

**N-ras ONKOGENİNİN p53, p19 ve MDM2
PROTEİNLERİNİN SENTEZİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN KÜLTÜR HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Kamel SALEH

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

**N-ras ONKOGENİNİN p53, p19 ve MDM2
PROTEİNLERİNİN SENTEZİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN KÜLTÜR HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Kamel SALEH

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca Desteklenmiştir.

Proje No: 991036

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kamel SALEH' ın N-ras Onkogeninin p53, p19 ve MDM2 Proteinlerinin Sentezi Üzerine Etkilerinin Kültür Hücrelerinde Araştırılması başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 25.06.2001 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

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

Üye :Prof. Dr. Erol AKSÖZ

Üye :Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Üye : Yard. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU

Üye : Yard. Doç. Dr. Zerrin İNCESU

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ..27.06.2001...tarih ve 24/1..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Hayatı boyunca bilimin değerini tüm çocuklarına
aşılamayı büyük ustalıkla ve yüksek başarıyla yapan
sevgili **BABAM'** ın kutsal ruhuna
sevgi ve saygılarımla.....

ÖZET

Doktora Tezi

N-ras ONKOGENİNİN p53, p19 ve MDM2 PROTEİNLERİNİN SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KÜLTÜR HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Kamel SALEH

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU

2001

İnsan mutant *N-ras* onkogeninin ekspresyonunun, p53, mdm2, p19 ve β -aktin proteinlerinin seviyelerinin üzerindeki etkisi hücre kültürü ortamında Western Blot yöntemiyle araştırılmıştır. Mitojenik aktivitesi düşük olan besiyerinde (% 10 HS) büyütülen CO25 miyoblast hücreleri farklılaşarak miyotüp oluşturmaktadırlar. Ancak transformasyon besiyerinde (% 10 HS+Dex) büyütüldüklerinde taşıdıkları mutant *N-ras* onkogeninin etkisiyle farklılaşmayı durdurarak sürekli çoğalmakta ve yığınlar oluşturmaktadır. Mitojenik aktivitesi yüksek fakat Dex. içermeyen (% 10 FBS) besiyerinde büyütülen CO25 hücreleri belli bir sayıya ulaştıklarında kontakt inhibisyon etkisiyle çoğalmayı durdurmakta ve oldukları safhada kalmaktadırlar.

N-ras onkogeninin aktivasyonunun p53, mdm2, p19 ve β -aktin üzerindeki etkileri araştırıldığında, *N-ras*' ın p53 ekspresse edilmesini engellemediği ancak p53' ün hücre döngüsü üzerine olan etkisini engellediği tespit edilmiştir. Mdm2' nin *N-ras* tarafından baskılandığı, p19^{ARF}' nin ise p53-*N-ras* arasında bağlayıcı bir rolünün bulunmadığı tespit edilirken p53-mdm2 arasında bulunan ve daha önce çeşitli çalışmalarla tespit edilen feed-back ilişkisi bir kez daha ortaya konmuştur. p19^{ARF}' ın CO25 miyoblast hücrelerinin farklılaşmasında bir role sahip olamayacağı düşünülmektedir. β -aktin seviyesinin her üç ortamda sabit olduğu ve sinyal şiddetinin yüklenen proteininin miktarıyla paralel olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Onkogen, ras, p53, MDM2, Farklılaşma

ABSTRACT

Doctor of Science Thesis

INVESTIGATION OF EFFECTS OF N-RAS ONCOGENE ON SENTHESIS OF p53, p19 and mdm2

Kamel SALEH

Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program

Supervisor: Assist. Prof. Hülya ZEYTİNOĞLU

The effects of the expression of mutant human N-*ras* oncogene on the levels of p53, mdm2, p19 and β -actin proteins have been investigated by Western Blotting method in cell line. CO25 myoblast cells grown on % 10 HS medium having low mitogenic activity differentiate into myotubes. However, when these cells were grown on transformation medium (% HS+Dex.), they stop the differentiation and proliferate forming foci by the effects of N-*ras* oncogene which the cells have. The CO25 myoblast cells grown on %10 FBS which has high level mitogenic activitors but does not have Dex. stopped the proliferation by the effects of contact inhibition caused by the number of the cells and the cells stay at the same stage which is monolayer stage.

When the effects of the activation of N-*ras* oncogene on p53, mdm2, p19 and β -actin were investigated, it was determined that N-*ras* did not block the expression of p53, but it inhibits the effects of p53 on the cell cycle. Mdm2 was inhibited by N-*ras*. p19^{ARF} did not have a binding activity between p53 and N-*ras*. For that reason, p19^{ARF} is not required for the accumulation of p53 in response to mutant human oncogenic N-*ras*. p19^{ARF} may not be required for differentiation of CO25 myoblast cells. The feed-back relationship between p53-mdm2 detected in this study has the same results with the studies published recently. The levels of β -actin are same in all three medium, the taken signals from β -actin increase with the volume of protein loaded to the gel.

Key word: Oncogene, ras, p53, MDM2, differentiation

TEŞEKKÜR

Bölümün bütün olanaklarının sağlanmasında desteğini gördüğüm, her alanda engin bilgileriyle beni yönlendiren sayın bölüm başkanımız **Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'** ya, tezimin her adımında yanımda olan ve bilimsel katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın **Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU'** na teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Çalışmalarımın bir bölümünü yürüttüğüm, olanak ve desteklerinden yararlandığım TBAM müdürü sayın **Prof. Dr. K. Hüsnü CANBAŞER'** e başta olmak üzere, sayın **Araş. Gör. Seval KORKMAZ'** a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimde karşılaştığım zorlukları internet aracılığıyla benimle paylaşan engin fikirlerini, çözümlerini ve önerilerini benden esirgemeyen **Prof. Dr. Iqnacio PALMERO'** ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimin boyama ve hücrelerinin morfolojisinin değerlendirilme aşamalarında değerli fikirlerini ve yardımlarını aldığım sayın **Yard. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU'** na ve **Araş. Gör. A. Tansu KOPARAL'** a, aralarında bulunduğum süre boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisans, yüksek lisans ve doktora öğrenimi yapmam ve tamamlamamı sağlayan maddi ve manevi tüm zorluklara göğüs germem için ellerinden geleni yapan, benim hiçbir isteğimi geri çevirmeyen destek ve görüşlerine yaşamımın her anında ihtiyaç duyduğum sevgili **ANNEM'** e ve değerli ağabeyim sayın **Uzm. Dr. Mahmod SALEH (ABU TAMIM)'** a tezimin bitmesini büyük sabırla ve anlayışla bekleyen sevgili **NİŞANLIM'** a en içten şükran ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
 BÖLÜM I.....	 1
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser ve Nedenleri.....	2
1.2. Onkogenler.....	2
1.2.1. Onkogenlerin fonksiyonları.....	3
1.2.2. Tümör baskılayıcı genler.....	5
1.2.3. Onkogenlerin aktivasyonu.....	6
1.2.4. Onkogenler ve farklılaşma.....	7
1.3. Miyogenesis ve <i>Ras</i> Aktivasyonu.....	8
1.4. Miyoblast Hücre Sistemi.....	11
1.5. Bu Çalışmanın Amacı.....	12
 BÖLÜM II.....	 13
2.1. <i>Ras</i> Geni ve ürünü $p21^{ras}$	13
2.2. $p21^{ras}$ Proteininin Aktivasyon Mekanizması.....	14
2.3. $p21^{ras}$ ın Fonksiyonları.....	16
2.4. $p21^{ras}$ ın Effektörleri.....	18
2.4.1. Raf.....	18
2.4.2. <i>Rac/Rho</i>	19
2.4.3. Ral-GDS.....	19
2.4.4. Fosfotidil İnositol 3-Kinaz (PI3K).....	20
2.4.5. MAP Kinazlar.....	20

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa
2.5. <i>Ras</i> Ailesi ve Farklılaşma.....	21
BÖLÜM III.....	23
3. p53, MDM2 ve p19.....	23
3.1. p53.....	23
3.1.1. p53' ün fonksiyonu.....	25
3.1.2. p53' ü aktif eden sinyaller.....	25
3.1.3. p53' ün apoptosisteki rolü.....	26
3.1.4. p53 ve farklılaşma.....	27
3.1.5. p53' ün diğer fonksiyonları.....	28
3.2. MDM2.....	30
3.2.1. <i>MDM2</i> Gen ve Proteini.....	30
3.2.2. Mdm2-p53 kontrol mekanizması.....	31
3.2.3. Mdm2-p53 kompleksi ve embriyo gelişmesindeki rolü.....	36
3.2.4. Mdm2 ve terminal farklılaşma.....	37
3.3. p19.....	38
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	41
4.1. Kullanılan Materyaller.....	41
4.1.1. Antikorlar.....	41
4.1.2. Kimyasal maddeler.....	41
4.2. Hücre Kültürü.....	41
4.3. Hücre Büyüme Eğrisi.....	42
4.4. Hücrelerden Kromozom Elde edilmesi.....	42
4.5 Toplam Protein Analizi.....	43
4.5.1 Toplam protein ekstraksiyonu.....	43
4.5.2 Jel elektroforezi (SDS PAGE).....	44
4.5.3 Western blotting.....	44
4.5.4 Antikor ile işaretleme.....	45
4.5.5 ECL ile belirleme.....	45

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa
4.5.6 Dot blotting.....	45
4.6 Hücrelerin May-grünwald: Giemsa ile Boyanması.....	46
5. BULGULAR.....	47
5.1. Hücrelerin Özellikleri.....	47
5.1.1. Hücre büyüme oranı.....	47
5.1.2. Kromozom sayısı.....	48
5.1.3. Morfolojik özellikler.....	49
5.7. Çok Çekirdekli Hücre Sayımı.....	56
5.8. p21 ^{N-ras} Protein Sentezi.....	57
5.9. p53 Protein Sentezi.....	58
5.10. Mdm2 Protein Sentezi.....	58
5.11. p19 Protein Sentezi.....	59
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	66
6.1. Büyüme Oranı.....	66
6.2. Kromozom Sayısı.....	68
6.3. Morfolojik Özellikler.....	68
6.4. p21 ^{N-ras}	71
6.5. p53.....	71
6.6. Mdm2.....	73
6.7. p19.....	75
KAYNAKLAR.....	78
EK -1: KULLANILAN SOLÜSYONLARIN HAZIRLANIŞI.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

2.1. p21 ^{ras} in aktivasyonunun kontrol mekanizması ve aktif p21 ^{ras} in etkilediği efektörler ve sinyal yolları.....	22
3.1. p53 proteinin aktivasyon mekanizmalarının kontrolü ve etkiledikleri hücrefonksiyonları.....	29
3.2. MDM2 proteinin aktivasyon mekanizmalarının kontrolü ve etkiledikleri hücre fonksiyonları.....	40
5.1. Normal, farklılaşma ve 1 µM Dex. içeren transformasyon besiyerlerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin büyüme oranları.....	47
5.2. % 10 FBS içeren normal besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin elde edilen metafaz kromozom görüntüsü.....	48
5.3. % 10 FBS içeren normal besiyerinde büyütülen C2 miyoblast hücrelerinin kromozom görüntüsü.....	49
5.4. % 10 FBS içeren normal besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin 4. günde görüntüsü.....	52
5.5. % 10 HS içeren farklılaşma besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin 4. günde oluşturdukları çok çekirdekli miyotüplerin görüntüleri.	53
5.6. % 10 HS içeren farklılaşma besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin 4. günde oluşturdukları farklı miyotüp şekillerinden görüntüler.....	54
5.7. % 10 HS + 1 µM Dex. içeren tranforme besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin 4. günde oluşturdukları koloni görüntüleri.....	55
5.8. CO25 miyoblast hücrelerinin değişik günlerde çok çekirdekli görüntüleri.....	57

Sayfa

5.9.	Farklılaşma (% 10 HS), transformasyon (% 10 HS+Dex.) ve normal (% 10 FBS) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinden p21 ^{N-ras} ve β -aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi.....	60
5.10.	Farklılaşma (% 10 HS), transformasyon (% 10 HS+Dex.) ve normal (% 10 FBS) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinden p53 ve β -aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi.....	61
5.11.	Farklılaşma (% 10 HS), transformasyon (% 10 HS+Dex.) ve normal (% 10 FBS) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinden mdm2 ve β -aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi.....	62
5.12.	Farklılaşma (% 10 HS), transformasyon (% 10 HS+Dex.) ve normal (% 10 FBS) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinden p19 ve β -aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi.....	63
5.13.	Kontrol amacıyla p19 antikorunun Dot Blot yöntemiyle çalıştığının gösterilmesi.....	64
5.14.	Normal (% 10 FBS) ve transformasyon (% 10 HS+Dex.) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütilen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinden mdm2 ve p53 ve β -aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

1.1. Tümör baskılayıcı genler ve bulundukları kanser tipleri [12].....	5
5.1. Değişik ortamlarda büyütülen CO25 hücrelerinin çok çekirdekli olması yönünden karşılaştırmalı tablosu.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR ÇİZELGESİ

ERK	: Extracellular sinyal regulated kinase
GAP	: GTPase-activating protein
GDS	: Guanine nucleotide dissociation stimulator
MAPK	: Mitogen-aktivated protein kinase
MAPKKK	: MAPK kinase kinase
PI3K	: Posphatidylinositol 3-kinase
RBD	: RAS binding domain
SH	: Src homology
ARF	: Alternatif Reading Frame
PKC	: Protein kinase C
DNA-PK	: DNA Phospho-kinase
DEX.	: Deksemetazon
F.K.	: Final konsantrasyon

BÖLÜM I

1. GİRİŞ

Çok hücreli organizmalardaki her bir hücrenin yaşamı, çoğalması ve farklılaşması bir bütün olarak organizmanın gereksinimlerini karşılamak üzere dikkatli bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu kontrolün kaybolduğu kanser hücreleri sürekli olarak bölünmekte ve çoğalmaktadır.

Temel hücre kontrol mekanizmalarındaki bozukluklardan sonuçlanan kanseri anlayabilmek, uzun yıllar boyunca moleküler ve hücre biyologlarının araştırma konusu olmuştur. Tüm bu kanser araştırmaları aynı zamanda normal hücre davranışlarını kontrol eden mekanizmaları da açıklamaktadır. Çünkü gerçekten de, hücre sinyal iletiminde, hücre döngüsünün ve programlanmış hücre ölümünün kontrolünde anahtar rol oynayan bir çok protein, genlerdeki değişiklikler sonucu aktivitelerindeki anomalilerin kanser hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına izin verdiği için ilk olarak bunlar ortaya çıkarılmıştır [1].

Tümör virüsleri ile yapılan çalışmalar onkogen adı verilen özel genlerin hücre transformasyonuna neden olduğunu gösterdi ve böylece kanserin moleküler temellerine ilk bakışı sağlamıştır. Böylece, virüs onkogenleri ile yapılan çalışmalar bu tip kanserlerde hücreSEL yada proto-onkogenlerin keşfine olanak sağlamıştır. Bununla birlikte, günümüzde insan kanserlerinin aşağı yukarı % 80' ninin virüsler tarafından değil karsenogenik faktörler tarafından meydana geldiği kesinlik kazanmıştır.

Tümör oluşumu, çeşitli karsenogenik ajanların hayvanlar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı deney sistemlerinde incelenilmektedir. Fakat bu tip deneyler kantitatif olarak kontrol edilmeleri bakımından zordur. Bundan dolayı, kültür ortamında normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüştürülmesiyle *in vitro* yöntemlerin geliştirilmesi (hücre transformasyonu) kanser araştırmalarında en büyük gelişimi sağlamıştır.

1.1. Kanser ve Nedenleri

Bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi, bir virüsün enfeksiyonu sonucu (Hepatitis B) onu bölünmeye itecek genlerinin aktivite kazanmasıyla, hücre çoğalmasında rolü olan proteinleri etkileyerek transformasyonuna yol açmasıyla (SV40 T antijeni, Rb ve p53' e bağlanarak onları inhibe eder) yada mutant bir onkogene sahip olmasıyla (retrovirüsler) olabileceği gibi, çeşitli karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucu söz konusu genlerde mutasyon meydana gelmesi ile de olmaktadır [2].

İnsanda, yalnızca birkaç hayvan virüsü direk olarak bazı kanserlere neden olurken (karaciğer = Hepatit B, servikal = papillomavirüs, Burkittin lenfoması = Herpes virüsleri), genellikle kanser vakalarının yaklaşık % 80' ninde ise proto-onkogen adı verilen ve pek çoğu hücre çoğalmasında rolü olan genlerin onkogenlere dönüşümü etkili olmaktadır [3].

1.2. Onkogenler

Onkogenler ilk defa, tümöre neden olan virüslerin özgün genleri olarak keşfedilmişler ve viral-onkogenler (v-onk) olarak isimlendirilmişlerdir [3]. Daha sonra, bu genlerin ökaryotik hücrelerin geniş bir serisinde de korunmuş olmaları, bunların normal hücrelerin komponentleri olduklarını ve sonradan virüs genomuna, mutant formları olarak geçtiklerini gösterilmiştir. Normal hücrelerde bulunan bu genler proto-onkogenler yada hücresel-onkogenler (h-onk) olarak isimlendirilmişlerdir. Proto-onkogen ürünlerinin normal çoğalma ve farklılaşma gibi hücresel olaylarda önemli roller oynadıklarına inanılmaktadır [4].

Çeşitli tümörlerden izole edilen DNA' larda onkogenlerin varlığı kanıtlanmıştır [5-9]. Böyle hücresel onkogenler, gen transferi veya DNA transfeksiyonu olarak adlandırılan bir yöntemle ortaya konabilmektedir. Bu yöntem; tümörde var olan bazı genlerin, normal kültür hücrelerinde de transformasyonlara neden olabilecekleri prensibine dayanmaktadır [4]. Tümör hücrelerinden izole edilen DNA, NIH/3T3 fibroblast yada C2 miyoblast hücreleri

gibi birçok kültür hücrelerine transfer edilerek transformasyon mekanizması geniş olarak çalışılmaktadır [10-11].

1.2.1. Onkogenlerin fonksiyonları

Günümüze kadar, en azından 80 civarında onkogen tespit edilmiştir [12]. Onkogenleri fonksiyonlarına göre 9 grup altında toplamak mümkündür. Bunlar:

1. Büyüme faktörü veya morfogenerler: Bu genler tarafından kodlanan proteinler otokrin sisteminde yer alıp, hücre çoğalmasını uyaran proteinlerdir. Örneğin; PDGF (platelet-derived growth factor)' in β -zinciri ile ilgili olarak *v-sis* ve *int-2* genleri ve FGF (Fibroblast Growth Factor) ile ilgili olarak *k-fgf-hst* onkogenleri bu gruba örnektir [2].

2. Reseptör protein-tirozin kinazlar: Katalitik bölgeye sahip plazma zar reseptörlerini içermektedir. Örneğin; *erb-B* geninin amplifikasyonu sonucu EGF (Epidermal Growth Factor) reseptörü artmaktadır [13]. CSF 1(Colony stimulating factor 1) reseptörü olan *fms* onkogeninin aktivasyonu miyalodisplastik sendromunda saptanmıştır [14]. Bu gruba giren diğer bazı onkogenler ise *c-kit*, *c-met* ve *c-neu*' dur [15].

3. Plazma zarında ve hücre dışında domain içermeyen protein-tirozin kinazlar: Bu genler tarafından kodlanan proteinler hücre dışı bölge içermediklerinden dolayı plazma zarının sitoplazmik yüzeyinde yer almaktadırlar. Aktivasyonları hücre zarını geçen sinyalin sitoplazmadaki reseptörüne bağlanması ile gerçekleşmektedir. Örneğin; bu gruba giren *src* ilk keşfedilen onkogendir [2]. Diğer bir örnek ise çekirdekte yer alan *abl* genidir ve kronik miyalojenik lösemide tesbit edilmiştir [15].

4. Protein-serin /threonin kinazlar: Hücre, mitojenler ile uyarıldığı zaman *c-raf* gibi proteinlerin fosforilizasyonu ve buna bağlı olarak da bu proteinlerin protein kinaz aktivitesi artmaktadır. *v-raf* onkogeni NIH3T3 fibroblast

hücrelerine transfekte edildiğinde söz konusu hücrelerin transformasyonuna neden olmaktadır [16]. *mil*, *mos* onkogenlerinin de *c-raf* ve *v-raf* gibi hareket ettikleri bilinmektedir [2].

5. Zar-bağımlı G proteinleri: G proteinin alt ünitesini kodlayan *H-ras*, *K-ras*, *N-ras*, *gip* ve *gsp* gibi onkogenlerdir. Reseptörlerden tetiklenen sinyal yolunda önemli rolleri vardır [2, 9, 17-19].

6. DNA-bağımlı proteinler: *myc*, *myb*, *fos*, *jun*, *pax* ve *rel* gibi genler çekirdekte lokalize olurlar ve transkripsiyon faktörler olarak işlev görmektedirler [2]. Örneğin; *N-myc*, *L-myc* onkogenleri ilk olarak insan nöroblastoma ve küçük akciğer karsinoma hücrelerinde tespit edilmiştir [15].

7. DNA- bağımlı reseptör proteinler: *erb-A* bir tiroid hormon reseptörü (T3) olup ilk olarak kuşlarda eritroblastosis virusunda keşfedilmiştir [2].

8. Mitokondriyal zar faktörü: Orijinal olarak non-Hodgkin' nin B hücre limfomasında tesbit edilen *bcl-2* geninin ürünü mitokondriden proteinlerin salınmasını kontrol etmekte ve böylece tümör baskılayıcı gen olan *p53*' ün etkisini engellemektedir [20].

9. Sitoplazmik regülatörler: *bcl-1*, *nck* ve *crk* bilinmektedir. *v-crk* onkogenin kodladığı protein fosfolipaz C' ye benzer olup, reseptör olmayan tirozin kinazlara bağlanmakta ve onların tirozin fosforilizasyonunu arttırmaktadır [12].

10. Protein kinaz aktivitesi olmayan reseptörler: *mas*, *mpl* ve $\alpha 1\beta$. *Mpl* onkogeni, insan haematopoietik malignans ve miyaloplastik lökemisinde tespit edilen ve trombopoietin reseptörü olan bir proteini kodlamaktadır [12].

1.2.2. Tümör baskılayıcı genler

Antionkogen olarak da isimlendirilen tümör baskılayıcı genler ilk olarak retinoblastoma ve Wilms tümörü gibi kalıtsal kanser sendromlarında tanımlanmıştır [12]. Daha sonraları birçok diğer kanserlerde de varlığı tesbit edilen tümör baskılayıcı genlerin sayısı günümüzde 17 civarında olup Tablo 1’ de tesbit edildiği kanser çeşitleri ile birlikte verilmektedir.

Çizelge 1.1 Tümör baskılayıcı genler ve bulundukları kanser tipleri [12]

Tümör baskılayıcı gen	Tespit edildiği nöplazmalar
<i>APC</i>	Adenomatosis poliposis
<i>BCNS</i>	Medulloblastoma
<i>BCRA1</i>	Göğüs ve yumurtalık kanseri
<i>BCRA2</i>	Göğüs kanseri
<i>CMAR/CAR</i>	Göğüs ve prostat kanseri
<i>DCC</i>	Kolon kanseri
<i>INHA</i>	Gonadal kanseri
<i>MEN 1</i>	Paratroid, pankreas ve hipofiz kanseri
<i>NF1</i>	Nörofibroma tip 1
<i>NF2</i>	Nörofibroma tip 2
<i>NM23</i>	Nöroblastoma ve kolon kanseri
<i>p16/MLM/MTS</i>	Melanoma, pankreas ve küçük akciğer kanserleri
<i>p53</i>	Göğüs, kolon, akciğer, astrositoma ve osteosarkoma .vs.
<i>RB</i>	Ratinoblastoma, osreosarkoma, göğüs, mesane ve akciğer kanserleri
<i>VHL</i>	Böbrek, feokromositoma ve hemangioblastoma
<i>WT1</i>	Wilm tümörü
<i>p19</i>	Retinoblastoma

Çeşitli çalışmalarla tümör baskılayıcı genlerin normal fonksiyonlarının hücre döngüsünün kontrolü, transkripsiyonun baskılanması, sinyal iletimi ve DNA tamir mekanizmalarında önemli olduğu gösterilmiştir [21-26]. Bu genlerin baskılanması, inaktivasyonu, kaybı yada fonksiyon bozukluğu hücre transformasyonuna ve

kansere olanak sağlamaktadır [27-28]. Tüm bu nedenlerin aksine bu genlerin aktivasyonu yada ekspresyonu kanser oluşumunu engelleyerek hücre için koruyucu bir rol oynamaktadır [21-26].

1.2.3. Onkogenlerin aktivasyonu

Proto-onkogenlerin ifadesini veya yapısını değiştiren ve bunların onkogenik hale dönüşmelerine katkıda bulunan 4 mekanizma bilinmektedir [4]. Bunlar:

1. Promotor ilavesi. Onkogen içermeyen retrovirüslerin hücreleri enfekte etmelerinin ardından, eğer provirüs proto-onkogenlere komşu olarak bütünleşmiş ise, promotör gibi davranarak proto-onkogenin transkripsiyonunu aktive edebilir [29-31]. Örneğin; kemirgenlerde, *myc* proto-onkogeni promotoruna retrovirus integrasyonu sonucu *myc* aktivasyonunun T hücre lökemiasına neden olduğu tesbit edilmiştir [32].

2. Kromozomal translokasyonlar: Proto-onkogenleri içeren çeşitli kromozom anomalisi birçok kanser vakasında yapılan karyotip analizleri ile gösterilmiştir [33-35]. Onkogenlerin aktivitesine neden olan kromozom translokasyonlarına en iyi örneklerden bir tanesi kronik miyelositik lökemiya özgü olan filadelfiya kromozomudur. Bu kromozom özellikle t(9;22)(q34;q11) bölgelerindeki *bcr* ve *abl* genlerinin birleştirilmesinden doğan ve bir onkoprotein kodlayan kromozomdur [34].

3. Gen amplifikasyonu: Onkogenlerin amplifikasyonu, en çok insan solid tümörlerinde karakterize edilmesine rağmen değişik oranlarda limfoid malignant tümörlerde de bulunmuştur. Fare osteosarkoma hücrelerinde, [36] *myc* amplifikasyonu ve tümörleşme arasında positive bir korelasyon olduğu bilinmektedir[37]. Neuroblastomada, N-*myc* amplifikasyonunun bir rolü olduğu saptanmıştır [38]. İnsan glioma ve sarkoma vakalarında, amplifikasyona hedef olan genlerden bir tanesinde 12. kromozomda bulunan *mdm2* (Mouse double minute) genine homolog olan gen olup bazen aynı kromozomda yer alan *CDK4* (cycline

dependent kinase) geni ile birlikte amplifikasyona uğradığı tesbit edilmiştir [28, 39-40].

4. Nokta mutasyonları: Nokta mutasyonu sonucu, onkogenlerin aktifleşmesinin en tipik ve yaygın örneği, H, K, N-*ras* onkogenleridir. Bu nokta mutasyonları genellikle 12. 13. ve 61. pozisyonunda gerçekleşip, tek bir amino asidin değişmesine yol açarak onkogenin aktifleşmesini sağlamaktadırlar [2]. Bu tip *ras* mutasyonlarına, kolon, pankreas, mesane hücrelerinde ve çeşitli lösemi tiplerinde yaygın olarak rastlanılmaktadır [2].

Nokta mutasyonları, onkogenleri aktif ettiği gibi, bazen tümör baskılayıcıların fonksiyonlarını ortadan kaldırmaktadır. *p53*' te meydana gelen nokta mutasyonlarının çoğunun 5. ve 9. ekzonların arasında gerçekleştiği [27] ve bunun sonucunda kolorektal, servikal hepatosellüler prostat, astrositoma, melanoma, non-hodgkin limfoma, multiple miyeloma ve kronik lösemi gibi kanser tipleri meydana gelmektedir [41].

1.2.4. Onkogenler ve farklılaşma

Onkogenlerin değişik hücrelerin farklılaşması üzerine etki gösterdikleri çeşitli çalışmalar sonucu bilinmektedir. Örneğin; *v-src*, *v-erb* ve *v-ski* ile transforme olmuş olan miyoblast hücrelerinde miyotüp oluşumu engellenmiştir [42-43]. Ayrıca *c-myc* geninin, NIH/3T3 hücrelerinde *MyoD* geninin etkisi olarak, meydana gelmesi gereken farklılaşmayı [44] ve L6 rat miyoblastlarının farklılaşmasını engellediği bildirilmektedir [45]. *v-jun* ile transformasyonun, bıldırcın ve tavuk miyoblast hücrelerinin farklılaşmasını, bazı kas özgül genlerinin ekspresyonu engelleyerek bloke ettiği rapor edilmiştir [46-47].

Ras ve *fos* genlerinin, kas farklılaşması için gerekli transkripsiyon faktörler olan *MyoD1*' in ve miyogeninin ekspresyonunu engelleyerek, miyogenesi bloke ettikleri Lassar ve arkadaşları [48] tarafından gösterilmiştir. Ayrıca *v-fos* onkogeni ile transforme olmuş rat kas hücrelerinden üretilmiş ve neoplastik özelliği gösteren iki hücre tipi olan M4 ve RMS4' ün, *c-fos*, *c-myc*, *erbB*, *erbA*, *src* ve *sis*

onkogenlerin inaktivasyonu ile miyogenik kapasitelerini kaybetmeleri arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir [49].

Bu güne kadar süregelen araştırmalar, onkogenlerin, hücrelerin farklılaşmalarında üstlendikleri görev ve fonksiyonlarının, sınırlı ve özgül olduklarını göstermektedir. Onkogen aktivasyonunun farklılaşmayı engellemesi ile ilgili bulguların aksine, onkoproteinlerin farklı dokularda farklılaşma ile birlikte artış gösterdiği bulunmuştur. Örneğin; *ski* onkogeninin, bildircin embriyo fibroblastoid hücrelerinden kas gelişiminde rol oynamaktadır [50]. *c-fms* ve *c-fos* genlerinin ekspresyonlarının makrofaj hücrelerini meydana getirmekten sorumlu monomiyelosit hücrelerinin farklılaşması sırasında artıkları bilinmektedir [51-52]. Ayrıca sinirsel farklılaşma sırasında *c-src* onkogenin ekspresyonunun arttığı [53], *c-myc* onkogeninin hücrenin çoğalmasında rol oynamasına rağmen PC12, HL60 ve kronik limfositik lösemi hücrelerinin farklılaşmasında artış gösterdiği rapor edilmiştir [52].

Ras onkogeninin ürünü olan $p21^{ras}$ daha önce bahsedildiği gibi büyük oranda transformasyona neden olmasının aksine, sinir hücrelerinde sinir büyüme faktörü (NGF= Nerve Growth Factor) tarafından tetiklenen farklılaşma mekanizması ve ayrıca *Xenopus laevis* yumurtalarının olgunlaşması mekanizmasında rol oynamaktadır [54-58].

1.3. Miyogenesis ve *Ras* Aktivasyonu

Miyoblast hücreleri somatik mezoderm tabakasından gelişmektedir ve kas hücrelerini oluşturma görevini üstlenmiştir. Holtzer ve Bishoff [59] miyoblast hücreleri, “post-mitotik, tek çekirdekli, füzyon yapabilme yeteneğine sahip ve kasılma proteinleri sentezleyebilen hücrelerdir” diye tanımlamışlardır. Miyoblastlar, kas-özümlü gen ürünleri sentezlemeyen pre-miyoblast hücrelerden meydana gelmektedir ve DNA sentezi, hücre bölünmesi gibi işlemleri yerine getirmeye devam etmektedirler [60].

Tek çekirdekli miyoblastlar, düşük mitojenik ajanlar içeren ortamda, birbirleri ile füzyon yaparak çok çekirdekli miyotüp oluşturmaktadırlar. Miyoblastlar, hücre döngüsünden çıkarak füzyon için yüzey proteinleri

sentezlemektedirler. Ancak bunu yaparken de kas-özgül proteinlerinin ve onların izoformlarının sentezini de yapmaktadırlar [61].

Miyogenesis mekanizmasında, miyoblast hücreleri sürekli bölünmeyi ve çoğalmayı durdurarak kendi aralarında füzyon yapmakta ve miyotüp oluşturmaktadırlar. Bu morfolojik değişimleri sırasında kas-özgül genlerinden protein sentezlenmektedir [60].

Miyogenesisin kas-özgül kontrol faktörler ailesi denilen ve transaktivatörler olarak hareket eden *MyoD1*, *myd*, *Myf-5*, *MRF4* ve miyogenin genleri tarafından belirlendiği birçok çalışma ile saptanmıştır [60-61]. Öncelikle *MyoD1* geninin normalin üstünde sentezi, miyogenik kontrol ailesine bağlı diğer genlerin aktif olmasına neden olmaktadır [62]. Miyogenin sadece kas hücrelerin farklılaşmasını sağlamakla kalmayıp, kas olmayan hücrelerde de kas-özgül genlerinin aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir [61].

Miyotüplerin morfolojisi, uzunlamasına silindirik çok çekirdekli yapılar olarak tanımlanmaktadır. Miyotüpler, kas kasılması için gerekli olan miyofibril proteinleri, aktin ve miyozini içermektedirler [61]. Primer miyotüpler, sekonder hatta tersiyer miyotüp oluşturmak üzere kendi aralarında tekrar füzyon yapabilmektedirler [60].

Onkogenlerin, miyogenesis ile ilgisi de bulunmaktadır. L6 miyoblast hücrelerinde *c-fos* onkogeninin mRNA' sının 4 kat arttığı tespit edilmiştir [45]. Onun tersine *N-ras* onkogeninin CO25 hücrelerinde indüklendiği zaman miyogenesisi durdurduğu [10] ve *H-ras* onkogeninin, *MyoD1* genini baskıladığından dolayı bazı hücrelerin miyogenesisini engellediği tespit edilmiştir. [45]. FGF ve TGF- β ' nında (Transforming Growth Factor Beta) muhtemelen *myf-5* geninin ekspresyonu engellediği ileri sürülmektedir [45].

İnsan mutant *N-ras* onkogeni ile transforme edilmiş olan CO25 hücrelerinde, p21^{ras} ' ın sentezinin, FGF ve TGF- β ' nın etkisine benzer bir şekilde miyogenik farklılaşmayı engellediği gösterilmiştir [10]. Bu engellemenin ise farklılaşmanın erken safhalarında, keratin kinaz (CK) ve Asetil kolin (Ach) reseptörlerinin aktiviteleri gibi kasa özgül aktivasyonlara etki edilmesi ile olduğu belirlenmiştir [63]. *Ras* stimülasyonunu takiben CO25 hücrelerinin, normalde farklılaşma sırasında azalan vimentin, β ve δ -aktini sentezlemeye devam ettiği,

fakat sentezlenmeye başlaması gereken α -sarkomerik aktin ve desminin sentezlenmediği görülmüştür [63].

CO25 miyoblast hücrelerinin atası ve fare bacak kısmından izole edilen C2 miyoblastlarının füzyonu ile birlikte *c-myc* mRNA' sının dramatik bir şekilde azalmasının aksine *N-ras* ile transfekte edilmiş C2 hücrelerinde, füzyonu uyaran benzer ortamda *c-myc* mRNA seviyesinin arttığı rapor edilmiştir [10]. Ayrıca C2 hücrelerinin PDGF-BB büyüme faktörü için yüksek seviyede bağlanma bölgeleri yani reseptör bulundurduğu tesbit edilmiştir [64]. Hücre çoğalmasını uyaran ve farklılaşmayı baskılayan PDGF-BB ile başlatılan sinyal yolunun *N-ras* onkogeninden nasıl etkilendiği ise CO25 hücrelerinde Zeytinoğlu ve ark.[65] tarafından çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *N-ras* ile transforme olan hücrelerin PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) büyüme faktörüne cevap oluşturmamaları ve PDGF reseptörlerinin seviyesinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *ras* onkogeninin hücre içi sinyal iletiminin ilk adımlarında yer alabileceğini göstermektedir [65].

Bir başka çalışmada aktif *N-ras* genini içeren hücreler 7-10 gün içinde yığınlar oluşturmuşlardır. Aynı çalışmada, hücrelerin zarlarında villüs uzantıları olduğu rapor edilmiştir. Ancak ortamdan deksametazon uzaklaştırıldığında hücrelerin 6 gün sonra tekrar miyotüp oluşturdukları görüntülenmiştir. *N-ras* aktivasyonundan sonra CO25 hücrelerinde, hücre iskelet proteinlerinden F-aktinin organize olamadığı ve farklılaşma ortamında tespit edilen fibril şeklindeki F-aktin yapılarının kayıp oldukları belirlenmiştir [66].

Ras geninin aktif ya da inaktif olduğu CO25 hücrelerinin her ikisinde de Ca^{+2} 'un hücre içi depolarından salınmasına ve az miktarda plazma zarı kanallarından Ca^{+2} girişi yoluyla Ca^{+2} artışına yol açan Thapsigarin (ThG) kullanılmıştır. ThG' nin hücre içi Ca^{+2} iyonlarının yükselmesi üzerine etkisi benzer bir şekilde olmuştur. EGF ve bombesin, *ras* geninin aktif olduğu yada farklılaşmış hücrelere eklendiklerinde herhangi bir Ca^{+2} hareketi oluşturmamıştır. Buna göre CO25 hücrelerinin, EGF ve bombesin ligandları için reseptör bulundurmadığı ya da farklı bir [67] sinyal yoluyla reseptörlerin duyarsızlaştırılmış olabileceği gösterilmiştir [67]. *c-myc*, *p53*, *c-K-ras* ve β -aktin'in mRNA seviyeleri CO25 hücrelerinde, Northern Blot yöntemi kullanılarak Zeytinoğlu ve ark. tarafından

incelenmiştir. Farklılaşma ortamında, *c-myc* mRNA' sı ilk 2 günde artmışken 3. günde bu durumun ortadan kalktığı, fakat 4. günde tekrar birikmeye başladığı ve bazal seviyeye döndüğü tespit edilmiştir. Transformasyon ortamında ise *c-myc* mRNA' sının seviyesi, 1. günde yüksek olduğu 2. günde hafif bir düşme gösterdiği tespit edilmiştir. 3. günde ise tekrar yükselen *c-myc* mRNA' sının seviyesi 4. günde tekrar bazal seviyeye inmiştir. Fakat farklılaşma ortamında görülen *c-myc* seviyesinin, transforme ortamındaki *c-myc* seviyesine göre daha az olduğu tespit edilmiştir. *c-K-ras* mRNA' sı CO25 hücrelerinin farklılaşma ve transformasyonu sırasında farklılık göstermiştir. Farklılaşma sırasında *c-K-ras* mRNA' nın seviyesi iki gün azalmış 3. günde ise başlangıç seviyesinin %50' sine ulaştığı tespit edilmiştir. Transformasyon sırasında tüm günlerin seviyeleri başlangıç seviyesinin %80' i oranında gerçekleştiği rapor edilmiştir [68].

Farklılaşma ve transformasyon ortamlarında p53 mRNA seviyesinde kayda değer bir değişme olmadığı görülmüştür. Her iki ortamda da CO25 hücrelerinin az miktarda p53 mRNA sentezlendiği tespit edilmiştir. β -aktin mRNA seviyesi 2-3. günde hafif bir düşüş göstermiştir. 4.günde ise tekrar başlangıç seviyesine dönmüştür [68].

1.4. Miyoblast Hücre Sistemi

Tümör gelişimi çeşitli sistemlerde çalışılmaktadır. Gelişimin farklı basamaklarında örnek eldesinin ve diğer dokularla olası etkileşimin kontrol edilmesinin yarattığı zorluklar mekanizmayı anlamaya engel olmaktadır. Bundan dolayı, bir onkogen ile transfekte edilmiş hücre kültür sistemlerinde çalışmak oldukça popüler olmuştur.

Bu çalışmada seçilmiş olan CO25 miyoblast hücreleri, 1977' de Yaffe ve Saxel [69] tarafından, fare bacak kasından izole edilip, kültürü yapılan C2 hücrelerinden elde edilmistir. Daha sonra C2 hücreleri Gosset ve arkadaşları [10] tarafından, insan 61. kodonundan mutant *N-ras* onkogeni taşıyan bir plazmid ile transforme edilmiştir. Bu *N-ras* onkogeninin transkripsiyonu ise ona eklenmiş olan, steroidlere (deksametazon 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 sıgır 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 başlıyarak miyotüp oluşturmaktadırlar. Fakat, N-*ras* onkogeni içeren CO25 hücreleri, düşük seviyede mitojen içeren aynı besi ortamında, bir steroid hormon olan deksametazon ile muamele edildiği zaman miyotüp oluşturma yerine *ras* onkogeninin uyarılması sonucu transforme fenotipi göstermektedirler. Bu da kontak inhibisyonun kaybı ve ilerleyen sürede küçülmüş hücrelerden ibaret yığınların meydana gelmesidir. Diğer yandan, N-*ras* indüklenmesine neden olan deksametazon ortamdaki uzaklaştırıldığı zaman, CO25 hücreleri, C2 hücrelerinden hiçbir farklılık göstermeksizin tekrar miyotüp oluşturabilmektedirler [10].

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. Ayrıca bu sistem hakkında oldukça yeterli literatür bilgisi de bulunmaktadır.

1.5. Bu Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın ilk bölümü, N-*ras* geninin ekspresyonunun hücre çoğalma oranına ve morfolojisine etkisinin araştırılmasını içermektedir. Ayrıca, transfeksiyondan sonra, hücrelerin birçok kereler pasajlanması sonucu karyotiplerinde herhangi bir değişimin olup olmadığının araştırılmasını kapsamaktadır.

Çalışmanın ikinci bölümü ise, özellikle tümör baskılayıcı gen olan *p53* ve *p19* ile bunlarla ilişkisi olduğu ileri sürülen Mdm2' nin protein seviyelerinin araştırılmasını içermektedir. *p53*' ün transkripsiyonel seviyede farklılaşma ve transformasyon mekanizmalarında rolü olduğu ve çeşitli hücre sistemlerinde *p21^{ras}* onkogeni tarafından etkilendiği bilinmektedir [70]. İnsanda, transkripsiyon faktörleri tarafından aktive olan *p19* homologunun, Mdm2-*p53* kompleksine bağlandığı ve *p53*' ün parçalanmasını engelleme yoluyla anormal hücre büyümesini

baskıladığı ileri sürölmüştür [71]. Fare hücrelerinde ise p19' un p53' ü aktive ettiği çok yeni çalışmalarda rapor edilmiştir [72-74]. En çarpıcı sonuç ise, farede, onkogenik *ras*' a cevap olarak p53 aktivasyonu için p19' un gerekli olduğudur [75].

Bütün bu bulguların ışığında, bu çalışmanın amacı *N-ras* onkogeni taşıyan CO25 miyoblast hücrelerinde, *N-ras* aktivasyonu sonucunda, p19, p53 ve Mdm2 protein seviyelerinin nasıl etkilendiğini ve aralarında nasıl bir ilişki olabileceğini araştırmaktır.

BÖLÜM II

2.1. *Ras* Geni ve ürünü $p21^{ras}$

İnsan kanserlerinin %30' unda *ras* onkogeninin 12. ve 13. kodonlarda nokta mutasyonuna sahip olduğu saptanmıştır [76-78]. Örneğin, pankreas kanserlerinde %90' na varan oranlarda, kolon kanserlerinin %50' si, testis kanserlerinin %40' ı ve akciğer kanserlerinin %30' unda *K-ras* onkogeninde nokta mutasyonu olduğu bilinmektedir. Ayrıca, akut miyeloid lösemi kanserinin %30' u, testis kanserinin %40' ı ve melanomanın %20' sinde *N-ras* onkogeninde nokta mutasyonları tespit edilmiştir [78-80].

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 orjinal onkogenleri olup, virüslerde yalnızca *H-ras* ve *K-ras* onkogenlerinin karşılığı bulunmuştur [2,12, 81-82].

$p21^{ras}$ proteinleri, 50' nin üstünde, genellikle 20-30 kD olan küçük proteinleri içeren dört alt-aileden oluşan bir süper-aile içinde yer almaktadır. Bunlar gerçek *ras*, *ras* benzeri, *rho* ve *rab /YPT*' dir. Bunların hepsi guanin nükleotidi bağlama bölgesini içermektedirler ve bundan dolayıda G-proteinleri olarak bilinmektedirler. Gerçek $p21^{ras}$ a, $p21^{ras}$ benzeri proteinler %50, *rho* %35 ve *rab/YPT* ise yaklaşık %30 homoloji göstermektedir [83-86].

Bütün *ras* genleri 21 kD moleküler ağırlığında, ve 188-189 aminoasit içeren proteinleri ($p21^{ras}$) kodlamaktadır. $p21^{ras}$ G-proteinleri ailesine ait, alfa-alt üniteye homolog olan küçük bir protein olup, karboksil kuyruğu ile hücre zarının sitoplazmik bölgesine bağlanmaktadır [87,88]. $p21^{ras}$ ailesine ait tüm proteinlerin temel yapısı büyük bir benzerlik göstermektedir. *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 [78]. Ayrıca *K-ras* proteininin, *K-rasA* ve *K-rasB* olarak iki formu bulunmaktadır. Bunlar *K-ras*' ın dördüncü ekzonunda oluşan alternatif sıplayzing sonucunda meydana gelmektedirler [89].

N-kuyruğu $p21^{ras}$ proteinleri arasında çok iyi korunurken karboksil kuyruğu ise değişiklik göstermektedir [76,86,88].

$p21^{ras}$ in plazma zarında lokalize olabilmesi için bir takım modifikasyonlar geçirmesi gerekmektedir. İlk olarak, karboksil kuyruğunda yer alan 3 aminoasit karboksil metillenme ile ortadan kaldırılır. Sonra yeni oluşan karboksil ucunda yer alan sistein, izoprenillenmektedir [90]. Bunu K-rasA, H-ras ve N-ras' in karboksil ucundaki sistein aminoasidine palmitit grup eklenmesiyle palmitilasyon izlemektedir. Sistein aminoasidine eklenen palmitit grupları söz konusu $p21^{ras}$ proteinlerinin yarı ömrünü bir kaç dakika daha arttırabilmektedir [91].

Böylece plazma zarının iç tarafında yer alan $p21^{ras}$, büyüme faktörü reseptörleri ile hücreye gelen sinyalin iletilmesinde ilk adım oluşturmaktadır [86-88].

2.2. $p21^{ras}$ Proteininin Aktivasyon Mekanizması

Normal olarak $p21^{ras}$, GTP' a (Guanosine trifosfat) bağlanarak aktivite kazanmakta ve daha sonra kendine özgü olan GTP' az aktivitesi ile GTP' yi hidroliz ederek GDP' a (Guanosine difosfat) çevirir ve tekrar inaktif formuna dönmektedir [92,87,88] (Şekil 2.1).

$p21^{ras}$ proteininin GTP' ye bağlanmasını sağlayan proteinlere GDS (Guanine nucleotide dissociation stimulator) ve çözülmesini sağlayanlara da GAP (GTP' ase Activating Protein) adı verilmektedir. $p21^{ras}$ proteini hücrede normal olarak GDP proteinlere bağlıdır. Dolayısı ile GDS proteinlerinin $p21^{ras}$ proteinin aktivasyonunu stimüle ettikleri düşünülmektedir. [76, 78]. $p21^{ras}$ kontrol etme özelliği taşıyan 3 grup protein tespit edilmiştir. Birincisi, GEF (guanin nukleotidi değiştiren faktör), $p21^{ras}$ ailesine üye olan bütün proteinler üzerine aktif olan bir proteindir [89]. Diğer ikinci ve üçüncü grup ise $p21^{ras}$ GRF (GDP releasing faktör) ve $p21^{ras}$ -REP ($p21^{ras}$ exchange proteini) $p21^{ras}$ proteini için özgül sitosolik faktörleri oluşturmaktadırlar. Fakat bu proteinler, şimdiye kadar tam olarak karakterize edilemedikleri gibi, nasıl bir kontrol mekanizmasını izledikleri de bilinmemektedir [93-94] (Şekil 2.1).

GAP, (GTPaz' ı aktif eden protein) GTPaz' ı aktif ederek GTP' nin p21' den hidrolizine neden olmaktadır [95]. GAP 120.000 dalton ağırlığında olup etkisi normal p21^{ras} proteinleri üzerinde gözlenirken, mutant p21 üzerinde gözlenmemektedir. Böylece negatif regülasyona uğramayan mutant p21^{ras} proteinleri, transformasyona neden olmaktadır [96].

Ras proto-onkogenleri, 12, 13, 59, 61, 63, 116., 117., 119. ve 146. aminoasitlerini kodlayan bölgelerinde meydana gelebilecek bir nokta mutasyonu sonucu devamlı olarak aktif hale gelerek transformasyona neden olmaktadır [76]. 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 [76].

p120 GAP protein aktivasyonu ise çeşitli hücre tiplerinde tirozin kinaz aktive eden büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir [78,97-100]. Ayrıca 190 kDa moleküler ağırlıktaki bir proteininin p120 ile kompleks oluşturması GAP' ın, p21^{ras} proteinine bağlanma aktivitesini düşürmektedir. Bundan dolayı p190 proteininin, p21^{ras} in upstream regülasyonunda rol oynadığı ileri sürülmektedir [78].

GAP proteininin bağlanması sonucu p21^{ras} da meydana gelen inaktivasyon, p21^{ras} a %50 homolog olan ve tıpkı p21^{ras} gibi GTP' yi hidroliz eden, p21^{ras}-bağımlı proteinlerden olan rap1 proteini ile de açıklanmaya çalışılmıştır [80]. Buna göre p21^{rap1}-GTP kompleksinin p120 GAP proteinine bağlanma affinitesi çok kuvvetli olmakta ve dolayısıyla p21^{rap1}-GTP kompleksi, p21^{ras}-GTP' nin inhibitörü olarak literatürlerde geçmektedir [100]. Fakat Rap1 proteininin, *K-rev1* genin ürünü olduğu keşfedilmiş ve *K-rev1* geninin yüksek seviyelerde sentezi durumunda, *K-ras* onkogenini etkileyerek fibroblastların transforme olmasına ve fenotip değişikliği göstermelerine neden olduğu gösterilmiştir [101].

Proteinlerin, p120 GAP proteinini etkileyerek *ras* geninin aktivasyonuna yol açmalarının yanısıra, fibroblastlarda mitogenik cevap olarak meydana gelen fosfotidik asit, araşidonik asit ve fosfotidil inositol fosfatlar' ın, GAP' ın aktifleşmesini engellemektedirler [102].

$p21^{ras}$ in diğer kontrol mekanizmalardan bir tanesi inhibisyonudur ve nükleotid değişme oranını stimüle eden faktörlerinin engellenmesi ile olmaktadır [80]. Bu inhibisyonu sağlayan proteinler genellikle $p21^{ras}$ bağımlı Rap1, Rho ve Rab3a gibi proteinler GDI (GDP dissociation inhibitör) olarak belirtilmektedir [78].

$p21^{ras}$ kontrol mekanizmalarından bir diğeri ise fosforilizasyondur. rap1B proteini, protein kinaz A ile fosforile edilmektedir. Dolayısı ile Rap1B proteini, fosforlandıktan sonra Rap-GDS faktörlerin etkisine daha yatkın ve hassas duruma geçmektedir. Bunun sonucunda $p21^{ras}$ proteininin fosforlanmasının oranında bir düşüş olmaktadır [103].

NF1 (Neurofibromatosis type 1), $p21^{ras}$ a karşı GTPaz aktivitesini stimüle etmektedir. Bu proteini kodlayan genin klonlanarak incelenmesi sonucunda söz konusu proteinin içerdiği katalitik bölgenin, GAP katalitik bölgesine homolog olduğu gösterilmiştir [104]. NF-1-GAP bileşiminin $p21^{ras}$ a karşı affinitesinin düşük konsantrasyonlarda bile GAP' dan daha fazla olduğu bildirilmektedir. NF1 proteininin bir germ line mutasyonu sonucu meydana gelen, kalıtım yolu ile dölden döle aktarılabilen, tümörlere yol açması ile karakterize edilen Nörofibromatosis'e neden olduğu bilinmektedir [105] (Şekil 2.1).

Genetik literatüre göre *NF-1* geni, tümör baskılayıcı bir gendir ve eşey hücrelerinde, genin allellerinden bir tanesinin mutasyon görmesi ve diğer allelin de somatik bir mutasyona uğraması, hücredeki *NF-1* geninin görevsiz kalmasını sağlayarak hücrenin transformasyonuna yol açmaktadır. *NF-1* in bütün hücrelerde ifade edilmesine rağmen neden sadece sinir hücrelerinde kansere yol açtığı sorusuna şimdiye kadar net cevap bulunamamıştır [106].

2.3. $p21^{ras}$ in Fonksiyonları

$p21^{ras}$ in reseptörlerden gelen sinyali daha aşağı basamaklara iletme mekanizması çok sayıda yol ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlardan en önemlileri; protein kinaz C aktivasyonu, kalsiyum ve fosfolipid bağımlı protein kinazlar ile olanlarıdır [107]. *Xenopus* oositlerine, mikroyenjeksiyon yolu ile verilen $p21^{ras}$ proteini, fosfotidilin' in hidroliz hızını arttırmış ve ancak

diacilgliserolün birikmesine yol açarak protein kinaz C aktivasyonuna neden olmuştur. Ayrıca fibroblast hücrelerine verilen aktif *ras* onkogeninin protein kinaz C' yi stimüle ettiği tespit edilmiştir [107].

$p21^{ras}$ proteinin başka etkileri de bulunmaktadır. Bunlardan biri, transforma hücrelerin morfolojisi üzerine karakteristik değişimler meydana getirmesidir. Memeli hücrelerde bulunan iyonik şartlar, beklenen GTP bağlanma yarı ömrünü bir saate kadar uzatmaktadır. Bu değişiklikleri stimüle eden herhangi bir hücresel faktör, $p21^{ras}$ proteininin GTP' ye bağlanılmasını arttırmaktadır. Bu da sitozöl de bulunan guanin nukleotidi predominantlığını göstermektedir [103].

T hücrelerinde, stimüle edilen T hücre reseptörü olan CD2, İnterLökin-2 reseptörü ve protein kinaz C, $p21^{ras}$ ın aktivasyonuna yol açmışlardır. Mast hücrelerinde interlökin-3 ve Granülosit/makrofaj koloni stimüle eden faktör olarak bilinen GM-CSF, $p21^{ras}$ ı aktif etmiştir [108-109]. Normal NIH3T3 fibroblast hücrelerinin PDGF' ye maruz bırakılması sonucunda, söz konusu hücrede, GTP- $p21^{ras}$ seviyesinde az fakat önemli bir artış kayt edilmiştir [64]. Fakat Swiss 3T3 fibroblast hücrelerinde $p21^{ras}$ overexpressiyonu, PDGF ve EGF seviyelerinde küçük bir artış bulunmuştur [110]. Rat-1 fibroblastlarında, insülin reseptörünün normalden fazla sentez edilmesinin önemli derecede $p21^{ras}$ aktivasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir [111].

Forbolester ve fosfotidil inositol ile, T hücrelerindeki antijen reseptörün aktif edildiğinde, GAP-benzer proteinlerin aktivitelerinin kat kat azaldığı ve protein kinaz C aktif olduğunda aynı hücrelerde, GAP benzer proteinlerin aktivasyonu bastırılmıştır. Bunun sonucunda GTPaz aktivitesinde meydana gelen büyük değişimler, GTP' nin $p21^{ras}$ proteinine bağlanmasını hızlandırmıştır [108]. Bunun aksine, fibroblast hücrelerinde, forbol esterler $p21^{ras}$ proteinini aktive etmemektedirler . Dolayısı ile $p21^{ras}$ kontrol mekanizması, bir hücreden başka bir hücreye eğer kalitatif olarak değişim göstermezse de en azından kantitatif olarak değişme göstermektedir [78].

2.4. p21^{ras} in Effektörleri

2.4.1. Raf

RAF izoformları, sinyal iletiminde p21^{ras} proteininin efektörü olarak yer almakta ve p21^{ras} biyolojik aktivitesini direk ve açık bir şekilde etkilemektedir. p21^{ras} proteininin, hücre transformasyonunu gerçekleştirebilmesi için hem Raf a hem de MAP (mitogen activating protein) kinazlara gereksinimi vardır [112-113].

Raf, bir serin/threonin kinaz olup insanda 3 formu bulunmaktadır [114]. *Raf* ile interaksyona giren sadece aktif p21^{ras} formlarıdır ve mutant *ras*' ların *raf*' la interaksiyonunun olmadığı görülmüştür [115]. Amino asit kuyruğu kısalmış RAF formu ile K-ras' ın izopenillenmiş formunun kompleks oluşturmasının, hücrelerin transformasyonuna neden oldukları saptanmıştır [116].

p21^{ras} proteini, hücre transformasyonunu etkileyen hücre içi sinyal iletim yollarından bir tanesi olan Erk yolunu harekete geçirmektedir [117-119]. Bazı araştırmalar, mutant H-ras' ın Hela hücrelerinde, transkripsiyon faktör olan *jun* onkoproteininin aktivasyonunu kontrol eden *JNK* (jun-kinaz) yolunu, Erk yolundan daha fazla etkilediğini göstermiştir [15]. H-ras mutasyonunun tek başına söz konusu hücrelerin transformasyonuna neden olamadığı, bu yüzden p21^{ras} ile meydana gelen transformasyonların en azından iki yol izlemeleri gerektiği ileri sürülmüştür [15] (Şekil 2.1).

Bir başka örnekle, p21^{ras} (Y40C) mutant tipinin zarın akışını harekete geçirmesine rağmen Erk üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı kanıtlanmıştır [120]. Aynı zamanda *ras* mutasyonu Erk aktifleşmesine yol açtığı halde DNA sentezi veya zar akışını etkilemediği tespit edilmiştir [120]. Oysa, bazı mutantlar, p21^{ras}-G12V gibi sözü geçen her üç aktiviteyi de etkilemektedir [15].

İnsan hücresinde bulunan Af-6 proteini, p21^{ras} proteinin GTP' ye bağlanma bölgesine bağlanmaktadır [15]. İşte bu özellikten dolayı *raf* ile bir yarış içinde olduğu ileri sürülmektedir [15]. Fakat, bu proteinin (Af-6) fonksiyonu ve p21^{ras} tarafından nasıl kontrol edildiği henüz bilinmemektedir. Af-6' nın ise sitoskeleti

ve sitoiskelete bağlanan plazma zarını kontrol ettiği sanılmaktadır [121] (Şekil 2.1).

2.4.2. *Rac/Rho*

Ras ile transforme sağlanırsa, hücrelerin sadece çoğalması değil sitoiskeletlerinin de değiştiği bilinmektedir [15]. $p21^{ras}$ -GAP, p190 ağırlığında bir proteini bağlar. Bu proteinin amino kuyruğunda Rac-GAP ve Rho-GAP' lara homoloji gösteren SH2 ve SH3 bölgeleri olup, hücre iskeleti reorganizasyonunun kontrolünde rolleri vardır [15,82,122]. Dolayısıyla $p21^{ras}$ -GDP ve p190 (Rho-GAP) proteinlerinin aktif $p21^{ras}$ ile bağlanmaları, $p21^{ras}$ ın hücre iskeletinin kontrolünde rol oynayabileceğini düşündürmektedir [123]. Bununla ilgili olarak yapılan bir çalışmada, $p21^{ras}$ proteininin hücrelere enjeksiyonu Rac-bağımlı hücre zarında geniş yaprağımsı mikrovilli oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir [124]. Rac aktivasyonu, kinazların aktivasyonuna bağlıdır. Bu kinazlar, yapı bakımından $p21^{ras}$ tarafından regüle edilen Erk' e benzemesine rağmen fonksiyon bakımından farklılık göstermektedir [125-127]. Rho familyası, RhoA, Rac1 ve Cdc42 kapsamaktadır. Rho familyası, aktin stress formasyonunu ve yapışkanlığı regüle etmektedir [128-130]. *Rho* familyası onkogenik *ras* transformasyonu için gerekli olduğu tespit edilmiştir [128]. *Rho* yanı sıra *rac* ve *Cdc42 ras* ile transforme edilen hücrelerin çoğalması için gerekli oldukları tespit edilmiştir [128]. *Ras* ile transforme edilen hücrelerin RhoA-GTP' nin seviyesini arttırdıkları tespit edilmiştir [128]. RhoA-GTP' nin görevi ise hücre döngüsünün inhibisyonuna yol açan p^{21WAF1} fonksiyonunu azaltmaktır [15]. Dolayısıyla hücre çoğalmaya sevk edilmektedir [128]. Bir başka çalışmada ise $p21^{ras}$, melanosit ve melanoma hücrelerinde direk olarak c-AMP tarafından regüle edildiği tespit edilmiştir [131] (Şekil 2.1).

2.4.3. *Ral-GDS*

Ral-GDS (Guanine nucleotide exchange factor) proteini diğer $p21^{ras}$ efektör proteinleri ile benzer karakterlere sahip olup, $p21^{ras}$ proteinin GTP' ye

bağlanma bölgesi ve efektör-bağlanma bölgesi ile etkileşim yaptığı ortaya çıkarılmıştır [82]. $p21^{ras}$ proteininin ise Ral-GDS proteinini aktif ettiği Jiang H. ve ark. [132] tarafından açıklanmıştır. Böylece aktif hale gelen Ral-GDS, bilinmeyen bir yol izleyerek plazma zarında yer alan Ral proteinin fosfolipaz D ile bağlanmasını sağlamaktadır [132]. Fakat Ral proteininin, GTP' az ailesine üye olan Rac-1 ve CDC42 GTP bağlantılarının hidrolizini stimüle ettiği, dolayısı ile Ras/Ral-GDS etkileşiminin Rac yolunu izleyerek hücre iskeletini kontrol edebileceği düşünülmektedir [127].

2.4.4. Fosfotidil İnositol 3-Kinaz (PI3K)

Hücrelere enjekte edilen aktif $p21^{ras}$ in, 110 kDa moleküler ağırlığındaki PI3K proteininin aktivitesini stimüle ettiği tespit edilmiştir [133]. PI3K' ın src kinaz ve PDGF, insülin ve CSF-1 reseptör kinazlarında içinde bulunduğu belirli protein kinazlar ile çok sıkı ilişkisi olduğu ve bundan dolayı sinyal iletimi mekanizmasında önemli rolü olduğu bilinmektedir [133-134] (Şekil 2.1).

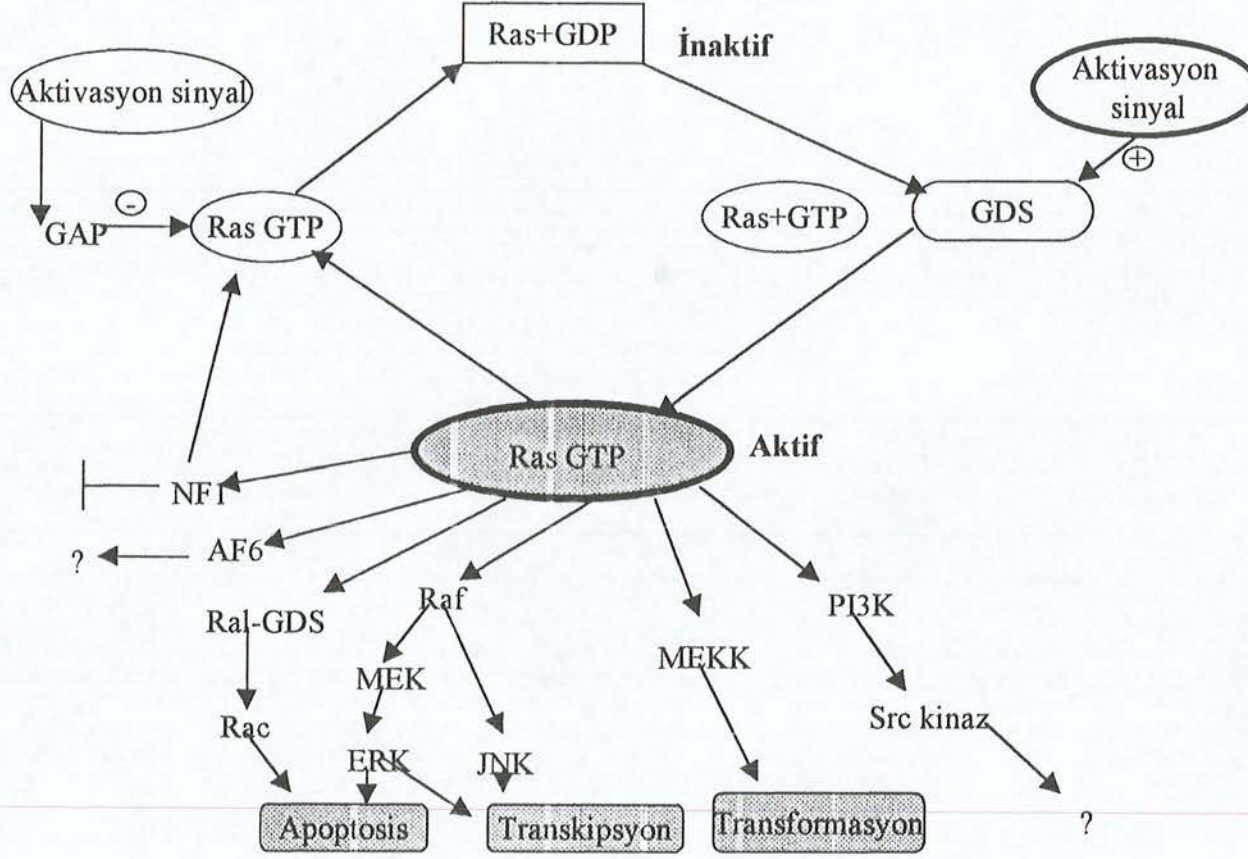
2.4.5. MAP Kinazlar

$p21^{ras}$ in Mek' yi aktif ettiği gösterilmiştir [135]. Mek ise, Raf-Mek-Erk yoluna benzer bir aktivasyon mekanizmasını başlatmaktadır. Ancak bu mekanizma, hücrel stres cevap yolunun yerini almaktadır [125,126]. Mek (GTP-dependent manner) de $p21^{ras}$ a bağlanmaktadır [136]. Raf-Mek ve Erk proteinlerinin regüle edilmemesi (ki bu regülasyon $p21^{ras}$ ile gerçekleşmektedir) halinde hücre kültüründe transformasyona yol açmaktadırlar. Bir başka açıdan bakıldığında, $p21^{ras}$ proteini hücre transformasyonunda etkisi olan Erk aktivasyonunda iki şekilde merkezi bir konum aldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, *ras'* ta meydana gelen bir mutasyon büyük ölçüde hücre çoğalmasını derinden etkileyecektir. Mek kinazlar, Mek ve Erk' leri içeren $p21^{ras}$ -Raf-Mek-Erk yolunun özü, değişik extrasellüler sinyaller tarafından kullanılıp hücrenin özgül cevap vermesine bağlanmaktadır [15].

2.5. *Ras* Ailesi ve Farklılaşma

p21^{ras} ailesinin, mitojenik ve transforme potansiyaline sahip olan proteinleri kodladığı bilinmektedir. Hücrenin normal çoğalmasını ve transformasyonunu etkileyen p21^{ras} hücrelerinin farklılaşmasını, büyümesini durdurulmasını ve yaşlanmasını etkilemektedir. Fare feokromatositoma PC12 hücrelerine mikroenjeksiyon ile enjekte edilen *H-ras*' ın bu hücrelerin büyümesini engellediğini ve nöronal farklılaşmaya neden olduğu Bar-Sagi 1985 [137] tarafından ileri sürülmüştür. Aynı şekilde normal durumlarda IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) etkisiyle adiposit hücrelerine farklılaşan NIH 3T3-L-1 hücrelerinin, IGF-1 büyüme faktörü olmadığı zaman onkogenik p21^{ras} etkisiyle farklılaştığını rapor edilmiştir [138]. Ayrıca *H-ras* onkogeninin, ekspresse olduğu rat Schwann hücrelerinin büyümelerini engellediği tespit edilmiştir. Ancak SV40 virüsü ile ortaklaşa hareket eden *H-ras*' ın, hücrelerin büyüme engelini ortadan kaldırdığını gözlemlenmiştir [139]. Aynı sonuç Raf-1 ile yapılan çalışmada da gözlemlenmiştir [140]. p21^{ras} onkogeninin, değişik kas hücrelerinde ekspresse edilmesi sonucu söz konusu hücrelerde yer alan ve kas farklılaşmasında önemli görev yapan *MyoD1*' in ve miyogenin faktörlerinin ekspresyonlarını bloke edildiği görülmüştür [49,141]. Fare kas hücre tipi olan 23A2' nin farklılaşmasının, *H-ras*' ın aktif edilmesi ile bloke edildiği tespit edilmiştir [142]. *N-ras* ve *H-ras* ekspresyonlarının, gerek C2 gerekse CO25 hücre tiplerinin kas özgül proteinleri olan α aktin, desmin, myosin ağır zinciri gibi proteinlerin sentezini engellediği halde, kasa has olmayan proteinler olan α ve γ aktin ve vimentin ekspresyonuna yol açtıkları bildirilmiştir [61-63].

Şekil 2.1. p21^{ras}' in aktivasyonunun kontrol mekanizması ve aktif p21^{ras}' in etkilediği efektörler ve sinyal yolları [15,123,133-134]
kaynaklardan modifiye edilerek çizilmiştir



BÖLÜM III

3. p53, Mdm2 ve p19

3.1. p53

p53 geni 11 ekzondan meydana gelen ve omurgasızlar hariç bir çok hayvanda keşfedilmiş olan bir gendir. *p53* bir tümör baskılayıcı gen olup hücrelerde yabancı tipinin kaybı veya inaktif duruma düşmesi halinde kanser meydana gelme olasılığı artmaktadır. İnsan tümörlerinin yaklaşık %50' sinde *p53* geninin normal fonksiyonunu kaybettiği bilinmektedir [143-145]. Normal *p53* proteini zincire özgül transkripsiyon faktör olup bazı özgül genleri aktive edebilmektedir. Aynı zamanda proteininin normalden fazla sentezi bazı genlerin baskılanmasına neden olabilmektedir [146].

p53 proteini 5 altüniteden ibaret olup monomerleri kendi aralarında bağlantı kurarak homo-oligomerler meydana getirmektedirler [147-149]. *p53* proteininin oligomerizasyonu çekirdekdeki lokalizasyonunu sağlayan 319-366. aminoasitlerini içeren bölgelerde gerçekleşmektedir [150]. *In vivo* koşullarda *p53* proteini, multiple serin ve threonin amino asitlerinden fosforile edilmektedir. *p53* proteininin fosforilizasyonu, genellikle birden fazla kinaz enzimi ile yapılmaktadır. *In vitro* çalışmalarda, insan ve fare *p53*' ün DNA-protein kinaz (DNA-PK), kazain kinaz ve MAP kinazlar tarafından fosforile edildiği rapor edilmiştir [151-154].

Normal *p53* proteini, DNA çift ipliğine özgül bölgelerden (genellikle GGGCGG) bağlanır ve bazı genleri transaktif ederken bazılarını baskılamaktadır [155]. Proteinin içerdiği birbirine anti paralel sandviç şeklindeki iki beta-plaka yapının içerdiği üç tane loop-plaka-sarmal motif elementleri DNA' ya major oluktan bağlanmaktadır. Kanserleşme ile sonuçlanan *p53* mutasyonları genellikle bu bölgelerde gerçekleştiğinden dolayı *p53* DNA' ya bağlanamaz ve böylece *p53* baskılama fonksiyonunu görevini yitirmektedir [15]. Bir allelde meydana gelen bir mutasyon kısa bir zaman sonra ikinci allelin kaybına neden olmaktadır. Dolayısı ile *p53* expressiyonu tümüyle kaybolmaktadır [15].

Kolorektal, servikal, hepatosellüler, prostat kanseri, astrositoma, melanoma, Non-hoçkin limfoma, multible miyeloma ve kronik miyelojen lösemi gibi kanser çeşitlerinde, *p53* mutasyonu ile tümörün patolojik durumu arasında bir korelasyon bulunmaktadır [42]. Fakat bu kanserlerin incelenmesi, *p53* mutasyonunun diğer bazı genlerin mutasyonunu takiben geç bir safhada meydana geldiğini ve bundan sonra tümör oluştuğunu göstermektedir. Bununla birlikte akciğer, meme ve boyun kanserlerinde olduğu gibi ilk safhalarda oluşan *p53* mutasyonu sonucu gelişen tümörler de bulunmaktadır [42].

Farelerde yapılan çeşitli çalışmalarda, normal *p53* genlerini bulunduran hayvanlar normal gelişimlerini sürdürmüşler, fakat *p53*' ü heterozigot olarak taşıyan hayvanlar 3-5 hafta sonra tümör gelişimi gösterirken *p53* allelerini hiç taşımayan hayvanlar ise daha erken tümör gelişimi göstermişlerdir [156-157].

p53 fonksiyonu kaybına yol açan mekanizmaların başında, nokta mutasyonları olmak üzere delesyonlar, gen tekrar düzenlenmesi ve sıplayzing mutasyonları bulunmaktadır [158-160]. *p53* geninde meydana gelen nokta mutasyonlarının bir çoğu 5. ve 9. ekzonlar arasında dağılmaktadır. 175, 245, 248, 249, 273 ve 282 kodonları en çok mutasyona uğrayan bölgelerdir. Bu mutasyon sıklığı ve dağılımı, bir *p53* orjinli tümörden diğer *p53* orjinli tümöre farklılık göstermektedir [42].

Söz konusu mutasyonların belli bir oranının dominant negatif mutasyonlar olduğu, yani fonksiyonel olarak inaktif olan *p53*' ün, transfer edildiği hücrelerdeki normal *p53*' ü de inaktif edebildiği gösterilmiştir [15,161]. Benzer şekilde, mutant *p53* ve aktif *ras* genlerinin birlikte transfer edildiği primer kültür hücrelerinde, normal *p53* proteinleri ile oligomer oluşturmak yoluyla onları inaktif hale getirdikleri ve hücreleri transforme ettikleri bulunmuştur [15].

Somatik kanserlerin %50' sinde *p53* mutasyonu tespit edilirken, sadece Li-fraumeni sendromuna yakalanan hastaların bazı bireylerinde, *p53* mutasyonu sonucu eşey hücrelerinde kanser olduğu tespit edilmiştir [15]. Bu az rastlanan bir otozomal dominant sendromdur ve en tipik karakterlerinden bir tanesi, çocuk ve erginlerde meme, yumuşak doku sarkoma, beyin tümörü, osteosarkoma, lösemi ve adreno kortikal kansere yol açabilmesidir. *p53* heterozigot mutasyonu taşıyan

bireyler ise, tümör geliştirdiği zaman *p53* normal tip allelini kaybetmektedirler [156,157-158,162].

3.1.1. *p53*' ün fonksiyonu

p53 proteininin hücre içindeki aktivitesi iki önemli olay için, hücre döngüsünün durdurulması ve programlanmış hücre ölümü (apoptosis) için gereklidir. Bu aktiviteler kanser gibi çeşitli genetik hasara uğramış hücrelerin replikasyondan elemine edilerek çeşitli anomali risklerinin azalmasına olanak sağlamaktadır [163]. Bu gibi etkilerin normal hücreler için arzu edilmemesi *p53* aktivitesinin sıkı bir kontrol altında tutulmasını gerektirmektedir.

p53 geni, özellikle çoğalmayı kontrol etmesi bakımından bütün kanser araştırmaları, hücre genetiği ve biyokimyasal araştırmaların ilgi odağı haline gelmiştir. Bu çalışmaların bir çoğu G_0/G_1 fazlarında hücrenin çoğalmaya gitmesi veya engellenmesi üzerine yoğunlaşmıştır [164-169]. Bazı çalışmalarda *p53* ile apoptosis arasındaki ilişki açığa çıkarılmaya çalışılırken, bazılarında ise *p53* ile farklılaşma arasındaki bağlantı çözülmeye çalışılmıştır [170-171].

3.1.2. *p53*' ü aktif eden sinyaller

Normal koşullar altındaki hücrelerde, *p53* daha çok inaktif olarak bulunurken çeşitli stres koşullarının oluşmasıyla hızlı bir şekilde aktivite kazanmaktadır. Bu stres koşulları direk DNA hasarını [172], hücresel genetik materyalin çoğalması ve aktarılmasında gerekli olan elemanların hasarını [173], ribonükleotidlerin [174] oksijen azalmasını, sıcak şoku ve nitrik okside maruz kalmayı içermektedir. Bunlara ek olarak *Myc*, *ras* ve adenovirüs *E1A* gibi onkogenik proteinler *p53* aktivasyonunu tetikleyen faktörler içerisinde yer almaktadır [173-174] (Şekil 3.1).

Örneğin, 1984 senesinde, Czyzyk ve Maltzman tarafından UV ışığına ve UV benzeri kanserojen ajanlara maruz bırakılan fare hücrelerinde *p53* proteininin post-translasyonel bir mekanizma ile biriktiği tespit edilmiştir [175]. Bir başka çalışmada, hücrelerin DNA' ya zarar verecek herhangi bir iyonik radyasyona

maruz bırakıldıkları zaman GADD45 geninin (growth arrest and DNA damage-inducible) transkripsiyonundaki artışın *p53* geninin varlığıyla ilgili olduğunu ileri sürülmüştür [15,176]. Kastan ve arkadaşları [177] normal insan haematopoietik progenitor hücrelerinde (HL60), γ -radyasyonunun, *p53* seviyesinin artmasına neden olduğu ve DNA' nın replikasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca bir başka çalışmada, mutant *p53* ve aynı zamanda normal *p53*' e sahip olan RKO hücreleri, aynı γ -radyasyonuna maruz kaldıklarında yine G_1 fazının engellendiğini tespit ederek *p53* normal tipinin, *p53* mutant tipine baskın olduğunu ileri sürmüştür [178] (Şekil 3.1).

p53 geni taşımayan fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarda, hücrelerin gerek radyasyona gerekse kimyasal uyarıcılara daha hassas oldukları tespit edilmiştir [179]. Buna göre kanserli hücrelerdeki *p53* statüsü, antikanser ajanların sitotoksitesine olan duyarlılığı ölçmekte ve belirlemekte önemli bir rol oynamaktadır.

3.1.3. *p53*' ün apoptosisteki rolü

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 yaşadıkları tespit edilmiştir. Fakat bunun aksine normal *p53* geni olan ve *p53* geni olmayan mutant farelerden alınan timüs hücrelerinin dexametozon ile uyarıldıklarında apoptosise gitmeleri *p53* dışındaki bir mekanizmanında olabileceğini düşündürmektedir [180].

Buna ilaveten, *myc*, *E1A* ve *H-ras* gibi onkogenler apoptosise yol açabilmektedir. Serumdan mahrum kalan hücrelerin ise özellikle *p53*' e bağlı olarak apoptosis gerçekleştirebildikleri tespit edilmiştir [181-184].

p53' ü baz alan apoptosisin moleküler düzeydeki mekanizması ile ilgili kısıtlı bulgular vardır. İnsan *bax* geninin *p53* ile direkt bağlantılı olan bir pro-apoptotik protein olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir [185-186]. Örneğin Bax proteininin inhibe ettiği bilinen *bcl2*, *p53*-bağımlı apoptosisi bloklamaktadır [185]. Yüksek seviyede normal *p53* sentezleyen hücrelerdeki Bax seviyesi

artarken Bcl2 seviyesinde azalma olmakta ve dolayısı ile hücre apoptosise gitmektedir [185] (Şekil 3.1).

p53' ün uyardığı apoptosis ile G₁ fazı durdurma mekanizmalarının farklı olduğu bazı çalışmalarla ifade edilmektedir. Örneğin sıcaklığa duyarlı olan p53 alleli ile transenfekte edilen eritrolösemik hücrelerin, seçici sıcaklıklarda, G₁, apoptosis yada farklılaşmaya gittikleri, ancak söz konusu hücrelerin besi ortamına sitokin (erithropoietin KIT-ligand veya interlökin-3) eklendiği zaman, bu hücrelerin apoptosis ve farklılaşmalarının bloke edildiği halde G₁' de durma mekanizmasının normal olarak devam ettiği gözlenmiştir [187].

p53' ün transkripsiyon faktörü olma özelliğinin, p53' e bağlı apoptosis için gerekli olduğu ileri sürülmektedir [178]. Bir başka çalışmada ise p53' ün mitokondriyal enzimlerle apoptosise yol açan ve elektron taşınımı için çok önemli olan sitokrom C den bağımsız olarak apoptosisi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir [188] (Şekil 3.1).

3.1.4. p53 ve farklılaşma

p53' ün, embriyogenesinin mekanizmasında hiç gerekli olmadığı, p53 geninden tamamen yoksun olan farelerin embriyolarının gelişme göstermeleri sonucu ileri sürülmektedir [162].

Abelson virüsü ile transenfekte edilmiş pre B-L12 ve p53 negatif hücrelerinde, normal p53 proteini sentezlendiği zaman hücrelerin yüzeyinde bulunan ve farklılaşmalarının birer işareti olan B220 antijeninin ve sitoplazmik immünoglobulin μ ağır zincirinin sentezinin arttığı görülmüştür [161]. Ayrıca Friend virüsü ile transforma edilen eritrolösemik hücrelerde, p53 alleli ekspresse edildiğinde, eritroid farklılaşmasının işareti sayılan globin RNA ve proteinin sentezlendiği gözlenmiştir [189]. Rotter ve ark. [190], p53' ün spermatogenesis mekanizmasında rol oynayabileceğini önermektedirler.

3.1.5. p53' ün diğer fonksiyonları

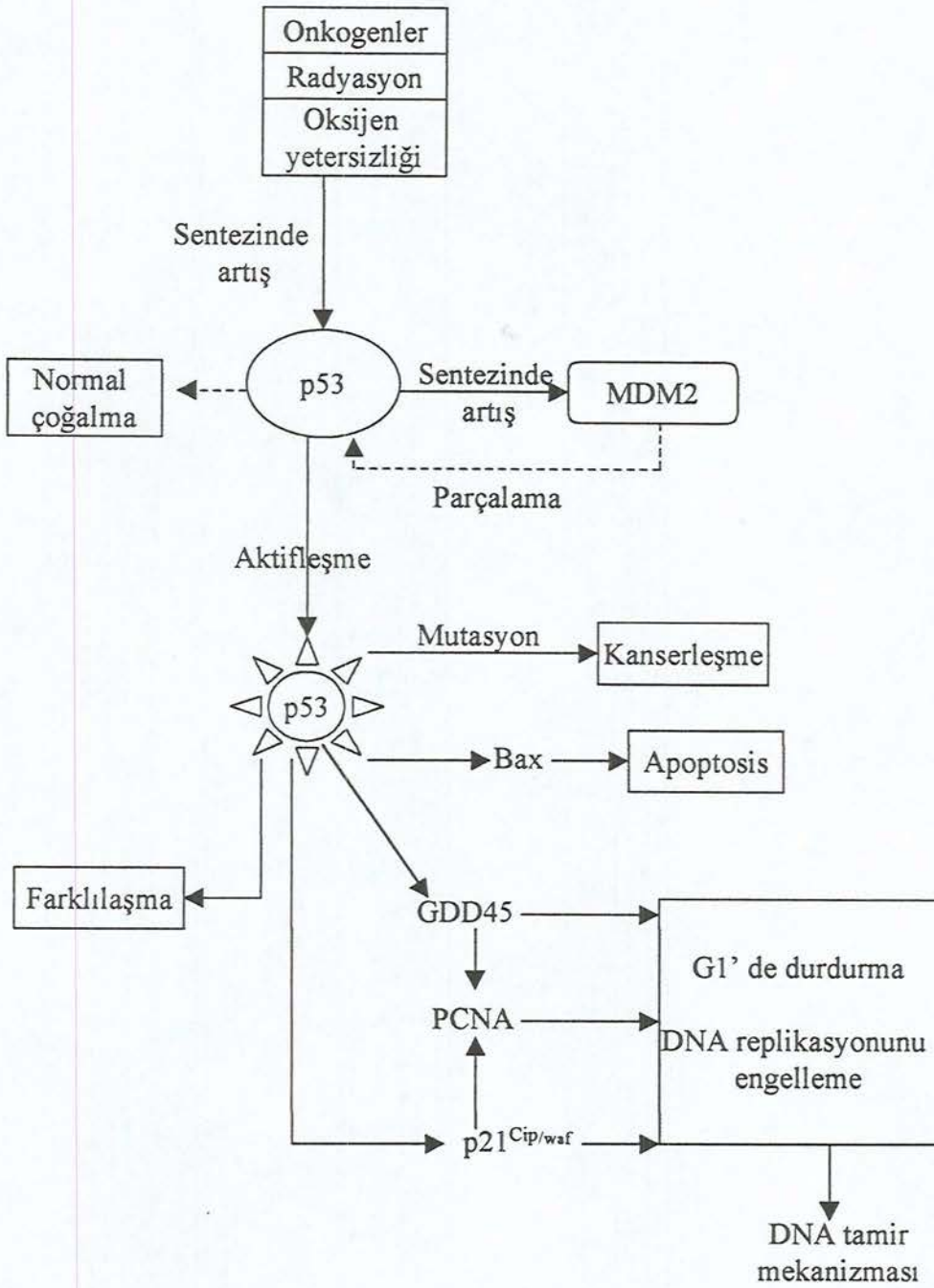
SV40 orijinli DNA replikasyonunun, *in vivo* ve *in vitro* deneylerde p53 proteini ile inhibe edildiği tespit edilmiştir [15]. p53' ün SV40 orijinli replikasyon için gerekli olan helikaz enziminin aktivitesine, içerdiği son 27 aminoasit ile bir şekilde karıştığı ileri sürülmektedir. Buna ilaveten p53 proteininin, DNA polimeraz δ enzimi ile rekabet içinde olduğu bildirilmektedir [191-192].

p53, DNA' nın tek zincirine bağlanabilen ve replikasyonda rol alan protein A (RpA)' ya bağlanmaktadır. p53 proteini, Protein A' ya bağlanmadığı takdirde, söz konusu protein A DNA' nın zincirine bağlanamayıp görevini yitirmektedir [193]. Buna ilaveten, p53' ün tek iplikli DNA uçlarına bağlandığı ve kuvvetli DNA-DNA ve RNA-RNA çift iplik oluşumunda rol aldığı gösterilmiştir [133].

p53' ün kontrol ettiği diğer bir gen de p21^{CIP1/WAF1} dir. Bu genin ürünü cdk (Cyclin dependent kinase) aktivitesini engellediği için G₁-S geçişinde çok önemlidir. p21^{CIP1/WAF1} ile p53 arasındaki etkileşimin hücrenin çoğalmasının kontrolünde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. p53' ün cdk aktivitesini inhibe eden p21^{CIP1/WAF1} genini uyardığı ve direkt olarak PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ile bağlanabildiği son zamanlarda yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. PCNA ise DNA replikasyonunda yer alan, DNA polimeraz α enziminin aktivasyonu için gerekli bir proteindir [194] (Şekil 3.1).

p53 normal tipi, *in vitro* ortamlarda Ber (Base Excision Repair = baz ekleme çıkarma tamiri) proteinini ve yine aynı mekanizmada görev alan ERCC3 faktörünü stimüle ederek tamir mekanizmasıyla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [133,195].

p53' ün kemirgenlerde 5.8 rRNA' ya kovalent bağ ile bağlandığı ve dolayısıyla p53' ün, tRNA' nın ribozoma bağlanmasında önemli rolü olan 5.8 rRNA' nın kontrolünde, işlevinde veya transportunda rol oynayabileceği düşünülmektedir [15]. Yapılan yeni çalışmalarla, p53' ün farklı bir sitoplazmik aktivitesi olarak alternatif bir mekanizma ileri sürülmektedir. Translasyonel kontrolü içine alan bu mekanizmada, p53 kendi mRNA' sı dahil belirli bazı mRNA türlerinin translasyonunu engelleyebilmektedir [133].



Şekil 3.1. p53 proteinin aktivasyon mekanizmalarının kontrolü ve etkiledikleri hücre fonksiyonları [178, 185, 194] kaynaklardan modifiye edilmiştir

3.2. Mdm2

3.2.1. Mdm2 Gen ve Proteini

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 3T3DM' lerde görülen kromozom çeşitidir [196]. p53' ün işe karıştığı G₁ fazı birçok yolla engellenebilmektedir. Örneğin RKO hücrelerinde, Mdm2 proteinin ekspresyonu, p53-Mdm2 interaksyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle p53' ün G₁' deki transaktivasyonu kaybedilmektedir ve radyasyona cevap verilememektedir [197].

Çeşitli insan tümörlerinde ekspresse edilen *mdm2*, yeni bir proto-onkogen çeşidi olarak ele alınmaya başlanmıştır. Çünkü onun ürünleri, diğer tümör baskılayıcılarının aktivitelerini nötralleştirmektedir [196]. Mdm2' nin, tümör baskılayıcı proteinler içindeki ana hedefinin p53 proteini olduğu gösterilmiştir [198].

Mdm2 en az 12 ekzon ve iki tane promotörü olan ve 90 kDa moleküler ağırlıkta, p53 ile bağlanabilme özelliği taşıyan bir protein kodlayan bir gendir. Birinci promotör, genin yukarı bölgesinde ve ikinci ise promotör birinci intronda yer almaktadır. İkinci promotör gerek farelerde gerekse insanda içerdiği iki p53-bağlanma bölgesinden dolayı p53 tarafından kontrol edilmektedir [199-201]. Farede Mdm2 proteini 489 aminoasitten ibaret olup 14-130 bölgesi p53 bağlanma bölgesidir. Bunun insanda 19-102 bölgeler olduğu tesbit edilmiştir [202-204].

p53 geninin aktivasyonunun gerek *mdm2* ve gerekse *cip1* (çoğalma inhibitörü ve onun gibi çoğalma inhibitörleri) gibi genlerle aynı promotör üzerinden gerçekleştiği ve söz konusu iki genin ekspresyonunu etkilediği rapor edilmiştir [196,205]. *Mdm2*' nin ekspresyonun ana hedefinin ise p53' ün çoğalma inhibitörleri üzerindeki etkisini azaltmak olduğu ileri sürülmüştür [206].

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

DNA' nın replikasyonunu engellenmektedir. Buna göre Mdm2 ve p53 arasında kompleks oluşturma mekanizması –bir şekilde—kontrol edilmektedir [207].

Mdm2' nin promotörleri, p53 proteini tarafından baskılanmaktadır. Ancak ortamda Mdm2 proteini olduğu zaman, p53' ün TATA kutularına yaptığı baskılama işlemini engellemektedir. [196]. *Mdm2*' nin promotörleri alternatif olarak transkripte edilmelerinden dolayı farklı kodonların içinde başlayan translasyon, Mdm2 proteininin de farklı oluşmasına neden olmakta ve sonuçta p53 ile bağlanmasını etkilemektedir [196]. Yapılan çeşitli çalışmalarda, bazı hücrelerde (LTR6) *mdm2* geninin her iki promotöründen olan transkripsiyon oranı ile proteininin kısa ve uzun formları arasındaki oranın değişmediği [201] ve hatta insan keratinosit hücreleri gibi bazı hücrelerde p53' ün olmadığı bir ortamda tam bir Mdm2 proteininin bulunduğu saptanmıştır [208]. Tüm bu sonuçlar p53 ve Mdm2 arasında sıkı bir kontrol olduğunu ifade etmektedir. Bu kontrolün kaybolduğu transforme ve kanserli hücrelerde ise *mdm2* geninin transkripsiyonunun alternatif sıplayzing ile olduğu ve Mdm2 proteininin p53 ile bağlanma özelliğinin kaybolduğu rapor edilmiştir [209-211]. Bu küçük N-terminalli olan Mdm2 formlarının normal hücrelerde, kanserli ve transforme hücrelere göre daha az görüldüğü yine bir başka çalışmada ortaya konmuştur [196].

3.2.2. Mdm2-p53 kontrol mekanizması

Mdm2 p53' ü negatif olarak kontrol eden bir proteindir [197-212]. *Mdm2* olmayan ve p53 içeren fare embriyolarının öldüğü tespit edilirken, p53 geni alındıktan sonra, söz konusu embriyoların normal yaşlarında öldükleri tespit edilmiştir [213]. Bu negatif kontrol iki şekilde olduğu ileri sürülmektedir. Birincisi, Mdm2 sitoplazmik proteozomlarda p53' ün parçalamasını sağlar ve böylece her hangi bir stressle karşılaşmayan hücrelerde p53 seviyesi düşük tutulmaktadır [214]. Mdm2 E3 ubiquitin-protein ligaz ile birleşerek kazandığı ligaz aktivitesi ile p53' ün ubiquitinasyonuna neden olur ve bu da p53' ün proteozomal degradasyonu ile sonuçlanmaktadır [163,215-216].

İkinci mekanizma ise p53' ün transkripsiyonal aktivasyonunun negatif olarak kontrol edilmesidir. Mdm2, p53' e koaktivatörlarına bağlanmasını yada yeni bir p53-bağımlı gen ekspresiyonunu engelleyerek p53' ün transaktivasyonunu ve böylece apoptosis yeteneğini engellemektedir [214]. Aynı zamanda Mdm2' nin p53' ün transrepressyon fonksiyonunu engelleyebileceği düşünülmektedir. Diğer yandan p53 özgül olarak *mdm2* genine bağlanır ve transkripsiyonunu uyarır ve bir negatif feed-back mekanizmasına yol açmaktadır [196].

Mdm2 ve p53 arasındaki etkileşimi özellikle genotoksik bir faktöre maruz bırakılan hücrelerde yapılan çalışmalar göstermektedir. UV ışınlarına maruz bırakılan C127 hücrelerinde, p53 stabilizasyonu ve Mdm2 indüksiyonu arasında oldukça belirgin bir gecikme olduğu gözlenmiştir [207]. Dolayısıyla, p53 proteininin transkripsiyonal aktivasyon hedefi olan diğer proteinlerin aynı koşullardan etkilenmiş olma olasılığı bulunduğu öne sürülmüştür. Gamma radyasyonunun bazı hücrelerde Mdm2 mRNA' sının hızlı indüksiyonuna neden olduğu ve G1 fazında durdurulan hücreleri bölünmeye sevk ettiği rapor edilmiştir [197]. *Mdm2*' nin indüklenmesine bağlı olarak *p53* genindeki upiquitinasyon arttığı ve dolayısıyla *p53* ürünün azalmasına yol açtığı bildirilmiştir [215].

Momand ve Zambetti [217], Mdm2' nin farklı hücrelerde p53' ün değişik formlarına bağlanabileceğini tespit etmişlerdir. 3T3DM hücrelerinde Mdm2' nin tüm p53 proteinlerine bağlandığı halde Balb/3T3 hücrelerinde veya normal fibroblastlarda bağlanmamıştır. [217]. Piette ve ark. 97 [196] ise bir başka çalışmada Mdm2 ve p53' ü serbest olarak aynı anda bulunduğunu rapor ederek bu durumun fosforilizasyon mekanizmasına bağlı olmadığı ileri sürmüştür. Bu bulgunun aksine, iyonize radyasyona maruz kalma sonucu, hücrelerdeki p53 proteininin stabilize olmasının, Mdm2' nin bir fosforilizasyon-fosforilizasyon mekanizması tarafından baskılanmasıyla olduğu bulunmuştur. DNA hasarı ile aktif olan p53 önce ser15 ve thr18 de fosforile olmakta ve böylece Mdm2' nin etkisinden kurtularak stabilize hale gelmektedir [218]. İnsanda, DNA-fosfokinaz veya ona bağlı kinazlar p53' ün fosforilizasyonuna neden olmakta ve böylece Mdm2 ile p53' ün birleşmesinde rol oynamaktadır [196,219]

Mdm2' nin p53 üzerine bu şekilde negatif kontrolü olmasına rağmen, nöroblastoma dahil bazı insan tümörlerinde, p53' ün Mdm2' nin neden olduğu degradasyona dayanıklı olduğu ve sonuç olarak söz konusu hücrelerde anormal seviyede devamlı olarak birikim gösterdiği gözlenmiştir [214]. Bu dayanıklılığının ise aynen fosforilizasyon-fosforilizasyon mekanizmasında olduğu gibi p53' ün geçirdiği kovalent modifikasyonlarla ilgili olduğu rapor edilmiştir [214].

Mdm2' nin apoptosis için bir negatif regülatör olarak iş gördüğü diğer bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin; insan glioblastoma hücrelerinde, yüksek seviyelerde Mdm2 sentezinin bu hücrelerde cisplatin ile sağlanan apoptosisi azalttığı görülmüştür. Oysa antisense Mdm2' nin bu hücrelerdeki varlığı apoptosis yeteneklerinin artmasına neden olmuştur [220].

Haupt ve ark. [215] *c-myc* onkogeninin aktivasyonundan sonra aktifleşen p53 ve ona bağlı apoptosisin Mdm2 ile inhibe edildiğini rapor etmiştir. *mdm2* bir onkogen olarak kabul edilmekte ve hücrelerde normalin üzerinde sentezi transformasyona neden olmaktadır. *Mdm2* ile transforme olmuş NIH3T3 ve Rat 2 hücrelerinde, Mdm2' nin yüksek seviyede sentez edildiği ve insanda *Mdm2* geninin lokalize olduğu 12q13-14 bölgesinin, insan sarkomalarının bir çoğunda amplifike olduğu anlaşılmıştır [221] (Şekil 3.2). Örneğin; *mdm2* geninin, astrositoma özofagal, osteosarkoma veya testis hücrelerinde amplifike olduğu bulunmuştur [222]. Mdm2' nin proteinin yüksek seviyede olması genin amplifikasyonuna bağlı olduğu gibi [222-223] bazı çalışmalarla kanserli hücrelerde, *mdm2* geninin amplifikasyonuna bağlı olmadan da protein seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir [224-225].

Mdm2' nin aktivitesi, fiziksel benzerlik gösteren MdmX adındaki bir başka protein tarafından kontrol edilmektedir. Hem Mdm2' nin sentezinin artmasına ve hem de onunla etkileşim gösteren p53' ün parçalanmasına neden olmaktadır [196]. Bir başka çalışmada, MdmX' in p53 ile birlikte aktivite gösterdiği ve MdmX' in daha kısa bir formu olan MdmX-S' in ise transforme hücrelerde sentez edilerek p53' e MdmX' ten daha etkili bir şekilde bağlandığı, dolayısıyla apoptosis ve çoğalmada önemli rol oynadığı bulunmuştur [226].

Mdm2' nin onkogenik aktivasyonlar sonucu kontrol edildiği yapılan yeni çalışmalarla gösterilmiştir. Ries ve ark. [227] *Ras* onkoproteininin başlattığı *Raf/ Mek/ MAP* kinaz yolunun *Mdm2'* nin aktivitesini *p19* adında bir protein varlığı ile kontrol ettiğini ileri sürmüşlerdir. Burada, *p19 Mdm2'* yi inhibe ederek *p53'* ü parçalanmaktan koruyarak hücre döngüsünü durdurmakta ve apoptosise neden olmaktadır. Fakat *p19* dan yoksun hücrelerde *Raf/ Mek* yoluyla *Mdm2* artarak *p53* parçalanmakta ve böylece tümör gelişimi gözlenmektedir (Şekil 3.2).

Burada *p19*, *Mdm2-E3* kompleksine bağlanarak ligaz aktivitesini bloke eder ve proteozomal parçalanma meydana gelmemektedir [163,228]. *Ras/ Raf/ Mek* yolu *p19* ve *p53'* ün yanı sıra *E2F-1* aktivasyonunun artması yoluyla *p16* ve *p21^{CIP}* proteinlerinin artışına neden olmaktadır. Bunların kontrolü ile *p19-Mdm2-p53* döngüsünü içeren fare hücrelerinde prematüre ölümler görülmektedir [228-230] (Şekil 3.2).

Onkogenik *H-ras'* in aktif olduğu kemirgen fibroblast hücrelerinde *p16* ve *p19'* un her ikisinin yada yalnız *p19* veya *p53'* ün yokluğu morfolojik transformasyona neden olmaktadır [216,228] yine *p21^{CIP}* ve *p21^{KIP}* (*Cyc*-bağımlı kinaz) yolunda, *p21^{ras}* hücre döngüsünün tamamlanması için gerekli genlerin fonksiyonları etkilemek suretiyle transformasyona neden olmaktadır [228].

p19' un bir transkripsiyon faktörü olan *Dmp1* tarafından uyarıldığı ve fare fibroblast hücrelerinin *p53*-bağımlı hücre döngüsünü durdurarak ile cevap verdiği Honda ve ark. [216] tarafından rapor edilmiştir. Fakat *Dmp1*-yoksun hücreler pasajlandığı zaman *p19*, *Mdm2* ve *p53* seviyeleri normal hücrelere göre düşüş göstermiş ve ölüm gözlenmiştir. Yine bu *Dmp1'* in yoksun hücreler onkogenik *H-ras* ile morfolojik olarak transforme olabilmişlerdir [216].

p53' ün negatif regülatörü olan *p19^{ARF}*, *p16^{INK4a}* (*Cdk4* inhibitörü) ile aynı lokusu paylaşmakta olup alternatif okuma çerçevesi de genel bir ikinci kodlama eksonundan belirlenmektedir [233]. *Myc*, *E1A* ve *E2F-1* adenovirüsleri, *v-abl* ve onkogenik *ras* tarafından indüklenen *p19* yukarıda anlatıldığı gibi *p53'* ü stabilize eder ve böylece *cip1* (*Cdk2* inhibitörü) gibi *p53*-cevaplı genlerin uyarılmasını sağlamaktadır. Hücre döngüsünde görevli bu genlerin uyarılması hücrelerin S fazına girişine neden olmaktadır [228].

Resptörlerin aktif ettiği *ras*' ın, *ras*-bağımlı ekstrasellüler sinyal regüle edilmiş kinaz (Erk1 ve Erk2) yolunun aktivasyonu ile aktif hale gelen CycD1-cdk4 ve Cip/Kip kompleksi Rb fosforilizasyonuna neden olmaktadır. Bunun sonucu, Dna üzerindeki E2F-Rb kompleksinden Rb' nin ayrılması ve dolayısıyla baskılanmış genlerin aktivasyonu meydana gelmektedir. Bu aktivasyon yollarında bir tanesi E2F- transkriptif edici aktivasyonu sonucu *p19^{ARF}* promotörün indüklenmesi ve prematüre ölümü olmasıdır. Bir diğeri ise E2F-cevap genlerinin aktivasyonu sonucu Cyc B ve Cyc A' nın sentezlenmesiyle hücrenin S fazına başlamasıdır [228].

p53 mutasyonu ile birlikte Mdm2' nin yüksek seviyede sentezlendiği durumlar da bulunmaktadır [196]. Araştırılan 104 insan kanser vakasından 12 tanesinin yalnızca *p53* mutasyonu, 10 tanesinin yüksek seviyelerde Mdm2 sentezi veya amplifikasyonu ve 1 tanesinin hem yüksek seviyede Mdm2 sentezi ve hem de *p53* mutasyonunu rapor edilmiştir [231]. Yumuşak doku kanseri üzerine yapılan başka bir çalışmada ise *p53* mutasyonu ve Mdm2 yüksek seviyede sentezinin prognosis ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir [232]. Sezary sendrom üzerine yapılan bir başka çalışmada, *p53* mutasyonu ve yüksek seviyede Mdm2 sentezlenmesi malignansiye hücrelerine yol açtığı ileri sürülmüştür [233].

Elde edilen tüm bu bulguların aksine, yapılan bazı çalışmalarda *p53* ile *mdm2* arasında benzer bir ilişki bulunmadığı ve *mdm2*' nin tek başına, hücreleri transforme edebildiği bulunmuştur [211,234]. *Mdm2*' nin transforme edebilme yeteneğinin N-terminal kuyruğunda meydana gelen delesyon sonucu ortaya çıktığı gerek sidik kesesi gerekse yumurtalık kanserlerinde yakın bir zamanda gösterilmiştir [211]. İlk önceleri, *mdm2*' nin tek başına hücreleri transforme edebilme yeteneği, *p53* normal tipini sentezleyen hücrelerde ortaya konmuş [196] ve takibeden çalışmalarla, bu onkogenik özelliğin çoğalmayı baskılayan *p53*' ü inhibe etme yoluyla gerçekleştiği ileri sürülmüştür [235].

Bununla birlikte, *p53*' ten yoksun olan hücreler, yüksek seviyede Mdm2 sentezi ile transform edilebildiği [235] ve bu transformasyon gerçekleşirken *p107* proteininin ortadan kalktığı, bunun sonucunda da hücrelerin G₁ duraklama fazını atlattığı ileri sürülmektedir [234]. Yüksek seviyelerde sentez edilen Mdm2 proteininin, *p53* proteinine sahip olan ve olmayan meme bez hücrelerinde S fazına

girmeleri sonucu poliploidi ve kanserleşme belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olduğu belirtilmiştir [236].

İnsanda *mdm2* genin bulunduğu 12q13-14 bölgesinde genellikle *cdk4* (Cycline Dependent Kinase) geni de bulunmaktadır. Kanserleşmede, söz konusu bölgenin amplifikasyonunda *cdk4*' ün de amplifikasyonu söz konusu olmaktadır ki *cdk4*' ün tümörleşme mekanizmasında bir rolü olduğu ileri sürülmektedir [237].

Mdm2 proteininin gerek ribozom biyosentezinde gerekse translasyonel regülasyonda yer aldığı düşünülmektedir. Bunun genellikle Mdm2 proteininin 5S rRNA' ya bağlanan L5 proteini ile etkileşimine bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Mdm2 proteinini yüksek seviyede sentez eden hücrelerde, Mdm2, L5 ve 5SrRNA üçlü kompleksinin yanısıra, Mdm2, p53, L5 ve 5SrRNA dördü kompleksinin bulunduğu gösterilmiştir. 5SrRNA-L5 protein kompleksinin memeli hücreleri nükleoplazmasında saklanması ribozom sentezi için kaynak oluşturmaktadır ve ayrıca 5SrRNA, nükleus ile sitoplazma arasındaki geçişini sağlamaktır. Böylece, ribozom biyosentezinin regülasyonunda, Mdm2' nin sözkonusu L5 fonksiyonlarını kontrol etme yoluyla rol aldığı düşünülmektedir [238-239].

3.2.3. Mdm2-p53 kompleksi ve embriyo gelişmesindeki rolü.

Mdm2 mRNA' sı oositin I. ve II. aşamalarında tespit edilmiş olup VI. ve V. aşamalarına doğru yavaş yavaş artarak maksimum seviyeye ulaştığı ve sonra tekrar azalmaya başladığı rapor edilmiştir [240]. Embriyo blastula aşamasına kadar geldiğinde Mdm2' nin seviyesi tespit edilemeyecek kadar azalır. Buna bağlı olarak, mitozun ilk aşamalarında, p53 aktivitesinin baskı altında tutulduğu ileri sürülmektedir [240]. Bu da aynı zamanda, Mdm2' nin oogenesis sırasında sadece p53' ün transkripsiyonal aktivasyonuna bağlı olmadığını göstermektedir. p53 ise fertilizasyona kadar büyük ölçüde sitoplazmik kaynak olarak tutulmakta ve devreye sokulmamaktadır [240]. Embriyonun daha sonraki aşamalarında, Mdm2 proteini, p53 proteininin seviyesini ve aktivitesini kontrol etmek için bulunmaktadır ve p53 seviyesine bağlı olarak hareket etmektedir. *Xenopus laevis*' da, Mdm2 proteininin p53 seviyesine bağlı olarak arttığı gösterilmiştir [240].

Fare embriyonik gelişimi sırasında, Mdm2 devamlı olarak düşük seviyelerde sentez edilirken [213] zebra balığının gelişiminde daha sonradan sentez edildiği görülmüştür [196]. Gamma radyasyonuna maruz bırakılan fare embriyolarında, yüksek seviyelerde bulunan Mdm2' den dolayı p53 aktivasyonunun engellendiği tespit edilmiştir. Bu durum ise DNA' da hasar olduğu zaman Mdm2 ile p53 kompleksinin oluşmadığını savunan modeli geçersiz kılmaktadır [241].

3.2.4. Mdm2 ve terminal farklılaşma

Mdm2 mRNA' sının, beyin, kas veya testis gibi dokularda yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir [196]. C2C12 miyoblast hücrelerinin farklılaşması sırasında, Mdm2 proteininin normalden fazla sentezinin *MyoD* genine bağlı farklılaşmayı, *MyoD1* geninin transkripsiyonu engelleme yoluyla yaptığı belirlenmiştir [242]. p53 transkripsiyonal aktivitesinin aynı hücrelerin farklılaşması için gerekli olduğu başka bir çalışma ile tespit edilmiştir [243]. Ancak, kas farklılaşmasında, Mdm2-p53 loopün direkt etkisi henüz bilinmemektedir [243].

Normal ve farklılaşma durumunda olan deri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, Mdm2 ekspresyonunun farklılaşmanın son aşamasına gelen hücrelerin çekirdeklerinde oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu hücrelerde, p53 geninin mutasyona uğraması, Mdm2' nin artışını etkilemiştir. Ayrıca C2C12 miyoblast gibi bazı hücrelerin farklılaşması sırasında Mdm2' nin, p53 proteininden bağımsız olarak arttığı tespit edilmiştir [226].

1999 yılında Alkhaf ve ark. [244] tarafından yayınlanan bir makalede Mdm2 epidermal hücrelerde ekspresse edildiği zaman p53' e bağımlı kalmadan farklılaşmaya yol açabildiğini ve tümörleşmeye neden olmadığını savunulmuştur. Keratinosit hücrelerinin farklılaşması sırasındaki Mdm2' nin artışı ve p53' ün azalışı söz konusu hücrelerin farklılaşma programında bir rolü olabileceğini göstermektedir [245]. Fakat Mdm2' nin miyoblastlarının farklılaşmasında rolü olan *MyoD* proteinini inhibe ettiği için miyoblast hücrelerinin farklılaşmasında bir görevi olmadığı düşünülmüştür [242].

3.3. p19

p19 geni INK4a gen lokusunda bulunan alternatif okuma çerçevesine (alternative reading frame= ARF) sahip bir tümör baskılayıcı gendir . p19 proteini ise 169 amino asitten ibaret, alternatif splayzing geçiren bir mRNA molekülünün ürünü olup hücre çoğalmasını bloke etmektedir ve interfaz aşamasında çekirdek içinde lokalize olmaktadır [75].

p19^{ARF} p53' ü stabilize eden bir proteindir [75]. p19' un bu etkisini nasıl yaptığını açıklayan farklı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında p19^{ARF}, ın p53' ü destabilizasyonunu sağlayan Mdm2 proteinine bağlandığı ve böylece Mdm2' nin p53' e bağlanmasını engellediği ileri sürülmektedir [74-75,216,246]. Bazı çalışmalarda ise p19^{ARF}, p53-DNA kompleksine direk olarak etkileşime girmektedir [75,216]. ARF-p53' ten yoksun olan hücrelerin daha çabuk çoğaldıkları tespit edilmiştir [246].

Kamijo ve ark. [74] fare embriyo hücrelerinde, p53 ve p19' un yaşlanmayı kontrol ettiğini ve p19' un G1 fazında durmayı uyarabilmesi için normal p53' e gerek duyduğunu ileri sürmüşlerdir. Bates ve ark. [73] 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 homoloğu) proteininin sentezini aktive etmektedir. Aktif p14 ise p53 proteininin Mdm2 tarafından parçalanmasını engellemekte ve böylece hücre apoptosise gitmekte yada hücre döngüsünü durdurmaktadır [247].

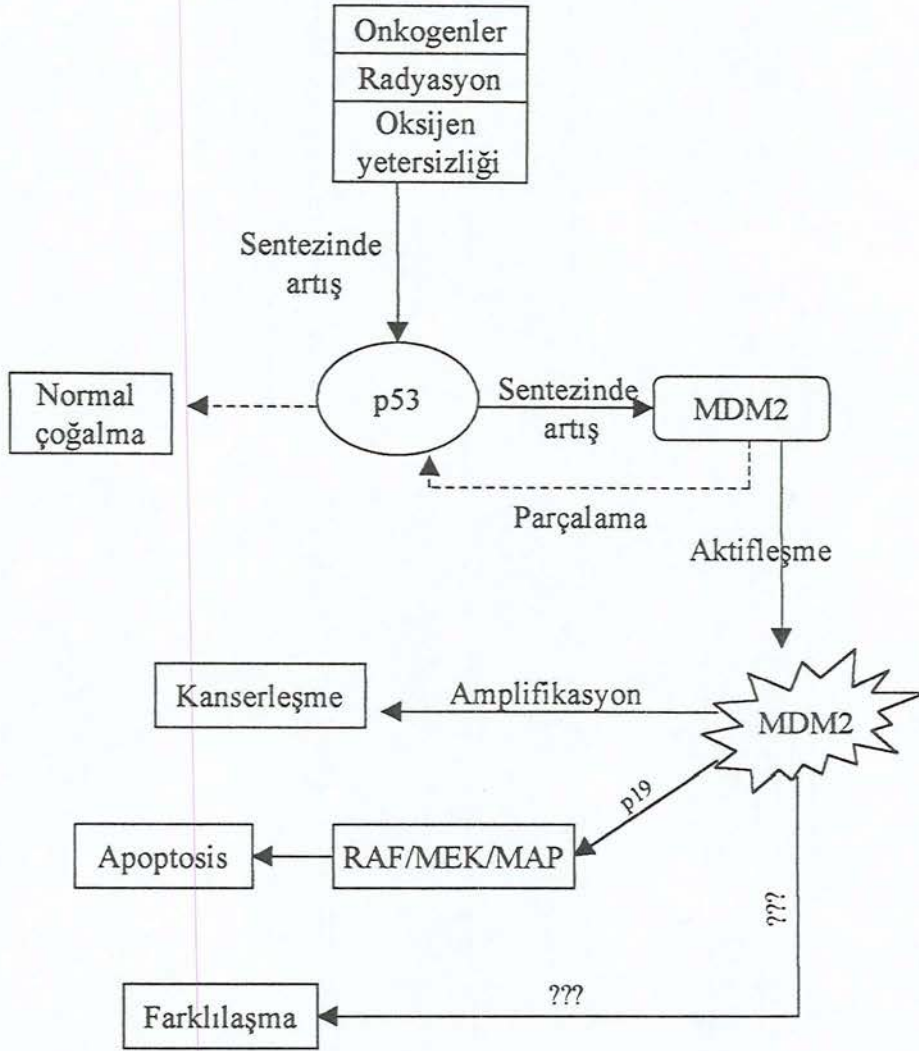
Bir başka çalışmada ise, DNA hasarı olduğu zaman aktif hale gelen p53' ün, p19 aracılığı ile aktif edilmediği yani p19 seviyesinin artmadığı, fakat bunun aksine *ras* onkogeni ile aktif edilen p53' ün, p19 aracılığı ile aktif olduğu tesbit edilmiştir [76]. Ayrıca bazı kanser tiplerinde de tespit edilmiş olan p19^{ARF}, ın 1.ekzon bölgesindeki mutasyonların p19' un hücre döngüsünü durdurama yeteneğini yok ettiği belirlenmiştir [248]. p19^{ARF}, tan yoksun embriyo kökenli fibroblast hücreleri çok sayıdaki pasajdan sonra herhangi bir yaşlanma krizi yaşamamışlar ve böylece H-*ras* onkogeni ile transform edilerek

ölümsüzleştirilmişlerdir. Oysa p19 heterozigotunu taşıyan fibroblast hücreler pasajlardan sonra kriz geçirdikleri tespit edilmiştir [75,248].

Onkogenik *ras*, insan ve kemirgen fibroblastlarının INK4a/ARF tümör baskılayıcı lokusunun iki ürününü olan p16^{INK4a} ve p19^{ARF} u indüklemektedir. Bunun sonucunda, hücreler yaşlanmışa benzer bir hal alarak hücre döngüsünü durdurmaktadırlar. p19^{ARF} p53 transkripsiyon faktörünü aktif ederken, p16^{INK4a} siklin D' ye bağlı kinazlara karşı antagonist aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. INK4a/ARF, tek ARF veya p53' ten yoksun olan ölümsüzleşen kemirgen fibroblast hücreleri, onkogenik *ras*' ın büyüme inhibitörlük etkisine karşı dirençli olmaktadır. Bu özellikte olan hücreler aynı zamanda çoğalmaya devam ederken morfolojik değişikliklere uğrayarak transforme olmaktadır [228]. Onkogenik *ras*, G1 fazının durdurulmasının indüklenmesi yerine DNA sentezini etkilemektedir. Dolayısıyla anormal bir nükleer bölünme, sitokenesis başarısızlığı ve sonuçta poliploid hücresinin meydana gelmesine neden olmaktadır [228].

Mdm2, p53' ün inhibisyonunu sağlarken, p53' ün C-terminal kuyruğunu ubiquitinleştirerek gerçekleştirmektedir. Oysa p19^{ARF} , Mdm2' nin ubiquitinleştirme aktivitesini engellemektedir [216]. p53' ün, Mdm2 tarafından ubiquitinleştirmesinin yanı sıra aynı zamanda fosforilasyonu da p53' ün dayanıklılığını sağlamaktadır.

p19 nüllizomi taşıyan farelerde, multiple kanserin gelişmediği ve dolayısıyla p19' un Mdm2-p53 yolunun dışında başka bir yol izlediği ileri sürülmektedir [249]. p53' ün olmadığı hücrelerde, p19^{ARF} ın hücrelerin büyümelerini bilinmeyen bir mekanizma ile baskıladığı tespit edilmiştir. Fakat bu baskılama olayı hangi mekanizma ile olduğu bilinmemektedir [250].



Şekil 3.2. MDM2 proteinin aktivasyon mekanizmalarının kontrolü ve etkiledikleri hücre fonksiyonları [228-230] kaynaklardan modifiye edilmiştir

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Kullanılan Materyaller

4.1.1. Antikorlar

Fare β -aktin antikor (Sigma), keçi IgG antikor (Santa Cruz sc -2022), fare IgG antikor (Santa Cruz sc -2008), fare MDM2 antikor (Santa Cruz sc -965), fare N-ras antikor (Santa Cruz sc-32), keçi p19^{ARF} antikor (Santa Cruz sc -32), p53 antikor (Santa Cruz sc -99).

4.1.2. Kimyasal maddeler

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

4.2. Hücre Kültürü

Deneyde kullanılan CO25 ve atası olarak bilinen fakat insan mutant N-ras onkogenini taşımayan C2 miyoblast hücreleri, East Anglia Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Okulu, Moleküler Biyoloji Bölümünden sağlanmıştır. Her flaska bir milyon hücre olacak şekilde, thoma lamında sayılarak ekilmiştir. Miyoblast hücreleri normal büyüme ortamı olan %10 FBS (Foetal Bovine Serum), %1 L-glutamin ve 100 ünite/ml penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içinde, %5 CO₂ ve %95 hava verildikten sonra 37 °C'deki CO₂ inkübatöründe (Hearouse) büyütülmüşlerdir.

CO25 hücrelerin transformasyonu ve taşıdıkları insan mutant *N-ras* onkogenini indüklemek amacıyla, yaklaşık %80 sıklığa ulaşan hücreler %10 HS + 1µM/ml deksametazon içeren besin ortamında dört gün büyütülmüşlerdir. Deksametazon, steril distile su içinde 200µM stok şeklinde hazırlanmış ve -20°C'de saklanmıştır.

C2 ve CO25 miyoblast hücreleri, yukarıda sözü edilen her üç ortam için yeterli hücre sayısı elde etmek amacı ile %10 FBS'de kültür edilmişlerdir. Buradan her flaska bir milyon hücre olacak şekilde farklı besi ortamlarına aktarılarak, her biri 12, 24, 48, 72 ve 96 saat inkübe edilmişlerdir. Hücrelerin besi ortamı her gün yenisi ile değiştirilmiştir.

4.3. Hücre Büyüme Eğrisi

CO25 miyoblast hücreleri, FBS, HS ve HS+DEX ortamlarında her flaska bir milyon hücre olacak şekilde kültür edilmiştir. Her biri 12, 24, 48, 72, 96 saat inkübe edilmişlerdir. Hücreler, belirtilen zaman periyodunda sayılması için 1 ml Tripsin-EDTA ile 37 °C de 5 dakika veya hücreler birbirinden ayrılana kadar inkübe edilmişlerdir. Hücreler thoma lamel ile sayılmıştır. Bu deney üç kez ayrı ayrı olarak yapıldıktan sonra, toplam deneylerden alınan sonuçların ortalaması alınmıştır.

4.4. Hücrelerden Kromozom Elde edilmesi

CO25 ve C2 miyoblast hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml (2X) tripsin uygulanmasıyla hücreler birbirinden ayrılarak flask tabanından kaldırılmıştır. Daha sonra 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücreler toplanmıştır. Tripsini içeren süpernatant atılmış, 37°C'de % 0.4 KCl solüsyonu damlatılmış, hücreler süspanse edilmiştir ve yaklaşık 50 damladan sonra 15 ml % 0.4 KCl solüsyonu hızlı bir şekilde eklenmiştir. Bu aşamadan sonra hücre süspanasyonu 37°C 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücreler toplanmıştır. Süpernatantın atılmasından sonra fiksatif (3:1 metanol : asetik asid) önce damla damla eklenmiş

ve karıştırılmış, ardından 15 ml hızla eklenmiş ve tekrar karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildikten sonra tekrar 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Fiksatif içeren supernatantın yaklaşık 1 ml'lik kısmı bırakılarak kalan kısmı atılmıştır. Geriye kalan hücre süspansiyonu, 1N nitrik asite bırakılmış ve soğutulmuş lamlara damlatılarak preparat hazırlanmıştır.

5 ml tampon A (% 4.53 KH_2PO_4 pH= 4.8), 5 ml tampon B (% 5.93 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ pH= 9.3), ve 5 ml sıvı Giemsa solüsyonunda hazırlanan boyama solüsyonu içinde yayma preparatlar 20 dakika boyandıktan sonra entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirilmiştir [251]. Her hücre tipinden üç preparat hazırlanmış, her preparattan 20 figür, normal kromozom sayısı ve poliploidi sayılarak iki hücre tipi karşılaştırılmıştır. Boyanan kromozomların fotoğrafları çekilmiştir.

4.5 Toplam Protein Analizi

4.5.1 Toplam protein ekstraksiyonu

Toplam protein ekstraksiyonu Sambrook [252] göre yapılmıştır. Hücrelerden soğuk bir ortamda besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Flask yüzeyine yapışık olarak bulunan hücreler soğuk PBS tamponu (137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 15 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4) ile yıkandıktan sonra üzerine lizis solüsyonu (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, % 0.02 sodyum azid, % 1 NP-40, 100 µg/ml fenilmetilsülfonilflorid (PMSF), 1µg/ml aprotonin) eklenip buz üzerinde, her 5 dakikada bir çalkalanarak toplam 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra lizise uğramış hücreler, hücre sıyrıcı ile flasklardan sıyrılarak dikkatli bir şekilde toplanarak mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve 13000 g' de +4°C'de 10 dakika santrifüj (Heraouse) edilmiştir. Süpernatant kısmı alınarak analiz için küçük volümlere ayrılarak -20°C'de saklanır. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak spektrofotometre (Schimadzu) ile tespit edilmiştir [252].

4.5.2 Jel elektroforezi (SDS PAGE)

Herbir örnekten alınan 60 µg protein, 10 µl 2X jel yükleme tamponu (% 4 SDS, %20 gliserol, 100 mM Tris-Cl (pH 6.8), 200mM DTT, % 0.2 Bromfenol blue) ile karıştırılmıştır. Protein ve jel yükleme tamponu karışımı 100°C'de 4-5 dakika kaynatılarak denatüre edilir. % 12'lik bir SDS poliakrilamid mini jelde yürütülür. Elektroforez, önce toplayıcı jel için 80 V sonra ayırıcı jel için 120 V elektrik akımı uygulanarak, Tris-Glisin elektroforez tamponu(0.25 M Tris, 1.92 M glisin) içinde gerçekleştirilmiştir. Moleküler ağırlık standardı aynı jelde, protein örneklerinin hazırlandığı gibi hazırlanarak ayrı bir sütunda yürütülür. Bromfenol blue boyası, jelin sonuna gelene kadar akım uygulanmıştır. Western blott için kullanılmayacak jeller ya da western blottan sonraki jeller, Coomassie brilliant blue boyası ile 2 saat boyanarak, daha sonra Destain tamponu (% 20 metanol, % 13.3 glasiyal asetik asit) ile yıkanarak % 7 glasiyal asetik asit içinde saklanmıştır ve bantları incelenmiştir [253].

4.5.3 Western blotting

Jel ile aynı ebatlarda nitrosellüloz (0,45 µm) filtreden bir parça kesilen nitrosellüloz filtre distile su ile hava kabarcıkları kalmayınca kadar ıslatılmıştır. Altı tane 3MM Whatman kağıdı transfer tampon (39mM glisin, 48mM Tris-base, %0.037 SDS, %20 metanol) içine alınmıştır. Elektrobloetterin alt ünitesine, transfer tampon ile ıslatılmış üç tane Whatman kağıdı yerleştirilmiştir. Bunun üstüne nitrosellüloz filtre aynı şekilde yerleştirilir. Daha önce hazırlanan jel distile su ile yıkanarak nitrosellüloz filtrenin üstüne yerleştirilmiştir. Üç Whatman kağıdı jelin üstüne yerleştirilerek ve üstüne blotterin üst ünitesi kapatılmıştır. Protein transferi için 0.65 mA/cm^2 elektrik akımı sağlandıktan sonra 1-2 saat bekletilmiştir. Proteinlerin transferinden emin olmak için bir gece boyunca kurutulan nitrosellüloz filtre, Ponceu S boyasında, 2-5 dakika bekletildikten sonra distile su ile bolca yıkanarak fotoğrafı çekilmiştir [253].

4.5.4 Antikor ile işaretleme

Kuru filtre, yıkama tamponunda (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), %0.02 Tween 20), 5-10 dakika ıslatıldıktan sonra bloklama tamponunda (%5 yağsız süt tozu) 1 saat hafifçe çalkalanarak bloklanır. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak filtrenin üstüne yıkama solüsyonuna birinci antikor eklenerek (ras, MDM2, p53 ve β -aktin için 1:500, p19 için 1:250) 2 saat hafifçe çalkalayarak inkübe edilmiştir. Filtre, dört defa 5'er dakika yıkandıktan sonra % 5 yağsız süt tozu içinde 10 dakika tekrar bloklanmıştır. Filtre, ikinci antikor (HRP) ile (anti-mouse için 1:1000, anti-goat için 1:3000) % 0.2 yağsız süt tozu içine eklenerek 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra filtre, altı defa 10' ar dakika Tween-20'li yıkama solüsyonunda ve iki defa 10' ar dakikalık Tween-20' siz yıkama tamponunda yıkanmıştır [253].

4.5.5 ECL ile belirleme

Karanlık odada, filtrenin solüsyonu iyice uzaklaştırılmıştır. Amersham yöntemine göre ECL A ve B solüsyonları karıştırıldıktan sonra filtrenin üstüne alınmıştır ve 1-2 dakika bekletilmiştir. ECL solüsyonları iyice uzaklaştırıldıktan sonra filtre kasetteki camın üstüne yerleştirilmiştir ve streç filmiyle sarıldıktan sonra üstüne X-ray filmi (Sigma Z37,037-1) konularak ve 3-1200 saniye bekletilmiştir. Süre dolduktan sonra X-ray filmi alınmış ve banyo edilmiştir.

4.5.6 Dot blotting

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

4.6 Hücrelerin May-grünwald: Giemsa ile Boyanması

Hücreler bulundukları besi ortamından uzaklaştırıldıktan sonra soğuk PBS ile üç kez yıkanmıştır. Soğuk metanolle 3 dakika fikse edildikten sonra hücrelerin üstüne May-grünwald boyası ilave edilmiş ve 3 dakika bekletilmiştir. Sonra boyanın yarısı alınarak geri kalan boya kısmına eşit miktarda distile su ilave edilmiş ve 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bir kez distile su ile yıkadıktan sonra hücrelerin üstüne Giemsa boyası eklenerek ve 3-5 dakika bekletildikten sonra distile su ile 3-4 defa yıkanmıştır [254].

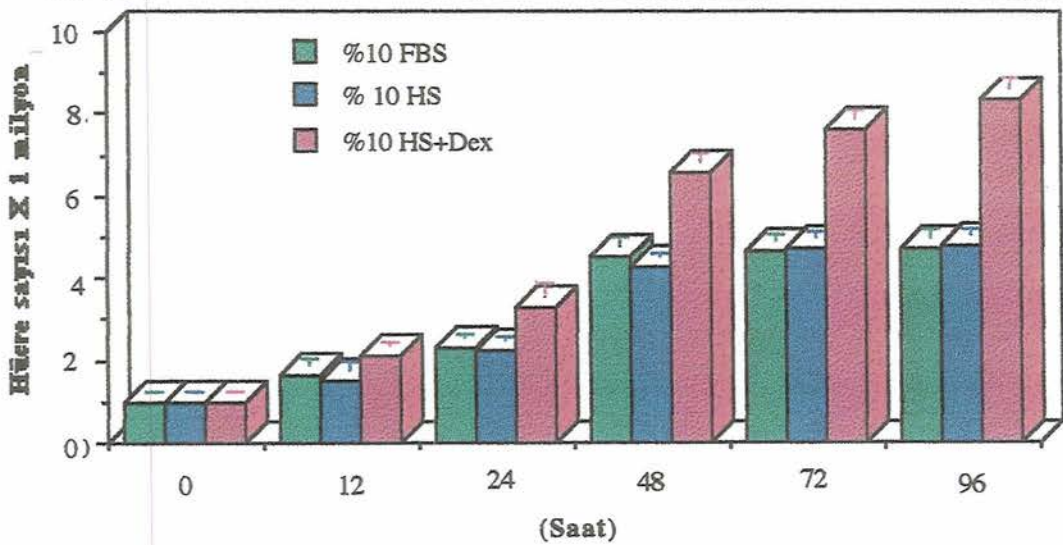
Boyanan hücre preparatları Olympus BX50 fotomikroskobu altında, değişik büyütme ölçeklerinde incelenerek Olympus PM-30 otomatik fotomikrografi aracı ile fotoğraflanmıştır.

5. BULGULAR

5.1 Hücrelerin Özellikleri

5.1.1. Hücre büyüme oranı

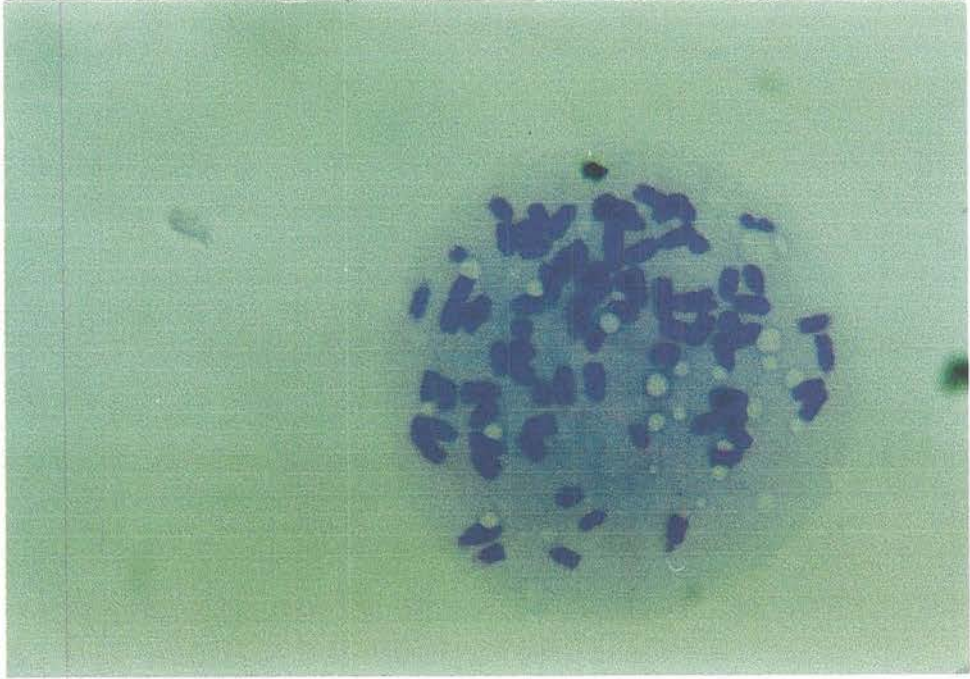
CO25 hücreleri normal büyüme ortamı olan % 10 fetal sığır serum (FBS), farklılaşma ortamı olan % 10 at serumu (HS) ve transformasyon ortamı olan %10+1 μ M deksametazon içeren at serumunda (HS+Dex.) 12, 24, 48, 72 ve 96 saat periyotlarla büyütüldükten sonra tripsinlenerek sayılmış ve büyüme eğrileri çıkartılmıştır (Şekil 5.1). Buna göre, normal büyüme besiyerinde, hücrelerin 48 saata kadar çoğalmaya devam ettikleri gözlenmiştir. 72 saatten itibaren flaskın yüzeyini tamamen kaplayarak kontakt inhibisyon etkisiyle çoğalmayı durdurmuşlardır. Farklılaşma ve transformasyon besiyerlerinde hücrelerin çoğalma oranları 24 saata kadar önemli bir farklılık göstermemiştir. Oysa 48. saatte transformasyon besiyerinde büyütülen hücreler sürekli artış göstermiştir ve bu artış 96. saat sonuna kadar devam etmiştir. Bunun aksine farklılaşma besiyerinde ise hücreler, 48 saata kadar artış gösterdikten sonra 72. ve 96. saatlerde hücre sayısı aynı kalmıştır.



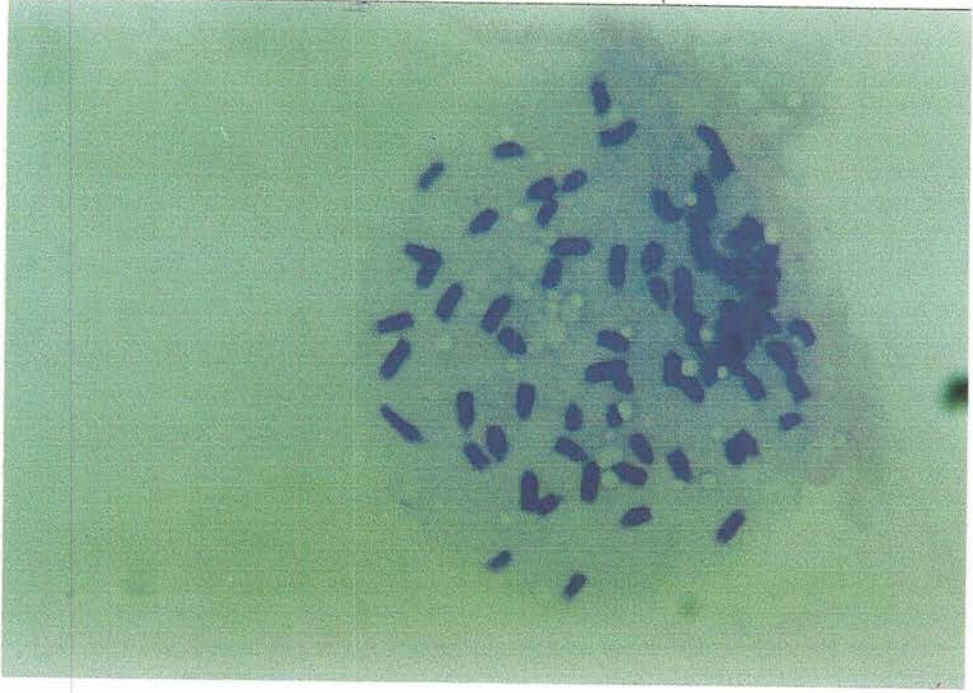
Şekil 5.1. Normal, farklılaşma ve 1 μ M Dex. içeren transformasyon besiyerlerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin büyüme oranları. Her sütündeki değerler, her birinden 3 ayrı flask olmak üzere iki ayrı deneyin sonuçlarından elde edilmiştir

5.1.2. Kromozom sayısı

CO25 miyoblast hücreleri, fare bacak kas dokusundan elde edilmiş olan C2 hücrelerinden türetilmiş bir hücre hattıdır (ayrıntılı bilgi 1.4 te verilmiştir). Bu çalışmada kullanılan CO25 hücreleri elde edildiklerinden bu güne kadar bir çok kereler pasaj edildikleri için kromozom sayılarında meydana gelebilecek olası anomalileri ortaya koymak için her iki hücre hattı May-Grünwald-Gimsa ile boyanarak metafaz preparatları hazırlanmıştır. Her hücre hattından Materyal ve Metod bölümünde anlatıldığı gibi iki flask normal büyüme besiyerinde (% 10 FBS) büyütülmüştür. Her flasktan 3' er preparat hazırlanarak her preparattan 20 kromozom figürü sayılmıştır. Bu inceleme sonucunda CO25 ve C2 hücreleri 40 kromozom [255] sayısı bakımından her hangi bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 5.2, 5.3).



Şekil 5.2. % 10 FBS içeren normal besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin Materyal ve Metotda anlatılan Giemsa boyama ile elde edilen metafaz kromozom görüntüsü. Büyütme: 1cm= 10 μ



Şekil 5.3. % 10 FBS içeren normal besiyerinde büyütülen C2 miyoblast hücrelerinin büyütüldükten sonra Materyal ve Metotda anlatıldığı gibi hazırlanan ve Giemsa ile boyanan kromozom görüntüsü. Büyütme: 1cm= 10 μ

5.1.3. Morfolojik özellikler

Normal (%10 FBS), farklılaşma (%10 HS) ve transformasyon (%10 HS+Dex.) besiyerlerinde büyütülen CO25 hücreler May-Grünwald-Giemsa ile boyanarak ışık mikroskobu altında morfolojik özellikleri açısından incelenmiştir.

%10 FBS içeren besiyerinde 4 gün süreyle büyütülen hücrelerinin tümünün uzun-iğsi biçiminde ve tek katlı bir tabaka oluşturdukları gözlenmiştir. CO25 miyoblast hücreleri çekirdek özelliği bakımından incelendiğinde hepsinin tek çekirdekli olduğu saptanmıştır. Hücrelerin % 20' sinin yuvarlak çekirdeğe, % 80' inin ise oval çekirdeğe sahip olduğu gözlenmiştir. Hücre çekirdeklerinin,

hücresinin merkezine yerleşmiş biçimde olduğu görülmüştür. CO25 miyoblast hücrelerinin çekirdeklerinde bulunan kromatin taneciklerinin çoğunlukla homojen olduğu ve çekirdekçiğin belirgin olmadığı tespit edilmiştir. May-Grünwald-Gimsa boyama tekniği uygulanan hücre çekirdeklerinin açık pembe, çekirdek içindeki kromatin taneciklerinin ise siyah renkte boyandığı görülmüştür.

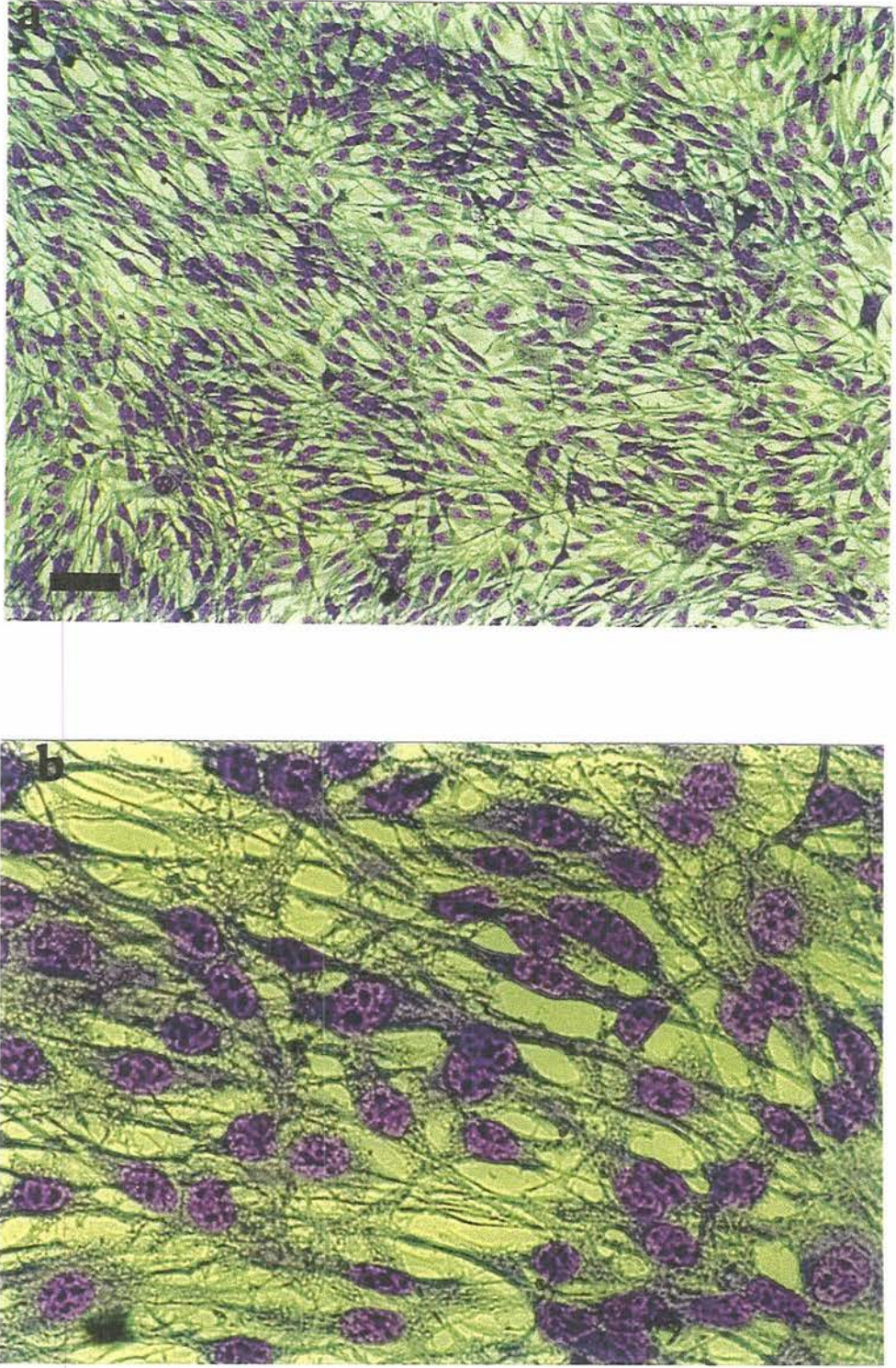
CO25 miyoblast hücrelerinin uzantıları bakımından incelendiklerinde, hücre uzantılarının karşılıklı 2 kutupta olduğu belirlenmiştir. Hücrelerinin bazılarında karşılıklı 2 kutuptaki uzantıların dallanma gösterdiği saptanmıştır. Bazı hücre uzantılarının diğer hücrelerin üzerinden geçtiği ve çok uzun olduğu tespit edilmiştir. May-Grünwald-Gimsa boyama yöntemi uygulanan CO25 miyoblast hücrelerinin sitoplazmalarının çekirdek çevresinde koyu renkte ve yoğun, perifere doğru daha açık renkte ve daha az yoğun olduğu gözlenmiştir. (Şekil 5.4 a ve b).

% 10 HS içeren farklılaşma besiyerinde 4 gün büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin tek tabaka düzen gösterdikleri yaygın olarak iğsi şekilli oldukları ve merkezi konumda çoğunlukla yuvarlak ve iri bir çekirdeğe sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 5.5 a, b). Aynı hücrelerin boyuna çizgilenme gösteren dallı ve kalın miyotüp oluşumları meydana getirdikleri saptanmıştır. Miyotüp içindeki çekirdekler belirli bir düzende değildir, rastgele miyotüp içine yerleşmişlerdir (Şekil 5.6 a). Miyotüp içindeki hücrelerin, hücre sınırlarının kaybolduğu ve sadece çekirdeklerinin belirgin olduğu tespit edilmiştir. Miyotüp dışındaki hücrelerin uzantılarının diğer hücrelerle birleşmiş olduğu görülmüştür. May-Grünwald-Gimsa boyama tekniği ile boyanan CO25 miyoblast çekirdeklerin % 10' luk bir bölümünün iğsi biçimde olduğu tespit edilmiştir. Çekirdeklerin sahip olduğu kromatin taneciklerinin sayısında bir azalma olduğu kromatin taneciklerinin çoğunluğunun çekirdeğin merkezinde yer aldığı ve renklerinin siyah olduğu saptanmıştır (Şekil 5.5 a, b ve 5.6 a). Miyotüp dışındaki hücre çekirdeklerinin, hücrelerin merkezinde yer aldıkları, yuvarlak ve iğsi şekilli oldukları gözlenmiştir. Miyotüp dışındaki bazı hücrelerin çekirdekleri, diğerlerine göre daha küçük ve daha koyu renkte boyanmıştır. Bu hücrelerin çekirdeklerinin, miyotüp içindeki çekirdeklere göre daha fazla sayıda ve homojen dağılımlı daha küçük kromatin taneciklerine sahip olduğu gözlenmiştir. Miyotüplerin bazı

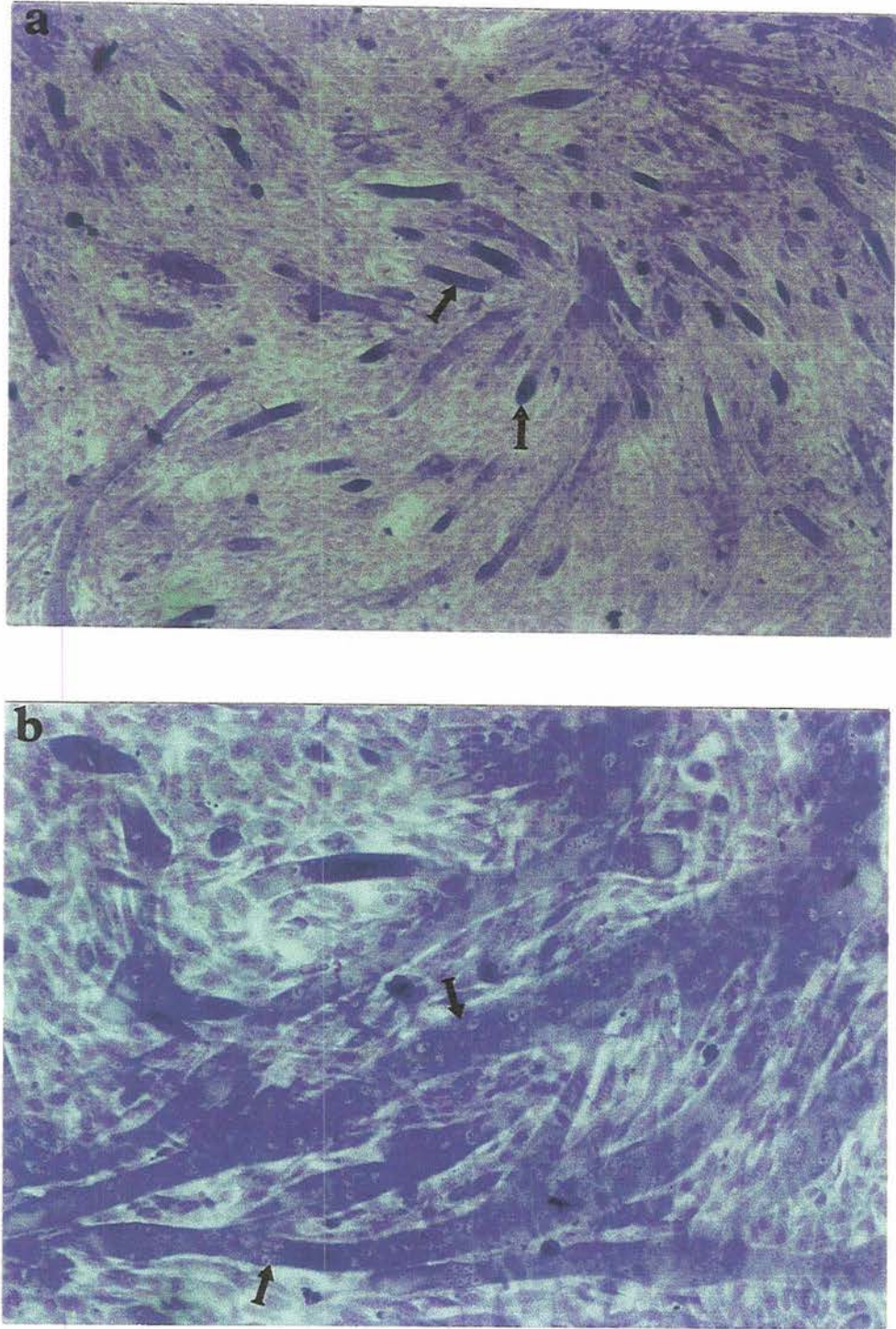
bölümlerinin daha koyu renkte, bazı bölümlerinin ise daha açık renkte boyandığı görülmüştür. May-Grünwald-Gimsa boyama tekniği kullanılarak boyanan hücrelerin, miyotüp içinde yer alanlarının hücre sınırlarının kaybolduğu sadece çekirdeklerinin belirgin olduğu ve sitoplazmalarının kaynaşmış olduğu gözlenmiştir. Miyotüp dışında yer alan hücrelerin sitoplazmalarının çekirdeklerine göre çok açık renkte boyandığı gözlenmiştir. Miyotüp oluşumlarının tek bir noktadan başladığı ve daha sonra kollara ayrıldığı, bu kolların birbirleriyle kavis oluşturarak birleştikleri tespit edilmiştir (5.6 b).

% 10 HS+1 μ M Dex. içeren transformasyon besiyerinde 4 gün büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin çoğunluğunun uzun-ışsi görünümde olduğu, çok küçük bir bölümü ise poligonal bir şekle sahip olduğu tespit edilmiştir. 4. günde hücreler bir araya gelerek çok tabakalı bir koloni oluşturmuşlardır.

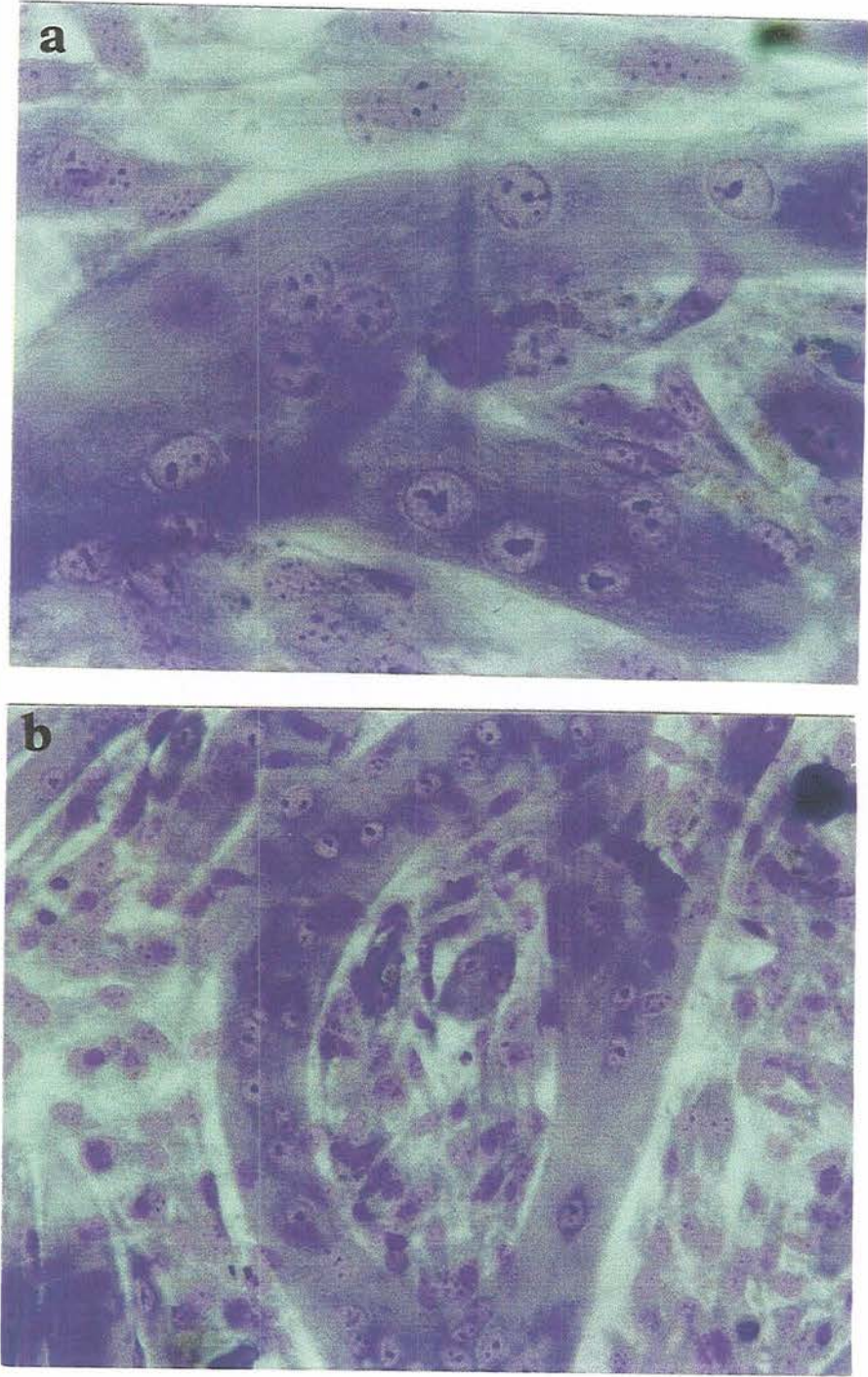
Çekirdeklerin sitoplazmaya göre daha koyu renkte boyandıkları ve hücrelerin çoğunluğunun tek bir çekirdeğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerin çekirdeklerinin yuvarlak olduğu, bu koloniden çevreye ışınsal şekilde yayılan tek tabakalı hücrelerin çekirdeklerinin ise oval olduğu saptanmıştır. Koloniyi oluşturan hücrelerin çekirdeklerinde kromatin tanecikleri ayırt edilmezken koloninin etrafındaki hücrelerin çekirdeklerinde homojen dağılmış kromatin tanecikleri gözlenmiştir. Çekirdeklerin hücrenin merkezinde bulunduğu saptanmıştır. Koloninin etrafındaki hücrelerin bazılarının karşılıklı iki kutupta dallanmalar gösteren uzantılara sahip oldukları görülmüştür. Poligonal şekle sahip hücrelerin hemen her yönde uzantılara sahip olduğu tespit edilmiştir. Koloni çevresindeki hücrelerin uzantılarının, ağısı bir görünüm gösterdiği saptanmıştır. Koloniyi oluşturan hücrelerin sitoplazmaları ayırt edilmezken, koloninin çevresinde bulunan hücrelerin sitoplazmaları çekirdek etrafında daha koyu ve daha yoğun buna karşılık hücre kenarlarına doğru daha açık ve az yoğunlukta gözlenmiştir (Şekil 5.7 a ve b).



Şekil 5.4. % 10 FBS içeren normal besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin 4. günde May-Grünwald Gimsa ile boyanarak ışık mikroskopunda farklı büyütme ölçeklerinde görüntülenmiştir. Büyütme a) 1cm= 85 μ b) 1cm= 20 μ



Şekil 5.5. % 10 HS içeren farklılaşma besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin 4. günde oluşturdukları çok çekirdekli miyotüplerin görüntüleri. Hücreler Materyal ve Metotde belirtildiği gibi May-Grünwald Gimsa ile boyanarak ışık mikroskopunda farklı büyütme ölçeklerinde görüntülenmiştir. Büyütme a) 1cm= 214 μ b) 1cm= 85 μ



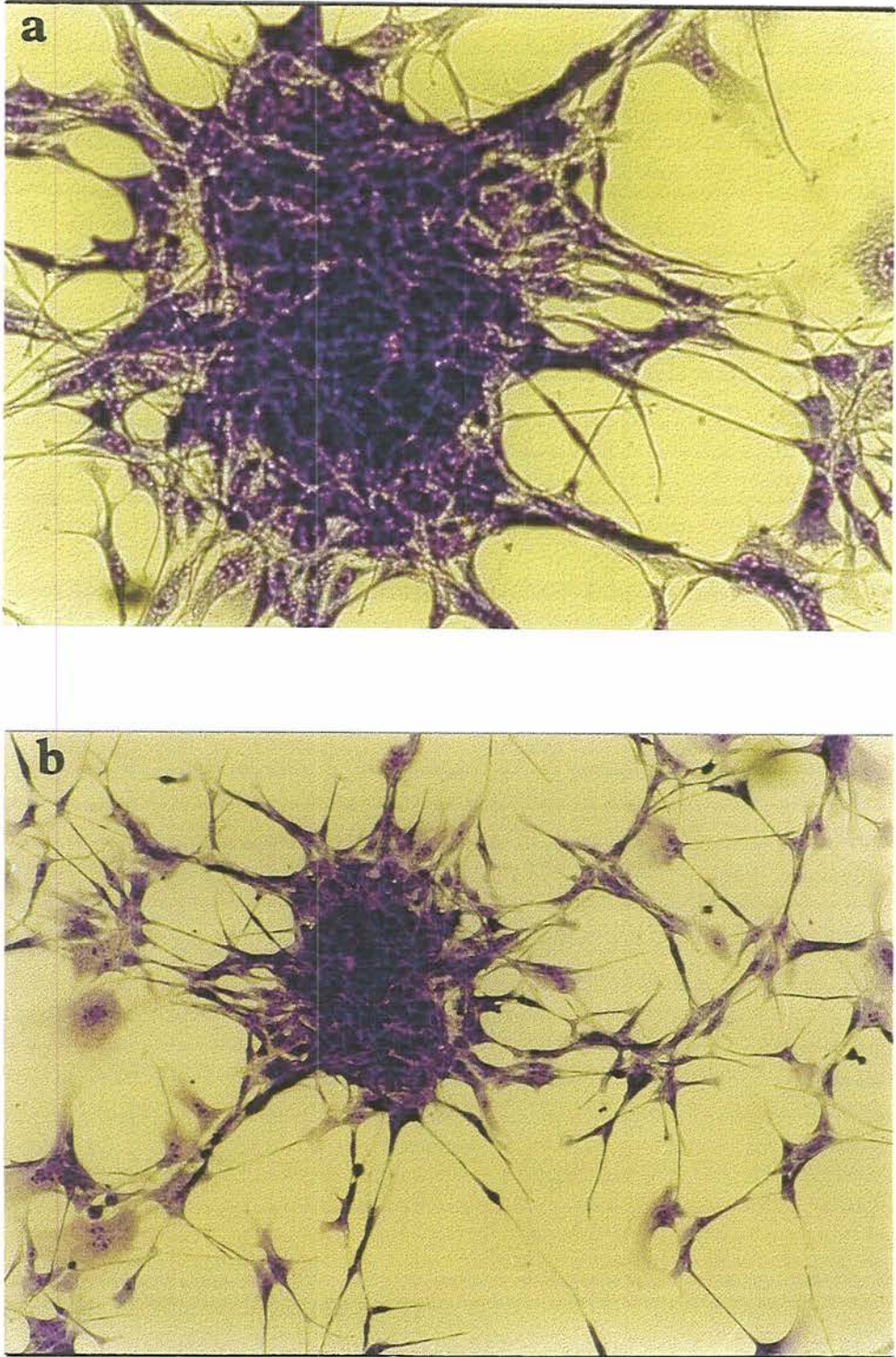
Şekil 5.6. % 10 HS içeren farklılaşma besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin 4. günde oluşturdukları farklı miyotüp şekillerinden görüntüler.

A) Çatallanmış miyotüp

B) Kavis oluşturan miyotüp

Hücreler Materyal ve Metotde belirtildiği gibi May-Grünwald Gimsa ile boyanarak ışık mikroskopunda farklı büyütmelerde görüntülenmiştir. Büyütme a) 1cm= 20 μ

b) 1cm= 43 μ



Şekil 5.7. % 10 HS + 1 μ M Dex. içeren tranforme besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin 4. günde oluşturdukları koloni görüntüleri. Hücreler Materyal ve Metotde belirtildiği gibi May-Grünwald Gimsa ile boyanarak ışık mikroskopunda farklı büyütmelerde görüntülenmiştir. Büyütme a) 1cm= 20 μ b) 1cm= 85 μ

5.7. Çok Çekirdekli Hücre Sayımı

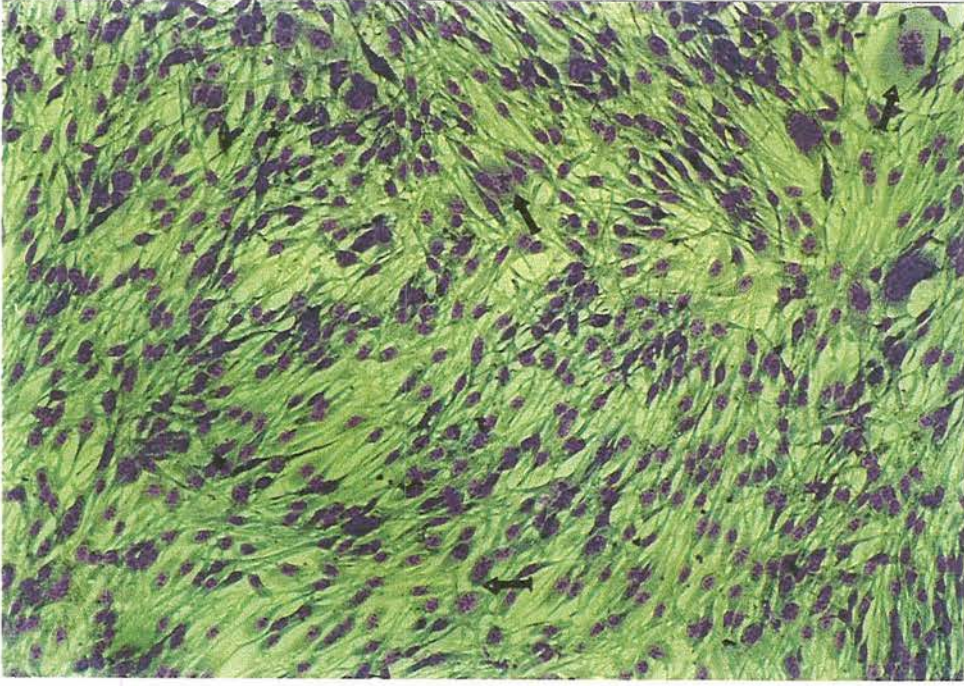
Uzun süre pasajlanmış olan CO25 hücreleri çok çekirdekli dev hücreler bakımından farklı besiyerlerinde büyütüldükten sonra incelenmiştir. Normal büyüme, Dex.'li ve Dex.'siz besiyerinde büyütülen hücreler, her ortamdan 3 flask hazırlanmış ve her flasktan 100000 hücre içinde May-Grünwald Giemsa boyası ile boyadıktan sonra çok çekirdekli konumundaki hücreler sayılmıştır (Şekil 5.9). Bu sayımın sonucu çizelge 1' de verilmiştir. % 10 HS + 1 μ M Dex. içeren transformasyon besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin bazılarında farklı sürelerden birden fazla çekirdeğe sahip oldukları ve bu çekirdeklerin birlikte hücrenin merkezinde yer aldıkları tespit edilmiştir. Bu hücrelerdeki oval biçimli çekirdekler içinde kromatin tanecikleri homojen bir şekilde dağıldıkları ve kromatin taneciklerinin sayısında bir artış olduğu saptanmıştır. Çok çekirdekli hücrelerin sitoplazmalarının rengi, çekirdeğin etrafından hücre kenarlarına doğru gittikçe açıldığı gözlenmiştir. Çok çekirdekli hücrelerinin şekillerinin poligonal olduğu görülmüştür. Poligonal şekilli, çok çekirdekli hücrelerin uzantılarının her yönde olduğu belirlenmiştir. İstatistik değerleri student-T testi ile hesaplanmıştır. Buna göre transformasyon besiyerindeki çok çekirdekli dev hücrelerin ($p > 0.05$) sayısı diğer iki ortamdaki hücelere göre anlamlı olarak fazla sayıda bulunmuştur.

Çizelge 5.1. Değişik ortamlarda büyütülen CO25 hücrelerinin çok çekirdekli olması yönünden karşılaştırmalı tablosu

Saat	Hücre sayısı/ Flask	CO25 hücrelerinin büyütüldüğü ortam		
		% 10 FBS	%10 HS	%10 HS+Dex.
12	100000	1	1	5
24	100000	1	2	7
48	100000	3	4	11
72	100000	5	5	16
96	100000	6	5(*)	19

$P > 0.05$

* 4. Günden itibaren başlayan ve 5. günde devam eden miyotüp oluşumu, sağlıklı çok çekirdekli hücre sayımını engellenmiştir.



Şekil 5.8. CO25 miyoblast hücrelerinin değişik günlerde çok çekirdekli görüntüleri. Hücreler Materyal ve Metotde belirtildiği gibi May-Grünwald Gimsa ile boyanarak ışık mikroskopunda görüntülenmiştir. Büyütme: 1cm= 85 μ

5.8. p21^{N-ras} Protein Sentezi

CO25 miyoblast hücrelerinin, %10 HS+Dex. içeren besiyerinde büyütüldüklerinde N-ras geni indüklenerek aktif hale geçmekte ve hücreler transformasyon özelliklerini göstermektedir. İşte bu ayırt edici özelliğin moleküller düzeyde tespit edilebilmesi için, Materyal ve Metod bölümünde anlatıldığı gibi büyütülen hücrelerin p21^{N-ras} seviyesi araştırılmıştır. Dex. etkisiyle indüklenen p21^{N-ras} proteinin seviyesi zaman geçtikçe artmıştır ve p21^{N-ras} proteini, hücre içerisinde birikmeye başlamıştır (Şekil.5.9). β -aktin seviyesi tüm periyotlarda birbirine yakın sinyal verdiği gözlenmiştir.

5.9. p53 Protein Sentezi

Aynı koşullarda p53 ile ilgili yapılan deneydeki bulgular, HS+Dex. besiyerindeki 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde p53' ten elde edilen sinyalin β -aktinden elde edilen sinyalden daha fazla olduğu ve tüm periyotlarda sabit kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.10).

% 10 FBS normal besiyerinde 48 saatlik periyot sonunda hücrelerin lizis edilmesiyle elde edilen total protein Western Blot yöntemiyle değerlendirildiğinde p53 proteininden sinyal alınmadığı tespit edilmiş, aynı süredeki kontrol amacıyla yapılan β -aktinden sinyal alınmıştır.

% 10 HS besiyerinde 12-96 saatlerde büyütülen hücrelerden elde edilen toplam proteinin yine aynı yöntemle p53 seviyeleri tespit edilmiş olup, 12. saatteki gözlenen p53 seviyesi β -aktinden daha düşük olduğu bulunmuştur. 72 saatte olmak üzere β -aktin ve p53 seviyeleri aynı olduğu, 96. saatte ise p53 seviyesinde bir azalma olduğu gözlenmiştir. Fakat β -aktin seviyesinde azalma olmadığı tespit edilmiştir (şekil 5.10).

β -aktin seviyesindeki farklı yoğunluktaki sinyaller jele yüklenen protein miktarı ile paralel gittiği görülmüştür.

5.10. Mdm2 Protein Sentezi

CO25 miyoblast hücrelerinin % 10 HS farklılaşma ortamında büyütüldükten sonra incelenen β -aktin ve mdm2 proteinleri ise, 12. saatte mdm2' den hiç sinyal alınamamış β -aktin ise belirgin bir şekilde olduğu gözlenmiştir. 24. saatte mdm2' de belirgin bir artış gözlenmiş β -aktin ise aynı seviyede kalmıştır. 48. saatin sonunda mdm2 deki artışın devam ettiği, β -aktin seviyesinde ise hiçbir değişiklik olmadığı görülmüştür. 72. saatte mdm2' nin artışı devam etmekte ancak β -aktin seviyesinin diğer periyotlardakine göre azalma gösterdiği tespit edilmiştir. 96. Saatin sonunda mdm2' de belirgin bir düşüş gözlenmiş, β -aktinin ise 72.

saatte gözlenen β -aktin seviyesiyle aynı olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak mdm2' nin seviyesinde artış vardır.

Transformasyon besiyerinde (% 10 HS+Dex.) büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden elde edilen total protein Western Blot yöntemiyle değerlendirildiğinde 12. saat sonunda mdm2' de hiçbir sinyal belirtisi gözlemlenmiştir. Aynı saatteki β -aktin ise çok bir şekil sinyal vermiştir. 24. saatte mdm2' den sinyal alınmış ve β -aktinden alınan sinyal daha düşük olduğu tespit edilmiştir. 48. saatte mdm2' deki sinyal daha belirgin ve β -aktin seviyesine yaklaştığı gözlenmiştir. 72. saatte β -aktin seviyesi sabit olduğu halde mdm2' de düşüş kayıt edilmiştir. Bu düşüş 96. saat sonuna kadar devam ettiği görülmüştür (Şekil 5.11).

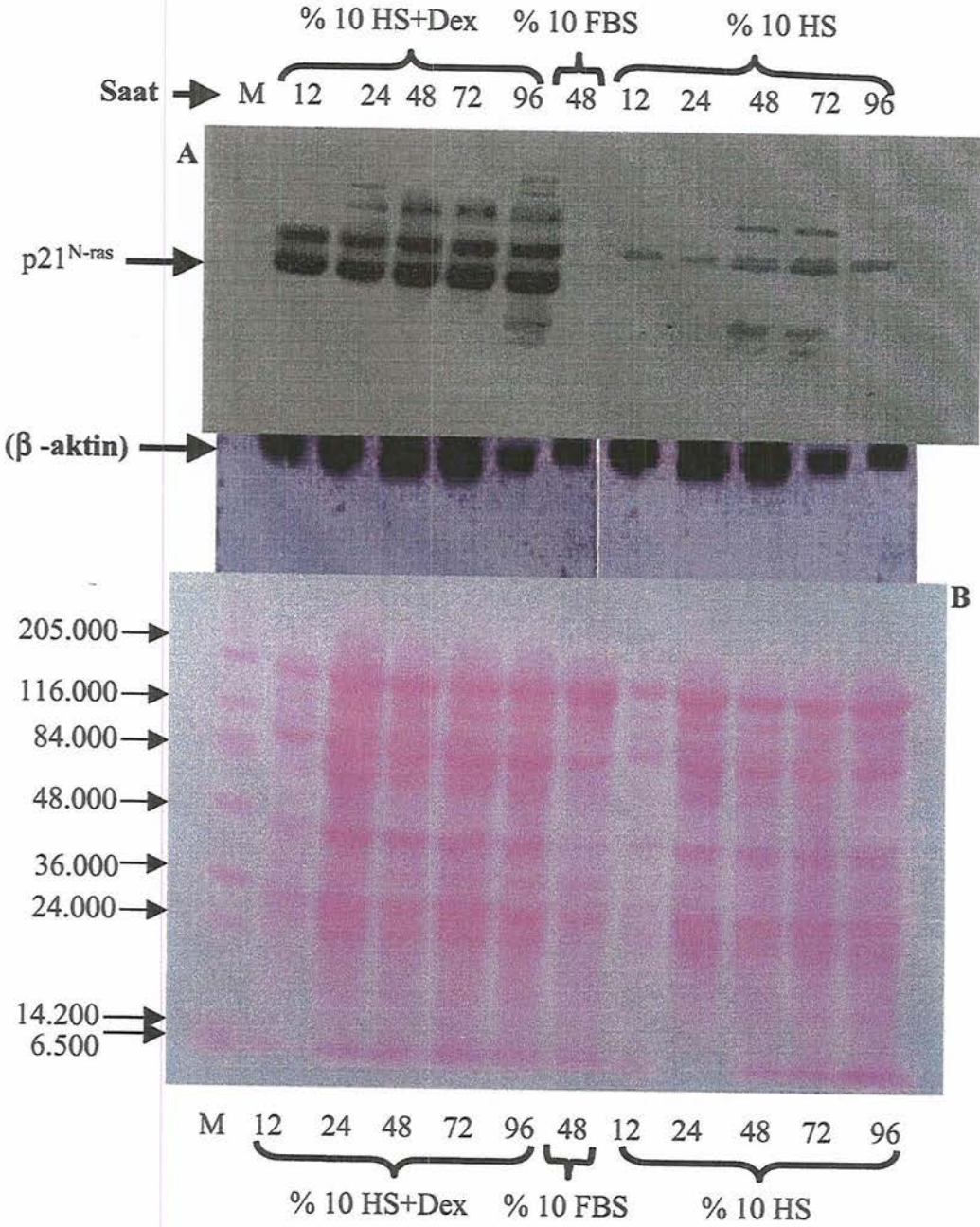
%10 FBS besiyerinde büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin mdm2 proteinin incelendiğinde, 48. Saatten β -aktin den kuvvetli bir sinyal alınmasına rağmen mdm2' den hiç sinyal alınmamıştır (Şekil 5.11).

5.11. p19 Protein Sentezi

Farklılaşma (% 10 HS), transformasyon (% 10 HS+Dex.) ve normal (% 10 FBS) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinde p19 ve β -aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle değerlendirildiğinde 12-96 saat periyodunda her üç besiyerinde p19 ve β -aktine karşılaştırıldığında hiçbir bulgu görülmemiştir (Şekil 5.12)

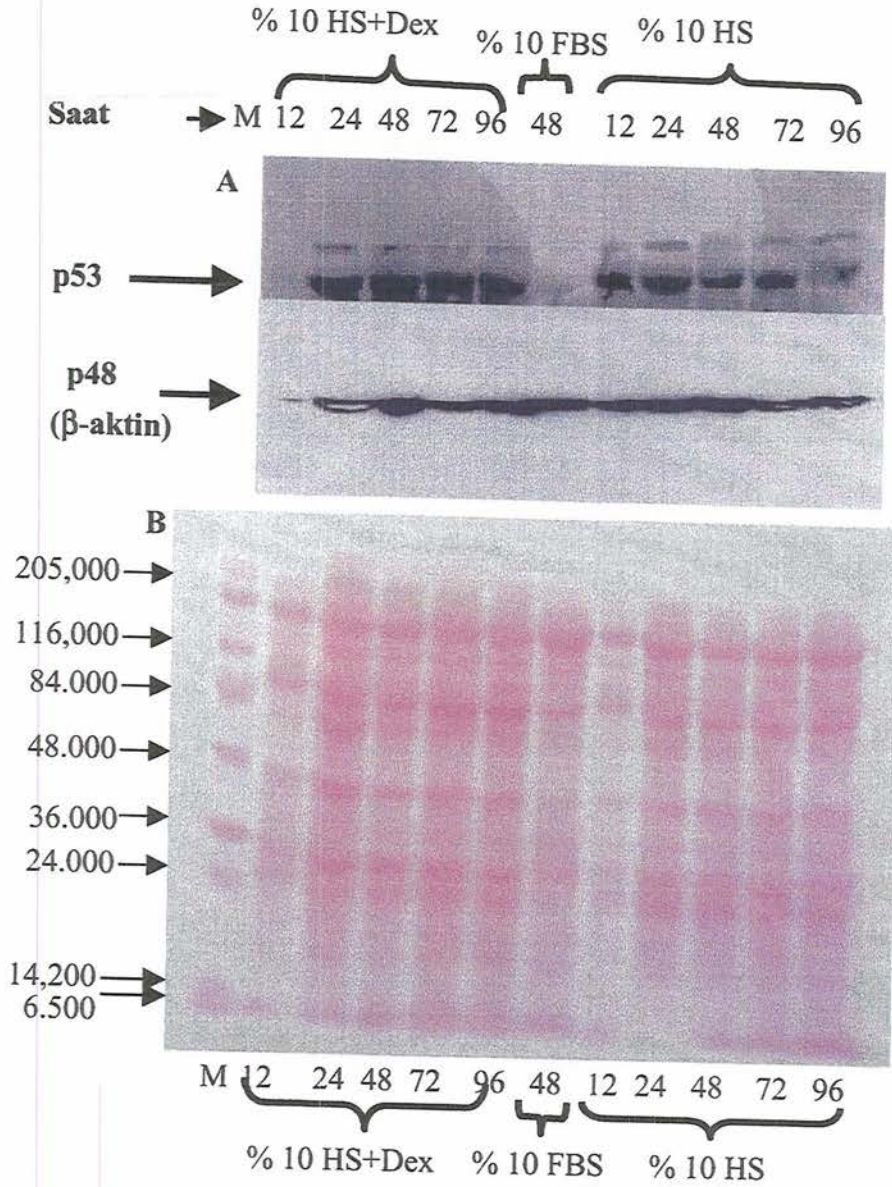
p19 antikorundan hiç sinyal alınmaması kullanılan p19 antikorunda bir sorun olabileceği düşüncesini ortadan kaldırmak amacıyla p19' un aktivitesi Dot Blot yöntemiyle kontrol edilmiştir (Şekil 5.13).

%10'luk FBS ve % 10 HS+Dex'li besiyerinde büyütülen hücrelerden elde edilen total proteinlerin western blot yöntemiyle p53 ve mdm2 proteinlerine bakılmış ve her iki proteinden de sinyal alınamamıştır. Dex'li olan ise kontrol amacıyla kullanılan 96 saatlikten belirgin bir sinyal alınmıştır. Söz konusu her iki ortam için β -aktin yapılmıştır ve tüm periyotlardan sinyal alınmıştır (Şekil 5.14).



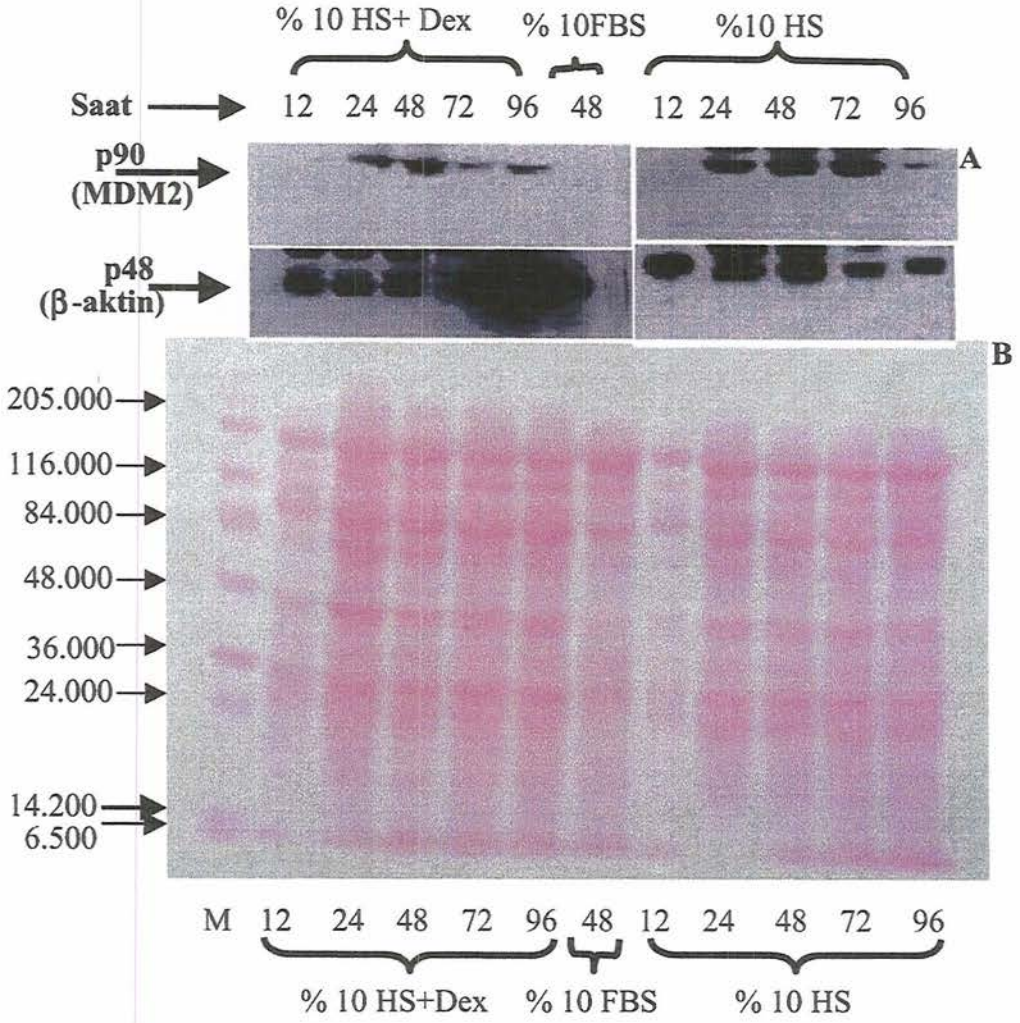
Şekil 5.9. A) Farklılaşma (% 10 HS), transformasyon (% 10 HS+Dex.) ve normal (% 10 FBS) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinden p21^{N-ras} ve β-aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi

B) Kontrol amacıyla jel' den transferden hemen sonra toplam proteinin nitrosellüloz filtre üzerinde Ponceu S ile boyanmış görüntüsü



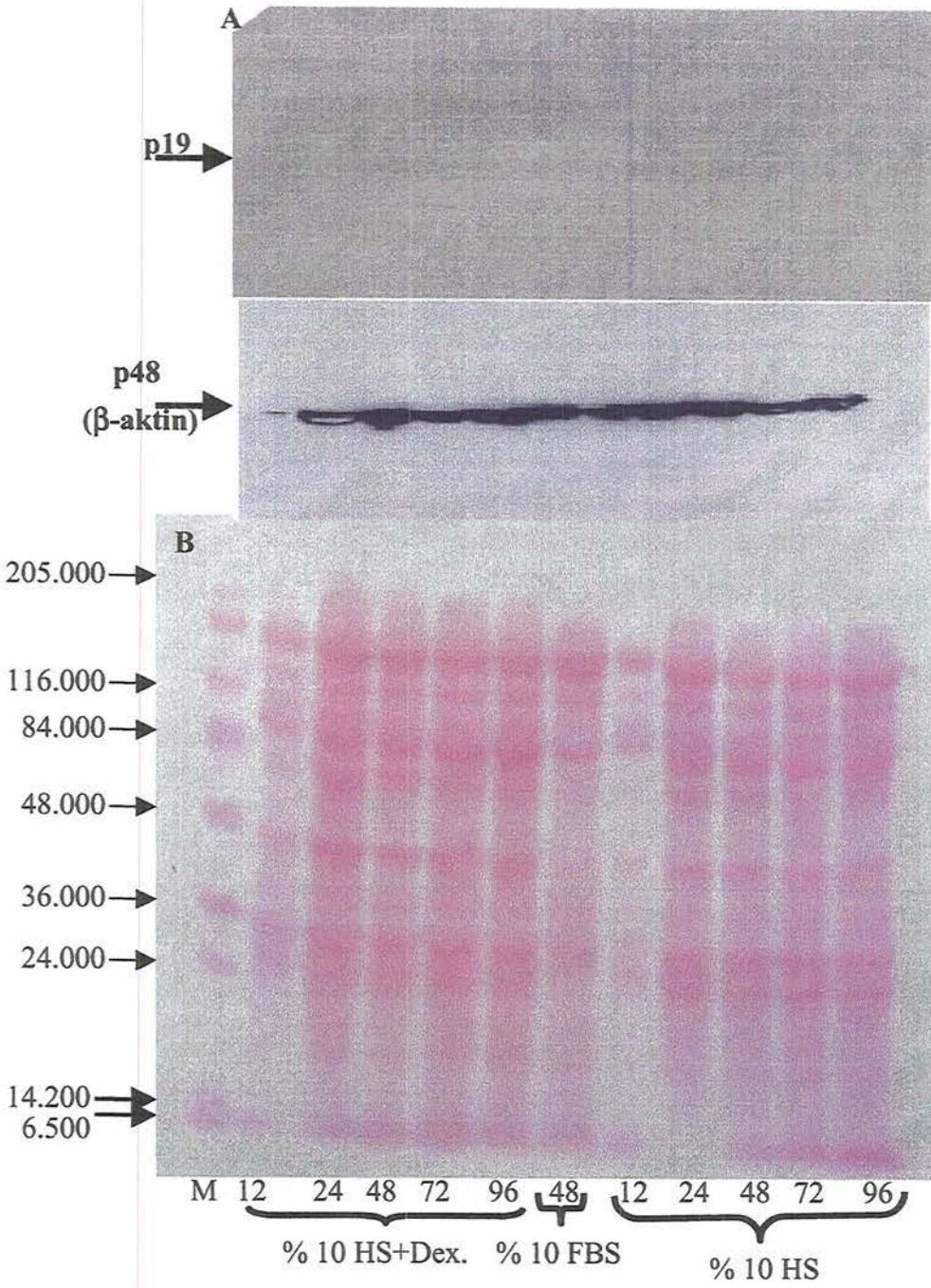
Şekil 5.10. A) Farklılaşma (% 10 HS), transformasyon (% 10 HS+Dex.) ve normal (% 10 FBS) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinden p53 ve β-aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi

B) Kontrol amacıyla jel' den transferden hemen sonra toplam proteinin nitrosellüloz filtre üzerinde Ponceu S ile boyanmış görüntüsü



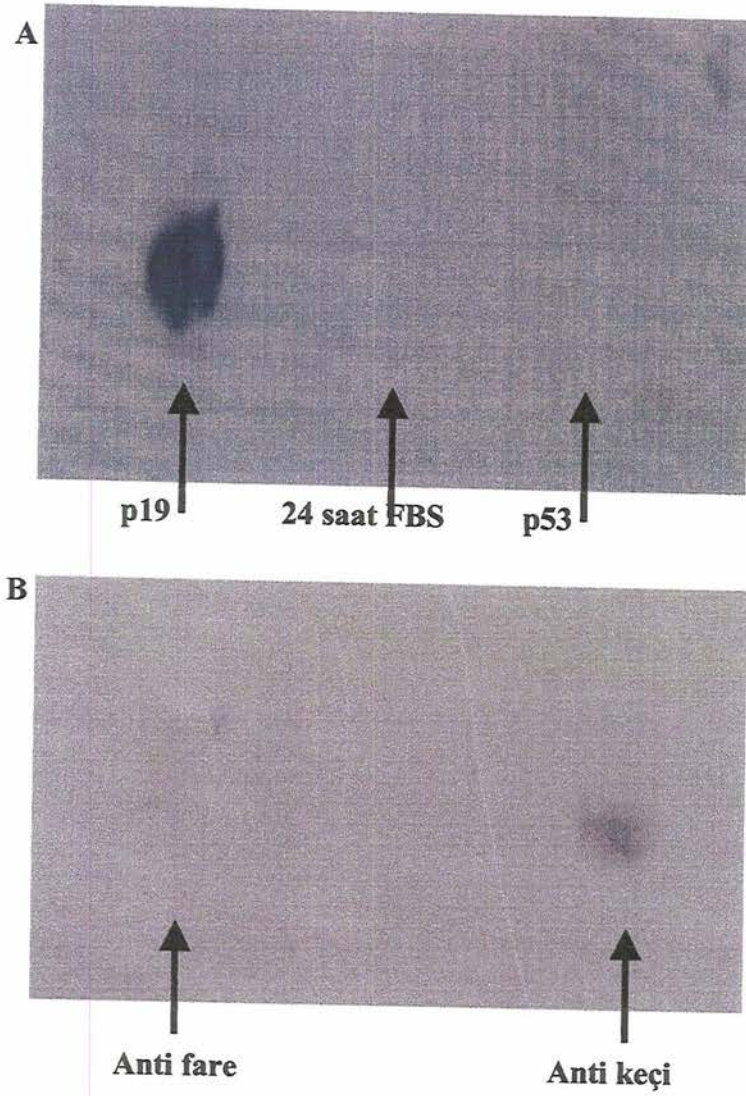
Şekil 5.11. A) Farklılaşma (% 10 HS), transformasyon (% 10 HS+Dex.) ve normal (% 10 FBS) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinden mdm2 ve β -aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi

B) Kontrol amacıyla jel' den transferden hemen sonra toplam proteinin nitrosellüloz filtre üzerinde Ponceu S ile boyanmış görüntüsü



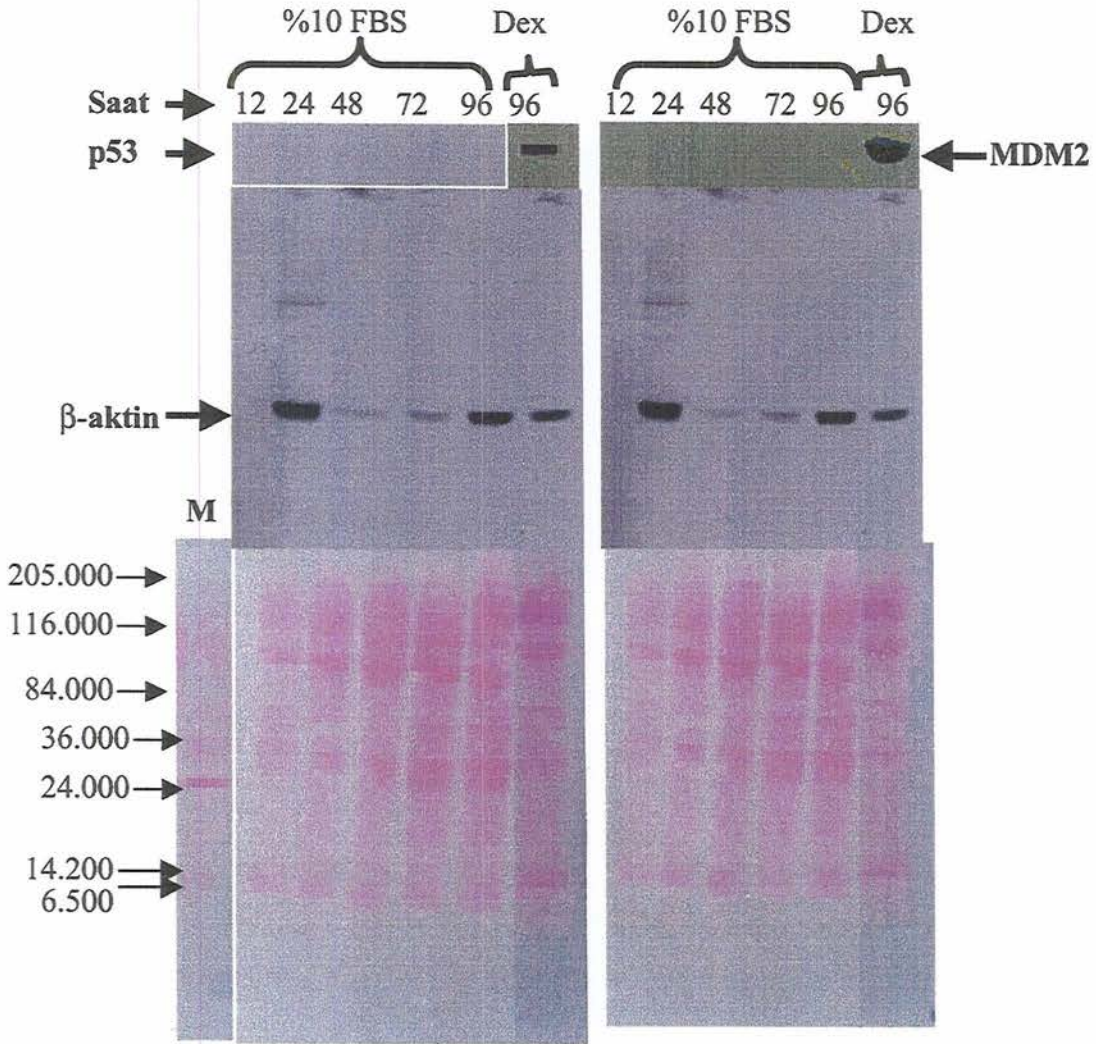
Şekil 5.12. A) Farkılaşma (% 10 HS), transformasyon (% 10 HS+Dex.) ve normal (% 10 FBS) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinden p19 ve β -aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi

B) Kontrol amacıyla jel' den transferden hemen sonra toplam proteinin nitrosellüloz filtre üzerinde Ponceu S ile boyanmış görüntüsü



Şekil 5.13. A) Kontrol amacıyla p19 antikorunun Dot Blot yöntemiyle çalıştığının gösterilmesi.

B) Çalışmamızda kullanılan anti-fare ve anti-keçi antikorların verdikleri özgül olmayan bağlantıları aranmıştır



Şekil 5.14. A) Normal (% 10 FBS) ve transformasyon (% 10 HS+Dex.) besiyerlerinde belirli periyotlarla büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinden izole edilen total proteinden mdm2 ve p53 ve β-aktin seviyelerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi
B) Kontrol amacıyla jel' den transferden hemen sonra toplam proteinin nitrosellüloz filtre üzerinde Ponceu S ile boyanmış görüntüsü

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hayvan hücre kültürleri, hücre farklılaşma olaylarının incelenmesi, onkojenik maddelerin ve onkojenlerin etkilerinin analizleri, hücre hareketleri olaylarının incelenmesinde büyük önem taşımaktadır.

Bizim çalışmamızda kullandığımız bir steroid olan deksametazona hassas mutant insan *N-ras* onkogeni taşıyan plazmid ile transfekte edilen CO25 fare miyoblast hücreleri, mutant insan *N-ras* onkogeni taşımakta olup, bu genin bir steroid hormon olan deksametazon ile aktif edilmesi sonucu mitojenler bakımından yoksun olan %10 at serumu içeren besi ortamında normalinde farklılaşma yerine transformasyona uğramaktadır. Bu sisteme dayanarak CO25 hücreleri farklılaşma ve *N-ras* onkogenin neden olduğu transformasyon aşamalarında çeşitli parametreler açısından daha önce yapılan bazı çalışmalarla araştırılmıştır [10, 76-79]. Uygun şartlar sağlandığında bir canlıdan alınarak kültürde üretilen hücrelerin belirli jenerasyonlarda karakteristik özelliklerini koruduğu, geliştiği, bölündüğü ve farklılaştığı saptanmıştır.

Bu çalışmada ise hücre kültürü yöntemi ile farklı besi ortamlarında büyütülen CO25 hücrelerinin özellikle morfolojik özellikleri, büyüme eğrileri, kromozom sayıları, sitoplazma içerikleri incelenerek karşılaştırılmıştır. Daha sonra ise Western Blot yöntemiyle p53, mdm2, *N-ras*, p19 ve β -aktin gibi proteinlerin seviyeleri araştırılmış ve *N-ras* aktivitesinin söz konusu özellikleri ve proteinler üzerine etkisi hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

Bu amaçla 12, 24, 48, 72 ve 96' şar saat büyüme sürelerinde % 10 HS (at serumu) farklılaşma ortamı, % 10 HS+Dex. transformasyon ortamı ve % 10 FBS normal büyüme ortamında kültürü yapılan CO25 miyoblast hücreleri incelenmiştir.

6.1. Büyüme Oranı

CO25 miyoblast hücreleri 1×10^6 olarak 25 cm² flaska ekildikleri 3 farklı besiyerinde 4 gün boyunca inkübe edildikten sonra tripsinlenerek thoma lamı yöntemiyle sayılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre normal besiyerinde (% 10

FBS) büyütülen hücrelerin sayısının kontakt inhibisyona bağlı olarak giderek azaldığı saptanmıştır. Büyütülen hücrelerin, bu hücre sayısına 48 saatte ulaştıkları ve flaskın yüzeyini tamamen kapladıkları tespit edilmiştir. 48 saatten sonra hücre sayısının artmadığı gözlenmiştir. CO25 hücrelerinin normal besiyerinde (% 10 FBS) büyütüldüğünde belli bir süre sonra kontakt inhibisyon etkisiyle çoğalmalarını durdurdukları daha önce de bildirilmiştir [1]. Zeytinoğlu [67] ve Gosset [10] tarafından yapılan çalışmalarda bizim çalışmamızdan farklı olarak hücrelerin kontakt inhibisyona 72 saatte ulaştıkları görülmüştür. Zeytinoğlu [67] ve Gosset [10]'ın çalışmalarında hücre sayısı yaklaşık olarak 5×10^6 'a ulaştığında kontakt inhibisyonun etkisinin başladığı görülmüştür. Benzer sonuçlar bizim çalışmamızda da elde edilmiştir. Karşılaştırılan çalışmalar arasındaki kontakt inhibisyona ulaşma süreleri bakımından farklı olmasının Zeytinoğlu [67] ve Gosset [10] tarafından kullanılan FCS'den kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. FCS'nin FBS'ye göre daha az mitojenik faktör içerdiği düşünülebilir veya FCS'nin içerdiği mitojenik faktörlerin etkisi farklı mekanizmalarla gerçekleşebilir. FCS'nin kullandığı reseptörlerin farklı olma olasılığı vardır.

% 10 HS (at serumu) içeren besiyerinde büyütülen CO25 hücrelerinin de büyüme sürecinde kontakt inhibisyona 48 saatte ulaştığı görülmüştür. Bu sonuçlar Zeytinoğlu [67] ve Gosset [10] tarafından 72 saatte elde edilmiştir. Oysa HS' nin gerek FBS'ye gerekse FCS'ye göre mitojenik faktörlerin konsantrasyonu bakımından bir hayli düşük olduğu bilinmektedir. Buna göre hücrelerin kontakt inhibisyona ulaşma zamanının daha geç olması gerekmektedir. Fakat gerek bizim çalışmamızda gerekse Zeytinoğlu [67] ve Gosset [10] tarafından yapılan çalışmalarda benzer sonuç elde edilmiştir. Buna göre hücrelerinin hangi besiyerinde olursa olsun kontakt inhibisyona kadar aşağı yukarı aynı hızla çoğalacağı izlenimi oluşmuştur.

CO25 miyoblast hücrelerinin büyüme hızının *N-ras* indüklenmesine yol açan Dex' in HS serum içeren ve mitojenik aktivitesi çok düşük olan besiyerine eklenmesiyle sadece HS içeren ve Dex içermeyen besiyerinde büyütülen aynı hücrelere göre önemli derecede arttığı ve bu çoğalmanın kontakt inhibisyonla durmadığı, hücrelerin 48 saatte kontakt inhibisyon sınırını aşarak sürekli

çoğaldıkları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Zeytinoğlu [67] ve Gosset [10] tarafından da elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir.

6.2. Kromozom Sayısı

Hücre kültüründe büyütülen hücrelerin pasajlandıkça aktivitelerinde ve morfolojilerinde bozulmalar meydana gelebileceği ve hücrelerin orijinalliklerinin bozulabileceği çeşitli çalışmalarla tespit edilmiştir [1]. Bizim çalışmamızda kullanılan CO25 miyoblast hücreleri fare bacak kas dokusundan elde edilmiş olan C2 hücrelerinden türetilmiş bir hücre hattıdır (bkz. 1.4). Bu çalışmamızda mümkün olabildiğince az pasajlanmış hücreler kullanılmaya çalışılmıştır. Birçok pasaj edilen bu hücrelerin kromozom sayılarında meydana gelebilecek olası anomalilerin ortaya konması oldukça önemlidir. C2 ve CO25 hücrelerinde aynı kromozom sayısının (40) [255] daha önce farelerde (*Mus musculus*) tespit edilen kromozom sayısı ile eşit olduğu bulunmuştur. İncelenen C2 ve CO25 hücrelerinin kromozom sayısı bakımından herhangi bir fark göstermemesi N-ras aktivasyonu sonucu CO25 hücrelerinde meydana gelen çeşitli değişikliklerin kromozomal bozulmaya dayanmadığını göstermektedir. Aynı zamanda bizim çalışmamızda hücrelerin sürekli pasajlanmasının kromozomal bozulmaya yol açmadığı kolaylıkla anlaşılmaktadır.

6.3. Morfolojik Özellikler

Hücrelerin işlevlerine bağlı olarak sahip oldukları çekirdek, çekirdekçik gibi hücre içi organellerinin konum, biçim ve sayıları ayırt edici bir özellik olarak kullanılmaktadır [256]. Çalışmamızda CO25 hücreleri farklı ortamlarda büyütüldüklerinde aralarında morfolojik açıdan büyük ve belirgin farklar saptanmıştır. Bu özelliklerin hücrelerin değişik aktivitelerine neden olduğu düşünülmektedir.

Hücrelerinin işlevlerine bağlı olarak sitoplazma özelliklerinde de değişiklikler olduğu bilinmektedir. Hem yoğunluk hem de kimyasal özelliklerine bağlı olarak gösterdikleri boyanma özelliklerine bakarak yaptığımız incelemeler

ve kullandığımız boyama tekniği ile hücrelerde sitoplazmik özelliklerin ortaya konulabileceği ve bu şekilde hücrelerin birbirinden ayırt edilebileceği göstermiştir.

Çalışmamızda kullanılan miyoblast hücrelerinin genel özelliklerine bakıldığında miyoblastlar, tek kutuplu konfigürasyona sahiptirler. Miyofibriller oluşumundan önce kültür ortamlarında bir miyoblastın sitolojik olarak tanısı zor olmaktadır [257]. Miyoblastlar genelde fusiform şekillidirler ve morfolojik farklılaşmanın diğer özelliklerinin hiçbirini göstermezler. Bu genel açıklama bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir.

CO25 miyoblast hücreleri farklılaşma ve transformasyon ortamlarında büyütüldüklerinde önemli morfolojik değişikliklere uğradığı görülmüştür. Miyoblast hücrelerinin farklılaşarak sonuçta miyotüp oluşturdukları gözlenmiştir. Zeytinoğlu [67] ve Gossett [10] tarafından yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklılaşma dokudan üretilerek elde edilmiş miyoblastların genetik özelliği nedeniyle olabileceği gibi, belirli sayıya ulaşarak kontakt inhibisyon etkisi sonucu gerçekleşebilmektedir. Ayrıca miyoblastları farklılaşmaya iten sebep olarak kültür ortamına mitotik aktiviteyi uyarmak amacıyla belirli oranda konulan serum miktarındaki azalmanın neden olduğu düşünülmektedir. Kültür besiyerlerinde kullanılan değişikliklerin saptandığı çalışmaların sonuçları bu düşünceyi desteklemektedir.

In vivo ve *in vitro* ortamlarda iskelet kas farklılaşmasının, tek çekirdekli iğ biçimli miyoblastların füzyonla birleşerek çok çekirdekli miyotüpleri oluşturması şeklinde olduğu bilinmektedir [60]. Füzyon olayında birbirine yakın miyoblastlar arasında plazma membranlarının direkt fiziksel etkileşiminin gerektiği bildirilmiştir [258]. Bizim çalışmamızda mitotik aktivitesi çok düşük olan HS' nun (at serumu) hücreleri normal besiyeri olan % 10 FBS (Fötal sıgır serumu) den daha kısa süre içinde farklılaşmaya sevkettiği tespit edilmiştir. % 10 FBS içeren besiyerinde büyütülen hücrelerin 96 saatte incelendiklerinde ise farklılaşmanın herhangi bir belirtisine rastlanılmamıştır. Ancak aynı çalışmada %10 HS besiyerinde büyütülen hücrelerin kontakt inhibisyon olmadan farklılaşmaya gidemedikleri tespit edilmiştir. Bu sonuç, *in vitro* ortamlarda hücrelerin farklılaşması için genetik yapısının uygun olmasına, kontakt inhibisyonun

gerçekleşmesine ve düşük mitojenik aktiviteye sahip olan besiyerinde büyütülmesine gereksinim duydukları düşüncesini güçlendirmektedir. *In vivo* ortamda ise hücreler düşük mitotik aktiviteye sahip bir ortamda bulunmamaktadırlar. *In vivo* ortamında hücrelerin farklılaşmasının hormonal ve sinirsel uyarılarla gerçekleştiği düşünülmektedir [60].

Hücreler çekirdeklerinin içerdiği kromatin sayısı bakımından incelendiklerinde, füzyona giren hücrelerin çekirdeklerinde kromatin sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerin, işlevine bağlı olarak sahip oldukları çekirdek ve kromatinlerinde gibi değişiklikler gösterebileceği daha önce Gorbsky 1992 [259] tarafından bildirilmiştir. May-Grünwald ile boyanan miyotüpler içinde yoğun boyanan bölümler tespit edilmiştir. Buna göre hücrelerin işlevlerine bağlı olarak sitoplazma özelliklerinde de değişikliklerin ve bazı proteinlerin birikmesinin söz konusu olabileceği görülmektedir. Söz konusu yoğun boyanan bölümlerin transformasyon ve normal büyüme besiyerlerinde tespit edilememesi, bu proteinlerin ya füzyon proteinleri yada farklılaşmada rolü olan proteinler olabileceği düşüncesini güçlendirmektedir. Nitekim Lassar ve ark. [48] tarafından yapılan bir çalışmada miyoblast hücrelerin farklılaşmasında rolü olan MyoD1 gibi proteinlerin hücre içinde birikmesinin *ras* tarafından engellendiği ve dolayısıyla miyoblast hücrelerinin farklılaşmasının ortadan kalktığı bulunmuştur [48]. Ancak bu yoğun boyanan bölümler tek bir proteinden mi yoksa çeşitli proteinlerden mi meydana geldiğinin tam olarak çıkarılabilmesi için daha detaylı ve özgül immünohistokimyasal veya *in situ* hibridizasyon tekniklerinin kullanılması önerilmektedir.

Ras onkogeninin kodladığı protein olan p21^{ras} plazma zarında lokalize olmuştur. p21^{ras}'in fonksiyonu hücre içi etkenlerle hücre dışında lokalize olan büyüme faktörlerinin reseptörleri arasında sinyal iletimidir. p21^{ras}'in hücrelerde farklılaşmayı bu yolu kullanarak engellediği düşünülmektedir. Nitekim bazı büyüme faktörlerinin FGF gibi (Fibroblast büyüme faktörü) hücrelerin farklılaşmasını p21^{ras} yolunu kullanarak engellediği tespit edilmiştir. [260].

Çeşitli çalışmalar, *ras* onkogenlerinin miyoblast hücrelerinin farklılaşmasını engellediğini vurgulamaktadır [10]. Bizim çalışmamızda insan mutant N-*ras* onkogeni ile transfekte edilen CO25 miyoblast hücrelerin, Dex.

içeren besiyerinde büyütüldüğünde morfolojik değişimlere uğradığı ve kontakt inhibisyonundan etkilenmediği tespit edilmiştir. Hücrelerin sürekli çoğalıp bir araya gelerek yığın oluşturdıkları görülmüştür. Yığının oluşumu ve kontakt inhibisyonun etkili olmaması transformasyonun tipik belirtileridir [261]. CO25 miyoblast hücrelerinin yığın oluşturmalarının *N-ras* aktivasyonuna bağlı olduğu daha önce belirtilmiştir [10].

6.4. p21^{N-ras}

İnsan mutant *N-ras* onkogeninin aktivasyonu, farklılaşma, normal ve transformasyon besiyerlerinde büyütülen CO25 hücrelerinde Western Blot yöntemiyle incelenmiştir. Bunun ışığında CO25 miyoblast hücrelerinin normal çoğalması ve farklılaşması *N-ras* etkisinden uzak bir ortamda sağlayabilecekleri anlaşılmaktadır. Çünkü farklılaşma besiyerine, *N-ras*' ı indükleyen Dex. konulduğunda hücrelerin farklılaşmayı durdurdukları tespit edilmiştir. Bu bulgu Gossett ve ark. [10] Zeytinoğlu ve ark. [67] tarafından yapılan çalışmalarla desteklenmiştir.

Transformasyon besiyerinde (% 10 HS+Dex.) büyütülen CO25 miyoblast hücrelerinin sitoplazmalarında 12-96 saatlerdeki periyotlarda p21^{ras} in gittikçe birikmesi ve hücrelerinin miyotüp oluşturma aktivitelerinin durması, *N-ras* onkogeninin beklediği gibi çalıştığını ve hücrelerin farklı nedenlerden dolayı transformasyona uğramadıklarını göstermektedir.

6.5. p53

Günümüzde p53' ün görevi hakkında bir çok varsayım ileri sürülmektedir. Bu varsayımlara göre 1) p53 hücrenin çoğalmasını siklin proteinleri kontrol eden genleri kullanarak durdurmakta [185],. 2) p53 hücrenin farklılaşmasını sağlamakta [190], 3) p53 hücrenin genomunun tamir mekanizmasında önemli rol üstlenmekte [193], 4) hücrelerin apoptotik mekanizmasında rol almaktadır [187]. Aslında bu varsayımlarının hiç biri tek başına p53' ün görevini açıklamak için yeterli

değildir. Araştırmacılar p53' ün asıl görevini bulamadıklarından dolayı p53' ün çok fonksiyonel (multifonksiyonel) olduğunu söylemektedirler.

Bizim çalışmamızda transformasyon (% 10 HS+Dex.), normal (% 10 FBS) ve farklılaşma (% 10 HS) besiyerlerinde büyütülen miyoblast hücrelerinden elde edilen total proteinde p53 seviyesi incelenmiştir. Buna göre normal besiyerinde (% 10 FBS) büyütülen hücrelerin p53 proteinine hiç rastlanılmamıştır. Nitekim p53' ün normal hücrelerde tespit edilemeyecek kadar az olduğu bilinmektedir [216]. Bu sonuç bizim kullandığımız maddeler ve sağladığımız deney koşullarının DNA' ya zarar verecek herhangi bir kimyasal veya fiziksel etken içermediğini göstermektedir. Çünkü söz konusu koşullarda DNA' ya zarar veren herhangi bir etken olsaydı hücrelerin p53 seviyesinin artmış olması gerekirdi. Buna göre koşullarımızın deney için çok uygun olduğu görülmektedir. Ancak bu tespitimiz “p53 hücre çoğalmasını durdurucu bir protein” diye savunan varsayıma ters düşmektedir. Çünkü hücrelerimiz 48 saatten itibaren büyümelerini durdurmuşlardır. Eğer hücrenin her çoğalması p53 ile durduruluyor ise bizim çalışmamızda 48 saatten itibaren p53' ün artması gerekirdi. Oysa, p53' ün artmaması çalışmamızda kullanılan hücrelerin büyümelerinin başka bir mekanizma ile durdurulduğunu göstermektedir. Bundan elde edilebilecek sonuç, p53' ün kontakt inhibisyonla harekete geçen bir gen olmadığıdır. Çünkü böyle bir özelliği olsaydı deneyimizde kontakt inhibisyonun gerçekleştiği 48 saatte p53 proteinin seviyesinin artması gerekirdi.

Farklılaşma ortamında büyüyen hücrelerde (% 10 HS) tespit edilen p53 seviyesinin ise zamanın tüm periyotlarında sabit olduğu bulunmuştur. Daha önce CO25 miyoblast hücrelerinde Northern Blot yöntemi ile p53 mRNA' sının seviyesini inceleyen Zeytinoğlu ve ark. [67] bu seviyenin önemli derecede değişmediğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda Western Blot yöntemiyle elde edilen sonuçlar ise p53 mRNA' sının eşit oranlarda translasyon olduğunu göstermektedir. İlk bakışta bu sonuçların p53' ün farklılaşmada bir görevi olabileceği düşüncesini desteklediği görülmektedir. Aynı zamanda p53' ün farklılaşmada rolü olduğunu gösteren başka çalışmalar da bulunmaktadır ve bu görüşü savunan bir varsayım olduğu da daha önce belirtilmiştir [190]. p53' ün transkripsiyonal aktivitesinin *in vitro* ortamlardaki farklılaşma için gerekli olduğu

C2C12 miyoblast hücrelerinde tespit edilmiştir. Bu hücreleri inceleyen Soddu ve ark. [243] p53' ün hücre döngüsünün bloke edilmesi için arttığını savunmuşlardır. Soddu' ya göre hücre döngüsü bloke edildikten sonra hücreler farklılaşmaya doğru gitmektedirler. Ancak daha önce yapılan çalışmalarda p53' ten yoksun olan fare embriyolarının normal olarak farklılaştıkları gösterilmiştir [213]. Dolayısıyla p53' ün CO25 miyoblast hücrelerinin farklılaşmasında görevi olup olmadığını ve varsa ne gibi bir görevi olduğunu tespit etmek için daha özgül ve amaca yönelik daha kapsamlı bir çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Transformasyon besiyerinde büyütülen hücrelerden elde edilen total proteinde (% 10 HS+Dex.) Western Blot yöntemiyle incelenen p53 protein seviyelerinin zaman periyodu içerisinde önemli derecede değişmediği tespit edilmiştir. Transformasyon besiyerinde büyütülen hücrelerde tespit edilen p53 seviyelerinin, farklılaşma besiyerinde tespit edilen p53 protein seviyelerinden farkı olmadığı gözlenmiştir. Aynı sonuçlar Northern Blot yöntemiyle tespit edilmiştir [67]. Buna göre *N-ras*' ın aktif olması veya olmamasının p53' ü hiçbir biçimde etkilemediği düşünülebilir. p53' ün seviyesinin artmasının ise hücrelerin bulundukları besiyerinden kaynaklanma olasılığı daha yüksektir. Hücrelerin bulundukları besiyeri mitojenik faktörler açısından çok düşüktür. Bu durum hücre için anormallik gösterdiğinden dolayı p53' ün artmış olabileceği düşünülmektedir. p53 proteininin seviyesi, düşük oranda mitojenik faktörler içeren besiyerlerinde bütün hücrelerde artıp artmadığı ise farklı hücre hatlarında denenmesi önerilmektedir.

6.6. Mdm2

Mdm2, p53 proteini tarafından aktif edilen bir gendir. Çünkü *mdm2*, p53' ün kontrolünü sağlamaktadır. Bu çalışmanın kapsamında *mdm2* proteininin seviyeleri normal (%10 FBS), farklılaşma (%10 HS) ve transformasyon (%10 HS+Dex.) besiyerlerinde büyütülen hücrelerde incelemiştir.

Normal besiyerinde büyütülen hücrelerde *mdm2* proteini hiç tespit edilememiştir. Daha önce belirtildiği gibi *mdm2* p53 tarafından aktif edilen bir gendir. Dolayısıyla p53' ün olmadığı bir ortamda *mdm2*' nin bulunması

beklenemez ve eğer bulunursa hücrenin anormal bir durumda olduğunu gösterir. Mdm2' nin p53' ten bağımsız olarak artması kanserlerin % 30' unda tespit edilmiştir [196]. Bizim çalışmamızda kullanılan hücrelerde normal durumlarda mdm2' nin olmaması hücrelerin çalışmak için elverişli özelliklere sahip olduklarını göstermektedir.

Farklılaşma ortamında büyütülen hücrelerde incelenen mdm2' nin seviyesi ilk 12 saatte hiç tespit edilmemiştir. Bu durum aslında beklenen bir durumdur. Çünkü p53' ün, *mdm2*' yi aktive edebilmesi için belli bir seviyeye ulaşması gerekmektedir. Nitekim Honda ve ark. [216] tarafından mdm2 nin, p53' ten sonra meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca mdm2' nin p53' ün kontrolünü sağlaması için önce p53' ün meydana gelmesi gerekmektedir. p53' e bağlı olarak mdm2 24 saatten itibaren 96 saatin sonuna kadar p53 seviyesine yakın bir seviyeye ulaşmıştır. Zaman periyodu içerisinde p53 seviyesine bağlı olarak artan ve azalan mdm2 proteininin davranışının, p53' ü kontrol altında tuttuğunu göstermektedir. Mdm2' nin mRNA'sı beyin, kas ve testis gibi olgunlaşmış organlarda da yüksek seviyelerde bulunmuştur [202, Shvarts 1996]. Mdm2' nin kas farklılaşmasında regülatör bir rolü olduğu gibi daha önce Fiddler ve ark. [242] tarafından bildirilmiştir. Fiddler ve ark. [242] yaptıkları çalışmada mdm2' nin yüksek seviyede sentezlenmesinin C2C12 miyoblast hücrelerinin MyoD-bağımlı farklılaşmasını engellediğini tespit etmişlerdir. Bu yönden 96 saatte yok olması farklılaşma ile ilgili olabilir. Ayrıca Dazard ve ark. [208] tarafından incelenen deri hücrelerinde mdm2' nin seviyesinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak ne yazık ki bu çalışmada p53' ün seviyesi incelenmemiştir.

Bizim çalışmamızda tespit edilen mdm2 protein seviyesinin artış nedeni farklılaşma olayı mı yoksa p53' ün baskılanması mı sorusunun cevabı farklılaşma proteinleri ve mdm2 arasındaki bağlantı çözüldükten sonra belli olacaktır. Çalışmamızın sonuçlarına göre mdm2 seviyesindeki artışın nedeninin p53' ün baskılanması olduğu önerilebilir. Bu nedenle mdm2' nin seviyesi p53 seviyesine yakın bir durumda seyretmektedir.

Transformasyon besiyerinde büyütülen hücrelerde incelenen mdm2 seviyelerinde ise 12. saatte hiç sinyal alınmamıştır. Bunun sebebi daha önce belirtildiği gibi p53 proteinin belli bir seviyeye ulaştıktan sonra mdm2 devreye

girmektedir. Bu hücrelerde tespit edilen mdm2 proteininin seviyelerinin tüm zaman periyotlarında farklılaşma besiyerinden daha az olduğunu baştan belirtmemiz gerekmektedir. 24 saatten elde edilen mdm2 seviyesinin az olduğu belirlenmiştir. 48 saatte ani bir artış gösteren mdm2 protein seviyesi 72. saatte başlayan ani bir düşüş göstermiş ve 96. saatin sonuna kadar devam etmiştir. 12. saatte mdm2'nin olmaması ve *N-ras*'ın düşük seviyelerde olması bu her iki protein arasında bir bağlantı olduğunu göstermez. Ancak 24. Saatte artan *N-ras* ve mdm2'nin p53'e göre beklenen seviyelerde olmaması *N-ras*'ın mdm2'yi çok az da olsa baskıladığını ama p53'ün yüksek seviyede kaldığını göstermektedir. Nitekim bu baskılama *N-ras*'ın yüksek seviyelere ulaştığı 72. ve 96. saatlerde daha belirgin bir şekilde olduğu görülmektedir. *N-ras*, p53 ve mdm2'nin seviyeleri karşılaştırıldığında *N-ras*'ın mdm2'yi baskıladığı izlenimini doğmaktadır. Mdm2'nin, Ras/Raf/Mek/MAP kinaz yoluyla etkilendiği Ries ve ark. tarafından açıklanmıştır [227]. Ancak söz konusu çalışmada normal ras/raf/mek/MAP kinaz yolunun mdm2'yi indüklediği savunulmuştur. Bizim çalışmamızda kullanılan mutant *N-ras*'ın, söz konusu normal Ras/Raf/Mek/MAP kinaz yolunun tersine işlediği düşünülmektedir. Bu bulguların ışığında p21^{ras} proteini ile mdm2 proteini arasında çok yakın bir ilişki olduğu savunulmaktadır. Mek aktivitesi engellenen ras kökenli kanser hücrelerinde mdm2'nin seviyesinde düşüş olduğu Ries ve ark. [227] tarafından bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda aktiveleştirilen *N-ras* onkogeninin mdm2 proteini seviyelerine etkisi Ries ve ark. [227] tarafından varılan sonucu desteklemektedir. Ancak bizim çalışmamızda Mek incelenmemiştir. Bunun için *N-ras*'ın, mek yoluyla mı yoksa başka bir yolla mı mdm2'yi etkilediği açık değildir. Bu sorunun cevabı bu çalışmanın devamı niteliğindeki başka çalışmaları gerektirmektedir. *N-ras*'ın mdm2'yi ister Mek yoluyla ister başka yolla etkilemesi, *N-ras* ve mdm2'nin arasında açık bir biçimde ilişki olduğunu göstermektedir.

6.7. p19

p19^{ARF}, in mdm2'ye bağlanarak p53'ün kontrolünü sağladığı Honda ve ark. tarafından bildirilmiştir [216]. Bizim çalışmamızda p19^{ARF} normal,

farklılaşma ve transformasyon besiyerlerinde büyütülen hücrelerden izole edilen total protein Western Blot yöntemiyle incelenmiştir. Normal besiyerinde incelenen p19^{ARF}, 12-96 saat periyodu içerisinde hiç rastlanılmamıştır. p53 ve mdm2' nin olmadıkları bir ortamda p19^{ARF} olmaması literatürlerde savunulan p19-mdm2-p53 ilişkisini destekler niteliktedir.

Farklılaşma besiyerinde büyütülen hücrelerde p19^{ARF} proteini tespit edilmemiştir. Literatür taramasında p19^{ARF} ve farklılaşma arasında ne gibi bir bağlantı olduğuyula ilgili hiçbir bilgiye rastlanılamamıştır. Buna göre bizim çalışmada tespit edilen p19^{ARF} bulgusunun farklılaşmakta olan hücrelerde p19^{ARF}'in görevinin olmadığını göstermektedir. Bu bulguyu destekleyecek veya reddedecek herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Eischen ve ark. [246] 1999 immünoblot tekniğini kullanarak inceledikleri p19^{ARF}, den yoksun lenf hücrelerinin sitoplazmalarında yüksek seviyelerde mdm2 proteininin olduğunu bulmuşlardır. Bu bulgunun ışığında p19^{ARF} proteininin mdm2' nin her fonksiyonu için gerekli olmadığını kanıtlamaktadır. Bizim çalışmamızda farklılaşmakta olan CO25 miyoblast hücrelerinin sitoplazmalarında mdm2' nin seviyesi yüksek ve sabit olmasına rağmen p19^{ARF} proteinine rastlanılmaması sonucuna Eischen ve ark. [246] tarafından yapılan çalışmalarda farklı hücre hatlarında varılmıştır. Dolayısıyla Eischen ve ark [246] tarafından elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızda elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

Transformasyon besiyerinde büyütülen hücrelerde incelenen p19^{ARF}, ın ise mdm2' ye bağlı olarak hareket etmediği bir kez daha tespit edilmiştir. Bu hücrelerde mdm2' nin zaman periyodu içerisinde azalan seviyesine karşın p19^{ARF} seviyesinde herhangi bir artış gözlenmemiştir. Fakat p19^{ARF} ve mdm2' nin birbirine bağlandığı taktirde mdm2' nin p53' ün üstündeki ubiquitinasyon etkisinin azalttığını ve dolayısıyla p53' ün bozulmasından kurtardığını Honda ve ark [216] tarafından bildirilmiştir.

Ras-p19^{ARF} arasındaki ilişki Palmero ve ark [75] tarafından incelenmiştir. Palmero ve ark onkogenik *ras*' a cevap olarak p53' ün birikmesini p19^{ARF} ile sağladığını savunmuşlardır. Ancak bizim çalışmamızda kullanılan insan mutant N-*ras* onkogeninin p19^{ARF} üzerine öyle bir etkisinin olmadığı görülmüştür. p19^{ARF} proteininden Western Blot yöntemiyle hiç sinyal alınamamasına rağmen

kontrol amacıyla Dot Blot yöntemi kullanıldığında sinyal alınmıştır. Dolayısıyla çalışmamızda kullanılan p19' un antikorunun aktivitesinden ve verimliliğinden kaynaklanan şüpheleri uzaklaştırılmıştır.

Bütün bu bilgi ve bulgularının ışığında varılan sonuçlar özetlendiğinde:

1. *N-ras* p53'ün ekspresse edilmesini engellemez fakat p53' ün hücre döngüsünün üzerindeki etkisini engellemektedir.

2. *N-ras* mdm2' yi baskılamaktadır ve bu baskılama büyük olasılıkla mek yoluyla gerçekleşmektedir.

3. *N-ras* p19^{ARF}, ı aktiveştirmemektedir. p19^{ARF}, ın *N-ras* ve p53 arasında bağlayıcı bir rolü bulunmamaktadır.

4. p53-mdm2' nin arasındaki feed-back ilişkisi bir kez daha pekiştirilmiştir.

5. p19^{ARF}, ın CO25 miyoblast hücrelerinin farklılaşmasında bir role sahip olamayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. COOPER, G.M., *The Cell A Molecular Approach*, Second Ed., Sinauer Associates Inc, p.522-602, Sunderland, Massachusetts, 2000.
2. BARRITT, J.G., *Comminacation Within Animal Cells*, p. 291-314, Oxford University Press, New York, 1992.
3. BISHOP, J., *Molecular Themes in Oncogenes*, Cell, 64, 235-248 (1991).
4. MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, A.P., RODWELL, V.W., ÇEVİRENLER: MENTEŞ, G. ve ERSÖZ, B., *Harper'in Biyokimyası*, 818-837, 1993.
5. MATSUDA, T., KURAOKA, I., KOBAYASHI, T., NAKATSU, Y., MATSUNI, C., SUGASAWA, K., HANAOKA, F., YASUI, A. and TANAKA, K., *DNA Repair Protein XPA Binds Replication Protein A*, J. Biol. Chem., 270, 4152-4157 (1995).
6. YAMAUCHI, K., HOLT, K. and PESSIN, J.E., *Phophotidylinositol 3-Kinase Functions Upstream of ras and raf in Mediating Insulin Stimulation of c-fos Transcription*, J. Biol. Chem., 268, 14597-14600 (1993).
7. SMITH, B.S., HIJMANS, M.E., BEIJERSBERGEN, R.L., and BERNARDS, R., *Functional Analysis of Burkitt's Lymphoma Mutant C-Myc Proteins*, J. Biol. Chem., 271, 513-5518 (1996).
8. CHENG, M., BOULTON, G.T. and COBB, M.H., *ERK3 is A Constitutively Nuclear Protein Kinase*, J. Biol. Chem., 271, 8951-8958 (1996).
9. SEMMES, O.J., BARRETT, J.F., DANG, Chi., V. and JEANG, K.T., *Human T-cell Leukemia Virus Type1 Tax Masks c-myc Function Trough A cAMP-dependent Pathway*, J. Biol. Chem., 271, 9730-38 (1996).
10. GOSSET, L.A., ZHANG, W. and OLSON, E.N., *Dexamethasone-Dependent Inhibition of Differentiation of C2 Myoblasts Bearing Steroid Inducible N-ras Oncogene*, J. Biol. Chem., 106, 2127-2137 (1988).
11. VALGEIRSDOTTIR, S., ERICSSON, A., NISTER, M., HELDIN, C.H., WESTERMARK, B. and WELSH, L.C., *Compartmentalization of Autocrine Signal Transduction Pathways in Sis-Transformed NIH/3T3 Cells*, J. Biol. Chem., 270, 10161-10170 (1995).
12. FRANKS, L.M., and TEICH, N.M., *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, Third Ed., Oxford University Press, 1998

KAYNAKLAR (Devam)

13. GULLICK, W.J., *Prevalance of Aberrant Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor in Human Cancers*, Br. Med. Bull., 47, 87-95 (1991).
14. JACOBS, A., *Gene Mutations in Myelodysplasia*, Leuk. Res., 16, 47-53 (1992).
15. PETERS, G. and VOUSDEN, K.H., *Oncogenes and Tumour Supressors*, p.87-107, Oxford University Press, 1997.
16. JHON, D.Y., LEE, H.H., PARK, D., LEE, C.W., LEE, K.H., YOO, O.J. and RHEE, S.G., *Cloning, Sequencing, Purification and G-q-dependent Activation of Phospholipase C-beta3*, J. Biol. Chem., 268, 6654-6661 (1993).
17. MOKOTURA, T., ENDO, K., KUMAKI, K., OGATA, E. and IKEDA, K., *Neoplastic Transformation of Normal Rat Embryo Fibroblasts by a Mutated p53 and An Activated ras Oncogene Induces Parathroid Hormone-Related Peptide Gene Expression and Causes Hypercalcemia in Nude Mice*, J. Biol. Chem., 270, 30887-30861 (1995).
18. KARSMEYER, S.J., *Chorosomal Translocations in Lymphoid Malignancies Reveal Novel Proto-oncogenes*, Annu. Rev. Immunol., 10, 785-800 (1992).
19. GAUWERKY, C.E. and CROEE, C.M., *Chromosomal Translocation in B-cell-derived Tumours*, Genes. Chrom. Cancer., 1, 3-9 (1993).
20. LAURENZI, V.DE. and MELINO, G. *Apoptosis, the Little Devil of Death*, Nature, 406, 135-36 (2000).
21. SERRANO, M., HANNON, G.J. and BEACH, D., *A New Regulatory Motif in Cell Cycle Control Causing Specific Inhibition Cyclin D/CDK4*, Nature, 366, 704-707 (1993).
22. GUAN, K.-L., JENKINNS, C.W., LI, Y., NICHOLS, M.A., WU, X., O'KEEFE, C.L. *Growth Suppresion by p18, A p16^{INK14/MTS1}-and p14^{INK4/MTS2}-Related CDK6 Inhibitor, Correlates with Wild-type pRrb Function*, Genes Dev., 8, 2939-2945 (1994).
23. HANNON, G. and BEACH, D., *p15^{INK4B} is A Potential Effector of TGF-β-Induced Cell Cycle Arrest*, Nature, 371, 257-260 (1994).
24. HIRAI, H., ROUSSEL, M.F., KATO, J., ASHMUUN, R.A. and SHERR, C.J., *Novel INK4 Proteins, p19 and p18, are Specific Inhibitions of Cyclin*

KAYNAKLAR (Devam)

- D-dependent Kinases CDK4 and CDK6*, Mol. Cell. Biol., 15, 226722-226728 (1995).
25. RAYCOFT, L., WU, H. and LOZANO, G., *Transcriptional Activation by Wild-Type but not Transforming Mutants of the p53 Anti-oncogene*, Science, 249, 1049-1056 (1990).
 26. SMITH, M.L., CHEN, I-T., ZHAN, Q., C'CONNER, P.M. and FORNACE, A.J.Jr., *Involvement of the p53 Tumour Suppressor in Repair of UV-Type DNA Damage*, Oncogene, 10, 1053 (1995).
 27. BLONDAL, J.A. and BENCHIMOL, S., *the Rol of p53 in Tumour Progression*, Semin Cancer. Biol., 5, 177-184 (1994).
 28. SCHMIDT, E., ICHIMURA, K., REIFENBURGER, G. and COLLINS, V.P., *CDKN2 (p116MTS1) Gene Delesyon or CDK4 Amplification Occurs in the Majority of Glioblastomas*, Cancer Res., 54, 6321-6324 (1994).
 29. CLURMAN, B.E. and HAYWARD, W.S., *Insertional Activation of Proto-Oncogenes Previously Identified A Viral Oncogenes. in Cellular Oncogene Activation*, Marcel Ddekker, Inc., New York, 1988.
 30. PETERS, G., *Oncogenes at Viral Integration Sites*, Cell Growth Diff., 1, 503 (1990).
 31. JONKERS, J. and BERNS, A., *Retroviral Insertional Mutagenesis As A Strategy to Identify Cancer Genes*, Biochim. Biophys. Acta, 29, 1287 (1996).
 32. HAUPT, Y., ALEXENDER, W.S., BARRI, G., KLINKEN, S.P. and ADAMS, J.M., *Novel Zinc Finger Gene Implicated As myc collaborator by Retrovirally Accelerated Lymphomagenesis in Eμ-myc Transgenic Mice*, Cell, 65, 753 (1991).
 33. TSUJIMOTO, Y., FINGER, L., YUNIS, J.J., NOWELL, P.C. and CROCE, C.M., *Cloning the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B-cells with the t(14;18) Chromosome Translocation*, Science, 226, 1097 (1984).
 34. SESSAREGO, M., MARTINELLI, G., CHIAMENTI, A., DEFFERATI, R., FUGAZZA, G., BRUZZONE, R., *Molecular Analysis of Six Variant Philadelphia Chromosome Translocations in Chronic Myeloid Leukemia*, Cancer Genet. Cytogenet., 67, 50-58 (1993).
 35. HEISTERKAMP, N., STEPHENSON, J.R., GROFFEN, J., HANSEN, P.F., DE KLEIN, A., BARTRAM, C.R., *Localization of the c-alb*

KAYNAKLAR (Devam)

- Oncogene Adjacent to A Translocation Break Point in Chronic Myelogenous Leukemia*, Nature, 306, 239-242 (1983).
36. LEVAN, G., STAHL, F. and WETTERGEN, Y., *Gene Amplification in the Murine SEWA System*, Mutation Res., 276, 285-291 (1992).
 37. MARTINSSON, T.F., STAHL, P., POLLWEIN, A., WENZEL, A., LEVAN, A., SCHWAB, M., et al., *Tumorigenicity of SEWA Murine Cells Correlates with Degree of c-myc Amplification*, Oncogene, 3, 437-441 (1988).
 38. BRODEUR, G.M., AZAR, C., BROTHER, M., HIEMSTRA, J., KAUFMAN, B., MARSHALL, H., et al., *Neuroblastoma. Effect of Genetic Factors on Prognosis and Treatment*, Cancer, 70, 1685-1692 (1992).
 39. HALL, M. and PETERS, G., *Genetic Alterations of Cyclins, Cyclin-dependent Kinases and Cdk Inhibitors in Human Cancer*, Adv. Cancer Res., 68, 67-73 (1996).
 40. COLLINS, V.P., *Amplified Genes in Human Glioma Semin*, Cancer. Biol., 4, 27-30 (1993).
 41. GREENBLATT, M.S., BENETT, W.P., HOLSTEIN, M. and HARRIS, C.C., *Mutations in the p53 Tumour Suppressor Gene Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis*, Cancer Res., 54, 4855-4862 (1994).
 42. HOLTZER, H., BIEHL, J., YEOH, G., MEGANATHAN, R. and KAZI, A., *Effect of Oncogenic Virus on Muscle Differentiation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4051-4055 (1975).
 43. ALEMA, S. and TATO, F., *Interaction of Retroviral Oncogenes with the Differentiation Program of Myogenic Cells*, Advances in Cancer Res., 49, 67-78 (1987).
 44. MINER, J.H. and WOLD, B.J., *C-MYC Inhibition of MyoD and Myogonin Initiated Myogenic Differentiation*, Mol. Cel. Biol., 11(5), 2842-2851 (1991).
 45. DENIS, N., BLANC, S., LEIBOVICH, M.P., NICOLAIEW, N., DAUTRY, F., RAYMONDJEAN, M., KRUH, J. and KITZIS, A., *c-myc Oncogene Expression Inhibits the Initiation of Myogenic Differentiation*, Exp. Cell. Res., 172, 212-217 (1987).
 46. GROSSI, M., COLCONI, A. and TATO, F., *v-jun Oncogene Prevents Terminal Differentiation and Suppresses Muscle-specific Gene Expression in ASV-17-infected Muscle Cells*, Oncogene, 6, 1767-1773 (1991).

KAYNAKLAR (Devam)

47. SU, H., BOS, T.J., MONTECLARA, F.S. and VOGT, P.K., *Jun Inhibits Myogenic Differentiation*, *Oncogene*, 6, 1759-1766 (1991).
48. LASSAR, A.B., THAYER, M.J., OVERELL, R.W. and WEINTRAUB, H., *Transformation by Activated ras or fos Prevents Myogenesis by Inhibiting Expression of MyoD1*, *Cell*, 58, 659-667 (1989).
49. LEIBOVITCH, M.P., LEIBOVITCH, S.A., HILLION, J., GULLIER, M., SHIMITZ, A. and HAREL, J., *Possible Rol of c-fos, c-N-ras and c-mos Proto-oncogenes in Muscular Development*, *Exp. Cell., Res.*, 170, 80-92 (1987).
50. COLMENARES, C. and STAVNNEZER, E., *the Ski Oncogene Induces Muscle Differentiation in Quail Embryo Cell*, *Cell*, 59, 293-303 (1989).
51. SARIBAMN, E., MITCHELL, T. and KUFE, D., *Expression of the c-fms Proto-oncogene During Human Monocytic Differentiation*, *Nature*, 316, 64-66 (1985).
52. ZELENKA, P.S., *Proto-oncogenes in Cell Differentiation*, *BioEssays*, 12, 22-26 (1990).
53. ADINOLFI, M., *Differentiation and Oncogenes*, *Develop.Med. Child Neuro.*, 30, 536-549 (1988).
54. TAINSKY, M.A., YIM, S.O., KRIZMAN, D.B., KANNAN, P., CHIAO, P.J., MUKHOPADHYAY, T. and BUETTNER, R., *Modulation of Differentiation in Pa-1 Human Teratocarcinoma Cells After N-ras Oncogene-induced Tumorigenicity*, *Oncogene*, 6, 1575-1582 (1991).
55. BAR-SAGI, D. and FERAMISCO, J.R., *Induction of Membrane Ruffling and Fluid-phase Pinosytosis in Quiescent Fibroblasts by ras Proteins*, *Science*, 233, 1061-1068 (1986).
56. DOWNWARD, J., *Regulatory Mechanisms for ras Proteins*, *BioEssays*, 14(3), 177-183 (1992).
57. MUROYA, K., HATTORI, S. and NAKAMURA, S., *Nerve Growth Factor Induces Rapid Accumulation of GTP-bound form of p21^{ras} in Rat Pheochromocytoma PC21 Cells*, *Oncogene*, 7, 277-281 (1992).
58. NODA, M., KO, M., OGURA, A., LIU, D., AMANO, T., TAKANO, T. and IKAWA, Y., *Sarcoma Viruses Carrying ras Oncogenes Induce Differentiation Associated Properties in A Neuronal Cell Line*, *Nature*, 318, 73-75 (1985).

KAYNAKLAR (Devam)

59. HOLTZER, H. and BISHOFF R., *Mitosis and Myogenesis. In the Physiology and Biochemistry of Muscle As A Food*, Vol.2, p.29-51. University of Wisconsin Press., 1970.
60. LOUSE, M., *Cellular and Biochemical Aspects of Muscle Differentiation*, Comp. Biochem. Physiol., 97B, 2, 215-225 (1990).
61. FLORINI, J.M., EWTON, D.Z. and MAGRI, K.A., *Hormones , Growth Factors and Myogenic Differentiation*, Annu. Rev. Physiol., 53, 201-216 (1991).
62. ZINGG, J.M., PEDRAZA-ALVA, G. and JOST, J.P., *MyoD1 Promoter Autoregulation is Mediated by two Proximal E-boxes*, Nucleic Acids Res., 22, (12), 2234-2241 (1994).
63. OLSON, E.N. and CAPETANAKI, Y.G., *Developmental Regulation of Intermediate Filament and Actin mRNA During Myogenesis is Distrupted by Oncogenic ras Genes*, Oncogene, 4, 907-913 (1989).
64. YAPLONKA-REUVENI, Z., BALESTREI, T.M. and BOWEN-POPE, D.F., *Regulation of Prolifiration and Differentiation of Myoblasts Derived From Adult Mouse Skeletal by Specific Isoform of PDGF*, the J. Cell Biol. 111, 1623-29 (1990).
65. ZEYTİNOĞLU, H., GRIFFITTIS, S.L., DAWSON, A.P. and GIBSON, I. *the Effects of N-ras Oncogene Expression on PDGF -BB Stimulated Responses in Cultured Mouse Myoblasts*, Cellular Signaling, 7 (3), 23-246 (1995).
66. ZEYTİNOĞLU, H., GIBSON, I. and ZEYTİNOĞLU, M. *Microscopic Analysis of a Cell Line Which Switches Between the Differentiated and the Transformed Phenotype*, Micron., 24 (3), 265-272 (1993).
67. ZEYTİNOĞLU, H., and GIBSON, I. *Cytosolic Ca^{+2} Levels in CO25 Myoblast Cells Bearing A Human N-ras Oncogene after Stimulation by Thapsigargin and Growth Factors*, Tr. J. Biol. 23, 159-168 (1999).
68. ZEYTİNOĞLU, H. and GIBSON, I. *Effects of the N-ras Oncogene on the Expression of Other Cellular Genes in CO25 Myoblast Cells*, Tr. J. of Medical Sciences, 28, 115-121 (1998).
69. YAFFE, D. and SAXEL, O., *Serial Passaging and Differentiation of Myogenic Cells Isolated from Dystrophic Mouse Muscle*, Nature, 270, 725-227 (1977).

KAYNAKLAR (Devam)

70. SERRANO, M., LIN, A., McCURRAH, M.E., BEACH, D. and LOWE, S.W. *Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated With Accumulation of p53 and p16INK4a*, Cell, 88, 593-602 (1997).
71. POMERANTZ, J., SCHREIBER-AGUS, N., LIEGEOIS, N.J., SILVERMAN, A., ALLAN, L., CHIN, L., POTES, J., ORLOW, I., LEE, H-W., CORDON-CORDO, C. and DEPINHO, R.A. *the INK4a Tumor Suppressor Gene Product, p19ARF Interacts with MDM2 and Neutralizes MDM2's Inhibition of p53*, Cell, 92, 713-723 (1998).
72. ZHANG, Y., XIONG, Y. and YARBROUGH, W.G. *ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes p53: ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the RB and p53 Tumor Suppression Pathway*, Cell, 92, 725-734 (1998).
73. BATES, S., PHILLIPS, C.A., CLARK, P.A., STOTT, F., LUDWIG, L.R. and VOUSDEN, K.H., *p14ARF Links the Tumour Suppressors RB and p53*, Nature, 395, 124-125 (1998).
74. KAMIJO, T., ZINDEY, F., ROUSSEL, M.F., QUELLE, D. E., DOWNING, J.R., ASHMUN, R.A., GROSVELD, G. and SHERR, C.J. *Tumor Suppression at the Mouse INK4a Locus Mediated by the Alternative Reading Frame Product p19ARF*, Cell, 91, 649-59 (1997).
75. PALMERO, I., PANTOJA, C. and SERRANO, M. *p19ARF Links the Tumor Suppressor p53 to ras*, Nature, 395, 125-126 (1998).
76. BARBACID, M. *ras Genes*, Ann. Rev. Biochem. 56, 779-827 (1987).
77. BOS, J.L. *the ras Family and Human Carcinogenesis*, Mutation Res., 195, 255-271 (1988).
78. SANTOS, E. and NEBRED, A.R. *Structural and Functional Properties of ras Proteins*, FASEB, 3, 2151-63 (1989).
79. BOS, J.L., TOKSOZ, D., MARSHALL, C.J., VERLOON-DE VERIES, M. and VEENEMAN, G.H. *Amino Acid Substitutions at Codon-13 of the N-ras Oncogene in Human Acute Myeloid-leukemia*, Nature, 315, 726-730 (1985).
80. BOS, J.L. *Ras Oncogenes in Human Cancer*, Cancer Res., 49, 4682-4689 (1989).
81. SCHIELDS, M.J., PRUITT, K., McFALL, A., SHAUB, A. and DER, C.J. *Understanding ras: "It Ain't Over Til It's Over"*, Trends Cell Biol. 10, 147-54 (2000).

KAYNAKLAR (Devam)

82. MARSHALL, C.J. *Ras Effectors*, Current Opinoin Cell Biol. 8, 197-204 (1996).
83. DOWNWARD, J. *the ras Superfamily of Small GTP-binding Proteins*, TIBS, december, 469-72 (1990).
84. BOURNE, H.R., SANDERS, D.A. and McCORMICK, F. *the GTPase Superfamily: Cosseted Structure and Molecular Mechanism*, Nature, 349, 117-127 (1991).
85. DRIVAS, G.T., PALMIER, S., D' EUSTACHIO, P. and RUSH, M.G. *Evolutionary Grouping of the ras-protein Family*, Biochem. Biophy. Ras. Com. 176, 1130-35 (1991).
86. GRAND, R.J.A. and OWEN, D. *the Biochemistry of ras p21*, Biochem. J. 279, 609-631 (1991).
87. MARSHALL, J.C. *the ras Gene Family. Oncogenes and Growth Control*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 191-199 (1986).
88. LOWY, D.R., ZHANG, K.E., DECLUE, J.E. and WILLUMSEN, B.M. *Regulation of p21 ras Activity*, TIG, 7, 346-350 (1991).
89. CASEY, P.J., SOLSKI, P.A., DER, C.A. and BUSS, J.E. *p21 ras is Modified by Farnesyl Isoprenoid*, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 86, 8323-27 (1989).
90. HANCOCK, J.F., MAGEE, A.I., CHILDS, J.E. and MARSHALL, C.J. *All ras Proteins are Polyisoprenylated but Only Some are Palmitoylated*, Cell, 57, 11167-11177 (1989).
91. HAUBRUCK, H. and McCORMICK, F. *Ras p21: Effects and Regulation*, Biochimica et. Biophysica Acta, 1072, 215-229 (1991).
92. HANCOCK, J.F., CADWALLADER, K. MARSALL, C.J. *Methylation and Proteolysis are Essential for Effcient Membrane Binding of Prenylated p21 K-ras (B)*, EMBOJ. 10, 641-646 (1991).
93. DOWNWOARLD, J., RIEHL, R., WU, L. and WEINBERG, R.A. *Identification of Nucleotide Exchange-promoting Factor for p21^{ras}*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 5998-6 002 (1990).
94. TRAHEY, M. and McCORMICK, F. *A Cytoplasmic Protein Stimulates Normal N-ras p21^{ras} GTPase, but dose not Affect Oncogenic Mutants*. Science, 238, 542-545 (1987).

KAYNAKLAR (Devam)

95. CANTLY, L.C., AUGER, K.R., CARPENTER, C., DUCKWORTH, B., GRAZIANI, A., KAPPELLER, R. and SOLTOFF, S. *Oncogenes and Signal Transduction*, Cell, 64, 281-302 (1991).
96. ADARI, H., LOWY, D.R., WILLUMSEN, B. M., DER, C.J. and McCORMICK, F., *Guanosine Triphosphatase Activating Protein (GAP) Interacts with the p21^{ras} Effector Binding Domain*. Science, 240, 518-21 (1988).
97. MOLLOY, C.J., BOTTARO, D.P., FLEMING, T.P., MARSHALL, M.S., GIBBS, J.B. and AARONSON, S.A., *PDGF Induction of Tyrosine Phosphorylation of GTPase Activating Protein*, Nature, 342, 711-714 (1989).
98. KAPLAN, D.R., MORRISON, D.K., WONG, G., McCORMICK, F. and WILLIAMS, L.T., *PDGF-Receptor Stimulates Tyrosine Phosphorylation of GAP and Association of GAP with A signaling complex*, Cell, 61, 125-33 (1990).
99. REEDIJK, M., LIU, X. and PAWSON, T., *Interaction of Phosphatidylinositol Kinase. GTPase Activating Protein (GAP) and GAP-Associated Proteins with the Colony Stimulating Factor 1 Receptor*, Mol. Cell Biol. 10, 5601-5608 (1990).
100. HATA, Y., KIKUCHI, A., SASAKI, T., SCHABER, M.D., GIBBS, J.B. and TAKAI, Y., *Inhibition of the Ras p21 GTPase-Activating Protein Stimulated GTPase Activity of c-H-ras p21 by smg p21 Having the Same Putative Effector Domain as Ras p21's*, J. Biol. Chem., 265, 7104-07 (1990).
101. FRECH, M., JOHN, J., PIZON, V., CHARDIN, P., TAVITIAN, A., CLARK, R., McCORMICK, F. and WITTINGHOFFER, A., *Inhibition of GTPase Activating Protein Stimulation of ras-p21 GTPase by the Krev-1 Gene Product*, Science, 249, 169-171 (1990).
102. TSAI, M.H., YU, C.L., WEI, F.S. and STACEY, D.W., *the Effect of GTPase Activating Protein Upon ras is Inhibited by Mitogenitally Responsive Lipids*, Science, 243, 522-526 (1989).
103. CALES, C., HANCOCK, J.F., MARSHALL, C.J. and HALL, A. *the Cytoplasmic Protein GAP is Implicated as the Target for Regulation by the Ras Gene Product*, Nature, 332, 548-551 (1988).

KAYNAKLAR (Devam)

104. XU, G., O'CONNELL, P., VISKOCHIL, D., CAWTHON, R., ROBERTSON, M., CULVER, M., DUNN, D., STEVENS, J., GESTELAND, R., WHITE, R. and WEISS, R., *the Neurofibromatosis Type1 Gene Encodes Apoprotein Related to GAP*, Cell, 62, 599-608 (1990).
105. ELLIS, C., MORAN, M., McCORMICK, F. and PAWSON, T., *Phosphorylation of GAP-Associated Proteins by Transforming and Mitogenic Tyrosine Kinases*, Nature, 343, 377-381 (1990).
106. BUCHBERG, A.M., CLEVELAND, L.S., JANKINS, N.A. and COPELAND, N.G., *Sequence Homology Shared by Neurofibromatosis Typ-1 Gene and IRA-1 and IRA-2 Negative Regulators of Ras and Cyclic AMP Pathway*, Nature, 347, 291-294 (1990).
107. DOWNWARD, J., GRAVES, J.D., WARNE, P.H., RAYTER, S. and CANTRELL, D.A., *Stimulation of p21^{ras} Upon T-cell Activation*, Nature, 346, 719-723 (1990).
108. GRAVES, J.D., DOWNWARD, J., RAYTER, S., WARNE, P.H., TUTT, A.L., GLENNIE, M. and CANTRELL, D.A., *CD2 Antigenmediated Activation of the Guanine Nucleotide Binding Proteins p21^{ras} in Human T Lymphocytes*, J. Immunol., 146, 3709-3712 (1991).
109. SATOH, T., NAKAFUKU, M., MIYAJIMA, A. and KAZIRO, Y., *Involvement of p21^{ras} in Signal Transduction Pathways From Interleukin2, Interleukon3 and Granulocyte1 Macrophage Colony Stimulating Factor but not from Interleukin4*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 3314-3318 (1990).
110. SATTH, T., ENDO, M., NAKAFUKU, M., NAKAMURA, S. and KAZIRO, Y., *Platetet-Derived Growth Factor Stimulates Formation of Active p21^{ras}.GTP Complex in Swiss Mouse 3T3 Cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 5993-5997 (1990).
111. BURGERING, B.M.T., MEDEMA, R.H., MAASSEN, J.A., VAN DE WETERING, M.L., VANDER EB, A.J., McCORMICK, F. and BOS, S.L., *Insulin Stimulation of Gene Expression Mediated by p21^{ras} Activation*, EMBO J., 10, 1103-1109 (1991).
112. LEEVERS, S.J., PETERSON, H.F. and MARSHALL, C.J., *Requirement for ras in raf Activation is Overcome by Targeting RAF of the Plasma Membrane*, Nature, 369, 411-413 (1994).
113. STOKOE, D., McDONALD, S.G., CADWALLADER K., SYMONS, M. and HANCOCK, T., *Activation of ras as a Result of Recruitment to the Plasma Membrane*, Science, 264, 1463-66 (1994).

KAYNAKLAR (Devam)

114. MOELLING, K., HEIMANN, B., BEIMLING, P., RAPP, U.R. and SANDER, T., *Serine and Threonine-specific Protein Kinase Activities of Purified gag-mil and gag-raf Proteins*, Nature, 312,558-560 (1984).
115. MOODIE, S.A., WILLIAMSEN, B.M., WEBER, M.J. and WOLFMAN, A., *Complexes of ras-GTP with raf-1 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*, Science, 260,1658-63 (1993).
116. QIU, R.G., CHEN,J., KIRN, D., McCORMICK, F. and SYMONS, M., *An Essential Role for raf in ras Transformation*, Nature, 374,457-459 (1995).
117. McDONALD, S.G., CREWS, C.M., WU, L., DRILLER, J., CLARK, R., and ERICSON, R.L. *Reconstitution of the raf-1-MEK-ERK Signal Transduction Pathway in vitro*, Mol. Cell. Biol., 13,6615-22 (1993).
118. HOWE, L.R., LEEVERS, S.J., GOMEZ, N., NAKIELNY, S., COHEN, P. and MARSHALL, C.J., *Activation of the MAP Kinase Pathway by the Protein Kinase raf*, Cell, 71, 335-42 (1992).
119. KYRIAKIS, J.M., APP, H., ZHANG, X.F., BANERJEE, P., BRAUTIGON, D.L., RAPP, U.R., *Raf-1 Activates MAP Kinase Kinase*, Nature, 358, 417-419 (1992).
120. JONESON, T., WHITE, M.A., WIGLER, M.H. and BAR-SAGI, D., *Stimulation of Membrane Ruffling and MAP Kinase Activation by Distinct Effectors of ras*, Science, 271, 810-13 (1996).
121. KURIYAMA, M., HARADA, N., KURODO, S., YAMAMATO, T., NAKAFUKU, M., IWAMATSU, A., *Identification of AF-6 and Canoe as Putative Targets for ras*, J. Bio. Chem., 271, 810-18 (1996).
122. McCORMICK, F., *Activators and Effectors of ras p21 Proteins*, Current Opinion in Genetic and Development, 4, 71-76 (1994).
123. BOGUSKI, M.S. and McCORMICK, F., *Proteins Regulating ras and its Relatives*, Nature, 366, 643-646 (1993).
124. RIDLEY, A.J., PATERSON, H.F., JONSTON, C.L., DIEKMANN, D. and HALL, A., *the Small GTP-binding Protein rac Regulates Growth factor-Induced Membrane Ruffling*, Cell, 70, 401-410 (1992).
125. MINDEN, A., LIN, A., McMAHON, M., LANGE, C.C., DERIJARD, B., and DAVIS, R.J., *Differential Activation of ERK and JNK Mitogen-activated Protein Kinase by raf-1 and MEKK*, Science, 266, 1719-22 (1994).

KAYNAKLAR (Devam)

126. YAN, M., DAI, T., DEAK, J.C., KYRIAKIS, J.M., ZON, L.J., WOODGETT, J.R., *Activation of Stress-activated Protein Kinase by MEKK1 Phosphorylation of Its Activator SEK1*, Nature, 372, 798-800 (1994).
127. MINDEN, A., LIN, A., CLARET, F.X., ABO, A. and KARIN, M., *Selective Activation of JNK Signaling Cascade and c-jun Transcriptional Activity by the Small GTPases Rac and Cdc42Hs*, Cell, 81, 1147-53 (1995).
128. SAHAI, E.M., OLSON, F. and MARSHALL, C.J., *Cross-talk Between ras and Rho Signaling Pathway in Transformation Favours Proliferation and Increased Motility*, EMBO J., 20 (4), 755-766 (2001).
129. AMANO, M., CHIHARA, K., KIMURA, K., FUKATA, Y., NAKAMURA, N., MATSUURA, Y. and KAIBUCHI, K., *Formation of Actin Stress Fibers and Focal Adhesions Enhanced by Rho-kinase*, Science, 275, 1308-1311 (1997).
130. TOMINAGA, T., SAHAI, E., CHARDIN, P., McCORMICK, F., COURTNEIDGE, S.A. and ALBERTS, A.S., *Diaphanous-related forming Bridge Rho GTPase and Src Tyrosine Kinase Signaling*, Mol. Cell., 5, 13-25 (2000).
131. BUSCA, R., ABBE, P., MATOUX, F., ABERDAM, E., PEYSSONNAUX, C., EYCHENE, A., ORTONNE, J.P. and BALLOTTI, R., *Ras Mediates the cAMP-dependent Activation of Extracellular Signal-regulated Kinases (ERKs) in Melanocytes*, EMBO J., 19, 2900-2910 (2000).
132. JIANG, H., LUO, J.Q., URANO, T., FRANKEL, P., LU, Z., FOSTER, D.A., *Involvement of Ral-GTPase in v-src-induced Phospholipase D Activation*, Nature, 378, 409-411 (1995).
133. RODRIGUEZ-VICIANA, P., WARNE, P., DHAND, R., VANHAESEBROECK, B., GOUT, I., FRY, M.J., *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase as a Direct Target of ras*, Nature, 370, 527-230 (1994).
134. KODAKI, T., WOSCHOLSKI, R., HALLBERG, B., RODRIGUEZ, V.P., DOWNWARD, J. and PARKER, P.J., *the Activation of Phosphatidylinositol-3-kinase by ras*, Curr. Biol., 4, 798-806 (1994).
135. LANGE-CARTER, C.A. and JOHNSON, G.L., *Ras-dependent Growth Factor Regulation of MEK Kinase in Pc12 cells*, Science, 265, 1458-60 (1994).

KAYNAKLAR (Devam)

136. RUSSEL, M., LANGE-CARTER, C. and JOHNSON, G.L., *Direct Interaction Between ras and the Kinase Domain of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase (MEKK1)*, J.Biol. Chem., 270, 11757-67 (1995).
137. BAR-SAGI, D. and FERKICO, J.R. *Microinjection of the Ras Oncogene protein into PC12 Cells Induces Morphological differentiation*, Cell, 42, 841-48 (1985).
138. BENITO, M., PORRAS, A., NEBRED, A.R. and SANTOS, E. *Differentiation of 3T3-L1 Fibroblasts to Adipocytes Induced by Transfection of Ras Oncogenes*, Science, 253, 565-68 (1991).
139. RIDLEY, A.J., PETERSON, H.F., NOBEL, M. and LAND, H. *Ras-Mediated Cell Cycle Arrest is Altered by Nuclear Oncogenes to Induce Schwann Cell Transformation*, EMBOJ., 7, 1635-45 (1988).
140. LLOYD, A.C., OBERMÜLLER, F., STADDON, S., BARTH, C.F., McMAHAN, M. and LAND, H. *Cooperating Oncogenes Coverage to Regulate Cyclin/Cdk Complexes*, Genes and Dev., 11, 663-77 (1997).
141. KONIECZNY, S.F., DROBES, B.L., MENKE, S.L. and TAPAROWSKY, E.J., *Inhibition of Myogenic Differentiation by H-ras Oncogene is Associated with the Down Regulation of MyoD1 Gene*, Oncogene, 4, 473-481 (1989).
142. VAIDYA, T.B., WEYMAN, M.C., TEEGARCLIN, D., ASHENDEL, L.C. and TAPAROWSKY, E.J., *Inhibition of Myogenesis by the H-ras Oncogene: Implication of a Role for Protein Kinase C*, the Cell. Biol., 114, 809-820 (1991).
143. BENCHIMOL, S., LAMP, P., CRAWFORD, L.V., SHEER, D., SHOWS, T.B., BRUNS, G.A.P., *Transformation Associated p53 Protein is Encoded by a Gene on Human Chromosome 17*, Somatic Cell Mol. Genet., 11, 505-12 (1985).
144. SOUSSI, T., CARON DE FROMENTEL, C. and MAY, P., *Structural Aspects of the p53 Protein in Relation to Gene Evolution*, Oncogene, 5, 945-53 (1990).
145. MATLASHEWSKI, G., LAW, P., PIM, D., PEACOCK, J., CRAWFORD, L. and BENCHIMOL, S., *Isolation and Characterization of the Human p53 cDNA Clone: Expression of the Human Gene*, EMBO J., 3, 3257-63 (1989).

KAYNAKLAR (Devam)

146. RIGAUDY, P. and ECKHART, W., *Nucleotid Sequence of cDNA Encoding the Monkey Cellular Phosphoprotein p53*, *Nucleic Acids Res.*, 17, 8375-82 (1989).
147. CARO DE FROMENTEL, C., PAKDEL, F., CHAPUS, A., BANEY, C., MAY, P. and SOUSSI, T., *Rainbow Trout p53: cDNA Clonning and Biochemical Characterization*, *Gene*, 112, 241-49 (1992).
148. SLINGERLAND, J.M., JENKINS, J.R. and BENCHIMOL, S., *The Transforming and Supressor Functions of p53 Alleles: Effects of Mutations That Distrupt Phosphorylation, Oligomerization and Nuclear Translocation*, *EMBO J.*, 12, 1029-37 (1993).
149. MEEK, D.W. and ECKHART, W., *Phosphorylation of p53 in Normal and Simian Virus 40-transformed NIH3T3 Cells*, *Mol. Cell. Biol.*, 8, 461-67 (1988).
150. WANG, Y. and ECKHART, W., *Phosphorylation Sites in the Amino-terminal Region of Mouse p53*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4231-38 (1992).
151. MILNE, D.M., CAMPELL, D.G., CAUDWELL, F.B. and MEEK, D.W., *Phosphorylation of the Tumour Suppressor Protein p53 by Mitogen-Activated Protein Kinases*, *J. Biol.Chem.*, 269, 9253-65 (1994).
152. TACK, L.C. and WRIGHT, J.H., *Altered Phosphorylation of free and Bound Forms of Monkey p53 and Simian Virus 40 Large T Antigen During Lytic Infection*, *J. Virol.*, 66, 1312-20 (1992).
153. KERN, S.E., KINZLER, K.W., BRUSKIN, A., JAROSZ, D., FRIEDMAN, P., PRIVES, C., *Idendification of p53 as A Sequence-specific DNA-binding Protein*, *Science*, 252, 1708-53 (1992).
154. MALKIN, D., LI, F.P., STRONG, L.C., FRAUMENI, J.F., NELSON, C.E., KIM, D.H., *Germ-line p53 Mutation in Familial Syndrome of Breast Cancer, Sarcoma and Other Neoplasms*, *Science*, 250, 1233-38 (1990).
155. KEMP, C.J., DONEHOVWER, L., BRADLEY, A., and BALMAIN, A., *Reduction of p53 Dosage does not Increase Initiation or Promotion but enhances Malignant Progression of Chemically Induced Skin Tumours*, *Cell*, 74, 813-21 (1993).
156. MALKIN, D., JOLLY, K.W., BARBIER, N., LOOK, A.T., FRIEND, S.H., and GEBHARDT, M.C., *Germline Mutations of the p53 Tumour Suppressor Gene in Children and Young Adults with Second Malignant Neoplasms*, *N. Engl. J. Med.*, 326, 1309-15 (1992).

KAYNAKLAR (Devam)

157. SRIVASTA, S., ZON, Z., PIROLLO, K., BLATTNER, W., and CHANG, E.H., *Germ-Line Transmission of a Mutated p53 Gene in a Cancer-prone Family with Li-fraumeni Syndrome*, Nature, 348, 747-49 (1990).
158. MASUDA, H., MILLER, C., KOEFFLER, H.P., BATTIFORA, H., and CLINE, M.J., *Rearrangements of the p53 Gene in Human Osteogenic Sarcomas*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7716-22 (1987).
159. MILLER, C.W., ASLO, A., TSAY, C., SLAMON, D., ISHIZAKI, K., TOGUCHIDA, Y., et al., *Frequency and Structure of p53 Rearrangements in Human Osteosarcomas*, Cancer Res, 50,7950-57 (1990).
160. AHUJA, H., BAR-ELI, M., ARLILN, Z., ADVANI, S., ALLANN, S.L., GOLDMAN, J., et al., *Alterations in the p53 Gen and the Clonal Evolution of the Blast Crisis of Choronic Myelocytic Leukaemia*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6783-90 (1989).
161. LANE, D.P. and BENCHIMOL, S., *P53:Oncogene or Anti-oncogene?*, Genes Dev., 4, 1-8 (1990).
162. LI, F.P., FRAUMENI, J.F., MULVIHILL, J., BLATTNER, W.A., DREYFUS, M.G., TUACKER, M.A., et al., *A Cancer family Syndrome in Twenty Four Kindreds*, Cancer Res., 48, 5358-62 (1988).
163. OREN, M., *Regulation of the Tumour Suppressor Protein*,J. Biol. Chem., 274(51), 36031-36034 (1999).
164. CHEN, P-L., CHEN, Y., BOOKSTEIN, R., and LEE, W.-H.,*Genetic Mechanisms of Tumour Suppression by the Human p53 Gene*, Science, 250, 1576-78 (1990).
165. DILLER, L., KASSEL, J., CAMILLE, E.N., GRYKA, M.A., LITWAK, G., GEBHARDT, M., *p53 Functions as A Cell Cycle Control Protein in Osteosarcomas*, Mol. Cell. Biol., 10, 5772-79 (1990).
166. MARTINEZ, J., GEORGOFF, I., and LEVINE, A.J., *Cellular Localisation and Cell Cycle Regulation by A Temperature-sensitive p53 Protein*, Genes Dev., 5, 151-57 (1991).
167. JOHNSON, P., GRAY, D., MOWAT, M., and BENCHIMOL, S., *Expression of Wild-type p53 is not Compatible with Continued Growth of p53-negative Tumor Cells*, Mol. Cell. Biol., 11,1-7 (1991).
168. MERCER, W.E., SHIELDS, M.T., LIN, D., APPELLA, E., and ULLRICH, S.J., *Growth Suppression Induced by Wild-type p53 Protein is*

KAYNAKLAR (Devam)

Accompanied by Selective Down-regulation of Proliferating-cell Nuclear Antigen Expression, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1958-63 (1991).

169. MICHALOVITZ, D., HALEVY, O., and OREN, M., *Conditional Inhibition of Transformation and of Cell Proliferation by A Temperature-sensitive Mutant of p53*, Cell, 62, 671-79 (1990).
170. SHAULSKY, G., GOLDFINGER, N., PELED, A., and ROTTER, V., *Involvement of Wild-type p53 in Pre-B-cell Differentiation in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8982-91 (1991).
171. DONEHOWER, L.A., HARVEY, M., SLAGLE, B.L., McARTHUR, M.J., MONTGOMERY, C.A., BUTEL, J.S., et al., *Mice Deficient for p53 are Developmentally Normal but Susceptible to Spontaneous Tumours*. Nature, 356, 215-17 (1992).
172. TANAKA, H., ARAKAWA, H., YAMAGUCHI, T., SHIRAISHI, K., FUKUDA, S., MATSUI, K., TAKEI, Y. and NAKAMURA, Y., *A Ribonucleotide Reductase Gene Involved in a p53-dependent Cell-Cycle Checkpoint for DNA Damage*, Nature, 404, 42-49 (2000).
173. LOZANO, G. and ELLEDGE, S.J., *p53 Sends Nucleotids to Repair DNA*, Nature, 404, 24-25 (2000).
174. ELLEDGE, S.J., *Cell Cycle Checkpoints: Preventing An Identity Crisis*, Science, 274, 1664-72 (1996).
175. MALTZMAN, W. and CZYZYK, L., *UV Irradiation Stimulates Levels of p53 Cellular Tumor Antigen in Non-Transformed Mouse Cells*, Mol. Cell. Biol., 4, 1689-95 (1984).
176. KASTAN, M.B., ZHAN, Q., EL-DEIRY, W.S., CARRIER, F., JACKS, T., WALSH, W.V., *A Mammalian Cell-Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and GDD45 is Defective in Ataxia-Telangiectasia*, Cell., 71, 587-590 (1992).
177. KASTAN, M.B., ONYEKWERE, O., SIDRANSKY, D., VAGELSTEIN, B. and CRAIG, R.W., *Participation of p53 Protein in Cellular Response to DNA Damage*, Cancer Res., 51, 6304-6310 (1991).
178. KUERBITZ, S.J., PLUNKET, B.S., WALSH, W.V. and KASTAN, M.B., *Wild Type p53 is A Cell-Cycle Checkpoint Determinant Following Irradiation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 749-753 (1992).

KAYNAKLAR (Devam)

179. LOWE, S.W., SCHMITT, E.M., SMITH, S.W., OSBORNE, B.A. and JACKS, T., *P53 is Required for Radiation Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes*, Nature, 362, 847-850 (1993).
180. CLARKE, A.R., PURDIE, C.A., HARRISON, D.J., MORRIS, R.G., BIRD, C.C., HOOPER, M.L., *Thymocyte Apoptosis Induced p53-dependent and Independent Pathways*, Nature, 362, 849-851 (1993).
181. DEBBAS, M. and WHITE, E., *Wild Type p53 Mediates Apoptosis by E1A, Which is Inhibited by E1B*, Genes Dev., 7, 546-552 (1993).
182. LOWE, S.W., JACKS, T., HOUSMAN, D.E. and RULEY, H.E., *Abrogation of Oncogene-Associated Apoptosis Allows Transformation of p53-deficient Cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 2026-2032 (1994).
183. SONG, S. and 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).
184. MARCHENKO, N.D., ZAIKA, A. and 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).
185. MIYASHITA, T., KRAJEWSKA, M., WANG, H.G., LIN, H.K., and 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).
186. LIN, Y. and BEUCHIMOL, S., *Cytokines Inhibit p53-mediated Apoptosis but not p53-mediated G1-arrest*, Mol. Cell. Biol., 15, 6045-6050 (1995).
187. CHAO, C., SAITO, S., KANG, J., ANDERSON, C.W., APPELLA, E. and XU, Y., *p53 Transcriptional Activity is Essential for p53-dependent apoptosis Following DNA Damage*, EMBO J., 19, 4967-4975 (2000).
188. POCHAMPALLY, R., FOCLERA, B., CHEN, L., LU, W. and CHEN, J., *Activation of An MDM2-specific Caspase by p53 in the Absence of Apoptosis*, J. Bio. Chem., 274, 15271-15277 (1999).
189. JOHNSON, P., CHUNG, S. and BEUCHIMOL, S., *Growth Suppression of Friend Virus-Transformed Erythroleukemia Cells by p53 Protein is Accompanied by Hemoglobin Production and is Sensitive to Erythropoietin*, Moll. Cell. Biol., 13, 1456-1461 (1993).
190. ROTTER, V., *Does Wild Type p53 Play a Role in Normal Cell Differentiation?*, Semin. Cancer. Biol., 5, 229-236 (1994).

KAYNAKLAR (Devam)

191. GANNON, J.V. and LANE, D.P., *p53 and DNA Polymerase Alpha Complete for Binding to SV40T Antigen*, Nature, 329, 456-459 (1987).
192. BRAITWAITE, A.W., STRURZBECHER, H.W., ADDISON, C., PALMER, C., RUDGE, K. and JENKINS, J.R., *Mouse p53 Inhibits SV40 Origin-dependent DNA Replication*, Nature, 329, 458-460 (1987).
193. DUTTA, A., RUPPERT, J.M., ASTER, J.C. and WINCHESTER, E., *Inhibition of DNA Replication Factor RPA by p53*, Nature, 365, 79-81 (1993).
194. WAGA, S., HANNON, G.J., BEACH, D. and STILLMAN, B., *the p21 Inhibitor of Cyclin-dependent Kinase Controls DNA Replication by Interaction with PCNA*, Nature, 369, 574-576 (1994).
195. ZHANG, J., AHN, J., WILSON, H.S. and PRIVES, C., *A Role of p53 in Base Excision Repair*, EMBO J., 20(4), 914-923 (2001).
196. PIETTE, J., NEEL, H. and MARECHAL, V., *MDM2; Keeping p53 Under Control*, Oncogene, 15, 1001-1010 (1997).
197. CHEN, C., OLINER, J.D., ZHAN, Q., FORNACE, A.S., VOGELSTEIN, Jr.B. and KESTAN, M.B., *Interaction Between p53 and MDM2 in A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2684-2688 (1994).
198. HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B. and HARRIS, C.C., *P53 Mutations in Human Cancer*, Science, 253, 49-53 (1991).
199. WU, X., BAYLE, J.H., OLSON, D. and LEVINE, A.J., *the p53-MDM2 Autoregulatory Feedback Loop*, Genes and Dev., 7, 1126-1132 (1993).
200. JUVEN, T., BARAK, Y., ZAUBERMAN, A., GEORGE, D.L. and OREN, M., *Wild Type p53 can Mediate Sequence-specific Transactivation of An Internal Promotor Within the MDM2 Gene*, Oncogene, 8, 3411-3416 (1993).
201. BARAK, Y., COTTELIB, E., JUVEN, G.T. and OREN, M., *Regulation of MDM2 Expression by p53: Alternative Promoters Produce Transcripts with Nonidentical Translation Potential*, Genes and Dev., 8, 1739-1749 (1994).
202. FAKHARZADEH, S.S., TRUSKO, S.P. and 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).

KAYNAKLAR (Devam)

203. LENG, P., BROWN, D.R., DEB, S. and DEB, S.P., *Human Oncoprotein MDM2 Interacts with the TATA-binding Protein in vitro and in vivo*, Int. J. Oncology, 6, 251-259 (1995).
204. CHEN, X., FARMER, G., ZHU, H., PRYWES, R. and PRIVES, C., *Cooperative DNA Binding of p53 with TFIID (TBP): A Possible Mechanisms for Transcriptional Activation*, Genes and Dev., 7, 1837-1849 (1993).
205. BAE, I. SMITH, M.L. and FORNACE, A.G.Jr. *Induction of p53-MDM2 and p21^{CIP/WAF1} Like Molecules in Insect Cells by DNA Damaging Agents*, Exp. Cell Res., 217, 541-45 (1995).
206. OLINER, J.D., PIETENPOL, J.A., THIAGALINGAM, S., GYURIS, J., KINGLER, K.W. and VOGELSTEIN, B., *MDM2 Oncoprotein Conceals the Activation Domain of Tumour Suppressor p53*, Nature, 362, 857-860 (1993).
207. CARRIER, F., BAE, I., SMITH, M.L. and FORNACE, A.G.Jr. *Characterization of the GADD45 Response to Ionizing Radiation in WIL-NS Cells, a p53 Mutant Cell Line*, Mut. Res., 352, 79-86 (1996).
208. DAZARD, J.E., PIETTE, J., BASSET-SEQUIN, N., BLANCHARD, J.M. and GANDARILLAS, A. *Switch from p53 to MDM2 as Differentiating Human Keratinocytes Loss Their Proliferative Potential and Increase in Cellular Size*, Oncogene, 19, 3693-705 (2000).
209. MAXWELL, S.A., *Two-dimensional Gel Analysis of p53-mediated Changes in Protein Expression*, Anticancer Res., 14,2549-2556 (1994).
210. HAINES, D.S., LANDERS, J.E., ENGLE, L.J. and GEORGE, D.L., *Physical and Functional Interaction Between Wild Type p53 and MDM2 Proteins*, Mol. Cell. Biol., 14,1171-1178 (1994).
211. SIGALAS, I., CALVERT, A.H., ANDERSON, J.J., NEAL, D.E. and LUNEC, J., *Alternatively Spliced MDM2 Transcripts with Loos of p53 Binding Domain Sequences: Transforming Ability and Frequent Detection in Human Cancer*, Nature, med., 2 (8), 912-917 (1996).
212. CHEN, J., WU, X., LIN, J. and LEVINE, A.J., *MDM2 Inhibits the G1 Arrest and Apoptosis Functions of the p53 Tumour Suppressor Protein*, Mol. Cell. Biol., 16 (5),2445-2452 (1996).
213. MONTES DE OCA LUNA, R., WANGER, D.S. and LOZANO, G. *Rescue of early embryonic Lethality in MDM2 Deficient Mice by Deletion of p53*, Nature, 378, 203-6 (1995).

KAYNAKLAR (Devam)

214. WADGAONKAR, R. and COLLINS, T., *Murine Double Minute (MDM2) Blocks p53-coactivator Interaction, A New Mechanism for Inhibition of p53 Dependent Gene Expression*, J. Bio. Chem., 274, 13760-13767 (1999).
215. HAUPT, Y., MAYA, R., KAZAZ, A. and OREN, M. *MDM2 Promotes the Rapid Degradation of p53*, Nature, 387, 296-99 (1997).
216. HONDA, R. and YASUDA, H., *Association of p19^{ARF} with MDM2 Inhibits Ubiquitin Ligase Activity of MDM2 for Tumour Suppressor p53*, EMBO J., 18, 22-27 (1999).
217. MOMAND, J. and ZAMBETTI, G.P., *MDM2: "Big Brother" of p53*, J. Cell. Biochem., 64, 343-352 (1997).
218. SAKAGUCHI, K., SAITO, Si., HIGASHIMOTO, Y., ROY, S., ANDERSON, C.W. and APELLA, E., *Damage-mediated Phosphorylation of Human p53 Threonine 18 A Cascade Mediated by A casein I-like Kinase Effect on MDM2 Binding*, J. Biol. Chem., 275 (13), 9278-9283 (2000).
219. ANDERSON, C.W. and LEES-MILLER, S.P. *the Nuclear Serine/Threonine Protein Kinase DNA-PK*, Crit. Rev. Eucar. Gene. Exp., 2, 283-314 (1992).
220. KONDO, S., BARNETT, G.H., HARA, H., MORIMORA, T. and TAKENCHI, J. *Mdm2 Protein Confers the Resistance of a Human Glioblastoma Cell Line to Cisplatin-Induced Apoptosis*, Oncogene, 10, 2001-6 (1995).
221. LEACH, F.S., TOKINO, T., MELTZER, P., BURNELL, M., OLINER, J.D., SMITH, S., HILL, D.E., SIDRANSKY, D., KINZLER, K.W., and VOGELSTEIN, B., *P53 Mutations and MDM2 Amplification in Human Soft Tissue Sarcomas*, Cancer Res., 53, 2231-2234 (1993).
222. MARCHETTI, A., BUTTITTA, F., PELLEGRINI, S., MERLO, G., CHELLA, A., ANGELETTI, C.A. and DEVILACQUA, G. *MDM2 Gene Amplification and Overexpression in Non-Small Lung Cell Carcinomas with Accumulation of the p53 Protein in the Absence of p53 Gene Mutations*, Diagn. Mol. Path., 4, 93-7 (1995).
223. McCANN, A.H., KIRLEY, A., CARNEY, D.N., CORBALLY, N., MAGEE, H.M., KEATING, G. and DERVAN, P.A., *Amplification of the MDM2 Gene in Human Breast Cancer and It's Association with MDM2 and p53 Protein Status*, Br. J. Cancer, 71 (5), 981-985 (1995).

KAYNAKLAR (Devam)

224. OLINER, J.D., KINZLER, K.W., MELTZER, P.S., GEORGE, D.L. and VOGELSTEIN, B., *Amplification of A Gene Encoding p53-Associated Protein in Human Sarcomas*, Nature, 358 (6381), 80-83 (1992).
225. LANDERS, J.E., HAINES, D.S., STRAUSS, J.F. and GEORGE, D.L. *Enhanced Translation: A Novel Mechanism of MDM2 Oncogene Overexpression Identified in Human Tumor Cells*, Oncogene, 9, 2754-50 (1994).
226. JACKSON, M.W. and BERBERICH, S.J., *MDMX Protects p53 from MDM2-mediated Degradation*, Mol. Cell. Biol., 20, 1001-1007 (2000).
227. RIES, Y., *Ras Suppresses the Activity of p53 and Renders Cells Radioresistant*, Cell, 103, 321-330 (2000).
228. GROTH, A., WEBER, J.D., WILLIAMSEN, B.M., SHERR, C.B. and ROUSSEL, M.F., *Oncogenic ras Induces p19^{ARF} and Growth Arrest in Mouse Embryo Fibroblasts Lacking p21^{cip} and p27^{kip1} Without Activating Cyclin-D-dependent Kinases*, J. Biol. Chem., 275, 27473-80 (2000).
229. MARTIN, K., TROUCHE, D., HAGEMERE, C., SORENSEN, T.S., LATHANQUE, N.B. and KOUZARIDES, T. *Stimulation of E2F1/DPI Transcriptional Activity by MDM2 Oncoprotein*, Nature, 375, 691-4 (1995).
230. XIAO, Z.-X., CHEN, J., LEVINE, A.J., MODJTAHEDI, N., XING, J., SELLER, W.R. and LIVINGSTONE, D.M. *Interaction Between the Retinoblastoma Protein and Oncoprotein MDM2*, Nature, 375, 694-98 (1995).
231. FLORENES, V.A., MAELANDSMO, G.M., FORUS, A., ANDREASSEN, A., MYKLEBOST, O., FODSTAD, O. and FLERNES, V.A., *MDM2 Gene Amplification and Transcript Levels in Human Sarcomas: Relationship to TP53 Gene Status*, J. Natl. Cancer Inst., 86 (17), 1297-1302 (1994).
232. CARDON-CARDO, C., LATERS, E., DROBNJAK, M., OLIVA, M.R., POLLACK, D., WOODRUFF, J.M., MARECHAL, V., CHEN, J., BRENNAN, M.F. and LEVINE, A.J., *Molecular Abnormalities of MDM2 and p53 Genes in Adult Soft Tissue Sarcomas*, Cancer Res., 54 (3), 794-799 (1994).
233. MARKS, D.I., VONDERHEID, E.C., KURZ, B.W., BIGLER, R.D., SINHA, K., MORGAN, D.A., SUKMAN, A., NOWELL, P.C., HAINES, D.S., *Analysis of p53 and MDM2 Expression in 18 Patients with Sezary Syndrome*, Br.J. Haematol., 92 (4), 890-899 (1996).

KAYNAKLAR (Devam)

234. DUBS-POTERSZMAN, M.C., TOCQUE, B. and WASYLYK, B. *MDM2 Transformation in the Absence of p53 and Abrogation of the p107 G1 Cell Cycle Arrest*, *Oncogene*, 11, 2445-9 (1995).
235. FINALY, C.A., *The MDM2 Oncogene can Overcome Wild-type p53 Suppression of Transformed Cell Growth*, *Mol. Cell. Biol.*, 13, 301-306 (1993).
236. LUNDGREN, K., MONTES DE OCA LUNA, R., McNEILL, Y.B., EMERICK, E.P., SPENCER, B., BARFIELD, C.R., LOZANO, G., ROSENBERG, M.P. and FINALY, C.A., *Targeted Expression of MDM2 Uncouples S Phase from Mitosis and Inhibits Mammary Gland Development Independent of p53*, *Genes and Develo.*, 11, 714-725 (1997).
237. KHATIB, Z.A., MATSUSHIME, H., VALENTINE, M., SHAPIRO, D.N., SHERR, C. and LOOK, T., *Coamplification of CDK4 Gene with MDM2 and GLI in Human Sarcomas*, *Cancer Res.*, 53, 5535-5541 (1993).
238. STEITZ, J.A., BERG, C., HENDRICK, J.B., La BRANCHE-CHABOT, H., METSPALU, A., RINKE, J. and YARIO, T. *A 5SrRNA/L5 Complex is A Precursor to Ribosome assembly in Mammalian Cells*, *J. Cell Biol.*, 106, 545-56 (1988).
239. MURDOCH, K.J. and ALLISON, L.A. *A Role for Ribosomal Protein L5 in the Nuclear Import of 5SrRNA in Xinopus Oocytes*, *Exp. Cell Res.*, 227, 332-43 (1996).
240. TCHANG, F., GUSSE, M., SOUSSI, T. and MECHALI, M. *Stabilization and Expression of High Levels of p53 During Early Development in Xinopus Laevis*, *Dev. Biol.* 159, 168-72 (1993).
241. WANG, X.W., YEH, H., SCHEFFER, L., ROY, R., MONCOLLIN, V., and EGLY, J-M. *p53 Modulation of TFIIH- Associated Nucleotide Excision Repair Activity*, *Nature, Genet.*, 10, 188-190 (1995).
242. FIDDLER, T.A., SMITH, L., TAPSCOTT, S.J. and THAYER, M.J. *Amplification of MDM2 Inhibits MyoD-Mediated Myogenesis*, *Mol. Cell Biol.*, 16, 5048-57 (1996).
243. SODDU, S., BLANDINO, G., SCORDIGLI, R., COEN, S., MARCHETTI, A., RIZZO, M.G., BOSSI, G., CIMINO, L., CRESCENZI, M. and SACCHI, A. *Interference with p53 Protein Inhibits Hematopoietic and Muscle Differentiation*, *J. Cell Biol.*, 134, 193-204 (1996).

KAYNAKLAR (Devam)

244. ALKHLAF, M., GANGULI, G., MESSADEG, N., LeMEUR, M. and WASYLYK, B. *MDM2 Overexpression generates a Skin Phenotype In Both Wild Type and p53 Null Mice*, *Oncogene*, 18, 1419-1434 (1999).
245. WEINBERG, W.C., AZZOLI, C.G., CHAPMAN, K., LEVINE, A.J. and YASUPA, S.H. *p53-Mediated transcriptional Activity Increase in Differentiating Epidermal Keratinocytes in Association with Decreased p53 protein*, *Oncogene*, 10, 2271-2279 (1995).
246. EISCHEN, M.C., WEBER, J.D., ROUSSEL, M.F., SHERR, C.J. and CLEVELAND, J.L. *Disruption of the ARF-MDM2-p53 Tumor Suppressor Pathway in Myc-Induced Lymphomagenesis*, *Genes and Dev.*, 13, 2658-69 (1999).
247. CLARK, A.P., STOTT, F. and PETERS, G. *p14^{ARF} Links the Tumor Suppressors RB and p53*, *Nature*, 395, 125-126 (1998).
248. HABER, D.E. *Splicing into Senescence: the Currious Case of p16 and p19^{ARF}*, *Cell*, 91, 555-558 (1997).
249. WEBER, J.D., JEFFERS, J.R., REHG, J.E., RANDLE, D.H., LOZANO, G., ROUSSE, M.F., SHERR, C.J. and ZAMBETTI, G.P. *p53 Independent functions of p19^{ARF} Tumor Suppressor*, *Genes and Dev.*, 14, 2358-65 (2000).
250. MARTELLI, F., HAMILTON, T., SILVER, D.P., SHARPLESS, N.E., BARDEESY, N., ROKAS, M., DEPINHO, R.A., LIVINGSTON, D.M., and GROSSMAN, S.R. *p19^{ARF} Targets Certain E2F Species for Degradation*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 4455-60 (2000).
251. SHARAMA, A.K. and SHARAMA, A. *Chromosome Techniques A Manual*, Harwood Academic Publishers, 1994.
252. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. *Molecular Cloning*, Second Edi. Cold Harbor Lab. Press, 1998.
253. DUNBER, B.S. *Protein Blotting A Practical Approach*, Oxford University Press, 1994.
254. BALTIMORE, G.C. *Staining procedures*, William & Wilkins, 4th ed. 1981.
255. TEMİZKAN, G.O. *Genetik*, İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, 2. Baskı, 1994.
256. JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRA, J., and KELLEY, O.K. *Basic Histology*, Appleton and Lange, 7th edition, 1992

KAYNAKLAR (Devam)

257. FISCHMAN, D.A., *The Synthesis and Assembly of Miyofibrils in Embriyonic Muscle*, Current Topics in Developmental Biology, 10, 235-280, (1983).
258. CHUNG, C.Y., and KANG, M.S., *Correlation Between Fibronectin and Its Receptor in Chick miyoblast Differentiation*, J. Cellular Phy., 142, 392-400, (1990).
259. GORBSKEY, G.J., *Chromosome Motion in mitosis*, BioEssays, 14(2), 73-80, (1992).
260. SPIZZ, G., ROMAN, D., STAUSS, A., and OLSON, E.N., *Serum and Fibroblast Growth Factor Inhibit myogenic Differentiation Through the Mechanism Dependent on Protein Synthesis and Independent of Cell Proliferation*, J., Bio., Chem., 261, 9483-9488, (1986).
261. LINSTEAD, P., JENNINGS, B., PRESCOTT, A., HAWLEY, P., WARN, R., and GIBSON, I., *Scanning Electron Microscopy and the Transformed phenotype*, Micron and Micros., Acta, 19, 155-162, (1983).

EK-1:**KULLANILAN SOLÜSYONLARIN HAZIRLANIŞI.****Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM) (10X)**

100 ml için:

13.42 g toz DMEM önce 80 ml steril distile su içinde çözülür, sonra toplam hacim 100 ml' ye distile su ile tamamlanır. 0.22 µm porlu filtre ile steril edilir ve +4 °C' de saklanır.

Kültür Vasatı (DMEM+%10 FBS= Fotal Sığır Serumı)

500 ml için:

%9.2 Steril sodyum bikarbonat çözeltisinden 20 ml (f. k. %1), penisillin/streptomisin solüsyonundan 5 ml (f.k.%1), Fötal sığır serumdan 50 ml (f.k. %10 olacak), 10X DMEM solüsyonundan 50 ml (f.k. %10) alınarak distile su ile 500 ml tamamlanır. 0.22µm porlu filtre ile steril edilir ve +4 °C' de saklanır.

NOT: Kullanılan DMEM L-glutamin içermiyorsa ayrıca glutamin solüsyonu ilave edilmelidir.(f.k. %1).

Kültür Vasatı (DMEM+%10 HS= At Serumı)

500 ml için:

%9.2 Steril sodyum bikarbonat çözeltisinden 20 ml (final k. %1 olacak), penisillin/streptomisin solüsyonundan 5 ml (f.k.%1 olacak), at serum 50 ml (f.k. %10 olacak), 10X DMEM solüsyonundan 50 ml (f.k. %10 olacak) alınır ve distile su ile 500 ml' e tamamlanır. 0.22 µm porlu filtre ile steril edilir ve +4 °C' de saklanır.

Puk's Saline-A (PSA)

100 ml için:

Potasyum klorür 0.4 g, sodyum klorür 8 g, sodyum bikarbonat 0.35 g, D-glukoz 1 g, fenol red 0.005 g 80 ml steril distile su içinde çözülür, NaOH ile pH 7.2-7.4 ayarlandıktan sonra toplam hacim 100 ml' ye distile su ile tamamlanır. 0.22 µm porlu filtre ile steril edilir ve +4 °C' de saklanır.

EDTA Solüsyonu (300mM)

100 ml için:

11.166 g EDTA 80 ml steril distile su içinde çözülür, NaOH ile pH 8.0 ayarlandıktan sonra toplam hacim 100 ml' ye distile su ile tamamlanır. Otoklav ile steril edilir ve +4 °C' de saklanır.

Tripsin Solüsyonu (2X)

100 ml için:

PSA 10 ml, %5 sodyum bikarbonat 0.7 ml, 300mM EDTA 0.33 ml, 10X tripsin-EDTA 25 ml. steril distile su ile 100 ml' ye tamamlanır. NaOH ile pH 7.2' ye ayarlanır, 0.22µm porlu filtre ile steril edilir ve +4 °C' de saklanır.

Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffer Saline-PBS) (1X)

1 lt için:

NaCl 8 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g, NaHPO₄ 1.14 g 800 ml steril distile su içinde çözülür, NaOH ile pH 7.3 ayarlandıktan sonra toplam hacim 1000 ml' ye distile su ile tamamlanır. Otoklav ile steril edilir ve +4 °C' de saklanır.

Lizis Tamponu

3 ml için

1 M Tris (pH 8.0) den 150 μ l, 5 M NaCl'den 90 μ l, %0.2 sodyum azid'ten 300 μ l, %100 NP-40'ten 30 μ l, 10 mM PMSF (1.74 mg/ ml) 170 μ l, 1.9 mg/ ml aprotonin'den 1.6 μ l, karışımı 2258.4 ml stril distle su ile 3 ml' ye tamamlanır.

Not: PMSF ve Aprotenin kısa ömürlü olduklarından dolayı karışıma hemen kullanılmadan önce kullanılması tavsiye edilir.

SDS Jel Yükleme Tamponu (2X)

2X final konsantrasyon için:

Tris-base (pH 6.8) 100 mM, DTT 200mM, SDS %4, bromfenol blue % 0.04 (renk göz kararı ile ayarlanabilir), glyserol % 20.

1 M Tris-HCl (pH 6.8) den 1 ml, 1 M DTT'ten 2 ml, %20 SDS'ten 2 ml, bromfenol blue'den 0.004 g (renk göz kararı ile ayarlanabilir), % 100 glyserol'den 2 ml alınır ve distile su ile 10 ml' ye tamamlanır. +4 °C' de saklanır.

Transfer Tamponu (1X)

1 litre için:

2.9 g glisin, 5.8 g Tris base, 0.37 g SDS, 200 ml metanol. 800 ml steril distile su içinde çözülür, NaOH ile pH 8.3-8.5 ayarlandıktan sonra toplam hacim 1000 ml' ye distile su ile tamamlanır. +4 °C' de saklanır.

Coomasie Brilliant Blue R250 boyası

0.25 g Coomasie Brilliant Blue boyası, 90 ml metanol:H₂O (1:1 v/v), 10 ml Glasiyal asetik asit. +4 oC' de saklanır

Elektroforez Tamponu (10X)

500 ml için:

72 g Glisin, % 10 SDS 25 ml, 15.15 g Tris-base. 400 ml distile su içinde çözülür, NaOH ile pH 8.3-8.5 ayarlandıktan sonra toplam hacim 500 ml' ye distile su ile tamamlanır. +4 oC' de saklanır.

Destain Tamponu

1 litre için:

Metanol'den 50 ml, Glasiyal asetik asitten 75 ml alınır ve distile su ile 1000 ml' ye tamamlanır

Filtre Yıkama Tamponu

100 ml için:

Final konsantrasyon için: 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), %0.02 Tween 20.

300 mM NaCl'den 50 ml, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) den 20 ml, %100 Tween 20'den 20 µl alınır ve distile su ile 100 ml' ye tamamlanır. +4 oC' de saklanır.

Bloklama Solüsyonu (%5)

5 g süt tozu 100 ml yıkama tamponunda çözülür.

F.K. = Final Konsantrasyon