda, metastazlarda ise aşırı miktarlarda HIF-1 $\alpha$  proteini bulunduğunu göstermiştir (Stiehl vd., 2002; Talks vd., 2000; Tian vd., 1997). Birçok kanser tipinde anormal bir HIF aktivitesi görülür. Solid tümörler aşırı derecede hipoksiktir ve bu bölgelerdeki hücreler kemo ve radyoterapiye karşı dirençlidir (Liu vd., 2008). Solid tümörler çok düşük oksijen konsantrasyonlarında bazı bölgeler içerirler ve bu bölgeler sıklıkla nekroz bölgelerini çevreler. Bu hipoksik bölgelerdeki hücreler radyoterapi ve kemoterapiye dirençlidirler. Buna rağmen hipoksi ve nekrozun varlığı hipoksi, hipoksi-spesifik gen terapisi, uyarılabilir hedeflenmiş hipoksi faktör 1 transkripsiyon faktörü ve rekombinant anaerobik bakteri içeren seçilmiş tümör tedavisine olanak sağlar. Bu stratejiler günümüzde kanser tedavisine engel olan koşulları ortadan kaldırmak için önemli bir avantaj sağlamaktadır (Brown ve Wilson, 2004). İmmunohistokimya analizi, kolon, meme, mide, akciğer, deri, yumurtalık, pankreas, prostat ve böbrek karsinomları dahil olmak üzere ilgili normal dokulara kıyasla tümör tiplerinde HIF-1 $\alpha$ 'nın aşırı eksprese edildiğini göstermiştir (Zhong vd.,1999). HIF-1 $\alpha$  protein seviyelerinin çeşitli kanserlerde, yeni tedavi stratejileri planlanırken bir biyomarkır olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Chen vd., 2001; Conway vd., 2001).

### ***HIF-1 $\alpha$ ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesi***

Tümördeki enerji metabolizması süreci, mitokondriyal oksidatif ile birleşmiş glukoz metabolizmasından anaerobik glikolize, Warburg etkisi olarak bilinen ve artan laktat üretimine karşı azalmış mitokondriyal solunum gösteren bir kayma gösterir (Warburg, 1956). Yapısal veya bazal glukoz alımından sorumlu glukoz taşıyıcıları GLUT1 ve GLUT3 ve glikolitik akışı düzenleyen fruktoz-2,6-bifosfatın (Fru-2,6-P2) temel bir düzenleyicisi olan 6-fosfofrukto-2-kinase (PFKFB3), HIF-1 $\alpha$  hedefleri olarak onaylanmıştır (Hayashi vd., 2004; Obach vd., 2004). Bu süreçte, HIF-1 $\alpha$  tarafından düzenlenen bu genlerin transaktivasyonu, glukozun hücre içi kaderini yeniden programlayarak, glukozdan laktata eşdeğerlerin azaltılmasında artışa neden olur (Lum vd., 2007). İki glikolitik enzimin, yani fosfogliserat kinaz 1 (PGK 1) ve piruvat kinaz M2'nin (PKM2) HIF-1 tarafından transkripsiyonel olarak aktive edildiği gösterilmiştir

(Rodriguez vd.,1997; Kress vd., 1998). Çoğu dokudan laktik asit akışına aracılık eden monokarboksilat taşıyıcı MCT4, HIF-1 $\alpha$ 'ya bağımlı bir mekanizma yoluyla hipoksi tarafından yukarı regüle edilir (Ullah vd., 2006). HIF-1 ayrıca, piruvat dehidrojenaz kinaz 1'i (PDK1) kodlayan geni doğrudan transaktive ederek metabolizmayı aktif olarak baskılamaktadır (Kim vd., 2006). Bir PDH kinazı olarak PDK1, piruvat oksidatif dekarboksilasyonu asetil-CoA'ya önler ve piruvatın TCA döngüsüne girişini azaltır. Zorlanmış PDK1 ekspresyonu, hipoksik HIF-1 $\alpha$  null hücrelerini, artmış ATP seviyesi ve azalmış ROS üretimi eşliğinde apoptozdan kurtarabilir (Papandreou vd., 2006).



Şekil 2.11. HIF-1 $\alpha$ 'nın glikoliz ve oksidatif fosforilasyon üzerine hedef genleri (Matsuura vd., 2016)

### ***HIF-1 $\alpha$ ve apoptozun düzenlenmesi***

Fizyolojik olarak stres olan hipoksinin, belirgin yüksek düzeyde DNA hasarına yol açarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Hammond vd., 2003; Graeber vd., 1996) hipoksinin onkojenik olarak transforme edilmiş hücrelerde apoptozu indüklediğini, p53 tümör baskılayıcı gen kaybının ise hipoksinin indüklediği hücre ölümünü azalttığını bildirmişlerdir. Buna göre, yüksek apoptotik bölgeler doğal tip p53 eksprese eden

transplante tümörlerde hipoksik bölgelerle güçlü bir şekilde korelasyon gösterir, ancak p53 eksikliği olan tümörler değildir (Graeber vd.,1996). p53'ün, Puma, Bax ve p21 gibi downstream moleküllerinin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla hücre programlı ölümü ve büyümenin durmasını düzenlediği öne sürülmüştür (Yu vd., 2003, Chipuk ve Green, 2004). Çalışmalar aynı zamanda yabani tip p53'ün HIF-1 $\alpha$  tarafından stabilize edilebileceğini ve HIF-1 ile p53 arasındaki etkileşimin doğrudan veya dolaylı olabileceğini göstermiştir (Hansson vd., 2002; Chen vd., 2003). Diğer sonuçlar, aktif olarak çoğalan hücrelerde ve kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen çok işlevli bir protein olan NPM adlı HIF-1 $\alpha$ 'nın başka bir doğrudan hedefinin p53 ile ilişkili olduğunu göstermektedir. NPM ekspresyonunun shRNA tarafından baskılanması hipoksiye bağlı apoptozu artırır (Li vd., 2004). Ek olarak, HIF-1 $\alpha$ 'nın, hUcn2 geninin 3'FLR'sindeki spesifik bir HRE yoluyla insan ürokortin 2 (hUcn2) ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir, bu da kalp fonksiyonunu korumaya ve kalpteki iskemik koşullarda apoptozu önlemeye yardımcı olabilir (Bühler vd., 2009).

Mitokondride ifade edilen ve apoptozu indükleyen Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan BNIP3'ün doğrudan HIF-1 $\alpha$  tarafından düzenlendiği bildirilmiştir ve hipoksi aracılı apoptoz, nekroz ve otofajinin patolojik ilerlemesinde özel bir rol oynadığı bildirilmiştir (Bruick, 2000; Velde vd., 2000). Ayrıca, p53 ile indüklenen apoptozu aracılık eden bir molekül olan sadece BH3 Bcl-2 familyası proteini Noxa da HIF-1 $\alpha$ 'nın hedefi olarak tanımlanmıştır. Noxa aracılı hipoksik hücre ölümü, reaktif oksijen türleri ve sonuçta ortaya çıkan sitokrom c salınımı ile ilgilidir (Kim vd., 2004).

### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

Deneysel aşamalarda kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler Tablo 3.1.'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** *Kimyasal ve Sarf Malzememeler*

Kimyasal ve Sarf Malzemeler	Marka
RPMI 1640 (L-glutamin ve glukoz içeren)	Sigma, Birleşik Krallık
RPMI1640 (L-glutamin ve D-glukoz içermeyen)	Biological Industries, ABD
Fetal sığır serumu	Biowest, Güney Amerika
Dialize fetal sığır serumu	Biowest, Güney Amerika
Penisilin-Streptomisin	Gibco, ABD
Tripsin-EDTA	Biochrom, Berlin
L-glutamin çözeltisi	Sigma, Birleşik Krallık
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma Aldrich, ABD
Tween 20	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Etanol	Sigma Aldrich, Almanya
Hidroklorik Asit	Merck, Almanya
Metanol	Sigma Aldrich, İsrail
Sodyum klorür	Merck, Almanya
Potasyum klorür	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Sodyum bifosfat	Horasan Kimya, Türkiye
Potasyum bifosfat	Horasan Kimya, Türkiye
Sodyum Hidroksit	Merck, Almanya
Triton-X 100	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum Bikarbonat	Sigma Aldrich, ABD
RIPA tamponu (10×)	Millipore, ABD
Proteaz inhibitör kokteyi	Sigma Aldrich, ABD
Fosfataz inhibitör kokteyi	Roche, Almanya
Full Range Protein Marker	Biorad, ABD
Bradford solüsyonu	Sigma, ABD
2× Laemmli tamponu	Sigma, ABD
%30 Akrilamid-bis-akrilamid jel karışımı	Sigma, ABD
3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB)	Sigma, ABD

**Tablo 3.1. (Devam) Kimyasal ve Sarf Malzemeler**

<b>Hücre Hattı, Kimyasal ve Gereçler</b>	<b>Marka</b>
β-merkaptolanol	Sigma, ABD
Tris-HCl	Sigma Aldrich, ABD
Tris-Base	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	VWR, Belçika
Amonyum persülfat (APS)	Sigma, ABD
N, N, N', N'-Tetrametiletildiamin(TEMED)	Sigma, ABD
Glisin	Applichem, Almanya
PVDF membran	Amersham, Almanya
Whatman Kâğıdı	Amersham, Almanya
XIAP fare monoklonal IgG birincil antikor	Santa Cruz Biotechnology, ABD
HRP konjuge anti-tavşan ikincil antikor	Santa Cruz Biotechnology, ABD
HRP konjuge anti-fare ikincil antikor	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Anneksin V-FITC Apoptoz kiti	BD, ABD
Kaspaz 3 aktivite analiz kiti	BD, ABD
Kaspaz 9 aktivite analiz kiti	Thermo Fischer Scientific, ABD
JC-1 mitokondriyal membrane potansiyel ölçüm kiti	BD, ABD
L-Laktat analiz kiti	Abcam, ABD
Sitrat sentaz aktivitesi ölçüm kiti	Abcam, ABD
ATP analiz kiti	Roche, Almanya
10, 200 ve 1000 ml mikropipet uçları	Isolab, Almanya
15 ve 50 ml falkon tüpleri	Isolab, Almanya
25 ve 75 cm <sup>2</sup> hücre kültür flaskları	Isolab, Almanya
150 cm <sup>2</sup> petri kabı	Nunclon, Danimarka
1,5 ve 2 ml santrifüj tüpleri	Eppendorf, Almanya
20 ml steril enjektör	Beybi, Çin
6 kuyucuklu hücre kültür plakası	Nest Biotechnology, Çin
5 ml akım sitometre tüpleri	Sarstedt, Almanya
Neubauer lamı	Isolab, Almanya
Lamel	Isolab, Almanya
0,22 µm filtre	Isolab, Almanya
0,45 µm filtre	Aısımo, Birleşik Krallık



**Tablo 3.1. (Devam) Kimyasal ve Sarf Malzemeler**

<b>Hücre Hattı, Kimyasal ve Gereçler</b>	<b>Marka</b>
Kazıyıcı	Nest Biotechnology, Çin
2 ml Karyotüp	Nest Biotechnology, Çin
Parafilm	Fisher Scientific, ABD
Spektrofotmetre küveti	Isolab, Almanya

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 3.2.'te verilmiştir.

**Tablo 3.2.** *Kullanılan cihazlar*

<b>Cihaz</b>	<b>Marka/Model</b>
CO <sub>2</sub> inkübatörü	Hera Cell 240 Thermo Scientific-Almanya
Üç gazlı inkübatör	Heal Force, Şangay
Jel görüntüleme cihazı	UVP Biospectrum, ABD
Isıtıcı blok	Biosan, Letonya
Jel yürütme tankı	Biorad, Çin
Mini Santrifüj	Eppendorf, Almanya
Güç kaynağı	Consort, Belçika
Transfer cihazı	Biorad, Singapur
Homojenizatör	Hangzhou Miu Instruments, Çin
Laminar Kabin	Heal Force, Çin
Spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Vorteks	IKA, ABD
Hassas Terazi	Ohaus, İsviçre
İnverted Mikroskop	Leica, Almanya
Su Banyosu	Nüve BM 302, Türkiye
Pipet yıkayıcı	Bandelin, Almanya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Etüv	Nüve, Türkiye
Otoklav	ALP, Japonya
Sterilizatör	Nüve FN 500, Türkiye
Azot Tankı	TRII Air Liquid, Fransa
Buz Makinası	Simag, İtalya
Distile Su Cihazı	Nüve, Türkiye
Mikroplate Okuyucu	Biotek, ABD
Ultrasonik Banyo	Elma T470/H, Singen, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	IKA, Almanya
Santrifüj	Hettich- Almanya
pH Metre	Mettler Toledo, İsviçre
-20 °C Derin dondurucu	Bosch, Almanya
-86 °C Derin dondurucu	New Brunswick Sci., ABD
Akış Sitometri	BD FACSAria, ABD
Vakumlu aspiratör	Integra Biosciences, İsviçre

**Tablo 3.2. (Devam) Kullanılan cihazlar**

<b>Cihaz</b>	<b>Marka/Model</b>
Multikanallı elektronik mikro pipet (30-300 $\mu$ l'lik)	Eppendorf, Almanya
2-20 $\mu$ l'lik elektronik mikro pipet	Nichipet, Japonya
10-100 $\mu$ l'lik elektronik mikro pipet	Nichipet, Japonya
20-200 $\mu$ l'lik elektronik mikro pipet	Gilson, Fransa
1000 $\mu$ l'lik elektronik mikro pipet	Eppendorf, Almanya

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Hücre Kültürü

İnsan akciğer karsinoma epitelyal hücre hattı (A549) ATCC (American Type Culture Collection)'nin önerdiği şekilde, %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin, içeren RPMI 1640 (L-glutamin ve glukoz içeren) besiyerinde, %5 CO<sub>2</sub> iç atmosferine sahip inkübatörde 37°C'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir hücreler tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek 1:3 oranda alt kültürlerle ayrılarak pasajlanmıştır.

#### 4.1.1. 5 mM ve 25 mM glukoz içeren büyüme ortamının hazırlanması

%10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin ve içeren RPMI 1640 (L-glutamin ve glukoz içermeyen) besiyeri ile glukoz konsantrasyonu 5 mM (Gli 5) veya 25 mM (Gli 25) olacak şekilde hazırlanmıştır.

#### 4.1.2. 10 mM galaktoz içeren büyüme ortamının hazırlanması

%10 dialize FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 (L-glutamin ve glukoz içermeyen) besiyeri ile galaktoz konsantrasyonu 10 mM (OKSFOS) olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Tablo 4.1.** Deneysel Metabolik Ortamlar

Kısaltma	Hücre Ortamı	Metabolik Yolak
<b>Gli 5</b>	5 mM Glukoz	Glikolitik
<b>Gli 25</b>	25 mM Glukoz (Hiperglisemik)	Glikolitik
<b>OKSFOS</b>	10 mM Galaktoz veya Glutamin (Aglisemik)	Oksidatif Fosforilasyon/ Glutaminoliz

Hücreler farklı metabolik ortamlara alınarak, normoksi koşullarda CO<sub>2</sub> inkübatöründe (Hera Cell 240 Thermo Scientific, Almanya) ve hipoksi (%1 O<sub>2</sub>) koşullarda üç gazlı inkübatörde (Heal Force, Şangay) inkübe edilmiştir.

#### 4.1.3. A549 hücrelerinin kültür ortamına alınması

Sıvı azot (-192°C) ortamında saklanan A549 hücrelerinin kültür ortamına aktarılması için öncelikle hücreler hızlı bir şekilde sıcak su banyosunda

çözdürülmüştür. Çözülen hücre süspansiyonu, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri içerisine aktarılmıştır. 1200 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Santrifüj işlemi 3 kez tekrarlanarak, stok besi yeri içerisinde yer alan dimetilsülfoksit (DMSO) tamamen hücre ortamından uzaklaştırılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen hücre peleti 1 ml besiyeri ilavesi ile süspansiyon haline getirilmiştir. Hücre süspansiyonu daha sonra 25 cm<sup>2</sup>'lik flaska aktarılarak 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübe edilmiştir.

#### **4.1.4. Hücrelerin pasajlanması**

Hücre yoğunluğu %80-90 oranına ulaştığında hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre besi ortamının uzaklaştırılması sonrasında 25 cm<sup>2</sup>'lik flaskın içerisine 1×PBS ilave edilerek, besi ortamının serum içeriğinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında, %0.25 Tripsin/EDTA solüsyonu besi kaplarına ilave edilerek, hücreler 5 dk 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin, besi kaplarının yüzeyleri ile olan bağlantılarının koparılması inverted mikroskop ile monitor edildikten sonra süspansiyon haline gelen hücreler 15 ml'lik falkonlara aktarılmıştır ve 1200 rpm'de 3 dk santrifüj edilen hücrelerin süpernatantlarının ortamdaki uzaklaştırılması sonrasında hücre peleti 1 ml besi solüsyonu ile süspansiyon haline getirilmiştir. Daha sonra, hücre süspansiyonu 75 cm<sup>2</sup>'lik flask içerisine aktarılmış olup, hücreler %80-90 yoğunluğa ulaşmaya kadar 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

## **4.2. Western Blot Analizi**

### **4.2.1. Total protein lizati hazırlanması**

A549 hücreleri hipoksi ve normoksi altında Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik ortamlarda 24 veya 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, hücreler buz üzerine alınmıştır ve hücre besi ortamı uzaklaştırılarak, soğuk PBS ile hücreler 2 kez yıkanmıştır. 1 ml RIPA lizis tamponuna 100 µL proteaz inhibitör kokteyli ve 100 µL fosfataz inhibitör kokteyli eklenerek taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu lizis solüsyonundan 400 µL alınarak, hücrelerin üzerine eklenmiştir ve kazıyıcı ile hücreler besi kaplarından toplanmıştır. Toplanan hücre lizatları homojenizatör yardımı ile 2 kez 20 000 devirde 10 sn boyunca hücreler parçalanmıştır. 4°C'de 13 500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında, süpernatant

yeni ependorf tüplere aktarılmıştır. Hazırlanan hücre lizatlarındaki protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak spektrofotometrede 595 nm’de belirlendikten sonra porsiyonlanarak -80° C’ye kaldırılmıştır (Durukan, 2016; Burnette, 1981).

#### 4.2.2. Örneklerin jele yüklenmesi ve jelde yürütülmesi

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) işlemi için %12’lik ayırıcı jel ve %5’lik paketleyici jel Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

**Tablo 4.2.** %12’lik ayırıcı jelin hazırlanması

Bileşenler	Hacim (ml)
dH <sub>2</sub> O	3,3 ml
%30 Akrlamid jel karışımı	4 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	0,1 ml
%10 Amonyum persülfat (APS)	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

**Tablo 4.3.** %5’lik paketleyici jelin hazırlanması

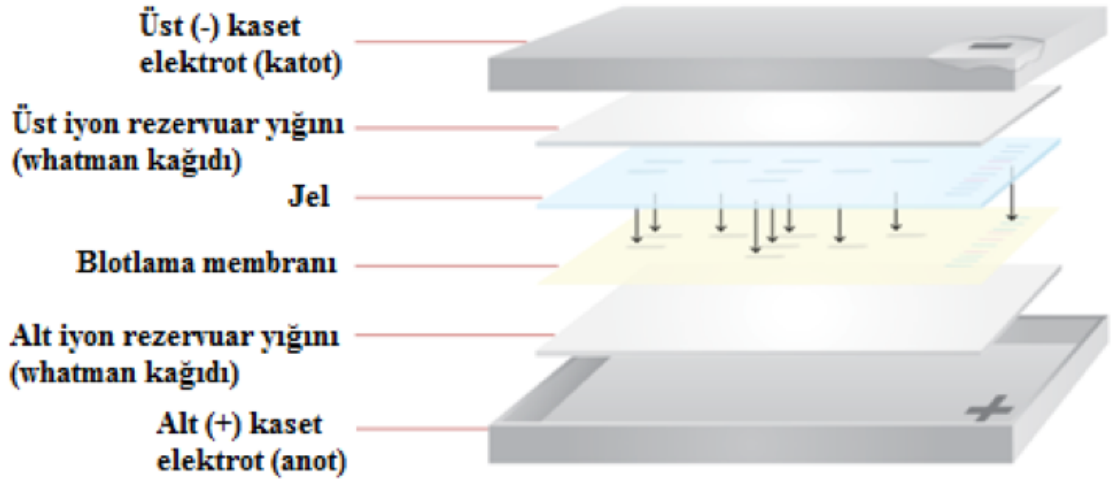
Bileşenler	Hacim (ml)
dH <sub>2</sub> O	2,7 ml
%30 Akrlamid jel karışımı	0,67 ml
1,5 M Tris-HCl (pH8,8)	0,5 ml
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	0,04 ml
%10 Amonyum persülfat (APS)	0,04 ml
TEMED	0,004 ml

Ayırıcı jel (%12) jel kasedine döküldükten sonra hava temasını engellemek ve yüzeyinin düz olması için üzerine 1 ml dH<sub>2</sub>O eklenerek, polimerize olması için 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra hazırlanan paketleyici jel (%4) ayırıcı jelin üzerine dökülmüş ve jel tarağı yerleştirilerek polimerizasyon için 30 dk bekletilmiştir. Örnekler 2× laemli buffer ile 1:1 oranında karıştırılarak 95°C’de 5 dk ısıtıcı blokta denature edilmiştir. Bu sırada jel elektroforez tankına yerleştirilerek tank yürütme tamponu (500 ml’inde 1,515 g tris base, 7,2 g glisin, 0,5 g SDS pH 8,3) ile doldurulmuştur. Marker (10-250 kDa) ve

örnekler jele yüklenerek paketleyici jel için 80V, ayırıcı jel için 120V olmak üzere 2 saat boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2.3. Yarı ıslak transfer yöntemiyle proteinlerin membrana aktarılması

Proteinlerin membrana transferi yarı ıslak transfer yöntemiyle “Trans Blot Turbo transfer cihazı (Biorad)” kullanılarak yapılmıştır. Jel kasetten çıkarıldıktan sonra transfer yöntemin de katottan anoda transfer olacak şekilde Şekil 4.1’de gösterildiği üzere whatman kağıdı, jel, membran, whatman kağıdı sırasıyla konularak kaset kapakları kapatılmıştır. Blotlama için ise “0,2 µm PVDF Trans-blot turbo transfer paketi (Biorad, US)” kullanılmıştır. 2,5 A akımda karışık molekül ağırlıklı (5-150 kDa) örnekler için 7 dk, düşük molekül ağırlıklı (<30 kDa) örnekler için 5 dk süreyle transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Blotlama sisteminin kurulumu (<http-1>)

#### 4.2.4. Membranların bloklanması ve antikor eklenmesi

Membran yıkama tamponunda (TBS-T) (500 ml dH<sub>2</sub>O içinde 1,57 gr Tris-HCl, 4 gr NaCl ve 500 µl Tween 20) 3×5 dk yıkanmıştır. Yıkama tamponu dökülüp, bloklama çözeltisi olarak %5 BSA içeren TBS-T’de 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra membrane 3×5dk TBS-T ile yıkanmıştır.

HIF-1α, p-PDH, PDH, Bax, Bid, Smac, Sitokrom c, XIAP ve β-aktin monoklonal antikorları %5 BSA içeren TBS-T içerisinde 1:250 dilüsyonda hazırlanmıştır.

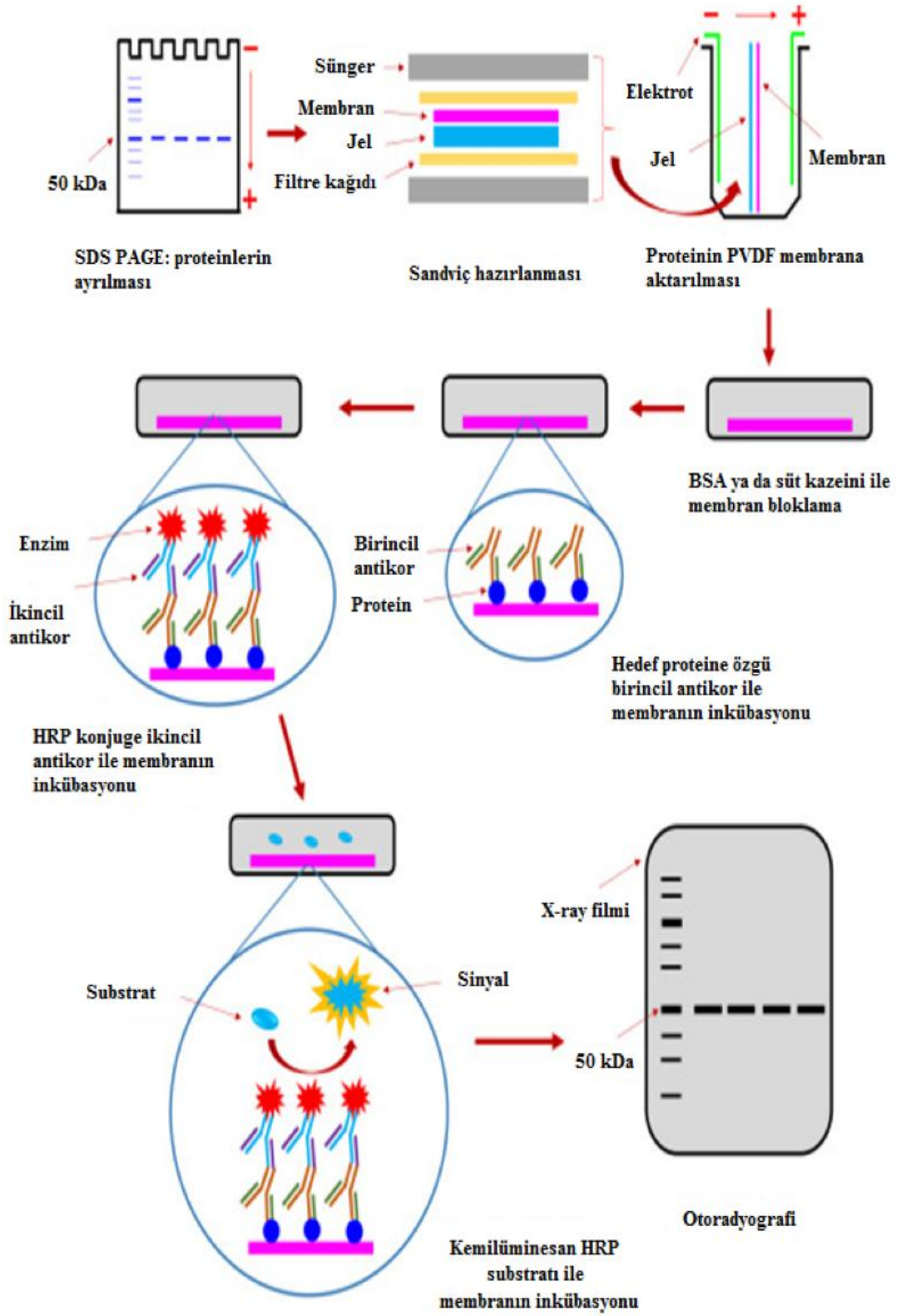
Membranlar bu hazırlanan birincil antikorlar ile +4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, 3×5 dk TBS-T ile yıkanmıştır.

Birincil antikora uygun anti-mouse ya da anti-rabbit ikincil antikorunu %5 BSA içeren TBS-T içerisinde 1:200 dilüsyonda hazırlanmıştır. Membranlar HRP konjuge ikincil antikor ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra tekrar 3×5 dk TBS-T ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Protein bandı görünür hale gelene kadar oda sıcaklığında 3 ml 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) ile karanlıkta muamele edilmiştir. Bantlar görünür görünmez TMB solüsyonu TBS-T ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra UVP Jel görüntüleme sistemi ile membran görüntülenmiştir. Verilerin dansitometrik analizi Image J programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.5. Birincil ve ikincil antikorların membrandan uzaklaştırılması**

Aynı membran üzerinde farklı bir protein bandını görüntüleyebilmek için birincil ve ikincil antikorlar membrandan uzaklaştırılmıştır. Bu işlem için membranlar 4×5 dk TBS-T ile yıkandıktan sonra, stripping çözeltisi 6,25 ml Tris-HCl pH 6,8, 2g SDS, 700 µl β-merkaptoetanol eklenerek 100 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Membran 50°C'de 30 dk stripping solüsyonu ile inkübe edildikten sonra 6×5 dk TBS-T ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra bloklama ve antikorla işaretleme aşamaları aynı şekilde yeniden tekrarlanmıştır.





Şekil 4.2. Western blot yöntemi şematik gösterimi (Mallick, 2019)

### 4.3. L-Laktat Analizi

L-Laktat ölçümü için “L-Lactate assay (Colorimetric/Fluorometric) kit (Abcam)” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. A549 hücreleri Gli 5, Gli 25 veya OKSFOS besi ortamında 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilerek, 72 saat hipoksi veya normoksi koşullarda inkübe edilmiştir. Daha sonra, hücre besi ortamları toplanarak tüplere aktarılmıştır. Laktat enzim karışımı 220  $\mu$ l laktat test tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Deney standartı olarak 1 nmol/  $\mu$ l laktat kullanılarak 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/kuyucuk olan laktat konsantrasyonları hazırlanmıştır. Standartların seyreltmesi laktat test solüsyonu ile yapılmıştır.

Reaksiyon karışımı her bir örnek için Tablo 4.4.’de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

**Tablo 4.4.** *Reaksiyon karışımının hazırlanması*

Bileşenler	Reaksiyon karışımı ( $\mu$ l)	Background karışımı ( $\mu$ l)
Laktat test tamponu	46	48
Probe	2	2
Enzim karışımı	2	0

50  $\mu$ l standart ya da örnek (besi ortamı) üzerine 50  $\mu$ l reaksiyon karışımı eklenerek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Mikroplate okuyucuda 570 nm’de kolorimetrik ölçüm yapılmıştır.

### 4.4. Sitrat Sentaz Aktivitesinin Ölçümü

Sitrat sentaz aktivite ölçümü için “Human citrate synthase activity assay kit (Abcam)” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. A549 hücreleri Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS besi ortamında  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde 25  $\text{cm}^2$  hücre besi kaplarına ekilerek, 72 saat hipoksi ve normoksi koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler kazıyarak toplanmıştır. Hücreler 500 g’de 10 dk  $+4^{\circ}\text{C}$ ’de santrifüj edildikten sonra 2 kez  $1 \times$  PBS ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Hücre peletine proteaz ve fosfataz inhibitor kokteyli eklendikten sonra 200  $\mu$ l ekstraksiyon tamponu eklenmiştir. Daha sonra hücreler 20 dk buzda inkübe edilmiştir. 1600 g’de  $+4^{\circ}\text{C}$ ’de 20 dk santrifüj edildikten

sonra hücre pelleti uzaklaştırılıp supernatant kısmı temiz bir eppendorfa aktarılmıştır. Protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak spektrofotometrede 595 nm’de tayin edilmiştir.

1× inkübasyon tamponu, bloklama solüsyonunun 1:10 oranında 1× yıkama tamponu ile seyreltilmesi sonucunda hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakadaki her kuyucuğa örneklerden 100 µl eklenmiştir. Standart olarak da 100 µl 1× inkübasyon tamponu eklendikten sonra plaka oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklar aspire edildi ve 300 µl 1× yıkama tampon ile 2 kez yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Liyofilize halde olan 10× reaksiyon ajanı 1 ml base buffer eklenerek sulandırılmıştır. 1× aktivite solüsyonu 10× reaksiyon ajanının 1:10 oranında base buffer ile seyreltilmesi sonucunda taze olarak hazırlanmıştır. 100 µl 1× aktivite solüsyonu kuyucuklara dikkatli bir şekilde eklenerek, kabarcık oluşumu engellenmiştir. Mikroplaka okuyucuda (Biotek, ABD) oda sıcaklığında 412 nm’de her 20 saniyede bir okuma olacak şekilde, 30 dk boyunca kinetik okuma yapılmıştır.

#### **4.5. ATP Analizi**

A549 hücrelerinde ATP miktarının ölçümü için “ATP bioluminescence assay kit HS II (Roche)” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.  $5 \times 10^5$  hücre/ml A549 hücreleri Gli 5, Gli 25 veya OKSFOS besi ortamında 72 saat süre ile hipoksi ya da normoksi koşullarda inkübe edilmişlerdir. ATP standart çözeltisinin final konsantrasyonu 10 mg/ml (16,5 mM) olacak şekilde seyreltme çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. ATP standart eğrisinin oluşturulması için ATP standardının  $10^{-4}$  ile  $10^{-12}$  M aralığında seri dilüsyonları hazırlanmıştır. İnkübasyon süresinin bitimi ile birlikte hücreler kazıyıcı ile besi kaplarından toplanarak, 3 dk 1200 rpm’de santrifüj işlemine tabi tutulmuşlardır. Hücre pelleti 150 µl seyreltme çözeltisi ile süspanse edildikten sonra hücrelere 150 µl hücre lizis tamponu eklenmiştir. Lizis işlemi için hücreler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Hücre lizatlarının 50 µl’si 96 kuyucuklu plakalara aktarıldıktan sonra 50 µl lusiferaz ajanı hücrelere eklenmiştir. Farklı dilüsyonlarda hazırlanan ATP standartı dilüsyonları ve hücre örnekleri mikroplaka okuyucuda biyoluminometrik okuma ile ölçülmüştür. ATP standart eğrisi için log-log grafiği çizildikten sonra hücre örneklerinin konsantrasyon hesaplaması ATP standart grafiği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **4.6. Anneksin V-FITC/PI Yöntemi**

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için “FITC Anneksin V Apoptosis Detection Kit II (BD Pharmingen)” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem için A549 hücreleri Gli 5, Gli 25 veya OKSFOS besi ortamında 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilerek 24, 48 ve 72 saat boyunca hipoksi veya normoksi koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkandıktan sonra  $1 \times$  tripsin/EDTA ile inkübasyon sonrasında hücreler toplanarak akım sitometri tüplerine alınmıştır. 1200 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra üzerine 100  $\mu$ l  $1 \times$  bağlanma solüsyonu eklenerek resüspanse edilmiştir. 5  $\mu$ l Anneksin V-FITC ve 5  $\mu$ l PI ilave edilerek hücreler oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 15 dk inkübasyona tabi tutulmuştur. 400  $\mu$ l bağlanma solüsyonu eklenen hücre çözeltisi bir saat içerisinde akım sitometri cihazı (BD FACSAria, ABD) ile analiz edilmiştir.

#### **4.7. Mitokondriyal Membran Potansiyel (MMP) Ölçümü**

Mitokondriyal membran potansiyelinin ölçümü için “Flow Cytometry Mitochondrial Potential Detection Kit (BD)” kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. A549 hücreleri Gli 5, Gli 25 veya OKSFOS besi ortamında 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilerek 24, 48 ve 72 saat boyunca hipoksi veya normoksi koşullarda inkübe edilmiştir. Hücreler tripsinlendikten sonra santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti 0,5 ml JC-1 çalışma solüsyonu ile resüspanse edilmiştir. Daha sonra, hücreler 37 °C’de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edilmiştir. Örneklere sırasıyla önce 2 ml daha sonra 1 ml  $1 \times$  tampon solüsyonu ilave edilerek yıkama işlemine tabi tutulmuştur ve her bir yıkama işlemi arasında 3 dk 1200 rpm’de santrifüj edilmiştir. Supernatant atıldıktan sonra pellet 0,5 ml  $1 \times$  tampon solüsyonu ile resüspanse edilmiştir ve akım sitometri (BD FACSAria, ABD) ile analiz edilmiştir.

#### **4.8. Kaspaz-9 Aktivitesinin Belirlenmesi**

Kaspaz 9 aktivitesinin ölçümü için “CaspGLOW Fluorescein Active Caspase 9 Staining Kit (Thermo)” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. A549 hücreleri Gli 5, Gli 25 veya OKSFOS besi ortamında 6

kuyucuklu plakalara her kuyucukta  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilerek, 24 ve 48 saat hipoksi ve normoksi koşullarda inkübe edilmiştir. Hücreler  $1 \times$  tripsin ile toplanarak, 3 dk 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 300  $\mu$ l besi ortamı ile resüspanse edilmiştir. Hücrelere 1  $\mu$ l FITC-LEHD-FMK eklenerek hücreler 1 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  inkübatöründe inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırılmıştır. 0,5 ml yıkama tampon ile hücreler 2 kez yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Pellet 500  $\mu$ l yıkama tamponu içerisine alınarak akım sitometri (BD FACSAria, ABD) ile analiz edilmiştir.

#### **4.9. Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi**

Kaspaz 3 aktivitesinin ölçümü için "FITC Active Caspase-3 apoptosis kit (BD)" kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. A549 hücreleri Gli 5, Gli 25 veya OKSFOS besi ortamında 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilerek 24, 48 ve 72 saat hipoksi veya normoksi koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda  $1 \times$  tripsin ile toplandıktan sonra 3 dk 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantın uzaklaştırılması ile hücre pelleti  $1 \times$  soğuk PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra hücreler 0,5 ml Cytotfix/Cytoperm solüsyonu ile resüspanse edilmiştir. 20 dk buzda inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra 3 dk 1200 rpm'de santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pellet 2 kez oda sıcaklığında  $1 \times$  perm/yıkama solüsyonu ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Her örnek için 100  $\mu$ l tampon ve 20  $\mu$ l antikordan oluşan çözelti ile pellet resüspanse edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildikten sonra 1 ml  $1 \times$  perm/wash tamponu ile yıkandıktan sonra hücreler 0,5 ml perm/yıkama solüsyona alınarak, akım sitometri (BD FACSAria, ABD) ile analiz edilmiştir.

#### **4.10. İstatistiksel Analiz**

Tüm veriler ortalama  $\pm$  Standart Error of Mean (S.E.M.)/Standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9.0 software programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırmalar iki yönlü varyans analizi (Two-way ANOVA) ile yapılmıştır. ANOVA analizi Tukey çoklu karşılaştırma analizi ile birlikte kullanılmıştır. Tüm testlerde istatistiksel önem için  $p < 0.05$  kriter alınmış ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar \* ile gösterilmiştir (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ , \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

İstatistiksel olarak anlamlı olmayan farklılıklar ise “non-significant (ns)” ifadesi ile belirtilmiştir (ns,  $p \geq 0.05$ ). Her deney bağımsız en az üç kez tekrar edilmiştir.

## **5. BULGULAR ve TARTIŞMA**

### **5.1. Hücre Kültüründe Metabolik Koşulların Oluşturulması**

Tez çalışması kapsamında üç farklı metabolik ortam oluşturulmuştur. Birincisi, oksidatif fosforilasyonun kısmen ya da tamamen baskılandığı ve ATP üretiminin baskın olarak aerobik glikoliz tarafından sağlandığı glikolitik metabolik ortamı, tez kapsamında (Gli) olarak ifade edilmiştir. İkincisi, oksidatif fosforilasyon mekanizmasının aktif olduğu oksidatif fosforilasyon metabolik ortamı, tez kapsamında (OKSFOS) olarak ifade edilmiştir. İki ana metabolik ortam ile birlikte iki farklı glikolitik ortamda deneysel olarak hazırlanmıştır. Bunlardan birincisi 5 mM glukoz (Gli 5) ve ikincisi 25 mM glukoz (Gli 25)'dur.

Rossignol vd., (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, insan kanser hücre hattı (HeLa)'nda, enerji eldesinde kullanılan substratı (glukoz/galaktoz) değiştirmenin mitokondrial içerik, yapı ve fonksiyonu üzerine etkilerini incelenmiştir. Kanser hücrelerindeki baskılanmış mitokondrial sistemin, substrat (glukoz/galaktoz) değişikliği yaparak aktive edilebileceğini göstermiştir. Bu makale de çalışılan HeLa hücreleri, aglisemik ortamda galaktoz ve glutamin kullanılarak kültüre edilmiştir ve bu hücrelerde, mitokondri kompozisyonunun enerji substratına bağlı olarak değiştiği, solunum zincirindeki birçok proteinin seviyesinin arttığı, kompleks I, II, IV, V seviyelerinin arttığı ve krebs enzimlerini indükleyen sitrat sentaz aktivitesinin iki kat arttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda HeLa hücrelerindeki PDH kompleks seviyesi OKSFOS grubunda yüksek iken fibroblastlarda düşük bulunmuş ve PDH'nin down regüle olduğu düşünülmüştür. Tüm bunlar, doğrudan bu enzimlerin ekspresyon seviyesinin artmasındaki etkenin yalnızca “galaktoz” değil beraberinde “glutamin”den de kaynaklandığı, glutaminolizi kullandığı belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında kullanılan A549 hücreleri, aglisemik koşullarda ve galaktoz/glutamin kullanılarak oksidatif fosforilasyona zorlanmıştır. Bu OKSFOS hücreleri aerobik glikoliz ve OKSFOS'un karışımı ile kanser hücre biyoenerjeticinin prototipidir. Kısmi glikolitik değişim glukozun oksidasyonunun yetersizliği ile karakterizedir ve bu durumda piruvat laktik aside dönüşür. Benzer şekilde, 2015 yılında yapılan bir araştırmada, HepG2 hücreleri için de bu üç metabolik koşul oluşturulmuş

olup, elde edilen sonuçlarda bu hücre tipinde aglisemik koşullarda oksidatif fosforilasyona zorlandığı, Gli 5 ve Gli 25 hücrelerinde ise OKSFOS'un azaldığı ya da baskılandığı gösterilmiştir (Plecitá-Hlavatá vd., 2015).

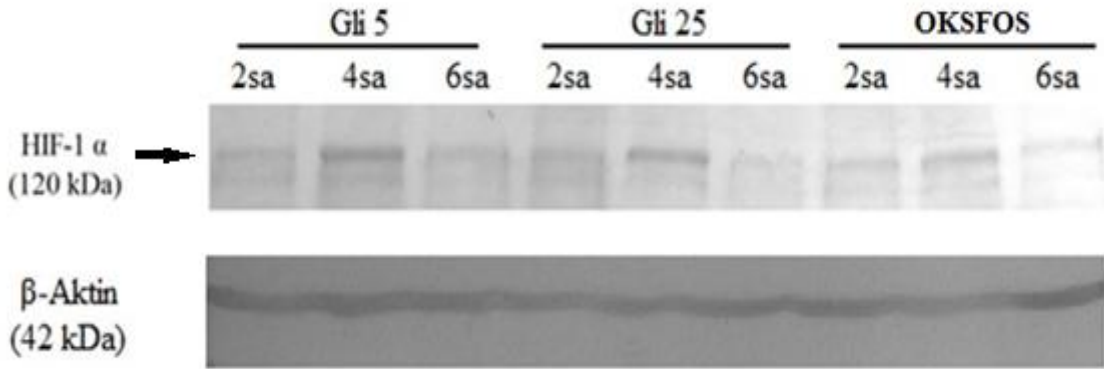
## 5.2. HIF-1 $\alpha$ 'nın stabilizasyonu

Hipoksik adaptasyon biyoenerjetik modülasyonun tipik örneğidir (Brocato vd., 2014; Denko, 2008; Fukuda vd., 2007; Greer vd., 2012; Jiang vd., 1996; Metallo vd., 2012; Seagroves vd., 2001; Semenza, 2007, 2012a, 2012b, 2013; Taylor, 2008; Zepeda vd., 2013). Aşırı proliferasyon ve bozulmuş anjiyogenez, büyümekte olan bir tümör içindeki belirli bölgede hipoksiye neden olur ve bu da HIF-1 $\alpha$ 'nın stabilizasyonuna ve aerobik glikolizin desteklenmesi dahil HIF sistemi tarafından eş zamanlı metabolik yeniden programlanmaya yol açar (Brocato vd., 2014; Semanza, 2007, 2012; Schito ve Semenza, 2016; Zepeda vd., 2013).

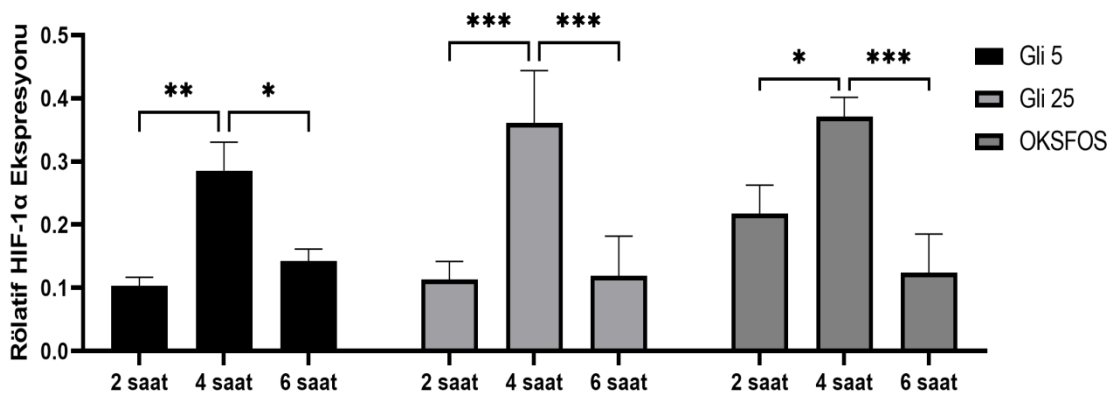
Glikolitik fenotipin değişmesi; AMP-aktive protein kinaz, HIF, NF $\kappa$ B, mTOR ve onkogenler yoluyla yeniden gen düzenlenmesiyle meydana gelmektedir. Normoksi durumunda, PDH tarafından HIF-1 $\alpha$  proteinlerinin hidroksilasyonu olur ve faktör-inhibe edici HIF (FIH) ile asparajinler oluşur ve HIF-1 $\alpha$  poliübikitasyon/degradasyonu ile sonuçlanır. O<sub>2</sub> seviyesi eşik değerin altına düştüğünde (<%5 O<sub>2</sub>) sitosolik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PDH'lerin ve FIH'nin Fe<sup>+2</sup> sini yükseltir ve okside ederek inaktive olmalarına neden olur. Böylece HIF-1 $\alpha$  stabilitesi gerçekleşir ve spesifik genlerin transkripsiyonu artmış olur (Ježek vd., 2010).

İmmunohistokimyasal analizler; benign tümörlerde saptanabilir miktarlarda, malign tümörlerde artmış miktarlarda, metastazlarda ise aşırı miktarlarda HIF-1 $\alpha$  proteini bulunduğunu, normal dokularda ise bulunmadığını göstermiştir (Stiehl vd., 2002; Talks vd., 2000; Tian vd., 1997). HIF-1 $\alpha$ 'ın kolon, meme, akciğer, over, prostat, deri ve mide gibi birçok insan malign kanserlerinde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. Daha da ötesi, meme ve kolon kanser metastazlarının pek çoğunda HIF-1 $\alpha$  birikimi saptanmış ve kötü yaşam sonuçlarıyla ilişkilendirilmiştir (Bruick ve McKnight, 2001; Brusselmans vd., 2001). HIF-1 $\alpha$  protein seviyelerinin çeşitli kanserlerde, yeni tedavi stratejileri planlanırken, bir biyomarker olarak kullanılabilceği öne sürülmüştür (Chen vd., 2001; Conway vd., 2001).

Bu çalışmada, üç farklı metabolik ortamda bulunan A549 hücreleri hipoksi inkübatörde (%1 O<sub>2</sub>) 2, 4 veya 6 saat inkübe edilmiştir. Her bir inkübasyon süresi sonrasında hücrelerin HIF-1 $\alpha$  protein seviyesi western blot yöntemi ile belirlenmiştir. %1 O<sub>2</sub> adaptasyonunda ve tüm deneysel metabolik ortamlarda 4 saat inkübasyonu sonrasında HIF-1 $\alpha$  maksimum stabilizasyonuna ulaştığı gözlenmiştir. İnkübasyon süresinin 6 saate uzatılması ile HIF-1 $\alpha$  ekspresyon düzeyinin azalmaya başladığı tespit edilmiştir (Şekil 5.1 ve 5.2).



**Şekil 5.1.** Glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin hipoksik (%1 O<sub>2</sub>) ortamda 2, 4 veya 6 saat inkübasyonu sonrası HIF-1 $\alpha$  protein ekspresyon seviyesi (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz) Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.



**Şekil 5.2.** Glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin hipoksik (%1 O<sub>2</sub>) ortamda 2, 4 veya 6 saat inkübasyonu sonrası HIF-1 $\alpha$  protein ekspresyon seviyesine ait dansimetrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz) Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\* $p$  < 0,05; \*\* $p$  < 0,01; \*\*\* $p$  < 0,001).



Jezeck vd., (2018)'nin yaptığı çalışmada, HepG2 hücreleri hafif hipoksiye (%5 O<sub>2</sub>) maruz bırakıldığında, benzer tüm metabolik durumlarda HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonunun 5 saat inkübasyon süresi sonrasında maksimum seviyeye ulaştığı gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada ise, HEK293 hücreleri 8 saat inkübe edildikten sonra HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonuna ulaşıldığı belirtilmiştir (Nguyen vd., 2013).

Akciğer alveolar epitel hücrelerinde HIF-1 ve HIF-2'nin varlığı, iki izoformun birlikte eksprese edildiğini düşündüren çalışmalar bulunmaktadır (Yu vd., 1998; Sato vd., 2002). HIF-2'nin hipoksik indüksiyonu, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak gösterilmiştir (Wiesener vd., 1998; 2003), buna karşın HIF-1'in indüksiyonu tartışmalıdır. HIF-1 proteini, gelincik akciğerinde ve alveolar epitel hücre hattı A549'da akut hipoksizde hızla indüklenir, ancak hafif hipoksiye maruz kalan farelerin akciğerlerinde veya 12 saat hipoksiye maruz kalan A549 hücrelerinde saptanamaz haldedir (Yu vd., 1998; Stroka vd., 2001; Sato vd., 2002). Bu bulgular, HIF-1 ve HIF-2'nin alveolar epitel hücrelerinde hipoksinin şiddeti ve süresi ile ne kadar farklı düzenlendiği konusunda önemli sorular ortaya çıkarmaktadır. Uchida vd., (2004) yaptıkları bir çalışmada, A549 hücrelerinde, HIF-1 protein ekspresyon seviyeleri hem hücrede ve hem de nükleer ekstralarında belirlenmiştir. Normoksi sırasında, HIF-1 ekspresyonu hem hücrede hem de nükleer ekstralarda çok düşük seviyede gözlenmişken, hücreler 4 saat boyunca hipoksiye (%0.5 O<sub>2</sub>) maruz kaldığında, HIF-1 ve 2'nin indüklendiği belirtilmiştir. HIF-1'in hipoksik indüksiyonunun oksijen konsantrasyonuna bağlı olduğu ve %3'ün altındaki O<sub>2</sub> konsantrasyonunda artış gözlemlendiği ve maksimum artışın %0.5 O<sub>2</sub> seviyesinde olduğu belirtilmiştir. HIF-1 proteinin uzun süreli hipoksi durumunda ortadan kaybolabileceği gösterilmiştir. Uzun süreli hipoksi durumunda, HIF-1 mRNA seviyesi, HIF-1'in kendisi tarafından otomatik olarak geri beslenerek veya HIF-1 ile HIF-2 arasındaki trans-regülasyonla düzenlendiği belirtilmiştir (Uchida vd., 2004).

Bu çalışmada, A549 hücrelerinin hipoksik ortamdaki (%1 O<sub>2</sub>) üç metabolik koşulun tümünde 4 saatlik inkübasyon sonrasında maksimum HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonuna ulaştığı, 6 saatlik inkübasyon sonrasında ise ekspresyonun azaldığı şeklinde elde edilen deneysel sonuçlar, hem Uchida vd., (2004)'de A549 hücre hattı ile yaptığı çalışmayla hem de farklı hücre dizilerinde hipoksiye bağlı HIF-1 proteininin uzun süreli hipoksi ile ortadan kaybolabileceğini gösteren önceki çalışmalarla uyumludur (Wiesener vd., 1998; Graven, vd., 2003; Wenger vd., 1997).

Hipoksik ve normoksi koşullarda 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin nükleer lokalize HIF-1 proteininde önemli bir artış gözlenmiştir. (Krick vd., 2005). Buna karşı Sato vd., (2002) yapılan çalışmada ise, HIF-1 proteinin seviyesinin daha kısa inkübasyon (12 saat) süresi sonrasında düştüğü gözlenmiştir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar Sato vd., (2002)'e benzer şekilde 6 saat sonra HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun düşmeye başladığını göstermiştir (Şekil 5.1 ve Şekil 5.2).

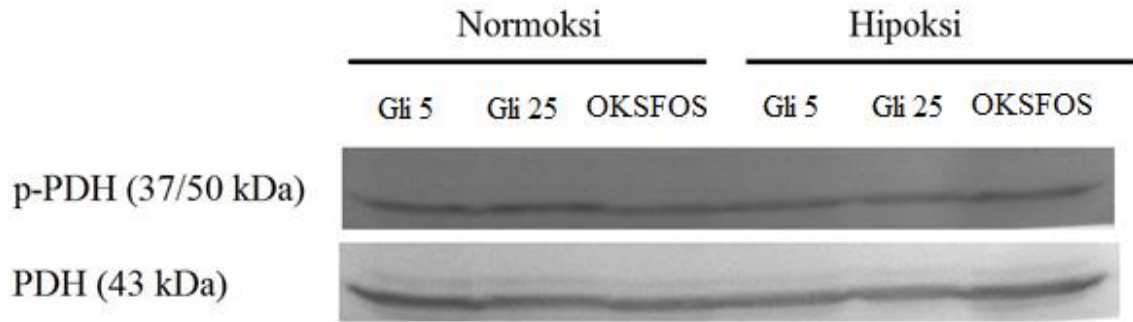
### 5.3. p-PDH/PDH ekspresyonunun değerlendirilmesi

HIF glikolitik fenotipi üzerine; PKM izoformunu değiştirerek ve PDH kinaz aracılı PDH fosforilasyonu ile PDH inhibisyonu yaparak etki gösterir (Krall vd., 2013; Kim vd., 2006; Hitosugi vd., 2009). Piruvatın Krebs döngüsüne bu şekilde girmesinin engellenmesine rağmen çoğu kanser hücresi özellikle glutaminoliz yoluyla oksidatif fosforilasyonu belirli dereceye kadar korunmaktadır (Altman vd., 2016; DeBerardinis ve Chandel, 2016; Jin vd., 2016; Smolková vd., 2011; Vander Heiden vd., 2017). Glutamin, glutamaz tarafından glutamata okside edilmektedir. Tipik glutaminolitik kanser hücrelerinde olduğu gibi eğer glutamat dehidrogenaz (GDH) inhibe edilmezse, glutamat  $\alpha$ -ketoglutarat ( $\alpha$ KG) okside olabilir (Altman vd., 2016; DeBerardinis ve Chandel, 2016; Jin vd., 2016; Smolková vd., 2011; Vander Heiden vd., 2017). Bunun yerine glutaminoliz, Krebs döngüsüne doğrudan  $\alpha$ KG sağlayan aminotransferaz anaplerotik reaksiyonları ile gerçekleşir (Altman vd., 2016; Van der Heiden vd., 2017). ALT1/ALT2, piruvatı kullanan bir diğer enzim olan laktat dehidrojenaz ile rekabet eder ve piruvatı kullanır. Glutaminoliz olmadan, kanonik HIF transkriptom yeniden programlaması da PDH'nin inhibisyonuna yol açtığı zaman, hipoksi sırasında kalıcı bir asetil-CoA eksikliği olacaktır. Bu engelleme tamamlanmış olması durumunda, Krebs döngüsü ve OKSFOS durmaktadır.

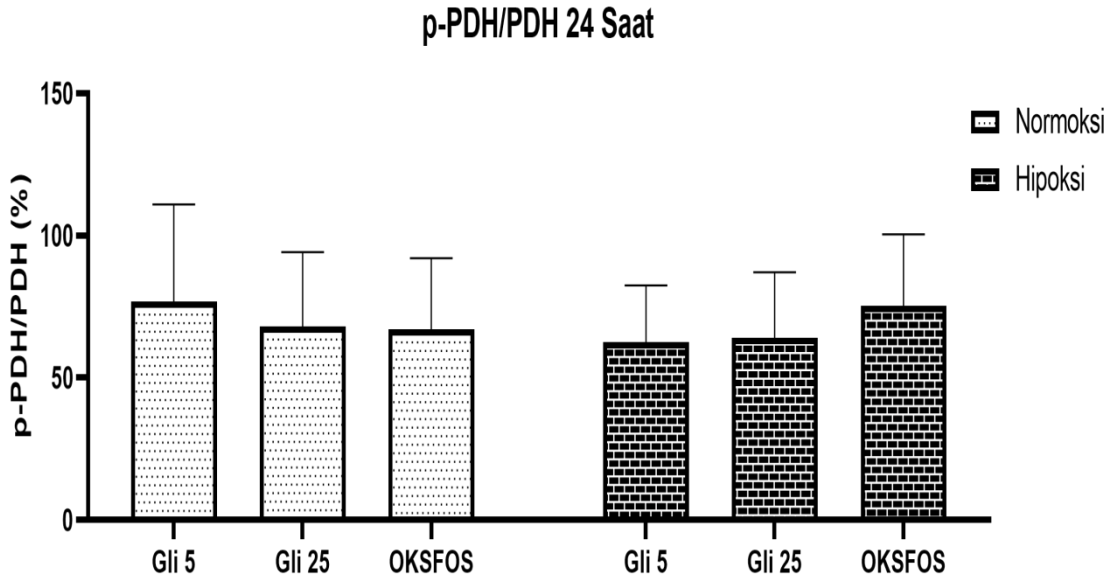
Tez çalışmasında, A549 hücreleri 24 ya da 48 saat hipoksi ve normoksi şartlarda kültüre edilmiştir. 24 saat inkübasyon sonrasında p-PDH/PDH ekspresyon oranları arasında herhangi bir değişim tespit edilmemiştir (Şekil 5.3 ve Şekil 5.4). 48 saat normoksik koşullarda inkübe edilen Gli hücre grubunda (Gli 5 mM ve Gli 25 mM) p-PDH/PDH ekspresyon oranı yüksek bulunurken (sırasıyla, %67  $\pm$ 6.5; %77  $\pm$ 12.1), OKSFOS hücre grubunda bu oran istatistiksek olarak düşük (%33  $\pm$ 4.3) tespit edilmiştir (\*p < 0.05; \*\*p < 0,01). Normoksi koşullarda 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin

glikolitik yolağı tercih ettiğı ve deneysel olarak hazırlanan metabolik koşulların sağlandığı gösterilmiştir. Normoksi koşullar altında glikolitik Gli 5 ve Gli 25 hücre gruplarında Warburg fenotipinin hallmarkı olan p-PDH ekspresyonu diğer gruplara kıyasla daha belirgin olarak gözlenmiştir. 48 saat inkübasyon sonrasında, OKSFOS (10 mM galaktoz) hücre grubunda ise p-PDH ekspresyonu düşük olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.5 ve Şekil 5.6). Bu durumda, OKSFOS metabolik koşul ortamında inkübe edilen normoksi hücrelerin ise yüksek oranda oksijenli solunum yönüne kaymasına rağmen kısmen de olsa glikolitik yolağı da tercih ettikleri söylenebilir. Hipoksi koşullarda 48 saat inkübe edilen OKSFOS hücre grubunda ise p-PDH/PDH oranı normoksi hücre grubuna göre artış (%53±0,6) gözlenmiştir.

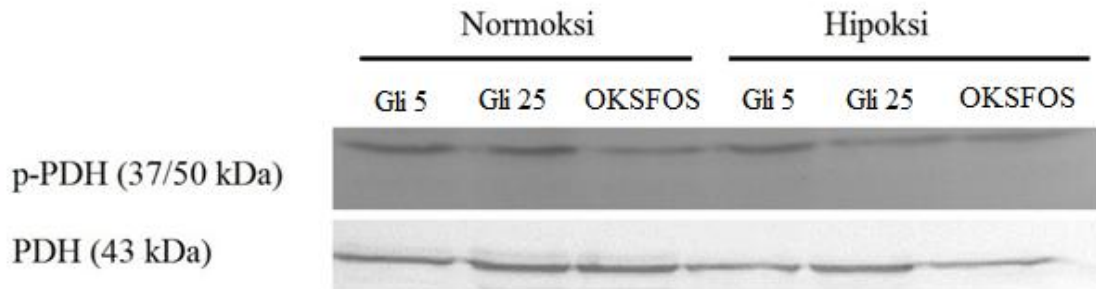
Plecitá-Hlavatá vd., (2015)'nin yaptığı çalışmada, HepG2 hücreleri glutamin ve galaktoz içeren besi ortamında kültüre edildiğinde (aglisemik ya da OKSFOS hücreleri) PDH fosforilasyonunun yetersiz olduğu gözlemlenmiştir. Normoksidede yaklaşık %50, hipoksidede yaklaşık %40 PDH aktif iken, 5 ve 25 mM glukoz içeren HepG2 hücrelerinde (glikolitik hücreler, Gli 5 ve Gli 25) sadece normoksidede %20, hipoksidede %5-10 aktiftir (Plecitá-Hlavatá vd., 2015).



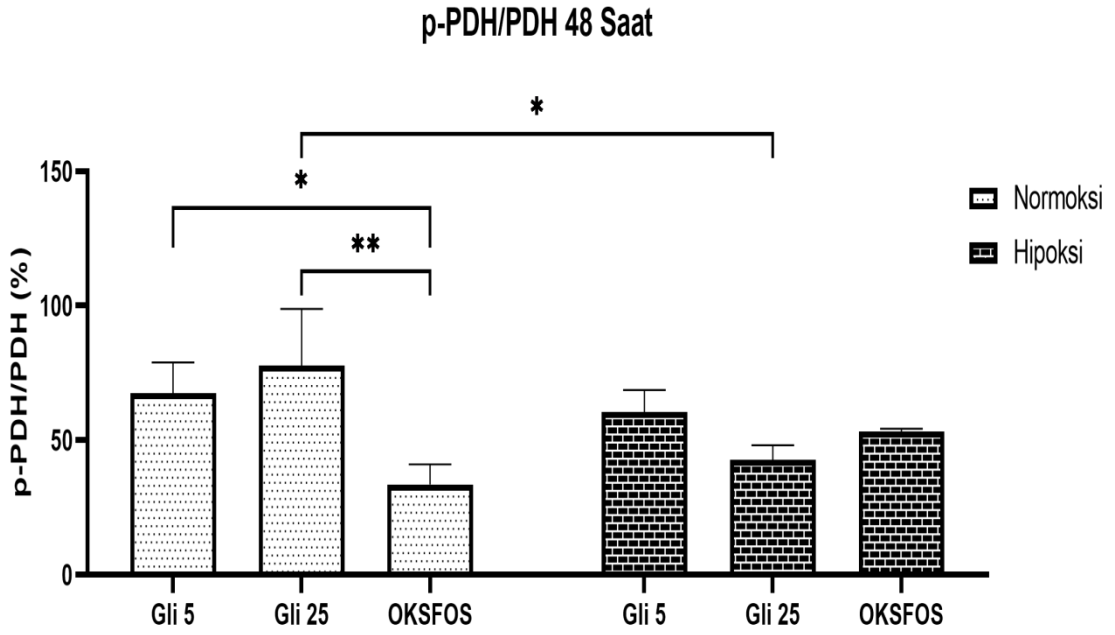
**Şekil 5.3.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin p-PDH ve PDH protein ekspresyon seviyesi (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz).



**Şekil 5.4.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin p-PDH/PDH protein ekspresyon oranının western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).



**Şekil 5.5.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin p-PDH ve PDH protein ekspresyon seviyeleri (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.



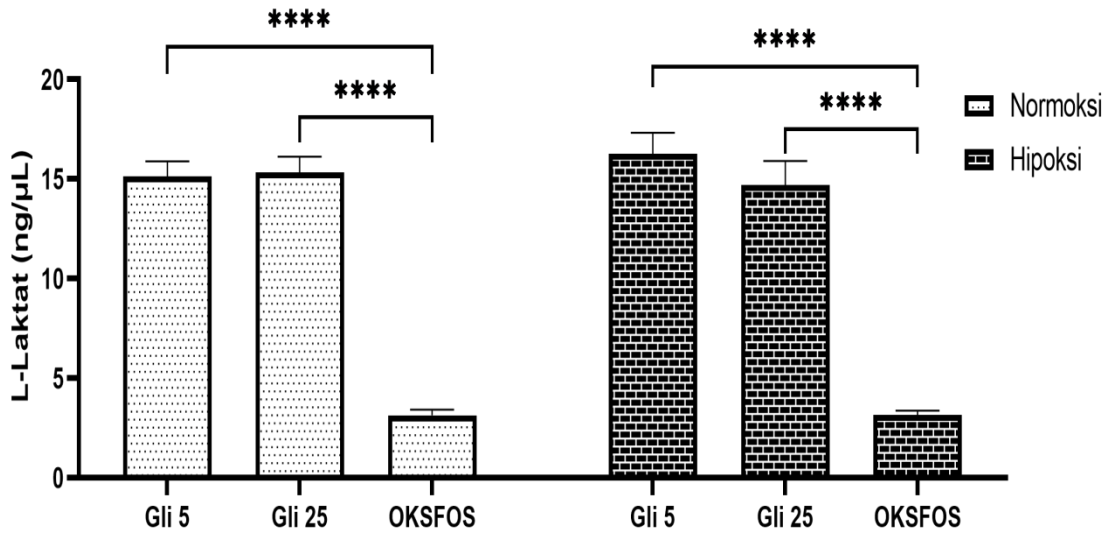
**Şekil 5.6.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin p-PDH/PDH protein ekspresyon oranının western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz. Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\*p < 0.05; \*\*p < 0,01).

#### 5.4. L-laktat Analizi

HIF-1 $\alpha$ , piruvatın laktata dönüşümünü kolaylaştıran laktat dehidrogenaz-A'nın ekspresyonunu uyarmaktadır (Semenza vd., 1996; 2003; 2007). LDH, LDH-H alt biriminden (LDHB geni tarafından kodlanır) ve/veya LDH-M alt biriminden (LDHA tarafından kodlanır) oluşan tetramerik bir enzimdir. Genel olarak, LDH ile katalize edilen reaksiyon tersine çevrilebilir. Ancak, "saf" LDH-M alt birimlerini içeren LDH enzimi, tercihen piruvatı laktata dönüştürür. LDHA, HIF'nin doğrudan transkripsiyonel bir hedefidir ve hipoksi ile yüksek oranda indüklenebilir. Bu nedenle HIF, yalnızca LDH-M'den yapılan LDH enziminin oluşumunu teşvik eder ve piruvatı daha verimli bir şekilde laktata dönüştürür. Bu durumda HIF, mitokondriye piruvat akışını dolaylı olarak azaltabilir. Genelde metastatik tümörlerin hipoksik mikro ortamı, HIF aracılı glikolitik duruma dönüşümü uyarmakla birlikte, OKSFOS durumunun görüldüğü tümörlerde bulunmaktadır (Ježek vd., 2010).

Bu çalışma kapsamında, A549 hücreleri Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik koşullarda ve hipoksi ya da normoksi ortamında 72 saat inkübe edildikten sonra besi ortamına salınan laktik asit miktarı kolorimetri yöntemi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.7’de gösterilmiştir. Normoksi koşullarda Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarında laktat miktarı sırasıyla;  $15.1 \pm 0.38$ ,  $15.3 \pm 0.39$ ,  $3.1 \pm 0.1$  ng/ $\mu$ l olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, normoksi koşullarda hücrelerin metabolik ortama uygun olarak davrandığını göstermektedir. Glikolitik ortamda hücrelerin OKSFOS ortamdaki hücrelere kıyasla 5 kat fazla laktat ürettikleri tespit edilmiştir ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (\*\*\*\*p < 0,0001). Hipoksi koşullarda ise laktat miktarı Gli 5 hücre grubunda  $16.2 \pm 0.5$  ng/ $\mu$ l, Gli 25 hücre grubunda  $14.7 \pm 0.6$  ng/ $\mu$ l, OKSFOS hücre grubunda  $3.1 \pm 0.1$  ng/ $\mu$ l olarak ölçülmüştür. Hem normoksi hem de hipoksi koşullarda, OKSFOS hücre grubundaki laktat miktarı Gli grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir (\*\*\*\*p < 0,0001). Koşulların normoksiden hipoksiye geçişi, hücrelerin laktat üretim miktarında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

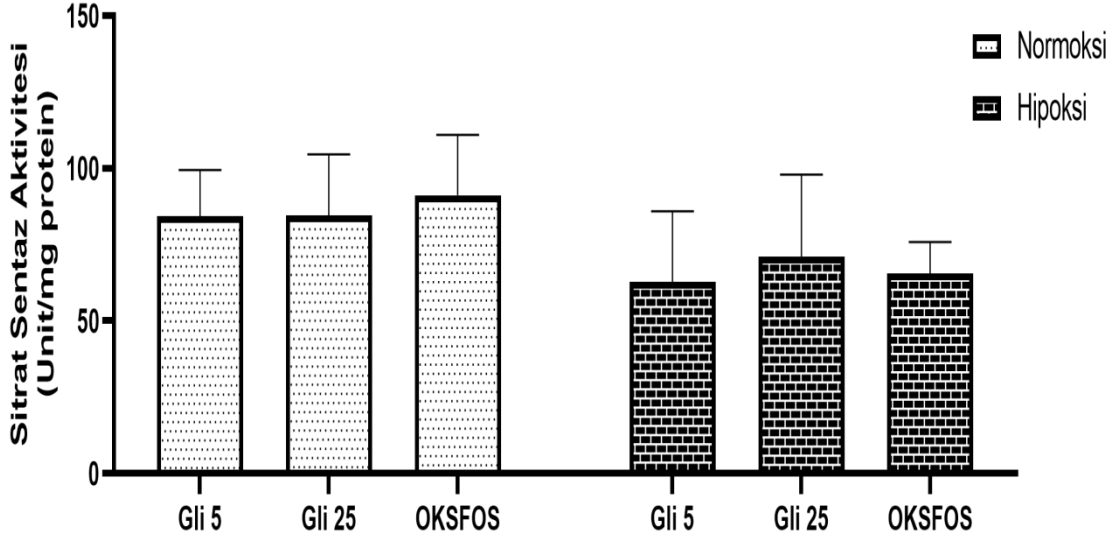
HepG2 hücrelerinin, hipoksik koşuldaki (%5 O<sub>2</sub>) OKSFOS hücre grubunun laktat salınımı normoksik koşuldaki OKSFOS hücre grubuna göre 1.6 kat arttığı, hem hipoksik hem de normoksik koşuldaki Gli 5 ve Gli 25 hücre gruplarının ise normoksik koşuldaki OKSFOS’a göre 6 kat ve 8 kat daha yüksek laktat salınımı yaptığı tespit edilmiştir (Plecitá-Hlavatá vd., 2015). Gli 5 ve Gli 25 grubu HepG2 hücrelerinin laktat üretim miktarının, hücrelerin hipoksi ortamına alınması sonrasında değişmediği gösterilmiştir (Plecitá-Hlavatá vd., 2015). Literatürde yer alan bu deneysel veriler, tez kapsamında A549 hücrelerinden elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.



**Şekil 5.7.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 72 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin L-laktat analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 5.5. Sitrat Sentaz Aktivitesi

72 saat boyunca normoksi ya da hipoksi ortamda ve Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik koşullarda inkübe edilen A549 hücrelerinde sitrat sentaz enzim aktivitesi kolorimetri yöntemi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, hipoksi ortamda 72 saat inkübe edilen hücrelerin sitrat sentaz aktivitesinin normoksi ortamda tutulan hücre grubuna göre daha düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.8), ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (ns,  $p \geq 0.05$ ). Normoksi ortama maruz bırakılan A549 hücrelerindeki sitrat sentaz aktivitesi sırasıyla Gli 5 hücre grubunda  $84.26 \pm 6.1$ , Gli 25 hücre grubunda  $84.55 \pm 8.1$  ve OKSFOS hücre grubunda ise  $91.17 \pm 8$  Unit/mg olarak bulunmuştur. Hipoksi ortama maruz bırakılan A549 hücrelerindeki sitrat sentaz aktivitesi sırasıyla Gli 5 hücre grubunda  $62.86 \pm 9.4$ , Gli 25 hücre grubunda  $71.02 \pm 10.9$  ve OKSFOS hücre grubunda ise  $65.44 \pm 4.2$  Unit/mg olarak ölçülmüştür (Şekil 5.8).



**Şekil 5.8.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 72 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin sitrat sentaz aktivitesi analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz) D deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

Yapılan bir çalışmada, A549 hücrelerindeki solunumun azalmasının mitokondri sayısındaki azalmaya bağlı olup olmadığını araştırmak için 24 saat süreyle normoksi ya da hipoksi ortamda inkübe edilen A549 hücrelerinde sitrat sentaz enzim aktivitesinin ölçümü yapılmış ve hipoksiye maruz bırakılan hücrelerde sitrat sentaz aktivitesinin yaklaşık %23 oranında azaldığı gösterilmiştir (Heerlein vd., 2005). HepG2 hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada ise, normoksi ortamdan hipoksiye geçişte Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS metabolik koşullarının tümünde yaklaşık %10'luk düşüş olmuştur (Plecitá-Hlavatá vd., 2015). Tez çalışmasında normoksi koşullardan hipoksiye geçişte, Gli 5 hücre grubunda %25, Gli 25 hücre grubunda %17, OKSFOS hücre grubunda ise %28'lik düşüş olmuştur. Literatürdeki bu veriler, tez kapsamındaki A549 hücrelerinde elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

## 5.6. ATP Analizi

OKSFOS'un aerobik glikolize karşı ATP üretimine katkısı çeşitli hücre tiplerinde fizyolojik veya patolojik koşullar altında farklılık göstermektedir (Jezek vd., 2010). Bu nedenle, ATP'nin metabolik kaynağı, moleküler hücre fizyolojisinin sayısız fenomenini

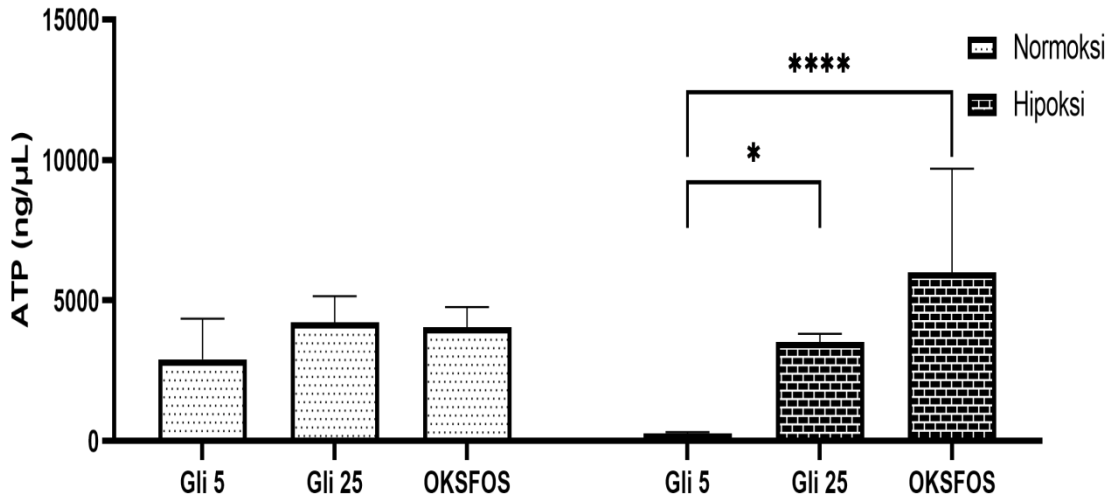


açıklayan kilit nokta olabilir. Yani kanser hücresinin ATP kaynağının daha çok glikolitik yolak mı olduğu yoksa OKSFOS'un baskın olduğu bir yolağı mı kullandığını bilmek önemlidir. Hücrenin biyoenerjisinin önemli bir kısmı aslında glikoliz tarafından üretilen piruvat molekülüne karşı OKSFOS tarafından kullanılan piruvat molekülünün oranıdır (Ježek vd., 2010; Kim vd., 2006; Wu vd., 2007). OKSFOS tarafından kullanılmayan piruvat ise, laktat üretimi için kullanılmaktadır (Wigfield vd., 2008). Hücre biyoenerjisinin diğer önemli bir kısmını ise, OKSFOS tarafından üretilen ATP'ye göre daha sonra OKSFOS'dan bağımsız olarak yalnızca glikoliz (aerobik) tarafından üretilen ATP'nin oranıdır.

Aglisemik, yani galaktozla büyütülen OKSFOS hücrelerinde glutaminoliz, tamamen galaktozdan oluşan G6-P'ye bağlı olan glikoliz reaksiyonu ile birlikte bulunur. Galaktoliz tarafından sağlanan glikolitik yol, 3 ATP molekülü verirken, G6-P'a galaktoz dönüşümü talebini karşılamak için 1 veya 2 ATP gereklidir (Morava, 2014; Tang vd., 2016). Galaktoliz, *Leoir yolu* olarak da bilinir ve oldukça düşük bir aktivite ile karakterizedir (Morava vd., 2014; Tang vd., 2016). Tüm bu olaylar, hücrenin yüksek enerji talebini verimli şekilde karşılayamamasına sebep olmaktadır. Bu, aglisemik hücrelerin glutaminden OKSFOS'a bağımlılığı anlamına gelir ve hatta bu hücrelerin OKSFOS'a zorlandığı şeklinde tanımlanmaktadır (Ježek vd., 2018).

Bu çalışma kapsamında, Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik ortamlarda kültüre edilen A549 hücreleri 72 saat normoksi ya da hipoksi koşullara maruz bırakıldıktan sonra total hücre ATP analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.9'de gösterilmiştir. Glikolitik A549 hücrelerinin normoksi koşullar altında üretilen ATP miktarının, hipoksi koşullara maruz bırakılan glikolitik A549 hücrelerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Hem Gli 5 hem de Gli 25 hücrelerinin hipoksi koşullar altındaki ATP üretiminde düşüş gözlenmiştir. Gli 5 metabolik ortamda kültüre edilen ve normoksi koşullara 72 saat süre ile maruz bırakılan hücrelerdeki ATP üretim miktarı  $2904 \pm 591$  ng/ $\mu$ l iken, hipoksi koşullara maruz bırakılan hücrelerdeki ATP üretim miktarı ise  $266 \pm 20$  ng/ $\mu$ l olarak ölçülmüştür (Şekil 5.9). Gli 25 metabolik ortamda kültüre edilen ve normoksi koşullarda inkübasyona tabi tutulan hücrelerdeki ATP üretim miktarı  $4234 \pm 377$  ng/ $\mu$ l iken, hipoksi koşullara maruz bırakılan hücrelerdeki ATP üretim miktarı ise  $3517 \pm 121$  ng/ $\mu$ l olarak tespit edilmiştir. Gli 25 metabolik koşullarda kültüre edilen hücrelerin ATP üretim miktarı üzerine normoksi ya da hipoksi koşullarının belirgin bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Ancak, hipoksi

koşuldaki Gli 25 metabolik ortam ile Gli 5 metabolik ortam sonucunda üretilen ATP miktarı kıyaslandığında ise, Gli 25 metabolik ortamının A549 hücrelerinin ATP üretimine istatistiksel olarak anlamlı (\* $p < 0.05$ ) bir artışa, normoksi koşulda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışa (ns,  $p \geq 0.05$ ) neden olduğu belirlenmiştir. OKSFOS metabolik ortamda kültüre edilen ve normoksi koşullarda inkübasyona tabi tutulan hücrelerdeki ATP üretim miktarı  $4053 \pm 294$  ng/ $\mu$ l iken, hipoksi koşullara maruz bırakılan hücrelerdeki ATP üretim miktarı ise  $5987 \pm 1511$  ng/ $\mu$ l olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.9).



**Şekil 5.9.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 72 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin ATP analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz) Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Heerlein vd., (2005) A549 hücrelerinin 24 saat boyunca hipoksiye (%1.5 O<sub>2</sub>) maruz kalmasından sonra hücresel ATP konsantrasyonunun %30 azaldığını belirlemiştir.

Wu vd., (2007) ise glukoz ortamında kültüre edilen hücrelerin aksine, glukozdan yoksun hücrelerin oligomisine duyarlı hale geldiğini ve hücresel ATP seviyesinin H460 hücrelerinde %60 ve A549 hücrelerinde ise %40 gibi önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Bu sonuçlar, OKSFOS'un bu hücre dizilerinde işlevsel olduğunu ve ATP

dönüşümüne katkıda bulunduğunu göstermektedir. Ancak, OKSFOS kapasitesindeki bu zayıflama, sadece hücre glikolizinin inhibe olması ile ya da glukoz yoksunluğundan kaynaklı enerji stresi durumunda belirgin hale gelmektedir.

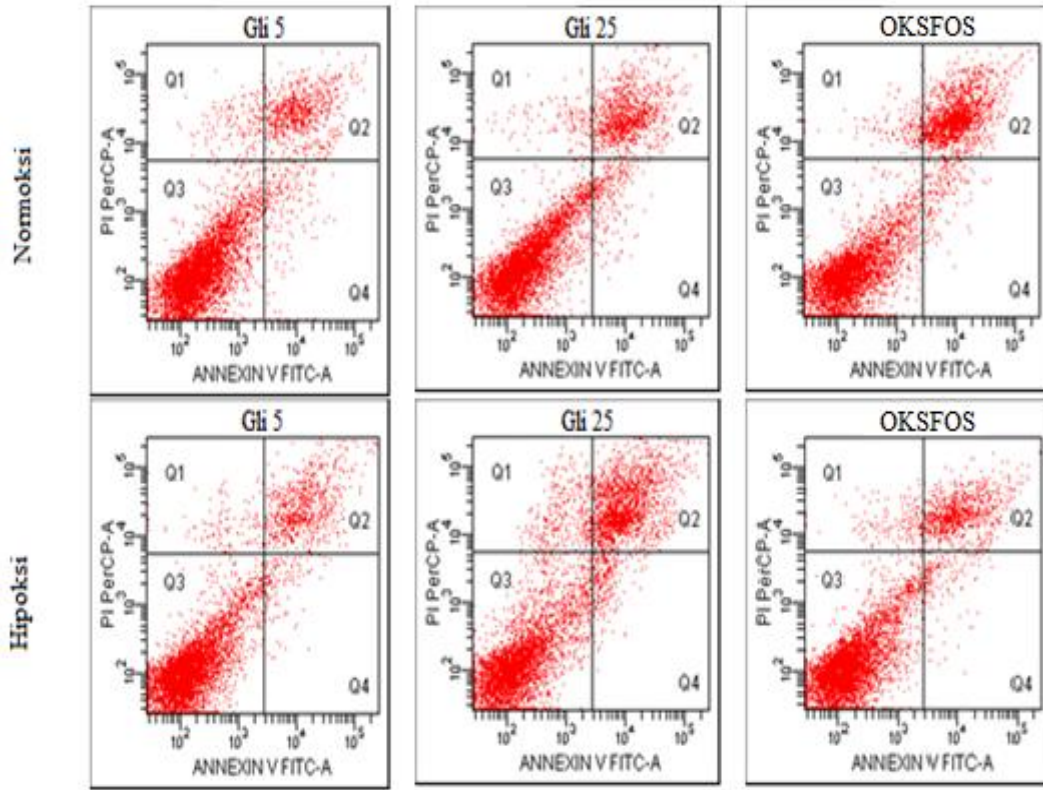
Plecitá-Hlavatá vd., (2015) normoksi koşullarda kültüre edilen HepG2 hücrelerinin ATP içeriğinin, OKSFOS hücre grubuna göre glikolitik hücre grubunda daha düşük (yaklaşık %60, %70) olduğunu belirtmiştir. Hipoksi (%5 O<sub>2</sub>) uygulandığında da ise, bu durumun değişmediğini, Gli 5 ve Gli 25 de ise daha da azaldığını (yaklaşık OKSFOS'a kıyasla %40-35) bildirilmiştir. Hipoksi durumunda, glikolitik hücre grubunun solunum hızında ve ATP seviyesinde yaklaşık %60 azalma olduğu gösterilmiştir. Hipoksik aglisemik HepG2 hücrelerinde HIF-aracılı transkriptom yeniden programlamasına rağmen bu değişmeyen solunum ve ATP seviyesi, kanonik (standart, kabul edilmiş) olmayan HIF yanıtı olarak adlandırılmıştır (Plecitá-Hlavatá vd., 2015). Yani bilinen “kanonik” HIF aracılı OKSFOS’un downregülasyonu gerçekleşmemiştir.

Kanser hücreleri sıklıkla oksijenden yoksun kalır. Bir tümör büyüdükçe, oksijen konsantrasyonunun sağlıklı dokulardakinden önemli ölçüde daha düşük olduğu bölgeler oluşur (Ježek vd., 2010; Semenza 2012a, b; Smolková vd., 2011). Sıklıkla, bu tür hücreler oksijen yoksunluğunun yanı sıra ayrıca glukoz tedariki ile de sınırlıdır. Bu nedenle, glutamin veya serin gibi diğer substrat kaynaklarına, yani glutaminolize geçmeye zorlanırlar (Plecitá-Hlavatá vd., 2015).

Tez çalışması kapsamında A549 hücreleri ile yapılan tüm metabolik deneyler değerlendirildiğinde; Gli 5 ve Gli 25 hücre gruplarının Warburg etkisini desteklediğini, artan laktat üretimine karşı azalmış mitokondriyal solunum gösteren bir kayma göstermiştir. OKSFOS hücre grubunun (aglisemik) ise mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu koruyabildiği belirlenmiştir. HIF-1 $\alpha$  tarafından düzenlenen yeniden metabolik programlamaya rağmen oksidatif fosforilasyonun korunabilmesi kanonik olmayan HIF yanıtıdır ve değişen bu HIF yanıtı aglisemi durumunda devreye girmiştir. Hipoksi durumunda HIF, glikolizi destekleyerek laktat oluşumunu ve p-PDH (inaktif formu)’ın ekspresyonunu artırır. Aglisemi durumunda ise HIF aracılı sinyal yolu değişmiş ve tam PDH blokajı gerçekleşmemiştir.

## 5.7. Anneksin V-FITC/PI ile Apoptoz Tayini

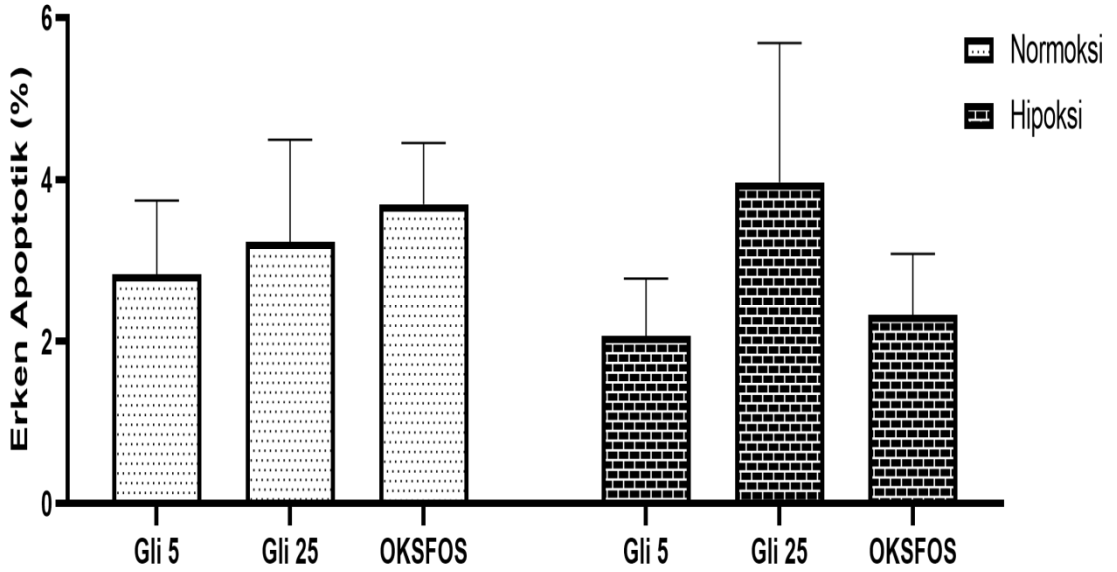
Farklı metabolik koşullarda kültüre edilen A549 hücrelerinin normoksi ya da hipoksi ortamda 24 saat inkübasyona tabi tutulmasından sonra erken apoptozun belirteci olan Anneksin V proteinin relokalizasyonu “Anneksin V- FITC Apoptoz Belirleme Kiti II (BD Pharmingen)” yardımıyla belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.10, Şekil 5.11 ve Tablo 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.10. Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Anneksin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

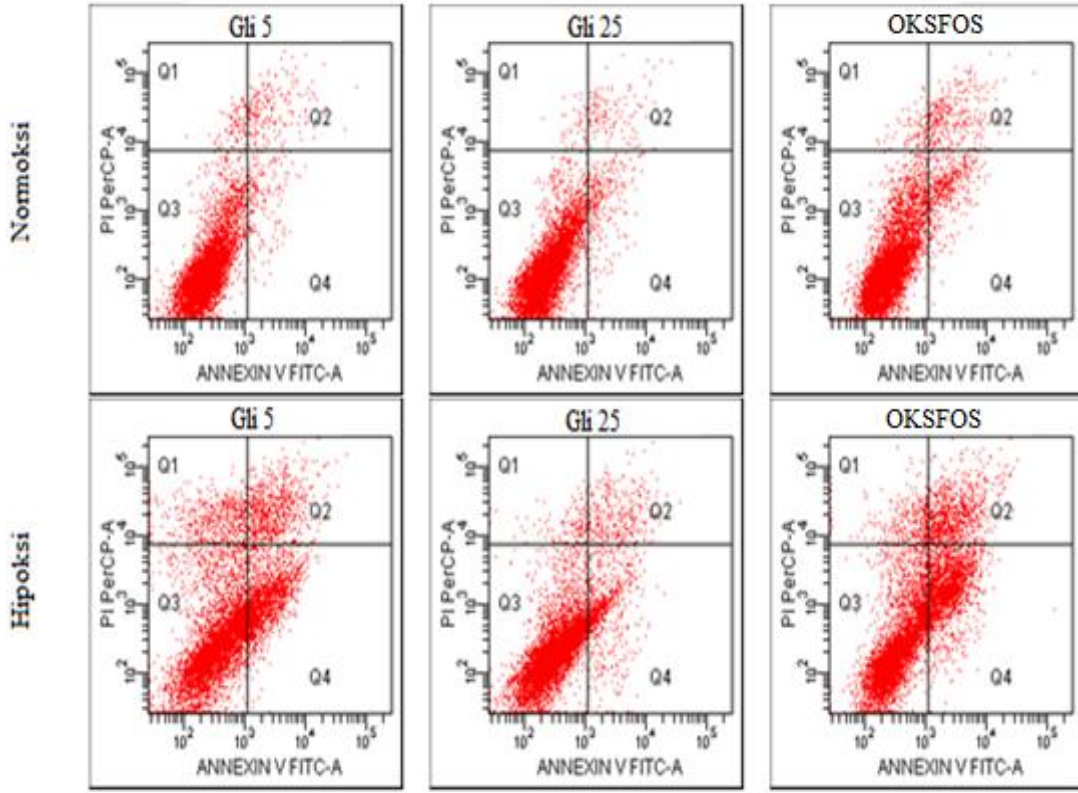
**Tablo 5.1.** 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin apoptoz analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı. Canlı ( $Annexin-V^-/PI^-$ , Q3), erken apoptoz ( $Annexin-V^+/PI^-$ , Q4), geç apoptoz ( $Annexin-V^+/PI^+$ , Q2, ve nekrotik ( $Annexin-V^-/PI^+$ , Q1)) hücreler. (N: Normoksi, H: Hipoksi) Deney 3 bağımsız tekrarludur. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

	Q1 (Nekrotik/Geç Apoptoz)	Q2 (Geç Apoptoz)	Q3 (Canlı)	Q4 (Erken Apoptoz)
Gli 5 (N)	0.9 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 3.2	89.1 $\pm$ 4.0	2.8 $\pm$ 0.5
Gli 25 (N)	1.4 $\pm$ 0.7	7.4 $\pm$ 3.2	87.9 $\pm$ 4.5	3.2 $\pm$ 0.7
OKSFOS (N)	2.8 $\pm$ 1.5	12.5 $\pm$ 5.9	81.1 $\pm$ 7.3	3.7 $\pm$ 0.4
Gli 5 (H)	0.8 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 2.4	91.9 $\pm$ 3.2	2.1 $\pm$ 0.4
Gli 25 (H)	3.3 $\pm$ 1.5	13.5 $\pm$ 6.4	79.2 $\pm$ 8.7	4.0 $\pm$ 1.0
OKSFOS (H)	1.2 $\pm$ 0.6	5.4 $\pm$ 2.5	91.0 $\pm$ 3.5	2.3 $\pm$ 0.4



**Şekil 5.11.** 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre erken apoptotik hücre (%) dağılımı.

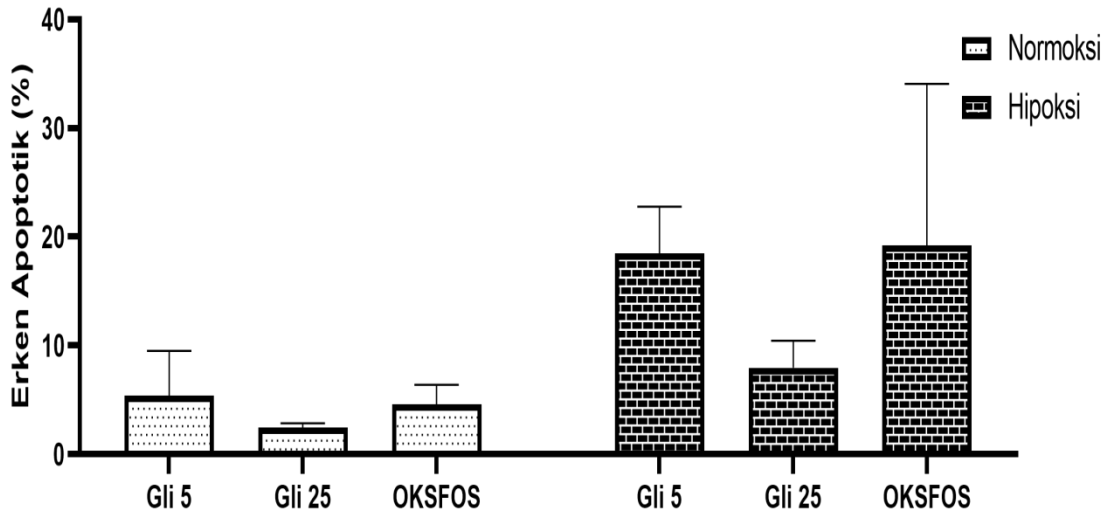
Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik koşullarda kültüre alınan A549 hücrelerinin normoksi ya da hipoksi ortamda 48 saat inkübe edilmesinden sonra erken apoptoz belirteci olan Anneksin V protein relokalizasyon düzeyi “Anneksin V- FITC Apoptoz Belirleme Kiti II (BD Pharmingen)” kit yardımıyla belirlemiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 5.12, Şekil 5.13 ve Tablo 5.2’de verilmiştir.



**Şekil 5.12.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktöz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.2.** 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin apoptoz analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı. Canlı ( $Annexin-V^-/PI^-$ , Q3), erken apoptoz ( $Annexin-V^+/PI^-$ , Q4), geç apoptoz ( $Annexin-V^+/PI^+$ , Q2, ve nekrotik ( $Annexin-V^-/PI^+$ , Q1) hücreler. (N: Normoksi, H: Hipoksi). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\*p < 0.05).

	Q1 (Nekrotik/Geç Apoptoz)	Q2 (Geç Apoptoz)	Q3 (Canlı)	Q4 (Erken Apoptoz)
Gli 5 (N)	1.3 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 2.7	87.3 $\pm$ 5.1	5.4 $\pm$ 2.4
Gli 25 (N)	4.2 $\pm$ 1.9	3.6 $\pm$ 1.2	89.8 $\pm$ 2.8	2.4 $\pm$ 0.2
OKSFOS (N)	6.9 $\pm$ 3.5	7.4 $\pm$ 2.5	81.2 $\pm$ 4.4	4.6 $\pm$ 1.0
Gli 5 (H)	6.7 $\pm$ 0.3	12.1 $\pm$ 5.3	67.0 $\pm$ 7.5	14.2 $\pm$ 4.6
Gli 25 (H)	3.3 $\pm$ 0.8	7.1 $\pm$ 3.2	83.3 $\pm$ 3.4	6.4 $\pm$ 1.8
OKSFOS (H)	9.7 $\pm$ 5.6	12.5 $\pm$ 1.7	62.1 $\pm$ 3.6	15.5 $\pm$ 7.1



Şekil 5.13. 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre erken apoptotik (%) dağılımı.

Bu çalışmada, glikolitik ya da OKSFOS metabolik ortamda kültüre edilen A549 hücrelerinin 24 saat hipoksi ortamda inkübasyonu sonrasında elde edilen sonuçlar, Gli 25 hücre grubunun erken apoptotik hücre oranı  $4.0 \pm 1.0$  olarak bulunmuştur ve bu değer diğer hücre gruplarına (Gli 5  $2.1 \pm 0.4$  ve OKSFOS  $2.3 \pm 0.4$ ) kıyasla iki kat daha yüksektir. Hücrelerin 48 saat süreyle hipoksi ortamda inkübasyonu sonrasında ise Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücrelerinde sırasıyla  $14.2 \pm 4.6$ ,  $6.4 \pm 1.8$  ve  $15.5 \pm 7.1$  erken apoptoz belirlenmiştir. Hipoksi koşullardaki inkübasyon süresinin uzatılması ile kontrol hücre grubuna kıyasla erken apoptoz oranlarında Gli 5 ve OKSFOS hücre grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir ( $*p < 0.05$ ). OKSFOS hücre grubunda ise erken apoptotik hücre oranı en yüksek ( $15.5 \pm 7.1$ ) bulunmuştur. OKSFOS metabolik koşulda ve hipoksi ortamda 48 saat süre ile inkübasyon A549 hücrelerinin erken apoptozunu etkili bir şekilde uyardığı görülmüştür.

Alveolar epitel hücrelerinin hipoksi koşullara maruz kalması ile birlikte hücre döngüsünün G0/G1 fazında belirgin artış olduğu ve S fazındaki azalma ile birlikte hücre döngüsünün durduğu gösterilmiştir (Krick vd., 2005; Vaporidi vd., 2005). Hücre döngüsünün G0/G1 fazında durmasının hem A549 hücrelerinde hem de birincil alveolar epitel hücrelerinde apoptoz ile eş zamanlı meydana geldiği bildirilmiştir. Özellikle

A549 hücrelerinde yapılan bir çalışma, HIF-1'i hedefleyen RNA interferansının, oksijene bağımlı hücre döngüsü düzenlemesinde HIF-1'in rolünü destekleyerek, S fazından G fazına geçişi baskıladığı belirtilmiştir (Hanze vd., 2003).

Alveolar epitel hücreleri hem normal ve hem de patolojik koşullar altında apoptoza uğrayabilir. Alveolar hipoksinin erken evresinde, alveolar astar tabakasında hasara, alveolar epitel hücrelerinin apoptozuna ve akciğer ödemine neden olan yıkıcı birtakım değişikliklerin meydana geldiği bilinmektedir. Daha sonraki aşamada ise alveolar tip II hücrelerin reaktif hiperplazisinin baskın olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, apoptoz mekanizmasında hipoksi koşullarına bağlı meydana gelen değişiklikler ile birlikte alveolar epitel hücrelerinin proliferasyonu alveolar epitel bütünlüğünün korunması için merkezi bir rol üstlenebilir (Clerici ve Planes; 2009). 48 saat süre ile hipoksiye (%0.5 O<sub>2</sub>) maruz kalan alveolar epitel hücrelerindeki apoptoz oranının maksimum seviyede olduğu gösterilmiştir. Apoptoz oranındaki artışın maruziyetin şiddetine ve süresine bağımlı olduğu belirtilmiştir (Bouvry vd., 2006; Krick vd., 2005; Vaporidi vd., 2005). Bouvry vd., (2006)'nın yaptığı bir çalışmada, akciğer epitel hücrelerinin apoptotik oranının normoksik koşullardaki hücrelerde %1.25 ±0.01 olduğu, ancak, oksijen oranının %3 O<sub>2</sub> ve %0.5 O<sub>2</sub> düşürüldüğünde yani hücrelerin hipoksi koşullarda 18 saat inkübe edildiğinde ise apoptoz oranının sırasıyla % 2.69 ±0.45 ve %3.77 ±0.45'e (p<0.01) yükseldiği gösterilmiştir. Krick vd., (2005)'nin yaptığı bir çalışma ise, hipoksi koşullarda inkübe edilen A549 akciğer adenokarsinom hücreleri ve birincil tip II hücrelerindeki (ATII hücreleri) apoptoz oranı ile HIF-1 protein seviyeleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; hücrelerin 24 ya da 48 saat süreyle %1 O<sub>2</sub>'ye maruz bırakıldığında, özellikle 24 saat sonrasında ATII hücrelerinin %70±7 oranında buna karşın A549 hücrelerinin ise %50±7 oranında apoptoza gittiği görülmüştür. Hipoksik koşullar altında 48 saat sonra, hücre apoptozu her iki hücre tipinde (ATII ve A549) de yükselmiştir. 48 saat normoksik koşullarda inkübe edilen kontrol hücrelerinde ise apoptotik hücre oranında değişiklik gözlenmemiştir. Vaporidi vd., (2005) A549 hücrelerinin 24 saat ya da 48 saat hipoksi koşullarına (%1 O<sub>2</sub>) maruz bırakılması sonrasında hücrelerin %6.9±0.9'u ve %19.6 ±3.5'sinin apoptotik olduğu gösterilmiştir.

Yakın zamanda yapılan bir başka çalışma ise diğer çalışmaların aksine, A549 hücreleri normoksi ve hipoksi koşullarda (%1 O<sub>2</sub>) 72 saat inkübe edilmiş ve hipoksideki hücrelerin önemli ölçüde çoğaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda hipoksi koşulda,

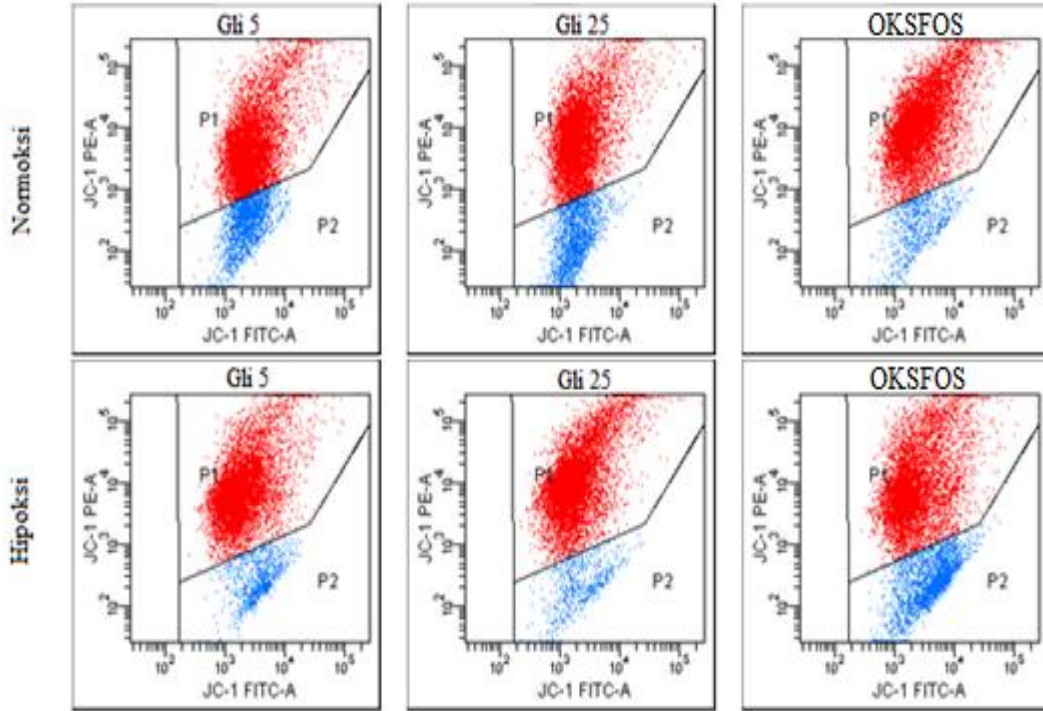


normoksi koşula kıyasla hem erken apoptotik hem de geç apoptotik hücrelerin az olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2014). Tez çalışmasında 48 saat hipoksi ortamda inkübe edilen hücre gruplarında erken apoptoz oranının arttığı ancak bu artışın normoksi gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızın apoptoz yolağına dair sonraki diğer verileri de göstermiştir ki; Gli 5 ve Gli 25 hücre gruplarının hipoksik koşullarda apoptozla gitmediği, buna karşın OKSFOS hücre gruplarının ise apoptozla gittiği tespit edilmiştir. Steinbach vd., (2003) yaptığı çalışmada hipoksik hücre ölümünün, glukoz konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir. LN-229 hücrelerinin ortamda 5 mM ve 25 mM glukoz olduğunda, hücrelerin hipoksinin neden olduğu hipoksiden korunduğu, 2 mM glukoz olduğunda ise önemli ölçüde hücre ölümü olduğu bildirilmiştir (Steinbach vd., 2003). Literatürdeki bu veriler tez çalışmasını destekler niteliktedir.

### **5.8. Mitokondrial Membran Potansiyelinin (MMP) Belirlenmesi**

Mitokondri, hücre canlılığının sürdürülmesinde önemli rolü olan ve hücrenin enerji üretim merkezi olan bir organeldir. Mitokondri zarının transmembran potansiyeli ( $\Delta\psi_m$ ) mitokondri canlılığı için optimum düzeyde srdrlmalıdır. Apoptotik süreçte, MMP azalmaktadır, yalnız bu sürecin apoptozla olan bağlantısı tam olarak aydınlatılamamıştır. MMP'nin azalmasıyla sitokrom c salınımı artmakta ve kaspaz proteinlerinin tetiklediği hücre ölümüne neden olmaktadır (Ly, Grubb ve Lawen; 2003).

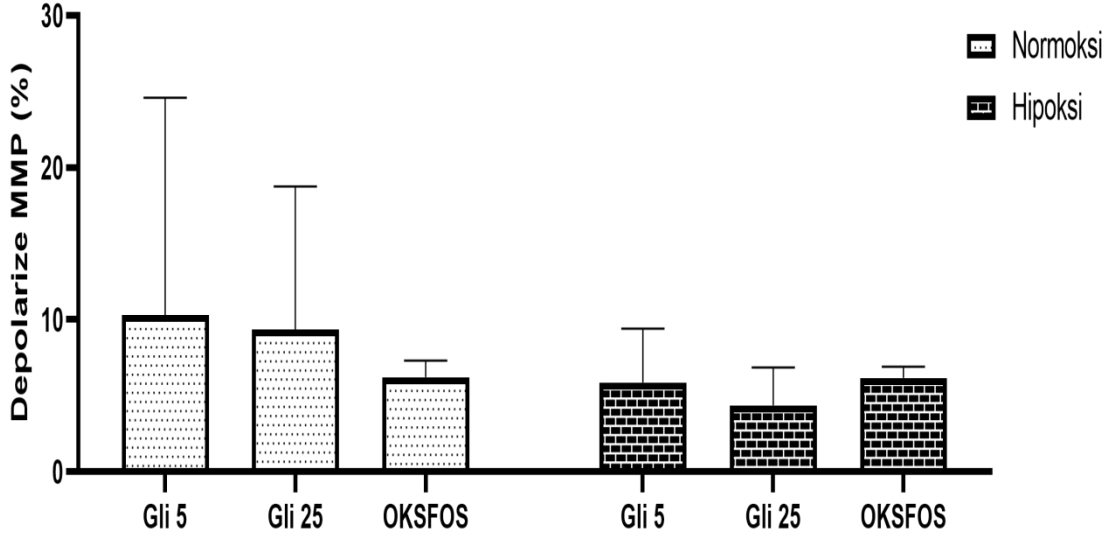
Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik ortamda kültüre alınan A549 hücreleri 24 saat normoksi ya da hipoksi ortamda inkübasyonunu sonrasında mitokondriyel membran potansiyel kit (BD Pharmingen, ABD) yöntemi ile akım sitometrisi kullanılarak llmştir ve sonuçlar şekil 5.14, şekil 5.15 ve Tablo 5.3'te verilmiştir.



**Şekil 5.14.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin MMP analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.3.** 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin MMP analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı (yüksek mitokondri membran potansiyeli (P1), depolarize mitokondri membranı (P2)) (N: Normoksi, H: Hipoksi). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

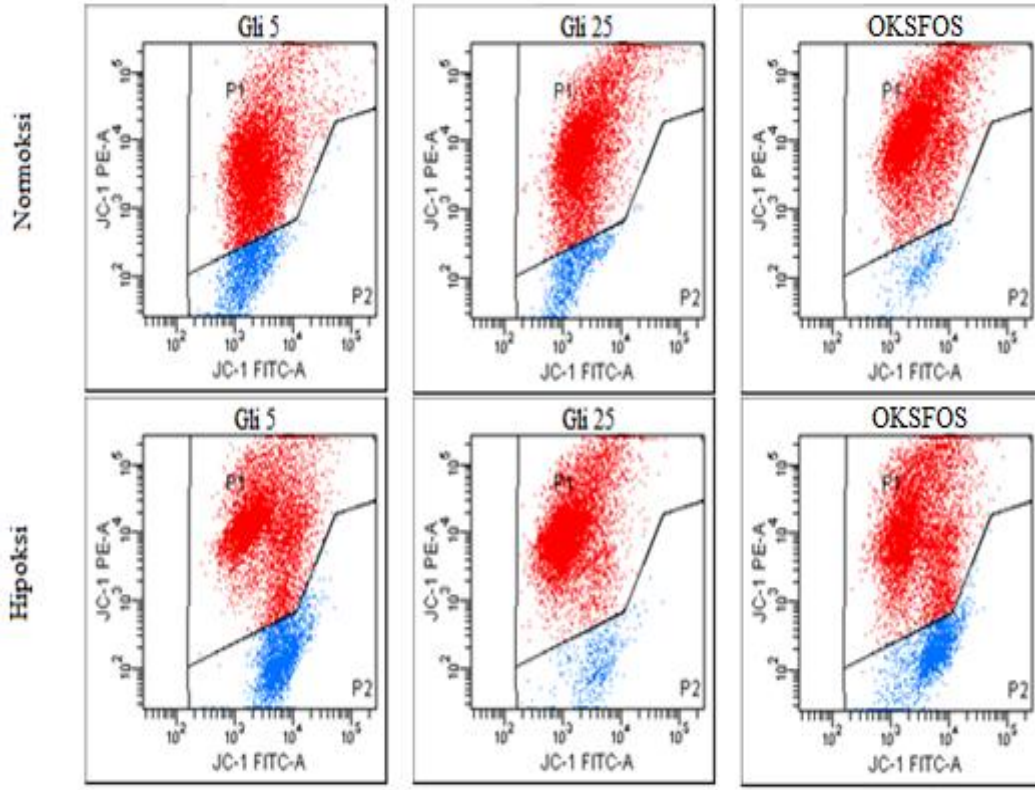
	P1	P2
Gli 5 (N)	89.7 $\pm$ 8.2	10.3 $\pm$ 8.3
Gli 25 (N)	87.8 $\pm$ 5.4	12.3 $\pm$ 5.4
OKSFOS (N)	93.8 $\pm$ 0.6	6.2 $\pm$ 0.6
Gli 5 (H)	94.1 $\pm$ 2.0	5.9 $\pm$ 2.1
Gli 25 (H)	95.6 $\pm$ 1.4	4.4 $\pm$ 1.4
OKSFOS (H)	93.8 $\pm$ 0.4	6.2 $\pm$ 0.4



Şekil 5.15. 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre depolarize MMP (%) dağılımı.

Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 24 saat boyunca normoksi koşullarda inkübasyonu sonrasında depolarize MMP'i (P2) sırasıyla  $10.3 \pm 8.3$ ,  $12.3 \pm 5.4$  ve  $6.2 \pm 0.6$  olarak bulunmuştur. Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 24 saat boyunca hipoksi koşullarda inkübasyonu sonrasında ise depolarize MMP'i sırasıyla  $5.9 \pm 2.1$ ,  $4.4 \pm 1.4$  ve  $6.2 \pm 0.4$  olarak bulunmuştur. Normoksi koşullardaki glikolitik hücre gruplarında depolarize MMP'i oranı hipoksi koşullardaki glikolitik hücre gruplarına göre yüksek olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır.

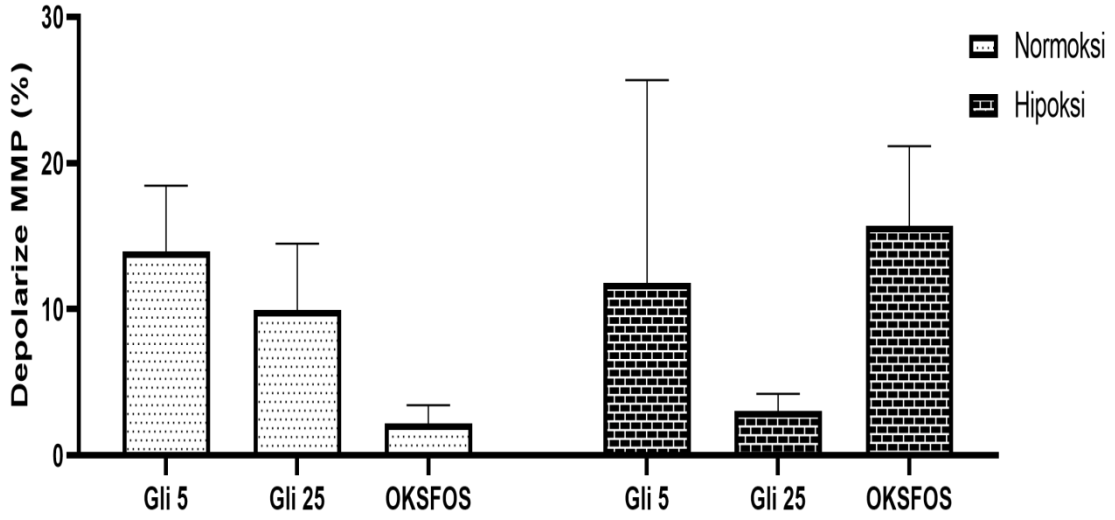
Farklı metabolik koşullar altında normoksi ya da hipoksi ortamda 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerindeki mitokondriyel membran potansiyel oranları Şekil 5.16, Şekil 5.17 ve Tablo 5.4'te verilmiştir.



**Şekil 5.16.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin MMP analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz) Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.4.** 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin MMP analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı (yüksek mitokondri membran potansiyeli (P1), depolarize mitokondri membranı (P2)) (N: Normoksi, H: Hipoksi) Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

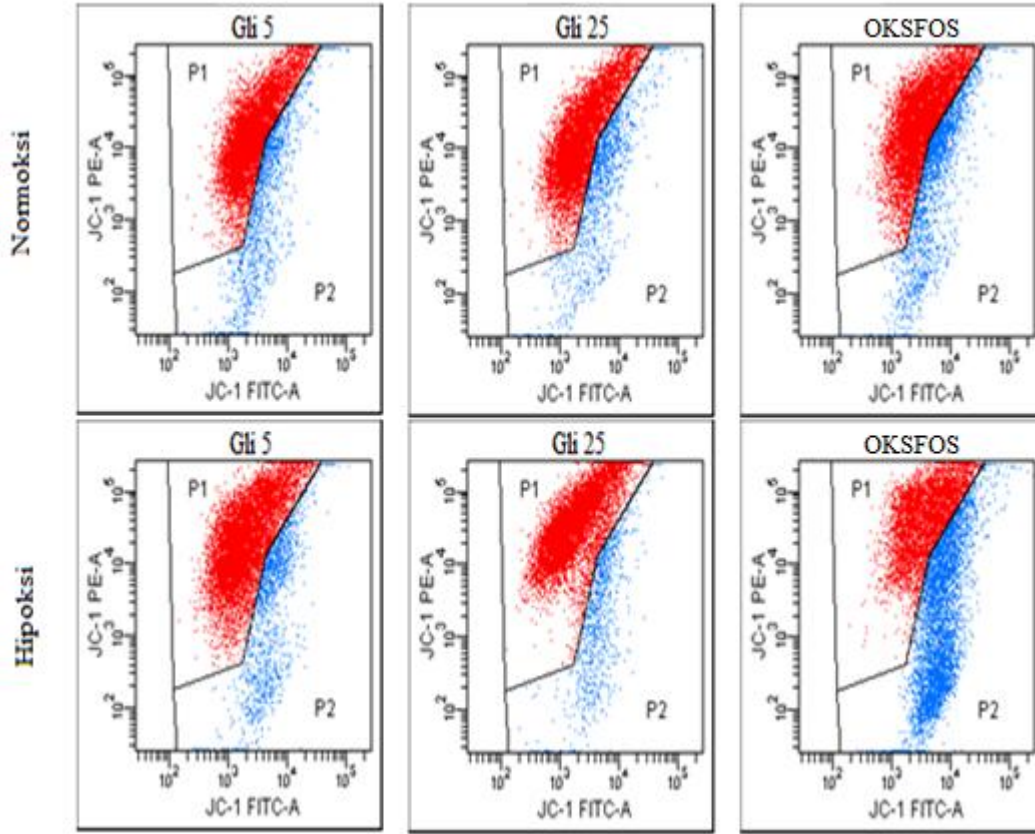
	P1	P2
Gli 5 (N)	86.0 $\pm$ 2.5	13.9 $\pm$ 2.6
Gli 25 (N)	90.0 $\pm$ 2.6	10.0 $\pm$ 2.6
OKSFOS (N)	97.7 $\pm$ 0.7	2.2 $\pm$ 0.7
Gli 5 (H)	83.8 $\pm$ 9.3	16.4 $\pm$ 9.3
Gli 25 (H)	96.9 $\pm$ 0.7	3.0 $\pm$ 0.7
OKSFOS (H)	84.2 $\pm$ 3.0	15.7 $\pm$ 3.2



Şekil 5.17. 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre depolarize MMP (%) dağılımı.

Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 48 saat boyunca normoksi koşullarda inkübasyonu sonrasında depolarize MMP'yi sırasıyla 13.9±2.6, 10.0±2.6 ve 2.2±0.7 olarak bulunmuştur. Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 24 saat boyunca hipoksi koşullarda inkübasyonu sonrasında ise depolarize MMP'yi sırasıyla 16.4±9.3, 3.0±0.7 ve 15.7±3.2 olarak tespit edilmiştir. 24 saat inkübasyona maruz bırakılan hücre gruplarından elde edilen deneysel sonuçlara kıyasla, 48 saat sonuçlarında depolarize MMP'de artış olmuştur. Gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (ns,  $p \geq 0.05$ ).

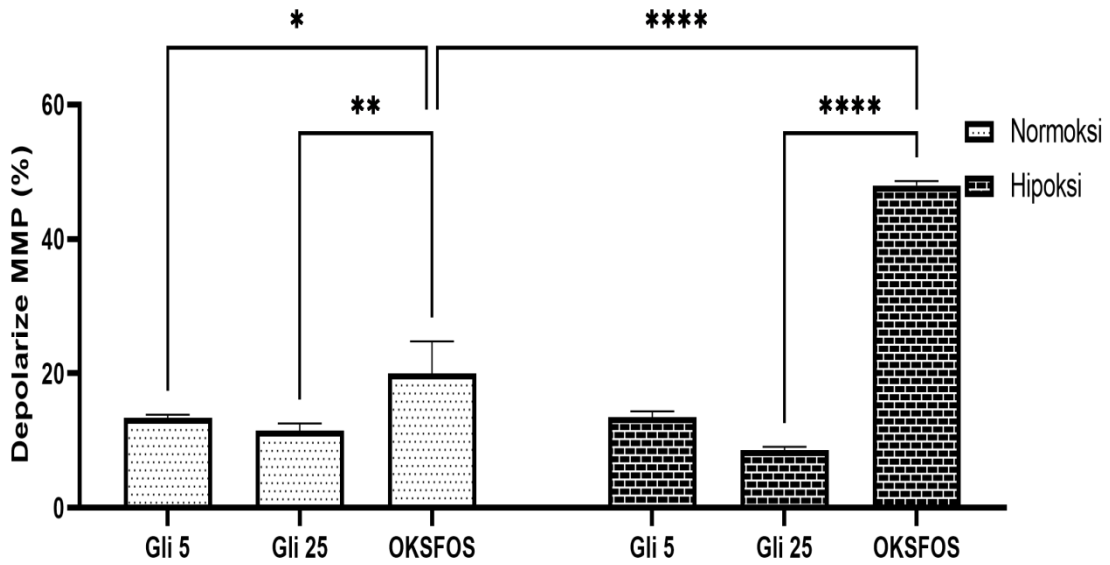
Aynı metabolik koşullar altında normoksi ya da hipoksi ortamda 72 saat inkübe edilen A549 hücrelerindeki mitokondriyel membran potansiyel oranları Şekil 5.18, Şekil 5.19 ve Tablo 5.5'te verilmiştir.



**Şekil 5.18.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 72 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin MMP analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktöz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.5.** 72 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin MMP analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı (yüksek mitokondri membran potansiyeli (P1), depolarize mitokondri membranı (P2)) (N: Normoksi, H: Hipoksi). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\*\* $p < 0,01$ ).

	P1	P2
Gli 5 (N)	86.7 $\pm$ 0.3	13.4 $\pm$ 0.3
Gli 25 (N)	88.5 $\pm$ 0.7	11.5 $\pm$ 0.6
OKSFOS (N)	80.0 $\pm$ 2.8	20.0 $\pm$ 2.8
Gli 5 (H)	86.5 $\pm$ 0.5	13.5 $\pm$ 0.5
Gli 25 (H)	91.4 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.3
OKSFOS (H)	51.9 $\pm$ 0.4	48.0 $\pm$ 0.4



Şekil 5.19. 72 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre depolarize MMP (%) dağılımı.

Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 72 saat boyunca normoksi koşullarda inkübasyonu sonrasında depolarize MMP’i  $13.4 \pm 0.3$ ,  $11.5 \pm 0.6$  ve  $20.0 \pm 2.8$  olarak bulunmuştur. Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 72 saat boyunca hipoksi koşullarda inkübasyonu sonrasında ise depolarize MMP’i sırasıyla  $13.5 \pm 0.5$ ,  $8.6 \pm 0.3$  ve  $48.0 \pm 0.4$  olarak bulunmuştur. Tüm gruplardaki depolarize MMP artışı kontrol grubuna kıyasla istatistik olarak anlamlı bir artış olmuştur. Hem normoksi hem de hipoksi koşuldaki OKSFOS hücre grubunda, Gli 5 ve Gli 25 hücre gruplarına göre daha yüksek depolarize MMP tespit edilmiştir (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Hipoksik OKSFOS hücre grubunun ( $48.0 \pm 0.4$ ), normoksik OKSFOS’a ( $20.0 \pm 2.8$ ) göre daha yüksek depolarize MMP sergilediği tespit edilmiştir (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

24 saat sonuçlarına kıyasla 48 ve 72 saat OKSFOS hücre grubu verilerinde depolarize MMP’de artış olmuştur. Elde edilen tüm sonuçlar göstermiştir ki; OKSFOS metabolik koşul altında kültüre edilen A549 hücrelerinin 48 saat hipoksi ortamda inkübasyonu sonrasında depolarize mitokondriyel membran potansiyel oranı  $15.7 \pm 3.2$  olarak tespit edilmiştir, bu oran test edilen diğer metabolik koşullara ve normoksi ortama göre yüksektir. İnkübasyon süresinin (72 saat) uzatılması ile depolarize mitokondriyel membran potansiyel oranında da yaklaşık 3 kat artış görülmüştür (Tablo 5.5). Bu sonuçlar, erken hücre apoptoz oranları ile desteklenmektedir.

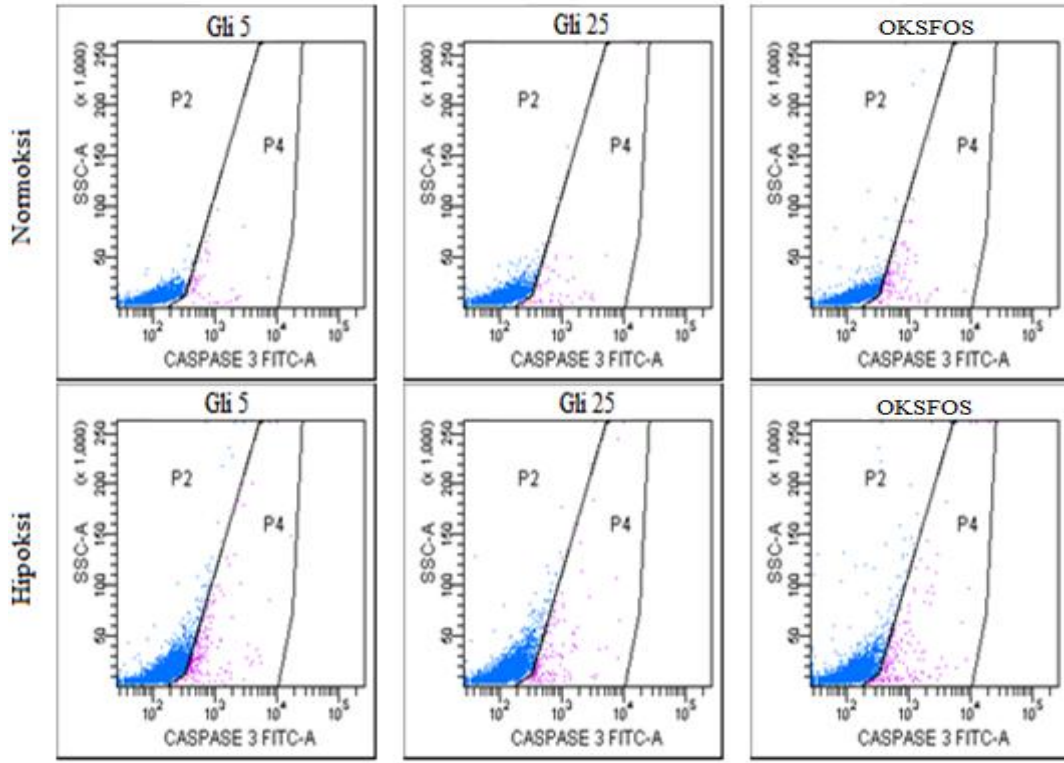
Mitokondriden ve fonksiyonel bir ETS'den yoksun A549 hücrelerinin anoksinin (%0 O<sub>2</sub>) neden olduğu apoptoza karşı dirençli olduğu gösterilmiştir (Santore vd., 2002). Çalışmamız A549 OKSFOS hücrelerinde oksidatif fosforilasyonun aktif hale gelmesiyle, artan erken apoptotik hücre oranı ve azalan MMP (artan depolarize MMP) oranı ile literatürdeki verilere katkı sağlamaktadır.

### **5.9. Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi**

Kaspaz-3 proteini, sistein-aspartik asit proteaz ailesinin bir üyesidir (Alnemri vd., 1996). Kaspaz-3, apoptotik hücrede hem dışsal (ölüm ligandı) hem de içsel (mitokondriyal) yollarla aktive olur (Salvesen, 2002; Ghavami vd., 2009). Dışsal aktivasyon kaspaz-3'ün baskın bir rol oynadığı apoptotik yolun ayırt edici kaspaz kaskadını tetikler (Perry vd., 1997). İçsel yolakta mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 ve ATP'nin katılmasıyla Apoptozom kompleksi oluşur ve kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 inaktif kaspaz aktive edici DNaz (ICAD)'ı inaktifleştirerek kaspaz aktive edici DNaz'ı (CAD) serbestleştirir. CAD ise çekirdek kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olmaktadır (Adams ve Cory, 2001; Smaili vd., 2000; Palmer vd., 2000).

Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik ortamda kültüre alınan A549 hücreleri 24 saat süre ile normoksi ya da hipoksi ortamda inkübasyonu sonrasında kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi kit (BD Pharmingen, ABD) yöntemi ile akım sitometrisi kullanılarak ölçülmüştür ve sonuçlar Şekil 5.20, Şekil 5.21 ve Tablo 5.6'da verilmiştir.

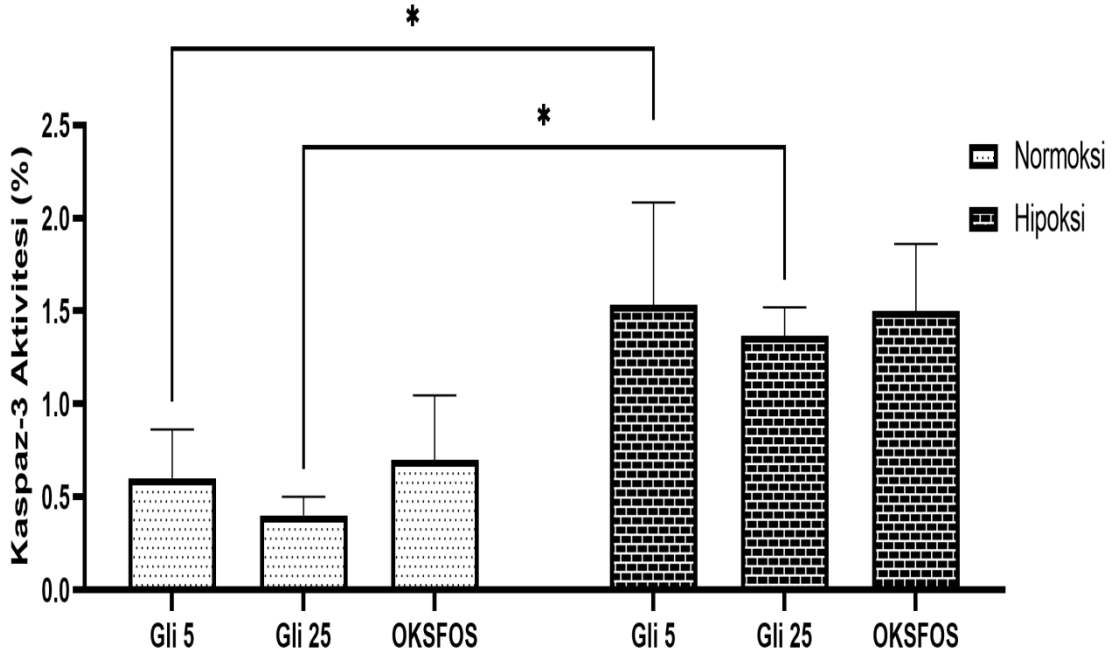




**Şekil 5.20.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin kaspaz-3 analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.6.** 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin kaspaz-3 analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı (P2: Kaspaz-3 inaktif, P4: Kaspaz-3 aktif) (N: Normoksi, H: Hipoksi) Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\* $p < 0.05$ ).

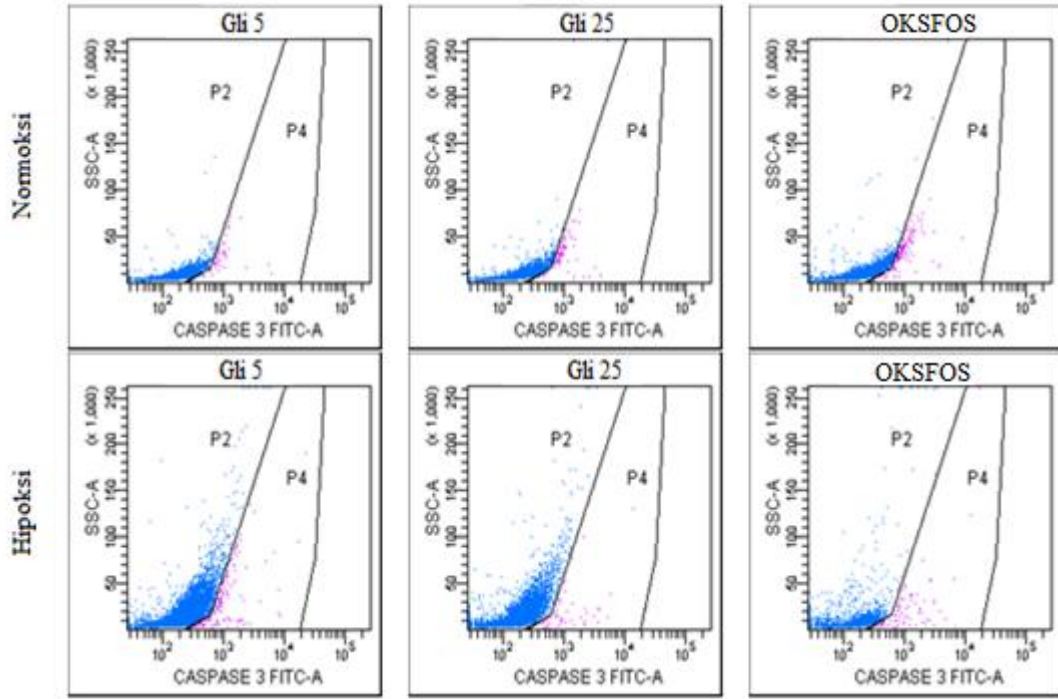
	P2 (-)	P4 (+)
Gli 5 (N)	99.4 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2
Gli 25 (N)	99.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
OKSFOS (N)	99.3 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.2
Gli 5 (H)	98.4 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3
Gli 25 (H)	98.6 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1
OKSFOS (H)	98.4 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2



Şekil 5.21. 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre kaspaz-3 aktivitesi (%)

Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS hücre gruplarının 24 saat normoksi ortamda inkübasyonu sonrasındaki kaspaz-3 aktivasyonu sırasıyla  $0.6 \pm 0.2$ ,  $0.4 \pm 0.1$  ve  $0.7 \pm 0.2$  olarak tespit edilmiştir. Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 24 saat boyunca hipoksi koşullarda inkübasyonu sonrasındaki kaspaz-3 aktivasyonu  $1.5 \pm 0.3$ ,  $1.4 \pm 0.1$  ve  $1.5 \pm 0.2$  olarak tespit edilmiştir. Hipoksik Gli 5 ( $1.5 \pm 0.3$ ) ve Gli 25 ( $1.4 \pm 0.1$ ) hücre grubunda normoksik Gli 5 ( $0.6 \pm 0.2$ ) ve Gli 25 ( $0.4 \pm 0.1$ )'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir kaspaz-3 aktivitesi artışı olmuştur (\* $p < 0.05$ ). Hipoksi koşuldaki OKSFOS hücre grubu da normoksi koşuldaki OKSFOS'a göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan kaspaz-3 aktivite artışı sergilemiştir (ns,  $p \geq 0.05$ ).

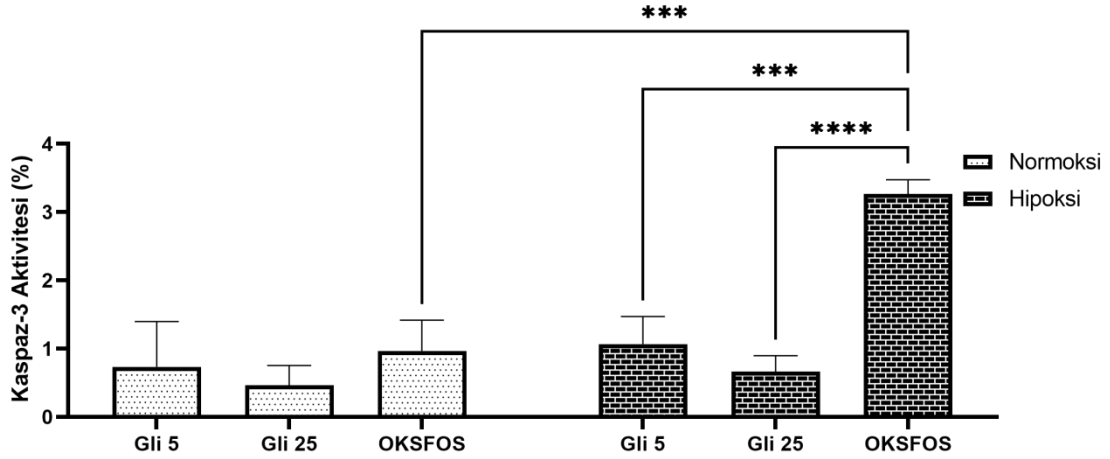
Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik ortamda kültüre alınan A549 hücreleri 48 saat normoksi ya da hipoksi ortamda inkübasyonu sonrasında kaspaz-3 aktivitesi kit (BD Pharmingen, ABD) yöntemi ile akım sitometrisi kullanılarak ölçülmüştür ve sonuçlar Şekil 5.22, Şekil 5.23 ve Tablo 5.7'de verilmiştir.



**Şekil 5.22.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin kaspaz-3 analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.7.** 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin kaspaz-3 analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı (P2: Kaspaz-3 inaktif, P4: Kaspaz-3 aktif) (N: Normoksi, H: Hipoksi). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

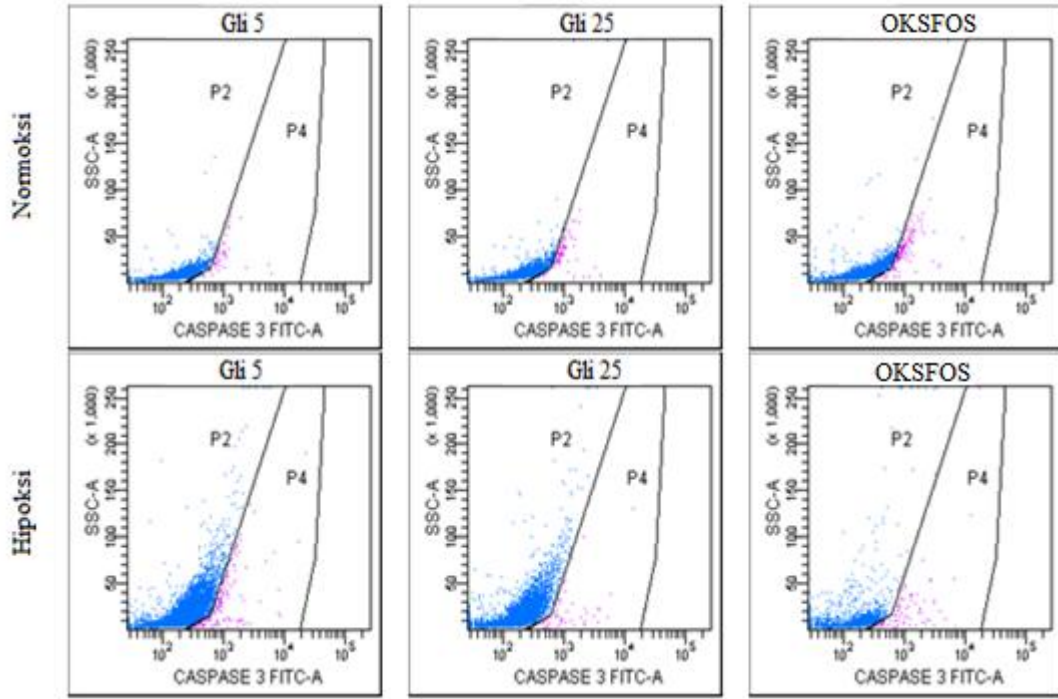
	P2(-)	P4(+)
Gli 5 (N)	99.6 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0
Gli 25 (N)	99.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2
OKSFOS (N)	98.8 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.3
Gli 5 (H)	98.7 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2
Gli 25 (H)	99.2 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
OKSFOS (H)	96.2 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.1



Şekil 5.23. 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre kaspaz-3 aktivitesi (%)

Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS hücre gruplarının 48 saat normoksi ortamda inkübasyonu sonrasındaki kaspaz-3 aktivasyonu sırasıyla  $0.3 \pm 0.0$ ,  $0.5 \pm 0.2$ ,  $1.0 \pm 0.3$  olarak tespit edilmiştir. Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 48 saat boyunca hipoksi koşullarda inkübasyonu sonrasındaki kaspaz-3 aktivasyonu sırasıyla  $1.1 \pm 0.2$ ,  $0.7 \pm 0.1$ ,  $3.3 \pm 0.1$  olarak tespit edilmiştir. Hipoksi koşuldaki OKSFOS hücre grubu, hem normoksi hem de hipoksi koşuldaki glikolitik hücre gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artmış kaspaz-3 aktivitesi sergilemiştir ( $****p < 0,0001$ ). Hipoksik OKSFOS hücre grubunun ( $3.3 \pm 0.1$ ), normoksik OKSFOS'a ( $1.0 \pm 0.3$ ) göre daha yüksek kaspaz-3 aktivitesi sergilediği tespit edilmiştir ( $****p < 0,0001$ ). OKSFOS hücre grubunun, 24 saatlik hipoksik inkübasyon sonrasında  $1.5 \pm 0.2$  olan kaspaz-3 aktivitesi 48. saatin sonunda artarak  $3.3 \pm 0.1$  olmuştur.

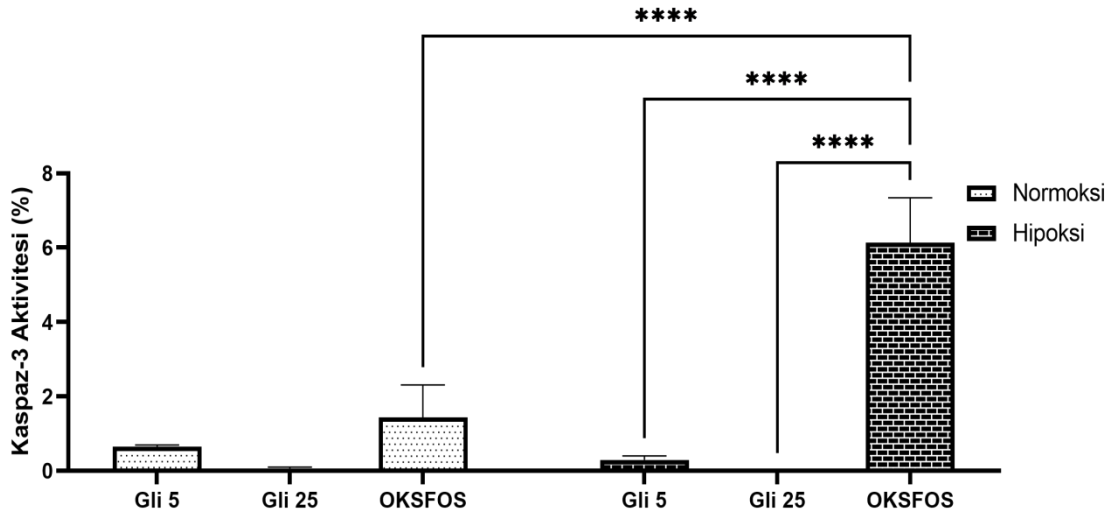
Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik ortamda kültüre alınan A549 hücreleri 72 saat normoksi ya da hipoksi ortamda inkübasyonu sonrasında kaspaz-3 aktivitesi kit (BD Pharmingen, ABD) yöntemi ile akım sitometrisi kullanılarak ölçülmüştür ve sonuçlar Şekil 5.24, Şekil 5.25 ve Tablo 5.8'de verilmiştir.



**Şekil 5.24.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 72 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin kaspaz-3 analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.8.** 72 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin kaspaz-3 analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı (P2: Kaspaz-3 inaktif, P4: Kaspaz-3 aktif) (N: Normoksi, H: Hipoksi). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

	P2 (-)	P4 (+)
Gli 5 (N)	99.0 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.0
Gli 25 (N)	100.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0
OKSFOS (N)	98.0 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.5
Gli 5 (H)	99.6 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
Gli 25 (H)	100.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
OKSFOS (H)	91.6 $\pm$ 1.2	6.1 $\pm$ 0.9



Şekil 5.25. 72 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre kaspaz-3 aktivitesi (%)

Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS hücre gruplarının 72 saat normoksi ortamda inkübasyonu sonrasındaki kaspaz-3 aktivasyonu sırasıyla  $0.7 \pm 0.0$ ,  $0.1 \pm 0.0$  ve  $1.4 \pm 0.5$  olarak tespit edilmiştir. Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 72 saat boyunca hipoksi koşullarda inkübasyonu sonrasındaki kaspaz-3 aktivasyonu sırasıyla  $0.3 \pm 0.1$ ,  $0.0 \pm 0.0$  ve  $6.1 \pm 0.9$  olarak tespit edilmiştir. Hipoksi koşuldaki OKSFOS hücre grubu, hem normoksi hem de hipoksi koşuldaki glikolitik hücre gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artmış kaspaz-3 aktivitesi sergilemiştir (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Hipoksik OKSFOS hücre grubunun ( $6.1 \pm 0.9$ ), normoksik OKSFOS'a ( $1.4 \pm 0.5$ ) göre daha yüksek kaspaz-3 aktivitesi sergilediği tespit edilmiştir (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). OKSFOS hücre grubunun, 24 saatlik hipoksik inkübasyon sonrasında  $1.5 \pm 0.2$  olan kaspaz-3 aktivitesi 48 saatin sonunda artarak  $3.3 \pm 0.1$  ve 72. saatin sonunda ise daha da artarak  $6.1 \pm 0.9$  olmuştur.

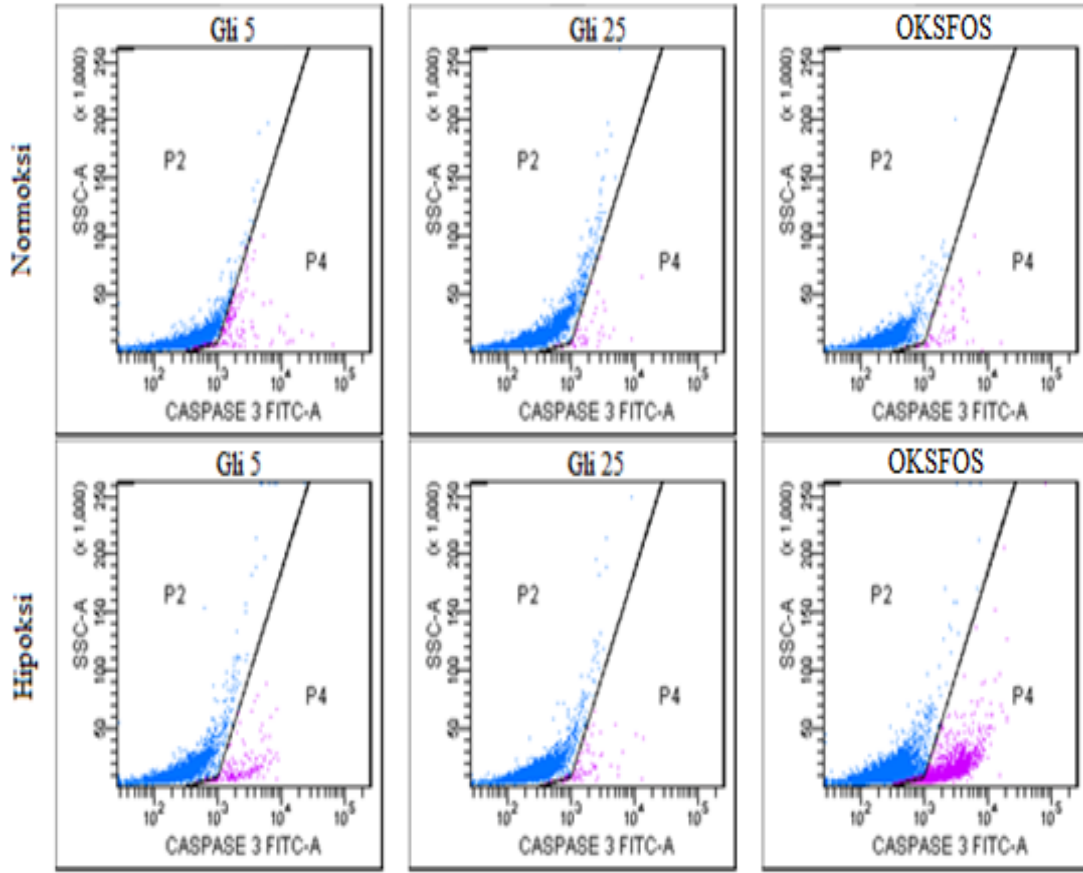
A549 hücrelerinde anoksinin ( $0.0 O_2$ ) neden olduğu hücre ölümü, bir pankaspaz inhibitörü ve anti-apoptotik protein olan Bcl-xl tarafından önlenmiş, bu da hipoksinin kaspaz bağımlı ve proapoptotik yolları aktive ettiğini göstermiştir (Santore vd., 2002). A549 hücrelerinde, KLF5 veya HIF-1 $\alpha$  knockdown edildiğinde, hipoksiye bağlı hücre hayatta kalımını inhibe ettiğini ve aktif olarak siklin B1, survivin ve kaspaz-3'ü yukarı regüle ederek hücre apoptozunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Li vd., 2014). Literatürdeki bu veriler göstermektedir ki; A549 hücrelerinin hipoksi koşullardaki hücre ölümü HIF-1 $\alpha$  inhibisyonu ile sağlanabilir böylelikle tez çalışmasında belirlenen glikolitik hücre

gruplarının hipoksideki düşük kaspaz-3 aktivitesi artırılabilir ve apoptotik hücre ölümü gerçekleşebilir. Hipoksik OKSFOS hücre grubu ise kanonik olmayan bir HIF yanıtı verdiği için hali hazırda yüksek kaspaz-3 aktivitesi sergilediği belirlenmiştir.

#### **5.10. Kaspaz-9 Aktivitesinin Belirlenmesi**

Kaspaz-9 birçok dokuda bulunan apoptotik yol için kritik olan başlatıcı bir kaspazdır (Li vd., 1997). Kaspaz-9 inaktif olduğunda, sitozolde zimojen olarak monomer formunda bulunur (Renatus vd., 2001; McIlwain vd., 2013). Apoptotik sinyaller, sitokrom c'nin mitokondriden salınmasına ve apaf-1'in aktivasyonuna neden olarak pro kaspaz-9 enzimini aktif dimer formuna dönüştürür (Li vd., 1997). Aktive edildikten sonra, kaspaz-9, kaspaz-3, -6 ve -7'yi parçalayarak, kaspaz kaskadını başlatır (Kuida, 2000).

A549 hücrelerinin farklı metabolik koşullarda normoksi ve hipoksi ortamda 24 saat muamele edilmesinden sonra “Aktif Kaspaz-9 kiti (Thermo)” kullanılarak elde edilen kaspaz-9 analiz sonuçları Şekil 5.26, Şekil 5.27 ve Tablo 5.9’da verilmiştir.

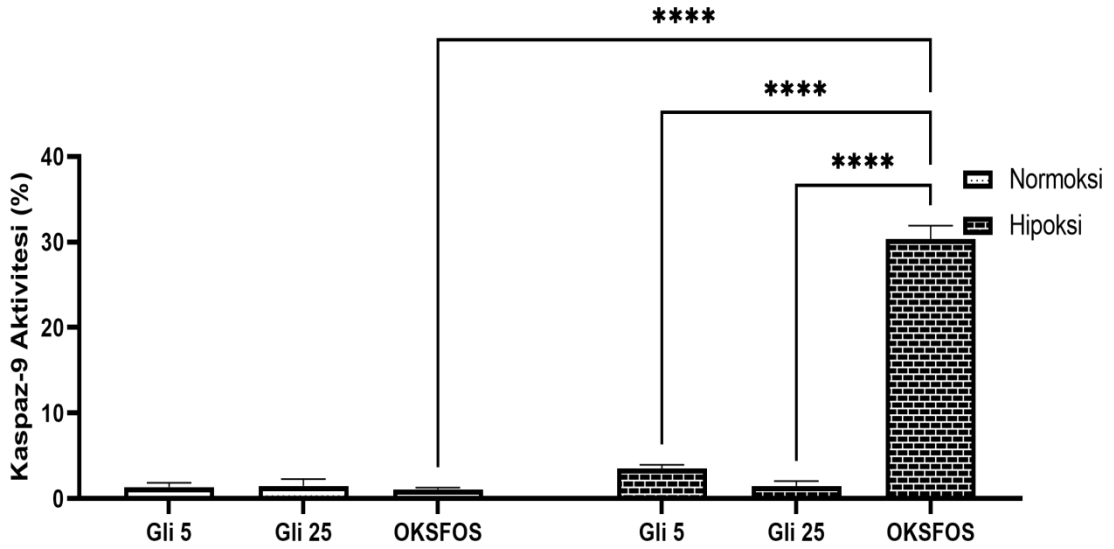


**Şekil 5.26.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin kaspaz-9 analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktöz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.9.** 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin kaspaz-9 analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı (P2: Kaspaz-9 inaktif, P4: Kaspaz-9 aktif) (N: Normoksi, H: Hipoksi). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

	P2 (-)	P4 (+)
Gli 5 (N)	98.8 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.3
Gli 25 (N)	98.7 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5
OKSFOS (N)	99.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1
Gli 5 (H)	96.6 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.3
Gli 25 (H)	98.7 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.4
OKSFOS (H)	71.3 $\pm$ 0.6	30.4 $\pm$ 0.9

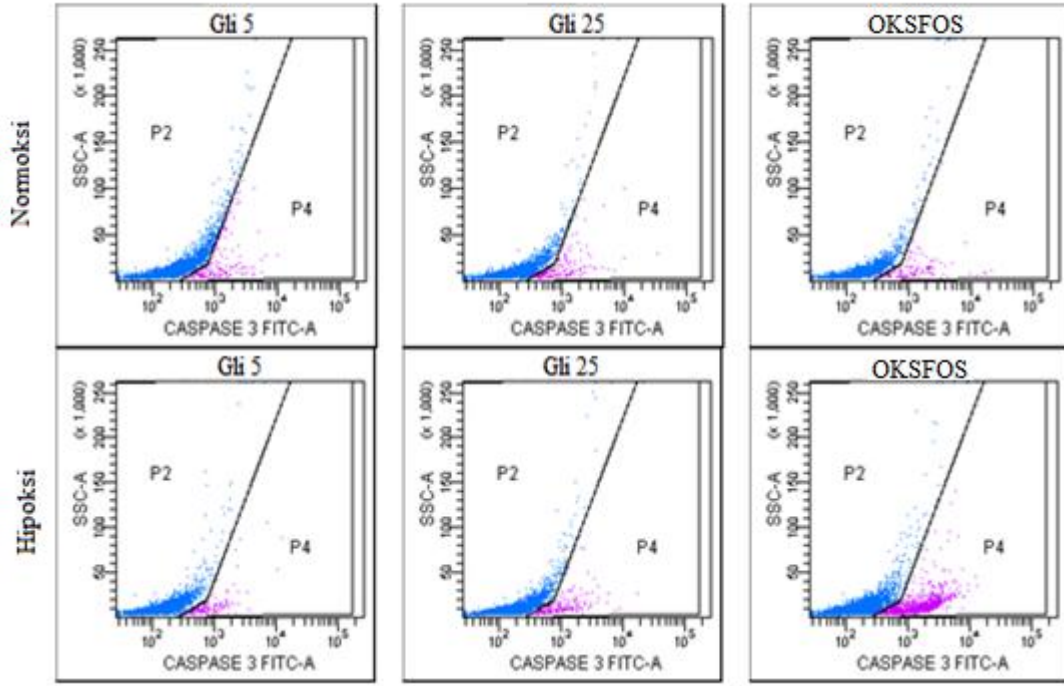




Şekil 5.27. 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre kaspaz-9 aktivitesi (%)

Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS hücre gruplarının 24 saat normoksi ortamda inkübasyonu sonrasındaki kaspaz-9 aktivasyonu sırasıyla  $1.3 \pm 0.3$ ,  $1.4 \pm 0.5$  ve  $1.1 \pm 0.1$  olarak tespit edilmiştir. Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 24 saat boyunca hipoksi koşullarda inkübasyonu sonrasındaki kaspaz-9 aktivasyonu sırasıyla  $3.5 \pm 0.3$ ,  $1.4 \pm 0.4$  ve  $30.4 \pm 0.9$  olarak tespit edilmiştir. Hipoksi koşuldaki OKSFOS hücre grubu, hem normoksi hem de hipoksi koşuldaki glikolitik hücre gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı kaspaz-9 aktivite artışı görülmüştür ( $****p < 0,0001$ ). Hipoksik OKSFOS hücre grubunun ( $30.4 \pm 0.9$ ), normoksik OKSFOS'a ( $1.1 \pm 0.1$ ) göre daha yüksek kaspaz-9 aktivitesi tespit edilmiştir ( $****p < 0,0001$ ).

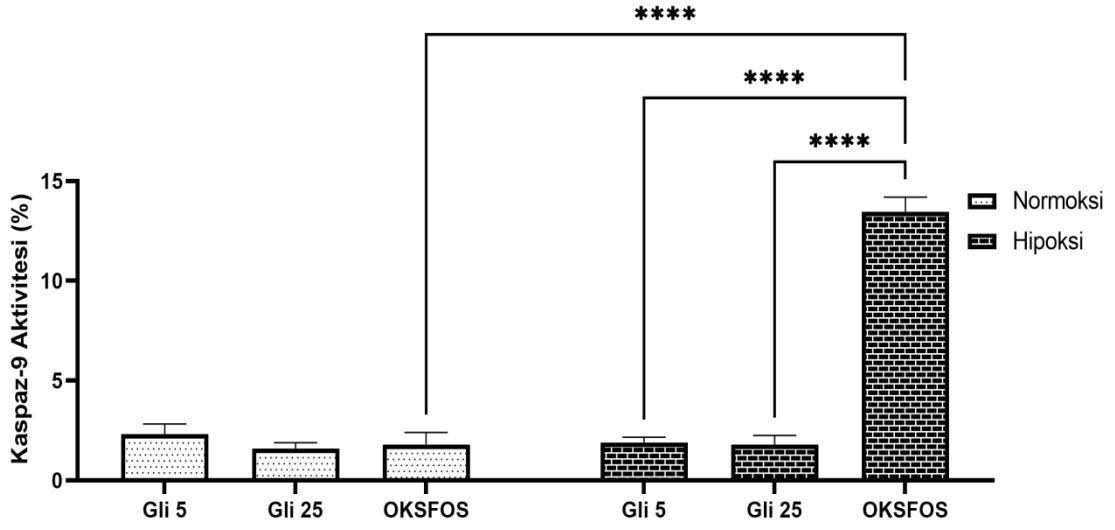
A549 hücrelerinin farklı metabolik koşullarda normoksi ve hipoksi ortamda 48 saat muamele edilmesinden sonra “Aktif Kaspaz-9 kiti (Thermo)” kullanılarak elde edilen kaspaz-9 analiz sonuçları Şekil 5.28, Şekil 5.29 ve Tablo 5.10’da verilmiştir.



**Şekil 5.28.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin kaspaz-9 analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktöz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.10.** 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri cihazından alınan kaspaz-9 analizlerinde hücrelerin alanlara göre % dağılımı (P2: Kaspaz-9 inaktif, P4: Kaspaz-9 aktif) (N: Normoksi, H: Hipoksi). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (\*\*\*) $p < 0,0001$ .

	P2 (-)	P4 (+)
Gli 5 (N)	97.6 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.3
Gli 25 (N)	98.3 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2
OKSFOS (N)	98.2 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.4
Gli 5 (H)	98.1 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2
Gli 25 (H)	98.2 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.3
OKSFOS (H)	86.4 $\pm$ 0.4	13.5 $\pm$ 0.4



Şekil 5.29. 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen alanlara göre kaspaz-9 aktivitesi (%)

Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS hücre gruplarının 48 saat normoksi ortamda inkübasyonu sonrasındaki kaspaz-9 aktivasyonu sırasıyla  $2.3 \pm 0.3$ ,  $1.6 \pm 0.2$  ve  $1.8 \pm 0.4$  olarak tespit edilmiştir. Gli 5, Gli 25 ve OKSFOS hücre gruplarının 48 saat boyunca hipoksi koşullarda inkübasyonu sonrasındaki kaspaz-9 aktivasyonu sırasıyla  $1.9 \pm 0.2$ ,  $1.8 \pm 0.3$  ve  $13.5 \pm 0.4$  olarak tespit edilmiştir. Hipoksi koşuldaki OKSFOS hücre grubu, hem normoksi hem de hipoksi koşuldaki glikolitik hücre gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı kaspaz-9 aktivite artışına neden olmuştur ( $****p < 0,0001$ ). Hipoksik OKSFOS hücre grubunun ( $13.5 \pm 0.4$ ), normoksik OKSFOS'a ( $1.8 \pm 0.4$ ) göre daha yüksek kaspaz-9 aktivitesi tespit edilmiştir ( $****p < 0,0001$ ). OKSFOS hücre grubunun, 24 saatlik hipoksik inkübasyon sonrasında  $30.4 \pm 0.9$  olan kaspaz-9 aktivitesi inkübasyon süresinin iki katına çıkarılması ile (48 saat) düşerek,  $13.5 \pm 0.4$  olmuştur.

Bu çalışma kapsamında akım sitometrisi ile elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; OKSFOS metabolik ortamda kültüre edilen A549 hücreleri 24 saat süre ile hipoksi ortama maruz bırakıldığında en yüksek kaspaz-9 aktivitesi tespit edilmiştir. İnkübasyon süresinin uzatılması kaspaz-9 aktivitesinin düşmesine neden olmuştur.

Anoksi ya da hipoksi koşullarda kültüre edilen çeşitli kanser hücrelerinin apoptotik cevaplarına yönelik birçok araştırmanın literatürde yer almasına rağmen anoksi ( $0.0 O_2$ ) ya da hipoksi koşullar sonucunda uyarılan apoptotik mekanizmanın detayları tam olarak aydınlatılamamıştır. Anoksi koşullar altında kültüre edilen A549

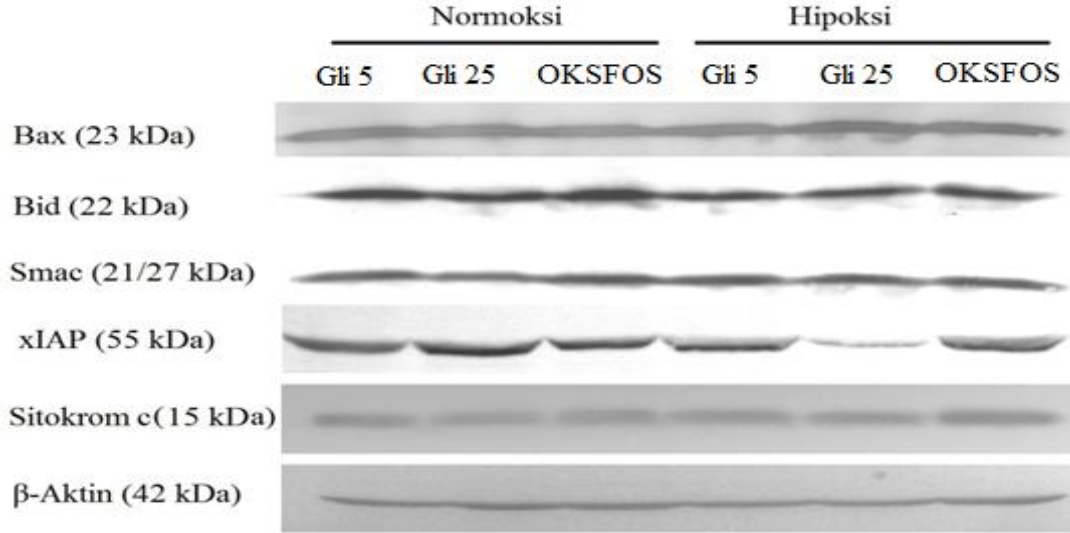
hücrelerinde, sitokrom c salınımı ve kaspaz-9 aktivasyonu ile eş zamanlı olarak total hücre apoptoz oranında artış gözlenmiştir. Antiapoptotik protein Bcl-xl, sitokrom c ve kaspaz-9 aktivasyonunun salınımını inhibe ederek anoksinin neden olduğu hücre ölümünü önlemiştir (Santore vd., 2002). İnsan oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde ise (OSCC) HIF-1 $\alpha$ 'nın aşırı ekspresyonu, ROS oluşumunu, hücre içi Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonunun yükselmesini, mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasını ve sitokrom c'nin sitozolik birikimini inhibe etmiştir, bu da kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün inaktivasyonu ile sonuçlanmıştır (Sasabe vd., 2005). Literatürde yer alan bu çalışmada elde edilen bulgular, çalışmamızdaki A549 glikolitik hücre grubu ile uyumludur. Hipoksi koşullarda glikolitik hücre gruplarının kaspaz-9 aktivitesinde değişiklik olmamıştır (Şekil 5.29). Bu hücre gruplarında tespit edilen HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun apoptotik süreçte kaspaz-9 aktivitesinin uyarılmasını önlediği düşünülmektedir. Ancak, HIF-1 $\alpha$  ile kaspaz-9 arasındaki ilişkinin net bir şekilde belirlenebilmesi için HIF-1 $\alpha$ 'nın knockdown edilerek kaspaz-9 aktivitesinin belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda hipoksi koşulda OKSFOS hücre grubu ise yüksek kaspaz-3 ya da kaspaz-9 aktivitesi ve depolarize MMP gösterilmiştir ve bu bulgular kendi içinde uyumludur. Hipoksi koşulundaki OKSFOS hücre grubunun HIF-1 $\alpha$  ekspresyonuna rağmen hücre ölümünden kaçamadığı belirlenmiştir.

### **5.11. Apoptotik Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**

Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik koşullarda kültüre alınan A549 hücreleri normoksi ya da hipoksi ortamda 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra Bax, Bid, Smac, XIAP ve sitokrom c proteinlerin ekspresyonu hücre lizatlarında western blot analiz yöntemi ile belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 5.30 ve Şekil 5.31'te verilmiştir. Her bir protein ekspresyonuna ait dansitometrik sayısal veriler ise Şekil 5.32-5.41'de verilmiştir.

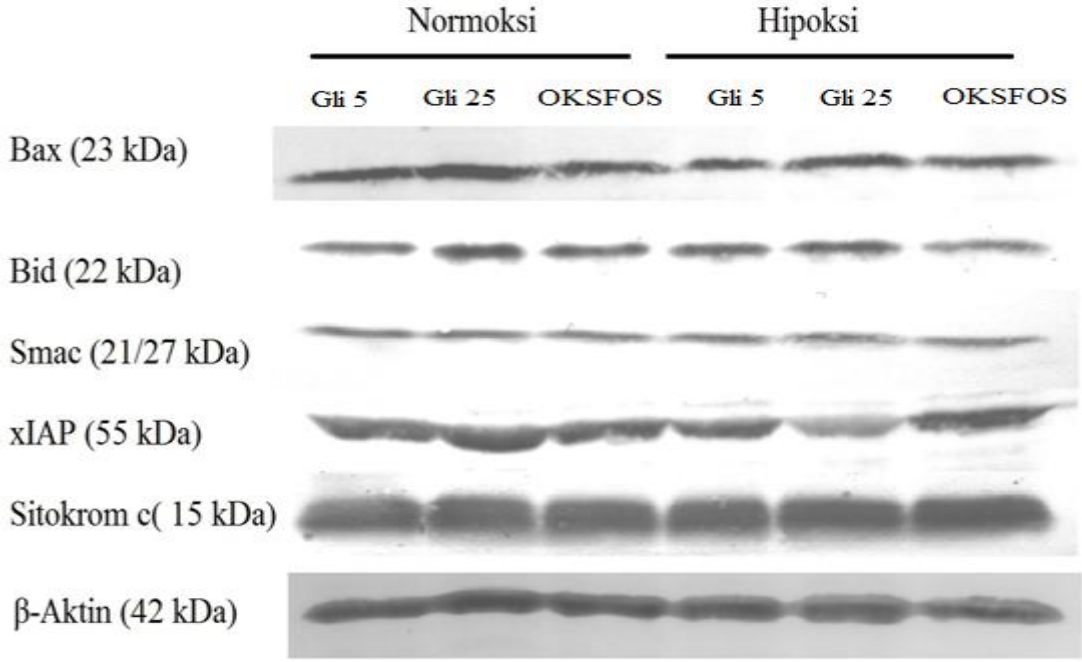
Proapoptotik protein ekspresyon seviyelerinin artmasında hücre apoptoza eğilimliyken, antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyelerinin artmasında ise apoptoza daha az eğilimlidir (Adams ve Cory; 2001). Bid, antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder ve Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelinin değişmesine neden olmaktadır (Spierings vd., 2004). Mitokondriyal membran potansiyelinin değişmesi ile sitozole sitokrom c salınır. Smac IAF'ı inhibe eder ve apoptozu hızlandırır (Palmer vd.,

2000). XIAP ise kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi inhibe eden anti-apoptotik IAP üyesidir (Obexer ve Ausserlechner, 2014).



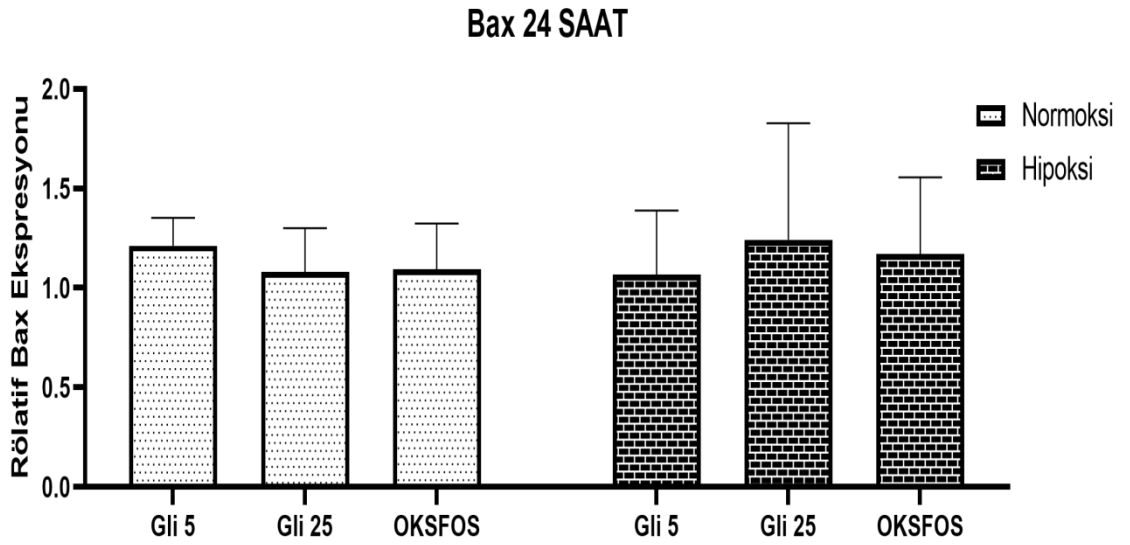
**Şekil 5.30.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bax, Bid, Smac, XIAP ve sitokrom c protein ekspresyonu western bulguları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon/10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

Gli 5, Gli 25 ya da OKSFOS metabolik koşullarda kültüre alınan A549 hücreleri normoksi ya da hipoksi ortamda 48 saat inkübe edildikten sonra proapoptotik Bax, Bid, Smac, XIAP ve sitokrom c proteinlerin ekspresyonun seviyeleri Şekil 5.31'de verilmiştir.



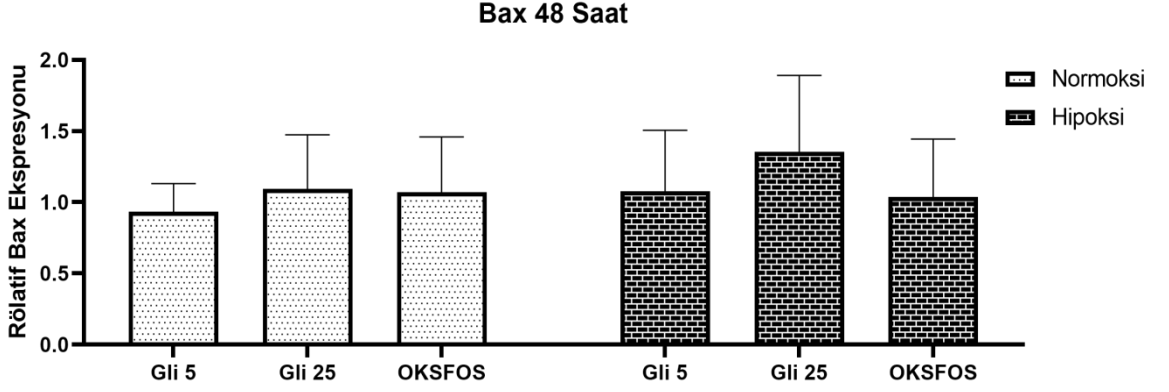
**Şekil 5.31.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bax, Bid, Smac, xIAP ve sitokrom c protein ekspresyonu western bulguları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur.

Şekil 5.30 ve Şekil 5.31’de gösterilen her bir proteininin ekspresyon seviyesine ait dansimetrik analiz sonuçları Şekil 5.32-5.41’de verilmiştir.



**Şekil 5.32** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bax protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansimetrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz),

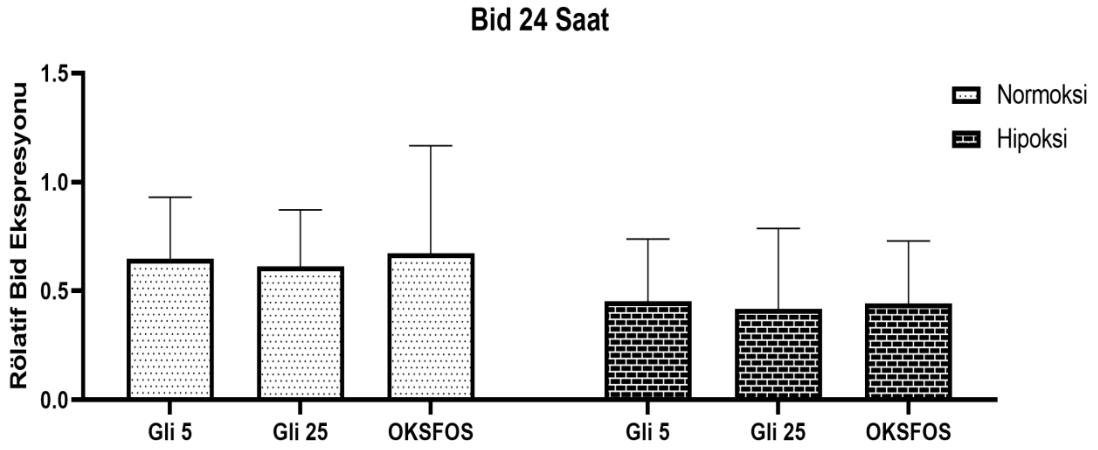
OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).



**Şekil 5.33.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bax protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

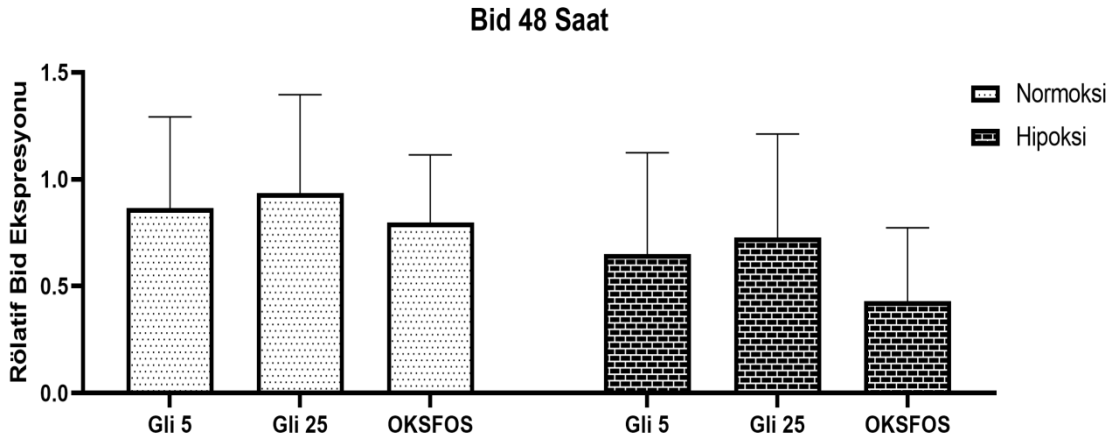
Test edilen tüm deneysel hücre gruplarında 24 ya da 48 saat inkübasyon sonrasında proapoptotik Bax protein ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (ns,  $p \geq 0.05$ ) (Şekil 5.30-Şekil 5.33).

Anoksi koşulda ( $< 0.1\% O_2$ ) inkübe edilen HCT116, HT29 ve SW480 üç kolon karsinom hücre hattının tümünde ve hipoksi koşulda ( $1-2\% O_2$ ) inkübe edilen SW480 hücrelerinde Bax ekspresyon seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Erler vd., 2004). İnsan OSCC hücrelerinde HIF-1 $\alpha$ 'nın aşırı ekspresyonunda, antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xl seviyelerini artmış, proapoptotik Bax ve Bak seviyeleri ise azalmıştır (Sasabe vd., 2005). Bir başka çalışmada ise, hipoksi koşulda inkübe edilen LN-229 hücre hattında Bcl-2, Bcl-xl ve Bax protein ekspresyon seviyesi değişmeden kaldığı gösterilmiştir (Steinbach vd., 2003). Steinbach vd., (2003)'e benzer şekilde çalışmamızda 24 ve 48 saat normoksi ve hipoksi koşulda inkübe edilen A549 hücre hattının tüm metabolik koşulları için Bax ekspresyon seviyesinin değişmediği gösterilmiştir.



**Şekil 5.34.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bid protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

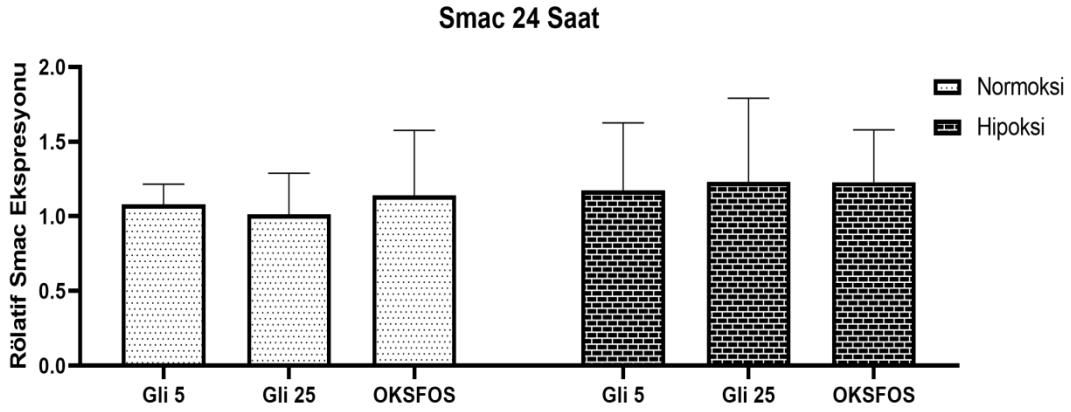
A549 hücrelerinin farklı metabolik koşullar altında kültüre edilmesi proapoptotik Bid protein ekspresyonu üzerine anlamlı bir etki oluşturmazken, hücrelerin 24 saat süre ile hipoksi koşullarda inkübasyona tabi tutulması Bid protein ekspresyonunda metabolik koşuldaki bağımsız olarak azalmaya neden olmuştur, ancak düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 5.30 ve Şekil 5.34).



**Şekil 5.35.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Bid protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

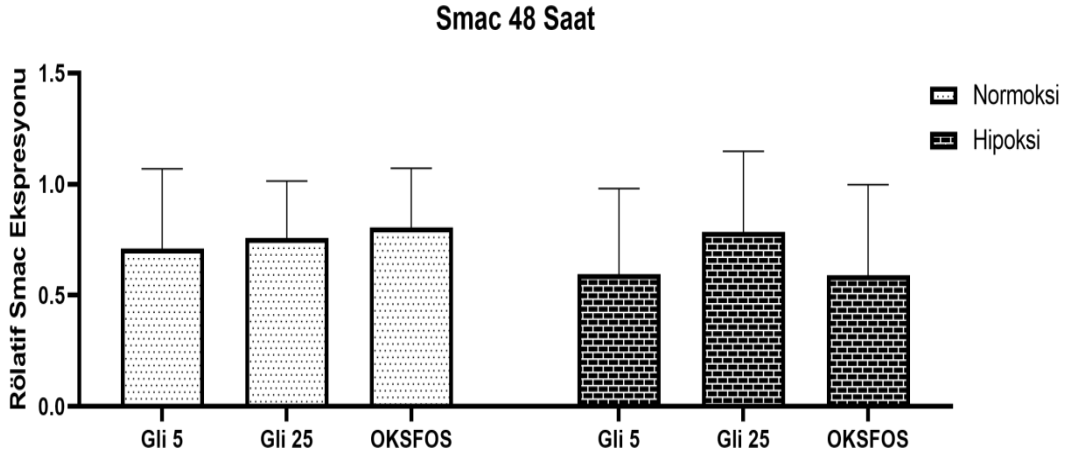


A549 hücrelerinin 48 saat normoksi ve hipoksi koşulda inkübe edilmesi sonrasında, hem normoksi hem de hipoksi koşullarında OKSFOS hücre grubunun glikolitik hücre gruplarına kıyasla daha düşük Bid ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir. Tüm hücre grupları için ise hipoksi koşulda Bid ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalış belirlenmiştir (ns,  $p \geq 0.05$ ) (Şekil 5.31 ve Şekil 5.35). Anoksi koşulda ( $< \%0.1 O_2$ ), kolon karsinom hücre hatlarında (HCT116, HT29 ve SW480), Çin hamsteri akciğer fibroblastında (V79) ve murin hepatom hücrelerde (HEPA-1) ve hipoksi koşulda ( $\%1-2 O_2$ ) inkübe edilen SW480 hücrelerinde Bid ekspresyon seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Erlor vd., 2004). Literatürdeki bu veriler, tez kapsamındaki A549 hücrelerinde elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.



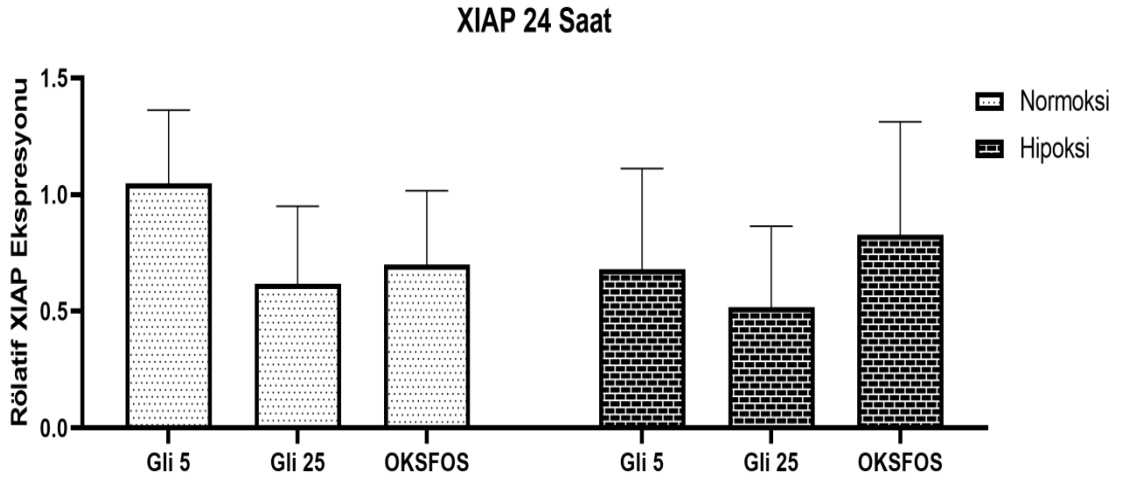
**Şekil 5.36.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Smac protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

A549 hücrelerinin tüm metabolik ortam koşulları 24 saat inkübasyon sonrasında hipoksi koşulda normoksi koşula kıyasla Smac protein ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir (ns,  $p \geq 0.05$ ).



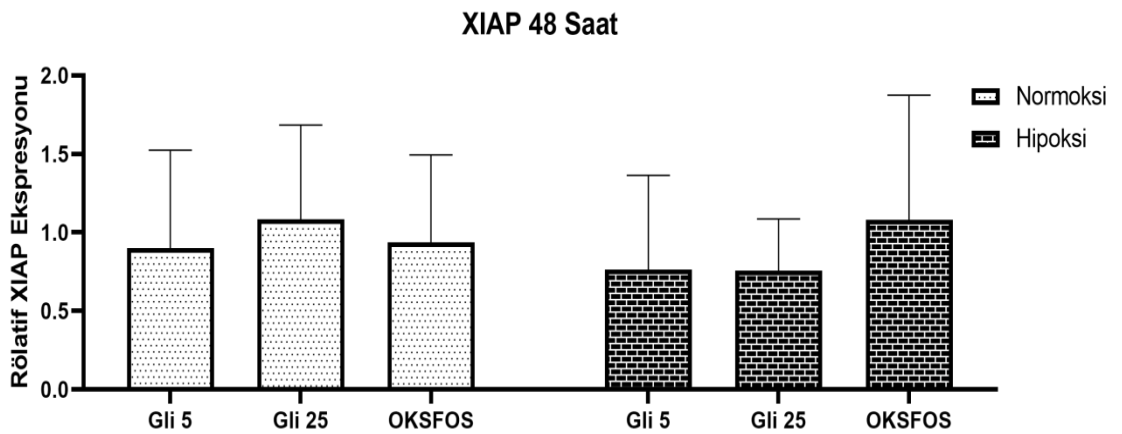
**Şekil 5.37.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin Smac protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

İçsel apoptotik yolağın uyarılması sonrasında bir mitokondriyal protein olan, Smac proteini mitokondriden sitoplazmaya salınarak sitokrom c / Apaf-1 / kaspaz-9 apoptotik yolda kaspaz enzimlerinin aktivasyonunu uyarmaktadır (Du vd., 2000). Smac proteinlerinin inhibitör apoptotik proteinler (IAP'lerin) ile etkileşerek inhibitor proteinlerinin inaktif forma geçmesine ve kaspaz-9'un aktif olmasına neden olmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar göstermiştir ki, A549 hücrelerinin hipoksi koşullarda 24 saat inkübe edilmesi Smac proteininin ekspresyonuna istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışa neden olmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ) (Şekil 5.30 ve Şekil 5.36). 48 saat inkübe edildikten sonra ise hipoksi koşuldaki Gli 25 hücrelerini Smac ekspresyon seviyesi değişmezken, Gli 5 ve OKSFOS hücre grubunun Smac ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüş göstermiştir (ns,  $p \geq 0.05$ ).



**Şekil 5.38.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin XIAP protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

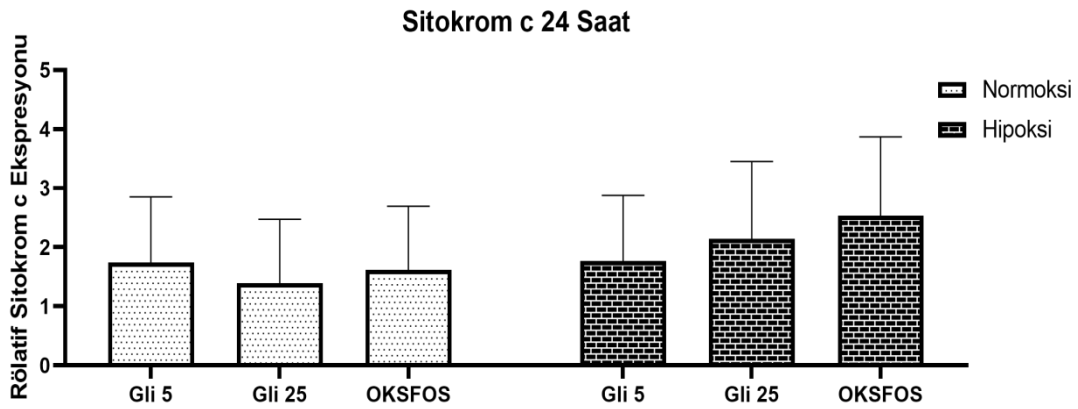
A549 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında, glikolitik hücre grupları normoksi koşula kıyasla hipoksi koşullardaki XIAP ekspresyon seviyesi azalırken, OKSFOS hücre grubunda ise değişiklik olmamıştır. Ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (ns,  $p \geq 0.05$ ).



**Şekil 5.39.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin XIAP protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

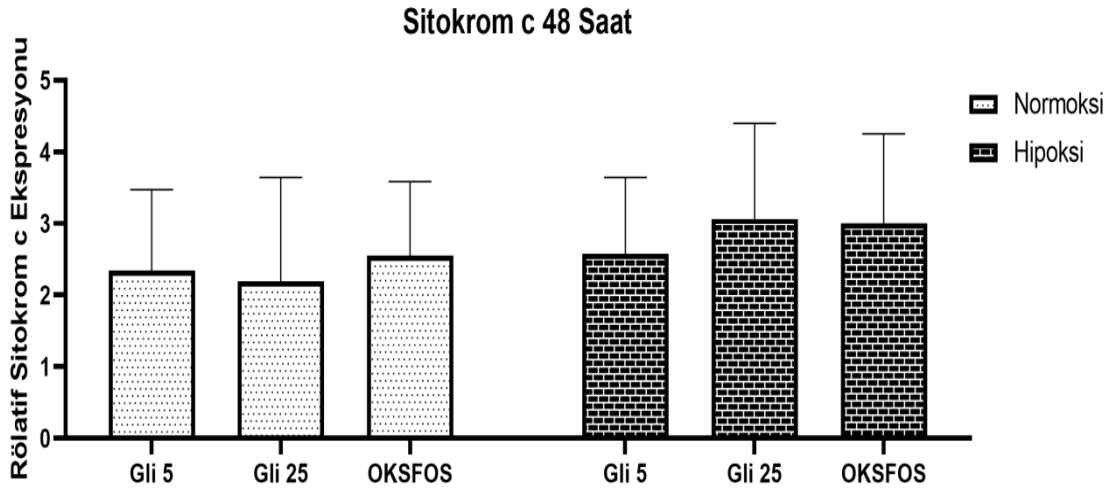
A549 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonrasında ise 24 saatlik inkübasyona benzer şekilde hipoksi koşulda glikolitik hücrelerin XIAP ekspresyon seviyesi azalırken, OKSFOS grubununki istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış sergilemiştir (ns,  $p \geq 0.05$ ).

X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü (XIAP), BIR3 alanı aracılığıyla kaspaz-9'u ve BIR2 alanı aracılığıyla efektör kaspazları-3 ve kaspaz-7'yi doğrudan nötralize eden en güçlü ve en iyi tanımlanmış anti-apoptotik IAP ailesi üyesidir. XIAP'nin doğal bir inhibitörü, apoptotik hücrelerde mitokondriden salınan ve XIAP'ın BIR2 / BIR3 alanlarından bağlı kaspazları değiştiren, böylece hücre ölümü uygulamasını yeniden aktive eden Smac/Diablo'dur (Obexer ve Ausserlechner, 2014). Yapılan bir çalışmada XIAP, LN-229 hücrelerini normoksi altında CD95L'nin neden olduğu apoptozdan korurken, hipoksik hücre ölümüne karşı koruma sağlayamamıştır (Steinbach vd., 2003). Benzer şekilde çalışmamızda da XIAP'ın antiapoptotik bir protein olmasına rağmen hipoksi koşuldaki OKSFOS hücre grubunun ekspresyon seviyesinin artışı hücreyi ölümden koruyamamakta ve hipoksik OKSFOS hücreleri diğer deney verilerinde belirtildiği şekilde (kaspaz-3/9 aktivitesi artışı (Şekil 5.25 ve Şekil 5.29) ve MMP düşüşü (Şekil 5.19) apoptoza mekanizması tetiklenmiştir.



**Şekil 5.40.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 24 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin sitokrom c protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur. (ns,  $p \geq 0.05$ ).

A549 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasında hipoksi koşullarda Gli 5 hücre grubunun sitokrom c ekspresyon seviyesi değişmezken, Gli 25 ve OKSFOS hücre grupları daha yüksek sitokrom c ekspresyonu sergilemiştir. Hipoksi koşuldaki OKSFOS hücre grubunda ise diğer gruplara kıyasla en yüksek sitokrom c ekspresyon seviyesi belirlenmiştir (ns,  $p \geq 0.05$ ). Bu bulgular MMP sonuçları ile uyumludur.



**Şekil 5.41.** Normoksi ve hipoksi koşullar altında 48 saat inkübe edilen glikolitik ve OKSFOS A549 hücrelerinin sitokrom c protein ekspresyonunun western bulgularına ait dansitometrik analiz sonuçları (Gli 5: Glikolitik/ 5 mM glukoz, Gli 25: Glikolitik/ Hiperglisemik (25 mM glukoz), OKSFOS: Oksidatif Fosforilasyon / 10 mM galaktoz). Deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M olarak sunulmuştur (ns,  $p \geq 0.05$ ).

A549 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasında 24 saatlik inkübasyon sonrası verilere benzer şekilde hipoksi koşullarda Gli 5 hücre grubunun sitokrom c ekspresyon seviyesi değişmezken, Gli 25 ve OKSFOS hücre grupları daha yüksek sitokrom c ekspresyonu sergilemiştir. Hipoksi koşuldaki OKSFOS hücre grubunda ise diğer gruplara kıyasla yüksek sitokrom c ekspresyon seviyesi belirlenmiştir (ns,  $p \geq 0.05$ ).

Apoptozun içsel yolağında, pro-apoptotik sinyaller sonucunda, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1) ve kaspaz-9'un inaktif formu ile bir kompleks (apoptozom) oluşturur ve sitoplazmada mitokondriyal membran pertürbasyonu ve sitokrom c salınımı olur. Bu kompleks, kaspaz-9'u parçalamak ve aktive etmek için adenozin trifosfatı hidrolize eder. Başlatıcı kaspaz-9 daha sonra uygulayıcı kaspazlar olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive ederek hücre apoptozuna neden olur

(Loreto vd., 2014). İnsan OSCC hücrelerinde HIF-1 $\alpha$  aşırı ekspresyonunun, mitokondriden sitokrom c salınımını inhibe ederek hipoksinin neden olduğu apoptozu bastırıldığı gösterilmiştir (Sasabe vd., 2005). LN-229 hücre hattında yapılan bir çalışmada ortamda 2 mM'dan daha fazla glukoz konsantrasyonunu olduğunda sitokrom c salınımının olmadığı bildirilmiştir (Steinbach vd., 2003). Tez çalışmasında da literatürdeki bu veriye benzer şekilde aglisemik olan OKSFOS hücre grubunda hipoksi koşullarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan en yüksek sitokrom c seviyesi tespit edilmiştir (ns,  $p \geq 0.05$ ). Bu bulgular, OKSFOS hücre grubunun daha önceki verilerde belirlenen kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesindeki artış ile (Şekil 5.25/ Şekil 5.29), MMP'deki düşüşü (Şekil 5.19) ve sitokrom c ekspresyon artışı ile uyumludur.

## 6. SONUÇ

Tez çalışmasında A549 hücreleri için glikolitik metabolik ortamı (Gli 5 ve Gli 25) ve oksidatif fosforilasyon ortamı (OKSFOS) olmak üzere üç farklı metabolik koşulda hücre yanıtları incelenmiştir. Bu üç metabolik koşulun tümü ciddi hipoksi koşullarında %1 O<sub>2</sub> adaptasyonunda 4. saatte maksimum HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonuna ulaşmış ve 6. saatten sonra HIF-1 $\alpha$  ekspresyon seviyesi azalmıştır. HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu tespit edildikten sonra metabolizma ve apoptoz deneylerine geçilmiştir. Metabolizma deneyleri kapsamında L-laktik asit analizi, p-PDH/PDH ekspresyon oranı, ATP analizi ve sitrat sentaz aktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Apoptoz deneyleri kapsamında ise erken ve geç apoptoz tayini, mitokondrial membran potansiyeli, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesi ve apoptoz yolağındaki proteinlerin (Bax, Bid, XIAP, Smac, sitokrom c) ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

A549 hücreleri 48 saat hipoksi ve normoksi şartlarda inkübe edildikten sonra p-PDH/PDH protein ekspresyon seviyesi western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Gli grubunda p-PDH/PDH protein ekspresyon oranı yüksek iken OKSFOS grubunda düşük bulunmuştur. Normoksi koşullar altında inkübe edilen Gli 5 ve Gli 25 hücrelerinde, Warburg fenotipinin belirteci olan p-PDH protein ekspresyon seviyesi önemli düzeyde yüksek iken, OKSFOS hücrelerinde ise düşük miktarda p-PDH belirlenmiştir. OKSFOS hücrelerinin, glikolitik hücrelerden çok düşük oranda laktat üretimi sergilediği de belirlenmiştir. Koşulların normoksiden hipoksiye geçişi, hücrelerin laktat üretim miktarında bir değişikliğe neden olmamıştır. Hipoksi koşullarda HIF-aracılı LDH upregülasyonunun OKSFOS hücrelerinde laktat miktarının artmasına etkisi olmamıştır. Tüm metabolik koşulların hipoksidedeki sitrat sentaz aktivitesinin normoksiye göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Hipoksiye maruz kalan glikolitik hücrelerin ATP konsantrasyonunda düşüş olmuştur. Hipoksik OKSFOS hücre grubunda ise en yüksek ATP konsantrasyonu belirlenmiştir.

İnsan akciğer kanseri hücre hattının biyoenerjetik analizi, Warburg'un teorisini doğrulamış ve OKSFOS'un kendi başına inaktif olmadığını, ancak düşük kapasitede çalıştığını ve glukoz varlığıyla bastırıldığı gösterilmiştir (Wu vd., 2007). Wu vd., (2007)' nin yaptığı çalışmada A549 hücresi için tanımlanan biyoenerjetik fenotip, zayıflatılmış bir mitokondriyal fonksiyonla yakından bağlantılı artan bir glikolitik hız ve kapasite ile karakterizedir. Bu metabolik değişiklikler, tümör hücrelerine büyümeyi, hayatta kalmayı, istilayı ve metastazı teşvik etme yeteneği verebilir. Tez çalışmasındaki

bulguların literatürle uyumlu olduğu ve Gli 5 ve Gli 25 hücre grubunun Warburg hipotezini doğruladığı, hücrelerin mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yerine aerobik glikoliz yoluyla baskın bir ATP üretimi ile karakterize edilen biyoenerjetik özellikler sergilediği belirlenmiştir.

Normoksi ve hipoksi koşullarda inkübe edilen Gli 5 ve Gli 25 hücre grupları ile normoksi koşulda inkübe edilen OKSFOS hücrelerinin MMP, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmaz iken, hipoksi koşuldaki OKSFOS hücrelerinde erken apoptoz, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesinde artış, MMP’de ise düşüş gözlenmiştir. Hipoksi koşullardaki OKSFOS hücrelerinin 48 saat apoptoz belirleme analizi akım sitometrisi sonuçlarına göre  $15.5 \pm 7.1$  oranında geç apoptoz gözlemlenmiştir. OKSFOS hücrelerinde 48 saat hipokside  $15.7 \pm 3.2$  depolarize mitokondri membran potansiyeli tespit edilirken, 72 saatte bu oran daha da artarak  $48.0 \pm 0.4$ ’e çıkmıştır. 48 saat hipoksiye maruz kalan OKSFOS hücrelerinde  $3.3 \pm 0.1$  aktif kaspaz-3 tespit edilirken 72 saatte bu oran artarak  $6.1 \pm 0.9$  çıkmıştır. OKSFOS hücrelerinde 24 saat hipokside  $30.4 \pm 0.9$  aktif kaspaz-9 tespit edilirken 48 saatte ise bu oran azalarak  $13.5 \pm 0.4$  olarak belirlenmiştir. Sitokrom c protein ekspresyon seviyesinin OKSFOS hücrelerinde arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, hipoksik OKSFOS hücrelerinin apoptoza gittiğini fakat diğer normoksik OKSFOS ve hipoksik/normoksik glikolitik hücrelerin ise hücre canlılığını koruduğu görülmüştür.

Tez çalışmasının A549 hücrelerine dair literatüre iki önemli katkısı olmuştur. Bunlardan birincisi; enerji eldesi için glukoz yerine galaktoz ve glutaminin kullanıldığı aglisemik ortamda, HIF-1 $\alpha$  tarafından düzenlenen yeniden metabolik programlamaya rağmen, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun işlevsel hale geldiği ikincisi ise; hipoksi koşullardaki aglisemik hücre grubunda (OKSFOS) apoptotik yolağın tetiklendiği belirlenmiştir. Bu veriler kanser hücrelerin çoğunluğunun hipoksik olduğu düşünüldüğünde terapötik müdahalede hedeflerin belirlenebilmesi açısından önem taşımaktadır.

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar doğrultusunda, apoptotik mekanizmanın ayrıntılı bir şekilde aydınlatılması, geçirimli elektron mikroskopu ile ultrayapısal olarak incelenmesi, sitokrom c’nin lokasyonunun tespiti için immunofloresan yapılması ve test edilen metabolik koşullar altında inkübe edilen hücrelerdeki antioksidan kapasitenin belirlenmesi gerekliliği doğmuştur. Bununla birlikte, ko-kültür yöntemi ile hipoksik



tümör mikro çevre oluşturularak farklı metabolik koşullar altında olası hücre cevapların belirlenmesi planlanmaktadır.

## KAYNAKÇA

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular Cell*, 9(2), 423-432.
- Adams, J. M., Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 61-66.
- Airley, R. E., Mobasher, A. (2007). Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy*, 53(4), 233-256.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
- Altman, B. J., Stine, Z. E., Dang, C. V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 619.
- Arnesen, T., Kong, X., Evjenth, R., Gromyko, D., Varhaug, J. E., Lin, Z., Sang, N., Caro, J., Lillehaug, J. R. (2005). Interaction between HIF-1 $\alpha$  (ODD) and hARD1 does not induce acetylation and destabilization of HIF-1 $\alpha$ . *FEBS Letters*, 579(28), 6428-6432.
- Arsham, A. M., Plas, D. R., Thompson, C. B., Simon, M. C. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 $\alpha$  nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 15162-15170.
- Atsumi, T., Chesney, J., Metz, C., Leng, L., Donnelly, S., Makita, Z., Mitchell, R., Bucala, R. (2002). High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Research*, 62(20), 5881-5887.
- Bacon, A., Harris, A. (2004). Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology. *Annals of Medicine*, 36(7), 530-539.
- Baek, J. H., Liu, Y. V., McDonald, K. R., Wesley, J. B., Zhang, H., Semenza, G. L. (2007). Spermidine/spermine N1-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1 $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33358-33366.

- Bahadori, B., Uitz, E., Mayer, A., Harauer, J., Dam, K., Truschnig-Wilders, M., Pilger, E., Renner, W. (2010). Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene and peripheral artery disease. *Vascular Medicine*, 15(5), 371-374.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2006). *Biochemistry*. sixth ed. New York: WH.Freeman.
- Bilton, R., Mazure, N., Trottier, E., Hattab, M., Déry, M. A., Richard, D. E., Pouysségur, J. Brahimi-Horn, M. C. (2005). Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and is not induced by hypoxia or HIF. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 31132-31140.
- Bouvry, D., Planes, C., Malbert-Colas, L., Escabasse, V., Clerici, C. (2006). Hypoxia-induced cytoskeleton disruption in alveolar epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(5), 519-527.
- Brizel, D. M., Schroeder, T., Scher, R. L., Walenta, S., Clough, R. W., Dewhirst, M. W., Mueller-Klieser, W. (2001). Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 51(2), 349-353.
- Brocato, J., Chervona, Y., Costa, M. (2014). Molecular responses to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and beyond. *Molecular Pharmacology*, 85(5), 651-657.
- Brown, J. M., Wilson, W. R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 437-447.
- Bruick, R. K. (2000). Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 9082-9087.
- Bruick, R. K., McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, 294(5545), 1337-1340.
- Brusselmans, K., Bono, F., Maxwell, P., Dor, Y., Dewerchin, M., Collen, D., Herbert, J. M., Carmeliet, P. (2001). Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 39192-39196.
- Bühler, K., Plaisance, I., Dieterle, T., Brink, M. (2009). The human urocortin 2 gene is regulated by hypoxia: identification of a hypoxia-responsive element in the 3'-flanking region. *Biochemical Journal*, 424(1), 119-127.

- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195-203.
- Bustamante, E., Pedersen, P. L. (1977). High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(9), 3735-3739.
- Carreau, A., Hafny-Rahbi, B. E., Matejuk, A., Grillon, C., Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(6), 1239-1253.
- Catalina-Rodriguez, O., Kolukula, V. K., Tomita, Y., Preet, A., Palmieri, F., Wellstein, A., Byers, S., Giaccia, A. J., Glasgow, E., Albanese, C., Avantaggiati, M. L. (2012). The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis. *Oncotarget*, 3(10), 1220.
- Chaneton, B., Hillmann, P., Zheng, L., Martin, A. C., Maddocks, O. D., Chokkathukalam, A., Coyle, J. E., Jankevics, A., Holding, F. P., Vousden, K. H., Frezza, C., O'Reilly, M., Gottlieb, E. (2012). Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature*, 491(7424), 458-462.
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., Maity, A. (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1: interaction between H-ras and hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9519-9525.
- Chen, D., Li, M., Luo, J., Gu, W. (2003). Direct interactions between HIF-1 $\alpha$  and Mdm2 modulate p53 function. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 13595-13598.
- Chen, H., Wang, L., Beretov, J., Hao, J., Xiao, W., Li, Y. (2010). Co-expression of CD147/EMMPRIN with monocarboxylate transporters and multiple drug resistance proteins is associated with epithelial ovarian cancer progression. *Clinical & Experimental Metastasis*, 27(8), 557-569.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., Huang, D. C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell*, 17(3), 393-403.

- Chipuk, J. E., Green, D. R. (2004). Cytoplasmic p53: back and forward. *Cell Cycle*, 3(4), 427-429.
- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., Fleming, M. D., Schreiber, S. L., Cantley, L. C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184), 230-233.
- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Wu, N., Asara, J. M., Cantley, L. C. (2008). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature*, 452(7184), 181-186.
- Clerici, C., Planès, C. (2009). Gene regulation in the adaptive process to hypoxia in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 296(3), L267-L274.
- Coller, H. A. (2014). Is cancer a metabolic disease?. *The American journal of pathology*, 184(1), 4-17.
- Conway, E. M., Collen, D., Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research*, 49(3), 507-521.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49-63.
- Czernin, J., Phelps, M. E. (2002). Positron emission tomography scanning: current and future applications. *Annual Review of Medicine*, 53(1), 89-112.
- DeBerardinis, R. J., Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5), e1600200.
- DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., Thompson, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19345-19350.
- Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 705-713.
- Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., Devin, A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(6), 568-576.

- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33-42.
- Durukan, Ö. (2016). Investigation of the effects of combine use of cisplatin and metformin on proliferation of prostate cancer cell lines and gstp, cyp17a1 and hexokinase II enzymes (*Master's thesis, Middle East Technical University*).
- Emerling, B. M., Weinberg, F., Liu, J. L., Mak, T. W., Chandel, N. S. (2008). PTEN regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2622-2627.
- Erler, J. T., Cawthorne, C. J., Williams, K. J., Koritzinsky, M., Wouters, B. G., Wilson, C., Miller, C., Demonacos, C., Stratford, I.J., Dive, C. (2004). Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and-independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), 2875-2889.
- Fadaka, A., Ajiboye, B., Ojo, O., Adewale, O., Olayide, I., Emuowhochere, R. (2017). Biology of glucose metabolization in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences*, 3(2), 45-51.
- Fan, T., Sun, G., Sun, X., Zhao, L., Zhong, R., Peng, Y. (2019). Tumor energy metabolism and potential of 3-bromopyruvate as an inhibitor of aerobic glycolysis: implications in tumor treatment. *Cancers*, 11(3), 317.
- Fantin, V. R., St-Pierre, J., Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9(6), 425-434.
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N. V., Pak, B., Ferreira, G., Semenza, G. L. (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Research*, 59(16), 3915-3918.
- Fernald, K., Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*, 23(12), 620-633.
- Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, A. W., Kreutz, M.

- (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 109(9), 3812-3819.
- Fischer, U., Jänicke, R. U., Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*, 10(1), 76-100.
- Flügel, D., Görlach, A., Michiels, C., Kietzmann, T. (2007). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Molecular and Cellular Biology*, 27(9), 3253-3265.
- Fogal, V., Richardson, A. D., Karmali, P. P., Scheffler, I. E., Smith, J. W., Ruoslahti, E. (2010). Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 30(6), 1303-1318.
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J. W., Shimoda, L., Dang, C. V., Semenza, G. L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, 129(1), 111-122.
- Fulda, S., Debatin, K. M. (2007). HIF-1-regulated glucose metabolism: a key to apoptosis resistance?. *Cell Cycle*, 6(7), 790-792.
- Galbán, S., Kuwano, Y., Pullmann, R., Martindale, J. L., Kim, H. H., Lal, A., Abdelmohsen, K., Yang, X., Dang, Y., Liu, J. O., Lewis, S. M., Holcik, M., Gorospe, M. (2008). RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Molecular and Cellular Biology*, 28(1), 93-107.
- Gatenby, R. A., Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nature Reviews Cancer*, 4(11), 891-899.
- Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S. R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus C.J., Kadkhoda K., Wiechec, E., Halayko, A.J., Los, M. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics*, 46(8), 497-510.
- Giaccia, A. J., Simon, M. C., Johnson, R. (2004). The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & Development*, 18(18), 2183-2194.
- Giaccia, A., Siim, B. G., Johnson, R. S. (2003). HIF-1 as a target for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(10), 803-811.

- Giovannucci, E., Harlan, D. M., Archer, M. C., Bergenstal, R. M., Gapstur, S. M., Habel, L. A., Pollak, M., Regensteiner, J. G., Yee, D. (2010). Diabetes and cancer: a consensus report. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60(4), 207-221.
- Goldberg, M. S., Sharp, P. A. (2012). Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. *Journal of Experimental Medicine*, 209(2), 217-224.
- Görlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V. B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R. P., Kietzmann, T., Busse, R. (2001). Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: role of the p22 phox-containing NADPH oxidase. *Circulation Research*, 89(1), 47-54.
- Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R. B., Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes & Development*, 15(11), 1406-1418.
- Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W., Giaccia, A. J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, 379(6560), 88-91.
- Graven, K. K., Bellur, D., Klahn, B. D., Lowrey, S. L., Amberger, E. (2003). HIF-2 $\alpha$  regulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1626(1-3), 10-18.
- Greer, S. N., Metcalf, J. L., Wang, Y., Ohh, M. (2012). The updated biology of hypoxia-inducible factor. *The EMBO Journal*, 31(11), 2448-2460.
- Greijer, A. E., Van der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology*, 57(10), 1009-1014.
- Große, L., Wurm, C. A., Brüser, C., Neumann, D., Jans, D. C., Jakobs, S. (2016). Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *The EMBO Journal*, 35(4), 402-413.
- Guppy, M., Leedman, P., Zu, X., Russell, V. (2002). Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical Journal*, 364(1), 309-315.



- Hagen, T., Taylor, C. T., Lam, F., Moncada, S. (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1 $\alpha$ . *Science*, 302(5652), 1975-1978.
- Hammond, E. M., Dorie, M. J., Giaccia, A. J. (2003). ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12207-12213.
- Hansson, L. O., Friedler, A., Freund, S., Rüdiger, S., Fersht, A. R. (2002). Two sequence motifs from HIF-1 $\alpha$  bind to the DNA-binding site of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10305-10309.
- Hänze, J., Eul, B. G., Savai, R., Krick, S., Goyal, P., Grimminger, F., Seeger, W., Rose, F. (2003). RNA interference for HIF-1 $\alpha$  inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(3), 571-577.
- Hao, J., Chen, H., Madigan, M. C., Cozzi, P. J., Beretov, J., Xiao, W., Delprado, W. J., Russel, P. J., Li, Y. (2010). Co-expression of CD147 (EMMPRIN), CD44v3-10, MDR1 and monocarboxylate transporters is associated with prostate cancer drug resistance and progression. *British Journal of Cancer*, 103(7), 1008-1018.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271-274.
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 38-47.
- Hatzivassiliou, G., Andreadis, C., Thompson, C. B. (2005). Akt-directed metabolic alterations in cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2(2), 255-262.
- Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., Hingorani, S. R., Tuveson, D. A., Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*, 8(4), 311-321.
- Hayashi, M., Sakata, M., Takeda, T., Yamamoto, T., Okamoto, Y., Sawada, K., Kimura, A., Minekawa, R., Tahara, M., Tasaka, K., Murata, Y. (2004). Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *Journal of Endocrinology*, 183(1), 145-154.

- Heerlein, K., Schulze, A., Hotz, L., Bartsch, P., Mairbaurl, H. (2005). Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of a549 cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(1), 44-51.
- Hes, F. J., Höppener, J. W., van der Luijt, R. B., Lips, C. J. (2005). Von hippel-lindau disease. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 3(4), 1-8.
- Hitosugi, T., Kang, S., Vander Heiden, M. G., Chung, T. W., Elf, S., Lythgoe, K., Dong, S., Lonial, S., Wang, X., Chen, G. Z., Xie, J., Gu, T. L., Polakiewicz, R. D., Roesel, J. L., Boggon, T. J., Khuri, F. R., Gilliland, D. G., Cantley, L. C., Kaufman, J. Chen, J. (2009). Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Science Signaling*, 2(97), ra73-ra73.
- Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A., Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, 252(5008), 954-958.
- Hon, W. C., Wilson, M. I., Harlos, K., Claridge, T. D., Schofield, C. J., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., Stuart, D. I., Jones, E. Y. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 $\alpha$  by pVHL. *Nature*, 417(6892), 975-978.
- Hong, S. S., Lee, H., Kim, K. W. (2004). HIF-1 $\alpha$ : a valid therapeutic target for tumor therapy. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, 36(6), 343.
- Hsiao, P. C., Chen, M. K., Su, S. C., Ueng, K. C., Chen, Y. C., Hsieh, Y. H., Liu, Y. F., Tsai, H. T., Yang, S. F. (2010). Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  gene polymorphism G1790A and its interaction with tobacco and alcohol consumptions increase susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, 102(2), 163-169.
- <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10016505E.pdf> (Erişim Tarihi: 01.04.2021)
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 7987-7992.

- Huang, Y., Du, K. M., Xue, Z. H., Yan, H., Li, D., Liu, W., Chen, Z., Zhao, Q., Tong, J. H., Zhu, Y. S., Chen, G. Q. (2003). Cobalt chloride and low oxygen tension trigger differentiation of acute myeloid leukemic cells: possible mediation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Leukemia*, 17(11), 2065-2073.
- Hume, D. A., Radik, J. L., Ferber, E., Weidemann, M. J. (1978). Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation. *Biochemical Journal*, 174(3), 703-709.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., Kaelin Jr, W. G. (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*, 292(5516), 464-468.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292(5516), 468-472.
- Jain, S., Maltepe, E., Lu, M. M., Simon, C., Bradfield, C. A. (1998). Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mechanisms of Development*, 73(1), 117-123.
- Jariel-Encontre, I., Bossis, G., Piechaczyk, M. (2008). Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1786(2), 153-177.
- Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., Yoo, M. A., Song, E. J., Lee, K. J., Kim, K. W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111(5), 709-720.
- Ježek, J., Plecítá-Hlavatá, L., Ježek, P. (2018). Aglycemic HepG2 cells switch from aminotransferase glutaminolytic pathway of pyruvate utilization to complete Krebs cycle at hypoxia. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 637.
- Ježek, P., Plecítá-Hlavatá, L., Smolková, K., Rossignol, R. (2010). Distinctions and similarities of cell bioenergetics and the role of mitochondria in hypoxia, cancer, and embryonic development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(5), 604-622.

- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 17771-17778.
- Jiang, B. H., Semenza, G. L., Bauer, C., Marti, H. H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(4), C1172-C1180.
- Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R., Semenza, G. L. (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19253-19260.
- Jin, L., Alesi, G. N., Kang, S. (2016). Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene*, 35(28), 3619-3625.
- Kaelin Jr, W. G., Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*, 30(4), 393-402.
- Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *The EMBO Journal*, 17(22), 6573-6586.
- Kalyanaraman, B. (2017). Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biology*, 12, 833-842.
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557-563.
- Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3), 177-185.
- Kim, J. Y., Ahn, H. J., Ryu, J. H., Suk, K., Park, J. H. (2004). BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *The Journal of Experimental Medicine*, 199(1), 113-124.
- Kimura, H., Braun, R. D., Ong, E. T., Hsu, R., Secomb, T. W., Papahadjopoulos, D., Hong, K., Dewhirst, M. W. (1996). Fluctuations in red cell flux in tumor

- microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Research*, 56(23), 5522-5528.
- Koh, M. Y., Spivak-Kroizman, T. R., Powis, G. (2008). HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(11), 526-534.
- Kong, X., Alvarez-Castelao, B., Lin, Z., Castano, G. J., Caro, J.(2007). Constitutive/hypoxic degradation of HIF- $\alpha$  proteins by the proteasome is independent of von Hippel Lindau protein ubiquitylation and the transactivation activity of the protein. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15498–15505.
- Koritzinsky, M., Magagnin, M. G., van den Beucken, T., Seigneuric, R., Savelkoul, K., Dostie, J., Pyronnet, S., Kaufman, R. J., Wepler, S. A., Voncken, J. W., Lambin, P., Koumenis, C., Sonenberg, N., Wouters, B. G. (2006). Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. *The EMBO Journal*, 25(5), 1114-1125.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Bougioukas, G., Didilis, V., Gatter, K. C., Harris, A. L. (2003). Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *British Journal of Cancer*, 89(5), 877-885.
- Koumenis, C., Wouters, B. G. (2006). “Translating” Tumor Hypoxia: Unfolded Protein Response (UPR)–Dependent and UPR-Independent Pathways. *Molecular Cancer Research*, 4(7), 423-436.
- Krall, A. S., Christofk, H. R. (2013). A metabolic metamorphosis. *Nature*, 496(7443), 38-40.
- Kress, S., Stein, A., Maurer, P., Weber, B., Reichert, J., Buchmann, A., Huppert, P., Schwarz, M. (1998). Expression of hypoxia-inducible genes in tumor cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 124(6), 315-320.
- Krick, S., Eul, B. G., Hanze, J., Savai, R., Grimminger, F., Seeger, W., Rose, F. (2005). Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(5), 395-403.
- Kuida, K. (2000). Caspase-9. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(2), 121-124.

- Kurokawa, M., Kornbluth, S. (2009). Caspases and kinases in a death grip. *Cell*, 138(5), 838-854.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C., Semenza, G. L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and Cellular Biology*, 21(12), 3995-4004.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2(3), 183-192.
- Li, J., Zhang, X., Sejas, D. P., Bagby, G. C., Pang, Q. (2004). Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41275-41279.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489.
- Li, P., Nijhawan, D., Wang, X. (2004). Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell*, 116, S57-S61.
- Li, X., Liu, X., Xu, Y., Liu, J., Xie, M., Ni, W., Chen, S. (2014). KLF5 promotes hypoxia-induced survival and inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer cells via HIF-1 $\alpha$ . *International Journal of Oncology*, 45(4), 1507-1514.
- Liao, S. H., Zhao, X. Y., Han, Y. H., Zhang, J., Wang, L. S., Xia, L., Zhao, K. W., Zheng, Y., Guo, M., Chen, G. Q. (2009). Proteomics-based identification of two novel direct targets of hypoxia-inducible factor-1 and their potential roles in migration/invasion of cancer cells. *Proteomics*, 9(15), 3901-3912.
- Lindner, A. U., Prehn, J. H., Huber, H. J. (2013). The indirect activation model of mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP) initiation requires a trade-off between robustness in the absence of and sensitivity in the presence of stress. *Molecular BioSystems*, 9(9), 2359-2369.
- Liu, L., Cash, T. P., Jones, R. G., Keith, B., Thompson, C. B., Simon, M. C. (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Molecular Cell*, 21(4), 521-531.

- Liu, L., Ning, X., Sun, L., Zhang, H., Shi, Y., Guo, C., Han, S., Liu, J., Sun, S., Han, Z., Wu, K., Fan, D. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Science*, 99(1), 121-128.
- Liu, Y. V., Baek, J. H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R. N., Semenza, G. L. (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 $\alpha$  and is required for O<sub>2</sub>-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 $\alpha$ . *Molecular Cell*, 25(2), 207-217.
- Liu, Y. V., Hubbi, M. E., Pan, F., McDonald, K. R., Mansharamani, M., Cole, R. N., Liu, J. O., Semenza, G. L. (2007). Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 282(51), 37064-37073.
- López-Ríos, F., Sánchez-Aragó, M., García-García, E., Ortega, Á. D., Berrendero, J. R., Pozo-Rodríguez, F., López-Encuentra, A., Ballestin, C., Cuezva, J. M. (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Research*, 67(19), 9013-9017.
- Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S., Sansalone, S. (2014). The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *BioMed Research International*, 2014.
- Lou, J. J. W., Chua, Y. L., Chew, E. H., Gao, J., Bushell, M., Hagen, T. (2010). Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein synthesis by DNA damage inducing agents. *PloS one*, 5(5), e10522.
- Lum, J. J., Bui, T., Gruber, M., Gordan, J. D., DeBerardinis, R. J., Covelto, K. L., Simon, M. C., Thompson, C. B. (2007). The transcription factor HIF-1 $\alpha$  plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes & Development*, 21(9), 1037-1049.
- Lunt, S. Y., Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 441-464.
- Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R. N., Pandey, A., Semenza, G. L. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 145(5), 732-744.
- Lüthi, A. U., Martin, S. J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*, 14(4), 641-650.

- Ly, J. D., Grubb, D. R., Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi$  m) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8(2), 115-128.
- Magrath, I., Lee, Y. J., Anderson, T., Henle, W., Ziegler, J., Simon, R., Schein, P. (1980). Prognostic factors in Burkitt's lymphoma importance of total tumor burden. *Cancer*, 45(6), 1507-1515.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414(6863), 550-554.
- Mallick, B. (Ed.). (2019). AGO-driven non-coding RNAs: codes to decode the therapeutics of diseases. *Academic Press*.
- Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Vital-González, P. A., Flores-Rodríguez, F. L., Macías-Silva, M., Sosa-Garrocho, M., Moreno-Sánchez, R. (2006). Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells: Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *The FEBS Journal*, 273(9), 1975-1988.
- Martinez-Outschoorn, U. E., Balliet, R. M., Rivadeneira, D., Chiavarina, B., Pavlides, S., Wang, C., Whitaker-Menezes, D., Daumer, K., Lin, Z., Witkiewicz, A., Flomenberg, N., Howell, A., Pestell, R., Knudsen, E., Sotgia, F., Lisanti, M. P. (2010). Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle*, 9(16), 3276-3296.
- Martinez-Outschoorn, U. E., Pestell, R. G., Howell, A., Tykocinski, M. L., Nagajyothi, F., Machado, F. S., Tanowitz, H.B., Sotgia, F., Lisanti, M. P. (2011). Energy transfer in "parasitic" cancer metabolism: mitochondria are the powerhouse and Achilles' heel of tumor cells. *Cell Cycle*, 10(24), 4208-4216.
- Martínez-Zaguilán, R., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Chu, Y. W., Gillies, R. J., Hendrix, M. J. (1996). Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 14(2), 176-186.
- Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W., Kurokawa, M. (2016). Metabolic regulation of apoptosis in cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 327, 43-87.



- Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. (2001). Activation of the HIF pathway in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(3), 293-299.
- Mazurek, S., Boschek, C. B., Hugo, F., Eigenbrodt, E. (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *In Seminars in Cancer Biology*. 15(4), 300-308.
- McFate, T., Mohyeldin, A., Lu, H., Thakar, J., Henriques, J., Halim, N. D., Wu, H., Schell, M. J., Tsang, T. M., Teahan, O., Shaoyu, Z., Califano, J. A., Jeung, N. H., Harris, R. A., Verma, A. (2008). Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(33), 22700-22708.
- McIlwain, D. R., Berger, T., Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656.
- Meadows, A. L., Kong, B., Berdichevsky, M., Roy, S., Rosiva, R., Blanch, H. W., Clark, D. S. (2008). Metabolic and morphological differences between rapidly proliferating cancerous and normal breast epithelial cells. *Biotechnology Progress*, 24(2), 334-341.
- Medina, R. A., Owen, G. I. (2002). Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biological Research*, 35(1), 9-26.
- Metallo, C. M., Gameiro, P. A., Bell, E. L., Mattaini, K. R., Yang, J., Hiller, K., Jewell C. M., Johnson Z. R., Irvine D. J., Guarente L., Kelleher J. K., Vander Heiden M. G., Iliopoulos O., Stephanopoulos, G. (2012). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481(7381), 380-384.
- Michelakis, E. D., Sutendra, G., Dromparis, P., Webster, L., Haromy, A., Niven, E., Maguire, C., Gammer, T. L., Mackey, J. R., Fulton, D., Abdulkarim, B., McMurtry, M. S., Petruk, K. C. (2010). Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Science Translational Medicine*, 2(31), 31ra34.
- Molenaar, D., Van Berlo, R., De Ridder, D., Teusink, B. (2009). Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Molecular Systems Biology*, 5(1), 323.
- Morava, E. (2014). Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG. *Molecular Genetics and Metabolism*, 112(4), 275-279.

- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Saavedra, E., Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C. (2009). The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells?. *Biofactors*, 35(2), 209-225.
- Mottet, D., Dumont, V., Deccache, Y., Demazy, C., Ninane, N., Raes, M., Michiels, C. (2003). Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathway in HepG2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31277-31285.
- Newsholme, E. A., Crabtree, B., Ardawi, M. S. M. (1985). The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Bioscience Reports*, 5(5), 393-400.
- Nguyen, L. K., Cavadas, M. A., Scholz, C. C., Fitzpatrick, S. F., Bruning, U., Cummins, E. P., ... & Cheong, A. (2013). A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) network. *Journal of Cell Science*, 126(6), 1454-1463.
- Obach, M., Navarro-Sabaté, À., Caro, J., Kong, X., Duran, J., Gómez, M., Perales, J. C., Ventura, F., Rosa, J. L., Bartrons, R. (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), 53562-53570.
- Obexer, P., Ausserlechner, M. J. (2014). X-linked inhibitor of apoptosis protein—a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy. *Frontiers in Oncology*, 4, 197.
- Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V., Kaelin, W. G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the  $\beta$ -domain of the von Hippel–Lindau protein. *Nature Cell Biology*, 2(7), 423-427.
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3), 335-348.
- Palmer, A. M., Greengrass, P. M., Cavalla, D. (2000). The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives*, 13(6), 378-384.

- Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., Denko, N. C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*, 3(3), 187-197.
- Parsons, M. J., Green, D. R. (2010). Mitochondria in cell death. *Essays in Biochemistry*, 47(1), 99.
- Pastorino, J. G., Hoek, J. B., Shulga, N. (2005). Activation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Research*, 65(22), 10545-10554.
- Pedersen, P. L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", ie, elevated glycolysis in the presence of oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(3), 211.
- Perry, D. K., Smyth, M. J., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Duriez, P., Poirier, G. G., & Hannun, Y. A. (1997). Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3: a novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18530-18533.
- Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Pereira, S. M. M., Etlinger, D., Moreira, M. A., Jubé, L. F., Queiroz, G. S., Schmitt, F., Baltazar, F. (2009a). Monocarboxylate transporters 1 and 4 are associated with CD147 in cervical carcinoma. *Disease Markers*, 26(3), 97-103.
- Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Simões, K., Jacob, C. E., Bresciani, C. J. C., Zilberstein, B., Cecconello, I., Avancini, V., Alves, F., Schmitt, F., Baltazar, F. (2009b). The prognostic value of CD147/EMMPRIN is associated with monocarboxylate transporter 1 co-expression in gastric cancer. *European Journal of Cancer*, 45(13), 2418-2424.
- Plecitá-Hlavatá, L., Ježek, J., Ježek, P. (2015). Aglycemia keeps mitochondrial oxidative phosphorylation under hypoxic conditions in HepG2 cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(6), 467-476.
- Rastogi, S., Banerjee, S., Chellappan, S., Simon, G. R. (2007). Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. *Cancer Letters*, 257(2), 244-251.

- Rattigan, Y. I., Patel, B. B., Ackerstaff, E., Sukenick, G., Koutcher, J. A., Glod, J. W., Banerjee, D. (2012). Lactate is a mediator of metabolic cooperation between stromal carcinoma associated fibroblasts and glycolytic tumor cells in the tumor microenvironment. *Experimental Cell Research*, 318(4), 326-335.
- Reiling, J. H., Sabatini, D. M. (2006). Stress and mTOR signaling. *Oncogene*, 25(48), 6373-6383.
- Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C., Salvesen, G. S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), 14250-14255.
- Reske, S. N., Grillenberger, K. G., Glatting, G., Port, M., Hildebrandt, M., Gansauge, F., Beger, H. G. (1997). Overexpression of glucose transporter 1 and increased FDG uptake in pancreatic carcinoma. *Journal of Nuclear Medicine*, 38(9), 1344-1348.
- Rodriguez, H., Drouin, R., Holmquist, G. P., Akman, S. A. (1997). A Hot Spot for Hydrogen Peroxide-Induced Damage in the Human Hypoxia-Inducible Factor 1 Binding Site of the PGK 1 Gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 338(2), 207-212.
- Rodríguez-Enríquez, S., Vital-González, P. A., Flores-Rodríguez, F. L., Marín-Hernández, A., Ruiz-Azuara, L., Moreno-Sánchez, R. (2006). Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 215(2), 208-217.
- Rofstad, E. K. (2000). Microenvironment-induced cancer metastasis. *International Journal of Radiation Biology*, 76(5), 589-605.
- Rofstad, E. K., Danielsen, T. (1999). Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *British Journal of Cancer*, 80(11), 1697-1707.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J., Capaldi, R. A. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Research*, 64(3), 985-993.
- Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G., Sloane, B. F. (1994). Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Research*, 54(24), 6517-6525.

- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development*, 19(18), 2199-2211.
- Salvador-Gallego, R., Mund, M., Cosentino, K., Schneider, J., Unsay, J., Schraermeyer, U., Engelhardt, J., Ries, J., García-Sáez, A. J. (2016). Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *The EMBO Journal*, 35(4), 389-401.
- Salvesen, G. S. (2002). Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death & Differentiation*, 9, 3-5.
- Sánchez-Aragó, M., Chamorro, M., Cuezva, J. M. (2010). Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis*, 31(4), 567-576.
- Santore, M. T., McClintock, D. S., Lee, V. Y., Budinger, G. S., Chandel, N. S. (2002). Anoxia-induced apoptosis occurs through a mitochondria-dependent pathway in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282(4), L727-L734.
- Sasabe, E., Tatemoto, Y., Li, D., Yamamoto, T., Osaki, T. (2005). Mechanism of HIF-1 $\alpha$ -dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Science*, 96(7), 394-402.
- Sato, M., Tanaka, T., Maeno, T., Sando, Y., Suga, T., Maeno, Y., Sato, H., Nagai, R., Kurabayashi, M. (2002). Inducible expression of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia in human lung adenocarcinoma A549 cells: role of Src family kinases-dependent pathway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(1), 127-134.
- Schito, L., Semenza, G. L. (2016). Hypoxia-inducible factors: master regulators of cancer progression. *Trends in Cancer*, 2(12), 758-770.
- Schlappack, O. K., Zimmermann, A., Hill, R. P. (1991). Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells. *British Journal of Cancer*, 64(4), 663-670.
- Seagroves, T. N., Ryan, H. E., Lu, H., Wouters, B. G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute K., Johnson, R. S. (2001). Transcription factor HIF-1 is a necessary

- mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 21(10), 3436-3444.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 721-732.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews cancer*, 3(10), 721-732.
- Semenza, G. L. (2007). Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discovery Today*, 12(19-20), 853-859.
- Semenza, G. L. (2007). Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Journal*, 405(1), 1-9.
- Semenza, G. L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(12), 3835-3837.
- Semenza, G. L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, 29(5), 625-634.
- Semenza, G. L. (2010). Oxygen homeostasis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(3), 336-361.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399-408.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(4), 207-214.
- Semenza, G. L. (2013). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3664-3671.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P., Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51), 32529-32537.
- Semenza, G. L., Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*, 12(12), 5447-5454.

- Shi, Y. (2002). Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure*, 10(3), 285-288.
- Shiozaki, E. N., Chai, J., Shi, Y. (2002). Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4197-4202.
- Simon, M. C. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF $\alpha$  stabilization. *Hypoxia and Exercise*, 165-170.
- Simonnet, H., Alazard, N., Pfeiffer, K., Gallou, C., Bérout, C., Demont, J., Bouvier, R., Schägger, H., Godinot, C. (2002). Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 23(5), 759-768.
- Smaili, S. S., Hsu, Y. T., Youle, R. J., Russell, J. T. (2000). Mitochondria in Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32(1), 35-46.
- Smolková, K., Plecítá-Hlavatá, L., Bellance, N., Benard, G., Rossignol, R., Ježek, P. (2011). Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(7), 950-968.
- Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E. A., Gutkind, J. S. (2000). The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Cancer Research*, 60(17), 4873-4880.
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A. G. (2007). New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Molecular Cell*, 28(5), 721-729.
- Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., De Saedeleer, C. J., Kennedy, K. M., Diepart, C., Jordan, B. F., Kelley, M. J., Gallez, B., Wahl, M. L., Feron, O., Dewhirst, M. W. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(12), 3930-3942.
- Sotgia, F., Martinez-Outschoorn, U. E., Pavlides, S., Howell, A., Pestell, R. G., Lisanti, M. P. (2011). Understanding the Warburg effect and the prognostic value of

- stromal caveolin-1 as a marker of a lethal tumor microenvironment. *Breast Cancer Research*, 13(4), 1-13.
- Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., de Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(6), 821-831.
- Steinbach, J. P., Wolburg, H., Klumpp, A., Probst, H., Weller, M. (2003). Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 10(7), 823-832.
- Stiehl, D. P., Jelkmann, W., Wenger, R. H., Hellwig-Bürgel, T. (2002). Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by insulin and interleukin-1 $\beta$  involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Letters*, 512(1-3), 157-162.
- Stroka, D. M., Burkhardt, T., Desbaillets, I., Wenger, R. H., Neil, D. A., Bauer, C., Gassmann, M., Candinas, D. (2001). HIF- 1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ- specific regulation under systemic hypoxia. *The FASEB Journal*, 15(13), 2445-2453.
- Tait, S. W., Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621-632.
- Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Harris, A. L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American Journal of Pathology*, 157(2), 411-421.
- Tang, M., Etokidem, E., Lai, K. (2016). The Leloir pathway of galactose metabolism—a novel therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*, 36(12), 6265-6271.
- Tang, T. T. L., Lasky, L. A. (2003). The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 30125-30135.
- Taylor, C. T. (2008). Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochemical Journal*, 409(1), 19-26.



- Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 231-241.
- Telang, S., Yalcin, A., Clem, A. L., Bucala, R., Lane, A. N., Eaton, J. W., Chesney, J. (2006). Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene*, 25(55), 7225-7234.
- Tian, H., McKnight, S. L., Russell, D. W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & Development*, 11(1), 72-82.
- Toker, A., Newton, A. C. (2000). Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell*, 103(2), 185-188.
- 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 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14871-14878.
- Ullah, M. S., Davies, A. J., Halestrap, A. P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 $\alpha$ -dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9030-9037.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033.
- Vander Heiden, M. G., DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell*, 168(4), 657-669.
- Vaporidi, K., Tsatsanis, C., Georgopoulos, D., Tsihchlis, P. N. (2005). Effects of hypoxia and hypercapnia on surfactant protein expression proliferation and apoptosis in A549 alveolar epithelial cells. *Life Sciences*, 78(3), 284-293.
- Vaupel, P., Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2), 225-239.
- Velde, C. V., Cizeau, J., Dubik, D., Alimonti, J., Brown, T., Israels, S., Hakem, R., Greenberg, A. H. (2000). BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular and Cellular Biology*, 20(15), 5454-5468.
- Vora, S., Halper, J. P., Knowles, D. M. (1985). Alterations in the activity and isozymic profile of human phosphofructokinase during malignant transformation in vivo

- and in vitro: transformation-and progression-linked discriminants of malignancy. *Cancer Research*, 45(7), 2993-3001.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5510-5514.
- Wang, G. L., Semenza, G. L. (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 268(29), 21513-21518.
- Wang, G. L., Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1230-1237.
- Warburg, O. (1925). The metabolism of carcinoma cells. *The Journal of Cancer Research*, 9(1), 148-163.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Warburg, O., Posener, K., Negelein, E. (1924). Über den stoffwechsel der carcinomzelle. *Naturwissenschaften*, 12(50), 1131-1137.
- Weidemann, A., Johnson, R. S. (2008). Biology of HIF-1  $\alpha$ . *Cell Death & Differentiation*, 15(4), 621-627.
- Wenger, R. H., Gassmann, M. (1997). Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biological Chemistry*, 378(7), 609-616.
- Wenger, R. H., Kvietiko, I., Rolfs, A., Gassmann, M., Marti, H. H. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is regulated at the post-mRNA level. *Kidney International*, 51(2), 560-563.
- Wenger, R. H., Stiehl, D. P., Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science's STKE*, 2005(306), re12-re12.
- Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U. E., Flomenberg, N., Birbe, R., Witkiewicz, A. K., Howell, A., Pavlides, S., Tsirigos, A., Ertel, A., Pestell, R. G., Broda, P., Minetti, C., Lisanti, M. P., Sotgia, F. (2011). Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. *Cell Cycle*, 10(23), 4047-4064.
- Wiesener, M. S., Jürgensen, J. S., Rosenberger, C., Scholze, C., Hörstrup, J. H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U. A., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Bachmann, S. Maxwell, P. H., Eckardt, K. U. (2003). Widespread,

- hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *The FASEB Journal*, 17(2), 271-273.
- Wiesener, M. S., Turley, H., Allen, W. E., Willam, C., Eckardt, K. U., Talks, K. L., Wood, S. M., Gatter, K. C., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Maxwell, P. H. (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Blood*, *The Journal of the American Society of Hematology*, 92(7), 2260-2268.
- Wigfield, S. M., Winter, S. C., Giatromanolaki, A., Taylor, J., Koukourakis, M. L., Harris, A. L. (2008). PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer. *British Journal of Cancer*, 98(12), 1975-1984.
- Wion, D., Christen, T., Barbier, E. L., Coles, J. A. (2009). PO<sub>2</sub> matters in stem cell culture. *Cell Stem Cell*, 5(3), 242-243.
- Wu, M., Neilson, A., Swift, A. L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., Chomicz, S., Ferrick, D. A. (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C125-C136.
- Yang, M. H., Wu, M. Z., Chiou, S. H., Chen, P. M., Chang, S. Y., Liu, C. J., Teng, S. C., Wu, K. J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis. *Nature Cell Biology*, 10(3), 295-305.
- Yi, W., Clark, P. M., Mason, D. E., Keenan, M. C., Hill, C., Goddard, W. A., Peters, E. C., Driggers, E. M., Hsieh-Wilson, L. C. (2012). Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science*, 337(6097), 975-980.
- Youle, R. J., Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47-59.
- Yu, A. Y., Frid, M. G., Shimoda, L. A., Wiener, C. M., Stenmark, K., Semenza, G. L. (1998). Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 275(4), L818-L826.

- Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Zhang, L. (2003). PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1931-1936.
- Yu, M., Shi, Y., Wei, X., Yang, Y., Zhou, Y., Hao, X., Zhang, N., Niu, R. (2007). Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells. *Toxicology Letters*, 170(1), 83-93.
- Zepeda, A. B., Pessoa Jr, A., Castillo, R. L., Figueroa, C. A., Pulgar, V. M., Farías, J. G. (2013). Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochemistry and Function*, 31(6), 451-459.
- Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W. B., Semenza, G. L., Simons, J. W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Research*, 59(22), 5830-5835.
- Zhou, J., Schmid, T., Schnitzer, S., Brüne, B. (2006). Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Letters*, 237(1), 10-21.