

2000-00062



TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**KERATİNSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (KGF) İLE  
KERATİNSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (KGF  
EKSPRESYONLARININ VE HEPARİN BENZERİ  
PROTEOGLİKANLARIN (HPLGs)  
TÜMÖR HÜCRESİNDEKİ İYONİZE RADYASYON İLE  
ÖLÜME DİRENÇTEKİ ROLÜ**

Proje No: SBAG-1460

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu

Health Sciences Research Committee

**KERATİNOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (KGF) İLE  
KERATİNOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (KGFR)  
EKSPRESYONLARININ VE HEPARİN BENZERİ  
PROTEOGLİKANLARIN (HLPGs)  
TÜMÖR HÜCRESİNDEKİ İYONİZE RADYASYON İLE  
ÖLÜME DİRENÇTEKİ ROLÜ**

**Proje No: SBAG-1460  
(195S026)**

**Doç. Dr. Neşe Atabey  
Doç. Dr. Özden Anal  
Doç. Dr. Hilmi Alanyalı  
Doç. Dr. Güldal Kırkalı  
Dr. Zeynep Yüce  
Ar. Gör. Özlem İzci  
Bio. Faize Yüksel  
Prof. Dr. Meral Sakızlı**

**Ağustos, 1999  
İZMİR**

## ÖNSÖZ

Hücre sağkalımı, büyüme ve farklılaşması, metabolik regülasyonu gibi çok sayıda hücrenel olayın düzenlenmesinde rol oynayan büyüme faktörleri, hücre yüzeylerindeki kendilerine özgü reseptörleri aracılığı ile etki gösteren polipeptitlerdir. Farklı gruplarda incelenen büyüme faktörleri salındıkları ve etkiledikleri hücre tiplerine göre gruplandırılırlar. Bu büyüme faktörü ailelerinden birisi de fibroblastlar, endotel hücreleri ve kondrositleri de içeren oldukça geniş bir hücre grubu üzerinde etkili olan fibroblast büyüme faktörü ailesidir. Bu ailenin üyelerinden birisi olan keratinosit büyüme faktörü KGF(FGF 7) stromal hücreler tarafından salınan, epitelial hücreler üzerinde etkili bir heparine bağlanan mitojendir. Embriyonik dönemde salınımı embriyonik gelişmenin regülasyonunda, erişkinde salınımı ise hücre migrasyonu, proliferasyonu, diferansiasyonu ve sitoproteksiyon ile homeostazın regülasyonunda önemlidir. KGF in biyolojik aktivite göstermesinde hedef hücre yüzeyindeki reseptörünün (KGFR) ve heparin benzeri proteoglikanların (HSPG) ekspresyonuları önemlidir. HSPG ların KGFR dimerizasyonunu sağlayarak down stream sinyal transduction yollarını aktive ettiği düşünülmektedir. Diğer araştırmalardan elde edilen bazı veriler ise FGF ailesi üyelerinin özellikle bFGF ve KGF in radyasyona bağlı DNA hasarını önlemede önemli rol oynadığı düşünülmektedir. HSPG ların KGFR sinyal iletimindeki rolü göz önüne alındığında, HSPG ların ve KGF-KGFR etkileşimine bağlı reseptör aktivasyonu ve ikinci mesajcı moleküllerin aktivasyonu, hücrede gen ekspresyonu paternlerini değiştirerek ve DNA hasarını önleyerek hücre sağ kalımının artmasına neden olabilir. Bu durumda KGF in kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç gelişiminde rol oynayabileceğini ve/veya hücreleri kemoterapi veya radyasyona bağlı DNA hasarından ve apoptozdan koruyabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Bu düşünceden yola çıkarak TÜBİTAK SBAG ca SBAG-1460 no ile desteklenen proje kapsamında KGF, KGFR ve KGF-KGFR sinyal iletiminde rol oynadığı düşünülen HSPG ların ve KGFR nün radyasyon ile uyarılan hücre hasarı, hücre ölümü ve hücre döngüsü regülasyonunda önemi araştırılmıştır.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Önsöz	2
Tablolar	3
Şekiller	4-5
Öz	6
Abstract	7
Proje ana metni	
Giriş	9-11
Genel Bilgiler	12-22
Gereç-Yöntem	23-26
Bulgular	27-43
Tartışma	44-49
Sonuç	50
Kaynaklar	51-52

## TABLÖLAR

- Tablo 1. FGF ailesi üyelerinin adlandırımı ve bunların kromozomal yerleşimleri
- Tablo 2. FGF e bağlanan proteinlerin adlandırılmaları ve alternatif isimleri
- Tablo 3 . Farklı radyasyon dozlarında ışınlanan CHO hücrelerinde hücre tipine göre ortalama koloni sayım sonuçları
- Tablo 4.Farklı dozlarda ışınlamayı takiben farklı hücre tiplerinde sağ kalan hücre fraksiyonları
- Tablo 5. CHO WT-A hücrelerinin hücre döngüsü analizi sonuçları
- Tablo 6- CHO WT-C hücrelerinin hücre döngüsü analizi sonuçları
- Tablo 7- CHO 745C hücrelerinin hücre döngüsü analizi sonuçları
- Tablo 8. CHO 745-A hücrelerinin hücre döngüsü analizi sonuçları
- Tablo 9 . İyonize radyasyon uygulanan hücrelerde G1 fazının değerlendirilmesi
- Tablo 10. Deney hücrelerinde S fazının değerlendirilmesi
- Tablo 11. Deney hücrelerinde G2 fazının değerlendirilmesi
- Tablo 12.Kontrol hücrelerinde G1 fazının değerlendirilmesi
- Tablo 13 . Kontrol hücrelerinde S fazının değerlendirilmesi
- Tablo 14. Kontrol hücrelerinde G2 fazının değerlendirilmesi

## ŞEKİLLER

Şekil 1 . FGF ve KGF reseptörünün şematik yapısı

Şekil 2 KGF ve heparin veya HSPG ların varlığında KGFR dimerizasyonu. Model A 2:1 KGFR:KGF modeli, Model B 2:2:1 KGFR:Heparin:KGF modeli

Şekil 3. İyonize radyasyona bağlı p53 uyarımı ve p53 aktivasyonundan sonra ekspresyonu değişen efektörler

Şekil 4 . FGF ve FGF reseptörü sinyali

Şekil 5 . Hücre sağ kalım eğrileri

Şekil 6. CHO hücrelerinin 12. saatteki hücre döngüsü analizi sonuçları (A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)

Şekil 7. CHO hücrelerinin 24. saatteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)

Şekil 8. CHO hücrelerinin 36. saatteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)

Şekil 9. CHO hücrelerinin 48. saatteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)

Şekil 10. CHO hücrelerinin 60. saatteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)

Şekil 11. CHO hücrelerinin 72. saatteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)

Şekil 12. CHO hücrelerinin 96. saatteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)

Şekil13. CHO WT-A , CHO WT-C , CHO 745-A ve CHO 745-C hücrelerinde 10 Gy radyasyon uygulanmasından sonra farklı zaman aralıklarında G1 deki hücre oranları

Şekil 14 . KGFR eksprese eden CHO ,WT-A ve CHO 745 A hücrelerinde (14A) ve KGFR eksprese etmeyen CHO WT-C ve CHO 745-C hücrelerinde (14B) G1 deki hücre yüzdeleri.

Şekil 15. KGFR eksprese eden CHO WT-A ve CHO 745 A hücrelerinde (15A) ve KGFR eksprese etmeyen CHO WT-C ve CHO 745-C hücrelerinde (15B) G2 deki hücre yüzdeleri.

Şekil 16. 10 Gy radyasyon uygulaması sonrası apoptozdaki hücre oranları

## ÖZET

Heparine bağlanan büyüme faktörleri olarak da adlandırılan fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ailesinin bir üyesi olan keratinosit büyüme faktörü (KGF) spesifik olarak epiteliyal hücreler üzerinde etkilidir. Biyolojik etkisini kendisine özgü reseptörü (KGFR) ile gösteren bu büyüme faktörüne bağlı olarak gerçekleşen sinyal iletimi olaylarında heparin benzeri proteoglikanların (HSPG) da rol oynadığı düşünülmektedir. KGF'nin normal epiteliyal hücreler için mitojenik etkili olduğu ve akciğer alveolar epitel hücreleri ve gastrointestinal sistemi döşeyen epitel hücreleri gibi bazı hücreleri kemoterapötikler veya radyasyona bağlı hücre hasarından koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Bu koruma doku remodelling, hücre sağkalımı, neovaskülarizasyon, metastaz gibi olayların gerçekleşmesinde son derece önemlidir. Ayrıca bu ilişkinin radyasyon ile tedaviye dirençte de rolü olabilir. Bu verilerden yola çıkarak KGF, KGFR ü ve HSPG ların tümörlerin iyonize radyasyona yanıtının belirlenmesinde önemli bir faktör olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada KGF reseptörü eksprese eden (WT-A, 745-A) HSPGs sentezleyen (WT-A) ve sentez defektli (745-A) Chinese Hamster Ovary (CHO) hücre hatları ile KGF reseptörü eksprese etmeyen (WT-C, 745-C) HSPGs sentezleyen (WT-C) ve sentez defektli (745-C) hücre hatları kullanılarak, KGF, KGFR ve KGF-KGFR sinyal iletiminde rol oynadığı düşünülen HSPG ların radyasyon ile uyarılan hücre hasarı, hücre ölümü ve hücre döngüsü regülasyonunda önemi araştırılmıştır. Çalışmada farklı dozlarda radyasyon uygulaması sonrası hücre sağ kalımları belirlenmiş ve flow sitometri kullanılarak hücre siklusu analizleri yapılmıştır. KGFR ve özellikle HSPG ekspresyonlarının iyonize radyasyona uygulaması sonrası hücre sağ kalımını artırdıkları ve hücreleri apoptozdan korudukları gösterilmiştir. Hücre döngüsü analizleri ise KGFR eksprese eden hücrelerin G1 fazında kalma süresinin, KGFR eksprese etmeyen hücrelerden anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular KGF-KGFR ve HSPG ların varlığının hücre sağ kalımı ve hücre döngüsü regülasyonunda önemli olduğunu ve tümör tedavisi öncesi iyonize radyasyona karşı direncin belirlenmesinde ve/veya tedavi sonrasında epiteliyal hücre hasarına bağlı olarak ortaya çıkan hücre hasarından korumada etkili olabileceğini göstermiştir.

**Anaktar kelimeler:** KGF, KGFR, Heparin proteoglikanlar, iyonize radyasyon, hücre sağkalımı, hücre döngüsü regülasyonu



## ABSTRACT

### (THE ROLE OF KERATINOCYTE GROWTH FACTOR(KGF) RECEPTOR AND HEPARIN PROTEOGLYCANS (HSPGs) ON THE CELL CYCLE AND CELL SURVIVAL AFTER IONIZING RADIATION)

Keratinocyte growth factor (KGF) is a member of heparin-binding fibroblast growth factor family (FGF) that acts specifically on cells of epithelial origin. The biologic activity of KGF is known to be mediated via KGF receptor (KGFR) which is specific high affinity cell surface protein. Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) have crucial role as a coordinator for the interaction of KGF and KGFR. In addition, KGF's high and low affinity receptors participate in signal transduction pathway. As well KGF has potent mitogenic activity on normal epithelial cells and has been found to enhance cell survival in irradiated mice. Heparin is also known to inhibit the mitogenic activity of KGF in cells that express the KGFR. These findings suggested that KGF, KGFR and HSPGs might be important in the cell survival and cell cycle progression. To gain an insight into these hypotheses, we studied the role of KGFR and HSPGs in the cell cycle and cell survival after ionizing radiation treatment. In this study 4 different CHO cell lines: *i*-Wild type CHO cells (CHO WTC) *ii*-CHO cells transfected with KGFR (CHO WTA) and *iii*-CHO mutant cells that transfected with KGFR but defective in their metabolism of glycosaminoglycans(GAGs) (CHO 745 C), *iv*-CHO mutant cells that defective in their metabolism of GAGs (CHO 745 C) have been used. Each cell line was exposed ionizing radiation and the percentage of cell population in each phase of the cell cycle was determined at various intervals after irradiation using flow cytometry. We established cell survival and dose relationship for each cell line and carry out comparative analyses. There were differences in terms of survival of cell lines in the presence or absence of KGFR and HSPGs. We found that KGFR and HSPGs enhances cellular capacity to cell survival after ionizing radiation and to prevent radiation induced apoptosis. Furthermore, cell cycle analysis shows an increase in the duration of G1 in KGFR expressed CHO cells. These findings suggest that KGFR mediated signal transduction pathway might have an important task in the acquisition of resistance of human tumors to radiation therapy and/or it could be useful to lessen the side effects of current cancer therapy regiment, and thus may be important in decision of therapy modality.

**Key Words:** KGF, KGFR, Heparin proteoglycans, ionizing radiation, cell survival, cell cycle regulations

## GİRİŞ

Metabolik regülasyon, hücre bölünmesi ve farklılaşması gibi çok sayıdaki hücreyel olayın gerçekleşmesinde ve düzenlenmesinde rol oynayan büyüme faktörleri (GFs) hücre yüzeyindeki kendilerine özgü reseptörlere (GFRs) bağlanarak etki gösterirler. Büyüme faktörünün reseptörüne bağlanması, çeşitli sinyal transduction yollarının aktivasyonu ile hedef genlerdeki gen ekspresyonlarını düzenlenmesine ve sonuç olarak hücre growth ve regülasyonunda, diferansiyasyonunda değişikliklere neden olur. Bu büyüme faktörlerinden birisi de fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesidir. Yapısal olarak birbiri ile ilintili yaklaşık 20 polipeptitten oluşan FGF ailesinin bir üyesi de keratinosit büyüme faktörü (KGF= FGF 7) dır . KGF stromal hücreler tarafından salınan, epitelial hücreler üzerinde etkili bir heparine bağlanan mitojendir. Epitelial hücreler üzerinde mitojenik etkisi olması fakat FGF ailesinin diğer üyelerinin etki gösterdiği fibroblast, endotelial hücreler ve diğer non epitelial hücreleri etkilememesi KGF in normal epitelial hücrelerin büyüme ve farklılaşması için spesifik bir parakrin mediatör olduğunu desteklemektedir. KGF in embriyonik gelişmenin regülasyonunda, erişkinde ise hücre migrasyonu, proliferasyonu, diferansiyasyonu ve sitoproteksiyon ile homeostazın regülasyonunu sağladığı bilinmektedir<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>. Normal mezenşimal-epitelial interaksyondaki rolüne ek olarak inflamatuvar barsak hastalığı, benin prostat hipertrofisi, prostat kanseri, pankreas kanseri gibi patolojilerde rol oynadığı düşünülmektedir<sup>6,7, 8</sup>. KGF etkisini Keratinosit Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü (KGFR) olarak adlandırılan FGFR 2 nin splice varyantı olan ve epitelial hücreler üzerinde eksprese olan reseptör aracılığı ile gösterir. FGFR ailesinin benzer yapısal özellikler sahip 4 bilinen üyesi vardır. FGF ve FGFR lerinin heparin sülfat proteoglikanlara (HSPGs) bağlanma özellikleri vardır .

Proteoglikanlar çoğu ökaryotik hücrede üretilen, periselüler(PCM) ve ekstraselüler (ECM) matriksin en önemli komponentlerinden olan, bir veya daha fazla Glikozaminoglikan (GAG ) zinciri taşıyan proteinlerdir. GAG lar uzun lineer tekrarlayan disakkarit üniteleri içeren karbohidratlar olup: heparin, heparin sülfat, kondrin sülfat ve dermatan sülfat olmak üzere dört ailede gruplandırılırlar<sup>9</sup>. Hücre adhezyonu, proliferasyonu, antikoagülan aktivite ve lipid metabolizmasının kontrol gibi birçok farklı biyolojik olayda görev alırlar. Çoğu hücrenin yüzeyinde ve ECM de bulunan HSPGs FGF leri termal denatürasyondan ve proteolitik yıkımdan

korurlar. Hücre yüzeyinde HSPGs eksprese eden Balb7 MK keratinositlerinde KGF in KGFR ne bağlanması veya mitojenik sinyal için HSPG lar gerekli değildir<sup>1</sup>. Ancak heparin varlığı KGF e bağlı mitojenik sinyali inhibe etmektedir<sup>10</sup>. Eğer hücre yüzeyinde HSPG ekspresyonu yoksa ortama heparin eklenmesi reseptörün ligand bağlama kapasitesini yaklaşık 8 kat artırmaktadır. Ancak hücre yüzeyinde HSPG ekspresyonu varsa heparin varlığı bağlama kapasitesini çok değiştirmemektedir. HSPG ların KGFR dimerizasyonunu sağlayarak down stream sinyal transduction yollarını aktive ettiği düşünülmektedir<sup>10, 11</sup>. HSPG ların KGF sinyal iletiminde rolünü araştıran çalışmalarda ortamda heparin olmadığı zaman p42 ve p44 MAP kinaz aktivasyonunun gerçekleşmediğini, ortama heparin eklenmesi veya HSPG ların varlığı halinde MAP kinaz aktivasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir<sup>10</sup>. Ayrıca ortamda heparin olmadığında KGF tarafından stimüle edilen *c-fos* geni ekspresyonunun da azaldığı gösterilmiştir<sup>10</sup>. *c-fos* geni transkripsiyonu AP-1 transkripsiyon faktörü gibi transkripsiyonel regülasyonda çok önemli role sahip genlerin regülasyonunu sağlar<sup>12, 13</sup>. Birçok araştırmacı ısı şoku uygulanması, uv irradiasyonu, iyonize radyasyon uygulaması ve kimyasal ajanlarla muamele sonrası *c-jun*, *c-fos* genlerinin eksprese olduğunu göstermiştir<sup>12, 14</sup>. Bu stres ayrıca AP-1 bağlanma aktivitesini de etkilemektedir. AP-1 ise FGF gen ekspresyonunu artırmaktadır. Özellikle kemoterapiye dirençli meme kanseri hücre hatlarında iyonize radyasyon uygulamasını takiben *c-jun*, *c-fos* genlerinin ekspresyonlarının ve AP1 bağlanma aktivitesinin ve bFGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir<sup>12</sup>. Ayrıca, araştırmalar endotelial hücrelerde iyonize radyasyon uygulamasını takiben HSPG ve CS/DS proteoglikanların sentez ve sekresyonunu artırdığını göstermiştir<sup>9</sup>. Diğer araştırmalardan elde edilen bazı veriler ise FGF ailesi üyelerinin özellikle bFGF ve KGF in radyasyona bağlı DNA hasarını önlemede önemli rol oynadığı düşünülmektedir<sup>9,15, 16</sup>.

Bu bilgiler HSPG ların KGFR sinyal iletimindeki rolü göz önüne alındığında daha da anlamlı olmaktadır. Bu şekilde HSPG ların artışı KGF-KGFR sinyal iletimini aktive ediyor, buna bağlı reseptör kinaz aktivasyonu, MAP kinaz aktivasyonu sonucu *c-jun*, *c-fos* gibi genlerin ekspresyonları artmakta ve sonuçta KGF düzeyi yükselmekte olabilir. Bu durumda KGF in kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç gelişiminde rol oynayabileceğini ve/veya hücreleri kemoterapi veya radyasyona bağlı DNA hasarından ve apoptozdan koruyabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

Bu düşünceden yola çıkarak proje kapsamında KGF, KGFR ve KGF-KGFR sinyal iletiminde rol oynadığı düşünülen HSPG ların ve KGFR nün radyasyon ile uyarılan hücre hasarı, hücre ölümü ve hücre döngüsü regülasyonunda önemi araştırılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü regülasyonu siklinler ve siklin bağımlı kinazlarca (cdk) düzenlenir. Memeli hücrelerinin hücre siklusuna girip girmemesi kararının alınması ve hücre siklusunun ilerleyişi pozitif veya negatif, intraselüler ve/veya ekstraselüler birçok sinyal tarafından idare edilen karmaşık bir prosedir. Büyüme faktörleri ve hücre yüzeyindeki büyüme faktörü reseptörleri hücre döngüsünün regülasyonunda çok önemlidir. Büyüme faktörü reseptörüne bağlandıktan sonra bir seri fosforilasyon olayı tetiklenir. Bu fosforilasyonlar sinyallerin nükleusa iletimini sağlar. Farklı sinyaller development, differansiyasyon ve hücrenin hayatsal fonksiyonlarının devamı , hücre bölünmesi, hücre ölümü gibi farklı biyolojik yanıtların ortaya çıkması ile sonuçlanır. Büyüme faktörleri spesifik hücre tipleri üzerinde ve hücre döngüsünün belli dönemlerinde etkilidirler. Çoğunlukla hücre döngüsünde  $G_0 \rightarrow G_1$  geçişinde ve  $G_1$  de ilerlemeyi ve  $G_1 \rightarrow S$  geçişini sağlarlar. Epidermal büyüme faktörü (EGF) epidermal hücrelerde , Sinir büyüme faktörü (NDF) sinir hücrelerinde , fibroblast büyüme faktörü (FGF) konnektif doku ve mezenşimal hücrelerde ve Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) endotelial hücrelerde  $G_0 \rightarrow G_1$  geçişinde görev alırken, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1)  $G_1 \rightarrow S$  geçişini sağlar. Transforme edici büyüme faktörü (TGF) ve Tümör nekroz faktörü gibi diğer bazı büyüme faktörleri ise hücre döngüsünü bloklayıcı role sahiptir. Ancak bu etkiler hücre tipine göre değişiklik gösterebilir.

Bu büyüme faktörlerinden birisi olan FGF ilk olarak 1970 de mitojenik ve anjiogenetik aktivitelerinin varlığı ile sıgır beyin ekstraktından elde edilmiştir. Daha sonraki araştırmalar FGF lerin yapısal olarak birbiri ile ilintili ancak farklı aktivitelere sahip çok sayıda proteinden oluştuğunu göstermiştir. Yaklaşık 20 farklı üyesi olduğu belirlenen ailenin üyeleri genel olarak epitel, kas, konnektif doku ve sinir dokusunu içeren dört dokunun gelişiminde rol oynamaktadırlar (Tablo 1) . Heparine bağlanan büyüme faktörleri ailesi olarak da adlandırılan FGF ailesi üyelerinin hücre fonksiyonları hedef hücrenin tipine ve biyolojik olarak hücre döngüsünün hangi döneminde olduğuna bağlı olarak değişebilir. Genellikle hücre replikasyonu ve anjiogenezin gerçekleşmesinde görev aldığı, ayrıca hücre sağ kalımı ve apoptozu, adhezyon, motilite ve diferansiyasyonu düzenlediği bildirilmiştir<sup>5</sup> . FGF in regülatör özellikleri nedeniyle tümör oluşumu, kan damarlarının yeniden yapılanması, morfogenez, embriyolojik gelişim gibi birçok kompleks biyolojik olayı modüle ettiği gösterilmiştir.

Tablo 1. FGF ailesi üyelerinin adlandırımı ve bunların kromozomal yerleşimleri

Adı	Alternatif Adı	Kromozomal yerleşimi	Kodlayan ekzon sayısı
FGF-1	Asidik FGF (aFGF)	5q31.3-33.3	3
FGF-2	Bazik FGF (bFGF)	4q26-27	3
FGF-3	INT-2	11q13	3
FGF-4	HST -1, k-FGF (kaposi FGF)	11q13.3	3
FGF-5		4q21	3
FGF-6	HST-2	12p13	3
FGF-7	KGF(Keratinosit GF)	15	
FGF-8	AIGF(Androjen induced GF)	10q24	6
FGF-9	GGF (Glial GF)	13q12-q13	
FGF-10		5p12-13	
FGF-11	FHF-3	17p12	
FGF-12	FHF-1	3q28	
FGF-13	FHF-2	Xq21	5
FGF-14	FHF4	13	
FGF-15			3
FGF-16			
FGF-17			3
BNL	Branchless		3

FGF ailesi üyelerinin üç farklı tip moleküle bağlandıkları gösterilmiştir: FGFR, HSPG ve sistince zengin FGF reseptörü (CFR) (Tablo 2). FGFR ler benzer yapısal özelliklere sahiplerdir. Amino asit düzeyinde % 60-95 sekans homolojisi gösteren yaklaşık 150 kDa luk tek transmembran proteinlerdir.

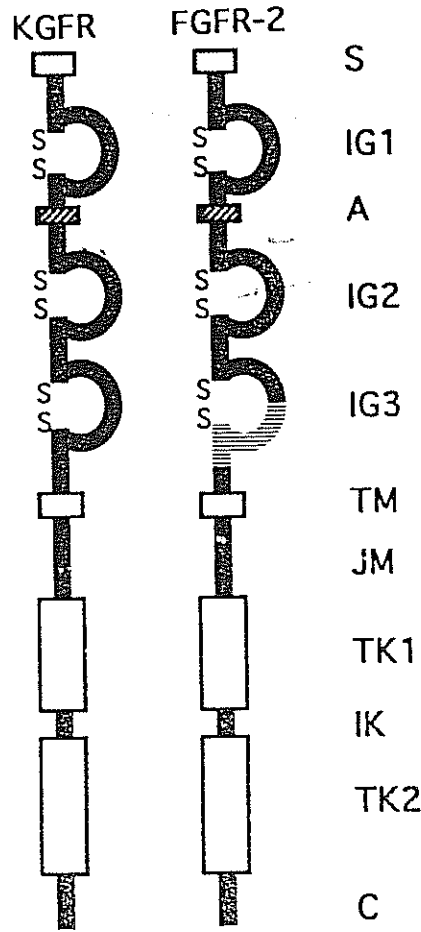
FGF ailesinin bir üyesi de keratinosit büyüme faktörü (KGF= FGF 7) dür . KGF stromal hücreler tarafından salınan, epitelial hücreler üzerinde etkili bir heparine bağlanan mitojendir. Epitelial hücreler üzerinde mitojenik etkisi olması fakat FGF ailesinin diğer üyelerinin etki gösterdiği fibroblast, endotelial hücreler ve diğer non epitelial hücreleri etkilememesi KGF in normal epitelial hücrelerin büyüme ve farklılaşması için spesifik bir parakrin mediatör olduğunu desteklemektedir. KGF in embriyonik gelişmenin regülasyonunda, erişkinde ise hücre migrasyonu, proliferasyonu, diferansiasyonu ve sitoproteksiyon ile homeostazın regülasyonunu sağladığı bilinmektedir<sup>1,2,3,4,5</sup>. Normal mezenşimal-epitelial interaksyondaki rolüne ek olarak inflamatuvar barsak hastalığı, benin prostat hipertrofisi, prostat kanseri, pankreas kanseri gibi patolojilerde rol oynadığı düşünülmektedir<sup>6,7,8</sup>. KGF etkisini keratinosit benzeri büyüme faktörü

Reseptörü (KGFR) olarak adlandırılan FGFR 2 nin splice varyantı olan ve epitelial hücreler üzerinde eksprese olan reseptör aracılığı ile gösterir.

Tablo 2. FGF e bağlanan proteinlerin adlandırmaları ve alternatif isimleri

Adı	Tipi	Alternatif isimler
fgfr	FGFR1	<i>flg, fms, cek-1</i>
	FGFR2	<i>bek, K-sam, kgfr, cek3</i>
	FGFR3	<i>cek2</i>
	FGFR4	<i>frek</i>
hspg	Syndekanlar1,2,3,4	2 =Fibroglikan 3 =N-syndekan 4= Ryodocan, amphiglikan
	Glikolipinler1,2,3,4,5	2=Cerbroglikan 3= OCI-5 4= k-Glipikan dDLY
	Perlekanlar Betaglikanlar	
cfr		MG-160, E selektin ligand (ESL-1)

KGFR ünün ekstraselüler bölümünde 2 veya 3 Ig benzeri bölge (Ig1-3), bir asidik bölüm (A), bir heparin bağlayan bölge ve bir CAM homoloji bölümü vardır. İntraselüler bölge jukstamembran domaini de içerir, iki yüksek korunumlu kinaz bölgesi (TK 1,2), bir interkinaz bölge ve intraselüler substratlar ile ilişkiye giren, birçok olası otoposforilasyon bölgesi olan karboksi terminal bölgeden oluşur (Şekil 1). KGF bağlayan bölüm yaklaşık 139 aa lik Ig2 ve Ig3 bölümündedir Ig 1 bölgesinin ligand spesifitesini ve ligand ile bağlanma afinitesini belirlemede önemli olduğu düşünülmektedir <sup>4,5</sup>. Asidik bölgenin Ca, Mg, Cu gibi divalen katyonları bağlamada önemli olduğu, bu katyonların ise reseptörün üç boyutlu yapısını korumada, dolayısıyla KGF ve proteoglikanlar ile bağlanmada, CAM homoloji bölgesinin ise N-CAM ve N kadherine bağlanmada rol oynadığı belirlenmiştir <sup>5</sup>.



Şekil 1 . FGF ve KGF reseptörünün şematik yapısı (4 No lu kaynaktan modifiye edilerek hazırlanmıştır)

KGF dahil olmak üzere tüm FGF lerin heparine bağlandıkları ve heparinin yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörler aracılığı ile sinyal iletimini modüle edebildiği bilinmektedir <sup>10,11</sup>. FGFR sinyal iletimi için reseptör dimerizasyonunun gerekli olduğu gösterilmiştir. Ancak bu dimerizasyonun tam olarak nasıl gerçekleştiği bilinmemektedir. Reseptör dimerizasyonunun nasıl gerçekleştiği konusunda iki mekanizma ileri sürülmektedir. Birinci modelde KGF-KGFR 2:1 oranı yapacak şekilde birleşmektedirler Bu modelde önce heparin KGF ile KGFR arasındaki bağlantıyı kolaylaştırmakta ve 1:1:1 olacak şekilde Heparin:KGF:KGFR kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleksin oluşturduğu konformasyon hücre yüzeyinde bir diğer KGFR ünün bu komplekse bağlanmasına, dolayısıyla reseptör dimerizasyonuna yol açmakta ve 2:1 lik KGFR: KGF kompleksi ortaya çıkmaktadır(Şekil 2A) . İkinci modelde ise 2 adet FGFR heparin veya HSPG köprüleri aracılığı ile 2:2:1 KGFR:Heparin:KGF oranı oluşturacak şekilde birleşmektedir ve reseptör dimerizasyonu ve liganda bağlanması yani aktif yapı kazanması heparin varlığında gerçekleşmektedir<sup>11</sup> (Şekil 2B) .



### Model A

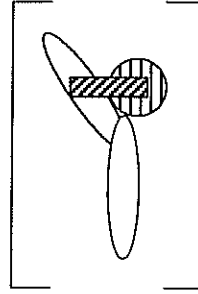
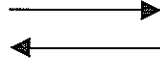
HEPARIN



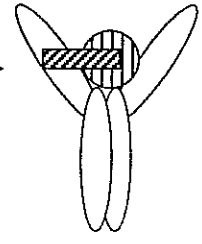
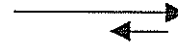
KGF



sKGFR



UNSTABLE  
INTERMEDIATE



2:1 sKGFR:KGF  
COMPLEX with  
HEPARIN

### Model B

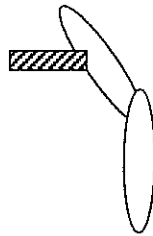
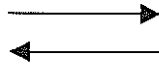
HEPARIN



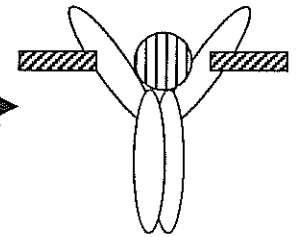
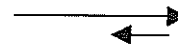
KGF



sKGF, INACTIVE  
CONFORMATION

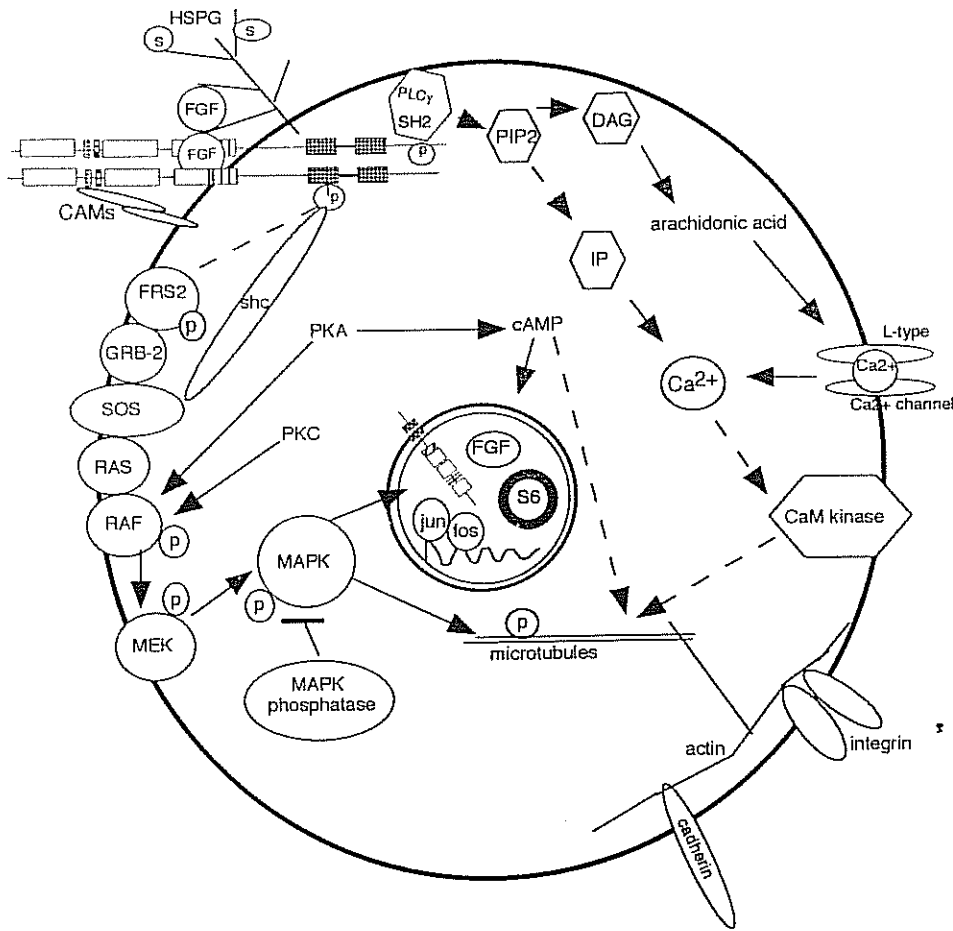


sKGF, ACTIVE  
CONFORMATION



Şekil 2 KGF ve heparin veya HSPG ların varlığında KGFR dimerizasyonu. Model A 2:1 KGFR:KGF modeli, Model B 2:2:1 KGFR:Heparin:KGF modeli (Modeller metin içerisinde açıklanmıştır (11 nolu kaynaktan modifiye edilerek hazırlanmıştır))

KGF-KGFR BAĞLANMASINI TAKİBEN GELİŞEN SİGNAL TRANSDUCTION OLAYLARI: reseptör ligand bağlanması takiben FGFR lerinde bulunan kinaz domainleri ve fosforilasyon bölgelerinin aktivasyonu ile sinyal iletimi başlamaktadır (Şekil 4) Bu aktivasyonda reseptörün fosforile edildiği bölgeye bağlı olarak SHC/FRS-2-RAF/MAPKKK-MAPKK-MAPK yolu veya PLC-gama, PKC, IP3 ve Ca salınımı yollarından birisi aktive olmakta ve bu aktivasyonlara bağlı farklı biyolojik etkiler ortaya çıkmaktadır<sup>5, 17</sup>. Örneğin FGF -R ü Y463 den fosforillenirse bir adaptif protein olan Crk aktive olmakta ve sonuçta iletilen sinyal hücrelerin proliferasyonunu sağlamakta iken, JM domainden fosforillenme bir diğer adaptör molekül olan FRS2 aracılığı ile proliferasyon ve diferansiyasyonu uyarmakta, Src yolu proliferasyon, diferansiyasyon ve migrasyonu, Shb yolu apoptozu tetiklemektedir<sup>17</sup>.



Şekil 4. FGF sinyal iletimi yollarının şematik görünümü (5 no lu kaynaktan modifiye edilerek hazırlanmıştır)

### **KGF in BİYOLOJİK ETKİLERİ:**

26-28 kDa moleküler ağırlığa sahip bir monomerik polipeptit olan KGF<sup>1</sup>, cDNA sı sinyale peptidini ve bir potansiyel glikolizasyon bölgesini de içeren 194 amino asitlik bir protein kodlar. KGF deri, akciğer, prostat, mesane, meme ve tükrük bezi mezenşiminde eksprese olmaktadır. Stromal hücreler tarafından salınan KGF epitelial hücreler üzerinde mitojenik etkilidir; ancak fibroblast, endotelial hücreler ve diğer non epitelial hücreleri etkilememektedir. Keratinositler, tip 2 pneumositler, prostatik epitelial hücreler, hepatositler, korneal epitelial hücreler ovarian granüloza hücreleri diğer KGF responsive hücrelerdir<sup>1</sup>. İnsan keratinositlerine nanomolar düzeyinde eklenmesi bile keratinositler için terminal diferansiyasyon markerları olan keratin 1 ve flagrin ekspresyonuna neden olmaktadır. KGF in normal epitelial hücrelerin büyüme ve farklılaşması için spesifik bir parakrin mediatör düşünülmektedir. KGF in embriyonik gelişmenin regülasyonunda, erişkinde ise hücre migrasyonu, proliferasyonu, diferansiyasyonu ve sitoproteksiyon ile homeostazın regülasyonunu sağladığı bilinmektedir<sup>1,2,3,4,5</sup>. Normal mezenşimal-epitelial interaksiyondaki rolüne ek olarak inflamatuvar barsak hastalığı, benin prostat hipertrofisi, prostat kanseri, pankreas kanseri gibi patolojilerde rol oynadığı düşünülmektedir<sup>6,7,8</sup>. Tam kalınlıklı deri grefti alınımını takiben KGF ekspresyonunda artış olması, ekzojen KGF in derideki yaralanmalarda etkisinin araştırılmasını stimüle etmiş ve KGF in deri reepitelizasyonunu artırdığı gösterilmiştir<sup>4</sup>. Son yapılan çalışmalar KGF in tip 2 pneumositlerin pulmoner surfaktan sentezini spesifik olarak etkilediğini ayrıca intratekal KGF uygulamasını takiben Tip 2 pneumositlerin proliferasyonunun arttığını göstermiştir. Çalışmalar KGF ve KGFR ünün akciğer gelişiminde ve akciğer epitelinin yenilenmesinde rol oynadığını desteklemektedir<sup>4,18</sup>.

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin ve iyonizan radyasyonun hızla bölünmekte olan tümör hücrelerini öldürmeleri hedeflenmektedir. Ancak bu etkenler aynı zamanda vücuttaki hızla ve sürekli bölünmekte olan kemik iliği hücreleri, gastrointestinal sistemi döşeyen epitel hücreleri gibi hücrelerde de hasara yol açmaktadırlar. İyonize radyasyon uygulamasını takiben ortaya çıkan oksidatif hasar, hücre membranlarında hasara yol açmakta ve buna bağlı hücre integritesinde ve hücre iskeletinde yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Bunu hücre ödemi ve mitokondrilerin şişmesi izlemekte ve bir süre sonra hücreler tamamen dejenere olmaktadır<sup>19,20</sup>. Dejenerasyonun olduğu hücrelerin fonksiyonlarına bağlı olarak farklı etkiler oluşmakta ve normal.

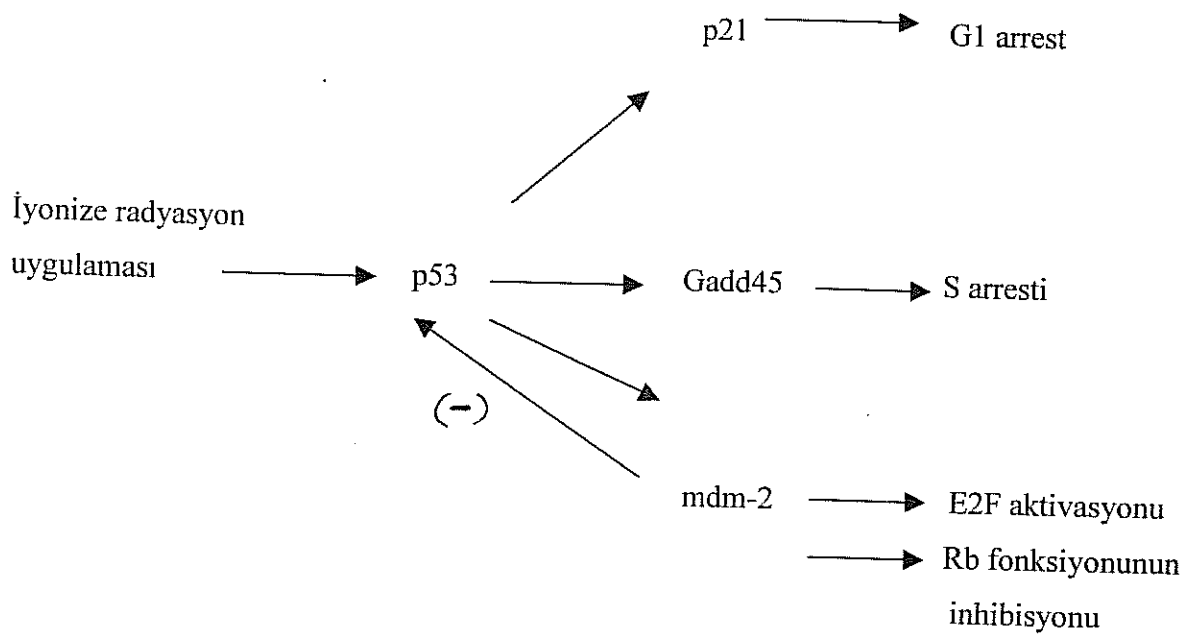
hücrelerdeki bu hasar farklı klinik semptomlarla kendini göstermektedir. Örneğin GIS epitelindeki hasara bağlı mukozit tablosu, akciğerdeki alveolar epitelin tip 1 ve tip 2 hücrelerindeki hasara bağlı pnomoni ve pulmoner fibrozis gibi<sup>19,20</sup>.

Son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalar rekombinant KGF in sistemik veya lokal uygulamasını takiben çok sayıda hayvan modelde GIS i döşeyen epitelin, akciğer, mesane gibi dokulardaki epitel hücrelerinin epitelial/mukozal hasardan korunduğu gösterilmiştir<sup>21,22</sup>.

Ayrıca KGF in radyasyon ve/veya kemoterapi tarafından uyarılan oral veya gastrointestinal mukozitlere karşı sitoprotektif etkisi olduğu , 2-3 gün kadar rekombinant KGF uygulamasının oral mukozal proliferasyonu indüklemeye yeterli olduğu ve mukozit oluşumunu engellediği gösterilmiştir<sup>21,21</sup>. Çalışmalar bir doz KGF uygulamasının radyasyon veya 5 florourasil veya methotrexate veya radyasyon, 5 florourasil ve methotrexate kombinasyonu uygulanan hayvanlarda survival'ın %55 veya daha fazla arttığını göstermiştir. Radyasyon veya kemoterapi uygulaması sonrası KGF verilen hayvanlarda önce kilo kaybının anlamlı derecede azaldığı ve zamanla kilo almaya başladıkları saptanmıştır. Bunun KGF in mukozal kalınlığı artırması ve ince barsaktaki kript survivalını artırması ile ilgili olduğu düşünülmele birlikte , KGF in iyileştirici etkinin KGF in hücreleri apoptoza girmesini engelleyerek de gerçekleşiyor olabileceği düşünülmektedir. Bu veriler KGF in kanser tedavisi sonrası ortaya çıkan intestinal yan etkileri azaltmak için kullanılabileceğini göstermiş ve bunu takiben insan gönüllülerde faz 1 çalışmaları başlamıştır. Faz 1 çalışma sonuçları KGF in iyi tolere edildiği ve uygulamasından üç gün sonra mukozal proliferasyonu anlamlı derecede artırdığı göstermiş olup, faz iki çalışmalar sürmektedir<sup>16,20</sup>.

Buna ek olarak KGF in tip 2 alveolar epitel hücreleri için in vivo ve invitro mitojen olduğu ve akciğeri hiperoksiya gibi hasarlardan koruduğu gösterilmiştir<sup>19, 22</sup>. Bu etkinin nasıl gerçekleştiğini araştıran Buckley ve arkadaşları (22) KGF in hiperoksia sonucu oluşan apoptozu engelleyici etkisi olduğunu, 20 ng/ml KGF in oksijen tarafından indüklenen DNA ipliği kırıklarının oluşumunu blokladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca KGF uygulaması sonrasında p21, p53 ve bax proteinlerinin ekspresyonlarında azalma olduğunu ve KGF in tip 2 alveolar epitel hücreleri için bir survival faktör olduğunu göstermişlerdir. Bir başka çalışmada KGF in kültüre edilmiş akciğer epitel hücrelerinde radyasyona bağlı DNA hasarını önlemekte ve DNA tamirini DNA polimeraz bağımlı olarak indüklemekte olduğu belirlenmiştir<sup>23</sup>.

DNA hasarının onarımında p53 düzeyindeki artışın G1 arrestinden ve iyonize radyasyona bağlı apoptozdan sorumlu olduğu bilinmektedir<sup>24</sup>. p53 bağımlı G1 arresti sonrasında p21 ve gadd45 i de içeren pek çok molekül aktive olur. p21 G1 CDK-siklin aktivitesini inhibe ederek G1 arrestine neden olurken ayrıca proliferating cell nükleer antijen (PCNA) ile ilişkiye girerek PCNA tarafından düzenlenen DNA transkripsiyonunu ve PCNA tarafından düzenlenen DNA tamirini inhibe eder<sup>25,26</sup>. PCNA e bağlanarak DNA eksizyon tamirini stimüle eden bir protein olan Gadd45 düzeyi de p53 indüksiyonu sonrası artar. Bu protein de hücrenin S fazına girmesini engeller. pRb nun hücre döngüsü üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldıran bir protein olan mdm-2 de p53 uyarımı sonrası aktive olur (Şekil 3).



Şekil 3. İyonize radyasyona bağlı p53 uyarımı ve p53 aktivasyonundan sonra ekspresyonu değişen efektörler

p53 ün G1deki etkisine ek olarak G2 M geçişi için de gerekli olduğu gösterilmiştir. p53 geni defektli hücrelerde G2 de gecikme saptanmıştır<sup>24</sup>.

Normal dokuların radyasyona bağlı hasardan korunmasında ekstraselüler matriksin (ECM) önemi açıktır. ECM in en önemli komponentlerinden birisi olan proteoglikanlar çoğu ökaryotik hücrede

üretileen bir veya daha fazla Glikozaminoglikan (GAG ) zinciri taşıyan proteinlerdir. GAG lar uzun lineer tekrarlayan disakkarit üniteleri içeren karbohidratlar olup: heparin, heparin sülfat, kondrin sülfat ve dermatan sülfat olmak üzere dört ailede gruplandırılırlar<sup>9</sup>. Hücre adhezyonu, proliferasyonu, diferansiasyonu da dahil olmak üzere antikoagülan aktivite ve lipid metabolizmasının kontrol gibi birçok farklı biyolojik olayda görev alırlar. Çoğu hücrenin yüzeyinde ve ECM de bulunan HSPG lar TGF $\beta$  -1, hepatosit GF, FGF gibi pek çok GF ün biyolojik aktivitesini düzenlemektedirler. HSPG lar meme dokusu gibi çeşitli dokuların gelişiminde önemli regülatörlerdir<sup>27</sup>. Eğer hücre yüzeyinde HSPG ekspresyonu yoksa ortama heparin eklenmesi reseptörün ligand bağlama kapasitesini yaklaşık 8 kat artırmaktadır. Ancak hücre yüzeyinde HSPG ekspresyonu varsa heparin varlığı bağlama kapasitesini çok değiştirmemektedir . HSPG ların KGFR dimerizasyonunu sağlayarak down stream sinyal transduction yollarını aktive ettiği düşünülmektedir<sup>10,11</sup>. HSPG ların KGF sinyal iletiminde rolünü araştırarak çalışmalarda ortamda heparin olmadığı zaman p42 ve p44 MAP kinaz aktivasyonunun gerçekleşmediğini, ortama heparin eklenmesi veya HSPG ların varlığı halinde MAP kinaz aktivasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir<sup>10</sup>. Ayrıca ortamda heparin olmadığı KGF tarafından stimüle edilen *c-fos* geni ekspresyonunun da azaldığı gösterilmiştir<sup>10</sup>. *c-fos* geni transkripsiyonu AP-1 transkripsiyon faktörü gibi transkripsiyonel regülasyonda çok önemli role sahip genlerin regülasyonunu sağlar<sup>12,13,14</sup>. Birçok araştırmacı ısı şoku uygulanması, uv irradiasyonu, iyonize radyasyon uygulaması ve kimyasal ajanlarla muamele sonrası *c-jun*, *c-fos* genlerinin eksprese olduğunu göstermiştir<sup>12,14</sup>. Bu stres ayrıca AP-1 bağlanma aktivitesini de etkilemektedir. AP-1 ise FGF gen ekspresyonunu artırmaktadır. Özellikle kemoterapiye dirençli meme kanseri hücre hatlarında iyonize radyasyon uygulamasını takiben *c-jun*, *c-fos* genlerinin ekspresyonlarının ve AP1 bağlama aktivitesinin ve bFGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir<sup>12</sup>. Ayrıca, araştırmalar endotelial hücrelerde iyonize radyasyon uygulamasını takiben HSPG ve CS/DS proteoglikanların sentez ve sekresyonunu artırdığını göstermiştir<sup>9</sup>. HSPG ların KGF in reseptörüne bağlanmasını ve buna bağlı biyolojik etkilerini gerçekleştirilmesinde rolü gözönüne alındığında (Şekil 2), iyonize radyasyona bağlı hücre ölümünden korunmada HSPG ların da rol oynayabileceği akla gelmektedir .

Bu mekanizmanın açıklanması klinikte iki açıdan yararlı olabilir:

1)Eğer KGFR ve HSPG ların varlığı hücreleri apoptozdan koruyor ve hücre sağkalımını artırıyorsa, bir tümör popülasyonunun HGFR ve KGFR ekspresyon düzeyine bakılarak iyonize

radasyona ve / veya kemoterapötiklere karşı direncin önceden saptanmasında marker olarak kullanılabilir.

2) KGF in veya HSPG ların lokal veya sistemik uygulaması radyasyon uygulamasını takiben ortaya çıkan epiteliyal hücre ölümüne bağlı mukozitlerin , pneumoni ve pulmoner fibrozis gibi yan etkilerin azaltılmasında yararlı olabilir.

Bu çalışmada olası klinik etkileri de gözönüne alınarak proje kapsamında KGF, KGFR ve KGF-KGFR sinyal iletiminde rol oynadığı düşünölen HSPG ların ve KGFR nün radyasyon ile uyarılan hücre hasarı, hücre ölümü ve hücre döngüsü regölasyonunda önemi araştırılmıştır

## GEREÇ YÖNTEM

### HÜCRE HATLARI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ:

Bu çalışmada kullanılan 4 farklı CHO hücre hattının özellikleri aşağıdaki gibidir:

I-Wild type CHO hücreleri (CHO -WTC)

II- KGFR ile transfekte edilmiş CHO hücreleri (CHO - WTA)

III-KGFR taşımayan glikosaminoglikan metabolizması defektli olduğu için HSPG eksprese edemeyen CHO hücreleri (CHO 745 C),

IV-KGFR ile transfekte edilmiş ve glikosaminoglikan metabolizması defektli olduğu için HSPG eksprese edemeyen CHO hücreleri (CHO 745 A) .

KGFR reseptörü eksprese eden ve etmeyen Chinese Hamster Ovary (CHO) hücreleri Dr. Donald P. Bottaro (NIH, NCI, LCMB, Bethesda, MD,USA) dan sağlandı. DMSO da dondurulmuş olarak gönderilen hücreler Hank's Dengeli Tuz Solusyonu (HBSS, Seromed) ile 2 kez yıkandı. Her tüpten 2 şer flask olacak şekilde %10 FCS, %1 L Glutamin ve 100 ug/ml Streptomisin ve 100 U/ml Penisilin içeren Ham's F12 (Seromed) içinde %5 CO<sub>2</sub> li ortamda 37 °C de inkübe edildi. Hücrelerin yapışmasından sonra yaklaşık 2 günde bir kez ortamı değiştirilen hücreler konfluent hale gelene kadar inkübe edildi. Konfluent hücreler Tripsin-EDTA (Seromed) ile flask yüzeyinden kaldırıldı ve 1:10 veya 1:5 oranında pasajlandı . Hematositometre veya coulter cell counter ile sayılan ve tripan blue kullanılarak canlı olduğu belirlenen hücreler her deney için gerekli olan uygun sayıda plate veya flasklara pasajlandı.

### HÜCRE SAĞKALIM EĞRİLERİ (CELL SURVIVAL CURVES)

CHO WT A ile Plating efficieny 'nin ve her radyasyon dozu için uygun hücre sayısı -<sup>2</sup>

Radyasyon dozu oranlarının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı. Bu amaçla:

Petrilere aşağıdaki şemaya uygun olacak sayıda ekim yapıldı ve şemada belirtilen dozlarda ışınlandı. 7 günlük inkübasyondan sonra standart protokole göre Giemza ile boyanan hücrelerde koloni sayımı yapıldı.



Monolayer Kültür Hazırlandı  
↓  
Trypsin-EDTA kullanılarak hücreler yüzeyden kaldırıldı ve süspansiyon edildi  
↓  
Hücre sayımı yapıldı ve petrilere doza bağlı olarak artacak şekilde standart sayıda hücre ekildi  
↓  
Aşağıda belirtilen sayıdaki hücreler belirlenen dozlarda ışınlandı (Her doz için 3 plak olacak şekilde)

100	0
150/300/ 400	2
200/ 400/ 1 000	4
250/ 1000/ 10 000	6
300/10 000/ 100 000	8
400/ 100 000/ 1 000 000	10

↓  
1 (ikinci deneyde) veya 2 (birinci deneyde) hafta süre ile % 5 CO<sub>2</sub> li ortamda 37° C de inkübe edildi  
↓  
Giemza kullanılarak boyandı  
↓  
Koloniler sayıldı  
↓  
Plating Efficiency ve Surviving Fraction hesaplandı.

Sağ kalan hücre sayısının (SF) hesaplanması aşağıdaki formül kullanılarak yapıldı:

SF= Sayılan koloni sayısı / ekilen hücre sayısı x (PE/10)

PE= Işınlanmayan plakta sayılan koloni sayısı / ekilen hücre sayısı

Sağ kalım analizleri her hücre tipi ve radyasyon dozu için 3 kez tekrarlandı ve benzer sonuçlar elde edildi (Bulgular bölümünde verilen tablolar ve grafikler her doz için , her deneyde kullanılan 3 plaktan elde edilen değerlerin + üç farklı günde yapılan deneylerde elde edilen değerlerin ortalaması alınarak hazırlanmıştır. Sonuç olarak tablodaki veriler her bir zaman periyodu için 9 farklı değerlerin ortalaması alınarak hazırlanmıştır))

## HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ

Hücre döngüsü analizi için  $5 \times 10^5$  hücre/flask olacak şekilde, tüm hücre tiplerinden her bir inceleme saati için 2 deney hücresi 2 kontrol hücresi olacak şekilde ekim yapıldı. Farklı tarihlerde ekilen hücreler 37° C de %10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saat süre ile inkübe edildi. 24. saatte steril koşullarda nakledildiği DEÜ Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalındaki Theraton

Cobalt 60 ile 10 Gy ışınlandı. Işınlamadan sonraki 12., 24., 36., 48., 60., 72. ve 96. saatte hücre siklusu analizleri için flow cytometrik olarak incelendi. Her hücre siklusu analizi öncesi hücreler Tripsinize edildi ve flow sitometri için hazırlandı.

## HÜCRELERİN FLOW SİTOMERİ İÇİN HAZIRLANMASI

Flow sitometrik analiz için Coulter DNA prep kiti kullanıldı.

- 1- Hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı,
- 2- Hücrelere 7 ml (flask için) veya 4ml (Plate için) ılık DPBS w/o Ca, Mg eklendi
- 3- DPBS i uzaklaştırıldı ve 1 ml Tripsin EDTA eklendi
- 4- 37 ° C de 5-7dk inkübe edildi
- 5- Üzerine 4 ml taze ortam eklendi ve pipet ile homojenize edildi
- 6- Hücreleri oda sıcaklığında 1500 g de 10dk süre ile santrifüj edildi.
- 7- 250 ul toplam hacim içinde ortam kullanılarak süspande edildi
- 8- Hemositometri kullanarak hücre sayımı yapıldı, Hücre miktarı  $3 \times 10^6$  hücre /ml olacak şekilde ayarlandı
- 9- Hücrelerin 25 ul sini flow cytometric analiz için kullanıldı
- 10- DNA prep malzemeleri aşağıdaki şekilde eklendi ekleyin

Materyal	Miktar	PLR*	PI*
Tavuk Eritrositi (kontrol olarak kullanıldı)	5 ul	-	500 ul
Lenfosit	25 ul	25 ul	500 ul
Hücre Örnekleri	25 ul	25 ul	500 ul

\*Tüplere PLR ve PI aynı anda eklenmemelidir ve mutlaka vorteks ile iyice karıştırılmalıdır.

11- Tüpler 2 saat içinde Flow cytometri (Coulter) ile incelendi

12- Multicycle adlı program ile veri analizleri yapıldı.

Tüm hücre siklusu analizleri her hücre tipi ve zaman periyodu için 3 kez tekrarlandı ve benzer sonuçlar elde edildi (Bulgular bölümünde verilen tablolar ve grafikler üç değer in ortalaması alınarak hazırlanmıştır. Her deney günü her bir hücreden ve periyottan 2 flask analiz edilmiştir. Sonuç olarak tablodaki veriler her bir zaman periyodu için 6 farklı değer in ortalaması alınarak hazırlanmıştır)

**İSTATATİSTİK ANALİZLER:** Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını araştırmak için SPSS programı kullanılarak Kruskal Wallis analizi yapılmış, gruplar bağımsız olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunan gruplarda farkın hangi gruptan kaynaklandığını anlamak için iki ortalama Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır.

## BULGULAR

Doz-hücre sayısı optimizasyon amacıyla yapılan deneyler sonucunda her doz için optimum hücre sayısı belirlendi. Buna göre 9 cm<sup>2</sup> plaklar için 2 Gy için 150, 4 Gy için 200, 6 Gy için 250, 8 Gy için 300 ve 10 Gy için 400 hücre/ plak oranının ve bir haftalık toplam inkübasyon süresinin uygun olduğu belirlendi.

Sağ kalan hücre fraksiyonlarını hesaplamak için hücreler farklı dozlarda materyal metod bölümünde açıklandığı şekilde ışınıldı. Üç kez tekrarlanan deneyler sonucunda farklı radyasyon dozlarında elde edilen koloni sayımı sonuçları Tablo 3 de verilmiştir.

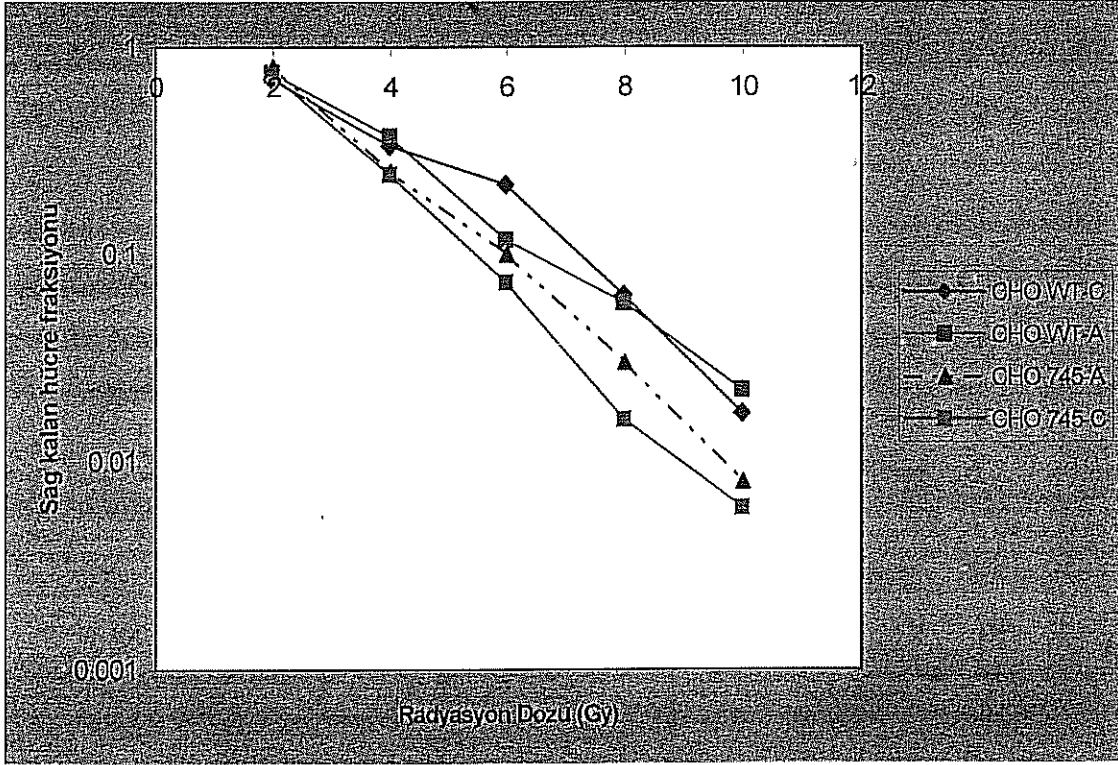
Tablo 3 . Farklı radyasyon dozlarında ışınlanan CHO hücrelerinde hücre tipine göre ortalama koloni sayım sonuçları

Radyasyon Dozu↓(Gray)	Ekilen Hücre Sayısı (hücre/plate)	Hücre tipine göre ortalama koloni sayısı			
		CHO WT-C	CHO WT-A	CHO 745-A	CHO 745-C
0	100	70	74	65	73
2	150	63	66	60	71
4	200	41	48	25	32
6	300	39	23	15	15
8	400	15	16	6	4
10	500	5	7	2	2

Tablo 4 Farklı dozlarda ışınlamayı takiben farklı hücre tiplerinde sağ kalan hücre fraksiyonları

Radyasyon Dozu↓(Gray)	Hücre tipine göre sağ kalan hücre fraksiyonu				
	CHO WT-C	CHO WT-A	CHO 745-A	CHO 745-C	P değerleri
0	1	1	1	1	1.0000
2	0,600	0,595	0,620	0,639	0.0117*
4	0,292	0,324	0,190	0,212	0.0027*
6	0,185	0,103	0,076	0,067	0,0027*
8	0,054	0,054	0,023	0,013	0,0051*
10	0,011	0,019	0,006	0,002	0,0027*

\* Fark istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 5 : Farklı dozlarda ışınlanmış CHO hücrelerinde hücre sağ kalım eğrileri

Bu verilere göre gerek HPLG defekti olan hücrelerde (745 A ve C) sağ kalımın HPLG sentezi normal olan hücrelere (WT A ve C) oranla azaldığı görülmektedir. HPLG sentezi normal olan hücrelerde 2, 4, 8 Gy lerdeki sağ kalım oranının birbirine çok yakın olduğu, ancak 6 Gy lik dozda KGFR reseptörü taşımayan hücrelerde (WT-C) sağ kalımın daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Doz 10 Gy e çıktığında ise KGFR ile transfekte edilmiş ve HPLG defekti (WT-A) olmayan hücrelerin sağ kalımının daha yüksek olduğu görülmektedir.

İstatistiksel analizlere göre ışınlanmayan hücreler (0 Gy) dışındaki tüm gruplarda hücre sağ kalımı açısından anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir (Tablo 4) Bu farklılığın hangi gruptan veya gruplardan kaynaklandığını anlamak için yapılan analizler sonucunda tüm dozlarda HSPG defekti olan hücrelerle (745 A ve C) sağ kalımın , HSPG sentezi normal olan hücrelerden (WT A ve C) anlamlı derecede düşük olduğu kaynaklandığı görüldü. (p=0.0202) . KGFR ekspresyonu

(WT-A ve 745-A) ise sağ kalımı özellikle 10 Gy gibi yüksek dozlarda reseptör ekspresyonu olmayan hücrelere göre (WT-C) anlamlı derecede daha yüksek olmasını sağlamaktadır (p=0194) Bu fark HSPG defektli hücrelerde 2 Gy dışındaki tüm dozlarda anlamlı bulundu (p=0. 0202) . HSPG ekspresyonu normal olan WT hücrelerde 6 ve 10 Gy dışındaki dozlarda fark anlamlı bulunmadı.

### HÜCRE SIKLUSU ANALİZİ

Coulter flow sitometri ile yapılan hücre döngüsü analizlerinin, M cycle programı ile işlenmesi sonucunda elde edilen veriler farklı saatlerde analiz edildi. İyonize radyasyon uygulanan hücrelere bir diploid bir aneuploid siklus gözlemlendi, istatistiksel analizler diploid döngü üzerinden yapıldı(Tablo 5-14, Şekil 6-12).

Tablo 5- CHO WT-A hücrelerinin hücre döngüsü analizi sonuçları

Zaman (saat)	%G1 Doney		%G1 Kontrol	%S Doney		%S Kontrol	%G2 Doney		%G2 Kontrol	% Toplam Doney	
	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle
12	23,5	82,8	46,2	51,0	16,9	41,6	25,5	0,3	12,2	57,9	42,1
24	52,5	89,9	45,2	47,5	10,0	37,1	0,0	0,1	17,6	52,0	48,0
36	44,8	38,1	43,8	45,1	53,8	55	10,2	8,1	1,2	78,4	21,6
48	43,6	54,4	53,8	49,6	41,9	46,2	6,8	3,7	0	72,5	27,5
60	48,6	53,6	53,2	34,2	23,8	44,6	17,1	22,7	2,2	75,8	24,2
72	94,1	60,8	69,3	5,9	32,1	19,8	0,0	7,2	10,9	18,5	81,5
96	51,7	41,2	70,8	47,4	53,9	23,4	0,9	4,8	5,8	68,2	31,8

Tablo 6- CHO WT-C hücrelerinin hücre döngüsü analizi sonuçları

Zaman (saat)	%G1 Doney		%G1 Kontrol	%S Doney		%S Kontrol	%G2 Doney		%G2 Kontrol*	% Toplam Doney	
	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle
12	50.2	83.0	35.2	49.8	17.0	52.8	0.0	0.0	12.1	61.6	38.4
24	63.4	87.4	34.8	35.2	12.6	47.6	1.5	0.0	17.6	72.2	27.8
36	42.3	43.4	38.3	55.4	56.6	41.4	2.2	0.0	20.3	66.8	33.2
48	45.0	42.0	50.5	54.8	58.0	49.0	0.0	0.0	0.5	82.9	17.1
60	33.2	53.6	47.0	48.3	20.1	31.4	33.2	35.2	21.6	75.2	24.2
72	46.2	54.2	62.9	37.2	30.6	24.9	16.5	15.3	12.3	71.1	28.9
96	49.2	38.7	45.9	44.5	29.7	34.6	6.3	31.6	19.4	8.4	91.6

Tablo 7- CHO 745C hücrelerinin hücre döngüsü analizi sonuçları

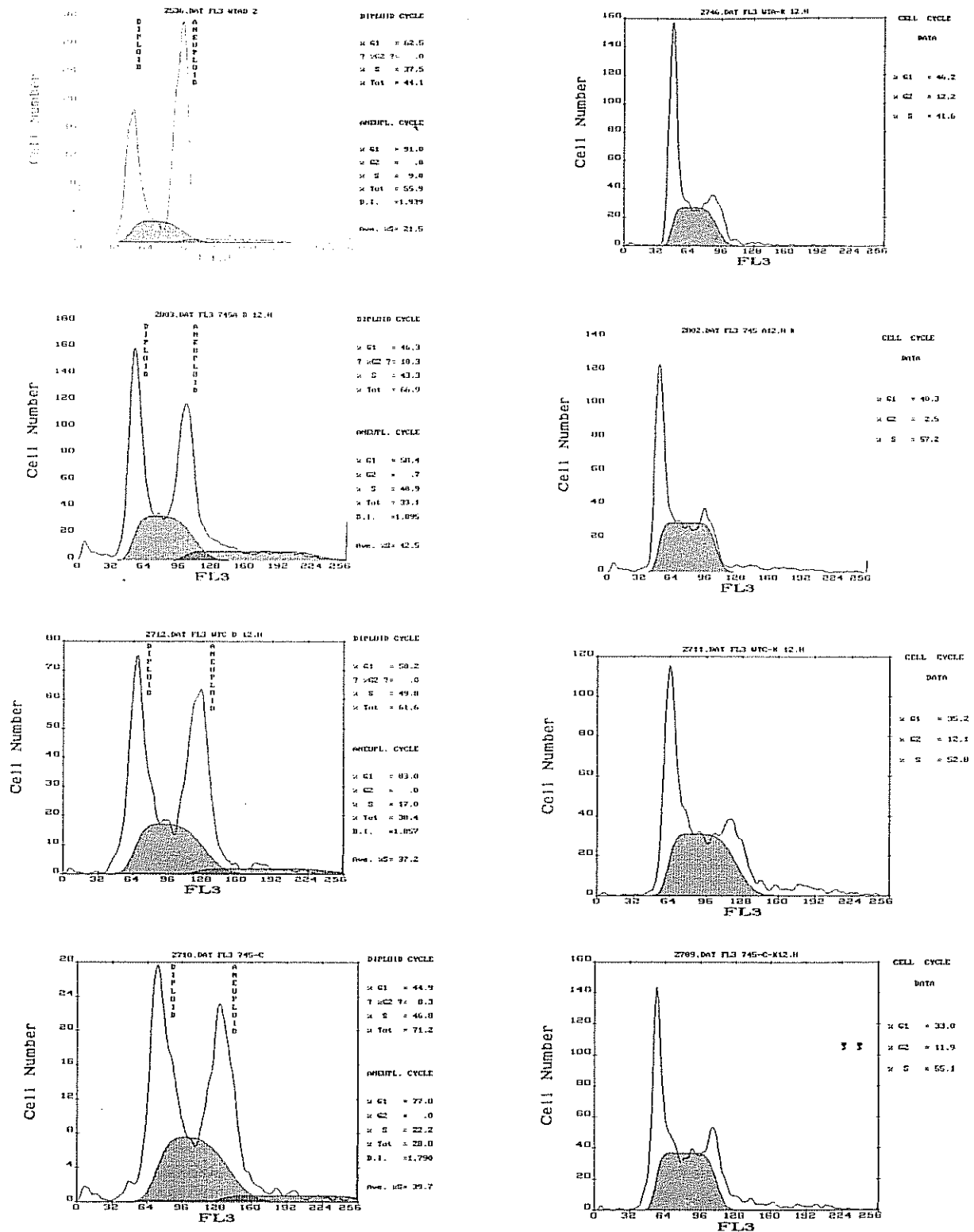
Zaman (saat)	%G1 Deneş		%G1 Kontrol	%S Deneş		%S Kontrol	%G2 Deneş		%G2 Kontrol	% Toplam Deneş	
	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle
12	44.9	77,8	33.0	49.8	17	55.1	0	0	11.9	61.6	38.4
24	66.1	82.2	52.0	22.6	16.4	38.5	11.3	1.4	9.5	61.8	38.2
36	37.0	44.3	50.1	58.1	47.3	39.9	4.8	8.4	10.0	76.5	23.5
48	44.9	77.8	55.1	46.8	22.2	29.8	8.3	0.0	15.1	71.2	28.8
60	33.2	44.8	29.6	48.3	20.1	69.1	18.5	35.2	1.3	75.2	24.8
72	33.1	40.2	55.1	44.6	39.7	22.6	22.3	20.0	22.3	59.0	41.0
96	47.3	63.1	59.1	39.4	0.0	22.8	13.2	36.9	18.1	39.4	60.6

Tablo 8. CHO 745-A hücrelerinin hücre döngüsü analizi sonuçları

Zaman (saat)	%G1 Deneş		%G1 Kontrol	%S Deneş		%S Kontrol	%G2 Deneş		%G2 Kontrol	% Toplam Deneş	
	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle	Diploid Cycle	Diploid Cycle	Aneuploid Cycle
12	46.3	58.4	40.3	43.3	40.9	57.2	10.3	0.7	2.5	66.9	33.1
24	51.9	84.4	44.4	32.1	15.6	37.0	16.0	0.0	18.7	58.4	41.6
36	64.2	74.2	58.5	32.5	25.8	15.6	3.3	0.0	25.9	65.8	31.2
48	43.4	56.9	50.4	49.3	43.1	34.8	7.3	0.0	14.8	76.0	24.0
60	48.7	60.7	53.6	34.1	25.1	21.9	17.2	14.3	24.5	50.2	49.8
72	92.1	60.1	56.3	5.0	0.0	24.4	2.9	39.9	19.3	9.6	90.4
96	57.9	50.5	57.9	28.0	33.5	18.0	14.1	16.0	24.1	36.1	63.9

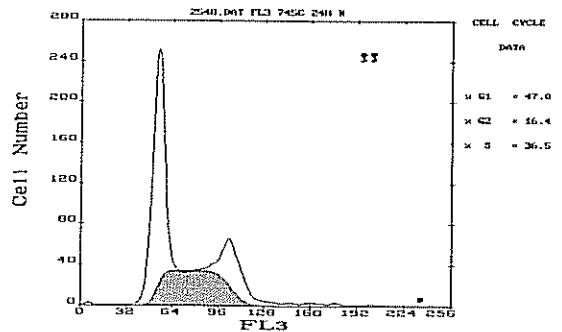
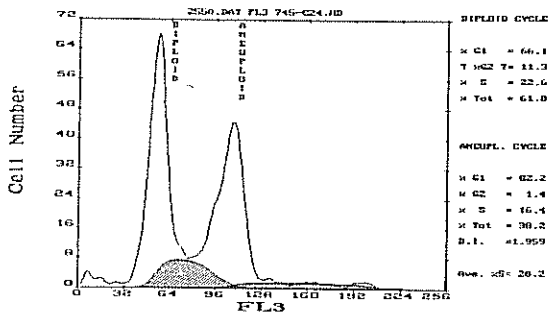
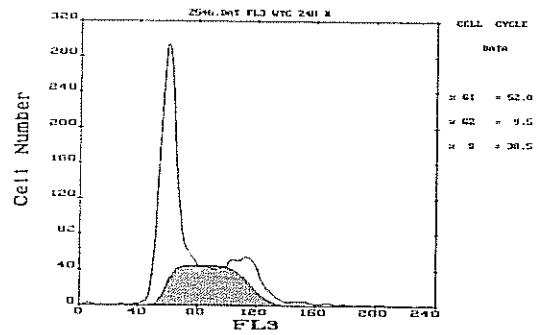
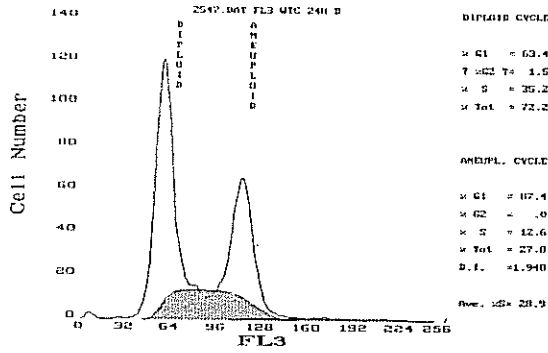
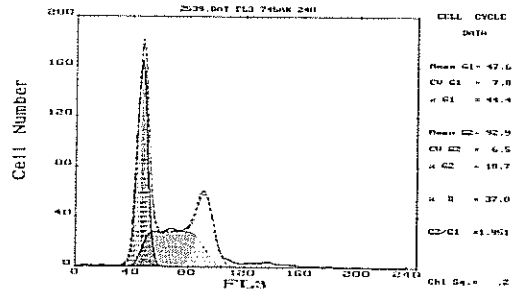
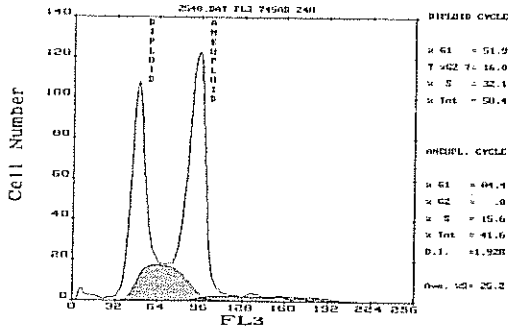
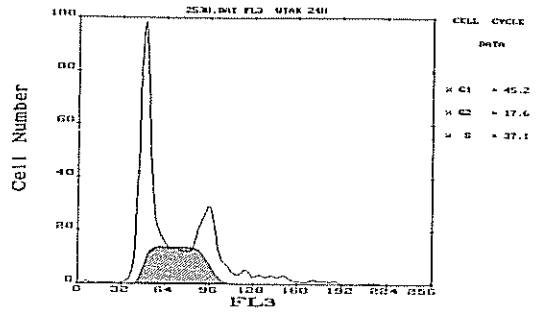
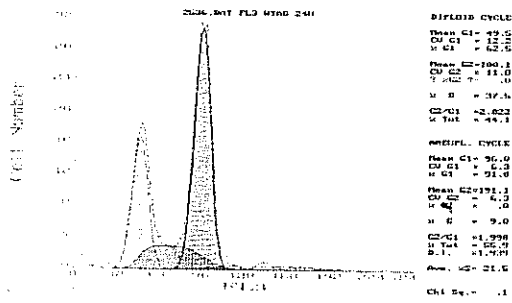
Tablo 9 . İyonize radyasyon uygulanan hücrelerde G1 fazının değeriendirilmesi

Zaman (saat)	H ü c r e T i p i (Deneş)			
	CHO- WT		CHO 745	
	WT-A	WT-C	745-A	745-C
12	23,5	50,2	46,3	44.9
24	52,5	63,4	51,9	66.1
36	44,8	42,3	64,2	37.0
48	43,6	45,0	43,4	44.9
60	48,6	33,2	48,7	33.2
72	94,1	46,2	92,1	33.1
96	51,7	49,2	57,9	47.3

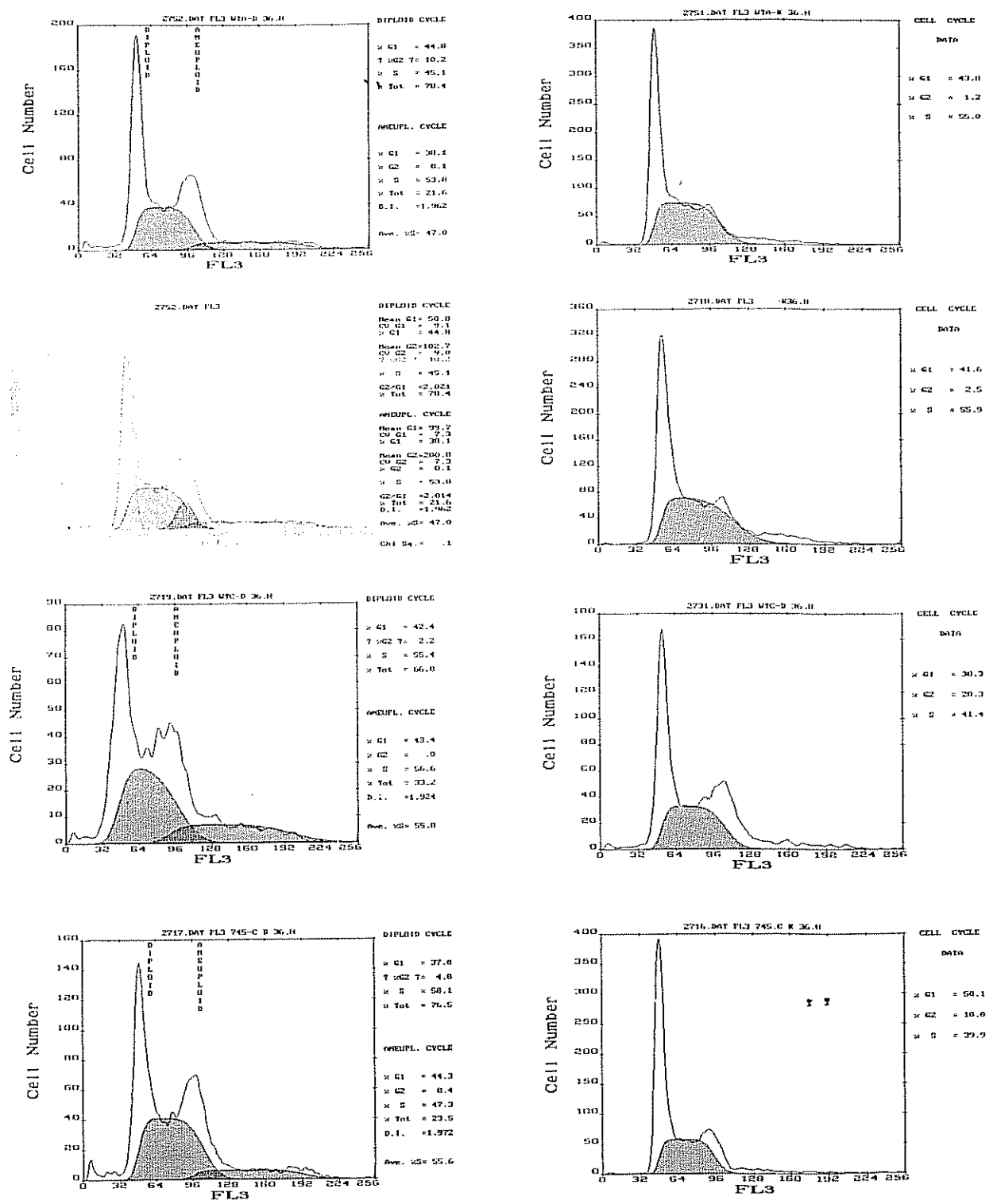


Şekil 6. CHO hücrelerinin 12. saattteki hücre döngüsü analizi sonuçları (A: WT-A Deney, B: WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F: WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)

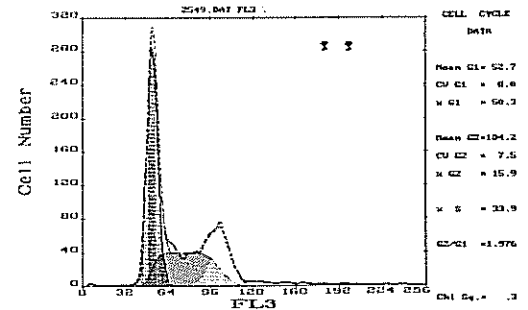
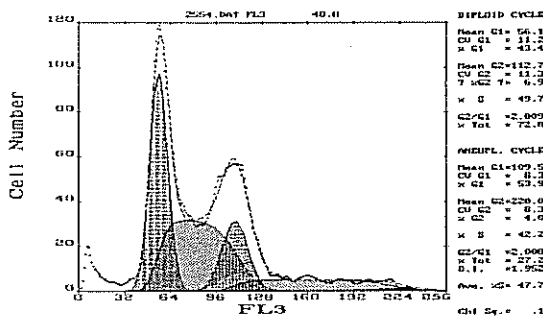
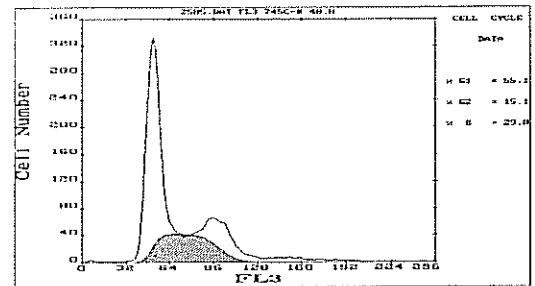
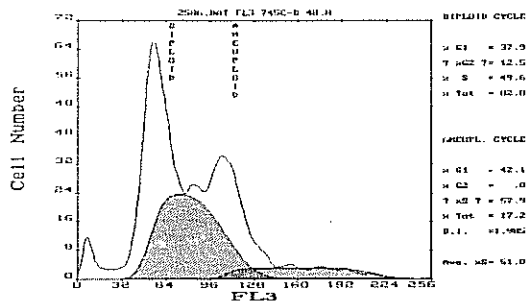
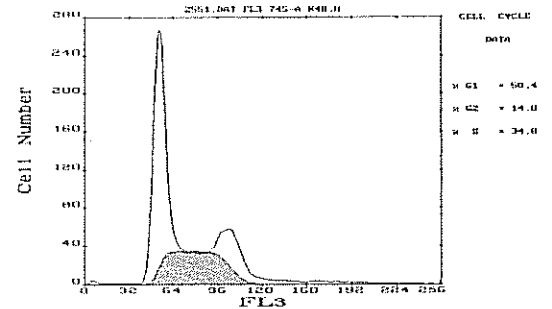
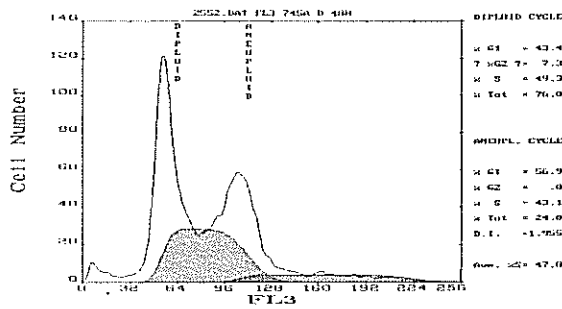
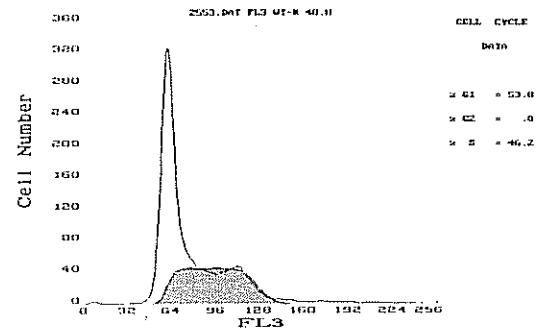
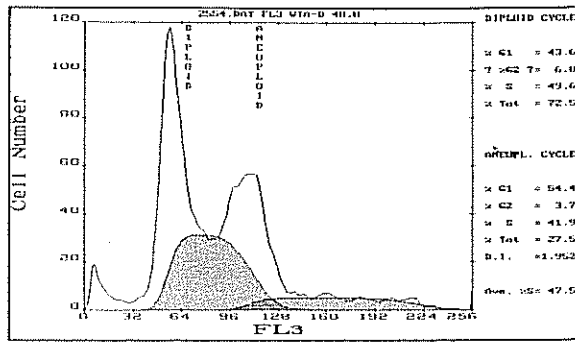




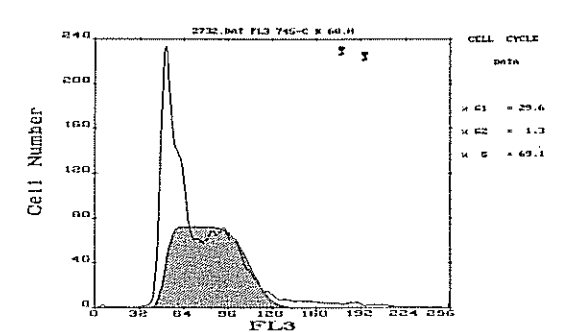
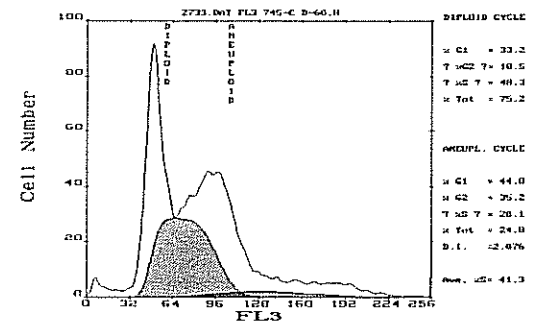
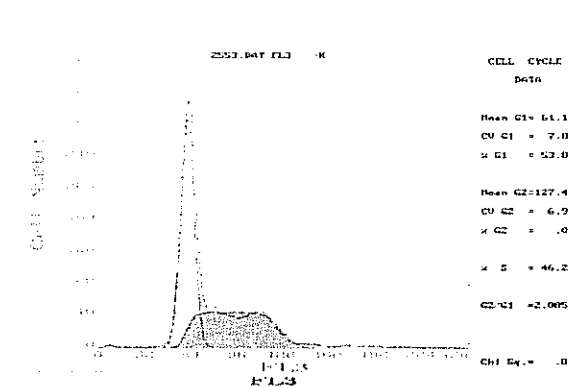
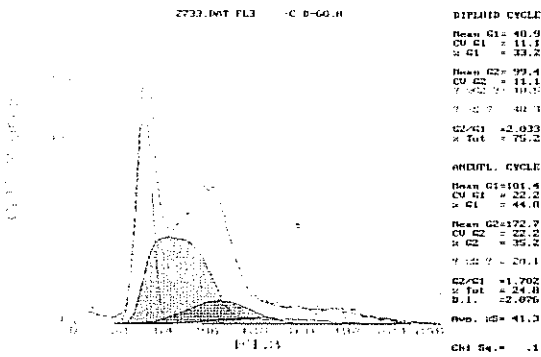
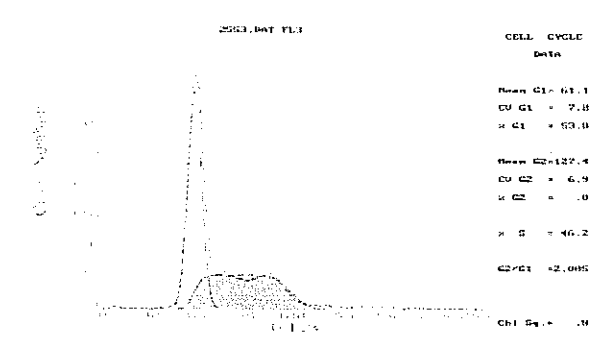
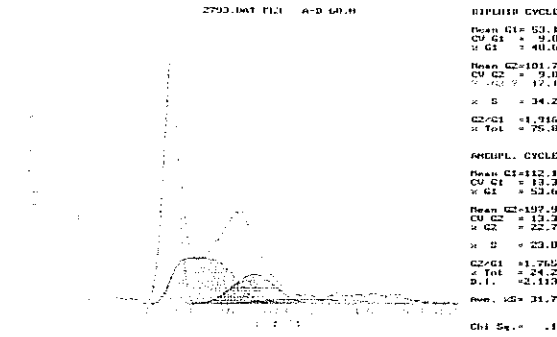
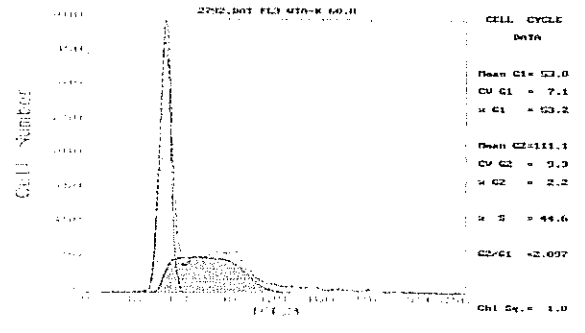
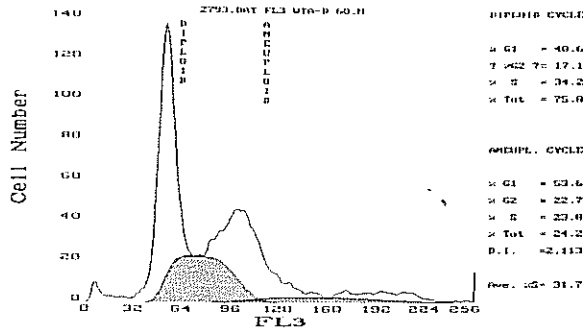
Şekil 7. CHO hücrelerinin 24. saattteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)



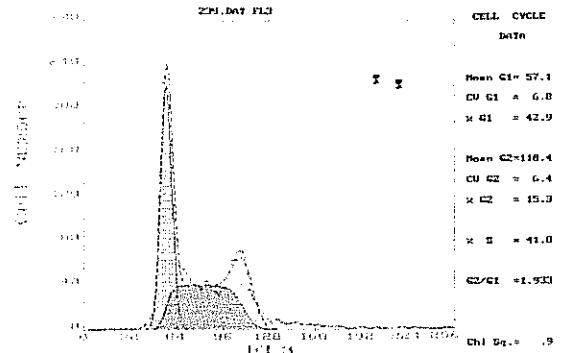
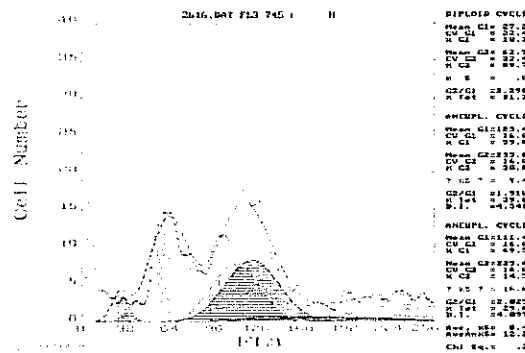
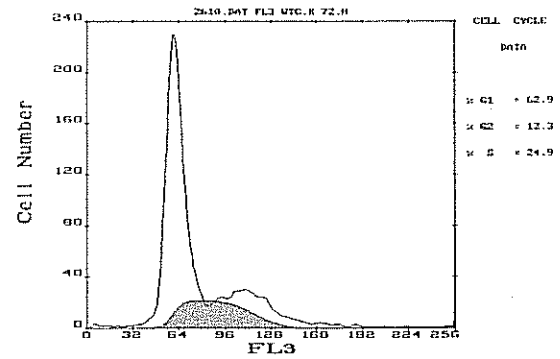
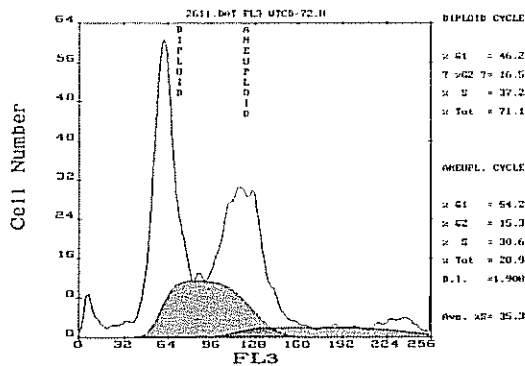
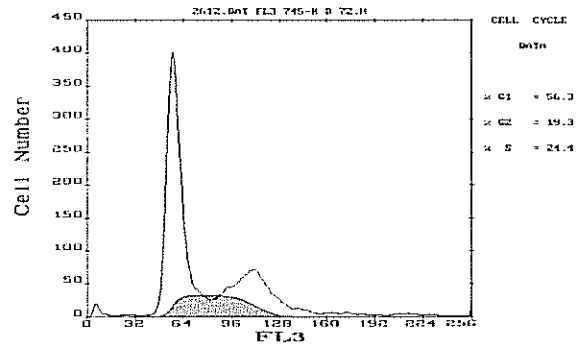
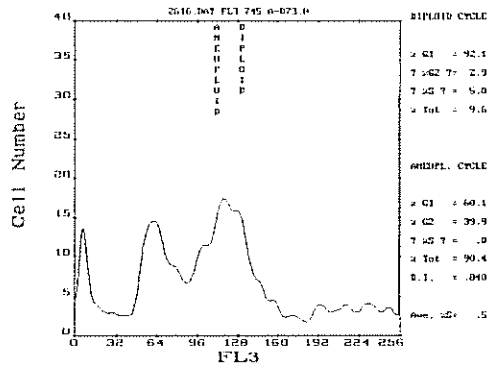
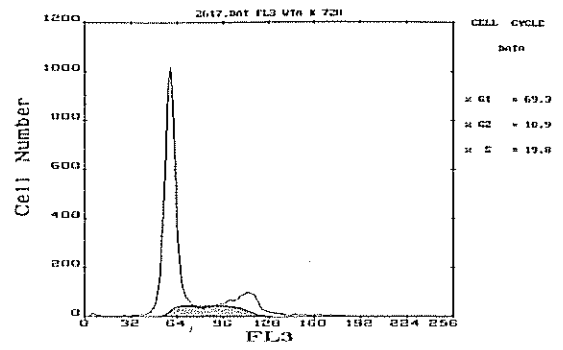
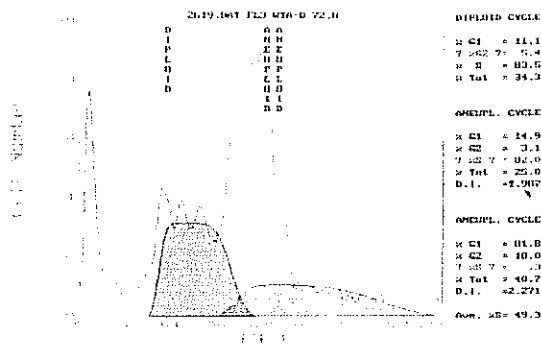
Şekil 8. CHO hücrelerinin 36. saattteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)



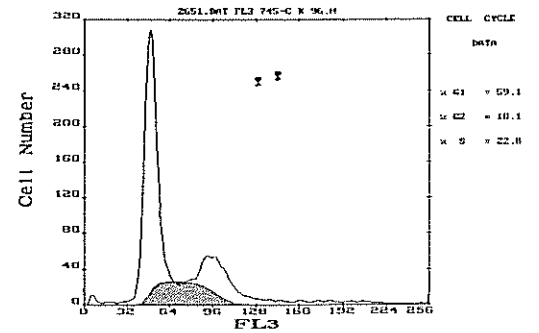
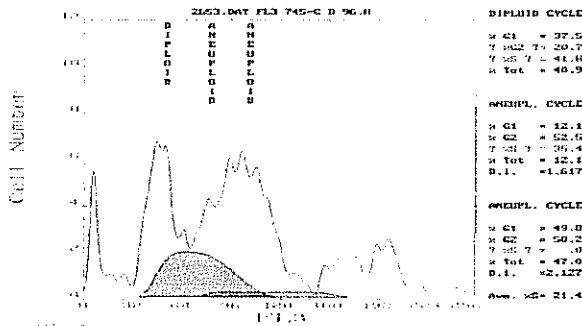
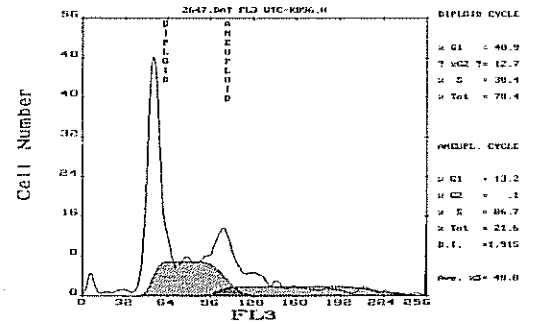
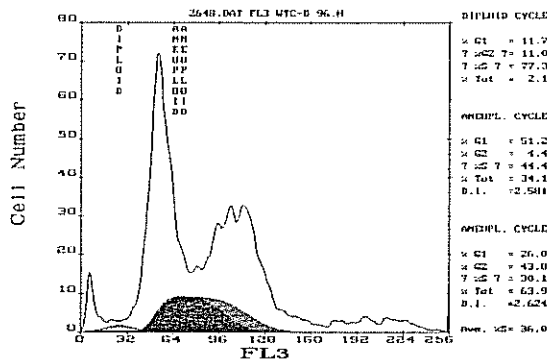
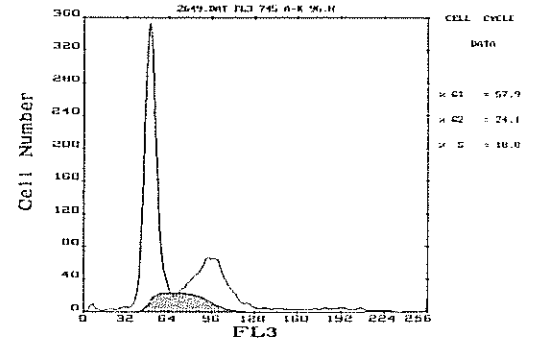
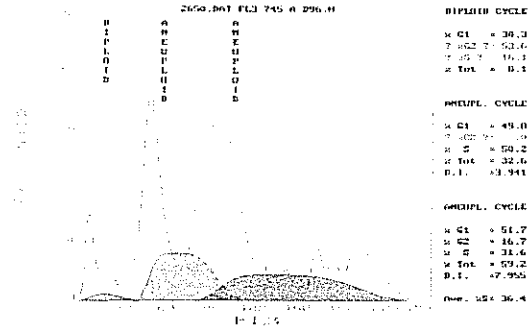
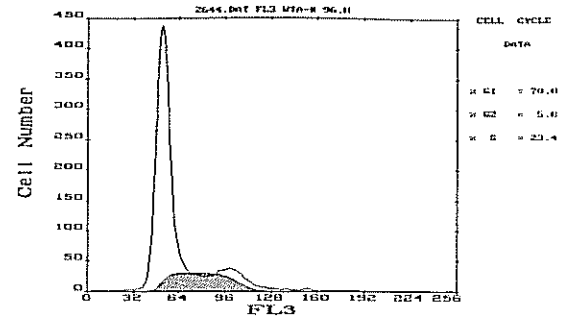
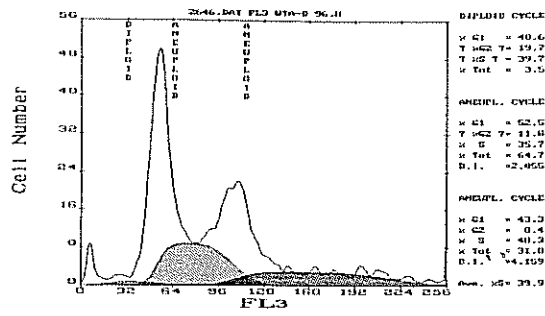
Şekil 9. CHO hücrelerinin 48. saattteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deneysel, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deneysel, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deneysel, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deneysel, H:745-C Kontrol)



Şekil 10. CHO hücrelerinin 60. saattteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)



Şekil 11. CHO hücrelerinin 72. saattteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A D deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A D deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C D deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C D deney, H:745-C Kontrol)



Şekil 12. CHO hücrelerinin 96. saattteki hücre döngüsü analizi sonuçları(A: WT-A Deney, B:WT-A Kontrol, C :745-A Deney, D:745-A Kontrol, E: WT-C Deney, F:WT-C Kontrol, G:745-C Deney, H:745-C Kontrol)

Tablo 10. Deney hücrelerinde S fazının değerlendirilmesi

Zaman(saat)	HÜCRE TİPİ			
	WTA	WTC	745-A	745C
12	51.0	49.8	43.3	46.8
24	47.5	35.2	32.1	22.6
36	45.1	55.4	32.5	58.1
48	49.6	54.8	49.3	46.8
60	34.2	48.3	34.1	48.3
72	5.9	37.2	5.0	44.6
96	47.4	44.5	28.0	39.4

Tablo 11. Deney hücrelerinde G2 fazının değerlendirilmesi

Zaman(saat)	HÜCRE TİPİ			
	WT-A	WT-C	745-A	745-C
12	25.5	0.0	10.3	8.3
24	0.0	1.5	16.0	11.3
36	10.2	2.2	3.3	4.8
48	6.8	0.0	7.3	8.3
60	17.1	18.5	17.2	18.5
72	0.0	16.5	2.9	22.3
96	0.9	6.3	14.1	13.2

Tablo 12. Kontrol hücrelerinde G1 fazının değerlendirilmesi

Zaman(saat)	WT-A	WT-C	745-A	745-C
12	46.2	35.2	40.3	33.0
24	45.2	34.8	44.4	52.0
36	43.8	38.3	58.5	50.1
48	53.8	50.5	50.4	55.1
60	53.2	47.0	53.6	29.6
72	69.3	62.9	56.3	55.1
96	70.8	45.9	57.9	59.1

Tablo 13 . Kontrol hücrelerinde S fazının değerlendirilmesi

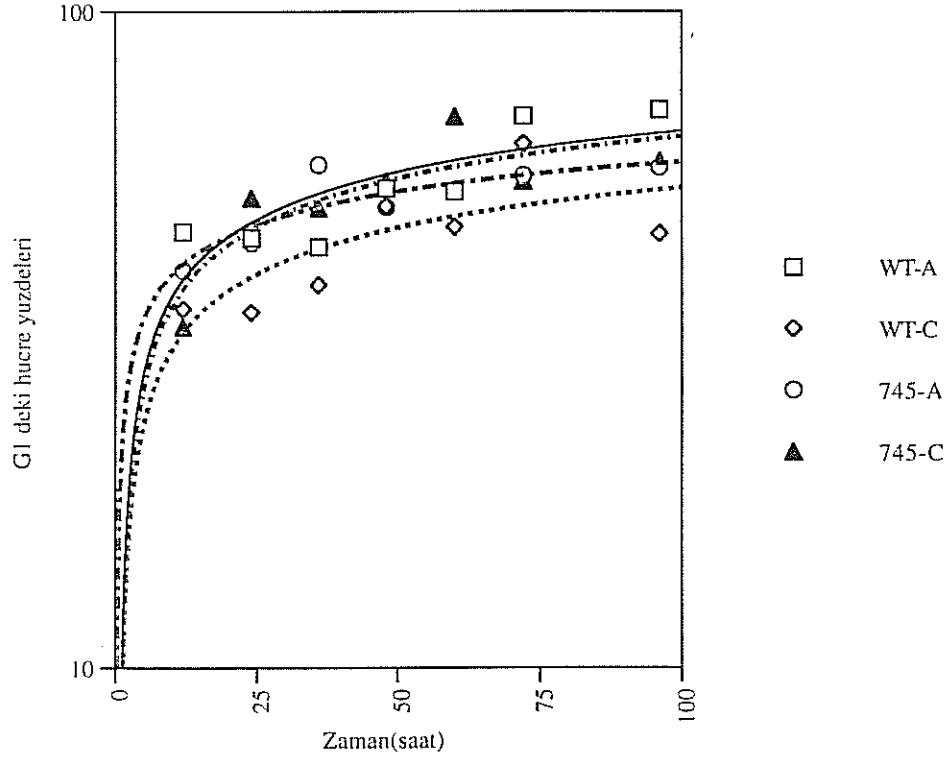
Zaman(saat)	HÜCRE TİPİ			
	WTA	WTC	745-A	745C
12	41,6	52.8	57.2	55.1
24	37,1	47.6	37.0	38.5
36	55	41.4	15.6	39.9
48	46,2	49.0	34.8	29.8
60	44,6	31.4	21.9	69.1
72	19,8	24.9	24.4	22.6
96	23,4	34.6	18.0	22.8

Tablo 14. Kontrol hücrelerinde G2 fazının değerlendirilmesi

Zaman(saat)	HÜCRE TİPİ			
	WT-A	WT-C	745-A	745-C
12	12,2	12.1	2.5	11.9
24	17,6	17.6	18.7	9.5
36	1,2	20.3	25.9	10.0
48	0	0.5	14.8	15.1
60	2,2	21.6	24.5	1.3
72	10,9	12.3	19.3	22.3
96	5,8	19.4	24.1	18.1

Bu verilerin istatistiksel analizi sonucunda iyonize radyasyon uygulanmayan kontrol hücrelerinde farklı zaman periyotlarında hücre döngüsünde ilerleyişin benzer olduğu görüldü. Ortalama veriler göz önüne alınarak çizilen grafikte G1 deki hücre yüzdeleri arasında anlamlı bir fark olmadığı ( $p=0.1489$ ) ve hücrelerin G1 de kalış sürelerinin sayısında bir artış dikkati çekmektedir benzer oldukları belirlendi (Şekil 13). Bu veriler G2 ve S dönemlerinde de paralellik göstermektedir (paternler benzer olduğundan şekil verilmemiştir)

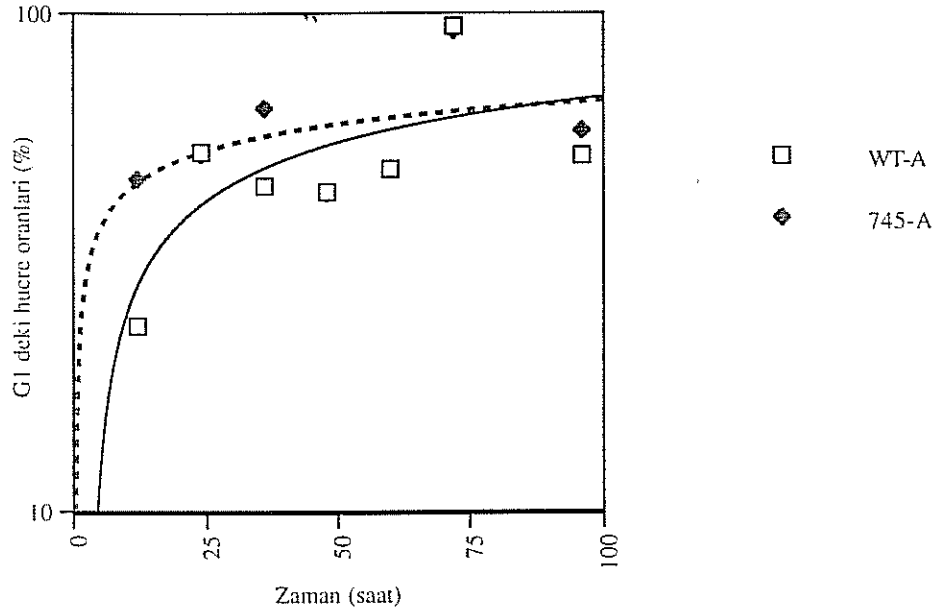




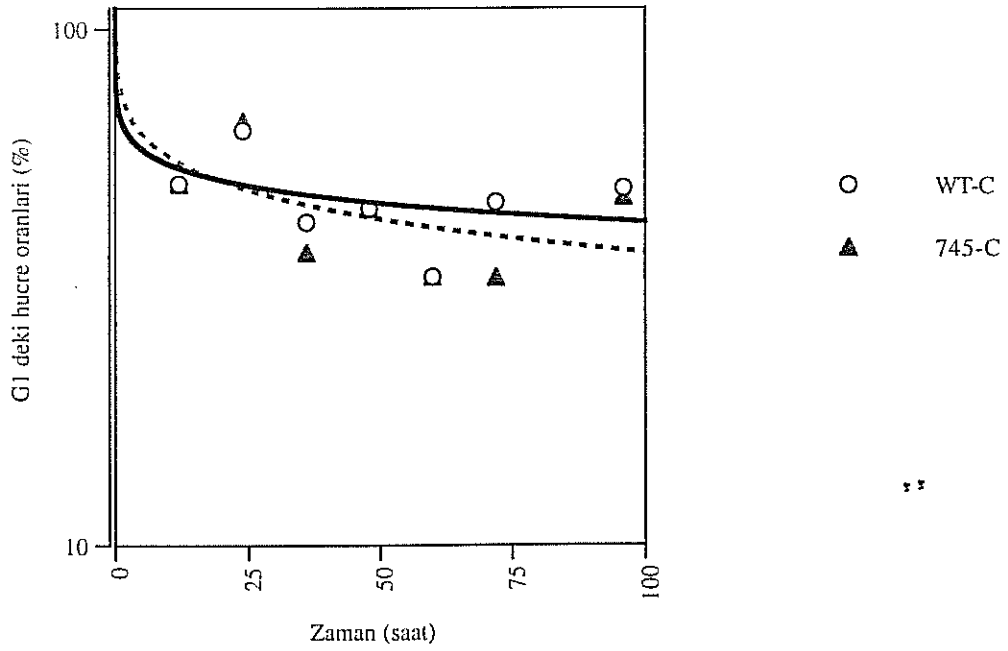
Şekil 13. CHO WT-A , CHO WT-C , CHO 745-A ve CHO 745-C hücrelerinde 10 Gy radyasyon uygulanmasından sonra farklı zaman aralıklarında G1 deki hücre oranları

10 Gy iyonize radyasyon uygulanan grupta hücre döngüsünde ilerleyiş hücrelerin KGFR ekspresyon etmemesine göre önemli derecede farklıdır ( $p = 0.0209$ ). Radyasyon uygulaması KGFR ü pozitif olan WT A ve 745 A hücrelerinde G1 deki hücre döngüsünde ilerleme paternleri ışınlanmayan hücrelere benzer bir dağılım göstermekte iken (Şekil 14 A), KGFR ekspresyon etmeyen WT-C ve 745-C hücrelerinde hücrelerin G1 de kalmadan ilerledikleri dikkati çekmektedir (Şekil 14B).

A) KGFR (+) olup HSPG eksprese eden (WT) ve etmeyen (745) hucreler



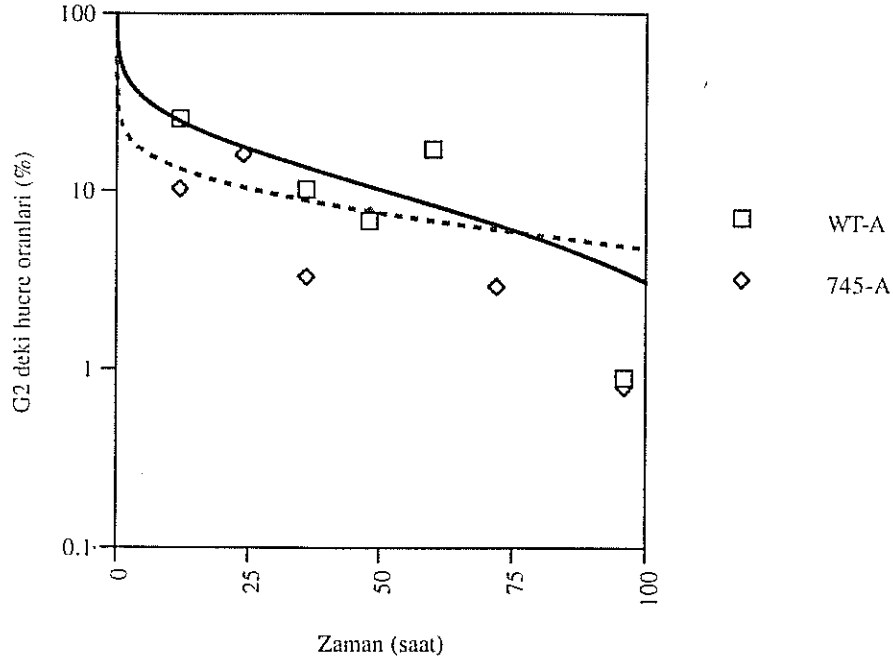
B) KGFR (-) olup HSPG eksprese eden (WT) ve etmeyen (745) hucreler



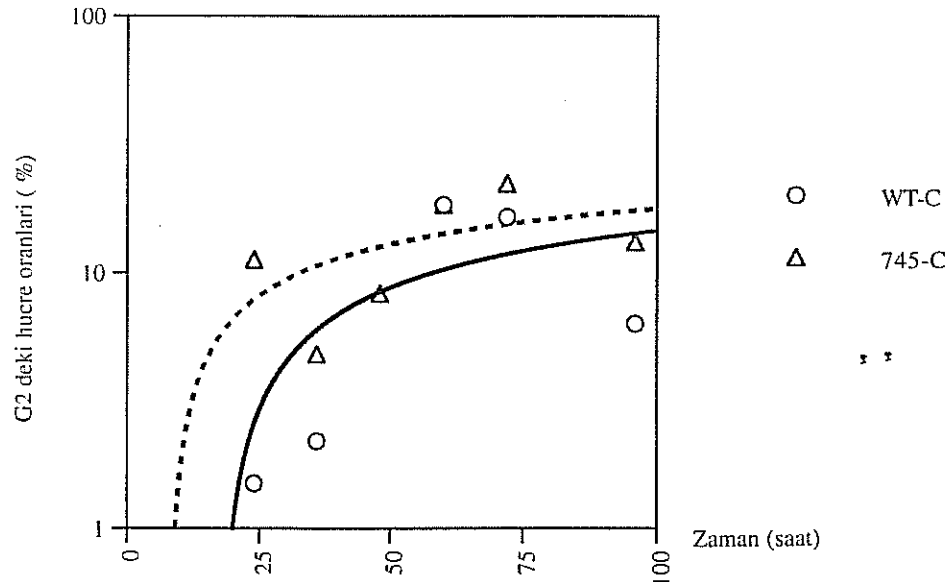
Şekil 14 . KGFR eksprese eden CHO WT-A ve CHO 745 A hücrelerinde (14A) ve KGFR eksprese etmeyen CHO WT-C ve CHO 745-C hücrelerinde (14B) G1 deki hücre yüzdeleri.

Bu veriler G2 ve S döneminde de karşılaştırılmış ve KGFR (+) olan hücrelerde zamana bağlı olarak G2 deki hücre oranlarında azalma görülürken (Şekil 15A) , KGFR (-) hücrelerin G2 de kalma oranlarında zamana bağlı bir artış olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 15B).

A. KGFR eksprese eden CHO WT-A ve 745-A hücreleri

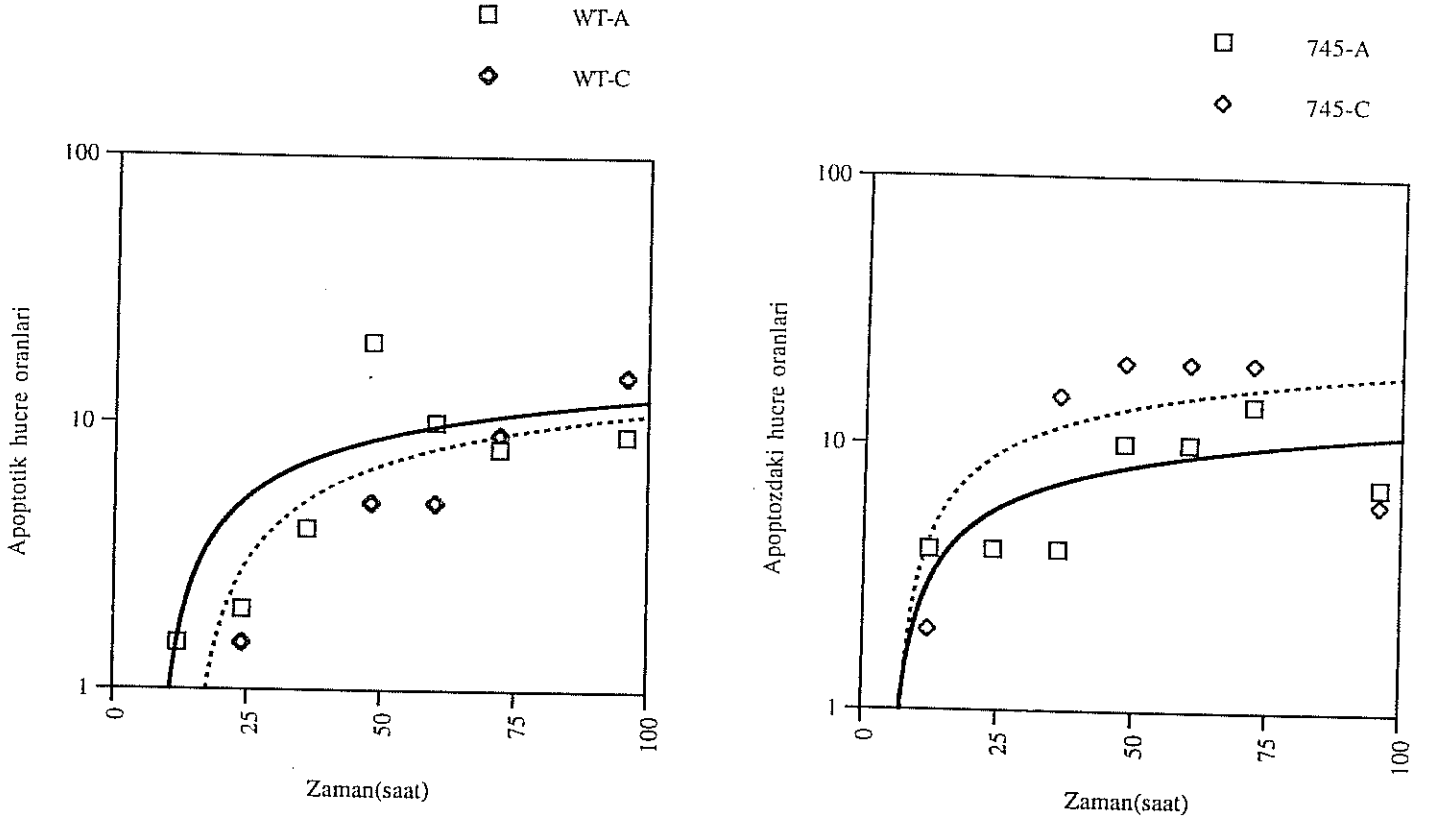


B-KGFR Eksprese etmeyen WT-C ve 745-C hücreleri



Şekil 15. KGFR eksprese eden CHO WT-A ve CHO 745 A hücrelerinde (15A) ve KGFR eksprese etmeyen CHO WT-C ve CHO 745-C hücrelerinde (15B) G2 deki hücre yüzdeleri.

10 Gy ışınlamayı takiben hücre döngüleri sırasında elde edilen apoptoz oranları gözönüne alındığında en yüksek apoptoz oranının KGFR ve HSPG defektli hücrelerde olduğu dikkati çekmektedir. Bunu KGFR (+) olan ve HSPG defektli hücreler izlemektedir. En düşük apoptoz oranı ise KGF ve HSPG ekspresyonu yüksek olan hücrelerdedir (Şekil 6-12, Şekil 16) . Bu bulgular hücre sağkalım analizleri ile uyumludur.



Şekil 16. 10 Gy ışınlanan CHO hücrelerinde farklı zaman aralıklarında apoptoz giren hücre oranları

A-HSPG ekspresyonu normal olan KGFR eksprese eden ve etmeyen hücreler (WT A ve WTC)

B-HSPG ekspresyonları defektli KGFR eksprese eden ve etmeyen hücreler (745 A ve 745C)

## TARTIŞMA

Hücrelerin radyasyona duyarlılığı henüz moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamış kompleks bir prosedir. Epitelial hücrelerin radyasyona karşı duyarlılığında KGF, KGFR ve HSPG ların rolünü araştırmayı hedefleyen çalışmamızda 2-10 Gy arasında 5 farklı dozda bir doz radyasyon uygulamasını takiben HPLG defekti olan hücrelerde (745 A ve C) sağ kalımın HPLG sentezi normal olan hücrelere (WT A ve C) oranla azaldığı görülmektedir. Hücre sağkalım oranları KGFR ile transfekte edilmiş ve edilmemiş hücrelerde karşılaştırıldığında , HPLG sentezi normal olan hücrelerde 2, 4, 8 Gy lerdeki sağ kalım oranının birbirine çok yakın olduğu, ancak 6 Gy lik dozda KGFR reseptörü taşımayan hücrelerde (WT-C) sağ kalımın daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Doz 10 Gy e çıktığında ise KGFR ile transfekte edilmiş ve HPLG defekti (WT-A) olmayan hücrelerin sağ kalımının daha yüksek olduğu görülmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin ve iyonizan radyasyonun hızla bölünmekte olan tümör hücrelerini öldürmeleri hedeflenmektedir. Hücre sağ kalımındaki artış tümör hücreleri için tedaviye direnç anlamına gelirken, radyasyondan etkilenen hızla ve sürekli bölünmekte olan kemik iliği hücreleri, gastrointestinal sistemi döşeyen epitel hücreleri, endotel hücreleri gibi normal hücrelerde ise hücre hasarına bağlı oluşan yan etkiler anlamına gelmektedir. Son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalar rekombinant KGF in sistemik veya lokal uygulamasını takiben çok sayıda hayvan modelde GIS i döşeyen epitelin, akciğer, mesane gibi dokulardaki epitel hücrelerinin epitelial/mukozal hasardan korunduğu gösterilmiştir<sup>21,22</sup> Ayrıca KGF in radyasyon ve/veya kemoterapi tarafından uyarılan oral veya gastrointestinal mukozitlere karşı sitoprotektif etkisi olduğu ve mukozit oluşumunu engellediği gösterilmiştir<sup>21</sup>. Çalışmalar KGF in radyasyon veya 5 florourasil veya methotrexate veya radyasyon, 5 florourasil ve methotrexate kombinasyonu uygulanan hayvanlarda sağ kalımı arttığını göstermiştir. Radyasyon veya kemoterapi uygulaması sonrası KGF verilen hayvanlarda önce kilo kaybının anlamlı derecede azaldığı ve zamanla kilo almaya başladıkları saptanmıştır. Bunun KGF in mukozal kalınlığı artırması ve ince barsaktaki kript survivalını artırması ile ilgili olduğu düşünülmekle birlikte , KGF in iyileştirici etkinin KGF in hücreleri apoptoza girmesini engellemesi ile gerçekleştiği de düşünülmektedir. Buna ek olarak KGF in tip 2 alveolar epitel hücreleri için in vivo ve invitro mitojen olduğu ve akciğeri hiperoksiya gibi hasarlardan koruduğu gösterilmiştir<sup>19, 22</sup>. Bu etkinin KGF in oksijen tarafından indüklenen DNA ipliği kırıklarının oluşumunu blokladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca KGF uygulaması sonrasında p21, p53 ve bax proteinlerinin

ekspresyonlarında azalma olduğunu ve KGF in tip 2 alveolar epitel hücreleri için bir sağkalım faktörü olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmalarda KGF in hücre sağkalımını artırıcı etkisi üzerinde durulmuş ancak KGF in biyolojik etkisini göstermek ve hücre içi sinyal iletimi yollarını uyarmak için mutlaka hücre yüzeyinde eksprese olması gereken KGFR den ve KGFR-KGF ilişkisinin ve reseptör dimerizasyonunun gerçekleşmesinde önemli role sahip HSPG ların ekspresyonlarından söz edilmemiştir. Çalışmamızda HSPG ların hücre sağkalımını artırıcı dolayısıyla hücreleri ölümden koruyucu etkisi olduğu görülmüştür. HSPG ların KGF sinyal iletiminde rolünü araştırılan çalışmalarda ortamda heparin olmadığı zaman p42 ve p44 MAP kinaz aktivasyonunun gerçekleşmediğini, ortama heparin eklenmesi veya HSPG ların varlığı halinde MAP kinaz aktivasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir<sup>10</sup>. Ayrıca ortamda heparin olmadığıda KGF tarafından stimüle edilen *c-fos* geni ekspresyonunun da azaldığı gösterilmiştir<sup>10</sup>. *c-fos* geni transkripsiyonu AP-1 transkripsiyon faktörü gibi transkripsiyonel regülasyonda çok önemli role sahip genlerin regülasyonunu sağlar<sup>12,13,14</sup>. Birçok araştırmacı ısı şoku uygulanması, uv irradiasyonu, iyonize radyasyon uygulaması ve kimyasal ajanlarla muamele sonrası *c-jun*, *c-fos* genlerinin eksprese olduğunu göstermiştir<sup>12,14</sup>. Bu stres ayrıca AP-1 bağlama aktivitesini de etkilemektedir. AP-1 ise FGF gen ekspresyonunu artırmaktadır. Özellikle kemoterapiye dirençli meme kanseri hücre hatlarında iyonize radyasyon uygulamasını takiben *c-jun*, *c-fos* genlerinin ekspresyonlarının ve AP1 bağlama aktivitesinin ve bFGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir<sup>12</sup>. Ayrıca, araştırmalar endotelial hücrelerde iyonize radyasyon uygulamasını takiben HSPG ve CS/DS proteoglikanların sentez ve sekresyonunu artırdığını göstermiştir<sup>9</sup>. HSPG ların hem hücre-hücre hemde hücre-matriks integritesinin korunmasında önemi gözöüne alındığında hücre sağ kalımı için önemli olabilecekleri düşünülmektedir. Ayrıca ECM de bFGF ve bazı diğer GF lerin depolanmaktadır<sup>9</sup>. ECM den salınımları ise heparin, HS ve heparitinaz gibi HS degrade eden enzimler aracılığı ile gerçekleşmektedir. İrradiasyonun bFGF in kültür ortamına salınımını sağladığı ve bu büyüme faktörünün ortamda bulunması halinde hücrelerin radyasyona bağlı letal hasardan korunduğu saptanmıştır. Bu koruyucu etkinin mekanizmalardan birisinin HSPG lar ile bFGF in oluşturduğu kompleksin hücre içi sinyal iletimini yolu ile bFGF salınımını stimüle etmesi ve bFGF in de hücre membranlarında hasar oluşumunu engellemesi şeklindedir.

Hücre permeabilitesinde doza bağımlı artma olması radyasyona erken yanıtlardan birisi olup (yaklaşık 3 saat sonra ortaya çıkar) radyasyonun intestinal, endotelial ve korneal epitel hücrelerinde bariyer fonksiyonu azalttığı ve oksijen kökenli serbest radikallerin oluşumunu başlattığı bilinmektedir. Bu oluşan serbest radikaller epitel hücrelerini etkileyerek permeabilitede artışa neden olmaktadır. Savla ve arkadaşları (19) KGF uygulamasının 2 ve 5 Gy dozlarda radyasyona bağılı olarak gerçekleşen hücre permeabilitesindeki artışın doza bağımlı olarak azalmasına neden olduğunu, 10 Gy dozdaki permeabilite artışını ise tamamen blokladığını göstermişlerdir. KGFR ü tirozin kinaz aktivitesi gösterir. KGFR tirozin fosforilasyonu hücre iskeleti reorganizasyonu ve bariyer fonksiyonun modülasyonu ile de ilişkilidir. Aynı çalışmada bu permeabilite artışı azalmasının ortama tirozin kinaz inhibitörü olan genisteinin eklenmesi ile ortadan kalktığı, dolayısıyla tirozin kinaz yolu ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Tirozin fosforilasyonu adherent junctionların en önemli komponentlerinden olan vinkulin, alfa aktinin gibi proteinlerin katılımı ile gerçekleşen hücre iskeleti reorganizasyonu ve sıkı bağlantıların yapılanmasında önemlidir. KGF uygulamasının bir diğer etkisinin de radyasyona bağılı F aktin hücre iskeleti hasarının azaltılması olduğu, filamentlerin intakt olarak kalmasını sağladığı saptanmıştır. KGF ve HSPG ların varlığında KGFR dimerize olmakta, tirozin kinaz aktivasyonu ve otofosforilasyon sonrası fosfolipaz C gama (PLC- $\gamma$ ) ve mitojence aktive edilen protein kinaz (MAPK) aktive olmaktadır. PLC- $\gamma$  ise KGF in biyolojik etkilerinin gerçekleşmesinde çok önemli rol oynadığı saptanan protein kinaz C (PKC) aktivasyonunu sağlamaktadır. PKC paraselüler permeabilitenin gerçekleşmesinde rol oynadığı bilinen sıkı bağlantıların (tight junctions) yapılanmasında da önemlidir. PKC nin bloklanması sonucu KGF in radyasyona bağılı permeabilite artışını azaltmak gibi biyolojik etkileri gerçekleşmemektedir. KGF tarafından aktive edilen PKC ve tirozin kinaz aktivasyonunun aktin depolimerizasyonunu veya G aktin ile F aktin arasındaki bağlantının bozulmasını önleyerek hücre iskeletinin stabilizasyonunu sağladığı ve gap formasyonu oluşumunu önlediği düşünülmektedir<sup>19</sup>. Haimovitz-Friedman ve ark (15) bFGF stimülasyonu sonrasında aktive olan PKC nin antiapoptotik etkili olduğu ve PKC yi bloklayan inhibitörlerin ortamda varlığı bFGF in radyasyona bağılı apoptozdan koruyucu etkisinin ortadan kalktığını bildirmişlerdir. Bizim verilerimiz de 10 Gy ışınlamayı takiben en yüksek apoptoz oranının KGFR ve HSPG defektli hücrelerde olduğunu, bunu KGFR (+) olan ve HSPG defektli hücreler izlediğini, en düşük apoptoz oranının ise KGF ve HSPG ekspresyonu normal olan hücrelerde gözlendiğini göstermiştir. Daha önce de belirtildiği gibi KGF ve HSPG ların

varlığında KGFR de tirozin kinaz aktivasyonu olduğu ve tirozin kinaz aktivasyonunun PKC yolu ile PLC $\gamma$  yi aktive etmektedir. HSPG lar ve KGFR ü varlığında elde edilen hücre sağ kalımı artışı ve apoptozdaki azalma da bu mekanizma ile ortaya çıkmış olabilir. İleriki çalışmalarda çalışmamızda kullandığımız hücre hatlarında tirozin fosforilasyon ve/veya PKC aktivasyonu engellenerek hücre sağkalımı ve apoptoz oranları incelenerek elde edilen etkinin PKC bağımlı olup olmadığı araştırılabilir.

İyonize radyasyon gibi etkenlerin hücre siklusunun G1 fazında durdurulması DNA tamiri veya apoptoz yollarından birisinin seçiminde önemlidir. Bu restriksiyon noktasının geçilmesinde veya G1 arrestinde P53 aktivasyonu önemlidir, ancak CHO hücrelerinde p53 den bağımsız bir başka mekanizmanın da var olduğu gösterilmiştir. G1/S kontrol noktasında defekt olan mayaların normallere oranla radyasyona bağlı sağ kalımlarının anlamlı derecede düşük olduğu bildirilmiştir<sup>31</sup>. Proje kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmada 10 Gy radyasyon uygulaması KGFR ü pozitif olan WT A ve 745 A hücrelerinde G1 deki kalış süresinde zamana bağımlı bir artışa neden olurken (Şekil 14 A), KGFR eksprese etmeyen WT-C ve 745-C hücrelerinde hücrelerin G1 de kalma sürelerinde zamana bağlı bir azalma olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 14B). G1 de kalış süresi daha uzun olan hücrelerin KGF tarafından stimüle edilen DNA hasar tamirini gerçekleştirmesi ve dolayısıyla sağ kalımın artması mümkündür. Yi ve arkadaşları<sup>28</sup> akciğerlerde KGF tarafından stimüle edilen re-epitelizasyonun radyasyon tarafından uyarılan fibrozisin önlenmesinde önemli olduğunu bildirmişlerdir. KGF e bağlı olarak ortaya çıkan DNA tamirindeki artış da bu koruyucu etkide önemli olduğu saptanmıştır. Bir başka çalışmada KGF in kültüre edilmiş akciğer epitel hücrelerinde radyasyona bağlı DNA hasarını önlemekte ve DNA tamirini DNA polimeraz bağımlı olarak indüklemekte olduğu belirlenmiştir<sup>25</sup>. DNA hasarının onarımında p53 düzeyindeki artışın G1 arrestinden ve iyonize radyasyona bağlı apoptozdan sorumlu olduğu bilinmektedir<sup>27</sup>. p53 bağımlı G1 arresti sonrasında p21 ve gadd45 i de içeren pek çok molekül aktive olur<sup>29</sup>. p21 G1 CDK-siklin aktivitesini inhibe ederek G1 arrestine neden olurken ayrıca proliferating cell nükleer antijen (PCNA) ile ilişkiye girerek PCNA tarafından düzenlenen DNA transkripsiyonunu ve PCNA tarafından düzenlenen DNA tamirini inhibe eder<sup>25,26</sup>. PCNA e bağlanarak DNA eksizyon tamirini stimüle eden bir protein olan Gadd45 düzeyi de p53 indüksiyonu sonrası artar. Bu protein de hücrenin S fazına girmesini engeller. Ancak kısa son zamanlarda Hu ve arkadaşları<sup>30</sup> bazı CHO hücrelerinde p53 ün DNA ya bağlanan



bölgesinde iki adet nokta mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonu taşıyan hücrelerde G1 kontrol noktasının ortadan kalktığını bildirmektedirler . Bizim çalışmamızda kullanılan CHO hücrelerinde böyle bir etki gözlenmemiştir. Bu veri hücrelerde p53 ekspresyonunun normal olduğunu, veya G1/S geçişini kontrol eden başka mekanizmaların da var olabileceğini düşündürmektedir. Ancak KGFR ve HSPG ekspresyonu normal olan hücrelerde G1 arrestinin nasıl gerçekleştiği hakkında kesin yorum için hücre hatlarında p53 mutasyonlarının aranması veya bu geçişin kontrolünde önemli olduğu düşünülen genlerin hücre döngüsü regülasyonundaki rollerinin araştırılması gerekmektedir. G1/S kontrol noktasından geçişte büyüme faktörlerinin rol oynadığı IGF-II ile transfekte edilmiş CHO hücrelerinde hücre döngüsünün kısaldığı ve DNA hasarlarının oluşumunun arttığı (veya tamir edilemediği), buna bağlı olarak da G1 kontrol noktasından geçişte azalmalar olduğu saptanmıştır<sup>29</sup>.

Çeşitli araştırmalarda G1/S geçişinde rol oynadığı düşünülen p53 den bağımsız mekanizmaların da var olduğu saptanmıştır<sup>31,32</sup>. Bu kontrolün gerçekleşmesinde RAD9 gen ürününün rolü olabilir<sup>31</sup>. CHO hücrelerinde yapılan çalışmalar sonucunda overekspresyonu sonrasında iyonize radyasyona direnç gelişimine neden olduğu belirlenen bir diğer gen de, bakterilerde farklı tiplerde (tek veya çift iplik kırıkları, post replikasyon gap gibi) DNA hasarlarının tamirinde görev alan RecA proteini homologu Rad51 dir<sup>32</sup>. Rad 51 in CHO hücrelerinde DNA daki çift iplik kırıklarının onarımında görev aldığı ve bunu DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK) yolu ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Rad51 overeksprese eden CHO hücrelerinde Rad 51 inhem homolog rekombinasyonda hem de iyonize radyasyona karşı direnç gelişiminde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada KGF reseptörü eksprese eden (WT-A, 745-A) HSPGs sentezleyen (WT-A) ve sentez defektli (745-A) Chinese Hamster Ovary (CHO) hücre hatları ile KGF reseptörü eksprese etmeyen (WT-C, 745-C) HSPGs sentezleyen (WT-C) ve sentez defektli (745-C) hücre hatları kullanılarak, KGF in KGFR'nin ve KGF-KGFR sinyal iletiminde rol oynadığı düşünülen HSPG ların radyasyon ile uyarılan hücre hasarı, hücre ölümü ve hücre döngüsü regülasyonunda önemi araştırılmıştır.

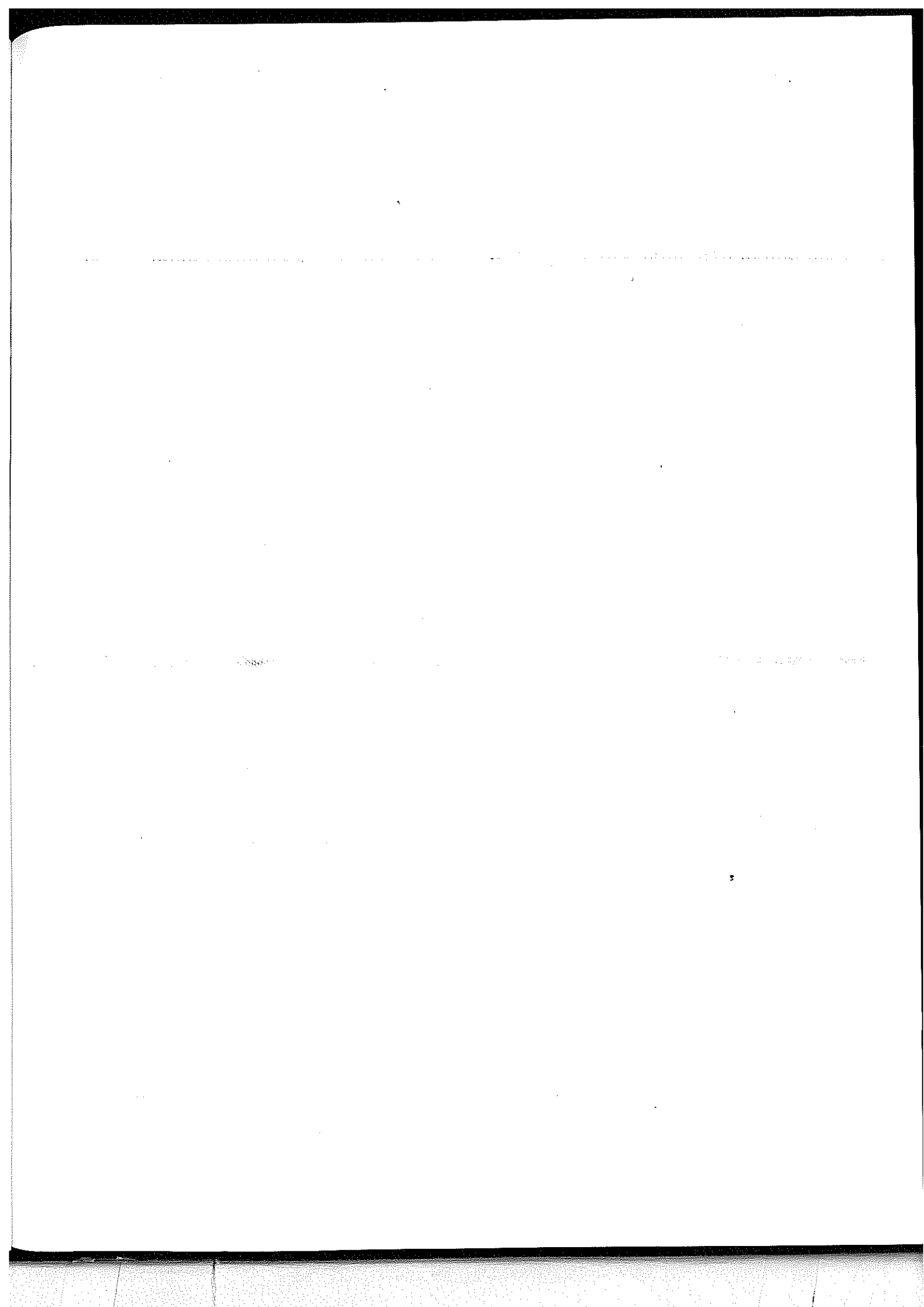
Çalışmada farklı dozlarda radyasyon uygulaması sonrası hücre sağ kalımları belirlenmiş ve flow sitometri kullanılarak hücre siklusu analizleri yapılmıştır. KGFR ve özellikle HSPG ekspresyonlarının iyonize radyasyona uygulaması sonrası hücre sağ kalımını artırdıkları ve hücreleri apoptozdan korudukları gösterilmiştir. Hücre döngüsü analizleri ise KGFR eksprese eden hücrelerin G1 fazında kalma süresinin, KGFR eksprese etmeyen hücrelerden anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak KGFR ve HSPG ların varlığı hücreleri apoptozdan korumakta ve hücre sağkalımını artırmaktadır. Bu veri bir tümör popülasyonunun HGFR ve KGFR ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi iyonize radyasyona ve/veya kemoterapötiklere karşı direncin önceden saptanmasında marker olarak kullanılabilir. Ayrıca KGF in veya HSPG ların lokal veya sistemik uygulaması radyasyon uygulamasını takiben ortaya çıkan epiteliyal hücre ölümüne bağlı mukozitlerin, pnemoni ve pulmoner fibrozis gibi radyoterapiye bağlı yan etkilerin azaltılmasında yararlı olabilir.

## KAYNAKLAR

- <sup>1</sup> Rubin JS, Osada H, Finch PW et al. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. PNAS,1989, 86:802-806
- <sup>2</sup> Finch PW, Rubin JS, Miki T ve ark Human KGF is FGF related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth, Science, 1989,245:752-755.
- <sup>3</sup> Aaronson SA, Bottaro PD, Miki T et al. KGF:A fGF family member with unusual target specificity, Ann N.Y Acad Sci,1991,638:62-77.
- <sup>4</sup> Rubin JS, Bottaro DP, Chedit M et all. Keratinocyte growth factor, Cell Biol Intern. , 19(5):399-411,1995
- <sup>5</sup> Szebenyi G, Fallon JF. Fibroblast growth factor as multifunctional signaling factor, Int Rew Cytol, 1999, 185: 45-106.
- <sup>6</sup> Nemeth JA, Zelner DJ, Lang S. Endocrinology ,1998, 156:115-125
- <sup>7</sup> Leung HY, Mehta P,Gray L et al. Oncogene, 1997, 15:1115-1120
- <sup>8</sup> Ishivata T, Friess H, Büchler M et al. Characterization of KGF and KGFR expression in human pancreatic cancer, Am J Pathol,1998, 153(1):213-222
- <sup>9</sup> Pye, Biochem,Biohy Acta 1994
- <sup>10</sup> LaRochella WJ, Sakaguchi K, Atabey N et al. Heparan sulfate proteoglycan modulates KGF signaling through interaction with both ligand and receptor, Biochemistry,1999, 38(6):1765-1771
- <sup>11</sup> Hsu YR, Nybo R, Sulliiivan JK, et alHeparin is essential for single KGF molecule to bind and form a complex with two molecules of extracelular domain of its receptor, Biochemistry,1999, 38:2523-2534
- <sup>12</sup> Lee YJ, Galaforo SS, Berns C et al. Effect of ionizing radiation on AP1 bindingactivity and bFGF gene expression in drug sensitive human breast carcinoma MCF-7 and multidrug resistant MCF-7/ADR cells, JBC,1995, 270(48):28790-28796.
- <sup>13</sup> Binetruy B, Smeal T, Karin M. Nature, 1991:121-127
- <sup>14</sup> Hallahan D, Virrudachalam S, Sherman ML et al. PNAS, 1991, 88:2156-2160
- <sup>15</sup> Haimovitz-Friedman A, Balaban N, McLoughlin M, et all. PKC mediates bFGF protection of endothelial cells against radiation induced apoptosis , Cancer Res, 1994, 54:2591-2597.
- <sup>16</sup> Ning S, Shui C, Khan WB et al. Effects to KGF on the proliferation and radiation survival of human squamous cell carcinoma vell lines in vitro and invivo,Int J Radiation Biol Biophy, 1998,40:177-187.
- <sup>17</sup> Klint P, Claesson-Welsh L. Signal transduction by FGFRs. Frontiers in Bioscience, 1999, 4:D165-177.
- <sup>18</sup> Peters K, Werner S, Liao X et al. Targeted expression of a dominant negative FDFR blocs branching morphogenesis and epithelial differantiation of the mouse lung, EMBO J,1994,12:973-986.
- <sup>19</sup> Savla U, Waters CM. Barrier function of airway epithelium: effects of radiation and protection by KGF, Radiation Research, 1998,150:195-203
- <sup>20</sup> Danilenko DM. Preclinical and early clinical development of KGF, an epithelial specific-tissue growth factor, Toxicol Pathol, 1999.,27:67-71.
- <sup>21</sup> Farrell CL, Bready JV, Rex KL et al. KGF protects mice from chemotherapy and radiation induced gastrointestinal injury and mortality, Cancer Res., 1998, 58:933-939.
- <sup>22</sup> Buckley S, Barskey L, Drisoll B et al. apoptosis and DNA damage in type 2 alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats, Am J Physiology, 1998:L714-L720

- 
- <sup>23</sup> Takeoka M, Ward W, Pollack H, Kamp DW, Ralph Panos, KGF facilitates repair of radiation induced DNA damage in alveolar epithelial cells, *Am J Physiology*, 1997:L1174-L1180.
- <sup>24</sup> Rudoltz MS, Kao G, Blank KR, Muschel RJ, McKenna WG. Molecular Biology of the cell cycle :potential for therapeutic applications in radiation oncology.
- <sup>25</sup> Li R, Waga S, Hannon GJ et al. Differential effects of the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair, *Nature*, 1994,371:534-537
- <sup>26</sup> Lou Y, Hurwitz J, Massague J. Cell cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domain in p21<sup>cip</sup>, *Science*, 1995, 375:158-161.
- <sup>27</sup> Lambrecht V, Bourhis XL, Toillon RA, et al. Alteration in both HSPGs and mitogenic activity of FGF-2 are triggered by inhibitors of proliferation in normal and breast cancer epithelial cells, *Exp Cell Researc*, 1998, 245:239-244.
- <sup>28</sup> Yi ES, Williams ST, Lee H et al. KGF ameliorates radiation and bleomycin induced lung injury and mortality, *Am J Pathol*, 1996:149:1963-1970
- <sup>29</sup> Zhang L, Kim M, Chon YH et al. Diminished G1 checkpoint after gamma irradiation and altered cell cycle regulation by IGF II overexpression, 1999, *JBC*,274:13118-13126
- <sup>30</sup> Hu T, Miller CM, Ridder G. M, Aardema MJ. Characterization of p53 in CHO-K1, CHO-WBL and CHL, *Mut Res*, 1999, 426:51-62
- <sup>31</sup> Lee H, Larner JM, Hamlin JL. A p53 independent damage sensing mechanism that functions as a checkpoint at the G1/S transition in CHO cells, *PNAS*, 1997,94:526-531.
- <sup>32</sup> Vispe S, Cazaux C, Lesca C, Defais M. Overexpression of Rad 51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation, *Nucleic Acid Research*, 1998,26:2859-2864.



BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1- Proje No: SBAG 1460

2- Rapor Tarihi: 3. Eylül. 1999

3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:1. 11. 1995-1. 12. 1998

4- Projenin Adı:Keratinosit büyüme faktörü ile keratinosit büyüme faktörü reseptörü ve heparin benzeri proteoglikanların tümör hücresindeki iyonize radyasyon ile ölüme dirençteki rolü

5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:

Doç. Dr. Neşe ATABEY (Proje Yürütücüsü)

Doç. Dr. Özden ANAL

Doç. Dr. Hilmi ALANYALI

Doç. Dr. Güldal KIRKALI

Dr. Zeynep YÜCE

Ar. Gör. Özlem İZCİ

Bio. Faize YÜKSEL

Prof. Dr. Meral SAKIZLI

6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 35340, Inciraltı, İzmir

7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK SBAG, Atatürk Bulvarı No221 Ankara

## 8- Öz (Abstract):

Heparine bağlanan büyüme faktörleri olarak da adlandırılan fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ailesinin bir üyesi olan keratinosit büyüme faktörü (KGF) spesifik olarak epitelial hücreler üzerinde etkilidir. Biyolojik etkisini kendisine özgü reseptörü (KGFR) ile gösteren bu büyüme faktörüne bağlı olarak gerçekleşen sinyal iletimi olaylarında heparin benzeri proteoglikanların (HSPG) da rol oynadığı düşünülmektedir. KGFin normal epitelial hücreler için mitojenik etkili olduğu ve akciğer alveolar epitel hücreleri ve gastrointestinal sistemi döşeyen epitel hücreleri gibi bazı hücreleri kemoterapötikler veya radyasyona bağlı hücre hasarından koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Bu koruma doku remodelling, hücre sağkalımı, neovaskülarizasyon, metastaz gibi olayların gerçekleşmesinde son derece önemlidir. Ayrıca bu ilişkinin radyasyon ile tedaviye dirençte de rolü olabilir. Bu verilerden yola çıkarak KGF, KGFR ü ve HSPG ların tümörlerin iyonize radyasyona yanıtının belirlenmesinde önemli bir faktör olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada KGF reseptörü eksprese eden (WT-A, 745-A) HSPGs sentezleyen (WT-A) ve sentez defektli (745-A) Chinese Hamster Ovary (CHO) hücre hatları ile KGF reseptörü eksprese etmeyen (WT-C, 745-C) HSPGs sentezleyen (WT-C) ve sentez defektli (745-C) hücre hatları kullanılarak, KGF, KGFR ve KGF-KGFR sinyal iletiminde rol oynadığı düşünülen HSPG ların radyasyon ile uyarılan hücre hasarı, hücre ölümü ve hücre döngüsü regülasyonunda önemi araştırılmıştır. Çalışmada farklı dozlarda radyasyon uygulaması sonrası hücre sağ kalımları belirlenmiş ve flow sitometri kullanılarak hücre siklusu analizleri yapılmıştır. KGFR ve özellikle HSPG ekspresyonlarının iyonize radyasyona uygulaması sonrası hücre sağ kalımını artırdıkları ve hücreleri apoptozdan korudukları gösterilmiştir. Hücre döngüsü analizleri ise KGFR eksprese eden hücrelerin G1 fazında kalma süresinin, KGFR eksprese etmeyen hücrelerden anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular KGF-KGFR ve HSPG ların varlığının hücre sağ kalımı ve hücre döngüsü regülasyonunda önemli olduğunu ve tümör tedavisi öncesi iyonize radyasyona karşı direncin belirlenmesinde ve/veya tedavi sonrasında epitelial hücre hasarına bağlı olarak ortaya çıkan hücre hasarından korumada etkili olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** KGF, KGFR, Heparin proteoglikanlar, iyonize radyasyon, hücre sağkalımı, hücre döngüsü regülasyonu

**9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler:** Bildiri Atabay N, Anal Ö, Alanyalı H, Sercan Y Z, İzci Ö, Yüksel F, Sakızlı M. THE ROLE OF KERATINOCYTE GROWTH FACTOR(KGF) RECEPTOR AND HEPARIN PROTEOGLYCANS (HSPGs) ON THE CELL CYCLE AND CELL SURVIVAL AFTER IONIZING RADIATION), Balkan Onkoloji Kongresi , Özetler Kitabı, Kuşadası, İzmir, Eylül 1998

10- Bilim Dalı Tıbbi Biyoloji

Doçentlik B. Dalı Kodu:

ISIC Kodu:

Uzmanlık Alanı Kodu:

11- Dağıtım(\*):

Sınırlı

Sınırsız ✓

12- Raporun Gizlilik Durumu:

Gizli

Gizli Değil ✓

(\* ) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz.