

**N-ras ve H-ras ONKOGENLERİNİN
p53 ve MDM2 PROTEİNLERİNİN
SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
DNA HASARLI KÜLTÜR
HÜCRELERİNDE ARASTIRILMASI**

Emel ERGEN
Doktora Tezi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ocak 2005

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
desteklenmiştir.**

Proje No: 101074

JÜRI VE ENSTITÜ ONAYI

Emel Ergene' nin "N-ras ve H-ras onkogenlerinin p53 ve mdm2 proteinlerinin sentezi üzerine etkilerinin DNA hasarlı kültür hücrelerinde araştırılması" başlıklı Biyoloji Ana Bilim Dalındaki Doktora tezi 14.01.2005 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adi soyadı	İmza
Üye (Tez danışmanı)	: Yard. Doç. Dr. Hülya SIVAS
Üye	: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA
Üye	: Yard. Doç. Dr. Berrin AYZAZ TÜYLÜ
Üye	: Yard. Doç. Dr. Zerrin İNCESU
Üye	: Yard. Doç. Dr. Asuman DEMİROGLU

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Yönetim Kurulu'nun
..... Tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Altug İFTAR

Hayatim boyunca; sevgi, ilgi ve desteklerini hep hissettiğim sevgili anneme, babama ve kardeşlerim Dilek ve Emre'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım....

ÖZET**Doktora Tezi****N-ras ve H-ras ONKOGENLERİNİN p53 ve MDM 2 PROTEİNLERİNİN
SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DNA HASARLI KÜLTÜR
HÜCRELERİNDE ARASTIRILMASI****EMEL ERGENE****Anadolu Üniversitesi****Fen Bilimleri Enstitüsü****Biyoloji Anabilim Dalı****Danisman: Yard. Doç. Dr. HÜLYA SIVAS****2005, 142 sayfa**

Bu çalışmada; *ras* transform hücrelerin DNA'larına, apoptosisi uyarmak için UV isigi ile hasar verilerek, hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan p53 ve onun regülatörü MDM2 proteinlerinin ekspresyonu ve apoptosise üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmalarda kullanılmak üzere, H-*ras* aktif 5RP7 fibroblastları ve insan N-*ras* aktif CO25 miyoblastları seçilmiştir. UV isiginin farklı dozlarına maruz bırakıldıktan sonra hücre çekirdeklerinde ve morfolojisinde meydana getirdiği apoptotik değişimler AO/EB boyama yöntemi ile belirlenmiş ve DNA'larında meydana gelen fragmentasyonlar tespit edilmiştir. p53 ve MDM2 proteinlerinin ekspresyonlarını ve hücre içindeki lokalizasyonlarını belirlemek için, FITC işaretli özgül antikolar ve Dapi çift işaretleme yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak; H-*ras* transformasyonu; fibroblast hücrelerinde p53'ün MDM2 tarafından parçalanmasıyla, UV ile uyarılan apoptosise karşı dayanıklılığı arttırırken; N-*ras* transformasyonunun, miyoblast hücrelerde p53'e bağlı apoptotik yolu uyardığı ve apoptosise duyarlı hale getirdiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler : Apoptosis, Onkogen, N-ras, H-ras, p53, MDM2

ABSTRACT**PhD Thesis****INVESTIGATION OF EFFECTS OF N-*ras* AND H-*ras* ONCOGENES ON
SYNTHESIS OF p53 AND MDM2 PROTEINS IN DNA-DAMAGED CELL
LINES****EMEL ERGENE****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Assist. Prof. Dr. HULYA SIVAS
2005, 142 pages**

In this study, effects on N-*ras* and H-*ras* oncogenes on the synthesis of p53, p19 and MDM2 proteins in cell lines, DNA damaged by UV, were investigated. For this purpose, H-*ras* active 5RP7 fibroblast and human N-*ras* active CO25 myoblast were selected. Apoptotic changes on cell nuclei and morphology, after different UV dose treatment, were determined by AO/EB staining procedure. DNA fragmentation were detected. FITC-specific antibodies and Dapi staining procedures were used to determine p53 and MDM2 protein expressions and their localization. As a result, H-*ras* transformation in fibroblast, UV induced apoptosis resistance increased by p53 degradation by MDM2. N-*ras* transformation in myoblast, UV induced apoptosis sensitivity increased by apoptotic way dependent on p53.

Keywords: Apoptosis, Oncogen, N-*ras*, H-*ras*, p53, MDM2

TESEKKÜR

Tez çalışmalarımı yürütmem için fakülte ve bölüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan hocalarım sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA ve sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a, tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylasan ve destek olan danisman hocam sayın Yard. Doç. Dr. Hülya SIVAS'a tesekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım sayın Yard. Doç. Dr. A.Tansu KOPARAL, Yard. Doç. Dr. Berin AYZAZ TÜYLÜ, Yard. Doç. Dr. Asuman DEMIROGLU (Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve Yard. Doç. Dr. Zerrin INCESU (Eczacılık Fakültesi)'ya ve deney sonuçlarının yorumlanmasında fikirlerine danistığım sayın Öğr. Gör. Esra ERDAL (9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı)'a tesekkür ederim.

Her konuda ilgi ve desteklerini hissettığım sevgili arkadaşlarım Yard. Doç.Dr. Filiz SUSUZ ve Yard. Doç. Dr. Nalan YILMAZ'a, Aras. Gör. Volkan KILIÇ ve Aras. Gör. Gözde AYDOGAN'a, deney hazırlıklarım sırasında özveri ve sabırla yardımlarını benden esirgemeyen arkadaşlarım Uzm. Biyolog Hülya TASKIN, Uzm. Biyolog Erdogan ÇAKIR ve Tkn. Mustafa KARAKAS'a ve emegi geçen bütün arkadaşlarıma sonsuz tesekkürlerimi sunuyorum.

101074 no'lu proje ile doktora çalışmamı destekleyen Anadolu Üniversitesi Arastırma Fonu'na ve vergi veren Türk Halkı'na tesekkürlerimi sunuyorum.

Emel ERGENE

Ocak 2005

İÇİNDEKILER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TESEKKÜR	iii
İÇİNDEKILER	iv
ÇİZELGELER DIZINI	vii
SEKİLLER DIZINI	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DIZINI	xi
1.GİRİS	1
1.1. Hücre döngüsünün kontrol noktaları.....	2
1.2. Kanser Neden Olan Ajanlar.....	4
1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Kanserojenler.....	4
1.2.2. Virüsler.....	6
1.3. Kanser Neden Olan Mekanizmalar	6
1.3.1. DNA tamir mekanizmasının bozulması.....	7
1.3.2. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu	7
1.3.3. Büyüme faktörleri ve reseptörleri ile ilgili değişiklikler.....	8
1.3.4. Apoptosis mekanizmasında bozukluklar.....	8
1.4. Onkogenler.....	9
1.4.1.Onkogenlerin Fonksiyonları.....	9
1.4.2.Onkogenlerin Aktivasyonu.....	11
1.5. Tümör Baskılayıcı Genler.....	13
1.6. Ras Geni ve Kanser Olusumundaki Rolü.....	15
1.6.1. <i>ras</i> geni ve ürünü p21 ^{ras}	15
1.6.2. p21 ^{ras} proteininin aktivasyon mekanizması.....	17
1.6.3. p21 ^{ras} fonksiyonları.....	19
1.6.3.1. Hücre çoğalması ve farklılaşmasında fonksiyonu.....	19
1.6.3.2. Hücre döngüsünün kontrolünde fonksiyonu.....	20

1.6.3.3. Angiogenesis'de fonksiyonu.....	20
1.6.4. Ras'in efektörleri.....	21
1.7. <i>p53</i> geni ve Kanser Olusumunda Rolü.....	23
1.7.1. <i>p53</i> geni ve ürünü.....	23
1.7.2. <i>p53</i> ve hücre döngüsünün kontrolü.....	26
1.8. <i>MDM2</i> Geni ve Kanser Olusumundaki Rolü.....	27
1.8.1. <i>MDM2</i> geni ve ürünü.....	27
1.8.2. <i>MDM2</i> - <i>p53</i> kontrol mekanizması.....	28
1.9. Apoptosis ve Temel Fonksiyonlari.....	32
1.9.1. Apoptosisde görülen morfolojik özellikler ve nekrozisden farki.....	33
1.9.2. Apoptosis mediatörleri.....	34
1.9.3. Apoptosisin uyarılması.....	35
1.9.4. Bcl-2 ailesi ve mitokondri üzerindeki etkileri.....	36
1.10. Miyoblast Hücre Sistemi.....	37
1.11. Fibroblast Hücre Sistemi.....	38
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
2.1. Materyal.....	41
2.1.1. Antikorlar.....	41
2.1.2. Kimyasal maddeler.....	41
2.1.3. Cihaz ve diger malzemeler.....	42
2.1.4. Deneyde kullanılan solüsyonların içerikleri ve hazırlanmaları.....	42
2.2. Yöntem.....	47
2.2.1. Hücre kültürü.....	47
2.2.2. Tripan mavisi ile canlı hücrelerin belirlenmesi.....	47
2.2.3. UV ışığı uygulaması.....	48
2.2.4. Akridin orange / etidyum bromid boyama ile apoptosis analizi.....	48
2.2.4. DNA fragmentasyonunun agaroz jel elektroforezi ile analizi	49
2.2.5. İmmünofloresan boyama ile hücre içindeki <i>p53</i> ve <i>MDM2</i> proteinlerinin tespiti.....	51

3. BULGULAR.....	53
3.1. Apoptotik Hücrelerin Acridine Orange/Ethidium Bromide Boyama Yöntemi ile Belirlenmesi.....	53
3.1.1. Fibroblastlarda apoptotik hücreler.....	53
3.1.2. Miyoblastlarda apoptotik hücreler.....	62
3.2. DNA fragmentasyonu' nun belirlenmesi.....	74
3.3. p53 ve MDM2 Proteinlerinin Immüno Floresan Boyama Yöntemi ile Tespiti.....	78
3.3.1. F2408 ve 5RP7 fibroblastlarında UV-uyarılmasından sonra p53 ve MDM2 proteinlerinin ekspresyonu.....	78
3.3.2. CO25 (Dex-) ve CO25 (Dex+) miyoblastlarında UV-uyarılmasından sonra p53 ve MDM2 proteinlerinin ekspresyonu.....	94
4. TARTISMA VE SONUÇ.....	110
4.1. Fibroblastlarda UV'nin Apoptotik Etkileri.....	112
4.2. Miyoblast Hücrelerde UV'nin Apoptotik Etkileri.....	114
4.3. DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi.....	117
4.4. Immüno floresan yöntemi ile p53 ve MDM2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının belirlenmesi.....	119
4.4.1. p53 Proteininin ekspresyonu ve lokalizasyonu.....	119
4.4.2. MDM2 proteininin ekspresyonu ve lokalizasyonu.....	121
KAYNAKLAR.....	125

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Tümör baskılayıcı genler.....	13
1.2. İnsan tümörlerinde temel <i>ras</i> mutasyonları.....	16
4.1. Fibroblast ve miyoblastlarda UV'nin etkisi sonucu AO/EB boyaması ve DNA agaroz jel yöntemleriyle elde edilen bulguların özeti.....	112
4.2. Fibroblast ve miyoblastlarda UV'nin p53 ekspresyonu üzerine etkisi özetlenmiştir.....	120
4.3. Fibroblast ve miyoblastlarda UV'nin MDM2 ekspresyonu üzerine etkisi özetlenmiştir.....	121

SEKILLER DIZINI

1.1.	Hücre döngüsünün farklı evrelerinde, çeşitli siklinler ve siklin bağımlı kinazlar arasındaki ilişki.....	4
1.2.	Ras proteinlerinin aktivasyon döngüsü	18
1.3.	Ras proteinlerinin efektörleri.....	22
1.4.	Apoptosis kontrolünde önemli Ras –sinyal yolları.....	23
3.1.	F2408 hücrelerinin normal koşullarda 24, 48 saat inkübasyonundan sonra AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta elde edilmiş görüntüleri.....	55
3.2.	UV uygulamasının F2408 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkisi (24 saat).....	56
3.3.	UV uygulamasının F2408 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkisi (48 saat).....	57
3.4.	5RP7 hücrelerinin normal koşullarda 24,48 saat inkübasyonundan sonra AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta elde edilmiş görüntüleri.....	59
3.5.	UV uygulamasının 5RP7 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri (24 saat).....	60
3.6.	UV uygulamasının 5RP7 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri (48 saat).....	61
3.7.	CO25 (Dex-) hücrelerinin normal koşullarda 24,48 saat inkübasyonundan sonra AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta elde edilmiş görüntüleri.....	63
3.8.	UV uygulamasının CO25 (Dex-) hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri (24 saat).....	64
3.9.	UV uygulamasının CO25 (Dex-) hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri (48 saat).....	65
3.10.	CO25 (Dex+) hücrelerinin normal koşullarda 24,48 saat inkübasyonundan sonra AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta elde edilmiş görüntüleri.....	67
3.11.	UV uygulamasının CO25 (Dex+) hücrelerinin morfolojisi üzerine	

etkileri (24 saat).....	68
3.12. UV uygulamasinin CO25 (Dex+) hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri (48 saat).....	69
3.13. C2 hücrelerinin normal kosullarda 24,48 saat inkübasyonundan sonra AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta elde edilmiş görüntüleri.....	71
3.14. UV uygulamasinin C2 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri (24 saat).....	72
3.15. UV uygulamasinin C2 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri (48 saat).....	73
3.16. A: F2408 hücrelerinde UV ve etapositin DNA üzerine etkisi.....	75
3.16. B. Clarke ve ark. 1999'un yöntemine göre uygulanan DNA izolasyonu yönteminden elde edilen sonuçlar.....	75
3.17. 5RP7 hücrelerinde UV ve etapositin DNA üzerine etkisi.....	76
3.18. CO25 hücrelerinde UV ve etapositin DNA üzerine etkisi.....	77
3.19. F2408 hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra p53 proteininin tespiti.....	79
3.20. F2408 hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra p53 proteininin tespiti.....	80
3.21. F2408 hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra p53 proteininin tespiti.....	81
3.22. F2408 hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra MDM2 proteininin tespiti.....	83
3.23. F2408 hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra MDM2 proteininin tespiti.....	84
3.24. F2408 hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra MDM2 proteininin tespiti.....	85
3.25. 5RP7 hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra p53 proteininin tespiti.....	87
3.26. 5RP7 hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra p53 proteininin tespiti.....	88

3.27. 5RP7 hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra p53 proteininin tespiti.....	89
3.28. 5RP7 hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra MDM2 proteininin tespiti.....	91
3.29. 5RP7 hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra MDM2 proteininin tespiti.....	92
3.30. 5RP7 hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra MDM2 proteininin tespiti.....	93
3.31. CO25 (Dex-) hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra p53 proteininin tespiti.....	95
3.32. CO25 (Dex-) hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra p53 proteininin tespiti.....	96
3.33. CO25 (Dex-) hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra p53 proteininin tespiti.....	97
3.34. CO25 (Dex-) hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra MDM2 proteininin tespiti.....	99
3.35. CO25 (Dex-) hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra MDM2 proteininin tespiti.....	100
3.36. CO25 (Dex-) hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra MDM2 proteininin tespiti.....	101
3.37. CO25 (Dex+) hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra p53 proteininin tespiti.....	103
3.38. CO25 (Dex+) hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra p53 proteininin tespiti.....	104
3.39. CO25 (Dex+) hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra p53 proteininin tespiti.....	105
3.40. CO25 (Dex+) hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra MDM2 proteininin tespiti.....	107
3.41. CO25 (Dex+) hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra MDM2 proteininin tespiti.....	108
3.42. CO25 (Dex+) hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra MDM2 proteininin tespiti.....	109

SIMGELER VE KISALTMALAR DIZINI

AIF	: Apoptosis Induced Factor's
AO	: Acridine Orange
CAD	: Caspase-Activated Deoxyribonuklease
CDK	: Cyclin Dependent Kinase
CDI	: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
EB	: Ethidium Bromide
EGF	: Epidermal Growth Faktör
ERK	: Extracellular sinyal Regulated Kinase
FGF	: Fibroblast Growth Faktör
Dex	: Dexamethasone
GAP	: GTPase-activated Protein
GNEFs	: Guanin Nükleotid Exchain Faktör's
GRF	: GDP Releasing Faktör
GTP	: Guanosine Trifosfat
HPV	: Human Papilloma Virus
ICAD	: Inhibitör of Caspase-Activated Deoxyribonuklease
IRF-1	: Interferon Regulatory Faktör-1
JNK	: Jun Amino Terminal Kinase
kDa	: Kilo Dalton
MAP kinaz	: Mitogen Activated Protein Kinase
MDM2	: Murine Double Minute 2
PDGF	: Platellet Derived-Growth Faktör
Rb	: Retinoblastoma
REP	: p21 ^{ras} Exchange Protein
PI3-K	: Phospho-Inositole 3-Kinase
PIP3	: Phosphorylated Inositol 3,4,5-Triphosphat
TNFR1	: Tumor Necros Faktör Receptor
UV	: Ultra Viole

BÖLÜM I

1. GIRIS

Çok hücreli canlıların en temel özelliği, büyümesi ve çoğalması ileri düzeyde kontrol sistemine sahip vücut hücrelerine bağlı olarak, belirli yaşam sürelerine sahip olmalarıdır. Çoğalmak üzere uyarılmış bir hücre “hücre döngüsü” olarak adlandırılan bir dizi morfolojik değişikliklerin ve biyokimyasal aktivitelerin gözlemlendiği bir süreçten geçmektedir. Hücre döngüsü çekirdek bölünmesinin gerçekleştiği mitoz (M) evresi ve iki bölünme arasındaki interfaz (I) evresi olmak üzere 2 temel evreden oluşmaktadır. Bir hücrenin mitozla girmeden önceki hazırlık evresi olan interfaz fonksiyonel olarak G_1 , S ve G_2 evrelerinden geçmektedir. Bölünmeyi düzenleyici çeşitli siklinler ve siklin-bağımlı protein kinazlar gibi gerekli birçok proteinin sentezi tüm interfaz evresi boyunca gerçekleşirken yalnızca S fazında DNA replikasyonu meydana gelmektedir (Cooper 2000, Güven 1999).

Bir organizmanın yaşamı boyunca epitel hücreler ve hematopoietic kök hücreler gibi bazı hücreler sürekli bölünmektedir. Çoğalma sinyali hücreler arası büyüme faktörleri tarafından düzenlenmekte, hücre G_1 kontrol noktasını geçerek S evresine girmekte ve mitozla döngüyü tamamlamaktadır. Yeterli büyüme faktörü olmayan durumlarda ise hücre, kontrol noktasında kalarak S evresine girmeden döngüden çıkmakta ve hücre döngüsü engellenmiş olan hücreler, G_0 olarak adlandırılan sessiz bir evreye girmektedirler. G_0 hücreler, metabolik olarak aktif fakat bölünmekten vazgeçmişler ve protein sentezini azaltmışlardır. T ve B lenfositleri ile fibroblastlar gibi birçok hayvan hücresi, uygun büyüme faktörleri yada hücreler arası sinyaller tarafından çoğalmaya yönlendirilmeksizin G_0 evresinde beklemektedir. Diğer bazı hücre tipleri ise, terminal olarak farklılaşmış ve organizmanın yaşamı boyunca bölünmeyen hücrelerdir. İskelet kasi hücreleri, kalp kasi hücreleri, yağ hücreleri ve sinir hücrelerini içine alan bu grupta, özellikle dış kaynaklı uyarılara cevap olarak büyümekte ancak bölünmemektedir. Bu hücrelerin bölünüp çoğalması embriyonik dönemde olmakta ve yaşamları boyunca G_0 evresinde kalmaktadır (Reddel 2000, Stein 1999, Cooper 2000). Bazı

hücreler ise embriyonik dönemde yada gelişmiş organizmada olsun programlanmış bir şekilde ölüyorlar (apoptosis). Bütün bu mekanizmalar ile homeostatik denge sağlanır ve organizmaların normal gelişimleri için çok önemlidir. Bu mekanizmaların herhangi bir basamağında yada kontrol noktalarında meydana gelen aksama ise hücrenin sınırsız bir şekilde çoğalmasıyla yani kanser gelişimiyle sonuçlanabilmektedir. Kanserli hücreler sürekli bölünmeyi durdurma sinyallerine uymazlar. G_1 evresi hücrenin geri kalan yasantisi için seçim yaptığı evredir. Döngünün diğer evrelerinde hücre dış dünya ile iletişimini kısmis durumdadır ancak G_1 de hücre dışarıdan gelen her türlü sinyale açıktır. Normal bir hücre etrafından gelen sinyaller doğrultusunda hareket ederken, kanserli hücre bu sinyallere uymamakta ve devamlı olarak döngüde kalmaktadır (Guo ve Hay 1999, Bertram 2001).

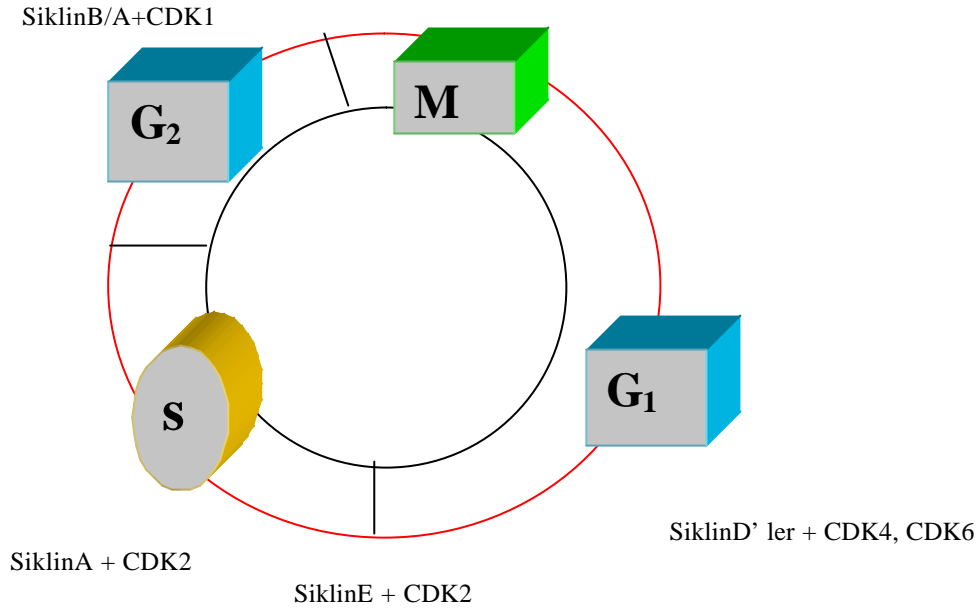
1.1. Hücre döngüsünün kontrol noktaları

Hücre döngüsünün kontrolünde etkili olan 3 ana kontrol noktasından en temel olanı, DNA replikasyonu tamamlanana kadar mitozun başlamasını engelleyen G_2 kontrol noktasıdır. Genomun tamamının eksiksiz ve hatasız bir şekilde kopyasının çıkartılması sırasında oluşabilecek hataları bulup tamir edebilmek için hücreye zaman kazandırmaktadır. Bir diğer kontrol noktası G_1 'de ise, hücre S evresine girmeden önce mevcut olan DNA hasarları tamir edilmekte ve hatalı replikasyon engellenmektedir. Üçüncü bir kontrol noktası ise M evresinde görülmektedir. Mitozun sonunda kromozomların yeniden düzenlenmesini denetlemekte ve kardeş hücrelere hatalı paylaştırılmasını önlemektedir (Cooper 2000). G_1 döngünün süresi bakımından en fazla değişkenlik gösteren ve döngünün en belirleyici evresidir. Bu evrede hücre; bölünmek, farklılaşmak yada ölmek için karar vermektedir. Hücreyi bölünmeye sevk eden sinyaller, çok sayıda hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinlerden oluşmaktadır (Cooper 2000, Karp 1999). Bu moleküller reseptörleri aracılığıyla ya direkt olarak transkripsiyonu başlatmakta veya hücre döngüsünü kontrol eden proteinlerin aktivasyonlarını sağlayan bir selüleyi tetikleyerek transkripsiyonu başlatabilmektedir (Stein ve ark. 1999).

Hücre döngüsü, siklin adı verilen proteinler, siklin-bağımlı protein kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı protein kinaz inhibitörler (CDI) tarafından kontrol edilmektedir (Şekil 1.1). Ortamda bir mitojen bulunduğunda cevap olarak siklin D sentezlenir, mitojen ortadan kalktığında ise hızla parçalanır. G₁ evresi aktiviteleri, D tipi siklinler (D₁, D₂ ve D₃) ile birleşen CDK4 ve CDK6 tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu CDK'ların substralları arasında, DNA replikasyonu için gerekli genlerin aktivasyonunu sağlayan transkripsiyon faktörleri vardır. Siklin E, G₁/S evrelerinin sınırında sentezlenmekte, replikasyona başlamak için gerekli olan Siklin E ile CDK2 birleştiğinde, hücre S evresine geçmekte ve S evresinde siklin E parçalanmaktadır. G₂'den M'ye geçiş ise, siklinA-CDK1 ve siklinB-CDK1 komplekslerinin aktiviteleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu kompleks, hücre iskelet proteinlerinin, histon ve çekirdek etrafını saran proteinlerin fosforilasyonuna sebep olmaktadır. Siklin A, S boyunca sentezlenir ve anafaz başında yıkılırken siklin B1 ise S'in sonunda sentezlenmeye başlayarak G₂/M evresinde en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Siklin B'nin parçalanması, CDK1'in inaktif olmasında anahtar rolü oynamaktadır. Böylece, döngünün mitozu tamamlayıp G₁'e geri dönmesini engellenmektedir. CDK; sentezlendiğinde inaktiftir, ancak siklin ile birleştiğinde aktifleşerek siklin-CDK bileşenini oluşturmakta ve aktif CDK da substratları fosforilayarak aktive etmektedir. Aktive olan substrat, hücre döngüsünü ya durdurarak ya da bir sonraki aşamaya geçirecek şekilde düzenlemektedir. Aktive kazanmış CDK; CDI'nin sikline, siklin-CDK kompleksine veya kendisine bağlanması sonucunda inaktif hale dönüşmektedir (Karp 1999, Moroy ve Geiser 2004, Cooper 2000, Yang ve ark. 1998).

İnsan kanserlerinin tamamına yakınında gözlenen bozukluklar, G₁ evresinin ilerlemesini doğrudan ya da dolaylı olarak düzenleyen genler üzerinde meydana gelmektedir. Siklin miktarında ve işlevinde sürekli bir artış gözlenirken, CDI miktarı ve işlevi ya azalmakta ya da tamamen ortadan kalkmaktadır. Buradan da anlaşıldığı gibi, siklin proteinleri veya CDI proteinlerini kodlayan genlerde meydana gelen bozukluklar kansere neden olmaktadır. Siklin genlerindeki bozukluklar sonucunda protein asiri miktarda ya da daha etkin bir şekilde sentezlenirken, CDI proteinini kodlayan gen bozuklukları (gen delesyonu),

proteinin ya hiç sentezlenmemesine ya da inaktif protein sentezine yol açmaktadır (Öztürk 1997).



Sekil 1.1. Hücre döngüsünün farklı evrelerinde, çeşitli siklinler ve siklin bağımlı kinazlar arasındaki ilişki (Karp, 1999).

1.2. Kanser Neden Olan Ajanlar

1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Kanserojenler

Kanser, bir vücut hücresinin engellenemeyen, kötü huylu çoğalmasıdır ve anormal doku kitlesinin (tümör) oluşmasıyla sonuçlanır (Güven 1999). Günümüzde kansere yol açan etmenler arasında doğal ve insan yapımı kimyasal maddeler, fiziksel (radyasyon) etkenler ve virüsler bulunmaktadır. Radyasyon ve kimyasal kanserojenler DNA hasarlarına ve mutasyonlara yol açarlar. Bu kanserojen ajanlar çoğunlukla hücre döngüsünde rol alan hedef genlerde mutasyon oluşturduğundan dolayı kanser oluşumunu başlatmaktadırlar. UV ışınları ve kimyasal kanserojenlerin, insan kanserlerinin %90'ına sebep olduğu bilinmektedir (Cooper 2000).

Kanserojenlerden çoğunun, DNA ile ve hücrenin diğer makro molekülleri ile kovalent bağlar kurmak üzere reaksiyona giren elektrofil maddeler olduğu bilinmektedir. Neoplastik hücrelerde meydana gelen transformasyonlar kalıtsal olduğundan ve genetik işleyiş değiştiğinden, DNA kanserojen maddeler için bir hedef teskil etmektedir. Mutajenik kanserojenlerden bazıları DNA'daki bazların alkilasyonuna veya arilasyonuna yol açmakta, bu etkileşim, DNA molekülü üzerinde bulunan nükleofilik oksijen ve azot ile reaksiyona girerek gerçekleşmektedir. En reaktif bölgeler guanindeki N⁷ ve O⁶ ile adenindeki N³ ve N⁷ kısımlarıdır. Alkilasyon ve arilasyonun yani sıra, DNA çift sarmalı içine bazı toksik maddelerin girdiği görülmektedir. Sarmalın kıvrım uzunluğunda bir artışa yol açan bu bileşikler, sarmalın çapına eşit üç tane bitişik aromatik halka (heterosiklik) dan oluşan yapıya sahiptir (Güven 1999, Bertram 2001, Marnett 2000, Guengerich 2000).

Ultraviyole (UV) ışınları ve fotonları içeren iyonize radyasyon tek başına DNA sarmalının tek yada çift ipliğinde kırılmaya sebep olabileceği gibi hücre içinde DNA polimeraz'dan kaynaklanan DNA hasarları, 5-metilsitozin'in depürinasyonu, deaminasyonu yada serbest radikallerden oluşan oksidatif hasarlar (Nara ve ark. 2001, Finkel 2002, Smith ve Fornace 1997) gibi olayların da başlatıcı ajanı olarak görev almaktadır (Bertram 2001, Soehnge ve ark. 1997). UV radyasyonunda, iyonların etkisiz olan enerjileri DNA'daki bazlar tarafından tutularak çeşitli kimyasal reaksiyonlar ile etkili bir hale dönüştürülmektedir. DNA moleküllerinin en iyi tuttuğu UV fotonu 260nm dalga boyundadır ve DNA baz çiftlerinde hasara neden olmaktadır (Zimmer ve Slawson 2002). Örneğin DNA sarmalında iki komşu timidin arasında UV etkisi ile kovalent bağ kurularak timidin dimerleri oluşmaktadır, normal baz çiftlerinin bu şekilde bozulmasıyla, DNA polimerazın ilerlemesini engellediğinden dolayı eğer tamir edilmezse mutasyon oluşmaktadır. UV hasarı sonucunda genomda artan mutasyonların tamir edilmesi yada hasarlı hücrelerin yok edilme mekanizması (apoptosis)'nin bozulması gibi yollarda görev alan genlerdeki bozukluklar sonucunda yaklaşık %90 oranında deri kanserleri gelişmektedir (Bertram 2001, Soehnge ve ark. 1997, Zimmer ve ark. 2002, Carvalho 2003).

1.2.2. Virüsler:

Günümüzde yapılan araştırmalar sonucunda virüslerin kansere sebep olduğu bilinmektedir. Virüslerin tasidiklari onkogenler konakçı hücre genomuna girip ifade edildiklerinde, oluşturdukları ürünler ile konak hücrenin kanserleşmesine neden olmaktadır. Peyton Raus'un tavuklarda lösemiye neden olan, Raus sarcoma adını verdiği bir virüs ile yaptığı çalışmalar sonucunda virüslerin de kansere neden olduğu anlaşılmıştır. Raus sarcoma bir retrovirüstür ve *src* adı verilen bir onkogen taşımaktadır. *src* geni bir hücre içi sinyal molekülü olan protein kinazı kodlar (Inoue ve ark.1992, Inoue ve ark.1998). Normal hücrelerde protein kinaz molekülü serin ve treonin' i fosforlarken *src* ürünü olan protein kinaz, tirozini fosforlamak suretiyle hücre bölünmesini baslatıp kanserleşmeye yol açmaktadır. *v-erb-B*, *v-myc*, *v-fms* diğer bazı viral onkogenlere örnek verilebilir (Yoshioka ve ark. 2002, Cooper 2002).

Onkogen içermeyen retrovirüslerin hücreyi enfekte etmesi sonucunda, eğer virüs genomu proto onkogenlere komsu olacak şekilde eklenmiş ise, promotor gibi davranarak proto onkogenin transkripsiyonunu aktive edebilir. Örneğin İnsan papilloma virüsü (HPV) ve hepatit B'nin *myc* lokusu yakınına integre olması karaciğer ve genital kanserlere neden olmaktadır (Popescu 1987, Peters 1990).

1.3. Kansere Neden Olan Mekanizmalar

Kansere neden olan temel genetik olaylar; DNA tamir mekanizmasının bozulması, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, büyüme faktörleri ve reseptörleri ile ilgili değisiklikler ve apoptosis mekanizmasının engellenmesi, olarak 4 grup da incelenebilir (Köktürk 2003).

1.3.1. DNA tamir mekanizmasının bozulması

Normal kosullarda, kanserojenler ve genotoksik olaylara maruz kalma hücre döngüsünü yavaşlatmakta ve bu sırada hücreler DNA hasarını G₁ evresinde tamir etmektedirler. DNA'si hasarlı hücrelerin G₁ evresinde durmasını p53 adı verilen bir tümör baskılayıcı protein tarafından kontrol edilen bir mekanizma sağlamaktadır. Bu arada hata tamir edilir yada edilemeyecek kadar büyükse hücre apoptosise gider. Ama DNA tamir mekanizmalarının eksik olduğu durumlarda ise hücre bir şekilde apoptosisten kurtularak hatalı DNA'nın bir şekilde yavru hücrelere aktarılması mutasyonların birikmesine ve kanser gelişimine neden olmaktadır (Köktürk 2003, Cooper 2002, Bertram 2001, Soehnge ve ark. 1997).

DNA tamir kapasitesindeki genetik kökenli hasarlar bazı kalıtsal kanserlerin gelişiminde önemli faktörlerdir. Örneğin UV'nin etkisiyle gelişen kseroderma pigmentosumun görüldüğü bireylerde bazı DNA tamir mekanizmalarının çalışmadığı bilinmektedir. Bazı kalıtsal kolon kanseri formlarında hatalı eşleşme'yi tamir eden enzimlerde mutasyon genomik kararsızlığı arttırmaktadır (Bertram 2001'den derlenmiştir).

1.3.2. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu

Kanser gelişiminde rolü olan bir diğer mekanizma, tümör baskılayan genlerin fonksiyonlarının kaybidir. Kanser gelişiminde en iyi bilinen tümör baskılayıcı gen p53'tür. DNA hasarına verilen hücresel cevabın kontrolünde görev alan bir transkripsiyon faktörü olan bu gen, DNA hasarı ile aktive olur ve bir dizi genin, p21, MDM2, BAX ve GADD45, düzenlenmesine neden olmaktadır. Bunlar, G₁/S geçişini, G₂/M DNA hasarı kontrol noktasını ve apoptosisi düzenlemeye yardımcı olmaktadır. p53 fonksiyonunun kaybı sonunda bu fonksiyonlar görülemeyeceğinden dolayı kansere yatkın ve kanserleşen hücreler

gelmektedir. p53 fonksiyon kaybı çoğunlukla allel kayıpları veya vücut hücrelerinde yanlış anlamlı mutasyonlar şeklinde ortaya çıkmaktadır (Bertram 2001, Lewin 1997, Karp 1999, Shay ve ark. 1991).

1.3.3. Büyüme faktörleri ve reseptörleri ile ilgili değişiklikler

Kanser hücreleri çeşitli hormonlar üretmekte ve bu hormonların hücre yüzeyindeki reseptörleri ile etkileşimi sonucunda kendi büyümelerini otokrin yollarla uyarmaktadırlar. Kanser hücreleri birçok büyüme faktörü üretilmesiyle çoğalmak için avantaj kazanmaktadır. Eğer bir tümör hücresi, hem bir büyüme faktörü hem de reseptörünü taşıyorsa kendisini uyaran büyüme halkasına (otokrin büyüme halkası) sahiptir, otokrin halkası normal hücrelerde de bulunmakta ancak sadece fizyolojik uyarılara cevap vermektedir fakat kanserli hücrelerde bu denge bozulmuştur. Hücrelere büyüme sinyali gönderen çok sayıda büyüme faktörü ve reseptörü bilinmektedir. Epidermal growth faktör (EGF) ve reseptörü (EGFR), transforming growth faktör (TGF), hepatosit growth faktör (HGF), fibroblast büyüme faktörleri (FGF), matriks metallo proteinazlar (MMP) ve PDGF örnek olarak verilebilir.

1.3.4. Apoptosis mekanizmasında bozukluklar

Çevresel nedenlerle ya da virüslerin etkisiyle DNA'si zarar görmüş olan hücreler, organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler. Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen bu ölüm şekli apoptosistir. Genel olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşmesi sonucunda uyarılır. Bu ölüm şekli fizyolojik koşullarda meydana gelmektedir. Ancak p53, Rb gibi tümör baskılayıcıların inaktivasyonu ya da bcl-2'nin aktivasyonunda apoptosise

gidemediginden, hücreler kontrolsüz olarak bölünmeye devam etmektedir. Bazı virüsler, enfekte ettikleri hücrenin apoptosise gitmesini baskılayan yollar geliştirmişlerdir. Örneğin, ebstein barr virüsü, hücrenin apoptosise engelleyici faktörü olan bcl-2'ye benzer moleküller üreterek apoptosise engellerken, papiloma virüsünde, p53'ü inaktif ederek apoptosise engellemektedir. Zamani geldiginde normal olarak apoptosise gidemeyen ve daha uzun süre yasayan hücreler, genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisiyle kanserli hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar (Lowe ve Lin 2000, Natsugoe ve ark. 2001).

1.4. Onkogenler

Normal hücrelerde, hücrenin büyümesi, farklılaşması yani yaşamı için gerekli olan, "proto-onkogen" adı verilen ve onkogenlerin kökenini oluşturduğu düşünülen genler vardır (Stehelin 1976, Cooper 2002, Bertram 2001, Öztürk 1997). Proto-onkogen adı verilen normal hücre genleri, mutasyon, kromozom translokasyonları ve amplifikasyon veya transkripsiyon düzensizlikleri ile aktive olarak anormal protein sentezine veya asiri protein yapımına neden olmaktadır. Aktive olan proto-onkogenlere onkogen, kodladıkları proteinlerine de onkoprotein adı verilmektedir. Proto-onkogenler tarafından kodlanan proteinler genel olarak hücre sinyal iletim yolunda ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Lewin 1997, Köktürk ve ark. 2003, Güven 1999, Karp 1999).

1.4.1. Onkogenlerin fonksiyonları

Bugüne kadar en az 100 kadar onkogen tespit edilmiştir (Lewin 1997) ve bu onkogenleri fonksiyonlarına göre dört grupta toplamak mümkündür (Karp 1999).

1. Büyüme faktörü ve reseptörlerini kodlayan onkogenler:

Onkogenler ile büyüme faktörleri arasındaki ilişki ilk kez, Simian Sarcoma Virüsü (ssv)'ün bir büyüme faktörü olan PDGF (Platlet Derived-Growth Factor)'i uyaran bir onkogen (sis) taşıdığı tespit edildiğinde belirlenmiştir. PDGF' in β - zinciri ile ilgili olarak *v-sis* ve *int-z* genleri, EGF (Epidermal Growth Faktor)

ile ilgili olarak *erb-B* onkogeni ve FGF (Fibroblast Growth Faktor) ile ilgili *k-fgf-hst* onkogenleri bu gruba örnek verilebilir (Karp 1999, Barit 1992, Mosesson ve Yarden 2004).

2. Sitoplazmik protein kinazları kodlayan onkogenler: Serin-threonin kinazlar ve tirozin kinazları kapsayan sitoplazmik protein kinazlar, onkogenler tarafından kodlanmaktadır (Karp 1999). Örneğin, *raf* onkogeni MAP kinaz yolunu başlatarak hücreye ilk bölünme sinyalini vermektedir (Köktürk ve ark. 2003, Karp 1999, Barit 1992, Stancato ve ark. 1993, Morrison ve ark. 1993, Kovacina ve ark.1990). Diğer bir örnek, *src* onkogenidir. Bu gen aynı zamanda bir protein kinazdır ve serin threonin yerine proteindeki tirozin'i fosforile etmektedir. *src*-protein kinaz, sinyal iletiminde, hücre iskelet sistemi gelişiminde ve hücrelerin birbirine tutunmasında (adezyon) görev almaktadır. Diğer bilinen onkogenlere, *c-erb B-1*, *c-erb b-2*, *c-fms*, *c-met*, örnek verilebilir (Köktürk ve ark. 2003, Karp 1999, Yoshioka ve ark. 2002, Inoue ve ark.1992, Barit 1992, Stancato ve ark. 1993, Rohon ve ark. 1993).

3. Nükleer transkripsiyon faktörleri kodlayan onkogenler: *myc*, *myb*, *fos*, *jun*, *rel*, *erbA* gibi onkogenler transkripsiyon faktörleri olarak görev yapan proteinleri kodlamaktadır. Bir transkripsiyon faktörü kodlayan onkogenlerden en çok çalışılmış olanı *myc*'dir (Rohon ve ark.1993, Petters ve ark. 1997). *myc* geni DNA'ya bağlanan üç çekirdek fosfoprotein'i kodlar, bu fosfoproteinler DNA sentezinin başlamasında, hücre çoğalması ve farklılaşmasında görev almaktadırlar (Köktürk ve ark. 2003). *myc* geni genellikle amplifikasyon ve transkripsiyondaki düzensizliklerle onkogen haline dönüşmektedir ve küçük hücreli akciğer kanserlerinin %18-31'inde *myc* aktivasyonuna rastlanmıştır (Petters 1997, Shay ve ark.1991, Lackinger 2000, Fischen 1999, Popescu ve Zimonjic 2002, Felsner ve ark. 2000).

4. Apoptosis engel olan proteinleri kodlayan genler: Apoptosis (programlanmış hücre ölümü) ile ilgili en iyi bilinen onkogen *bcl-2*'dir. Hücre membranına bağlı bir protein kodlamakta ve bu protein hücreyi apoptosis'den

korumaktadır (Barit 1992, Lowe ve ark. 2000, Assefa ve ark. 2003, Data ve ark. 2001, Boulet ve ark. 2002, Hockenbery ve ark. 1993). *myc* geni gibi *bcl-2* onkogeni de kromozom üzerinde anormal bir bölgeye transloke olduğunda normalden fazla ifade edilmekte ve tümör gelişimine neden olmaktadır. İnsan lenfoid kanserlerinin oluşumuna *bcl-2* geninin yol açtığı bilinmektedir. Anti-apoptotik *bcl-2* ailesi genlerinden diğerleri *bcl-X1* ve *mcl-1*'dir (Lowe ve ark. 2000, Assefa ve ark. 2003, Data ve ark. 2001, Boulet ve ark. 2002, Hockenbery ve ark. 1993). Apoptosisi dolaylı olarak engelleyen bir gende *MDM2* genidir. *p53*'ün negatif düzenleyicisi olarak görev yaparak apoptosisi engellemektedir (Stad ve ark. 2001).

1.4.2. Onkogenlerin aktivasyonları

Proto-onkogenlerin ifadesini ve yapısını değiştirerek aktifleştiren, onkogene dönüştüren 3 temel mekanizma bilinmektedir.

1. Nokta mutasyonları: Çalışılmış bütün insan tümörlerinin %30'unda aktive olmuş *ras* genlerinden kaynaklandığı bulunmuştur. Üç *ras* geninin (*H-ras*, *K-ras*, *N-ras*), kodlama dizisinin 12., 13. ve 61. kodonlarında olmak üzere 3 tane mutasyon eğilimi taşıyan sıcak nokta bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bölgelerden birinde meydana gelen nokta mutasyonları ile tek bir aminoasit değişimi sonucunda onkogenik aktivite kazanmaktadır (Adjei, 2001; Tidd ve ark. 2002, Henderson 2000). Nokta mutasyonları sonucu bazen tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonları ortadan kalkmaktadır. *p53*'de meydana gelen mutasyonların çoğunluğu 5. ve 9. ekzonlar arasında olmaktadır, bunun sonucunda kolorektal, servikal hepatosellüler prostat, kronik lösemi gibi kanser türleri oluşmaktadır (Ören 1999, Candwell ve Zambetti 2001).

2. Promotor ilavesi ve gen amplifikasyonu: Örneğin; kemirgenlerde, *myc* proto onkogeni promotoruna retrovirüs eklenmesi sonucu *myc* aktivasyonu ile T hücre lösemisi oluştuğu tespit edilmiştir (Popescu ve Zimonjic 2002, Felsher ve Zetterberg 2000). Yapılan çalışmalar, birçok onkogenin amplifikasyonu yolu ile; ya gen kopya sayısında ya da transkripsiyon seviyesinde artışla aktive olduklarını göstermiştir (Köktürk ve ark. 2003, Popescu ve Zimonjic 2002).

Onkogenlerin amplifikasyonu, en çok insan solid tümörlerinde gösterilmiştir. Ayrıca değişik oranlarda limfoid malignan tümörlerde de bulunmuştur. Fare osteosarkoma hücrelerinde, meme kanseri ve tümör hücre hatlarında *myc* amplifikasyonu ve tümörleşme arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir (Popescu ve Zimonjic 2002, Bertram 2001). İnsan glioma ve sarkoma olgularında, amplifikasyona uğrayan genlerden bir diğeri de 12. kromozomda bulunan *MDM2* (mouse double minute) genine homolog olan gen olup bazen aynı kromozomda yer alan *CDK4* geni ile birlikte amplifikasyona uğradığı tespit edilmiştir (Adjei 2001, Fishen ve ark. 1999, Popescu ve Zimonjic 2002, Tidd ve ark. 2002, Henderson 2000).

3. Kromozom translokasyonları: Birçok tümör hücresinde, bilinen onkogen bölgesinde genin çaplı translokasyonlar ve diğer kromozom anomalilerinin meydana geldiği bilinmektedir. Kromozom translokasyonlarında, kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir, genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin regülatör bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır (Köktürk ve ark. 2003). *myc* lokusunun yakınında yada içinde yaygın olarak bulunan translokasyonlar *Ig* geninin transkripsiyonuna neden olmaktadır. Lösemi, lenfoma ve solid tümörlerde belirlenmiş olan translokasyonlar promotör bölgeleriyle çok yakın olan proto-onkogenlerin aktivasyonlarına neden olmaktadır (Popescu ve Zimonjic 2002, Köktürk ve ark. 2003, Güven 1999). Kromozomal translokasyon ile oluşan diğer bir aktivasyon şekli ise, kronik miyelotik lösemiye özgü Philadelphia kromozomudur. *abl* onkogeni normal yerleşim yeri olan 9. kromozomdan 22. kromozomun özel bir bölgesine geçiş yaptığında normal *abl* proteininden oluşan ve tirozin kinaz aktivitesine sahip bir füzyon proteini üretmektedir (Popescu ve Zimonjic 2002, Shimakage ve ark. 1995).

1.5. Tümör Baskılayıcı Genler

Anti-onkogenler olarak da adlandırılan tümör baskılayıcı genleri normal hücrede aktif iken tümör hücresinde fonksiyonlarını kaybetmektedirler (Güven 1999, Soehnge ve ark. 1997, Agarwall ve ark. 1998). Tümör baskılayıcı genler,

hücre bölünmesini durduran proteinleri kodlamaktadırlar ve bu yüzden hücre çoğalması için bir negatif düzenleyicidirler (Karp 1999). İlk kez keşfedilen tümör baskılayıcı gen retinoblastoma (Rb), göz retinasında oluşan çocuk kanserlerinin araştırılması sırasında ortaya çıkarılmıştır (Petters ve Vousden 1997).

Günümüzde bilinen yaklaşık 20 tane insan tümör baskılayıcı gen tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları Çizelge 1.1.'de verilmiştir. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan tümör baskılayıcı genlerden en çok çalışılmış olanları *p53* ve *Rb* genleridir. Tümör baskılayıcı genlerden bir kısmı (*p53*, *WT1*) transkripsiyon faktörleri kodlamaktadır; diğer bir kısmı (*RB*, *p16*) hücre döngüsünü düzenleyen proteinleri kodlarken bir kısım tümör baskılayıcı genler ise (*NF1*), sinyal iletim yollarında görev alan molekülleri kodlamaktadır (Petters ve Vousden 1997).

Çizelge 1.1. Tümör baskılayıcı genler (Karp 1999)

Tümör baskılayıcı gen	Tespit edildiği kanser türleri
<i>APC</i>	Adenomatosis poliposis
<i>BRCA1</i>	Göğüs ve yumurtalık kanseri
<i>NF1</i>	Nörofibroma tip 1
<i>NF2</i>	Nörofibroma tip 2
<i>P16 (MTS1)</i>	Melanoma, pankreas, Küçük hücreli akciğer kanserleri
<i>P53</i>	Göğüs, kolon, akciğer, astrositom ve osteosarkoma v.s.
<i>RB</i>	Retinoblastoma, osteosarkoma, göğüs, mesane ve akciğer kanserleri
<i>VHL</i>	Böbrek, feokromositoma ve hemangioblastoma
<i>WT1</i>	Wilm tümörü
<i>PTEN</i>	Cowden hastalığı

p53 geninin rolü: *p53* tümör baskılayıcı gen, DNA'ya bağlanabilen bir protein kodlamaktadır. Bu genin kaybı yada oluşacak herhangi bir mutasyon, kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Ainsley ve James 1997, Soehnge

ve ark. 1997, Lepik ve ark. 2003, Brooks ve Gu 2003, Bassi ve ark. 2002, Strano ve ark. 2001, Inoue ve ark. 1998, Cadwell ve Zambetti 2001). *p53* geni, DNA'ya hasar veren çok sayıda etmene karşı oluşacak hücresel cevabın düzenlenmesinde bir anahtar rol oynayarak DNA bütünlüğünü muhafaza etmektedir (Bassi ve ark. 2002). Söz konusu genin ürünü olan protein, herhangi bir DNA hasarı oluşması durumunda, hücre döngüsünün G_1/S kontrol noktasında sentezlenmekte ve hücrenin S evresine girmeden G_1 de bekletilmesini sağlamaktadır (Bassi ve ark. 2002, Saller ve ark. 1999). Strano ve ark. (2001) tarafından yapılmış bir çalışmada, *p53* tümör baskılayıcı genin *p63* ve *p73* olarak tanımlanmış iki yeni homologu olduğu belirtilmiştir (Inoue ve ark. 1998).

Retinoblastoma geninin rolü: *Rb*, ilk bulunan tümör baskılayıcı genidir ve bir çekirdek proteini kodlamaktadır (White 2004). *RB*'nin ürünü olan Rb, hücre döngüsünü G_1 evresinden DNA sentezinin gerçekleştiği S evresine geçişinde yavaşlattığı için bir tümör baskılayıcı olarak görev almaktadır. S evresinin gerçekleşmesi için gerekli olan genlerin aktivasyonunda rolü olan transkripsiyon faktörleri arasında Rb'nin en önemli hedeflerinden birisi E2F ailesinin üyeleri bulunmaktadır. G_1 evresi boyunca hücrelerin E2F transkripsiyon faktörleri, normalde Rb'ye bağlanmış ve DNA'ya bağlanması engellenmiş durumdadır. Bir mitojen uyarısının ardından G_1 'in sonunda, Rb-E2F bileşeni CDK tarafından serin treonin bölgelerinden fosforlanarak birbirinden ayrılmakta, daha sonra E2F DNA'ya bağlanarak hücrenin döngüyü tamamlaması için gerekli proteinler ifade edilmekte ve ardından hücre geri dönüşümsüz olarak S evresine girmektedir. *Rb*'de bir mutasyon sonucu Rb aktivitesini kaybetmişse; E2F'i inaktif durumda tutacak bir mekanizma olmadığından sürekli DNA'ya bağlanmakta ve hücre kontrolsüz olarak çoğalmaya devam etmektedir (Bertram 2001, Shay ve ark. 1991, Adams ve Kaeling 1998, Guo ve Hay 1999, Morgenbesser ve ark. 1994, Berry ve ark. 1996). Rb, anlamsız mutasyonlar, delesyonlar, azalmış RNA ifadesi ve hatalı protein yapımı gibi yollarla inaktif olabilir. *Rb*'nin fonksiyonel olarak inaktif olması sonucunda da çok sayıda tümör gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir Aynı zamanda *Rb*'nin mutasyon geçirmiş bir kopyası, bireysel olarak kalıtıldığında, çocukluk döneminde retinoblastoma ve ileri yaşlarda ise

osteosarkoma olusumuna neden olmaktadır (Adams ve Kaeling 1998, Morgenbesser ve ark. 1994).

1.6. *Ras* Geni ve Kanser Olusumundaki Rolü

1.6.1. *ras* geni ve ürünü p21^{ras}

ras geni 21 kDa. moleküler ağırlıkta bir zar-bağımlı protein kodlamakta olup geniş bir sinyal iletim ağında sinyal başlatıcı molekül olarak fonksiyon görmektedir, hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol etmektedir (Spandidos ve ark. 2002). p21^{ras}, 190 amino asit uzunluğunda olan GTP/GDP bağımlı bir G proteindir. G proteinleri ailesine ait, alfa alt üniteye homolog olan küçük bir proteindir ve karboksil kuyruğu ile hücre zarının sitoplazmik bölgesine bağlanmaktadır (Adjei 2001, Campbell ve Der 2004, Krenenburg ve ark. 2004, Waters ve ark. 2004, Eungdamrong ve Iyengar 2004, Penela ve ark. 2003).

ras gen ailesi H-*ras* (Harvey *ras*), K-*ras* (Kirsten *ras*), R-*ras*, M-*ras* ve N-*ras* (Neuroblastoma *ras*) olmak üzere 5 üyeden oluşmaktadır. Bunlar hücrenin kendi orijinal onkogenleri olup, virüslerde yalnızca H-*ras* ve K-*ras* onkogenlerinin karşılığı bulunmaktadır (Adjei 2001, Hill ve ark. 2000). H-*ras*, K-*ras* ve N-*ras* genleri tarafından kodlanan proteinler birbirine %85 homoloji gösterirler fakat p21^{ras} ailesine ait diğer üyeler %50 veya daha az oranda homoloji göstermektedir. Ayrıca K-*ras* proteininin, K-*ras* 4A ve K-*ras* 4B olarak iki formu bulunmaktadır. Bunlar K-*ras*'in dördüncü ekzonunda oluşan alternatif splicing sonucunda meydana gelmektedirler (Johnson ve ark. 2001, Adjei 2001, Hill ve ark. 2000, McMahon ve Woods 2001, Kloog ve Cox 2004, Waddick ve Uçkun 1998, Campbell ve Der 2004, Krenenburg ve ark. 2004, Waters ve ark. 2004, Eungdamrong ve Iyengar 2004).

İnsan kanserlerinin %30'unda *ras* onkogeninin 12, 13 ve 61. kodonlarında nokta mutasyonuna sahip olduğu saptanmıştır. Bu kodonlardaki mutasyonlar, *ras* ailesinin GTPase aktivitesini değiştirebileceğinden, sürekli sinyal aktivitesi oluşur. Sinyal yolunda meydana gelen bu mitojenik uyarılar, tümör oluşumuna neden olmaktadır (Köktürk 2002). K-*ras* mutasyonları en sık 12. kodonda görülür

ve insan tümörlerinde en sık mutasyona uğrayan onkogendir (Johnson 2001). Örneğin, pankreas kanserlerinde %90'a varan oranlarda, kolon kanserlerinin %50'si, testis kanserlerinin %40'i ve akciğer kanserlerinin %30'unda *K-ras* onkogeninde nokta mutasyonu olduğu bilinmektedir (Spandidos ve ark. 2002, Johnson ve ark. 2001, Adjei 2001, Hill ve ark. 2000, McMahon ve Woods 2000). Ayrıca, akut miyeloid lösemi kanserinin %30'u, testis kanserinin %40'i ve melanomanın %20'sinde *N-ras* onkogeninde nokta mutasyonları tespit edilmiştir (Kloog ve Cox 2004, Nishigory 2000, Campbell ve Der 2004, Krenenburg ve ark. 2004, Waters ve ark. 2004, Eungdamrong ve Iyengar 2004). *ras* genindeki mutasyonlar sonucu oluşan baslıca insan tümörleri Çizelge 1.2.'de verilmiştir.

Çizelge 1.2 İnsan tümörlerinde temel *ras* mutasyonları. K: Kirsten; H: Harvey; N: neuroblastoma. (Spandidos ve ark. 2002)

Tümör bölgesi	<i>ras</i> izoformu	Mutasyon %
Akciğer (adenokarsinoma)	K	33
Kolon	K	44
İnce barsak	H	31
Pankreas	K	90
Karaciğer	N	30
Miyelodisplastik sendrom	N, K	40
Akut miyelogenik lösemi	N	30
Deri	H, K, N	46
Ovaryum	K	48
Serviks	K	20
Endometrium	K	10-40
Tiroid		
Foliküler	H, K, N	53
Farklılaşmamış papilları	H, K, N	60
Bas ve boyun	H, K	30
İdrar kesesi	H	10
Meme	K	12
Beyin	N, H	13
Böbrek	H	10
Seminoma	K, N	43

$p21^{ras}$ in plazma zarına yerleşebilmesi için, sentezlendikten sonra bir takım değişiklikler geçirmesi gerekmektedir. İlk olarak, farnesil transferaz enziminin rol aldığı prenilasyon reaksiyonu geçirir, bu reaksiyonda karboksil kuyruğunda yer alan sistein aminoasitlerini korumak için 15 karbonlu farnesil eklenir. Ardından, 3 aminoasit karboksil metillenme ile ortadan kaldırılır ve yeni oluşan karboksil ucunda yer alan sistein, izoprenillenmektedir. Bunu *K-rasA*, *H-ras* ve *N-ras*'in karboksil ucundaki sistein aminoasitine palmitit grubu

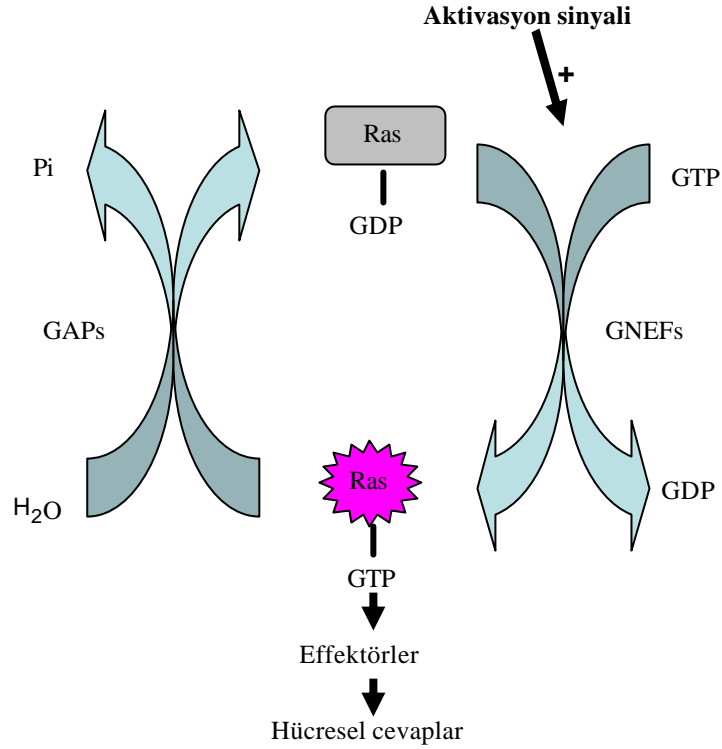
eklenmesiyle palmitilasyon izlemektedir. Sistein aminoasidine eklenen palmitit gruplari söz konusu p21^{ras}'in yari ömrünü bir kaç dakika daha arttirabilmektedir. Böylece plazma zarinin iç tarafında yer alan p21^{ras}, büyüme faktörü reseptörleri ile hücreye gelen sinyalin iletilmesinde ilk adim olusturmaktadır (Kloog ve Cox 2004, Waddick ve Uçkun 1998, Adjei 2001, Hill ve ark. 2000).

1.6.2. p21^{ras} proteininin aktivasyon mekanizmasi

Normal olarak p21^{ras}, zar bagimli bir G proteini ailesinden olup, guanosine trifosfat (GTP)' a baglanarak biyolojik olarak aktivite kazanmakta ve daha sonra kendine özgü olan GTPase aktivitesi ile GTP'yi hidroliz ederek guanosine difosfat (GDP)'a çevirir ve tekrar inaktif formuna dönmektedir (Sekil.1.2.) (Stice ve ark. 1999, Waddick ve Uckun 1998).

p21^{ras}'in biyolojik aktivitesi, GDP/GTP döngüsünün düzenlenmesi ile kontrol edilir ve hücrede normal olarak GDP proteinlerine baglidir (Adlei 2001). p21^{ras}'i kontrol etme özelligi tasiyan 3 grup protein tespit edilmistir. Birincisi, guanin nukleotidi degistiren faktör (GEFs; RasGRF 1/2 ve Sos 1/2), ras'in GTP'ye bagli olan formunu olusturmaktadır. p21^{ras} ailesine üye olan bütün proteinler üzerinde aktif olan bir proteindir. Ikinci ve üçüncü grup ise, p21^{ras} GRF (GDP releasing faktör) ve p21^{ras}-REP (p21^{ras} exchange proteini)'dir ve p21^{ras} için özgül sitosolik faktörleri olusturmaktadirlar. Fakat bu proteinler, simdiye kadar tam olarak karakterize edilemedikleri gibi nasıl bir kontrol mekanizmasini izledikleri de bilinmemektedir (Spandidos ve ark. 2002, Waters ve ark. 2004, Adjei 2001, Hill ve ark. 2000).

GTPase'i aktif eden protein (GAP), GTPase'i aktiflestirerek GTP'nin p21'den hidrolizine neden olmaktadır. GAP 120.000 Da. agirliğında olup, etkisi normal p21^{ras} proteinleri üzerinde gözlenirken, mutant p21 üzerinde gözlenmemektedir. Böylece negatif regülasyona ugramayan mutant p21^{ras} proteinleri, transformasyona neden olmaktadır (Dawnward 1992, Hill ve ark. 2000, Adlei 2001, Waddick ve Uçkun 1998).



Sekil 1.2. Ras proteinlerinin aktivasyon döngüsü. GNEFs : Guanin nükleotid degistirici faktörler, GAPs: Guanin trifosfat aktive edici faktörler

Ras proto-onkogenleri, 12, 13, 59, 61, 63, 116., 117., 119. ve 146. amino asitlerini kodlayan bölgelerinde meydana gelebilecek bir nokta mutasyonu sonucu devamlı olarak aktif hale gelerek transformasyona neden olmaktadır. Çünkü tüm bu bölgeler p21^{ras} ve GTP'nin birbiri ile bağlandıkları bölgelerde yada ona yakın bölgelerde yer almaktadır. Bundan dolayı söz konusu mutasyonları taşıyan p21^{ras} proteinlerinde, GTPaz aktivitesi etkisiz olmakta ve aktif olan GTP'ye bağlı p21, hücrenin içinde birikmektedir (Adjei 2001).

p120 GAP protein aktivasyonu ise, çeşitli hücre tiplerinde tirozin kinaz aktive eden büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir (Chambell ve Der 2004, Kloog ve Cox 2004). GAP proteininin bağlanması sonucu p21^{ras}'da meydana gelen inaktivasyon, p21^{ras}'a %50 homolog olan ve tipki p21^{ras} gibi GTP'yi hidroliz eden, p21^{ras}-bağımlı proteinlerden olan rap1 proteini ile de açıklanmaya çalışılmıştır. Buna göre p21^{rap1}-GTP kompleksinin p120 GAP

proteinine bağlanma kapasitesi çok kuvvetli olmakta ve dolayısıyla p21^{rap1}-GTP kompleksi, p21^{ras}-GTP'nin inhibitörü olarak bilinmektedir (Mochizuki 2001). Fakat Rap1 proteininin, *K-rev1* genin ürünü olduğu keşfedilmiş ve *K-rev1* geninin yüksek seviyelerde sentezi durumunda, *K-ras* onkogenini etkileyerek fibroblastların transform olmasına ve fenotip değişikliği göstermelerine neden olduğu gösterilmiştir (Frech ve ark. 1990).

1.6.3. p21^{ras} fonksiyonları

1.6.3.1. Hücre çoğalması ve farklılaşmasında fonksiyonu

Ras proteinleri, etkili bir şekilde çoğalma ve farklılaşmak için, hücreler arası uyarılara karşı cevap olarak aktive olmaktadır. Bu uyarılar, EGF, PDGF, IL-2, IL-3 gibi büyüme faktörleridir ve hücre yüzey reseptörleri tipik olarak tirozin kinazlarda olduğu gibi yada reseptörsüz tirozin kinaz reseptörlerine benzemektedir ve ras proteinleri, tirozin kinaz'ın aracılık ettiği mitojenik sinyal yollarının temel bileşenlerindedir. Normal koşullarda, G₀'da bekleyen hücrelerde toplam ras miktarı %5'in altında iken, mitojenik uyarıyla birlikte hemen hemen %50'ye yükselmektedir. *Ras*'in aracılık ettiği sinyal iletimi, hücre tipine ve transmembran reseptörlerine bağlı olarak, hücre farklılaşmasına yada hücre çoğalmasına da aracılık edebilmektedir. Örneğin; fibroblastlarda ras proteini mitojenik etkiye sahip olmasına rağmen aynı zamanda hücre çoğalmasının gecikmesinde ve bu gecikme süresinin uzamasında rol oynamaktadır (Adjei 2001).

Ras, JNK ve jun arasında doğrudan bir ilişki olduğu bilinmektedir. 3T3/4A hücrelerin UV ile aktivasyonu sonucunda, ifade edilen proteinlerin antikörlerle immüno presipitasyonu yapılmış ve ras, JNK ve jun proteinlerinin birlikte ifade edildiği gözlenmiştir. Pincus ve arkadaşları (2000)'nin yaptığı bu çalışmanın sonucuna göre; onkogenik *ras*'in, aktive olmuş normal proteinlerden farklı olarak normal kontrol mekanizmasını bırakıp direkt olarak JNK/jun ile etkileşime girebileceği gösterilmiştir. Normal proteinler, Raf/MEK/MAP kinaz yoluyla ve siklin ile aktive olmaktadır. Rac/Rho/CDC42 yolu'da uyarılmakta ve

daha sonraki basamaklarda da JNK'nin aktivasyonu düzenlenmektedir (Adjei, 2001, Waddick ve Uckun 1998, Stice ve ark. 1999).

1.6.3.2. Hücre döngüsünün kontrolünde fonksiyonu

Ras proteininin aracılığı ile MEK/MAP kinaz sinyal yolunun aktivite kazanması, hücresel siklin D1 seviyesini arttırmaktadır. Siklin D1 seviyesinin artması, hücrenin G₁'den S evresine girişini başlatarak hücre çoğalmasına yol açmaktadır. Fosfoinositid 3-kinaz (PI3-K) ve Ral-GDS yollarının ras aracılığıyla aktivasyonu aynı zamanda hücrenin G₁'den geçişine yol açmaktadır. PI3-K'nin aktivitesi, iç kaynaklı siklin D1'in sentezi ve G₁'de bulunan NIH 3T3 fibroblastların serum ile uyarılmalarının ardından S fazına girişi için gerekli olduğunu, Gille ve Dawnward (1999) yaptıkları çalışmalarla göstermiştir. PI3-K tarafından uyarılan siklin D1 transkripsiyonu ve E2F aktivitesine, Akt/PKB ve GTPaz-Rac ailesinden Rho'nun da aracılık ettiği bilinmektedir. İlave olarak, hem Ral GDS benzeri faktörler hem de Raf'in aktif edilmesi, siklin D1 transkripsiyonu ve E2F aktivitesini uyarmaktadır ve PI3-K ile birlikte hareket etmektedir. Böylece, ras'in aracılık ettiği çok sayıda mekanizma, hücre döngüsünün düzenlenmesi üzerine ras'in etkilerine aracılık etmektedir (Spandidos ve ark. 2002, Adjei 2001, Kloog ve Cox, 2004, .Kranenburg ve ark. 2004, Waters ve ark. 2004, Yang ve ark. 1998, Moroy ve Geisen 2004, Haganir ve Zipursky 2004, Noren ve Pasquale 2004).

1.6.3.4. Angiogenesis'de fonksiyonu

Kanserli dokularda hücrenin sınırsızca çoğalması sonucu, düşük kan basıncı ve düşük pH koşulları gözlenmektedir. Tümör gelişim sürecinde, hücre kitlesinin beslenebilmesi amacıyla ana damarların etrafında yeni kılcal damarlar oluşmaktadır bu olaya angiogenesis adı verilmektedir.

Onkogenik ras mutasyonları, tümör metastazlarında ve angiogenesis'de ise karismaktadır, Bu etki, ras onko-proteinin direk etkili olduğu yapılan çalışmalarla ileri sürülmektedir. *Hras* transform embriyo fibroblast hücrelerinde,

metastaz olusumunda önemli olan jelatinaz gibi anahtar metallo proteinazların ekspresyonunu arttıgı rapor edilmiştir. Bundan başka angiogenik büyüme faktörü olan VEGF'nin K-*ras* ve H-*ras* epitelyal hücrelerde yüksek oranda sentezlendiği bulunmuştur (Su ve ark. 1993, Zabrenetzky ve ark. 1994, Rak, ve ark. 1995, Kranenburg 2004, Adjei 2001).

Transgenik farelerde, onkogenik H-*ras* ve K-*ras* sentezinin engellenmesi apoptosizi uyarak melanoma ve akciğer kanserinin yok olmasıyla sonuçlanmıştır. K-*ras*'in engellenmesi aynı zamanda p53 ve Arf ekspresyonu bulunmayan transgenik farelerde de-apoptosizi uyarmıştır. *ras*-transform hücrelerde, kimyasal ve UV ile uyarılmış apoptosise engellenmiştir. Kolon hücrelerinde butirat ve yağ asitleri, büyümenin durdurulmasını ve apoptosise duyarlılığı değiştirmiştir. *ras* aktivasyonu, transformasyonun aksine, fibroblastlarda sikloheksimid, seramid, mitomisin C'nin, TNF ve TGF-beta ile uyarılan apoptosise karşı duyarlılığı artırdığı bulunmuştur (King ve ark. 2002).

Ras'a bağlı pro ve anti apoptotik sinyallerin meydana gelmesinin büyük oranda hücre tipine ve içeriğine bağlı olduğu görülmektedir. Pozitif ve negatif sinyal dengesi kinetigine, farklı bağlanma partnerlerinin varlığına ve diğer benzer kuvvetlerin aktivasyonuna bağlı olarak farklı olabilmektedir. Normal hücrelerde, yüksek seviyedeki aktif *ras*'in onkogenesisi önlemek için koruyucu pro-apoptotik cevabi uyardığı, fakat transform hücrelerde aktif *ras*'in ölümden çok yaşamla ilgili olduğu düşünülmektedir (Campbell ve Der 2004, Cox ve Der 2003).

1.6.4. Ras'in efektörleri

Aktif GTP-bağlı Ras, fonksiyonel olarak farklı aşağı efektör hedeflere

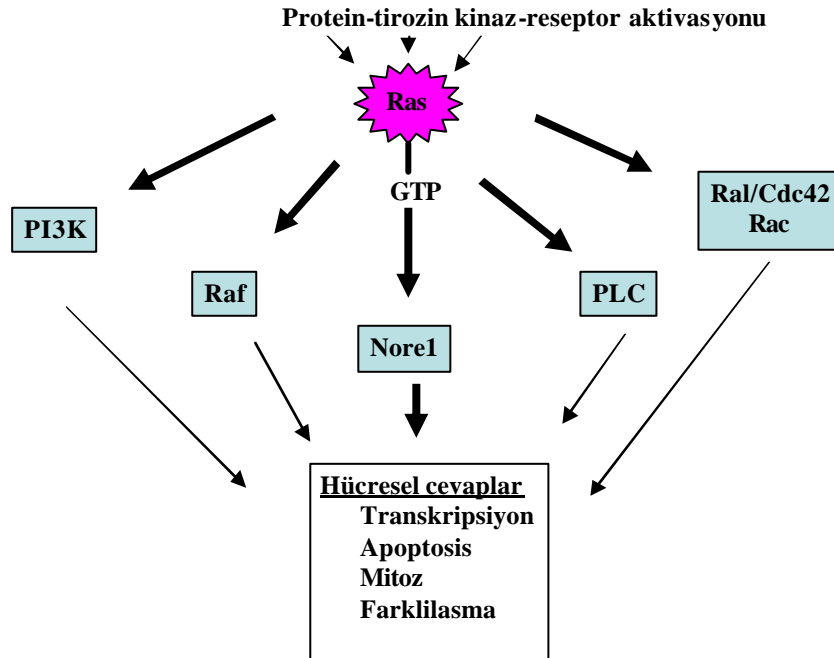
bağlanabilir ve kontrol edebilir (Şekil.1.3.). En iyi çalışılmış Ras

efektörlerinden bir tanesi serin/tironin (S/T) kinaz Raf-1'dir.

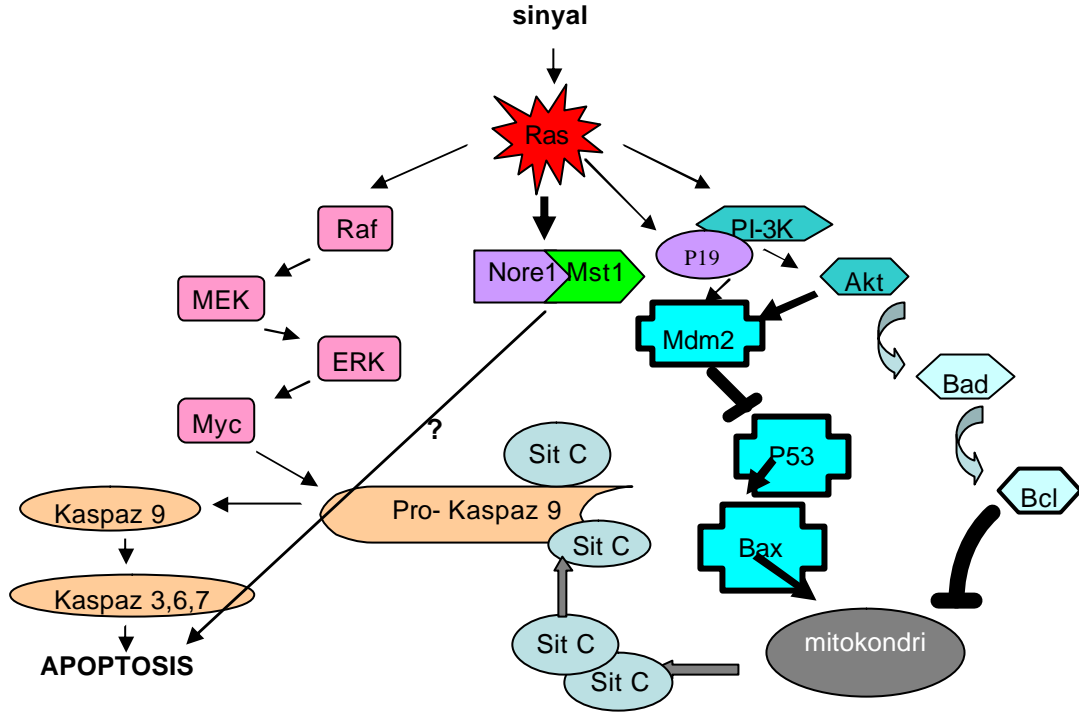
Raf/MEK/ERK/MAP kinaz yolunun aktivasyonu ya apoptosise ya da yaşamla sonuçlanan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna izin verebilir. Ras bir lipid kinaz olan PI3-K'in katalitik alt ünitesine de bağlanıp onu aktive edebilir. PI3-

K, zar-bagimli PIP2'yi PIP3'e çevirir ve bunun oluşumu da Akt (S/K) ve GEF gibi birçok aşağı hedeflerin aktivitesini kontrol eder. Akt'nin anti-apoptotik aktivitesi Bad ve Bcl gibi yaşam faktörlerinin fosforilasyonunu takiben kaspaz 9 aktivitesinin engellenmesiyle gerçekleşir (Campbell ve Der 2004).

Akt'nin onkogenic *ras* tarafından aktivasyonunun bu olayların tümünü nasıl etkilediği çok az bilinmektedir. Ras bu anti-apoptotik efektörlerinin aksine, Akt yada p19 yoluyla p53'ün regülatörü olan Mdm2'yi etkileyerek kaspaz aktivasyonuna neden olmaktadır. Bundan başka, Nore1 ve RASSF1 apoptosisi pozitif yönde etkilediği ve aktif Ras'ın direk olarak Nore1'e ve ilgili protein RASSF1'e bağlanabileceği yakın bir zamanda ileri sürülmüştür (Şekil.1.4.). Nore1 ve RASSF1 homo- yada heterodimer oluşturduktan sonra S/T kinaz olan Mst1 ile bir kompleks yaparak aktivitesini kontrol ederler (Khokhlatchev ve ark 2002, Campbell ve Der 2004).



Şekil. 1.3. Ras proteinlerinin efektörleri. PI3K: Phosphoinositide 3'kinase; PLC: Phospholipase C



Sekil.1.4. Apoptosis kontrolünde önemli Ras –sinyal yolları

1.7. *p53* Geni ve Kanser Olusumunda ki Rolü

1.7.1. *p53* geni ve ürünü

Bir tümör baskılayıcı gen olan *p53*, hücre döngüsünü düzenleyen 53 kDa.'luk bir çekirdek proteini kodlamakta ve bu protein, hücrenin S evresine girmesini engellemektedir (Zergeroglu ve ark. 1999). İnsanda bulunan *p53*, 17. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. 393 amino asit'lik protein kodlamaktadır. N-terminal transaktivasyon (TAD) merkezi, DNA bağlanma (DBD) ve C-terminal oligomerizasyon (OLD) bölgelerinden meydana gelmektedir. Bu bölgelerin bütünlüğü ve kararlılığı, *p53*'ün etkili bir şekilde bağlanabilmesi için gereklidir (Strano ve ark. 2001, Soehne ve ark. 1997).

p53 proteini, DNA hasarının tamiri, genomik kararlılık, gen transkripsiyonu, hücre döngüsünün kontrolü, yaşlanma ve apoptosis gibi hücrel olaylarda önemli bir rol oynamaktadır. DNA sentezinde nükleotid yetersizliği, onkogenlerin aktivasyonu, DNA'nın tek ipligindeki kırılmalar gibi DNA hasarları,

hipoksiya gibi stres koşullarında ve aynı zamanda hücre yaşlanmasında göze çarpan telomer kısalması sonucunda p53 sentezinde meydana gelen artış tüm bu hücrel mekanizmalarda önemli bir rol oynamaktadır (Bertram 2001). p53 sentezi, DNA hasarı ile aktifleşmekte ve DNA'yi tamir edebilmesi için hücreyi G₁'de durdurarak S evresine girmesine engel olmaktadır. Hasarın tamir edilemediği durumlarda ise hücreyi apoptosise sürüklemektedir (Lee ve ark. 2004).

Normalde p53, çok kısa bir yarı ömrü olan ve çok az miktarda sentez edilen bir proteindir. Yukarıda tarif edilen çeşitli uyarılara karşı üç farklı seviyede cevap oluşabilmektedir. Birincisi; transkripsiyondaki artış yada yarılanma ömrünün uzamasıyla, protein konsantrasyonunda artış, ikincisi; p53'ün inaktif formdan aktif yapısal forma dönüşmesi ve üçüncüsü; sitoplazmadan çekirdeğe taşınması yoluyla p53 aktivite göstermektedir (Liang ve Clarke 2001, Wang ve Shi 2001, Blagosklonny 1997). p53'ün aktivasyonu fosforilasyon ve asetilasyon ile proteinin post-translasyonel modifikasyonlarını gerektirir. Bu iki olay ise, p53'ün yarılanma ömrünü önemli bir şekilde artmasına ve transkripsiyonel aktivitesinin en iyi hale gelmesine yol açar (Daujat ve ark. 2001).

Fibroblastlarda p53'ün, G₁ evresi boyunca sitoplazmada birikmekte olduğu, G₁'den S'e geçiş sırasında ise enerji gerektiren mekanizmalarla çekirdeğe göç ettiği ve S evresinin başlangıcından itibaren kısa periyotlarla sitoplazmaya geri döndüğü bilinmektedir (Liang ve Clarke 2001). Bu bilgi, p53 aktivasyonunun hücre döngüsü boyunca konumsal olarak düzenlenmekte olduğunu ortaya koymaktadır.

p53'ün çekirdek içine transferi ve orada tutulması, bölünmenin durdurulması yada apoptosisin başlatılabilmesinde p53'ün normal fonksiyonu için gereklidir. Yabani tip p53 proteinin, beyin, kolon ve neuroblastoma gibi insan tümörlerinde sitoplazmada anormal olarak tespit olup tümör oluşumunun, p53'ün çekirdek içine taşınması sırasında oluşabilecek bir hasardan kaynaklanabileceği, Liang ve Clarke (2001) tarafından ileri sürülmüştür.

Yabani tip p53'ün parçalanması, muhtemelen sitoplazmik yerleşim ile ilgilidir ve çekirdeğe taşınması, p53'ün kararlılığını arttırmaktadır. Yabani tip p53'ün sitoplazmada yerleşmesi ve parçalanması; p53 aktivasyon sinyalinin

yoklugunda hücrede p53'ün düşük seviyede tutulmasını sağlamaktadır (Scotto ve ark. 1999).

Yih ve Lee (2000) çalışmalarında, HFW hücrelerinde X-ray radyasyonu etkisiyle p53 proteininin kinetigini araştırmışlar ve 1Gy X-ray radyasyonu uygulamasının ardından p53'ün çekirdekte lokalize olduğunu bulmuşlardır. Bu konuda yapılmış bir başka çalışmada; Non Responder (NR) hücrelerin 5 gün büyütülmüş kontrol gruplarında p53'ün sitoplazmada yoğunlaştığı gözlenirken, Nerve Growth Factor (NRF) ile muamele edilmiş hücrelerde 5.günde p53 proteininin çekirdeğe göç ettiği tespit edilmiştir (Misale ve ark. 1996).

p53, insan kanserlerinin %50'sinde en yaygın olarak mutasyona uğrayan genidir. Bununla birlikte, p53'ün bazı mutant formları, hücre döngüsünün sürekli çalışması ve tümör potansiyelinin artmasıyla açığa çıkan asiri artmış bir fonksiyon fenotipi de kazanabilmektedir (Cadwell ve Zambeti 2001). kanser gelişiminde önemli bir kanıt olan Li-Fraumeni sendromlu hastalarda, p53'ün 2 allelinden birinde kalıtsal bir mutasyon vardır. Üreme hücrelerinde, normal *p53* allelinde delesyon yada mutasyon sonucunda gelişimin erken evrelerinde ortaya çıkan kalıtsal bir kanser türüdür (Cadwell ve Zambeti 2001, Halazonetis 2004).

p53 proteininin fonksiyonunu olumsuz etkileyen 3 tip genetik değişiklik bilinmektedir. Bunlardan ilki; p53'ün tümör baskılama aktivitesinde etkili olan genlerden bir kısmının yada tamamının delesyonudur. İkincisi; yabancı tip p53 proteininin fonksiyonunu baskılayabilen bazı kritik mutasyonların olumsuz etkileridir. Bunun sonucunda proteinin DNA'ya bağlanması ve transaktivasyon fonksiyonu engellenmektedir. Yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki; mutant p53 135 Val. proteinini kodlayan bir mutant allel taşıyan transgenik hayvanlarda, tümör baskılama fonksiyonu kaybolmakta ve tümör gelişmektedir. 175 Pro gibi bazı mutasyonların ise, belirli hücrelerde p53 proteininin, apoptosisi uyarabilmesini ortadan kaldırmaktadır (Soehnge 1997). Son çalışmalarda bildirildiğine göre; *p53* geninde bulunan bütün sıcak nokta mutasyonları, yabancı tip p53'ün transkripsiyonel aktivitesini engelleyebilen bir mutant protein sentezlenmesine neden olmaktadır. p53 proteininin fonksiyonunu olumsuz etkileyen diğer genetik değişiklikte ise; p53 mutantlarının asiri fonksiyon artışı (gain of function) ile bir onkogenik potansiyel kazanmaktadır. Yabancı tip p53'ün

kayboldugu hücrelerde tümörleşme ve metastas yapma potansiyelinin arttigi gözlenmiştir (Soehnge 1997).

1.7.2. p53 ve hücre döngüsünün kontrolü

Aktif p53'ün birikmesi, hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan farklı proteinlerin sentezini uyarmaktadır. *Waf 1* geni tarafından kodlanan p21 proteini, CDK-Siklin kompleksini inaktif hale getirmektedir. Bu inaktivasyonu sağlamak için, CDK2/siklinA yada E/PCNA/Waf1 kompleksi oluşturulmaktadır. Bu kompleks, hiperfosforilasyona uğramış Rb'nin birikmesine ve E2F'in serbest kalmasına yol açmaktadır (Vargas ve Ronai 2002, Agarwal ve ark. 1998, Oren 1999, Cadwell ve Zametti 2001).

p53 iki bağımsız mekanizma ile apoptosisi uyurabilmektedir. Bu mekanizmalardan biri; p53 tarafından bax, IGF-BP3 ve fas proteinlerinin sentezinin üst seviyede düzenlenmesi yoluyla, diğer mekanizmada ise, bcl-2, IGF-1R ve IGFII protein sentezinin alt seviye düzenlenmesi ile gerçekleşmektedir. (Soehnge 1997). Aktif p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesinin üyesi olan bax'ın uyarılmasına yol açarak apoptosisi başlatmaktadır. Yüksek seviyede normal p53 sentezleyen hücrelerdeki bax seviyesi artarken bcl-2 seviyesinde azalma olmakta ve dolayısı ile hücre apoptosise gitmektedir (Miyashita ve ark. 1994). Bax'ın haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılmasına neden olarak da apoptosisi başlatabilmektedir (Chao ve ark. 2000, Coe ve ark. 2002, Natsugou ve ark. 2001, Hendriks ve Middendorp 2004, Lowe ve Lin 2000, Etten 2004, Miyashita ve ark. 1994, Lin ve Beuchimol 1995, Lin ve ark. 2003).

Ratların normal timüs hücrelerinin, radyasyona maruz kaldıkları zaman apoptosise gittikleri tespit edilirken, p53'ü olmayan farelerden alınan timüs hücrelerinin, radyasyondan sonra kısa bir süre için yasadıkları tespit edilmiştir. Fakat bunun aksine, normal p53 geni olan ve p53 geni olmayan mutant farelerden alınan timüs hücrelerinin deksametozon ile uyarıldıklarında apoptosise gitmeleri, p53 dışındaki bir mekanizmanın da olabileceğini düşündürmektedir (Clarke ve ark. 1993). Serumdan mahrum kalan hücrelerin özellikle p53'e bağlı olarak apoptosise gerçekleştirebildikleri tespit edilmiştir (Debbas ve White 1993, Lowe ve

ark. 1994, Song ve Lambert 1999, Marchenko ve ark. 2000). Pochampally ve ark. (1999)'nin p53'ün transkripsiyon faktörü olma özelliğinin, p53'e bağlı apoptosis için gerekli olduğunu ileri sürmektedir. Kuerbitz ve ark. (1992) ise bir başka çalışmada, p53'ün mitokondri enzimleriyle apoptosise yol açan ve elektron tasini için çok önemli olan sitokrom C'den bağımsız olarak apoptosisi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir.

1.8. *MDM2* Geni ve Kanser Olusumundaki Rolü

1.8.1. *MDM2* geni ve ürünü

MDM2 (murine double minute 2) geni ilk kez double minute kromozomda yer alan, amplifikasyona uğramış bir gen olarak tarif edilmiş olup Balb/c3T3 hücrelerinin transforme tipi olan 3T3 DM'lerde görülen kromozom çeşitidir (Reis ve ark. 2000, Momand ve ark. 2000).

Fare *MDM2* proteini 489 amino asitten ibaret olup 14-130 bölgesi p53 bağlanma bölgesidir. Bunun insanda 19-102 bölgeler olduğu tespit edilmiştir (Fakharzadeh ve ark. 1991, Leng ve ark. 1995, Chen ve ark. 1993). İnsanda *MDM2* proteini, 491 amino asit uzunluğundadır ve N-terminal bölgesi boyunca p53'ün transaktivasyon bölgesinde bulunan α -heliks ile etkileşim halindedir. *MDM2* proteini aynı zamanda çok sayıda diğer proteinlerle de etkileşir. *MDM2*'nin evrimsel gelişim sürecinde en iyi korunmuş bölgesi, C-terminal bölgesindeki Ring finger bölgesidir. Bu bölge, p53'e karşı ubiquitin ligaz aktivitesine sahiptir. Böylece *MDM2* sadece kendisinin transkripsiyon aktivite bölgesine sahip olarak değil, aynı zamanda ubiquitinasyonu takiben p53'ün parçalanmasını başlatarak da p53 aktivitesini etkisiz hale getirmektedir. Stres uyarısı olmadığı durumlarda *MDM2*'nin normal fonksiyonu, inaktif p53'ün düşük seviyede tutulmasına dayalıdır (Daujat ve ark. 2001). p53 tarafından uyarılabilen bir gen olarak *MDM2*, p53'ün feedback düzenleyicisi olarak işlev görmektedir. *MDM2* etkisiyle ubiquitinasyona uğrayan p53, *MDM2*'ye bağlanmakta ve hızla parçalanmaktadır (Lu ve ark. 2002). Bundan dolayı çeşitli insan tümörlerinde de eksprese edilen *MDM2*, yeni bir proto-onkogen çeşiti

olarak ele alınmaya başlanmıştır (Jones ve ark. 1998, Wu ve ark. 1993). *MDM2*'nin amplifikasyonu ve ekspresyonu, sarkoma, lösemi, mesane kanserlerinde sıklıkla dikkati çekmektedir (Lu ve ark. 2002).

1.8.2. *MDM2*-p53 kontrol mekanizması

MDM2, p53'ün negatif regülatörü olarak p53'ün kendisi tarafından ekspresyonu aktive edilir. (Momand ve ark. 2000, Stad ve ark. 2001, Vargas ve Ronai 2002, Agarwall ve ark. 1998, Colman ve ark. 2000, Daujat ve ark. 2001, Reis ve ark. 2000). *MDM2* üç post translasyonel mekanizma ile p53'ü kontrol etmektedir. Bunlardan birincisinde; *MDM2*, p53'ün N-terminal transaktivasyon aktivitesini engellemektedir (Zhang ve ark. 2004). Bu p53'ün N-terminal bölgesinde *MDM2*'nin bağlanması için gerekli olan 22 ve 23 amino asitlik özgül bölge, DNA hasarının ardından ser15, ser20 ve ser33 noktalarından fosforillenmesi yoluyla *MDM2*'nin N-terminale bağlanmasına engel olmaktadır. Bu şekilde p53 daha kararlı hale gelmekte ve *MDM2* tarafından parçalanmaktan kurtulmaktadır (Cadwell ve Zambetti 2001, Brooks ve Gu 2003, Reis ve ark. 2000, Ard ve ark. 2002).

İkinci mekanizma; *MDM2*'nin Ring Finger bölgesi ile p53'ün çekirdeğin dışına taşınmasıdır. Bu bölge, p53'e karşı ubiquitin ligaz aktivitesine sahiptir. Böylece *MDM2*, ubiquitinasyonu takiben p53'ün parçalanmasını başlatarak da p53 aktivitesi etkisiz hale getirir (Zhang ve ark. 2004, Daujat ve ark. 2001, Brooks ve Gu 2003). Üçüncü mekanizma ise, p53'ün ubiquitinasyonu ile sitoplazma ve çekirdek proteozomları tarafından parçalanmasıdır (Colman ve ark. 2000, Zhang ve ark. 2004). *MDM2* ve p53 arasında oluşmuş olan kompleks, p53'ün parçalanabilmesi için yeterli değildir. p53'ün parçalanması için *MDM2*-p53 kompleksinin çekirdekten sitoplazmaya geçmesi gerekmektedir. Bu modele göre *MDM2* sürekli olarak çekirdekte yerleşme dizisi (NLS: nuclear localization signal) ve çekirdekten taşınma dizisi (NES: nuclear export signal) kodladığı için sitoplazma ve çekirdek arasında geçiş yapmaktadır. *MDM2*'nin NES bölgesinde oluşan mutasyon, p53'ün kararlı hale gelmesini ve çekirdekte birikmesini uyarılmaktadır (Momand ve ark. 2000, Stad ve ark. 2001).

Üçüncü mekanizma olarak; *INK4a-ARF* lokusunda, alternatif reading frame (ARF), *myc*, *ras* gibi onkogenleri aktive etmesiyle uyarılmaktadır. MDM2 ARF sayesinde çekirdekçik içinde tutularak MDM2'nin ubiquitin ligaz aktivitesi engellenmekte ve MDM2 parçalanmaktadır (Zhang ve ark. 2004, Don ve ark. 2003).

MDM2, p53 ile direk olarak ilişkili olmayan ilave fonksiyonlara da sahiptir. p53'den bağımsız olaylarda hücre büyümesini olumsuz etkilemektedir, muhtemelen pRb ile yada E2F/DP1 ile etkileşime girdiği görülmüştür. MDM2'nin bu fonksiyonları, p53'ün düzenlenmesindeki rolünden daha az ölçüde karakterize edilmiştir. Aslında, *in vivo* ortamda *MDM2* genlerinde meydana gelen bozulmanın öldürücü etkileri p53 genindeki bozulma ile telafi edilmektedir (Ries ve ark. 2000).

Normal koşullarda MDM2'nin görevi inaktif p53'ün düşük seviyede tutulmasıdır. *MDM2*'den yoksun farelerin yaşayamadığı çeşitli deneylerle gösterilmiştir. Bu inaktif p53'den kaynaklanan bir sonuçtur. Çeşitli onkogenik stres koşulları, MDM2'nin p53'den ayrılmasına yol açmaktadır. İyonize radyasyon sonucunda p53, serin20 noktasından fosforilasyona uğramakta ve bu nedenle MDM2'ye bağlanamamaktadır. Sonuç olarak p53 kararlı hale gelmekte, p53 hedef genlerin transkripsiyonu artmaktadır (Daujat ve ark. 2001).

MDM2 geni, aynı zamanda *ras* tarafından başlatılan Raf/MEK/MAP kinaz yolu ile, p53'den bağımsız bir mekanizmayla düzenlenmektedir. MDM2 proteini, inhibitörü olan p19^{ARF} yokluğunda, aktive edilmiş Raf sayesinde p53'ün parçalanmasını sağlamaktadır. Onkogenik *ras* tarafından transforme hale getirilen hücrelerin, DNA hasarının ardından p53 bağımlı apoptosise daha fazla direnç gösterdiği bildirilmiştir. Bu nedenle, *ras*'in uyardığı Raf/MEK/MAP kinaz'ın aktivasyonu, tümör gelişimi boyunca p53'ün baskılanmasında önem kazanmıştır. Öncül hücrelerde Raf aynı zamanda *MDM2*'yi durdurup p^{19ARF}'i da aktive edebilmektedir (Ries ve ark. 2000).

p19 geni *INK4a* gen lokusunda bulunan ve alternatif okuma çerçevesine (ARF: alternative reading frame) sahip bir tümör baskılayıcı gendir. p19 proteini ise 169 amino asit içeren, alternatif *splicing* geçiren bir mRNA molekülünün ürünü olup hücre çoğalmasını engellemektedir. İnterfaz aşamasında çekirdek

içinde tespit edilmektedir. (Palmero ve ark. 1998, Ries ve ark. 2000, King ve ark. 2002, Eischen ve ark., 1999).

p19^{ARF}, p53'ü kararlılığını sağlayan bir proteindir (Palmero ve ark. 1998). p19'un bu etkisini nasıl yaptığını açıklayan farklı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında p19^{ARF}'in p53'ü kararsız hale getiren Mdm2 proteinine bağlandığı ve böylece Mdm2'nin p53'e bağlanmasını engellediği ileri sürülmektedir (Kamijo ve ark. 1997, Palmero ve ark. 1998, Honda ve Yasuda. 1999, Lu ve ark. 2002). Bazı çalışmalarda ise p19^{ARF}, p53-DNA kompleksine direkt olarak bağlanmaktadır (Honda ve Yasuda 1999, Palmero ve ark. 1998). ARF-p53'den yoksun olan hücrelerin daha çabuk çoğaldıkları tespit edilmiştir (Lu ve ark. 2002). Bates ve ark.(1998)'nin bildirdiğine göre, E2F1 direkt olarak insan tümör baskılayıcı olan *p14^{ARF}*'in ekspresyonunu aktive etmektedir. *p14^{ARF}* ise MDM2-p53 kompleksine bağlanarak p53'ün parçalanmasını engellemektedir.

p19^{ARF}, MDM2 ile bağlandığında, çekirdekçik içinde MDM2'nin parçalandığı rapor edilmektedir, bunun sonucunda p53 birikmektedir. Diğer yandan p19^{ARF}, Mdm2 ubiquitinasyon ligaz aktivitesini direkt olarak inhibe etmektedir. *P14^{ARF}* ise bir şekilde mitojenik sinyal yollarından p53'ün uyarılmasıyla bağlantılıdır. *ras*'in düzenlediği Raf/MEK/ERK kinaz yolunun CDK4/siklinD kinazları aktive ettiği bildirilmiştir. Böylece, Rb'nin fosforilasyonu E2F1'in serbest kalmasına yol açmaktadır. *p14^{ARF}* promotorları birkaç tane E2F1 bağlanma bölgesi içermektedir ve *p14^{ARF}*'in aktivitesinin E2F12 in asiri ekspresyonu ile arttığı bildirilmiştir. Ras/Raf/MEK/MAP kinaz yolunun *p14^{ARF}*'in birikmesine ve MDM2 aktivitesinin engellenmesine direkt olarak yol açabileceği çalışmalarla gösterilmiştir (Ries ve ark. 2000, King ve ark. 2002, Palmero ve ark. 1998, Haber 1997).

Kamijo ve ark. (1997), fare embriyo hücrelerinde p53 ve p19'un yaşlanmayı kontrol ettiğini ve p19'un hücre döngüsünü G1 evresinde durdurabilmesi için normal p53'e gerek duyduğunu ileri sürmüşlerdir. Ries ve ark. (2000)'nin ileri sürdüğü bir modele göre, Rb'nin kaybı yada onkogen aktivasyonu gibi anormal çoğalma sinyali sonucunda hücrede E2F-1 adındaki transkripsiyon faktörünün aktive olması p14 (p19'un insandaki homologu) proteininin sentezini

aktive etmektedir. Aktif p14 ise p53 proteininin Mdm2 tarafından parçalanmasını engellemekte ve böylece hücre apoptosise gitmekte yada hücre döngüsünü durdurmaktadır (Clark ve ark. 1998)

Bazı kanser tiplerinde tespit edilmiş olan $p19^{ARF}$ 'in 1.ekzon bölgesindeki mutasyonların p19'un hücre döngüsünü durdurma yeteneğini yok ettiği belirlenmiştir (Kamijo ve ark. 1997, Weber ve ark. 2000).

Onkogenik *ras*, insan ve kemirgen fibroblastlarının *INK4a/ARF* tümör baskılayıcı lokusunun iki ürününü olan $p16^{INK4a}$ ve $p19^{ARF}$ 'u indüklemektedir (Kamijo ve ark. 1997). Bunun sonucunda hücre döngüsünü durdurmaktadırlar. $p19^{ARF}$ p53 transkripsiyon faktörünü aktif ederken, $p16^{INK4a}$ siklinD'ye bağlı kinazlara karşı antagonist aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Guo ve Hay, 1999, Korgaonkar ve ark. 2002, King ve ark. 2002). Onkogenik *ras*, G1 fazının durdurulmasının uyarılması yerine DNA sentezini etkilemektedir (Stott ve ark. 1998, Kamijo ve ark. 1997).

Guo ve Hay (1999)' in bildirdiklerine göre, $p19^{ARF}$ 'in her iki allelinden de yoksun olan hücrelerde onkogen ekspresyonu, *p53*'ün uyarılmasında ciddi oranda azalmaya neden olmakta ancak tamamen kaybolmamaktadır, böylece hücreler apoptosise yönelmektedir. Aynı zamanda; yaşlanma krizindeki yada *c-myc*'nin asiri ekspresyonu gözlenen normal hücrelerde genellikle, *p53* veya $p19^{ARF}$ 'dan birinde mutasyon gözlenmiştir. $p19^{ARF}$ 'in her iki allelinden de yoksun olan hücrelerin tümör gelişimine yüksek derecede eğilimli olduğu rapor edilmiştir.

MDM2, *p53*'ün nukleo-sitoplazmik translokasyonunu iki yolla düzenlemektedir. Birincisi; MDM2 çekirdekte *p53* ile birleşmekte ve sitoplazmaya geçirecek burada parçalanmasını sağlamaktadır. Alternatif olarak MDM2, çekirdekte *p53*'ün ubiquitinasyonuna aracılık edebilmektedir. Böylece, NES' in ortaya çıkmasıyla *p53* çekirdekten sitoplazmaya geçmeye başlamaktadır. *p53*'ün hücre lokalizasyonunda MDM2 rol oynamaktadır. MDM2 fonksiyonu, neuroblastoma ve beyin kanseri gibi tümörlerin alt sınıflarında *p53*'ün çekirdekten çıkması ile direkt bağlantılıdır. MDM2'nin ziti anlamlı bir oligonükleotid tarafından inhibisyonu yada $p19^{ARF}$ tümör baskılayıcı protein tarafından MDM2 fonksiyonunun baskılanması, yabancı tip *p53*'ün sitoplazmadan çekirdeğe geri

dönmesi ile sonuçlanmaktadır (Liang ve Clarke 2001, Böttger ve ark. 1997, Stommel ve ark. 1999, Stad ve ark. 2001).

Diger yandan bazı çalismalarda gösterildigine göre, p53'ün çekirdege tasinmasi, MDM2'ye baglanmasindan bagimsizdir. Mutant p53, MDM2 ile etkilesime giremeyebilir. Liang ve Clark (2001)' in bildirdigine göre; MDM2 bazı kosullarda hücre içerigine bagli olarak belirli mekanizmalarla p53'ün çekirdek-sitoplazma tasinmasini kontrol edebilmektedir.

1.9. Apoptosis ve Temel Fonksiyonlari

Hücre çoğalması ve apoptosis (programlanmış hücre ölümü) arasındaki denge ve ilişki, organizmanın normal gelişimi ve doku- büyüklük oranı arasındaki dengenin sağlanabilmesi için gereklidir (Guo ve Hay 1999, Bertram 2001). Apoptosis; aynı zamanda programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intihari olarak da bilinmektedir. Apoptosis, normal hücre hayat döngüsünde yer alan bir ölüm şekli olmasına rağmen hastalık belirtisi yada sonucu olarak da karsımıza çıkmaktadır (Mihich 1994, Liu ve ark. 2002).

Lenfositlerin timustaki klonal seçilimi ve iltihap reaksiyonu sonrasında ortamdaki uzaklaştırılmalarında, embriyonik gelişim sırasında deride keratinositlerin yüzeye doğru göç edip epiderminin en üst tabakasını oluşturmada, menstrasyon sırasında uterus duvarındaki epitel doku dökülmesinde ve gözde lens oluşumunda, metamorfozda apoptosis gözlenmektedir (Engin ve Özyardımcı 2001). Organizmada yapım (mitoz) ve yıkım (apoptosis) arasında bir denge vardır. Bu dengenin apoptosis aleyhine bozulması, birçok hastalığın belirtisi olabilmektedir. Örneğin; bazı viral enfeksiyonlar (ebstein barr, insan papilloma virüsü) apoptosisi baskılayabilmekte ve kanser gelişimine yol açabilmektedir. Diger bir mekanizmada ise, alzheimer ve AIDS gibi hastalıklarda apoptosis'in asiri aktive olması sonucu artmış hücre kayıpları (nöron, T lenfositleri) gözlenmektedir (Engin ve Özyardımcı 2001, Lowe ve Lin 2000).

1.9.1. Apoptosisde görülen morfolojik özellikler ve nekrozisden farkı

Apoptosis'in morfolojik olarak nekrozisden farklı özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Hücre apoptosise yöneldiği zaman, özgün morfolojik ve biyokimyasal özellikler sergilemektedir. Nekrozisde hücrenin sismesi dikkat çekerken apoptotik hücrelerde büzülme ve küçülme olduğu bilinmektedir. Nekrotik hücrelerde kromatin şekli bakımından normal hücreyle arasında fark gözlenmemektedir (Liu ve ark. 2002, Mihich 1994, Studzinski 1999). Nekrotik hücrelerin su alıp sismesinden dolayı hücre zarı bir süre sonra patlamakta ve zar bütünlüğü bozularak hücre içeriği dışına çıkmakta ve sitoplazmada bulunan lizozomal enzimler etraftaki hücreleri sindirmektedir (Engin ve Özyardımcı 2001). Apoptosisde kromatindeki yoğunlaşma ve çekirdek zarı etrafında kondanse olmasının yani sıra, sitoplazmanın su kaybedip yoğunlaşmasının ardından hücre zarının bogumlanmasıyla küçük cepçikler (apoptotik body) oluştuğu gözlenmektedir. Apoptotik cepçiklerin zarla çevrilmiş ve içlerinde değişen miktarlarda çekirdek veya diğer hücre içi yapıları içerdiği bildirilmiştir. Hücre zarı bütündür ve hücre içeriği hiçbir zaman dışarı verilmediğinden dolayı iltihap oluşumu gözlenmemektedir. Apoptotik hücre, komşu hücreler veya makrofajlar tarafından sindirilmektedir (Dobrucki ve Darzynkiewicz 2001, Liu ve ark. 2000, Studzinski 1999, Watters ve Lavin 1999).

Apoptotik hücrelerin morfolojik değişimleri çekirdek ve sitoplazma boyayan çeşitli boyalarla boyanarak belirlenebilmektedir. Örneğin hücreler akrinin orange/etidyum bromid kokteyli ile boyandığında, sadece akrinin orange plazma zarını geçmekte ve bütün hücreleri boyamaktadır. Sağlıklı hücrelerin çekirdekleri parlak yeşil, sitoplazmaları sarı renkte boyanırken erken apoptotik evredeki hücrelerin çekirdekleri parlak yeşil kromatinin yoğunlaştığı alanlar ise koyu yeşil olarak gözlenmektedir. Etidyum bromid sağlıklı hücrenin intakt plazma zarından geçemediği için sağlıklı hücreleri ve erken apoptotik evredeki hücreleri boyamamakta, ancak plazma zarının bütünlüğü bozulmuş olan geç apoptotik yada nekrotik hücreleri boyamaktadır. Bu hücrelerde etidyum bromid hücre içine girdiğinde hücrenin tamamı turuncu renkte boyanmaktadır (Cotter ve Martin 1997).

Apoptosisın en önemli belirteçlerinden biri de, DNA'nın nükleozomlar arasından yaklaşık 180-200 bp'lik parçalar halinde kırılmasıdır. Bu durum, agaroz gel elektroforezinde merdiven görüntüsü (ladder) oluşturmaktadır. Bu durum hücrenin tipine göre değişmektedir. Bazen de sadece 50 kb'lik tek bir bant da gözlemlenmektedir. DNA'nın bu şekilde parçalanmasında kalsiyum/magnezyum bağımlı bir endonükleaz enziminin sorumlu olduğu bilinmektedir. DNase I ve II'nin de parçalanmada rol aldığı bildirilmiştir (Higuchi ve ark. 2000).

1.9.2. Apoptosis mediatörleri

Apoptosis çok sayıda çeşitli mediatör tarafından düzenlenmektedir. Bu mediatörler; kalsiyum gibi iyonlar, seramid gibi moleküller, *c-myc* gibi genler, p53 gibi proteinler ve mitokondri gibi organeller yer almaktadır. Apoptosis boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olmaktadır. Bu kalsiyum iyonlarının endonükleaz aktivasyonunda, DNA hasarının tamirinde, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda rol oynadığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Irusta ve ark. 2003). Sitoplazmada ve diğer hücre içi zarlı yapılarda kalsiyumun ani ve asiri artışı, hücreyi hızla nekroze götürürken, hücre dışı kalsiyumun eksilmesi veya hücre içi kalsiyum depolarının çözünmesinin de tipik apoptotik çekirdek oluşumunu engellemekte olduğu Mihish ve Schimke (1999) tarafından rapor edilmiştir.

Bcl-2 ailesinden üyelerin bir kısmı (bax, bad, bid, bcl-x_S) apoptosisi uyarırken (pro-apoptotik) diğer kısmının (bcl-2, bcl-x_L) engellediği (anti-apoptotik) bazı çalışmalar ile desteklenmiştir (Joshi ve ark. 2004, Natsugoe ve ark. 2001). Hücrenin yaşayabilirlik oranı, bu ailenin pro-apoptotik/anti-apoptotik oranına bağlıdır. bcl-2/bax oranının kan kanserlerinde önemli bir değer taşıdığı rapor edilmiştir. Bu oranın artması ya da azalması, apoptosisin uyarılması ya da baskılanması ile sonuçlanmaktadır. Bcl-2, mitokondri dışı membranında yer almakta ve iyon geçişini düzenlemektedir. Bax ise sitozol içinde bulunmaktadır. Bir apoptotik uyarının ardından mitokondri zarına bağlanmakta ve burada por oluşumunu uyararak zarın seçici iyon geçirgenliğini bozarak, sitokrom C ve AIF

(apoptosis indükleyici faktör)'nin mitokondriden sitozole çıkmasında görev almaktadır (Irusta, ve ark. 2003, Joshi ve ark. 2004, Datta ve ark. 2001, Bertram 2001, Assefa ve ark. 2003).

Apoptosisin temel mediatörleri arasından sitokrom C, kaspaz olarak adlandırılan hücre içi proteazları direk olarak uyarabilmektedir (Bertram 2001, Assefa ve ark. 2003, Agostino ve ark. 2003). Sitokrom C, mitokondri iç zarında bulunan elektron transport zincirinin bir proteini olup apoptosis sürecinde merkezi bir konuma sahiptir. Bir hücrede sitokrom C, AIF ile birlikte mitokondriden salınıp sitoplazmaya geçmesiyle Apaf 1 adı verilen bir protein ile ATP varlığında bağlanmakta ve apoptosom kompleksi oluşturmaktadır. Bu kompleks, inaktif olan prokaspaz-9'u aktifleştirerek prokaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktif kaspaz-3, ICAD (inhibitör of caspase-activated deoxyribonuklease) molekülünü inaktif hale getirerek CAD molekülünü serbest bırakmakta, bu molekül apoptosisin karakteristik belirtisi olan DNA fragmentasyonuna sebep olmaktadır (Adams ve Cory 2002, Lockshin ve Zakeri 2002, Schimnich ve ark. 2002).

Seramid, hücre zarına bağlı asit sifingomiyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plazma zarında oluşacak bir hasara karşı haberci sinyal yollama özelliğine sahip olduğu düşünülmektedir (Engin ve Özyardımcı 2001).

Apoptosis mekanizmasında mediatör olan bir diğer protein p53'dür. p53, hücrede çeşitli nedenlerle oluşan hasarlara karşı apoptosis mekanizmasını tetikleyen bir tümör baskılayıcı proteindir. p53'ün apoptosisi uyarması, bax'ın ekspresyonunu uyarmasıyla meydana gelmektedir. Bu şekilde bcl-2/bax oranı düşeceğinden apoptosis başlatılmaktadır (Lowe ve Lin 2000).

1.9.3. Apoptosisin uyarılması

Apoptosis, genel olarak hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas ve TNFR1 (tümör nekroz faktör reseptörü)'nin özgül ligandlarıyla birleşmesi sonucu başlatılabilmektedir. Bu reseptörler hücre zarının yüzeyinde yerleşmişlerdir ve TNFR ailesinin üyeleridirler. Fas lenfoid hücrelerde, akciğerde ve bazı tümör hücrelerinde tespit edilmiştir. İlgili ligandına Fas-L adı verilmektedir. Fas ve

TNFR1, ligandları ile bağlandıktan sonra, bir ölüm uyarani oluşmakta ve bir seri protein-protein etkileşim zinciri başlatılmaktadır (Wang ve Cai 1999). Öncelikle, kendilerine doğal olarak bağlı olan ölüm bölgeleri (TRADD ve FADD) ile etkileşime girmektedirler. Bu ölüm bölgeleri de prokaspaz 8'i aktifleştirerek selale tarzı bir kaspaz aktivasyonunu başlatmaktadır (Bertram 2001, Assefa ve ark. 2003).

Apoptosis, daha önce de açıklandığı gibi çeşitli genotoksik etkiler sonucunda oluşan DNA hasarlarına bir cevap olarak p53'ün uyarılmasıyla başlatılabilmektedir. Uyarılan p53, bcl-2 ailesinden bax'ın uyarılmasına yol açarak apoptosis mekanizmasını başlatabildiği gibi, Fas, DR4 ve DR5 gibi hücre yüzeyi ölüm reseptörlerini uyararak da apoptosisi uyarabilmektedir (Lowe ve Lin 2000, Bertram 2001). Reaktif oksijen radikalleri; hem mitokondri hem de sitoplazma zari ve DNA üzerindeki hasarlar sonucu apoptosis başlatılabildiği gibi büyüme faktörlerinin ortamda azalması da hücrelerin p53 bağımlı apoptosis mekanizması ile ölmesine neden olmaktadır. Pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax proteini fosforile olamadığı durumlarda eğer aktivite kazanmışsa, mitokondriden sitokrom C salinimini arttırarak apoptosis yolunu başlatabilmektedir. Apoptosisin uyarılmasında etkili bir diğer mekanizma ise T lenfositlerinden salınan granzim B'lerin hedef hücrede kaspaz sistemini harekete geçirmesidir (Adams ve Cory 2002).

1.9.4. Bcl-2 ailesi ve mitokondri üzerindeki etkileri

Bcl-2 ailesi birbirine ters etkilere sahip iki gruptan oluşmaktadır. Pro-apoptotik grup, sitokrom C'nin mitokondri zarından hücre içine geçişini sağlayarak apoptosisin uyarılmasında etkili olurken, anti-apoptotik grup üyeleri ise sitokrom C salinimine engel olarak apoptosisi baskılamaktadır (Joshi ve ark. 2004). Bu iki grubun birbirine zıt çalışması, yapılarındaki hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks bölgeleri ile olmaktadır. Bu ailenin üyelerinde, yapılarında bulunan BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cep oluştururken BH3 bölgesinde amfipatik α -heliks bölgesi bulunmaktadır (Bouillet ve ark. 2002).

Pro-apoptotik bcl-2 üyelerinin bazılarında (bax ve bak), BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinin tamamı bulunurken bazılarında (bid, bad ve bim) sadece BH3 bulunmaktadır. Anti-apoptotik hücrelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunmaktadır ki bu bölgenin, diğer hücresel yollarla apoptosis arasında bir ilişki kurduğu düşünülmektedir (Lockshin ve Zakeri 2002, Bouillet ve ark. 2002).

Bcl-2 ailesi üyeleri apoptosis mekanizmasındaki görevlerini mitokondri aracılığıyla gerçekleştirmektedirler (Irusta ve ark. 2003). Pro-apoptotik bcl-2 üyelerinden bid, bak ve bax normalde hücrelerde sessiz halde bulunmakta ve aktive edildiklerinde sitokrom C salınması için harekete geçmektedirler. Bid proteininin aktiflesmesine yol açan mekanizma kaspaz-8'in aktiflesmesidir. Aktive olmuş kaspaz-8, bid proteinini kırmakta ve 15 kDa'luk karboksil ucu olmaktadır. Oluşan bid parçası içerdiği BH3 bölgesi ile diğer pro-apoptotik üyelerle birleşmekte ve onları sessiz olarak bekledikleri sitoplazmadan mitokondriye geçirerek aktive olmalarını sağlamaktadır. Bu aktivasyon sonucunda sitokrom C sitoplazmaya salınmaktadır (Bouillet ve ark. 2002). Birçok normal hücrede bulunduğu bilinen bad proteininin ailenin diğer üyeleriyle kompleks oluşturması için defosforile olması gerekmektedir. Normalde bad, yaşam faktörleri (survival faktörler) etkisiyle fosforile durumdadır ve anti-apoptotik üyelerle birleşemediğinden onları baskılayamamaktadır. Böylece anti apoptotik proteinler sitokrom C'yi mitokondride tutarak apoptosisi engellemektedir. Ancak yaşam faktörlerinin eksikliği gibi bir durumda bad proteini defosforile olursa, anti-apoptotik üyelerle birleşerek sitokrom C salınmasını başlatmaktadır (Lockshin ve Zakeri 2002).

1.10. Miyoblast Hücre Sistemi

Bu çalışmada kullanılan CO25 miyoblast hücreleri, 1977'de Yaffe ve Saxel tarafından, fare bacak kasından izole edilip, kültürü yapılan C2 hücrelerinden elde edilmiştir. Daha sonra C2 hücreleri Gosset ve arkadaşları (1988) tarafından, insan 61. kodonunda mutant N-*ras* onkogeni taşıyan bir plazmid ile transform edilmiştir. Bu N-*ras* onkogeninin transkripsiyonu ise ona

eklenmiş olan, steroidlere (dekzametazon gibi) hassas fare meme kanser virüsünün promotörü (MMTV-LTR) ile yapılabilmektedir.

C2 ve CO25 miyoblast hücrelerinin her iki hattı da normal oranda serum içeren (%20 fetal sigir serumu) ortamda kültür edildikleri zaman birbirlerine dokunana kadar çoğalmakta ve tamamen flask yüzeyini kaplayınca kontak inhibisyon etkisiyle çoğalmayı durdurmaktadırlar. Bunun aksine, eğer az seviyede mitojenik ajanları içeren besi ortamında (%10 at serumu) kültürleri yapılırsa yaklaşık 4. günden sonra füzyon yapmaya başlayarak miyotüp oluşturmaktadırlar. Fakat, N-*ras* onkogeni içeren CO25 hücreleri, düşük seviyede mitojen içeren aynı besi ortamında, bir steroid hormon olan dekzametazon ile muamele edildiği zaman miyotüp oluşturma yerine *ras* onkogeninin uyarılması sonucu transform fenotipi göstermektedirler. Bu da kontak inhibisyonun kaybı ve ilerleyen sürede küçülmüş hücrelerden ibaret yığınların meydana gelmesidir. Diğer yandan, N-*ras* indüklenmesine neden olan dekzametazon ortamdan uzaklaştırıldığı zaman, CO25 hücreleri, C2 hücrelerinden hiçbir farklılık göstermeksizin tekrar miyotüp oluşturabilmektedir (Saleh 2001, Yaffe ve Saxel 1977, Gosset ve ark. 1988, Zeytinoglu ve ark.2002, Ciechanover ve ark. 1999, Hsieh ve ark. 2000). Tüm bu özellikler CO25 miyoblast hücrelerini, daha morfolojik olarak ayırt edilebilen bir sistemde, N-*ras* onkogeninin farklılaşma ve transformasyon mekanizmalarındaki etkisini araştırmak için elverişli bir model yapmaktadır.

1.12. Fibroblast Hücre Sistemi

Bu çalışmada kullanılmış olan F2408 hücreleri, bilimsel adı *Rattus norvegicus* olan fisher cinsi siçan embriyosundan izole edilerek, DMEM ve %10 FCS kültür ortamında yetiştirilen bir fibroblast (kas) hücresi olup fibroblast hücrelerinin genel morfolojik ve karakteristik özelliklerini tasımlamaktadırlar (IFO Cell Bank). Bu hücreler ilk kez Kaplan ve Ozanne tarafından 1983 yılında geliştirilmişlerdir. Bu çalışmada, fisher siçan fibroblastlardan, kirsten murine sarcoma virüsü ve abelson murine leukemia virüsü eklenmesi ile birbirinden farklı 5 alt soyu elde edilmiştir. Bu hücreler epidermal, platelet-derived ve sarkoma büyüme hormonları ile uyarıldıklarında, hormona karşı farklı hassasiyet

göstermişlerdir. Inoue ve arkadaşları (1992), normal F2408 hücrelerine çeşitli viral genler aktarmışlar, transform olan hücrelerde p53 proteinin metabolik kararlılığı ve seviyesini belirlemişlerdir. Polyomavirüs, *v-K-ras* ve *v-src* ile transforme olmuş hücrelerde p53'ün seviyesi ve kararlılığında önemli bir artışa rastlanmamasına karsin *c-H-ras* ile transforme olduğunda, p53'ün kararlılığında yine belirgin bir artış olmamasıyla birlikte seviyesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Yoshioka ve arkadaşları (2002) ise; aktif *c-H-ras* taşıyan bir dizi plazmid ile F2408 hücreleri transform ederek neuratin, heparin bağımlı büyüme faktörü ve lumican'ın transkripsiyon baskılayan genler üzerine etkilerini araştırmışlardır.

Çalışmamızda kullandığımız bir diğer hücre ise 5RP7 fibroblast hücreleridir. Bu hücre tipi de F2408 hücreleri gibi siçan embriyosundan izole edilerek kültüre edilmişlerdir (IFO Cell Bank). F2408 hücreleri normal besi ortamında kontak inhibisyon sağlayana kadar çoğalmakta, hücreler birbirine temas ettikten sonra çoğalmayı durdurmaktadırlar, ancak aktif *H-ras* taşıyan hücreler, komşu hücreler ile temas ettikten sonra bile çoğalmayı durdurmuyarak yığınlar halinde çoğalmaya devam ederek transform hücre fenotipi göstermektedirler (Garbisa ve ark. 1987). 5RP7 hücreleri ilk kez Garbisa ve arkadaşları (1987) tarafından geliştirilmişlerdir. Bu çalışmada; ikinci pasajdaki siçan embriyo hücrelerine çeşitli onkogenleri taşıyan plazmidler eklenerek transform hücreler elde edilmiştir. 1R, 2R, 3R, 4R ve 5R hücre hatları; mesane kanseri hücre hattı olan T24'den elde edilen aktif *c-H-ras* onkogeni içeren pEJ plazmidin eklenmesiyle elde edilmiştir. *H-ras* transform hücrelerle yapılmış bir çalışmada; E1A ve T24 *H-ras* ile transform olmuş *p53*^{-/-} fare embriyo fibroblast hücrelerinde *p53*-esrtojen reseptörü füzyon proteinin tamoxifen adlı bir bileşikle aktive edilmesi sonucunda *p53* bağımlı apoptosisi arttırdığı bulunmuştur (Vater ve ark. 1996). Nozawa ve arkadaşları (1999) da yine bu konuda benzer çalışmalar yapmıştır. Bir transkripsiyon faktör olan IRF-1 (interferon regulatory factor-1) bakımından eksik olan öncül fare embriyo fibroblastlarına, aktif *c-H-ras* geni eklendiğinde, hücrelerin DNA hasarına bağlı apoptosisten kurtulduğu bu çalışmayla bildirilmiştir.

Bütün bu çalışmalar, aktif H-*ras* taşıyan fibroblast hücrelerin, *ras* geninin transformasyon mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalarda kullanılması için uygun bir model olduğunu göstermektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Antikorlar

Fare monoklonal MDM2 antikorunu (Chemicon International, MAB4 134 Msx MDM2 50 ug-0,2 mg/ml Lot. 23060288), FITC isaretili keçi anti fare İkinci Antikor (Goat anti Mouse IgG H&L, Flourescein Conjugated, Chemicon International, HRP-FITC, APR4F GtxMs IgG Flour, 2 mg Lot. 23070590), Fare hibridoma p53 süpernetant antikorunu (B10 kod' lu antikor, Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü)'nden temin edilmistir.

2.1.2. Kimyasal maddeler

Agaroz, Akridin Orange (AO), Bovin Serum Albumin, Brom Fenol Mavisi, DAPI, Dekzametazon, Dimetilsülfoksit (DMSO), Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM), Etaposit, Etilen-di-amine-triasetikasit (EDTA), Etidyum Bromid (EB Fenol ve Buffer 10,5, Gliserol, (Sigma), N-Louryl Sarkosil Sodyum Tuzu, Penisilin/Streptomisin solüsyonu, Puks saline A (PSA), Proteinaz K, Ribonükleaz A, Sodyum Azid, Sodyum Bikarbonat, Sodyum Klorür, Sodyum Hidroksit, Trizma Base, Trizma – HCl, Triton X-100 (Sigma), Aseton, Magnezyum Klorür, Potasyum klorür, Sodyum Asetat, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Merk), At Serumu, Fötal Sigir Serumu (Biochrom KG), Borik asit, Absölü Alkol (Carlo Erba), Metanol (Lab-Scan Analytical Sciences), Tripsin - EDTA solüsyonu (10X) (Biological Industries), DNA Ladder (100 bp MBI Fermentas Gene Ruler)'dan temin edilmistir.

2.1.3. Cihaz ve diger malzemeler

Hücre Sayıcı (Coulter Z1 Particle Counter), Isik Mikroskopu (Olympus BX), Florasan Filtreler (FITC, WB; NU, Dapi), Jel Dökümantasyon Sistemi (Biolab, Uvitec) deneylerde kullanilmistir.

2.1.4. Deneyde kullanılan solüsyonların içerikleri ve hazırlanmaları

10X DMEM (Dulbecco's Modification of Eagles Medium) (100 ml)

13,2 g DMEM, 80 ml steril distile su içinde çözülmüş ve toplam hacim, 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µ por çaplı filtre ile steril edilmiştir.

%10 FBS (Fetal Bovine Serum yada Fetal Calf Serum FCS) (500 ml)

50 ml Serum (FBS yada FCS), 50 ml 10X DMEM, 20 ml %9,2 Sodyum bikarbonat ve 5 ml Penisilin-streptomisin steril bir sisede karıştırılmış ve toplam hacim steril distile su ile 500 ml'ye tamamlandıktan sonra, CO₂ musluğu ile yada steril 1N HCl ve 1N NaOH ile pH 7,2-7,4'e ayarlanmıştır.

2X Tripsin - EDTA (PH 7,4) (125 ml)

380,43 µl %9,2 Sodyum bikarbonat, 1X Puck's saline A ile 100 ml'ye tamamlanmış, 25 ml 10X Tripsin EDTA eklenmiştir. CO₂ musluğu ile yada steril 1N HCl ve 1N NaOH ile pH 7,2-7,4'e ayarlanarak, ve küçük hacimlerde bölünerek -20 °C'de saklanmıştır.

%9,2 Sodyum bikarbonat (100 ml)

9,2 g Sodyum bikarbonat, 80 ml distile su içinde çözülmüş ve toplam hacim, steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır, 121 °C de 1,5 atmosfer basınç altında otoklav edilerek yada 0,22 µ por çaplı filtre ile steril edilmiştir.

1N HCl (100 ml)

8,4 ml % 37 HCl, 91.6 ml distile su ile seyreltilmiş ve toplam hacim, steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır, 0,22 µ por çaplı filtre den geçirilerek steril edilmiştir.

1N NaOH (100 ml)

4 g NaOH, 80 ml distile su içinde çözülmüş ve toplam hacim, steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır, otoklav edilerek yada 0,22 µ por çaplı filtreye steril edilmiştir.

200 mM Dekzametazon (25,641 ml)

0,002 g Dekzametazon, 25,641 ml steril de iyonize su içinde çözülmüş ve küçük hacimlere bölünerek -20 °C'de saklanmıştır. Steril ortamda hazırlanmıştır.

10X PBS (Phosphat Buffer Saline) (500 ml)

1 g potasyum klorür, 40 g sodyum klorür, 1 g Potasyum di fosfat, 5,7 g Sodyum di hidrojen fosfat 450 ml distile su içinde çözülmüş ve toplam hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavlanarak steril edilmiştir. Çalışma solüsyonu 1X'dir. 1:10 oranında steril distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

100 mg/ml Stok akridin orange solüsyonu (1 ml)

0,1 g Akridin Orange, 1 ml 1X PBS içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

A solüsyonu

10 µl stok AO solüsyonu, 9,9 ml 1X PBS içinde seyreltilerek hazırlanmıştır.

10 mg/ml Stok Etidyum bromid solüsyonu (10 ml)

1 tablet (0,1 g) etidyum bromid, 10 ml 1X PBS içinde çözülerek hazırlanmıştır.

B solüsyonu (10 ml)

100 µl stok EB solüsyonu 9,9 ml 1X PBS içinde seyreltilerek hazırlanmıştır.

Akridin orange/etidyum bromid kokteyl solüsyonu (100 mM:100 mM) (20 ml)

10 ml A solüsyonu ve 10 ml B solüsyonu karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 1:10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

DNA liziz solüsyonu (10 ml)

200 µl 1 M tris (pH 8), 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8), 500 µl %10 SDS ve 40 µl 10 mg/ml RNase karıştırılmış ve toplam hacim steril distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. RNase, kullanılmadan hemen önce solüsyona ilave edilmiştir.

1 M Tris - HCl (pH 8) (100 ml)

15.76 g tris-HCl, 80 ml distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır. pH ayarı için 4,2 ml konsantre HCl eklenmiş ve toplam hacim, distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklav edilerek oda sıcaklığında saklanmıştır.

0,5 M EDTA (pH 8) (100 ml)

18,61 g EDTA, 80 ml distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır. EDTA, tam olarak pH 8'de çözünür. Solüsyon manyetik karıştırıcıda karıştırılırken NaOH pellet ile pH ayarı yapılmıştır. Toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak otoklav edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

3M Sodyum asetat (100 ml)

40,81 g sodyum asetat, 80 ml distile suda çözülmüş ve toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklav edilerek oda sıcaklığında saklanmıştır.

%10 SDS (Sodyum dodesil sülfat) (100 ml)

10 g SDS, 80 ml distile suda çözülmüş ve toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

10 mg/ml RNase (15,7 ml)

157 mg RNase, 15,7 ml sulandırma solüsyonu ile çözülmüş, küçük hacimlere bölünerek -20 °C'de saklanmıştır.

RNase Sulandırma solüsyonu:

10 mM tris-HCl (pH 7,5) ve 15 mM NaCl ile hazırlanmıştır.

1 X TE (Tris-EDTA) solüsyonu (10 ml)

20 µl 1M tris-HCl (pH 8), 100 µl 0,5 M EDTA (pH 8) karıştırılmış ve 9,880 ml steril distile su ile seyreltilmiştir.

5X TBE solüsyonu (Tris–Borikasir-EDTA) (100 ml)

5,4 g tris, 2,75 g borikasit , 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8) ve 80 ml distile su karıştırılmış ve toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır, çalışma solüsyonu 1X'dir. 1:5 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

6X DNA Yükleme Solüsyonu (10 ml)

5 ml gliserol, 0,002 g brom fenol mavisi ve 5 ml 1X TBE karıştırılarak hazırlanmıştır.

10 mM Etaposit (10 ml)

0,088 g etaposit, 10 ml steril de iyonize su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Metanol-Aseton Tespit solüsyonu (1:1) (100 ml)

50 ml metanol ve 50 ml aseton karıştırılarak hazırlanmıştır.

Fenol saturated solüsyonu (425,5 ml)

400 ml fenol ve 25,5 ml saturated buffer karıştırılmış ve faz oluşumu için yaklaşık 10 dk beklenecek +4 °C'de saklanmıştır.

%1 BSA (Bovin Serum Albumin) (100 ml)

1 g BSA, 90 ml 1X PBS içinde çözülmüş ve toplam hacim 1X PBS ile 100 ml'ye tamamlanarak +4 °C'de saklanmıştır.

%1 Triton X-100 (100 ml)

1 ml Triton X-100, 99 ml 1X PBS içinde seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre kültürü

Deneyde kullanılan CO25 hücreleri ve onların atası olarak bilinen fakat insan mutant *N-ras* onkogenini taşımayan C2 miyoblast hücreleri, Anglia Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Okulu, Moleküler Biyoloji Bölümünden sağlanmıştır. *H-ras* taşıyan 5RP7 hücreleri ile onların kontrolü olan F2408 hücreleri, IFO Cell Bank, Japonya'dan temin edilmişlerdir. Kullanılan 5 tip hücre de flask'da 1×10^6 hücre olacak şekilde, hücre sayıcı (Coulter Counter) ile sayılarak ekilmiş, normal büyüme ortamı olan %10 FBS (Foetal Bovine Serum), %1 L-glutamin ve 100 ünite/ml penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içinde, % 5CO₂ ve % 95 hava verilerek, 37°C'deki CO₂ inkübatöründe büyütülmüştür. Hücrelerin pasajlarının yapılması için, 2X tripsin-EDTA ile hücreler kaldırılmış ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek, 1X PBS'de 1 kez yıkanmıştır. Taze %10 FBS ile tekrar çözümü ve flasklara aktararak pasajları yapılmıştır.

CO25 hücrelerin transformasyonunu ve tasdikleri insan mutant *N-ras* onkogenini indüklemek amacıyla, yaklaşık %80 sıklığa ulaşan hücreler, tripsinlenerek flask yüzeyinden kaldırılmış ve 1X PBS ile yıkandıktan sonra, %10 HS ve 1 µM (5 µl/ml) dekzametazon içeren besi ortamına aktararak büyütülmüşlerdir (Zeytinoglu ve ark. 2002).

2.2.2. Tripan mavisi ile canlı hücrelerin belirlenmesi

Deneyde kullanılacak hücrelerin kültür flaskına ekilmesi sırasında canlı hücrelerin oranının belirlenebilmesi amacıyla %0,2 tripan mavisi ile boyanmıştır. Hücreler 2X tripsin EDTA ile kaldırılıp 1X PBS ile yıkandıktan sonra 5 ml 1X

PBS içinde süspansiyon edilerek, 1:1 oranında hücre süspansiyonu ve %0,2 tripan mavisi bir ependorf tüpte karıştırılmıştır. Pipetleme ile hücre ve boyanın homojen bir şekilde karışması sağlandıktan sonra, Thoma lami'nin sayım alanına 1 damla damlatılarak preparat hazırlanmış ve mikroskopta canlı hücrelerin sayımı yapılmıştır. Sayımı yapılan canlı hücrelerin, sulandırma faktörü de göz önünde bulundurularak 1 ml'deki miktarları hesaplanmıştır. Tripan mavisi, büyük moleküllü bir boya olduğundan dolayı canlı hücrelerin içine girememektedir. Ancak ölü hücrelerin hücre zarları seçici geçirgen özelliğini kaybettiğinde dolayı boyayı içlerine alabilmekte ve mikroskopta sitoplazmaları parlak mavi renkte görünmektedir. Canlı hücreler ise boyanmadığından dolayı sitoplazmaları renksiz seffaf, hücre zarının etrafında mavi halka şeklinde görünmektedir (Cotter ve Martin 1997).

2.2.3. UV ışığı uygulaması

Deneyde kullanılacak olan bütün hücrelerin medyumunu vakum pompası yardımıyla çekilerek, oda sıcaklığındaki 1X PBS ile iki kez yıkanır. Daha sonra, içinde 30 watt UV lambası (Philips) bulunan UV kutusuna yerleştirilen petrilere, 30 cm yükseklikten, 10 sn, 30 sn ve 1 dk süreler ile, 300 J/m², 900 J/m² ve 1800 J/m² dozlarında UV ışığı uygulanmıştır. Bu sürenin sonunda hücrelere taze %10 FBS (yada %10 HS) medyum eklenerek 24 ve 48 saat boyunca %5 CO₂'de 37°C'de büyütülmüşlerdir. Söz konusu dozlar literatür çalışmasına dayalı olarak (Nishigori 2000) yapılan ön çalışma ile belirlenmiştir. Ön çalışmada, 10 sn, 30 sn, 1 dk, 5 dk, 15 dk ve 30 dk UV uygulama süreleri ile 12 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süreleri denenmiş, içlerinden en iyi sonuç veren 10 sn, 30 sn ve 1 dk UV uygulama süreleriyle 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri seçilerek deneylere bu şekilde devam edilmiştir.

2.2.4. Akridin orange / etidyum bromür boyama ile apoptozis analizi

Apoptotik çekirdeğin AO/EB ile boyanması çalışması, Cotter ve Martin (1997)'in yöntemi geliştirilerek yapılmıştır. %10 FBS (yada %10 HS) ve DMEM

içeren besiyerinde büyütülen hücreler, $1,4 \times 10^4 / \text{cm}^2$ olacak şekilde, lamel içeren petrilere ekilmiş ve 24 saat süre ile büyütülmüşlerdir. Hücreler lamel yüzeyini %80 kapladığında, daha önce anlatıldığı şekilde UV ışığı uygulanmıştır. 24 ve 48 saatin sonunda hücrelerin yapışık olduğu lameller, 3 kez 2 dk'lık sürelerle 1X PBS ile yıkanmış ve %70 etanol içinde 10 dk, oda sıcaklığında tespit edilmiştir. Bu işlemin ardından, 5 kez 1dk süreyle distile suda bekletilen hücreler, 2 dk 1X PBS ile yıkanmış ve (100 μ M:100 μ M) AO/EB kokteyl solüsyonu ile 10 dk oda sıcaklığında ve karanlık ortamda boyanmıştır. Son olarak 4 kez 1dk süreyle 1X PBS ile yıkanan lameller, tırnak cilası ile lam'a yapıştırılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar, Olympus BX50 foto mikroskobu altında, Floresan WB filtre kullanılarak değişik büyütme oranlarında incelenmiş ve Olympus PM-30 otomatik foto mikrografi aracı ile 40X büyütmede fotoğraflanmıştır.

2.2.4. DNA fragmentasyonunun agaroz jel elektroforezi ile analizi

Bu çalışma; Catter ve Martin (1997)'in yöntemi geliştirilerek yapılmıştır. Yukarıda anlatıldığı gibi flask basına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilerek büyütülmüş ve UV'ye maruz bırakılmış olan hücrelerden, 24 ve 48. saatin sonunda, DNA izolasyonu yapılmıştır. Bunun için, 2X Tripsin EDTA solüsyonu ile kaldırılan hücreler, 1000 rpm'de 5dk. santrifüj edilerek toplanmış ve 2 kez 1X soğuk PBS ile yıkanmıştır. Hücreler 10 mg/ml stok solüsyondan 4 μ l/ml oranında RNase içeren 0,5 ml DNA liziz solüsyonu (10mM Tris, pH 8, 0,1mM EDTA, pH 8, %0,5 SDS) içinde yeniden sulandırılarak 37⁰C' de 1 saat bekletilmiş ve daha sonra, 25 mg/ml stok proteinaz K'dan 8 μ l / ml oranında eklenerek 50⁰C' de 3 saat inkübe edilmiştir. Enzim uygulamalarının ardından, DNA liziz karışımı ile eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) karışımı eklenerek 13.000 rpm/1 dk. santrifüj edilmiştir. Üst kısımda bulunan berrak kısım toplanarak bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra DNA liziz sıvısının 2 kati kadar soğuk absolu etanol ve 1/10 kadar da 3M NaCl eklenmiş ve 0⁰C' de 1 gece bekletilerek DNA'nin çökmesi sağlanmıştır. Çöken DNA'yi ayırmak için +4⁰C' de 10 dk, 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernetant atılarak pellet 1 ml %70 etanol ile yeniden çözülmüştür. Son olarak +4⁰C' de 10 dk, 13.000 rpm'de santrifüj edilerek

etanol uzaklastirilmis ve DNA pelleti oda sicakliginda 1-2 saat bekletilerek, etanol uçurulmustur. DNA 20 µl 1X TE solüsyonu içinde çözülmüş ve çalışilana kadar -20°C'de saklanmistir. Izole edilen DNA, 1X TBE solüsyonu ile hazirlanmis ve 0,2 µg/ml EB içeren %1.8'lik agaroz jelde, 7 V/cm (100 volt) akimda 1X TBE solüsyonu ile yürütölmüş ve UVP jel görüntöleme sistemi ile görüntölenmistir.

DNA fragmentasyonu pozitif kontrolü için 10 mM stok solüsyondan, 2,5 µl/ml (25 µM) etaposit (Bassi ve ark. 2002) kullanilmistir.

Çalışmamizin basinda, apoptotik DNA fragmentasyonunun belirlenmesi için bir ön çalışma yapilmistir. Bu amaçla, fenol gerektirmeyen ve islem basamaklari kısa olan, Clarke ve ark. (1999)'nin yöntemi uygulanmistir. Sayılarak ekilen hücreler, yukarida açıkladigi sekilde UV uygulaması ve belirtilen inkübasyon sürelerinin sonunda, tripsinlenerek bir tüp içinde toplanmis ve 2 kez 1X PBS ile yikanmistir. Ardından hücreler, ependorf tüp içinde 1×10^6 hücre olacak sekilde sayilmis ve 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8), %0,5 N-lauryl sarcosine ve 0,5 mg/ml proteinaz K içeren DNA liziz karisimi içinde 1 saat süreyle 50°C'de inkübe edilmişlerdir. 10µl 0,5 mg/ml ribonükleaz A ilave edildikten sonra aynı sıcaklıkta 1 saat daha inkübe edilmişler ve sürenin sonunda sıcaklık 50°C'ye çıkartılarak her bir örnege 10µl jele yükleme solüsyonu (10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8, %1 low melting agaroz, %0,25 brom fenol mavisi ve %40 sükröz) eklenmistir. 15 dk bu sıcaklıkta inkübe olan DNA örnekleri %2'lik agaroz jele kuru olarak yüklenmiş ve 1X TBE tamponu varliginda 40V akim uygulayarak yürütölmüştür. 1µg/ml EB ile boyanarak UVP jel görüntöleme sistemi ile fotografi çekilmistir. Uygulanan bu DNA izolasyonu yönteminde kontrol DNA'lari da dahil olmak üzere bütün hücrelerin DNA'larinin rastgele parçalandigi (smear) görölmüştür (Sekil 3.16.B). Bu sebeple, bu yöntemin bizim çalışmamizin amacına uygun olmayacağına karar verilip, bundan sonraki çalışmalarda Cotter ve Martin (1997)'nin yöntemi uygulanmistir.

2.2.5. Immünofloresan boyama ile hücre içindeki p53 ve MDM2 proteinlerinin tespiti.

Ling - Huei Yih ve Te - Cang Lee (2000)'in yönteminden geliştirilmiştir. Hücreler yukarıda anlatıldığı gibi lamel üzerinde büyütülüp UV uygulaması yapıldıktan sonra, 12 ve 24 saat sürelerle inkübe edilmiştir. Daha sonra besiyeri uzaklaştırılıp 1X PBS ile 2 kez 1dk yıkanmıştır. Hücreleri tespit etmek için, -20⁰C' ye soğutulmuş aseton:metanol (1:1) ile 20⁰C'de, 10 dk inkübe edilmiştir. Bu asamadan sonra, bütün işlem basamakları çalkalamalı ortamda gerçekleştirilmiştir. 3 kez 5 dk 1X PBS ile yıkandıktan sonra, %1 BSA ile 37⁰C' de 30 dk bloklanmıştır. BSA'nin fazlasını uzaklaştırmak için 3 defa 5 dk sürelerle 1X PBS ile yıkandıktan sonra 37⁰C'de 1 saat süreyle antikor uygulaması yapılmıştır. Kullanılan p53 antikoruna bir fare hibridoma supernetanti olduğundan dolayı konsantrasyonu bilinmemektedir. Bu sebeple hiç seyreltmeden %100 oranında kullanılmıştır. Fare monoklonal anti MDM2 (0,2 mg/ml) ise, 1:100 oranında, %1 BSA ile seyreltilerek kullanılmıştır. Fazla antikorunu uzaklaştırmak için %1 Triton X-100/1X PBS ile 3 defa 5 dk yıkanmış ve 1:200 oranında FITC işaretli keçi anti fare ikinci antikor (goat anti Mouse IgG H&L, fluorescein conjugated) ile 37⁰C'de, 1 saat karanlık ortamda muamele edilmiştir. Bu asamadan sonra bütün işlemler karanlık odada gerçekleştirilmiştir. Bağlanmamış fazla antikorunu uzaklaştırmak için %1 Triton X-100/PBS ile 3 defa 5 dk yıkandıktan sonra 0,1 µg/ml Dapi (4,6-diamino-2-phenylindole) boyası ile çalkalamalı etüvde 37⁰C'de 1 saat karanlık ortamda boyanmıştır. Son olarak 3 kez 5dk. sürelerle karanlık ortamda 1X PBS ile yıkanan lameller, tırnak cilası ile lam'a yapıştırılarak preparat haline getirilmiştir. Boyanan hücre preparatları, Olympus BX50 ışık mikroskobu altında, antikor için, FITC-WB filtre kullanılarak, Dapi için de NU filtre kullanılarak incelenmiş ve Olympus PM-30 otomatik foto mikrografi aracı ile 40X büyütmede fotoğraflanmıştır.

Ön çalışma olarak yapılan 12, 24 ve 48 saat inkübasyonlardan, en uygun sinyallerin alındığı 12 ve 24 saat inkübasyon süreleri tüm deneyler boyunca uygulanmıştır. Ayrıca ikincil antikorun özgül bağlanıp bağlanmadığını belirlemek amacıyla her deneyde paralel olarak, bir grup hücre birincil antikor ile

isaretlenmeden direk FITC isaretili keçi anti fare ikinci antikoru ile isaretlenerek preparat hazırlanmıştır. Bu hücrelerde ikinci antikor hiçbir özgül olmayan bölgeye bağlanamadığından dolayı herhangi bir sinyal gözlenmemiştir.

3. BULGULAR

3.1. Apoptotik Hücrelerin Acridine Orange/Ethidium Bromide Boyama Yöntemi ile Belirlenmesi:

Fibroblast hücreler olan F2408 ve 5RP7'ler ile miyoblast hücreler olan CO25'ler farklı periyotlarda UV'ye maruz bırakıldıktan sonra 24 ve 48 saat inkübe edilmişler ve apoptosise duyarlılıklarının araştırılması amacıyla, materyal ve yöntem bölümünde anlatıldığı gibi boyanmış ve karanlık ortamda florasan mikroskopi ile incelenerek görüntülenmiştir.

3.1.1. Fibroblastlarda apoptotik hücreler

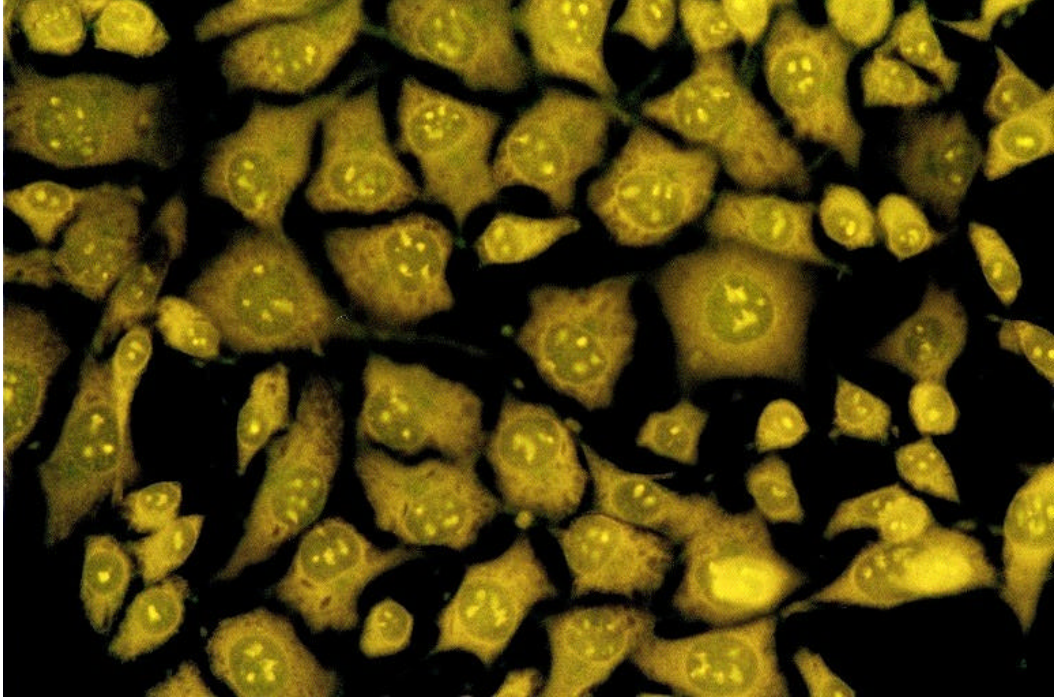
Aktif *H-ras* onkogeni içermeyen normal F2408 hücreleri normal ortamlarında 24 ve 48 saat kültüre edildikten sonra görüntülenmiştir (Şekil 3.1.A ve B). Genel olarak hücre şekilleri poligonal olup yassı hücreler şeklinde yüzeye yapışmıştır. Çekirdek-sitoplazma oranı normal ve kromatin birkaç parça halinde koyu boyanmış halde çekirdeğin ortasında yer almaktadır. Sağlıklı hücreler çekirdeği beklenildiği gibi yeşil ve sitoplazması sarı renkte gözlenmektedir.

F2408 hücrelerinin UV uygulamasından 24 saat sonraki görüntüleri Şekil 3.2.'de verilmektedir. 10 sn UV uygulanan hücreler büzülerek hacimce küçülmüşler, çekirdek morfolojileri düzensizleşmiş ve çekirdek zari kontrol hücrelere oranla oldukça belirginleşmiştir (Şekil 3.2.A ve B). 30 sn ve 1 dk UV uygulanan hücrelerde sitoplazmik büzülmenin yani sıra sitoplazmanın bir bölümünün bogumlanarak kopması ile oluşan keseler (apoptotik body) görülmektedir (Şekil 3.2.C, D, E ve F). Kromatin yine çekirdek zari etrafında yoğunlaşmış yada çekirdek içinde atmalı şeklini almıştır.

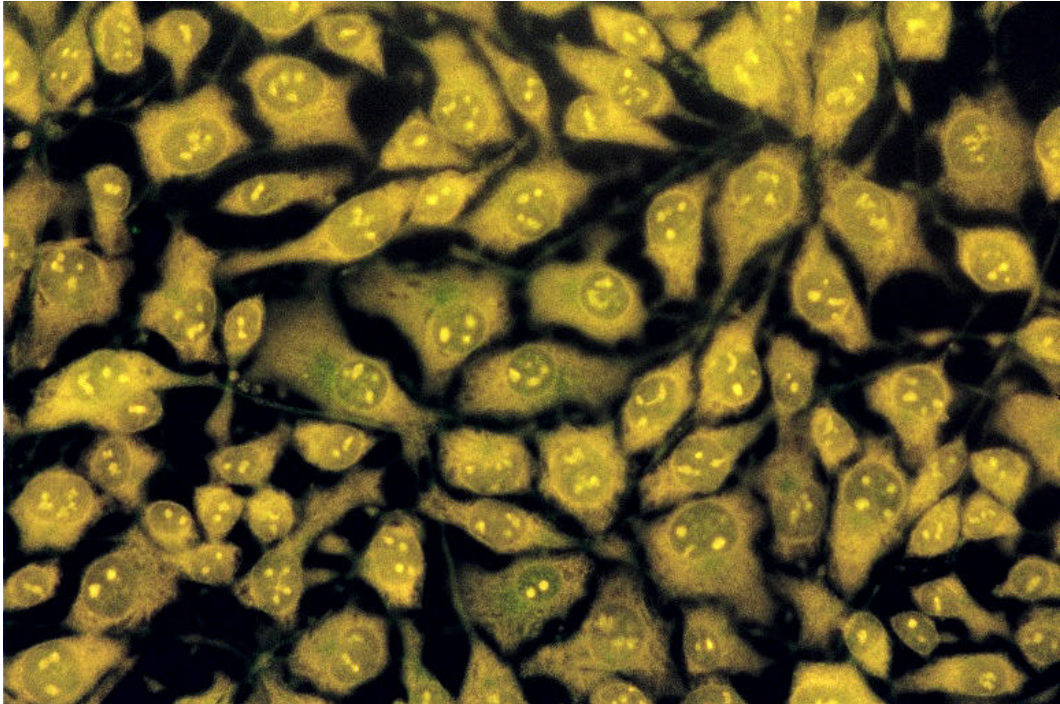
F2408 hücrelerinin UV uygulamasından 48 saat sonraki görüntüleri Şekil 3.3.'de verilmektedir. 10 sn UV uygulanan hücrelerin bazılarının erken apoptotik morfoloji olan hücre büzülmesi ve kromatin yoğunlaşması göstermelerinin yani sıra bazılarının çok parçalı çekirdek ve koful içererek hacimce büyüdükleri gözlenmiştir (Şekil 3.3.A ve B). Ayrıca yoğunlaşmış ve düzensiz şekil almış kromatin de dikkat çekmektedir. 30 sn UV uygulaması, aynı hücrelerde yukarıda

belirtilen özelliklerdeki erken apoptotik hücrelerin yoğunlugunu arttirmistir (Sekil 3.3.C ve D). 1 dk UV uygulamasinda ise hücreler digerlerine oranla daha büyük ve kromatinleri düzensiz bir sekilde yogunlasarak hücre zarina dogru çekilmis olduklari gözlenmistir (Sekil,3.3.E ve F). Sonuç olarak, F2408 hücrelerinde 1 dk UV uygulamasinin 24 saat inkübasyon sonunda daha etkili, 30 sn UV uygulamasinin ise 48 saat inkübasyondan sonra digerlerinden daha etkili bir sekilde apoptosise neden oldugu tespit edilmistir.

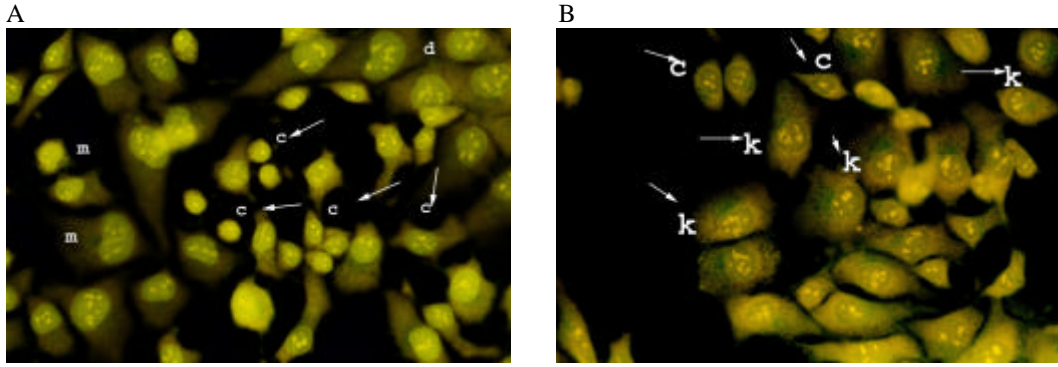
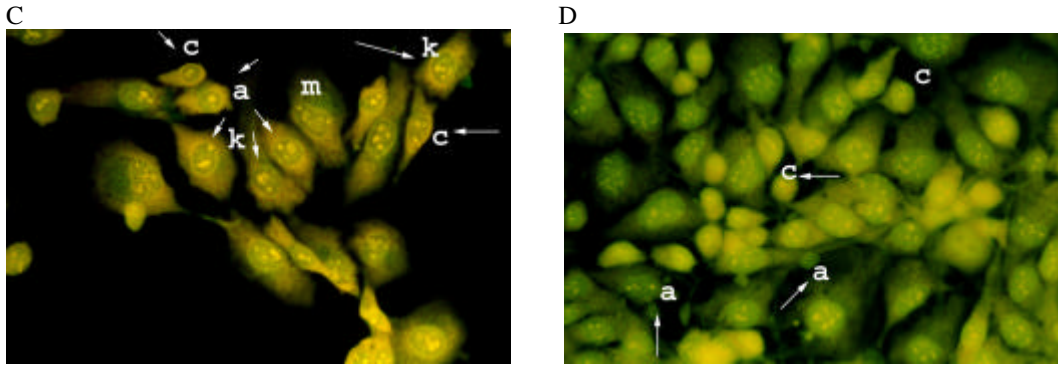
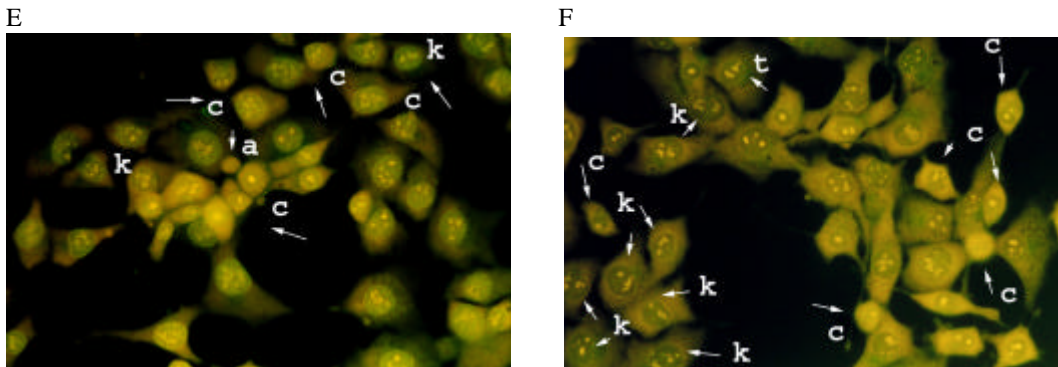
A



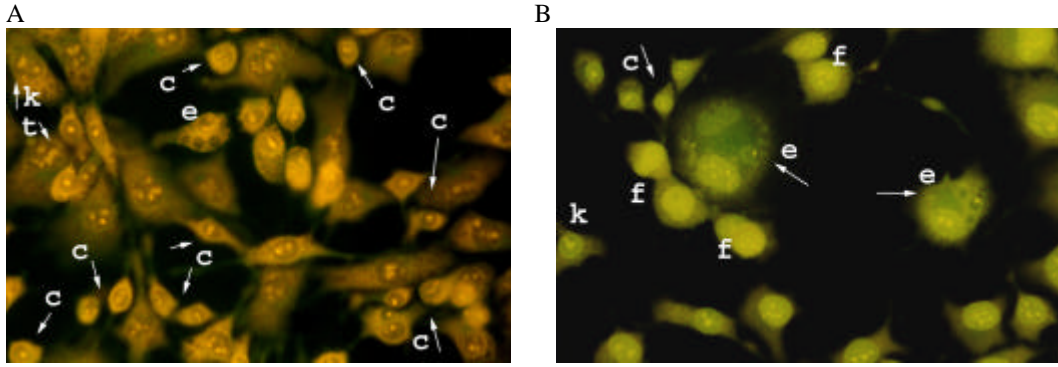
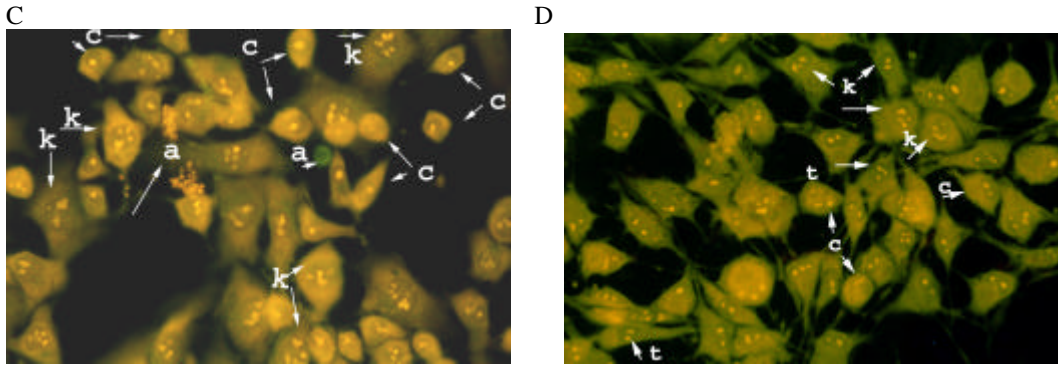
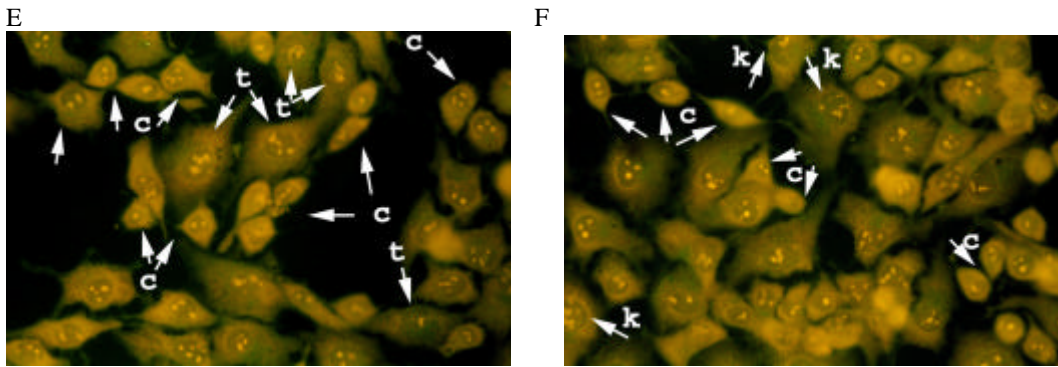
B



Sekil 3.1. F2408 hücrelerinin normal kosullarda 24 (A) ve 48 (B) saat inkübasyonundan sonra AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta elde edilmiş görüntüleri. Büyütme: 1550X

10 sn UV30 sn UV1 dk UV

Sekil 3.2. UV uygulamasının F2408 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri. UV muamelesinden 24 saat sonra hücreler AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir. a: apoptotik kese, c: büzülmüş hücre, d: dev hücre, k: çekirdek zarında yoğunlaşmış kromatin, m: anormal sekilli çekirdek, t: at nali sekilli kromatin. Büyütme: 732X

10 sn UV30 sn UV1 dk UV

Sekil 3.3. UV uygulamasinin F2408 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri. UV muamelesinden 48 saat inkübasyonundan sonra hücreler AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir. a: apoptotik kese, c: büzülmüş hücre, e: çok çekirdekli hücre, f: mitotik hücre, k: çekirdek zarında yoğunlaşmış kromatin, t: at nali şekilli kromatin. Büyütme: 732X

Aktif *H-ras* onkogeni içeren transform 5RP7 hücreleri, normal ortamlarında, materyal ve yöntemde anlatıldığı gibi 24 ve 48 saat kültüre edildikten sonra görüntülenmiştir (Sekil 3.4.A ve B). Hücreler F2408'lere göre daha küçük ve yuvarlagimsi, iki yada üç kutuplu morfolojiye sahip olup sitoplazmaları daha yoğun boyanma özelliği göstermektedir. Kromatin ise, tek parça yada iki parça halinde yoğunlaşmış olarak görünmekte ve çekirdek yesile sitoplazma ise sarıya boyanarak sağlıklı oldukları gözlenmektedir.

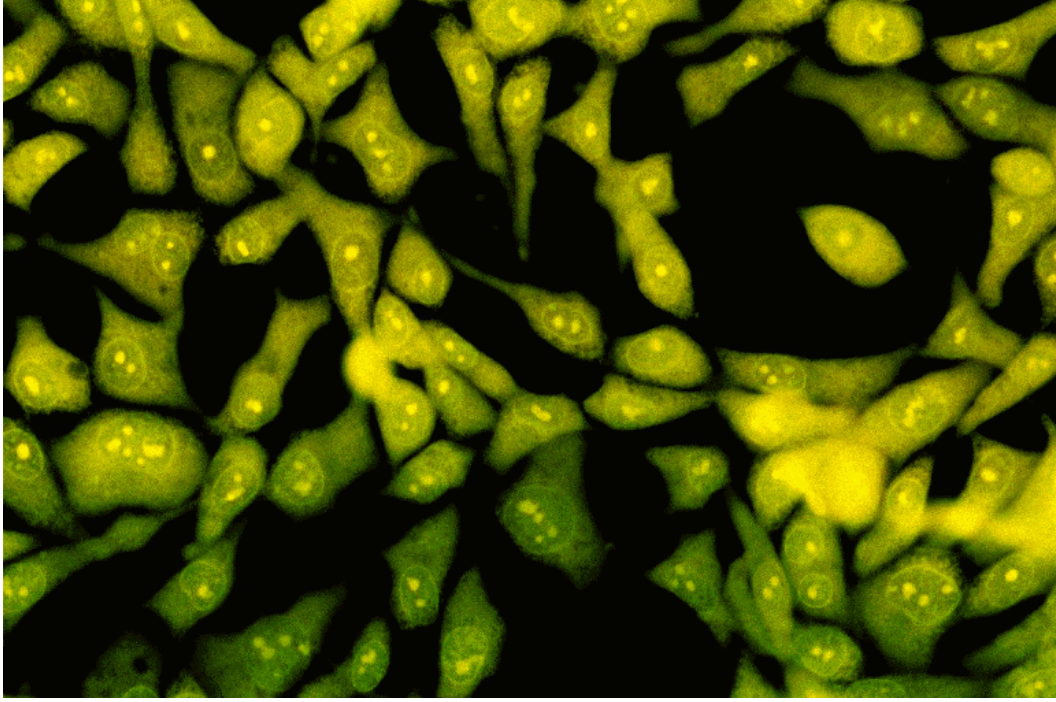
5RP7 hücrelerinin UV uygulamasından 24 saat sonraki görüntüleri Sekil 3.5.'de verilmektedir. 10 sn UV uygulanan hücrelerde belirgin bir küçülme dikkati çekmektedir (Sekil.3.5.A ve B). Sitoplazmanın büzülmesi sonucunda sitoplazma çekirdek oranı değişmiş, kromatin birkaç parça halinde yoğunlaşmış ama çekirdek zarına çekilme gözlenmemiştir. Ayrıca bu hücrelerin yani sıra, nadiren çok fazla büyümüş, çok sayıda çekirdek içeren dev hücrelere de rastlanmıştır (Sekil.3.5.A). 30 sn UV uygulanmış hücrelerin büzüldüğü ve çekirdek etrafındaki sitoplazmanın azaldığı gözlenmiştir (Sekil 3.5.C ve D). Bazı hücrelerde ise çekirdek etrafında sitoplazma toplanarak apoptotik cepler oluşturmuştur. 1 dk UV uygulanmış hücrelerde ise hacimce büyümüş olan erken nekrotik hücrelere (Sekil 3.5.F) ve bölünmekte olan hücrelere de rastlanmıştır (Sekil 3.5.E).

5RP7 hücrelerinin UV uygulamasından 48 saat sonraki görüntüleri Sekil 3.6.'da verilmektedir. 10 sn UV uygulanan hücrelerin büzüldüğü ve bunların bazılarında sitoplazmanın toplanarak apoptotik keseler oluşturdukları gözlenmiştir (Sekil 3.6.A ve B). 30 sn UV uygulamada ise, kromatinin çekirdek zarına göç edip yoğunlaşmıştır (Sekil 3.6.C ve D). 1 dk UV uygulanmış hücreler incelendiğinde hücrelerin neredeyse tamamının apoptotik evreye girdiği görülmektedir (Sekil 3.6.E ve F). Bu preparatlarda çok sayıdaki büzülüp yuvarlaklaşmış hücre, apoptotik kese, ve yoğunlaşmış kromatin çok belirgin olarak tespit edilmiştir.

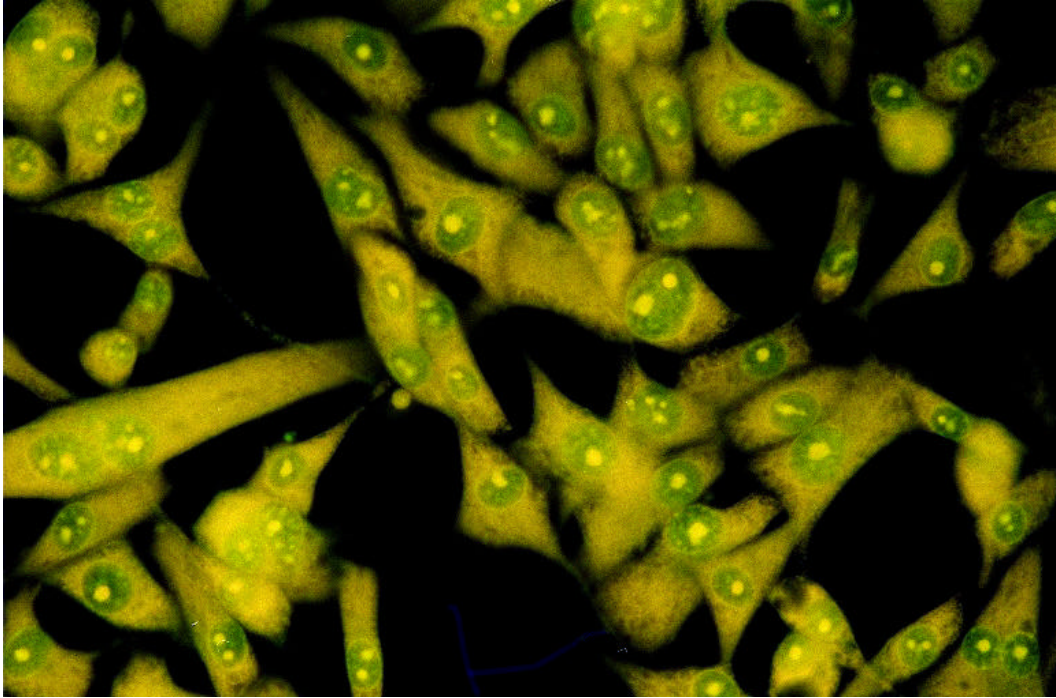
Sonuç olarak 5RP7 hücrelerinde 48 inkübasyon süresi, 24 saate göre daha çok apoptotik etki oluşturmuştur. 30 sn UV uygulamasının, 24 saat inkübasyondan sonra daha etkili, 10 sn UV uygulamasının ise 48 saat inkübasyondan sonra diğerlerinden daha etkili bir şekilde apoptosise sürüklediği

tespit edilmistir. Ayrica UV uygulanmis 5RP7 hücreleri, F2408 hücrelerine göre genelde daha küçük ve çekirdek sinirlari daha belirgin olarak gözlenmis ve apoptosise daha çok sürüklenmistir.

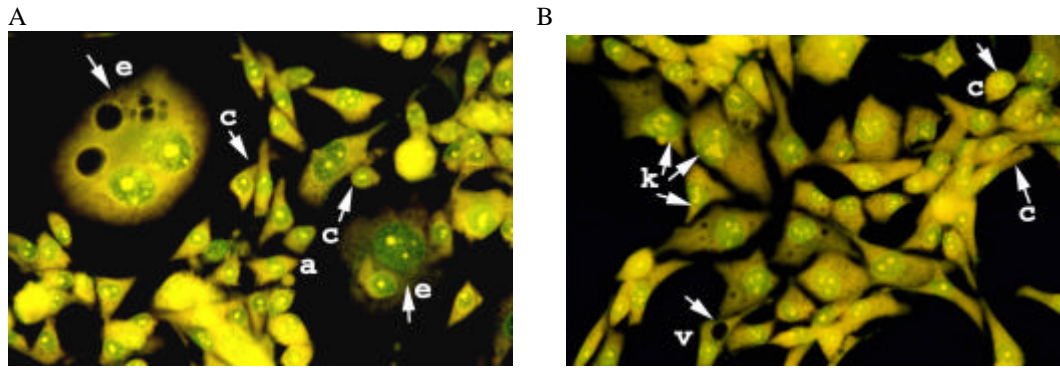
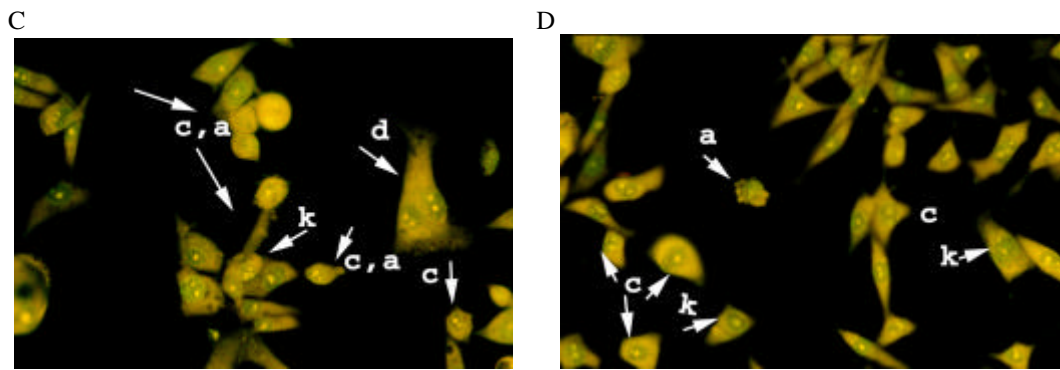
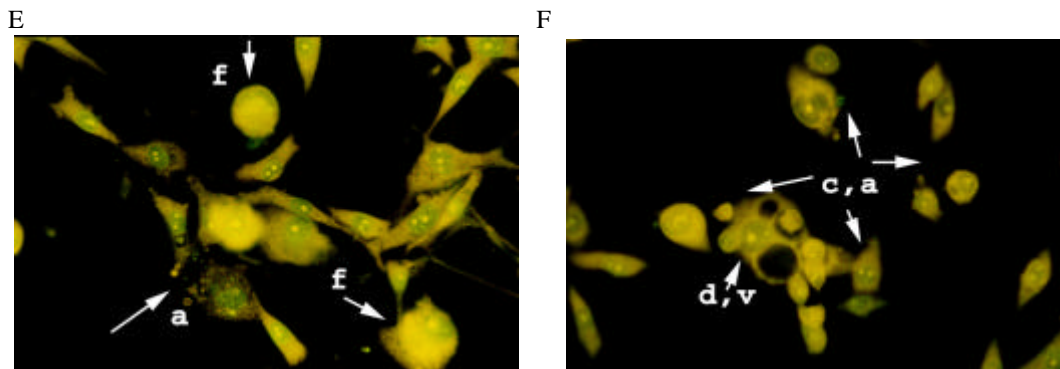
A



B

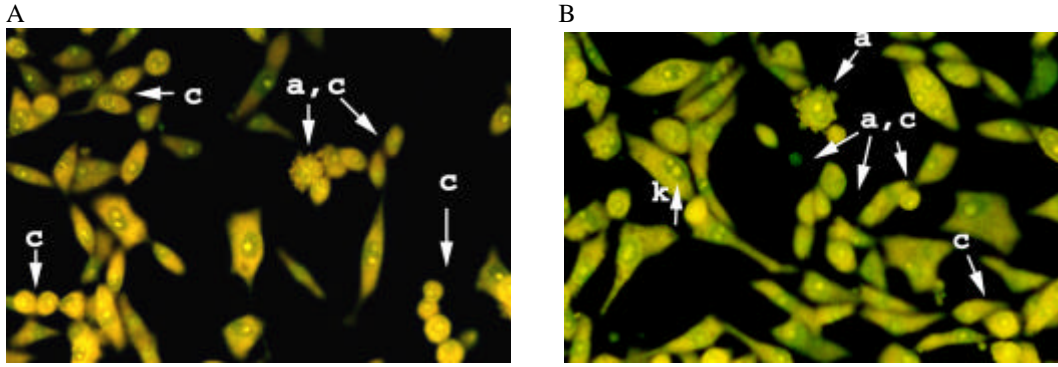


Sekil 3.4. 5RP7 hücrelerinin normal kosullarda 24 (A) ve 48 (B) saat inkübasyonundan sonra AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta elde edilmiş görüntüleri. Büyütme: 1550X

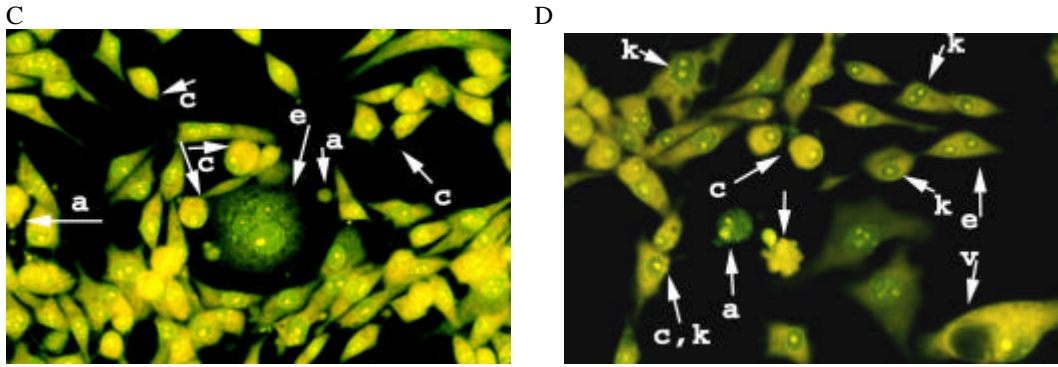
10 sn UV30 sn UV1 dk UV

Sekil 3.5. UV uygulamasinin 5RP7 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri. UV muamelesinden 24 saat sonra hücreler AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir. a: apoptotik kese, c: büzülmüş hücre, d: dev hücre, e: çok çekirdekli hücre, f: mitotik hücre, k: çekirdek zarında yoğunlaşmış kromatin, v: koful. Büyütme: 732X

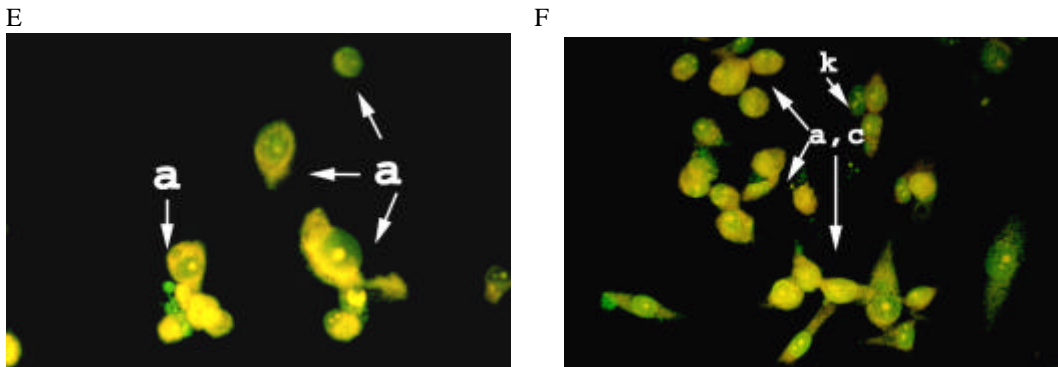
10 sn UV



30 sn UV



1 dk UV



Sekil 3.6. UV uygulamasinin 5RP7 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri. UV muamelesinden 48 saat sonra hücreler AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir. a: apoptotik kese, c: büzülmüş hücre, e: çok çekirdekli hücre, k: çekirdek zarında yoğunlaşmış kro matin, v: koful. Büyütme: 732X

3.1.2. Miyoblastlarda apoptotik hücreler

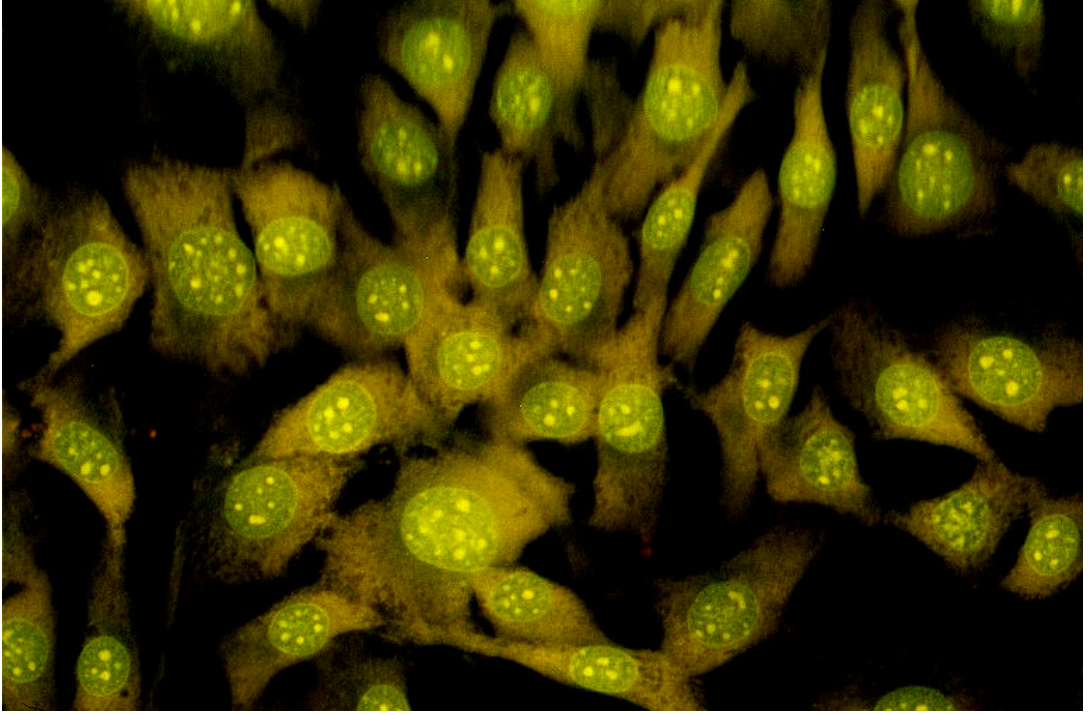
Bir steroid hormon olan deksametazon ile uyarılabilen insan *N-ras* onkogeni içeren CO25 miyoblastları normal ortamlarında (Dex-), materyal ve yöntemde belirtildiği gibi 24 ve 48 saat kültüre edildikten sonra görüntülenmiştir (Sekil 3.7.A ve B). Poligonal şeklindeki hücreler, yassı bir şekilde yüzeye yapışmış, çekirdek genelde hücrenin merkezinde lokalize olmuş ve kromatin çekirdek içerisinde birkaç parça olarak koyu boyanmış bölgeler halinde görülmüştür.

CO25 hücrelerinin UV uygulamasından 24 saat sonraki görüntüleri Sekil 3.8.'de verilmektedir. 10 sn ve 30 sn UV uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiş hücrelerde, kromatin çekirdek zari etrafında yoğunlaşmış ve hücre sitoplazması büzülmuş halde gözlenmiştir. Çekirdek morfolojisi genellikle bozulmuş olup, çekirdeği çok parçaya bölünmüş hücreler tespit edilmiştir (Sekil 3.8.A-D). Sekil 3.8.E ve F'de görüldüğü gibi 1 dk UV uygulamasının genel olarak hücre ve çekirdek morfolojisini bozduğu belirlenmiştir. Çekirdek-sitoplazma oranının bozulduğu, kromatinin çekirdek zarında lokalize olduğu ve şekilsiz çekirdek morfolojisinin oluştuğu gözlenmiştir (Sekil 3.8.E ve F)

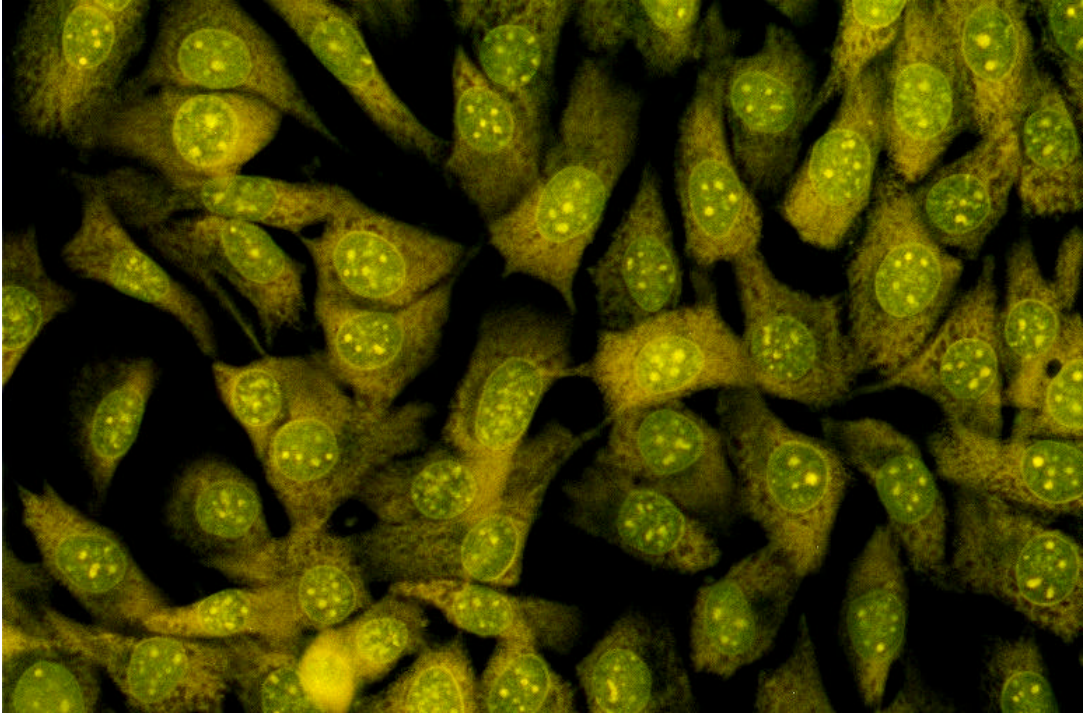
CO25 hücrelerinin UV uygulamasından 48 saat sonraki görüntüleri Sekil 3.9.'da verilmektedir. Burada genel olarak, farklı büyüklüklerde çok çekirdekli dev hücrelerde artış gözlenmiştir. Kromatinin çekirdek zarında yoğunlaştığı büzülmiş hücreler, şekilsiz çekirdekli hücreler, her üç farklı UV uygulama süresinde görülen ortak özelliklerdir (Sekil 3.9.A-F). 10 sn UV uygulanan hücrelerde koful oluşumu gözlenirken 1 dk UV uygulaması yapılmış hücrelerde, at nalı şeklinde kromatin yoğunlaşması ve apoptotik kese meydana gelmiştir (Sekil 3.9.E ve F).

Sonuç olarak CO25 hücreleri UV'ye maruz kaldıktan 48 saat sonra farklı büyüklükte çok çekirdekli dev hücre morfolojisine sahip olmaktadır. Ayrıca 24 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak bozulması ve düzensizleşmesi görülürken 48 saat sonra, özellikle 1 dk UV uygulamasında, erken apoptosis evresini gösteren kromatin parçalanması ve yoğunlaşması dikkati çekmektedir

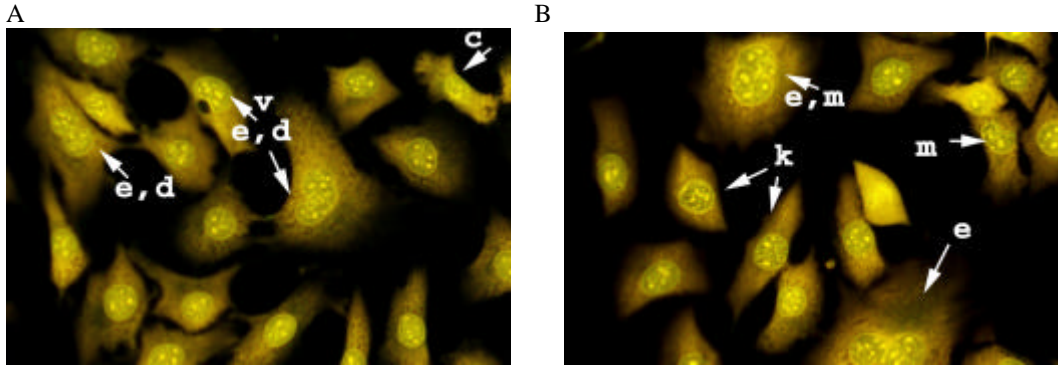
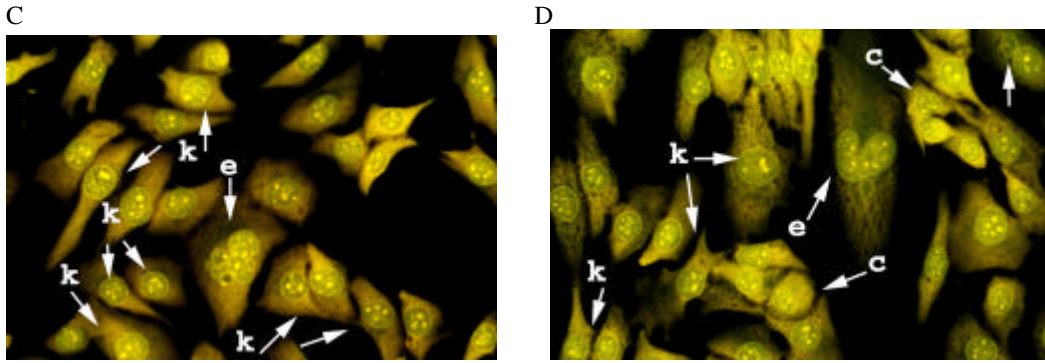
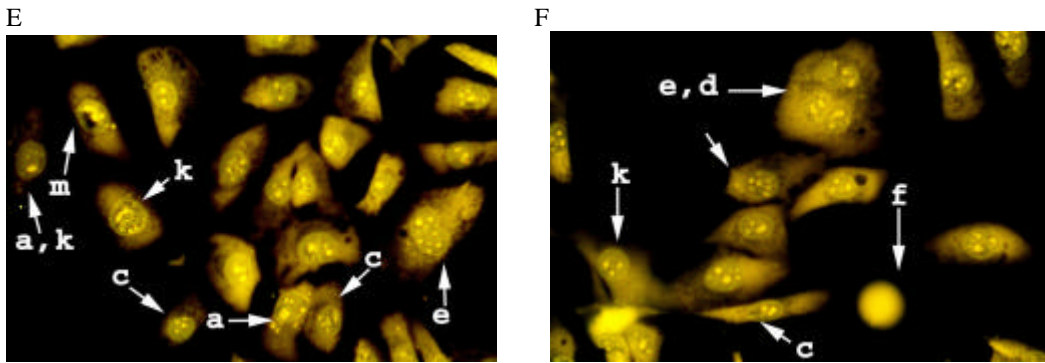
A



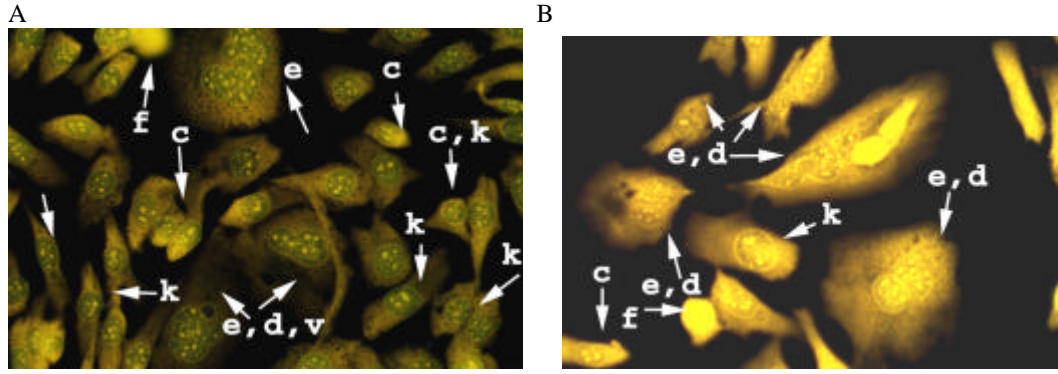
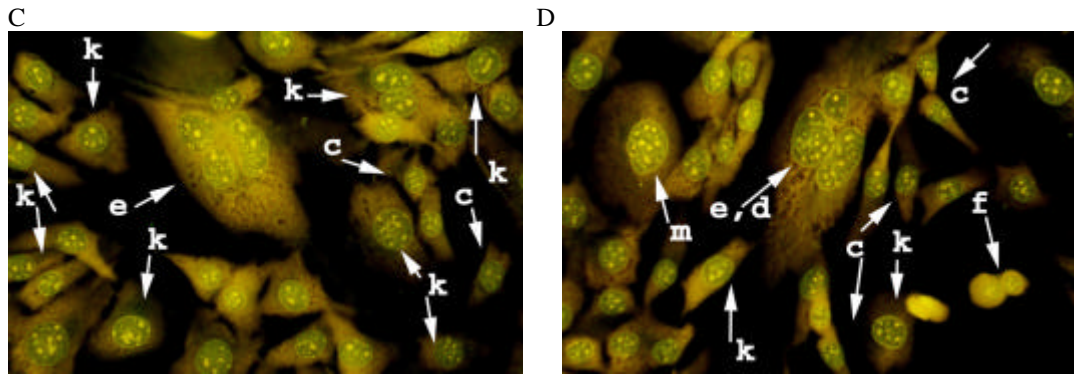
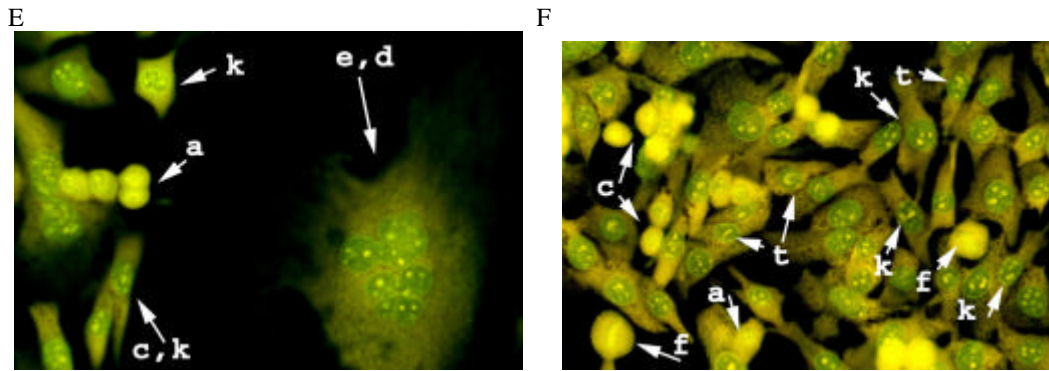
B



Sekil 3.7. CO25 (dex-) hücrelerinin normal kosullarda 24 (A) ve 48 (B) saat inkübasyonundan sonra AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta elde edilmiş görüntüleri. Büyütme: 1550X

10 sn UV30 sn UV1 dk UV

Sekil 3.8. UV uygulamasinin CO25 (Dex-) hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri. UV muamelesinden 24 saat sonra hücreler AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir. a: apoptotik kese, c: büzülmiş hücre, d: dev hücre, e: çok çekirdekli hücre, f: mitotik hücre, k: çekirdek zarında yoğunlaşmış kromatin, m: anormal şekilli çekirdek, v: koful. Büyütme: 732X

10 sn UV30 sn UV1 dk UV

Sekil 3.9. UV uygulamasının CO25 (Dex-) hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri. UV muamelesinden 48 saat sonra hücreler AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir..a: apoptotik kese, c: büzülmüş hücre, d: dev hücre, e: çok çekirdekli hücre, f: mitotik hücre, k: çekirdek zarında yoğunlaşmış kromatin, m: anormal şekilli çekirdek, t: at nali şekilli kromatin, v: koful. Büyütme: 732X

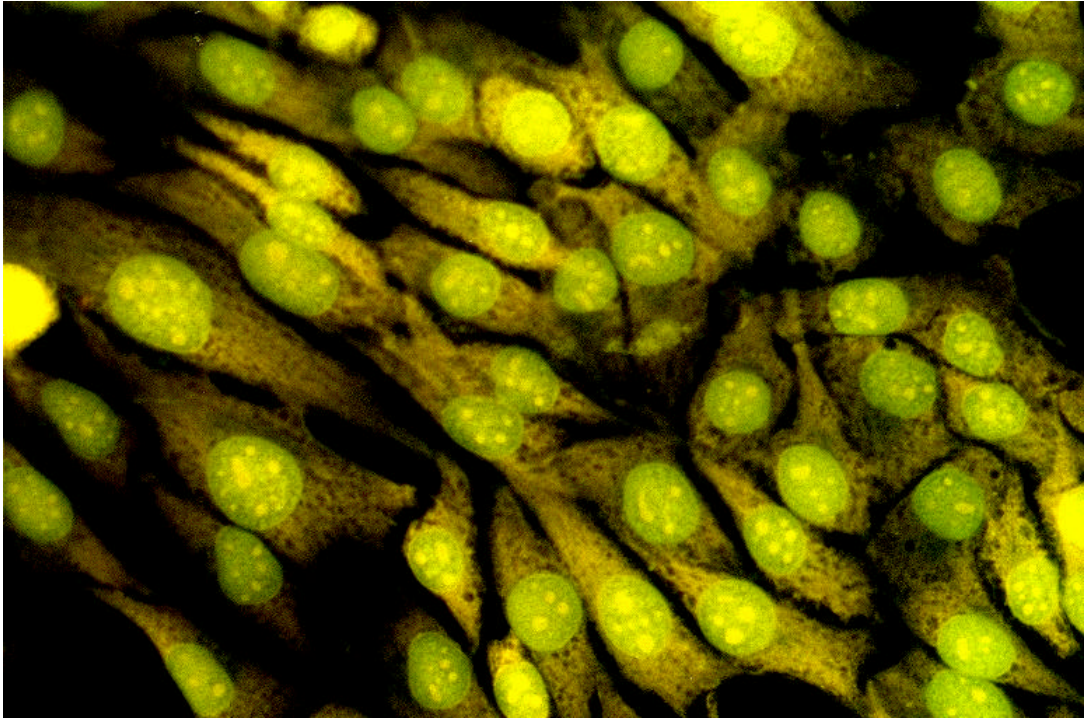
N-*ras* onkogeninin aktivasyonunu saglamak için dekzametazon varliginda (Dex+) inkübe edilen CO25 miyoblastlar materyal ve yöntemde anlatildigi gibi normal ortamlarinda 24 ve 48 saat kültüre edildikten sonra boyanmis ve karanlik ortamda florasan mikroskopi ile incelenerek görüntülenmistir (Sekil 3.10.A veB). Saglikli hücrelerin çekirdekleri yesil, sitoplazmaları sari renkte boyanmis olup Dex- hücrelerle benzer özellikler göstermistir.

CO25 Dex+ hücrelerinin UV uygulamasindan 24 saat sonraki görüntüleri Sekil 3.11.'de verilmektedir. Genel olarak her üç UV uygulamasinda da sitoplazma büzülmesi ve çekirdek zarindaki kromatin yogunlasmasi yaygin olarak gözlenmektedir. Çok çekirdekli dev hücre ve at nali sekilli kromatin, 30 sn ve 1 dk UV uygulamasinin her ikisinde (Sekil 3.11.C-F) gözlenirken apoptotik kese ve anormal sekilli çekirdek olusumu yalnızca 30 sn UV uygulanan hücrelerde (Sekil 3.11.C ve D) tespit edilmistir. Apoptotik keseler, hücreler ve bunun yani sıra parçalanmis çekirdege sahip hücrelerde artis olmustur. 1 dk UV uygulanmis hücrelerde ise hücrelerin çogunlugu öldüğünden dolayi az sayida olan hücreler genislemis ve çekirdeklerinde parçalanmalar olusmustur.

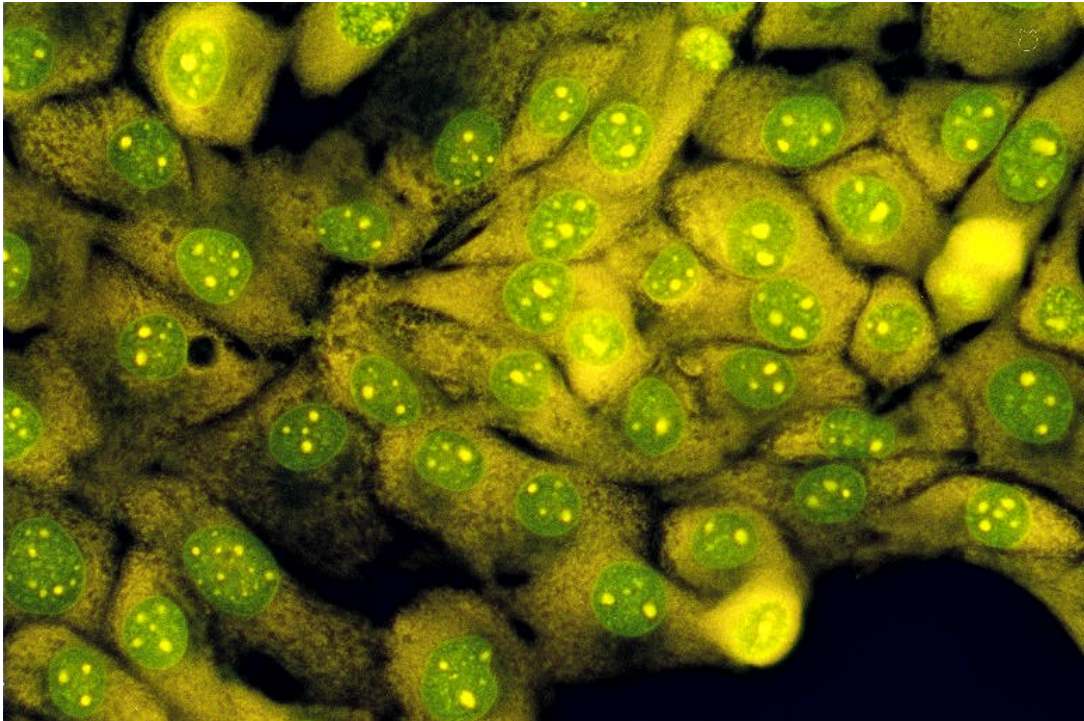
CO25 Dex+ hücrelerinin UV uygulamasindan 48 saat sonraki görüntüleri Sekil 3.12'de verilmektedir. Çekirdek zarinda yogunlasmis kromatin ve çok çekirdekli hücre morfolojisi her üç UV uygulamasinda gözlenirken (Sekil 3.12.A-F), 10 sn ve 1 dk UV uygulananlarda (Sekil 3.12. A, B ve E, F) büzölmüs hücreye rastlanmistir. Bunlarin yani sıra 30 sn UV uygulamada (Sekil 3.12.C ve D) at nali sekilli kromatin olusumu gözlenirken 1 dk uygulamada (Sekil 3.12.E ve F) anormal sekilli dev hücre ve çok sayida apoptotik keseler olusmustur.

Sonuç olarak CO25 Dex+ hücrelerinin 24 saat ve 48 saat UV uygulamaları karsilastirildiginda; apoptotik etkiler, doza bagli olarak 24 saat sonra daha yogun olarak gözlenmistir. *ras*'in aktif oldugu hücrelerde UV uygulaması apoptotik hücre olusumunu artirmis *ras* inaktif hücrelerde ise daha çok çekirdek parçalanması ve hücre büyüklüğünde artis tespit edilmistir.

A

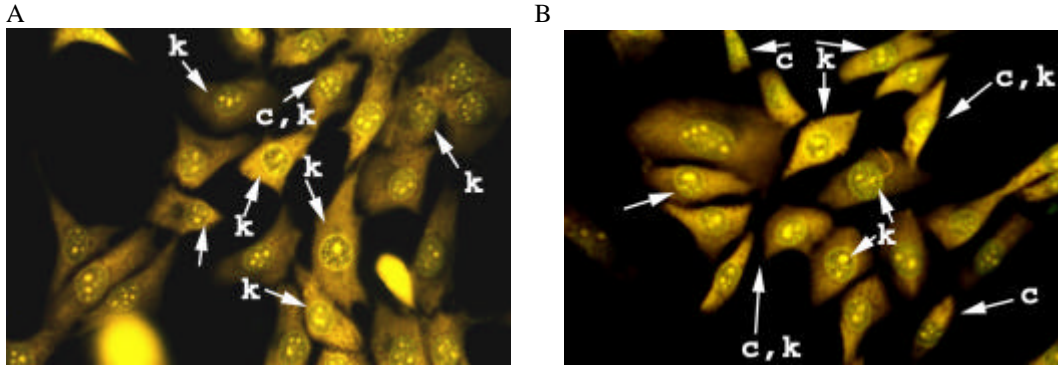


B

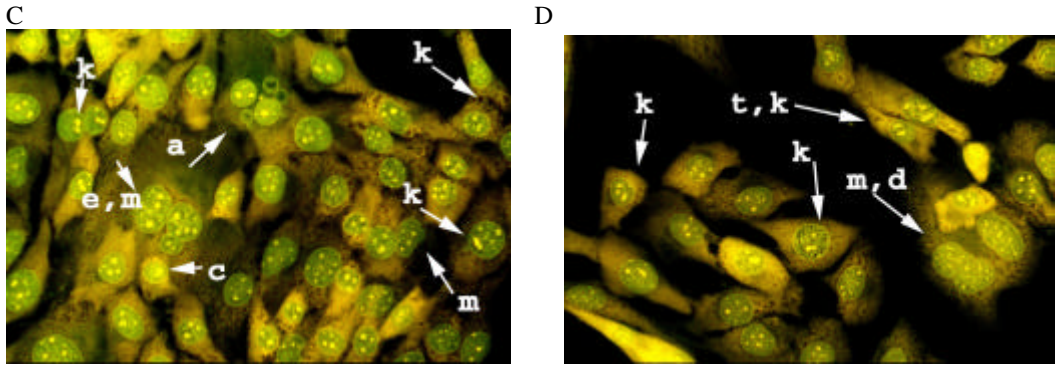


Sekil 3.10. CO₂5 Dex (+) hücrelerinin normal kosullarda 24 (A) ve 48 (B) saat inkübasyonundan sonra AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta elde edilmiş görüntüleri. Büyütme: 1550X

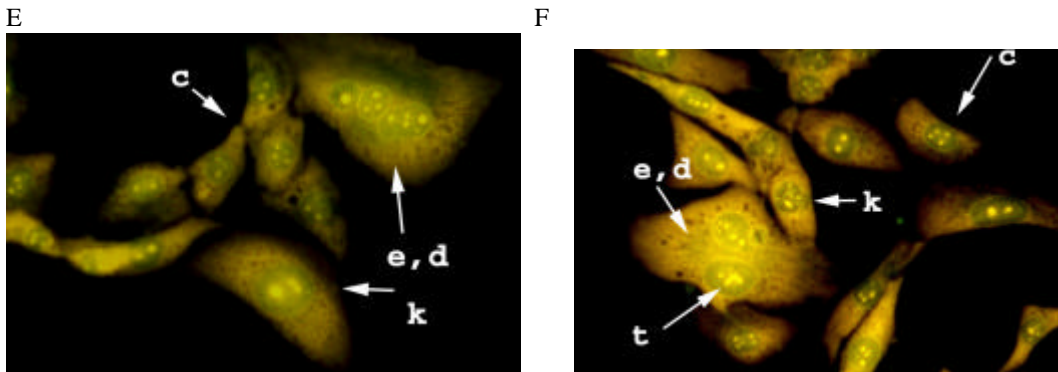
10 sn UV



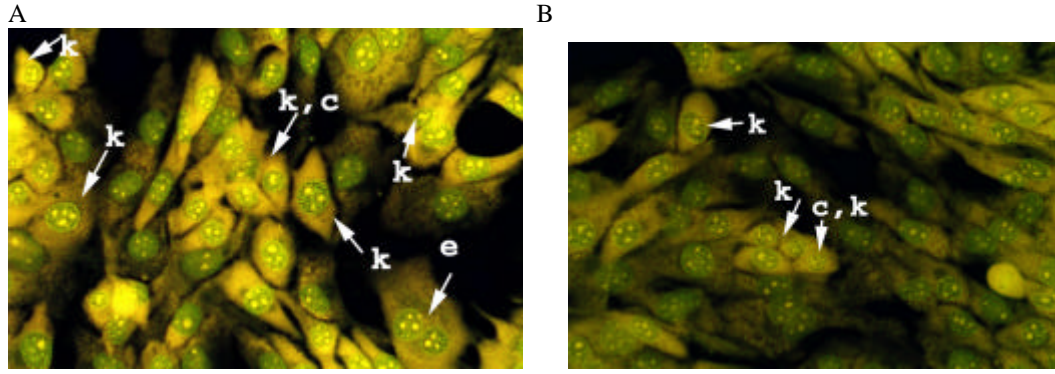
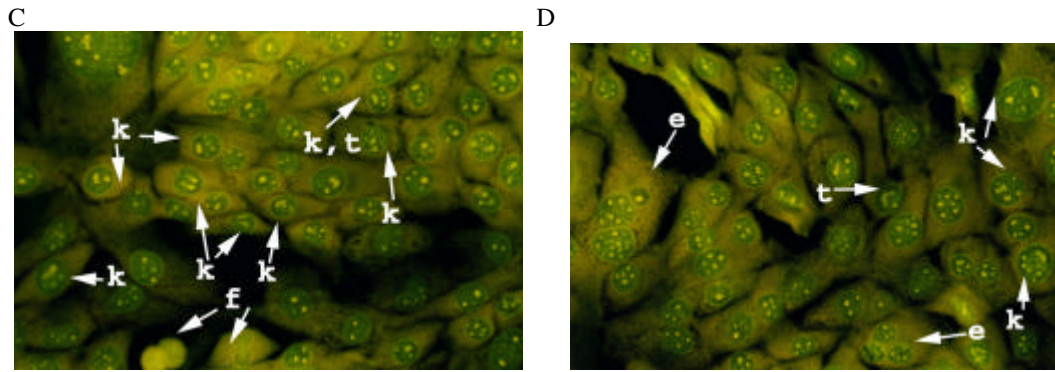
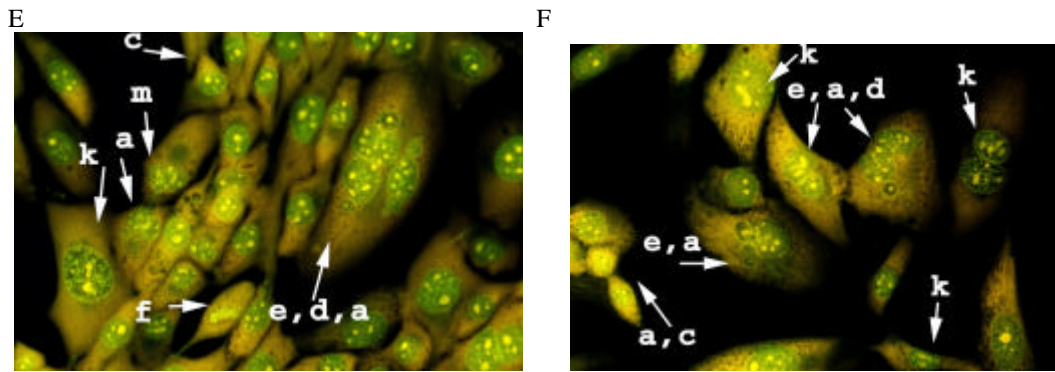
30 sn UV



1 dk UV



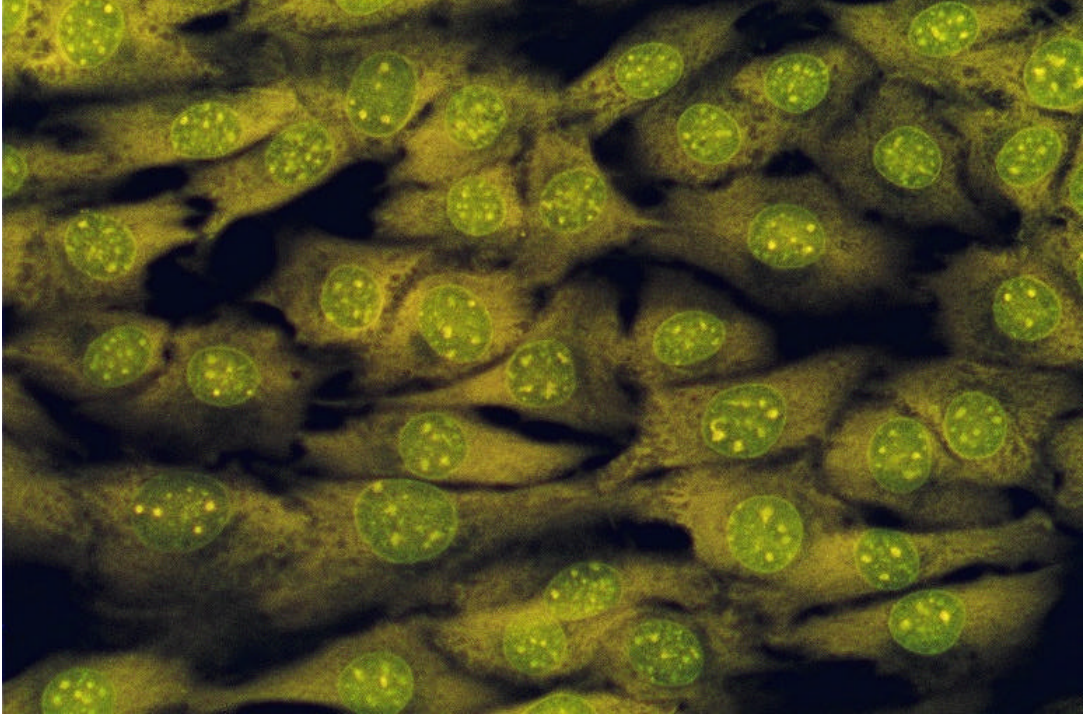
Sekil 3.11. UV uygulamasının CO25 (dex+) hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri. UV muamelesinden 24 saat sonra hücreler AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir a: apoptotik kese, c: büzülmüş hücre, d: dev hücre, e: çok çekirdekli hücre, k: çekirdek zarında yoğunlaşmış kromatin, , m: anormal şekilli çekirdek, t: nali şekilli kromatin. Büyütme: 732X

10 sn UV30 sn UV1 dk UV

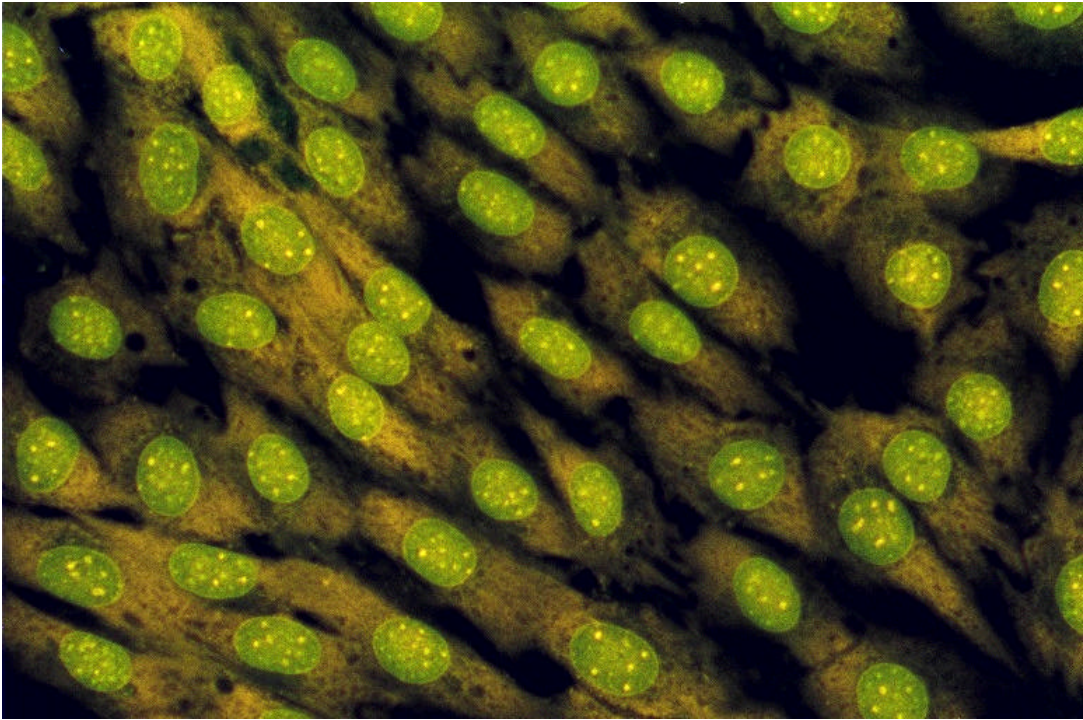
Sekil 3.12. UV uygulamasinin CO25 (dex+) hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri. UV muamelesinden 48 saat sonra hücreler AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir a: apoptotik kese, c: büzölmüş hücre, d: dev hücre, e: çok çekirdekli hücre, f: mitotik hücre, k: çekirdek zarında yoğunlaşmış kromatin, m: anormal şekilli hücre, t: at nali şekilli hücre. Büyütme: 732X

CO25 hücrelerin orijini olan ve N-ras onkogenini içermeyen C2 miyoblastları materyal ve yöntemde anlatıldığı gibi normal ortamlarında 24 ve 48 saat kültüre edildikten sonra boyanmış ve karanlık ortamda floresan mikroskopi ile incelenerek görüntülenmiştir. Hücreler genel olarak Poligonol yada iki kutuplu olup, yassı bir şekilde yüzeye yapışmış, çekirdek genelde hücrenin merkezinde lokalize olmuş ve kromatin çekirdek içerisinde birkaç parça olarak koyu boyanmış bölgeler halinde görülmektedir (Sekil 3.13.A ve B). 10 sn UV uygulanmış 24 saat inkübe edilmiş hücrelerde, çekirdek zari oldukça belirginleşmiş, kromatin bu bölgede yoğunlaşmış ve bir kısmı da düzensiz şekiller oluşturarak çekirdek içinde dağınık olarak gözlenmiştir. Ayrıca büzülmüş hücre ve çok çekirdekli dev hücre morfolojisi de tespit edilmiştir (Sekil 3.14. A ve B). 30 sn ve 1 dk UV uygulamalarında 10 sn'dekine benzer kromatin görüntülerine rastlanırken, koful içeren çok çekirdekli dev hücreler ve nadiren de büzülmüş hücreler belirlenmiştir (Sekil 3.14.C-F). 48 saat sonundaki hücrelerde, 10 sn UV etkisiyle hücrenin kromatini çekirdek zari boyunca inci gibi dizilmiş olup, sitoplazma büzülmüş ve erken apoptotik evrede sitoplazma sarı turuncu boyanmıştır (Sekil 3.15.A ve B). 30 sn ve 1 dk UV uygulandığında (Sekil 3.15.C-F) kromatin çekirdek zarında yoğunlaşmış ve bir kısmı da düzensiz şekiller oluşturarak çekirdek içinde dağınık olarak gözlenirken koful içeren anormal şekilli hücreler ve büzülmüş hücreler tespit edilmiştir.

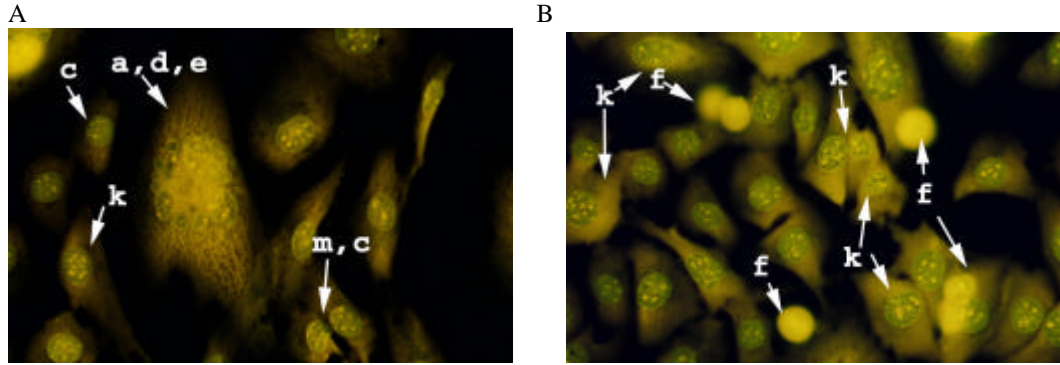
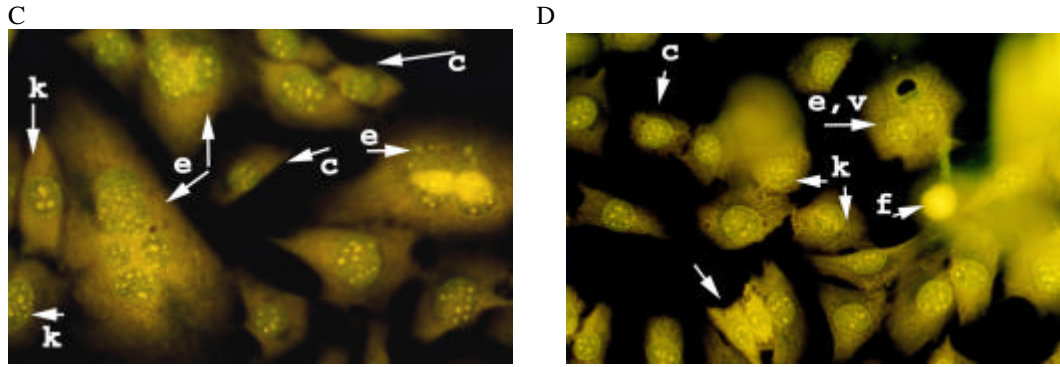
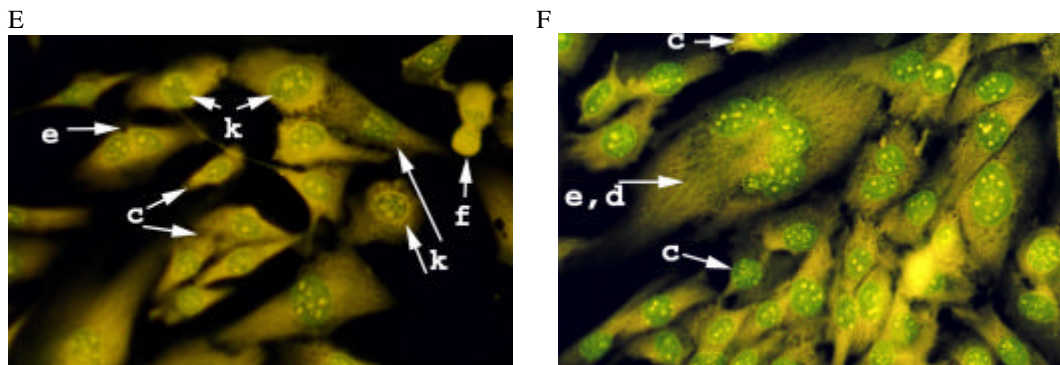
A



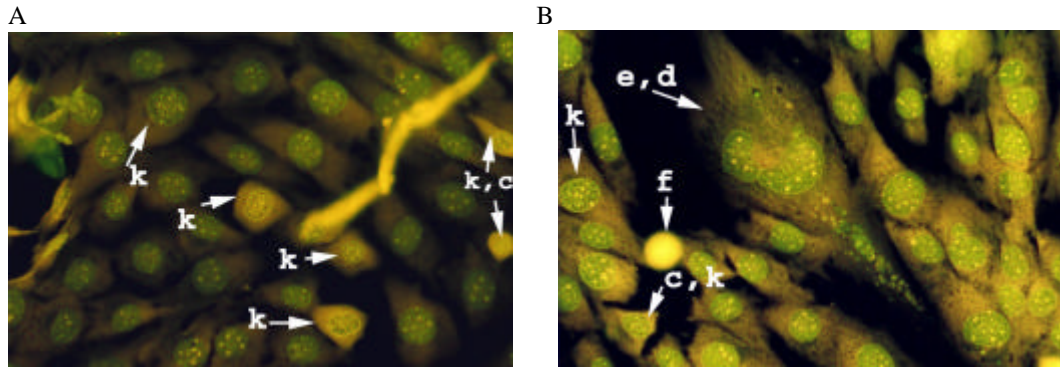
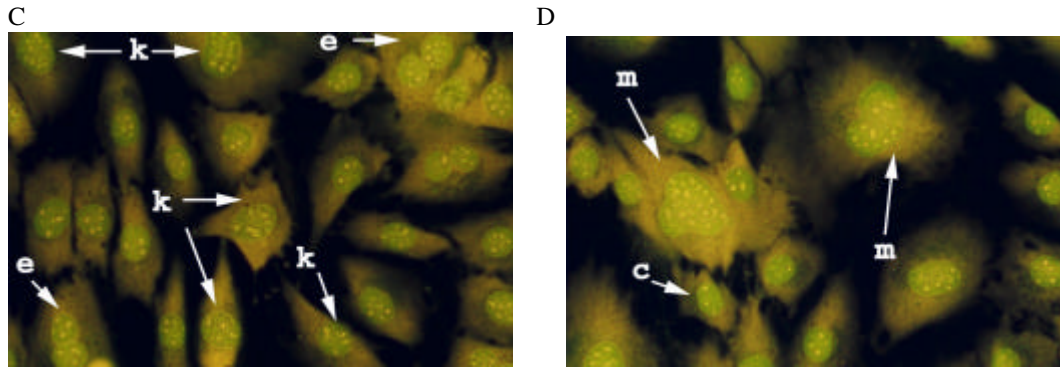
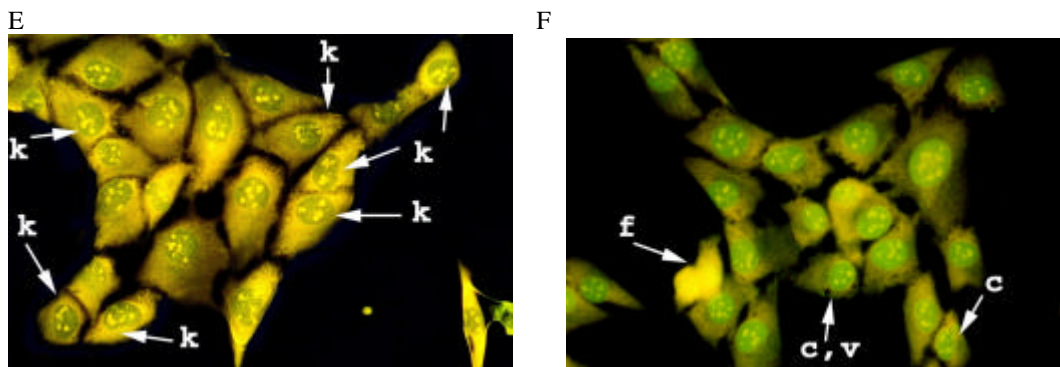
B



Sekil 3.13. C2 hücrelerinin normal kosullarda 24 (A) ve 48 (B) saat inkübasyonundan sonra AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta elde edilmiş görüntüleri. Büyütme: 1550X

10 sn UV30 sn UV1 dk UV

Sekil 3.14. UV uygulamasının C2 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri. UV muamelesinden 24 saat sonra hücreler AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir. a: apoptotik kese, c: büzülmüş hücre, d: dev hücre, e: çok çekirdekli hücre, f: mitotik hücre, k: çekirdek zarında yoğunlaşmış kromatin, m: anormal şekilli çekirdek, v: koful. Büyütme: 732X

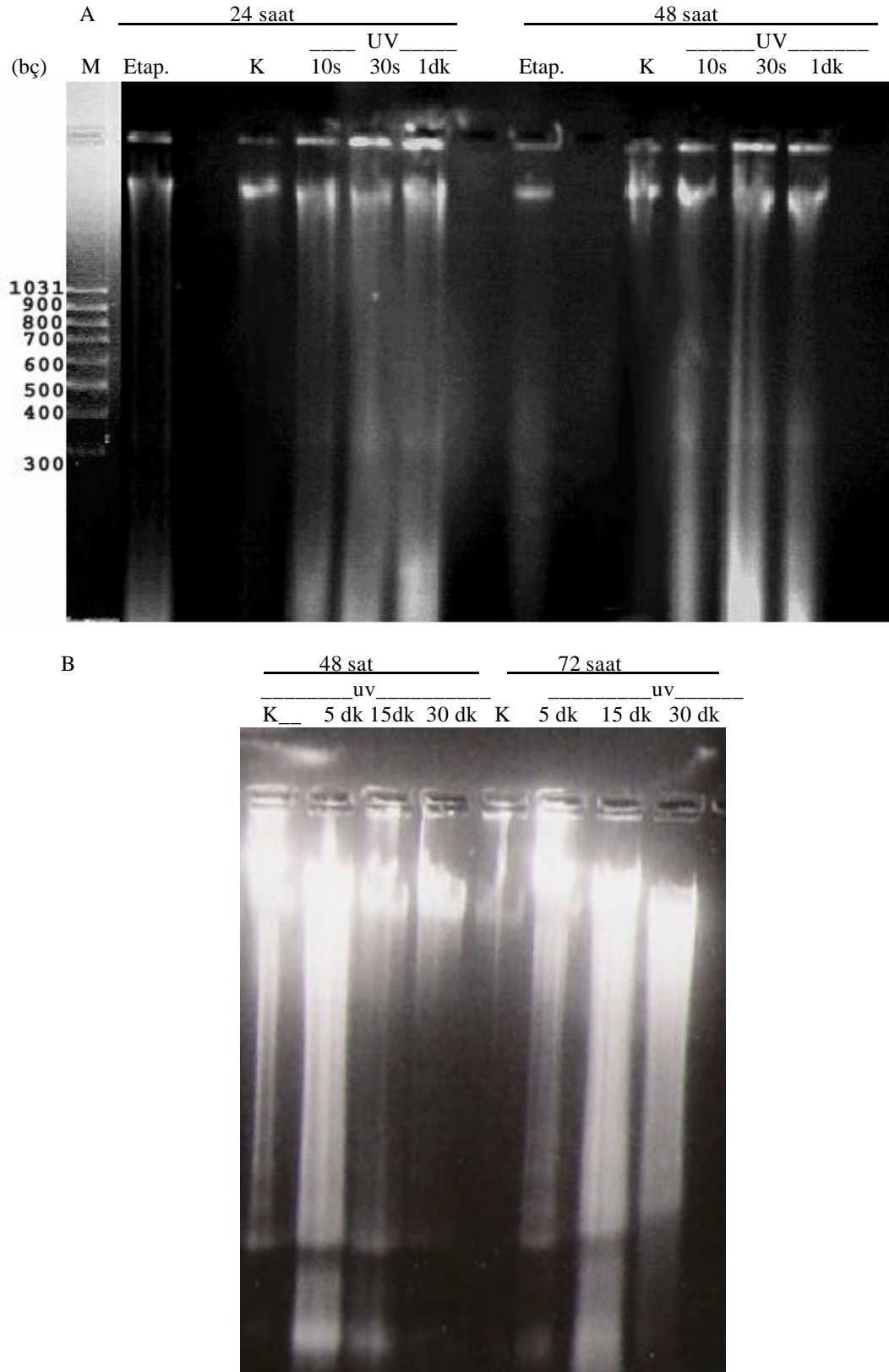
10 sn UV30 sn UV1 dk UV

Sekil 3.15. UV uygulamasinin C2 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri. UV muamelesinden 48 saat inkübasyonundan sonra hücreler AO/EB ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir. c: büzölmüş hücre, d: dev hücre, e: çok çekirdekli hücre, f: mitotik hücre, k: çekirdek zarında yoğunlaşmış kromatin, m: anormal şekilli çekirdek. Büyütme: 732X

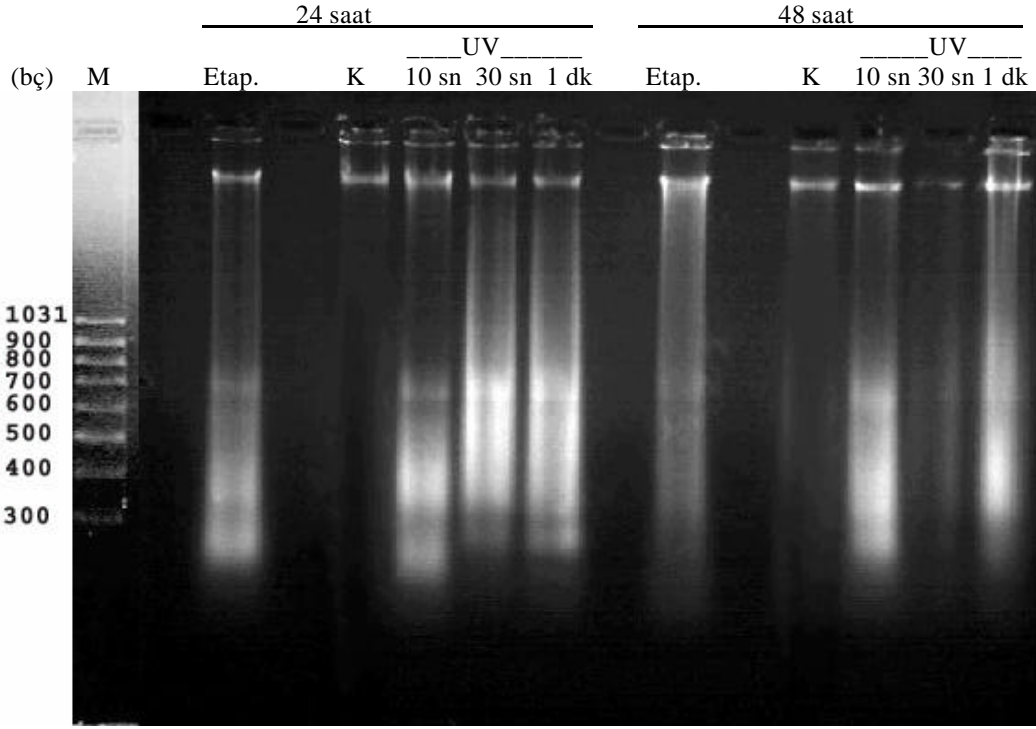
3.2. DNA fragmentasyonu'nun belirlenmesi

UV ile muamele edilmiş *ras* transform hücrelerde olabilecek apoptotik DNA fragmentasyonu üç hücre tipinde agaroz jel elektroforezi yöntemiyle araştırılmıştır. Deneylerde pozitif kontrol olarak çeşitli hücrelerde apoptotik DNA fragmentasyonuna neden olduğu bilinen 25 μ M etaposit paralel olarak hücrelere uygulanmıştır. F2408 ve 5RP7 fibroblastları ile Dex varlığı yada yokluğunda büyütülen miyoblast hücreleri farklı periyotlarla UV'ye ve etaposite maruz bırakıldıktan 24 ve 48 saat sonra materyal ve yöntem bölümünde belirtildiği gibi DNA'ları izole edilip agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Şekil 3.16.A'da görüldüğü gibi UV uygulaması F2408 hücrelerde 24 ve 48 saat sonunda kontrole göre benzer şekilde DNA parçalanmasına (smear) neden olmuştur. *Ras* transform 5RP7 hücrelerinde UV ve etaposit muamelesi ile DNA fragmentasyonunda yine kontrollere göre F2408 hücrelerine benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.17). Ancak 30 sn UV uygulamasından 48 saat sonraki örneklerden yeterli DNA elde edilemediği görülmektedir.

Çalışmamızın basında, apoptotik DNA fragmentasyonunun belirlenmesi için bir ön çalışma yapılmıştır. Bu amaçla, materyal ve yöntem bölümünde açıklandığı şekilde fenol gerektirmeyen ve işlem basamakları kısa olan, Clarke ve ark. (1999)'nin yöntemi uygulanmış, aynı zamanda farklı UV süreleri ve farklı inkübasyon süreleri de denenmiştir. Uygulanan bu DNA izolasyonu yönteminde kontrol DNA'ları da dahil olmak üzere bütün hücrelerin DNA'larının rastgele parçalandığı (smear) görülmüştür (Şekil 3.16.B). Bu sebeple, bu yöntemin bizim çalışmamızın amacına uygun olmayacağına karar verilip, Cotter ve Martin (1997)'nin yöntemi uygulanmıştır.

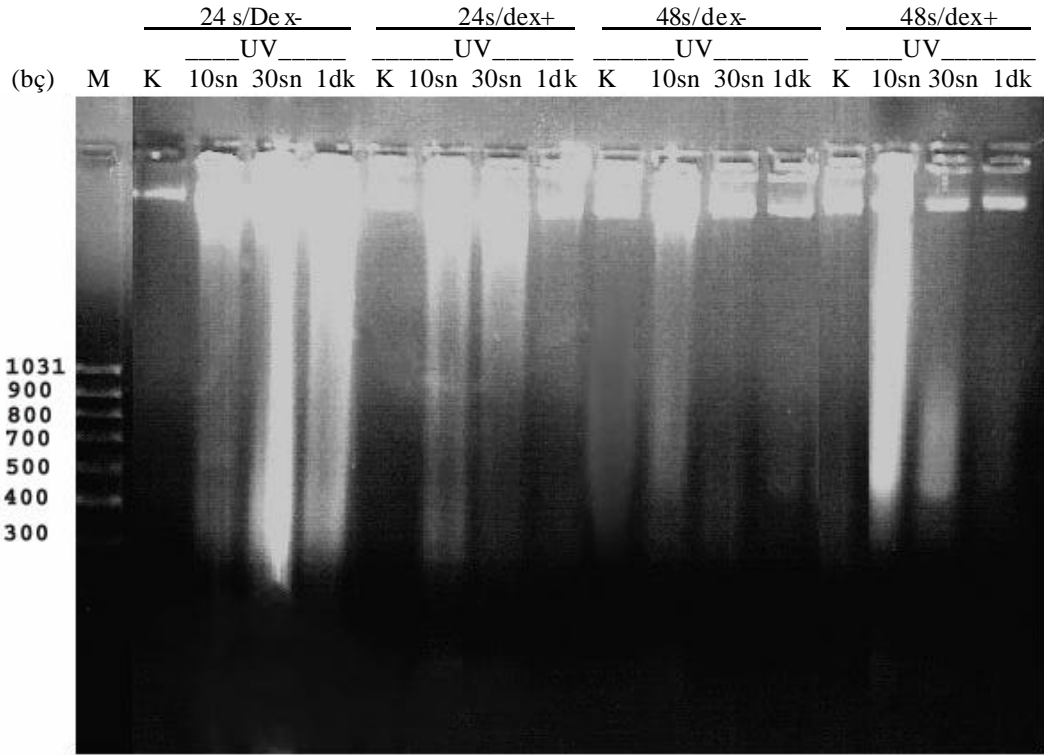


Sekil 3.16. A: F2408 hücrelerinde UV ve etapositin DNA üzerine etkisinin 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra %1.8 agaroz jelde belirlenmesi. M: 100 bç' lik DNA marker, Etap.: Etaposit, K: kontrol. B: Clarke ve ark. 1999'un yöntemine göre uygulanan DNA izolasyonu yönteminden elde edilen sonuçlar.



Sekil 3.17. 5RP7 hücrelerinde UV ve etapositin DNA üzerine etkisinin 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra %1.8 agaroz jelde belirlenmesi. M: 100 bç'lik DNA marker, Etap.: Etoposit, K: kontrol.

UV'nin CO25 hücrelerinin DNA'sına olan etkisini araştırmak amacıyla materyal ve yöntemde belirtildiği gibi Dekzametazon varlığında ve yokluğunda büyütülmüş olan hücrelerin DNA'ları elde edilerek agaroz jel'de yürütülmüştür. Sekil.3.18'da görüldüğü gibi *ras* inaktif hücrelerde 30 sn ve 1 dk UV uygulandıktan 24 saat sonunda DNA'nın tamamen parçalandığı gözlenirken, 48 saat sonra elde edilen DNA'nın hiçbirinde parçalanmaya rastlanmamıştır. *Ras* aktif hücrelerde ise, 10 sn ve 30 sn UV uygulanmasından 24 saat sonra DNA'da bir miktar kırılma gözlenirken, 48 saatin sonunda sadece 10 sn UV uygulanan örneklerde parçalanmış DNA'ya rastlanmıştır.



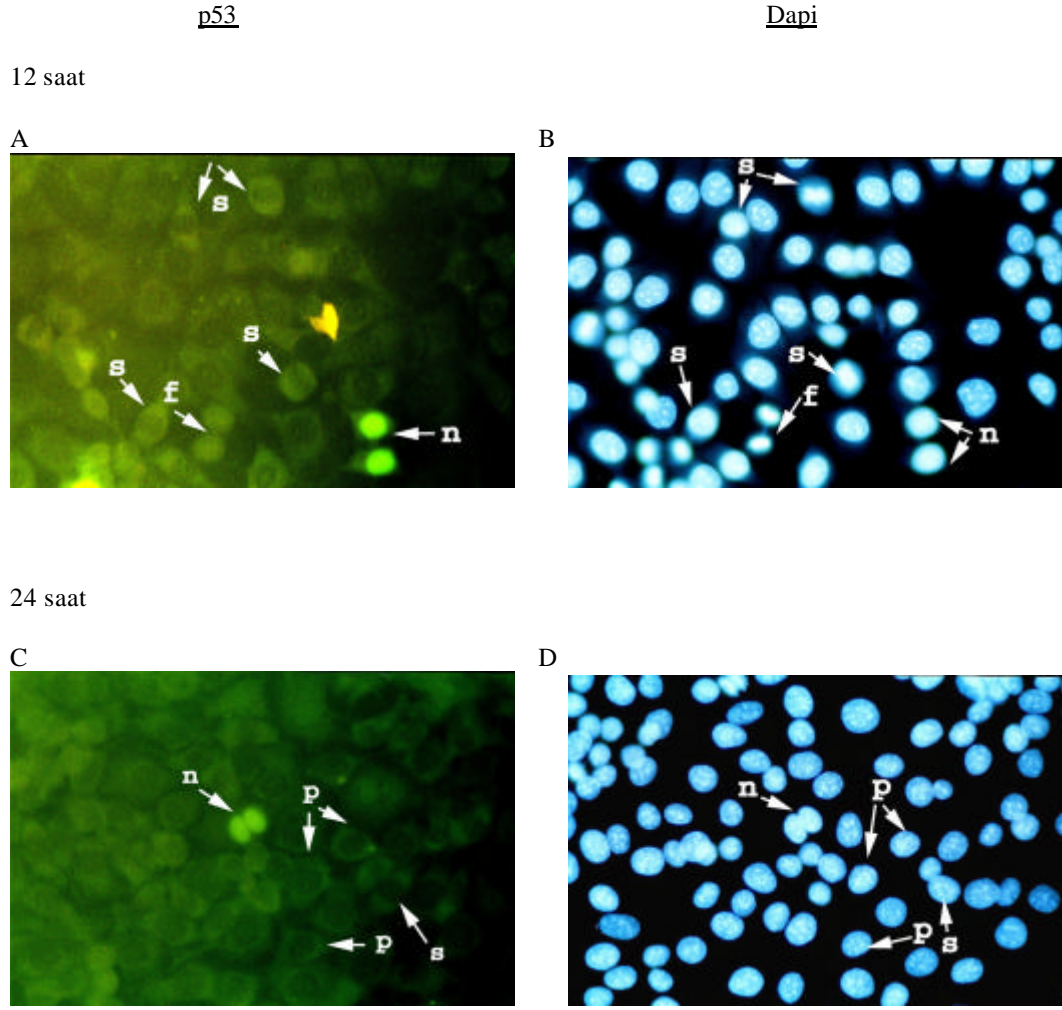
Sekil 3.18. CO25 hücrelerinde Dex varlığında ve yokluğunda UV ve etapositin DNA üzerine etkisinin 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra %1.8 agaroz jelde belirlenmesi. M: 100 bç'lik DNA marker, Etap.: Etaposit, K: kontrol.

3.3. p53 ve MDM2 Proteinlerinin İmmüno Floresan Boyama Yöntemi ile Tespiti:

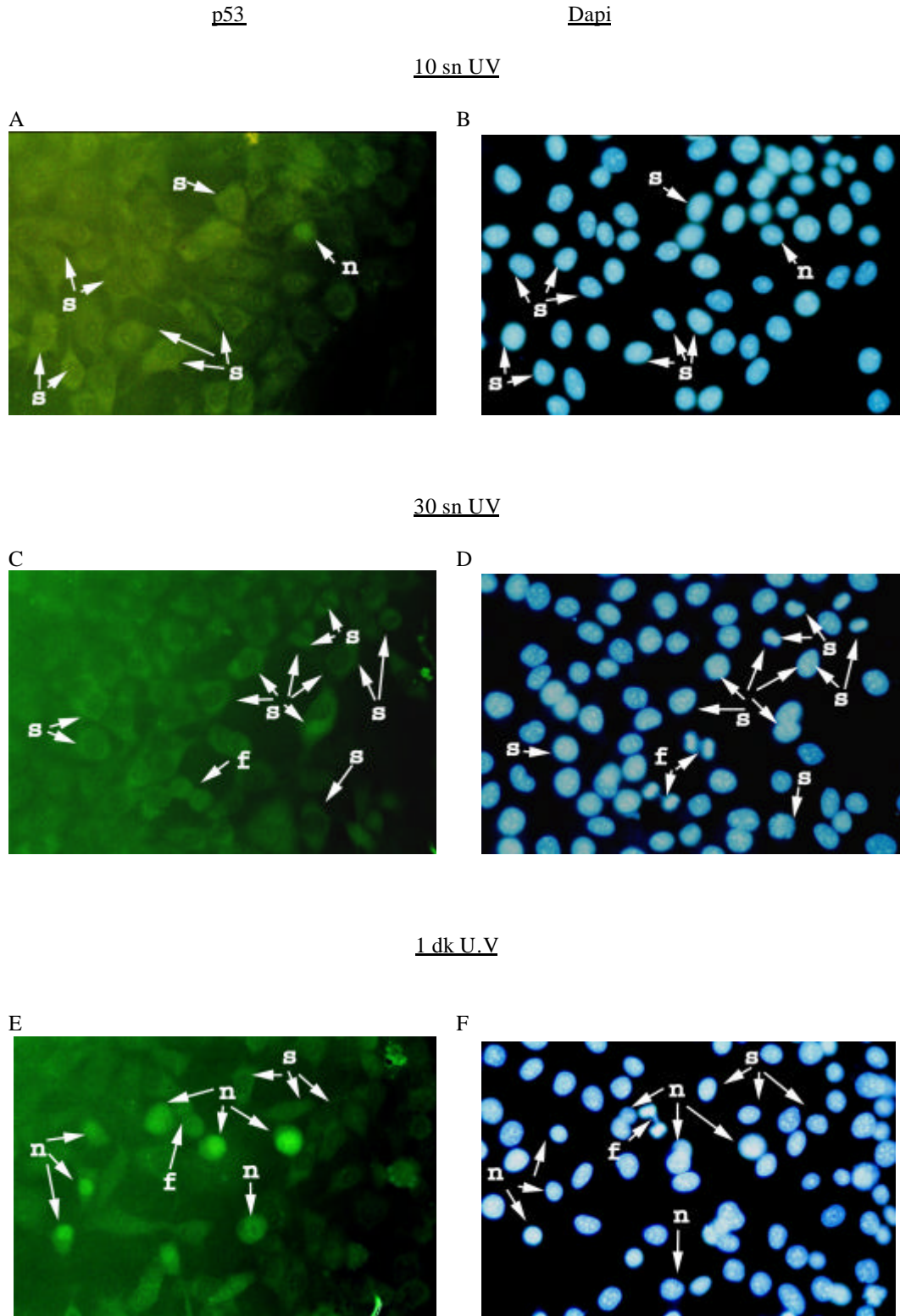
Apoptosis uyarılmış *ras* transform hücrelerde, p53 proteini ve onun regülatörü olan MDM2 proteinlerinin lokalizasyonu ve seviyesini araştırmak amacıyla materyal ve yöntemde belirtildiği gibi farklı periyotlarda UV'ye maruz bırakılan hücrelerin 12 ve 24 saat inkübasyonundan sonra FITC işaretli uygun antikolar ve Dapi çift boyama ile immüno floresan yöntemiyle incelenmiştir. Ön çalışma olarak yapılan 12, 24 ve 48 saat inkübasyonlardan en uygun sinyallerin alındığı 12 ve 24 saat inkübasyon süreleri tüm deneyler boyunca uygulanmıştır.

3.3.1. F2408 ve 5RP7 fibroblastlarında UV-uyarılmasından sonra p53 ve MDM2 proteinlerinin ekspresyonu

F2408 fibroblastlar normal ortamlarında 12 saat inkübasyondan sonra FITC işaretli p53 antikor ve Dapi ile boyanmış ve mikroskopik görüntüleri Şekil.3.19'da verilmiştir. p53 proteininin genellikle hücrenin sitoplazmasında lokalize olduğu görülmekte, ancak çok az oranda çekirdekte de sinyal vermektedir (Şekil 3.19.A). 24 saat inkübasyon sonunda yine p53'ün genellikle sitoplazmada ancak farklı olarak çekirdek zari etrafında (perinükleer) lokalize olduğu görülmektedir (Şekil 3.19.C). 12 saat inkübasyon süresinde olduğu gibi, çok az oranda çekirdekte de p53 proteini yer almaktadır. Aynı preparatlar çekirdek boyası olan Dapi ile boyandığında, p53 için alınan sinyallerin lokalizasyonunun tam olarak belirlenmesini sağlamış ve artefakt olmadığı Şekil 3.19.B ve D'de görülmektedir. 10 sn ve 30 sn UV uygulamasının ardından 12 saat inkübe edilmiş olan F2408 hücrelerinde p53 proteini sitoplazmada gözlenirken (Şekil 3.20.A, C), 1 dk. UV uygulanmış hücrelerde p53'ün büyük oranda çekirdeğe geçtiği tespit edilmiştir (Şekil 3.20.E). Hücrelerin 24 saat inkübasyonu sonunda ise her üç UV süresince de p53 sitoplazmada belirlenmiş, ancak UV sürelerindeki artışla birlikte p53 proteini için alınan sinyalde artış tespit edilmiştir (Şekil 3.21.A, C ve E). Aynı preparatların Dapi filtresi ile elde edilen çekirdek görüntüleri ile hücrelerin lokalizasyonu tespit edilmiştir (Şekil 3.21.B, D ve F).



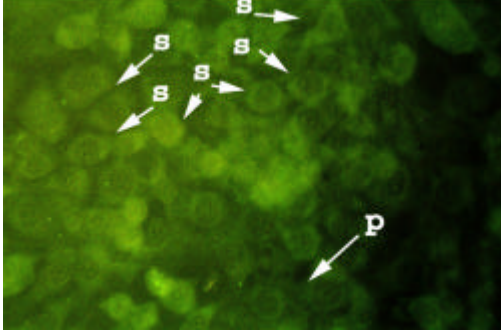
Sekil 3.19. F2408 hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra FITC isaretili P53 antikorunu (A, C) ile Dapi (B, D) ile isaretilenerek Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmiştir. f: mitotik hücre, n: çekirdekdeki protein, p: perinükleer, s: sitoplazmik protein. Büyütme: 732X



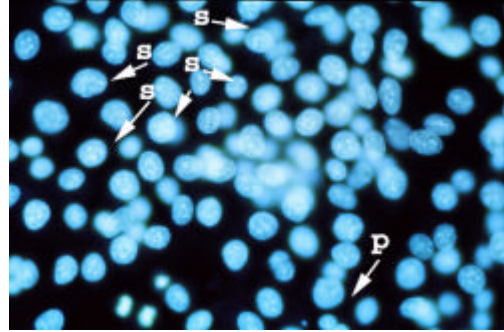
Sekil 3.20. F2408 hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra FITC isaretili p53 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretlenmis ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmistir. f: mitotik hücre, n: çekirdekdeki protein, s: sitoplazmik protein. Büyütme: 732X

p53Dapi10 sn UV

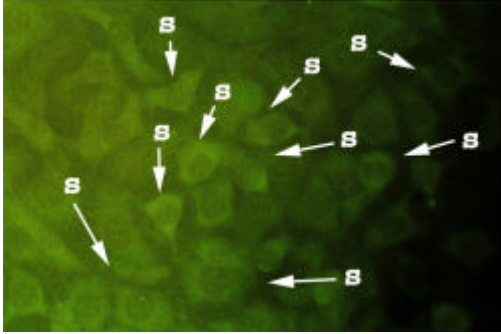
A



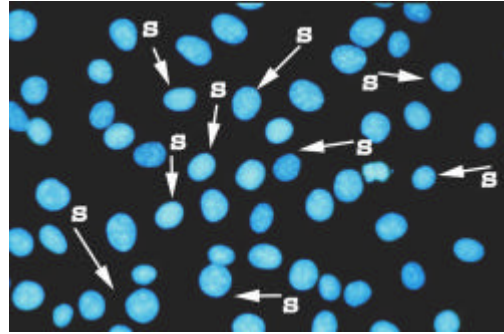
B

30 sn UV

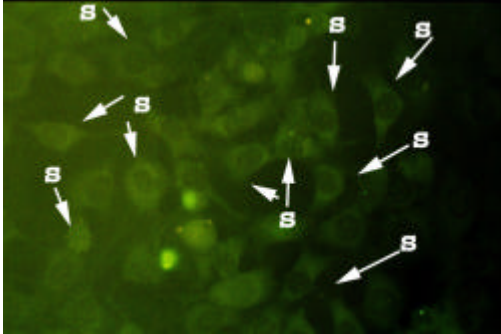
C



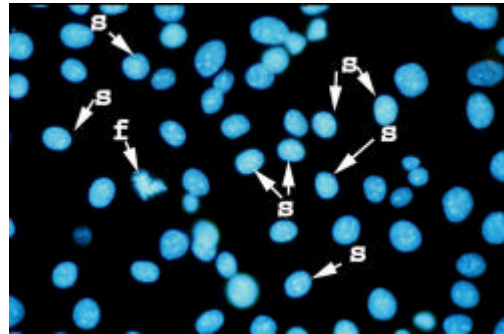
D

1 dk UV

E



F



Sekil 3. 21. F2408 hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra FITC isaretili p53 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isareetlenmis ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmistir. f: mitotik hücre, s: sitoplazmik protein, p: perinükleer protein. büyüme: 732X

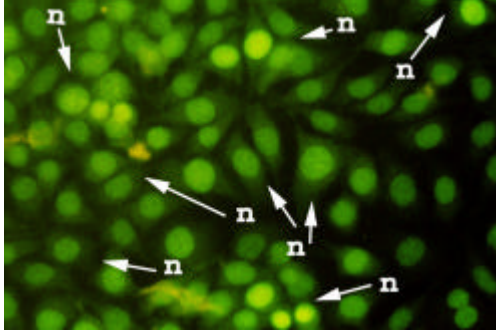
p53'ün aktivasyonunu takiben sentezlendiği bilinen MDM2 proteininin F2408 hücrelerindeki varlığı ve lokalizasyonu, normal büyüme ortamlarında 12 ve 24 saat inkübasyon sonunda FITC isaretili MDM2 antikoruyla ve Dapi çift boyamayla araştırılmış ve mikroskopik görüntüler Şekil 3.22'de verilmiştir. Her iki durumda da, hücrelerin çekirdeği içerisinde MDM2 için sinyaller görülmektedir (Şekil 3.22.A ve C). Aynı preparatların Dapi filtresi ile elde edilen çekirdek görüntüleri ile hücrelerin lokalizasyonu tespit edilmiştir (Şekil 3.22.B ve D). Hücreler farklı UV uygulama sürelerinden 12 saat sonra incelendiğindeyse, MDM2 sinyallerinin 10 sn ve 30 sn UV uygulanmış hücrelerde azaldığı ama yine de çekirdekte lokalize olduğu görülmektedir (Şekil 3.23.A ve C). 1 dk UV uygulanan hücrelerde ise büyük çekirdeklerin çoğunda MDM2 sinyali daha yoğun bulunmuştur (Şekil 3.23.E). Aynı preparatların Dapi filtresi ile elde edilen çekirdek görüntüleri ile hücrelerin lokalizasyonu tespit edilmiştir (Şekil.3.23.B, D ve F).

Hücrelerin farklı UV sürelerine maruz kaldıktan 24 saat sonra FITC-MDM2 ve Dapi ile isaretleme sonuçlarının mikroskopik görüntüleri Şekil.3.24'de verilmektedir. 10 sn UV uygulanmış hücrelerde, MDM2 miktarında kontrol ve 12 saat inkübasyonlu hücrelere göre azalma gözlenirken genel olarak çekirdekte lokalize oldukları ancak çok az miktarda sitoplazmada buldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.24.A). 30 sn UV uygulanmış hücrelerde MDM2 miktarı azalarak tamamen çekirdekte lokalize olurken (Şekil 3.24.B), 1 dk UV uygulanmış hücrelerde MDM2 çekirdekte yoğun olarak görülmektedir (Şekil 3.24.E). Dapi ile isaretili hücrelere bakıldığında düzensiz morfolojiye sahip, hacimce büyük çekirdekler dikkati çekmektedir (Şekil 3.24.F).

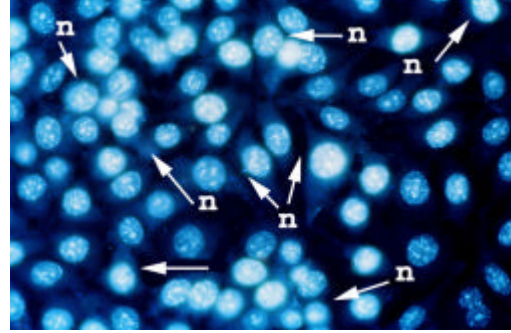
MDM2Dapi

12 saat

A

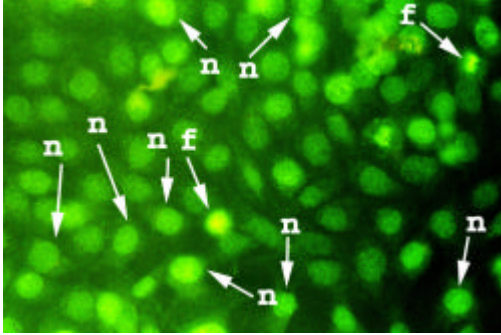


B

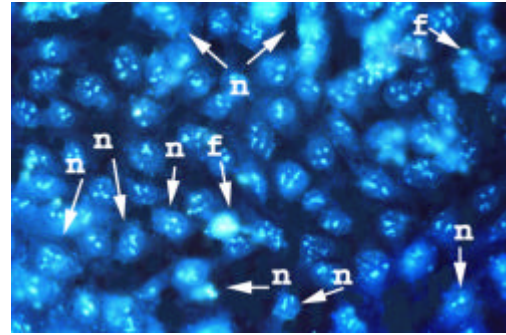


24 saat

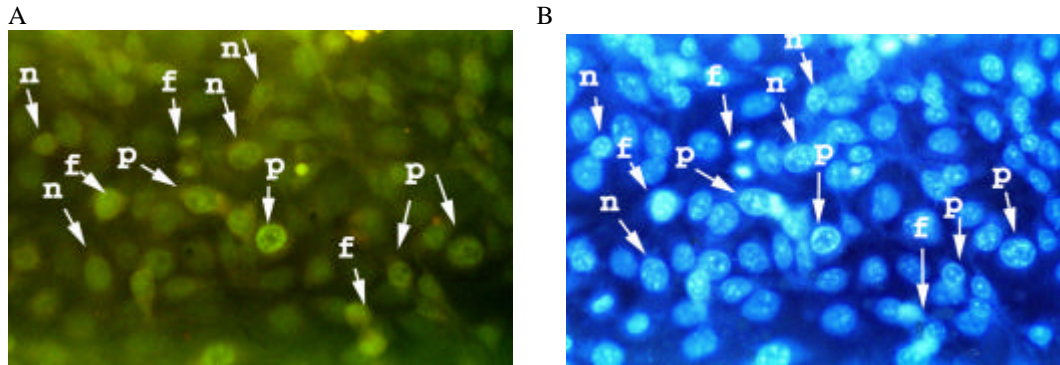
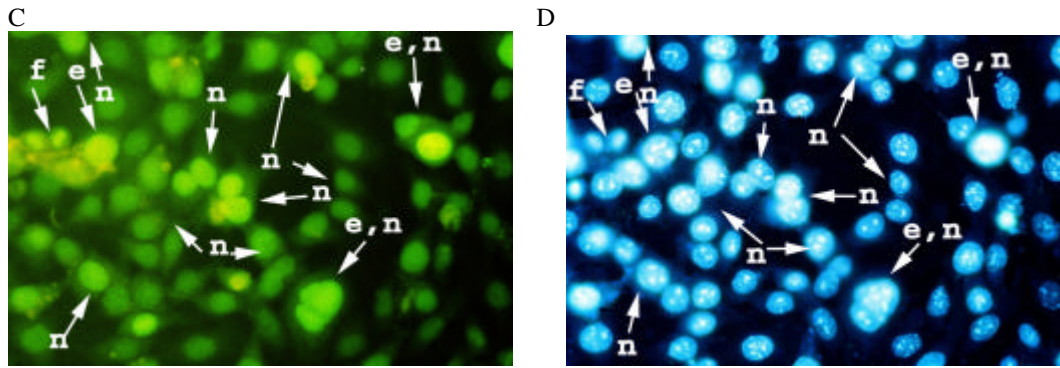
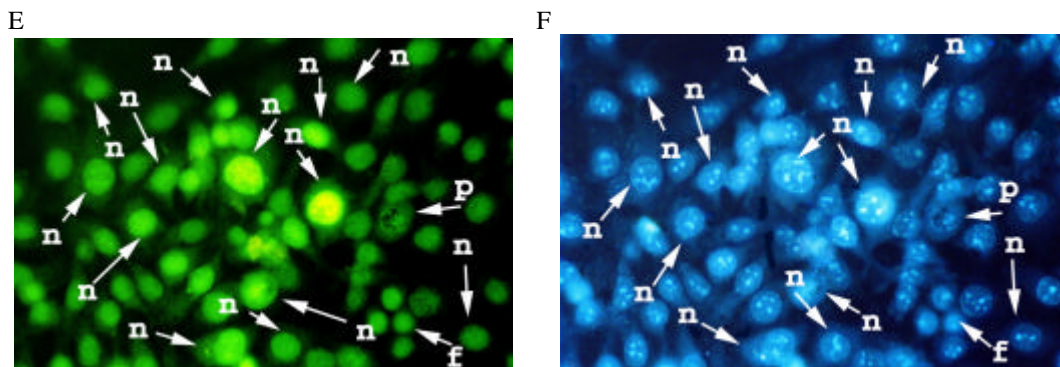
C



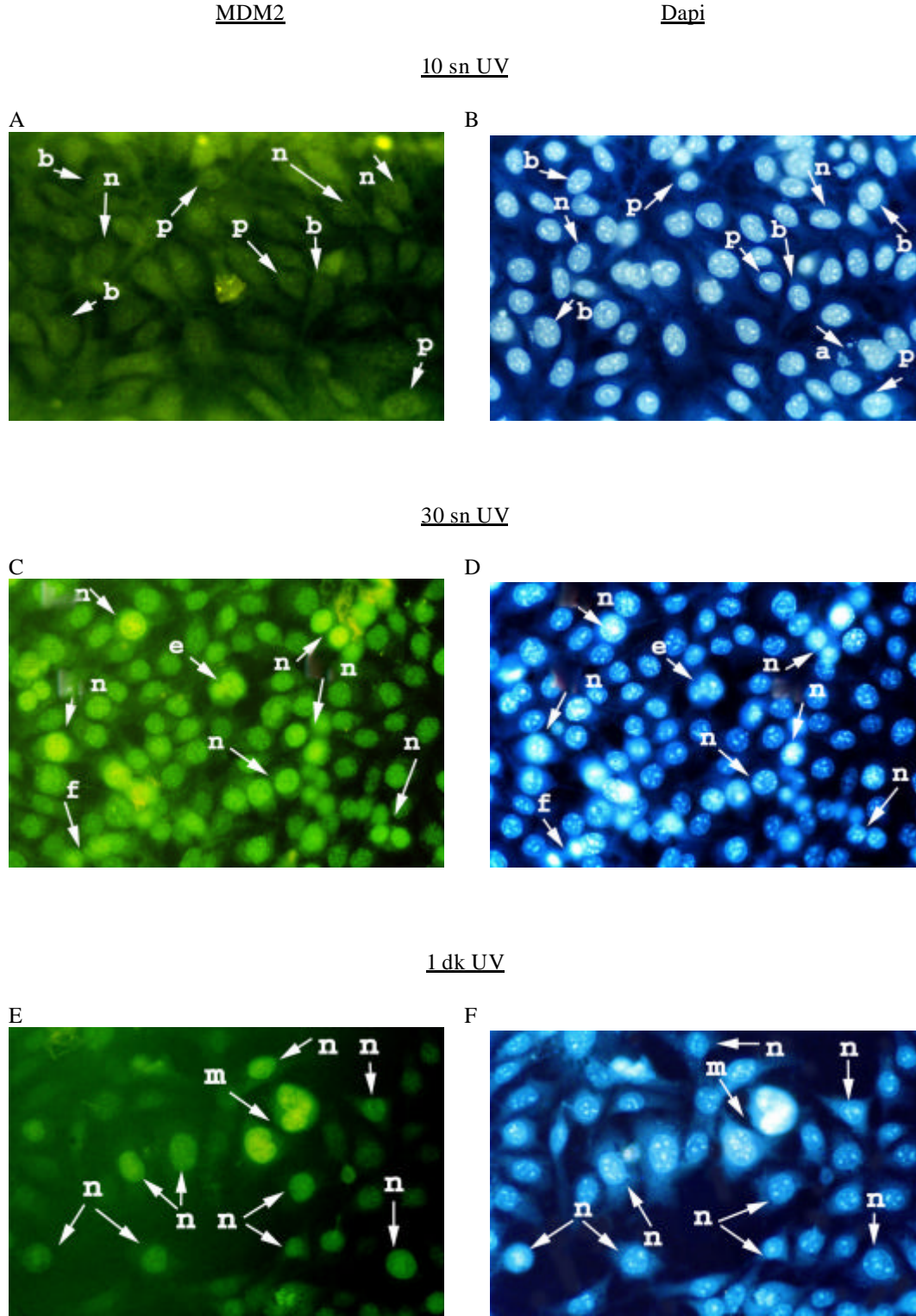
D



Sekil 3.22 F2408 hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra FITC isaretili MDM2 antikorunu (A, C) ile Dapi (B, D) ile isaretilenerek Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmiştir, f: mitotik hücre, n:çekirdekteki protein. Büyütme: 732X

MDM2Dapi10 sn UV30 sn UV1 dk UV

Sekil 3.23 F2408 hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra FITC isaretili MDM2 antikorü (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isareetlenmis ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmistir. e: çok çekirdekli hücre, f: mitotik hücre, n: çekirdekdeki protein, p: perinükleär protein. Büyütme: 732X



Sekil 3.24. F2408 hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra FITC isaretli MDM2 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isarenmis ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmistir. a: apoptotik kese, b: hem çekirdek hem sitoplazmadaki protein. e: çok çekirdekli hücre, f: mitotik hücre, m: anormal sekilli hücre, n: çekirdekteki protein, p: perinükleer protein. Büyütme: 732X

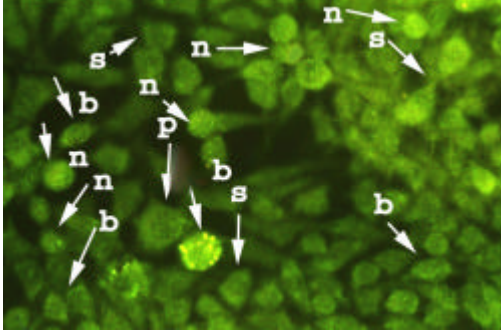
Aktif *H-ras* onkogeni içeren 5RP7 fibroblastlarının 12 ve 24 saat inkübasyonları sonunda, FITC-p53 antikoru ve Dapi ile çift isaretleme yapılmış ve mikroskopik görüntüleri Sekil 3.25’de verilmiştir. p53 proteininin genel olarak çekirdekte yerleşmiş olduğu, çok az olarak da sitoplazmada lokalize olduğu görülmektedir (Sekil 3.25.A ve C). Aynı preparatlar Dapi filtresi ile de incelenmiş ve elde edilen çekirdek görüntüleri ile çekirdeğin lokalizasyonu tespit edilmiştir (Sekil.3.25.B ve D). Hücrelere farklı dozlarda UV uygulandıktan 12 saat sonra p53’ün varlığı Sekil 3.26.’da gösterilmiştir. Her üç farklı UV uygulamasında da yok denecek kadar az p53 sinyali elde edilmiştir. Çok az seviyede gözlenen bu p53’ün çekirdekten sitoplazmaya doğru göç ettiği izlenimini vermektedir. Yine aynı hücreler Dapi filtresiyle incelenerek elde edilen sinyallerin lokalizasyonları doğrulanmıştır (Sekil.3.26.B, D ve F).

Sekil.3.27’de 5RP7 hücrelerinin farklı sürelerle UV uygulanmasından 24 saat sonra p53 proteininin lokalizasyonu görülmektedir. Genellikle p53 çekirdek zari etrafında (perinükleer) yoğunlaşmıştır (Sekil.3.27.A, C ve E). 1 dk UV uygulanmış hücrelerde p53’ün sitoplazmada lokalize olduğu belirlenmiştir (Sekil .3.27.E). Aynı preparatlar Dapi filtresiyle de incelenerek elde edilen sinyallerin lokalizasyonları doğrulanmıştır (Sekil 3.27.B, D ve F).

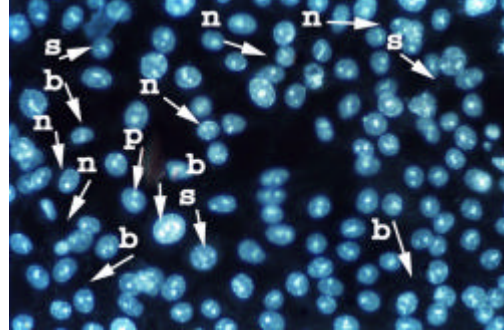
p53Dapi

12 saat

A

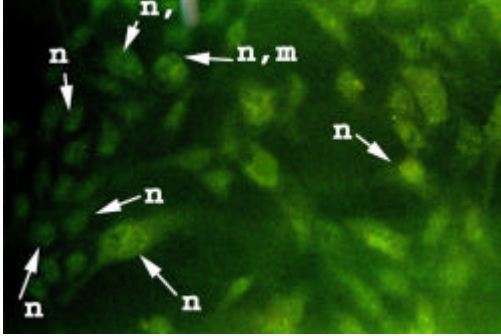


B

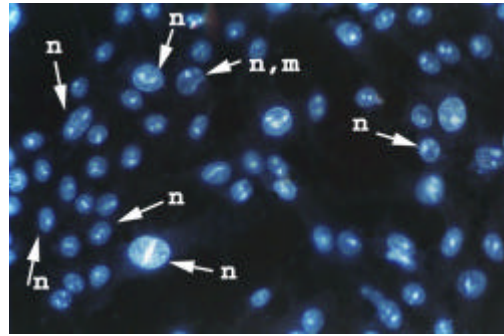


24 saat

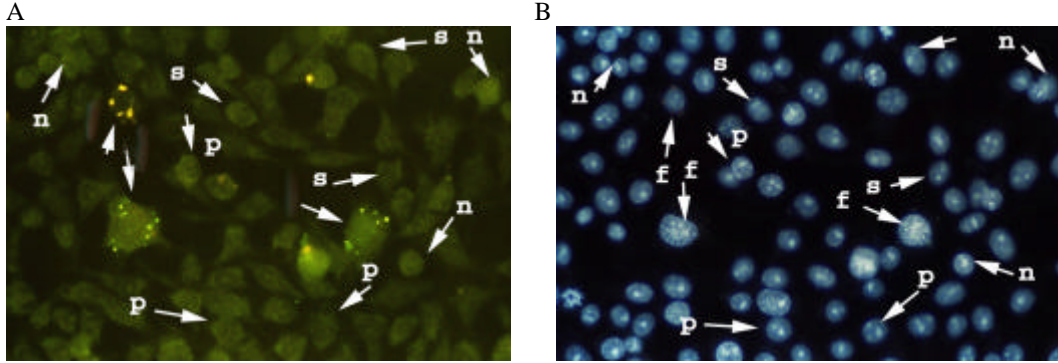
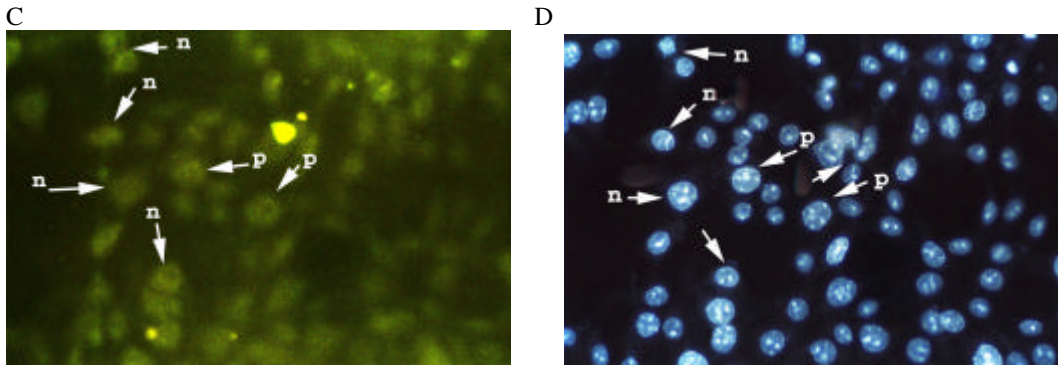
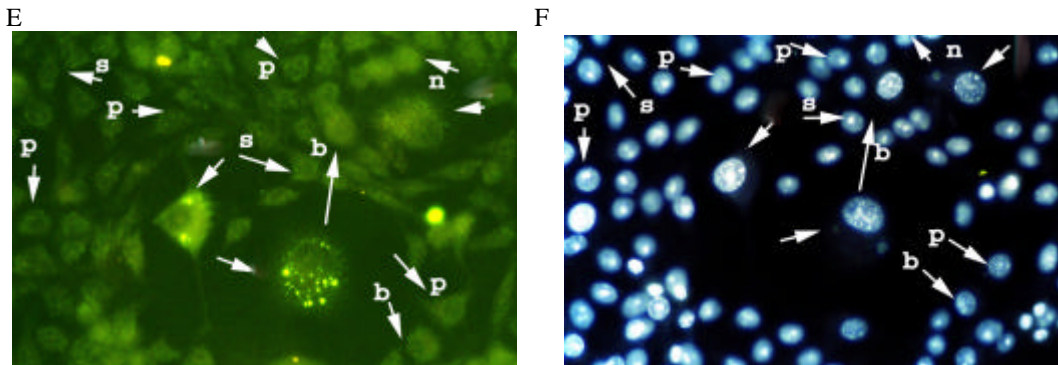
C



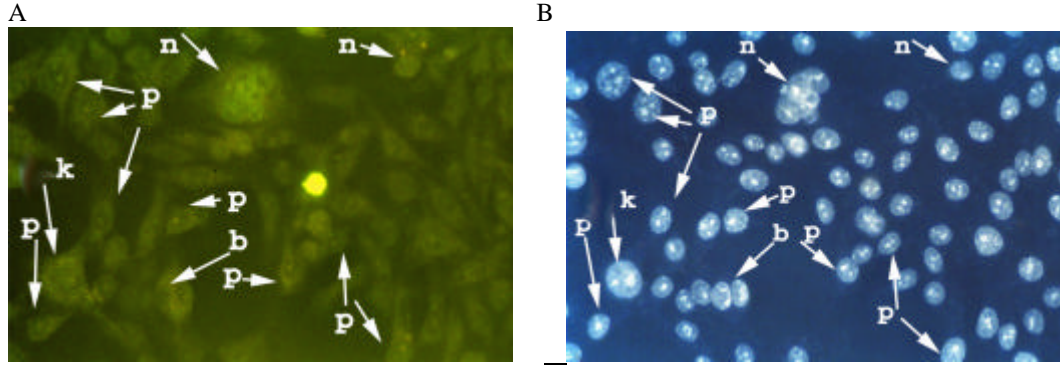
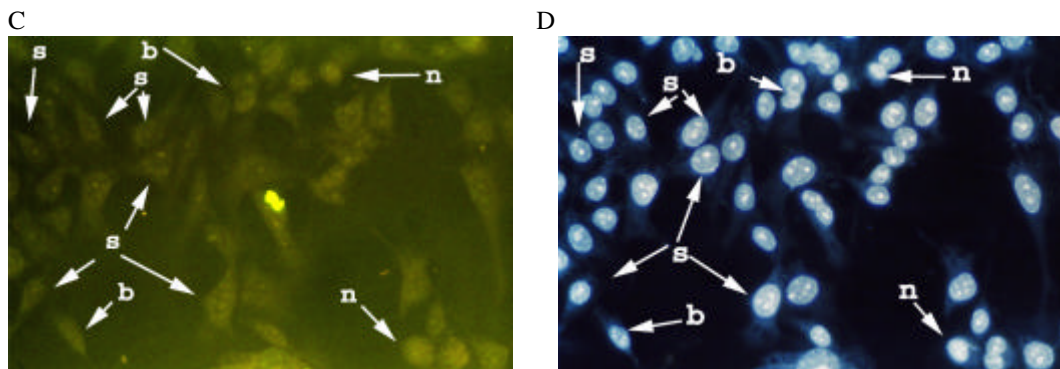
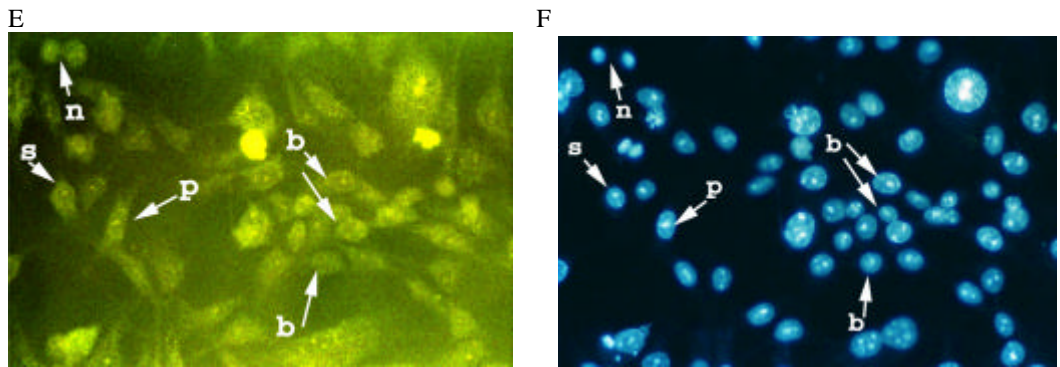
D



Sekil 3.25. 5RP7 hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra FITC isaretili P53 antikorunu (A, C) ile Dapi (B, D) ile isaretilenerek. Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmiştir. b: hem çekirdek hem sitoplazmadaki protein, m: anormal sekilli çekirdek, n: çekirdekdeki protein, p: perinükleer protein, s: sitoplazmik protein. Büyütme:732X

p53Dapi10 sn UV30 sn UV1 dk UV

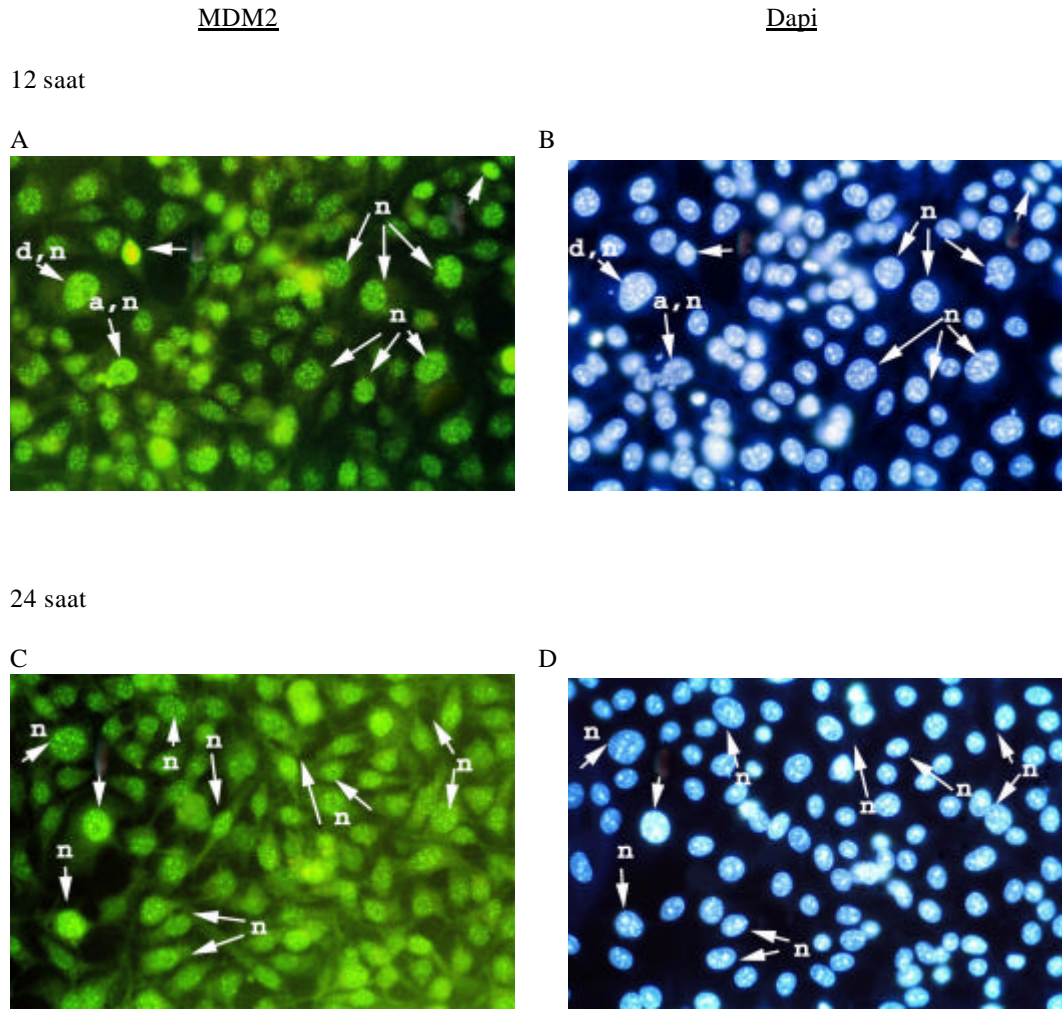
Sekil 3.26. 5RP7 hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra FITC isaretili p53 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretilenmiş ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmiştir. b: hem sitoplazma hem çekirdekteki protein, f: mitotik hücre, n: çekirdekteki protein, p: perinükleer protein, s: sitoplazmik protein. Büyütme: 732X

p53Dapi10 sn UV30 sn UV1 dk UV

Sekil 3.27. 5RP7 hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra FITC isaretili p53 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretilenmiş ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta

görüntülenmiştir. b: hem sitoplazma hem çekirdekteki protein, n: çekirdekteki protein, s: sitoplazmik protein, p: perinükleer protein. Büyütme: 732X

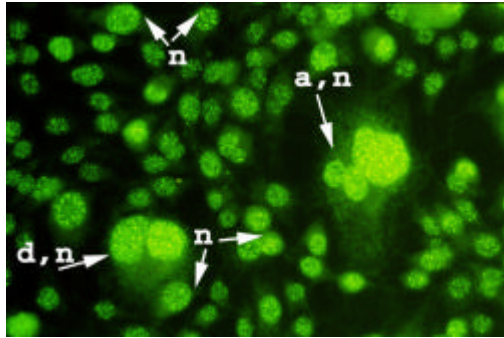
H-ras aktif 5RP7 hücreleri, p53'ün belirlendiği paralel koşullarda MDM2 proteininin varlığı ve lokalizasyonu için araştırılmıştır. Normal besiyerinde 12 ve 24 saat inkübasyon sonucunda FITC-MDM2 ve Dapi ile işaretlenen hücrelerde MDM2'nin genellikle çekirdekte yer aldığı Şekil 3.28.A ve C'de görülmektedir. Hücrelere 10 sn UV uygulamasından 12 saat sonra, çekirdek parçalanması ve çok çekirdekli dev hücre oluşumunda bir artış gözlenirken (Şekil 3.29.A), her iki inkübasyon süresinde de, artan UV dozlarında bu tip hücrelerin oranı artmış ve apoptotik keselerin oluşumu gözlenmiştir. Bütün dozlarda MDM2 çekirdekte lokalize olmuştur. Özellikle apoptotik karakterleri gösteren dev, sekilsiz ve çok çekirdekli hücreler ile çekirdekleri parçalanmış hücrelerde MDM2 çok yoğun olarak sinyal vermiştir (Şekil 3.29A, C ve E). 24 saat UV uygulanmış olan hücrelerde MDM2 yine belirgin bir şekilde çekirdekte lokalize olmuş, özellikle 1 dk UV uygulanan hücrelerde diğerlerine oranla az da olsa çekirdek parçalanması gözlenmektedir (Şekil 3.30.E). Genel olarak 5RP7'lerdeki MDM2 lokalizasyonu ve miktarı normal F2408'lere göre belirgin bir şekilde artış göstermiş ve ilginç bir şekilde Dapi görüntüsüne benzer bir görüntü belirlenmiştir (Şekil 3.30.B, D ve F).



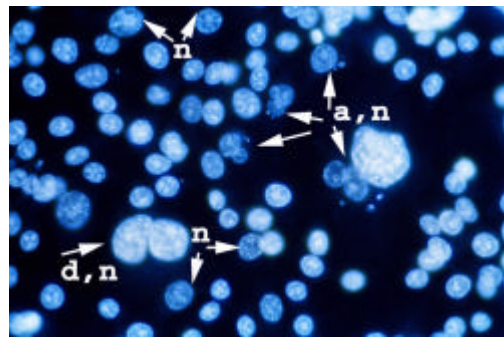
Sekil 3.28. 5RP7 hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra FITC isaretili MDM2 antikorunu (A, C) ile Dapi (B, D) ile isaretilenerek Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmiştir. a: apoptotik kese, d: dev hücre, n: çekirdekteki protein. Büyütme: 732X

MDM2Dapi10 sn UV

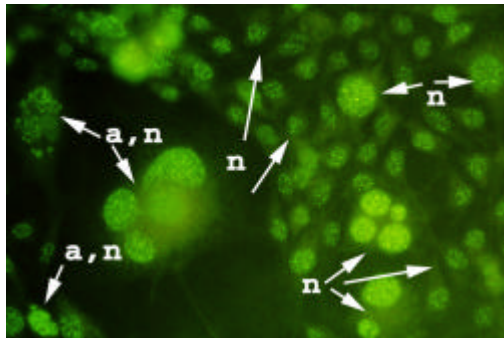
A



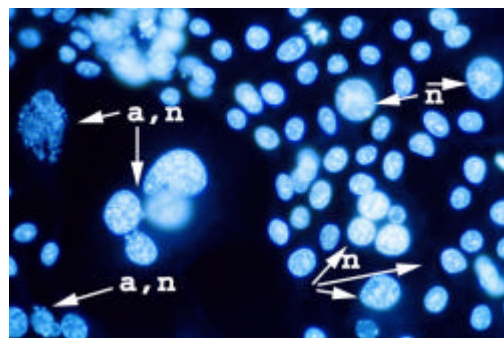
B

30 sn UV

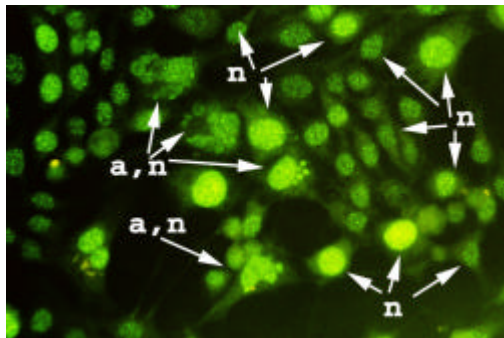
C



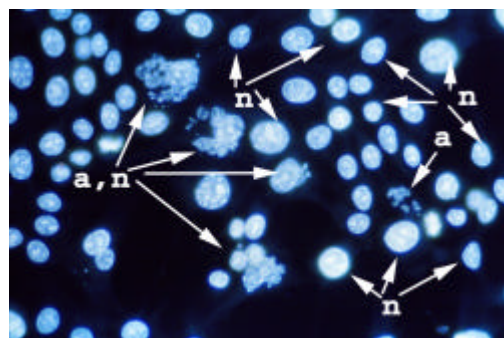
D

1dk UV

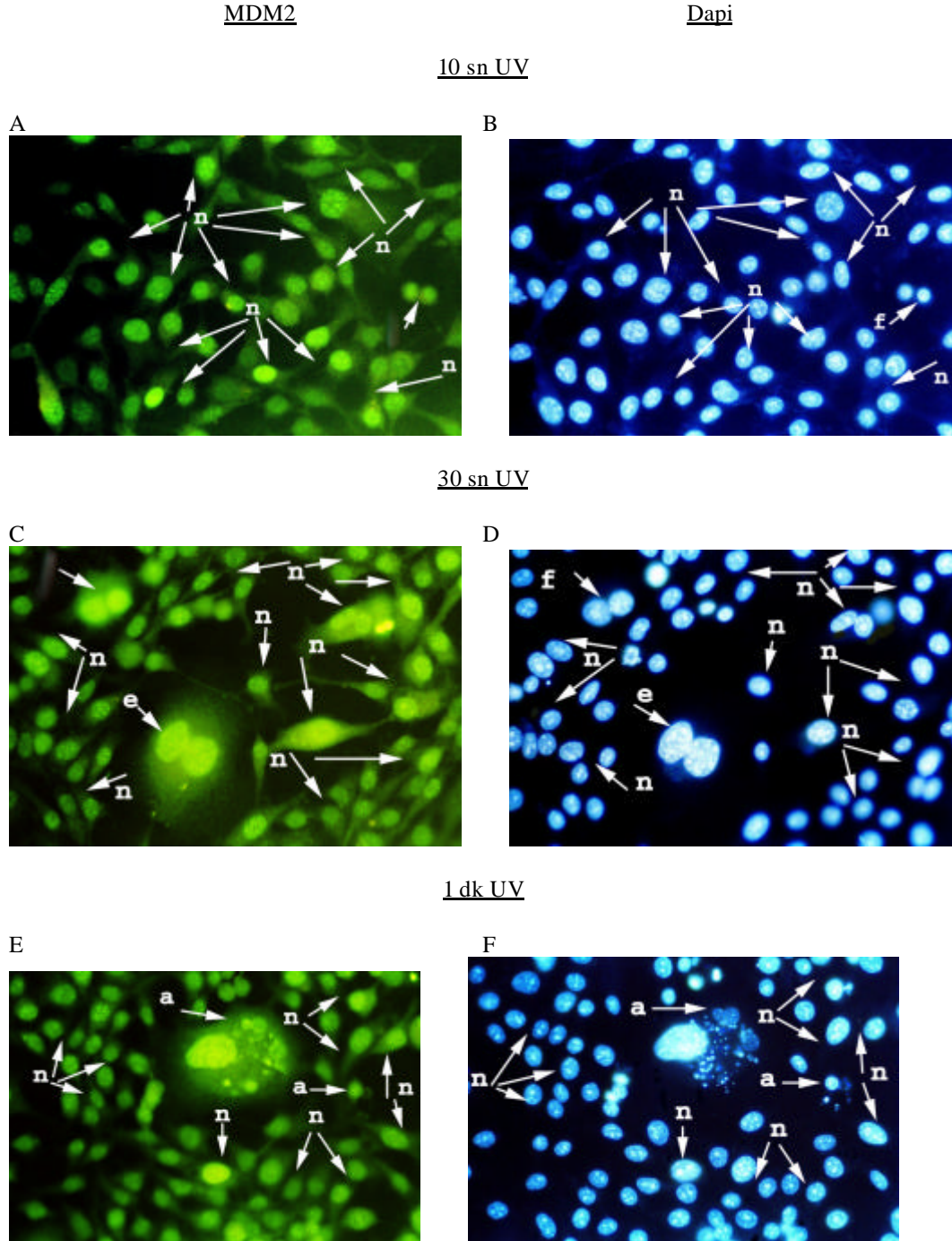
E



F



Sekil 3.29. 5RP7 hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra FITC isaretili MDM2 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretlenmis ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmistir, a: apoptotik kese, d: dev hücre, n: çekirdekdeki protein. Büyütme: 732X



Sekil. 3.30. hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra FITC isaretili MDM2 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretlenmis ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmistir. a: apoptotik kese, e: çok çekirdekli hücre, n: çekirdekdeki protein. Büyütme: 732

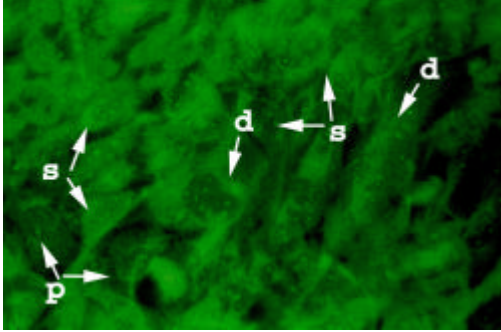
3.3.2. CO25 (Dex-) ve CO25 (Dex+) miyoblastlarında UV-uyarılmasından sonra p53 ve MDM2 proteinlerinin ekspresyonu

CO25 hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyonlar sonucunda FITC-p53 ve Dapi isaretlenmiş, floresan mikroskopik görüntüleri Sekil 3.31.'de verilmistir. Çok az miktarda p53 sinyali elde edilen hücrelerde proteinin lokalizasyonu 12 saat sonunda genellikle sitoplazmada bulunurken, 24 saat sonunda hem sitoplazma hem de çekirdekte gözlenmistir. Yine paralel olarak aynı hücrelerin Dapi görüntüsü Sekil.3.31.B ve D'de oklarla gösterilmistir. Hücrelerin UV'ye maruz bırakıldıktan 12 saat sonunda özellikle bazı hücrelerde çekirdekte yoğunlaşarak arttığı görülmektedir (Sekil 3.32.A, C ve E). CO25 hücrelerinin UV uygulamasından 24 saat sonra ise belirgin bir şekilde oluşan parçalanmış çekirdeklerde yoğun bir şekilde p53 sinyali elde edilmistir (Sekil 3.33.A,C ve E). Bu parçalanmış çekirdeklerin görüntüleri her iki isaretlemede de birbirine oldukça uymaktadır (Sekil 3.33.B,D ve F).

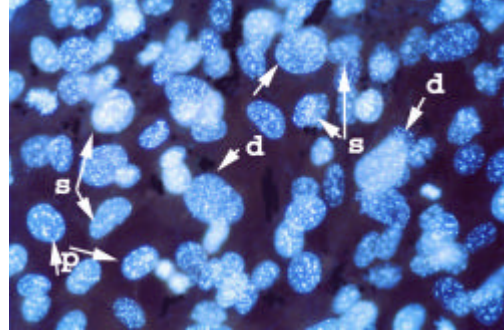
p53Dapi

12 saat

A

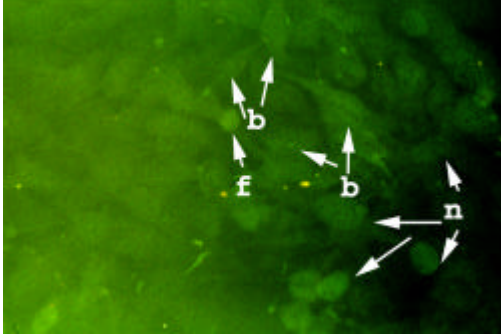


B

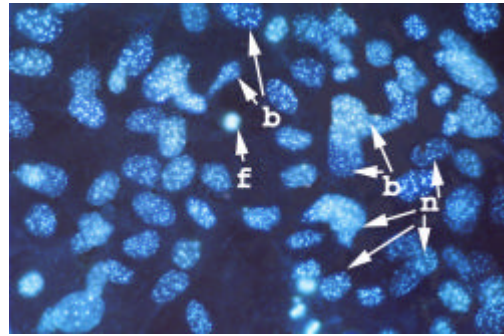


24 saat

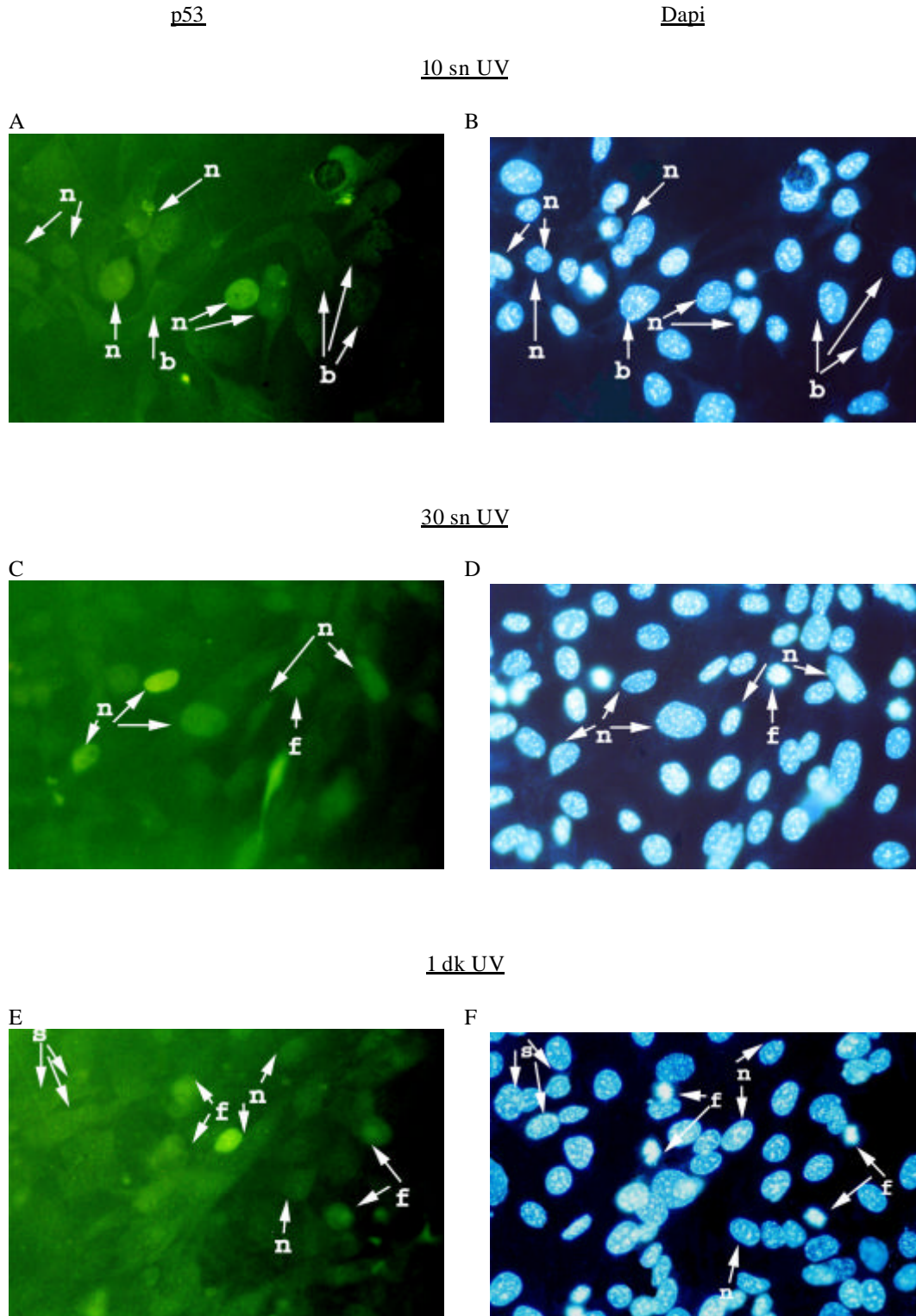
C



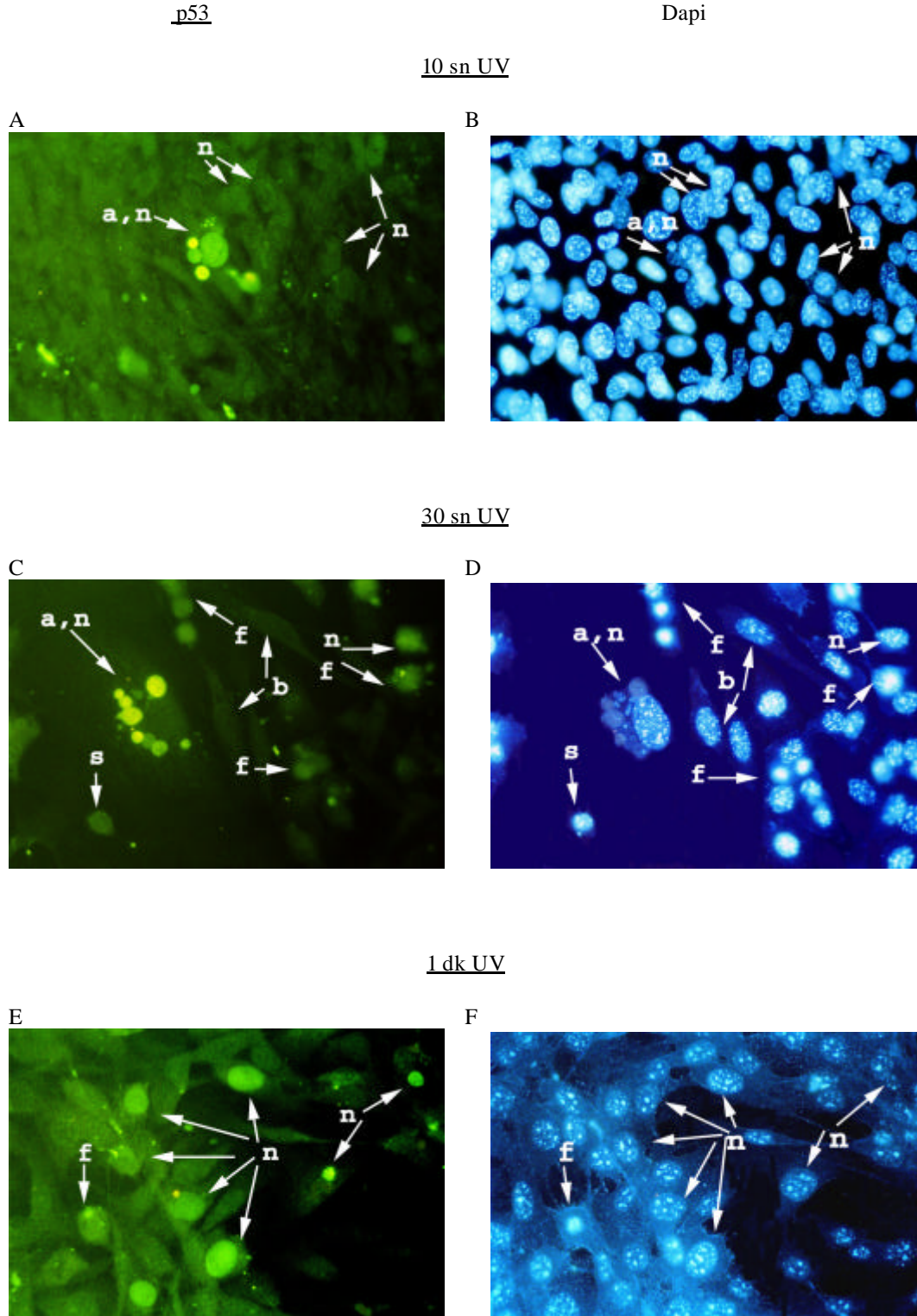
D



Sekil 3.31. CO25 (dex -) hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra FITC isaretili P53 antikorunu (A, C) ile Dapi (B, D) ile isaretilenerek Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmiştir. b: hem sitoplazmada hem çekirdekte bulunan protein, d: dev hücre, f: mitotik hücre, n:çekirdekteki protein, p: perinükleer protein, s: sitoplazmik protein. Büyütme: 732X



Sekil 3.32. CO25 (dex -) hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra FITC isaretili p53 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isareetlenmis ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmistir. b: hem sitoplazma hem çekirdekte bulunan protein, f: mitotik hücre, n: çekirdekteki protein, s: sitoplazmik protein. Büyütme: 732X



Sekil 3.33. CO25 (dex -) hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra FITC isaretili p53 antikoru (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretlenmis ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmistir. a: apoptotik kese, b: hem sitoplazma hem çekirdekte bulunan protein, f: mitotik hücre, .n: çekirdekteki protein, s: sitoplazmik protein. Büyütme: 732X

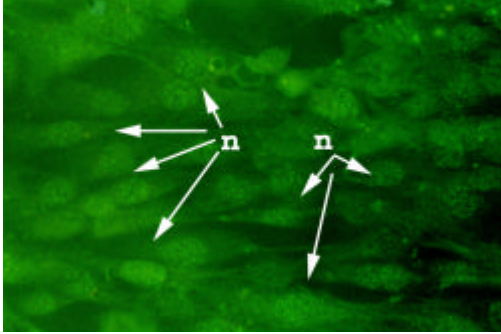
Normal kosullarda büyütülen CO25 hücrelerinin 12 ve 24 saat inkübasyonlari sonunda FITC-MDM2 ve Dapi floresan mikroskop görüntüleri Sekil 3. 34'de verilmiştir. Genel olarak çok az sinyal veren MDM2 proteini 12 saat sonunda hücrelerin çekirdeğinde gözlenirken 24 saat sonunda çekirdek ve sitoplazma arasındaki fark kaybolarak hücreler homojen bir şekilde sinyal vermiştir. Daha sonra UV'ye maruz kalmış hücreler MDM2 proteininin varlığı ve lokalizasyonu için incelenmiş ve Sekil 3.35'de ve 36'da görüntüleri verilmiştir. 10sn UV uygulandıktan 12 saat sonra hücreler incelendiğinde MDM2'nin sitoplazmada lokalize olduğu görülürken (Sekil 3.35A), 30 sn ve 1 dk UV uygulanan hücrelerde ise daha yoğun olarak çekirdekte lokalize olduğu gözlenmiştir (Sekil 3.35.C ve E).

CO25 hücreleri UV uygulandıktan 24 saat sonra MDM2 proteininin varlığı için incelendiğinde, 10 sn UV uygulanmış hücrelerin sitoplazmada çekirdek zarına yakın olarak bulunmuştur (Sekil 3.36.A). 30 sn UV uygulanan hücrelerde ise genel olarak tüm hücrede homojen bir şekilde MDM2 için sinyal elde edilirken nadiren bazı hücrelerin çekirdeğinde bulunduğu gözlenmiştir (Sekil 3.36.C). 1 dk UV uygulanan hücrelerde ise MDM2'nin miktarında azalmayla birlikte sitoplazmada yerleştiği görülmüştür (Sekil 3.36.E).

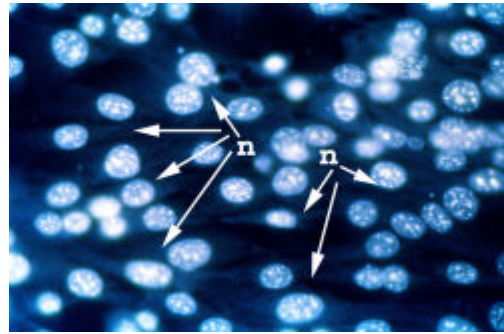
MDM2Dapi

12 saat

A

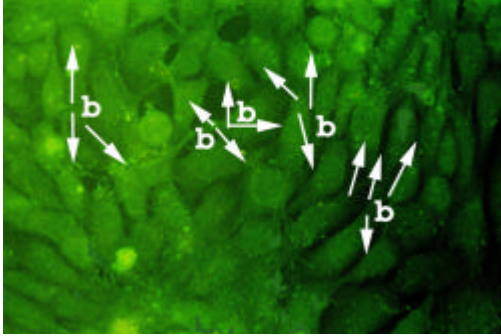


B

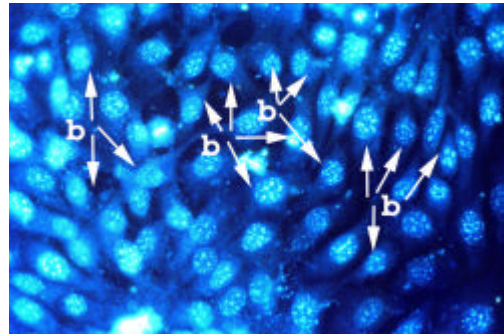


24 saat

C



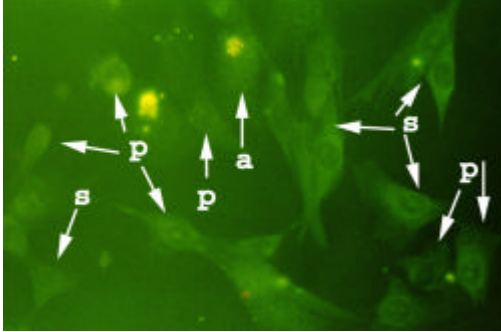
D



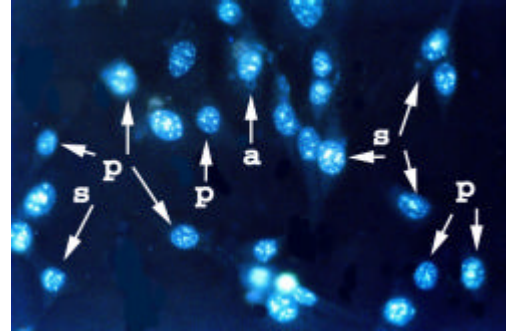
Sekil 3.34. CO25 (dex -) hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra FITC isaretili MDM2 antikoru (A, C) ile Dapi (B, D) ile isaretilenerek. Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmiştir. b: hem sitoplazmada hem çekirdekte bulunan protein, n: çekirdeki protein. Büyütme: 732X

MDM2Dapi10 sn UV

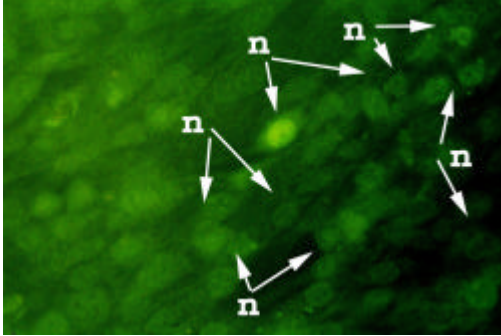
A



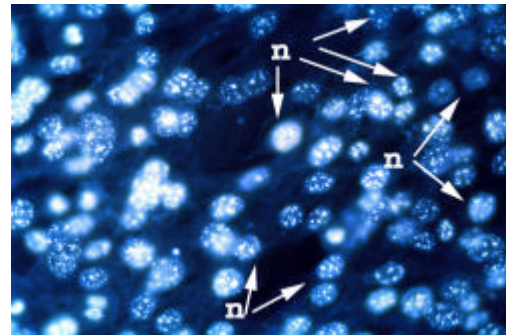
B

30 sn UV

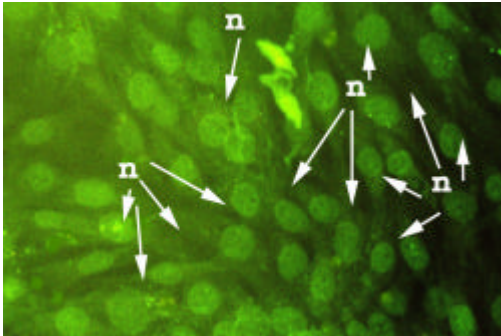
C



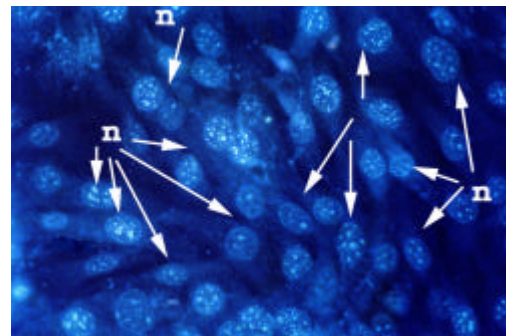
D

1 dk UV

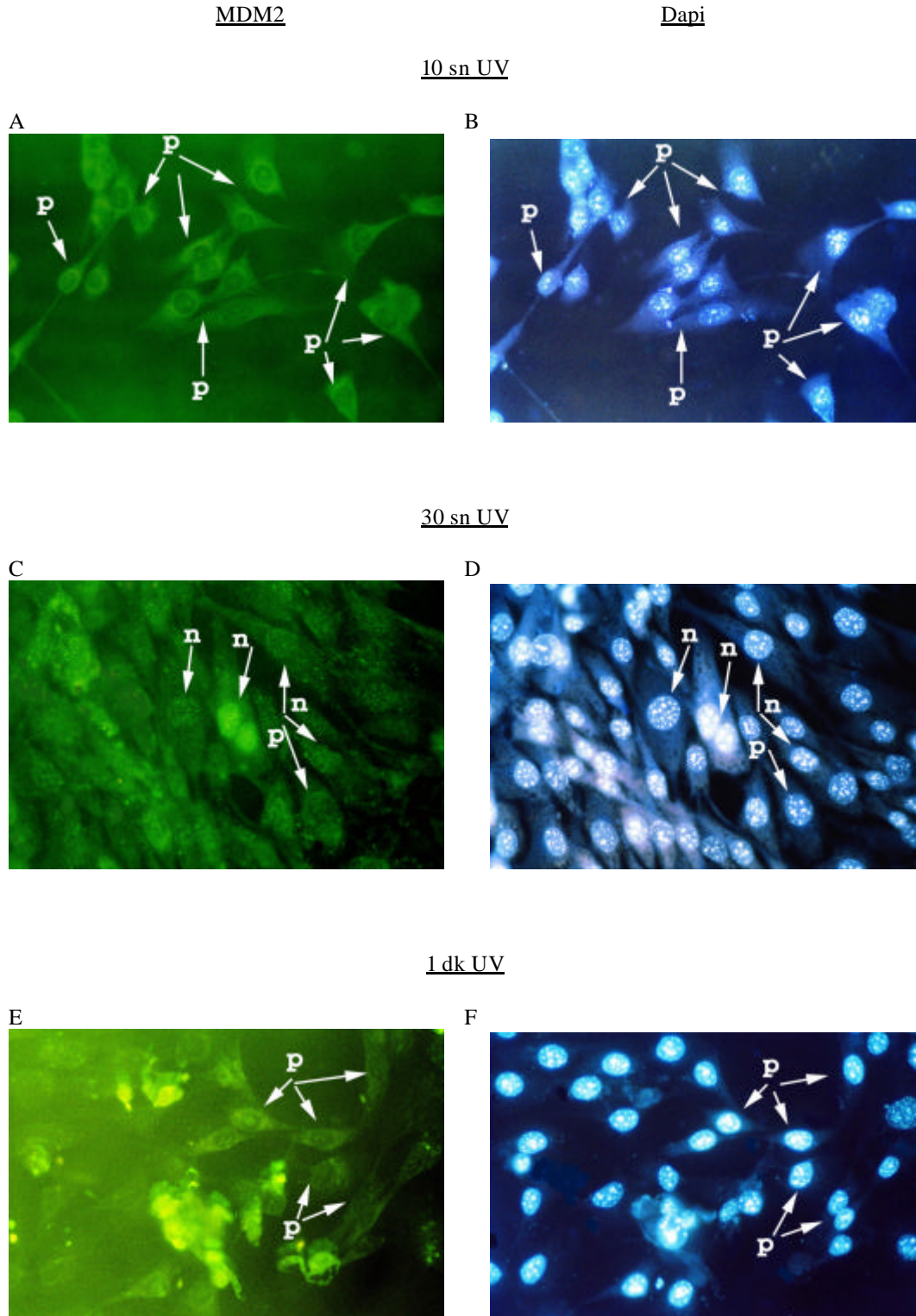
E



F



Sekil 3.35. CO25 (dex -) hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra FITC isaretili MDM2 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretlenmis ve Olympus BX-50 flioresan mikroskopta görüntülenmistir. a: apoptotik kese, n: çekirdekdeki protein, p: perinükleer protein, s: sitoplazmik protein. Büyütme: 732X



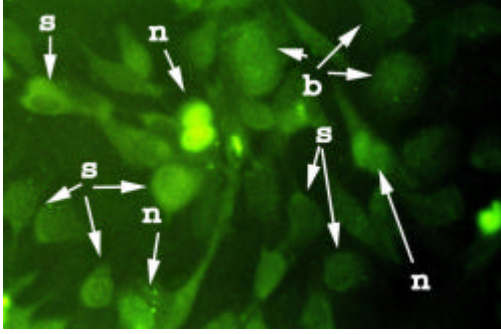
Sekil 3.36. CO25 (dex -) hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra FITC isaretili MDM2 antikoru (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretlenmis ve Olympus BX-50 filloresan mikroskopta görüntülenmistir. n: çekirdekteki protein, p: perinükleer protein. Büyütme: 732X

N -*ras* onkogeninin aktivasyonunu sağlamak için deksametazon varlığında (Dex+) inkübe edilen CO25 miyoblastları materyal ve yöntemde anlatıldığı gibi normal ortamlarında 12 ve 24 saat kültüre edildikten sonra FITC-p53 antikor ve Dapi ile çift isaretleme yapılmış ve mikroskopik görüntüleri Sekil 3.37'de verilmiştir. Genel olarak her iki inkübasyon süresinde de p53 proteininin çoğunlukla sitoplazmada lokalize olduğu ve 24 saat inkübasyonun sonunda 12 saate göre, p53 miktarında oldukça belirgin bir artış meydana geldiği gözlenmiştir. 12 saat inkübasyondan sonra p53'ün çok az miktarda da çekirdekte lokalize olduğu belirlenmiştir (Sekil 3.37.A). Aynı preparatlar antikor isaretlemeye paralel olarak Dapi isaretleme ile de incelenerek, hücrelerin lokalizasyonu tam olarak belirlenmiştir (Sekil 3.37.B ve D). Transform CO25 hücrelerine 10 sn UV uygulandıktan 12 saat sonra, p53'ün sitoplazmada lokalize olduğu ve hücrelerin sayısında artış meydana geldiği gözlenirken (Sekil 3.38.A), 30 sn ve 1 dk UV uygulanmış örneklerde p53 miktarında kontrole oranla biraz artış gözlenmiş ve lokalizasyonu tamamen sitoplazmada belirlenmiştir (Sekil 3.38.C ve E). 24 saat UV uygulamasından sonra ise, uygulanan üç UV süresinde de p53 sitoplazmada belirlenmiş (Sekil 3.39.A ve E) ancak 1 dk UV uygulandığında çok az oranda çekirdekte lokalizasyonuna rastlanmıştır (Sekil 3.39.E). Yine aynı hücrelerin Dapi isaretleli mikroskopik görüntüleri Sekil 3.39.B, D ve F'de verilmiştir.

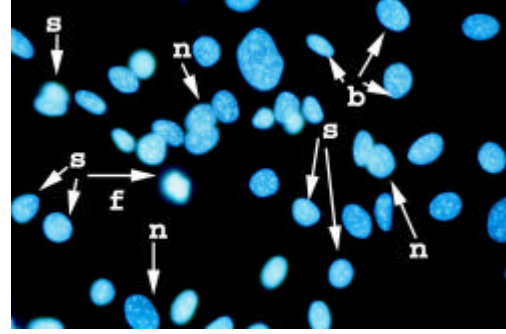
P53Dapi

12 saat

A

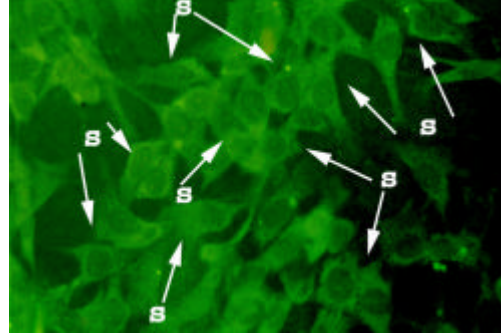


B

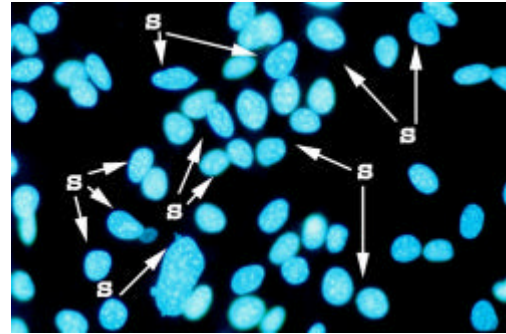


24 saat

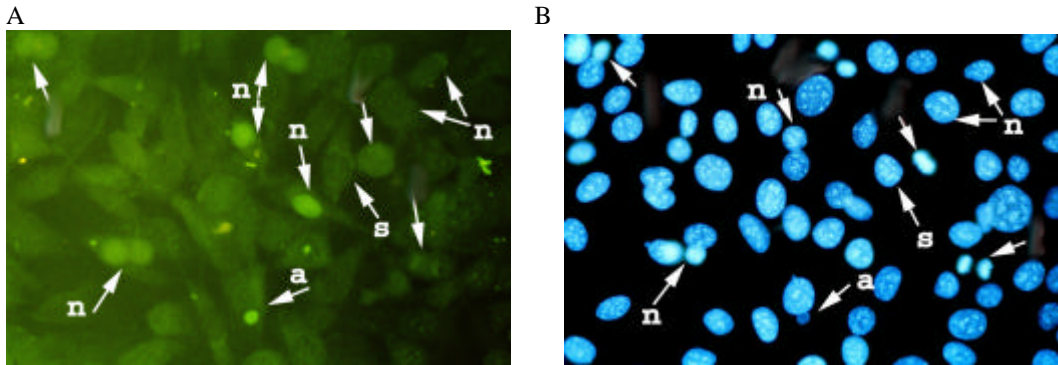
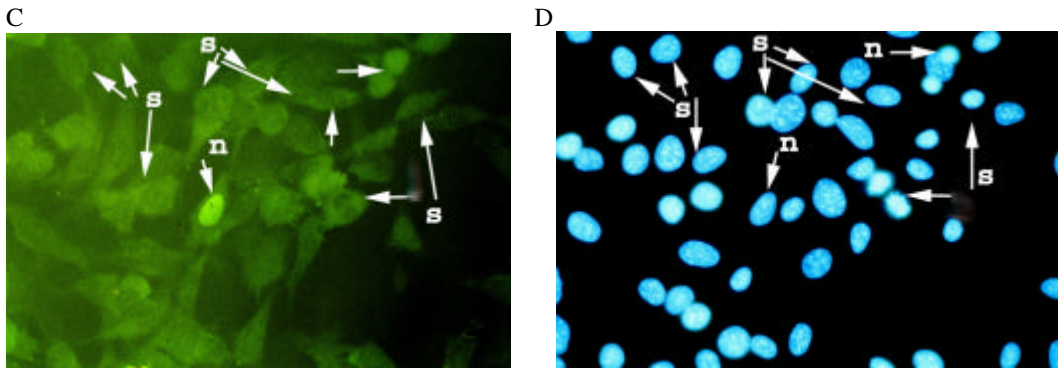
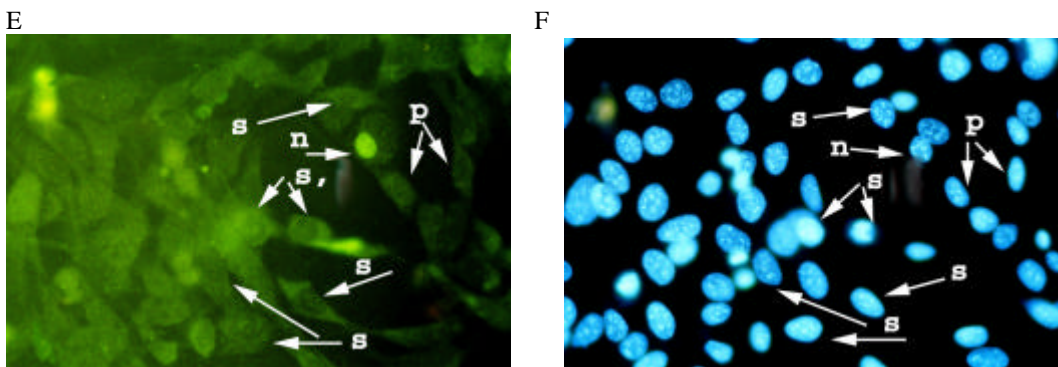
C



D



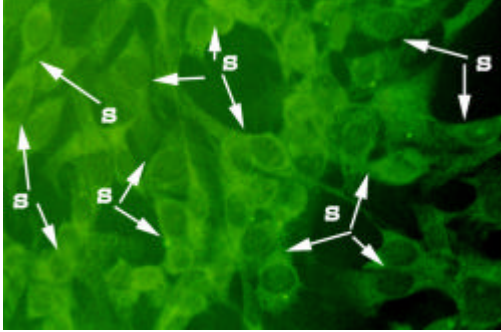
Sekil 3.37. CO25 (dex +) hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra FITC isaretki P53 antikorü (A, C) ile Dapi (B, D) ile isaretlenerék. Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmiştir b: hem sitoplazmada hem çekirdekte bulunan protein, f: mitotik hücre, n: çekirdekteki protein, s: sitoplazmik protein. Büyütme: 732X

p53Dapi10 sn UV30 sn UV1 dk UV

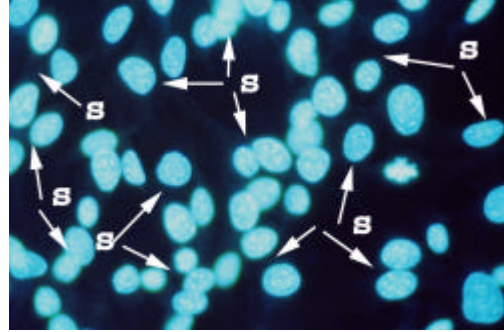
Sekil 3.38. CO25 (dex +) hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra FITC isaretili p53 antikoru (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretlenmis ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmistir. a:apoptotik hücre, n: çekirdekteki protein, s: sitoplazmik protein, p: perinükleer protein. Büyütme: 732X

p53Dapi10 sn UV

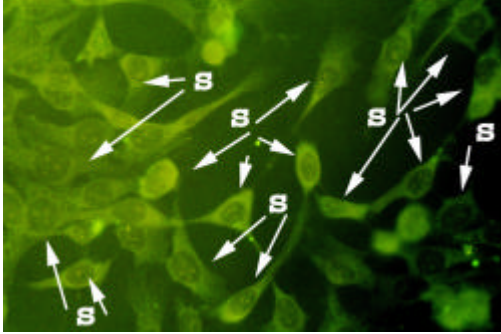
A



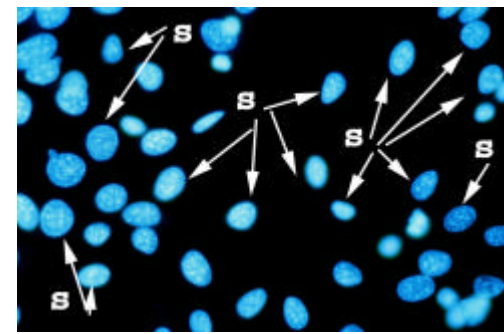
B

30 sn UV

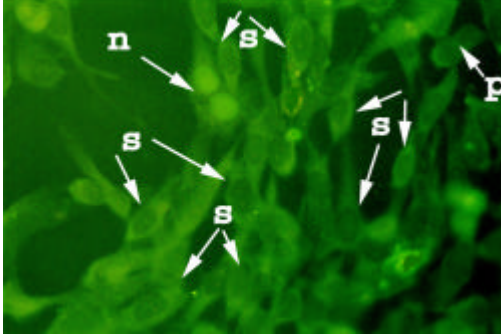
C



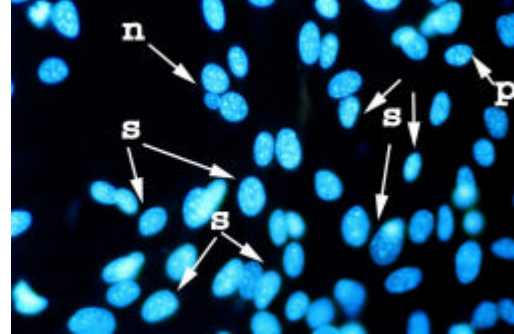
D

1 dk UV

E



F



Sekil 3.39. CO25 (dex +). hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra FITC isaretili p53 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isareetlenmis ve Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmistir. n:çekirdekte, p: perinükleer protein, s: sitoplazmik protein. Büyütme: 732X

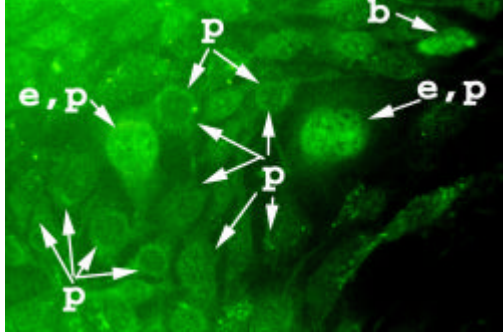
Dekzametazon varliginda kültüre edilen CO25 hücrelerinin 12 ve 24 saat inkbasyonlari sonunda FITC-MDM2 ve Dapi floresan mikroskop görüntüleri Sekil 3.40'da verilmistir. Genel olarak MDM2 proteininin sinyali 12 saat sonunda hücrelerin sitoplazmasinda çekirdek etrafinda (perinüklear) gözlenirken 24 saat sonunda protein çekirdekte lokalize olmuştur (Sekil.3.40.A ve C). Daha sonra UV'ye maruz kalmis hücreler MDM2 proteininin varligi ve lokalizasyonu için incelenmis Sekil 41. ve 42'de görüntüleri verilmistir. 10sn UV uygulandıktan 12 saat sonra hücreler incelendiğinde MDM2'nin sitoplazmada lokalize olduğu görülürken (Sekil 3.41.A), 30 sn ve 1 dk UV uygulanan hücrelerde ise MDM2 büyük hücrelerde çekirdekte gzlenmis, ancak diğer hücrelerde hem çekirdek hem de sitoplazmada rastlanmıstır (Sekil 3.41.C ve E). Hem kontrol hem de UV uygulanmıs hücreler aynı zamanda Dapi filtresiyle de incelenerek çekirdek görüntüleri Sekil 3.40.B ve D'de ve Sekil 3.41.B ve D ve F'de gösterilmistir.

CO25 hücreleri UV uygulandıktan 24 saat sonra MDM2 proteininin varligi için incelendiklerinde, MDM2 proteini, 10 sn UV uygulanmıs hücrelerin çekirdeklerinde bulunmus (Sekil 3.42.A), UV dozları arttika MDM2'nin çekirdekte yoğunlaştığı belirlenmıstır (Sekil 3.42.C ve E). Bu hücrelerin Dapi görüntüleri Sekil 3.42.B, D ve F'de verilmistir.

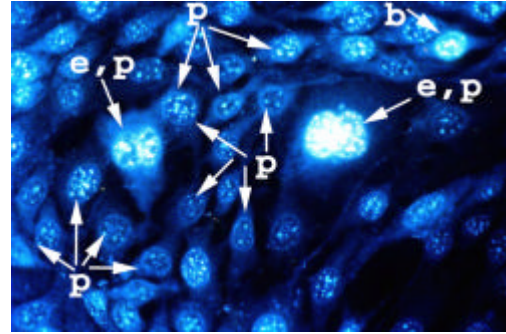
MDM2Dapi

12 saat

A

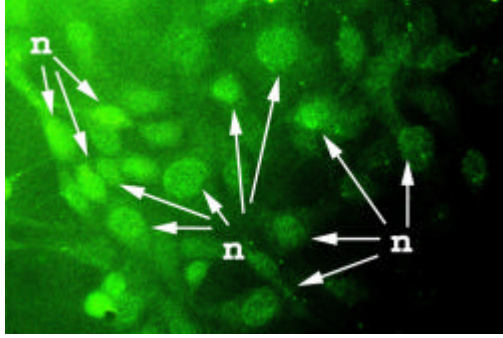


B

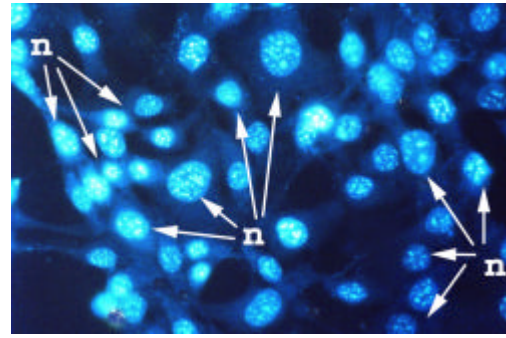


24 saat

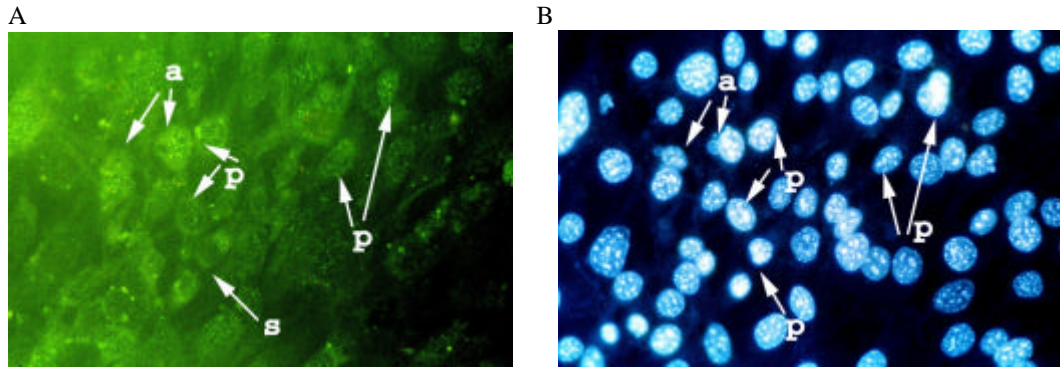
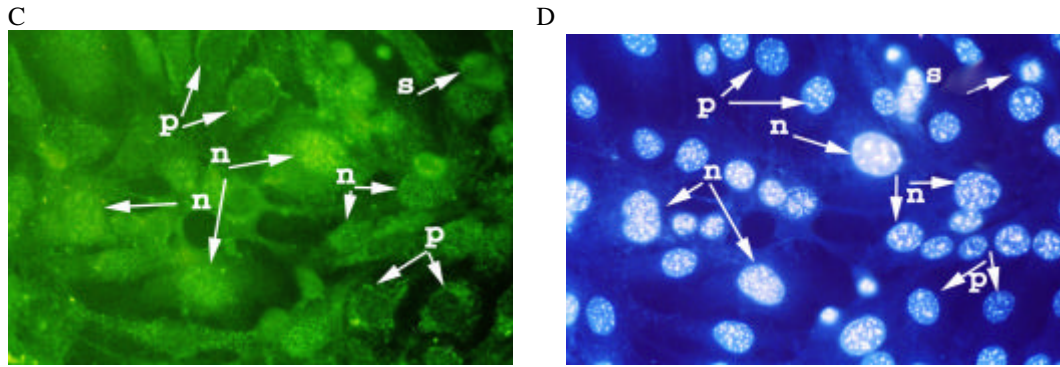
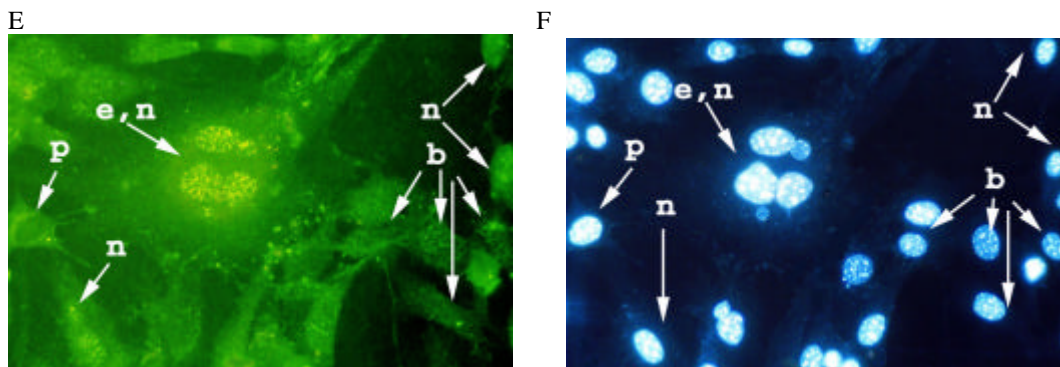
C



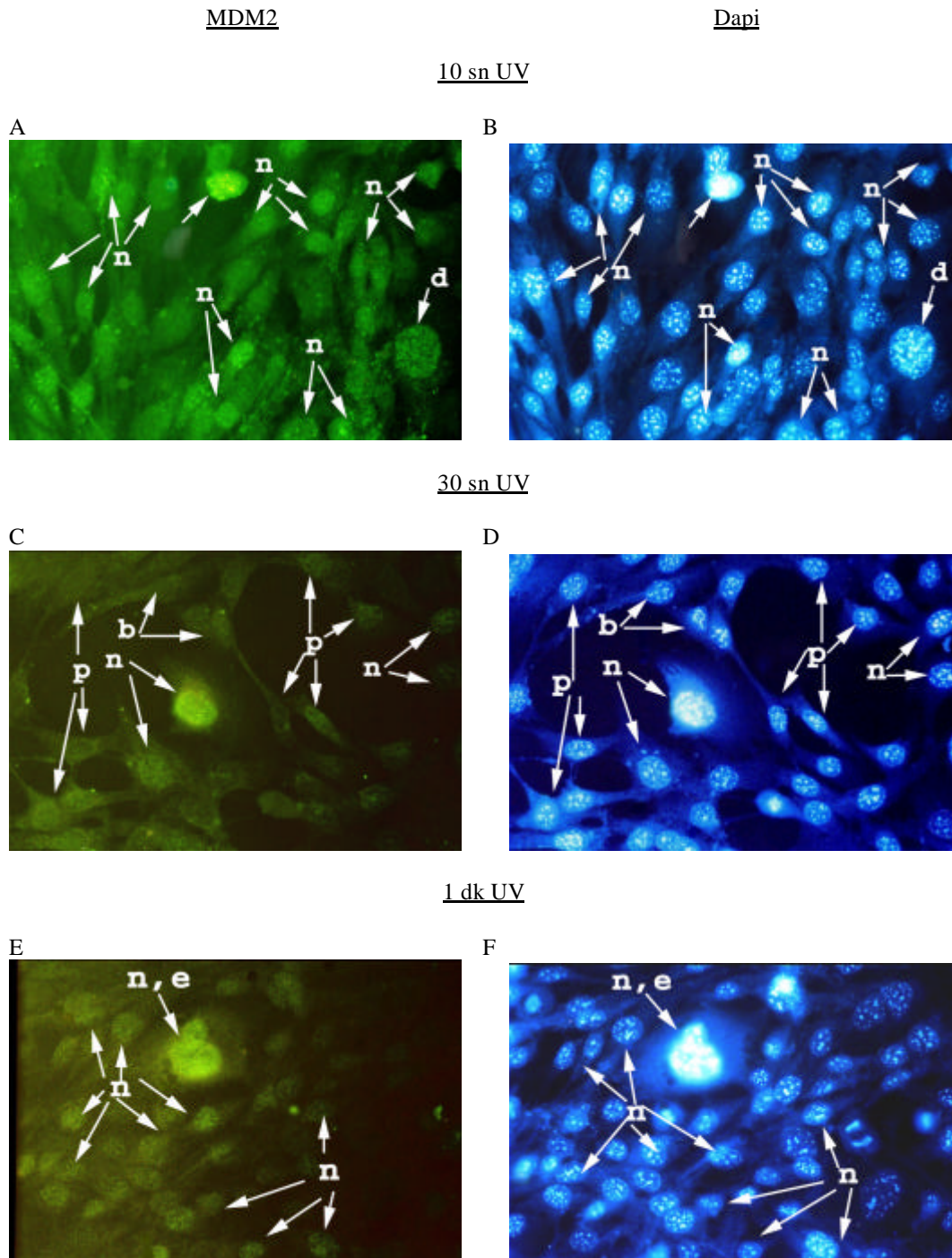
D



Sekil 3.40. CO25 (dex +) hücreleri 12 ve 24 saat inkübasyondan sonra FITC isaretili MDM2 antikoru (A, C) ile Dapi (B, D) ile isaretilenerek. Olympus BX-50 floresan mikroskopta görüntülenmiştir. b: hem sitoplazma hem çekirdekte bulunan protein, e: çok çekirdekli hücre, n: çekirdekdeki protein, p: perinükleer protein. Büyütme: 732X

MDM2Dapi10 sn UV30 sn UV1 dk UV

Sekil 3.41. CO25 (dex +) hücrelerin UV uygulamasini takiben 12 saat sonra FITC isaretili MDM2 antikoru (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretilenmis ve Olympus BX-50 flioresan mikroskopta görüntülenmistir. a: apoptotik kese, b: hem sitoplazmada hem çekirdekte bulunan protein, e: çok çekirdekli hücre, n: çekirdekdeki protein, p: perinükleer protein, s: sitoplazmik protein. Büyütme: 732X



Sekil 3.42. CO25 (dex +) hücrelerin UV uygulamasini takiben 24 saat sonra FITC isaretili MDM2 antikorunu (A, C ve E) ve Dapi (B, D ve F) ile isaretlenmis ve Olympus BX-50 filloresan mikroskopta görüntülenmistir. b: hem sitoplazmada hem çekirdekte bulunan protein, d: dev hücre, e: çok çekirdekli hücre, n: çekirdekteki protein, p: perinükleer protein. Büyütme: 732X

4. TARTISMA VE SONUÇ

ras onkogeni ile yapılan çalışmaların çoğu *ras*'in onkogenik aktivitesiyle ilgili olmasına rağmen son yıllarda yapılan çalışmalarda pro-apoptotik etkisinde olduğu bilinmektedir (Aznar ve Lacal 2001). *Ras*'a bağlı pro-apoptotik sinyallerin hücre tipine ve içeriğine bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir (Schwieger, ark. 2001). Bundan dolayı, yine de mekanizması tam bilinmeyen ve insan kanserlerinin yaklaşık %30'unda etkisi bulunan *ras*'in farklı hücre sistemlerinde apoptosis mekanizmasıyla ilişkisini araştırmak, kanser tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından çok önemlidir.

Bu çalışmada; *ras* transform hücrelerin DNA'larına, apoptozu uyarmak için UV ışığı ile hasar verilerek, hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan p53 ve onun regülatörü olan MDM2 proteinlerinin ekspresyonu ile hücrelerin apoptosis üzerine olan duyarlılıkları araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmalarda kullanılmak üzere farklı *ras* tiplerinin aktif olduğu hücreler olan H-*ras* onkogeninin aktif olduğu 5RP7 fibroblastları (Garbisa ve ark. 1987) ve insan N-*ras* onkogeninin aktif olduğu CO25 miyoblastları (Gosset ve ark. 1988) seçilmiştir. Materyal ve yöntemde açıklandığı şekilde UV ışığının farklı dozlarına maruz bırakıldıktan sonra, hücreler çekirdeklerinde ve morfolojilerinde meydana gelen apoptotik değişimler ile p53 ve MDM2 proteinlerinin varlığı için incelenmişlerdir.

Hücrelerin optimum apoptoza cevabi oluşturabileceği UV dozları belirlenirken, bazı literatür bilgileri dikkate alınmıştır. Yoon ve ark. (1996), HL-60 hücrelerinde 250 J/m² UV uygulamış, Nghiem ve ark. (2000)'da deri bazal hücrelerine 200 J/m² UV uygulamıştır. Ancak bizim çalışmamızda bu dozlardan başlanarak daha yüksek dozlar denenmiş ve 300, 900 ve 1800 J/m²'nin en etkili doz olduğu görülmüştür. Bu da çalışmamızda kullanılan F2408, 5RP7 ve CO25 hücrelerinin HL-60 ve deri bazal hücrelere göre UV'ye daha dayanıklı olduğunu göstermektedir. Yine bir çalışmayla; 10 ve 30 sn, 1, 5, 15 ve 30 dk periyotlarda ve kültür petrisinin kapagi kapalı olarak UV uygulaması yapılmış, 12, 24, 48 ve 72 saat sürelerle inkübe edilmişler ve 1dk UV uygulaması (300 J/m²)'nin üzerindeki sürelerde hücrelerin büyük oranda öldüğü tespit edilmiştir. 12 saat inkübasyon

sonunda hiçbir UV dozunda kontrole göre bir değisim gözlenmezken, 72 saat sonunda hücrelerin büyük çoğunluğunun öldüğü belirlenmiştir. Bütün bu sebeplerden dolayı, deneyler 300 J/m^2 , 900 J/m^2 ve 1800 J/m^2 dozlarında ve 24 ile 48 saat inkübasyon süreleri uygulanarak yapılmıştır.

Hücrelerin UV etkisiyle apoptoza girip girmediğini belirlemek amacıyla iki önemli özellik incelenmiştir. Birincisi; çekirdek morfolojisi ve ikincisi ise DNA fragmentasyonunun araştırılmasıdır. Apoptotik çekirdek incelemeleri için, çalışmanın başında hücrelerin alkol ile tespit edilmeden direk olarak AO ile boyanması prensibine dayanan bir yöntem denenmiştir (Clarke ve ark. 1999). Ancak bu yöntem sonunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde hücreler boyama süresince canlı olduklarından dolayı boyama işlemlerinden olumsuz etkilenmiş olup kontrol hücrelerinde dahi tipik olarak geç apoptotik hücre görüntülerine rastlanmıştır. Bu da yöntem seçiminin ve özellikle apoptotik mekanizmanın çalışıldığı yöntemler seçilirken, hücreyi strese sokacak olası her türlü koşulun dikkatlice düşünülmesi gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle apoptotik çekirdeğin incelenmesi, hücrelerin tespit edilerek Cotter ve Martin (1997)'nin yönteminin geliştirilmesiyle yapılmıştır. Çalışmamızda kullanılan F2408, 5RP7 ve CO25 hücrelerde UV uygulamasının etkileri toplu bir şekilde özetlenerek Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Fibroblast ve miyoblastlarda UV'nin etkisi sonucu AO/EB boyamasi ve DNA agaroz jel yöntemleriyle elde edilen bulgularin özeti.

	Hüc. Büzülme		Çek. /sitop. Orani. azalm.		Krom. Yogun.		Krom çek. zar. Lok.		Çekir. parç.		Sitpl. Parç. (apopt. body)		Dev hücre		Çok çek. hücre		DNA Frag.		
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	
F2408																			
10 sn	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	S	S	
20 sn	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	S	S	
1 dk	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	S	S	
5RP7																			
10 sn	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	F	S	
30 sn	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	F	S	
1 dk	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	F	S	
CO25 Dex-																			
10 sn	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	S	-	
30 sn	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	S	-	
1 dk	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	S	-	
CO25 Dex+																			
10 sn	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	
30 sn	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	S	S	
1 dk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	
C2																			
10 sn	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	Y	Y	
30 sn	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+			
1 dk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-			

S: smear, F: Fragmentasyon, Y: yapılmadi, 10 sn, 30 sn, 1 dk: uygulanan UV süreleri, 24 ve 48: Inkübasyon süreleri

4.1. Fibroblastlarda UV'nin Apoptotik Etkileri

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi aktif H-ras onkogeni içermeyen F2408 hücrelerinde, UV isiginin etkisiyle olan sitoplazma büzülmesi ve kromatinin çekirdek zarı etrafında yoğunlaşması gibi erken apoptotik evre (Liu ve ark. 2000) hücrelerinin karakteristik özellikleri belirgin olarak gözlenmiştir. Hiçbir uygulamaya maruz bırakılmamış sağlıklı hücreler, AO ile boyandıklarında çekirdekleri yeşil sitoplazmaları sarı renklere gözlenmiştir. Erken apoptotik çekirdekte hücrenin boyanma özelliği değişmemektedir. AO ile çekirdek yeşile, sitoplazma sarıya boyanmakta ve yoğunlaşarak çekirdek zarında lokalize olmuş kromatin koyu yeşil boyanmaktadır. (Cotter ve Martin1997). Bu nedenden, F2408

fibroblast hücreleri, çeşitli sürelerde UV uygulamasının ardından belirtilen periyotlarda inkübe edildiklerinde, Cotter ve Martin (1997)'in açıkladığı şekilde boyanma karakteri göstermiş ve çekirdek yeşile, sitoplazma sarıya, yoğunlaşarak çekirdek zarında lokalize olmuş kromatin ise koyu yeşile boyanmıştır.

Genel olarak F2408 ile 5RP7 hücrelerinin UV ışığına cevabi karşılaştırıldığında, genellikle erken apoptotik özellik olan hücre büzülmesi, çekirdek/sitoplazma oranındaki azalma ve kromozom yoğunlaşması ile geç apoptotik özellik olan apoptotik kese oluşumu bakımından aralarında bir fark gözlenmemiştir. Fakat 5RP7 hücrelerinin genelde kromatinin çekirdek zarında lokalizasyonu ve çekirdek parçalanması bakımından F2408 hücrelere göre daha dayanıklı olduğu söylenebilir. F2408 hücreleri bu oluşumlar bakımından 24 saat inkübasyon sonunda dayanıklı bulunurken 48 saat sonunda apoptosise duyarlılık kazanmışlardır.

Neuroblastomaların normal koşullarda spontan olarak hasarlanmasında *ras*'in rolünü araştırmış olan Kitanaka ve ark. (2002), tümör dokularında *ras* ekspresyonu, apoptosisin en önemli belirteçlerini ve hücre dejenerasyonunu belirlemek amacıyla ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ve immünohistokimyasal yöntemler kullanmışlardır. Hücre bozulması çalışmalarını aynı zamanda *H-ras* ile transfekte olmuş neuroblastoma hücrelerinde *in vitro* koşullarda da gerçekleştirmişlerdir. Sonuçta; dejenerasyon olan hücrelerde *ras* ekspresyonu artmış ancak apoptotik karakterlere rastlanmamıştır. Dejenere olmuş hücrelerde kromatinin çekirdekte yoğunlaşmasına rastlanmazken, kaspaz-3 aktivasyonu gözlenmemiş ve DNA'ların apoptotik olmayan rastgele fragmentasyonu görülmüştür. Bizim sonuçlarımızda da *H-ras* transformasyonunda hücrelerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak; *H-ras* transformasyonunun fibroblast hücrelerini en azından kromatinin çekirdek zarında yoğunlaşması ve çekirdek parçalanması özellikleri bakımından duyarsızlaştırdığını ileri sürebiliriz.

Çok çekirdekli hücrelere 5RP7 fibroblastlarında az da olsa rastlanırken, F2408 hücrelerinde yok denecek kadar az oranda, yalnızca 10 sn UV verildikten 48 saat sonra gözlenmiştir. Bunun da 5RP7 hücrelerinin hızlı çoğalma özelliklerine bağlı olarak sitokinez geçirmeyen hücrelerin bir sonucu olabileceği

düşünülmüştür. Aynı şekilde anormal tek çekirdekli dev hücreler yavaş çoğalma hızlarına sahip F2408 hücrelerinde 48 saat sonunda görülürken, 5RP7 hücrelerinde görülmemesi, hücrelerin sürekli mitoz geçirdiklerinden dolayı küçük morfoloji göstermelerinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

4.2. Miyoblast Hücrelerde UV'nin Apoptotik Etkileri

Dekzametazon ile uyarılabilen mutant insan *N-ras* onkogeni içeren CO25 (Dex-) ve (Dex+) hücreleri karşılaştırıldığında, *ras* aktif ve inaktif durumların her ikisinde de, erken apoptotik özellikler olan hücre büzülmesi, çekirdek sitoplazma oranında azalma ve kromatinin çekirdek zarında yoğunlaşması bakımından belirgin bir fark bulunmamaktadır, her iki durumda da hücreler apoptosise benzer oranda duyarlılığa sahiptir. Ancak kromatin yoğunlaşması bakımından, UV uygulamasından 48 saat sonra CO25 (Dex-) hücrelerinin duyarsızlaşmasına karşın CO25 (Dex+) hücreleri duyarlı kalmaya devam etmiştir. Yine CO25 (Dex-) hücrelerinin çekirdek parçalanmasına karşı duyarlı olduğu görülürken 10 sn UV süresinde CO25 (Dex+) hücrelerinde *ras* aktivasyonu sonucunda dayanıklı hale geldiği görülmektedir.

Geç apoptotik karakterlerden en önemlisi olan apoptotik kese oluşumuna ise, CO25 (Dex-) hücrelerinde rastlanmamasına karşın CO25 (Dex+) hücrelerinde yüksek oranda rastlanması, *N-ras* transformasyonunun apoptosise duyarlılığını arttırdığını göstermiştir. *N-ras*'in apoptosise duyarlılığını arttırması bu etkisi, 5RP7 hücrelerinde *H-ras*'in etkisiyle zıt yönde olmuştur. Çoğalma kapasitesi düşük olan CO25 (Dex-) hücrelerinde, çok fazla oranda dev hücelere rastlanırken CO25 (Dex+) hücrelerde rastlanmaması çoğalmanın beklenen sonucu olarak değerlendirilebilir. Çok çekirdekli hücrelerin oluşumu bakımından; her iki koşulda da (Dex- ve Dex +) fark gözlenmemesi, sitokinez mekanizmasının *ras*'dan bağımsız bir mekanizmayla etkilendiğini düşündürmektedir.

Hücrelerin AO/EB ile boyanma özellikleri, yukarıda açıklandığı gibi sağlıklı ve erken apoptotik hücrelerin boyanma karakterlerinde olduğu gibi görülmüştür. Hücreler, sitoplazma zari bütünlüğünü ve seçici geçirgenliğini

korudugu için sadece AO ile boyanabilmiş ve floresan ışıkta çekirdekleri yeşil, sitoplazmaları sarı renkte gözlenmiştir.

CO25 hücrelerinin orijini olan ve *N-ras* onkogeni içermeyen C2 miyoblastları ile de aynı çalışmalar tekrar edilmiştir. CO25 hücresinde bulunan *N-ras* onkogeni dex varlığında aktif edilmediği halde bilinmeyen başka yollardan da aktive olma ihtimaline karşı, hiç *ras* içermeyen kontrol hücre olarak C2 miyoblastlarının kullanılması uygun görülmüştür. Bu hücrelerin UV'ye cevapları da CO25 Dex- hücreleriyle benzerlik göstermiştir. Bütün UV sürelerinde 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda erken apoptoz karakterleri olan hücre büzülmesi, çekirdek/sitoplazma oranının azalması ve kromatinin yoğunlaşarak çekirdek zarına çekilmesi bakımından duyarlılık gösterirken çekirdek parçalanması bakımından 48 saat sonunda bir direnç kazandığı görülmüştür. Aynı şekilde her iki inkübasyon süresi ve tüm UV dozlarında apoptotik kese oluşumuna karşı da dayanıklı olduğu görülmüştür. Buradan, hücrelerin UV etkisi ile apoptosise gittiği ve erken apoptotik karakterleri gösterdiği ancak, apoptosis aşamalarını geçirme hızının CO25 (Dex-) hücrelerinde olduğu gibi daha yavaş olduğu ve geç apoptosise karşı dayanıklı olduğu anlaşılmıştır. *ras* aktif olan hücrelerde UV uygulamasının geç apoptotik hücre oluşumunu arttırdığı, *ras* inaktif olan CO25 (Dex-) hücrelerde ise daha çok hücre büyüklüğünün ve çekirdek parçalanmasının artmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

Apoptotik yolun uyarılması konusunda, *ras* transformasyonu olmayan hücreler ile yapılmış çalışmaların bir çoğunda çeşitli ajanlarla hücrelerin apoptosise girmesinin arttırıldığı belirlenmiştir. IGF-1 ile apoptozu uyarılan LM2d6 hücrelerinde IGF-1 uygulamasından 24 ve 72 saat sonucunda artan oranda apoptotik kese oluşumu gözlenirken (Seto ve ark. 2001), Yoon ve arkadaşları (1996)'da HL-60 lösemi hücrelerinde UV ve bazı anti kanser ilaçları denemeler ve hücrelerin apoptotik davranışlarını çeşitli yöntemler ile analiz etmişlerdir. Uygulanan UV ve kanser ilaçlarının, kanserli hücrelerin büyük oranda apoptosis ile ölmesine yol açmıştır. Bu sonuç, bizim bulgularımızı destekler yöndedir. Lin ve arkadaşları ise (2003), bir liken özütü olan CEP-2 ile HL-60 ve K562 hücrelerindeki apoptosisi uyardıklarında, DNA'si fragmente olan hücrelerin elektron mikroskopik analizlerini yapmışlardır. Yüksek dozda (300mg/ml) CEP-

2'nin hücredeki apoptotik yolu uyardığı tespit edilmiştir. *ras* transformasyonu olan hücrelerde yapılmış bir çalışmada ise, p21CIP1 ve p27KIP1'in her ikisinin de olmadığı primer fare fibroblast (MEF) hücre hatlarında, onkogenik H-*ras* val-12 (RasV12) ekspresyonunun siklin D1 birikmesini arttırdığı görülürken (Groth ve ark. 2000) yine aynı çalışmada p21CIP1 ve p27KIP1'in her ikisinin de olmadığı hücrelerde RasV12'nin ekspresyonunun, hücre döngüsünün durdurulmasına neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca FACS (floresan activated cell sorting) ile propidyum iyodür-çekirdek incelemelerinde, hücrenin S evresi boyunca ilerlediği sırada DNA replikasyonunun durdurulmasından önce anormal çekirdek bölünmeleri de belirlenmiştir.

Mitomisin C'nin p53 yoluyla apoptozu uyardığı Schwieger ve arkadaşları tarafından (2001) bildirilmiştir. Bu çalışmada, *ras* ekspresyonunu tespit etmek ve kontrol hücrelerin mitomisin C'nin uyardığı apoptoza duyarlılıklarını belirlemek için; *ras* transform IR fibroblast hücreler *ras* aktivasyonunu sağlamak amacıyla IPTG ile ön muameleye tutulmuşlardır. Daha sonra mitomisin C uygulaması yapılmış ve sonuçta; kontrollerine göre çok daha hızlı çoğalan, *ras* ekspresyonu olan hücrelerin mitomisin C tarafından apoptoza karşı uyarıldığı gözlenmiştir. Bu bulgu bizim sonuçlarımızla uygunluk göstermektedir. N-*ras* transform hücrelerin UV uygulamasından sonra kontrolüne oranla apoptosise karşı duyarlılığı artmıştır. Ancak H-*ras* transform hücrelerde apoptotik etkiler N-*ras*'in etkisiyle zıt yönde olmuştur.

Turner ve arkadaşları (2002), bizden farklı yöntemler kullanarak yaptıkları bir çalışmada ise, YAMC ve YAMC-Ras kolon hücrelerinde bütirat ve PUFA'nin hücre çoğalması ve apoptosise üzerine etkilerini araştırmışlar. Bu amaçla apoptosise mekanizmasında rolü olan ve en iyi apoptosise indikatörü (IAP) olarak kabul edilen kaspaz 3 aktivitesi ölçülmüş ve bütirat varlığında kaspaz 3'ün aktivasyonunun, hücrelerin selale şeklindeki kaspaz aktivitesini başlatarak apoptosise neden olduğu gözlenmiştir. *Ras* ekspresyonu olan YAMC-*ras* hücrelerde kaspaz aktivitesinin çok daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir. Buda hücrenin çoğalması yada apoptosise ile ölmesinin *ras* aktivitesine bağlı olduğunu göstermektedir.

4.3. DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi

UV etkisiyle *ras* transform hücrelerde olası apoptotik DNA fragmentasyonu üç hücre tipinin her birinde araştırılmış ve pozitif kontrol olarak apoptotik DNA fragmentasyonuna neden olduğu bilinen Etaposit kullanılmıştır (Bassi ve ark. 2002).

Normal fibroblastlar olan F2408 hücrelerinin UV uygulamasının ardından etaposit de dahil olmak üzere farklı UV dozlarını takiben farklı inkübasyon sürelerinden sonra elde edilen DNA örnekleri agaroz jel üzerinde, tipik apoptosis belirtisi olarak merdiven şeklinde bantlaşma yerine difüzyon şeklinde yayılma (smear) göstermiştir. Nükleozomal DNA fragmentasyonunun apoptosisin erken evresinde olduğu bilinmektedir (Engin ve Özyardımcı 2001). Ancak F2408 hücrelerinin apoptotik çekirdek incelemelerinde yoğun oranda, geç apoptosis göstergesi olan apoptotik kese oluşumuna yöneldiği göz önüne alınırsa, geç apoptosis evresinde hücrelerin DNA'larında rastgele parçalanmalar sonunda nekrotik hücre DNA'larında olduğu gibi smear meydana gelebileceği düşünülebilir. H-*ras* aktif olan 5RP7 hücrelerinde ise 24 saat inkübasyon sonunda DNA'nın 700 bp'den itibaren fragmente olması, erken apoptotik çekirdek karakteri sergilediğini de desteklemektedir. 48 saat inkübasyon sonunda ise F2408 hücrelerinde olduğu gibi geç apoptosis evresine girdiğinden dolayı DNA smear özellik kazanmıştır. Sonuç olarak; *ras* aktivasyonu olan 5RP7 hücrelerinin kontrol hücresinden bir farkı olmadığı, sadece 24 saatte kontrolden farklı olarak apoptosise dayanıklı olduğunu ileri sürebiliriz.

N-*ras* onkogenine sahip CO25 miyoblastların UV'nin etkisiyle 24 saatte geç apoptotik evreye girdiği smear DNA fragmentasyonu ile gözlenirken; 48 saat sonunda morfolojik çalışmalarında da desteklediği gibi, agaroz jel elektroforezinde hücre miktarında azalma gözlenerek hücrelerin büyük oranda öldüğü belirlenmiştir. N-*ras*'in aktif olduğu Dex+ hücrelerde ise hem 24 hem de 48 saatin sonunda DNA'da bir fragmentasyon gözlenmemiştir. Sadece 48 saat inkübasyonun sonunda 10 sn UV dozunda bir DNA'nın smear fragmentasyon göstermiştir. Sonuç olarak; *ras* aktivasyonu sonucunda CO25 hücrelerin apoptosise daha dayanıklı hale geldiği söylenebilir. H-*ras* aktivasyonu ile N-*ras*

aktivasyonlarının apoptosise direnç kazandırdığı, ancak *N-ras*'in aktif olduğu hücrelerin apoptosise gitme hızının diğerine oranla daha yavaş olduğu, hücre tipine bağlı olarak, farklı nükleazlar ile nükleozomların farklı bölgelerinden kesilmiş olabileceği ve bu yüzden de merdiven şeklinde bantlaşma yerine smear şeklinde fragmentasyon olabileceği söylenebilir.

Nekrotik hücre DNA'sinin agaroz jelde bantlaşma yerine smear oluşturduğu bilinmesine rağmen, bizim bulgularımızı destekleyen çok sayıda apoptotik DNA'nin smear oluşturduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; EPA ile uyarılmış HT29 kolon adenokarsinoma hücrelerinde (Clarke ve ark. 1999) ve IGF1 ile uyarılmış LM2d6 fare fibroblast hücrelerinde (Seto ve ark. 2001) apoptotik DNA parçalanması da smear olarak gösterilmiştir.

Aynı faktörlerin farklı hücrelerde DNA fragmentasyonunun farklı şekilde etkilediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin; siçan yolak sac tümör hücre hattı olan NMT-1R hücrelerinde, radyoaktif hassasiyetin belirlendiği bir çalışmada, kafein ile uyarılan hücrelerin apoptotik DNA fragmentasyonunda fark görülmezken, radyasyon uygulanmış hücrelerde ve kafein ile radyasyonun birlikte uygulanması sonucu hücrelerde apoptotik DNA smear olarak gözlenmiştir (Higuchi ve ark. 2000). Yine aynı şekilde kanserli hücre hatları olan siçan C6 ve insan RBR12T hücre hatları üzerine, toksik etkileri bilinen OHAP-1 adı verilen bir venomun apoptotik etkileri araştırılmış, C6 hücrelerinde az da olsa bir DNA fragmentasyonu gözlenirken RBR12T hücrelerinde büyük oranda smear apoptotik DNA parçalanmasına neden olduğu belirlenmiştir (Sun ve ark. 2003).

Bizim bulgularımızdan farklı olarak bazı hücre tiplerinde, çeşitli etmenler ile uyarılan normal ve kanserli hücre hatlarında DNA'nin tipik bir nükleozomal apoptotik fragmentasyon gösterdiği de bildirilmiştir. Örneğin, Jurkat H9-3D8 hücreleri APO-1 IgC3 ile muamele edildikten 24 saat sonra, düzenli bantlar oluşturarak fragmente olmuştur (Daniel ve ark., 1999). HL-60 ve K562 gibi kanser hücre hatlarının, UV ve anti kanser ilaçlarla (Yoon ve ark. 1996) veya bir liken özütü olan CFP-2 ile (Lin ve ark. 2003) uyarılmış apoptosise duyarlılıkları DNA fragmentasyonu ile gösterilmiştir.

Normal insan lenfositlerinde anti kanser ilaçlar olan fludarabine ve idarubicine ile apoptosis uyarıldığında, DNA'larında belirgin olarak gözlenen

fragmentasyona paralel olarak morfolojik incelemelerde de hücre çekirdeğinde de bir fragmentasyon gözlenmiştir (Gonzales-Cid ve ark. 2002).

Çalışmamızın başlangıcında F2408 hücrelerinde farklı bir DNA izolasyon yöntemi kullanılarak bir ön çalışma yapılmıştır. Fenol gerektirmeyen ve işlem basamakları kısa olan, Clarke ve ark. (1999)'nin yöntemi uygulanmış, aynı zamanda farklı UV süreleri (5 dk, 15 dk ve 30 dk) ve farklı inkübasyon süreleri (48 ve 72 saat) de denenmiştir. Uygulanan bu DNA izolasyonu yönteminde işlemler sırasında fenol-kloroform temizlenmesi ile ortamdaki RNA ve protein parçaları temizlenmediğinden dolayı, kontrol DNA'ları da dahil olmak üzere bütün hücrelerin DNA'larının agaroz jel elektroforezinde smear oluşturarak yürüdüğü görülmüştür. Bu sebeple, bu yöntemin bizim çalışmamızın amacına uygun olmayacağına karar verilmiştir.

4.4. İmmüno floresan yöntemi ile p53 ve MDM2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının belirlenmesi

Bu çalışmada; *ras* transform hücrelerin DNA'larına, apoptosisi uyarmak için UV ışığı ile hasar verilerek, hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan p53 ve onun regülatörü MDM2 proteinlerinin ekspresyonu ve hücre içindeki lokalizasyonları araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmalarda kullanılmak üzere farklı *ras* tiplerinin aktif olduğu hücreler seçilmiştir. *H-ras* onkogeninin aktif olduğu 5RP7 fibroblastları ve insan *N-ras* onkogeninin aktif olduğu CO25 miyoblastları materyal ve yöntemde açıklandığı şekilde UV ışığının farklı dozlarına maruz bırakıldıktan sonra p53 ve MDM2 antikorları ve dapi çift isaretleme ile incelenmiştir.

4.4.1. p53 Proteininin ekspresyonu ve lokalizasyonu

F2408, 5RP7 ve CO25 hücrelerinde UV uygulamasının p53 ekspresyonu üzerine etkileri toplu bir şekilde özetlenerek Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. p53'ün bir çok fonksiyonu çekirdekte lokalize olmasını gerektirmektedir. Mutant p53 çoğunlukla neoplastik ve transform hücrelerin çekirdeklerinde lokalize olurken,

yabani tip p53'ün sitoplazmik alanda da biriktigi de bildirilmistir (Ottaggio ve ark. 2000).

Çizelge 4.2. Fibroblast ve miyoblastlarda UV'nin p53 ekspresyonu üzerine etkisi özetlenmistir.

P53	Sitoplazma		Perinüklear		Çekirdek		Homojen		Miktar		
	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24	
kontrol 10 sn F2408 30sn 1 dk	+	+									Doza bagli artis
kontrol 10 sn 5RP7 30sn 1 dk	+			+	+ g.					ç.a ç.a ç.a	
kontrol 10 sn CO25 30 sn 1 dk	+	+ b.a									30sn ve 1dk da artis
kontrol CO25 10 sn Dex(+) 30sn 1 dk	+				+	+					Çok az siny. var

b.a: belirgin artis, b.h.: bazi hücrelerde, ç.a: çok az, g: genellikle, y: yoğunlasarak artis

F2408 fibroblast hücrelerinin kontrol gruplarında p53 sinyali genel olarak sitoplazmada lokalize olurken, H-*ras* aktif 5RP7 hücrelerinin 12 saat inkübe edilmiş kontrolünde ise, p53'ün çekirdekten sitoplazmaya geçtiği, 24 saat inkübasyon sonunda peri nüklear alanda yani sitoplazmada çekirdek zari etrafında yoğunlastığı görülmüştür. Bu da *ras* aktif hücrelerde p53'ün aktivitesini göstermiştir. UV uygulandığında ise, F2408 hücrelerinde p53'ün lokalizasyonu bakımından bir değişiklik olmazken, 5RP7 hücrelerinde UV etkisi ile p53'ün sitoplazmada, perinüklear alanda lokalize olduğu hücrelerin sayısında bir artis gözlenmiştir. Ancak normal fibroblastlar olan F2408'de perinüklearda p53'e rastlanmamıştır. 5RP7 hücrelerinde UV etkisiyle sitoplazmada çekirdek etrafında yoğunlaşması, p53'ün *ras*'a bağlı bir aktivasyonunu göstermiştir.

Miyoblast hücrelerin kontrol gruplarında, *ras* aktif ve inaktif hücrelerinin her ikisinde de p53 sitoplazmada lokalize olurken, UV etkisiyle CO25 (Dex-) hücrelerde yine p53'e sitoplazmada rastlanmıştır. N-*ras* aktif olan Dex+

hücrelerinde p53'ün belirgin bir şekilde çekirdekte lokalize olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, N-ras transformasyonunun p53'e bağlı apoptotik yolu uyardığı söylenebilir.

H-ras ve N-ras aktif hücreler karşılaştırıldığında, N-ras transformasyonu olan CO25 hücresinde her iki inkübasyon süresinde p53'ün belirgin bir şekilde çekirdekte lokalize olması, N-ras transformasyonunun miyoblastları apoptotikse daha duyarlı hale getirdiğini düşündürmektedir.

4.4.2. MDM2 proteininin ekspresyonu ve lokalizasyonu

F2408, 5RP7 ve CO25 hücrelerinde UV uygulamasının MDM2 ekspresyonu üzerine etkileri toplu bir şekilde özetlenerek Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Fibroblast ve miyoblastlarda UV'nin MDM2 ekspresyonu üzerine etkisi özetlenmiştir.

MDM2	Sitoplazma		Perinüklear		Çekirdek		Homojen		Miktar	
	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24
kontrol 10 sn F2408 30sn 1 dk							+	+ a		
							+ a	+ ç.a		
							+ a	+ y		
							+ a	+ y		
kontrol 10 sn 5RP7 30sn 1 dk							+	+		apop .Hüc .artis
							+	+		
							+	+		
							+	+		
kontrol 10 sn CO25 30 sn 1 dk	+					+	+	+ a		g. az siny. var
							+ y	+		
							+ y	+		
kontrol CO25 10 sn Dex(+) 30sn 1 dk	+		+					+		
								+		
							+	+	+	
							+	+	+	

a: azalarak, ç.a: çok az, g: genellikle, y: yoğunlaşarak artis

Mdm2 proteininin iki farklı ras transformasyonu taşıyan hücrelerde UV etkisi ile apoptotik yolda etkisi araştırıldığında, F2408 ve 5RP7 fibroblastlarının kontrol gruplarında MDM2 çekirdekte görülürken, UV uygulamasından sonra H-ras transform hücrede MDM2 miktarı çekirdekte artmış normal fibroblastlarda ise

tam aksi olarak azalma görülmüştür. Normal fibroblastlarda p53 miktarının çok olması, MDM2'nin az olmasından kaynaklanabilir. Çünkü MDM2, p53 proteinini parçalamakta ve aktivitesini kaybetmesine neden olmaktadır (Zhang ve ark. 2004, Brooks ve Gu 2003). Transform hücrelerde ise MDM2 miktarının artmış olması, sitoplazmadaki p53 miktarının azalmasına neden olduğu düşünülebilir çünkü MDM2, p53'ün bir regülatörüdür ve sitoplazmik p53 miktarının belirlenmesinde rol oynamaktadır (Vargas ve Ronai 2002, Daujat ve ark 2002).

Birçok yayında, normal kosullarda p19'un MDM2'yi bloke ederek p53'ün normal aktivitesini göstermesine ve dolayısıyla apoptozun gerçekleşmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir (Cox ve Der 2003, King ve ark., 2002, Felsher ve ark. 2000). Ancak, *ras* transform hücrelerde p19 gibi bazı proteinlerin aktivasyonu engellendiğinde H-*ras* transform 5RP7 fibroblastlarda MDM2'nin aktivite göstermediği ve p53'ün miktarında artışla birlikte hücrenin apoptoza karşı duyarlı hale geldiği görülmüştür.

CO25 (dex-) hücrelerde kontrol gruplarında MDM2 genel olarak çekirdekte lokalize olmuşken N-*ras* transform hücrede kontrol grupta sitoplazmik perinükleer alanda lokalize olmuştur. UV uygulamasıyla birlikte Mdm2 dex+ hücrelerde büyük oranda çekirdekte lokalize olmaya başlamış, Dex- hücrelerde ise 12 saate oranla 24 saat inkübasyon sonunda hala çekirdekte ancak miktarı giderek azalmıştır. Transform hücrelerde her iki inkübasyon süresinde MDM2'nin çekirdekteki lokalizasyonu ve miktarındaki artış dikkat çekmiştir. Yine bu hücrelerde 12 saat inkübasyondan sonra, 10 sn ve 30 sn UV sürelerinde hem çekirdekte hem sitoplazmada homojen olarak görülmüştür. Ancak aynı hücrelerde p53 proteinine sitoplazmada rastlanmıştır. *ras* aktivasyonu ile MDM2 miktarındaki artış, p53'ün sitoplazmaya geçişini ve parçalanmasını hızlandırırken aynı zamanda yeni sentez edilen MDM2'nin sitoplazmada sinyal verdiğini ileri sürebiliriz.

ras ile p53 arasındaki ilişkiyi açıklamak için yapılan bir çalışmada SW480 hücreler farnesil tiosalisilik asit (FTS) ile muamele edildikten sonra *ras*, p53 ve p21^{waf1} miktarları Western Blot yöntemi ile araştırılmış ve FTS uygulamasının ardından *ras*'da belirgin bir azalma olurken, p53 miktarında artış gözlenmiştir. Ras'in p53'ü aktive edebilmesi için p19'a gereksinimi vardır (Wiener ve ark.

2004). Yih ve Lee (2000), yaptıkları bir çalışmada, insan fibroblast hücrelerinde (HFW) arsenit ile uyarılan DNA zinciri kırılmalarını Comet yöntemiyle tespit etmişler ve arsenit ile uyarılan hücrenin çekirdeğinde p53'ün önemli miktarda biriktiğini belirlemişlerdir. ES hücrelerinde MDM2 ve p53 seviyeleri PALA, uygulamasının ardından araştırıldığında, MDM2 ile p53'ün kompleks oluşturdıkları ancak MDM2 seviyesinde artış olmadığı tespit edilmiştir (Aladjem ve ark. 1998).

NIH3T3 hücrelerde eksprese olan p53'ün seviyesini belirlemek için hücreler pcDNA ile transfecte edildikten sonra PEI bağımlı olarak p53'ün hücre içi seviyesinde ve onun regülatörü olan MDM2 seviyesinde anlamlı bir artışa rastlanmamıştır (Lepik ve ark. 2003).

Sonuç olarak, MDM2 proteini p53'ü parçaladığı için çekirdekte lokalize olan p53 azalmakta ve hücreler apoptosisten kaçmaktadırlar. N-*ras* ve H-*ras* aktif hücreler arasında apoptosise direnç ve p53-MDM2 proteinlerinin ekspresyonu bakımından fazla fark olmamıştır. Genel olarak her iki hücre tipi de UV'ye karşı benzer karakterleri göstermiştir. N-*ras* transform hücrelerde p53'ün az oranda görünmesinden dolayı, H-*ras* transform hücrelerde MDM2'nin *ras* bağımlı aktivasyonunun daha fazla olduğunu ileri sürebiliriz.

Ras aktivasyonu ile pro apoptotik ilişkisinin açıklanmasına yönelik çalışmalar, farklı yöntemler uygulanarak ta yapılmaktadır. Örneğin apoptosisin önemli belirteçlerinden olan DNA zincirindeki kırılmaları (3' serbest OH grupları)'nin tespit edilmesi TUNEL yöntemi ile yapılmaktadır (Schwieger ve ark. 2001). Apoptotik hücrelerin oranının belirlenebilmesi için Flowsitometride Anneksin V boyama yöntemi ile G1 evresinde bekleyen ve ölmüş hücrelerin sayısı belirlenebilmektedir (Sun ve ark. 2003). FACS yöntemi ile propidyum iyodür ile çekirdek boyamaları da apoptotik morfolojideki hücrelerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemler arasındadır. Biz çalışmamız sırasında laboratuvar imkanlarımıza uygun olan yöntemleri seçtik.

Çalışmanın bundan sonraki kısmında, tez kapsamında çalışmadığımız p19^{ARF} ile *ras* sinyal yolundaki ve apoptosiz mekanizmasında görev alan p53 ve MDM2 proteinleri üzerine etkilerinin araştırılması planlanmaktadır. Bunun için p21^{ras}, p19^{ARF}, p53 ve MDM2 proteinlerinin ekspresyonlarının Western Blot

yöntemi ile tespit edilmesi ve apoptotik hücrelerin oranının ise Flow sitometri Anneksin V floresan boyama yöntemleri ile belirlenmesi düşünülmektedir.

Bahsettığımız bütün bu mekanizmaların aydınlatılabilmesi, herhangi bir basamakta etkili olan bir molekülün keşfedilmesi en azından *ras* onkogeninin etkili olduğu kanserlerin tedavisine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

ADAMS, J.M. ve CORY, S., *Apoptosomes: engines for caspase activation*, Curr. Opin. in Cell Biol., **14** (6), 715-720 (2002).

ADAMS, P.D. ve KAELING Jr, W.G., *Negative control elements of the cell cycle in human tumors*, Current Opinion in Cell Biology, **10** (6), 791-797 (1998).

ADJEI, A.A., *Blocking oncogenic ras signaling for cancer therapy*, Journal of the National Cancer Institute, **93** (14), 1062-1074 (2001).

AGARWALL, M.L., TAYLOR, W.R., CHERNON, M.V., CHERNOVA, O.B. ve STARK, G.R., *The p53 network*, J. Biol. Chem., **273** (1), 2, 1-4 (1998).

d'AGOSTINO, P., FERLAZZO, V., MILANO, S., ROZA, M.L., BELLA, G.D., CARUSO, BARBERA, C., GRIMAUDO, TOLOMEO, M., FEO ve S., CILLARI, *Chemically modified tetracyclines induce cytotoxic effects against J774 tumour cell line by activating the apoptotic pathway*, Intern. Immunopharmacology, **3**, 63-73 (2003).

AINSLEY, W. ve JAMES, G.H., *Polymorphisms of H-ras-1 and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta-analysis*, Environmental Health Perspectives Supplements, **105** (4), 919-926 (1997).

ALADJEM, M.I., SPIKE B.T., RODEWALD, L.W., HOPE, T.J., KLEMM, M., JAENISCH, R. ve WAHL, G.M., *Es cells do not activate p53 – dependent stress responses and undergo p53 – independent apoptosis in response to DNA damage*, Current Biology, **8**, 145-155 (1998).

ARD, P.G., CHATTERJEE, C., KUNJIBRTTU, S., ADSIDE, L.R., GRALINSKI, L.E. ve McMAHON, S.B., *Transcriptional regulation of the mdm2 oncogene by p53 requires TRRAP acetyltransferase complexes*, Mol. and Cell. Biol. **22** (16), 5650-5661 (2002).

ASSEFA, Z., GARMYN, M., VANTIEGHEM, A., DECLERCQ, W., VANDENABEELE, P., J.R. ve AGOSTINIS, P., *Ultraviolet B radiation-induced apoptosis in human keratinocytes: cytosolic activation of procaspase-8 and the role of bcl-2*, FEBS Letters, **540**, 125-132 (2003).

AZNAR, S. ve LACAL, J.C., *Rho signals to cell growth and apoptosis*, Cancer Letters, Mini Review, **165**, 1-10 (2001).

BARITT, J.G., *Comminacation within animal cells*, 291-314, Oxford Universty Press, New York, USA (1992).

BASSI, L., CARLONI, FONTI, E., PALMA, de laPENA, N., MESCHINI, R. ve PALITTI, F., *Pifithrin-a, an inhibitor of p53, enhances the genetic instability induced by etoposide (VP16) in human lymphoblastoid cells treated in vitro*, Mutat. Res., **499**, 163-176 (2002).

BATES, S., PHILLIPS, C.A., CLARK, P.A., STOTT, F., LUDWIG, L.R. ve VOUSDEN, K.H., *p14ARF links the tumour suppressors RB and p53*, Nature, **395**, 124-125 (1998).

BERRY, D.E., LU, Y., SCHMIDT, B., FALLON, P.G., O'CONNELL, C., HU, S-X, XU, H-J. ve BLANCK, G., *Retinoblastoma protein inhibits INF- γ induced apoptosis*, Oncogene, **12**, 1809-1819 (1996).

BERTRAM, J.S., *The molecular biology of cancer*, Moleculer Aspects of Medicine, **21**, 167-223 (2001).

BLAGOSKLONNY, M.V., *Loss of function and p53 protein stabilization*, Review, Oncogene, **15**, 1889-1893 (1997).

BOULLET, P., PURTON, J.F., GODFREY, D.I., ZHANG, L.C., COULTAS, L., PUTHALAKATH, H., PELLEGRINI, M., CORY, S., ADAMS, J.M. ve STRASSER, A., *BH3-only bcl-2 family member bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes*, Nature, **415**, 21 Feb., 922-926 (2002).

BÖTTGER, A., BÖTTGER, V., SPARKS, A., LIU, W.-L., HOWARD, S.F. ve LANE, D.P., *Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo*, Current Biology, **7 (11)**, 860-864 (1997).

BROOKS, C.L. ve GU, W., *Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation*, Current Opinion in Cell Biology, **15**, 164-171 (2003).

CAMPBELL, P.M. ve DER, C.J., *Oncogenic ras and its role in tumor cell invasion and metastasis*, Seminars in Cancer Biology, **14**, 105-114 (2004).

CANDWELL, C. ve ZAMBETTI, G., *The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth*, *Gene*, **277**, 15-30 (2001).

CARVALHO, H., AUDUSTO da COSTA, R.M., CHIGANÇAS, V., WEINLICH, R., BRUMATTI, G., AMARANTE-MENDES, G.P., SARASIN, A. ve MENCK, C.F.M., *Effect of confluence on ultraviolet light apoptotic responses in DNA repair deficient cells*, *Mutat. Res.* **544**, 159-166 (2003).

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).

CHEN, X., FARMER, G., ZHU, H., PRYWES, R. ve PRIVES, C., *Cooperative DNA binding of p53 with TFIID (TBP): a possible mechanism for transcriptional activation*, *Genes and Dev.*, **7**, 1837-1849 (1993).

CIECHANOVER, A., BREITSCHOPF, K., HATOUM, O.A. ve BENGAL, E., *Degradation of MyoD by the ubiquitin pathway: regulation by specific DNA-binding and identification of a novel site for ubiquitination*, *Molecular Biology Reports*, **26**, 59-64 (1999).

CLARK, A.P., STOTT, F. ve PETERS, G., *p14^{ARF} links the tumor suppressors RB and p53*, *Nature*, **395**, 125-126 (1998).

CLARKE, A.R., PURDIE, C.A., HARRISON, D.J., MORRIS, R.G., BIRD, C.C. ve HOOPER, M.L., *Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways*, *Nature*, **362**, 849-851 (1993).

CLARKE, R.G., LUND, E.K., LATHAM, P., PINDER, A.C. ve JOHNSON, I.T., *Effect of eicosapentaenoic acid on the proliferation and incidence of apoptosis in the colorectal cell line HT29*, *Lipids*, **34** (12), 1287-1295 (1999).

COE, J.P., RAHMAN, I., SPHYRIS, N., CLARKE, A.R. ve HARRISON, D.J., *Glutathione and p53 independently mediate responses against oxidative stress in cells*, *Free Radical Biology & Medicine*, **32** (2), 187-196 (2002).

COLMAN, M.S., AFSHARI, C.A. ve BARRETT, J.C., *Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress*, *Mutat. Res.*, **462**, 179-188 (2000).

COOPER, G.M., *The cell cycle, the cell: a molecular approach*, 571-648, ASM Press, Washington, US A (2000).

COX, A.D. ve DER, C.L., *The dark side of Ras: regulation of apoptosis*, *Oncogene*, **22**,8999-9006 (2003).

COTTER, T.M. ve MARTIN, S.J., *Techniques in apoptosis, a user guide*, , 1-60, Portland Pres Ltd., London (1997).

DANIEL, P.T., STURN, I., RITSCHER, S., FRIEDRICH, K., DÖRKEN, B., BENDZKO, P. ve HILLEBRAND, *Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder)and simultaneous isolation of RNA from low cell numbers*, *Anal. Biochem.* **266**, 110-115 (1999).

DATTA, K., KERN, J.C., BISWAL, S.S ve KEHRER, J.P., *Proteolytic loss of bcl-X_L in FL5.12 cells undergoing apoptosis induced by MK886*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **174**, 273-281 (2001).

DAUJAT, S., NEEL, H. ve PIETTE, J., *MDM2: life without p53*, *Review, TRENDSin Genetics*, **17 (8)**, 459-464 (2001).

DEBBAS, M. ve WHITE, E., *Wild type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B*, *Genes Dev.*, **7**, 546-552 (1993).

DOBRUCKI, J. ve DARZYNKIEWCZ, Z., *Chromatin condensation and sensitivity of DNA in situ to denaturation during cell cycle and apoptosis-a confocal microscopy study*, *Micron*, **32**, 645-652 (2001).

DON, Y.B., YANG, H.Y., ELLIOTT, M.J. ve McMASTERS, *Increased mdm2 expression in a p53- independent manner blocks UV-induced cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma cells*, *Tumor Biology*, **24 (3)**, 130-139 (2003).

DOWNWARD, J., *Regulatory mechanisms for ras proteins*, *BioEssays*, **14 (3)**, 177-183 (1992).

ENGİN, K. ve ÖZYARDIMCI, N., *Akciger kanserleri, tani ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalari*, III. Bölüm, Avrupa Tıp Kitapçilik, Türkiye (2001).

EUNGDAMRONG, N.J. ve IYENGAR, *Modeling cell signaling Networks (review)*, *Biology of the Cell*, (makale basim asamasinda) (2004).

ETTEN, R.A.V., *Mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-imatinib era*, *Leukemia Research*, **28S1**, 21-28 (2004).

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).

FELSHER, D.W., ZETTERBERG, A., ZHU, J., TISTY, T. ve BISHOP, J.M., *Overexpression of myc causes p53-dependent G₂ arrest of normal fibroblasts*, PNAS, **97** (19), 10544-10548 (2000).

FINKEL, T., *oxidant signals and oxidative stres*, Current Opinion in Cell Biology, **15**, 274-254 (2002).

FISCHEN, C.M., WEBER, J.D., ROUSSEL, M.F., SHERR, C.J. ve CLEVELAND, J.J., *Disruption of the ARF-MDM2-p53 tumor suppressor pathway in myc-inducer lymphomagenesis*, Genes & Development, **13**, 2658-2669 (1999).

FRECH, M., JOHN, J., PIZON, V., CHARDIN, P., TAVITIAN, A., CLARK, R., McCORMICK, F. ve WITTINGHOFER, A., *Inhibition of GTPase activating protein stimulation of ras-p21 GTPase by the k-rev-1 gene product*, Science, **249**, 169-171 (1990).

GARBISA, S., POZATTI, R., MUSCHEL, R.J., SAFFIOTTI, U., BALLIN, M., GOLDFARB, KHOURY, G. ve LIOTTA, L.A., *Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: induction by transfection with c-Ha-ras plus Ad2-E1a*, Cancer Res. **47** (15), 1523-1528 (1987).

GOSSETT, L.A., ZHANG, W. ve OLSON, E.N., *Dexamethasone-dependent inhibition of rifferentiation of C2 myoblast bearing steroid-inducible N-ras oncogenes*, The Journal of Cell Biology, **106**, 2127-2137 (1988).

GONZALES-CID, M., FUNDIA, A.F., CUELLO, M.T. ve LARRIPA, I., *Correlation between chromosome damage and apoptosis induced by fludarabine and idarubicine in normal human lymphocytes*, Toxicology, **171**, 215-222 (2002).

GILLE, H. ve DOWNWARD, J., *Multiple ras effector pathways contribute to G₁ cell cycle progression*, J. Biol.Chem., **274**, 22033-22040 (1999).

GROTH, A., WEBER, J. D., WILLUMSEN, B. M., SHERR, C. J. ve ROUSSEL, M. F., *Oncogenic ras induces p19ARF and growth arrest in mouse*

embryo fibroblasts lacking p21cip1 and p27kip1 without activating cyclin D-dependent kinases, J. Biol. Chem. **275**, 27473-27480 (2000).

GUENGERICH, F.P., *Metabolism of chemical carcinogens*, Carcinogenesis, **21 (3)**, 345-351 (2000).

GUO, M. ve HAY, B.A., *Cell proliferation and apoptosis*, Current Opinion in Cell Biology, Review, **11 (6)**, 745-752 (1999).

GÜVEN, K., *Biyokimyasal ve moleküler toksikoloji*, 118-119, Dicle Üniversitesi Basım Evi, Diyarbakir, Türkiye (1999).

HABER, D.A., *Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19^{ARF}*, Cell, **91 (28)**, 555-658 (1997).

HALAZONETIS, T.D., *Constitutively active DNA damage checkpoint pathways as the driving force for the high frequency of p53 mutations in human cancer*, DNA Repair, (Makale basım aşamasında) (2004).

HENDERSON, C.W., *Study offers insight into cancer development, resistance to therapy: finding focuses on ras oncogene*, Cancer Weekly, **11. 07**, 23-25, (2000).

HENDRIKS, R.W. ve MIDDENDORP, S., *The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch*, Review, Trend in Immunology, **25 (5)**, 249-256 (2004).

HIGUCHI, K., MITSUHASHI, SAITOH, J.-I., MAEBAYASHI, K., SAKURAI, H., AKIMOTO, T. ve NIIBE, H., *Caffeine enhanced radiosensitivity of rat tumor cells with a mutant-type p53 by inducing apoptosis in a p53-independent manner*, Cancer Letters, **152**, 157-162 (2000).

HILL, B.T., PERRIN, D. ve KRUCZYNSKI, A., *Inhibition of ras-targeted prenylation: protein farnesyl transferase inhibitors revisited*, Critic. Rev. in Oncology / Hematology, **33**, 7-23 (2000).

HOCKENBERY, D.M., OLTAVAI, Z.N., YING, X.M., MILLIMAN, C.L. ve KORSMEYER, S.J., *Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis*, Cell, **75**, 22 Oct., 241-251 (1993).

HONDA, R. ve YASUDA, H., *Association of p19^{ARF} with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53*, The EMBO Journal, **18 (1)**, 22-27 (1999).

HSIEH, J-K., KLETSAS, D., CLUNN, G., HUGHES, A.D., SCHACHTER, M. ve DEMALIOU-MASON, C., *p53, p21^{waf1/cip1}, and MDM2 involment in proliferation and apoptosis in an in vitro model of conditionally immortalized human vascular smooth muscle cells*, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **20** (3), 636-652 (2000).

HUGANIR, R.L. ve ZIPURSKY, S.L., *Signalling mechanisms*, *Current Opinion in Neurobiology*, **14**, 1-5 (2004).

INOUE, H., KONDOH, G., SUDIRO, T.M. ve HAKURA, A., *Stability of p53 protein in rat cells trasformed by various viral transforming genes*, *Virology*, **187** (1), 343-347 (1992).

INOUE, H., PAN, J. ve HAKURA, A., *Suppression of v-src transformation by the drs gene*, *J. of Virology*, **72**(3), 2532-2537 (1998).

IRUSTA, P.M., CHEN, Y.-B. ve HARDWICK, J.M., *Viral modulators of cell death provide new links to old pathways*, *Current Opin. in Cell Biol.*, **15**, 700-705 (2003).

JOHONSON, L., MERCER, K., GREENBAUM, D., BRONSON, R.T., COWLEY, D., TUVESON, D.A. ve JACKS, T., *Somatic activation of the K-ras oncogene cause early onset lung cancer in mice*, *Nature*, **410**, 1111-1116 (2001).

JONES, S.N., HANCOCK, A.R., VOGELS, H., DONEHOWER, L.A. ve BRADLEY, A., *Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorogenesis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15608-15612 (1998).

JOSHI, S.G., FRANCIS, C.W., SILVERMAN, D.J., SAHNI, S.K., *NF- κ B activation suppresses hostcell apoptosis during Rickettsia ricettsii infection via regulatory effects on intracellularocalization or levels of apoptogenic and anti-apoptotic proteins*, *FEMS Microbiology Letters*, **234**, 333-341 (2004).

KAMIJO, , T., ZINDY, F., ROUSSEL, M.F., QUELLE, D.E., DOWNING, J.R., ASHMUN, R.A., GROSVELD, G. ve SHERR, C.J., *Tumor suppression at the Mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19^{ARF}*, *Cell*, **91** (28), 649-659 (1997).

KAPLAN, P. ve OZANNE, B., *Cellular responsiveness to growth factors correlates with a cell's ability to Express the transformed phenotype*, Cell, **33**, 931-938 (1983).

KARP, G., *Cell and molecular biology "Concept and experiments"*, Second Edition, p. 704-705, John Wiley & Sons, Inc., Canada, USA (1999).

KHOKHLATCHEV, A., RABIZADEH, S., XAVIER, R. ve NEDWIDEK, M., *Identification of novel ras-regulated proapoptotic pathway*, Current Biology, **12 (19)** (2002).

KING, D., YANG, G., THOMPSON, M.A. ve HIEBERT, S.W., *Loss of neurofibromatosis-1 and p19^{ARF} cooperate to induce on multiple tumor phenotype*, Oncogene, **21**, 4978-4982 (2002).

KITANAKA, .C., KATO, K., IJIRI, R., SAKURADA, K., TOMIYAMA, A., NOGUCHI, K., NAGASHIMA, Y., NAKAGAWARA, A., MOMOI, T., TOYODA, Y., KIGASAWA, H., NISHI, T., SHIROUZU, M., YOKOYAMA, S., TANAKA, Y. ve KUCHIN Y., *Increased ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression*, Journal of the National Cancer Institute, **94 (5)**, 358-365 (2002).

KLOOG, Y. ve COX, A.D., *Ptenyl-binding domains: potential targets for ras inhibitors and anti-cancer drugs*, Seminars in Cancer Biology, (makale basim asamasinda) (2004).

KORGAONKAR, C., ZHAO, L., MODESTOU, M. ve QUELLE, D.E., *ARF function does not require p53 stabilization or Mdm2 relocalization*, Molecular and cellular Biology, **22 (1)**, 196-206 (2002).

KOVACINA, K.S., YONEZAWA, K., BRAUTIGAN, D.L., TONKS, N.K., RAPP, U.R. ve ROTH, R.A., *Inulin activates the kinase activity of the raf-1, proto-oncogene by increasing its serine phosphorylation*, The Journal of Biological Chemistry, **265 (21)**, 12115-12118 (1990).

KÖKTÜRK, N., KIRISOGLU, C.E. ve ÖZTÜRK, C., *Akciger kanseri moleküler biyolojisi*, Solunum, **5 (3)**, 127-138 (2003).

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).

KRANENBURG, O., GEBBING, M.F.B.G. ve VOEST, E.E., *Stimulation of angiogenesis by ras proteins*, Biochim. Biophys. Acta, **1654**, 23-37 (2004)

LACKINGER, D. ve KAINA, B., *Primer Mouse fibroblasts deficient for c-fos, p53 or for both proteins are hypersensitive to UV light and alkylating agent-induced chromosomal breakage and apoptosis*, Mutation Research, **457**, 113-123 (2000).

LEE, Y.-L., SHIH, C.-M., CHIOU, H.-L., SHIAU, M.-Y., CHANG, G.-C. ve CHANG, Y.-H., *Alteration of autoantibodies against p53 in Taiwanese lung cancerpatients undergoing chemotherapy*, Clinica Chimica Acta, **349**, 87-96 (2004).

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).

LEPIK, D., JACKS, V., KADAJA, L., VARN, S. ve MAIMETS, T., *Electroporation and carrier DNA cause p53 activation, cell cycle arrest, and apoptosis*, Analytical Biochemistry, **318**, 52-59 (2003).

LEWIN, B., *Oncogenes and cancer, Genes*, 1131-1172, Second Edition, Oxford Universty Press, New York, USA (1997).

LIANG, S.-H. ve CLARKE, M.F., *Regulation of p53 localization*, Minireview, Eur. J. Biochem. **268**, 2779-2783 (2001).

LIN, Y. ve BEUCHIMOL, S., *Cytokines inhibit p53-mediated apoptosis but not p53-mediated G₁-arrest*, Mol. Cell. Biol., **15**, 6045-6050 (1995).

LIN, X., CAI, Y.-J., LI, Z.-X, CHEN, Q., LIU, Z.,-L. ve WANG, R., *Structure determination, apoptosis induction, and telomerase inhibition of CFP-2, a novel lichenin from Cladonia furcata*, Biochemica et Biophysica Acta, **1622**, 99-108 (2003).

LIU, X.-M., CHAMPMAN, G.B., PEYTON, K.J., SCHAFER, A.I. ve DURANTE, *Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells*, Cardiovascular Research, **55**, 396-405 (2002).

LIU, J., SHEN, H.-M. ve ONG, C.-N., *Silvia miltiorrhiza inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG₂ cells*, Cancer Research, **153**, 85-93 (2000).

LOCKSHIN, R. ve ZAKERI, Z., *Caspase-independent cell deaths*, Cur. Opin. Biol., **14**, 727-733 (2002).

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).

LOWE, S.W. ve LIN, A.W., *Apoptosis in cancer*, Carcinogenesis, **21** (3), 485-495 (2000).

LU, W., LIN, J. ve CHEN, J., *Expression of p^{4ARF} overcomes tumor resistance to p53*, Cancer Res. **62**, 1305-1310 (2002).

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).

MARNETT, L.J., *Oxyradicals and DNA damage*, Carcinogenesis, **21** (3), 361-370 (2000).

McMAHON, M. ve WOODS, D., *Regulation of the p53 pathway by ras, the plot thickens (minireview)*, Biochim. Biophys. Acta, **1471**, 63-71 (2001)

MIHICH, E. ve SCHIMKE, R.T., *Apoptosis*, 137-157, Plenum Press, New York and London, USA (1994).

MISSALE, C., LOSA, M., SIGALA, S., BALSARI, A., GIOVANELLI, M. ve SPANO, P.F., *NGF controls proliferation and progression of human prolactinoma cell lines through an autocrine mechanism*, Mol. Endocrinol., **10**, 272-285 (1996).

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).

MOCHIZUKI, N., YAMASHITA, S., KUROKAWA, K., OHBA, Y., NAGAL, T., MIYAWAKI, A. ve MATSUDA, M., *Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of ras and rap1*, Nature, **411**, 1065-1067 (2001).

MOMAND, J., WU, H.-H., DASGUPTA, G., *MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein*, Review, Gene, **242**, 15-29 (2000).

MORGENBESSER, S.D., WILLIAMS, B.O., JACKS, T. ve DePINHO, R.A., *p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens*, Nature, **371**, sep.1, 72-74 (1994).

MOROY, T. ve GEISEN, C., *Cyclin E, review*, International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **36**, 1426-1439 (2004).

MORRISON, D.K., HEIDECKER, G., RAPP, U.R. ve COPELAND, T.D., *Identification of the major phosphorylation sites of the raf-1 kinase*, The Journal of Biological Chemistry, **268** (23), 17309-17319 (1993).

MOSESSON, Y. ve YARDEN, Y., *Oncogenic growth factors: implications for signal transduction therapy*, Seminars in Cancer Biology, (makale basim asamasinda) (2004).

NARA, K-I, NAGASHIMA, F. ve YASUI, A., *Highly elevated ultraviolet-induced mutation frequency in isolated chinese hamster cell lines defective in nucleotide excision repair and mismatch repair proteins*, Cancer Res., **61** (1), 50-52 (2001).

NATSUGOE, S., MATSUMOTO, M., OKUMURA, H., NAKASHIMA, S., SAKAMOTO, F., SAKITA, H., BANA, M., TAKAO, S. ve AIKOU, T., *Bax and bcl-X_L expression are not related to prognosis in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma*, Cancer Letters, **174**, 91-97 (2001).

NGHIEM, P., *Identifying the missing link between UV and p53: The role of phosphatidyl inositol kinase-related kinase*, J. Am. Acad. Dermatol, **43** (4), 706-707 (2000).

NISHIGORY, C., *UV-induced DNA damage in carcinogenesis and its repair*, J. of Dermatological Science, **23** (1), 41-44 (2000).

NOREN, N.K. ve PASQUALE, E.B., *Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target ras and rho proteins*, Cellular Signalling **16**, 655-666 (2004).

NOZAWA, H., ODA, E., NAKAO, K., ISHIHARA, M., UEDA, S., YOKOCHI, T., OGASAWARA, K., NAKATSURU, Y., SHIMIZU, S., OHIRA, Y., HIOKI, K., AIZAWA, S., ISHIKAWA, T., KATSUKI, M., MUTO, T., TANIGUCHI, T. ve TANAKA, N., *Loss of transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying the Ha-ras transgene or nullizygosity for p53*, Genes & Development, **13**, 1240-1245 (1999).

OREN, M., *Regulation of the p53 tumor suppressor protein*, J. Biol. Chem., **274** (51), 36031-36034 (1999).

OTTAGGIO, L., BOZZO, S., MOR F., SPARKS, A., CAMPOMENOSI, P., MIELE, M., BONATTI, S., FRONZA, G., LANE, D.P. ve ABBONDANDOLO, A., *Defective nuclear localization of p53 protein in a Chinese hamster cell line is associated with the formation of stable cytoplasmic protein multimers in cells with gene amplification*, Carcinogenesis, **21** (9), 1631-1638 (2000).

ÖZTÜRK, M., *Kötü haber genlerde sakli: Kanser*, TÜBITAK Bilim ve Teknik Dergisi, **352**, 32-39 Kasim (1997).

PALMERO, I., PANTOJA, C. ve SERRANO, M. *p19ARF links the tumor suppressor p53 to ras*, Nature, **395**, 125-126 (1998).

PENELA, P., RIBAS, C. ve MAYOR, Jr.F., *Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases*, Cellular Signaling, **15**, 973-981 (2003).

PETERS, G., *Oncogenes at viral integration sites*, Cell Growth Diff., **1**, 503-510, (1990).

PETTERS, G. ve VOUSDEN, K.H., *Oncogenes and tumor suppressors*, 87-107, Oxford Universty Press, USA (1997).

PINCUS, M.R., BRANT-RAUF, P.W., MICHL, J., CARTY, R.P. ve FRIEDMAN, F.K., *ras-p21-induced cell transformation: unique signal transduction pathways and implications for the design of new chemotherapeutic agents*, Cancer Invest., **18**, 39-50 (2000).

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).

POPESCU, Z.C. ve ZIMONJIC, D.B., *Chromosome-mediated alterations of the myc-gene in human cancer*, J. Cell. Mol. Med., **6** (2), 151-159 (2002).

POPESCU, N.C., DIPAOLO, J.A. ve AMSBAUGH, S.C., *Integration sites of human papilloma virus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes*, Cytogenet. Cell Genet.**44**, 58-62, (1987).

RAK, J., MITSUHASHI, Y., BAYKO, L., FILMUS, J., SHIRASAWA, S. ve SASAZUKI, T., *Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis*, Cancer Res., **55**, 4575-4580 (1995).

REDDEL, R.R., *The role of senescence and immortalization in carcinogenesis*, Carcinogenesis, **21** (3), 477-484 (2000).

RIES S., BIEDERER, C., WOODS, D., SHIFMAN, O., SHIRASAWA, S., SASAZUKI, T., McMAHON, M., OREN, M. ve McCORMICK, *Opposing effects of ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19^{ARF}*, Cell, **103**, 321-330 (2000).

ROHON, P.J., DAVIS, P., MOSKULAK, C.A., KEARNS, M., KRUTZSCH, H., SIEBENLIST, U. ve KELLY, K., *PAC - 1: Mitogen induced nuclear protein tyrosine phosphatase*, Science, **259**, 15 March, 1763-1766 (1993).

SALEH, K., *N-ras oncogeninin p53, p19 ve MDM2 proteinlerinin sentezi üzerine etkilerinin kültür hücrelerinde araştırılması*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskisehir, Türkiye (2001).

SALLER, E., TOM, E., BRUNORI, M., OTTER, M., ESTREICHER, A., MACK, D.H. ve IGGO, R., *Increased apoptosis induction by 121F mutant p53*, The EMBO Journal, **18** (16), 4424-4437 (1999).

SCHIMNICH, A.A., BARNHART, B.C. ve PETER, M.E., *Apoptosis-independent functions of killer kaspaz*, Cur.Opin. in Cell Biol., **14**, 721-726 (2002).

SCHWIEGER, A., BAUER, L., HANUSCH, J., SERS, C., SCHAFER ve BAUER, G., *ras oncogene expression determines sensitivity for intercellular induction of apoptosis*, Carcinogenesis, **22** (9), 1385-1392 (2001).

SCOTTO, C., DELPHIN, D., DELOULME, J.C. ve BAUDIER, J., *Concerted regulation of wild-type p53 nuclear accumulation and activation by S100B and calcium-dependent protein kinase C*, Molecular and cellular Biology, **19 (10)**, 7168-7180 (1999).

SETO, J., SETO, Y., IINO, M., KOMATSU, T., KATAGIRI, K., HAGINO, A., ASO, H., KATOH, K., SASAKI, Y. ve OBARA, Y., *IGF-1-induced apoptosis in LM2d5 cultured at a low concentration of fetal bovine serum*, Cell Biol. Int., **25 (9)**, 893-899 (2001).

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).

SHIMAKAGE, M., KURATA, A., INOUE, H., OKAMOTO, Y., YUTSUDO, M. ve HAKURA, A., *Tumorigenicity of EBNA-2-transfected cells*, FEBS Letters **371**, 245-248 (1995).

SOEHNGE, H., OUHTIT, A. ve ANANTHASWAMY, H.N., *Mechanism of induction of skin cancer by UV radiation* Frontiers in Bioscience, **2**, 538-551 (1997).

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. Patho., **155**, 1121-1127 (1999).

SMITH, M.L. ve Jr. FORNACE, A.J., *p53-mediated protective responses to UV irradiation*, Proc. Natl. Acad. Sci. **94**, 12255-12257 (1997).

SPANDIDOS, D.A., SOURVINOS, G., TSATSANIS, C. ve ZAFIROPOULOS, *Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review)*, International Journal of Oncology, **21**, 237-241 (2002).

STAD, R., LITTLE, N.A., XIRODIMAS, D.P., FRENK, R., VAN DER EB, A.J., LANE, SAVILLE, M.K. ve JOCHEMSEN, A.G., *Mdmx stabilizes p53 and Mdm2 via two distinct mechanisms*, EMBO Reports, **21 (111)**, 1029-1034 (2001).

STANCATO, L.F., CHOW, Y.H., HUTCHISON, K.A., PERDEW, G.H., JOVES, R. ve PRATT, W.B., *Raf exists in a native heterocomplex with*

hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system, The Journal of Biological Chemistry, **268** (29), 21711-21716 (1993).

STEHELIN, D., VARMUS, H.E., BISHOP, J.M. ve VOGT, P.K., *DNA related to the transforming gene (s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA*, Nature **260**, 170-173 (1976).

STEIN, G.S., BASERGA, R., GIORDANO, A. ve DENHARDT, D.T., *The molecular basis of cell cycle and growth control*, 225-307, John Wiley & Sons, Inc., Canada, USA (1999).

STICE, L.L., VAZIRI, C. ve FALLER, D.V., *Regulation of platelet-growth factor signaling by activated p21^{ras}*, Frontiers in Bioscience, **4**, 72-86 (1999).

STOMMEL, J.M., MARCHENKO, N.D., JIMENEZ, G.S., MOLL, U.M., HOPE, T.J. ve WAHL, G.M., *A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking*, The EMBO Journal, **18** (6), 1660-1672 (1999).

STOT, F.J., BATES, S., JAMES, M.C., McCONNELL, B.B., STARBORG, M., BROOKES, S., PALMERO, I., RYAN, K., HARA, E., VOUSDEN, K.H. ve PETERS, G., *The alternative product from the human CDKN2A locus, p14^{ARF}, participates in a regulatory feedback loop with p53 and Mdm2*, The EMBO Journal, **17** (17), 5001-5014 (1998).

STUDZINSKI, G.P., *Apoptosis a practical approach*, 1-53, Oxford University Press, USA (1999).

STRANO, S., ROSSI, M., FONTEMAGGI, G., MUNARRIZ, E., SODDU, S., SACCHI, A. ve BALANDINO, G., *From p63 to p53 across p73*, Minireview, FEBS Letters, **490**, 163-170 (2001).

SU, Z.Z., AUSTIN, V.N., ZIMMER, S.G. ve FISHER, P.B., *Defining the critical gene expression changes associated with overexpression and suppression of the tumorigenic and metastatic phenotype in Ha-ras-transformed cloned rat embryo fibroblast cells*, Oncogene, **8**, 1211-1219 (1993).

SUN, L.-K., YOSHII, Y., HYODA, A., TSURUSHIMA, H., SAITO, A., HAKAKUNI, T., LI, Y.-P., KARIYA, K., NOZAKI, M. ve MORINE, N., *Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from*

Okinawa Habu (Trimeresurus flavoviridis) venom in relation to oxidative stress, Toxicology in Vitro, **17**, 169-177 (2003).

TURNER, N.D., ZHANG, J., DAVIDSON, L.A., LUPTON, J.R. ve CHAPKIN, R.S., *Oncogenic ras alters sensitivity of Mouse colonocytes to butyrate and fatty acid mediated growth arrest and apoptosis*, Cancer Letters, **186**, 29-35 (2002).

TIDD, D.M., HAWLEY, P., WARENIUS, H.M. ve GIBSON, I., *Evaluation of n-ras oncogene anti-sense, sense and nonsense sequence methylphosphonate oligonucleotide analogues*, Anti-Cancer Drug Design, **3**, 237-241 (2002).

VARGAS, D.A. ve RONAI, Z., *p53-mdm2-the affair that never ends*, Carcinogenesis, **23** (4) 541-547 (2002).

VATER, C.A., BARTLE, L.M., DIONNE, C.A., LITTLEWOOD, T.D. ve GOLDMACHER, V.S., *Induction of apoptosis by tamoxifen-activation of a p53-estrogen receptor fusion protein expressed in E1A and T24 H-ras transformed p53^{-/-} Mouse embryo fibroblasts*, Oncogene **13**, 739-748 (1996).

WADDICK, K.G. ve UÇKUN, F.M., *Innovative treatment programs against cancer; I. ras oncoprotein as a molecular target*, Biochem. Pharma., **56**, 1411-1426 (1998).

WANG, G.J. ve CAI, L., *Relatively low-dose cyclophosphamide is likely to induce apoptotic cell death in rat thymus through Fas/Fas ligand pathway*, Mutat. Res. **427**, 125-133 (1999).

WANG, S. ve SHI, X., *Mechanisms of Cr (VI)-induced p53 activation: the role of phosphorylation, mdm2 and ERK*, Carcinogenesis, **22** (5), 757-762 (2001).

WATERS, C., PYNE, S. ve PYNE, N.J., *The role of G-protein coupled receptors and associated proteins in receptor tyrosine kinase signal transduction*, Seminars in Cell & Developmental Biology, **15**, 309-323 (2004).

WATTERS ve LAVIN, M., *Signaling pathways in apoptosis*, 1-31, Harwood Academic publishers, USA (1999).

WEBER, J.D., JEFFERS, J.R., REHG, J.E., RANDLE, D.H., LOZANO, G., ROUSSE, M.F., SHERR, C.J. ve ZAMBETTI, G.P. *p53 independent functions of p19^{ARF} tumor suppressor*, Genes and Dev., **14**, 2358-65 (2000).

WHITE, R.J., *RNA polymerase III transcription-a battleground for tumour suppressors and oncogenes*, European Journal of Cancer, **40**, 21-27 (2004).

WIENER, H., KLOOG, Y., WACHECK, V. ve JANSEN, B., *Farnesyl thiosalicylic acid chemosensitizes human melanoma in vivo* J. Invest. Dermatol., **120** (1), 109 – 115 (2004).

WU, X., BAYLE, J.H., OLSON, D. ve LEVINE, A.J., *The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop*, Genes & Development, **7**, 1126-1132 (1993).

YAFFE, D. ve SAXEL, O., *Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle*, Nature, **270**, 725-727 (1977).

YANG, J., BARDES, S.G., MOORE, J.D., BRENNAN, J., POWERS, M.A. ve KORNBLUTH, S., *Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1*, Genes & Development, **12** (14), 2131-2143 (1998).

YIH, L.H. ve LEE, T.C., *Arsenite induces p53 accumulation through an ATM-dependent pathway in human fibroblasts*, Cancer Research, **60** (22), 6346-6352 (2000).

YOON, Y.S., KIM, J.W., KANG, K.W., KIM, Y.S. ve CHOI, K.H., *Poly (ADP-ribosyl)ation of histone H1 correlates with internucleosomal DNA fragmentation during apoptosis*, The J. Of Biol. Chem., **271** (15), 9129-9134 (1996).

YOSHIOKA, N., INOUE, H., NAKANISHI, K., OKA, K., YATSUDO, M., YAMASHITA, A., HAKURA, A. ve NOJIMA, H., *Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-k-ras*, J. of Virology, **74** (2), 1008-1013 (2002).

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).

ZERGEROGLU, S., GÜNGÖR, T. ve GÖKMEN, O., *Endometrial adenokarsinomalarda p53 protein (Tümör baskılayıcı gen) ekspresyonu ve grade ile ilişkisi*, Patoloji Bülteni, **16 (1)** 1-3 (1999).

ZEYTINOGLU, H, *Activated N-ras oncogene inhibits the expression of PDGF-BETA receptor in myoblast cells*, Experimental Oncology, **24**, 116-119 (2002).

ZHANG, R., MAYHOOD, T., LIPARI, P., WANG, Y., DURKIN, J., SYTO, R., GESELL, J., McNEMER ve WINDSOR, W., *Fluorescence polarization assay and inhibitor design for Mdm2/p53 interaction*, Anal. Biochem. (makale basım aşamasında) (2004).

ZIMMER, J.L. ve SLAWSON, R.M., *Potential repair of Escherichia coli DNA following exposure to UV radiation from both medium - and low - pressure UV sources used in drinking water treatment*, Applied and Environmental Microbiology, **68 (7)**, 3293-3299 (2002).