

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

**P53-/- ve P53 +/- HCT116 KOLON KANSER HÜCRE SERİLERİNDE RADYASYONUN HÜCRE  
PROLİFERASYONU VE TELOMERAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Danışman Öğretim Üyesi  
**Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu**

Biyolog Sevil OSKAY

ANKARA  
2008

Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu danışmanlığında Sevil Oskay tarafından hazırlanan bu çalışma 03/01/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Bařkan: Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu.....

İmza:

Üye: Prof. Dr. Dicle Güç.....

İmza:

Üye: Prof. Dr. Çiđdem Güngör.....

İmza:

Üye: Doç. Dr. Aslıhan Avcı.....

İmza:

Üye: Yar. Doç. Dr. Sena Aydos.....

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

(imza)

Prof. Dr. Nejat AKAR  
Enstitü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>2</b>
2.1 Radyasyon.....	2
2.1.1 İyonize Olmayan Radyasyon= Ultraviyole Radyasyon.....	2
2.1.2 İyonize Radyasyon=IR.....	3
2.2 Radyasyonun Biyolojik Etkileri.....	3
2.3 p53.....	4
2.3.1 TP53 Geninin Keşfi ve Mutasyonları.....	4
2.3.2 TP53 Geni Tarafından Kodlanan p53 Proteini ve Yapısı.....	6
2.3.3 p53 ve Hücrel Yanıt.....	6
2.3.4 p53' ün Regülasyonu.....	7
2.3.4.1 p53 ve Mdm2.....	7
2.3.4.1.1 Ubikütinasyon.....	8
2.3.5 IR ve p53.....	10
2.3.5.1 p53' ün Translasyon Sonrası Modifikasyonları ile IR' ye Karşı Hücrel Yanıt Oluşumu.....	10
2.3.5.1.1. p53 ve Hücre Döngüsünde G1/S Engeli.....	12
2.3.5.1.2 p53 ve Hücre Döngüsündeki G2/M Engeli.....	13
2.3.5.1.3 p53 ve Apoptozis.....	14
2.3.5.2 IR' ye Karşı p53' den Bağımsız Hücrel Yanıt.....	15
2.3.5.2.1 IR' ye Karşı p53'den Bağımsız G1/S ve G2/M Engeli.....	15
2.3.5.2.2 IR' ye Karşı p53' den Bağımsız Apoptozis.....	16
2.3.6 p53 ve Telomeraz.....	16
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
3.1 Gereç.....	19
3.2 Yöntem.....	19
3.2.1 DeneY Planı.....	19
3.2.2 Hücre Serilerinin Kültürü ve Pasajlanması.....	20
3.2.2.1 Besiyerinin Hazırlanması.....	20
3.2.3 Hücre Serilerine Gama Radyasyonunun Uygulanması.....	20
3.2.4 MTT Yöntemiyle Canlı Hücre Aktivitesinin Belirlenmesi.....	21
3.2.5 Tyripan Blue ile Canlı ve Ölü Hücre Sayımı.....	21
3.2.6 Hücre Döngüsü ve Apoptozis Tayini (Sub G0/G1 Fazı) için Akım Sitometri Yöntemi.....	21
3.2.7 Telomeraz Aktivitesi.....	21
3.2.7.1 Protein Ekstraksiyonu.....	22

3.2.7.2 Protein Miktarının Ölçümü.....	22
3.2.7.3 TRAP.....	23
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>30</b>
4.1 Hücrelerde Canlılık Oranı, Telomeraz Aktivitesi, Hücre Döngüsü ve Apoptozis.....	30
4.1.1 Metabolik Hücre Aktivitesi ve Canlılık Oranı.....	30
4.1.2 Tyripan Blue ile Canlı ve Ölü Hücre Oranı.....	30
4.1.3 Hücrelerde Apoptozis Oranı.....	31
4.1.3.1 Sub-Diploid DNA İçeriğine Göre Apoptozis Oranları.....	31
4.1.4 Hücre Döngü Analizi ve Apoptozis Sonuçları.....	32
4.1.5 Telomeraz Aktivitesi.....	34
4.1.6 Hücre Morfolojilerinin Faz Kontrast Mikroskoptaki Görüntüsü.....	35
4.1.7 İstatistiksel Bulgular.....	36
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>39</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>43</b>

## **P53<sup>-/-</sup> ve P53<sup>+/+</sup> HCT116 Kolon Kanser Hücre Serilerinde Gama Radyasyonunun Hücre Canlılığı ve Telomeraz Aktivitesi Üzerine Etkisi**

### **ÖZET**

P53 bir tümör baskılayıcı gen dir ve ayrıca " genomun gardiyanı olarak da bilinir. P53 tümör baskılayıcı çeşitli genotoksik stresler aracılığıyla aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. Çeşitli tip DNA hasarına cevapta p53 baskılayıcı gen ürünü aktive olur ve hücre döngüsünün durdurulması, apoptozis ve DNA onarımı gibi bir çok "down-stream" hücre sel olaylar düzenler.

Bu çalışmada, fonksiyonel p53 aktivitesine bağılı olarak kolon kanseri hücrelerinde radyasyona cevaben hücre döngüsü duraklaması, apoptozis ve telomeraz aktivitesi karakterize edilmiştir. Bu çalışmada, yaban tip p53 HCT116 ve mutant p53 HCT116 hücrelerine 5 Gy gama radyasyonu uygulanmıştır. 5 Gy gama radyasyonu uygulamasından sonra p53 yaban tip hücre serilerinde G<sub>1</sub>/S engeli gözlenirken p53<sup>-/-</sup> hücre serilerinde G<sub>2</sub> fazında duraklama meydana geldiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, tek başına p53 fonksiyonunun radyasyona maruz bırakılan insan tümör hücrelerinde hücre döngüsünü, G<sub>2</sub>M' den kontrol edemediğini göstermektedir. Tümörlerdeki telomeraz aktivitesi, sıklıkla p53 aktivitesi ile ilişkilidir. p53'ün ayrıca telomeraz için anahtar bileşen olan insan telomeraz ters transkriptaz (hTERT)' in güçlü bir inhibitörü olduğu bilinmektedir. Burada sunulan çalışmada, 5 Gy gama radyasyonu uygulan, p53<sup>+/+</sup> hücre serilerinde, telomeraz aktivitesi azalırken p53<sup>-/-</sup> hücre serilerinde arttığı tespit edilmiştir.

**The Effects of Gamma Irradiation on Cell Viability and Telomerase Activity in  
P53<sup>-/-</sup> ve P53<sup>+/+</sup> HCT116 Colon Cancer Cell Lines**

**ABSTRACT**

P53 is a tumor suppressor protein and also known as “Guardian of the Genome”. The p53 tumor suppressor is a transcription factor that is activated by diverse genotoxic stresses. In response to variety types of DNA damage, the p53 tumor suppressor gene product is activated and regulated number of downstream cellular processes such as cell cycle arrest, apoptosis and DNA repair.

The current study designed to response to radiation in the colon cancer cells in term of dependence on functional p53 activity. Studies were performed in p53 wild-type HCT116 cells and HCT116 cells with mutant p53. Exposure to 5 Gy gamma irradiation resulted in G<sub>1</sub>/S arrest in p53 wild-type cell line, and in G<sub>2</sub> phase arrest in p53<sup>-/-</sup> cell line. These results suggest that p53 function alone does not control the progression of irradiated human tumor cells from G<sub>1</sub>/S and G<sub>2</sub>/M. Telomerase activity is associated with p53 mutation. It is known that p53 is also a powerful inhibitor of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) a key component for telomerase. In the present study, we demonstrated that telomerase activity decreased in p53<sup>+/+</sup> cells whereas increased activity was detected in p53<sup>-/-</sup> HCT116 cells following exposure 5 Gy to ionizing radiation.

## TEŞEKKÜR

Bana araştırma olanağı sağlayan, yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu (Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi)' na, çalışmamın her safhasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Dr. Bio. Güvem Gümüő Akay (Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi)' a, deneyler için laboratuvar koşullarını sağlayan, analizler esnasında yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen Öğr. Gör. Hande Canpınar (Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji AD)' a, deneylerim sırasında içtenlikle yardım eden Uzm. Bio. Aynur Karadađ (Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi)' a, yine yardımlarını esirgemeyen Bio. Sibel Arat (Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi)' a, Uzm. Bio. Tülin Özkan (Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi)' a, Uzm. Bio. Buket Altınok (Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi)' a, Bio. Nuray Varol (Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi)' a, çalışmam için gerekli olan hücre serilerini sağlayan Prof. Dr. Bert Vogelstein (John Hopkins Üniversitesi Moleküler Biyoloji AD)' a sonsuz teőekkürler.

Sevil OSKAY

Ankara, 2007

## SİMGELER DİZİNİ

CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
DABSYL	(4-(dimetilamin)azo benzen sülfonik asit)
dH <sub>2</sub> O	distile su
NaCl	Sodyum klorür
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
Tris-HCl	Tris- Hidroklorik asit
TSR8	Telomeraz reaksiyonu için TTAGGG tekrarı içeren solüsyon



## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>APC</b>	Ademotus Polipozis Coli
<b>APS</b>	Amonyum-persülfat
<b>ATM</b>	Ataxia Talangiectasia Mutated gene
<b>ATR</b>	Ataxia Talangiectasia Related gene
<b>BAX</b>	Proapoptotik protein
<b>BCL</b>	Antiapoptotik protein ailesi
<b>BCL-XL</b>	Antiapoptotik bir protein
<b>BID</b>	Proapoptotik protein
<b>BRCA1</b>	Meme kanseri 1 geni
<b>CAK</b>	CDK Activated kinase
<b>CBP</b>	CREB-Binding protein
<b>CDK</b>	Siklin bağımlı kinaz
<b>CHK1</b>	Serin treonin kinaz 1
<b>CHK2</b>	Serin treonin kinaz 2
<b>CK II</b>	Casein Kinase II
<b>DISC</b>	“Death Inducing Signaling Complex”
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>EDTA</b>	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>FADD</b>	FAS( TNFRSF6) associated via death domain
<b>FBS</b>	Fetal dana serumu
<b>G1</b>	Gap 1
<b>G2</b>	Gap2
<b>HAUSP</b>	Ubiquitin-specific protease
<b>HECT</b>	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus domain
<b>HDM2</b>	“Human Double Minute 1” geni
<b>IR</b>	İyonize radyasyon
<b>MDM2</b>	“Murine Double Minute 1” geni
<b>NOXA</b>	Proapoptotik Protein
<b>PBS</b>	Phosphate- Buffer-Saline
<b>PCAF</b>	CBP-associated factor
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PK</b>	Protein kinaz
<b>PUMA</b>	Proapoptotik protein
<b>RAD3</b>	Mayalarda DNA tamirinden sorumlu bir protein
<b>Rb</b>	Retinoblastoma tümör baskılayıcı geni
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>RING</b>	U-box domain
<b>S</b>	Sentez
<b>SV-40</b>	Simian Virüs-40
<b>TAD</b>	Transaktivasyon domaini
<b>TERT</b>	Telomerazın katalitik alt ünitesi
<b>TERC</b>	Telomerazın RNA alt ünitesi

**TRAP**  
**UV**

Telomerase Repeat Amplification Protocol  
Ultraviyole radyasyon

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. UV radyasyonu ve hücresel etkileri.....	2
Şekil 2.2. Eksitasyon ve iyonizasyon.....	3
Şekil 2.3. DNA' da UV ve IR' nin neden olduğu hasarlar.....	4
Şekil 2.4. p53 fonksiyonlarının şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.5. TP53 geni.....	5
Şekil 2.6. p53 proteininin formülü ve translasyon sonrası modifikasyonu.....	6
Şekil 2.7. p53'ün aktive olduğu koşullar.....	6
Şekil 2.8. p53 proteinin genotoksik ve onkojenik sinyaller tarafından regülasyonu.....	8
Şekil 2.9. p53 regülasyonunda Mdm2-bağımlı ve Mdm2-bağımsız mekanizmalar.....	9
Şekil 2.10. p53' ün fosforillenme ve asetilasyon bölgeleri.....	10
Şekil 2.11. In vivo' da DNA hasarlarına yanıt olarak p53' ün post-translasyonel modifikasyon modeli.....	11
Şekil 2.12. p53'ün DNA hasarına karşı yanıt verme basamakları.....	12
Şekil 2.13. p53 ve hücre siklus kontrol noktaları.....	13
Şekil 2.14. p53 ve apoptozis.....	15
Şekil 2.15 p53 ve Cdc25 aracılı G1/S ve G2/M engeli.....	16
Şekil 2.16. Telomer disfonksiyonu ve p53 cevabı.....	18
Şekil 3.1. Hücrelerin taksimi.....	19
Şekil 3.2. 96'lık plaktaki örnek ve standart solüsyonların yerleşim düzeni.....	23
Şekil 3.3. TRAPEze XL Telomerase Detection Kit'in Çalışma Prensipleri.....	25
Şekil 4.1. K p53+/+ve K p53-/- hücre serilerinde G1, S ve G2 safhası.....	32
Şekil 4.2. IR p53-/- hücre serilerinde G1 safhası ve apoptozis.....	33
Şekil 4.3. IR p53+/+ hücre serilerinde G1, S safhası ve apoptozis.....	33
Şekil 4.4. K p53+/+ hücre serisinde 72. saat sonrası morfolojik şekil.....	35
Şekil 4.5. IR p53+/+ ve IR p53-/- hücre serilerinde 72. saat sonrası morfolojik değişiklik.....	35

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Protein kantitasyonu için hazırlanan 1. tip standardın içeriği.....	23
Çizelge 3.2 TRAP <sub>EZE</sub> XL kitinin içeriği.....	26
Çizelge 3.3 TRAP reaksiyon içeriği.....	27

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 3.1.</b> TSR8 standart tablosu ve telomeraz kantitasyonu için elde edilen formül.....	29
<b>Tablo 4.1.</b> Hücre serilerindeki canlılığın günlere göre oranı.....	30
<b>Tablo 4.2.</b> Hücre serilerinin tyripan blue boyaması sonrasında günlere göre ölü hücre oranları.....	31
<b>Tablo 4.3.</b> Hücre serilerinin Sub-G <sub>0</sub> fazıanalizi sonrasında günlere göre apoptotik oranlar.....	31
<b>Tablo 4.4.</b> N p53+/+ ile IR p53+/+ ve N p53-/- ile IR p53-/- hücre serilerindeki telomeraz aktivitesinin karşılaştırılması.....	34
<b>Tablo 4.5.</b> IR p53 -/- i le IR p53+/+ ve N p53-/- ile IR p53 +/+ hücre serilerindeki telomeraz aktivitesinin karşılaştırılması.....	34
<b>Tablo 4.6</b> K p53-/- hücrelerinin zamana bağlı olarak hücre siklusu ve apoptozisin istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	36
<b>Tablo 4.7.</b> K p53+/+ hücrelerinin zamana bağlı olarak hücre siklusu ve apoptozisin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	37
<b>Tablo 4.8</b> IR p53-/- hücrelerinin zamana bağlı olarak hücre siklusu ve apoptozisin istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	37
<b>Tablo 4.9</b> IR p53+/+ hücrelerinin zamana bağlı olarak hücre siklusu ve apoptozisin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	38

## 1. GİRİŞ

Gama radyasyonu gibi iyonize radyasyon formlarının DNA' da çeşitli hasarlar meydana getirdiği bilinmektedir ve bu hasarlara karşı öncül yanıtın p53 aracılı yollarla verildiği bilinmektedir. 5 Gy gama radyasyonunun özellikle tümör hücrelerine uygulanmasının ardından bu hücrelerde meydana gelen morfolojik farklılıklarla birlikte apoptozis oranında artış gözlenmektedir. Bunun yanı sıra gama radyasyonu uygulamasının ardından hücrelerdeki telomeraz aktivitesi, hücre tiplerine göre değişmekle birlikte; telomeraz ve p53 ekspresyonlarında genellikle artış saptandığı bildirilmektedir. Gama radyasyonunun dozuna bağlı olarak p53 aktivitelerindeki değişikliklerin yanında hücre döngüsü kontrol noktalarında da farklı dozlarda farklı yanıtlar oluşmaktadır. Hücreler radyasyona maruz kaldıklarında öncelikle G1/S safhasında engellenirler ve radyasyon dozuna ve hasar miktarına göre bu safhadan sonra hücrenin ne yapacağına karar verilir. Eğer radyasyon dozu düşük ve hasar tamir edilebilecek düzeydeyse hasarın tipine göre ilgili tamir mekanizmaları devreye girer ve DNA' daki hasar tamir edildikten sonra hücrenin tekrar döngüye girmesi sağlanır. Bunun tersine hücre yüksek doz bir radyasyon dozuna maruz kaldıysa, G1 engelinde bekledikten sonra genellikle bu safhada kalıcı bir hücre siklus engeline girer ve senesensi takiben apoptozis gerçekleştirilir ya da hasarlı hücrenin direk eliminasyonu için programlı hücre ölümü ile ilgili yollar uyarılarak hücrenin ölümü hızlı bir şekilde gerçekleştirilir. Hücrelerde ve özellikle DNA' daki hasarlar karşısında hücrede, yanıtın sorumlu olan başlıca molekülün p53 olduğu bilinmektedir ancak yeni çalışmalarla birlikte yukarıda bahsedilen yolların p53' den bağımsız olarak da uyarıldığını belirten çalışmalar bulunmaktadır. Aynı zamanda p53 aracılı olarak telomeraz aktivitesinin baskılandığı ve bunu HTERT üzerinden yaptığı bilinmektedir. Bu bakımdan yapılan bu tez çalışması bu yollarla ilgili hipotezlerin aydınlatılması bakımından ek bir çalışma olarak önem taşımaktadır.(Westphal C.H. ve ark., 1998, Siwicki J.V. ve ark., 2003, Vavrova J. ve ark., 2004, Serakinci N. ve ark., 2007)

Bu tez çalışmasında; p53 +/+ ve p53 -/- HCT116 kolon kanser hücre serilerine 5 Gy Gama radyasyonu uygulamasını takiben 0.,24.,48. ve 72. saatlerde telomeraz aktivitesi, hücre canlılığı, apoptozis ve hücre döngüsü profilleri üzerine radyasyonun etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Radyasyon

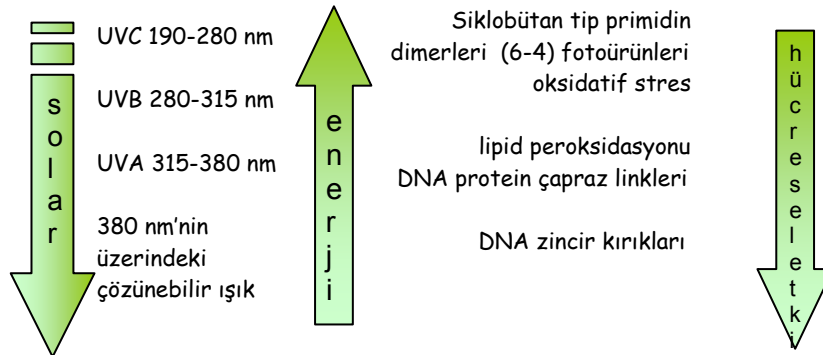
Radyasyon; güneş sisteminden ya da yeryüzündeki doğal kaynaklardan salınan elektromanyetik dalgalar ya da parçacıklar biçimindeki enerji emisyonu (yayımı) ya da aktarımıdır.

Radyasyonun keşfi ilk olarak 1895’ de Wilhelm Conrad Roentgen tarafından X-ray ışınlarının bulunmasıyla gerçekleştirilmiştir. Radyasyonun keşfiyle birlikte bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmış ve Nobel ödüllü Marie Curie tarafından da uranyumun doğal radyoaktivitesinin keşfiyle birlikte, özellikle tıp alanındaki çalışmalar önem kazanmıştır. Radyasyonun zararlı etkileri ile ilgili ilk rapor 1902’ de yayımlanan radyasyonun indüklediği deri kanseri ile ilgilidir. 1911’ de radyasyonun sebep olduğu ilk lösemi vakası ortaya çıkmıştır. Bu raporları 1920’ de radyum içerikli boyalarla çalışan ressamalarda teşhisi konulan kemik kanseri, 1940’ lı yıllarda da ilk radyologlar arasında lösemideki artışla birlikte radyasyonun zararlı etkileri tarihsel olarak açıklanabilmektedir. Ayrıca ABD’ nin, Japonya’ nın Hiroşima ve Nagasaki bölgelerine attığı atom bombası ve buna benzer Çernobil faciasının ardından bu bölgelerde özellikle ergen çağlardaki kişilerin radyasyona maruz kalmasıyla birlikte, yetişkin dönemde, özellikle meme ve tiroit kanserlerindeki artış da radyasyonun ne derece zararlı olduğunu altını çizmektedir.

Radyasyon biyolojik anlamda incelendiğinde iki ana sınıfa ayrılabilir:

#### 2.1.1 İyonize olmayan radyasyon=Ultraviyole Radyasyon

İyonize olmayan radyasyon formuna örnek olarak verilebilecek radyasyon ise ultraviyole radyasyondur. UV, güneş tarafından yayılan ve göz tarafından algılanmayan radyasyon tipidir. UV radyasyonu farklı dalga boylarına sahip üç ayrı alanda ya da tipte incelenebilmektedir. UVA 315-380 nm, UVB 280-315 nm ve UVC ise 190-280 nm dalga boyları arasındadır. Dalga boyları ile radyasyonun enerjisi arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. Bu nedenle dalga boyu en az ve dolayısıyla enerjisi en yüksek olan UVC’ nin daha ağır hücresel hasarlara neden olabileceği söylenebilmekte ve yine dalga boyu en yüksek ve enerjisi en az olan UVA’ nın da hücresel zararlarının tolere edilebilecek düzeyde olduğundan bahsedilebilmektedir. Ozon tabakası UVC’ nin neredeyse tamamını ve UVB’ nin de %90’ nını absorbe edebilmektedir. UVB’ nin % 10’ luk kısmı ve UVA ise yeryüzüne ulaşmaktadır. UV radyasyonu, deride yanma, immün baskılanma, ekstraselüler matrikste değişiklikler ve deri yaşlanmasını içine alan bir takım etkiler yaratmaktadır. UV radyasyonun etkileri şekil 2.1’ de şematize edilmiştir. (Leena Latonen ve Marikki Laiho, 2005)



Şekil 2.1. UV radyasyonu ve hücresel etkileri

## 2.1.2 İyonize Radyasyon=IR

İyonize radyasyon ise doğada ya da güneş sistemindeki kararsız atomların (radyoizotopların) kararlı yapıya ulaşmak için yaydıkları enerji=radyasyon olarak bilinmektedir.

İyonize radyasyon yayılma açısından incelendiğinde iki temel kısma ayrılmaktadır:

1\* Dışsal (eksternal) yayılım: Bir kaynaktan yayılan ve doz bağımlı olarak vücuda penetre olabilen radyasyon yayılımıdır. Bu yayılım şekliyle radyoaktif materyalin yaydığı radyasyonun enerjisine ve tipine göre 3 ana sınıf söz konusudur:

Beta partikülleri: P-32 gibi kaynaklardan salınan oldukça yüksek enerjiye sahip olan beta partikülleri deride ya da gözde hasarlar meydana getirebilmektedir ve deriye birkaç milimetre nüfuz edebilmektedir. Bu radyasyonun etkisini en aza indirmek için kalın pleksiglas levhalara gereksinim duyulmaktadır.

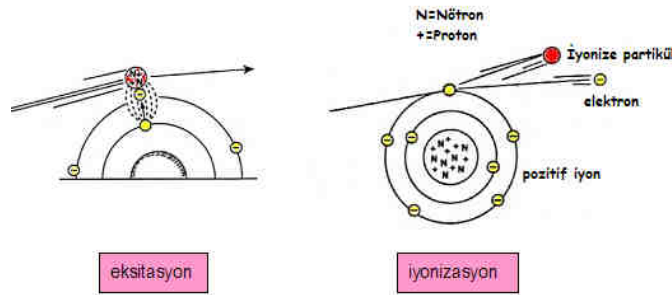
Alfa partikülleri: Dış deriye nadiren nüfuz edilmekte ve beta partiküllerinden daha geniş bir elektrik yüküne sahiptir.

Gama ve X ışınları: Her ikisinde penetrasyon gücü oldukça yüksektir ve mutlak korunmak gereklidir.

2\* İçsel (internal) yayılım: İçsel yayılım ise vücutta bulunan radyoaktif maddelerden salınan yayılım şeklidir. Vücuttaki bu radyoaktif maddelerin kaynağı da alınan hava, besinler ve deri teması olabilmektedir.

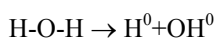
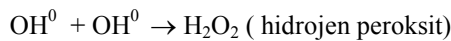
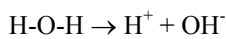
## 2.2 Radyasyonun biyolojik etkileri

Radyasyonun atomik düzeydeki etkisi elektronların eksitasyonu yani  $e^-$  nin bir üst yörüngeye geçmesi şeklinde olmaktadır.(Şekil 2.2). Radyasyonun gücüne göre  $e^-$  ya üst yörüngede kalacak ya da  $e^-$  nin salınımı sonucu geriye iyonize olmuş bir atom kalacaktır ki bu da büyük çoğunluğu sudan oluşan bir hücrede radyasyonun dozuna göre çeşitli hasarlara sebep olacaktır.



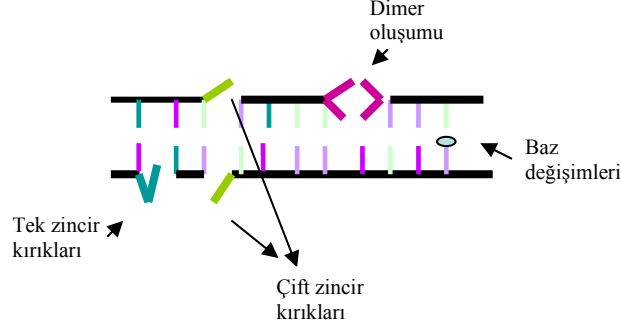
Şekil 2.2. Eksitasyon ve iyonizasyon

Radyasyonun atom üzerinde neden olduğu eksitasyon ve iyonizasyonun ardından bir üst yörüngeye geçen  $e^-$  hücrede özellikle makromoleküllerde ve DNA' da hasarlar meydana getirmektedir. Serbest  $e^-$  etkisini direkt ya da indirek olarak meydana getirmektedir. Direkt etkide serbest kalan bu  $e^-$  etkisini, DNA' da fosfodiester bağları ya da H bağları üzerinde göstermekte ve bu bağlardaki atomlara afinite göstererek bağların kırılmasına sebep olmaktadır. Özellikle fosfodiester bağlarının kırılması DNA' da tek ya da çift zincir kırıklarına sebep olmaktadır. İndirek etkide ise serbest kalan bu  $e^-$  hücredeki su molekülleri ile etkileşime girerek suyun radyolizisine neden olmaktadır. Burada meydana gelen reaksiyon şu şekildedir:





Bir serbest radikal, elektriksel olarak, orbitalinde paylaşılmamış bir  $e^-$  'ye sahiptir. Radikal elektrofildir ve yüksek oranda reaktiftir. Serbest radikallerin DNA ile etkileşimi ile DNA' da baz değişimleri, çift ve tek zincir kırıkları gibi bir takım hasarlar meydana gelmektedir. UV ve IR' nin neden olduğu hasarlar şekil 2.3' de özetlenmiştir.



**Şekil 2.3.** DNA' da UV ve IR' nin neden olduğu hasarlar

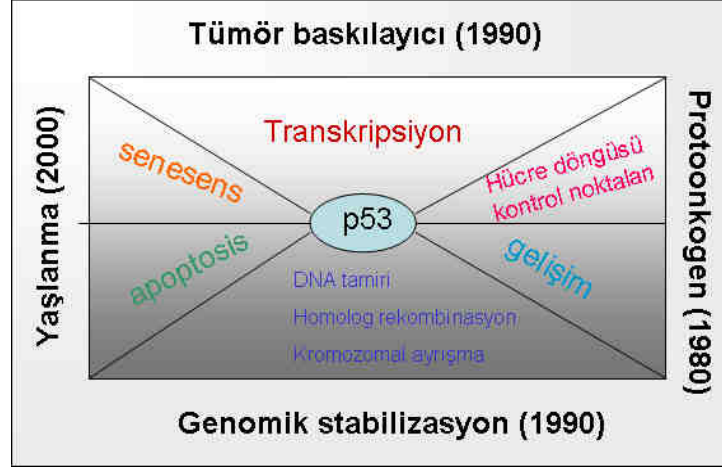
Memeli hücrelerinde, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi sırasında, hücre içinde, genotoksik kimyasal ajanlar; hücre dışında oksidatif metabolizma ile iyonize radyasyon, bir takım stres koşullarını ortaya çıkarabilmektedirler. Bu çevresel stres koşulları sırasında genetik bilgiyi barındıran DNA' nın replikasyonunda ya da genetik integrasyonda bozukluklar meydana gelmektedir.

Memeli hücrelerinde radyasyon tarafından indüklenen DNA hasarı, metabolik tamir işlemleri ile düzeltilmeye çalışılmaktadır. Genomik integrasyonun devamlılığında önemli bir yolak da tumor baskılayıcı bir gen olan p53 proteinini içine almaktadır. p53 DNA hasarına karşı hücrenin yanıtının oluşmasında merkezi bir rol üstlenen transkripsiyonel bir regülatördür. p53; öncelikle hücre siklus kontrolünü G1/S kontrol noktasında, daha sonra ise G2/S kontrol noktasında olmak üzere siklus progresyonunun engellenmesinde görev almaktadır. (Andrew J. Grosovsky, 2006, Little J.B., 2003, Caspari T., 2000, Lakin ND ve ark. 1999.)

## 2.3 p53

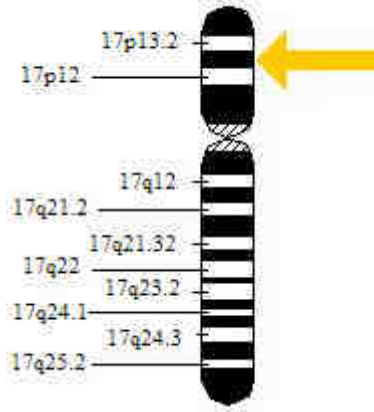
### 2.3.1 TP53 geninin keşfi ve mutasyonları

p53 ilk defa 25 yıl önce heksamerik DNA helikaz ve Simian Virus (SV-40) büyük-T antijenine bağlanan 53kD ağırlığında bir protein olarak keşfedilmiştir. Neoplastik rodentlerde ve insan hücrelerinde, p53' ü kodlayan TP53 geni, zayıf onkojenik özellikleri nedeniyle başlangıçta onkogen olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar, 1980' lerde insan ya da fare tümör hücre serilerinden elde edilen orijinal TP53 cDNA klonlarında yanlış anlamlı mutasyonları incelemeye başlamışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarda, yabancı tip TP53' e sahip rodent fibroblastlarında neoplastik transformasyonun ayrıca, kanser hücrelerinin gelişiminin baskılandığı gösterilmiştir. TP53 ile ilgili yapılan çalışmaların artmasıyla birlikte tümör baskılayıcı bir gen olduğu ve ayrıca bir çok kanser türünde mutasyona uğradığı bildirilmiştir. (Şekil 2.4) (Hussain S.P. ve Harris C.C., 2006)



Şekil 2.4. p53 fonksiyonlarının şematik gösterimi

*TP53*; anlamsız mutasyonlar, delesyon ya da insersiyon gibi mutasyonlara maruz kalan APC, BRCA1 ve ATM gibi tümör baskılayıcı genlerin aksine, sadece tümör baskılayıcı işlevi ile ilgili fonksiyonlarını yanlış anlamlı mutasyonlar sonucu kaybetmekte ve bu da onkojenik bir işlev kazanmasına yol açabilmektedir. p53 evrimsel süreçte sıkı bir şekilde korunmuştur. Genin korunmuş bölgelerinde meydana gelen nokta mutasyonları tekli aminoasit yer değişimleriyle p53'ün DNA bağlanma bölgesinde bozulmalara neden olabilmektedir. *TP53* geni 17. kromozomun p13 konumunda yerleşmiş olup bu ailenin bilinen 3 üyesi bulunmaktadır. (Şekil 2.5) Bildirilen 20.000 mutasyon oranıyla birlikte kanserlerin % 50'ünde *TP53* gen mutasyonlarının olduğu bilinmektedir. (Liang S.H. ve Clark M.F., 2001, Brooks L.C. ve Gu W., 2003, Latonen L. ve Laiho M., 2005, Hussain S.P. ve Harris C.C., 2006, Toledo F., ve Wahl G.M., 2006)

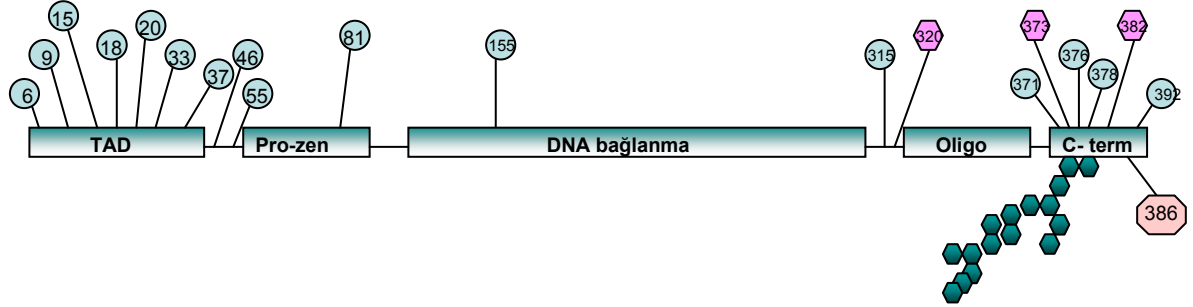


Şekil 2.5. *TP53* geni

*TP53* tümör baskılayıcı gende meydana gelen yapısal mutasyonların yanı sıra, yaban tip p53'ün fonksiyonel inaktivasyonu da bu genin düzenlenmesini içeren yolların bozulmasına neden olmakta, bu da malignansinin oluşmasına yol açmaktadır. (Liang S.H. ve Clark M.F., 2001)

### 2.3.2 TP53 geni tarafından kodlanan p53 proteini ve yapısı

TP53 geni tarafından kodlanan insan p53 proteini 393 aminoasit içermektedir ve son yıllardaki makalelerde moleküler ağırlığının 43.6 kDa olduğu belirtilmektedir. Bir transkripsiyon faktörü olarak bilinen p53, özgül özelliklere sahip farklı, ancak birbiriyle ilişkili işlevsel domainlere sahiptir. p53'ün transaktivasyon domaini (TAD; 1-42 aminoasit) proteinin N terminal ucunda bulunmaktadır. TAD'in ardından prolince zengin bir bölge gelmektedir. Bu dizinin ardından p53'te merkezi rolü üstlenen DNA bağlanma bölgesi bulunmaktadır. p53'ün C terminali, esnek bağlanma bölgesi ve temel olarak C terminalini düzenleyen oligomerizasyon domainini içermektedir. (Şekil 2.6) (Latonen L. ve Laiho M., 2005)

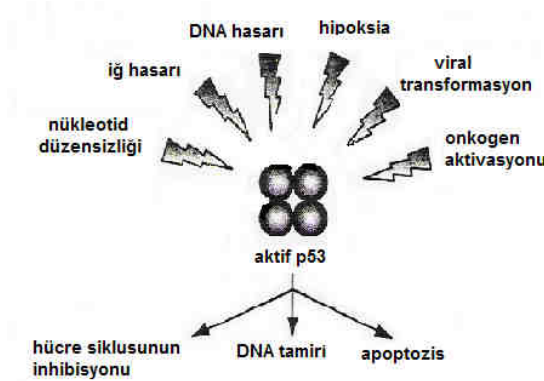


Şekil 2.6. p53 proteininin formülü ve translasyon sonrası modifikasyonu

### 2.3.3 p53 ve hücresel yanıt

Hücre, DNA hasarı gibi bir durumla karşılaştığında bu hasar çok çeşitli mekanizmalarla giderilmeye çalışılmaktadır. DNA hasarı söz konusu olduğunda P53 tümör baskılayıcı gen ürünü olan p53 aktive edilmekte ve bu da hücre siklus inhibisyonu, apoptozis, DNA tamiri ve yaşlanmayı içeren antiproliferatif bir etkiye neden olmaktadır. (Adimoolam S. ve J. Ford M., 2003, Brooks C. L. & Gu W., 2003, Latonen L. & Laiho M., 2005)

Bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan p53, DNA hasarı, hipoksi, viral transformasyon, onkogen aktivasyonu, iğ hasarı, nükleotid düzensizliği gibi hücrede meydana gelen bir çok bozukluk sonrası aktive edilerek hasarlı hücrenin proliferatif yayılımını engelleyecek olan gen ekspresyon programını başlatmaktadır. Böylece organizmayı kanser gelişimine karşı korumaktadır. (Şekil 2.7) (Vousden K.H., 2000, Vogelstein B. Ve ark., 2000, Liang S.H. ve Clark M.F., 2001, Vousden K.H. ve Lu X., 2002, Sharpless E.N. ve DePinho A. R., 2002, Wesierska- Gadek J. ve Schmid G., 2005)



Şekil 2.7. p53 çeşitli stres koşullarıyla aktive edilir ve sonuçta p53 aracılı hücre siklus inhibisyonu ya da apoptoz gerçekleştirilir. (Leena Latonen, Marikki Laiho, 2005)

Olumsuz koşullar sonrasında meydana gelen hasarların çeşitli hücresel yollarla düzeltilmeye çalışıldığı bilinmektedir. Hücrede hasar oluşumundan sonra bu hücrenin akıbeti ile ilgili 3 temel olasılık bulunmaktadır. Hücrede meydana gelen hasar çeşitli tamir mekanizmalarıyla tamir edilmeye çalışılacak, veya hasar tamir

edilmezse organizmanın korunması için hasarlı hücrenin ölümü gerçekleştirilecek ya da hücre bu hasarı ortadan kaldıramayarak çeşitli mutasyonları biriktirecek ve karsinogenez meydana gelecektir. p53, hücrenin akıbetini ilgilendiren bu 3 temel olayla yakından ilişkilidir. p53, DNA hasarı söz konusu olduğunda hücre döngüsünü durduran, DNA'nın tamirini gerçekleştiren ve hücreyi apoptozise yönlendiren çeşitli yolları harekete geçirmekten sorumludur. Aynı zamanda p53'ün hücreyi senesense ve farklılaşmaya yönlendirdiği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. (Vousden K.H., 2000, Latonen L. & Laiho M., 2005).

### 2.3.4 p53'ün regülasyonu

Normal bir hücrede p53 proteini çok hızlı bir şekilde parçalandığı için düşük bir seviyede bulunmaktadır. Ayrıca normal hücrede p53, muhtemelen latent formda, diğer bir ifadeyle inaktif formda bulunmaktadır. Ancak stres koşullarının ardından p53'ün aktive edilmesi ve hücrede seviyesinin artması gerekmektedir. Çeşitli stres koşullarıyla aktive edilen p53'ün harekete geçirilmesi 3 seviyede düzenlenmektedir:

1\* Protein sentezinin artırılması ya da protein yarı ömrünün uzatılması

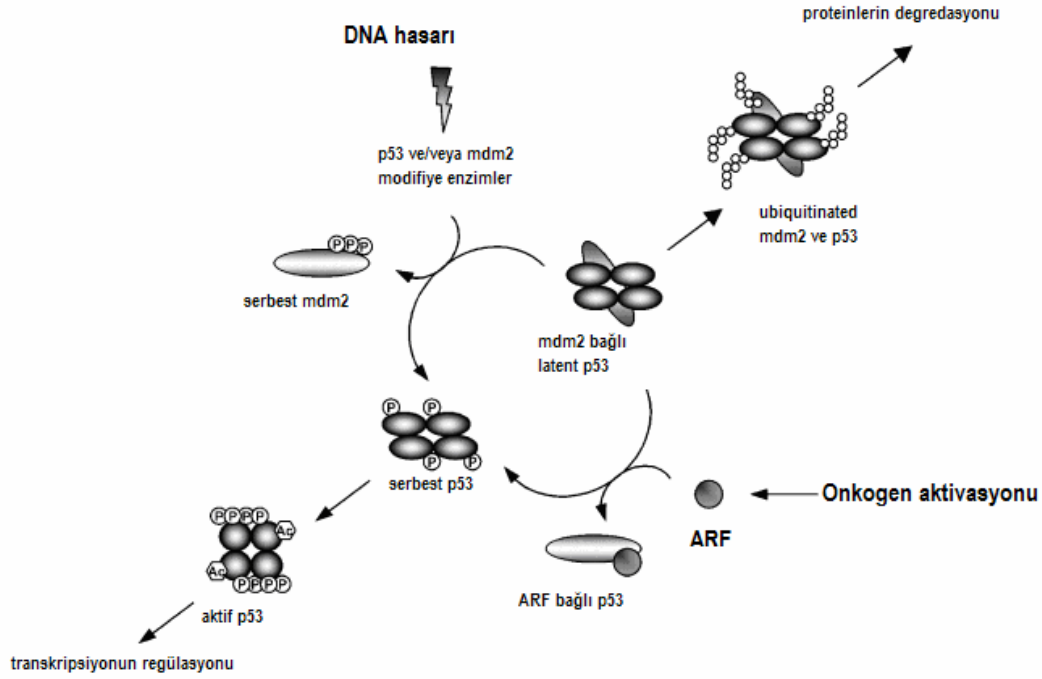
2\* p53 proteininin latent formdan aktif şekle ("konformasyon") dönüşmesi-translasyon sonrası modifikasyonlar

3\* Proteinin sitoplazmadan nukleusa göçü (Liang S.H. and Clarke F.C., 2001, Brooks L.C ve ark., 2004)

p53 hücrede çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. p53, hücrede sürekli eksprese edilmektedir, fakat çok kısa bir yarı ömre sahiptir. 26S proteozom kompleksi tarafından p53'ün bazı C-terminal lizin rezidüleri ubiquitinasyona uğramaktadır. p53 için temel ubiquitin ligaz ise Mdm2' dir. p53'ün düzenlenmesi bakımından Mdm2, çok önemli bir rol üstlenmektedir.

#### 2.3.4.1 p53 ve Mdm2

Mdm2, "Murine Double-Minute" kromozomu üzerinde amplifiye edilen bir gen olarak tanımlanmıştır. (Şekil 5) (Perry M.E., 2004, Leyav-Cohen Y. Ve ark., 2005) Mdm2' nin insan homologu ise Hdm2' dir ve onkojenik bir potansiyele sahiptir. Mdm2 onkoproteini p53'ün potansiyel inhibitörüdür. Mdm2, p53'ün transkripsiyonel aktivasyon domainine bağlanmakta ve böylece hedef genleri düzenlemesini ve antiproliferatif etkisini bloke etmektedir. Diğer yandan p53, Mdm2' nin ekspresyonunu aktive etmekte ve böylece geri-bildirim mekanizmasıyla otoregülasyonu gerçekleştirmektedir. (Şekil 2.8) (Leyav-Cohen Y. ve ark., 2005, Haupt Y., 1997)



**Şekil 2.8.** p53 proteinin genotoksik ve onkojenik sinyaller tarafından regülasyonu

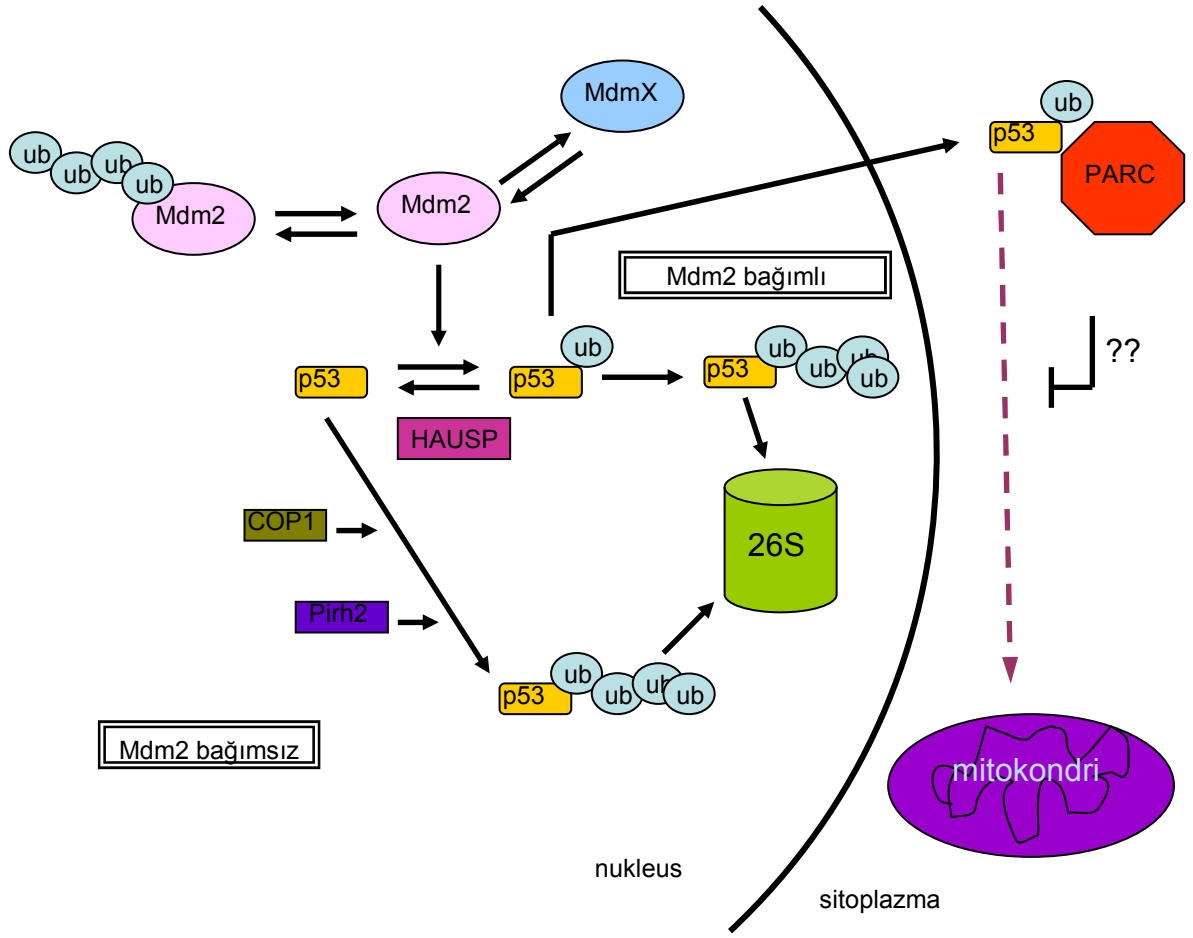
p53 stabilizasyonu, ağırlıklı olarak bir E3 ligaz olan Mdm2 ile birlikte ubiquitin-proteozomal yolak tarafından gerçekleştirilmektedir. P53 ubiquitinasyonu Mdm2 ile birlikte, tekli ve çoklu (“mono ve poli ubiquitinasyon”) ubiquitinasyon olarak gerçekleştirilmektedir. Yine, deubikütinasyon da p53 ve Mdm2 stabilizasyonunda önem taşımaktadır. (Brooks L.C ve ark., 2004)

### 2.3.4.1.1 Ubikütinasyon

Ubikütin, bütün ökaryotlarda bulunan yüksek derecede korunmuş küçük bir proteindir. Ubikütinasyon ise çeşitli proteinlere kovalent bağlarla bir ya da daha fazla ubikütin monomerlerinin takılmasıyla gerçekleştirilen translayon sonrası bir modifikasyon işlemidir. Ubikütinlerin proteinlere eklenip hücre içerisinde miktarlarının belirli bir seviyede kalmasını saylayan enzimler ubikütin ligazlardır.

Ubikütin ligazlar, HECT ya da RING domainleri içerip içermemelerine bağlı olarak 2 sınıfta incelenmektedir. Mdm2, RING E3 ligaz ailesi içerisinde yer almaktadır ve genel olarak C- terminal bölgelerinde CX2CX(9-39)CX(1-3)HX(2-)/HX2CX(4-48)CX2C motifiyle karakterizedir. p53, tekli ve çoklu ubikütinasyon ile parçalanabilmektedir. Özellikle tekli ubikütinasyon, p53’ ün çekirdek dışına verilmesi ile ilgilidir. Şayet Mdm2, düşük bir seviyede bulunuyorsa, ek modifikasyonlar ve parçalanma için p53, tekli ubikütinasyonla çekirdekte sitoplazmaya yönlendirilir. Mdm2 yüksek seviyede bulunuyorsa p53 çekirdek içerisinde çok hızlı bir şekilde çoklu ubikütinleşme ile nuklear proteozomlarca parçalanır. Bu tip bir regülasyona neden ihtiyaç duyulmaktadır?

Bilindiği gibi hem nukleusta ve hem de sitoplazmada proteozom kompleksleri bulunmaktadır ve sıkı ilişki içinde bulunan bazı proteinlerin hızlı bir şekilde parçalanmasının engellenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin DNA hasarının geç safhalarında, p53 hasar için gereken yanıt verdikten sonra hızlı bir şekilde parçalanmak durumundadır ve bu nedenle hücrede Mdm2 seviyesi artış gösterir. p53 negatif geri-bildirim mekanizmasıyla Mdm2’ nin ekspresyonunu artırmaktadır. Aynı zamanda proteozom-bağımsız olarak da p53’ ün parçalanmasını regüle edilebilmektedir. Pirh2 ve RING-H2 domaini içeren proteinler de p53 ile interaksiyona geçmekte ve Mdm2’ den bağımsız olarak p53’ ün ubiquitinasyonunu gerçekleştirmektedirler. Mdm2-bağımlı ve bağımsız mekanizmaların işbirliği ile p53’ ün sıkı bir şekilde regülasyonunun nasıl gerçekleştirildiği Şekil 2.9’ da açıklanmaktadır. (Brooks L.C ve ark., 2004)



**Şekil 2. 9.** p53 regülasyonunda Mdm2-bağımlı ve Mdm2-bağımsız mekanizmalar

Ubikütinasyon, p53-Mdm2 yolağının regülasyonu ve stabilizasyonunda önemli bir etkiye sahiptir ve deubikütinasyon da böylesine bir düzenleyici mekanizmanın önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Deubikütinaz HAUSP, hem in vivo ve hem de in vitro ortamlarda, ubikütinasyona uğramış p53' deki ubikütin kısımlarını çıkarmaktan sorumludur ve hücredeki p53 seviyesinin düzenlenmesinde de önemli bir role sahiptir. HCT116 hücre serileriyle yapılan bir çalışmada geçici RNAi kullanımıyla, hücrede HAUSP' un oranı azaltılmış ve böylece HAUSP' un p53 için spesifik bir deubikütinaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. (Brooks L.C ve ark., 2004)

p53 proteinin stabilizasyonu, önemli derecede ubikütin-proteozom yolağına bağlıdır ancak, onun potansiyel transkripsiyon faktörü olarak aktivitesi sumolasyon, fosforilasyon ve asetilasyon gibi diğer bazı translasyon sonrası modifikasyonlara da bağlıdır. Bu modifikasyonların 3 amacı olabilir:

- p53-Mdm2' nin direk iletişimini engellemek
- p53' ü aktive etmek
- p53' ün DNA' ya bağlanma ilgisini değiştirmek

Farklı bir çok hücrel stres altında meydana gelen bu tip modifikasyonlar p53 aktivitesinde oldukça önemli bir yere sahiptir. ((Brooks L.C ve ark., 2004 Brooks L.C. ve ark., 2003, Leyav-Cohen Y. ve ark, 2005, Dai M. S. Ve ark., 2006, Haupt Y. ve ark., 1997, Zhang Y. ve ark., 2001, Stommel J. M. Ve ark., 2005, Zhang H.G. ve ark., Oren M. Ve ark., 2002, Myung J. ve ark., 2001)

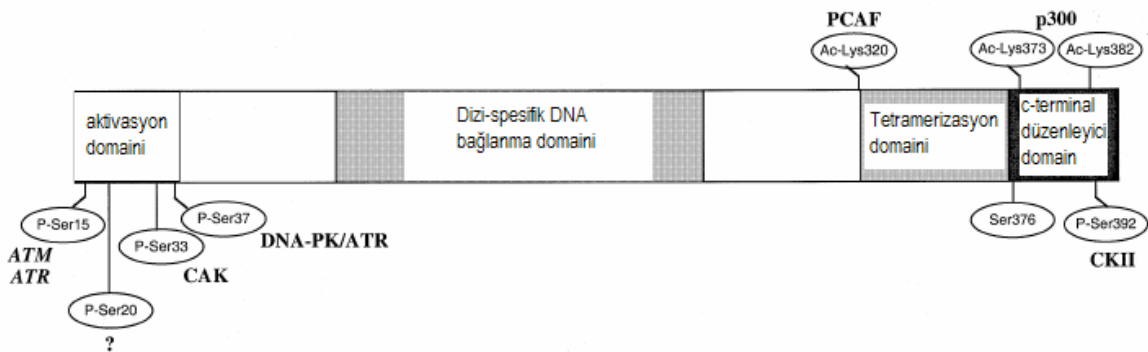
## 2.3.5 IR ve p53

### 2.2.5.1 p53'ün translayon sonrası modifikasyonları ile IR' ye karşı hücresel yanıt oluşumu

Hücre hasara uğradığında, hücredeki bir çok genin ürününün hücre siklus engelini, apoptozu ya da DNA tamirini tetiklediği bilinmektedir. Bunlardan en önemlisinin bütün bu fonksiyonlara aracılık ettiği için p53'ün olduğu söylenebilir. DNA çeşitli hücresel ya da çevresel bir takım stres koşulları (özellikle radyasyon) sonrasında hasara uğratıldığında p53 polipeptidinde bir seri fosforilasyon, defosforilasyon ve asetilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar gerçekleşmektedir. DNA hasarı meydana geldiğinde p53'ün hızlı bir şekilde regülasyonunda translayon sonrası modifikasyonlarla satbilizasyonu gerçekleştirilir. Bu modifikasyonlardaki iki önemli mekanizma ise fosforilasyon ve asetilasyondur.

In vivo koşullarda DNA hasarı sonrasında p53'ün bir çok bölgesinden fosforillenmesi çekici bir hipotez olarak öne sürülmektedir. p53'ün N-terminal bölgesinden fosforillenmesi Mdm2 ile olan interaksyonunu inhibe etmekte ve bu da p53'ün hücredeki seviyesinin artmasını sağlayarak transkripsiyonal aktivitesini gerçekleştirmesine yardımcı olmaktadır. Bunun yerine C-terminal bölgesinden fosforillenmesi ise dizi spesifik DNA bağlanma potansiyelini artırmaktadır. Böylesine modeller bir çok laboratuvar tarafından rekombinant p53 derivelere içeren, spesifik fosforilasyon bölgelerindeki mutasyonlarla birlikte tespit edilmiştir. Bu yaklaşımla DNA tamirinden sorumlu proteinlerden olan DNA-PK/ATM/ATR' nin fosforilasyon bölgelerindeki serin-15 ya da CKII bölgesindeki serin-392 mutasyonları analiz edilmiş ve bu bölgelerin özellikle radyasyonun indüklediği DNA hasarı sonrasında, p53'ün regülasyonunda önemli olduğu belirtilmiştir. Yine fosfo-spesifik antikolar kullanılarak UV ya da IR tarafından indüklenen DNA hasarlarında p53'ün serin-15 bölgesi fosforillenme bölgesi olarak tanımlanmıştır. Serin-15 fosforillendiğinde p53'ün yarı ömrü ve transkripsiyonel aktivitesi artmaktadır. Serin-20' nin de fosforillendiği Shieh ve ark. tarafından gösterilmiştir. Fosfo-spesifik antikolar aracılığıyla tespit edilen serin-33 bölgesi de DNA hasarı sonrasında "Cdk- activated kinase" (CAK) tarafından fosforillenmektedir. IR uygulaması sonrasında C-terminal bölgede bulunan serin-376 defosforile edilmekte ve bu defosforilasyon da p53 proteini ile 14-3-3 proteininin interaksyonu indüklenmektedir. Bu fosforilasyon ve defosforilasyon mekanizmalarının IR' nin indüklediği DNA hasarı sonrasında, p53 için anahtar düzenleyici mekanizmalar olduğu belirtilmektedir. ( Lakin ND ve ark., 1999, Fei P ve ark., 2003)

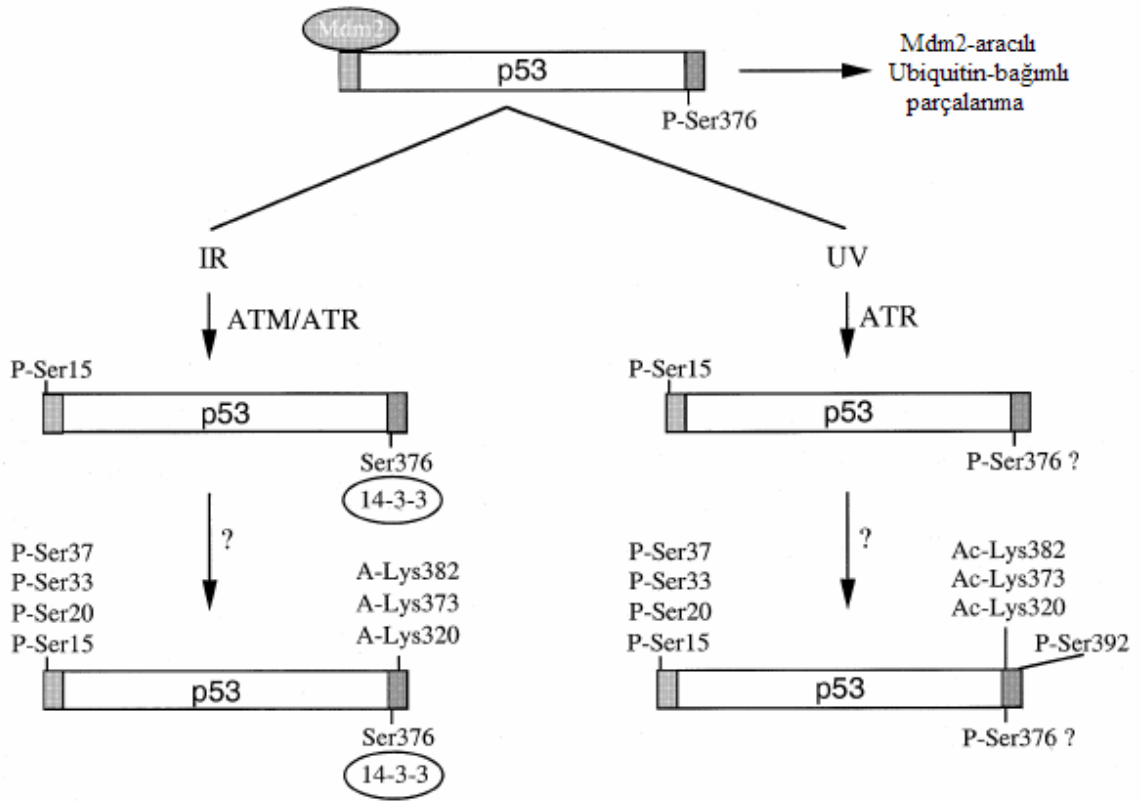
DNA hasarı sonrasında p53'ün DNA' ya bağlanmasını aktive eden mekanizmalardan biri de asetilasyondur. In vitro yapılan çalışmalarda CBP ve PCAF gibi proteinlerin p53' ü lizin-320, 373, 382 bölgelerinden asetillendiği ve bunun sonucunda DNA' ya bağlanma afinitesinin arttığı gösterilmiştir. Asetilasyon-spesifik antikor kullanılarak yapılan çalışmalarda lizin-382' nin IR ya da UV' nin indüklediği DNA hasarlarında asetillendiği yine Liu ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise lizin-320 ve lizin-373 bölgelerinin radyasyon uygulaması sonrasında arttığı saptanmıştır. p53'ün fosforillenme bölgelerinden olan serin-33 ve serin- 37' nin de in vitro koşullarda meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak CBP/p300 tarafından potansiyel asetillenme bölgeleri olduğu belirlenmiştir. p53'ün fosforilasyon ve asetilasyon bölgeleri şekil 2.10' de açıklanmaktadır. ( Lakin ND ve ark., 1999, Fei P ve ark., 2003)



Şekil 2.10. p53'ün fosforillenme ve asetilasyon bölgeleri

Translasyon sonrası modifikasyonların gerçekleşmesinde özellikle fosforilasyon basamaklarında ATM ("Ataxia-Talangiectasia Mutated Gen Ürünü") IR' ye karşı önemli bir rol oynamakta ve p53'ün DNA' ya

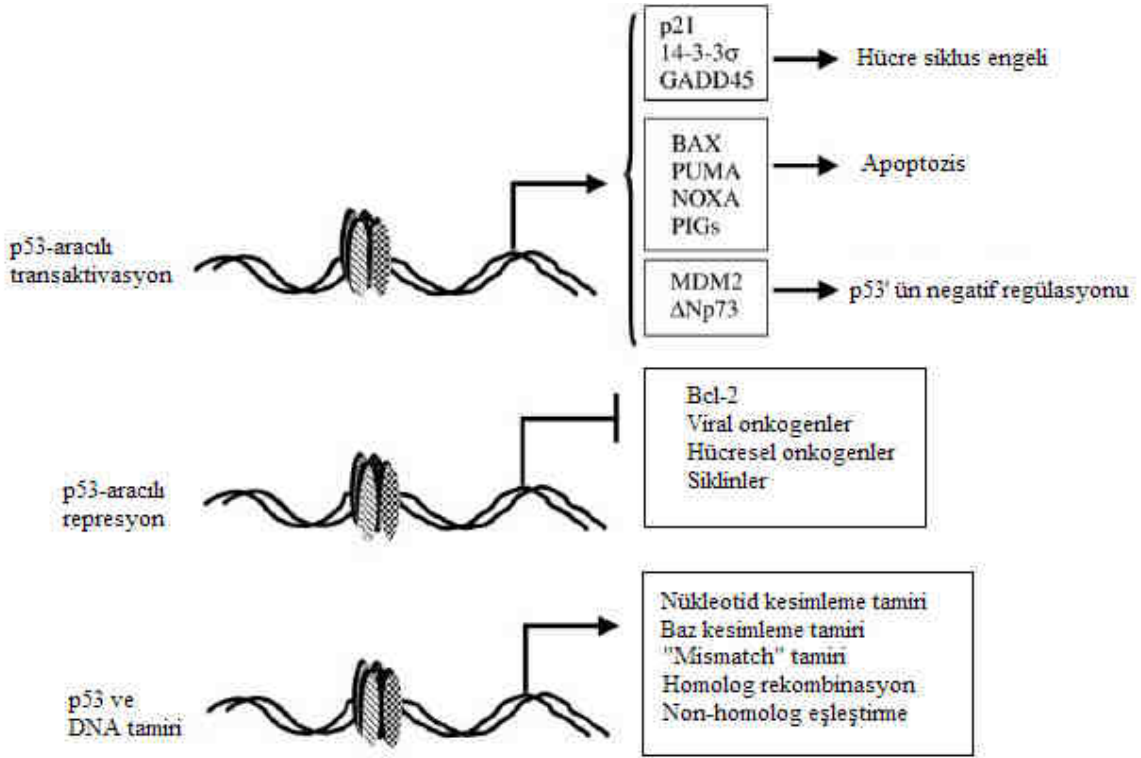
bağlanma kapasitesini artırmaktadır. Hücreler IR' ye maruz bırakıldığında ATM- aracılı olarak p53'ün serin-376 bölgesinden defosforile edildiği Waterman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada gösterilmiştir. Bunun nedeni olarak ATM' nin, diğer fosfataz enzimleri gibi "bear" motifleri içermemesi ve DNA hasarlarında p53 için bir fosfataz rolü üstlenmesi gösterilmiştir. Serin-376' nın defosforile edilmesi 14-3-3 proteinlerinin p53 ile interaksiyona girmesini sağlayarak p53' ün DNA' ya bağlanma potansiyelini artırmaktadır. ATM aynı zamanda çeşitli DNA hasarlarında, IR' ye yanıt olarak p53' ü serin-15 bölgesinden de fosforillemekte ve p53' ün stabilizasyonunu sağlamaktadır. Ancak, farklı hücre serileriyle yapılan çalışmalarda IR uygulamasını takiben ATM' nin rolü her zaman tespit edilememektedir. Bu durum p53' ün fosforillenmesinde diğer bir aday kinaz olan ATM-related polipeptid ATR' yi akla getirmektedir. In vitro yapılan çalışmalarda ATR' nin de ATM' ye benzer bir şekilde p53'ü serin-15 bölgesinden fosforillediği gösterilmiştir. Özellikle UV' nin indüklediği DNA hasarlarında ATR, hasarı tanımlayarak tamirle ilgili çeşitli yolları aktive etmektedir. (Şekil 2.11) ( Lakin ND ve ark., 1999, Fei P ve ark., 2003, Hermeking H. ve ark., 1997, Siliciano J.D. ve ark., 1997)



Şekil 2. 11. In vivo' da DNA hasarlarına yanıt olarak p53' ün post-translasyonel modifikasyon modeli

p53' ün translyasyon sonrası modifikasyonlarının ardından hasarlı genoma sahip hücreyi koruyucu bir takım yollar aktive edilmektedir. (Şekil 2.12) Özellikle IR' nin sebep olduğu DNA hasarı çift zincir kırıklarındır ve çift zincir kırıkları da hücredeki bir çok sensör molekölü harekete geçirerek tamiri ya da gerektiğinde de apoptozu gerçekleştirmektedir. p53 hasara yanıt olarak aracı bir moleköl rolü üstlenmekte ve bunu direk ya da indirek yapabilmektedir. Örneğin p53, hücre hasarı sonrasında içsel ya da dışsal olarak alınan apoptoz sinyallerini, radyasyondan sonra mitokondriye geçerek direk uyarabildiği gibi, BAX, NOXA, BID ve PUMA gibi proapoptotik proteinlerin transkripsiyonel olarak ekspresyonlarını artırarak indirek olarak da apoptozu yönlendirebilmektedir. (Attardi L.D., 2005, Essmann F. ve ark., 2005, Cuddihy RC. ve ark., 2004, Michael M. ve ark., 2004, Mihara M. ve ark., 2003, Fei P. ve ark., 2003)





Şekil 2.12. p53'ün DNA hasarına karşı yanıt verme basamakları

### 2.2.5.1.1 p53 ve hücre döngüsünde G1/S engeli

Ökaryotik canlılarda hücrenin çoğalması diğer bir ifade ile proliferasyon, hücre siklusunu da içine alan kompleks bir işlemdir. Hücre siklusu bir seri olaylardan meydana gelir ki meydana gelen bu olaylar iki temel kısımda incelenir. Bunlardan ilki hücre normal fonksiyonlarını gerçekleştirirken meydana gelen interfaz safhasıdır ve interfaz safhası da G1, S ve G2 olarak 3' e ayrılır. İkinci olarak meydana gelen ise DNA kendini replike ettikten sonra meydana gelen mitotik safhadır. Hücrenin hücre siklusuna girmesinde iki anahtar regülatör molekül vardır: Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK).

Hücre siklusunun her basamağında siklin bağımlı kinazların (CDK) aktivasyonu ya da inaktivasyonu çok sıkı bir şekilde denetlenmektedir ve onların düzenleyici alt ünitelerinin de siklinler olduğu söylenebilmektedir. Siklinlerin CDK' ler ile oluşturdukları kompleksler, CDK' lerin hücre içerisindeki miktarını ve siklinlerin loklizasyonunu da düzenlemektedir. Hücrenin siklusa girmek için gerekli sinyalleri almasını takiben, Rb ve E2F kompleksi ayrılır ve hücrede G1 siklinlerinin miktarlarının artması ile CDK'lere bağlanma gerçekleşmekte ve bunun sonrasında ise hücre, DNA replikasyonu için hazır hale getirilmektedir. "S-phase promoting factor" ün artmasıyla da siklin A CDK2 ye bağlanmakta ve bundan sonra replikasyon gerçekleştirilmektedir. Replikasyon gerçekleşirken siklin E nin parçalanmasıyla birlikte G2 siklinlerinin artışı söz konusu olmakta ve bundan sonra "M-phase promoting factor" –M fazı CDK leri ile birlikte mitotik siklinlerin oluşturduğu kompleks- ün aktive edilmesiyle hücre mitozaya girmektedir.

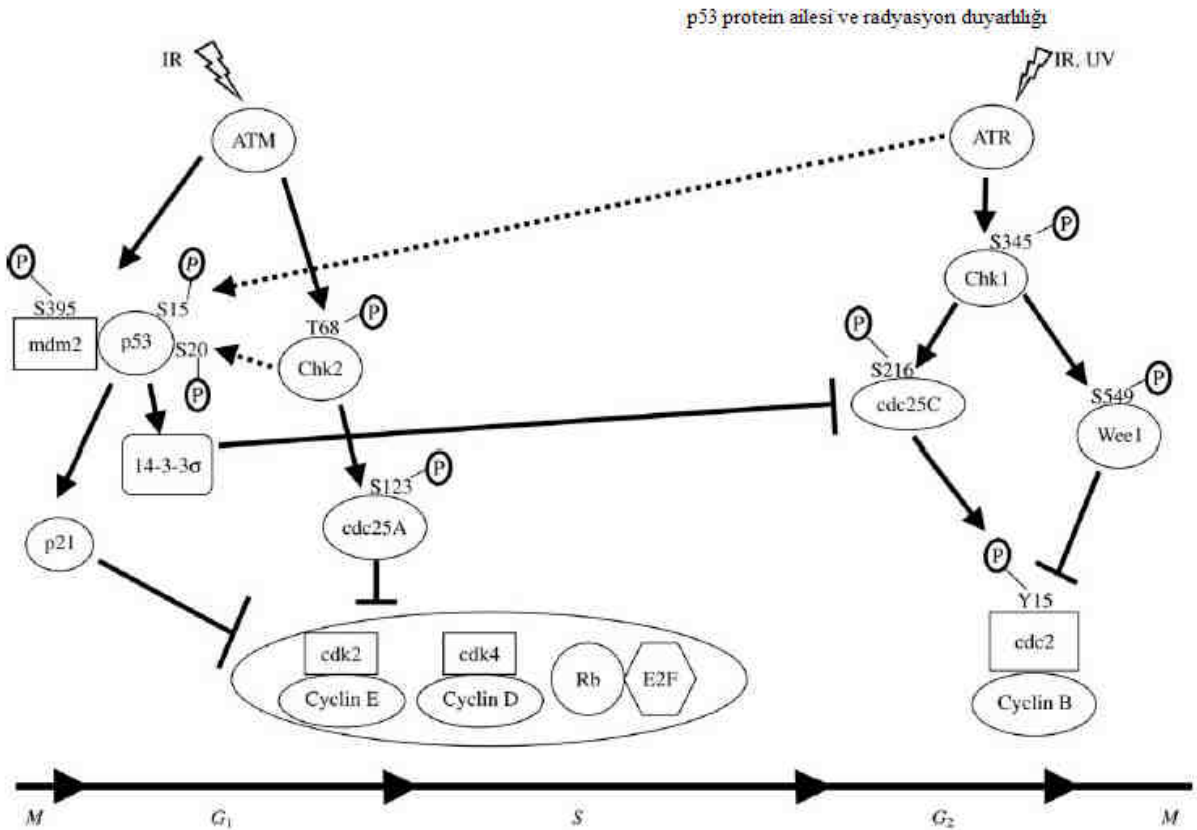
Hücre, siklus esnasında örneğin replikasyon meydana gelirken radyasyon, kimyasallar gibi bir stres unsuruyla karşılaştığında bu hasarları elimine edecek mekanizmaları devreye sokmaktadır. Bu mekanizmalardan en önemlisi ise hücrenin muhafazasını gerçekleştiren p53 ile ilgili mekanizmalardır ki p53 bu stres unsurlarıyla aktive edildiğinde oluşturduğu yanıtlardan biri de hücre siklusunun engellenmesini denetlemektir. P53, bu işlevini hem G1 esnasında ve hem de G2 kontrol noktalarının aktive edilmesiyle gerçekleştirebilmektedir.

G1 safhasında p53, IR tarafından aktive edilerek p21, GADD45 ve 14-3-3 proteinlerini indüklemektedir. p21' in indüklenmesi sonrasında siklin-bağımlı kinazlar inhibe edilerek, Rb-E2F kompleksinin devamlılığı sağlanmaktadır ve böylece S fazına giriş önlenmektedir. IR sonrası ATM aktive edildiğinde ise, c-ABL

kinazın fosforillenmesinin ardından p21 GADD45' in transaktivasyonu gerçekleştirmektedir ve böylece yine G1 engeli meydana gelmektedir.

### 2.2.5.1.2 p53 ve hücre döngüsünde G2/M engeli

IR uygulamasının ardından p53-aracılı G2/M kontrol noktaları ile ilgili halihazırda çok fazla bilgi mevcut olmamakla birlikte tomurcukla üreyen mayalarda, G2 gecikmesinin RAD9 adı verilen ve çift zincir kırıklarının tamirinden sorumlu olduğu bilinen bir proteinle gerçekleştirildiği saptanmıştır. DNA hasarı, ATM/RAD3 gibi aile proteinlerinin kinazlarını tetiklemekte ve bu da direkt ya da indirekt olarak ileri basamaktaki bir kinaz olan CHK1' i aktive etmektedir. Memeli hücrelerinde, CHK1 CDC25C'yi fosforillemektedir. Bu yolak aktive edilmez CDC25C ulaşılmaz durumda kalır, bu durum CDC2-siklin B heterodimerlerinin inaktif formda beklemesine sebep olarak hücreyi G2 evresinde duraklatır. G2/M kontrol noktalarından biri IR dozuna bağlı olarak ATM-aracılı olarak gerçekleşir ve bu yanıt oldukça hızlıdır. Diğer uzun yanıt ise IR dozuna karşı duyarlı olarak ATM' den bağımsız olarak gerçekleşir ve IR' nin indüklediği S fazı kontrolünün kaybı sonrasında meydana gelir. Yapılan çalışmalar p53' ün fazla eksprese edilmesi durumunda ya da p53' ün, 14-3-3 ve GADD45 gibi ileri basamak efektör proteinlerinin de G2/M engelini indükleyebileceği gösterilmiştir. 14-3-3σ, mitozu başlatan siklin B1 ve CDC2' nin ayrılmasını sağlayan bir proteindir. GADD45 ise CDC2/siklin B kompleksini destabilize etmekten sorumludur. P53 de aynı zamanda CDC2 ve siklin B' nin promotorlarını baskılayarak G2/M engelini öncülük etmektedir. (Şekil 2.13) (Cuddihy RC ve ark., 2004, Fei P ve ark., 2003)



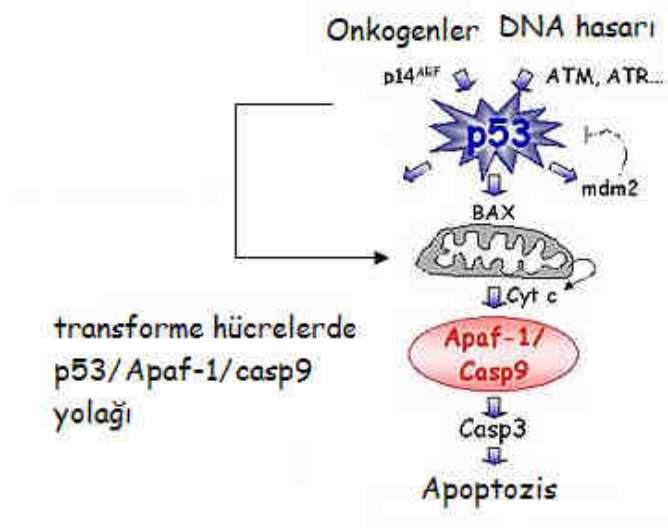
Şekil 2.13. p53 ve hücre siklus kontrol noktaları

### 2.2.5.1.3 p53 ve apoptozis

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü ilk defa 1972’ de keşfedilmiş ve genetik olarak stabil olmayan ve istenmeyen bir hücrenin kaldırılması olarak tanımlanabilmektedir. Apoptozis, başlangıç, işlem, ve patlama (hücrenin ortadan kaldırılması) gibi 3 basamağa ayrılır. Bu basamaklardan ilki başlangıç safhasıdır ki içsel ve dışsal yolak olarak iki kısımda incelenir. İçsel yolak DNA hasarı gibi içsel bir takım sinyaller sonrasında başlatılırken, dışsal yolak sitotoksik T- hücreleri gibi dışsal bir takım sinyaller sonrasında başlatılır. İçsel yolda mitokondri önemli bir görev üstlenmektedir ve buradaki en önemli regülatörler BCL2 ailesinin üyeleridir. BCL2, foliküler B lenfomada karakteristik t(14;18) translokasyon bölgesinde bulunan bir onkogen olarak tanımlanmaktadır. BCL2 ailesinin üyeleri proapoptotik, antiapoptotik ve sadece BH3 domaini içeren proteinler olarak sınıflandırılabilir. İçsel yolağın başlayabilmesi için BCL2 ve BCL-X<sub>L</sub> gibi antiapoptotik proteinlerin inaktivasyonu gereklidir. Bu proteinler mitokondri membranında muhtemelen BAX ve BAK gibi proapoptotik proteinlerle heterodimer oluşturan proteinlerdir. BAX ve BAK aracılı olarak mitokondri yapısında ve fonksiyonunda değişiklikler meydana gelmekte ve bu da mitokondri geçirgenlik geçişini (“Mitochondrial Permeability Transition”) değiştirmektedir. İç ve dış membran arasındaki iletişim de ATP’ nin iç membrana geçişiyle birlikte por açılır ve bu da 1500 D’ den küçük moleküllerin geçişine olanak verir. Sonrasında çoğu intermembran kompartımanında bulunan sitokrom c ve SMAC/Diablo gibi proteinlerin salınması sağlanır. Stoplazmada bulunan 8 adet sitokrom c eşit sayıdaki APAF1’le bağlantı kurarak “apoptozom” adı verilen kompleksin oluşması sağlanır. Apoptozom da stokiometrik sayıdaki pro-kaspaz ve pro-kaspaz 9 ve pro-kaspaz 3’ e bağlanarak apoptozis gerçekleştirilir.

Dışsal yolak ise özel bir takım yüzey reseptörlerinin kendilerine özel ligandlarına bağlanmasıyla başlatılır. Ölüm reseptörleri TNF reseptör süper ailesi içerisinde yer alır ve TNF $\alpha$  (“Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ”) bu reseptör süper ailesi içerisindeki bazı sitokinlerin ligandlarından biridir. Bu peptid, inflamatuvar reaksiyonlar sırasında ve hücre stresine yanıt olarak monositler, makrofajlar ve immün sistemin diğer hücreleri tarafından salınırlar. Ölüm ligandları reseptörlerine bağlandıklarında ligand-reseptör kompleksi trimerize olur ve reseptör ölüm domainleri FADD (“Fas (TNFRSF6)-associated via death domain”) proteinlerine bağlanır. FADD başlatıcı kaspazlarla homoloji gösteren efektör domainlere sahiptir. Reseptör ölüm domainleri FADD’ a bağlandıktan sonra bu komplekse genellikle başlatıcı kaspaz olan pro-kaspaz 8 ya da pro-kaspaz 10 bağlanarak “Death Inducing Signaling Complex” ya da kısaca DISC adı verilen kompleks oluşur ve bu kompleksin oluşumu kaspaz 3 gibi işlemi bitirici kaspazlarında devreye girmesiyle apoptozis gerçekleştirilir.

Çeşitli stres koşulları altında hücre apoptoza yönlendirilebilir. Bir çok durumda özellikle radyasyonun indüklediği çift zincir DNA kırıklarında P53 geninin aktivasyonu söz konusudur. Hücre hasardan sonra apoptoza yönlendirilmişse, P53, BAX, PUMA, NOXA ve PIG gibi proapoptotik genleri transaktive etmektedir. Ekspresyon düzeyleri artan proapoptotik genlerin protein ürünleri mitokondriden sitokrom-c salınımını gerçekleştirmekte ve sırasıyla APAF1, prokaspaz 9 ve son olarak da prokaspaz 3 ile birlikte apoptozom kompleksi meydana gelerek apoptozis gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalarda p53’ ün proapoptotik genleri aktive etmekten başka özellikle IR uygulamasını takiben, mitokondriye göçüyle sitokrom- c salınımını sağlayarak da hücrenin apoptoza yönlendirilmesini sağladığı belirtilmektedir. (Şekil 2.14) (Essmann F. ve ark., 2005, Crow MT. ve ark., 2004, Mihara M. ve ark., 2003)



*Şekil 2.14. p53 ve apoptozis*

### 2.2.5.2 IR ve p53'den bağımsız hücresel yanıt

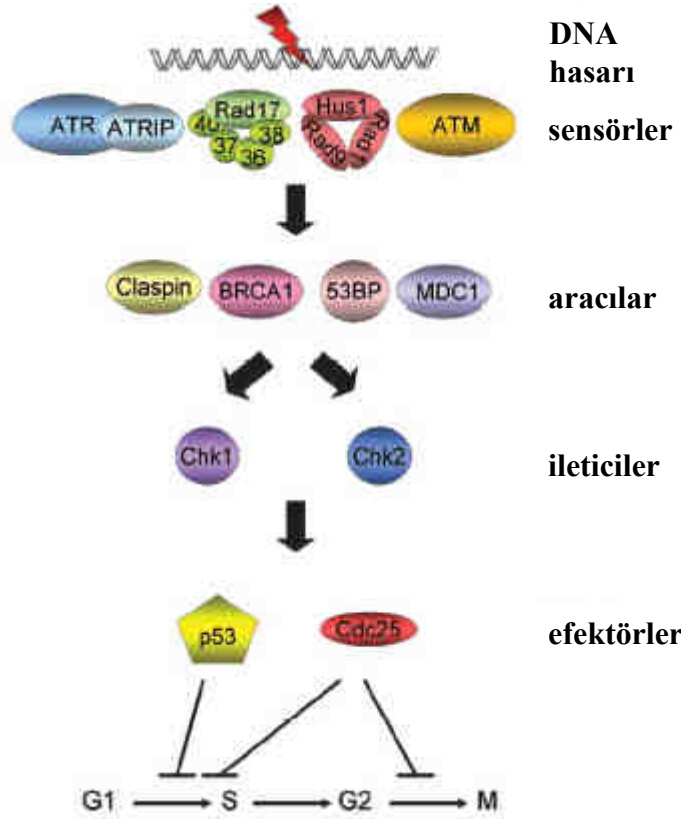
#### 2.2.5.2.1 IR ve p53' den bağımsız G1/S, G2/M engeli

DNA hasarı meydana geldiğinde; hücre tiplerine ve hasarın büyüklüğüne göre değişmekle birlikte hasarın algılanması, 4 aşamada gerçekleşir:

- 1- Hasar ATM ve ATR gibi sensör moleküllerce algılanır ve tanımlanır.
- 2- Bu sinyal aracı moleküllere iletilir. Burada önemli aracı moleküllerden birisi p53 bağlanma proteini olan 53BP' dir.
- 3- Sinyal aracı moleküllerce iletilici, haber verici moleküller olan Chk1 ve Chk2' ye aktarılır.
- 4- Son olarak efektör ya da etki edici moleküller olan p53 ve Cdc25 moleküllerine iletilir.

UV radyasyonuna karşı ya da gama radyasyonu gibi iyonize radyasyondan kaynaklanan bir DNA hasarı meydana geldiğinde CDC25A; CHK1 ya da CHK2 tarafından fosforillenir. İyonize radyasyonun neden olduğu DNA hasarına karşı, CDC25A' nın ser-123 bölgesinden fosforillenmesi bu fosfatazın ubiquitinlerce degradasyonuna neden olur. CDC25A' nın parçalanması ise normal G1/S geçişini önler çünkü CDC25A' nın aktivasyonu için siklinE-Cdk2' nin defosforile olması gerekir. (Dou P.Q. ve ark., 1995, Falck J. Ve ark., 2001)

Cdc25 fosfataz, hasarın tipine, ve radyasyon dozu ve tipine göre G1 ya da G2 kontrol noktasında etki gösterebilmektedir. (Şekil 2.15)(Sancar A. ve ark., 2001, Nida H. ve ark., 2006)



*Şekil 2.15 p53 ve Cdc25 aracılı G1/S ve G2/M engeli*

### 2.2.5.2.2 IR ve p53' den bağımsız apoptozis

Hasar yaratıcı ajanlar olan UV ve gama radyasyonu gibi iyonize radyasyon formları hücrede ve DNA' da hasar meydana getirdiği zaman 4 farklı hücresel yanıt oluşturulmaktadır. Birinci yanıt DNA hasarının ortadan kaldırılması ve DNA çift zincirinin devamlılığının restorasyonudur. İkinci yanıt, hücre döngüsü engellerini kapsayan, DNA hasar kontrol noktalarının aktivasyonudur ki bu tamir için bir bekleme basamağıdır ve böylece hasarlı DNA' nın yeni hücrelere geçişi engellenir. Üçüncü yanıt, transkripsiyonel yanıttır ve bu hücre için yararlı olabilecek transkripsiyon profillerinin değişimini sağlar. Sonuncusu ise ağır hasara uğramış DNA' nın ya da ciddi bir düzensizliğe sahip olan hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan apoptotik mekanizmadır. Apoptozisle ilişkili bir çok yolak bulunmaktadır ve gün geçtikçe bu mekanizmaların sayısı artmaktadır. Bu mekanizmalar içerisinde belki de en iyi bilinen mekanizma p53-aracılı meydana gelen apoptozisdir ancak son zamanlarda apoptozisin özellikle radyasyona karşı yanıtta p53' den bağımsız olarak da indüklendiği gösterilmiştir. P53' den bağımsız olarak apoptozisin gerçekleşmesi bir çok farklı mekanizma ile denetlenmektedir. Bu konuda yapılan yeni bir çok çalışma bulunmaktadır. Nöronal apoptozisle ilgili yapılan bir çalışmada E2F' ler aracılığıyla apoptozisin indüklendiği gösterilmiştir. (Major O. ve ark., 2002, Siwicki K.J., 2003, Spiedel D. ve ark., 2006, Verdeguer E. Ve ark., 2006)

### 2.2.6 p53 ve telomeraz

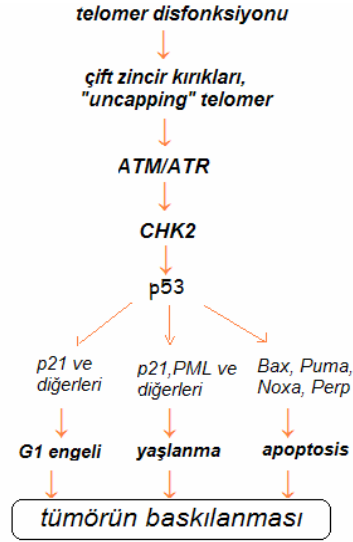
Hücre belirli bir olgunluğa eriştiğinde bölünme sinyalleri alınır ve bölünmeye yönlendirilir. Hücre bölünmesinde temel basamak DNA replikasyonudur. Replikasyon, memeli hücreleri gibi lineer kromozomlara sahip hücrelerde meydana geldiğinde ise DNA polimeraz enziminin sadece 5'-3' yönünde çalışması nedeniyle ve kesikli zincirdeki RNA primerlerinin çıkarılması sonucunda kesikli zincirin sürekli zincirden daha kısa olmasıyla birlikte "replikasyon sonu problemi" olarak isimlendirilen bir sorun ortaya çıkmaktadır. Birçok ökaryotik organizmada bu sorun özelleşmiş bir ters transkriptaz ya da polimeraz olarak

bilinen telomeraz enzimi tarafından çözülmüştür. Telomeraz enzimi, TERC olarak bilinen RNA altünitesi ile TERT olarak bilinen katalitik aktiviteye sahip protein altünitesinden oluşan bir ribonükleoproteindir. Diğer DNA polimerazlara benzer şekilde, aktivitesini DNA substratının 3' ucunda gerçekleştirir. Fakat diğer DNA polimerazlardan farklı olarak telomeraz, yeni dNTP' leri eklemek için ekzojen bir DNA kalıbına ihtiyaç duymaz. Bunun yerine telomerazın RNA bileşeni DNA' nın 3' ucuna telomerik diziyi eklemek için kalıp ödevi görür. Telomeraz özellikle, tek zincir DNA' yı kendi RNA' sını kullanarak uzatır. Yeni sentezlenen DNA da tek zincirlidir. Telomerazın işlevinde anahtar rolü, enzimin RNA bileşeni üstlenir. RNA dizisi telomer dizisinin komplementinin 1.5 kopyasını içerir. Telomerazın protein bileşeni RNA kalıbını kullanarak telomer bölgelerinin 3' ucundaki tek zincir DNA' yı uzatır. 5' ucun uzatılması ise replikasyon sırasında kesikli zincirde olduğu gibi 3' ucundaki ek bölgenin yeni okazaki fragmentleri için kalıp görevi görmesiyle birlikte yine telomeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir. (Telomeres 2006, Molecular Biology of the Gene, 2004, Artandi S.E. ve ark., 2005, Li H. ve ark., 2002, Collins K., 2006, Blackburn E.H., 2001, Shapless N.E., ve ark., 2004, Shay J.W., ve ark., 2002, Wright W.E., ve ark., 2002, Masutomi W.C., ve ark., 2003, Stewart S.A., 2002, Artandi S.E. ve ark., 2000)

Ökaryotik kromozomların uç kısımları, telomerik DNA, telomerle ilişkili proteinler ve telomeraz tarafından DNA hasar cevabının aktivasyonuna karşı korunmaktadır. Telomerler, ökaryotik kromozomların uçlarını başlık gibi sararak, DNA' yı kontrol noktaları aktivasyonundan koruyan ve kromozomal stabilitenin devamlılığını sağlayan nükleoprotein kompleksleridir. Telomerler, kromozomal stabilitenin devamlılığında önemli rol üstlenen Guanin nükleotid tekrarları bakımından zengin olup, memeli ve diğer bütün vertebraların telomerleri TTAGGG tekrarları içermektedir. TTAGGG tekrarlarının uzunluğu canlı türüne göre değişmekle birlikte insan telomerlerinin doğumda yaklaşık 10kb civarında olduğu ve her hücre bölünmesi ile birlikte tedrici olarak kıaldığı bilinmektedir. Ancak telomerin fonksiyonel olması için gerekli olan uzunluk şu an için bilinmemektedir. Memeli telomerlerinin 3' ucunda "overhang" (çıkıntı) yapıları içerdiği bilinmektedir. Fare ve insandan elde edilen telomerlerin mikroskopik görüntülerine bakıldığında telomerik ilmek ya da t-ilmek olarak bilinen "lariat" (kement) konfigürasyonunda yapılar görülmektedir. G- nükleotid bakımından zengin olan tek zincir "overhang" DNA çift zincirli telomerik DNA' ya eklenir ve telomerle ilişkili proteinlerin eklenmesiyle de başlık oluşturulur ya da telomerin fonksiyonel olması sağlanır. t-ilmegi yapısı telomer uzunluğunun regülasyonunda oldukça önemli bir rol üstlenmektedir. (Telomeres 2006, Artandi S.E. ve ark., 2005, Li H. ve ark., 2002, Collins K., 2006, Blackburn E.H., 2001, Shapless N.E., ve ark., 2004)

Primer insan hücrelerinin, uzun bir pasajlamanın ardından sınırlı bir bölünme kapasitesine sahip olduğu ve sonrasında replikatif senesens olarak bilinen kalıcı bir büyüme engeline girerek ve morfolojisinin değiştiği bilinmektedir. Replikatif senesens, aşamalı bir telomer kısalmasıdır ve bunun kanıtı olarak da primer kültürlerde bakıldığında TERT ekspresyonu ile birlikte telomer kısalmasının meydana gelmemesi ve immortal proliferasyonun oluşması gösterilebilmektedir. Senesens, Rb ve p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucunda atlanabilir. Sadece geçici bir kaçış olduğunda devamlı bir telomer kısalması kültürde hücre ölümüne ve kromozomal instabilitelere yol açar ve bu süreç de kriz olarak nitelendirilebilir. Telomerler kromozomların uçlarını koruyamayacak kadar kıaldıkları zaman disfonksiyonel olarak adlandırılan kritik bir kıalmaya, başlıksız safhaya girerler. Bu iki ifade bu kısa telomerlerde kromozom uç füzyonlarının oluşmasına neden olan konformasyonel değişiklikleri de tanımlamaktadır. Telomeraz-eksik farelerle yapılan çalışmalarda 4-6. jenerasyonlarda etkin bir telomer kısalmasının infertiliteye ve kemik iliği, lenfosit, deri ve gastrointestinal yoldaki yenilenme gerektiren organ sistemlerinde defektlere yol açtığı gözlenmiştir. Hücre proliferasyonundaki ve canlılıktaki bu defektler, hasarlı DNA' ya sahip hücrenin eliminasyonunda anahtar rolü üstlenen tümör baskılayıcı p53' ün aktivasyonu sonrasında bertaraf edilmeye çalışılmaktadır. p53 kanserin önlenmesi için önemlidir ve p53' den yoksun transgenik farelerde ise kanser gelişiminin hemen hemen %100 olduğu görülmüştür.

Hücrede, stres koşulları altında DNA' da tek ve çift zincir kırıkları, dimer ya da baz değişimleri gibi ya da telomerlerin aşınımı ile birlikte disfonksiyonel telomerlerin oluşumu söz konusu olabilmektedir. Disfonksiyonel telomerler meydana geldiğinde telomerlerin bu aşırı kısalmasının çift-zincir kırıklarındakine benzer bir DNA hasar sinyali oluşturduğu gözlenmektedir. İnsan fibroblastlarında replikatif senesens sonrasında DNA tamir ve CHK1 ve CHK2 gibi kontrol noktası proteinlerinin aktive edildiği gösterilmiştir. Ayrıca ATM/ATR ya da ATM' nin inaktive edilmesi durumunda normalde senesense girmiş olan hücrelerin tekrardan hücre siklusuna girdikleri gözlenmiştir. (Şekil 2.15) (Artandi S.E. ve ark., 2005)



**Şekil2.16.** Telomer disfonksiyonu ve p53 cevabı

İn vivo koşullarda disfonksiyonel telomerlere cevap olarak ATM' nin yanıtını incelemek için TERC eksikliğinde ATM mutasyonları çalışılmıştır. Gastrointestinal epitelyumdaki disfonksiyonel telomerlere yanıt olarak gerçekleşen apoptozun ATM' ye bağlı olarak gerçekleştiği gözlenmiştir. Farelerle yapılan çalışmalarda ATM/ATR aktivasyonunun ise p53' ün harekete geçmesini tetiklediği ve böylece disfonksiyonel telomerlerin oluşumu sonrasında da ATM/ATR aracılı olarak p53'ün indüklendiği gösterilmiştir. Telomerler disfonksiyonel olduklarında başlık oluşturulamadığından bu başlıksız yapı, ATM aracılığıyla p53' ü harekete geçirmekte ve hücrenin ölümünün başlaması sağlanmaktadır.

p53 stres sinyalleriyle aktive edildiğinde G1 engeli, senesens ya da apoptozis gibi farklı bir çok yolağı aktive edebilir. Bu yollardan hangisinin seçileceği hücre tipi, p53' ü aktive eden spesifik stres koşulları ya da çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Gereç:

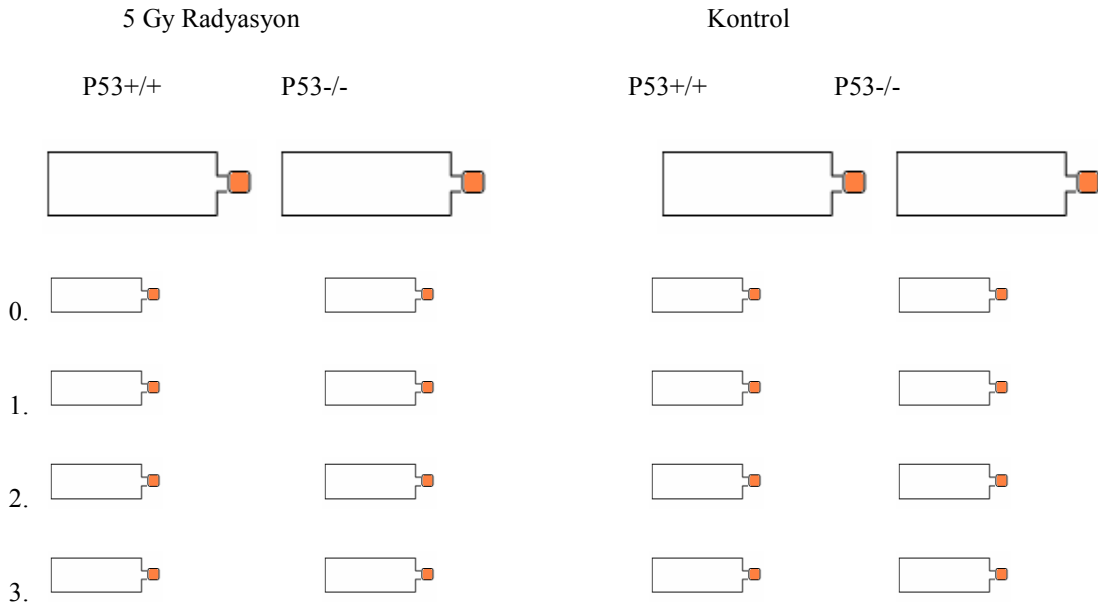
John Hopkins Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümünde görev yapmakta olan Prof. Dr. Bert Vogelstein tarafından hediye edilen ve yapışan hücre özelliği gösteren, mekik şekilli HCT116 p53<sup>-/-</sup> ve p53<sup>+/+</sup> kolon kanser hücre serileri kullanıldı.

Bu hücre serilerine 5 Gy gama radyasyonu uygulandıktan sonra 0, 24,48, ve 72. saat sonunda hücre canlılığı, telomeraz aktivitesi, apoptozis durumu ve hücre döngüsü analiz edildi. Hücre canlılığı ve telomeraz aktivitesi sırasıyla MTT, tyripan blue boyması ve TRAP testleri ile tayin edildi. Radyasyon uygulanan her bir hücre serisi için aynı özelliklere sahip radyasyon uygulanmayan hücre serileri kontrol olarak kullanıldı.

#### 3.2 Yöntem:

##### 3.2.1 Deney Planı:

75 mm<sup>2</sup>' lik flasklara ekilen HCT116 p53<sup>+/+</sup> ve HCT116 p53<sup>-/-</sup> kolon kanseri hücre serileri % 80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra A.Ü.T.F Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı tarafından 5 Gy Gama Radyasyonuna maruz bırakıldı. (Dmax- Co-60). Radyasyon uygulamasını takiben hücreler aşağıdaki şekilde olduğu gibi içerisinde 5 ml McCoy's 5A besiyeri (%10 FBS) içeren 25 mm' lik flaskların her birine 4x10<sup>6</sup> hücre olarak taksim edildi.



Şekil 3.1. Hücrelerin taksimi

1., 2. ve 3. gün flaskları 37 C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüve inkübe edilmek üzere konuldu.

0. günden itibaren 1., 2. ve 3. günlerde Kontrol p53<sup>+/+</sup>, Kontrol p53<sup>-/-</sup> ve IR p53<sup>+/+</sup>, IR p53<sup>-/-</sup> kodlu flasklardaki hücre sayıları tespit edildikten sonra telomeraz aktivitesi için 1,5 ml'lik endendorf tüplerine 1x10<sup>6</sup> hücre, MTT için 96 kuyucuklu plaklara 16x10<sup>5</sup> hücre, Tyripan Blue ile canlı ve ölü hücre tayini için 1,5



ml'lik ependorf tüplerine 10 µl hücre alındı. Akım sitometrisi ile apoptozis ve hücre döngüsünü analiz etmek için ise en az  $2 \times 10^6$  falkon tüplerine alındı.

### **3.2.2 Hücre Kültürü:**

#### **3.2.2.1 Besiyerinin Hazırlanması:**

Hazır olarak gelen 500 ml' lik McCoy's 5A besiyerine, 60 C° de 30' inaktive edilmiş olan 50 ml FBS, 5 ml L- Glutamin ve 5 ml pen/strep eklenerek %10' luk besiyeri hazırlanır.

#### **3.2.2.2 Kültürlerin pasajlanması:**

-Hücrelere ters mikroskopta bakıldı ve yoğunluk tespit edildi.

-Hücreler 2-3 ml PBS ile yıkandı.

- % 0.25' lik Tyripsin / EDTA solusyonundan 2-3 ml flaslara eklendi ve flasklar etüve kaldırılıp 5' beklendi.

-Süre sonunda flaskta bulunan hücrelerin tamamını elde etmek için önce tripsinize edilen hücreler tripsinle birlikte falkon tüplerine alındı ve ardından flask bir miktar PBS ile daha yıkanarak hücrelerin tamamı falkon tüplerine aktarılmış oldu .

- Tripsin/EDTA' nın hücreye zarar verici etkisini inhibe etmek için ise bir miktar, FBS içeren besiyeri eklendi.

- 900 rpm' de 10 dk santrifüj edildi.

- Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 1 ml besiyeri ile yıkandı.

- Thoma lamında hücre sayısı tespit edildi

- Flaslara istenilen yoğunlukta hücre üremesi için ekilmesi gereken hücre sayısı hesaplandı.

- 10-13 ml McCoy's 5A besiyeri konulmuş flaslara hesaplanan miktar ekildi

- Flasklar 37 C %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi

- Pasajlama işlemi, hücre yoğunluğu ve besiyeri miktarına göre ayarlanarak 2-3 gün arayla yapıldı.

### 3.2.3 Hücre Serilerine Gama Radyasyonun Uygulanması:

Hücre serileri T75' lik flasklarda %80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra 5 Gy Gama radyasyonunun uygulanması Ankara Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi AD' de bulunan Co60 kaynaklı Dmax adlı cihazla her bir flaska 9 dk olacak şekilde toplam 18 dk'de gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.4 MTT[ 3-(4,5- dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-tetrazolium bromid] Yöntemiyle Canlı Hücre Aktivitesinin Belirlenmesi:

Canlı hücrelerdeki mitokondriyel dehidrogenaz enziminin sarı MTT' deki tetrazolium halkalarını parçalaması ve geçirgen olmayan hücre membranı içerisindeki koyu mavi formazan kristallerinin biriktirilmesine dayanan bir yöntem olup ölçüm şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kontrol ve 5 Gy gama radyasyonu uygulanan HCT116 p53+/+ ve HCT116 p53-/- hücre serilerinden  $16 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ; 0, 1, 2, 3. günlerde 96 kuyucuklu plaklara (96- well plate) alınmıştır. Ardından kit içeriğine uygun olarak; 10:1 (toplam besiyeri: MTT ajanı) oranında MTT işaretleme ajanı ilave edilerek 4 saat inkübasyonun ardından 1:1 (besiyeri: solusyon) oranında çözücü solusyon ilave edilerek 1 gece inkübe edilmiş ve spektrofotometre ile kantitasyon yapılmıştır.

### 3.2.5 Trypan Blue ile Canlı ve Ölü Hücre Tespiti:

Trypan Blue boyası ölü hücrelerdeki membranın hasarlanarak interaksyonunun bozulması ve negatif yüklenmesi sebebiyle ölü hücrelerin içerisine kolayca girebilmekte ancak canlı hücrelerin yarı-geçirgen membran özellikleri nedeniyle hücre içerisine alınmamaktadır. Böylece bu yöntem canlı ve ölü hücre sayısının belirlenmesinde kullanılabilir. Trypan blue ile ölü hücre yüzdesinin belirlenmesi aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- Tripsinize edilip santrifüjlenen hücreler besiyeri eklendikten sonra 1:1 ya da 2:2 oranında trypan blue ile sulandırılır ve mikropipet yardımıyla iyice karıştırılır.
- Lam üzerine alınıp lamelle kapatılır.
- Ters mikroskopta, bir alanda 100 hücre sayılır.
- Trypan blue ile boyanmış hücreler (mavi- lacivert) apoptotik hücreler, boyanmayan hücreler ise canlı hücreler olarak hesaplanır.
- Sayılan 100 hücrede, yüzde olarak apoptotik hücre sayısı saptılır.

### 3.2.6 Hücre Döngüsü ve Apoptozis Tayini (SubG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Fazı ) için Akım Sitometrisi Yöntemi:

- Etüvden alınan flaskların içerisindeki besiyeri 15 ml' lik temiz bir falkon tüpüne alınır.
- Tripsinize edildikten sonra hücreler daha önce üzerlerindeki besiyerlerinin bulunduğu 15 ml' lik falkonlara alınır ve santrifüjlenir.
- Süpernatant atıldıktan sonra 1 ml besiyeri ile beslenir ve hücre sayımı yapılır.(Akım sitometrisi için en az  $1,5 \times 10^6$  hücre gereklidir).

- Hücre sayımı yapıldıktan sonra 2 ml PBS ile karıştırıldı.
- Fikse etmek için vorteks üzerinde karıştırılarak 2 ml soğuk % 99' luk alkolle muamele edildi.
- Fiksasyon işleminin ardından ortamdaki alkolü uzaklaştırmak için 2 ml daha PBS ilave edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra hücreler üzerine 70ul RNase (Sigma, P7003) ve 50 ul Propidium Iodide (Sigma, P4170) eklendi, karıştırıldıktan sonra 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi.
- Inkübasyon sonrası hücreler 37um'lik nylon mesh'den süzüldü ve akım sitometri cihazında (EPICS XL MCL, Beckman Coulter, USA) 10.000 hücre sayılarak hücre siklusu ve DNA analizi yapıldı.
- G0/G1, Sentez ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı ile apoptotic hücre oranı iki değişkenli DNA histogramları MCYCLE (Phonex Sys, USA) programı kullanılarak analiz edildi.

### **3.2.7 Telomeraz Aktivitesi:**

0. günden itibaren 1., 2. ve 3. günlerde Kontrol p53+/+, Kontrol p53-/- ve IR p53+/+, IR p53-/- kodlu flasklardaki hücre sayıları tespit edildikten sonra telomeraz aktivitesi için 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alınan  $1 \times 10^6$  hücre hücre ile telomeraz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

#### **3.2.7.1 Protein Ekstraksiyonu:**

- Tripsinize edilen hücreler sayıldıktan sonra  $1 \times 10^6$  hücre 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı.
- 13000 rpm' de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi.
- Süpernatant alındıktan sonra pelet 500ml steril ve 4 °C BPS ile yıkandı ve karıştırıldı.
- 13000 rpm' de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi.
- Santrifüjlemeden sonra PBS dikkatli bir şekilde alındı.
- Pelet,  $200 \times 10^{-6}$  lt 1x CHAPS Lysis Buffer ile muamele edildi.
- Buz üzerinde 30 dk inkübe edildi.
- Mikrosantrifüjde 12 000 Xg ve 4 °C' de 20 dk santrifüj edildi.
- 160 µl süpernatant yeni ependorf tüplerine aktarıldı.
- -80 °C' de saklandı.

### 3.2.7.2 Protein Miktarının Ölçümü:

Protein kantitasyonu için gerekli standartlar çizelge 3.1’ de gösterildiği gibi hazırlandı.

**Çizelge 3. 1** Protein kantitasyonu için hazırlanan standardın içeriği

Standart No	Protein Solüsyonu		Chaps Lysis Buffer (µl)	Final Konsantrasyon (mg/ml)
	Kullanılan protein solüsyonu	Miktar (µl)		
Standart 1	BSA(10 mg/ml)St.1	100	50	10
Standart 2	St.2	50	50	5
Standart 3	St.3	50	50	2,5
Standart 4	St.4	50	50	1,25
Standart 5	St.5	50	50	0,625
Standart 6	St.6	50	50	0,3125
Standart 7	St.7	50	50	0,156
Standart 8	St.8	50	50	0,078
Standart 9	St.9	50	50	0,039

(Standart sayısı + Örnek sayısı) x 1XBradford solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyondan 96’lık plaktaki her bir kuyucuğa 190 µl konulup üzeri 10’ ar µl standart ve örnekle tamamlandı. Standart ve örneklerin düzeni Şekil 3.2’ de olduğu gibidir.

B	St1	St2	St3	St4	St5	St6	St7	St8	St9		
Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör
Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör
Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör
Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör	Ör

**Şekil 3.2.** 96’lık plaktaki örnek ve standart solüsyonların yerleşim düzeni

Hazırlanan standartlar ve kör kontrol değerlerine dayanarak SOFT max Pro 3.12 programı kullanılarak protein kantitasyonu yapıldı.

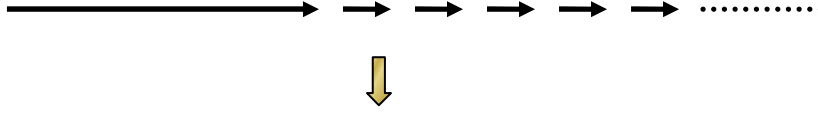
### 3.2.7.3 TRAP

Telomeraz aktivitesi, Kim ve arkadaşları tarafından geliştirilen geliştirilen PCR temelli “Telomerase Repeat Amplification Protocol” (TRAP) yöntemi ile analiz edilmektedir. (Kim ve ark., 1994) Bu tez çalışmasında, telomeraz aktivitesini ölçmek için TRAP<sub>EZE</sub> XL Telomerase Detection Kit (Chemicon, 7707) kullanılmıştır. TRAP<sub>EZE</sub> XL Telomerase Detection Kit, telomeraz aktivitesinin nonizotopik ve kantitatif olarak ölçülmesinde, floresan enerji transfer primerleriyle (ET), floresan işaretli Trap ürünlerinin kullanılması esasına dayanmaktadır. ET primerleri (Amplifluor primerleri) reaksiyon tüplerindeki floresan emisyonun direk olarak ölçülmesiyle, telomeraz aktivitesinin tespitinde ve kantitasyonunda kullanılmaktadır. Amplifluor primerleri sadece Trap ürünleri ya da internal kontrollere yerleştğinde ışımaktadır. Bununla birlikte her bir reaksiyon tüpündeki floresan miktarındaki net artış her bir reaksiyondaki amplifiye edilen DNA miktarı ile korelasyon göstermektedir. Amplifluor primerleri 3’ ucunda, hedef dizisine ve 5’ saç tokası yapısına tamamlayıcı bir dizi içermektedir. Fluorofor (enerji donörü) ve söndürücü DABSYL (4-(dimetilamin)azo benzen sülfonik asit) 5’ ucu saç tokası yapısına yakın bir yerde kapatılır. Primer, çift zincirli PCR ürünleri arasına yerleştğinde saç tokası , polimeraz aktivitesinin gerçekleşmesi için açılır. Bu uzatılmış konformasyonla birlikte , florofor ve söndürücü arasındaki mesafe artırılır ve floresan sinyal üretilir.

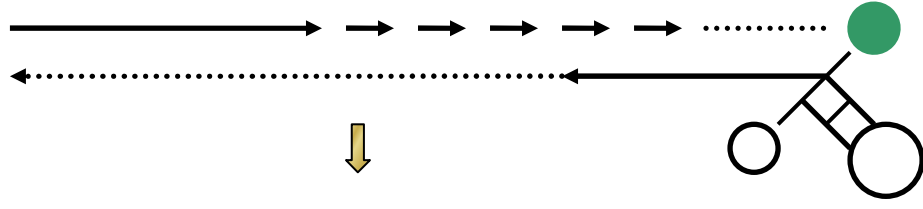
Bu kitin çalışma prensibi şu şekildedir:

Çalışılacak olan örnek hücreden elde edilen protein ekstraktında bulunan telomeraz enzimi, substrat olarak kit içerisindeki TS primerlerini kullanarak TTAGGG telomerik tekrar dizilerini DNA’ ya ekler. DNA’ ya eklenen bu tekrar üniteleri PCR kullanılarak amplifiye edilir. PCR’ de ters primer olarak, floresan ışımaya yapan Amplifluor primeri (Amplifluor RP primerinde, enerji donörü olarak florofor ve bunun kapatıcısı olan DABSYL(4-(dimetilamin) azo benzen sülfonik asit bulunmaktadır) kullanılır ve eğer ekstraktta telomeraz enzimi varsa ve bu telomerik tekrarlar eklenip PCR ile çoğaltılabiliyorsa her bir PCR döngüsünde Amplifluor primer takılmış demektir. Böylece bir diğer döngüde, PCR ürününe takılmış olan Amplifluor primerinde enerji donörü olan florofor ile kapatıcı olan DABSYL birbirinden uzaklaşmakta ve böylece PCR ürünüde ışımaya meydana gelmektedir. Döngü devam ettikçe TRAP ürünlerinin ve dolayısıyla floroforların akümüle olması, reaksiyon sonrasında spektrofotometrik olarak analize izin vermektedir. (Şekil 3.3)

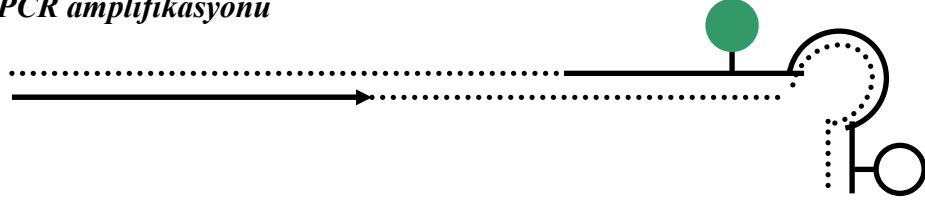
*A. Telomerez enzimi tarafından telomerik tekrarların eklenmesi*



*B. PCR ile komplementer dizilerin sentezlenmesi*



*C. PCR amplifikasyonu*



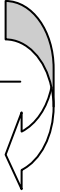
*D. Trap ürünlerinin floresan akümülyasyonu*



*Şekil 3.3. TRAP XL Telomerase Detection Kit'in çalışma prensibi*

Bu çalışmada TRAP<sub>EZE</sub> XL kiti içerisinde bulunan malzemeler çizelge 3.3' de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.2** TRAP<sub>EZE</sub> XL kitinin içeriği

<i>Malzeme adı ve içeriği</i>	<i>Hacmi</i>
<b>1XCHAPS Lizis tampon</b> 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1mM EGTA 0.1 mM Benzamidin 5mM B-merkaptotanol 0.5% CHAPS 10% Gliserol	13,5 ml
<b>5X TRAP Reaksiyon Tamponu</b> TS primer RP Amplifluor primer K2 Amplifluor primer TSK2 şablonu dA, dC, dG ve dTTP:  100 mM Tris-HCl, pH 8.3 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> 315 mM KCl 0,25 % Tween 20 5 mM EGTA 0,5 mg/ml BSA	1,12 ml
<b>PCR Suyu</b> Proteaz , DNase, RNase içermeyen deiyonize su	8,2 ml
<b>TSR8</b> 0,2 amole/µl TSR8 şablonu	45 µl
<b>Kontrol hücre peleti</b> Telomeraz pozitif hücreler	10 <sup>6</sup> hücre

Elde edilen protein örnekleri ile çizelge 3.3 de belirtilen TRAP reaksiyonu hazırlanır.

**Çizelge 3.3 TRAP reaksiyon içeriği**

	R8 <sub>1</sub> (0,2 amole/µl)	R8 <sub>2</sub> (0,04 amole/µl)	R8 <sub>3</sub> (0,008 amole/µl)	R8 <sub>4</sub> (0,0016 amole/µl)	K2 <sub>1</sub>	K2 <sub>2</sub>	K3 <sub>1</sub>	K3 <sub>2</sub>	Tel (+)	H.İ Tel (+)	Ör	H.İ Ör
PCR karışımı	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Taq polimeraz	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-	-	0,4	0,4	0,4	0,4
dH <sub>2</sub> O	37,6	37,6	37,6	37,6	37,6	37,6	37,6	37,6	37,6	37,6	37,6	37,6
TSR8	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Chaps lisis tamponu	-	-	-	-	2	2	2,4	2,4	-	-	-	-
Pozitif Hücre ekstraktı	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-
Örnek hücre ekstraktı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2

TRAP reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir:

30 °C–30 dk → Uzatma reaksiyonu

94 °C – 30 sn  
59 °C – 30 sn  
72 °C 1dk

} 36 döngü

72 °C – 3 dk  
55 °C – 25dk

} Uzatma  
reaksiyonu



Reaksiyon aşamasını takiben elde edilen PCR ürünleri 96 kuyucuklu siyah plaklarda, 150 µl TRAP reaksiyon tamponu içerisinde okutulmuştur. TRAP reaksiyon tamponu aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

10 mM Tris-HCl pH 7.3	}	1M Tris-HCl	----- 500µl	}	5 ml tamponun hazırlanması için gerekli miktarlar
0,15 M NaCl		0,15M NaCl	----- 33µl		
2 mM MgCl <sub>2</sub>		1,25 mM MgCl <sub>2</sub>	----- 400 µl		

TSR8, TS primeriyle aynı olan bir diziye 8 telomerik tekrar eklenerek uzatılmış bir oligonükleotid olup yapısı 5'AG(GGTATAG)<sub>7</sub> 3'seklinde. Bu kontrol, hücre süspansiyonu içindeki telomeraz ile, belli miktardaki TS primer kullanılarak uzatılabilecek telomerik tekrarı ölçmek için standart olarak kullanılmaktadır. TSR8'in 0,2 amole/µl, 0,04 amole/µl, 0,008 amole/µl ve 0,0016 amole/µl olarak dört farklı dilüsyonu sayesinde azalan oranlarda tekrar içerdiğinden spektrofotometrik olarak analiz gerçekleştirilirken eksitasyon/emisyon dalga boylarına göre ışımaya da azalmaktadır. Spektrofotometreden elde edilen sayısal veriler de uygun bir standart tablosunun çizilmesine olanak vermektedir. Spektrofotometrede standart ve örnekler 485-585 eksitasyon ve 535-620 emisyon değerlerine göre okutulmakta ve sonuç itibarıyla standartların okuma değerlerinden yola çıkılarak elde edilen sayısal veriler ışığında aşağıdaki formül kullanılarak telomeraz aktivitesinin logaritmik değerleri elde edilmiştir. Örneklerdeki telomeraz aktivitesinin niceliksel değerinin saptanması için gerekli formüller aşağıda belirtilmiştir.

$$\Delta FL = (\text{Örnek ve standartların FL değerleri}) - K2_{\text{ort}} \text{ FL değeri}$$

$$\Delta R = (\text{Örnek ve standartların R değerleri}) - K3_{\text{ort}} \text{ R değeri}$$

$\log(\Delta FL / \Delta R)$  ve  $\log_{10} \text{TPG}$  değerleri Microsoft Excel kullanılarak, TSR8 standartlarına göre elde edilen tablodaki denkleme uygun olarak telomeraz aktivitesinin sayısal verileri elde edilir.

FL: Florescein ışması

R: Rhodamin ışması

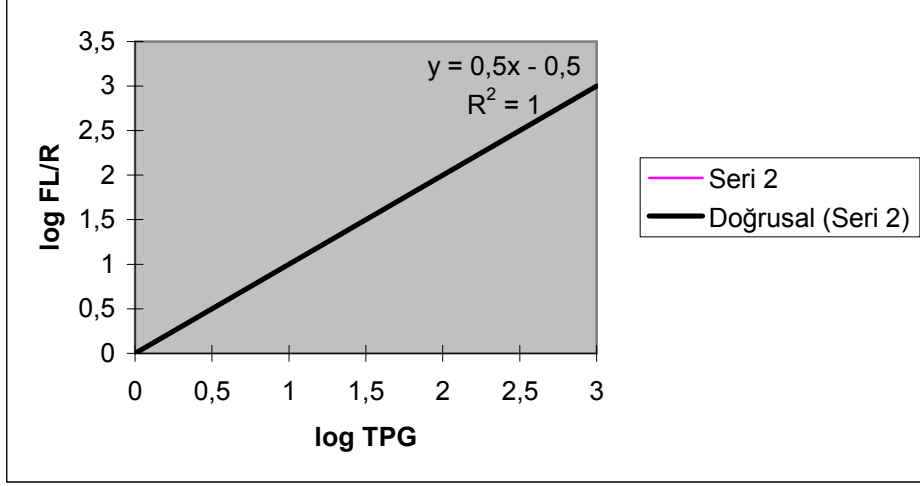
K2: Primer- dimer ve PCR kontaminasyonu için kullanılan kontrol grubudur. (Deneyden kaynaklanan hataları bertaraf etmek için aynı kontrol grubu 2 ayrı deney tüpünde hazırlanır ve spektrofotometride ölçümden sonra iki tüpten elde edilen ortalama değer kullanılır).

K3: Taq polimeraz kullanılmayan kontrol grubudur. Bu kontrolden elde edilen rhodamin emisyonu sayesinde örneklerden yansıyan net floresan miktarının tayin edilmesinde kullanılır. (Deneyden kaynaklanan hataları bertaraf etmek için aynı kontrol grubu 2 ayrı deney tüpünde hazırlanır ve spektrofotometride ölçümden sonra iki tüpten elde edilen ortalama değer kullanılır).

$\Delta FL$ :  $K2_{\text{ort}}$ 'nin floresan ışımaya miktarının örnek ve kontrollerde ölçülen floresan ışımaya miktarından çıkarılması ile elde edilen değerdir.

$\Delta R$ :  $K3_{\text{ort}}$ 'nin rhodamin ışımaya miktarının örnek ve kontrollerde ölçülen rhodaminin ışımaya miktarından çıkarılması ile elde edilen değerdir.

Yukarıda verilen formüllere uygun olarak TSR8'in 0,2 amole/ $\mu$ l, 0,04 amole/ $\mu$ l, 0,008 amole/ $\mu$ l ve 0,0016 amole/ $\mu$ l olarak dört farklı dilüsyonu için gerekli olan  $\Delta$ FL,  $\Delta$ R ve  $\log\Delta$ FL/ $\Delta$ R hesaplanır ve standart TPG (Total Pruduct Generated) oranlarına göre logaritmik bir tablo oluşturulur. Oluşturulan tablonun güvenilirliğinden yola çıkılarak örneklerdeki telomeraz aktivitesi oluşturulan bu standart tablosuna göre belirlenir. Tablo 3.1' de örnek bir tablo görülmektedir.



**Tablo 3.1.** TSR8 standart tablosu ve telomeraz kantitasyonu için elde edilen formül

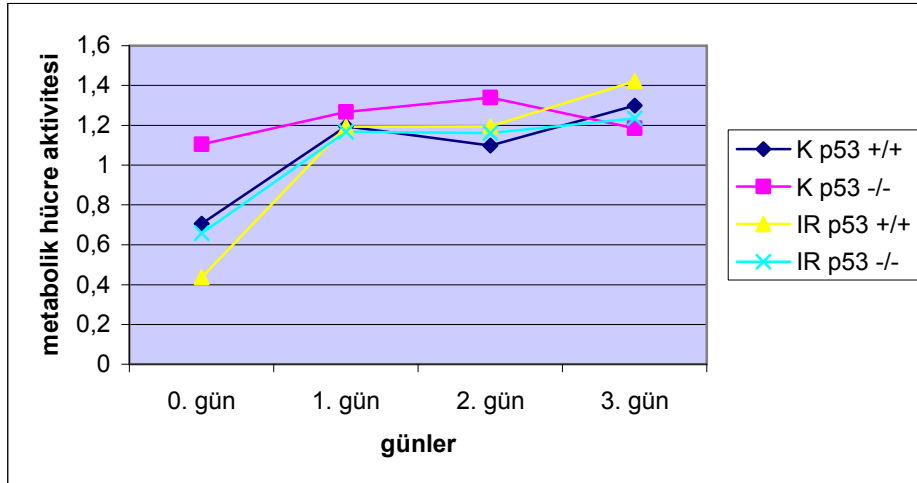
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada 0,1,2 ve 3. günlerde K p53 +/+, K p53-/- ve IR p53+/+, IR p53 -/- hücre serilerinden alınan toplam 16 örnekte TRAP analizi, MTT, apoptozis için Tyripan Blue boyaması ve akım sitometride Sub-G<sub>0</sub> faz ölçümü ve yine akım sitometride hücre döngü analizleri yapılmıştır.

##### 4.1 Hücrelerde canlılık oranı, telomeraz aktivitesi, hücre döngüsü ve apoptozis

###### 4.1.1 Metabolik hücre aktivitesi ve canlılık oranı:

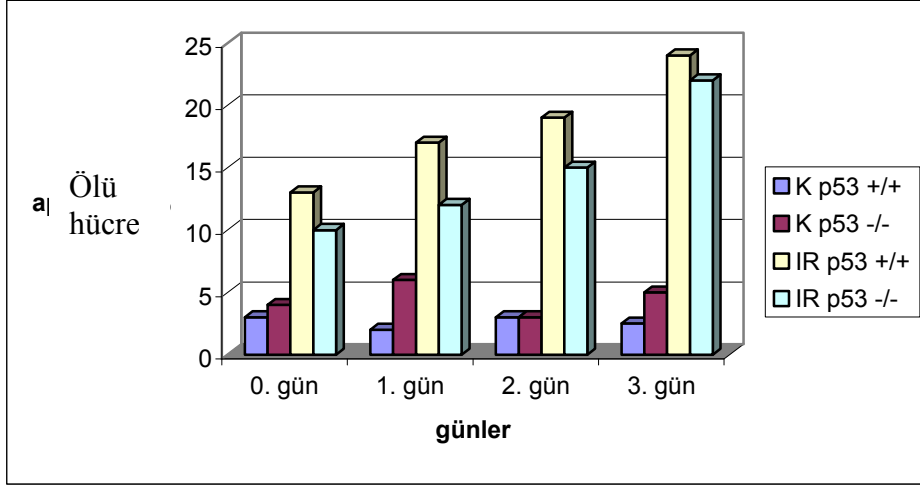
Kontrol ve 5 Gy gama radyasyonu uygulanan hücre serilerinde 1 günlük inkübasyon süresini takiben MTT analizleri yapılmıştır. MTT analiz sonuçlarına göre hem radyasyon uygulanan p53 +/+ ve p53 -/- deney gruplarında ve hem de p53 +/+ ve p53 -/- kontrol gruplarında metabolik aktivite ve dolayısıyla canlı hücre sayısı tespit edilmiştir. Burada, elde edilen canlı hücre sayıları için 3 tekrar gerçekleştirilmiş ve analiz sonunda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Sonuçlar tablo 4.1' de gösterilmiştir.



*Tablo 4.1. Hücre serilerindeki canlılığın günlere göre oranı*

###### 4.1.2. Tyripan blue ile canlı ve ölü hücre oranları:

Hücre serilerinde, günlere göre ölü hücre yüzdesini tespit etmek amacıyla kullanılan tyripan blue boyama sonuçları tablo 4.2' de gösterilmiştir. Radyasyon uygulanan hücre serileriyle, radyasyon uygulanmayan hücre serileri arasında ölü hücre oranı bakımından yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda radyasyon uygulanan serilerdeki ölü hücre oranlarının anlamlı derecede arttığı bulunmuştur. ( $p < 0,001$ )

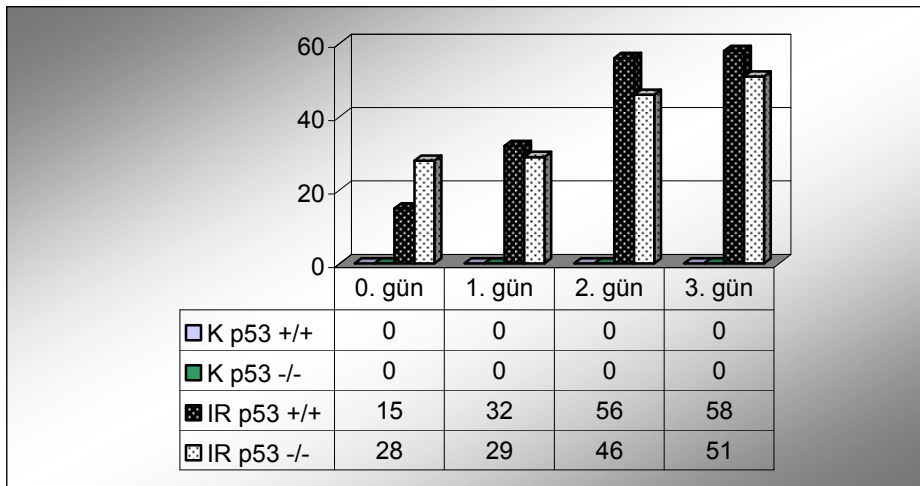


**Tablo 4.2.** Hücre serilerinin tyripan blue boyaması sonrasında günlere göre ölü hücre oranları

#### 4.1.3 Hücrelerde apoptozis oranı

##### 4.1.3.1 Sub-Diploid DNA içeriğine göre apoptozis oranları:

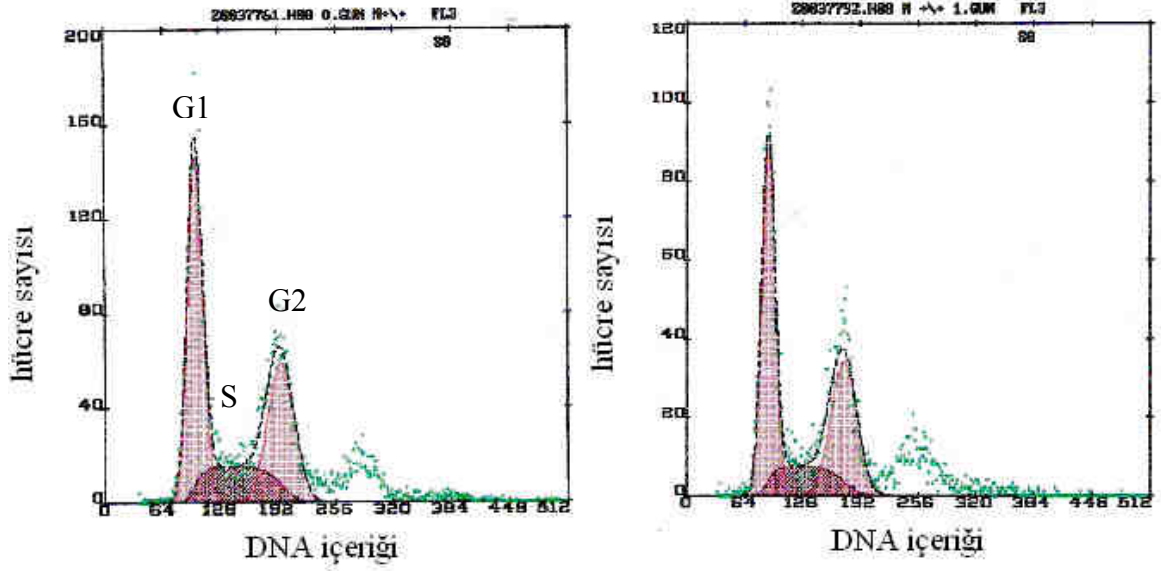
Hücre serilerinde, günlere göre apoptozis yüzdesini tespit etmek amacıyla kullanılan Sub-Diploid DNA içeriğine göre apoptotik yüzde oranları tablo 4.3' de belirtilmiştir. Akım sitometrik bu test sonuçlarına göre 5 Gy gama radyasyonuna maruz bırakılan IR p53+/+, IR p53 -/- hücre serilerinde anlamlı oranda apoptozis gözlenmiştir. Bu yöntemle göre normal kültür koşullarındaki hücrelerde meydana gelen apoptotik hücre ölümü belirli bir oranın altında olduğunda (ki %10' un altındaki bu oran normal karşılanmaktadır) pik vermemektedir.



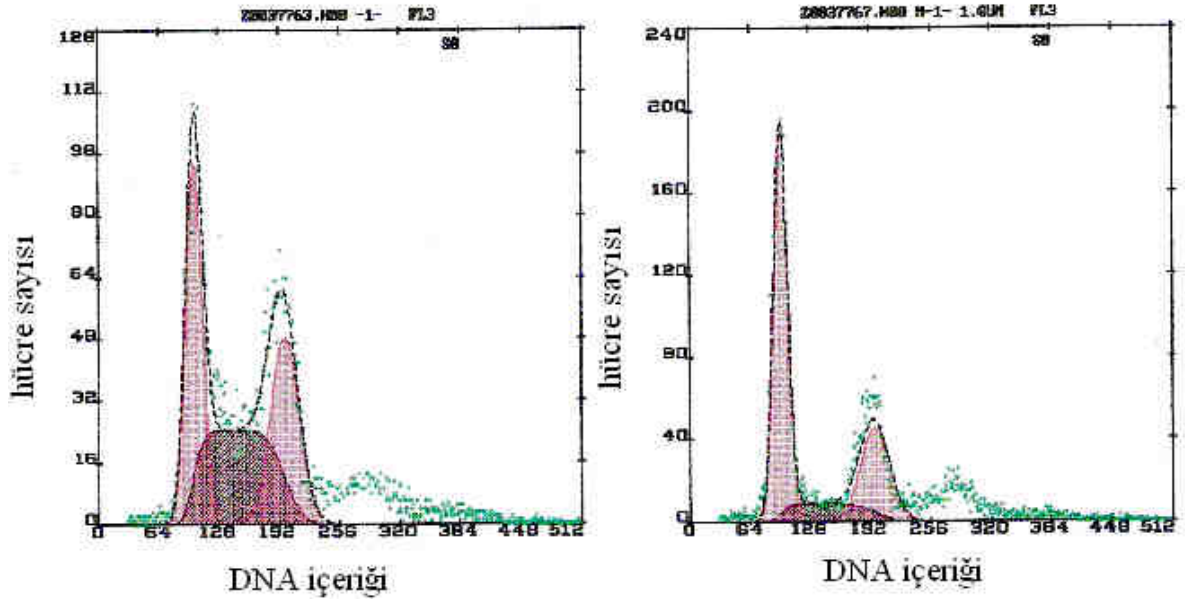
**Tablo 4.3.** Hücre serilerinin Sub-G<sub>0</sub> fazı analizi sonrasında günlere göre apoptotik oranlar

#### 4.1.4 Hücre döngüsü analizi ve apoptozis sonuçları

a)

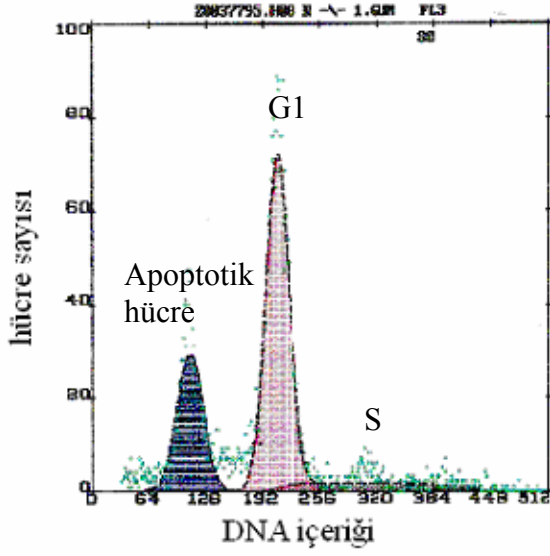


b)

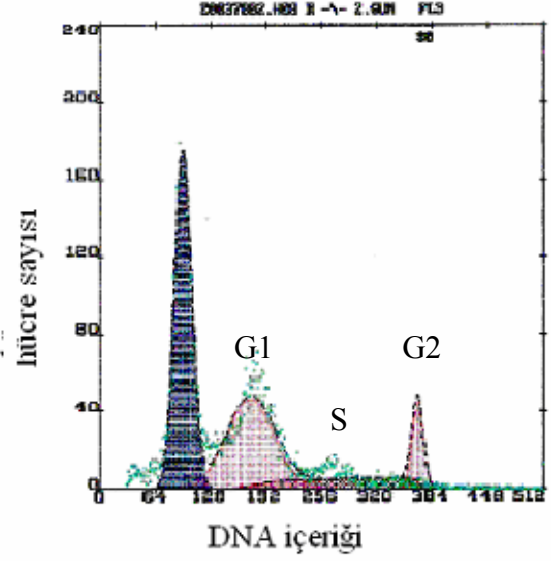


Şekil 4.1. a)  $p53^{+/+}$  hücre serilerindeki G1, S ve G2 safhası b)  $p53^{-/-}$  hücre serilerinde G1, S ve G2 safhası. Bu hücrelerde 24. saatte döngü normal bir şekilde devam etmektedir.

a)

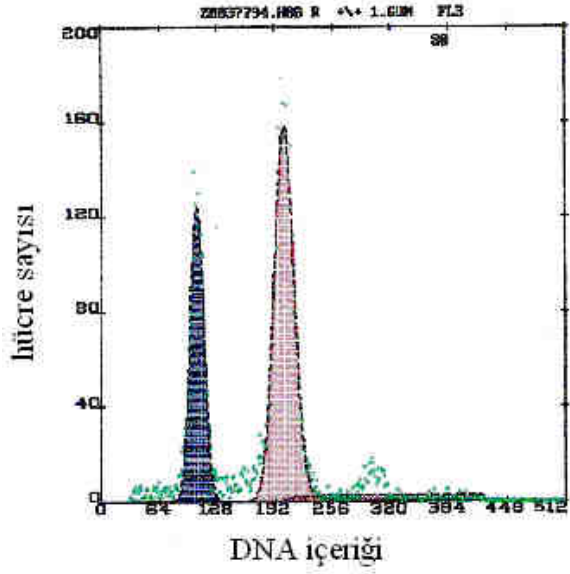


b)

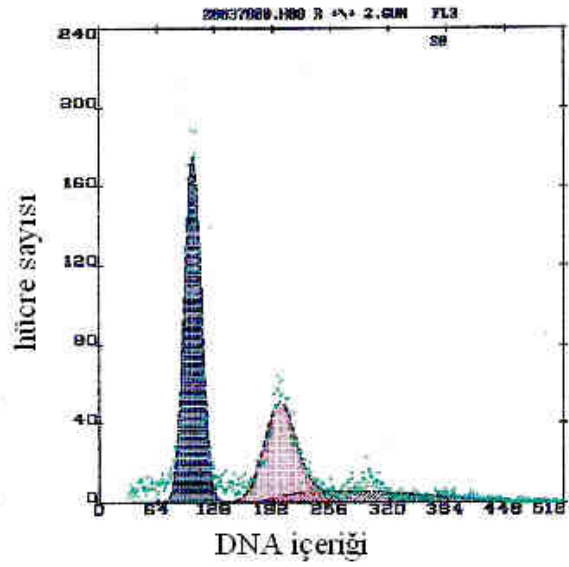


Şekil 4.2. a) IR p53<sup>-/-</sup> hücre serilerinde 24. saatte G1 safhası ve apoptozis b) IR p53<sup>-/-</sup> hücre serilerinde 5 Gy gama radyasyonunu takiben G2'de birikim ve sonrasında apoptotik pik görülmektedir.

a)



b)



Şekil 4.3. a) IR p53<sup>+/+</sup> hücre serisinde G1, S ve apoptozis b) IR p53<sup>+/+</sup> hücre serilerinde G1, S ve apoptozis.

#### 4.1.5 Telomeraz aktivitesi

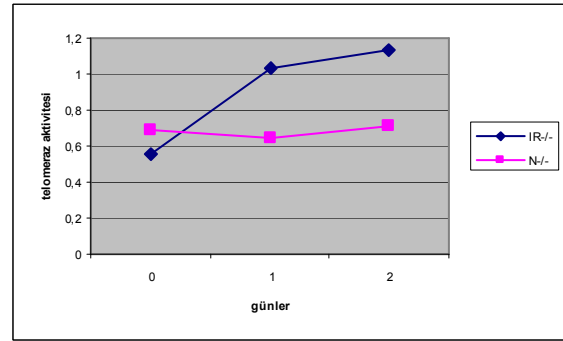
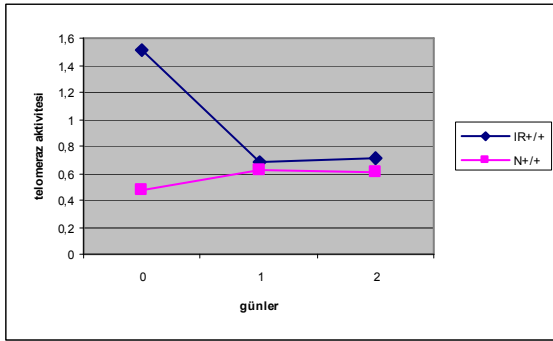
Telomeraz aktivitesinin sayısal verileri incelendiğinde kontrol p53+/+ ve p53 -/- hücre serilerinde 0.1. ve 2. günlerde 5 Gy gama radyasyonuna maruz bırakılmış olan IR p53+/+ hücre serisinde telomeraz aktivitesinde azalma görülürken IR p53-/- hücre serilerinde telomeraz aktivitesinde artış gözlenmiştir.

Hücreler/Günler	0. gün	1. gün	2. gün
IR+/+	1,507085341	0,6874236	0,710018775
N+/+	0,475023964	0,616803772	0,600571394

Hücreler/Günler	0. gün	1. gün	2. gün
IR-/-	0,553861975	1,035480432	1,131863107
N-/-	1,507085341	0,6874236	0,710018775

a)

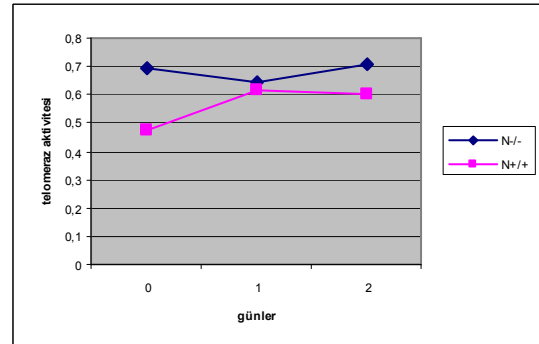
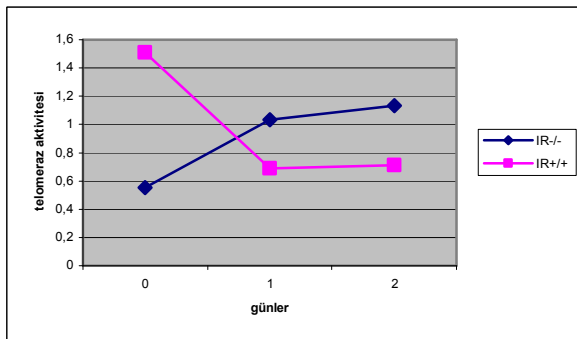
b)



**Tablo 4.1.1.** a) N p53+/+ ile IR p53+/+ ve b) N p53-/- ile IR p53-/- hücre serilerindeki telomeraz aktivitesinin karşılaştırılması

a)

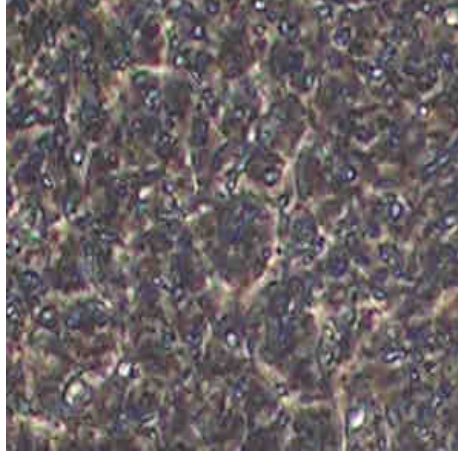
b)



**Tablo 4.1.2.** a) IR p53 -/- ile IR p53+/+ ve b) N p53-/- ile IR p53+/+ hücre serilerindeki telomeraz aktivitesinin karşılaştırılması

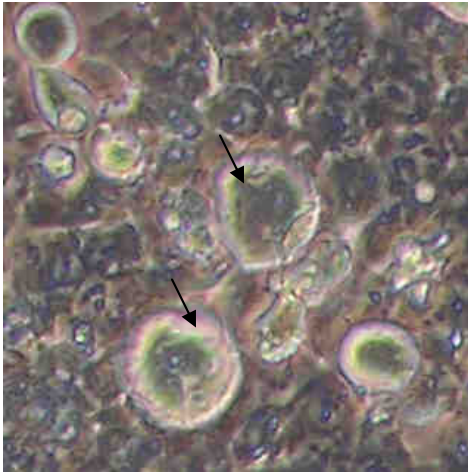
#### 4.1.6 Hücre morfolojilerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü

72. saatte hücrelerde 5 Gy gama radyasyonu sonrasında kontrol gruplarına göre meydana gelen morfolojik değişiklikleri görüntülemek amacıyla dijital fotoğraf makinesiyle 10x20 büyütmede, hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

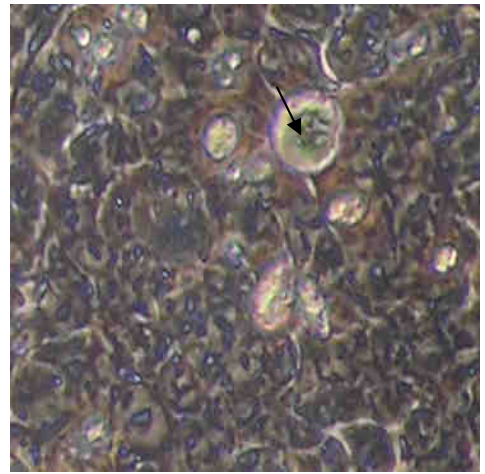


*Şekil 4.4 K p53 +/+ hücre serisinde 72. saat sonrası morfolojik şekil*

a)



b)



*Şekil 4.5 a) IR p53 -/- hücre serisinde 72. saat sonrası morfolojik değişiklik. 5 Gy gama radyasyonu sonrasında hücrelerde yuvarlak ve genişlemiş bir görüntü b) IR p53 +/+ hücre serisinde 72. saatte meydana gelen morfolojik değişiklik, IR p53 -/- hücre serilerine göre daha az sayıda hücrede morfolojik değişiklik meydana gelmiştir.*



#### 4.1.7 İstatistiksel bulgular:

Hücre döngüsü ve Sub G0 fazına göre elde edilen sayısal bulgular ki kare testi ile analiz edilmiştir. MTT için elde edilen ölçümsel veriler ise Kruskal Wallis, Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

K p53-/- grubu için kendi içerisinde günlere göre döngü ve apoptozis oranları aşağıdaki tablo 4.1.5.1 ile değerlendirilmiştir. ( $p > 0,005$ )

saat\*durum çapraz tablo

			durum			Total
			G0/G1	Sentez	G2/M	
saat	0. saat	hesap	83	50	67	200
		% saat	41,5%	25,0%	33,5%	100,0%
		% durum	21,4%	29,8%	27,2%	25,0%
	24. saat	hesap	91	47	62	200
		% saat	45,5%	23,5%	31,0%	100,0%
		% durum	23,5%	28,0%	25,2%	25,0%
	48. saat	hesap	103	37	60	200
		% saat	51,5%	18,5%	30,0%	100,0%
		% durum	26,6%	22,0%	24,4%	25,0%
	72. saat	hesap	110	34	57	201
		% saat	54,7%	16,9%	28,4%	100,0%
		% durum	28,4%	20,2%	23,2%	25,1%
Total	hesap	387	168	246	801	
	% saat	48,3%	21,0%	30,7%	100,0%	
	% durum	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tablo 4.6** K p53-/- hücre serisinin saatlere göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi

K p53+/+ grubu için kendi içerisinde günlere göre döngü ve apoptozis oranları aşağıdaki tablo 4.1.5.2 ile değerlendirilmiştir. (p> 0,005)

saat\*durum çapraz tablo

			durum				Total
			G0/G1	Sentez	G2/M	Apoptozis	
saat	0. saat	hesap	110	29	61	0	200
		% saat	55,0%	14,5%	30,5%	,0%	100,0%
		% durum	24,8%	21,2%	27,5%	,0%	24,2%
	24. saat	hesap	97	32	72	0	201
		% saat	48,3%	15,9%	35,8%	,0%	100,0%
		% durum	21,9%	23,4%	32,4%	,0%	24,3%
	48. saat	hesap	123	23	55	0	201
		% saat	61,2%	11,4%	27,4%	,0%	100,0%
		% durum	27,8%	16,8%	24,8%	,0%	24,3%
	72. saat	hesap	113	53	34	24	224
		% saat	50,4%	23,7%	15,2%	10,7%	100,0%
		% durum	25,5%	38,7%	15,3%	100,0%	27,1%
Total	hesap	443	137	222	24	826	
	% saat	53,6%	16,6%	26,9%	2,9%	100,0%	
	% durum	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tablo 4.7.** K p53+/+ hücre serisinin saatlere göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi

IR p53-/- grubu için kendi içerisinde günlere göre döngü ve apoptozis oranları aşağıdaki tablo 4.1.5.3 ile değerlendirilmiştir. (p< 0,005)

saat\*durum çapraz tablo

			durum				Total
			G0/G1	Sentez	G2/M	Apoptozis	
saat	0. saat	hesap	147	52	0	83	282
		% saat	52,1%	18,4%	,0%	29,4%	100,0%
		% durum	25,8%	29,1%	,0%	28,8%	25,9%
	24. saat	hesap	183	17	0	59	259
		% saat	70,7%	6,6%	,0%	22,8%	100,0%
		% durum	32,2%	9,5%	,0%	20,5%	23,8%
	48. saat	hesap	113	36	51	48	248
		% saat	45,6%	14,5%	20,6%	19,4%	100,0%
		% durum	19,9%	20,1%	100,0%	16,7%	22,8%
	72. saat	hesap	126	74	0	98	298
		% saat	42,3%	24,8%	,0%	32,9%	100,0%
		% durum	22,1%	41,3%	,0%	34,0%	27,4%
Total	hesap	569	179	51	288	1087	
	% saat	52,3%	16,5%	4,7%	26,5%	100,0%	
	% durum	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tablo 4.8** IR p53-/- hücre serisinin saatlere göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi

IR p53+/+ grubu için kendi içerisinde günlere göre döngü ve apoptozis oranları aşağıdaki tablo 4.1.5.4 ile değerlendirilmiştir. (p< 0,005)

saat\*durum çapraz tablo

			durum				Total
			G0/G1	Sentez	G2/M	Apoptozis	
saat	0.saat	hesap	95	26	78	23	222
		% saat	42,8%	11,7%	35,1%	10,4%	100,0%
		% durum	17,4%	15,2%	96,3%	7,2%	19,9%
24.saat	hesap	hesap	173	24	3	70	270
		% saat	64,1%	8,9%	1,1%	25,9%	100,0%
		% durum	31,7%	14,0%	3,7%	21,9%	24,2%
48.saat	hesap	hesap	135	64	0	114	313
		% saat	43,1%	20,4%	,0%	36,4%	100,0%
		% durum	24,8%	37,4%	,0%	35,6%	28,0%
72.saat	hesap	hesap	142	57	0	113	312
		% saat	45,5%	18,3%	,0%	36,2%	100,0%
		% durum	26,1%	33,3%	,0%	35,3%	27,9%
Total	hesap	hesap	545	171	81	320	1117
		% saat	48,8%	15,3%	7,3%	28,6%	100,0%
		% durum	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tablo 4.9** IR p53+/+ hücre serisinin saatlere göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi

## 5. TARTIŞMA

Bütün hücrelerde, tam bir hücre bölünmesi, genomik stabilizasyonun sağlanmasında ve mutasyonların önlenmesi bakımından önemlidir. DNA' nın doğru bir şekilde replikasyonu ve kromozomların iki yavru hücreye eşit sayıda dağılması gereklidir. İyonize radyasyon gibi fiziksel ajanlar DNA' da hasarlara sebep olduğunda, bu hasarın tamir edilmesi gerekmektedir, şayet hata tamir edilmezse bu hücre için letal olabilir. Hücrelerin hasar sonrasında sinyal ağları uyarılarak hasarlı hücrelerin engellenmesi ile bu hasarın yeni jenerasyona geçmesi önlenir. Radyasyon hücre döngüsünün ilerlemesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve G1/S kontrol noktasını aktive edebilir. Böylece replikasyondan önce tamir gerçekleştirilmiş olur. Aynı zamanda radyasyon sonrasında G2/M kontrol noktası da harekete geçirilir ki böylece replike olan kromozomlarda bir hasar varsa tamire olanak tanıyan zaman sağlanmış olur. G1/S ve G2/M kontrol noktalarına ek olarak S fazındaki kontrol noktası da tamir için zaman tanınması bakımından önem taşımaktadır. Bu kontrol noktalarındaki bekleme süresiyle birlikte hücrelerin akıbetini ilgilendiren hücresel yanıtın ne olduğuna karar verilmektedir. Hücreler bu kontrol noktalarından birinde durduruldukları zaman kalıcı bir engelleme ile senesense veya geçici bir engelleme sonrası hasarın yeni jenerasyona geçişini önlemek için apoptozise yönlendirilmektedir. Radyasyonun zararlı etkisini takiben, bu kontrol noktalarının harekete geçirilmesinde, önemli ve üzerinde en çok durulan anahtar bir protein söz konusudur ki bu protein p53' dür. p53 proteini ile yapılan çok fazla çalışma bulunmakta ve bu kontrol noktalarındaki moleküler mekanizmaları üzerindeki etkisi her geçen gün yeni bulgularla birlikte aydınlatılmaya çalışılmaktadır. (Sohn D. vd., 2006, Wichmann A. vd., 2002)

Gama radyasyonunun çeşitli dozlarıyla yapılan çalışmalarda özellikle 5 ve 7,5 Gy radyasyon dozunun DNA' da çoğunlukla tek ve çift zincir kırıklarına yol açtığı bildirilmiştir. Bazı hücre tiplerinde gama radyasyonu, p53-aracılı G1 kontrol noktalarını indüklemekte ve böylece hücrenin döngüye girmesini durdurarak hasarın tamiri ile ilgili yolları harekete geçirmekte ve DNA tamiri gerçekleştirilmekte veya eğer hasar tamir edilemeyecek büyüklükteyse ya da tamir sistemlerinde hasarlar meydana geldiyse onkojenik mutasyonların yayılmasını engellemek amacıyla senesense benzer bir şekilde, geri dönüşümsüz olarak G1 engelinde bekletilmektedir. Bu safhadan sonra programlı hücre ölümü gerçekleştirilmektedir. p53' ün bahsedilen bu mekanizmalardaki kitapların genel bilgilerinde yer alacak kadar çok araştırılmıştır. Özellikle gama radyasyonu sonrasında genomun gardiyanı ya da kale muhafızı olarak bilinen p53' ün nükleus içinde biriktirilerek bir transkripsiyon faktörü olarak görev almasıyla, hücrenin akıbetini ilgilendiren bir çok yolakla ilişkili olduğu bildirilmektedir.

Bu tez çalışmasında yaban tip p53 ve p21 taşıyan hücre serilerinde 5 Gy gama radyasyonu sonrasında hücrelerin G1/S safhasında akümüle oldukları ve bu noktadan sonra apoptozise yönlendirildikleri gözlenmiştir. Ancak bazı kimyasal ajanlar uygulandığında hücrelerin p53 varlığında S fazı kontrol noktasının da uyarıldığı bildirilmektedir. S fazı kontrol noktasının aktive edilmesi p53 varlığına bağlıdır. G1/S kontrol noktasından kaçan hücreler S fazında böylece durdurulmaktadır ve bu noktadan sonra apoptozise yönlendirilmektedir. Bizim sonuçlarımızda da yaban tip p53 hücre serilerinde 0. saatte G1' de biriktikleri ve bunun 24. saatte arttığı görülmüştür. 48. ve 72. saatte G1' e bakıldığında 24. saatten itibaren G1 engelini azaldığı bunun tersine S fazındaki hücre sayısının arttığı görülmüştür. Ancak 0.,24.,48. ve 72. saatlerdeki apoptotik hücre sayısı akım sitometri yöntemi ile incelendiğinde bu apoptozisin her saatte bir önceki saate göre anlamlı bir miktarda arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar da 48. saatte bu hücrelerin G1' den kaçan hücrelerin S fazı engeline takıldığı ve bunun sonrasında da apoptozise yönlendirildiği şeklinde yorumlanmıştır. G1 engeline takılan hücrelerin büyük çoğunluğu bu safhadan sonra apoptozise yönlendirilmişler ancak G1' direnç gösterip S fazına geçen hücreler de bu safhada durdurularak apoptotik yanıt sağlanmıştır.

p53 tümör baskılayıcı proteini hücresel stres meydana geldiğinde yanıt olarak ya hücre döngüsünü durdurmakta ya da hücreyi apoptozise yönlendirmektedir. Gama radyasyonu gibi DNA-hasar yaratıcı ajanlarla MEF ("Mouse Embryonic Fibroblast") hücre serilerinde yapılan deneylerde özellikle 5 Gy gama radyasyonu uygulamasında hücrelerin G1 ve G2 kontrol noktalarında durduruldukları gösterilmiştir. Gama radyasyonuna cevaben gelişen G1 duraklamasına bakıldığında yaban-tip ve p53-/- hücrelerde farklı yanıtlar verildiği ortaya konmuştur. p53-/- MEF hücre serilerinin, yaban tipten farklı olarak radyasyondan sonra G1 yerine G2 kontrol noktasında biriktikleri gözlenmiştir. Ayrıca, gama radyasyonu uygulamasından sonra hücrede p53 seviyesinin arttığı ve p53' ün direk bir şekilde p21 promotörünü aktive ederek hücredeki p21 seviyesinin artmasını sağladığı tespit edilmiştir. İndüklenmiş p21 ise CDK' ye bağlanmakta ve onun aktivitesini inhibe

ederek hücrelerin G1 engeline takılmasına sebep olmaktadır. (Speidel D. ve ark., 2006, Attardi LD ve ark., 2004, Szkanderova S. ve ark., 2003)

MEF hücre serilerinde, G2 engeline bakıldığında ise p53 negatif olan hücrelerde G2 engeli görülmüştür ve bunun da p53' den bağımsız olarak meydana geldiği saptanmıştır. MEF hücre serilerinde G1 engeli p53 aracılı olarak gerçekleşirken G2 engelini p53'den bağımsız olarak gerçekleştirdiği saptanmıştır. Yine aynı çalışmada p21' in western blot sonuçlarına göre, ekspresyonunun arttığı, indüklenerek CDK' ya bağlandığı ve G1 engelini gerçekleştirdiği saptanmıştır. G2 engeli p53 bağımsız olarak da gerçekleştirilmektedir. P53 bağımsız G2 engelini gerçekleştiren yolakta önem arzeden molekül Cdc25A molekülüdür. (Şekil 2.15) Bu molekül bilindiği gibi hücre döngüsünde kilit moleküllerden biridir ve eğer hücre gama radyasyonu gibi hasar yaratıcı bir ajanla indüklenirse bu molekülün hücredeki miktarı azalmakta ve bu molekülün miktarının hızlı bir şekilde düşmesiyle birlikte hücrenin p53' den bağımsız olarak M fazına girmesi önlenmiş olmaktadır. (Williams A.C. ve ark, 1997, Mailand N. ve ark., 2000, Deeds L. ve ark., 2003, Attardi L.D ve ark., 2004, Vavrova J. ve ark., 2004))

Bizim çalışmamızda p21 yaban tip ve p53 -/- HCT116 kolon kanseri hücreleri kullanılmış ve bu hücrelerde G1 engeli yerine G2 engeli meydana geldiği sentez aşamasının devam ettiği saptanmıştır. Bu bulgularımız literatürle uyumlu bulunmuştur. P53-/- hücre serilerinde p21 yaban tip olarak bulunduğu G2 engelini p53 bağımsız bir yolakla, p21 ve CDK üzeinden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu tez çalışmasında 5 Gy gama radyasyonuna maruz bırakılan hücre serilerinde radyasyon uygulanmayan p53 yaban tip ve p53 -/- kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede apoptozise yönlendirildiği saptanmıştır. (p 0,001) Ancak p53 içermeyen hücrelerdeki apoptotik oranlar yaban tip p53 bulunan hücrelere benzerlik göstermektedir ve sayısal değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (p>0,005) p53 yaban tip ve p53 yoksun hücrelerdeki apoptotik oranların benzerlik göstermesi literatürde "p53 independent apoptosis" olarak bahsedilen apoptozisin meydana geldiğini destekler niteliktedir.

İyonize radyasyonun (IR) DNA' da çift zincir kırıkları meydana getirdiği bilinmektedir. IR' nin , bir çok kanserde terapiye yönelik kullanımıyla birlikte hasarlı olan hücreyi p53 aracılı olarak apoptozise yönlendirdiğini ve ilgili tamir sistemlerini harekete geçirdiğini bildiren bir çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin farelerde dalak, timus ve osteosit hücreleriyle yapılan bir çalışmada farelere total olarak radyasyon uygulamasını takiben bu hücrelerde p53 birikmesi gözlenmiş ancak dalak ve timüs hücrelerinde apoptozis meydana gelirken osteositlerde apoptozisin gerçekleşmediği görülmüştür. Ancak p53 aracılı yolak kadar iyi anlaşılammış olsa da p53' den bağımsız olarak da apoptozisin gerçekleştiği bilinmektedir. IR' nin p53' den bağımsız olarak indüklediğinin bilinmesi de tedavide, genetik olarak iyimser bir model oluşturmak bakımından önem tekil etmektedir. 2006 yılında Anita Wichmann ve arkadaşlarının, Drosophyla melanogaster ile yaptıkları bir çalışmada ise IR radyasyonu sonrasında, DNA' da meydana gelen hasarların p53' den bağımsız olarak doğrudan kaspazlar aracılığıyla apoptozisi indüklediği saptanmıştır. Szkanderova ve arkadaşlarının 2003 yılında yayınladıkları bir çalışmada radyasyon dozlarına bağlı bir şekilde MOLT-4 hücrelerinde (insan T lenfositik lösemi hücreleri) p53 aracılı olarak apoptozisin gerçekleştirildiği gösterilmiştir. P53 aracılı olarak apoptozise yönlendirme mekanizması da oldukça çeşitlilik göstermektedir ve bu transkripsiyonel ve transkripsiyonel olmayan bir şekilde gerçekleştirilir. Transkripsiyonel yolakta önem arzeden p53 proteininin nükleusa göçü ve burada transkripsiyon faktörü olarak proapoptotik genlerin ekspresyonlarını artırmasıdır. Ancak transkripsiyonel olmayan yolakta p53 nükleus yerine sitozolde biriktirilerek mitokondri aracılığıyla apoptozisi yönlendirmektedir. (Major O. ve ark., 2002, Siwicki K.J., 2003, Speidel D. ve ark., 2006 Wichman A. vd., 2006)

Bu tez çalışmasında; p53+/+ ve p53 -/- hücre serilerinde 5 Gy gama radyasyon uygulamasının ardından canlı ve ölü hücre sayısını tespit etmek için kullanılan "Tyripan Blue" boyaması sonrasında p53+/+ ve p53 -/- hücre serilerinde ölü hücre yüzdelерinin birbirine benzer olduğu saptanmıştır. Yine aynı şekilde diploit DNA içeriği yöntemiyle akım sitometride yapılan analizler sonucunda da p53 +/+ ve p53 -/- hücre serilerindeki apoptotik yüzdelерin birbirine benzer olduğu belirlenmiştir. Bu da yukarıda bahsedilen literatürler ışığı altında HCT116 kolon kanser hücre serilerinde apoptozisin p53' den bağımsız olarak meydana geldiğini göstermektedir. Sohn D. ve arkadaşlarının Cancer Research' de 2006 yılında yayımlanan çalışmasında 20 Gy gama radyasyonu uygulanan HCT116 hücre serilerinde p21' in p53' den bağımsız olarak güçlü bir şekilde CDK aktivitesini baskılayarak IR' nin indüklediği apoptozise neden olduğu bildirilmiştir. MTT sonuçlarına bakıldığında ise anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. (p>0,005) Çünkü MTT yöntemi proliferasyonu belirlemek bakımından sensitif olmamakla birlikte hücrede metabolik aktivitenin devam edip etmediğini anlamak bakımından önemli bir yöntemdir.

Gama radyasyonunun telomeraz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldığında ise farklı hücre serilerinde farklı yanıtlar ortaya çıktığı gözlenmiştir. HCT116 kolon kanser hücre serilerine 5Gy gama radyasyonu uygulamasıyla yapılan bir çalışmada şimdiki adıyla CDKN1A olarak bilinen p21 proteinin radyasyon uygulandıktan sonra özellikle 4. ve 24. saatlerinde ekspresyonunun bir önceki ölçüm sonucuna göre arttığı tespit edilmiştir. p21' in hücreleri G1 safhasında engellediği bilinmekte olup bundan sonraki yanıt hücre tipine göre değişiklik arz etmektedir. Bu hücre serilerinde radyasyondan sonra daha yuvarlak ve genişlemiş hücreler gözlenmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında da 5 Gy gama radyasyonu uygulamasını takiben faz-contrast mikroskopta 2000 büyütmede hücrelerin özellikle 48. saatten sonra yuvarlak ve genişlemiş bir morfolojiye sahip olduğu ve bu oranın çalışmanın günlerine göre artış gösterdiği saptanmıştır. Mirzayans R. ve arkadaşlarının 2005 yılında yayımladıkları çalışmada 4 Gy gama radyasyonu uygulamasını takiben hücrelerde p21 ekspresyonunun yanı sıra %21 oranında B-galaktosidaz boyaması ile strese bağlı ortaya çıkan bir senesens türü olan akselere senesensin meydana geldiği saptanmıştır ve bu oranın radyasyon dozuna bağlı olarak duyarlılık gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamızda tyripan blue ve akım sitometri sonuçları incelendiğinde canlı ve S fazındaki hücrelerin azalması, apoptozis miktarındaki artışla birlikte genişlemiş görüntüde artış gözlenmesi, akselere senesensin meydana geldiğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar ise çalışmamızla oldukça uyumlu görünmektedir. Akselere senesensin ise, bu konuda çok fazla çalışma bulunmamasına rağmen telomeraz aktivitesinin regülasyonu ile düzenlendiği düşünülmektedir. (Mirzayans R. vd., 2005)

Telomeraz çok sıkı şekilde regüle edilen bir enzimdir. Çoğu insan dokusunda germinal hücrelerin ve kök hücrelerin dışında telomeraz aktivitesi doğumdan sonra aktivitesinin düştüğü veya olmadığı bilinmektedir. Telomerazın reaktivasyonu kanserli dokularda ve hücrelerde gerçekleşmektedir. Böylece telomeraz aktivitesi sınırsız hücre proliferasyonuna sahip hücreler için gereklidir ve bu da hücre siklusunun iptalini ya da hücre senesensi için gerekli olan telomer kısalmasını kompanse etmek için gereklidir. Buna karşın somatik hücrelerdeki telomerazın “down-regülasyonu” karsinogenezin kısıtlanması için önem taşımaktadır. Bilimsel verilere bakıldığında hücre döngüsü sırasında telomeraz aktivitesi ile ilgili çelişkili bulgulara rastlanmaktadır. Leteurtre ve arkadaşlarının 1997’ de Leukemia dergisinde yayımladıkları makalede 0-3 Gy gama radyasyonu uygulanan hematopietik hücre serilerinde telomeraz aktivitesinin hücre döngüsünü değiştirmediği ancak telomerazın up-regüle olduğu bildirilmiştir. Ancak HL60 hücre serileriyle yapılan başka bir çalışmada ise radyasyon uygulamasının ardından hücre siklusunun engeli ve telomerazın down-regüle olduğu ifade edilmiştir.(Leteurtre F. vd., 1997)

Çalışmamızda 0.24. ve 48. saatte analiz edilen telomeraz aktivite sonuçlarına bakıldığında p53 yaban tip HCT116 kolon kanser hücre serilerinde 5 Gy gama radyasyonundan sonra telomeraz aktivitesinde azalma meydana geldiği saptanmıştır. Ancak bunun tersine p53-/- hücre serilerinde telomeraz aktivitesinde artma meydana geldiği görülmüştür. Literatürde daha önce yayımlanmış olan çalışmalar incelendiğinde telomeraz enziminin katalitik alt ünitesi olan TERT in aktivitesinin p53 bağımlı bir mekanizma ile değiştiği belirtilmiştir. TERT aktivitesi radyasyon uygulamasından sonra p53 ün hücrede eksprese edilip edilmemesine göre değişmektedir. P53 varlığında hücrede radyasyon sonrasında TERT ekspresyonunun azaldığı ancak, p53 eksprese edilmediği durumlarda TERT aktivitesinin ve dolayısıyla telomeraz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. K.R. Jones ve arkadaşlarının 2005 yılında yayımladıkları çalışmada p53 yaban tip MCF7 meme kanseri hücre serilerinde 10 Gy gama radyasyonu uygulamasından sonra telomer boyalarının kıaldığı ve akselere senesensin meydana geldiği görülmüştür. Akselere senesens ya da stresin indüklediği DNA hasarı sonrası ortaya çıkan prematüre senesens, telomeraz aktivitesinin azalması sonrasında ortaya çıkabilmektedir. Bizim çalışmamızda p53 yaban tip hücre serilerinde 5 Gy gama radyasyonu sonrası telomeraz aktivitesinin azalması ve yaşlı hücre morfolojisinde artış gözlenmesi literatürdeki bu çalışmalarla uyum göstermektedir. Akselere senesens stresin indüklemiş olduğu şartlarda özellikle gama radyasyonu sonrasında meydana gelmektedir ki bu da telomer boyuyla yakından ilişkilidir. Telomerlerin ileri derecede kısalması ise bu stres koşullarında akselere senesensi uyardığı bilinmektedir. Ancak çalışmamızdaki bu verilerin, TERT ekspresyonu ve telomer boyu çalışmalarıyla desteklenerek, teyit edilmesi de ek bir proje olarak planlanmaktadır. (Shats I. ve ark., 2004, Jin Ju Y. ve ark., 2006, Kusumoto M. ve ark., 1999, Lin Z. ve ark., 2001)

Çalışmamızdan elde edilen deneysel bulgular ve literatürde buna eşlik eden çalışmalar ışığında gama radyasyonunun, hücre tipine ve radyasyon dozuna bağlı olarak, hücrelerde farklı yanıtlar oluşturabildiği ortaya çıkmıştır. Özellikle hücre tipine, hücrenin bulunduğu çevreye ve salgılanan faktörlere göre hücrelerin yanıtları farklı olabilmektedir. Hücrelerde gama radyasyonu gibi stresin indüklediği hasarlar meydana geldiğinde bu hasarların eliminasyonuna çalışılmaktadır. Hasarın bertaraf edilmesinde ilk olarak hücre döngüsündeki kontrol noktaları devreye girmekte ve kazanılan bu zamanda hücrelerin tamirine çalışılmaktadır. Ancak hasar tamir edilemezse ya da strese bağlı olarak tamir mekanizmalarında meydana

gelen bozukluklar neticesinde hücrenin programlı olarak ölümüne karar verilmektedir. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozis ile ilgili oldukça fazla araştırma yapılmaktadır. Bu çalışma sonuçları ise her geçen gün hücrenin akıbetini ilgilendiren bu mekanizmalar ile ilgili yeni bilgiler vermektedir. p53 proteininin ise stres koşullarında apoptozisi, G1 veya G2 safhasında hücreyi durdurduğu genel olarak bilinen yollardan en önemlisidir. Ancak çalışmamızda da gösterildiği gibi özellikle apoptozis ve G2 engelini p53'den bağımsız olarak meydana geldiği görülmüştür.

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular ışığında 5 Gy gama radyasyonu uygulaması sonucu HCT116 p53+/+ kolon kanser hücre serilerinde günlere göre G1 engelinde ve HCT116 p53-/- kolon kanser hücre serilerinde ise G2 engelinde artma gözlenmiştir. Elde edilen apoptozis sonuçları incelendiğinde ise hücrelerin p53' den bağımsız olarak apoptotik yanıtta karar kıldığı anlaşılmaktadır. Ancak p53-/- hücre serilerinde G2 safhasındaki ani düşüş, p53 -/- hücre serilerinde hücrelerin p53' e bağlı olarak 24. saatte G1 engelini aştığı, S engelini gittiği ve 1. günden sonra 5 Gy gama radyasyon dozunun kuvvetli etkisi nedeniyle G2 safhasından sonra apoptozisten kaçamadığı görülmüştür. 5 Gy gama radyasyonu p53 yaban tip hücre serilerinde telomeraz aktivitesinde günlere göre azalmaya neden olurken p53 -/- hücre serilerinde telomeraz aktivitesinde günlere göre artış gözlenmiştir. Hücrelerdeki genişlemiş ve yuvarlaklaşmış morfolojiyle birlikte G1 engelini takılan hücrelerden bir kısmının senesense girdiğini düşündürmektedir. Bu hücrelerin kalıcı bir G1 engelinden sonra senesense girdiğini ve bu safhadan sonra apoptozise girdiğini gösterir niteliktedir. Ancak B-galaktozidaz boyaması ve telomer boy ölçümlerinin yapılması bu düşüncenin desteklenmesi bakımından önem taşımaktadır.

## ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında öngörülen mekanizmaların doğrulanması için aşağıda listelenen deneysel çalışmalar, literatürde öne sürülen hipotetik mekanizmaların aydınlanması bakımından önem taşımaktadır.

- Hücrelerde radyasyonun indüklemiş olduğu telomer bozukluğunu tespit etmek amacıyla sitogenetik analizin yapılması
- Radyasyon sonrası hasarla ilintili olduğu düşünülen akselere senesense tespit etmek amacıyla telomer boy ölçümlerinin ve B-galaktozidaz boyamasının yapılması
- Telomer disfonksiyonu ile ilişkili olduğu farklı hücre serilerinde daha önce saptanmış olan TERT ekspresyon düzeylerine bakılması
- G2 engelini p53-bağımsız bir yolak olan CDC25'in ekspresyon seviyelerine bakılması
- P53-bağımsız apoptozisin p21 veya direkt kaspaz aktivitelerinden hangisiyle gerçekleştiğini saptamak amacıyla p21 ve kaspaz ekspresyon seviyelerine bakılması

## KAYNAKLAR

- Adimoolam S., Ford J.M., p53 regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair, *DNA Repair*, 2:947-954, 2003
- Ann C. Williams, Jayne C. Miller, Tracey Collard, Sara J. Browne, Robert F. Newbold, and Christos Paraskeva, The Effect of Different TP53 Mutations on the Chromosomal Stability of a Human Colonic Adenoma Derived Cell Line With Endogenous Wild Type TP53 Activity, Before and After DNA Damage, *GENES, CHROMOSOMES & CANCER* 20:44–52, 1997
- Appella E., Anderson C. W., Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses, *Eur. J., Biochem.*, 268:2764-2772, 2001
- Artandi S.E., and Depinho R.A., A critical role for in suppressing and facilitating carcinogenesis, *Current Opinion in Genetics & Development*, 10:39-46, 2000
- Artandi S.E., Attardi L.D., Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, spoptosis, and cancer, *BBRC*, 331:881-890, 2005
- Artandi S.E., Depinh R.A., Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer?, *Nature Medicine*, Vol. 6 No. 8 pp.852-855, 2000
- Attardi L.D., The Role of p53-mediated apoptosis as a Crucial anti-tumor response to genomic instability: lessons from Mouse models, *Mutation Research*, 569:145-157, 2005
- Attardi L.D., Vries A.D., Jacks T., Activation of the p53-dependent G1 checkpoint in response in Mouse embryo fibroblasts depends on the spesific DNA damage inducer, *Oncogene*, 23:973-980, 2004
- Ben-Porath I., Weinberg R.A., The Signals and pathways activating cellular senescence, *IJBCB*, 37:961-976, 2005
- Blackburn E.H., Switching and signaling at the telomere, *Cell*, 21;106(6):661-73, 2001
- Brooks L.C., and Gu W., Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for regulation, *Current Opinion in Cell Biology*, 15:164-171, 2003
- Brooks L.C., Gu W., Dynamics in the p53-Mdm2 Ubiquitination Pathway, *Cell Cycle*, 3:895-899, 2004
- Caspari T., How to Activate p53, *Current Biology*, 10:R315-R317, 2000
- Chendil D., Oakes R., Alcock R.A., Patel N., Mayhew C., Gallicchio V.S., Ahmed M.M., Low Dose Fractioned Radiation Enhances the Radiosensitization Effect of Paclitaxel in Colorectal Tumor Cells with Mutant p53, *American cancer Society*, 5:1893-1900, 2000
- Collins k., mammalian telomeres and telomerase, *Curr Opin Cell Biol*, 12(3):378-83, 2000
- Collins K., The biogenesis and regulation of telomere holoenziymes, *Nat Rev Mol cell Biol*, 7(7):484-94, 2006
- Crow M.T. Mani K., Nam Y.J., and Kitsis R.N., The Mitochondrial Death pathway and Cardiac Myocytes Apoptosis, *Circ. Res.* 95:957-970, 2004



- Dai M. S., Shi D., Jin Y., Sun X.X., Zhang Y., Grossman S.R. and Lu H., Regulation of The MDM2-p53 Pathway by Ribosomal Protein L11 Involves a post-ubiquitination Mechanism, *J. Biol Chem.* 281(34):24304-24313, 2006
- Deeds L., Teodorescu S., Chu M., Yu Q., Chen K.Y., A p53-independent G1 cell cycle checkpoint induced by the supression of protein kinase C alpha and theta isoforms, *J Biol Chem*, 10;278(41):39782-93, 2003
- Donzelly M and Draetta G.F., Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation, *Embo Rep.*, 4(7):671-677,2003
- Dou P. Q., An B., Will P.L., Induction of a retinoblastoma phosphatase activity by anticancer drugs accompanies p53-independent G1 arrest and apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:9019-9023, 1995
- Dyke V.T., p53 and Tumor Suppression, *NENGLJ Med.* 356(1):79-81, 2007
- Enss L., Bogen K.T, Wizniak J., Murtha A.D., and Weinfeld M., Low-Dose Radiation Hypersensitivity Is Associated With p53- Dependent Apoptosis, *Mol. Cancer Res.*, 2(10):557-566, 2004
- Esman F., pohlman S., Gilllisen B., Daniel P.T., Schulze-Osthoff K., Irradiation-induced Translocation of p53 to Mitochondria in the Absence of Apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280 No.44 pp 37169-37177, 2005
- Falck J., Mailand N., Sen Syljuae R.G., Bartek J., Lukas J., The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis, *Nature*, 10:842-847, 2001
- Fei P. And El-Deiry W.S., p53 and radiation responses, *Oncogene*, 22:5774-5783, 2003
- [ghr.nlm.nih.gov/gene=tp53](http://ghr.nlm.nih.gov/gene=tp53)
- Goodsell D.S., The Molecular Perspective: p53 Tumor Suppressor, *The Oncologist*, 4:138-139, 1999
- Grosovsky A.J., Radiation-induced mutations in unirradiated DNA, *PNAS*, 96:5346-5347, 1999
- Hahn W.C., Telomerase and Cancer: Where and When?, *Clinical Cancer Research*, 7:2953-2954, 2001
- Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M., Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Nature*, 387:296-299, 1997
- Hermenking H., Lengauer C., Polyak K., He T. C., Zhang L., Thiagalingam S., Kinzler K.W., and Vogelstein B., 14-3-3 $\sigma$  Is a p53- regulated inhibitor of G2/M Progression, *Molecular Cell*, 1:3-11, 1997
- Hussain S.P., and Harris C.C., p53 Biological Network: At the Crossroads of the Cellular-Stress Response Pathway and Molecular Carcinogenesis, *J. Nippon Med. Sch.*, 73(2):54-64, 2006
- Jallepalli P.V., Lengauer C., Vogelstein B., and Bunz F., The Chk2 Tumor Suppressor Is Not Required for p53 Responses in Human Cancer Cells, *j. Biol. Chem.*, Vol. 278(23):20475-20479, 2003
- Jan Konrad Siwicki, Sofie Degerman, Krystyna H. Chrzanowska, and Goˆran Roo, Telomere maintenance and cell cycle regulation in spontaneously immortalized T-cell lines from Nijmegen breakage syndrome patients, *Experimental Cell Research* 287:(178-189), 2003
- Jones K.R., Elmore L.W., Jackson-Cook C., Demasters G., Povirk L.F., Holt S.E., Gewirtz D.A., p53 Dependent accelerated senescence induced by ionising radiation in breast tumour cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 81, No. 6 pp. 445-458, 2005

- Jun Ji Y., Park E.J., Juhn K.M., Jeong J., Yun Mi., Park M.J., Park G.H., Choi K.Y., Cho M.H., Wong K.K., Park W.B., Lee K.H., Chromosomal end fusion resulting from telomere erosion increases susceptibility to radiation via multinucleation: Effect of p53, *International Journal of Oncology*, 29:753-763, 2006
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26(4):239-57, 1972
- Kusumoto M., Ogawa T., Mizumoto K., Ueno H., Niyama H., Sato N., Masafumi N., Tanaka M., Adenovirus-mediated p53 gene transduction inhibits telomerase activity independent of its effects on cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells, *Clinical Cancer Research*, 5:2140-2147, 1999
- Lakin N.D and Jackson P.S., Regulation of p53 in response to DNA damage, *Oncogene*, 18:7944-7655, 1999
- Latonen L., Laiho M., Cellular UV damage responses—Functions of tumor suppressor p53, *BBA*, 1755:71-89, 2005
- Leteurtre F, Li X, Gluckman E, Carosella ED., Telomerase activity during the cell cycle and in gamma-irradiated hematopoietic cells., *Leukemia*, 11(10): 1681-9, 1997
- Levine A.J., p53, the Cellular Gatekeeper for Growth And Division, *Cell*, Vol. 88:323-331, 1997
- Leyav-Cohen Y. Haupt S. & Haupt Y., Mdm2 in growth signaling and cancer, *Growth Factors*, 23(3): 183-192, 2005
- Li M., Brooks C.L., Wu-Baer F., Chen D., Baer R., Gu W., Mono-versus polyubiquitination differential control of p53 fate by Mdm2, *Science*, 12:302(5652):1972-5, 2003
- Li. H., Cao Y., Berndt M.C., Funder J.W., and Liu J. P., Molecular interaction between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro, *Oncogene*, 18:6785-6794, 1999
- Liang S.H. and Clarke F.C., Regulation of p53 localization, *Eur. J. Biochem.* 268:2779-2783, 2001
- Lin Z., Lim S., Viani M.A., Sapp M., Lim S.M., Down-regulation of telomerase activity in malignant lymphomas by radiation and chemotherapeutic agents, *American Journal of Pathology*, Vol.159. No. 2:711-719, 2001
- Little J.B., Genomic instability and radiation, *J Radiol Prot.*, 23:173-181, 2003
- Mailand N., Podtelejnikov A.V., Groth A., Mann M., Bartek J., Lukas J., Regulation of G2/M events by cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability, *The Embo Journal*, 21:5911-5920, 2002
- Major O., Szeifert G.T., Fazekas I., Vitanovics D., Csonka E., Kocsis B., Bari z., Kemeny A.A., Naggy Z., Effect of single-high dose gamma irradiation on cultured cells in human cerebral arteriovenous malformation. *J Neurosurg*, 97(5):459-63, 2002
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P. And Moll U.M., p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria, *Molecular Cell*, 11:577-590, 2003
- Mirzayans R., Scott A., Cameron M., Murray D., Induction of accelerated senescence by  $\gamma$  radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type TP53, *Radiation Research*, 163:53-62, 2005
- Myung J., Kim. K.B., Crews C.M., The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Proteasome Inhibitors, *Medicinal Research Reviews*, 21(4):245-273, 2001

- Nida H., Nakanishi M., DNA damage checkpoints in mammals, *Mutagenesis*, 21(1):3-9, 2006
- Oren M., Damalas A., Gottlieb T., Michael D., Taplick J., Leal F. M., Maya R., Moas M., Seger R., Taya Y., Ben-Ze'ev A., Regulation of p53: intricate loops and delicate balances, *Biochemical Pharmacology*, 64:865-871, 2002
- Perry M.e., Mdm2 in the Response to Radiation, *Molecular Cancer Research*, 2:9-19, 2004
- Ross G.M, Induction of cell death by radiotherapy, *Endocrine-Related Cancer*,6:41-44, 1999
- Ryan K.M., Phillips A.C., and Vousden K.H., Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein, *Current Opinion in Cell Biology*, 13:332-337, 2001
- Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Kaçmaz -Ünsal K., Linn Stuart, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annu. Rew. Biochem.*, 73:39-85, 2004
- Serakinci N., Christensen R., Graakjaer J., Cairney C.J., Keith N.W., Alsner J., Saretzki G., Kolvraa, Ectopically hTERT expressing adult human mesenchymal stem cells are less radiosensitive than their telomerase negative counterpart, *Experimental Cell Research*, 313: 1056-1067, 2007
- Sharpless N.E., DePinho R.A., Telomeres, stem cells, senescence, and cancer, *J Clin Invest*, 113(2):160-8, 2004
- Sharpless E.N. and DePinho A. R., p53: Good Cop/ Bad Cop, *Cell*, Vol. 110:9-12, 2002
- Shats I., Milyavsky M., Tang X., Stambolsky P., Erez N., Brosh R., Kogan I., Braunstein I., Tzukerman M., Ginsberg D., Rotter V., p53-dependent down-regulation of telomerase is mediated by p21, *JBC*, Vol. 279. No. 49, 50976-50985, 2004
- Shay J.W., Wright W.E., Telomerase: a target for cancer therapeutics, *Cancer cell*, 2(4):257-65, 2002
- Sherr C.J., Divorcing ARF and p53: an unsettled case, *Nature Reviews*, 6:663-673, 2006
- Siliciano J.d., Canman C.E., Taya Y., Sakaguchi K., Appella E., and Kastan M.B., DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53, *Genes&Development*, 11:3471-3481, 1997
- Siwicki J.K., Degerman S., Chrzonovska K.H., Roos G., Telomere maintenance and cell cycle regulation in spontaneously immortalized T-cell line from Nijmegen breakage syndrome patients, *Exp Cell research*, 287(1):178-189, 2003
- Sohn D., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Janick R.U., p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase mediated caspase-9 activation, *Cancer Res*, 1;66(23)11254-62, 2006
- Speidel D., Helmbold H., Deppert W., Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the p53 response to genotoxic stress, *Oncogene*, 25:940-953, 2006
- Stewart S.A., Hahn W.C., O'Connor B.F.; Banner E.N., Lundberg A.S., Modha P., Mizuno H., Brooks M.W., Fleming M., Zimonjic D.B., Popescu N.C., and Weinberg R.A., Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism, *PNAS*, 99:12606-12611, 2002
- Stewart S.A., Multiple Levels of telomerase Regulation, *Molecular Interventions*, 2(8):481-483, 2002
- Stommel J. M., Wahl G. M., A New Twist in the Feedback Loop: Stress- Activated MDM2 Destabilization is Required for p53 Activation, *Cell Cycle*, 4:3, 411-417, 2005

- Szkanderova S., Vavrova J., Rezacova M., Vokurkova D., Pavlova S., Smardova J., Stulik J., Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine-392 in human T-lymphocyte leukemia cell line, *Folia Biologica*, 49:191-196, 2003
- Toledo F., and Wahl G.M., Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas, *Nature Reviews*, 6: 909-921, 2006
- Vavrova J., Rezacova M., Vokurkova D., Psutka J., Cell Cycle Alteration, Apoptosis and Response of Leukemic Cell Lines to Gamma Radiation with High- and Low-Dose Rate, *Physiol. Res.* 53: 335-342, 2004
- Verdeguer E., Susana Gde A., Clemens A., Palas M., Comins A., Implication of the transcription factor E2f,F-1 in the modulation of neuronal apoptosis, *Biomed Pharmacother*, 61(7):390-9,2007
- Vogelstein B. Lane D. And Levine A.J., Surfing the p53 network, *Nature*, 408:307-310, 2000
- Vousden K.H. and Lu X., Live or let Die: The Cell's Response to p53, *Nature*, 2:594-604, 2002
- Vousden K.H., p53: Death Star, *Cell*, Vol. 103:691-694, 2000
- Wesierska- Gadek J. and Schmid G., The Subcellular Distribution of The p53 Tumor Suppressor, And Organismal Ageing, *Cellular&Molecular Biology Letters*, 10:439-453, 2005
- Westphal C.H., Hoyes K.P., Canman C.E., Huang X., Kastan M.B. Hendry J.H., and Leder P., Loss of atm Radiosensitizes Multiple p53 Null Tissues, *Cancer Research*, 58:5637-5639, 1998
- Wichmann A., Jaklevic B., Su T., Ionising radiation induces caspase-dependent but Chk2-and p53 independent cell death in *Drosophyla melanogaster*, *proc Natl Acad Sci*, 27;103(26):9952-7, 2002
- William A.C., Miller J.C., Collard T., Browne S.J., Newbold R.F., Parskeva C., The effect of different TP53 mutations on the chromosomal stability of a human colonic adenoma derived cell line with endogenous wild type TP53 activity, before and after DNA damage, *Genes Chromosomes Cancer*, 20(1)414-52, 1997
- Wright W.E., Shay J.W., Historical claims and current interpretations of replicative aging, *nat Biotechnol*, 20(7):82-8, 2002
- Xu D., wang Q., Gruber A., björkholm M., Chen Z., Zaid A., Selivanova G., Peterson C., Wiman K.G., and Pisa P., Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells, *Oncogene*, 19:5123-5133, 2000
- Yao KC, Komata T., Kondo Y, Kanzawa T., Kondo S., Germano Im., Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation : cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin- dependent kinase inhibitors, and autophagy., *Journal of Neurosurgery*, 98:378-384, 2003
- Yee K.S., and Vousden K.H., Complicating the complexity of p53, *Carcinogenesis*, Vol. 26 No. 8, pp. 1317-1322, 2005
- Zhang H.G., Wang J., Yang X., Hsu H. C., and Mountz J.D., Regulation of apoptosis proteins in cancer cell by ubiquitin, *oncogene*, 23:2009-2015, 2004
- Zhang Y. and Xiong Y., Control of p53 Ubiquitination and nuclear Export by MDM2 and ARF1, *Cell Growth&Differentiation*, 12:175-186, 2001

## **ÖZGEÇMİŞ**

Ankara'da 1983 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2000 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2004 yılında mezun oldu. 2004 yılında Gazi üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü'nde başladığı Orta Öğrenim Tezsiz yüksek Lisans Programını 2005 yılında tamamladı. 2004 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde Temel Biyoteknoloji yüksek lisans öğrenimini 2007 yılında tamamladı.