

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE DİZİLERİNDE,
HİPOKSİ VE RADYASYON STRESİNE KARŞI HÜCRENİN
DİRENÇ GELİŞTİRMESİNDE HGF SİNYAL İLETİMİ
SİSTEMİNİN ROLÜNÜN BELİRLENMESİ**

ASLI TOYLU

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2007

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE DİZİLERİNDE,
HİPOKSİ VE RADYASYON STRESİNE KARŞI HÜCRENİN DİRENÇ
GELİŞTİRMESİNDE HGF SİNYAL İLETİMİ SİSTEMİNİN
ROLÜNÜN BELİRLENMESİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

ASLI TOYLU

DANIŞMAN: Prof. Dr. NEŞE ATABEY

DEÜ BAP Proje No: 2004.KB.SAG.093

Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 99.3456.23.sayı ile desteklenmiştir.

“HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE DİZİLERİNDE, HİPOKSİ VE RADYASYON STRESİNE KARŞI HÜCRENİN DİRENÇ GELİŞTİRMESİNDE HGF SİNYAL İLETİMİ SİSTEMİNİN ROLÜNÜN BELİRLENMESİ” isimli bu tez 14.12.2007 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı
(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Neşe Atabey
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Meral Sakızlı
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof Dr. Sedat Karademir
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Nejat Topçuoğlu
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Dalı

Jüri Üyesi

Yard. Doç. Dr. Esra Erdal
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	iii
Şekil Listesi	iv
Kısaltmalar	vi
Teşekkür	vii
Türkçe Özet	viii
İngilizce Özet.....	x
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 HCC Gelişiminde ve İlerleyişinde Hipoksi Varlığı ve Vaskülarizasyon.....	5
2.2 Hipoksi HIF1 ile Çalışır	7
2.3 Hipoksi Tedavi Direnci Yaratır.....	10
2.4 Hipoksik Koşullarda ve Tümörigenez Sürecinde HGF/c-Met Yolağı Aktive Olur ve Tedavi Direnci Kazandırır	11
2.5 HGF/c-Met Sinyal Yolağı Direncin Yenilmesi İçin Hedefdir.....	13
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
3.1 Hücre Kültürü	15
3.2 Koloni Sağ Kalımı Deneyleri.....	16
3.3 MTT Hücre Çoğalması Deneyleri.....	16
3.4. LDH Hücre Toksisitesi Deneyleri.....	17
3.5 Motilite/ İnvazyon Deneyleri	17
3.6 RNA Eldesi	18
3.7 cDNA Eldesi	19
3.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	20
3.9 Protein Eldesi	22
3.10 Western Blotlama.....	23

4.BULGULAR.....	24
4.1 Koloni Sağ Kalımı Deney Sonuçları.....	24
4.2 Canlılık Deney Sonuçları.....	26
4.3 Motilite/ İnvazyon Deney Sonuçları	31
4.4 PCR Deney Sonuçları.....	34
4.5 Western Blot Sonuçları.....	42
5.TARTIŞMA.....	48
6.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	58
7.KAYNAKLAR	60

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Hif1 α transkripsiyon faktör proteini ile ekspresyonu düzenlenen ge	9
Tablo 2 48 saat hipoksi uygulaması sonrası MTT canlılık deneyi sonuçları	27
Tablo 3 48 saat hipoksi uygulaması sonrası LDH toksisite deneyi sonuçları	27
Tablo 4 6Gy γ Radyasyon uygulaması sonrası MTT canlılık deney sonuçları	28
Tablo 5 6Gy γ Radyasyon uygulaması sonrası LDH toksisite deneyi sonuçları	28
Tablo 6 HGF-Hipoksi- γ -Radyasyon uyarımı sonrasında 48. saatteki MTT canlılık deney sonuçları	29
Tablo 7 HGF-Hipoksi- γ -Radyasyon uyarımı sonrasında 48. saatteki LDH toksisite deney sonuçları	29

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 HCC gelişimi sürecinde hipoksiye bağlı olarak ortaya çıkan patolojik değişimler	5
Şekil 2: Kronik karaciğer hasarı etkisiyle hipoksinin oluşumu	6
Şekil 3 HIF-1a transkripsiyon faktörünün oksijen ile düzenlenmesi	8
Şekil 4 c-Met reseptör proteini bölgeleri ve fosforilasyon yerleri	12
Şekil 5 Hep 3B hücre dizisinde koloni sağ kalımı deney sonuçları	24
Şekil 6 Huh7 hücre dizisinde koloni sağ kalımı deney sonuçları.....	25
Şekil 7 HepG2 hücre dizisinde koloni sağ kalımı deney sonuçları	25
Şekil 8 Hep 3B hücre dizisinde 24 saat uyarım sonrası koloni sağ kalımı deney sonuçları	26
Şekil 9 HGF-Hipoksi- γ -Radyasyon uyarımı sonrasında uzun süreli kültür MTT canlılık deney sonuçları	30
Şekil 10 HGF-Hipoksi uygulaması sonrasında motilite deney sonuçları.....	31
Şekil 11 Radyasyon-Hipoksi-HGF uygulaması sonrasında motilite deney sonuçları.....	32
Şekil 12 HGF ve hipoksi uygulaması sonrasında invazyon deney sonuçları	32
Şekil 13 Radyasyon-Hipoksi-HGF uygulaması sonrasında invazyon deney sonuçları	33
Şekil 14 Hepatosellüler karsinoma hücre dizilerinde mRNA düzeyinde gen ekspresyonu değişimleri	35
Şekil 15 Hep3B hücrelerinde CoCl ile VEGF ve EPO gen ekspresyonu değişimleri	36
Şekil 16 HepG2 hücrelerinde CoCl ile VEGF ve EPO gen ekspresyonu değişimleri	36
Şekil 17 Hep3B hücrelerinde CoCl ile hedef genlerde ekspresyon değişimi	37
Şekil 18 Hep3B ve HepG2 hücrelerinde CoCl ile cMet geni ekspresyon değişimi	38
Şekil 19 HepG2 hücrelerinde HGF / Hipoksi ile EPO ve cMet geni ekspresyonu değişimi	38
Şekil 20 Hep3B ve HepG2 hücrelerinde 24 saat hipoksi ve/veya HGF uygulaması ile gen ekspresyonu değişimleri.....	39
Şekil 21: 6Gy γ -radyasyon uygulaması sonrasında hedef genlerdeki	

ekspresyon değişimleri.....	40
Şekil 22: 6Gy γ -radyasyon, HGF ve hipoksi uygulaması sonrasında hedef genlerdeki ekspresyon değişimleri.....	41
Şekil 23 Hep3B hücrelerinde 24 saat hipoksi ile Hif1 α proteini miktar değişimi	42
Şekil 24 HCC hücrelerinde normoksi ortamında Hif1 α proteini ekspresyonu.....	42
Şekil 25 Hep3B hücrelerinde 6 saat hipoksi ve HGF uyarımı ile Hif1 α proteinleri miktar değişimleri	43
Şekil 26 Hep3B hücrelerinde 6 saat hipoksi ve/veya HGF uygulaması ile cMet proteini fosforilasyonu değişimi.....	43
Şekil 27 Huh7 hücrelerinde 24 saat hipoksi ve HGF uygulaması ile cMet ve HIF proteini miktar değişimi	44
Şekil 28 Huh7 hücrelerinde 6 saat hipoksi ve HGF uygulaması ile fosfo cMet proteini ve total cMet proteinleri miktar değişimi	45
Şekil 29 Hep3B hücrelerinde YC-1 varlığında, 6 saat hipoksi ve HGF uygulaması ile Hif1 α proteini miktar değişimi.....	46
Şekil 30 Huh7 hücrelerinde YC-1 varlığında hipoksi ve HGF uygulaması ile Hif1 α ve c-Met proteini miktar değişimi.....	46
Şekil 31 Hep3B hücrelerinde 6Gy γ -radyasyon uygulaması sonrası fosfo c-Met , total c-Met ve HIF proteinleri değişimi.	47

KISALTMALAR

HCC: Hepatosellüler karsinoma

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü

PI3K: Fosfatidil İnositol 3-OH kinaz

AKT/ PKB: Protein Kinaz B

CLNX: Kalneksin

CoCl: Kobalt Klorit

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

EPO: Eritropoetin

HIF: Hipoksi İndüklenebilir Faktör

SET/ Taf1beta/ I2PP2A: Template Activating Factor 1 beta, Phosphatase 2A inhibitor 2

SIAH2: Seven in Absentia Homolog 2

MMP: Matriks Metallo Proteinaz

MT1-MMP: Membran Tip I Matriks Metallo Proteinaz

Rlip76/ RalBP1: RalA Binding Protein 1

Gy: Grey

MTT: Tetrazolyum Tuzu

LDH: Laktat Dehidrogenaz

YC-1: 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole

TEŞEKKÜR

Projenin mali kaynağını sağlayan Üniuersitemiz Rektörlüğü Bilimsel Araştırma projeleri Başkanlığı'na; Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Başkanı Sayın Prof. Dr. Meral Sakızlı'ya, Yard. Doç. Dr. Esra Erdal'a, PhD. Gülay Bulut'a, PhD. Verda Erkızan'a, MD PhD. Ozan Çetin'e, MSc Taylan Demirci'ye; Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'ndan Sayın Yard. Doç. Dr. Rachel Ann Cooper'a, Uzm. Dr. Zümre Arıcan'a, Uzm. Zafer Karakurt'a ve Kobalt 60 Teatron Radyoterapi Ünitesi çalışanlarına, Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Mehmet Öztürk'e teőekkürlerimizle.

ÖZET

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE DİZİLERİNDE, HİPOKSİ VE RADYASYON STRESİNE KARŞI HÜCRENİN DİRENÇ GELİŞTİRMESİNDE HGF SİNYAL İLETİMİ SİSTEMİNİN ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Aslı Toylu

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, İzmir

Hepatosellüler karsinoma (HCC) vasküler bir tümördür ve hipoksi HCC gelişiminde ve ilerleyişinde önemli bir anjiyogenik faktördür. Hipoksi tarafından uyarılan birçok faktör tümör hücrelerini ve komşu hücreleri etkileyerek, tümörün daha agresif olmasına ve tedavi direncine neden olmaktadır. Bu faktörlerden birisi olan hepatosit büyüme faktörünün (HGF) karaciğer hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. HGF ve reseptörü olan c-Met ekspresyonunun hipoksik koşullarda arttığı belirlenmiştir. Ancak HCC gelişimi, ilerleyişi ve tedavi yanıtında HGF/c-Met yolağının rolü tam olarak bilinmemektedir.

Çalışmamızda HGF/c-Met yolağı aktivasyonunun, HCC hücrelerinin hipoksi yanıtında ve radyoterapi direncinde rolü olabileceği düşüncesi ile HGF/c-Met yolağı aktivasyonu ile hipoksik koşullarda hücre sağ kalımını, hücre motilite ve invazyonunu, HIF ve HIF aracılı gen ekspresyonlarını ve HCC hücrelerinin radyasyon uygulamasına yanıtlarının nasıl etkilendiğini araştırdık.

Sonuçlarımız HCC hücre dizilerinde HGF/c-Met sinyal ileti yolağının hipoksi ve radyasyon ile uyarılabildiğini göstermektedir. Hipoksi ve / veya HGF uygulaması hücre canlılığını değiştirmemekte ancak motilite ve invazyonda belirgin artışa neden olmaktadır. HCC hücrelerinde radyasyon stresine verilen yanıt erken dönemde motilite artışı şeklinde olmakta geç dönemde ise hücre canlılığı etkilenmektedir. Radyasyon uygulaması öncesinde hücrelerin hipoksi ve / veya HGF ile uyarılmaları halinde canlılıklarında, motilite ve invazyonlarında belirgin artış olduğu görülmüştür.

Bu veriler HCC hücrelerinin malign fenotip kazanmalarında özellikle invazyon ve metastaz sürecinde HGF/c-Met yolağı aktivasyonunun önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu etkiyi gerçekleştirmesinde hipoksi tarafından uyarılan HIF aktivasyonu ve VEGF, EPO, integrin gen ekspresyonlarındaki artış önemli olabilir. Elde ettiğimiz veriler HCC hücrelerindeki radyasyon direncinin gelişmesinde HGF ve hipoksi tarafından uyarılan genlere ek olarak MT1-MMP ve Rlip76'nın da rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hepatosellüler karsinoma (HCC), HGF, HIF, radyasyon, motilite.

ABSTRACT

THE ROLE OF HGF SIGNALLING PATHWAY IN THE REGULATION OF CELLULAR RESPONSES INDUCED BY HYPOXIA AND RADIATION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL LINES

Asli Toylu

Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics

Hypoxic microenvironment in liver tissue during hepatocellular carcinogenesis (HCC) activates hepatocyte growth factor (HGF) signaling pathway which is important for the hepatocyte growth and differentiation. In addition to being involved in carcinogenesis, HGF also stimulates resistance to radiotherapy.

The induction of HGF/c-Met signalling pathway might be one of the mechanisms in order to develop resistance against hypoxia and radiation in HCC cells. We therefore analysed the putative protective effect of HGF/c-Met signalling pathway from the hypoxic stress and radiation. Hypoxia jars and gamma irradiation were used for hypoxia and irradiation treatment, respectively. We analyzed the survival of HCC cells lines by MTT/LDH viability assays. Alterations of the cell motility were measured by Boyden Chambers. The changes in expression level of c-Met, HIF1 and their targets were evaluated by RT-PCR and Western Blotting.

Our results showed that hypoxia or radiation treatment did not alter the viability of HCC cells in short course, but it increased the cellular motility. Intriguingly, HGF addition to system further increased these cellular responses. Before giving radiation to HCC cells, treatment of hypoxia and /or HGF promoted the cellular survival for long term course. HIF activation and its target genes VEGF, EPO and integrins, that are mediating the survival responses, and MT1-MMP and Rlip76 gene expression, which are responsible for the cellular resistancy, were up regulated.

These results are showing that the activation of HGF/c-Met signalling pathway up regulates the cellular malignancy regarding with the invasion and metastasis processes. Alterations of the cellular behaviours and gene expression levels, resulted from the

stimulation by hypoxia, HGF and radiation, are responsible from the HCC progression and response to therapy. Understanding of these signalling pathways could be helpful in addressing new target molecules and establishing new treatment modalities for the HCC patients.

Key Words: Hepatocellular carcinoma (HCC), HGF, HIF, radiation, motility.

1.GİRİŞ VE AMAC

Dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin yarısından sorumlu olan hepatosellüler karsinoma (HCC) tanısı alan hastalarda uygulanabilecek tedavi seçenekleri oldukça kısıtlıdır. Çoğunlukla kronik karaciğer hasarı zemininde gelişen HCC tanısı alan hastalarda sağ kalım karaciğer fonksiyonlarının düzeyiyle ilgilidir. Yalnızca %15 oranında cerrahi rezeksiyon ve transplantasyon yapılabilen hastaların geride kalanı kemo ve/veya radyoterapi uygulamalarıyla tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Kemoterapi uygulamaları karaciğer fonksiyon bozukluğu nedeniyle radyoterapi uygulamaları ise komşu hayati organlar, karaciğer dokusunun duyarlılığı gibi nedenlerle pratikte oldukça sınırlıdır. Ancak geliştirilmekte olan yeni planlama yöntemleri ve mikroküre uygulaması gibi teknikler ile hastanın yarar görebildiği radyoterapi protokolleri oluşturulmaya başlanmıştır. HCC daki tedavi arayışları ve bu yeni tekniklerle gerçekleştirilen radyoterapi uygulamaları ile elde edilen başarılı sonuçlar, HCC hücrelerinin radyasyona karşı verdikleri biyolojik yanıtların neler olduğu sorusunu gündeme getirmiştir.

Hepatositten karsinoma hücrelerine dönüşümden sorumlu moleküler mekanizmaların malignite derecesi, tedavi yanıtı ve tedavi sonrası hastalık tekrarlama gibi süreçleri de etkilediği düşünülmektedir. HCC gelişiminde ortaya çıktığı bilinen hipoksik mikroçevrenin hepatositlerde yol açtığı değişimlerin damar desteği bol olan invazif ve metastatik kanser dokuları gelişimine katkıda bulunduğu öne sürülmektedir. Hepatositlerin farklılaşmalarında, gelişmelerinde ve hepatosit fonksiyonlarını sürdürmelerinde rolü olan Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)'nin de karsinogenez sürecinden etkilendiği hatta sürecin yürütücülerinden biri olduğu düşünülmektedir. HGF sinyal ileti sisteminin aktive olmasıyla hepatositler sağ kalım, hücre hareketliliği, invazyon ve anjiyogenez açısından avantaj kazanmaktadırlar. Hepatositler hipoksik stres altında HGF uyarımına benzer şekilde sağ kalım ve anjiyogenez mekanizmalarını aktive etmektedirler. Hipoksik mikroçevrenin algılanmasıyla hücre içinde meydana gelen moleküler değişimlerin HGF sinyal iletimini gerçekleştiren proteinleri ve sinyal iletim mekanizmalarını da etkilediği bilinmektedir. HGF sinyal ileti sisteminin hipoksik koşullardaki hücrelerde normalden farklı olarak çalıştığı kabul edilebilir.

Gerek hipoksi gerekse HGF sinyal sistemi aktivasyonu hepatosellüler karsinoma hücre fenotipini değiştirmektedir. Bu değişim malign karakter kazanılmasına ve

uygulanacak tedavilere direnç geliştirilmesine neden olma potansiyeli taşımaktadır. Dolayısıyla bu iki uyarımın hücrelerde yol açtığı değişimlerin ve kazandırdıkları olası direnç mekanizmalarının belirlenmesi ile ileride tedavi amacıyla hedef olarak kullanılacak moleküller belirlenebilir.

Çalışmamız kapsamında HCC hücre dizilerinin hipoksi, HGF ve radyasyon uygulamasına nasıl yanıt verdiklerini ve bu yanıtların moleküler düzeyde hangi hedef genler tarafından yönlendirildiğini tanımlamayı hedefledik.

Bu hedef moleküllerin pre-malign lezyonlardaki ve tedavi öncesi veya sonrasındaki durumlarının belirlenmesi ile HCC gelişimi ve ilerleyişinde önemli, marker olarak kullanılabilme potansiyelleri olan moleküller tanımlanabilir.

2.GENEL BİLGİLER

Dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin yarısından sorumlu olan hepatosellüler karsinoma (HCC), yılda yarım milyondan fazla insanın ölümüne neden olmaktadır¹. HCC tanısı alan hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %5 civarındadır^{2,3}. HCC gelişimine neden olan kronik karaciğer hasarı açısından önemli risk faktörleri Hepatit B Virusu (HBV), Hepatit C Virusu (HCV), aflatoksin ve alkol kullanımıdır⁴.

HCC kesin tedavisi olmayan bir hastalıktır. Çoğunlukla sirotik zeminde lokal ilerlemiş olarak veya birden fazla odak oluşturmuş şekilde ortaya çıkmaktadır⁵. Hastanın hayatta kalması karaciğer fonksiyonlarıyla yakından ilişkilidir. Kronik karaciğer hasarı veya siroz varlığı karaciğer fonksiyonlarını esas etkileyen faktörlerdir, tümör dokusuyla ilgili özellik ise tümörün büyüklüğüdür. Tümör dokusunun cerrahi rezeksiyonu hastaların 2/3'ünde 5 yıllık yaşam şansını sağlamaktadır. Ancak hastaların sadece %15'inden azında rezeksiyon veya transplantasyon yapılabilmektedir, kalan hastalara değişik tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır.

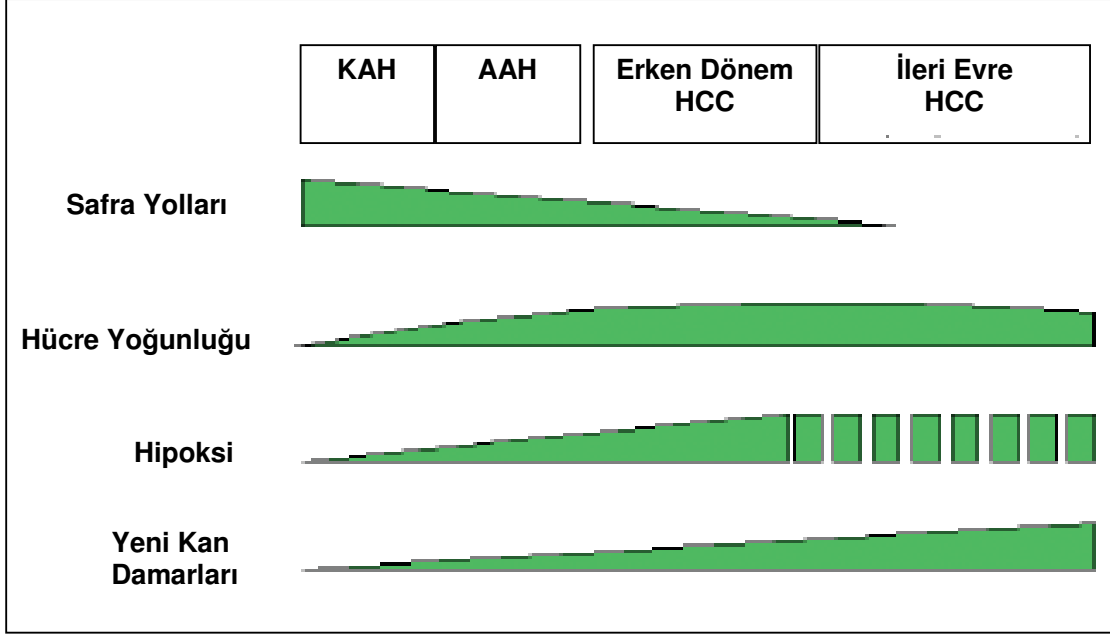
Karaciğer fonksiyonlarının hali hazırda bozuk olması sistemik kemoterapi uygulamasını sınırlamaktadır. Radyofrekans ablasyon ve transarteriyel kemoembolizasyonla büyük damar tutulumu olmayan tümörlerde bölgesel tümöral ilerleme durdurulabilmektedir⁶. Karaciğer dokusunun radyasyon hasarına toleransının düşük olması nedeniyle tüm karaciğere, tümör ilerlemesini durduracak dozda radyasyon uygulanamamaktadır. Radyoterapi uygulaması sonrası karaciğer yetmezliği gelişimi riski yanında viral hepatitin aktive olması veya mide ve böbrekler gibi komşu dokularda hasar oluşumu riski artmaktadır^{7,8}.

HCC risk faktörleriyle karşılaşan hepatositlerde uzun süreli hasar meydana gelmektedir. HBV, HCV virüsleri hepatositleri enfekte ederek yol açtıkları direk hasar yanında viral enfeksiyona bağlı immün yanıt oluşması nedeniyle karaciğer dokusunda enflamasyona da neden olmaktadır⁹. Hepatosit nekrozu, enflamasyon ve sağlam hepatositlerdeki rejeneratif çoğalma uzun süreler boyunca devam etmektedir¹⁰. Kronik hasar ve tamir süreci sitokinler, büyüme faktörleri ve reaktif oksijen radikalleri (ROR) açısından zengin bir çevre içinde hepatositlerde çoğalmanın artmasına neden olur. Alkol kullanımı dolaşımdaki endotoksinleri artırmakta, enflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olmaktadır¹¹. Alkolün hepatositlerde neden olduğu lipid peroksidasyonu sonrasında

meydana gelen hepatik hasar fibrozise ve siroz gelişimine yol açmaktadır^{12,13}. Aflatoksin hepatositlerde mutajenik etkiler göstermekte, özellikle p53 tümör baskılayıcı geninde neden olduğu mutasyonlar bu protein fonksiyonlarını bozmakta veya Ras onkogeninde proteini aktive edici mutasyonlara neden olmaktadır¹⁴.

Etiyolojik faktörlerin neden olduğu enflamatuvar yanıt ve oksidatif stres karaciğer stromasını ve mikroçevresini değiştirmekte, siroz gelişimine neden olmaktadır. Hepatositlerde değişen mikroçevre içinde rejenerasyon amacıyla çoğalma hızı artmaktadır. Gerek etiyolojik faktörler gerekse enflamasyonun yol açtığı çoğalma, zamanla genetik ve genomik düzenlenme değişikliklerine yol açacaktır¹⁵. Zamanla sirotik karaciğer dokusu içinde fibrotik stromayla çevrilmiş, çoğalan hepatositlerden oluşan nodüller oluşmaya başlar. Bu nodüller hiperplastik nodüllere daha sonra da büyüme hızı kontrolü kaybı ve genomik instabilite gelişimiyle displastik nodüllere sonuçta karsinomaya dönüşeceklerdir¹⁶. Düşük seviyede displastik nodül içi hepatositler yüksek çoğalma hızına sahiptir ancak çoğu hepatosit hücre özelliğini korumaktadırlar ve fonksiyonlarını yerine getirmektedirler. Zamanla hücrelerin farklılaşma seviyesi azalır ve hepatosit fonksiyonları kaybolmaya başlar (Şekil 1).

İleri seviye displazi aşamasında nodüllerin büyüklüğü artmaya başlar¹⁷. Çoğalma hızı yüksek olan ancak hepatosellüler özellikleri azalmış olan hücreler komşu karaciğer dokusu içine ilerleme eğilimindedir. Hücrelerin karaciğer dokusu içine ve damar yapıları aracılığıyla uzak dokulara invazyon yeteneği kazanmalarıyla birlikte düşük seviyede farklılaşmış, hepatik fonksiyonlarını gerçekleştiremeyen HCC hücreleri ortaya çıkar. Metastatik fenotipin kazanılmasında hepatositlerin hücre-hücre bağlantılarını kaybetme, matriks içinde hareket edebilme ve matriksi parçalama, dolaşıma girme, uzak dokulara metastaz ve sonunda metastaz tekrarlamaları gibi ileri evredeki malign davranışların ortaya çıkması hastanın prognozunu kötüleştirdiği gibi tedavi yanıtınlığını da beraberinde getirmektedir^{18,19}.

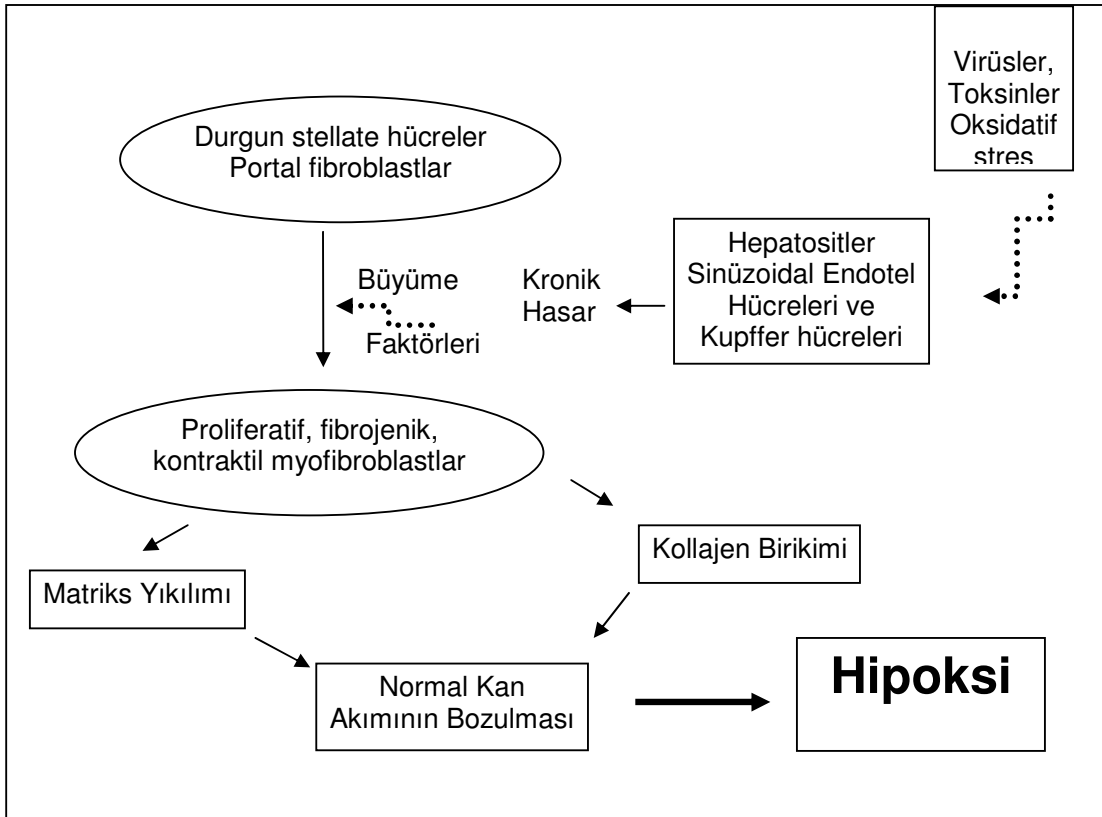


Şekil 1: HCC gelişimi sürecinde hipoksiye bağlı olarak ortaya çıkan patolojik değişimler²⁰.
(KAH: Klasik adenomatöz hiperplazi, AAH: Atipik adenomatöz hiperplazi)

2.1 HCC gelişiminde ve ilerleyişinde hipoksi varlığı ve vaskülarizasyon

HCC vasküler bir tümördür^{5,21,22}. Hepatokarsinogenez sürecinde kronik hepatik hasarın başladığı aşamadan itibaren damarlanmayı artıran büyüme faktörlerinin ekspresyonu artmıştır. İnterlökin-8 (IL-8) gibi sitokinler kronik enflamasyonda rol almalarının yanında anjiyogenezi de tetiklemektedirler. Karaciğer dokusunda meydana gelen enflamasyon hücrelerin hayatta kalmak için koruyucu büyüme faktörleri salgılamalarına neden olmaktadır²³. Çevreye salınan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi faktörler endotel hücrelerinin yeni damar oluşturmaya yönlendirir. Oksidatif hasar sonucu oluşan ROR'unin de anjiyogeneze neden olan VEGF in ekspresyonunda artışa neden olduğu bilinmektedir²⁴. Kronik enflamasyon görülen karaciğer dokularında normalden daha fazla VEGF var olduğu belirlenmiştir²⁵. Ayrıca HBV virüsüyle enfekte hepatositlerde eksprese olan HBx proteini de VEGF salınımını artırmaktadır²⁶.

Süreç ilerledikçe displastik nodüller içinde ilk mikrovasküler ağ yapıları ortaya çıkar. İleri seviye displastik nodüllerde, büyüklüğün artışı nedeniyle nodül içindeki hücreler yeterli oksijen ve besin desteği alamazlar^{27,28}. Hipoksiye maruz kalan bu hücreler kendilerine oksijen desteğini sağlamak için damarlanmayı artırıcı büyüme faktörleri üretmeye başlarlar. VEGF, FGF, HGF ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi anjiyogeneze yol açan büyüme faktörleri ekspresyonu hipoksi ile artar²⁰. Bu artış anjiyogenez yanında hücre çoğalmasının daha da artmasına, hücrelerin içinde buldukları enflamasyon stresine karşı direnç geliştirmelerine ve daha malign karakter kazanmalarına da neden olacaktır. Displastik hücreler sadece değişen mikro çevreleri nedeniyle değil aynı zamanda artmış olan genomik değişimlerin bir sonucu olarak büyüme faktörü yollarını normalden daha fazla aktive etmektedirler. Sıklıkla genlerin ekspresyon düzeylerinde epigenetik değişimler gözlenir; metilasyona bağlı değişimler, mikrosatellit instabilitesi ve telomeraz enzim ekspresyonu değişimleri gibi¹. Düşük seviyede olmakla birlikte genlerde ve kromozomlarda yapısal değişimler de gözlenmeye başlar.



Şekil2: Kronik karaciğer hasarı etkisiyle hipoksinin oluşumu²⁰.

HCC dokularında mikrovasküler yoğunluk artmıştır. Damarlanmanın az olduğu bölgelerde iskemi nedeniyle tümör hücreleri nekrozla ölürlür. Nekrotik alanlara komşu tümör dokularında da hipoksi nedeniyle VEGF miktarının yüksek olduğu saptanmıştır. HCC de damarlanmanın varlığı maligniteyle de yakından ilişkilidir. Damar desteği iyi olan tümör dokularında hücrelerin çoğalma hızları daha yüksek, invazyon ve metastaz yetenekleri daha fazladır. Tümör dokusundaki VEGF miktarının hastalığın prognozuyla ve tedavi sonrası tekrar etme olasılığıyla da ilişkili olduğunu öne süren çalışmalar bulunmaktadır.

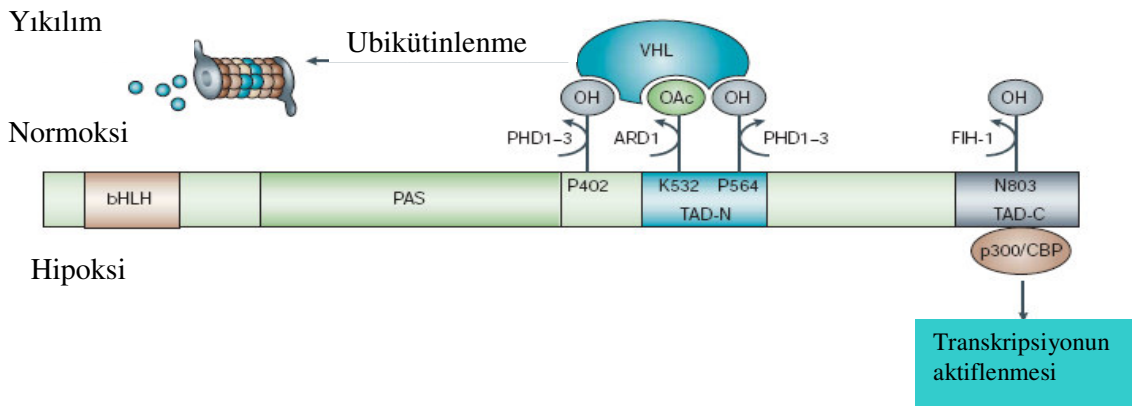
2.2 Hipoksi HİF1 ile çalışır

Yeni damar oluşumuna neden olan hipoksik mikroçevrenin hücreler tarafından nasıl algılandığı ve hipoksiye nasıl yanıt verildiği gerek iskemik olaylara yanıt açısından gerekse tümörigenez süreçleri açısından büyük önem taşımaktadır. Hücre içi oksijen miktarı yaşamsal fonksiyonlar açısından küçük değişimlerle tolere edilebilmektedir²⁹. Oksidatif hasar etkin mekanizmalarla engellenmekte ve hızla giderilmeye çalışılmaktadır. Oksijen miktarı azalması halinde ise hem oksijenin dağıtımını hem de oksijen azalmasına adaptasyon protein aktivite değişimleri ve gen ekspresyon değişimleriyle kontrol edilmektedir^{30,31}. Hipoksi-indüklenebilir faktör 1 (HİF-1) oksijen homeostazının esas düzenleyicisidir³². Oksijen miktarındaki azalma bir transkripsiyon faktörü olan HİF1 proteininin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlayarak gen ekspresyon değişiklikleri neden olmaktadır.

HİF1 bir heterodimer proteindir. Hif1 β alt ünitesi sürekli olarak hücre içinde bulunan bir proteindir. Hif1 α alt ünitesi ise ekspresyonu ve transkripsiyonel aktivite düzeyi hücre içi oksijen miktarına bağlı olan bir proteindir. Normoksik koşullarda Hif1 α proteini hızla ubiquitinlenir ve proteozomda yıkılır³³. Bir E3 ubiquitin protein ligaz olan von Hippel Lindau proteini (pVHL) Hif1 α üzerindeki oksijen bağımlı yıkılma bölgesine (oxygen dependent degradation domain(ODD)) bağlanarak proteini ubiquitinler³⁴. pVHL in ODD bölgesine bağlanabilmesi için, bu bölgede yer alan 402 ve 564 prolin aminoasitlerinin hidroksillenmiş olması gerekmektedir³⁵. Prolinlerin hidroksillenmesi demir ve oksijen bağımlı olarak prolin hidroksilaz enzimlerince gerçekleşir. Hipoksi varlığında hidroksilaz

enzimleri oksijen azlığına bağlı olarak fonksiyon göremezler ve Hif1 α proteini yıkımı engellenerek hücre içinde birikmeye başlar³⁶. Oksijen varlığında Hif1 α 'nın transkripsiyonel aktivasyonu da engellenmektedir. pVHL proteininin ve bir ko-represör olan HIF baskılayıcı faktör (FIH) proteininin üzerine, histon deasetilaz (HDAC) kompleks proteininin bağlanmasıyla HIF aktivasyonu baskılanır. Hif1 α proteini 803 nolu asparajin amino asitinin de hidrosillenmesi ile transkripsiyonel ko-aktivatör protein p300'ün bu bölgeye bağlanması engellenmektedir. Hipoksik koşullarda gerek Hif1 α 'nın yıkılmasına neden olan gerekse transkripsiyonel baskılanmasına neden olan enzimler çalışamazlar ve Hif1 α hücre sitoplazmasında birikir, çekirdek içine göç eder ve burada Hif1 β alt ünitesiyle birleşir. Bu sayede oksijen varlığında Hif1 α proteini yıkılırken, oksijen miktarı azalınca hücre içi HIF1 α protein miktarı artar ve transkripsiyonel olarak da aktif duruma geçer³⁷.

Hipoksik koşulda aktive olan HIF proteini çekirdekte hedef gen promotör bölgeleri üzerinde yer alan hipoksi yanıt elementi (HRE) adlı –CGTG– baz dizisine bağlanır. HIF hedef genleri hücre canlılığı/büyümesi, metabolizma değişimleri ve anjiyogeneze yol açarlar³⁸ (Tablo 1). HIF proteininin bu özellikleri göz önünde bulundurulduğunda tümör hücrelerinde HIF varlığı ile malign karakter arasındaki ilişki anlamlı hale gelmektedir. Malign tümörlerin yarısında HIF proteininin arttığı belirlenmiştir³⁹. Tümör hücrelerinin malignitesi arttıkça HIF miktarının da arttığı ve HIF miktarının tümör evresi ve prognozuyla da korelasyon gösterdiği öne sürülmektedir⁴⁰.



Şekil 3: HIF-1a transkripsiyon faktörünün oksijen ile düzenlenmesi⁴¹.

Tablo 1: Hif1 α transkripsiyon faktör proteini ile ekspresyonu düzenlenen genler⁴¹.

Hücre Çoğalması	Hücre Sağkalımı	Apoptosis	Motilite	Anjiyogenez	Vasküler Tonus
Cyclin G2 IGF2 IGF-BP1,2 WAF1 TGF- α	EPO IGF2 NOS2 VEGF	NIP3 NIX	AMF/GPI c-Met LRP1 TGF- α	EG-VEGF ENG LEP LRP1 TGF- β 3 VEGF	ADM ET1 Haem oxygenase-1 NOS2
pH Düzenlemesi	İlaç Direnci	Nükleotid Metabolizması	Demir Metabolizması	Glukoz Metabolizması	
Carbonic Anhydrase 9	MDR1	Adenylate Kinase 3 Ecto-5'-nucleotidase	Ceruloplasmin Transferrin Transferrin Receptor	HK1,2 AMF/GPI ENO1 GLUT1 GAPDH LDHA PGK1 PKM	

(Kısaltmalar: AMF, autocrine motility factor; ADM, adrenomedullin; EG-VEGF, endocrinegland-derived VEGF; ENG, endoglin; ET1, endothelin-1; ENO1, enolase 1; EPO, erythropoietin; GLUT1, glucose transporter 1; GAPDH, glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase; HK1, hexokinase 1; HK2, hexokinase 2; IGF2, insulin-like growth-factor 2; IGF-BP1, IGF-factor-binding-protein 1; IGF-BP2, IGF-factor-binding-protein 2; LDHA, lactate dehydrogenase A; LEP, leptin; LRP1, LDL-receptor-related protein 1; MDR1, multidrug resistance 1; NOS2, nitric oxide synthase 2; PGK 1, phosphoglycerate kinase 1; PKM, pyruvate kinase M; TGF- α , transforming growth factor- α ; TGF- β 3, transforming growth factor- β 3; VEGF, vascular endothelial growth factor.)

2.3 Hipoksi tedavi direnci yaratır

Tümör dokularında HIF ekspresyonunun artmış olması hücelere stres koşullarında yaşama avantajı sağlamaktadır. Oksijeni ve ihtiyaç duyduğu besin miktarının karşılanmadığı koşullara HIF aracılı proteomik değişimlerle uyum sağlayan hücreler bu süreç içinde başka stres koşullarında da kullanabilecekleri yaşamsal sistemleri harekete geçirmektedirler.

Hepatosellüler karsinogenez sürecinde de HIF protein miktarını artıran faktörlerin varlığı ortaya koyulmuştur^{42,43,44,45}. Erken dönemde, alkol kullanımına bağlı karaciğer hasarı gelişimi sırasında hipoksik stres nedeniyle hücrelerde HIF miktarının arttığı görülür⁴⁶. Benzer şekilde HBV enfekte hepatositlerde HIF aktivasyonu ve buna bağlı VEGF ekspresyon artışı gözlenmektedir⁴⁷. Kronik karaciğer hasarı görülen hastalarda enflamasyonla ilişkili sitokinlerin yanında hasarlı hücrelerin oluşturduğu oksijen radikallerinin de hücrelerdeki HIF miktarını artırdığı belirlenmiştir^{48,49}. Bu süreçlerde HIF proteininin artması hepatositlerin hayatta kalma olasılıklarını artırmaktadır. Ancak söz konusu stres koşulları altında genomlarını koruyamayan displastik hücrelerin çoğalması açısından da belirgin avantaj kazandırmaktadır.

Gerek kronik enflamasyon sürecinde gerekse displastik nodüllerden karsinoma hücrelerine dönüşüm dönemlerinde ortamda var olan büyüme faktörleri hücrelerin çoğalma hızını artırmakta ve canlılıklarını devam ettirmelerini sağlamaktadır. HIF proteini tanımlanmış çoğu büyüme faktörü tarafından (VEGF, FGF, PDGF, IGF) artırılmaktadır^{50,51}. HIF'in kendisinin de bu faktörlerin ekspresyonlarını artırdığı göz önüne alındığında hepatokarsinogenez sürecinde HIF ile büyüme faktörleri arasında pozitif bir geri beslemenin var olduğu ortaya çıkmaktadır.

Karsinoma aşamasında hücrelerde ortaya çıkan genomik değişimler nedeniyle HIF ekspresyonunda artışa neden olacak mutasyonlar da protein miktarını artırmaktadır^{52,53}. Tümör hücreleri tamir edemedikleri DNA hasarlarının varlığında HIF proteini aracılığıyla apoptozdan korunmaktadırlar. HIF anti-apoptotik gen ekspresyonlarını artırarak (Bcl-2, Survivin, XIAP) ve apoptotik genleri baskılayarak (Bax, Bid, Trail) apoptozu engellemektedir^{54,55,56,57}. Bu sayede daha malign ve invazif fenotipe sahip hücreler ortaya çıkmaktadır.

HİF proteini artışı hücrelerin kemoterapötiklere de direnç geliştirmelerini sağlamaktadır. Çoğu tümör hücresinde tedavide kullanılan ajanların hücre içinde birikimini azaltacak çoklu ilaç direnci proteini (MDR) ve p-glikoprotein ilaç dirençlilik genlerinde HİF bağımlı artış olduğu bilinmektedir^{58,59}. Hipoksi varlığı da genel olarak hücelere ulaşan kan akımını sınırladığından ilaçların doku içinde etkin doza çıkmasını engellemektedir.

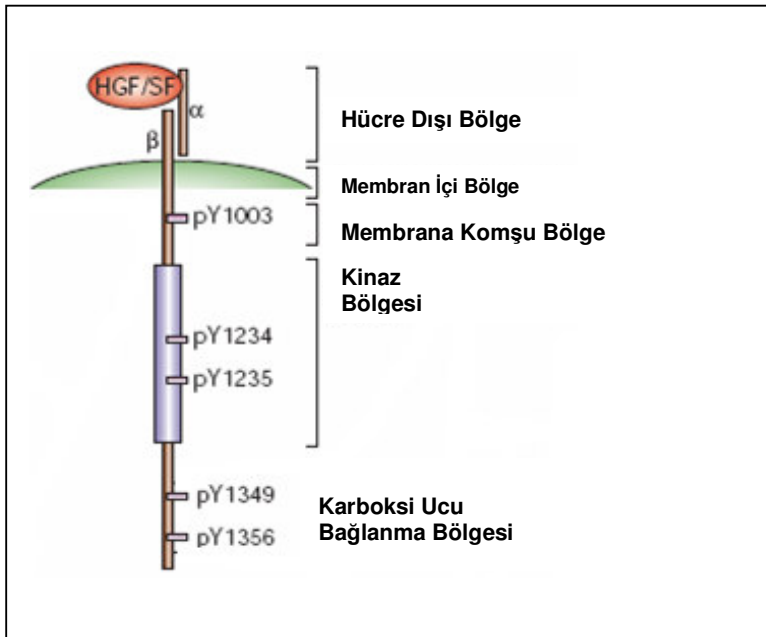
HCC tedavisi açısından sınırlı bir yeri olmakla birlikte radyoterapi uygulamaları da HİF aracılı dirençle karşı karşıyadır^{60,61,62}. Hipoksik hücrelerde oksijenin azlığı nedeniyle radyasyon ile oluşturulan DNA hasarlarının seviyesinde azalma olabilmekle birlikte esas sorun HİF proteini tarafından aktive hale getirilen sağ kalımı sağlayıcı sistemlerin varlığıdır^{63,64,65}. Radyoterapi sonrasında oluşan ROR'nin neden olduğu hücre hasarı HİF bağımlı anti-oksidan proteinlerin (SOD, HO-1, CP) ekspresyonları ile engellenmektedir^{66,67}. HİF proteini ekspresyonunun anti-apoptotik etkileri yanında hücre sağkalımını artıran PI3K/Akt yolağını da aktive hale getirdiği bilinmektedir^{68,69}. Akt'nin aktive olması HİF'in anti-apoptotik etkilerini daha da artırmakta ve stres koşullarında hücrelerin büyümesine, çoğalma hızının artmasına neden olmaktadır⁷⁰. Dolayısıyla hipoksik çevrenin varlığı, HCC hücreleri için kemo ya da radyoterapi ajanlarına karşı koyabilecekleri sistemleri önceden fonksiyonel hale getirebilme açısından bir çeşit ön-koşullanma/ önlem mekanizması olarak iş görmektedir⁷¹.

2.4 Hipoksik koşullarda ve tümörigenez sürecinde HGF/c-Met yolağı aktive olur ve tedavi direnci kazandırır

HCC gelişimi sürecinde büyüme faktörleri sinyal yolları hem etiyolojik faktörlerden tarafından etkilenirler, hem de karaciğer dokusunda oluşan yanıtın yönlendiricileri konumundadırlar. Olgun hepatositlerin çoğalmasını sağlayan en önemli faktör HGF'dir. Parsiyel hepatektomi sonrasında hem karaciğer dokusunda hem de kanda HGF miktarı artar⁷². Böylece olgun hepatositlerin ve hepatik progenitör hücrelerin çoğalması ile rejenerasyon gerçekleşir⁷³. Karaciğer dokusunun gelişiminde, hematopoetik ve embriyonik kök hücrelerin hepatositlere farklılaşmasında HGF önemli rol oynar^{74,75}.

HGF büyüme faktörü mezenkimal hücrelerden salınır ve çoğunlukla parakrin etki yapar^{76,77,78}. HGF'nin reseptörü olan membranda yerleşik c-Met proteini epitelyal

hücrelerde yer alır. HGF'nin c-Met proteinine bağlanmasıyla reseptör tirozin kinaz bölgeleri aktive olarak hücre içi sinyal iletim sistemini aktive eder. HGF/c-Met aracılı sinyaller hücrede çoğalma, motilite, farklılaşma, tübülogenez ve anjiyogeneze neden olacak genlerin ekspresyonunu değiştirir⁷⁹ (Şekil 4) . Karaciğer dokusunda sinüzoidal ve Kupffer hücrelerinde üretilen HGF parakrin olarak c-Met reseptör proteinine sahip hepatositlerde ve safra yolu epitel hücrelerinde etki gösterir. Bu etkileşim normal karaciğer dokusu gelişimi sürecinde ve rejenerasyon süreçlerinde çalışır⁸⁰. Hepatik hasarın gözlemlendiği kronik hepatit ve siroz durumlarında HGF ekspresyonunda bir miktar artış olmakla birlikte esas etki hepatositlerdeki c-Met proteini miktar artışıdır. Enflamasyon sırasında akut faz yanıtı olarak ortama salınan IL-1 ve IL-6, c-Met transkripsiyonunu artırmaktadırlar⁸¹. Tümör gelişimi ve ilerlemesi sırasında ise HGF/c-Met sistemi otokrin olarak çalışmaya başlamaktadır. Displastik hepatositlerde HGF ekspresyonun başlaması sonrasında c-Met transkripsiyonu da artış gösterir⁸². Hücreler hem HGF'ye hem de reseptörü olan c-Met proteinine sahip olduklarında, kendi kendilerine çoğalma ve invazyon özelliklerini kazanmaya başlarlar. HCC dokularında genomik değişimler nedeniyle de HGF aşırı ekspresyonuna, c-Met mutasyonlarına ya da aşırı ekspresyonlarına rastlanmaktadır⁸³.



Şekil 4: c-Met reseptör proteini bölgeleri ve fosforilasyon yerleri⁷⁷.

HGF erken dönemlerde çoğalma hızını artırmaktayken tümörün ileri evrelerinde daha çok hücre farklılaşmasını ve motilite/invazyon karakteristiklerini değiştirmektedir. Dolayısıyla HCC hücrelerinde HGF/c-Met sisteminin varlığı prognozu kötüleştirilmektedir. c-Met ekspresyonu varlığında tümör dokusu içinde mikrovasküler yoğunluğun, vasküler invazyon hızının ve intrahepatik metastazların arttığı görülmüştür. c-Met varlığında hastaların sağ kalım süreleri azalmakta ve tedavi sonrası hastalığın tekrarlama olasılığı artmaktadır.

c-Met ekspresyonunun hipoksi varlığında da arttığı belirlenmiştir^{84,85}. Hipoksi etkisiyle HİF ve AP-1 transkripsiyon faktörlerinin aktive olması sonucunda c-Met transkripsiyonu artmaktadır. Displastik nodüllerin büyümesi sürecinde duyulan vasküler desteğin sağlanmasında, hipoksi aracılı c-Met ekspresyonu artışının büyük önemi bulunmaktadır^{86,87}. İlginç bir diğer veri ise c-Met aktivasyonu sonrasında normoksik koşullarda da HİF proteininin aktive olmasıdır⁸⁸. HGF/c-Met yoluyla ile HİF arasındaki pozitif geri besleme hücrelerde malign karakteri artırmaktadır.

2.5 HGF/c-Met sinyal yoluyla tedavi direncin engellenmesi için hedeftir

HCC patogenezinde sahip olduğu roller nedeniyle HGF/c-Met sinyal yoluyla tedavi açısından önemli bir hedeftir. Sinyal yolunun değişik aşamalarında yapılabilecek bloklayıcı girişimlerle HGF aracılı değişimlerin engellenmesi planlanmaktadır. HGF'nin NK4 adı verilen kesilmiş formunun c-Met reseptörüne bağlanıp reseptörü HGF'ye kapatması ile başlangıç aşamasında reseptör aktivasyonunun engellenmesi amaçlanmaktadır. HCC hücre dizilerinde NK4 kullanımıyla hücre çoğalmasında ve invazyonunda belirgin azalma olduğu gözlenmiştir⁸⁹. c-Met aracılı hücrel yanıtın baskılanması amacıyla c-Met'e bağlanarak sinyal iletim sistemini düzenleyen Grb2 molekülü de malign davranışların azaltılabilmesi açısından hedef olarak değerlendirilmektedir^{90,91}. Hücre içinde HGF sinyali ile aktive olduğu bilinen AKT molekülü çoğalma, sağ kalım ve invazyon davranışlarının artırılmasını sağlamaktadır. AKT aktivasyonunun azaltılmasını sağlayacak tedavi seçeneklerinin oluşturulması HCC tedavisi açısından yoğun olarak araştırılan bir konudur^{92,93,94}. Hipoksik mikroçevre etkisiyle ortaya çıkan invazif karakterin, kemoterapi ve radyoterapi direncinin

engellenmesi açısından günümüzde en belirgin hedef HIF proteini olarak görülmektedir⁹⁵. HIF aracılı yanıtların durdurulması için HIF inhibitörü olan YC-1 molekülüyle HCC hücre dizilerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır^{96,97}. Günümüzde kullanılmakta olan ya da HIF inhibitörü özelliği de olduğu keşfedilen yeni moleküllerin sayısı da giderek artmaktadır^{98,99}. Tanımlanacak yeni hedef proteinler ile yeni tedavi ajanlarının ilişkileri, *in vivo* çalışmalar, hastalık prognozu ve yaşam kalitesi gibi değişkenlerin nasıl etkilendiği gibi soruların yanıtlanması HCC tedavisi açısından gelecek dönemde yürütülecek çalışmaların ana konularını oluşturacaktır.

3.GEREC VE YÖNTEM

3.1 Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan hepatosellüler karsinoma hücre dizileri Hep3B, HepG2 ve Huh7 Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından sağlanmıştır.

Hücreler %10 fetal bovin serum (FBS, Biochrom, S0115), penisilin/streptomisin, 2mM L-Glutamin (Biochrom, K0283) içeren Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM, Sigma, D5546) besi ortamı içerisinde, 37°C'de ve %5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkübatöründe (Heal Force, HF90) üretildi. Aralıklarla faz kontrast mikroskobu ile (Phase Contrast-2, Nikon, LWD 052, 202086) kontrol edildiler ve %80 yoğunluğa ulaştıklarında bir kısmı deneysel aşamalarda kullanılırken bir kısmı da dondurularak - 80°C'de saklandı. Hücre dizilerinin kültür işlemleri sınıf II steril hücre kültürü kabinetinde (Aura Vertical S.D.4, C5681) steril sarf malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi.

Hipoksi uygulaması anaerobik jar sistemi (Anaerocult-Merck) ile gerçekleştirildi. 2l hacimli jar içine kültür kaplarının yerleştirilmesi sonrasında oksijen bağlayıcı demir tozu reaktifi su ile aktive edilip jar içine koyuldu ve sızdırmaz kapak ile hacim sabitlendi.

Hipoksik mikroçevreyi taklit etmek için kobalt klorit (CoCl₂) kimyasalı kullanıldı. Distile su içinde çözülerek elde edilen stok solüsyondan 50-400 µM konsantrasyonda besi ortamına eklenerek kullanıldı.

HİF proteini baskılayıcısı olan YC-1 molekülü dimetilsulfoksit (DMSO) içinde çözüldü ve ortam içine eklenerek kullanıldı.

Radyasyon uygulamaları DEÜ Radyasyon Onkolojisi ABD tarafından kullanılmakta olan Kobalt 60 Teatron γ radyasyon kaynağı ile uygulandı.

3.2 Koloni Sağ Kalımı DeneYleri

Kültürde %80 yoğunluğa ulaşan hücreler gece boyu %2 serum içeren ortamda aç bırakılıp belirtilen dozda HGF ile uyarıldıktan 15 dakika sonra hipoksi jarına yerleştirildiler. 6 ila 24 saat sonra hücreler normoksik koşullara alındı ve bekletilmeden tripsin ile süspanse hale getirildiler. Thoma lamında sayım ile hücre konsantrasyonu elde edilip 2000-3500 hücre/ 2ml ortam olacak şekilde 3,5 cm'lik petrilere her koşul için 3 tekrarlı petri olacak şekilde ekildiler. Yaklaşık 2 haftalık inkübasyon sonrasında petriler PBS ile yıkandı, koloniler metanolle fikse edilip Giemsa ile boyandılar. En az 50 hücre içeren koloniler sayılarak koloni sağ kalım değerlendirildi.

3.3 MTT Hücre Çoğalması DeneYleri

Kültürde çoğaltılan hücreler 48 kuyulu kültür plakalarına 10.000 hücre/ 400 µl besi ortamı / kuyucuk olacak şekilde ekildiler. Bir gün sonra gece boyu %2 serum içeren ortama alınıp aç bırakıldılar. 40 ng/ml konsantrasyonda HGF ile 15 dakika uyarımın ardından hipoksi jarlarına yerleştirildiler. Jar içinde 48 saat süren hipoksi uygulaması sonrasında kültür plakaları normoksiye alındı ve bekletme yapılmadan 100µl besi ortamı içindeki hücreler üzerine 20 µl MTT test reageni (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega G3580) eklendi. 30 dakika boyunca 37 C'de ve %5 CO₂ varlığında inkübasyon sonrasında hücreler tarafından metabolize edilmiş reagen içeren kültür ortamı spektrofotometrik olarak 490 ve 630 nm dalga boylarında ölçümle değerlendirildi. Kontrol hücrelerinden elde edilen absorbans değerine göre düzeltme yapıldıktan sonra canlı hücre sayısı değişimi kontrolün yüzdesi olarak koşullar arasında karşılaştırıldı.

γ-Radyasyon uygulaması sonrasında uzun süreli kültür yapmak için planlanan deneyde de γ-radyasyon uygulaması öncesinde HGF uyarımı ve/ veya 2 saatlik hipoksi uygulaması sonrasında, hücreler hipoksik koşullarda iken, γ-radyasyona uygulaması gerçekleştirildi. Takip eden 48 saat içinde de Hep3B hücreleri hipoksik koşullarda inkübe edilmeye devam edildi. Süre sonunda sekiz ayrı kültür kabındaki hücreler tripsinizasyonla kaldırılıp sayıldı ve 48 kuyucuklu kültür plakalarına 5,000 hücre/ 400 µl/ kuyucuk olacak şekilde %2 FCS'li DMEM ortamında ekildi. γ-Radyasyon uygulaması öncesinde HGF ile

uyarılan koşuldaki hücreler, ekildikten sonra gün aşırı HGF ile uyarılmaya devam edildi. 3. / 5. / 7. ve 9. günlerde canlılığın nasıl etkilendiği MTT canlılık testi kullanılarak saptandı.

3.4 LDH Hücre Toksisitesi Deneyleri

Hücreler yukarıda anlatıldığı üzere 48 kuyucuklu kültür plakalarına ekildi ve tanımlanan deney planı uygulandı. 48 saatlik hipoksi sonrasında normoksiye alınan plakalarda, kültüre hücrelerin içinde bulunduğu besi ortamından 50 µl'si alınıp 50 µl LDH test reageniyle (CytoTox 96 Non-Radiactive Cytotoxicity Assay, Promega, G1780) karıştırıldı. Oda ısısında karanlıkta gerçekleştirilen 30 dakikalık inkübasyon sonrasında ölü hücrelerden ortama aktarılan LDH enzimi ile metabolize edilen reagentteki renk değişimi 490 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kontrol hücrelerinden elde edilen absorbans değerine göre düzeltme yapıldıktan sonra ölü hücre sayısı değişimi kontrolün yüzdesi olarak koşullar arasında karşılaştırıldı.

3.5 Motilite/ İnvazyon Deneyleri

Hep3B hücrelerinin bazal, HGF ve/veya hipoksi-radyasyon uygulaması sonrasında motilite ve invazyon davranışlarındaki değişimler Boyden Chamber sistemi esasına dayalı 24 kuyulu kültür plağına yerleşik kuyucuklar kullanılarak gerçekleştirildi (BD 354578 ve 354483). Motilite incelemesi 8 mikron çaplı porlara sahip membranlar üzerinde gerçekleştirilirken, membran üstü büyüme faktörleri azaltılmış matrijel ile kaplanmasıyla oluşturulan kuyucuklar invazyon deneylerinde kullanıldı.

Hücre Ekimi:

24 kuyucuklu plak içine HGF içeren ve içermeyen 750µl %2 serumlu besi ortamı koyuldu.

Motilite/invazyon kuyucukları plaka içine yerleştirildi.

20.000 hücre kuyucuk içine aktarıldı.

Hipoksik koşul için kültür plakaları hipoksi jarı içine yerleştirildi.

Hipoksinin başlatılmasında 2 saat sonra ilgili plakalara radyasyon uygulandı.

Hücreler 24 saat boyunca hücre kültürü inkübatöründe bekletildi.

İnkübasyon süresi sonunda motilite/invazyon kuyucukları pensetle tutularak boyandı (Diff-Quik Stain Set, Dade Behring, B4132-1).

Membranın üst kısmında yer alan göç etmemiş hücreler ucu pamuklu çubuklar yardımıyla silinerek uzaklaştırıldı. Membran alt yüzeyine göç eden hücreler mikroskop yardımıyla sayıldı. Sayım membran genelinde 4 kenarda 1 ortada olmak üzere 5 alan üzerinden gerçekleştirildi.

3.6 RNA Eldesi

HGF, hipoksi ve radyasyonun değişik kombinasyonlarda uygulanmasıyla oluşturulan koşullardaki hücrelerden inkübasyon süreleri sonrasında total RNA eldesi gerçekleştirildi.

RNA TidyG (Applichem A2867) adlı fenol-guanidin bileşiği reaktif kullanılarak hücreler parçalandı ve RNA çözünebilir hale getirildi. Alkoller yardımıyla çöktürülen RNA yıkanıp kurutulduktan sonra distile su içinde çözdürüldü.

RNA çalışmalarında kullanılan bütün malzemeler bir kullanımlık ve RNaz içermeyen nitelikteydi. Plastik malzemeler, solüsyonlar ve aparatlar DEPC ile muamele edilerek RNazlardan arındırıldı. Yüzeyler ve eldivenler RNase OFF (Applichem A2861) solüsyonuyla temizlenerek çalışıldı.

RNA İzolasyon Basamakları:

1. Petri içindeki ortam uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı.
2. 1ml RNA TidyG/ 1.10^6 hücre olacak şekilde reagen eklendi. Kazıyıcı ile tüm hücreler parçalanıncaya kadar karıştırıldı ve eppendorf tüpüne alındı. 5 dakika bekletilerek homojen parçalanma sağlandı.
3. 1ml reagen içine 200µl kloroform eklenip alt üst edilerek karıştırıldı. Bu sayede RNA-DNA-protein fazları elde edildi.
4. $+4^{\circ}\text{C}$ 10 dakika 8.000 rpm'de santrifüj ile fazların tam ayrımı sağlandı.
5. En üstteki RNA fazı yeni bir tüpe aktarılıp eşit hacimde izopropanol eklenip karıştırılarak RNA çöktürüldü. Bu işlemin etkinliğini artırmak için tüpler gece boyunca -20°C 'da bekletildi.
6. $+4^{\circ}\text{C}$ de 10 dakika 8.000 rpm'de santrifüj ile RNA pelleti oluşturuldu.

7. Süpernatant atılıp 1 ml %75'lik etanol ile pellet yıkandı.
8. +4°C 10 dakika 10.000 rpm'de santrifüj ile RNA pelleti çöktürüldü. Etanol uzaklaştırılıp pellet oda ısısında kurutuldu.
9. pH: 8,0 distile su içinde RNA pelleti çözüldü ve -80°C'de saklandı.

RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi:

Elde edilen RNA örneklerinin miktar tayini ve saflık değerlendirmesi için 260 ve 280 nm'de spektrofotometrik (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonrasında

$$A^{260} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 40 \mu\text{g/ml} = ? \mu\text{g/ml RNA}$$

formülü kullanılarak örneklerdeki RNA konsantrasyonu ve “ A^{260}/A^{280} ” oranından yararlanılarak RNA saflık değerleri elde edildi.

*Dilüsyon ve kalibrasyonlarda 10 mM Tris-Cl, pH: 7,5 solüsyonu kullanıldı.

3.7 cDNA Sentezi

Uygun konsantrasyon ve saflık değerlerine sahip total RNA örnekleri, rastgele primerler aracılığıyla cDNA sentezi kiti (Fermentas K1612) kullanılarak cDNA'ya çevrildiler. cDNA sentezi basamakları aşağıdaki gibidir:

1. RNaz içermeyen 200µl'lik PCR tüpü içine buz üzerinde reaksiyon karışımı hazırlandı
2 µg total RNA örneği
1 µl random hekzamer primer
karışımı 12 µl'ye tamamlayacak miktarda su
2. Karışım 70°C'da 5 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası tüp buz üzerinde soğutuldu ve sırasıyla aşağıdaki reagenler eklendi:

4 µl 5X reaksiyon tamponu

1 µl ribonükleaz inhibitörü

2 µl 10 nM dNTP karışımı

3. Karışım 25°C'da 10 dakika inkübe edildi.
4. Reaksiyona 1 µl M-MuLV revers transkriptaz eklendi.
5. Karışım 25°C'da 10 dakika ve daha sonra da 42°C'da 1 saat inkübe edildi.
6. Reaksiyon 70°C'ta 10 dakika inkübe edilerek enzim inaktive edildi.

3.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Hedef genlerin transkripsiyonunda mRNA düzeyinde meydana gelen değişimlerin incelenmesinde cDNA üzerinden gerçekleştirilen RT-PCR yöntemi kullanıldı. İleri ve geri primerler internetteki Primer3 programı ile tasarlandı, dizilerin yerleşimi NCBI BLAST programı kullanılarak kontrol edildi. PCR çalışmaları sıcaklık döngü düzenleyicisinde (MJ Research Inc, PTC-100TM) gerçekleştirildi.

Kullanılan primer sekansları ve PCR ürünlerinin uzunlukları aşağıdaki listede tanımlanmaktadır:

cMet ileri: 5'ATTTAGGTACCTCTCATAATGAAGGCCCCCG

cMet geri: 5'GCAGTGAACCTCCGACTGTATGTC

PHD1 ileri: 5'TGGGCAGCTATGTCATCAAC

PHD1 geri: 5'TTGGACACCTTTCTGTCCTG

PHD2 ileri: 5'ATCCGAGGCGATAAGATCAC

PHD2 geri: 5'CGTACATAACCCGTTCCATTG

PHD3 ileri: 5'AATTGCCCTGGAGTACATCG

PHD3 geri: 5'TGAATGATTTCCCCTCTGGA

HIF1a ileri: 5'TTTTACCATGCCCCAGATTC

HIF1a geri: 5'ATTCATCAGTGGTGGCAGTG

F1H ileri: 5'GGGGATTACCATCACTGTGAAC

F1H geri: 5'TCTCATTATGGCCACTTTCTGA

VEGF ileri: 5'CGAAACCATGAACTTTCTGC

VEGF geri: 5'TGGTGATGTTGGACTCCTCA

Rlip76 ileri: 5'ACTGTGCAGATCAGCAATCG

Rlip76 geri: 5'TCTGAGGCGTTCAATCTCTTC

S1AH2 ileri: 5'ACCTGGTGTGTAACCAATGC

S1AH2 geri: 5'CATGTTCTGGTTTCTCCGTATG

EPO ileri: 5'TGTGGATAAAGCCGTCAGTG

EPO geri: 5'GCACAAGCAATGTTGGTGAG

SET ileri: 5'ACGCAGAATAAAGCCAGCAG

SET geri: 5'CTTCCTCCCCTTCATCATCA

MT1-MMP ileri: 5'CGTTTCAACGAAGAGCTCAG

MT1-MMP geri: 5'GCTTCTGGTTGTTGAATTTCC

PCR reaksiyonu ile elde edilen ürünler %1,5 agaroz jel elektroforezinde, 80V akım altında, yaklaşık 1 saat yürütüldükten sonra görüntülendi (Eagle Eye II, Stratagene). Bant kalınlıkları deney koşulları arasında karşılaştırıldı. Beta aktin ve GAPDH genleri kontrol amaçlı kullanıldı.

3.9 Protein Eldesi

Kültür kaplarında yapışarak üreyen hücrelerden deney koşulları uygulandıktan sonra aşağıdaki basamaklar takip edilerek total protein eldesi gerçekleştirildi:

1. Kültür kapları buz üzerine alınıp besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Soğuk PBS ile hücreler yıkandı, 1 ml PBS içinde hücreler kazıyıcıyla toplanıp tüp içine alındı.
3. +4°C'da ve 5000 rpm'de 5 dk santrifüj ile hücre pelleti elde edildi.
4. Supernatan atılıp pellet üzerine 3 hacim lizis tamponu eklendi. Hücreler 30 dk buz üzerinde 5 dakikada bir vortekslenerek lize edildi.
5. +4°C'de 15 dakika maksimum hızda santrifüjleme sonrasında protein içeren süpernatant yeni tüpe aktarıldı. Protein örnekleri -80°C'ta saklandı.

Lizis tamponu içeriği:

Tris HCL pH:7,4:50 mM, NP40 %1, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Aprotinin 1 µg/ml, Leupeptin 1µg/ml, Pepstatin 1µg/ml, NaF 1mM, Na₃VO₄ 1mM, PMSF 1mM

Deneyle sonunda elde edilen örnekler içindeki protein miktarı BCA Protein Assay (Pierce, 23225) kiti kullanılarak belirlendi.

Hücrelerdeki HIF proteini miktarının incelenmesi için buz üzerinde soğuk PBS ile yapılan yıkama sonrasında 500µl / 10 cm petri olacak şekilde 2X Laemmli protein yükleme tamponu doğrudan hücreler üzerine eklendi. Elde edilen protein örneği kaynatılıp doğrudan SDS-PAGE jeline 40 µl / kuyu olarak yüklendi.

3.10 Western Blotlama

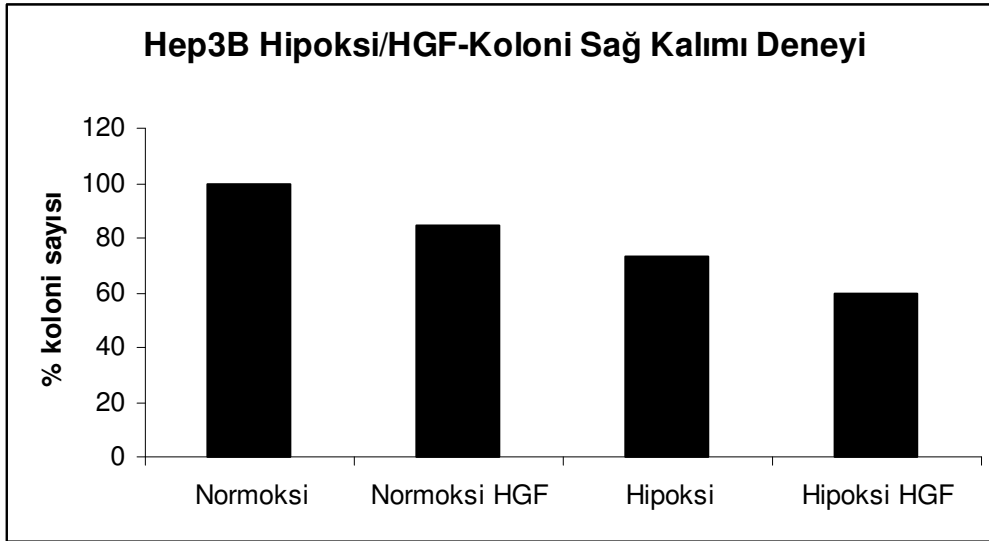
Uygulanan deney koşulları ile hücre içi hedef proteinlerdeki miktar değişimlerini belirlemek amacıyla western blotlama yöntemi kullanıldı. Protein örnekleri %8 ile 10'luk SDS-PAGE ile büyüklüklerine göre ayrımlandı. Her bir jel kuyusuna 50-100 µg protein 2X jel yükleme tamponu içinde 5 dakika kaynatıldıktan sonra yüklendi. Jel yürütme tamponu içinde yaklaşık 4-6 saat jel başına 25 mA akım uygulandı. Jel içindeki proteinler 300mA akım ile blotlama tamponu içinde PVDF membranlara aktarıldılar.

Proteinlerin membranlara blotlanması sonrasında c-Met proteini için %5 albumin-PBS-NP40 tamponunda oda ısısında 1 saat bloklama yapıldı. Membran %0,1 albumin-PBS-NP40 tamponu içinde 1:1000 c-Met (C28, Santa Cruz) antikoruna ile +4°C'ta gece boyu inkübasyon sonrasında yıkandı. c-Met antikoruna ikincil olarak HRP-bağlı anti-tavşan antikoruna ile oda ısısında 30 dk inkübasyonla bağlanma gerçekleştirildi. Hif1α proteini için %5 süt tozu içeren TBS-T tamponunda oda ısısında 30 dk bloklama sonrasında membran 1:250 oranda primer antikor (BD, 610959) içeren %3 süt tozu TBS-T tamponunda gece boyu +4°C'ta inkübe edildi. İkincil antikor 45 dk oda ısısında bekletildi. Her iki membran da tamponla yıkamalar sonrasında ECL (RPN 2108, Amersham) ile muamele edildi ve oluşan antikor sinyalleri film üzerine aktarıldı.

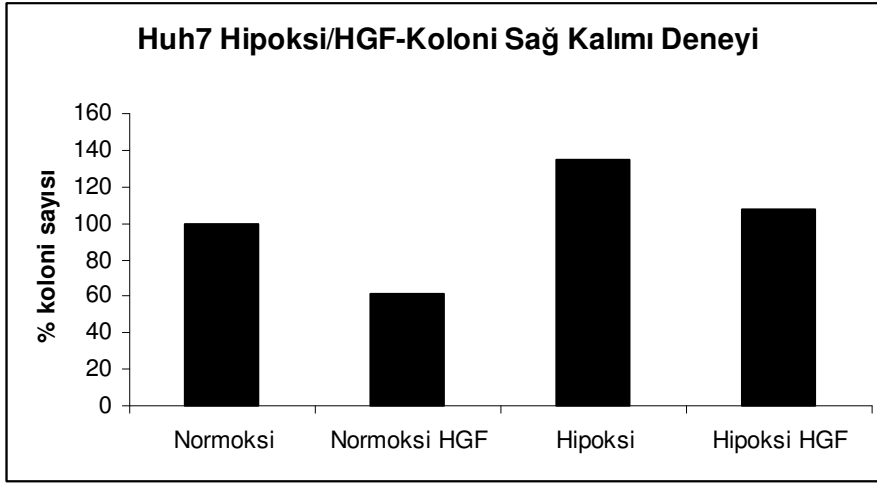
4.BULGULAR

4.1 Koloni Sağ Kalımı Deneş Sonuçları

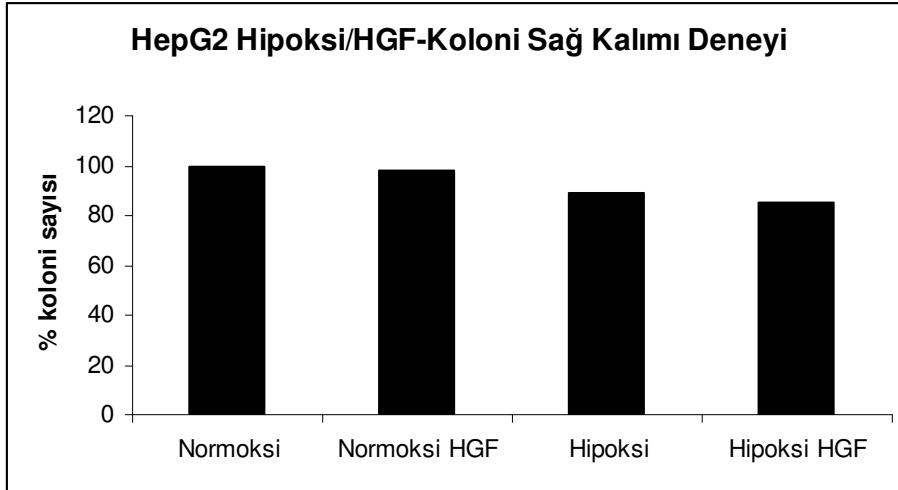
Stres koşullarına maruz bırakılan hücrelerin bu koşullara yanıt olarak adezyon-canlılık ve mitoz basamaklarının üçünü birden kullanarak hayatta kalmasıyla oluşturduğu kolonilerin incelenmesi, adı geçen üç basamakta da yer alan sistemlerin aynı anda yeterli seviyede fonksiyon görebilmesine bağlıdır. Tek bir hücrenin kültür kabı yüzeyine yapışarak çoğalmasıyla oluşan bu kolonilerin sayıları kullanılarak hücrelerin elde ettikleri yaşama avantajları değerlendirilmeye çalışılır. Çalışmamızın başlangıç aşamasında Huh7, HepG2 ve Hep3B hepatosellüler karsinoma hücre dizilerinin, 40 ng/ml HGF ile uyarıldıktan sonra 6 saatlik hipoksi uygulaması sonrasında koloni oluşturmaları sağlandı. Oluşan koloniler içinde en az 50 hücreye sahip olanları değerlendirilerek koloni sayılarındaki değişimler incelendi. Koloni sağ kalımı deneş sonuçları şekil 5, 6 ve 7'de gösterilmektedir.



Şekil 5: Hep 3B hücre dizisinde koloni sağ kalımı deneş sonuçları.



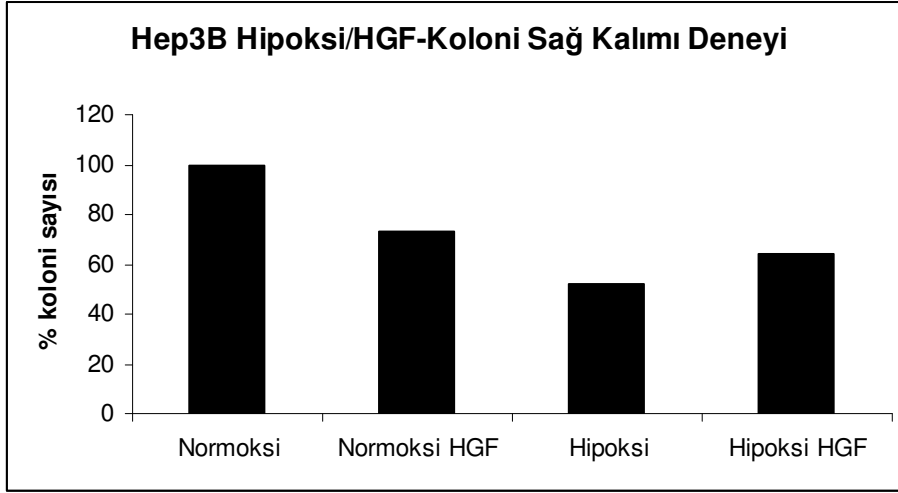
Şekil 6: Huh7 hücre dizisinde koloni sağ kalımı deney sonuçları.



Şekil 7: HepG2 hücre dizisinde koloni sağ kalımı deney sonuçları.

Deney sonuçları 6 saatlik hipoksi uygulamasına hücre dizilerinin farklı şekillerde yanıt verdiğini gösterdi. Hep3B ve HepG2 hücre dizileri hipoksi uygulamasını stres olarak algılayarak koloni sayılarını azalttılar ancak Huh7 hücreleri hipoksiyi bir çeşit avantaj olarak kullanarak daha fazla sayıda koloni oluşturdu. HGF bir büyüme faktörü olmakla birlikte bu üç hücre hattında da 6 saatlik uygulama sonrasında koloni sayılarında azalmaya neden oldu.

Hep3B hücre dizisine 24 saatlik HGF ve/ veya hipoksi uyguladığımızda elde ettiğimiz koloni sayıları aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 8: Hep 3B hücre dizisinde 24 saat uyarım sonrası koloni sağ kalımı deney sonuçları.

HGF ve/ veya hipoksi uygulama süresi uzatıldığında Hep3B hücrelerinde hipoksik stres oluşacak koloni sayısını %50 azaltmaktadır. HGF uyarımı normoksik koşullarda koloni sayısını azaltmakta ancak hipoksi varlığında bu etki tersine dönmekte ve koloni sayısı artmaktadır.

Sonuç olarak hipoksi hepatosellüler karsinoma hücre dizilerinde genel olarak koloni sağ kalımını azaltmaktadır. HGF'in varlığı, kısa süreli inkübasyonlarda koloni sağ kalımını azaltmaktadır. Bununla birlikte hipoksik stres süresi uzadığında HGF bir sağ kalım artırıcı ajan olarak fonksiyon görmeye başlamaktadır.

4.2 Canlılık Deney Sonuçları

Hipoksi uygulaması yapılan hücrelerde hipoksik koşullarda kaldıkları süre içerisinde çoğalma ya da ölüm gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla MTT canlılık deneyi ve LDH salınımı hücrel toksisite deneyleri planlandı. HGF ile uyarılan/ uyarılmayan hücreler 48 saatlik süre boyunca hipoksik ortamda inkübe edildiler. Süre sonunda saptanan canlı hücrelere ve ölü hücrelere ait % hücre sayıları aşağıda yer almaktadır:

Tablo 2: 48 saat hipoksi uygulaması sonrası MTT canlılık deneyi sonuçları.

48 Saat Hipoksi MTT Canlılık Deneyi (% canlı hücre)				
	Normoksi	Normoksi- HGF	Hipoksi	Hipoksi- HGF
Deney 1	100	106	102	107
Deney 2	100	102	108	110
Deney 3	100	98	96	89
Ortalama	100	102	102	102

Tablo 3: 48 saat hipoksi uygulaması sonrası LDH toksisite deneyi sonuçları.

48 Saat Hipoksi LDH Toksikite Deneyi (% ölü hücre)				
	Normoksi	Normoksi- HGF	Hipoksi	Hipoksi- HGF
Deney 1	100	98	132	109
Deney 2	100	145	82	104
Deney 3	100	102	95	92
Ortalama	100	115	103	102

Hipoksik koşullarda 48 saat süreyle inkübe edilen Hep3B hücrelerinde canlılık deneylerinden elde edilen veriler bu süre boyunca hücre sayılarında belirgin bir değişimin gerçekleşmediğini göstermektedir.

Radyasyon uygulaması sonrasında hücre canlılığındaki değişimlerin belirlenmesi amacıyla 6 Gy γ -radyasyon uygulamasını takiben 24., 48. ve 72. saatlerde canlılık değerlendirmeleri yapıldı.

Tablo 4: 6Gy γ Radyasyon uygulaması sonrası MTT canlılık deneyi sonuçları.

γ Radyasyon MTT Canlılık Deneyi (% canlı hücre)				
	Normoksi	Normoksi HGF	γ Radyasyon	γ Radyasyon HGF
24. saat	100	103	102	103
48. saat	100	98	100	99
72. saat	100	98	98	99

Tablo 5: 6Gy γ Radyasyon uygulaması sonrası LDH toksisite deneyi sonuçları.

γ Radyasyon LDH Toksikite Deneyi (% ölü hücre)				
	Normoksi	Normoksi HGF	γ Radyasyon	γ Radyasyon HGF
24. saat	100	104	111	112
48. saat	100	102	106	99
72. saat	100	109	112	116

γ -Radyasyon uygulaması öncesinde HGF uyarımı varlığı ve/ veya 2 saatlik hipoksi uygulaması sonrasında hücrelerin hipoksik koşullarda γ -radyasyona maruz bırakılıp takip eden 24 saat içinde de hipoksik koşullarda inkübasyonun Hep3B hücrelerinde canlılığı nasıl etkilediği MTT ve LDH deneyleriyle incelendi.

Tablo 6: HGF-Hipoksi- γ -Radyasyon uyarımı sonrasında 48. saatteki MTT canlılık deney sonuçları.

48 saat HGF-Hipoksi-γ Radyasyon MTT Canlılık Deneyi (% canlı hücre)								
	Norm	Norm HGF	Hyp	Hyp HGF	γ Rad	γ Rad HGF	Hyp γ Rad	Hyp γ Rad HGF
Deney 1	100	103	102	106	92	97	109	110
Deney 2	100	108	117	121	111	118	120	123

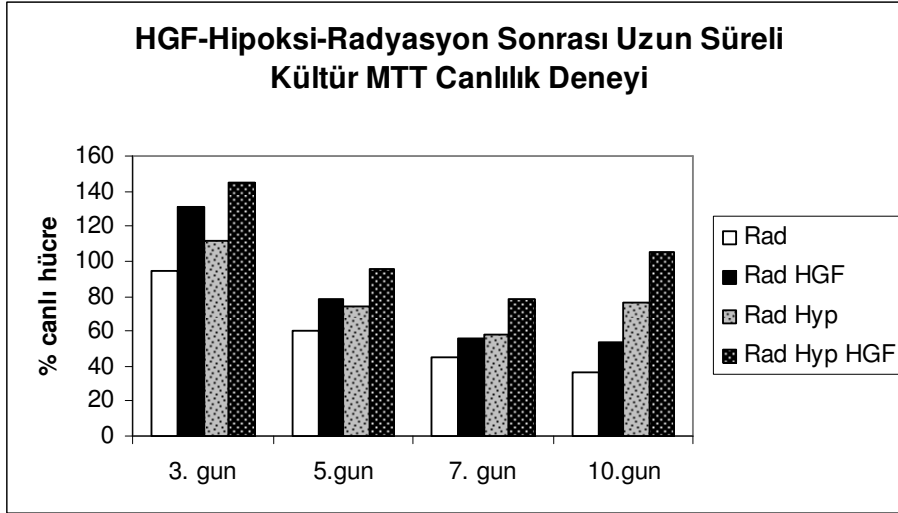
Tablo 7: HGF-Hipoksi- γ -Radyasyon uyarımı sonrasında 48. saatteki LDH toksisite deney sonuçları.

48 saat HGF-Hipoksi-γ Radyasyon LDH Toksikite Deneyi (% ölü hücre)								
	Norm	Norm HGF	Hyp	Hyp HGF	γ Rad	γ Rad HGF	Hyp γ Rad	Hyp γ Rad HGF
Deney 1	100	105	129	123	105	131	134	115
Deney 2	100	93	113	98	135	140	116	112

Normoksik ve hipoksik koşullarda γ -Radyasyon uygulamasını takiben 48 saat içerisinde hücre canlılığında belirgin bir değişim gözlenmemektedir. Hipoksik koşulda γ -Radyasyon uygulaması öncesinde HGF uyarımı varlığında düşük de olsa canlı hücre sayısında artış ve ölü hücre sayısında azalma gözlenmiştir.

Radyasyon uygulamasını takip eden 3 gün içinde hücre canlılığında belirgin bir değişimin gözlenmemesi üzerine daha uzun süreli kültür yapılmasına karar verilmiştir. Önceki deneylerden farklı olarak hücreler γ -radyasyon uygulaması sonrasında 48 saat

hipoksizde tutulmaya devam edildi. Süre sonunda kaldırılıp yeniden 48 kuyucuklu plakalara ekildiler ve 3. / 5. / 7. günlerde MTT canlılık testi ile değerlendirildiler. Deney sonuçlarına ait grafik aşağıda yer almaktadır.



Şekil 9: HGF-Hipoksi- γ -Radyasyon uyarımı sonrasında uzun süreli kültür MTT canlılık deney sonuçları.

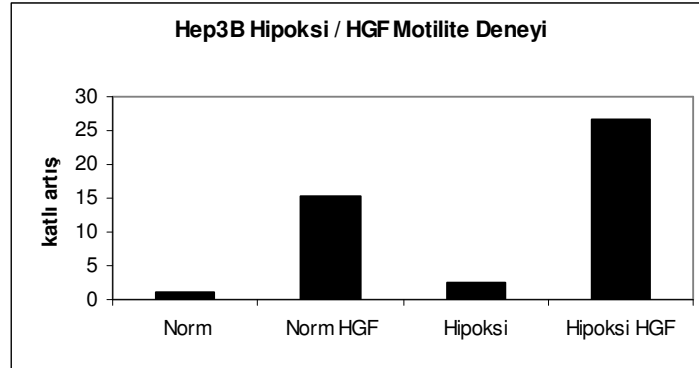
γ -Radyasyon uygulaması sonrasında Hep3B hücreleri uzun süreli kültüre edildiklerinde 3. günden itibaren ölmeye başlamakta ve 7. günde hücrelerin yaklaşık %40'ı ölmektedir. HGF uygulaması ile γ -radyasyona bağlı hücre ölümü % 20 oranında azalmaktadır. γ -Radyasyon uygulaması sırasında ve takip eden 48 saat içinde hipoksizde kalan hücrelerde de % 20 oranında sağ kalım artışı gerçekleşmiştir. Hem hipoksi uygulanan hem de HGF ile uyarılan hücrelerde ise toplamda ölen hücre oranı yarı yarıya azalmakta, γ -radyasyon uygulaması sonrasında en yüksek hücre canlılığı hipoksi ve HGF varlığının aditif etkisiyle elde edilmektedir. Dolayısıyla Hep3B hücreleri gerek hipoksi varlığı gerekse HGF uyarımı ile γ -radyasyona bağlı hücre ölümünden korunmakta, her iki uyarımın birlikte yapılması halinde ise canlı hücre sayısı 2 kat artmaktadır.

Bu sonuçlar tümör hücrelerinin içinde buldukları hipoksik mikroçevre etkisiyle ve hücrelerdeki HGF sinyal yolağı aktivasyonu nedeniyle radyoterapiye dirençli hale gelebildiklerini, bunun da ötesinde radyoterapi sonrasında dirençli ve çoğalabilme kapasitesine sahip hücre klonlarının avantaj kazanmasına neden olduklarını ortaya koymaktadır.

4.3 Motilite/ İnvazyon Deney Sonuçları

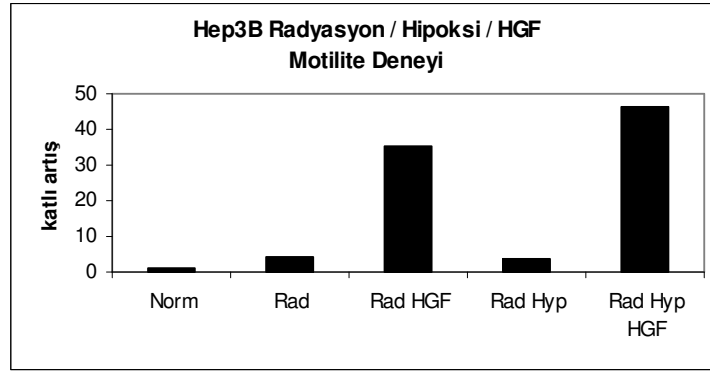
Hipoksi uygulaması süresi boyunca hücre canlılığı değişimi gözlenmediği yukarıda belirtilen sonuçlarla ortaya koyulmuştur. Hücrelerin canlılıklarını devam ettirdikleri hipoksik stres uygulaması sırasında motilite ve invazyon davranışlarında değişim olup olmadığını belirlemek amacıyla Hep3B hücre dizisi kullanılarak motilite/ invazyon deneyleri yapılmasını planladık. Deney sırasında kuyucuklara ekilecek hücre sayısı optimizasyonu sonrasında 20.000 hücre ile deneyler gerçekleştirildi. Hücreler kuyucuklara yerleştirildikten sonra 24 saat boyunca normoksi-hipoksi uygulaması gerçekleştirildi.

Hep3B hücreleri normoksi ortamında HGF uyarımına bağlı olarak hareketliliklerini 15 kata kadar artırdılar (Şekil 10). Hücreler hipoksik ortama maruz bırakıldıklarında yaklaşık 2,5 katlık bir motilite artışı gerçekleşti. HGF uyarımı ve hipoksi uygulaması birlikte yapıldığı zaman kontrole göre 25 kat daha fazla hücrenin porlardan göç ettiği saptandı.



Şekil 10: HGF-Hipoksi uygulaması sonrasında motilite deney sonuçları.

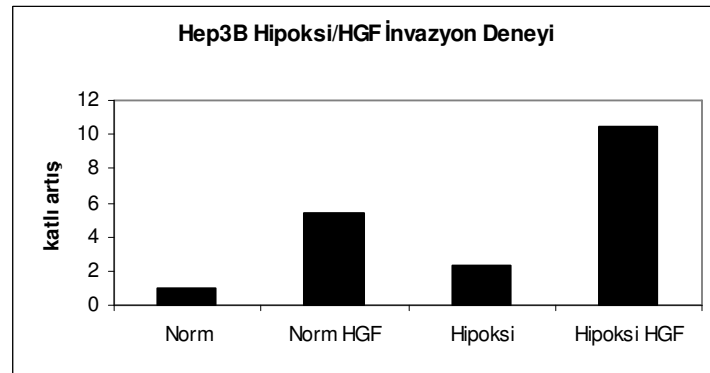
Radyasyon uygulamasının motilite üzerindeki etkisini belirlemek için yukarıda tanımlandığı gibi hazırlanan Hep3B hücreleri kuyulara ekilip hipoksi başlatıldıktan 2 saat sonra radyasyon verildi. Normoksik kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında radyasyonun hücre hareketliliğini 4 kat yukarı çıkardığı görüldü (Şekil 11). Radyasyon verilen hücreler HGF uyarımı varlığında 8 kat daha fazla hareketliydi. Hücrelerin radyasyon uygulaması öncesinde hipoksi ortamına alınmaları motilite davranışlarını etkilemedi ancak ortama HGF eklenmişse en yüksek değerde, normoksik kontrole göre 40 kata ulaşan bir artış elde edildi.



Şekil 11: Radyasyon-Hipoksi-HGF uygulaması sonrasında motilite deney sonuçları.

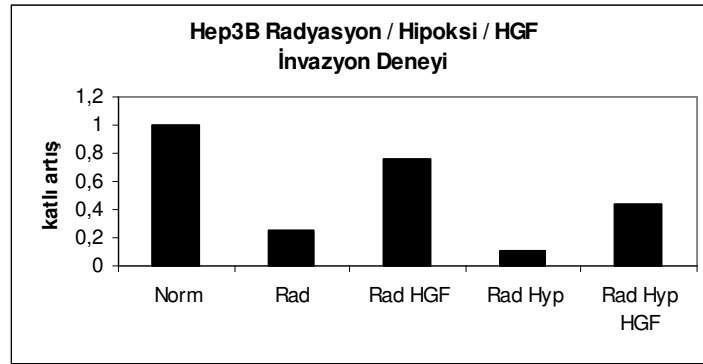
Motilite davranışı Hep3B hücrelerinde HGF uyarımı ile aktive edilmektedir. Bu aktivasyon gerek hipoksik koşullarda gerekse radyasyon maruziyeti sonrasında devam etmektedir.

Matrijel kaplı motilite kuyucukları kullanılarak incelenen invazyon davranışı Hep3B hücrelerinin HGF ile uyarılması sonucunda kontrole göre 5 kat daha yükseğe çıktı (Şekil 12). Hücreler hipoksi ortamında inkübe edildiğinde 2 katlık bir artış belirlenirken hipoksi ortamında HGF uyarımı da yapılan hücreler 10 kata varan invazyon artışı sergilediler.



Şekil 12: HGF ve hipoksi uygulaması sonrasında invazyon deney sonuçları.

Hipoksi ve HGF uyarımı Hep3B hücrelerinde invazyon yapabilme yeteneğini artırmaktayken radyasyon uygulaması invazyon kapasitesinde belirgin bir düşüğe neden olmuş, hücrelerin bazal invazyon yeteneğinde kontrolün dörtte birine ulaşan bir azalma saptanmıştır (Şekil 13). γ -Radyasyon uygulanmış hücrelerdeki invazyon davranışı HGF varlığında ancak kontrol değerlerine yakın seviyeye ulaşabilmektedir. Bu hücreler hipoksi ortamında daha da düşük seviyelerde invazyon göstermektedirler.



Şekil 13: Radyasyon-Hipoksi- HGF uygulaması sonrasında invazyon deney sonuçları.

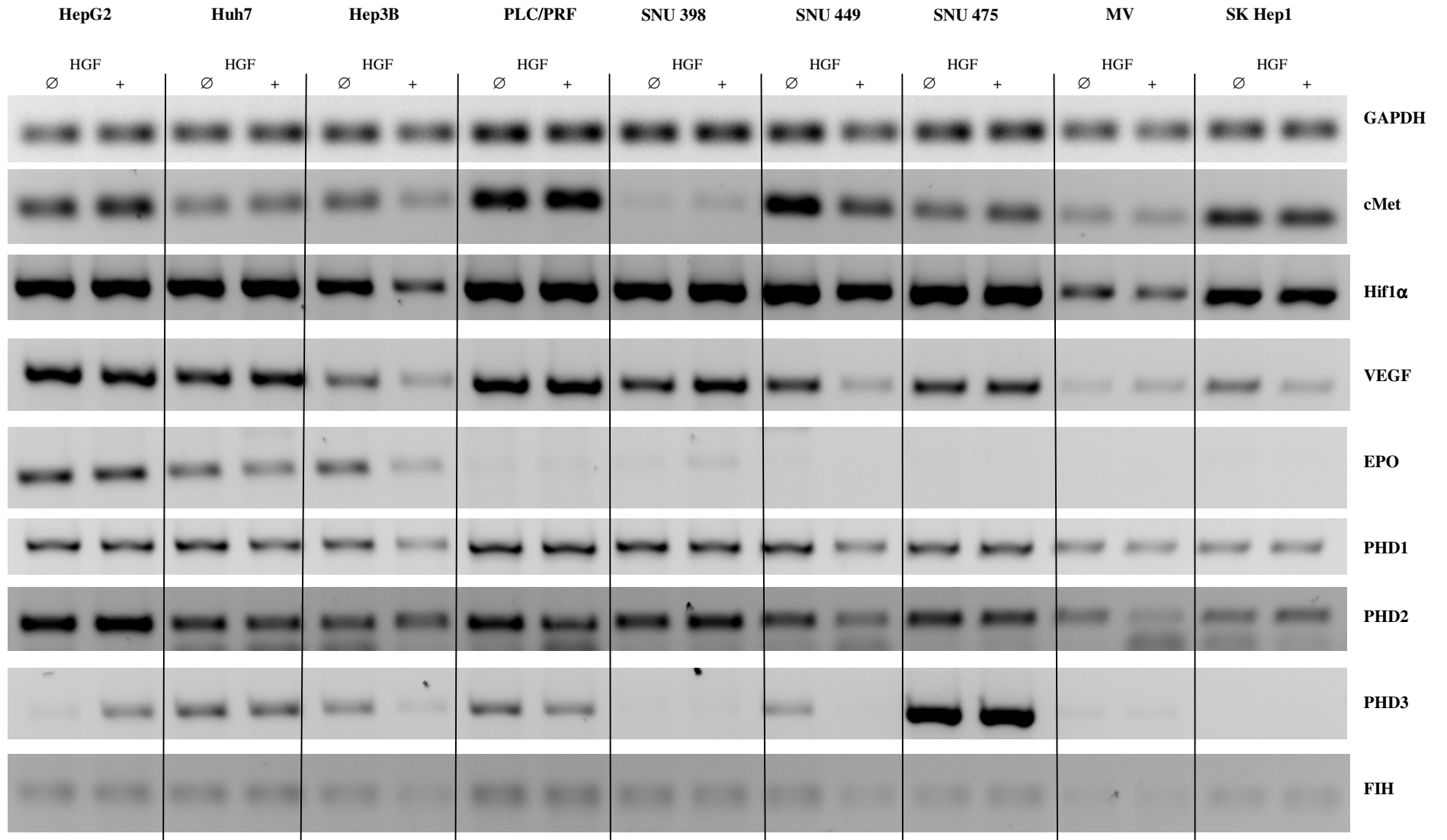
Genel olarak HGF ile uyarılan Hep3B hücrelerinde motilite ve invazyon kapasitesinde belirgin artış olduğu saptanmıştır. Hipoksik ortamda HGF uyarımı varlığında bu artış daha da yüksek seviyeye çıkmaktadır. Gerek motilite gerekse invazyon davranışları açısından HGF ve hipoksi aditif etki göstermektedirler. γ -Radyasyon uygulanan hücrelerde motilite davranışında artış gözlenmekle beraber invazyon kapasitesi düşmekte, HGF ve hipoksi ile indüklenebilen invazyon davranışı belirgin olarak baskılanmaktadır.

4.4 PCR Deney Sonuçları

Hepatosellüler karsinoma hücre dizilerinde HGF/c-Met sinyal ileti yolağında ve hipoksi algılamasında görev yapan HIF proteini ekspresyonu düzenlenmesinde rol oynayan başlıca proteinlerin mRNA düzeylerindeki durumlarını RT-PCR yöntemini kullanarak saptamayı hedefledik. Hücre dizilerinin uyarılmamış ve 24 saat HGF ile uyarılmış koşullarda hedef genlerimiz ekspresyonunda meydana gelen değişimler aşağıda Şekil 14'da incelenebilmektedir. HGF reseptörü olan cMet geni mRNA transkripti elimizde var olan hücrelerin tümünde bulunmakta, sadece SNU398 hücrelerinde diğerlerine göre en düşük miktarda gözlenmektedir. PLC/PRF, SNU449 ve HepG2 hücrelerinde ise cMet miktarı oldukça yüksektir.

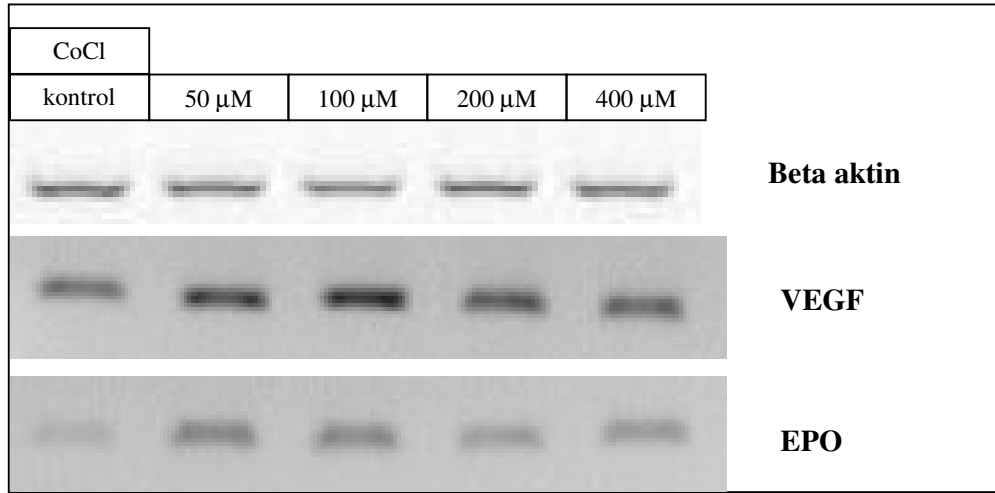
Hif1 α mRNA'sı tüm hücrelerde yaklaşık olarak aynı seviyede bulunmakla beraber sadece Mahlavu hücrelerinde 2 kat kadar daha az miktardadır. HIF transkripsiyon faktörünün hedef genlerinden olan VEGF farklı düzeylerde olmakla beraber tüm hücrelerde saptanmakta ancak EPO geni sadece HepG2, Huh7 ve Hep3B hücrelerinde karşılaştırılabilir miktarda transkribe olmaktadır.

Hücre içi Hif1 α proteini miktarını ayarlayan genlerden PHD1 ve 2 incelediğimiz hücrelerin hepsinde transkribe olmaktadır. PHD3 geninin ise SNU398, Mahlavu ve SK-Hep1 hücrelerinde diğer hücelere göre oldukça düşük transkript miktarına sahip olduğu görülmektedir. F1H geni transkript düzeyi genel olarak tüm hücrelerde bulunmakta ancak düşük miktarda saptanmıştır.

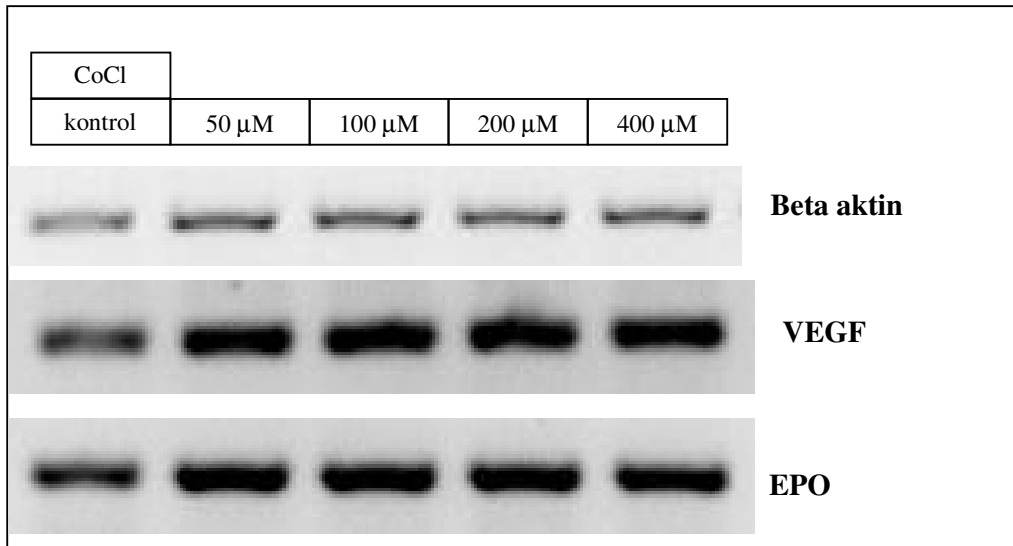


Şekil 14: Hepatosellüler karsinoma hücre dizilerinde mRNA düzeyinde gen ekspresyonu değişimleri.

Hipoksi jarı sistemiyle oluşturduğumuz hipoksi uygulaması ile hücrelerde moleküler düzeyde hipoksi algılamasının gerçekleştiğini ve HIF aktivasyonunun başladığını gösterebilmek amacıyla HIF'in hedef genleri olan VEGF ve Eritropoietin'de transkripsiyon artışını RT-PCR yöntemiyle tanımlamayı amaçladık. Hep3B ve HepG2 hücrelerinde HIF uyarımı sağlamak için kobalt klorit (CoCl) uygulaması ile normoksik koşullarda HIF yıkılımını baskılayarak proteinin hücre içinde birikmesini sağlandı. Hep3B hücrelerinde CoCl uyarımı ile HIF hedefi olan VEGF ve EPO genleri mRNA miktarı artışı Şekil 15'de, HepG2 hücrelerinde ise Şekil 16'da görülmektedir.



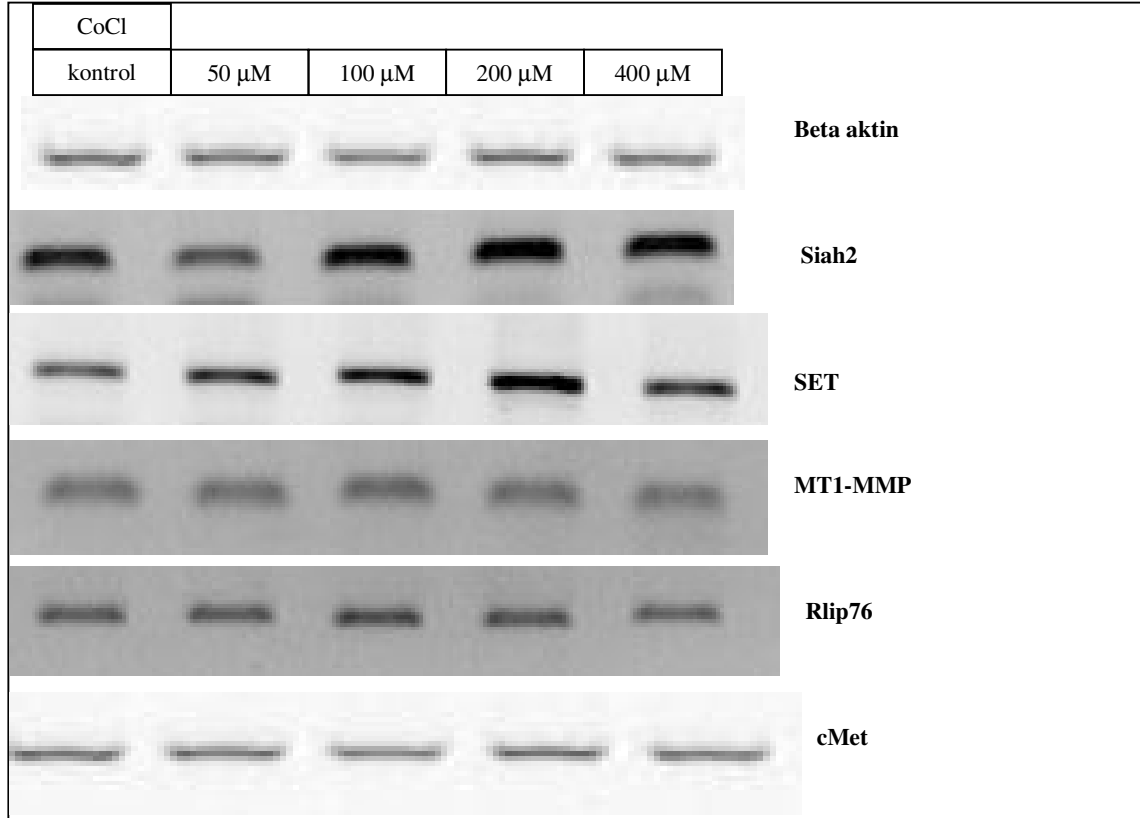
Şekil 15: Hep3B hücrelerinde CoCl ile VEGF ve EPO gen ekspresyonu değişimleri.



Şekil 16: HepG2 hücrelerinde CoCl ile VEGF ve EPO gen ekspresyonu değişimleri.

Hipoksi ile transkripsiyonlarının düzenlendiğini düşündüğümüz diğer hedef genlerin HIF tarafından etkilenip etkilenmediklerini belirlemek için CoCl uygulanmış hücrelerdeki

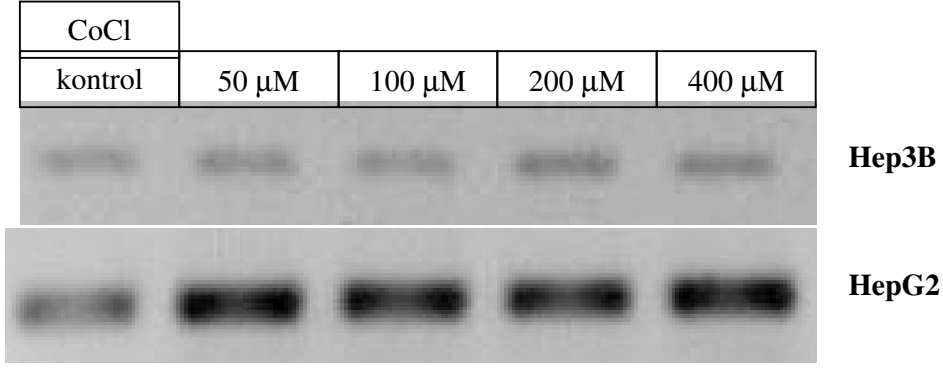
mRNA düzeylerini inceledik. Şekil 17’de görüldüğü üzere Hep3B hücrelerinde CoCl dozuna bağlı olarak Siah2 ve SET genlerinde belirgin ekspresyon artışı gözlemlenmektedir. Ancak membran tip MMP geninde ve Rlip76 transport proteini geninde anlamlı bir ekspresyon değişimi saptanamamıştır.



Şekil 17: Hep3B hücrelerinde CoCl ile hedef genlerde ekspresyon değişimi.

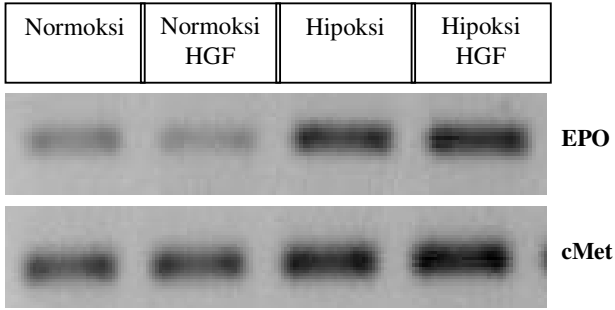
Hep3B hücre dizisinde kobalt uygulamasının HGF’in reseptörü olan c-Met proteini ekspresyonunu mRNA düzeyinde değiştirmedeği görülmektedir (Şekil 17) .

HepG2 hücrelerinin ise kobalt ile uyardığımızda, Hep3B’lerden farklı olarak c-Met mRNA’sını arttırdıkları ortaya çıkmıştır (Şekil 18).



Şekil 18: Hep3B ve HepG2 hücrelerinde CoCl ile cMet geni ekspresyon değişimi.

HepG2 hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrasında cMet geni ekspresyonunun nasıl etkileneceğini belirlemek amacıyla yapılan deney sonucunda cMet'in hipoksi varlığında mRNA düzeyinin arttığı, HGF ile bu değer bir miktar daha yükseldiği gözlenmiştir (Şekil 19).

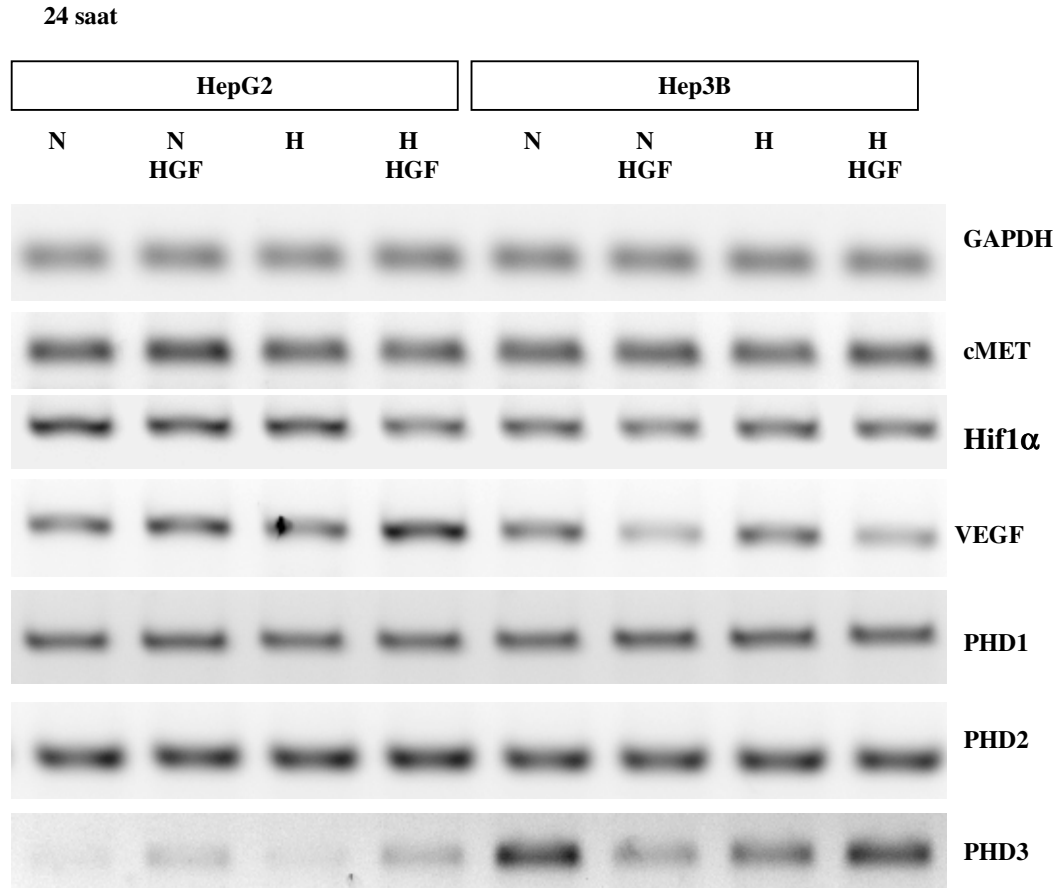


Şekil 19: HepG2 hücrelerinde HGF / Hipoksi ile EPO ve cMet geni ekspresyonu değişimi.

Hep3B ve HepG2 hücrelerinde 24 saatlik hipoksi ve/veya HGF uygulaması sonrasında kontrol genlerinde ve hedef genlerde transkripsiyonel olarak değişim olup olmadığını belirlemek amacıyla yaptığımız deney sonucunda (Şekil 20) hipoksi uygulamasıyla HIF transkripsiyon faktörü proteininin hedefi olan VEGF geni transkripsiyonunda artış olduğu gözlenmektedir. HepG2 hücreleri gerek normoksik gerekse hipoksik koşullarda HGF uyarımı ile VEGF mRNA miktarını artırmaktayken Hep3B hücreleri azalttığı ortaya çıkmıştır. Hif1 α 'nın kendi mRNA düzeyine baktığımızda Hep3B'lerde hipoksi ile düşük seviyede bir

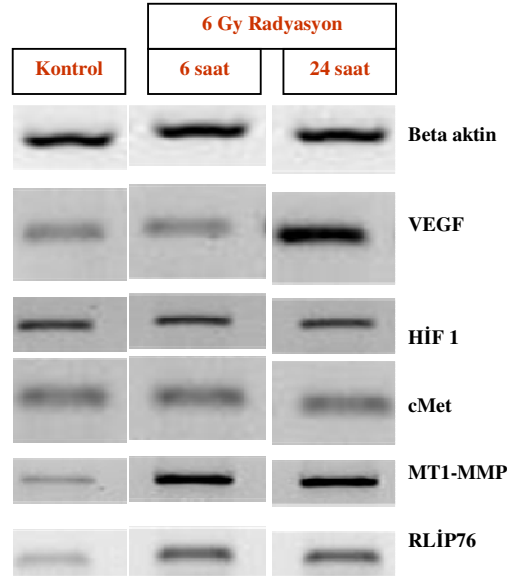
artış olmakta, HepG2 hücrelerinde ise değişim gözlenmemektedir. HGF uyarımı Hep3B hücrelerinin normoksideki Hif1 α transkriptini azaltırken HepG2’lerde değiştirmemektedir. cMet ekspresyonu Hep3B hücrelerinde hipoksiye bağlı değişim göstermemekte ancak HepG2 hücrelerinde HGF ile artmaktadır.

PHD1 ve PHD2 gen transkripsiyonu, hipoksi ve/veya HGF uyarımı varlığı ile incelenen iki hücre dizisinde de değişmemektedirler. HepG2 ve Hep3B hücrelerinde diğer HCC hücre dizilerinde de olduğu gibi gerek PHD1’den gerekse PHD2’den çok daha az miktarda transkriptte sahip olan PHD3 geninde oldukça anlamlı değişimler saptanmıştır. Hipoksi ortamındaki HepG2 hücrelerinin PHD3 transkripsiyonu düzeyi değişmezken Hep3B’lerininki azalmaktadır. HGF uyarımı yapıldığında ise HepG2’lerin PHD3 düzeyi yükselmekte Hep3B’lerinki ise düşmektedir.

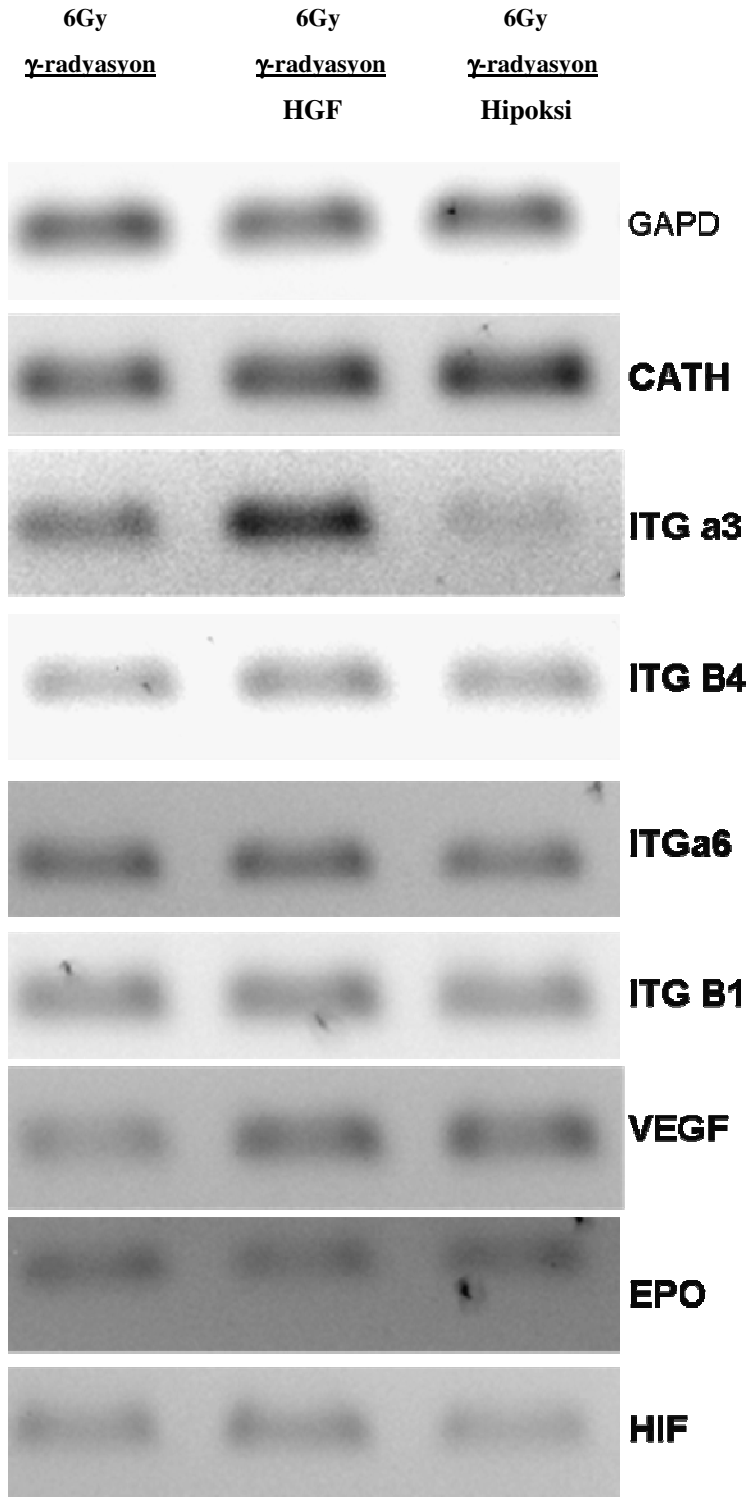


Şekil 20: Hep3B ve HepG2 hücrelerinde 24 saat hipoksi ve/veya HGF uygulaması ile gen ekspresyonu değişimleri.

Hep3B hücre dizisinde radyasyon uygulaması sonrasında ortaya çıkan gen ekspresyonu değişimlerinin tanımlanması amacıyla 6Gy γ -radyasyona maruz bırakılan hücrelerden 6 ila 24 saat sonra elde edilen RNA örnekleriyle RT-PCR çalışması gerçekleştirilmiştir. Hif1 α ve c-Met transkript miktarında γ -Radyasyon uygulaması ile değişim gözlenmemektedir. VEGF, MT1-MMP ve RLIP76 genlerinde ise 6. ve 24. saatlerde belirgin düzeyde artmaktadır (Şekil 21).



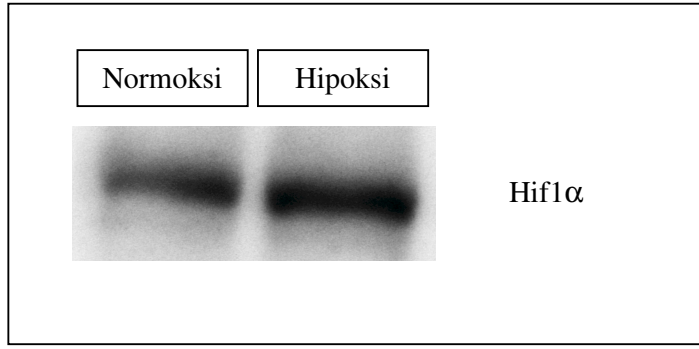
Şekil 21: 6Gy γ -radyasyon uygulaması sonrasında hedef genlerdeki ekspresyon değişimleri.



Şekil 22: 6Gy γ -radyasyon, HGF ve hipoksi uygulaması sonrasında hedef genlerdeki ekspresyon değişimleri.

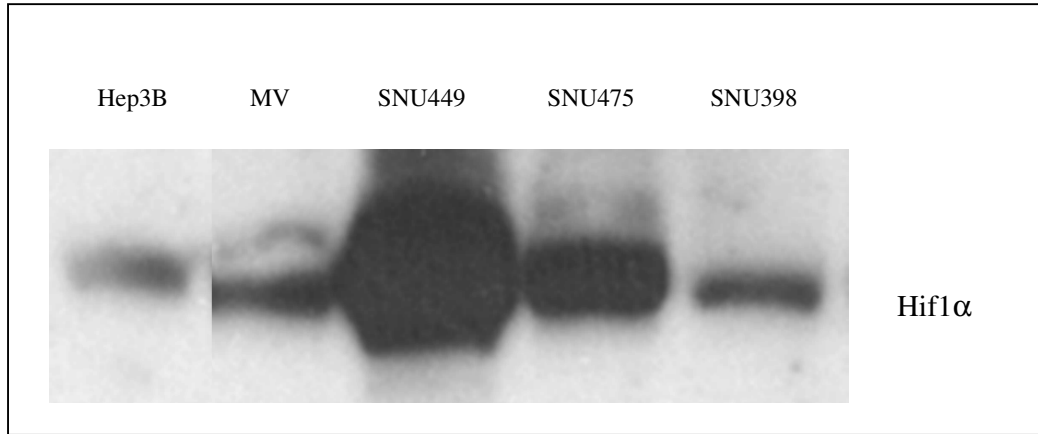
4.5 Western Blot Sonuçları

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz anaerobik jar sistemi ile hücre düzeyinde hipoksik uyarımın gerçekleştiğini ve hipoksinin algılanması ile Hif1 α proteininin yıkılımının engellenmesi sonucu hücre içinde birikimini gösterebilmek amacıyla 24 saat hipoksik jar içinde tutulmuş Hep3B hücrelerinden total protein eldesi yapıldı ve Hif1 α antikoru kullanılarak gerçekleştirilen western blot görüntüsü incelendi. Hif1 α proteini miktarında hipoksi uygulamasına bağlı artış olduğu bununla birlikte normoksik ortamdaki Hep3B hücrelerinin de Hif1 α proteini eksprese ettiği gözlenmektedir (Şekil 23).



Şekil 23: Hep3B hücrelerinde 24 saat hipoksi ile Hif1 α proteini miktar değişimi.

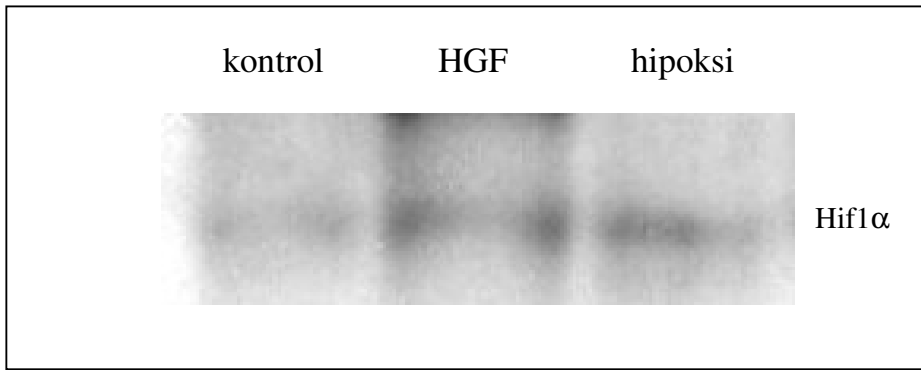
Hep3B hücrelerinde normoksik koşullarda bazal Hif1 α proteini ekspresyonu varlığı saptanınca diğer HCC hücrelerinde de normoksi ortamında Hif1 α proteini miktarları incelendi (Şekil 24).



Şekil 24: HCC hücrelerinde normoksi ortamında Hif1 α proteini ekspresyonu.

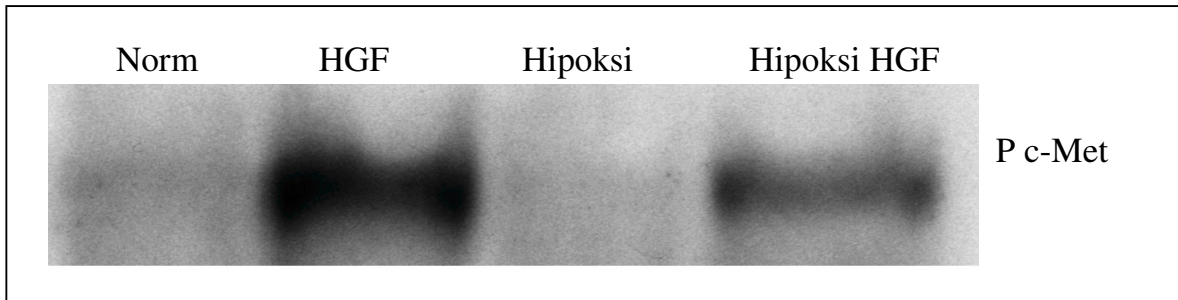
Normoksi ortamında Hep3B hücreleriyle karşılaştırıldığında Mahlavu ve SNU398 hücrelerinin 2-3 kat daha fazla, SNU449 ve SNU475 hücrelerinde ise çok daha yüksek oranda Hif1 α proteinine sahip olduğu görülmüştür.

Hipoksi uygulaması ile Hif1 α proteini birikiminin gerçekleştiğini gösterdikten sonra HGF uyarımının Hif1 α protein miktarını nasıl etkilediğini araştırdık. Hep3B hücrelerini 6 saat süreyle HGF uyarımına veya hipoksiye maruz bıraktık. Hipoksi ile Hif1 α proteini miktarının arttığını, normoksik koşulda HGF uyarımına bağlı olarak da Hif1 α proteininin biriktiğini gözlemledik (Şekil25).



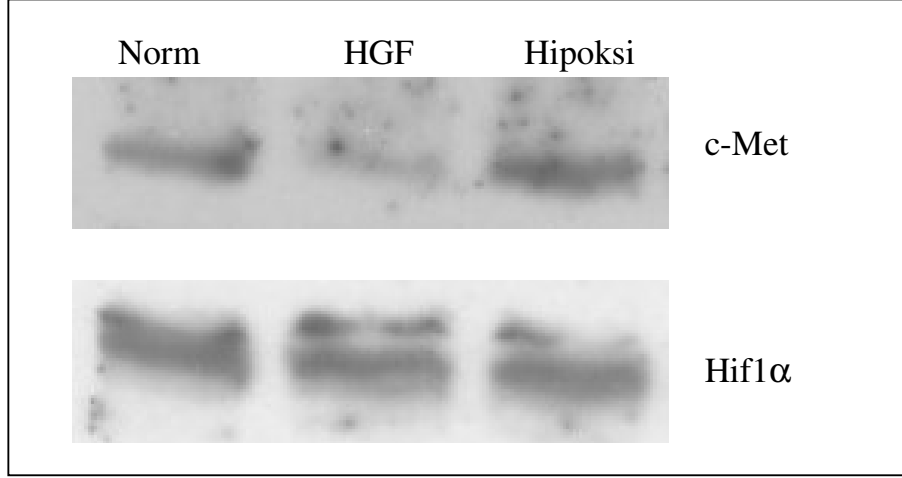
Şekil 25: Hep3B hücrelerinde 6 saat hipoksi ve HGF uyarımı ile Hif1 α proteinleri miktar değişimleri.

Hep3B hücrelerinde hipoksi ve HGF uyarımlarının c-Met reseptör proteini tirozin fosforilasyonu üzerindeki etkisini incelediğimizde, HGF uyarımı ile gerek normoksik gerekse hipoksik koşullarda reseptörün fosforillendiğini ancak bu fosforillenmenin hipoksi ortamında normoksiye göre daha düşük seviyede kaldığını saptadık (Şekil 26).



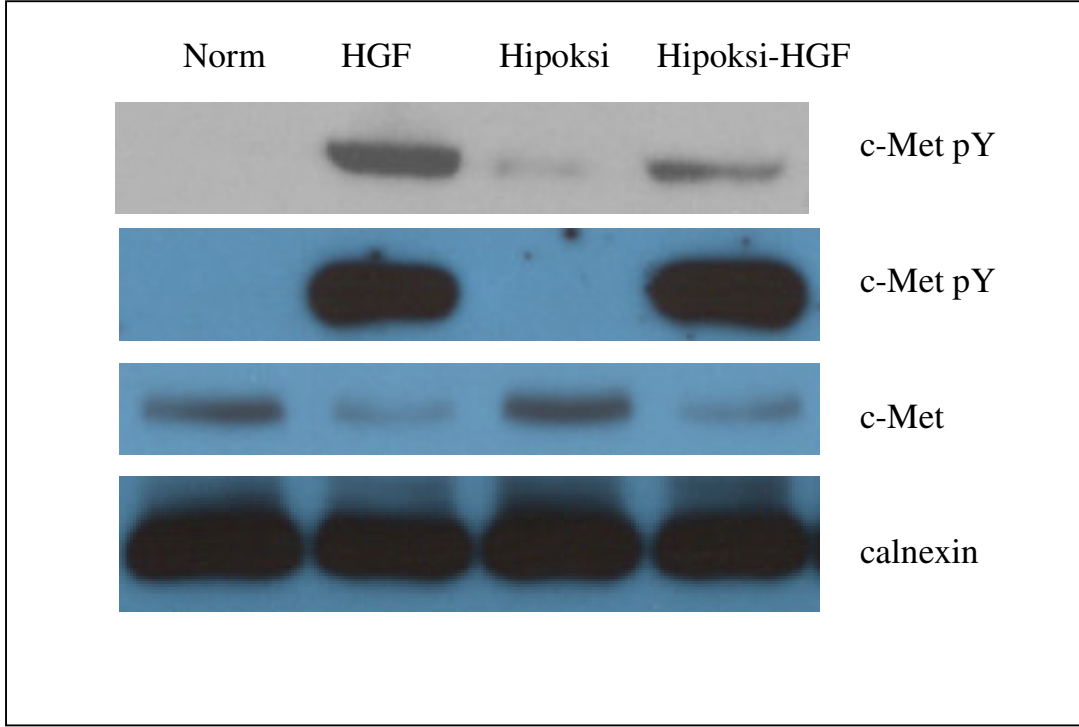
Şekil 26: Hep3B hücrelerinde 6 saat hipoksi ve/veya HGF uygulaması ile cMet proteini fosforilasyonu değişimi.

Huh7 hücrelerini kullanarak gerçekleştirdiğimiz deneylerde de hipoksi uygulaması ile Hif1 α protein miktarının arttığını gözlemlendi. Huh7'lerdeki c-Met protein miktarının HGF uyarımı sonrasında azaldığı, hipoksi uygulaması sonrasında ise arttığı belirlendi (Şekil 27).



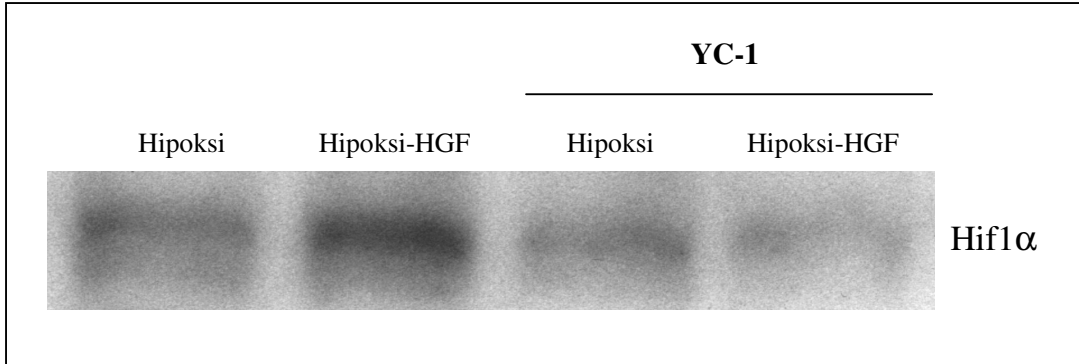
Şekil 27: Huh7 hücrelerinde 24 saat hipoksi ve HGF uygulaması ile cMet ve HIF proteini miktar değişimi.

Hipoksi ortamındaki Huh7 hücrelerinde, Hep3B'lerden farklı olarak c-Met reseptör fosforilasyonun arttığı saptandı (Şekil 28). Bununla beraber hipoksik ortamda HGF uyarımı sonucu oluşan c-Met fosforilasyonu seviyesi, Hep3B hücrelerinde de gözlemlendiği gibi, normoksik ortamdaki HGF uyarımıyla elde edilen değerden daha düşük seviyede idi.



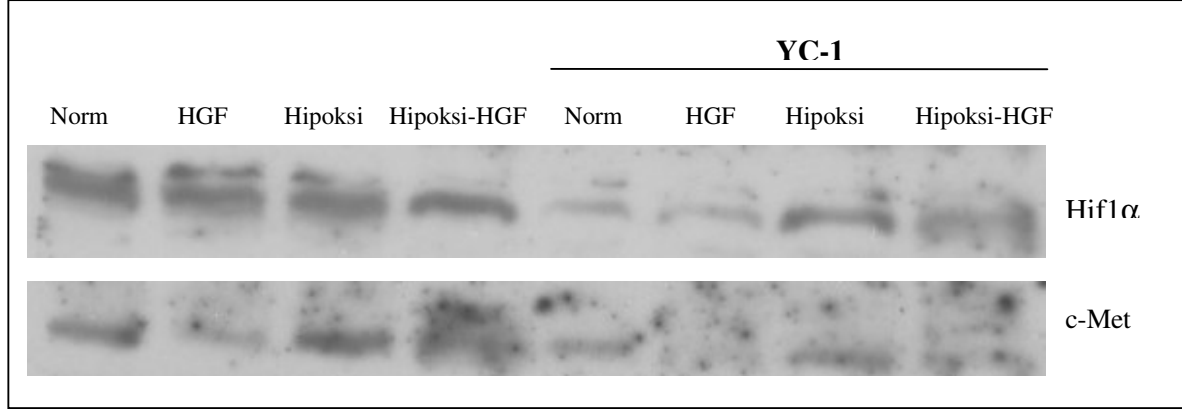
Şekil 28: Huh7 hücrelerinde 6 saat hipoksi ve HGF uygulaması ile fosfo cMet proteini ve total cMet proteinleri miktar değişimi. (Calnexin proteini, eşit yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.)

HİF proteini inhibitörü olarak tanımlanan YC-1 molekülü kullanarak yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz ekspresyon değişimlerinin ne oranda HİF bağımlı olduğunu araştırdık. Hep3B hücrelerinde, hipoksi veya HGF uyarımından 5 dakika önce kültür ortamına HİF proteini birikimini engelleyecek YC-1 molekülünü eklediğimizde Hif1 α protein bandının küçüldüğünü gördük. YC-1 uygulanan hücrelerde HGF uyarımı ile gerçekleşen Hif1 α birikimi de engellenmekteydi (Şekil 29).



Şekil 29: Hep3B hücrelerinde YC-1 varlığında, 6 saat hipoksi ve HGF uygulaması ile Hif1 α proteini miktar değişimi.

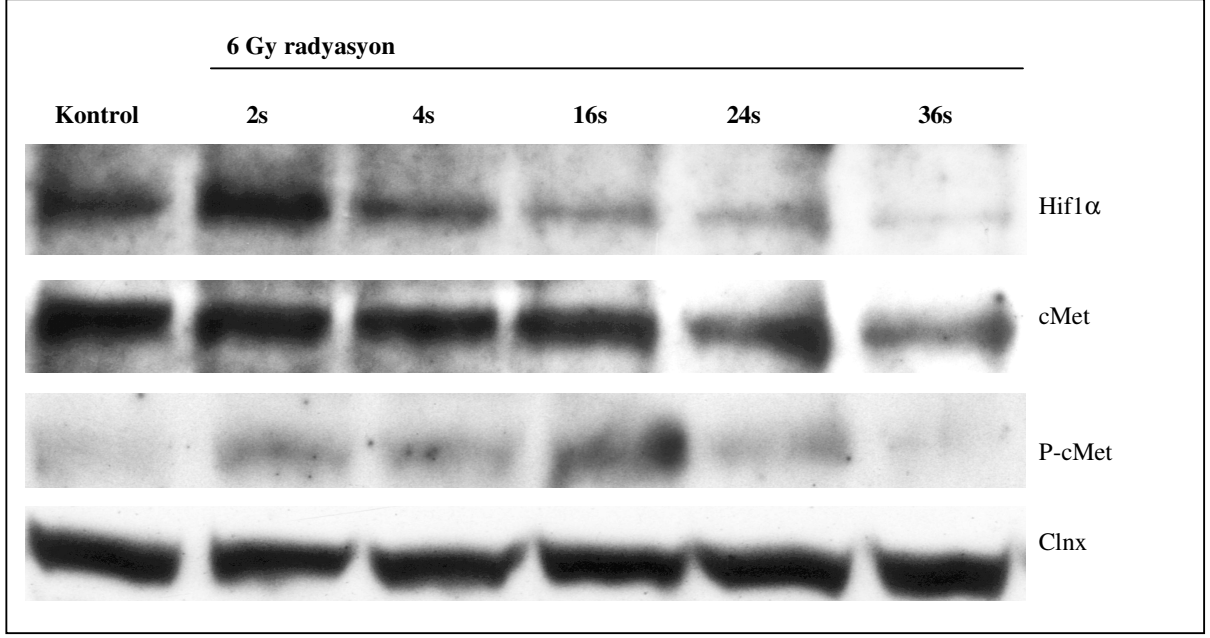
Huh7 hücreleri de gerek normoksi gerekse hipoksi ortamında YC-1 inhibitörü ile Hif1 α proteini miktarını azaltmaktaydı (Şekil 30).



Şekil 30: Huh7 hücrelerinde YC-1 varlığında hipoksi ve HGF uygulaması ile Hif1 α ve c-Met proteini miktar değişimi.

Huh7 hücrelerinde hipoksi uygulamasıyla meydana gelen c-Met reseptör proteini miktarı artışı YC-1 varlığında azalma gösterdi. Normoksi ortamında Huh7 hücrelerinin sahip olduğu bazal c-Met proteini miktarı da YC-1 ile düşmekteydi (Şekil 30).

Radyasyon stresine verilen yanıtta Hif1 α ve c-Met proteinlerinin nasıl değişimler gösterdiklerini belirlemek için 6Gy γ -radyasyon uygulamasını takiben 24 saat içinde elde edilen protein örnekleriyle blotlamalar gerçekleştirildi (Şekil 31).



Şekil 31: Hep3B hücrelerinde 6Gy γ -radyasyon uygulaması sonrası fosfo c-Met , total c-Met ve HIF proteinleri değişimi. (Calnexin eşit yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.)

Hep3B hücreleri 6Gy γ -radyasyon uygulamasından sonraki ilk 2 saat içinde Hif1 α proteini miktarını 2 kat kadar artırdılar bundan sonra ise Hif1 α miktarı hızla düşmeye başladı ve 16. saten itibaren Hif1 α protein seviyesi kontroldeki değerin de altına indi. Özellikle 24 ve 36. saatlerde çok belirgin bir azalma gözlemlendi.

HGF reseptör proteini c-Met miktarı radyasyon uygulaması sonrasındaki ilk 24 saat içinde değişim göstermezken 36. saatte kontrolün yarısı kadar azaldı. c-Met'in fosforilasyon durumuna baktığımızda radyasyondan sonra 24 saat içinde fosforilasyon artışı olmakla beraber özellikle 16. saatte anlamlı bir artış meydana geldi.

5.TARTIŞMA

Hepatosellüler karsinoma (HCC) hepatit virüslerine bağlı enflamasyon ve siroz zemininde ortaya çıkan, zamanla hipoksik strese bağlı anjiyogenik sürecin başladığı ve ileri evrelerinde iyi vaskülarize olmuş, farklılaşmasını yitirmiş invazif karakterdeki hücelere sahip kötü prognozlu bir hastalıktır^{5,10}. Karaciğer dokusunda karsinoma gelişim sürecini anlamaya yönelik olarak yapılan çalışmalar, günümüzde sadece etiyolojik faktörlerin genom üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlamakla yetinmemektedir^{15, 100}. Karsinogenez süreci içinde oluşan ve sürekli değişmekte olan hepatik mikroçevrenin, karaciğer dokusu içindeki tüm hücre gruplarında nasıl etkiler oluşturduğunu, hücreler arasında ne gibi karşılıklı etkileşimlere neden olduğunu ve bu olayların karaciğer fonksiyonlarının idamesi ile bağlantılı olarak hastalardaki sağ kalım beklentisini ne derecede değiştirdiğini belirlemeyi de amaçlamaktadır^{101,102}.

Karaciğerde siroz ve HCC gelişimi öncesinde gerek sitokinler ve ROR gerekse büyüme faktörleri açısından zengin, hipoksi-reoksijenasyon döngülerinin yaşandığı bir ortam olduğu tanımlanmaktadır²³. Böyle bir mikroçevre içinde var olan HCC dokularında, hipoksik ortamın etkisiyle ekspresyon birçok proteinin düzeyinin arttığı veya azaldığı belirlenmiştir^{103,104}. Bu proteinler arasında özellikle büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri yer almaktadır¹⁰⁵. Anjiyogenik yanıtın oluşması açısından da büyük öneme sahip olan büyüme faktörlerinin sinyal ileti yollarında yer alan ya da bu yollar tarafından düzenlenen proteinlerin, karsinogenez süreci sonrasında invazif ve metastatik karakterin kazanılmasına neden olduğu ve hastanın sağ kalım süresini kısalttığı ortaya çıkmıştır²¹. Klinik çalışma sonuçları, HCC tedavisine yanıtın düzenlenmesinde de benzer proteinlerin etkisiyle, hastaların yanıtızsızlık ve direnç gelişimi problemleriyle karşı karşıya kaldığını ortaya koymaktadır^{22,23}.

Hepatosellüler karsinoma tedavisi ve prognozu açısından hedef oluşturabilecek moleküllerin saptanabilmesi amacıyla *in vitro* koşullarda hücre dizileriyle yapılan çalışmalarda büyüme faktörlerinin ekspresyon düzeyi değişimleri ve hipoksi uygulaması ile bu proteinlerin nasıl etkilendiği araştırılmaktadır¹⁰⁶. Hücre sağ kalımı, farklılaşma derecesi, motilite ve invazyon gibi davranışların söz konusu proteinler tarafından nasıl etkilendiği ve düzenlendiği günümüzde en çok çalışılan araştırma alanları olarak karşımıza çıkmaktadır^{107,108}. Ancak bu alanda henüz yanıtlanamamış pek çok soru vardır. Bu nedenle çalışmamızda hepatosellüler hücre dizilerinin hipoksi ve radyasyon stresi uygulamasına nasıl yanıt verdikleri, bu yanıtların ortamda karaciğer gelişiminde çok önemli bir rol oynayan

HGF/c-Met sinyal ileti yolağından nasıl etkilendikleri incelenmiştir. Bu amaçla 9 farklı HCC hücre dizisi kullanılmıştır. Bu hücrelerde hipoksi hedef genler ve hipoksi tarafından uyarılan biyolojik yanıtların incelenmesine yönelik gerçekleştirilen ön çalışmalar sonrasında çalışmalara HepG2, Huh7 ve Hep3B hücre dizileri ile sürdürülmüştür.

Hep3B hücrelerinde hipoksi uygulaması sonrasındaki erken dönemde hücre canlılığında değişim gözlenmemiştir. Hipoksiye maruz bırakılan HCC hücre dizilerinde, sağ kalım açısından değişim gözlenmemesinin nedeninin hipoksi oluşturmak amacı ile kullandığımız anaerobik jar sisteminde yeterli hipoksik ortam sağlayamamış olmamız olabilir. Her ne kadar sistemde kullanılan indikatör ortamda hipoksi oluştuğunu gösteriyor olsa da çalışmamızın sürdürülmesi için hücresel düzeyde yeterli seviyede hipoksik ortamın oluşturulduğunu, hipoksinin moleküler düzeyde algılandığını ve yanıt verildiğini kanıtlamak gerekmektedir. Bu nedenle hipoksik ortamın oluştuğunun ve hücrelerin hipoksiyi algıladığının en önemli belirteci olan Hif1a ekspresyonu incelendi. Bu deneylerde, Hif1a mRNA ve protein düzeyinde artış olduğu gösterildi (Şekil 20 ve 23). Buna ek olarak HIF1 transkripsiyon faktörü proteininin hedef genleri olan VEGF ve EPO'da da mRNA düzeyleri değerlendirildi ve hipoksi uygulanmasına bağlı olarak bu hedef genlerin ekspresyonunda artış olduğu saptandı (Şekil 19 ve 20). Bu veriler hipoksik jar sisteminde, hücrelerin hipoksi uygulamasını algıladıkları, transkripsiyon ve protein miktar değişimi ile bu hipoksi uyarımına yanıt verdiklerini ortaya koymuştur.

Hipoksi uygulamasının hücresel düzeyde algılandığının tanımlanmasını takiben, HCC hücrelerinde HGF/c-Met sinyal yolağının hipoksi varlığından nasıl etkilendiği incelenmiştir. Bunun için önce HGF'in hücre membranında yerleşik reseptörü olan c-Met'in, hipoksik ortamdaki mRNA ve protein düzeyi değişimleri araştırılmıştır. Literatürde c-Met geni promoter bölgesinde, HIF1 proteininin bağlanabileceği HRE sekanslarının bulunduğu saptanmış olduğundan⁸², HIF1 proteininin aktive olduğu hipoksik koşulda c-Met geni transkripsiyonunun da değişeceği öngörülmüştür¹⁰⁹. Elde edilen veriler, HCC hücre dizileri arasında, hipoksiye bağlı olarak ortaya çıkan c-Met geni ekspresyonu değişiminde farklılıklar olduğunu göstermiştir. Huh7 ve HepG2 hücrelerinde hipoksi cMet protein ve mRNA miktarını artırmaktayken Hep3B hücrelerinde transkript miktarını değiştirmediği saptanmıştır (Şekil 17, 18, 19).

Hipoksi tarafından uyarılan cMet ekspresyonunun HIF1 aracılıklı olup olmadığını incelemek için normoksik ortamdaki hücre içinde Hif1 α proteininin aktive olmasını sağlayan ve HIF1'in proteozom sisteminde yıkılmasını engelleyen kobalt klorit (CoCl) molekülü uygulaması kullanılmıştır. Hep3B ve HepG2 hücrelerinde CoCl uygulaması sonrasında

HIF1'in aktive olarak, hedefi olan VEGF ve EPO genleri transkripsiyonunu artırdığı belirlenmiştir (Şekil 15 ve 16). Buna karşın c-Met mRNA düzeyinin HepG2'lerde yükselirken Hep3B'lerde değişmediği belirlenmiştir (Şekil 18). HCC hücrelerinde gerek hipoksi gerekse CoCl uygulaması ile HIF1 proteini aktivasyonu sağlandığı ve hücre tipine göre farklılık göstermediği kanıtlandıktan sonra, hücrelerde c-Met geni transkripsiyonu açısından elde edilen yanıt farklılıklarının, aktif HIF1 transkripsiyon faktörünün uyarımı sonrasındaki süreçten kaynaklanabileceği düşünüldü.

HIF1 proteininin, aktivasyonu sonrasında farklı HCC hücre dizilerinde farklı yanıtlara yol açabildiğini düşündüren bu veriler, çalışmaları bu hücrelerde HIF1 aktivasyonu düzenleyen moleküllerde farklılıkların olabileceğine yönlendirdi. Normoksik ortamda hücre içinde sentezlenen Hif1 α proteininin proteozom sistemi aracılığıyla yıkılması, başlıca HIF1 düzenleme mekanizması olduğu bilinmektedir³². Üretilen Hif1 α , PHD hidroksilaz enzimlerince işaretlenerek proteozom sistemine sunulduğundan, bu enzimlerin fonksiyonunda meydana gelebilecek değişimler Hif1 α düzenlenmesi açısından anlamlı farklılıklar oluşturabileceği düşünüldü. HIF1 transkripsiyon faktörü proteini, aktive olduktan sonra negatif geri besleme mekanizmasıyla PHD genleri ekspresyonunu artırdığı için Hif1 α düzenlenmesindeki farklılıkların tanımlanmasında uygun hedefler olabileceği öngörüldü¹⁰. Bu öngörüden yola çıkılarak HCC hücre dizilerinin PHD1, PHD2 ve PHD3 enzimleri mRNA ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırıldı.

Bu çalışma sonucunda incelenen tüm HCC hücre dizilerinde PHD1 ve PHD2 transkripti bulunduğu, PHD3'ün ise diğer ikisine oranla daha düşük seviyede eksprese olduğu gözlenmiştir (Şekil14). SK-Hep1 ve SNU398 hücrelerinde PHD3 geni eser miktarda eksprese edilmektedir. PHD2 geni transkripsiyonu seviyesinde hipoksi veya HGF uyarımı ile anlamlı bir değişim olmadığı ancak PHD1 ve PHD3 genleri transkripsiyonunun bu koşullarda yeniden düzenlendiği belirlenmiştir. HepG2 hücrelerinde hipoksi uygulamasının PHD1 ve PHD3 üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmazken, Hep3B hücrelerinde hipoksi PHD3 transkripsiyonunu azaltmaktadır (Şekil 20). HGF ile uyarım yapıldığında bu iki hücre dizisinin yanıtlarının birbirine tümüyle ters olduğu saptanmıştır: PHD3 transkripsiyonu HepG2 hücrelerinde artarken Hep3B'lerde azalmaktadır. Bu veriler aktive edilmiş Hif1 α proteininin kendi kendisinin etkilerini sınırlayacak negatif geri besleme yolağını HepG2 hücrelerinde çalıştırabildiğini, Hep3B hücrelerinde ise çalıştıramadığını düşündürmektedir. Hücreler arasındaki bu farklılığın HIF1'e bağlanan diğer transkripsiyon faktörlerinden

kaynaklanabileceği gibi stres yanıtını düzenleyen p53 proteini gibi faktörlerin aktivasyonuna da bağlı olabileceği düşündürmektedir.

Stres yanıtının düzenlenmesi açısından anahtar role sahip p53 proteininin HepG2 hücrelerinde normal iken Hep3B dizisinde delete olması, bu hipotezi desteklemektedir, ayrıca hücrelerin hipoksik stres nedeniyle sağ kalımlarının değişmemesini de açıklayabilecek mekanizmalardan biri olabilir¹¹⁰. p53 proteininin Hep3B hücrelerinde yeniden ekspresyonunun sağlanmasıyla, PHD ekspresyonlarının ve hücre canlılığının nasıl etkilendiği ve hücrelerin hipoksi uygulamasına nasıl yanıt verdikleri araştırılabilir. Olası bir diğer mekanizma da hipoksik stres uygulaması ile aktive olarak hücre sağ kalımını düzenleyen PI3K/AKT yolağının aktivasyon durumudur. Hep3B hücre dizisinde bazal koşullarda AKT proteininin inaktif olduğu belirlenmiştir (Kunter İ. , Erdal E. , yayınlanmamış veri). Hipoksi uygulamasının Hep3B hücrelerini stresten koruyacak düzeyde AKT aktivasyonuna neden olup olmadığının belirlenmesi, çalışmamız süresinde gözlenen hipoksi direncinin açıklanabilmesi açısından önemli bir hedef oluşturmaktadır.

Hipoksi ortamındaki HCC hücrelerinde elde ettiğimiz veriler, HIF1 transkripsiyon proteini miktarının artışı ve transkripsiyonel olarak aktif hale geçtiğini ortaya koymaktadır. Bilindiği gibi bir transkripsiyon faktörü olan HIF1 hedef genlerinin promotör bölgelerindeki HRE dizisine bağlanarak bu genlerin ekspresyonlarını değiştirmektedir¹¹¹. Çalışmamızın bu aşamasında, promotörlerinde aktif haldeki HIF1'in bağlanabileceği HRE bölgesini taşıyan bazı hedef genlerin incelenmesine karar verildi. Hep3B hücrelerinin CoCl ile muamele edilmesiyle HIF1 proteini aktivasyonu sağlanmış ve bu koşulda HIF1 hedef genlerinden Siah2, SET, MT1-MMP ve Rlip76 transkriptlerindeki değişimler incelenmiştir.

Hedef genlerin birincisi olan SET, hücre içinde Protein Fosfataz IIA (PP2A)'nın inhibitörü olarak görev yapmaktadır¹¹². Örneğin Protein Kinaz C (PKC) ve PI3K tarafından serin fosforile hale getirilen proteinlerin PP2A tarafından de-fosforile edilmesi hücre içindeki sinyal ileti yollarının düzenlenmesinde önemli bir basamak oluşturmaktadır¹¹³. Bu noktada SET proteini, PP2A'yı inhibe ederek PKC ve PI3K tarafından oluşturulan sinyalin idame ettirilmesini sağlamaktadır¹¹⁴. SET'in hücre içindeki bu rolünün, kemoterapötiklere karşı direnç gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir¹¹⁵. Özellikle BCR-ABL füzyon proteinine sahip KML hastalarında, imatinib tedavisine karşı direnç gelişimi, SET proteini ekspresyon artışı ile açıklanmaktadır¹¹⁶. Hep3B hücrelerinde elde ettiğimiz sonuçlar SET geni transkripti miktarının HIF1 aktivasyonu ile artmakta olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 17). Bizim bilgilerimize göre, bu güne kadar literatürde SET proteininin hipoksi uyarımı veya HIF1 protein aktivasyonu ile ilişkisine dair herhangi bir veri tanımlanmamıştır. Dolayısıyla

hipoksi ortamında hücre sağ kalımını devam ettiren PI3K / AKT yolağının düzenlenmesinde rol alan SET proteini ekspresyonunun, HCC hücrelerinde HIF1 tarafından artırıldığı verisinin, gerek karsinogenez süreci gerekse tedavi uygulamaları açısından değerli olabilir. Gelecekte bu etkinin PI3K-Akt yolağı ile ilişkili olup olmadığını incelemeye yönelik deneylerin yapılması planlanmıştır.

Bir diğer hedef gen olan SIAH2 bir ubiquitin ligazdır¹¹⁷. WNT sinyal yolağındaki düzenleyici fonksiyonuyla hepatosellüler karsinoma gelişiminde rol almasının yanında HIF1 protein miktarını da düzenleyerek hipoksi yanıtını etkilemektedir¹¹⁸. PHD3 enziminin proteozom sistemi tarafından yıkılması Siah2 aracılığıyla gerçekleşmektedir ve bu sayede Siah2 enzimi hücre içinde HIF1 birikimini kolaylaştırıcı etki göstermektedir¹¹⁹. Siah2 geni transkriptinin hipoksida arttığı bildirilmiştir ancak bu artışta HIF1'in olası rolüne ilişkin bir veri bulunmamaktadır^{120,121}. Elde ettiğimiz veriler Hep3B hücre dizisinde CoCl uygulaması ile Siah2 transkriptinin arttığını göstermektedir (Şekil 17). Bu sonuç Siah2'nin Hep3B hücrelerinde, HIF1 aracılı hipoksi yanıtının sınırlandırılmasını sağlayan negatif geri besleme mekanizmasının bir üyesi olduğunu düşündürmektedir. Bu veriyi bu hücrelerde hipoksi uygulamasına bağlı PHD3 transkripsiyonunda azalma olması da desteklemektedir. Her ne kadar literatürdeki veriler SIAH2 aracılıklı PHD3 yıkımının protein düzeyinde regüle edildiğini gösteriyor olsa da verilerimiz buna ek transkripsiyonel bir düzenlenme olabileceğini de düşündürmektedir.

Hep3B hücrelerinde CoCl uyarımıyla ekspresyon değişimini incelediğimiz genlerden biri de membran tip 1 metalloproteinazdır (MT1-MMP). Hücre dışı matriksin yıkılmasına yardımcı olan MT1-MMP proteini ekspresyonunun artışı embriyogenez, anjiyogenez, miyokard yeniden-düzenlenmesinde olduğu gibi meme kanseri, glioma ve HCC'de de invazif fenotipin kazanılmasını sağlayan proteinlerden biridir¹²². HIF1 proteininin CoCl ile aktive edildiği Hep3B hücreleriyle yapılan deneylerde MT1-MMP geni transkriptinin minimal düzeyde arttığı belirlenmiştir (Şekil17). Literatürde de MT1-MMP'yi HIF transkripsiyon faktörüyle ilişkilendiren veya hipoksi uygulamasıyla ekspresyonunun düzenlendiğini bildiren veriler bulunmaktadır^{123,124}. Bu sonuçlara bağlı olarak MT1-MMP geni Hep3B hücrelerinde de HIF1 aracılı invazif karakterin ortaya çıkmasında rol oynayan önemli proteinlerden biri olarak değerlendirilebilir. Bu veri hipoksiye bağlı olarak tanımladığımız hücre invazyonundaki artışta (Şekil 12) MT1-MMP artışının rol oynayabileceğini de düşündürmektedir. Hipoksi uygulaması ile uyarılan sinyal ileti yollarının, HIF1 ve buna bağlı olarak MT1-MMP genleri ekspresyonunda artış yapması, çoğunlukla ileri evre ve tedaviye

dirençli HCC dokularında gözlenen bu özelliklerin, karsinoma ilerlemesi sürecinde nasıl kazanıldığını açıklayacak mekanizmalardan biri olarak kabul edilebilir.

Hep3B hücrelerinde, HİF1'in hedefi olabileceği düşünülen dördüncü gen RLİP76'dır. Gerek hipoksi/reoksijenasyon tepkimeleri sonrasında gerekse radyasyon uygulaması sonrasında sitoplâzmadaki ortaya çıkan toksik molekülleri hücre dışına atan RLİP76 transport proteini, hücre sağ kalımı açısından büyük role sahiptir¹²⁵. Hücre içindeki oksijen radikallerini ve enolonları olduğu kadar doksorubisin gibi ilaçları da dışarıya pompalamakta, kemo ve radyoterapiye direnç kazanılmasına neden olmaktadır¹²⁶. Deney sonuçlarımız bu genin transkripsiyonunun da CoCl uygulaması ile HİF1 tarafından artırıldığını göstermektedir (Şekil 17). Bu veri Hep3B hücrelerinde hipoksi stresinin hücre canlılığını neden değiştirmediğini açıklamada önemlidir. Stres koşullarındaki HCC hücrelerinin canlılıklarını sürdürebilmeleri açısından ihtiyaç duyabilecekleri proteinlerden biri olan RLİP76'nın karaciğer dokusundaki ekspresyon durumunu veya HCC gelişimindeki rolünü gösteren literatür verisi bulunmamaktadır. Bu açıdan elde edilen RLİP76 ekspresyon verileri, gerek vücut içinde oluşan gerekse dışarıdan alınan toksik moleküllerin metabolitlerine parçalandığı, bunun sonucunda da çok çeşitli yan ürünlerin açığa çıktığı karaciğer dokusunda, HCC gelişimi mekanizmasının açıklanmasına yardımcı olabilecek önemli aday moleküllerden biridir.

Bu noktaya kadar elde ettiğimiz sonuçlar hipoksi ortamındaki HCC hücrelerinde canlılığın korunabildiğini, bunu sağlamak için de HİF1 proteini aracılığıyla SET, Siah2, RLİP76 gibi genlerde ekspresyonel değişimler gerçekleştiğini belirtmektedir. HCC gelişimi sürecinde hepatositlerin içinde buldukları ortam hücrelerin sağ kalmalarını sağlayacak bu mekanizmaların aktif olmasını gerektirirken aynı zamanda hayatta kalan hücrelerin daha malign karakter sergilemelerine de neden olmaktadır. Hücre davranışlarındaki değişimleri bu açıdan da inceleyebilmek amacıyla, çalışmanın devamında HCC hücrelerinin hareketliliklerinde ve invazyon yeteneklerinde ne gibi değişimler olduğunun ortaya koyulması hedeflenmiştir.

HCC gelişiminin erken dönemlerinde hepatositlerde yoğun bir çoğalma hızı artışı gözlenirken ileri aşamalarda bu hızın görece azaldığı buna karşılık hücrelerin motilite, invazyon yeteneklerinin arttığı tanımlanmıştır. Dolayısıyla motilitenin artması ve hücrelerin çevre doku içine invazyon yapabilmeleri, kanserin ileri evrelerinde daha belirgin olarak gözlenmekte, hastalar açısından ise kötü prognozu işaret etmektedir. Bu nedenlerle HCC hücrelerinin mikroçevreye bağlı olarak hipoksi veya HGF uyarımı gibi faktörlerle hareketliliklerinin hangi proteinler aracılığıyla düzenlendiğinin belirlenmesi önemlidir.

Boyden odacık yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen motilite deneyleri sonucunda, Hep3B hücrelerinin HGF ile uyarılmaları halinde hareketliliklerinin yüksek düzeyde arttığını göstermektedir, bu artış hipoksi ortamında da gözlenmiştir (Şekil 10). Hücrelerdeki motilite yanıtını düzenleyen PI3K-AKT-Rac proteinleri sinyal yolağının, HGF/c-Met aktivasyonuna bağlı olarak uyarıldığı bilinmektedir^{127,128}. Bu bağlantının gerçekleştiği, Hep3B hücre dizisi de dahil pek çok HCC hücre hattında HGF uyarımı sonrasında AKT proteininin aktif hale geçtiğinin saptanmış olmasıyla açıklanabilir(Kunter İ, Çokaklı M, Atabey N, Erdal E, yayınlanmamış veri). Huh7 hücreleriyle gerçekleştirilen deneylerde, hipoksi uygulamasının c-Met reseptör proteininde fosforilasyonu artırarak, motilite yanıtını dolaylı olarak c-Met aktivasyonu ile sağladığını düşündürmektedir (Şekil 28). Ancak bu yanıtın varlığı Hep3B hücrelerinde değerlendirilememiştir. Hipoksi uyarımı, c-Met'den bağımsız olarak da AKT'ı aktive etmiş olabilir^{129,130}. Bu yorumu destekleyecek hipoksi aracılı AKT aktivasyonuna dair elimizde veri bulunmamakla beraber, AKT uyarımının devam etmesini sağlayan SET geninde HIF1 aracılı artış gözlemlenmiş olması, diğer bir mekanizmanın var olabileceğini düşündürmektedir. SET proteininin Rac aracılı motilite davranışının düzenlenmesinde rolü olduğuna yönelik yayınlar bu olasılığı desteklemektedir¹³¹. Hücre motilitesinin HGF ve hipoksi uyarımlarının birlikte olduğu durumda daha da artmış olması, bu iki sistemin motilite yanıtı oluşturma açısından birbirini desteklediğini göstermektedir. HepG2 hücreleriyle yapılan başka çalışmalar da benzeri bulgular ortaya koymuştur⁸².

Motilitesinin arttığını gördüğümüz Hep3B hücrelerinde matrijel ile kaplı invazyon kuyucuklarıyla yapılan deneyler benzer sonuçlar vermiştir. HGF uyarımı gerek normoksi gerekse hipoksi ortamında invazyonu artırmaktadır (Şekil 12). Tek başına hipoksi uygulaması halinde de invazyon artmakta ve motilitede olduğu gibi iki koşul birlikteyken birbirinin etkisini daha da yükseltmektedir. Gerek HGF gerekse hipoksi uyarımının, invazyonun gerçekleşmesi için matrijel tabakasının yıkılmasını sağlayacak MMP enzimlerini aktive ettiği bilinmektedir^{132,133,134}. Daha önce belirttiğimiz üzere MT1-MMP geni ekspresyonunda gerçekleşen artış da invazyon artışından sorumlu olabilir. Bunlara paralel olarak hipoksi ile VEGF geni ekspresyonunun artması (Şekil 20), hücrelerde VEGF reseptörü uyarımına ve bu sinyal sistemi aracılığıyla da invazyon yanıtı oluşumuna katkıda bulunuyor olabilir^{40,41}. VEGF'nin sadece motilite ve invazyonu değil, aynı zamanda anjiyogenezi de artırdığı düşünülürse, HCC hücrelerinde hipoksi ortamında VEGF ilişkili uyarımın da büyük rolü olacaktır⁴².

HCC dokularında yeterli damarlanmanın var olması maligniteyi artıran faktörlerden biri olarak değerlendirilmektedir¹³⁵. Hastalık prognozunun ve tedavi sonrası tekrarlama riskinin belirlenmesi amacıyla VEGF değerleri yanında anjiyopoinetin gibi diğer anjiyogenezle ilişkili proteinlerin de ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmaktadır^{136,137}. Dolayısıyla HCC hastalarında seyir ve hastalığın tekrarlama riski büyük oranda mikroçevre tarafından, başta hipoksi olmak üzere, miktarları ve etkileri düzenlenen VEGF, HGF gibi büyüme faktörleriyle yakından ilgilidir. Bu genlerin düzenlenmesinde HIF1 transkripsiyon faktörünün üstlendiği rolün önemi göz önüne alındığında, HIF1 aracılı olarak ekspresyon değişimine uğrayan bu genlerin, birer tedavi hedefi olabileceğini, fonksiyonlarındaki ve yol açtıkları hücresel davranışlardaki değişikliklerin tanımlanmasının, hücre ve tümör biyolojisi açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

HCC gelişim mekanizması ve seyri ile ilgili tüm değişkenlerin tedavi yanıtı ile de doğrudan bağlantısı bulunmaktadır^{1,4}. Son yıllarda geliştirilen teknolojik yöntemler sayesinde radyoterapinin de HCC tedavi seçenekleri arasına girmesi sağlanmıştır⁶. Tümör alanı içine sınırlandırılmış radyoterapi uygulaması ile HCC hücrelerinde oluşan hücresel yanıtlar ve tedavi direnci gelişmesine yol açan moleküler mekanizmalar çok aktif araştırma alanlarından birisidir, ancak henüz tam olarak açıklığa çıkarılamamıştır⁷. Çalışmamızın bu bölümünde, radyasyonun tedavideki artan rolünden yola çıkarak, Hep3B hücre dizisinde radyasyon uygulaması sonrasında hücre davranışları ve gen ekspresyonu açısından ne gibi değişimler sergilediklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Başlangıç olarak radyasyon uygulanan hücrelerdeki sağ kalım değerleri incelenmiştir. Canlılık deneylerimizde Hep3B hücrelerinin radyasyon uygulamasından 72 saat sonrasına kadar sağ kalımlarının değişmediği ortaya çıkmıştır (Tablo 4, 5, 6, 7). Uzun süreli kültüre edilmeleri halinde 5. günde hücrelerin % 90'dan fazlasının, bir haftanın sonunda % 60'ının ve 12. günde % 35'inin canlı olduğu saptanmıştır (Şekil 13). Ekspresyon analizlerinde ise radyasyon uygulaması sonrasında hücre sağ kalımını artıracak pek çok gende transkript ya da protein düzeyinde ekspresyon artışı gözlenmiştir (Şekil 21). İlk 24 saat içinde VEGF, RLIP76 ve MT1-MMP genleri transkripsiyonu artmıştır. Hif1 α geni transkriptinde değişim olmazken protein miktarında ilk 2 saat içinde anlamlı bir artış olmakla beraber 4. saatten itibaren belirgin bir düşüş başlamıştır (Şekil 31). Radyasyon uygulamasının normoksik ortamda yapıldığı bu deneyde gözlenen Hif1 α proteini artışının, doğrudan hücre içinde radyasyonla tetiklenen uyarıya bağlı olduğu düşünülebilir. Literatürde radyasyona bağlı Hif1 α artışını, oluşan oksijen radikallerine ve stres granül aktivasyonuna bağlayan veriler bulunmakla

birlikte, bu etkilerin oluşması için gerekli sürenin uzunluğu nedeniyle geç etkiler olduğu düşünülebilir¹³⁸. Çalışmamızda elde ettiğimiz Hif1 α artışı radyasyonu takiben 2-4 saatlik süre aralığında gözleendiğinden, burada olası başka mekanizmaların rol aldığı düşünülebilir. Ancak bu hipotezin kabul edilebilmesi için, bir oksijen radikali koruyucusu molekül kullanılarak normoksik koşullarda kontrol çalışmalarının yapılması gerekecektir.

HGF/c-Met yolağına bakıldığında, c-Met transkriptinde değışim olmadığı, protein miktarının da buna eşlik ettiği görülmektedir (Şekil 21, 31). Bununla birlikte c-Met'in radyasyondan sonra aktivasyonunda artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 31). Aktif c-Met reseptörü aracılı hücre içi sinyallerin sağ kalım yanında, ileride tartışacağımız motilite yanıtıyla da ilişkili olduğu düşünülmektedir. HGF/c-Met ekspresyonunun yüksekliğı ile HCC malignitesi ve tedavi direnci gelişimi arasındaki bağlantıyı işaret eden veriler, bu sistemin hücrede yol açtığı değışimlerin tanımlanmasının önemini bir kez daha ortaya koymaktadır^{80, 81, 85}.

Bu verilerden yola çıkarak, HGF/c-Met sinyal ileti yolağıının ve/veya hipoksik ortamın, radyasyon stresine karşı verilen hücreyel yanıtta sağ kalım açısından ne gibi etkileri olduğunu belirlemek amacıyla Hep3B hücrelerine radyasyon uygulamasından önce HGF ve/veya hipoksi uygulaması gerçekleştirildi. MTT deneyleriyle elde edilen veriler uzun süreli kültür sonrasında HGF'in hücreleri koruduğunu, hipoksinin de benzer oranda koruyucu olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 9). HGF ve hipoksi uygulamasının birlikte olduğu durumda koruyucu etkinin 2 kat arttığı, bir hafta sonunda % 40'a inen canlı hücre oranının % 80'e yükseldiğı belirlenmiştir. HGF sinyal ileti sistemi ile hipoksik stres sinyalinin hücre canlılığını artırmak üzere DNA tamirinde rol alan genleri artırdığı, apoptotik genleri baskıladıkları yönünde veriler bulunmaktadır^{30, 52, 54, 55}. Bu yanıtların hangi moleküllerin ortak olarak etkilendiklerinin belirlenmesi ile koruma mekanizması yanında tedavi amaçlı hedef moleküller de belirlenebilecektir.

Radyasyon uygulaması sonrasında hücre sağ kalımı etkilendiğı gibi hücre hareketliliğı de bu stresten etkilenmektedir. Boyden odacık yöntemiyle yaptığımız deneylerde radyasyon uygulamasını takip eden, hücre sağ kalımında henüz değışimlerin gözlenmediğı 24 saatlik erken dönemde, hücre hareketliliğinde belirgin bir artış olduğu saptanmıştır (Şekil 11). Hücrelerin hareketlilikleri normoksik koşullarda radyasyon etkisiyle artmakta, HGF varlığında bu yanıt daha da artmaktadır. Hipoksi varlığının radyasyonla artırılan hücre motilitesi üzerinde etkisi yok gibi görünmektedir. Bu sonuçlara göre, HGF yolağıının aktif olduğu tümör hücrelerinin, radyasyona maruz kaldıktan sonra hareketliliklerini artırarak strese maruz kaldıkları bölgeden uzaklaşmak için avantaj kazandıklarını söyleyebiliriz.

HCC hücre dizileriyle gerçekleştirdiğimiz çalışmalar hipoksi ve radyasyon stresi uygulamalarına karşı oluşan hücresel yanıtları belirlemeyi hedeflemiştir. Gerek hipoksi gerekse radyasyon stresine verilen yanıtlar, ortamda HGF proteini varlığı halinde hücrelerin sağkalım açısından daha dirençli, malign fenotip açısından daha agresif davranışlar sergilemesine neden olmaktadır. Hücresel yanıtların oluşumunda ise üç sistem tarafından da uyarılan ortak molekül HIF1 proteini olarak önümüze çıkmaktadır. Gerek hepatositlerdeki değişimler gerekse mikroçevre etkisiyle oluşturulan yanıtlar, oldukça karmaşık etkileşimler aracılığıyla karsinogenez sürecinde ve hastalık seyrinde belirleyici sonuçlar doğurmaktadır. Moleküler düzeyde oluşan bu değişimlerden sorumlu mekanizmaların tanımlanması, gelecekte HCC hastalarında daha gelişmiş yaklaşımlarla tanı, tedavi ve izleme olanağı sağlayacaktır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

HCC vasküler bir tümördür ve hipoksi, HCC gelişimi ve ilerlemesi süreciyle bağlantılı önemli bir anjiyogenik faktördür. Hipoksi tarafından uyarılan birçok faktör tümör hücrelerini ve komşu hücreleri etkileyerek, tümörün daha agresif olmasına ve tedavi direncine neden olmaktadır.

Bu faktörlerden birisi olan HGF'in karaciğer hücrelerinin büyüme ve farklılaşması açısından vazgeçilmez bir büyüme faktörü olduğu bilinmektedir. HGF ve reseptörü olan c-Met ekspresyonunun hipoksik koşullarda arttığı belirlenmiştir. Ancak HCC gelişimi, ilerleyişi ve tedavi yanıtında HGF/c-Met yolağının rolü tam olarak bilinmemektedir.

Çalışmamızda HGF/c-Met yolağı aktivasyonunun HCC hücrelerinin hipoksi yanıtında ve radyoterapi direncinde rolü olabileceği düşüncesi ile HGF/c-Met yolağı aktivasyonu ile hipoksik koşullarda

- 1) HCC hücre sağ kalımını,
- 2) HCC hücre motilite ve invazyonunu,
- 3) HIF1 ve HIF1 aracılı gen ekspresyonlarını,
- 4) HCC hücrelerinin radyasyon uygulamasına yanıtlarının

nasıl etkilendiğini araştırdık.

Çalışma sonuçlarımız HCC hücre dizilerinde HGF/c-Met sinyal ileti yolağının hipoksi ve radyasyon ile uyarılabildiğini ortaya koymaktadır. Hipoksi ve / veya HGF uygulaması varlığında hücre canlılığının değişmediği, buna karşılık hücre motilitesinde ve invazyonunda belirgin artış olduğu belirlenmiştir. HCC hücrelerinde radyasyon stresine verilen yanıt erken dönemde motilite artışı şeklinde olmakta geç dönemde ise hücre canlılığı etkilenmektedir. Radyasyon uygulaması öncesinde hücrelerin hipoksi ve / veya HGF ile uyarılmaları halinde canlılıklarında, motilite ve invazyonlarında belirgin artış olduğu görülmüştür.

Bu veriler HCC hücrelerinin malign fenotip kazanmalarında özellikle invazyon ve metastaz sürecinde HGF/c-Met yolağı aktivasyonunun önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu etkiyi gerçekleştirmesinde hipoksi tarafından uyarılan HIF1 aktivasyonu ve VEGF, EPO gen ekspresyonlarındaki artış önemli olabilir.

Elde ettiğimiz veriler HCC hücrelerindeki radyasyon direncinin gelişmesinde HGF ve hipoksi tarafından uyarılan genlere ek olarak MT1-MMP ve Rlip76'nın da rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Ekspresyon değişimleri saptanan genlerin, HCC dokularındaki dağılımlarının ve hangi ara sinyal molekülleri ile düzenlendiklerinin belirlenmesi yeni çalışma hedeflerini oluşturmaktadır. Bir diğer konu ise genel olarak motilite/ invazyon potansiyeli kazanan hücrelerin sağ kalım açısından avantaj kazanıp kazanmadıklarının ve bu potansiyelin hücre dışı matriks bileşenlerine bağlı olarak nasıl düzenlendiğinin belirlenmesidir. Gelecekteki çalışmalar büyük oranda hücre dışı uyaranların veya stres yaratan mikroçevrenin hücrede neden olduğunu saptadığımız bu değişimlere bağlı olarak hücrenin içinde yer aldığı bu ortamı nasıl değiştirmeye çalıştığı konusuna yönelecektir.

Çalışmamızda bunlara ek olarak, HCC hücre dizileri kullanılarak yapılan ve tedavi açısından hedef olarak kullanılabilir molekül ve yolakların saptanmasını sağlayan araştırmalar sonucu elde edilen verilerin, hasta dokularına ait örneklerde de incelenmesi ve değişikliklerin belirlenmesi sayesinde hastalar için yeni tedavi seçeneklerinin oluşturulması sağlanabilir. Klinisyenler ve temel bilimle uğraşan araştırmacılar açısından en büyük sorun, uygun koşullarda saklanmış hasta doku materyallerine ulaşabilmektir. HCC tanısı alan veya kronik karaciğer hasarı olan bireylerden elde edilebilecek karaciğer materyallerinin uygun koşullarda arşivlenmesi, bu hastalarla ilgili klinik veri kayıtlarının hassasiyetle yapılması, gelecekte bu konuyla ilgili gerçekleştirilecek çalışmalar açısından oldukça önemli bir basamaktır.

7.KAYNAK LİSTESİ

1. Thorgeirson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002;31:339-346.
- ² Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907-1917.
- ³ Zhu AX. Hepatocellular carcinoma: Are we making progress? *Cancer Investigation* 2003;21:418-428.
- ⁴ Thorgeirson SS, Lee J, Grisham JW. Molecular prognostication of liver cancer: End of beginning. *J Hep* 2006;44:798-805.
- ⁵ Guo R, Zhong C, Shi M, Zhang C, Wei W, Zhang Y, Li J. Clinical value of apoptosis and angiogenesis factors in estimating the prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132:547-555.
- ⁶ Hawkins AM, Dawson LA. Radiation therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2006;106:1653-1663.
- ⁷ Lambert B, Wiele CV. Treatment of hepatocellular carcinoma by means of radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32:980–989.
- ⁸ Szyszkoa T, AL-Nahhasa A, Canelob R, Habib N, Jiaob L, Wasanc H, Pagoua M, Taitd P. Assessment of response to treatment of unresectable liver tumours with 90Y microspheres: Value of FDG PET versus computed tomography. *Nucl Med Commun* 2007;28:15–20.
- ⁹ Park BC, Huh MH, Seo JH. Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 1995 Mar;22:286-94.
- ¹⁰ Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2247-50.
- ¹¹ French SW. The role of hypoxia in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology Research* 2004;29:69–74.
- ¹² Seitz HK, Stickel F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol Chem.* 2006;387(4):349-60.
- ¹³ Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis - fact or fantasy? *Hepatology* 2006 ;43(2 Suppl 1):82-8.
- ¹⁴ McKillop IH, Moran DM, Jin X, Koniaris LG. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res* 2006;136(1):125-35.
- ¹⁵ Thorgeirsson SS, Lee J, Grisham JW. Functional Genomics of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2006;43:145-150.

-
- ¹⁶ Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver International* 2005; 25:16–27.
- ¹⁷ Feitelson MA, Sun B, Tufan NLS, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002;21: 2593-2604.
- ¹⁸ Qin L, Tang Z. Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130: 497–513.
- ¹⁹ Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006;25: 3866–3884.
- ²⁰ Kim K, Moon H, Kim K. Hypoxia-induced angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Med* 2002;80:703-714.
- ²¹ Kanematsu M, Semelka RC, Osada S, Amaoka N. Magnetic Resonance Imaging and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Hepatocellular Nodules in Cirrhosis and Hepatocellular Carcinomas. *Top Magn Reson Imaging* 2005;16:67–75.
- ²² Sun H, Tang Z. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the retrospectives and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130: 307–319.
- ²³ Tanaka S, Arai S. Current status and perspective of antiangiogenic therapy for cancer: hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2006;11:82–89.
- ²⁴ Kuo MT, Savaraj N. Roles of Reactive Oxygen Species in Hepatocarcinogenesis and Drug Resistance Gene Expression in Liver Cancers. *Molecular Carcinogenesis* 2006;45:701–709.
- ²⁵ Medina J, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in Chronic Inflammatory Liver Disease. *Hepatology* 2004;39:1185–1195.
- ²⁶ Sanz-Cameno P, Martin-Vilchez S, Lara-Pezzi E, Borque MJ, Salmeron J, Munoz de Rueda P, Solis JA, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R. Hepatitis B virus promotes angiopoietin-2 expression in liver tissue: role of HBV x protein. *Am J Pathol* 2006;169(4):1215-22.
- ²⁷ Ratcliffe PJ, O’rourke JF, Maxwell PH, Pugh CW. Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factor-1 And The Regulation Of Mammalian Gene Expression. *Journal of Experimental Biology* 1998;201: 1153–1162.
- ²⁸ Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brune B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Letters* 2006;237: 10-21.
- ²⁹ Boutilier RG, St-Pierre J. Surviving hypoxia without really dying. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2000;126(4):481-90.
- ³⁰ Semenza GL. HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 2001;107:1-3.

-
- ³¹ Haris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2001;2:38-47.
- ³² Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: Mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 2000;59:47-53.
- ³³ Bardos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005;1755:107 – 120.
- ³⁴ Kim W, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:55-60.
- ³⁵ Kageyama Y, Koshiji M, To KK, Tian YM, Ratcliffe PJ, Huang LE. Leu-574 of human HIF-1alpha is a molecular determinant of prolyl hydroxylation. *FASEB J.* 2004;18:1028-30.
- ³⁶ Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadow JM. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2004;279:38458-65
- ³⁷ Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* 2000;275(33):25733-41.
- ³⁸ Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in Molecular Medicine* 2001;7:345-350.
- ³⁹ Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* 2002;8:62-67.
- ⁴⁰ Brahmini-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer* 2006;93:E73-80.
- ⁴¹ Semenza GL. Targeting HIF1 for cancer therapy . *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-732
- ⁴² Dupuy E, Hainaud P, Villemain A, Bodevin-Phedre E, Brouland JP, Briand P, Tobelem G. Tumoral angiogenesis and tissue factor expression during hepatocellular carcinoma progression in a transgenic mouse model. *J Hepatol.* 2003;38(6):793-802.
- ⁴³ Yasuda S, Arai S, Mori A, Isobe N, Yang W, Oe H, Fujimoto A, Yonenaga Y, Sakashita H, Imamura M. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance. *J Hepatol.* 2004;40(1):117-23.
- ⁴⁴ Huang GW, Yang LY, Lu WQ. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: Impact on neovascularization and survival. *World J Gastroenterol.* 2005;11(11):1705-8.

-
- ⁴⁵ Gwak GY, Yoon JH, Kim KM, Lee HS, Chung JW, Gores GJ. Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression. *J Hepatol.* 2005;42(3):358-64.
- ⁴⁶ Li L, Chen S, Zhang Y, Yu C, Li S, Li Y. Is the hypoxia-inducible factor-1 alpha mRNA expression activated by ethanol-induced injury, the mechanism underlying alcoholic liver disease? *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006;5:560-563.
- ⁴⁷ Yoo YG, Oh SH, Park ES, Cho H, Lee N, Park H, Kim DK, Yu DY, Seong JK, Lee MO. Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1alpha through activation of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 2003;278(40):39076-84.
- ⁴⁸ Seitz HK, Stickel F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol. Chem.* 2006;387:349-360.
- ⁴⁹ Moon EJ, Jeong CH, Jeong JW, Kim KR, Yu DY, Murakami S, Kim CW, Kim KW. Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha. *FASEB J.* 2004;18(2):382-4.
- ⁵⁰ Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol.* 2001;21(12):3995-4004.
- ⁵¹ Mabeesh NJ, Willard MT, Frederickson CE, Zhong H, Simons JW. Androgens stimulate hypoxia-inducible factor 1 activation via autocrine loop of tyrosine kinase receptor/phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2003;9(7):2416-25.
- ⁵² Fu XS, Choi E, Buble GJ, Balk SP. Identification of hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation. *The Prostate* 2005;63:215-221.
- ⁵³ Blancher C, Moore JW, Robertson N, Harris AL. Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res.* 2001;61(19):7349-55.
- ⁵⁴ Peng XH, Karna P, Cao Z, Jiang BH, Zhou M, Yang L. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1alpha signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem.* 2006;281(36):25903-14.
- ⁵⁵ Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol.* 2004;57(10):1009-14.

-
- ⁵⁶ Wang X, Zhou Y, Kim HP, Song R, Zarnegar R, Ryter SW, Choi AMK. Hepatocyte growth factor protects against hypoxia/reoxygenation induced apoptosis in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004;279:5237–5243.
- ⁵⁷ Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T, Osaki T. Mechanism of HIF-1 α -dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 2005; 96: 394–402.
- ⁵⁸ Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 2002;62:3387-94.
- ⁵⁹ Comerford KM, Cummins EP, Taylor CT. c-Jun NH2-terminal kinase activation contributes to hypoxia-inducible factor 1 α -dependent P-glycoprotein expression in hypoxia. *Cancer Res.* 2004;64:9057-61.
- ⁶⁰ Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist* 2004;9 Suppl 5:31-40.
- ⁶¹ Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, Hu K, Shasha D. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist.* 2002;7(6):492-508.
- ⁶² Sasabe E, Zhou X, Li D, Oku N, Yamamoto T, Osaki T. The involvement of hypoxia-inducible factor-1 α in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2007;120:268-77.
- ⁶³ Bache M, Holzapfel D, Kappler M, Holzhausen HJ, Taubert H, Dunst J, Hansgen G. Survivin protein expression and hypoxia in advanced cervical carcinoma of patients treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol.* 2007;104:139-44.
- ⁶⁴ Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, Arbeit JM, Brown JM, Chao KS, Chapman JD, Eckelman WC, Fyles AW, Giaccia AJ, Hill RP, Koch CJ, Krishna MC, Krohn KA, Lewis JS, Mason RP, Melillo G, Padhani AR, Powis G, Rajendran JG, Reba R, Robinson SP, Semenza GL, Swartz HM, Vaupel P, Yang D, Croft B, Hoffman J, Liu G, Stone H, Sullivan D. Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int J Radiat Biol.* 2006;82(10):699-757.
- ⁶⁵ Vordermark D, Brown JM. Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther Onkol.* 2003;179(12):801-11.
- ⁶⁶ Bentzen SM, Harari PM, Bernier J. Exploitable mechanisms for combining drugs with radiation: concepts, achievements and future directions. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007;4(3):172-80.
- ⁶⁷ Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Apr 14

-
- ⁶⁸ Zhou J, Schmid T, Frank R, Brune B. PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem.* 2004;279(14):13506-13513.
- ⁶⁹ Blancher C, Moore JW, Robertson N, Harris AL. Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res.* 2001;61(19):7349-55.
- ⁷⁰ Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, Agani F, Jiang BH. Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1alpha, HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(44):45643-51.
- ⁷¹ Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brune B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett.* 2006;237(1):10-21.
- ⁷² Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol.* 2000;32(1 Suppl):19-31.
- ⁷³ Pahlavan PS, Feldmann RE Jr, Zavos C, Kountouras J. Prometheus' challenge: molecular, cellular and systemic aspects of liver regeneration. *J Surg Res.* 2006;134(2):238-51.
- ⁷⁴ Hasuike S, Ido A, Uto H, Moriuchi A, Tahara Y, Numata M, Nagata K, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation of hepatic oval cells and possibly promotes the differentiation in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20(11):1753-61.
- ⁷⁵ Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* 1995;9(15):1527-36.
- ⁷⁶ Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;53(1):35-69.
- ⁷⁷ Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *Int J Cancer.* 2006;119(3):477-83.
- ⁷⁸ Khan AZ, Mudan SS. Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more. *ANZ J Surg.* 2007;77(1-2):9-14.
- ⁷⁹ Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(12):915-25.
- ⁸⁰ Hata S, Namae M, Nishina H. Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev Growth Differ.* 2007;49(2):163-70.
- ⁸¹ Ljubimova JY, Petrovic LM, Wilson SE, Geller SA, Demetriou AA. Expression of HGF, its receptor c-met, c-myc, and albumin in cirrhotic and neoplastic human liver tissue. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(1):79-87.

-
- ⁸² Vejchapipat P, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Chittmittrapap S, Poovorawan Y. Association between serum hepatocyte growth factor and survival in untreated hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2004;39(12):1182-8.
- ⁸³ Wu F, Wu L, Zheng S, Ding W, Teng L, Wang Z, Ma Z, Zhao W. The clinical value of hepatocyte growth factor and its receptor--c-met for liver cancer patients with hepatectomy. *Dig Liver Dis.* 2006;38(7):490-7.
- ⁸⁴ Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell.* 2003;3(4):347-61.
- ⁸⁵ Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Tahara M, Yamamoto T, Okamoto Y, Minekawa R, Isobe A, Ohmichi M, Tasaka K, Murata Y. Up-regulation of c-met protooncogene product expression through hypoxia-inducible factor-1alpha is involved in trophoblast invasion under low-oxygen tension. *Endocrinology.* 2005;146(11):4682-9.
- ⁸⁶ Tsarfaty G, Stein GY, Moshitch-Moshkovitz S, Kaufman DW, Cao B, Resau JH, Vande Woude GF, Tsarfaty I. HGF/SF increases tumor blood volume: a novel tool for the in vivo functional molecular imaging of Met. *Neoplasia.* 2006;8(5):344-52.
- ⁸⁷ Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1582-95.
- ⁸⁸ Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis.* 2001;22(9):1363-71.
- ⁸⁹ Heideman DA, Overmeer RM, van Beusechem VW, Lamers WH, Hakvoort TB, Snijders PJ, Craanen ME, Offerhaus GJ, Meijer CJ, Gerritsen WR. Inhibition of angiogenesis and HGF-cMET-elicited malignant processes in human hepatocellular carcinoma cells using adenoviral vector-mediated NK4 gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2005;12(12):954-62.
- ⁹⁰ Atabey N, Gao Y, Yao ZJ, Breckenridge D, Soon L, Soriano JV, Burke TR Jr, Bottaro DP. Potent blockade of hepatocyte growth factor-stimulated cell motility, matrix invasion and branching morphogenesis by antagonists of Grb2 Src homology 2 domain interactions. *J Biol Chem.* 2001;276(17):14308-14.
- ⁹¹ Dharmawardana PG, Peruzzi B, Giubellino A, Burke TR Jr, Bottaro DP. Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy. *Anticancer Drugs.* 2006;17(1):13-20.
- ⁹² Erdal E, Ozturk N, Cagatay T, Eksioglu-Demiralp E, Ozturk M. Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2005;115(6):903-10.

-
- ⁹³ Beurel E, Kornprobst M, Blivet-Van Eggelpeol MJ, Cadoret A, Capeau J, Desbois-Mouthon C. GSK-3beta reactivation with LY294002 sensitizes hepatoma cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Int J Oncol.* 2005;27(1):215-22.
- ⁹⁴ Wang Z, Wang M, Carr BI. Hepatocyte growth factor enhances protein phosphatase Cdc25A inhibitor compound 5-induced hepatoma cell growth inhibition via Akt-mediated MAPK pathway. *J Cell Physiol.* 2005;203(3):510-9.
- ⁹⁵ Yang ZF, Poon RT, To J, Ho DW, Fan ST. The potential role of hypoxia inducible factor 1alpha in tumor progression after hypoxia and chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2004;64(15):5496-503.
- ⁹⁶ Lau CK, Yang ZF, Lam CT, Tam KH, Poon RT, Fan ST. Suppression of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) by YC-1 is dependent on murine double minute 2 (Mdm2). *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348(4):1443-8.
- ⁹⁷ Wang SW, Pan SL, Guh JH, Chen HL, Huang DM, Chang YL, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. YC-1 [3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole] exhibits a novel antiproliferative effect and arrests the cell cycle in G0-G1 in human hepatocellular carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(3):917-25.
- ⁹⁸ Escuin D, Kline ER, Giannakakou P. Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1alpha accumulation and activity by disrupting microtubule function. *Cancer Res.* 2005;65(19):9021-8.
- ⁹⁹ Zhang Q, Tang X, Lu QY, Zhang ZF, Brown J, Le AD. Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(10):1465-74.
- ¹⁰⁰ Hsu CN, Lai JM, Liu CH, Tseng HH, Lin CY, Lin KT, Yeh HH, Sung TY, Hsu WL, Su LJ, Lee SA, Chen CH, Lee GC, Lee DT, Shiue YL, Yeh CW, Chang CH, Kao CY, Huang CY. Detection of the inferred interaction network in hepatocellular carcinoma from EHCO (Encyclopedia of Hepatocellular Carcinoma genes Online). *BMC Bioinformatics.* 2007;8:66.
- ¹⁰¹ Wada H, Nagano H, Yamamoto H, Yang Y, Kondo M, Ota H, Nakamura M, Yoshioka S, Kato H, Damdinsuren B, Tang D, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Nakamori S, Sakon M, Dono K, Wakasa K, Monden M. Expression pattern of angiogenic factors and prognosis after hepatic resection in hepatocellular carcinoma: importance of angiopoietin-2 and hypoxia-induced factor-1a. *Liver International* 2006; 26: 414–423.
- ¹⁰² von Marschall Z, Cramer T, Höcker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *GUT* 2001; 48:87-96.
- ¹⁰³ Brader P, Riedl CC, Woo Y, Ponomarev V, Zanzonico P, Wen B, Cai S, Hricak H, Fong Y, Blasberg R, Serganova I. Imaging of hypoxia-driven gene expression in an orthotopic liver tumor model. *Mol Cancer Ther.* 2007 ;6(11):2900-8.

-
- ¹⁰⁴ Lee J, Chu I, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, Durnez A, Demetris AJ, Thorgerirsson SS. Classification and Prediction of Survival in Hepatocellular Carcinoma by Gene Expression Profiling. *HEPATOLOGY* 2004;40: 667– 676.
- ¹⁰⁵ Villa E, Colantoni A, Cammà C, Grottola A, Buttafoco P, Gelmini R, Ferretti I, Manenti F. Estrogen receptor classification for hepatocellular carcinoma: comparison with clinical staging systems. *J Clin Oncol.* 2003;21(3):441-6.
- ¹⁰⁶ Nam SW, Park JY, Ramasamy A, Shevade S, Islam A, Long PM, Park CK, Park SE, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Liu ET, Miller LD, Lee JY. Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling. *Hepatology.* 2005;42:809-18.
- ¹⁰⁷ Cui JF, Liu YK, Zhang LJ, Shen HL, Song HY, Dai Z, Yu YL, Zhang Y, Sun RX, Chen J, Tang ZY, Yang PY. Identification of metastasis candidate proteins among HCC cell lines by comparative proteome and biological function analysis of S100A4 in metastasis in vitro. *Proteomics.* 2006;6:5953-61.
- ¹⁰⁸ Llovet JM. Clinical and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2007 ;13(11 Suppl 2):S13-6.
- ¹⁰⁹ Willam C, Maxwell PH, Nichols L, Lygate C, Tian YM, Bernhardt W, Wiesener M, Ratcliffe PJ, Eckardt KU, Pugh CW. HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41(1):68-77.
- ¹¹⁰ Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR, Ozturk M. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *PNAS* 1990;87:1973-7.
- ¹¹¹ Wood SM, Wiesener MS, Yeates KM, Okada N, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 alpha-subunit (HIF-1alpha). Characterization of hif-1alpha-dependent and -independent hypoxia-inducible gene expression. *J Biol Chem.* 1998;273(14):8360-8.
- ¹¹² Li M, Makkinje A, Damuni Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 1996;271:11059-62.
- ¹¹³ Guan L, Song K, Pysz MA, Curry KJ, Hizli AA, Danielpour D, Black AR, Black JD. Protein kinase C-mediated down-regulation of cyclin D1 involves activation of the translational repressor 4E-BP1 via a phosphoinositide 3-kinase/Akt-independent, protein phosphatase 2A-dependent mechanism in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2007;11;282(19):14213-25.
- ¹¹⁴ Van Kanegan MJ, Adams DG, Wadzinski BE, Strack S. Distinct protein phosphatase 2A heterotrimers modulate growth factor signaling to extracellular signal-regulated kinases and Akt. *J Biol Chem.* 2005;280(43):36029-36.
- ¹¹⁵ Perrotti D, Neviani P. ReSETting PP2A tumour suppressor activity in blast crisis and imatinib-resistant chronic myelogenous leukaemia. *Br J Cancer.* 2006;95(7):775-81.

-
- ¹¹⁶ Neviani P, Santhanam R, Trotta R, Notari M, Blaser BW, Liu S, Mao H, Chang JS, Galletta A, Uttam A, Roy DC, Valtieri M, Bruner-Klisovic R, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Marcucci G, Perrotti D. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell*. 2005;8:355-68.
- ¹¹⁷ Frew IJ, Dickins RA, Cuddihy AR, Del Rosario M, Reinhard C, O'Connell MJ, Bowtell DD. Normal p53 function in primary cells deficient for Siah genes. *Mol Cell Biol*. 2002;22(23):8155-64.
- ¹¹⁸ Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N. Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell*. 2001;7(5):927-36.
- ¹¹⁹ Fukukawa C, Shima H, Tanuma N, Ogawa K, Kikuchi K. Up-regulation of I-2(PP2A)/SET gene expression in rat primary hepatomas and regenerating livers. *Cancer Lett*. 2000;161(1):89-95.
- ¹²⁰ Simon MC. Siah proteins, HIF prolyl hydroxylases, and the physiological response to hypoxia. *Cell*. 2004;117:851-3.
- ¹²¹ Nakayama K, Gazdoui S, Abraham R, Pan ZQ, Ronai Z. Hypoxia-induced assembly of prolyl hydroxylase PHD3 into complexes: implications for its activity and susceptibility for degradation by the E3 ligase Siah2. *Biochem J*. 2007;401:217-26.
- ¹²² Genís L, Gálvez BG, Gonzalo P, Arroyo AG. MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis? *Cancer Metastasis Rev*. 2006 ;25(1):77-86.
- ¹²³ Petrella BL, Lohi J, Brinckerhoff CE. Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2005 ;24:1043-52.
- ¹²⁴ Petrella BL, Brinckerhoff CE. Tumor cell invasion of von Hippel Lindau renal cell carcinoma cells is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Mol Cancer*. 2006;5:66.
- ¹²⁵ Yadav S, Zajac E, Singhal SS, Awasthi S. Linking stress-signaling, glutathione metabolism, signaling pathways and xenobiotic transporters. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:59-69.
- ¹²⁶ Awasthi S, Singhal SS, Yadav S, Singhal J, Drake K, Nadkar A, Zajac E, Wickramarachchi D, Rowe N, Yacoub A, Boor P, Dwivedi S, Dent P, Jarman WE, John B, Awasthi YC. RLIP76 is a major determinant of radiation sensitivity. *Cancer Res*. 2005;65(14):6022-8.
- ¹²⁷ Maulik G, Madhiwala P, Brooks S, Ma PC, Kijima T, Tibaldi EV, Schaefer E, Parmar K, Salgia R. Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. *J Cell Mol Med*. 2002 ;6(4):539-53.
- ¹²⁸ Segarra J, Balenci L, Drenth T, Maina F, Lamballe F. Combined signaling through ERK, PI3K/AKT, and RAC1/p38 is required for met-triggered cortical neuron migration.

J Biol Chem. 2006 ;281(8):4771-8.

¹²⁹ Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M, Michiels C. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells. J Biol Chem. 2003;278(33):31277-85.

¹³⁰ Pore N, Jiang Z, Shu HK, Bernhard E, Kao GD, Maity A. Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1alpha expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. Mol Cancer Res. 2006;4(7):471-9.

¹³¹ ten Klooster JP, Leeuwen I, Scheres N, Anthony EC, Hordijk PL. Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. EMBO J. 2007;26(2):336-45.

¹³² Wang SW, Pan SL, Peng CY, Huang DY, Tsai AC, Chang YL, Guh JH, Kuo SC, Lee KH, Teng CM. CHM-1 inhibits hepatocyte growth factor-induced invasion of SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells by suppressing matrix metalloproteinase-9 expression. Cancer Lett. 2007;257(1):87-96.

¹³³ Jiang Y, Xu W, Lu J, He F, Yang X. Invasiveness of hepatocellular carcinoma cell lines: contribution of hepatocyte growth factor, c-met, and transcription factor Ets-1. Biochem Biophys Res Commun. 2001 ;286(5):1123-30.

¹³⁴ Canning MT, Postovit LM, Clarke SH, Graham CH. Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells. Exp Cell Res. 2001;267(1):88-94.

¹³⁵ Wada H, Nagano H, Yamamoto H, Yang Y, Kondo M, Ota H, Nakamura M, Yoshioka S, Kato H, Damdinsuren B, Tang D, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Nakamori S, Sakon M, Dono K, Wakasa K, Monden M. Expression pattern of angiogenic factors and prognosis after hepatic resection in hepatocellular carcinoma: importance of angiopoietin-2 and hypoxia-induced factor-1 alpha. Liver Int. 2006;26(4):414-23.

¹³⁶ Poon RT, Lau C, Pang R, Ng KK, Yuen J, Fan ST. High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies. Ann Surg Oncol. 2007;14(6):1835-45.

¹³⁷ Kuboki S, Shimizu H, Mitsuhashi N, Kusashio K, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M. Angiopoietin-2 levels in the hepatic vein as a useful predictor of tumor invasiveness and prognosis in human hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol. 2007 Oct 11; [Epub ahead of print]

¹³⁸ Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. Cancer Cell. 2004;5(5):429-41.