

**KANSEROGENESİS'DE RAS VE  
P53 PROTEİNLERİNİN  
ROLÜ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Volkan KILIÇ  
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Eylül-2001

“Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.  
Proje no: 00 10 27”

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Volkan Kılıç'ın Kanserojenesis'de Ras ve P53 Proeinlerinin Rolü Üzerine Bir Çalışma başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki yüksek lisans tezi ~~11.10.2001~~ tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Yrd. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU

Üye : Doç. Dr. Sevilhan ARTAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Zerrin İNGESU

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ~~17.10.2001~~ tarih ve ~~32/3~~ sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Orhan ÖZER  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Müdürü

**ÖZET****Yüksek Lisans Tezi****KANSEROGENESİS'DE RAS VE P53 PROTEİNLERİNİN ROLÜ  
ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA****Volkan KILIÇ****Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Ana Bilim Dalı****Danışman: Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU  
2001, 53 Sayfa**

Tümör baskılayıcı *p53* geni insan tümör oluşumundaki en yaygın mutasyona uğramış gendir ve transkripsiyonel faktörü kodlar. İyonize radyasyon ve onkogenik aktivasyonla aktive edilir.

*p53* proteini çeşitli insan kanserlerinde ortaya çıkan *mdm2* proteini ile bir kompleks oluşturur. Bu nedenle *ras* onkogeninin *p53* üzerine etkisi ve UV ışınıyla aktive edilen onun düzenleyicisi *mdm2*'nin ekspresyonu, normal ve *ras* transform rat embriyo fibroblast hücre hatlarında araştırılmıştır. Western-Blot analizi hücrelerin *ras* transformasyonunun UV ile uyarılan *p53* geninin ekspresyonu ile inhibe edildiğini göstermiştir. Bu bulgu *ras* transformasyonunun *p53* ve onun etki yolunu tam baskılamasına neden olduğu fikrini akla getirmektedir.

**Anahtar Kelimeler: *p53*, *mdm2*, *H-Ras*, DNA hasarı, Hücre Kültürü**

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****A STUDY ON THE ROLE OF RAS and P53  
PROTEINS ON CARCINOGENESIS****Volkan KILIÇ****Anadolu University  
Graduate School of Natural and Applied Science  
Biology Program****Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU  
2001, 53 Pages**

The tumor suppressor p53 gene encoding a transcriptional factor is the most widely mutated gene in human tumorigenesis and activated by ionizing radiation or oncogenic activations. P53 protein forms a complex with Mdm2 protein which is overexpressed in a variety of human cancers. p53 inactivation is also involved in the ability of ras oncogene to cause cell transformation. Therefore, effects of ras oncogene on p53 and its regulator Mdm2 expression activated by UV light were investigated in both normal and ras transform rat embryonal fibroblast cell lines. Western Blot analyses showed that ras transformation of the cells inhibited the expression of p53 gene induced by UV. This finding suggest that ras transformation cause complete suppression of p53 and its pathway.

**Key words: p53, mdm2, H-Ras, DNA damaging, Cell Culture**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezım süresince bana her konuda desteğini esirgemeyen değerli hocam Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOğLU'na teőekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar çalıőmalarım sırasında büyük yardımları olan Kamel SALEH'e, Araő. Gör. A. Tansu KOPARAL' a ve Biyoloji Bölümünün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi desteklerini asla üzerimden esirgemeyen değerli aileme en içten teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ.....	1
1.1 <i>ras</i> Genleri ve Proteinleri.....	1
1.1.1. Ras Aktivasyonu.....	2
1.1.2. Ras'ın Fonksiyonları.....	4
1.1.2.1. Hücre Çoğalması ve Farklılaşmasındaki Rolü.....	4
1.1.2.2 Hücre Döngüsündeki Rolü.....	5
1.1.2.3. İntegrin Sinyal Yolu.....	6
1.1.2.4. Anjiogenesisisteki Rolü.....	6
1.2. p53 Antionkogeni ve Proteini.....	6
1.2.1. p53'ün fonksiyonları.....	8
1.2.2. p53'ü aktif eden sinyaller.....	8
1.2.3. p53'ün apoptosisteki rolü.....	8
1.2.4. p53 ve farklılaşma.....	9
1.3. <i>Mdm2</i> Geni ve Proteini.....	10
1.3.1. Mdm2-p53 kontrol mekanizması.....	11
1.3.2. Mdm2 ve terminal farklılaşma.....	14
1.4. Çalışmanın Amacı.....	14
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3. BULGULAR.....	21
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	31
5. KAYNAKLAR.....	35

## ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. p21ras'ın aktivasyonunun kontrol mekanizması ve aktif p21ras'ın oluşturduğu hücrel cevap.....	3
3.1. %10'luk FBS besiyerinde büyütülen 5RP7 ve F2408 hücrelerinin zamana göre büyüme oranları.....	21
3.2.A May-grünwald-Giemsa ile boyanmış normal rat embriyo fibroblast hücresi olan F2408 hücrelerinin ışık mikroskopunda 20X büyütmede görüntüsü.....	23
3.2.B May-grünwald-Giemsa ile boyanmış normal rat embriyo fibroblast hücresi olan F2408 hücrelerinin ışık mikroskopunda 40X büyütmede görüntüsü.....	23
3.2.C H-ras transforme olmuş rat embriyo fibroblast 5RP7 hücrelerinin ışık mikroskopunda 20X büyütmedeki görünümü.....	24
3.2.D Koloni oluşturmuş H-ras transforme olmuş rat embriyo fibroblast 5RP7 hücrelerinin ışık mikroskopunda 40X büyütmedeki görünümü.....	25
3.3. Dot-blot yöntemi ile p53, MDM2 ve ras antikorları kendilerine özgül olan fare immunoglobini ile reaksiyonun gösterilmesi.....	26
3.4. Normal rat embriyo fibroblast hücrelerinde farklı sürelerdeki UV ışını muamelesi ve farklı konsantrasyonlarda uygulanmış DMSO' nun 12. saat sonunda MDM2, p53 ve $\beta$ -aktin protein seviyelerinin western-blot ile gösterilmesi (A).....	27
Nitroselüloz membrana transferden sonra toplam proteinin Ponceao S boyama ile gösterilmesi (B).....	27

3.5. H-ras transform rat embriyo fibroblast (5RP7) hücrelerinde, farklı sürelerde UV ışını muamelesinden sonra 12. ve 24. saatlerde MDM2, p53 ve $\beta$ -aktin protein seviyelerinin western-blot ile gösterilmesi (A).....	30
Nitroselüloz membrana transferden sonra toplam proteinin Ponceao S boyama ile gösterilmesi (B).....	30
Ras protein seviyesinin western-blot ile gösterilmesi (C).....	30



## 1. GİRİŞ

Hücre çoğalması, büyümesi farklılaşması ve yaşlanması belirli sayıdaki hormon büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından kontrol edilmektedir. Söz konusu moleküller hücrelerdeki reseptörlerin ligandları olarak görev görürler ve hücre içi sinyal yollarını harekete geçirerek çekirdek ile haberleşmeyi sağlamaktadırlar. Ligandlarla harekete geçirdikleri hücre içi sinyal yolları arasındaki ilişki farklı hücre sistemlerinde değişiklik gösterir ve farklı bir gelişimi sağlamaktadır. Kanser hücrelerinde ise hücre içi sinyal yollarının kontrolünde bozulmalar meydana gelmektedir. Söz konusu kontrolün bozulması protoonkogenlerin mutasyonu yada normalin üzerinde ifade edilmeleri sonucu olmaktadır [1-3]. Diğer önemli bir mutasyon ise *p53* ve *Rb* (retinoblastoma) gibi antionkogen yada tümör-baskılayıcı genlerde meydana gelmekte ve yukarıda söz edilen onkogenlerin hücre çoğalmasındaki etkilerini gösterebilmelerine olanak sağlamaktadır [3-7].

*ras* protoonkogeni sinyal yollarının büyük bir kısmında moleküler bir anahtar olarak rol oynamakta ve hücrelerin farklılaşması yada çoğalmasını kontrol etmektedir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %30'unda *ras* geninin mutasyona uğradığı tespit edilmiştir [1,8-9]. *p53* geni ise tümör baskılayıcı genler içinde en çok çalışılan olup insan kanserlerinde yaklaşık %50 sinde fonksiyonunu kaybettiği bulunmuştur [10]. Bundan dolayı *ras* onkogeni ile *p53* geninin rol aldığı sinyal yolları arasındaki etkileşimin aydınlatılması oldukça önemlidir.

### 1.1. *ras* Genleri ve Proteinleri

Onkogenik potansiyele sahip 3 tane *ras* geni bulunmaktadır. *H-ras*, *N-ras* ve *K-ras* olan bu genler yüksek oranda birbirine benzeyen ve 21 kd moleküler ağırlığında olan 4 tane protein kodlamaktadır. Harvey (H) ve Kirsten (K) murine sarkoma virüslerinin transforme edici proteinleri sırasıyla v-H-ras ve v-K-ras olarak isimlendirilmektedir ve normal hücrel Ras'ların (c-H-ras ve c-K-ras) onkogenik formlarıdır. *N-ras* olarak belirtilen nöroblastoma-ras ise hiçbir

retrovirüsde bulunamamıştır. *K-ras* geni ise alternatif olarak splayzinge uğradığı için K-rasA ve K-rasB olarak iki protein izoformu kodlamaktadır [1,11-13].

Ras ailesinde, *H-ras*, *K-ras* ve *N-ras*'a ek olarak onkogenik potansiyeli daha düşük olan iki gen daha keşfedilmiştir. Bunlar R-ras ve *M-ras* olup ras proteinlerine yaklaşık olarak %55 oranında benzerlik göstermektedirler [14-15].

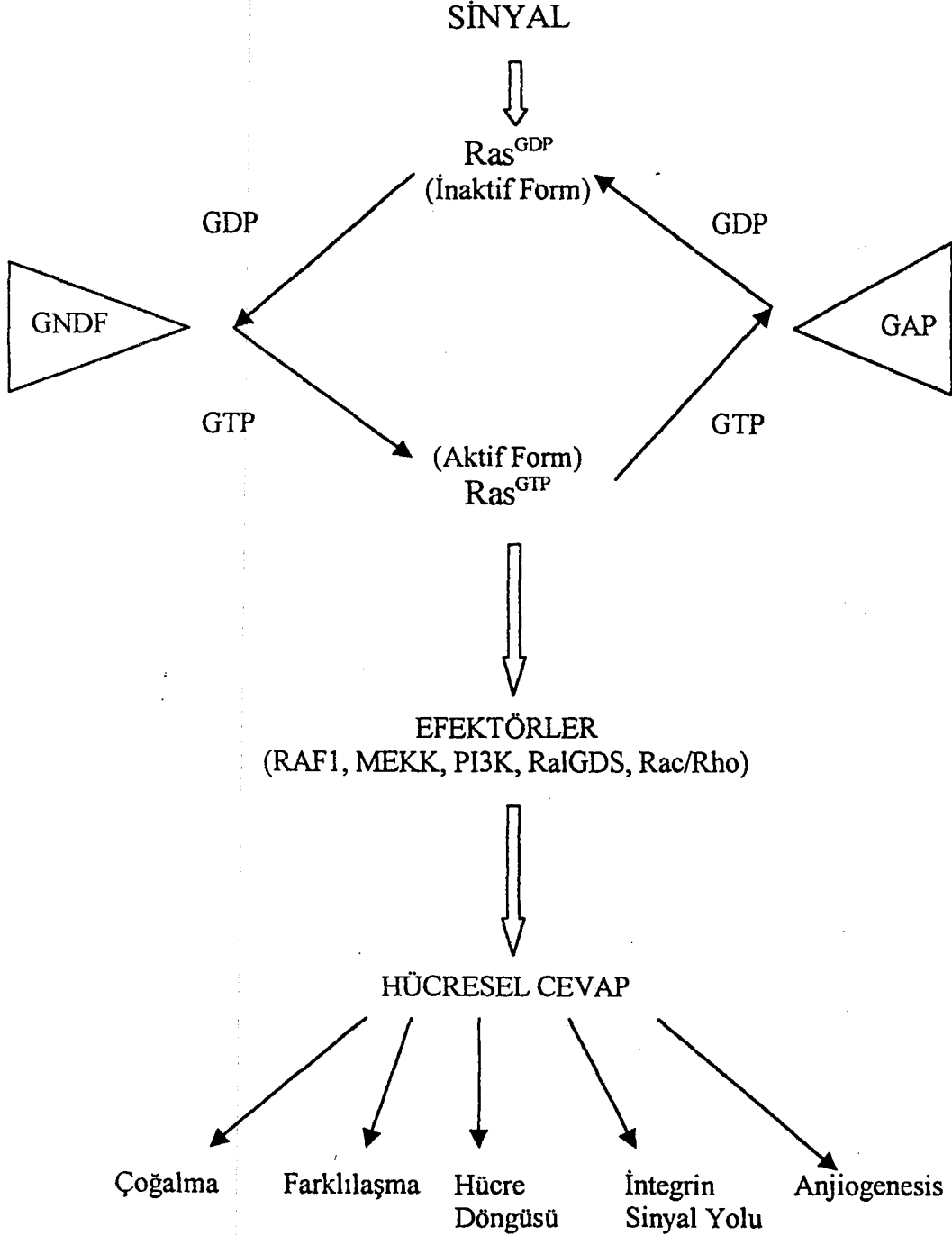
21 kd moleküler ağırlığında ve 188-189 aminoasit içeren ras proteini plazma zarının iç yüzeyinde lokalize olmaktadır ve burada hücre reseptöründen gelen bir sinyalin sitoplazma içerisindeki diğer moleküllere aktarılmasını sağlamaktadır. Bu işlevini yerine getirebilmesi için sentez edildikten sonra çeşitli modifikasyonlar geçirdiği bilinmektedir. Bunun için ilk olarak isoprenilasyon, daha sonra metilasyon ve prenilasyon geçirmektedir [1,16-18]

### 1.1.1. Ras Aktivasyonu

Ras proteini G-proteinleri ailesinin küçük bir üyesi olup sitoplazma içerisinde inaktif formu olan GDP-bağımlı ve aktif formu olan GTP-bağımlı formları arasında bir döngü içerisindeir [1,11-12,19-22].

Bir büyüme faktörünün hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanmasından sonra reseptörün dimerizasyonu meydana gelmektedir ve böylece tirozin kinaz reseptörü otofosforilasyon sonucu aktive olmaktadır. Bu aktivasyon Şekil 1'de de şematize edildiği gibi inaktif ras-GDP 'den GDP'nin ayrılmasını sağlayan Guanin Nükleotid Değişirme Faktörleri (GNDF) için bir aktivasyon sinyali oluşturur ve daha sonra ras proteinine GTP'nin bağlanmasını sağlar. Böylece aktif ras-GTP bir serin-tirozin kinazlar olan raf-1 ve MEKK1, fosfoinositide3-kinaz (PI3-K), RalGDS ve Rac-Rho gibi çeşitli efektör molekülleri aktive ederek farklı sinyal yollarını harekete geçirir [1,23-26]. Bu sinyal yollarının sonucu olarak örneğin *fos* ve *jun* gibi belirli genlerin aktivasyonu yada aktin gibi hücre iskeleti elemanlarında değişiklik meydana gelebilmektedir [27-29]. Ras sinyal yolu geçici olarak aktive olmaktadır. Çünkü ras'ın kendine özgü olan guanin trifosfaz (GTPaz) aktivitesi ile bağlı GTP molekülünü hidroliz ederek yavaş yavaş kendisini inaktif forma yani GDP-bağımlı forma dönüştürür. Ras'ın bu GTPaz aktivitesini arttıran çeşitli GTPaz-aktive edici proteinler (GAP) bulunmaktadır

[1,8-9,11-12,30]. Sonuç olarak normal ras proteinleri GNDF ve GAP moleküllerinin kontrolü altında aktif ve inaktif formları arasında bir döngü içersindedir.



Şekil 1.1. p21<sup>Ras</sup>'in aktivasyonunun kontrol mekanizması ve aktif p21<sup>Ras</sup>'in oluşturduğu hücresel cevap

Normal ras'ın aksine onkogenik ras proteinleri devamlı olarak aktif GTP bağımlı formlarında kalırlar ve devamlı olarak efektör molekülleri aktive ederek çoğalma sinyalini iletirler [1,9,31]. Çeşitli çalışmalarla mutant ras proteininin GAP proteinlerinden etkilenmediği gösterilmiştir [8,12,32-33]. Doğal yada uyarılmış kanserlerde *ras* geninin analizi sonucu genellikle 12, 13, 59, 61 ve 63. aminoasitlerde nokta mutasyonu olduğu görülmüştür [1,13,30,34-35]. Bu bölgelerin p21'in GTP'ye bağlandığı yerlerde bulunduğu ve bundan dolayı GAP aktivitesine dayanıklı olduğu bulunmuştur [9,11,32,36]. İnsan tümörlerinde, mutant *ras* genlerinin analiz çalışmaları çeşitli kimyasal kanserojenler tarafından ras'ın etkilendiğini ileri sürmektedir [9]. Ayrıca deneysel olarakta dimetilbenzantrazen (DMBA), 12-O-tetrat kanosil-forbol-13asetat (TPA) gibi çeşitli kimyasal ajanların *ras* genlerinde mutasyona ve tümöre neden oldukları gösterilmiştir [37].

Yukarıda söz edilen mutasyonların yanı sıra normal *ras* geninin yüksek oranlarda ekspresyonunun çeşitli kültür hücrelerinin transformasyonuna neden olduğu bildirilmiştir [38].

### 1.1.2. Ras'ın Fonksiyonları

Ras proteinlerinin fonksiyonları hakkında çeşitli hücre tiplerinden elde edilen oldukça farklı bulgular bulunmaktadır. Fakat yinede bu farklı hücre tiplerinde ras proteininin uyardığı farklı sinyal yollarının mekanizmasının araştırılması geniş olarak çalışılmaktadır. Yukarıda da bahsedildiği gibi normal ras proteinleri hücre dışından gelen bir uyarıyla aktive olmakta ve hücrenin farklı metabolik yollarını etkilemektedir. Ras proteinlerinin fonksiyonlarını Şekil 1'de de belirtildiği gibi aşağıdaki başlıklar altında açıklamak mümkündür:

#### 1.1.2.1. Hücre Çoğalması ve Farklılaşmasındaki Rolü

Ras proteinlerinin tirozin kinaz reseptörleri ve diğer tirozin kinazların başlattığı sinyal yolunda aktif p21-GTP formuna dönüşerek hücreyi mitoze

sevkettiği bilinmektedir [39-40]. Hücrelerin *ras* onkogeni ile transformasyonu ise dinlenme fazında olan hücreleri büyüme faktörlerine gerek duymadan çoğalmaya sevkettiği çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir [41-42]. *ras* geninin normalin üzerinde ekspresyonu hücrelerde anormal mitoz, aktin organizasyonunun bozulmasına, hücrelerin birbirine olan bağımlılığının kaybına ve hücre zarında yoğun mikrovilli oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir [43-45].

Çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlar *ras* proteininin sinyal iletimindeki ikincil mesaj sistemlerinde de anahtar bir rol oynadığını belirtmektedir. Örneğin *ras*'ın aktif olduğu hücrelerde bradykinin, bombesin, EGF gibi büyüme faktör reseptörleri aracılığıyla fosfolipaz-C aktivitesinde artış olduğu [46] hücrelerin PDGF uyarısına cevap vermediği ve hücre içi depolardan kalsiyum iyonlarını sitoplazmaya bırakmayı durdurduğu gözlenmiştir [47]. *Ras*'ın uyardığı sinyalin iletilmesini takiben çeşitli hücre genlerinin aktive olarak proteinlerinin sentezi çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Glikoz taşıyıcı genleri, *transin*, *c-myc*, *jun* ve *fos* proteinlerinin *ras* transfekte olmuş hücrelerde arttığı bulunmuştur [48-49].

*Ras* proteininin hücre çoğalmasındaki ve miyoblast gibi çeşitli hücrelerin farklılaşmasını engelleme [45,47,50-51] rolünün yanı sıra ilk kez Bar-Sagi ve Feramisco [52] tarafından PC12 fökromositoma hücre hattında sinir hücresi farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir. Daha sonra normal *H-ras* geninin ekspresyonu sonucu mutant *ras* genleri içeren hücrelerin tümörojenik fenotiplerini baskıladığı ve böylece bir tümör baskılayıcı gen olarak rol oynadığı ileri sürülmüştür [53].

### 1.1.2.2. Hücre Döngüsündeki Rolü

*Ras*'ın rol aldığı MEK kinaz yolunun ve PI3-K'nın aktivasyonu ile siklin D1 artışı hücrelerin G1 kontrol noktasından S fazına geçişinde oldukça önemli olduğu belirtilmiştir [1,54].

### 1.1.2.3. İntegrin Sinyal Yolu

İntegrinler ekstraselluler matriks proteinleri için adhezyon reseptörleri olup aynı zamanda göç, çoğalma ve apoptosisi de içine alan çeşitli hücrese fonksiyonlarla ilgili sinyalleri meydana getirirler [55]. Söz konusu sinyalleri bir sitoplazmik tirozin kinaz olan fokal adhezyon kinazlar (FAK) aracılığı ile mitojen aktive edici protein kinazları (MAP) aktive ederek iletir. Yapılan bazı çalışmaların sonuçları integrin bağımlı MAP kinaz yolunun aktivasyonunun ras-bağımlı olduğunu ileri sürmektedir [56,57].

### 1.1.2.4. Anjiogenesisisteki Rolü

Onkogenik ras mutasyonlarının tümör metastası ve angiogenesisisteki rolü hakkında elde edilen bulgular *ras*'ın direkt bir etkisi olduğunu göstermektedir. Su ve arkadaşları [58] tarafından yapılan bir çalışmada onkogenik *ras* geninin aktivasyonu sonucu tümör metastasına neden olan önemli metallo proteinazların sentezinin arttığını göstermişlerdir. Yine Zabranesky ve arkadaşları [59] tarafından yapılan bir çalışmada melanoma, akciğer ve meme karsinoma hücrelerinde, *ras* aktivasyonundan sonra metastatic tümörlerde de azaldığı gözlenen trombospondin sentez seviyesinin düştüğü rapor edilmiştir. Ayrıca bir anjiogenik büyüme faktörü olan VEGF sentezinin *K-ras* ve *H-ras* ile transforme edilmiş epitelyal hücrelerde arttığı bulunmuştur [60].

## 1.2. *p53* Antionkogeni ve Proteini

*p53* geni omurgasızlar hariç bir çok hayvanda keşfedilmiş olan bir tümör baskılayıcı gen olup hücrelerde yabani tipinin kaybı veya inaktif duruma düşmesi halinde kanser meydana gelme olasılığı artmaktadır. İnsan tümörlerinin yaklaşık %50' sinde *p53* geninin normal fonksiyonunu kaybettiği bilinmektedir [61-63]. Normal *p53* geninin kodladığı protein zincire özgül bir transkripsiyon faktör olup bazı özgül genleri aktive edebilmektedir [64].

p53 proteini 5 altüniteden meydana gelen bir homo-oligomerlerdir [65]. *In vivo* koşullarda p53 proteini, multiple serin ve threonin amino asitlerinden birden fazla kinaz enzimi ile fosforile edilmektedir. *In vitro* çalışmalarda, insan ve fare p53' ünün DNA-protein kinaz (DNA-PK), kazain kinaz ve MAP kinazlar tarafından fosforile edildiği rapor edilmiştir [66-69].

Normal p53 proteini içerdiği üç tane loop-plaka-sarmal motif elementleri ile DNA çift ipliğine major oluktaki genellikle GGGCGG bölgelerinden bağlanarak bazı genleri transaktif eder yada baskılar [70]. Kansere neden olan p53 mutasyonları genellikle bu bölgelerde gerçekleştiği için p53 DNA'ya bağlanamamakta ve böylece p53 baskılama fonksiyonunu yitirmektedir. Bir allelde meydana gelen bir mutasyon kısa bir zaman sonra ikinci allelin kaybına da neden olduğundan p53 ekspresyonu tümüyle kaybolmaktadır [71].

Kolorektal, servikal, hepatosellüler, prostat kanseri, astrositoma, melanoma, Non-hoçkin limfoma, multiple miyeloma ve kronik miyelojen lösemi gibi kanserlerinde tesbit edilen p53 mutasyonunun diğer bazı genlerin mutasyonunu takiben geç bir safhada meydana geldiği ve bundan sonra tümör oluştuğu görülmüştür. Bununla birlikte akciğer, meme ve boyun kanserlerinde olduğu gibi ilk safhalarda oluşan p53 mutasyonu sonucu gelişen tümörler de bulunmaktadır [72]. Farelerde yapılan çalışmalarda, normal p53 genlerini bulunduran hayvanlar normal gelişimlerini sürdürmüşler, fakat p53' ü heterozigot olarak taşıyan hayvanlar 3-5 hafta sonra tümör geliştirmişlerdir. p53 allelerini hiç taşımayan hayvanlar ise daha erken tümör gelişimi göstermişlerdir [73-74].

p53 fonksiyonu kaybına yol açan mekanizmaların başında, 175, 245, 248, 249, 273 ve 282 kodonlarında meydana gelen nokta mutasyonları olmak üzere delesyonlar, gen tekrar düzenlenmesi ve sıplayzing mutasyonları bulunmaktadır [75-77]. Söz konusu mutasyonların belli bir oranının dominant negatif mutasyonlar olduğu, yani fonksiyonel olarak inaktif olan p53' ün, transfer edildiği hücrelerdeki normal p53' ü de inaktif edebildiği gösterilmiştir [71,78]. Benzer şekilde, mutant p53 ve aktif ras genlerinin birlikte transfer edildiği primer kültür hücrelerinde, normal p53 proteinleri ile oligomer oluşturmak yoluyla onları da inaktif hale getirdikleri ve böylece transformasyona neden oldukları ileri sürülmektedir [71].

### 1.2.1. p53'ün fonksiyonları

p53 proteininin hücre döngüsünün durdurulması ve programlanmış hücre ölümü (apoptosis) için oldukça önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Söz konusu aktiviteler kanser gibi genetik hasara uğramış hücrelerin replikasyondan elemine edilmesine olanak sağlamaktadır [79]. *p53* geni, özellikle hücre döngüsünü kontrol etmesi bakımından kanser araştırmalarının ilgi odağı olmuştur. Çalışmaların bir çoğu  $G_0/G_1$  fazlarında hücrenin çoğalmaya gitmesi veya engellenmesinin kontrolünü [80-82] yada p53 ile apoptosis ve farklılaşma arasındaki ilişkiyi açıklamayı amaçlamaktadır [83-84].

### 1.2.2. p53'ü aktif eden sinyaller

Normal koşullar altındaki hücrelerde, *p53* daha çok inaktif olarak bulunurken DNA hasarı hücresel genetik materyalin çoğalması ve aktarılmasında gerekli olan elemanların hasarı, ribonükleotidlerin ve oksijenin azalması, sıcak şoku ve nitrik okside maruz kalma gibi çeşitli stres koşullarının oluşmasıyla hızlı bir şekilde aktivite kazanmaktadır [85-87]. Bunların dışında *myc*, *ras* ve adenovirüs *E1A* gibi onkogenik proteinler *p53* aktivasyonuna neden olan faktörler içerisinde yer almaktadır [87-88].

UV ışığı yada benzer kanserojen ajanlara maruz bırakılan çeşitli hücrelerde p53 proteininin biriktiği, GADD45 geninin (growth arrest and DNA damage-inducible) transkripsiyonunun arttığı ve DNA replikasyonunun engellendiği rapor edilmiştir [88-89]. *p53* geni taşımayan fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar, hücrelerin radyasyon ve kimyasal uyarıcılara daha hassas olduklarını göstermiştir [90].

### 1.2.3. p53'ün apoptosisteki rolü

*p53* geni olmayan hücrelerin radyasyona maruz kaldıkları zaman apoptosise gittikleri gözlenirken, normal hücrelerin radyasyondan sonra kısa bir süre için yaşadıkları tespit edilmiştir [91]. Ayrıca, *myc*, *E1A* ve *H-ras* gibi



onkogenler ile serumdan mahrum kalmanın p53' e bağılı olarak apoptosise neden olduğu ileri sürülmektedir[92-95].

İnsanda *bax* geni p53 ile direk bağılantılı olan bir pro-apoptotik protein olup p53-bağımlı apoptosisi bloke eden *bcl2* genini inhibe etmektedir. Yüksek seviyede normal p53 sentezleyen hücrelerde, Bax seviyesi artarken Bcl2 seviyesinde azalma olmakta ve dolayısı ile hücre apoptosise gitmektedir [96].

p53' ün uyardığı apoptosis ile G<sub>1</sub> fazı durdurma mekanizmalarının farklı olduğu sıcaklığa duyarlı olan *p53* alleli ile transenfekte edilen eritrolösemik hücrelerde çalışılmıştır. Hücrelerin seçici sıcaklıklarda, G<sub>1</sub>, apoptosis yada farklılaşmaya gittikleri, fakat besi ortamlarına sitokin eklendiği zaman, hücrelerin apoptosis ve farklılaşmalarının bloke edildiği halde G<sub>1</sub>'de durma mekanizmasının normal olarak devam ettiği rapor edilmiştir [97]. p53' ün transkripsiyon faktörü olma özelliğinin, p53' e bağılı apoptosis için gerekli olduğu [98] ve p53'ün mitokondriyal enzimlerle apoptosise yol açan ve elektron taşınımı için çok önemli olan sitokrom C den bağımsız olarak apoptosisi gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür [99].

#### 1.2.4. *p53* ve farklılaşma

*p53* geninden tamamen yoksun olan fare embriyolarının gelişme göstermeleri *p53*' ün, embriyogenesis mekanizmasında gerekli olmadığını düşündürmektedir [100].

Abelson virüsü ile transenfekte edilmiş p53 negatif hücrelerde, normal p53 proteininin sentezlenmesiyle hücrelerin farklılaşmalarının birer işareti olan B220 antijeninin ve sitoplazmik immünoglobulin  $\mu$  ağır zincirinin sentezinin arttığı görülmüştür [78]. Ayrıca Friend virüsü ile transforma edilen eritrolösemik hücrelerde, *p53* alleli ekspresse edildiğinde, eritroid farklılaşmasının işareti sayılan globin RNA ve proteinin sentezlendiği bildirilmiştir [101].

p53' ün SV40 orijinli replikasyon için gerekli olan helikaz enziminin aktivitesine, içerdiği son 27 aminoasit ile bir şekilde karıştığı ve replikasyonu engellediği ileri sürülmektedir. Buna ilaveten p53 proteininin, DNA polimeraz  $\delta$  enzimi ile rekabet içinde olduğu ve protein A'ya bağılandığı bildirilmektedir

[71,102-104]. Buna ilaveten, p53' ün tek iplikli DNA uçlarına bağlandığı ve kuvvetli DNA-DNA ve RNA-RNA çift iplik oluşumunda rol aldığı gösterilmiştir [26]. p53' ün kontrol ettiği diğer bir gen de p21<sup>CIP1/WAF1</sup> olup ürünü G<sub>1</sub>-S geçişinde önemli olan cdk (Cyclin dependent kinase) aktivitesini engellemektedir. p21<sup>CIP1/WAF1</sup> ile p53 arasındaki etkileşimin hücrenin çoğalmasının kontrolünde önemli rol oynadığı düşünülmektedir [105].

### 1.3. *Mdm2* Geni ve Proteini

Murine double minute 2 (*Mdm2*) geni double minute kromozomda yer alan, amplifikasyona uğramış bir gen olup Balb/c3T3 hücrelerinin transforme tipi olan 3T3DM'lerde görülen kromozom çeşitidir. Çeşitli insan tümörlerinde ifade edilen *mdm2*, diğer tümör-baskılayıcı proteinlerin aktivitelerini nötralleştirdiği için yeni bir proto-onkogen çeşidi olarak ele alınmaktadır [106]. *Mdm2*'nin, tümör baskılayıcı proteinler içindeki ana hedefinin p53 proteini olduğu gösterilmiştir [107]. *Mdm2* proteinin sentezi p53-*Mdm2* etkileşimine neden olmakta ve böylece p53'ün G<sub>1</sub>'deki aktivasyonu kaybedilmektedir [108].

*Mdm2* 90 kDa moleküler ağırlıkta, p53 ile bağlanabilme özelliği taşıyan bir proteindir. Birinci promotör, genin yukarı bölgesinde ve ikinci ise promotör birinci intronda yer almaktadır. Farede *Mdm2* proteini 489 aminoasitten ibaret olup 14-130 bölgesi p53 bağlanma bölgesidir. Bunun insanda 19-102 bölgeler olduğu tesbit edilmiştir [109-110].

Bu etkileşim üzerine ileri sürülen diğer bir modelde, DNA' da meydana gelen bir hasar, *Mdm2* ile p53 arasında oluşacak kompleksi engellemekte veya en azından geciktirmektedir. Bu durumda p53 etkisi ile, çoğalma inhibitör genleri (*cip1* gibi) harekete geçip hücre döngüsünü engellemektedir ve bu şekilde hasarlı DNA' nın replikasyonunu engellemektedir [111].

*Mdm2*' nin promotörleri, p53 proteini tarafından baskılanmaktadır. *Mdm2*'nin promotörleri alternatif olarak transkripte edilmelerinden dolayı farklı kodonların içinde başlayan translasyon, *Mdm2* proteininin de farklı oluşmasına neden olmakta ve sonuçta p53 ile bağlanmasını etkilemektedir [106]. p53 ve *Mdm2* arasında ki sıkı kontrolün kaybolduğu transforme ve kanserli hücrelerde

*mdm2* geninin transkripsiyonunun alternatif sıplayzing ile olduğu ve Mdm2 proteininin p53 ile bağlanma özelliğinin kaybolduğu rapor edilmiştir [112-114].

### 1.3.1. Mdm2-p53 kontrol mekanizması

Mdm2 p53' ü negatif olarak kontrol eden bir proteindir [107-122]. *Mdm2* olmayan ve *p53* içeren fare embriyolarının öldüğü tespit edilirken, *p53* geni alındıktan sonra, söz konusu embriyoların normal yaşlarında öldükleri tespit edilmiştir [123]. Bu negatif kontrol için iki model ileri sürülmektedir. Birincisi, Mdm2 sitoplazmik proteozomlarda p53' ün parçalamasını sağlar ve böylece her hangi bir stressle karşılaşmayan hücrelerde p53 seviyesi düşük tutulmaktadır [124]. Mdm2 E3 ubiquitin-protein ligaz ile birleşerek kazandığı ligaz aktivitesi ile p53' ün ubiquitinasyonuna neden olur ve bu da p53' ün proteozomal degradasyonu ile sonuçlanmaktadır [79,125-126].

İkinci mekanizma ise p53'ün transkripsiyonal aktivasyonunun negatif olarak kontrol edilmesidir. Mdm2, p53'e koaktivatörlerinin bağlanmasını yada yeni bir p53-bağımlı gen ekspresyonunu engelleyerek p53'ün transaktivasyonunu ve böylece apoptosis yeteneğini engellemektedir [124]. Aynı zamanda Mdm2'nin p53'ün transrepressyon fonksiyonunu engelleyebileceği düşünülmektedir. Diğer yandan p53 özgül olarak *mdm2* genine bağlanır ve transkripsiyonunu uyarır ve bir negatif feed-back mekanizmasına yol açmaktadır [106].

Mdm2 ve p53 arasındaki etkileşimi özellikle genotoksik bir faktöre maruz bırakılan hücrelerde yapılan çalışmalar göstermektedir. UV ışınlarına maruz bırakılan C127 hücrelerinde, p53 stabilizasyonu ve Mdm2 indüksiyonu arasında oldukça belirgin bir gecikme olduğu gözlenmiştir [111]. Dolayısıyla, p53 proteininin transkripsiyonal aktivasyon hedefi olan diğer proteinlerin aynı koşullardan etkilenmiş olma olasılığı bulunduğu öne sürülmüştür. Gamma radyasyonunun bazı hücrelerde Mdm2 mRNA'sının hızlı artışına neden olduğu ve G1 fazında durdurulan hücreleri bölünmeye sevk ettiği rapor edilmiştir [108]. *Mdm2*'nin indüklenmesine bağlı olarak *p53* genindeki upiquitinasyonun arttığı ve dolayısıyla *p53* ürünün azalmasına yol açtığı bildirilmiştir [125].

İyonize radyasyona maruz kalma sonucu, hücrelerdeki p53 proteininin stabilize olmasının, Mdm2'nin bir fosforilasyon-fosforilasyon mekanizması tarafından baskılanmasıyla olduğu bulunmuştur. DNA hasarı ile aktif olan p53 önce ser15 ve thr18 de fosforile olmakta ve böylece Mdm2'nin etkisinden kurtularak stabilize hale gelmektedir [126-127]. İnsanda, DNA-fosfokinaz veya ona bağlı kinazlar p53'ün fosforilasyonuna neden olmakta ve böylece Mdm2 ile p53'ün birleşmesinde rol oynamaktadır [106,128]

Mdm2'nin p53 üzerine bu şekilde negatif kontrolü olmasına rağmen, nöroblastoma dahil bazı insan tümörlerinde, p53'ün Mdm2'nin neden olduğu degradasyona dayanıklı olduğu ve sonuç olarak söz konusu hücrelerde anormal seviyede devamlı olarak birikim gösterdiği gözlenmiştir. Bu dayanıklılığının ise aynen fosforilasyon-fosforilasyon mekanizmasında olduğu gibi p53'ün geçirdiği kovalent modifikasyonlarla ilgili olduğu rapor edilmiştir [124].

Mdm2'nin apoptosiz için bir negatif regülatör olarak iş gördüğü diğer bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin; insan glioblastoma hücrelerinde, yüksek seviyelerde Mdm2 sentezinin bu hücrelerde cisplatin ile sağlanan apoptosizi azalttığı görülmüştür [129].

Haupt ve ark. [125] *c-myc* onkogeninin aktivasyonundan sonra aktifleşen p53 ve ona bağlı apoptosizin Mdm2 ile inhibe edildiğini rapor etmiştir. *mdm2* bir onkogen olarak kabul edilmekte ve hücrelerde normalin üzerinde sentezi transformasyona neden olmaktadır. *Mdm2* ile transforme olmuş NIH3T3 ve Rat 2 hücrelerinde, Mdm2'nin yüksek seviyede sentez edildiği ve insanda *Mdm2* geninin lokalize olduğu 12q13-14 bölgesinin, insan sarkomalarının bir çoğunda amplifike olduğu anlaşılmıştır [130-131]. Mdm2 proteininin yüksek seviyede olması genin amplifikasyonuna bağlı olduğu gibi bazı kanserli hücrelerde, *mdm2* geninin amplifikasyonuna bağlı olmadan da protein seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir [132-133].

*Mdm2*'nin onkogenik aktivasyonlar sonucu kontrol edildiği yapılan yeni çalışmalarla gösterilmiştir. Ries ve ark. [134] *Ras* onkoproteininin başlattığı Raf/Mek/ MAP kinaz yolunun Mdm2'nin aktivitesini p19 adında bir protein varlığı ile kontrol ettiğini ileri sürmüşlerdir. Burada, p19 Mdm2'yi inhibe ederek p53'ü parçalanmaktan koruyarak hücre döngüsünü durdurmakta ve apoptosise neden

olmaktadır. Fakat *p19* dan yoksun hücrelerde Raf/ Mek yoluyla Mdm2 artarak *p53* parçalanmakta ve böylece tümör gelişimi gözlenmektedir.

Burada *p19*, Mdm2-E3 kompleksine bağlanarak ligaz aktivitesini bloke eder ve proteozomal parçalanma meydana gelmemektedir [79,135]. Ras/ Raf/ Mek yolu *p19* ve *p53*' ün yanı sıra E2F-1 aktivasyonunun artması yoluyla *p16* ve *p21<sup>CIP</sup>* proteinlerinin artışına neden olmaktadır. Bunların kontrolü ile *p19*-Mdm2-*p53* döngüsünü içeren fare hücrelerinde prematüre ölümler görülmektedir [135-137].

*p19*' un bir transkripsiyon faktörü olan Dmp1 tarafından uyarıldığı ve fare fibroblast hücrelerinin *p53*-bağımlı hücre döngüsünü durdurarak ile cevap verdiği Honda ve. ark. [126] tarafından rapor edilmiştir. Fakat Dmp1-yoksun hücreler pasajlandığı zaman *p19*, Mdm2 ve *p53* seviyeleri normal hücrelere göre düşüş göstermiş ve ölüm gözlenmiştir. Yine bu Dmp1' in yoksun hücreler onkogenik H-*ras* ile morfolojik olarak transforme olabilmişlerdir [126].

*p53* mutasyonu ile birlikte Mdm2 nin yüksek seviyede sentezlendiği durumlar da bulunmaktadır [106]. Araştırılan 104 insan kanser vakasından 12 tanesinin yalnızca *p53* mutasyonu, 10 tanesinin yüksek seviyelerde Mdm2 sentezi veya amplifikasyonu ve 1 tanesinin hem yüksek seviyede Mdm2 sentezi ve hem de *p53* mutasyonunu rapor edilmiştir [138]. Yumuşak doku kanseri üzerine yapılan başka bir çalışmada ise *p53* mutasyonu ve Mdm2 yüksek seviyede sentezinin prognosis ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir [139]. Sezary sendrom üzerine yapılan bir başka çalışmada, *p53* mutasyonu ve yüksek seviyede Mdm2 sentezlenmesi malignansiye hücrelerine yol açtığı ileri sürülmüştür [140].

Elde edilen tüm bu bulguların aksine, yapılan bazı çalışmalarda *p53* ile *mdm2* arasında benzer bir ilişki bulunmadığı ve *mdm2*' nin tek başına, hücreleri transforme edebildiği bulunmuştur. *Mdm2*' nin transforme edebilme yeteneğinin N-terminal kuyruğunda meydana gelen delesyon sonucu ortaya çıktığı gerek sidik kesesi gerekse yumurtalık kanserlerinde yakın bir zamanda gösterilmiştir [141]. İlk önceleri, *mdm2*' nin tek başına hücreleri transforme edebilme yeteneği, *p53* normal tipini sentezleyen hücrelerde ortaya konmuş [106] ve takibeden çalışmalarla, bu onkogenik özelliğin çoğalmayı baskılayan *p53*'ü inhibe etme yoluyla gerçekleştiği ileri sürülmüştür [142]. Yüksek seviyelerde sentez edilen

Mdm2 proteininin, p53 proteinine sahip olan ve olmayan meme bez hücrelerinde S fazına girmeleri sonucu poliploidi ve kanserleşme belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olduğu belirtilmiştir [143].

Mdm2 proteininin gerek ribozom biyosentezinde gerekse translasyonel regülasyonda yer aldığı düşünülmektedir. Bunun genellikle Mdm2 proteininin 5S rRNA' ya bağlanan L5 proteini ile etkileşimine bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Mdm2 proteinini yüksek seviyede sentez eden hücrelerde, Mdm2, L5 ve 5SrRNA üçlü kompleksinin yanısıra, Mdm2, p53, L5 ve 5SrRNA dördümlü kompleksinin bulunduğu gösterilmiştir. 5SrRNA-L5 protein kompleksinin memeli hücreleri nukleoplazmasında saklanması ribozom sentezi için kaynak oluşturmaktadır ve ayrıca 5SrRNA, çekirdek ile sitoplazma arasındaki geçişini sağlamaktadır. Böylece, ribozom biyosentezinin kontrolünde, Mdm2'nin sözkonusu L5 fonksiyonlarını kontrol etme yoluyla rol aldığı düşünülmektedir [144-145].

### 1.3.2. *Mdm2* ve terminal farklılaşma

*Mdm2* geninin beyin, kas veya testis gibi dokularda yüksek seviyelerde transkripte edildiği ve [106] miyoblast hücrelerinde, *MyoD1* geninin transkripsiyonunu baskılama yoluyla farklılaşmayı engellediği tesbit edilmiştir [146]. Ayrıca C2C12 miyoblast hücrelerinin farklılaşması sırasında Mdm2'nin, p53 proteininden bağımsız olarak arttığı tespit edilmiştir [147].

Alkhaf ve ark. [148] tarafından yayınlanan bir makalede Mdm2 epidermal hücrelerde ekspresye edildiği zaman p53'e bağımlı kalmadan farklılaşmaya yol açabildiğini ve tümörleşmeye neden olmadığını savunulmuştur. Keratinosit hücrelerinin farklılaşması sırasındaki Mdm2'nin artışı ve p53'ün azalışı sözkonusu hücrelerin farklılaşma programında bir rolü olabileceğini göstermektedir [149].

### 1.4 Çalışmanın Amacı

Yukarıda verilen literatür bilgileri, bir hücrenin onkogenik aktivasyonu dahil anormal stres koşullarından özellikle *p53* geninin ve onun kontrolünü

sağlayan *mdm2* gibi bazı genleri aktive ederek kurtulduğunu yada apoptosis mekanizmasını salıncırdığını göstermektedir.

Söz konusu mekanizmaların *ras* onkogeninin aktivasyonu ile nasıl etkileşim gösterdiği hakkında henüz çok az bilgi bulunmaktadır bundan dolayı bu çalışmada, *ras*'ın neden olduğu kanserogenezin engellenebilmesi bakımından *H-ras* ile transformasyona uğratılmış kanserli hücreler ile onların normal karşılığı olan hücrelerde, UV ve DMSO gibi hücreye ve DNA'ya hasar veren ajanlara maruz kalıncıktan sonra *p53* ve *mdm2* genlerinin ekspresyonunun Western Blot yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1. Kullanılan Materyaller

#### 2.1.1. Antikorlar

Fare  $\beta$ -aktin antikorunu (Sigma), fare IgG antikorunu (Santa Cruz sc -2008), fare MDM2 antikorunu (Santa Cruz sc -965), p53 antikorunu (Santa Cruz sc -99), H-ras antikorunu (Santa Cruz sc-032) kullanılmıştır.

#### 2.1.2. Kimyasal maddeler

Akrilamid karışımı (%30) (Sigma), Aprotinin (Sigma), Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM) (Sigma), ECL (Enhanced Chemiluminiscence) solüsyonları (A, B) (Amersham), Fetal Bovine Serum (Sigma), Protein Marker (Sigma), Penisilin/Streptomisin solüsyonu (Sigma), Puks saline A (PSA) (Sigma), Tripsin-EDTA solüsyonu (Sigma), Dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma) kullanılmıştır.

### 2.2. Hücre Kültürü

Deneyde kullanılan 5RP7 ve F2408 rat embriyo fibroblast hücreleri, Osaka Fermentasyon Enstitüsü 'den hediye edilmiştir. Hücreler flasklara bir milyon hücre olacak şekilde, thoma lamında sayılarak ekilmiştir. Rat embriyo fibroblast hücreleri normal büyüme ortamı olan %10 FBS (Foetal Bovine Serum), %1 L-glutamin ve 100 ünite/ml penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içinde, 37 °C ve %5'lik CO<sub>2</sub> içeren CO<sub>2</sub> inkübatöründe (Hearouse) büyütülmüşlerdir. Pasajlama için tripsin ile muamele edilen hücreler yeni flasklarına aktarılmıştır.



### 2.3. Hücre Büyüme Eğrisi

5RP7 ve F2408 hücreleri, yukarıda belirtilen besi ortamlarını her flaska bir milyon hücre olacak şekilde ekilerek 24, 48, 72, 96 saat periyotlarla inkübe edilmişlerdir. Hücrelerin besi ortamı her gün yenisi ile değiştirilmiştir. Her periyot sonunda sayım yapılması için 1 ml Tripsin-EDTA ile 37 °C de inkübe edilmişlerdir. Hücreler bu aşamada hücre sayım aleti (Coulter Counter) ile sayılmıştır. Bu işlem üç kez tekrarlandıktan sonra, üç ayrı sayımın ortalaması alınmıştır.

### 2.4. Hücrelerin May-grünwald-Giemsa ile Boyanması

Hücreler buldukları besi ortamından uzaklaştırıldıktan sonra soğuk PBS ile üç kez yıkanmıştır. Soğuk metanolle 3 dakika fikse edildikten sonra hücrelerin üstüne May-grünwald boyası ilave edilmiş ve 4-5 dakika bekletilmiştir. Sonra boyanın yarısı alınarak geri kalan boya kısmına eşit miktarda distile su ilave edilmiş ve 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bir kez distile su ile yıkadıktan sonra hücrelerin üstüne Giemsa boyası eklenerek ve 7-8 dakika bekletildikten sonra distile su ile yıkanmıştır [150].

Boyanan hücre preparatları Olympus BX50 fotomikroskobu altında, değişik büyütmelemlerde incelenerek Olympus PM-30 otomatik fotomikrografi aracı ile fotoğraflanmıştır.

### 2.5. Hücrelerin UV Işını ve DMSO ile Muamelesi

F2408 hücreleri %10'luk FBS besiyerinde final konsantrasyonu %1, %2, %3 ve %4'lük olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) içeren besi ortamında yada 3,6,9,15 dakika 240 nm dalga boyundaki UV ışınına maruz bırakıldıktan sonra 12 saat süreyle büyütülmüşlerdir.

UV ışınına maruz bırakılacak hücrelerden ilk önce besiyeri uzaklaştırılmış ve ardından hücreler 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ile yıkanmıştır. Hücreler 3, 6, 9 ve 15 er dakika olmak üzere UV

ışığında bırakıldıktan sonra %10'luk FBS eklenerek 12 saat inkübasyona bırakıldı [151]

SRP7 hücreleride yukarıda belirtildiği gibi UV ışımına maruz bırakıldıktan 12 ve 24 saat sonra protein ekstraksiyonu için lizis edildi.

## 2.6. Western Blot Analizi

### 2.6.1 Toplam protein ekstraksiyonu

Toplam protein ekstraksiyonu Sambrook [152] göre yapılmıştır. Hücrelerden soğuk bir ortamda besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Flask yüzeyine yapışık olarak bulunan hücreler soğuk PBS tamponu (137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ile yıkandıktan sonra üzerine lizis solüsyonu (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, % 0.02 sodyum azid, % 1 NP-40, 100 µg/ml fenilmetilsülfonilflorid (PMSF), 1µg/ml aprotonin) eklenip buz üzerinde, her 5 dakikada bir çalkalanarak toplam 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra lizise uğramış hücreler, hücre sıyrıcı ile flasklardan sıyrılarak dikkatli bir şekilde toplanarak ependorf tüpüne aktarılmış ve 13000 g' de +4°C'de 10 dakika santrifüj (Heraouse) edilmiştir. Süpernatant kısmı alınarak -20°C'de saklanır.

Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak spektrofotometre (Schimadzu) ile tespit edilmiştir [152].

### 2.6.2. Jel elektroforezi (SDS PAGE)

Herbir örnekten alınan 40 µg protein, 10 µl 2X jel yükleme tamponu (% 4 SDS, %20 gliserol, 100 mM Tris-Cl (pH 6.8), 200mM DTT, % 0.2 Bromfenol blue) ile karıştırılmıştır. Protein ve jel yükleme tamponu karışımı 100°C'de 4-5 dakika kaynatılarak denatüre edilir. Protein örnekleri % 12'lik bir SDS poliakrilamid mini jelde (OWL) yürütülür. Elektroforez, önce toplayıcı jel için 80 V sonra ayırıcı jel için 120 V elektrik akımı uygulanarak, Tris-Glisin elektroforez tamponu (0.25 M Tris, 1.92 M glisin) içinde gerçekleştirilmiştir. Moleküler ağırlık standardı aynı jelde, protein örneklerinin hazırlandığı gibi hazırlanarak ayrı bir

sütunda yürütülür. Bromfenol blue boyası, jelin sonuna gelene kadar akım uygulanmıştır. Western blott için kullanılmayacak jeller ya da western blottan sonraki jeller, Coomassie brilliant blue boyası ile en az 2 saat boyanarak, daha sonra Destain tamponu (% 20 metanol, % 13.3 glasiyal asetik asit) ile yıkanarak % 7 glasiyal asetik asit içinde saklanmıştır [153].

### 2.6.3. Western blot

Nitrosellüloz (0,45  $\mu\text{m}$ ) filtreden jelle aynı boyutta bir parça kesilmiştir ve distile su ile hava kabarcıkları kalmayacak şekilde ıslatılmıştır. Yine jelle aynı boyutlarda altı adet 3MM Whatman kağıdı kesilmiştir ve transfer tampon (39mM glisin, 48mM Tris-base, %0.037 SDS, %20 metanol) içersine alınmıştır. Elektroblotterin alt ünitesine, transfer tampon ile ıslatılmış üç tane 3MM Whatman kağıdı yerleştirilmiştir ve bunun üstüne nitrosellüloz filtre aynı şekilde yerleştirilir. Daha önce hazırlanan jel distile su ile yıkanarak nitrosellüloz filtrenin üstüne yerleştirilmiştir. Daha sonra geriye kalan üç Whatman kağıdıda jelin üstüne yerleştirilmiştir ve üstüne elektro blotterin üst ünitesi kapatılmıştır. Protein transferi için gerekli 0.65 mA/cm<sup>2</sup> elektrik akımı 2 saat boyunca uygulanmıştır. Proteinlerin transferinden emin olmak için bir gece boyunca kurutulan nitrosellüloz filtre, Ponceu S boyasında, 2-5 dakika bekletildikten sonra distile su ile bolca yıkanarak fotoğrafı çekilmiştir [153].

### 2.6.4. Antikor ile işaretleme

Kuru filtre, yıkama tamponunda (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), %0.02 Tween 20), 5-10 dakika ıslatıldıktan sonra bloklama tamponunda (%5 yağsız süt tozu) 1 saat hafifçe çalkalanarak bloklanır. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak filtrenin üstüne yıkama solüsyonuna birinci antikor eklenerek (ras, MDM2, p53 ve  $\beta$ -aktin için 1:500) 2 saat hafifçe çalkalayarak inkübe edilmiştir. Filtre, dört defa 5'er dakika yıkandıktan sonra % 5 yağsız süt tozu içinde 10 dakika tekrar bloklanmıştır. Filtre, HRP (Horse redish peroksidaz) işaretli ikinci antikor olan IgG ile (anti-mouse için 1:1000) % 0.2 yağsız süt tozu içine

eklenerek 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra filtre, altı defa 10' ar dakika Tween-20'li yıkama solüsyonunda ve iki defa 10' ar dakikalık Tween-20' siz yıkama tamponunda yıkanmıştır [153].

#### **2.6.5. Dot blotting**

Test edilmesi istenilen protein örneği filtreye damlatılmış ve kuruması beklenmiştir. Kuruyan filtre daha önce anlatılan bloklama ve antibody ile işlem yapıldıktan sonra bir seri yıkama işleminden geçirilmiştir (Western blotting işleminde olduğu gibi). Daha sonra 2. antibody ile muamele edildikten sonra ECL solüsyonları ile aranan proteinin olup olmadığı ve 1. antibody'ye bağlanıp bağlanmadığı tespit edilmiştir.

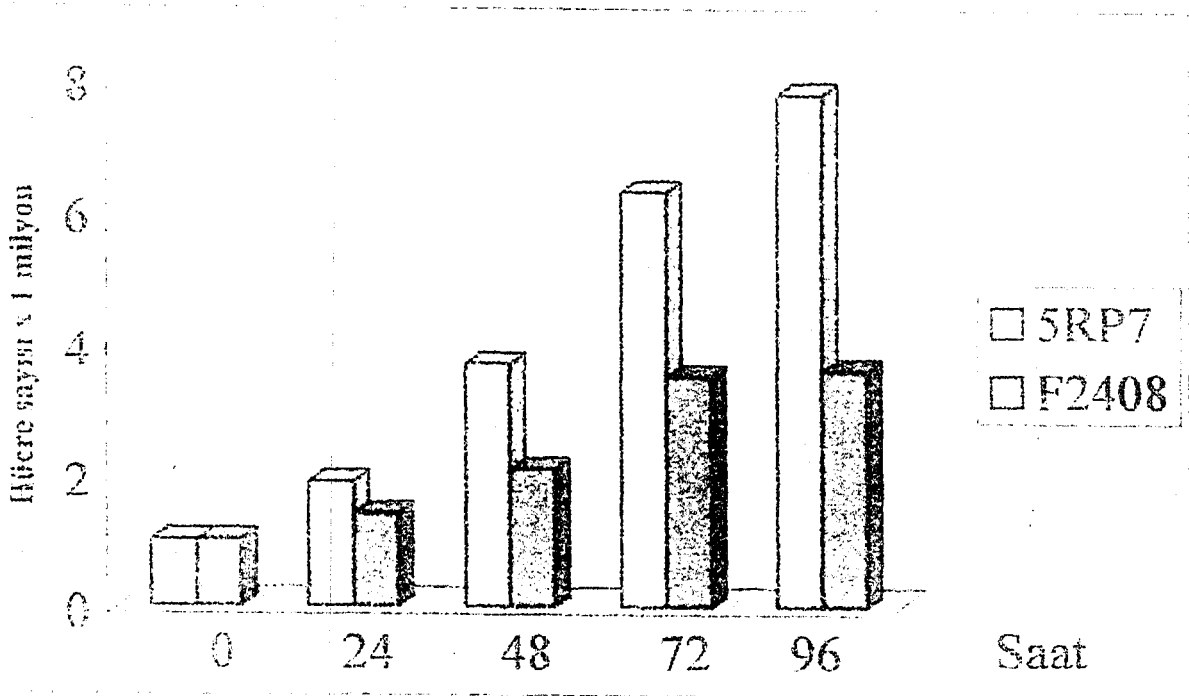
#### **2.6.6. ECL ile belirleme**

Karanlık odada, filtrenin solüsyonu iyice uzaklaştırılmıştır. Amersham yöntemine göre ECL A ve B solüsyonları karıştırıldıktan sonra solüsyon filtrenin üstüne eklenmiştir ve 1-2 dakika bekletilmiştir. ECL solüsyonları iyice uzaklaştırıldıktan sonra filtre streç filmiyle sarıldıktan sonra kasetteki camın üstüne yerleştirilmiştir ve üstüne X-ray filmi (Sigma Z37,037-1) konulduktan sonra 5 saniye ile 15 dakika arasında bekletilmiştir. Süre dolduktan sonra X-ray filmi kasetten alınmış ve banyo edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Hücrelerin Büyüme Özellikleri

F2408 ve 5RP7 hücreleri sayıları  $1 \times 10^6$  olarak materyal metotta belirtildiği gibi 4 flask olarak kültür edilmiş ve 24-96 saatleri arasında sayımları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.1 de grafikte gösterilmektedir. Buna göre normal rat embriyo fibroblast hücresi olan F2408 hücreleri flaskın yüzeyini kaplayana kadar yani kontakt inhibisyon etkisini gösterdiği zaman olan 48 saat sonunda büyümeyi durdurmuşlar ve 96 saattete yaklaşık  $4 \times 10^6$  olan hücre sayısında kalmışlardır. Bunun aksine, H-ras transforme rat embriyo fibroblast hücreleri olan 5RP7'ler devamlı olarak iki kat çoğalma gösterip, 96 saatin sonunda yaklaşık  $8 \times 10^6$  sayısına ulaşmıştır.



Şekil 3.1. %10'luk FBS besiyerinde büyütülen 5RP7 ve F2408 hücrelerinin zamana göre büyüme oranları

### 3.2. Hücrelerin Morfolojik Özellikleri

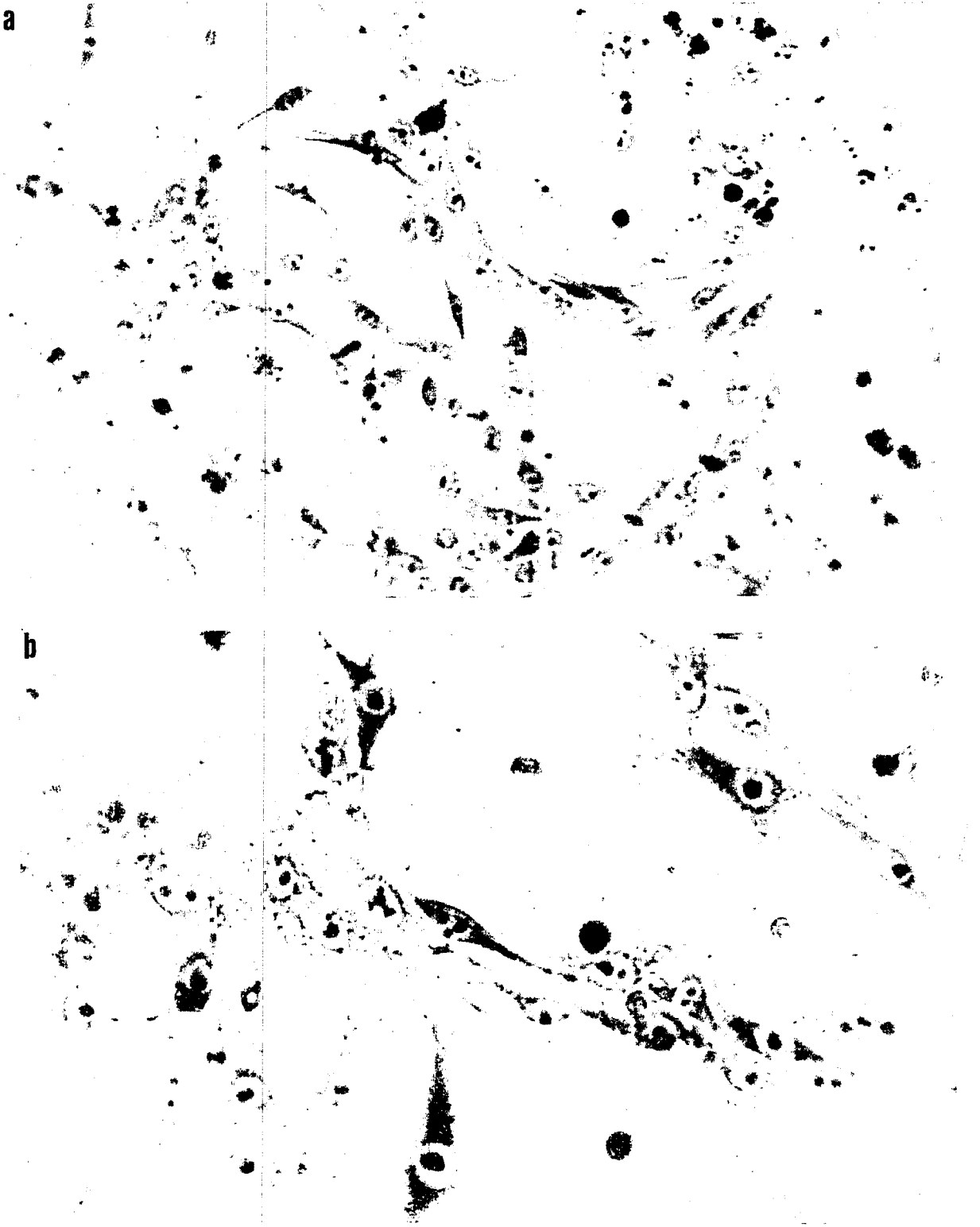
Hücrelerin inkübasyonundan sonra onların morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla May-grüwald-Giemsa boyasıyla boyanmıştır. Buna göre:

F2408 hücrelerinin tek tabakalı düzen gösterdikleri, hücrelerin büyük çoğunluğunun poligonal şekilli, küçük bir bölümünün ise iğsi ve üçgen şekilli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca mitoz geçirmekte olan küresel şekilli hücrelerde rastlanmıştır (Şekil 3.2.A ve B).

Hücrelerinin tek çekirdekli oldukları, çekirdeğin hücrenin merkezine yerleşmiş bir konumda ve oval biçimli olduğu tespit edilmiştir. Çekirdeğin görülmediği hücre çekirdeklerinde kromatin taneciklerinin hücrelerin bir bölümünde homojen olarak dağılırken bir bölümünde bir bütün olarak yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 3.2.A ve B).

İğsi şekilli hücrelerin hücrenin karşılıklı kutuplarında yaklaşık olarak uzunlukları birbirine benzeyen uzantılara sahip oldukları görülmüştür. Poligonal şekilli hücrelerin etraflarındaki hücrelerle bağlantı kurabilmek için hücrelerin her yönünden uzantıların çıktığı belirlenmiştir. May-grüwald-Giemsa boyama tekniği uygulanan F2408 hücrelerinde çekirdeğin sitoplazmaya göre daha açık renkte boyandığı görülmüştür (Şekil 3.2.A ve B).

5RP7 hücreleri ile aynı büyüme tekniği uygulanan F2408 hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarının 5RP7 hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarına göre daha açık renkte boyandığı saptanmıştır (Şekil 3.2.A ve Şekil 3.3.A).



Şekil 3.2.A May-grünwald-Giemsa ile boyanmış normal rat embriyo fibroblast hücresi olan F2408 hücrelerinin ışık mikroskopunda 20X büyütmede görüntüsü (1 günlük)

B. May-grünwald-Giemsa ile boyanmış normal rat embriyo fibroblast hücresi olan F2408 hücrelerinin ışık mikroskopunda 40X büyütmede görüntüsü (1 günlük)

H-ras transforme olmuş rat embriyo fibroblast hücreleri olan 5RP7 hücreleri flasklara ekildiklerinin 1. gününde tek tabakalı düzen göstermekte ekimlerinden 24 saat sonra ise çok tabakalı düzen gösterme eğiliminde oldukları tespit edilmiştir. Hücrelerin iğsi ve yuvarlak, az sayıda hücrenin ise poligonal şekle sahip oldukları saptanmıştır. Poligonal şekilli hücrelerin tek ve yuvarlak biçimli çekirdeğe sahip oldukları, bu çekirdeğin hücrenin merkezinde konumlandığı gözlenmiştir. Poligonal hücrelerde de çekirdekçiğin görülmediği kromatinin ise bir bütün olarak çekirdeğin merkezinde yer aldığı gözlenmiştir (Şekil.3.3.A ve B).

İğsi hücrelerin karşılıklı iki kutupta uzantıya sahip oldukları görülürken poligonal hücrelerin uzantılarının diğer hücrelerle kaynaşmış biçimde olduğu belirlenmiştir. Yuvarlak şekilli hücrelerin çekirdek ve sitoplazmaları mitoz geçirmediği için ayırt edilememiştir. Hücre çekirdeklerinin koyu pembe renkte boyandığı görülürken sitoplazmanın çekirdeğe göre daha açık renkte boyandığı görülmüştür.

Sayıları hızla artan 5RP7 hücrelerinin çok tabakalı hale gelerek bir koloni oluşturdukları tespit edilmiştir. Koloniyi oluşturan hücrelerin hepsinin yuvarlak şekilli oldukları saptanmıştır. Sitoplazma oranının büyük oranda azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.3.A. ve B).

### 3.3. Antikorların Dot-Blot Yöntemiyle Test Edilmesi

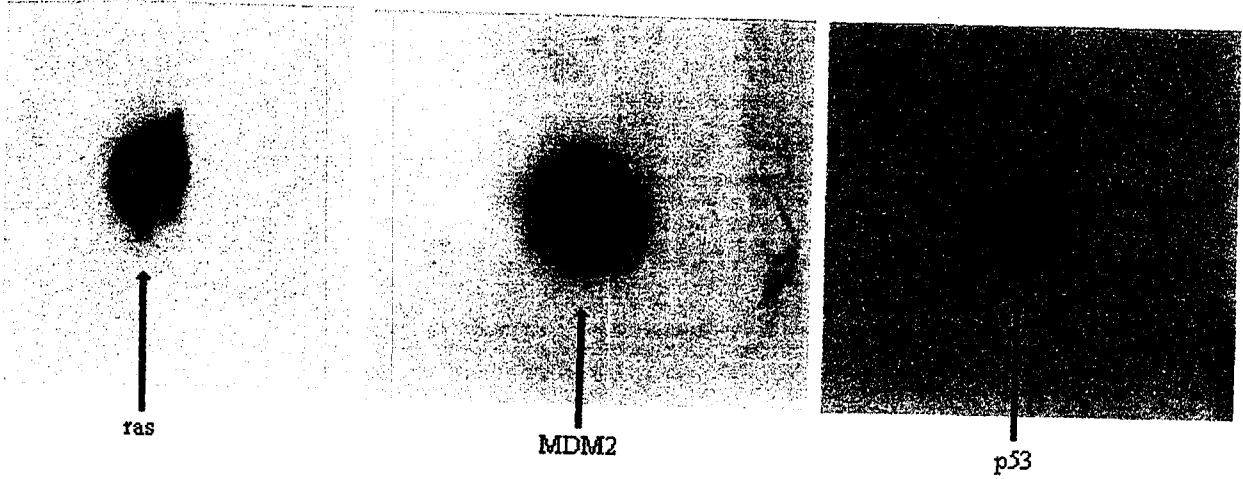
Deneilerde kullanılacak olan 4 özgül antikor ile onların HRP işaretli ikinci antikorlarının birbirlerine bağlanmaları ve ECL sisteminin çalışıp çalışmadığı materyal metotta belirtildiği gibi dot-blot yöntemiyle test edilmiştir. Şekil 3.4.'de gösterildiği gibi p53, MDM2,  $\beta$ -aktin ve ras antikorları kendilerine özgül olan fare immunoglobini ile reaksiyon vermiştir.





Şekil 3.3.A. H-ras transforme olmuş rat embriyo fibroblast 5RP7 hücrelerinin ışık mikroskopunda 20X büyütmedeki görünümü (1 günlük)

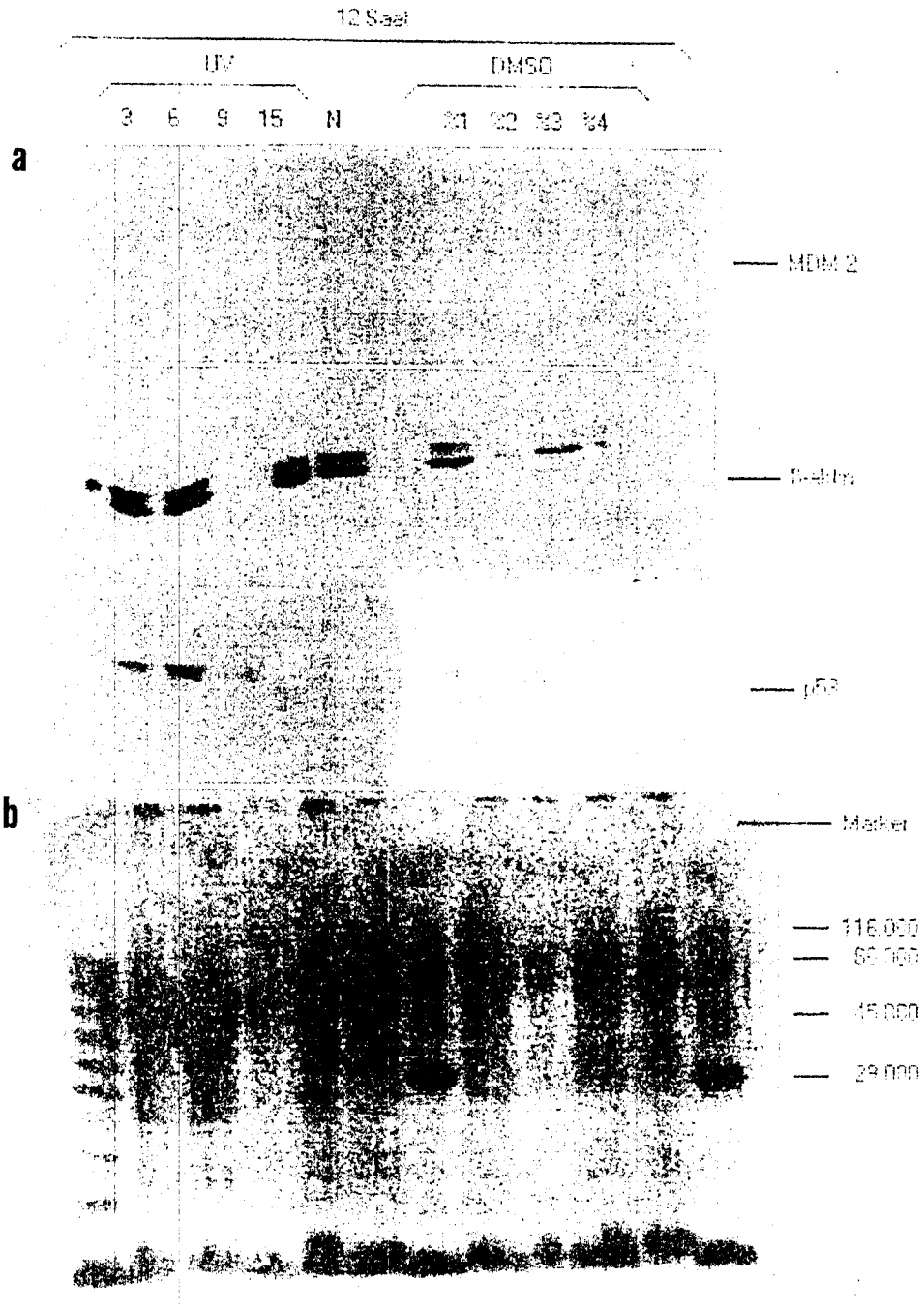
Şekil 3.3.B. Koloşi oluşturmuş H-ras transforme olmuş rat embriyo fibroblast 5RP7 hücrelerinin ışık mikroskopunda 40X büyütmedeki görünümü (2 günlük)



Şekil 3.3. Dot-blot yöntemi ile ras, MDM2 ve p53 antikorları kendilerine özgül olan fare immunoglobini ile reaksiyonun gösterilmesi

### 3.4. F2408 hücrelerinde UV ve DMSO muamelesinden sonra p53, MDM2 ve $\beta$ -aktin proteinlerinin seviyesi

Normal hücreler olan F2408 hücreleri DNA hasarı meydana getirebilmek için Materyal Metotda belirtildiği gibi UV ışınlarına maruz bırakılmışlardır. Daha sonra bu hücrelerde, olası DNA hasarı sonucu p53 ve MDM2 genlerinin ekspresyonu Western Blot yöntemiyle araştırılmıştır. Şekil.3.5.A'da gösterildiği gibi MDM2 proteini için hiçbir sinyal alınmazken p53 proteini 3,6 ve 9 dakika UV ışınına maruz bırakılan hücrelerde artan bir şekilde tespit edilmiştir. 15 dakika UV ışınına maruz bırakılan hücrelerde hiçbir sinyal alınamamıştır. Jeldeki herbir kuyucuğa yüklenen toplam protein miktarını kontrol etmek için aynı örnekler paralel bir jelde yürütüldükten sonra  $\beta$ -aktin proteinin miktarı tespit edilerek p53 ile karşılaştırılmıştır. Şekil.3.5.A.da görüldüğü gibi 9 dakika UV ile muamele edilen hücrelerin protein örneğinde  $\beta$ -aktin tespit edilemezken çok azda olsa p53 proteini için band görülmektedir.  $\beta$ -aktin (48 kD) ve p53 (53 kD) için elde edilen protein bandları moleküler ağırlık standartı (Marker) ile karşılaştırılarak uygun moleküler ağırlıkta olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.5. Normal rat embriyo fibroblast hücrelerinde farklı sürelerdeki UV ışını muamelesi ve farklı konsantrasyonlarda uygulanmış DMSO' nun 12. saat sonunda MDM2,  $\beta$ -aktin ve p53.protein seviyelerinin western-blot ile gösterilmesi (A).

Nitroselüloz membrana transferden sonra toplam proteinin Ponceao S boyama ile gösterilmesi (B).

N: UV ışını ve DMSO etkisinde bırakılmamış normal rat embriyo fibroblast hücrelerinden izole edilen toplam protein seviyesinin gösterilmesi

Hücrelerde DNA hasarına neden olan bir faktör olarak UV'nin etkisini hem kontrol etmek hem de olası kendi etkisini araştırmak için hücreler DMSO'nun farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Şekil 3.5.A'da görüldüğü gibi %1, %2, %3 ve %4'lük DMSO ile hücrelerin muamelesi p53 ve MDM2 proteinlerinin sentezlenmesine neden olmamıştır. Fakat buna karşın şekil 3.4.B'de verilen, her bir örnekteki toplam protein miktarını gösteren nitroseluloz filtreye baktığımızda %3'lük ve %4'lük DMSO ile muamele edilmiş örneklerde 1. örnekle aynı miktarda protein olmasına rağmen  $\beta$ -aktin seviyesi %3'lük de azalmış ve %4'lükde tamamen kaybolduğu görülmüştür.

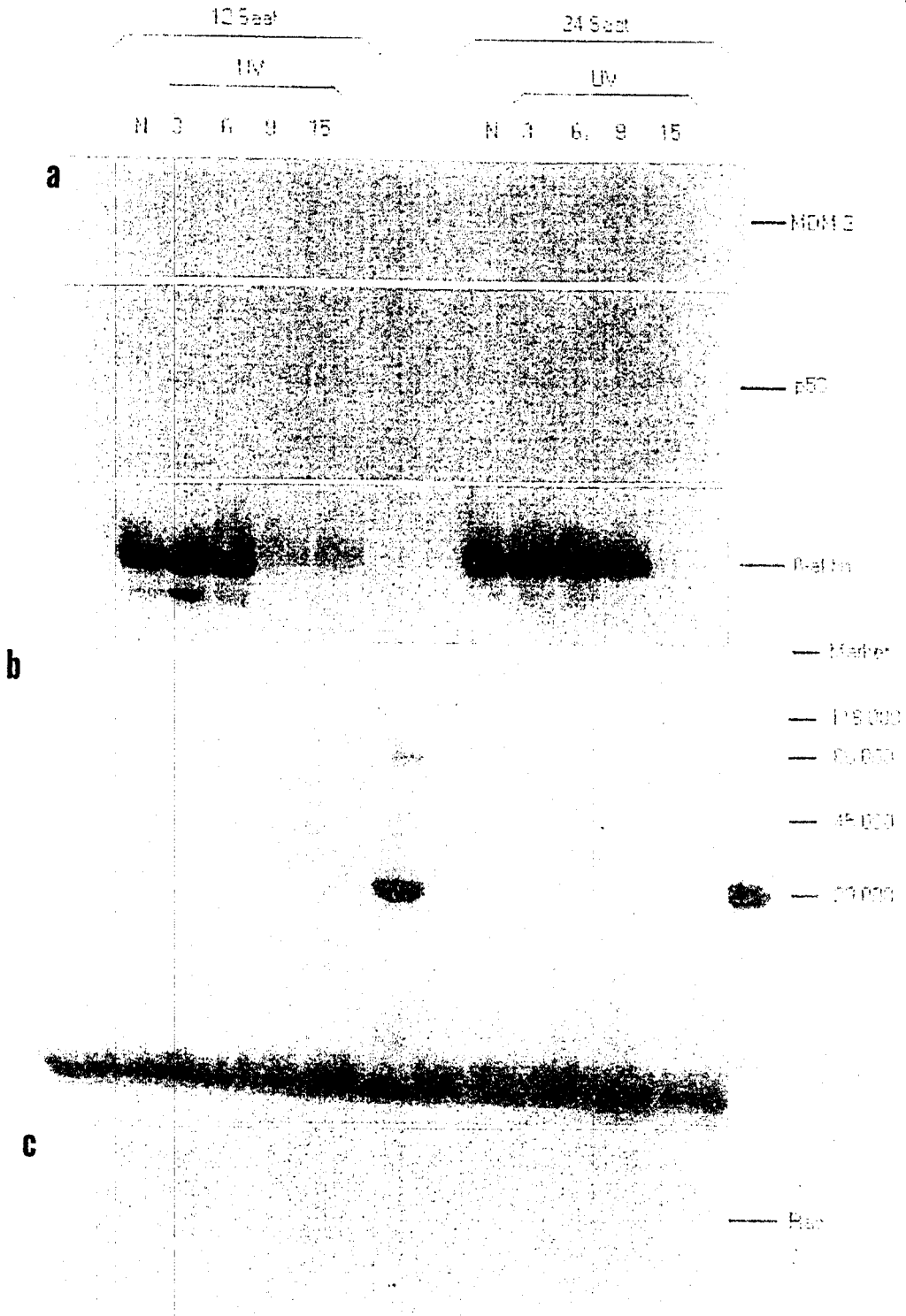
Hiçbir ajana maruz bırakılmamış normal hücrelerden elde edilen toplam proteinlerde p53 ve MDM2 proteinine bakıldığında beklenildiği gibi herhangi bir bant tespit edilemezken  $\beta$ -aktin seviyesi normal bir şekilde tespit edilmiştir.

### **3.5. 5RP7 hücrelerinde UV ve DMSO muamelesinden sonra p53, MDM2 ve $\beta$ -aktin proteinlerinin seviyesi**

H-ras transforme olmuş rat embriyo fibroblast hücreleri olan 5RP7 hücreleri de DNA hasarı meydana getirebilmek için Materyal Metotda belirtildiği gibi UV ışınlarına maruz bırakılmışlardır. Daha sonra bu hücrelerde DNA hasarı sonucu p53 ve MDM2 genlerinin ekspresyonu Western Blot yöntemiyle araştırılmıştır. Ancak Şekil 3.6.A'da görüldüğü gibi aynı blot üzerinde beta-aktin tespit edilirken p53 ve MDM2 proteinleri için hiçbir sinyal tesbit edilememiştir. Bu hücreler F2408'den farklı olarak yukarıda belirtilen sürelerle UV ışınına maruz bırakıldıktan 24 saat sonra lizis edilerek proteinleri analiz edildiğinde yine p53 ve MDM2 için bir sinyal alınamamıştır.

Kontrol amacıyla yapılan beta-aktin için elde edilen bantların şekil 3.6.B'de verilen herbir örnekteki toplam protein miktarı ile karşılaştırıldığında paralel olmadığı gözlenmiştir. UV ışını ile muamele edildikten 12 saat sonra elde edilen örneklerde 9. ve 15. dakika UV ışınına maruz bırakılmış  $\beta$ -aktinin tamamen yok olduğu görülmektedir. Bunun aksine benzer süre ile muamele edilmiş hücrelerden 24 saat sonra elde edilen protein örneklerinde bu yok olma gözlenmemektedir.

Ayrıca H-ras ile transformasyona uğratılmış 5RP7 hücrelerinde H-ras proteinin varlığı Western Blot ile araştırıldığında Şekil 3.6.C’de görüldüğü gibi hiç sinyal alınamamıştır.



Şekil 3.5. H-ras transform rat embriyo fibroblast (5RP7) hücrelerinde, farklı sürelerde UV ışını muamelesinden sonra 12. ve 24. saatlerde MDM2, p53 ve  $\beta$ -aktin protein seviyelerinin western-blot ile gösterilmesi (A).

Nitroselüloz membrana transferden sonra toplam proteinin Ponceao S boyama ile gösterilmesi (B).

Ras protein seviyesinin western-blot ile gösterilmesi (C).

N: UV ışınına maruz bırakılmamış H-ras transfekte edilmiş rat embriyo fibroblast hücrelerinden izole edilen toplam protein seviyesinin gösterilmesi

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

*p53* tümör baskılayıcı gen tümör oluşumundaki en yaygın mutasyona uğratılmış gendir. İnsan tümörlerinin yaklaşık %50'sinde *p53* geninin normal fonksiyonunu kaybettiği görülmektedir [126]. *ras* protoonkogen ise sinyal yollarının büyük bir kısmında moleküler bir anahtar olarak rol oynamakta ve hücrelerin farklılaşması ya da çoğalmasını kontrol etmektedir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %30'unda *ras* geninin mutasyona uğradığı tespit edilmiştir [154-155]. Bu kadar öneme sahip *p53* ve *ras* genlerinin ürünlerini incelemek amacıyla F2408 ve 5RP7 hücrelerinden yararlanılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız F2408 hücreleri rat embriyo fibroblast hücreleridir. Bu hücreler flaska ekildiklerinde 2. günden sonra kontakt inhibisyonundan dolayı büyümelerinin durması nedeniyle normal hücrelerle benzerlik gösterir. *H-ras* transforme edilmiş rat embriyo fibroblast hücresi olan 5RP7'ler ise sürekli mitoz halindedir ve normal hücrelerde görülen kontakt inhibisyonundan etkilenmemesi ve yığın oluşturması kanserli hücrelerde olduğu gibi bu hücrelerde de görülen tipik belirtilerdir [44.-45, 156].

Flask üzerinde fikse edilerek boyanan normal ve transform hücreler mikroskop altında incelendiğinde morfolojik olarak farklılıklar göstermiştir. F2408 hücreleri flask yüzeyine yayılmış olarak daha çok poligonal şekil gösterirken 5RP7 hücreleri tipik transform hücre morfolojisi olan daha yuvarlağımsı ve iğsi görünümündedirler [44-45]. Morfolojik özelliğın dışında May-Grünwald-Giemsa boyanması açısından da F2408 ve 5RP7 hücreleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Bu boyama ile 5RP7 hücrelerinin F2408 hücrelerine göre daha koyu boyanması transform hücrelerin asidik içeriklerinin arttığını doğrulamaktadır [150].

Bu çalışmada *p53*, *mdm2*, *ras* ve  $\beta$ -aktin proteinlerinin UV ışını ve DMSO muamelesi sonucu hücrelerdeki düzeyleri Western Blot yöntemiyle incelenmiştir. Çalışmamız da, F2408 hücrelerinin farklı sürelerle UV ışınına maruz bırakılmasıyla bu hücrelerin DNA'larında hasar meydana getirilerek *p53*'ün aktif hale gelebileceğı düşünölmüştür. Sonuçta UV muamelesinden sonra 3, 6 ve 9. dakikalardaki periyotlarda 12 saatlik inkübasyon süresinden sonra *p53* proteinin düzeylerinde periyodik olarak artışın gözlenmesi sözkonusu normal

fibroblastlarda p53'ün başlattığı yolun normal olarak çalıştığını göstermektedir. Buna benzer sonuçlar çeşitli hücre tiplerinde de elde edilmiştir [157-158]. Ancak UV ışınına 15 dakika bırakılmış olan F2408 hücrelerinde p53 gözlenememiştir. Bu durum uygulanan 15 dakikalık sürenin UV'nin hücre üzerine çok kuvvetli zararlı olduğu ve p53 de dahil birçok molekülü parçaladığını düşündürmektedir. Normal olarak p53'ün çok kısa ömürlü olduğu ve protein seviyesinin hiçbir strese maruz kalmayan hücrelerde çok düşük olduğu bilinmektedir [126, 157-158, 159]. Bizim yaptığımız çalışmada bunlara benzer olarak normal F2408'lerde p53 tesbit edilememiştir. Buda çalışılan sistemin beklenilene uygun olduğunu göstermektedir.

Aynı hücreler hem UV'nin etkisini hemde çok sık kullanılan bir çözücü olan DMSO'nun olası etkisini kontrol etmek amacıyla DMSO'nun %1, %2, %3 ve %4'lük konsantrasyonlarında muamele edildiklerin de p53 proteini gözlenememiştir. Bu sonuçta en azından DMSO'nun UV'nin meydana getirdiği zarar gibi DNA'ya herhangi bir zarar vermediğini yada p53'ün başlattığı yolu aktive etmediğini göstermektedir [157, 160-161].

*mdm2*, p53 proteini tarafından aktif edilen bir gen olduğu için hücre içerisinde p53 protein konsantrasyonu arttıkça *mdm2* proteininin artarak p53'ü parçaladığı çeşitli çalışmalarla ileri sürülmüştür [107, 157, 162]. Burada, UV ve DMSO'ya maruz bırakılan F2408 hücrelerinden elde edilen proteinlerde 12 saat sonra *Mdm2* proteini tesbit edilememiştir. Aynı şekilde 5RP7 hücrelerinde de görülememiştir. DMSO'ya maruz bırakılmış hücrelerde p53'ün gözlenememesinin yanısıra *mdm2*'ninde gözlenememesinin nedeni, *mdm2*'nin p53 ile aktif edildiğinden onun bulunmadığı ortamda *Mdm2*'nin bulunamayacağıdır [106].

*Mdm2* ve p53 arasındaki etkileşimde UV ışınlarına maruz bırakılan C127 hücrelerinde, p53 stabilizasyonu ve *mdm2* indüksiyonu arasında oldukça bir gecikme olduğu gözlenmiştir [111]. Gamma radyasyonunun bazı hücrelerde *mdm2* mRNA'sının hızlı artışına neden olduğu ve G1 fazında durdurulan hücreleri bölünmeye sevk ettiği rapor edilmiştir[(108)]. UV ışınına maruz bırakılan F2408 hücrelerinde gözlenen p53 dolayısıyla bu proteinlerin *mdm2*'yi aktif hale getirmesi ve böylece *Mdm2* proteininin gözlenmesi gerekirken p53 düzeyinin çok



düşük olması henüz mdm2'yi aktif hale getirecek düzeye gelmediğini düşündürmektedir.

UV ışınının F2408 hücrelerine etkisinde  $\beta$ -aktin protein seviyesine bakıldığında tüm etki sürelerindeki protein seviyeleri eşittir. Ancak DMSO'nun  $\beta$ -aktine etkisinde ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak  $\beta$ -aktin seviyesi düştüğü gözlenmiştir. Buda bize UV'nin söz konusu süreler içerisinde ancak DNA'ya zarar verebildiğini ama bunun aksine DMSO'nun yüksek konsantrasyonlarda bir hücre iskeleti elemanı olan  $\beta$ -aktine zarar verdiğini göstermektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarla DMSO'nun bir çözücü kontrolü olarak test edilmesi onun %1'lik dozlarının genotoksik olmadığını yada p53 ekspresyonunun uyarmadığı rapor edilmiştir [161].

F2408'lerinde, UV'den sonra 12 saatlik inkübasyonda tespit edilen p53 protein bantları 5RP7 hücrelerinde gözlenememiştir. Aynı sonuç inkübasyon süresi 24 saate kadar uzatılmasına rağmen 5RP7 hücrelerinde hiçbir şekilde p53 ve mdm2 tespit edilememiştir. Mdm2'nin yüksek seviyede sentez edildiği ve insanda *mdm2* geninin lokalize olduğu 12q13-14 bölgesinin, insan sarkomalarının bir çoğunda amplifike olduğu anlaşılmıştır [130-131]. Mdm2 proteinin yüksek seviyede olması genin amplifikasyonuna bağlı olduğu gibi bazı kanserli hücrelerde, *mdm2* geninin amplifikasyonuna bağlı olmadan da protein seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir [132-133]. *mdm2*'nin onkogenik aktivasyonlar sonucu kontrol edildiği yapılan yeni çalışmalarla gösterilmiştir [134]. Ancak 5RP7 hücrelerinde mdm2 gözlenememiştir.

UV'ye maruz bırakılan 5RP7 hücrelerinde  $\beta$ -aktin protein seviyesi incelenmiş ve doz sürelerine bağlı olarak 12 saat inkübasyona bırakıldığında  $\beta$ -aktin seviyelerinde 9 ve 15. dakikalarda düşüş göstermiş ancak 24 saat inkübasyona bırakılan hücrelerde ise 9. dakikada  $\beta$ -aktin seviyesi diğerleri ile aynı seviyeye gelmiş, 15. dakikada ise  $\beta$ -aktin gözlenememiştir. Bu sonuçlar DMSO ya maruz bırakılmış hücrelerdeki  $\beta$ -aktin sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

UV'ye maruz bırakılan 5RP7 hücrelerinde ras protein seviyesine bakılmış ve hiçbir bant gözlenememiştir. 5RP7 hücrelerindeki *H-ras* onkogeninin daha iyi araştırılması için yeni bir H-ras antikoru ile çalışılması gerekmektedir. Hiç sinyal alınamayan mdm2, ras proteininden bantların spesifik antikollarının kontrolü dot

blot yöntemiyle yapılmıştır ve bu antikorlardan sinyal alınmıştır. Bu da çalışmamızda kullanılan antikorların aktivitesi verimliliğinden kaynaklanan şüpheleri ortadan kaldırmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile aktif ras proteininin embriyonal fibroblast hücrelerinde UV tarafından uyarılan p53 geninin ekspresyonunu baskılayabileceği ve bu yolla transformasyona neden olabileceği ileri sürülmektedir. Ras aktivasyonunun hangi mekanizma yada moleküller aracılığı ile yada direkt mi bu baskılamaya neden olduğu ayrıca araştırılması gereken bir konu olup kanserogenesisde ras proteinlerine karşı tedavi geliştirme için çok yararlı olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. ADJEI, A.A., *Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy*, J. of the National Cancer Institute., **93**, 1062-1074 (2001).
2. VARMUS, H.E., *The Molecular Genetics of Cellular Oncogenes*, Ann. Rev. Genet., **18**, 553-612 (1984).
3. BISHOP, J.M., *Molecular themes in Oncogenesis*, Cell, **64**, 235-248 (1991).
4. LOWE, S.W., *Activation of p53 by Oncogenes*, Endocrine-Related Cancer, **6**, 45-48 (1999).
5. SHAY, J.W., WRIGHT, W.E. ve WERBIN H., *Defining the Molecular Mechanisms of Human Cell Immortalization*, Biochimica et Biophysica Acta, **1072**, 1-7 (1991).
6. AGARWAL, M.L., TAYLOR, W.R., CHERNOV, M.V. ve CHERNOVA, O.B., *The p53 Network*, The Journal of Biological Chemistry, **273**, No.1, 1-4 (1998).
7. NISHIMURA, S. ve SEKIYA, T., *Human Cancer and Cellular Oncogenes*, Biochem. J., **243**, 313-327 (1987).
8. WADDICK, K.G. ve UCKUN, F.M., *Innovative Treatment Programs Against Cancer*, Biochemical Pharmacology, **56**, 1411-1426 (1998).
9. BOS, J.L. *Ras Oncogenes in Human Cancer*, Cancer Res., **49**, 4682-4689 (1989).
10. SOEHNGE, H., OUHTIT, A. ve ANANTHASWAMY, H.N., *Mechanisms of Induction of Skin Cancer by UV Radiation*, Frontiers in Bioscience, **2** 538-551 (1997).
11. BREDEL, M. ve POLLACK I.F., *The p21-Ras Signal Transduction Pathway and Growth Regulation in Human High-Grade Gliomas*, Brain Research Reviews, **29**, 232-249 (1999).

12. BARBACID, M., *ras Genes*, Ann. Rev. Biochem., **56**, 779-827 (1987).
13. KIVINEN, L., *Effects of Ras Oncoprotein and Growth Factors on the Cell Cycle Regulators Retinoblastoma Protein RB and p21<sup>Cip1/Waf1</sup>*, Helsinki, 89, (1999).
14. MARTE, B.M., RODRIGUEZ-VICIANA, P., WENNSTROM, S., WARNE, P.H. ve DOWNWARD, J., *R-Ras can Activate the Phosphoinositide 3-kinase But Not the MAP kinase Arm of the Ras Effector Pathways*, Curr. Biol, **7**, 63-70 (1997).
15. QUILLIAM, L.A., CASTRO, A.F., ROGERS-GRAHAM, K.S., MARTIN, C.B., DER, C.J. ve BI, C., *M-Ras/R-Ras3, A Transforming Ras Protein Regulated by Sos1, GRF1 and p120 Ras GTPase-Activating Protein, Interacts With the Putative Ras Effector AF6*, J. Biol. Chem., **274**, 23850-23857 (1999).
16. GOODMAN, L.E., JUDD, S.R., FARNSWORTH, C.C., POWERS, S., GELB, M.H., GLOMSET, J.A. ve TAMANOL, F., *Mutants of Saccharomyces cerevisiae Defective in the Farnesylation of Ras Proteins*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 9665-9669 (1990).
17. CASEY, P.J., SOLSKI, P.A., DER, C.A. ve BUSS, J.E. *p21 ras is Modified by Farnesyl Isoprenoid*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **86**, 8323-27 (1989).
18. HANCOCK, J.F., MAGEE, A.I., CHILDS, J.E. ve MARSHALL, C.J. *All ras Proteins are Polyisoprenylated but Only Some are Palmitoylated*, Cell, **57**, 11167-11177 (1989).
19. MARSHALL, J.C. *the ras Gene Family. Oncogenes and Growth Control*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 191-199 (1986).
20. LOWY, D.R., ZHANG, K.E., DECLUE, J.E. ve WILLUMSEN, B.M. *Regulation of p21 ras Activity*, TIG, **7**, 346-350 (1991).
21. GIBBS, J.B., MARSHALL, M.S., SCOLNICK, E.M., DIXON, R.A.F. ve VOGEL, U.S., *Modulation of Guanine Nucleotides Bound to Ras in NIH3T3 Cells by*

- Oncogenes, Growth Factors and the GTPase Activating Protein (GAP)*, J. Biol. Chem., **265**, 20437-20442 (1990).
22. SATOH, T., NAKAFUKU, M., MIYAJIMA, A. ve KAZIRO, Y., *Involvement of p21<sup>ras</sup> in Signal Transduction Pathways From Interleukin2, Interleukon3 and Granulocyte1 Macrophage Colony Stimulating Factor but not from Interleukin4*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 3314-3318 (1990)
23. DOWNWOARLD, J., RIEHL, R., WU, L. ve WEINBERG, R.A. *Identification of Nucleotide Exchange-promoting Factor for p21<sup>ras</sup>*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**, 5998-6002 (1990).
24. LANGE-CARTER, C.A. ve JOHNSON, G.L., *Ras-dependent Growth Factor Regulation of MEK Kinase in Pc12 cells*, Science, **265**, 1458-60 (1994).
25. TRAHEY, M. ve McCORMICK, F. *A Cytoplasmic Protein Stimulates Normal N-ras p21<sup>ras</sup> GTPase, but dose not Affect Oncogenic Mutants*. Science, **238**, 542-545 (1987).
26. RODRIGUEZ-VICIANA, P., WARNE, P., DHAND, R., VANHAESEBROECK, B., GOUT, I. ve FRY, M.J., *Phophotidylinositol-3-OH Kinase as a Direct Target of ras*, Nature, **370**, 527-230 (1994).
27. ANGEL, P. ve KARIN, M., *The rol of Jun, Fos and the AP-1 Complex in Cell-Proliferation and Transformation*, Biochim. Biophys Acta, **1072**, 129-157 (1991).
28. BOGUSKI, M.S. ve McCORMICK, F., *Proteins Regulating ras and its Relatives*, Nature, **366**, 643-646 (1993).
29. McCORMICK, F., *Activators and Effectors of ras p21 Proteins*, *Current Opinion in Genetic and Development*, **4**, 71-76 (1994). // *Legi is*
30. SANTOS, E. ve NEBREDA, A.R. *Structural and Functional Properties of ras Proteins*, FASEB, **3**, 2151-63 (1989).

31. VISVANATHAN, K.V., POCOCC, R.D. ve SUMMERHAYES, I.C., *Preferential and Novel Activation of H-ras in Human Bladder Carcinomas*, *Oncogene Res.*, **3**, 77-86 (1988).
32. ADARI, H., LOWY, D.R., WILLUMSEN, B. M., DER, C.J. and McCORMICK, F., *Guanosine Triphosphatase Activating Protein (GAP) Interacts with the p21<sup>ras</sup> Effector Binding Domain*. *Science*, **240**, 518-21 (1988).
33. FUJITA, J., YOSHIDA, O., YUASA, Y., RHIM, J.S., HATANAKA, M. ve AARANSON, S.A., *Ha-ras Oncogenes are Activated by Somatic Alterations in Human Urinary Tract Tumours*, *Nature* **309**, 464-466 (1984)
34. TAPAROWSKY, E., SHIMIZU, K., GOLDFARB, M. And WIGLER, M., *Structure and Activation of the Human N-ras Gene*, *Cell*, **34**, 581-586 (1983)
35. PAI, E.F., KABSCH, W., KRENGEL, U., HOLMES, K.C., JOHN, J. ve WITTINGHOFER, A., *Structure of the Guanine-nucleotide-binding domain of the H-ras oncogene Product p21 in the triphosphate conformation*, *Nature*, **341**, 209-214 (1989).
36. BALMAIN, A., *Molecular Events Associated With tumor Initiation, Promotion and Progression in Mouse skin*, *Oncogenes and Growth Control*, ed. Khan, P., and Graf, T., Springer\_Verlag, Berlin Heidelberg, 326-331 (1986).
37. QUINTANILLA, M., BROWN, K., RAMDEM, M. ve BALMAIN, A., *Carcinogen-specific Mutations in Mouse Skin Tumors, ras gene Involvement in Both Initiation and Progression*, *Nature*, **322**, 78-80 (1986).
38. MCKAY, I.A., MARSHALL, C.J. ve HALL, A., *Malignant Transformation of Murine Fibroblasts by a Human c-Ha-ras-1 Oncogene does Not require A functional Epidermal Growth Factor Receptor*, *Mol. Cell. Biol.*, **6** (10), 3382-3387 (1986).

39. OSTEROP, A.P., MEDEMA, R.H., vd ZON, G.C., BOS, J.L., MOLLER, W. ve MAASEN, J.A., *Epidermal-growth-factor reseptors generate ras GTP more efficiently than insulin reseptors*, Eur. J. Biochem., **212**, 477-482 (1993).
40. SATOH, T., NAKAFUKU, M., MIYAJIMA, A ve KAZIRO, Y., *Involvement of Ras p21 protein in signal-transduction pathways from interleukin 2, interleukin 3, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not interleukin 4*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **88**, 3314-3318 (1991).
41. WEISMANN, B.E. ve AARONSON, S.A., *BALB and Kirsten murine sarcoma viruses alter growth and differentiation of EGF-dependent BALB/c mouse epidermal keratinocyte lines*, Cell, **32**, 599-606 (1983).
42. STACEY, D.W. ve KUNG, H.F., *Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein*, Nature, **310**, 503-511 (1984).
43. BAR-SAGI, D. ve FERAMISCO, J.R., *Induction of Membrane Ruffling and Fluid-phase Pinocytosis in Quiescent Fibroblasts by ras Proteins*, Science, **233**, 1061-1068 (1986).
44. LINSTEAD, P., JENNINGS, B., PRESCOTT, A., HAWLEY, P., WARN, R. ve GIBSON, I., *Scanningelectron microscopy and the transformed phenotype*, Micron and Microscopica Acta, **19** (3), 155-162 (1988).
45. ZEYTİNOĞLU, H., GIBSON, I. ve ZEYTİNOĞLU, M. *Microscopic Analysis of a Cell Line Which Switches Between the Differentiated and the Transformed Phenotype*, Micron., **24** (3), 265-272 (1993).
46. WAKELAM, M.J.O., DAVIES, S.A., HOUSLAY, M.D., MCKAY, I., MARSHALL, C.J. ve HALL, A., *Normal p21N-ras couples bombesin and other growth factor reseptors to inositol phosphate production*, Nature, **323**, 173-176 (1986).

47. ZEYTINOĞLU, H., GRIFFITTIS, S.L., DAWSON, A.P. ve GIBSON, I. *the Effects of N-ras Oncogene Expression on PDGF –BB Stimulated Responses in Cultured Mouse Myoblasts*, Cellular Signaling, **7** (3), 23-246 (1995).
48. GODWIN, A.K. ve LIEBERMAN, M.W., *Early and late responses to induction of rasT24 expression in Rat-1 cells*, Oncogene, **5**, 1231-1241 (1990).
49. SISTONEN, L., HÖLTTA, E., MAKELA, T.P., KESKI-OJA, J. ve ALITOLA, K., *The cellular response to induction of p21 v-Ha-ras oncoprotein includes stimulation of jun gene expression*, The EMBO J., **8** (3), 815-822 (1989).
50. OLSON, E.N.; SPIZZ, G. ve TAINSKY, M.A., *The oncogenic forms of N-ras or H-ras prevent skeletal myblast differentiation*, Molecular and Cellular Biol., **7**, 2104-2111 (1987).
51. VAIDYA, T.B., WEYMAN, M.C., TEEGARCLEN, D., ASHENDEL, L.C. ve TAPAROWSKY, E.J., *Inhibition of Myogenesis by the H-ras Oncogene: Implication of a Role for Protein Kinase C*, the Cell. Biol., **114**, 809-820 (1991).
52. BAR-SAGI, D ve FERKICO, J.R. *Microinjection of the Ras Oncogene protein into PC12 Cells Induces Morphological differentiation*, Cell, **42**, 841-48 (1985).
53. SPANDIDOS, A. ve WILKIE, N.M., *The normal human H-ras1 gene can act as an onco-suppressor*, Br. J. Cancer, **58**, 67-71 (1988)
54. GILLE, H. ve DOWNWARD, J., *Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression*, J. Biol. Chem., **145**, 1461-1469, (1999)
55. OKTAY, M., WARY, K.K., DANS, M., BIRGE, R.B. ve GIANCOTTI, F.G., *Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle*, J Cell. Biol, **145**, 1461-1469 (1999)



56. CLARK, E.A. ve HYNES, R.O., *Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and cytosolic phospholipase A2 but not for cytoskeletal organization*, J. Biol. Chem., **271**, 14814-14818 (1996).
57. HOWE, A.K. ve JULIANO, R.L., *Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase cascade*, J. Biol. Chem., **273**, 27268-27274, (1998).
58. SU, Z.Z., AUSTIN, V.N., ZIMMER, S.G. ve FISHER, P.B., *Defining the critical gene expression changes associated with expression and suppression of the tumorigenic and metastatic phenotype in Ha-ras-transformed cloned rat embryo fibroblast cells*, Oncogene, **8**, 1211-1219 (1993).
59. ZABRENETZKY, V., HARRIS, C.C., STEEG, P.S. ve ROBERTS, D.D., *Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines*, Int. J. Cancer, **59**, 191-195 (1994).
60. RAK, J., MITSUHASHI, Y., BAYKO, L., FILMUS, J., SHIRASAWA, S. ve SAZAZUKI, T., *Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis*, Cancer Res., **55**, 4575-4580 (1995).
61. BENCHIMOL, S., LAMP, P., CRAWFORD, L.V., SHEER, D., SHOWS, T.B. ve BRUNS, G.A.P., *Transformation Associated p53 Protein is Encoded by a Gene on Human Chromosome 17*, Somatic Cell Mol. Genet., **11**, 505-12 (1985).
62. SOUSSI, T., CARON DE FROMENTEL, C. ve MAY, P., *Structural Aspects of the p53 Protein in Relation to Gene Evolution*, Oncogene, **5**, 945-53 (1990).
63. MATLASHEWSKI, G., LAW, P., TEM, D., PEACOCK, J., CRAWFORD, L. ve BENCHIMOL, S., *Isolation and Characterization of the Human p53 cDNA Clone: Expression of the Human Gene*, EMBO J., **3**, 3257-63 (1989).

64. RIGAUDY, P. ve ECKHART, W., *Nucleotid Sequence of cDNA Encoding the Monkey Cellular Phosphoprotein p53*, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 8375-82 (1989).
65. CARO DE FROMENTEL, C., PAKDEL, F., CHAPUS, A., BANEY, C., MAY, P. ve SOUSSI, T., *Rainbow Trout p53: cDNA Clonning and Biochemical Characterization*, *Gene*, **112**, 241-49 (1992).
66. MILNE, D.M., CAMPELL, D.G., CAUDWELL, F.B. ve MEEK, D.W., *Phosphorylation of the Tumour Suppressor Protein p53 by Mitogen-Activated Protein Kinases*, *J. Biol.Chem.*, **269**, 9253-65 (1994).
67. TACK, L.C. ve WRIGHT, J.H., *Altered Phosphorylation of free and Bound Forms of Monkey p53 and Simian Virus 40 Large T Antigen During Lytic Infection*, *J. Virol.*, **66**, 1312-20 (1992).
68. KERN, S.E., KINZLER, K.W., BRUSKIN, A., JAROSZ, D., FRIEDMAN, P. ve PRIVES, C., *Idendification of p53 as A Sequence-specific DNA-binding Protein*, *Science*, **252**, 1708-53 (1992).
69. MALKIN, D., LI, F.P., STRONG, L.C., FRAUMENI, J.F., NELSON, C.E. ve KIM, D.H., *Germ-line p53 Mutation in Familial Syndrome of Breast Cancer, Sarcoma and Other Neoplasms*, *Science*, **250**, 1233-38 (1990).
70. KEMP, C.J., DONEHOVWER, L., BRADLEY, A., ve BALMAIN, A., *Reduction of p53 Dosage does not Increase Initiation or Promotion but enhances Malignant Progression of Chemically Induced Skin Tumours*, *Cell*, **74**, 813-21 (1993).
71. PETERS, G. ve VOUSDEN, K.H., *Oncogenes and Tumour Supressors*, p.87-107, Oxford University Press, 1997.
72. HOLTZER, H., BIEHL, J., YEOH, G., MEGANATHAN, R. ve KAZI, A., *Effect of Oncogenic Virus on Muscle Differentiation*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4051-4055 (1975).

73. MALKIN, D., JOLLY, K.W., BARBIER, N., LOOK, A.T., FRIEND, S.H., ve GEBHARDT, M.C., *Germline Mutations of the p53 Tumour Suppressor Gene in Children and Young Adults with Second Malignant Neoplasms*, N. Engl. J. Med., **326**, 1309-1315 (1992).
74. SRIVASTA, S., ZON, Z., PIROLLO, K., BLATTNER, W. ve CHANG, E.H., *Germline Transmission of a Mutated p53 Gene in a Cancer-prone Family with Li-fraumeni Syndrome*, Nature, **348**, 747-49 (1990).
75. MASUDA, H., MILLER, C., KOEFFLER, H.P., BATTIFORA, H., ve CLINE, M.J., *Rearrangements of the p53 Gene in Human Osteogenic Sarcomas*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 7716-22 (1987).
76. MILLER, C.W., ASLO, A., TSAY, C., SLAMON, D., ISHIZAKI, K. ve TOGUCHIDA, Y., *Frequency and Structure of p53 Rearrangements in Human Osteosarcomas*, Cancer Res, **50**, 7950-57 (1990).
77. AHUJA, H., BAR-ELI, M., ARLILN, Z., ADVANI, S., ALLANN, S.L. ve GOLDMAN, J., *Alterations in the p53 Gen and the Clonal Evolution of the Blast Crisis of Choronic Myelocytic Leukaemia*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 6783-90 (1989).
78. LANE, D.P. ve BENCHIMOL, S., *P53: Oncogene or Anti-oncogene?*, Genes Dev., **4**, 1-8 (1990).
79. OREN, M., *Regulation of the Tumour Suppressor Protein*, J. Biol. Chem., **274** (51), 36031-36034 (1999).
80. CHEN, P-L., CHEN, Y., BOOKSTEIN, R. ve LEE, W.-H., *Genetic Mechanisms of Tumour Suppression by the Human p53 Gene*, Science, **250**, 1576-78 (1990).
81. DILLER, L., KASSEL, J., CAMILLE, E.N., GRYKA, M.A., LITWAK, G. ve GEBHARDT, M., *p53 Functions as A Cell Cycle Control Protein in Osteosarcomas*, Mol. Cell. Biol., **10**, 5772-79 (1990).

82. MARTINEZ, J., GEORGOFF, I. ve LEVINE, A.J., *Cellular Localisation and Cell Cycle Regulation by A Temperature-sensitive p53 Protein*, *Genes Dev.*, **5**, 151-57 (1991).
83. SHAULSKY, G., GOLDFINGER, N., PELED, A. ve ROTTER, V., *Involvement of Wild-type p53 in Pre-B-cell Differentiation in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8982-91 (1991).
84. DONEHOWER, L.A., HARVEY, M., SLAGLE, B.L., McARTHUR, M.J., MONTGOMERY, C.A. ve BUTEL, J.S., *Mice Deficient for p53 are Developmentally Normal but Susceptible to Spontaneous Tumours*. *Nature*, **356**, 215-17 (1992).
85. TANAKA, H., ARAKAWA, H., YAMAGUCHI, T., SHIRAISHI, K., FUKUDA, S., MATSUI, K., TAKEI, Y. ve NAKAMURA, Y., *A Ribonucleotide Reductase Gene Involved in a p53-dependent Cell-Cycle Checkpoint for DNA Damage*, *Nature*, **404**, 42-49 (2000).
86. LOZANO, G. ve ELLEDGE, S.J., *p53 Sends Nucleotids to Repair DNA*, *Nature*, **404**, 24-25 (2000).
87. ELLEDGE, S.J., *Cell Cycle Checkpoints: Preventing An Identity Crisis*, *Science*, **274**, 1664-72 (1996).
88. KASTAN, M.B., ZHAN, Q., EL-DEIRY, W.S., CARRIER, F., JACKS, T. ve WALSH, W.V., *A Mammalian Cell-Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and GDD45 is Defective in Ataxia-Telangiectasia*, *Cell*, **71**, 587-590 (1992).
89. KASTAN, M.B., ONYEKWERE, O., SIDRANSKY, D., VAGELSTEIN, B. ve CRAIG, R.W., *Participation of p53 Protein in Cellular Response to DNA Damage*, *Cancer Res.*, **51**, 6304-6310 (1991).
90. LOWE, S.W., SCHMITT, E.M., SMITH, S.W., OSBORNE, B.A. ve JACKS, T., *P53 is Required for Radiation Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes*, *Nature*, **362**, 847-850 (1993).

91. CLARKE, A.R., PURDIE, C.A., HARRISON, D.J., MORRIS, R.G., BIRD, C.C. ve HOOPER, M.L., *Thymocyte Apoptosis Induced p53-dependent and Independent Pathways*, Nature, **362**, 849-851 (1993).
92. DEBBAS, M. ve WHITE, E., *Wild Type p53 Mediates Apoptosis by E1A, Which is Inhibited by E1B*, Genes Dev., **7**, 546-552 (1993).
93. LOWE, S.W., JACKS, T., HOUSMAN, D.E. ve RULEY, H.E., *Abrogation of Oncogene-Associated Apoptosis Allows Transformation of p53-deficient Cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **91**, 2026-2032 (1994).
94. SONG, S. ve LAMBERT, P.F., *Different Response of Epidermal and Hair Follicular Cells to Radiation Correlate With Distinct Patterns of p53 and Induction*, Am. J. Pathol., **155**, 1121-1127 (1999).
95. MARCHENKO, N.D., ZAIKA, A. ve MOLL, U.M., *Death Signal-Induced Localization of p53 Protein to Mitochondria, A Potential Role in Apoptotic Signaling*, J. Biol. Chem., **275**, 16202-12 (2000).
96. MIYASHITA, T., KRAJEWSKA, M., WANG, H.G., LIN, H.K. ve LEIBERMANN, D.A., *Tumor Suppressor p53 is a Regulator of bcl-2 and Bax Gene Expression in vitro and in vivo*, Oncogene, **9**, 1799-1805 (1994).
97. CHAO, C., SAITO, S., KANG, J., ANDERSON, C.W., APPELLA, E. ve XU, Y., *p53 Transcriptional Activity is Essential for p53-dependent apoptosis Following DNA Damage*, EMBO J., **19**, 4967-4975 (2000).
98. KUERBITZ, S.J., PLUNKET, B.S., WALSH, W.V. ve KASTAN, M.B., *Wild Type p53 is A Cell-Cycle Checkpoint Determinant Following Irradiation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 749-753 (1992).

99. POCHAMPALLY, R., FOCLERA, B., CHEN, L., LU, W. ve CHEN, J., *Activation of An MDM2-specific Caspase by p53 in the Absence of Apoptosis*, J. Bio. Chem., **274**, 15271-15277 (1999).
100. LI, F.P., FRAUMENI, J.F., MULVIHILL, J., BLATTNER, W.A., DREYFUS, M.G. ve TUACKER, M.A., *A Cancer family Syndrome in Twenty Four Kindreds*, Cancer Res., **48**, 5358-62 (1988).
101. JOHNSON, P., CHUNG, S. ve BEUCHIMOL, S., *Growth Suppression of Friend Virus-Transformed Erythroleukemia Cells by p53 Protein is Accompanied by Hemoglobin Production and is Sensitive to Erythropoietin*, Moll. Cell. Biol., **13**, 1456-1461 (1993).
102. GANNON, J.V. ve LANE, D.P., *p53 and DNA Polymerase Alpha Complete for Binding to SV40T Antigen*, Nature, **329**, 456-459 (1987).
103. BRAITWAITE, A.W., STRURZBECHER, H.W., ADDISON, C., PALMER, C., RUDGE, K. ve JENKINS, J.R., *Mouse p53 Inhibits SV40 Origin-dependent DNA Replication*, Nature, **329**, 458-460 (1987).
104. DUTTA, A., RUPPERT, J.M., ASTER, J.C. ve WINCHESTER, E., *Inhibition of DNA Replication Factor RPA by p53*, Nature, **365**, 79-81 (1993).
105. WAGA, S., HANNON, G.J., BEACH, D. ve STILLMAN, B., *the p21 Inhibitor of Cyclin-dependent Kinase Controls DNA Replication by Interaction with PCNA*, Nature, **369**, 574-576 (1994).
106. PIETTE, J., NEEL, H. ve MARECHAL, V., *MDM2; Keeping p53 Under Control*, Oncogene, **15**, 1001-1010 (1997).
107. HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B. ve HARRIS, C.C., *P53 Mutations in Human Cancer*, Science, **253**, 49-53 (1991).

108. CHEN, C., OLINER, J.D., ZHAN, Q., FORNACE, A.S., VOGELSTEIN, Jr.B. ve KESTAN, M.B., *Interaction Between p53 and MDM2 in A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 2684-2688 (1994).
109. FAKHARZADEH, S.S., TRUSKO, S.P. ve GEORGE, D.L., *Tumourigenic Potential Associated with Enhanced Expression of A Gene That is Amplified in A Mouse Tumour Cell Line*, EMBO J., **10**, 1565-2569 (1991).
110. CHEN, X., FARMER, G., ZHU, H., PRYWES, R. ve PRIVES, C., *Cooperative DNA Binding of p53 with TFIID (TBP): A Possible Mechanisms for Transcriptional Activation*, Genes and Dev., **7**, 1837-1849 (1993).
111. CARRIER, F., BAE, I., SMITH, M.L. ve FORNACE, A.G.Jr. *Characterization of the GADD45 Response to Ionizing Radiation in WIL-NS Cells, a p53 Mutant Cell Line*, Mut. Res., **352**, 79-86 (1996).
112. MAXWELL, S.A., *Two-dimensional Gel Analysis of p53-mediated Changes in Protein Expression*, Anticancer Res., **14**, 2549-2556 (1994).
113. HAINES, D.S., LANDERS, J.E., ENGLE, L.J. ve GEORGE, D.L., *Physical and Functional Interaction Between Wild Type p53 and MDM2 Proteins*, Mol. Cell. Biol., **14**, 1171-1178 (1994).
114. SIGALAS, I., CALVERT, A.H., ANDERSON, J.J., NEAL, D.E. ve LUNEC, J., *Alternatively Spliced MDM2 Transcripts with Loos of p53 Binding Domain Sequences: Transforming Ability and Frequent Detection in Human Cancer*, Nature, med., **2** (8), 912-917 (1996).
115. WU, X., BAYLE, J.H., OLSON, D. ve LEVINE, A.J., *the p53-MDM2 Autoregulatory Feedback Loop*, Genes and Dev., **7**, 1126-1132 (1993).
116. JUVEN, T., BARAK, Y., ZAUBERMAN, A., GEORGE, D.L. ve OREN, M., *Wild Type p53 can Mediate Sequence-specific Transactivation of An Internal Promotor Within the MDM2 Gene*, Oncogene, **8**, 3411-3416 (1993).

117. BARAK, Y., COTTELIB, E., JUVEN, G.T. ve OREN, M., *Regulation of MDM2 Expression by p53: Alternative Promoters Produce Transcripts with Nonidentical Translation Potential*, *Genes and Dev.*, **8**, 1739-1749 (1994).
118. LENG, P., BROWN, D.R., DEB, S. ve DEB, S.P., *Human Oncoprotein MDM2 Interacts with the TATA-binding Protein in vitro and in vivo*, *Int. J. Oncology*, **6**, 251-259 (1995).
119. BAE, I. SMITH, M.L. ve FORNACE, A.G.Jr. *Induction of p53-MDM2 and p21<sup>CIP/WAF1</sup> Like Molecules in Insect Cells by DNA Damaging Agents*, *Exp. Cell Res.*, **217**, 541-45 (1995).
120. OLINER, J.D., PIETENPOL, J.A., THIAGALINGAM, S., GYURIS, J., KINGLER, K.W. ve VOGELSTEIN, B., *MDM2 Oncoprotein Conceals the Activation Domain of Tumour Suppressor p53*, *Nature*, **362**, 857-860 (1993).
121. DAZARD, J.E., PIETTE, J., BASSET-SEQUIN, N., BLANCHARD, J.M. ve GANDARILLAS, A. *Switch from p53 to MDM2 as Differentiating Human Keratinocytes. Loss Their Proliferative Potential and Increase in Cellular Size*, *Oncogene*, **19**, 3693-705 (2000).
122. CHEN, J., WU, X., LIN, J. ve LEVINE, A.J., *MDM2 Inhibits the G1 Arrest and Apoptosis Functions of the p53 Tumour Suppressor Protein*, *Mol. Cell. Biol.*, **16** (5), 2445-2452 (1996).
123. MONTES DE OCA LUNA, R., WANGER, D.S. ve LOZANO, G. *Rescue of early embryonic Lethality in MDM2 Deficient Mice by Deletion of p53*, *Nature*, **378**, 203-6 (1995).
124. WADGAONKAR, R. ve COLLINS, T., *Murine Double Minute (MDM2) Blocks p53-coactivator Interaction, A New Mechanism for Inhibition of p53 Dependent Gene Expression*, *J. Bio. Chem.*, **274**, 13760-13767 (1999).



125. HAUPT, Y., MAYA, R., KAZAZ, A. ve OREN, M. *MDM2 Promotes the Rapid Degradation of p53*, *Nature*, **387**, 296-99 (1997).
126. HONDA, R. ve YASUDA, H., *Association of p19<sup>ARF</sup> with MDM2 Inhibits Ubiquitin Ligase Activity of MDM2 for Tumour Suppressor p53*, *EMBO J.*, **18**, 22-27 (1999).
127. SAKAGUCHI, K., SAITO, Si., HIGASHIMOTO, Y., ROY, S., ANDERSON, C.W. ve APELLA, E., *Damage-mediated Phosphorylation of Human p53 Threonine 18 A Cascade Mediated by A casein 1-like Kinase Effect on MDM2 Binding*, *J. Biol. Chem.*, **275** (13), 9278-9283 (2000).
128. ANDERSON, C.W. ve LEES-MILLER, S.P. *the Nuclear Serine/Threonine Protein Kinase DNA-PK*, *Crit. Rev. Eucar. Gene. Exp.*, **2**, 283-314 (1992).
129. KONDO, S., BARNETT, G.H., HARA, H., MORIMORA, T. ve TAKENCHI, J. *Mdm2 Protein Confers the Resistance of a Human Glioblastoma Cell Line to Cisplatin-Induced Apoptosis*, *Oncogene*, **10**, 2001-6 (1995).
130. LEACH, F.S., TOKINO, T., MELTZER, P., BURNELL, M., OLINER, J.D., SMITH, S., HILL, D.E., SIDRANSKY, D., KINZLER, K.W., ve VOGELSTEIN, B., *P53 Mutations and MDM2 Amplification in Human Soft Tissue Sarcomas*, *Cancer Res.*, **53**, 2231-2234 (1993).
131. MARCHETTI, A., BUTTITTA, F., PELLEGRINI, S., MERLO, G., CHELLA, A., ANGELETTI, C.A. ve DEVILACQUA, G. *MDM2 Gene Amplification and Overexpression in Non-Small Lung Cell Carcinomas with Accumulation of the p53 Protein in the Absence of p53 Gene Mutations*, *Diagn. Mol. Path.*, **4**, 93-7 (1995).
132. OLINER, J.D., KINZLER, K.W., MELTZER, P.S., GEORGE, D.L. ve VOGELSTEIN, B., *Amplification of A Gene Encoding p53-Associated Protein in Human Sarcomas*, *Nature*, **358** (6381), 80-83 (1992).

133. LANDERS, J.E., HAINES, D.S., STRAUSS, J.F. ve GEORGE, D.L. *Enhanced Translation: A Novel Mechanism of MDM2 Oncogene Overexpression Identified in Human Tumor Cells*, *Oncogene*, **9**, 2754-50 (1994).
134. RIES, Y., *Ras Suppresses the Activity of p53 and Renders Cells Radioresistant*, *Cell*, **103**, 321-330 (2000).
135. GROTH, A., WEBER, J.D., WILLIAMSEN, B.M., SHERR, C.B. ve ROUSSEL, M.F., *Oncogenic ras Induces p19<sup>ARF</sup> and Growth Arrest in Mouse Embryo Fibroblasts Lacking p21<sup>cip</sup> and p27<sup>kip1</sup> Without Activating Cyclin-D-dependent Kinases*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 27473-80 (2000).
136. MARTIN, K., TROUCHE, D., HAGEMEIRE, C., SORENSEN, T.S., La THANQUE, N.B. ve KOUZARIDES, T. *Stimulation of E2F1/DP1 Transcriptional Activity by MDM2 Oncoprotein*, *Nature*, **375**, 691-4 (1995).
137. XIAO, Z.-X., CHEN, J., LEVINE, A.J., MODJTAHEDI, N., XING, J., SELLER, W.R. ve LIVINGSTONE, D.M. *Interaction Between the Retinoblastoma Protein and Oncoprotein MDM2*, *Nature*, **375**, 694-98 (1995).
138. FLORENES, V.A., MAELANDSMO, G.M., FORUS, A., ANDREASSEN, A., MYKLEBOST, O., FODSTAD, O. ve FLERNES, V.A., *MDM2 Gene Amplification and Transcript Levels in Human Sarcomas: Relationship to TP53 Gene Status*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **86** (17), 1297-1302 (1994).
139. CARDON-CARDO, C., LATERS, E., DROBNJAK, M., OLIVA, M.R., POLLACK, D., WOODRUFF, J.M., MARECHAL, V., CHEN, J., BRENNAN, M.F. ve LEVINE, A.J., *Molecular Abnormalities of MDM2 and p53 Genes in Adult Soft Tissue Sarcomas*, *Cancer Res.*, **54** (3), 794-799 (1994).
140. MARKS, D.I., VONDERHEID, E.C., KURZ, B.W., BIGLER, R.D., SINHA, K., MORGAN, D.A., SUKMAN, A., HOWELL, P.C. ve HAINES, D.S., *Analysis of p53 and MDM2 Expression in 18 Patients with Sezary Syndrome*, *Br.J. Haematol.*, **92** (4), 890-899 (1996).

141. DUBS-POTERSZMAN, M.C., TOCQUE, B. ve WASYLYK, B. *MDM2 Transformation in the Absence of p53 and Abrogation of the p107 G1 Cell Cycle Arrest*, *Oncogene*, **11**, 2445-9 (1995).
142. FINALY, C.A., *The MDM2 Oncogene can Overcome Wild-type p53 Suppression of Transformed Cell Growth*, *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 301-306 (1993).
143. LUNDGREN, K., MONTES DE OCAJUNA, R., McNEILL, Y.B., EMERICK, E.P., SPENCER, B., BARFIELD, C.R., LOZANO, G., ROSENBERG, M.P. ve FINALY, C.A., *Targeted Expression of MDM2 Uncouples S Phase from Mitosis and Inhibits Mammary Gland Development Independent of p53*, *Genes and Develo.*, **11**, 714-725 (1997).
144. STEITZ, J.A., BERG, C., HENDRICK, J.B., La BRANCHE-CHABOT, H., METSPALU, A., RINKE, J. ve YARIO, T. *A 5SrRNA/L5 Complex is A Precursor to Ribosome assembly in Mammalian Cells*, *J. Cell Biol.*, **106**, 545-56 (1988).
145. MURDOCH, K.J. ve ALLISON, L.A. *A Role for Ribosomal Protein L5 in the Nuclear Import of 5SrRNA in Xinopus Oocytes*, *Exp. Cell Res.*, **227**, 332-43 (1996).
146. FIDDLER, T.A., SMITH, L., TAPSCOTT, S.J. ve THAYER, M.J. *Amplification of MDM2 Inhibits MyoD-Mediated Myogenesis*, *Mol. Cell Biol.*, **16**, 5048-57 (1996).
147. JACKSON, M.W. ve BERBERICH, S.J., *MDMX Protects p53 from MDM2-mediated Degradation*, *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1001-1007 (2000).
148. ALKHLAF, M., GANGULI, G., MESSADEG, N., LeMEUR, M. ve WASYLYK, B. *MDM2 Overexpression generates a Skin Phenotype In Both Wild Type and p53 Null Mice*, *Oncogene*, **18**, 1419-1434 (1999).
149. WEINBERG, W.C., AZZOLI, C.G., CHAPMAN, K., LEVINE, A.J. ve YASUPA, S.H. *p53-Mediated transcriptional Activity Increase in Differentiating Epidermal Keratinocytes in Association with Decreased p53 protein*, *Oncogene*, **10**, 2271-2279 (1995).

150. BALTIMORE, G.C. *Staining procedures*, William & Wilkins, 4<sup>th</sup> ed. (1981).
151. CARMELA, P. M., SHAWN, E. F., MICHEL, O., KIRAN, J. K., YING, Y., KATHLEEN, S. W., MICHAEL, A. W., WOODRING, E. W. ve JERRY, W. S., *Absence of Cancer-Associated Changes in Human Fibroblasts Immortalised with Telomerase*, *Nature Genetics*, **21**, 115-118 (1999).
152. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. ve MANIATIS, T., *Molecular Cloning*, Second Edi. Cold Harbor Lab. Press, (1998).
153. DUNBER, B.S. *Protein Blotting A Practical Approach*, Oxford University Press, (1994).
154. CHENG, M., BOULTON, G.T. ve COBB, M.H., *ERK3 is A Constitutively Nuclear Protein Kinase*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 8951-8958 (1996).
155. SEMMES, O.J., BARRETT, J.F., DANG, Chi., V. ve JEANG, K.T., *Human T-cell Leukemia Virus Type I Tax Masks c-myc Function Through A cAMP-dependent Pathway*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 9730-38 (1996).
156. GARBISA, S., POZZATTI, R., MUSCEHEL, J. R., SAFFIOTTI, U., BALLIN, M., GOLDFARB, H. R., KHOURY, G. ve LIOTTA, A. L., *Secretion of Type IV collagenolytic Protease and Metastatic Phenotype: Induction by Transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad 2-E 1A*, *Cancer Research*, **47**, 1523-1528 (1987).
157. WANG, S. ve SHI, X., *Mechanisms of Cr(VI)-Induced p53 Activation: The role of Phosphorilation, mdm2 and ERK*, *Carcinogenesis*, **22**, 5, 757-762 (2001).
158. PALMERO, I., PANTOJA, C. ve SERRANO, M., *p19<sup>arf</sup> Links the Tumour Suppressor p53 to Ras*, *Nature*, **395**, 125-126 (1998).
159. CHAO, C., SAITO, S., KANG, J., ANDERSON, W. C., APPELLA, E. ve XU, Y., *p53 Transcriptional Activity is Essential for p53-dependent Apoptosis Following DNA Damage*, *The EMBO J.*, **19**, 18, 4967-4975 (2000).

160. TANAKA, H., ARAKAWA, H., YAMAGUCHI, T., SHIRAISHI, K., FUKUDA, S., MATSUI, K., TAKEI, Y. ve NAKANURA, Y., *A Ribonucleotide Reductase Gene Involved in a p53-dependent Cell Cycle Checkpoint for DNA Damage*, *Nature*, **404**, (2000).
161. LAFFON, B., PASSARO, E. ve MENDEZ, J., *Effectes of Styrene-7,8-oxide Over p53, p21, bcl-2 and bax Expression in Human Lymphocyte Cultures*, *Mutagenesis*, **16**, 3, 243, (2001).
162. OLINER, D. J., PIETENPOL, A. J., THIAGALINGAM, S., GYURIS, J., KINZER, W. K. ve VOGELSTEIN, B., *Oncoprotein MDM2 Conceals the Activation Domain of Tumour Supressor p53*, *Nature*, **362**, (1993).