

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLİOBLASTOMALARDA PHOSPHATİDYLİNOSİTOL 3-
KİNASE/AKT YOLU ÜZERİNDEN ELK-1 AKTİVASYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Melike MUT

**İleri Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ**

**Ankara
2007**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİOBLASTOMALARDA PHOSPHATİDYLİNOSİTOL 3-
KİNASE/AKT YOLU ÜZERİNDEN ELK-1 AKTİVASYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Melike MUT

İleri Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nejat AKALAN

Ankara

2007

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından İleri Nörolojik Bilimler Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı-Danışman: Prof. Dr. Nejat Akalan
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Osman Ekin Özcan
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Turgay Dalkara
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Yasemin Gürsoy-Özdemir
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Türker Kılıç
Marmara Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmelięi'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişilere içtenlikle teşekkür eder.

Sayın Prof. Dr. Nejat Akalan, tez danışmanım olarak çalışmaya yol gösterici katkılarda bulunmuştur.

Sayın Prof. Dr. Turgay Dalkara ve Doç. Dr. Yasemin Gürsoy-Özdemir, tez izleme komitesinde yer alarak çalışmaya değerli katkılar sağlamışlardır.

Sayın Doç. Dr. Işıl Aksan Kurnaz, Sayın Özlem Demirci, Sayın Ömer Faruk Bayrak çalışmanın gerçekleşmesi için her türlü desteği sağlamışlardır.

Çalışma boyunca ailem ve arkadaşlarım sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla destek olmuşlardır.

ÖZET

Mut M. Glioblastomalarda phosphatidylinositol 3-kinase/Akt yolu üzerinden Elk-1 aktivasyonunun değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İleri Nörolojik Bilimler Programı Doktora Tezi, Ankara, 2007.

Glioblastoma glial tümörlerin en kötü seyredenidir. Glioblastoma patogenezi, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve altında yer alan sinyal iletim yolları ile yakından ilişkilidir. Bu yolların başlıcaları MAPK, PI3K ve PKC olarak sıralanabilir. Yaşam ve çoğalmadan sorumlu transkripsiyon faktörlerinden birisi olan Elk-1 faktörünün, daha önce glioblastomalarda yapılan çalışmalarda MAPK ve PKC yolları tarafından harekete geçirildiği ve bu yolların çoğalma etkilerini Elk-1 sayesinde sergilediği gösterilmiştir. Ancak, hücrenin yaşamı için çok önemli diğer bir yol, PI3K/Akt yolu ile Elk-1 ilişkisi çalışılmamıştır. Bu çalışmada, C6 sıçan hücrelerinin TPA veya EGF ile uyarılma sonrasında MAPK, PI3K ve PKC aracılığı ile Elk-1 aktivasyonunu sağladığı görülmüştür. Bu aktivasyon daha detaylı incelendiğinde, Elk-1 serin 383 fosforilasyonunun gerçekleştiği ve transkripsiyon aktivitesinin buna paralellik gösterdiği görülmüştür. Fosforilasyon ve transkripsiyonel aktivasyon UO 126, MEK inhibitörü tarafından engellenmiş ancak LY 294002, PI3K inhibitör sadece fosforilasyonu engelleyebilmiş, transkripsiyonda değişiklik yapmamıştır. MAPK yolunun Elk-1'i harekete geçiren ana yol olduğu teyit edilmiştir. Ayrıca, C6 sıçan glioma hücrelerinde TPA MAPK yolunu, EGF PI3K yolunu öncelikli olarak uyarılmaktadır. PI3K yolu EGF tarafından uyarıldığında MAPK yolunda yer alan Erk 1/ 2'yi fosforile etmekte ve Elk-1'i dolaylı olarak harekete geçirmektedir. Elk-1 aktivasyonu C6 sıçan glioma hücrelerinde fizyolojik bir karşılık bulamamış, TPA ve EGF gibi gliomalarda çoğalma yanıtı veren uyarılar Elk-1'i harekete geçirdikleri halde sağkalım, çoğalma veya apoptoz yönünde bir gelişme olmamıştır. Sonuç olarak, Elk-1 aktivasyonu esas olarak MAPK tarafından gerçekleştirilir ancak uyarana bağlı olarak PI3K yolu MAPK üzerinden Elk-1 harekete geçirir. C6 sıçan glioma hücrelerinde Elk-1 önemli bir yaşam faktörü olmayabilir, Elk-1'in rolünü insan kaynaklı glioblastoma hücrelerinde çalışılması tedavi hedefi olarak açısından daha yönlendirici olabilir.

Anahtar kelimeler: Glioma, Glioblastoma multiforme, PI3K, MAPK, PKC, TPA, EGF, Elk-1, Egf-1, çoğalma, canlılık, sağkalım, kaspaz

ABSTRACT

Mut M. Evaluation of Elk-1 activation by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastoma. Hacettepe University Institute of Health Sciences Advanced Neurosciences Program PhD Thesis, Ankara, 2007. Glioblastoma multiforme is the most malignant tumor among the glial tumors. GBM pathogenesis is closely related to epidermal growth factor receptor and the downstream signal transduction pathways; mainly MAPK, PI3K and PKC. A survival transcription factor, Elk-1 has been shown to be in the downstream of MAPK and PKC pathways and these pathways exerts some of its proliferative effect via Elk-1 activation in GBM. However, a possible interaction with Elk-1 and another major survival pathway PI3K has not been studied in GBM. Here, Elk-1 transcriptional activation was demonstrated after TPA or EGF stimulation of MAPK, PI3K and PKC pathways in rat C6 glioma cells as *in vitro* GBM model. Elk-1 transcriptional activity was parallel to the phosphorylation of its serine 383 residue in response to EGF or TPA stimulation. This activation was blocked mainly by UO 126, a MEK inhibitor. Inhibiting PI3K pathway with LY 294002 did not affect Elk-1 transcriptional activation but the phosphorylation of Elk-1 was blocked by LY 294002. EGF stimulated preferentially the PI3K pathway, while TPA did so for MAPK pathway in C6 rat glioma cells. Interestingly, PI3K phosphorylated Erk 1/2 in response to EGF, but not to TPA. PI3K had no direct effect in activation of Elk-1, rather interacted with MAPK to phosphorylate Elk-1. Elk-1 activation did not have a physiological corresponsse in regard to viability, proliferation and apoptosis in C6 rat glioma cells. Taken together, our findings suggest that Elk-1 is activated after phosphorylation at serine 383 residue mainly by MAPK pathway and PI3K pathway has an indirect role in Elk-1 activation via MAPK pathway. Elk-1 may not be the major survival factor in C6 rat glioma cells. Physiological significance of Elk-1 activation and blocking both MAPK and PI3K pathways have yet to be identified in other human GBM derived cells.

Keywords: Glioma, Glioblastoma multiforme, PI3K, MAPK, PKC, TPA, EGF, Elk-1, Egf-1, proliferation, survival, caspase, viability

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| ONAY | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii-viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| TABLolar DİZİNİ | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Kuramsal Yaklaşımlar | 1 |
| 1.2. Genel Bilgiler | 1 |
| 1.2.1. Epidermal Büyüme Faktörü | 1 |
| 1.2.2. Protein kinaz C | 2 |
| 1.2.3. MAPK Yolu | 2 |
| 1.2.4. Elk-1 Transkripsiyon Faktörü | 5 |
| 1.2.5. PI3K Yolu | 6 |
| 1.3. Amaç ve Varsayım | 7 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM | 8 |
| 2.1. Hücre Kültür | 8 |
| 2.2. Hücrelere Uyaran ve İnhibitör Uygulanması | 8 |
| 2.3. Western Blot | 9 |
| 2.4. <i>Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction (RT-PCR)</i> | 11 |
| 2.5. GAL Luciferaz Analizi | 12 |
| 2.6. Kaspaz Analizi | 13 |
| 2.7. Hücre Canlılığı Testi | 13 |
| 3. BULGULAR | 15 |
| 3.1. C6 Sıçan Glioma Hücrelerinde Elk-1 Alt Yolunda Yer Alan Egr-1 Geninin Ekspresyonunun TPA ve EGF ile Uyarılması | 15 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. C6 sıçan glioma hücrelerinde Elk-1 transkripsiyon faktörünün GAL-Luc reporter gen aktivasyonu | 16 |
| 3.3. EGF veya TPA ile Uyarılma Sonrası Elk-1 Serine 383 Fosforilizasyonu | 17 |
| 3.4. PI3Kinazın ERK 1/2 Fosforilizasyonu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi | 19 |
| 3.5. EGF veya TPA ile Uyarılma Sonrası Hücre Yaşam, Proliferasyon ve Apoptozun Değerlendirilmesi | 20 |
| 4. TARTIŞMA | 24 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 28 |
| KAYNAKLAR | 29 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

DMEM: *Dulbecco's modified medium*

DMSO: Dimetil sülfoksit

DTT: *Dithiothreitol*

ECL: *Enhanced chemiluminescence*

EGF: Epidermal büyüme faktörü

Egr: *Early growth response gene*

ERK: *Extracellular signal regulated kinase*

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GTP: Guanozin trifosfat

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

PBS: Fosfat bazlı salin

PDGF: *Platelet derived growth factor*

PI: *Phosphatidylinositol*

PIP: *Phosphatidylinositol-4-phosphate*

PIP2: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*

PIP3: *Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*

PI3K: *Phosphatidylinositol 3-kinase*

PKC: Protein kinaz C

PTEN: *Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*

RT-PCR: *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

SDS page: *Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*

SRE: *Serum response element*

SRF: *Serum response factor*

TAE buffer: Tris-asetat-EDTA

TBS: Tris bazlı salin

TCF: *Ternary complex factor*

TGF α : *Transforming growth factor alpha*

TPA veya PMA: *12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate, veya phorbol-12-myristate-13-acetate*

ŞEKİLLER

| | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1.2.1: MAPK yolu | 3 |
| Şekil 1.2.2: Elk-1 transkripsiyon faktörünün MAPK tarafından fosforilizasyonu | 4 |
| Şekil 1.2.3: Glioblastomada EGFR altında yer alan MAPK ve PI3K yolları | 6 |
| Şekil 3.1.1: Uyarılar varlığında Elk-1 alt yolunda yer alan Egr-1 aktivasyonu | 15 |
| Şekil 3.2.1: Uyarılar varlığında Elk-1 geçici tranfeksiyonu ile Gal:Lusiferaz reporter geninin aktivasyonu | 17 |
| Şekil 3.3.1: TPA ile uyarılma sonrası Elk-1 fosforilizasyonun ve inhibitörlerin etkisinin değerlendirilmesi | 18 |
| Şekil 3.3.2: EGF ile uyarılma sonrası Elk-1 fosforilizasyonun ve inhibitörlerin etkisinin değerlendirilmesi | 18 |
| Şekil 3.3.3: TPA veya EGF ile uyarılma sonrası Akt fosforilizasyonun ve inhibitörlerin etkisinin değerlendirilmesi | 19 |
| Şekil 3.4.1: TPA veya EGF ile uyarılma sonrası Erk ½ fosforilizasyonun ve inhibitörlerin etkisinin değerlendirilmesi | 20 |
| Şekil 3.5.1: TPA veya EGF ile uyarılma sonrası C6 sıçan glioma hücrelerinde hücre canlılığının değerlendirilmesi | 22 |
| Şekil 3.5.2: TPA veya EGF ile uyarılma sonrası C6 sıçan glioma hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonunun ve apoptozun değerlendirilmesi | 23 |
| Şekil 4.1: C6 sıçan glioma hücresinde MAPK ve PI3K yolları ile Elk-1 aktivasyonunu göstermek için önerilen şema | 27 |

TABLÖLAR

| | Sayfa |
|--------------------------------------------------|-------|
| Tablo 2.1: Deneyin yapılış aşamaları ve amaçları | 14 |

1. GİRİŞ

1.1. Kuramsal Yaklaşımlar

Gliomalar beyin dokusundan kaynaklanan tümörler arasında en sık görülenidir ve histopatolojik olarak çeşitli alt grupları ve malignite dereceleri vardır. Dünya Sağlık Örgütü Sınıflamasına göre Evre IV veya *glioblastoma multiforme*, gliomalar arasında en malign olanı ve en sık görülenidir. Hızlı çoğalma, beyin dokusuna invazyon, nekroz, anjiyogenez, mikrovasküler proliferasyon ve migrasyon gibi agresif özellikleri vardır. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiye rağmen ortalama 1 yıl yaşam süresi ile vücuttaki en kötü huylu tümörlerden birisidir. Glioblastomaların yeni tedavi hedeflerinin gelişmesini sağlamak için ve moleküler biyolojisini anlamak üzere son yıllarda yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Epidermal büyüme faktörü

Glioblastomaların oluşumunda en önemli yollardan biri EGF (*epidermal growth factor*-epidermal büyüme faktörü) reseptör ile ilgili olanıdır. EGF reseptörü erbB reseptör ailesindedir ve EGF ve TGF α (*transforming growth factor α*) bağlanması ile alt yolunda yer alan tirozin kinazları aktive eder ve başta MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PI3K (*Phosphoinositol 3-kinase*), PKC (protein kinaz C) yolları olmak üzere çeşitli sinyal iletim yollarını harekete geçirerek hücrenin yaşaması ve çoğalması ile ilişkili genlere mesajı iletir. EGF reseptörü glioblastomalar dahil pek çok kanserde önemli rol oynar (1) ve bu reseptörün aşırı uyarılması ile neoplastik hücrenin çoğalması, göçü, stromal invazyonu, apoptoza direnci ve anjiyogenezi oluşur. Glioblastomalarda, EGF reseptör durumunda %50 oranında bozukluk saptanmıştır; bunlar gen amplifikasyonu, reseptörlerin aşırı eksprese edilmesi veya reseptör gen mutasyonları olabilir (2-11). EGF reseptör mutasyonları, uyarılmaya gerek olmadan, yapısal olarak aktif reseptör formuyla sürekli tümörün çoğalmasına katkıda bulunur (6, 12-16). Glioblastomada EGF reseptör sinyal iletim yolunun kapatılması ile önemli ölçüde tümör kontrolü

sağlanmıştır. Bu yüzden, EGF reseptörü glioblastomalarda yeni ve etkin bir hedef haline almıştır. Monoklonal antikolar, küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörleri ve bunların radyoterapi ile bileşimi yeni tedavi yöntemleri olarak klinik kullanıma ulaşmıştır (11, 17-58). Benzer şekilde PDGF- α (*platelet derived growth factor- α*) reseptörü glioblastomalarda %5-8 arasında amplifiye olmuştur ve düşük gradeli gliomaların glioblastomaya dönüşme sürecinde etkin olduğu düşünülmektedir (7, 59-62).

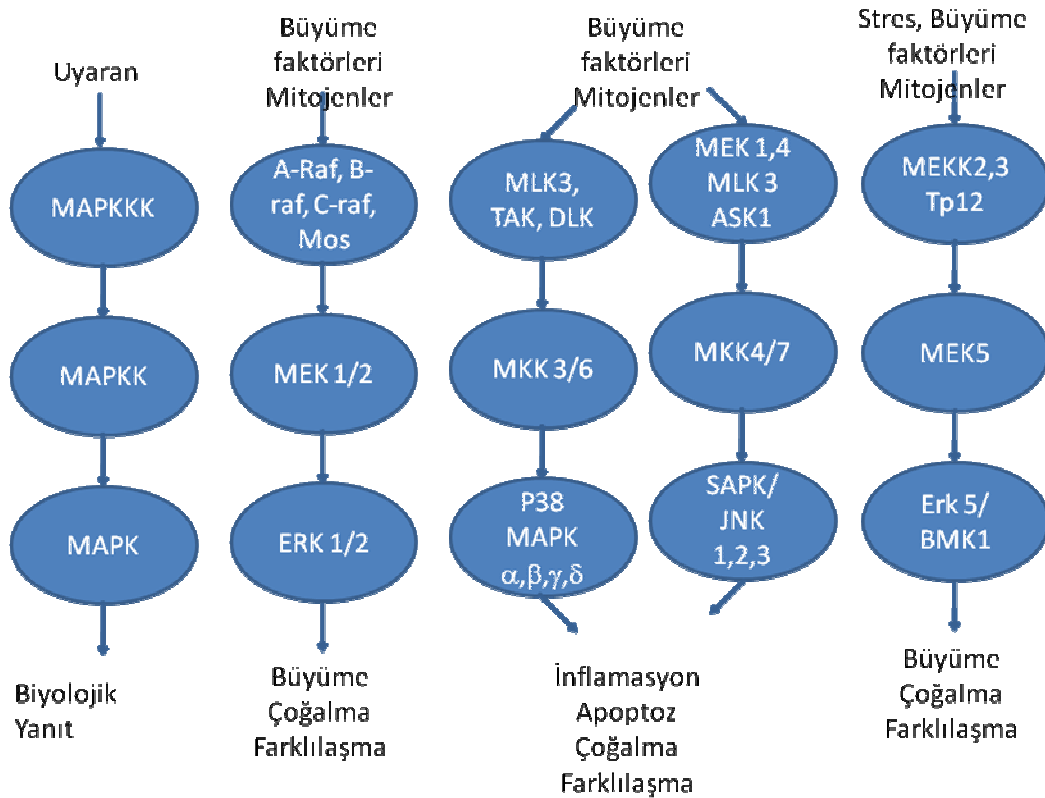
1.2.2. Protein kinaz C

Glioblastomanın oluşumunda, yaşamasında ve çoğalmasında reseptörden alınan mesajları taşıyan sinyal iletim yolları da detaylı olarak çalışılmıştır. Birbirinden bağımsız veya karşılıklı konuşma halinde MAPK ve PI3K/Akt yolları ana yollardan ikisidir ve çeşitli basamaklarda protein kinaz C (PKC) ile etkileşime girer (19, 21, 45, 51, 63-97). PKC ailesi 3 sınıftan oluşur: Klasik (α , β I, β II, γ), novel (δ , ϵ , η , θ) ve atipik (ζ , λ /1). Klasik izoformlar aktive olmak için Ca^{++} ihtiyaç duyarlar. Hem klasik, hem de novel izoformlar diasilgliserol ve forbol esterleri (örneğin TPA [12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate, bir başka adı phorbol-12-myristate-13-acetate [PMA]) ile aktive olur (98). Glioblastomalar dominant PKC isoformuna göre forbol esterlerine farklı yanıt verebilirler. PKC γ artmış çoğalma yanıtı, PKC δ azalmış büyüme ve çoğalma, PKC η varlığında ise radyasyona direnç ile artmış mitojenik yanıt gözlenir (99, 100). Tüm PKC isoformları MAPK/ERK kinase-1 (MEK-1) yollarını aktive edebilirler (101).

1.2.3. MAPK Yolu

Mitojen ve stres uyarılarını taşıyan ve ökaryotlarda korunmuş olan yol MAPK yoludur (102, 103). MAPK yolu genel olarak özetlenirse; uyarılma sonrası guanozin trifosfat (GTP)'a bağlanan protein tarafından hücre zarına MAPKKK çağrılır ve MAPKK fosforilize edilir. MAPKK de ilgili MAPK fosforilize ederek aktive eder. MAPK yolu 3 ana alt gruptan oluşur (Şekil 1.2.1). Bunlar extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) ve p38 kinase yollarıdır. ERK büyüme faktörlerine; p38 ve JNK sitokinler ve stres uyarılarına

yanıt verir. EGF reseptörüne ligand bağlandığında GTP'ye bağlanan protein Ras tarafından aktive edilir ve hücre zarına Raf (MAPKKK'den biri) çağrılır. Aktive olan Raf, MEK (MAPKK'den biri) fosforilize ederek aktive eder. MEK 1/2 de, ERK 1/2'yi fosforilize eder. ERK1/2 (MAPK 42/44) aktive olduktan sonra hücre çekirdeğine geçer ve transkripsiyon faktörlerini düzenler. UO 126, MEK'e özel bir inhibitördür.

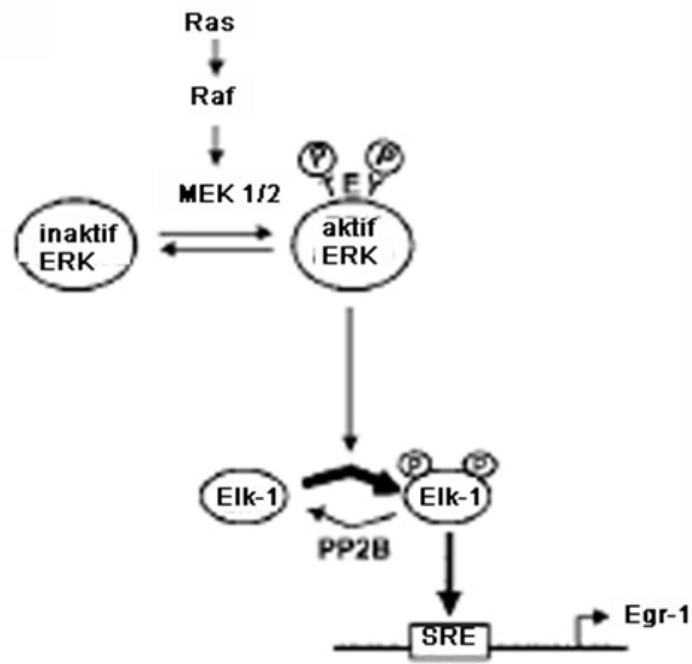


Şekil 1.2.1: MAPK yolu¹

MAPK tarafından düzenlenen transkripsiyon faktörlerinden en iyi bilineni ve en çok çalışılanı TCF (*ternary complex factors*)'dir. TCF, Ets-domain transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir ve bu aile Elk-1, Sap-1, Sap-2/Net/Erp içerir. TCF proteinleri kendilerine özel DNA'ya bağlanma domaini, C terminusunda MAPK ailesi tarafından fosforilize edilen serin ve treonin rezidüleri içerir (104-107)

¹ www.cellsignal.com sitesinden uyarlanmıştır.

(Şekil 1.2.2). Serum büyüme faktörleri, TPA gibi forbol esterleri ERK yoluyla; *interleukin-1*, *tumor necrosis factor α* , osmotik stres, H_2O_2 , ultraviyole radyasyon TCF'yi p38 ve JNK MAPK grubu ile fosforilize eder.



Şekil 1.2.2: Elk-1 transkripsiyon faktörünün MAPK tarafından fosforilasyonu²

TCF aktive olduktan sonra erken yanıt genlerinden (*immediate early genes*) transkripsiyonunu başlatır. Bu genler SRE (*serum response element*) bölgeleri içerir. Egr-1 (*early growth response gene-1*) geni erken yanıt genlerinden birisidir ve ürünü olan Egr-1 bir çekirdek fosfolipoproteinidir. Egr-1, hücrenin farklılaşmasında ve

² Galetic, I., ve arkadaşları, (2003). *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4416-23 makaleden uyarlanmıştır.

çoğalmasında rol alan genlerin GC zengin promoter bölgelerine bağlanır. Stres, yaralanma, mitojenler ve farklılaşma faktörleri tarafından uyarılır (106, 108-112). Egr-1 transkripsiyon faktörü; p21, p53, PTEN, TGF- 1, fibronectin, ve Gadd45 gibi genleri transaktive ederek apoptozu engeller ve büyüme-çoğalma yönünde uyarı verir (111, 113-117).

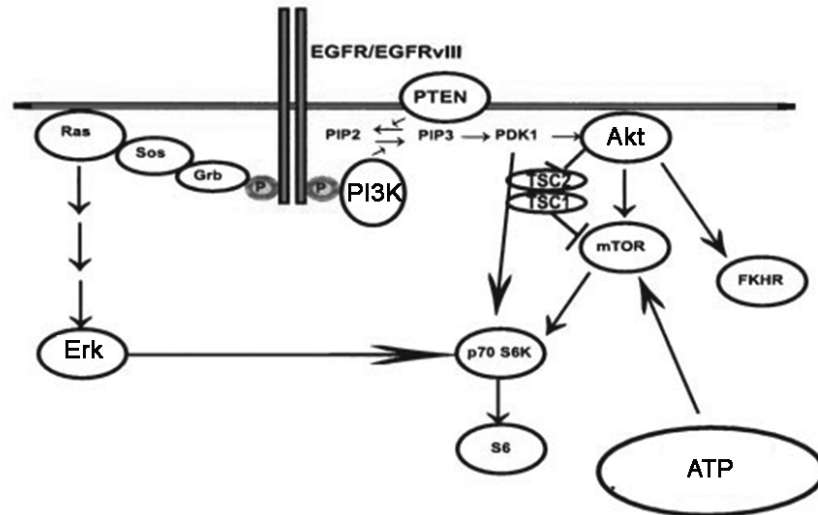
1.2.4. Elk-1 Transkripsiyon Faktörü

Egr-1 geninin uyarılması TCF ailesinde olan bir diğer transkripsiyon faktörü Elk-1 ile kompleks oluşturmasına bağlıdır (106, 107, 118). Egr-1 genin SRE, serum response factor (SRF) ile TCF ailesinden olan Elk-1 ile üçlü kompleks oluşturur ve ve Egr-1 gen promoter bölgesine bağlanır (112, 119) (Şekil 2). Glioblastomalarda (örneğin C6 sıçan gliomalarında) EGF reseptörünün harekete geçmesi ile Ras/Raf/ERK1/2 yolu Elk-1 TCF faktörünü Ser383 ve Ser389 rezidülerinden fosforilize eder. Sonrasında da hedef genlerden Egr-1 transkripsiyonu başlatmak üzere harekete geçer (120-125). Burada Elk-1 transaktivasyon rolü üstlenir. Elk-1 fosforilasyonunun azalması ile Elk-1 transaktivasyonu gerçekleşemez ve Egr-1 transkripsiyonunu başlatamaz (120-125).

Uyarı-sinyal iletim yolu-gen ilişkileri arasında, ERK yoluyla uyarılan Elk-1 transkripsiyon faktörünün Egr-1 transaktive etmesi en iyi bilinenlerindedir (120-125). Hem EGF hem de PDGF reseptörlerinin etki ettiği transkripsiyon faktörlerinden birisi Egr-1'dir. Reseptörlerin uyarılması ile harekete geçen ERK sinyal iletim yolu Elk-1 ve Egr-1 transkripsiyon faktörlerini kullanarak proliferasyon ve yaşam genlerini harekete geçirirken bir yandan da Egr-1 kendi sentezinin artmasına neden olur (126, 127). Egr-1 astrositlerin de çoğalmasında ve mitojen uyarılara yanıt vermede önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca glioblastoma hücrelerinin tutunması ve invazyonunda da önemli rol alır (119, 127-131). Diğer pek çok hücrede olduğu gibi glioblastoma hücrelerinde de uyarı olmadan Egr-1 seviyesi tespit edilemeyecek kadar düşük bulunmuştur. Ancak EGF veya PDGF uyarısı sonrasında hızla transkripsiyon yanıtı ve sentezi artmıştır. Bu yüzden glioblastomaya verilen uyarıya yanıtın değerlendirilmesi Egr-1 yolu ile yapılabilir (119, 132).

1.2.5. PI3K Yolu

PI3K yolu glioblastomaların oluşmasında, invazyonunda ve çoğalmasında rol alan ve hastalığın prognozu belirleyen en önemli yollardan birisidir (**Hata! Yer işareti tanımlanmamış., Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**) (Şekil 1.2.3). Hedefleri Akt [protein kinaz B (PKB) veya Rac olarak da bilinir] ve p70s6k hücrenin yaşamını, büyümesini, çoğalmasını, invazyonunu ve apoptozun önlenmesini denetleyen kritik bir proteinlerdir (133-147). Akt, PI3K yolu ile uyarılır. İnsulin gibi hormonlar ve çeşitli büyüme faktörleri PI3K yolunu harekete geçirir. PI3K, PI (phosphatidylinositol), PIP (phosphatidylinositol-4-phosphate) ve PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) fosforilize ederek PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) oluşturur. PIP3, PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1) aktive eder ve Akt'nin treonin 308 rezidüsünün hem de PDK2 ile serin 473 rezidüsünün fosforilizasyonu sağlar (148, 149). PI3K, Akt harekete geçtikten sonra apoptozu önler ve hücrenin yaşayıp çoğalmasını sağlar (150-152). *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN), PI3K/Akt yolunun ana negatif düzenleyicisi ve frenidir (153). LY 294002 PI3K özel inhibitörüdür (154).



Şekil 1.2.3: Glioblastomada EGFR altında yer alan MAPK ve PI3K yolları³

³ Choe, G., ve diğerleri. (2003) *Cancer Research*, 63(11), 2742-6 makalesinden uyarlanmıştır.

PTEN, PI3K ile başlayan olaylar zincirini ters çeviren ve bu yolun en önemli frenlerinden olan bir proteini olmasının yanı sıra, glioblastomalarda, özellikle *de novo* olanlarının oluşumunda çok önemlidir ve *de novo* glioblastomalarda PTEN kaybına sık rastlanır ve bu tür glioblastomalarda Akt yolu yapısal olarak sürekli aktiftir (49, 77, 155-171).

1.3. Amaç ve Varsayım

Glioblastomanın oluşmasında ve çoğalmasında önemli rol oynadığı bilinen Ras/Raf/ERK/Elk-1 yolunun PI3K yolu ile etkileşiminin araştırılması amacıyla C6 sıçan glioma hücrelerinde *in vitro* koşullarda araştırmamız planlanmıştır. Bu çalışmada, PI3K yolu uyarılması ile Elk-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ve glioma hücrelerinin fizyolojik yanıtı değerlendirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.2. Hücre Kültür

C6 sıçan glioma hücreleri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden alınmıştır. C6 sıçan glioma hücreleri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Doku Bankası'nda donmuş olarak (-80°C'de) saklanmaktaydı. Buradan çıkarılarak öncelikle glial hücrelerin iyi yetiştiği bilinen %10'luk fetal bovine serum içeren *Dulbecco's modified medium* (DMEM) [Sigma St. Louis, MO, ABD] içinde %1'lik Penisilin-Streptomisin karışımı eklendi ve hücreler bu mediumun içine konuldu. Bu hücreler DMEM mediumu içinde sağlıklı bir şekilde yetiştirilemedi ve çeşitli mediumlar denendikten sonra RPMI-1640 [Sigma St. Louis, MO, ABD] (500 ml) içine %15 at serumu, %2.5 fetal inek serumu, ve 12.5 ml glutamin, 5'er ml Penisilin/ Streptomisin/ Flukanazol karışımı eklenerek hazırlandı ve son formüle 25 mM Hepes konuldu. Bu medium içinde sağlıklı bir şekilde glial uzantıları korunarak yetiştirildi. Hücreler % 5 CO₂ ve 37°C inkubatörde tutuldu ve deneylerin amacına uygun plastik doku kültürü kaplarında tam olarak kaplayana kadar yetiştirildi. Yapılan tüm deneylerde aynı ortam kullanıldı. Western blot ve PCR öncesi starvasyon için kullanılan ortama at ve inek serumu eklenmedi.

2.3. Hücrelere Uyaran ve İnhibitör Uygulanması

Bu çalışmada, UO 126 ve LY 294002 inhibitör olarak, TPA ve EGF uyaran olarak kullanıldı. Hücrelerin 24 saatlik starvasyonu sonrası 60 ml'lik petrielerde yetiştirilen ve %90 üzerinde konfluent olan hücreler şu şekilde gruplara ayrıldı: 1, Kontrol sadece Dimetil sülfoksit (DMSO) [Sigma-Aldrich St. Louis, MO, ABD] uygulanmış; 2, sadece TPA [Sigma-Aldrich St. Louis, MO, ABD] (200 nM dozda klasik ve novel PKC uyararı) ile uyarılmış; 3, UO 126 [Merck KGaA, Darmstadt, Almanya] (10 µM dozda MEK1/2 inhibitörü) sonrası TPA uygulanmış; 4, LY 294002 [Merck KGaA, Darmstadt, Almanya] (50 µM dozda PI3K inhibitörü) sonrası TPA uygulanmış gruplar. Alınan ilk sonuçlara göre tüm deneyler EGF [Promega Madison WI, ABD] (Epidermal Growth Factor 100 nM)'in TPA yerine uyaran

olarak verilmesi ile tekrar edildi. Western blot analizleri için inhibitörler 30 dakika, sonrasında uyaranlar 30 dakika olarak uygulandı. Kaspaz analiz için inhibitörler 60 dakika, sonrasında uyaranlar 4 saat uygulandı; sadece uyaran veya inhibitör uygulanan gruplarda ajanlar 4 saat mediumda tutuldu. *Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction* (RT-PCR) deneyleri iki aşamada yapıldı. İlk aşamada hem TPA, hem de EGF tek başına veya 30 dakika inhibitör uygulaması sonrası 30 dakika süreyle verildi. İkinci aşama RT-PCR deneylerinde uyaranlar sadece 15 dakika uygulandı. Hücre canlılığı deneyi de iki aşamada yapıldı: İlk aşamada 30 dakika verilen inhibitörler sonrası uyaranlar 4 saat boyunca ortamda tutuldu. İkinci aşamada 30 dakika inhibitör sonrası uyaranlar 24 saat boyunca uygulandı. Kontrol grubuna sadece DMSO uygulandı.

2.4. Western Blot

C6 sıçan glioma hücreleri 60 ml petri tabaklarında yüzeyi %90 üzerinde kaplayana kadar yetiştirildikten sonra serum eklenmemiş RPMI-1640 karışımı ile 24 saat açlığa terkedildi. Sonrasında hücelere 30 dakika inhibitörler (PI3K inhibitörü Ly-294002 50 μ M, veya MEK 1-2 inhibitörü UO-126 10 μ M) eklendi. Sonrasında inhibitör eklene tabakların her birine TPA 200 nM veya EGF 100 nM ile uyarıldı. Sonrasında 4°C'da soğutulmuş fosfat bazlı salin (PBS) ile 3 kez yıkandı ve fosforilazasyon bakılacak grupta MAPK buffer (50 ml'de 0.6 gr Hapes [50 mM], 0.3 gr NaCl [100 mM], 200 μ l 0.5 M stoktan EDTA [2mM] eklendi ve pH 7.5 olduktan sonra %1 NP40 [0.5 ml] eklendi); total protein bakılacak grupta 1X triton parçalama buffer (0.5 ml triton X-100, 0.1 ml noniodet P40 substitute, 2mM EDTA eklendi ve 50 ml'ye distile su ile tamamlanarak hazırlandı) ile ekstrakte edildi. Her iki buffer içine 2 mg/ml sodyum orhtovanadate, 25 mg/ml Dithiothreitol (DTT), %1 protease inhibitörü ve %1 fosfotaz [Sigma-Aldrich St. Louis, MO, ABD] inhibitörü [Sigma-Aldrich St. Louis, MO, ABD] eklendi.

Mikrosantrifuj tüplerine alındıktan sonra 4°C'da 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatan alındıktan sonra Bradford analiz [Bio-Rad Hercules, CA, ABD] ile protein miktarları standardize edildi (595 nm'de okundu) ve hesaplanan miktarlar 5X örnek buffer ile (50 ml içine 25 ml gliserol, 10 ml %10 luk SDS, 3 ml 1

M'lık Tris eklenip pH 6.8 'e ayarlandı ve kullanmadan önce 25 mg/ml DTT eklendi) 5 dakika kaynatıldı.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS Page) yöntemi için mini Western blot [Bio-Rad Hercules, CA, ABD] ile kullanıldı. Tüm blotlar için %9'luk jel hazırlandı (Acrylamide %30 luk 3.6ml, *Resolving* buffer'dan 3 ml (Tris 36.2 gr, SDS 0.8 gr, DH₂O 200 ml, pH 8.9 titre edildi), dH₂O 5.35 ml, %10 APS 75 microlt, TEMED 5 µl konuldu ve polimerize olması için 2 saat beklendi. Üzerine *Stacking* bufferden (Tris 5.9 gr, SDS 0.4 gr, dH₂O 100 ml, pH 6.7 titre edilmiş) 3 ml, Acrylamide 2 ml, dH₂O 7 ml, %10 APS 100 µl, TEMED 5 µl konularak 1 saat polimerize olması beklendi. Alınan örnekler önce 80 mV ile 30 dakika, sonra 100-120 mV ile 2-3 saat yürütüldü (5X yürütme buffer: Tris 63.2 gr, Glycine 40 gr, SDS 10 gr, dH₂O 1 lt) ve protein marker [Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD] ile yürütmesi gözlemlendi. Sonrasında jel nitroselüloz membrana yarı kuru yöntemle transfer edildi. Buffer ile (Tris 3.03 gr, Glycine 14.4 gr, methanol 150 ml, SDS 1 gr, 1 litreye tamamlanır ve pH8.3-8.4'e titre edilir) 4°C'de 20 mV'ta 12 saat boyunca nitroselüloz membrana geçmesi sağlandı. Çıkarılan membranlar Panceau S boyasında [Amresco, Solon, Ohio, ABD] 10 dakika bekletildi ve dH₂O ile yıkandı. Protein bandlarının olduğu görüldükten sonra TBS (tris bazlı salin 10X solusyon 24.2 gr Tris, 80 gr NaCl konularak ve pH 7.6 'ya titre edilerek yapıldı) içine %5lik yağsız kuru süt ve %0.2 lik Tween 20 eklendikten sonra 1 saat boyunca bloke edildi. Sonrasında 3 kez 5'er dakika TBS ile yıkandı, primer antikorda (Anti-phospho-Elk-1 (pSer³⁸³) antikor [Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD], Anti-Elk-1 antikor [Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD], Anti-phospho-PKB (pSer⁴⁷³) antikor [Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD], anti-Akt antikor [Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD], Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) antikor [Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD], tubulin [Sigma, St Louis MO, ABD] deneylerin gerektirdiği yerlerde) 4°C'de 12 saat yıkandıktan sonra 3 kez 5'er dakika TBS ile yıkandı, sekonder antikorlar konuldu ([anti-rabbit HRP conjugated antibody anti-mouse HRP conjugated antibody, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD]) ve oda sıcaklığında 1 saat tutulduktan sonra 3 kez 5'er dakika TBS ile yıkandı. ECL için 5 dakika boyunca West Dura

Super Signal (Pierce, Rockford, IL, ABD) solusyonlarının karışımında karanlık ortamda yıkandıktan sonra sinyaller okundu.

2.5. Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction (RT-PCR)

PCR için primerler hazırlandı. **Elk-1** (282 bp) F 5'-CCT-TGC-GGT-ACT-ACT-ATG-AC-3' ve R 3'-GGC-TGC-GGC-TGC-AGA-GAG-TGC-3' **GAPDH-1** 5' TCG- GAG-TCA-ACG-GAT-TTG-G-3' ve **GAPDH-2** 5'-GCA-TTG-CTG-ATG-ATC-TTG-AGG-3'; **Egr-1** (348 bp) 5'-CAG-CAG-TCC-CAT-TTA-CTC-AG-3'; 3'-TGG-GAC-TGG-TAG-GTG-TTA-TT-5'.

Hücreler 60 ml'lik petrilere aynı yöntemle C6 sıçan glioma hücreleri yetiştirildi ve 24 saat starvasyon uygulandı. PCR deneyleri iki safhada yapıldı. İlkinde starvasyon sonrası 30 dakika inhibitörler ve 30 dakika uyarılar uygulandı, ikincisinde inhibitör sonrası uyarılar 15 dakika uygulandı. Mediumlar uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkandı ve RNA izolasyonu için Rneasy minikit (Qiagen, Valencia, CA, ABD) kullanıldı. Kitteki önerilen aşamalar takip edildi; özetle, 60 µl RLT buffer (içinde 1/50.000 oranında merkaptolanol) her bir tabağa konuldu. Alınan ekstrakt 15.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alındıktan sonra temiz bir tüpe konuldu ve iki kez 10.000 rpm'de 15 saniye süreli santrifüj edildi ve etanol ile santrifüj edildi. Altındaki sıvı uzaklaştırıldı ve kalanın üzerine 700 µl RW1 eklendi, iki kez 10.000 rpm'de 15 saniye süreli santrifüj edildi. Üzerine 500 µl RPE buffer eklendi, iki kez 10.000 rpm'de 15 saniye süreli santrifüj edildi. Üzerine 30 µl Rnase içermeyen su eklendi, 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve her bir örneğe 5 µl Rnase inhibitörü eklendi.

Hazırlanan RNA örneklerinden 5 µl alınarak cDNA hazırlandı. Bunun için RNA örnekleri 65°C'de 2 dakika tutuldu ve reverse transkriptaz, random primer, gerekli reaktanların eklenmesi ile 37 °C'de 2 saat inkubasyon sonrası hazırlandı. GAPDH optimizasyonu sonrası ilgili primerler ile RT-PCR yürütüldü.

Her bir tüpe 5X buffer (6 µl), MgCl₂ (3 µl), dNTP (0.5 µl), Tag polymerase (0.2 µl), Primer F 0.75 µl, Primer R (0.75 µl), hesaplanan kadar cDNA ve toplamı 30 µl tamamlanacak kadar su konuldu.

Elk annealing ısısının belirlenmesi için 45-60°C arasında 8 farklı ısı seçildi ve Elk-1 ve Egr-1 için 54.1°C ve 35 siklus, GAPDH için 50°C ve 30 siklus en uygun olanlar olarak belirlendi.

Çıkarılan örnekler %1.5 lik jele konulup 100 mV 45 dakika yürütüldü. (50 ml TAE buffer, 0.75 gr agarose mikrodalgada 6 dakika 500 watta kaynatıldı. İçine 3 µl ethidium bromide eklenip PCR tankına döküldü). İlk kulvara 2 µl 6X buffer, 4 µl 100 bp'lik işaretleyici, 6 µl dH₂O konuldu ve sırasıyla diğer örneklerden 12 µl eklendi. Tankın içine 1X TAE buffer konuldu ve sonuçlar değerlendirildi.

2.6. GAL Luciferaz Analiz

Gal-Elk-1, (GAL-RE)₅:luciferase reporter *construct*'lar Yeditepe Üniversitesi Genetik Bölümü'nden temin edilmiştir ve The Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega Madison WI, ABD) kullanılmıştır. C6 sıçan glioma hücreleri %90-100 yüzeyi kaplayana kadar yetiştirildikten sonra 24 kuyucuklu tabaklarda 5X10⁵ hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa pay edildi. Bir gün normal mediumda kaldı.

Elk-1 transaktivasyon aktivitesinin belirlenmesi için C6 sıçan glioma hücreleri 0,5 µg transaktivatör plasmid Gal4-Elk-1 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) transfekte edildi. Bu plasmide Gal4 DNA bağlanma domaini ve Elk-1 transkripsiyon faktörü aktivasyon domaini kodlanmıştır. Bu plasmid ile birlikte Gal4 bağlanma elementleri ile lusiferaz reporter olduğu 1 µg GAL-Luc plasmids birlikte transfekte edildi. Her bir transfeksiyona transfeksiyonun etkinliğini ölçmek için sadece Renilla Luciferase kodlayan 0,5 µg pRL-null plasmid (Promega, Madison, WI, ABD) eklendi (200 µl serumsuz medium, 0,5 µg Renilla Luciferase, 0,5 µg Gal4-Elk-1 and 1 µg GAL-Luc plasmids ile transfeksiyon karışımı hazırlandı). DNA'ların üzerine 12 µl TransFast reaktanı eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücrelerin mediumu uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkandı ve hazırlanan DNA ve reaktan karışımı eklendi. Hücreler 1.5 saat 37°C inkübe edildi. Transfeksiyon tamamlandıktan sonra karışım alındı. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler 12 saat serumsuz medyada bekletildi ve belirtilen şekilde uyaran ve inhibitörler uygulandı. UO 126 veya LY 294002 ile 1 saat, gruplara göre belirlenen uyaranlar ile 6 saat inkübe edildi. Medyum alındı ve PBS ile yıkandı. 100 µl parçalama buffer

eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika sallandı, sonrasında 50 µl alınan karışımlar Dual luciferase substratı ile 5 saniye karıştırıldı ve sinyaller Thermo luminoskan ile 3 saniye tarandı. Stop ve Glo substratları eklenerek 3 saniye daha tarandı. Luciferase sonuçları stop ve glo sonuçlarına bölünerek Firefly/Renilla oranı elde edildi. Luminesans ölçüldü. Her bir reporter analiz iki kez tekrar edildi. Veriler ortalama ve standart deviasyon olarak kaydedildi. One-way ANOVA ile ve post-hoc Tukey ile istatistiksel analizi yapıldı.

2.7. Kaspaz Analizi

Kaspaz-3 ayrılmasını ve aktivasyonunu ölçmek için CaspACE analiz sistem [Promega, Madison, WI, ABD] kullanıldı. C6 sıçan glioma hücreleri 96 kuyucuklu tabaklarda yetiştirildi. İnhibitörler (UO 126 veya LY 294002) 60 dakika öncesinde uygulanıp 4 saat boyunca uyarılar (TPA veya EGF) uygulandı. Sadece inhibitör veya uyarı verildiğinde 4 saat uygulandı. Bu sürelerin sonunda soğuk PBS ile yıkandı ve üreticinin talimatları doğrultusunda analiz uygulandı. Kısaca, hücre parçalama buffer eklendi (20 µl), -80°C'de donduruldu ve tekrar çözüldü, 15 dakika boyunca buzda tutuldu. Hücreler patladıktan sonra 15.000 rpm 20 dakika 4°C'de santrifuj edildi. Süpernatant alındı. Bir boş kontrol hazırlandı, her bir kuyucuğa 32 µl kaspaz analiz buffer, 2 µl DMSO, 10 µl DTT, 20 µl örneklerin süpernatantları, 34 µl distile su eklendi. Her bir tüpe 2 µl DEVD-pNA substrat eklendi. Parafin ile kaplandı ve 37°C'de 4 saat boyunca bekletildi. 405 nm'de Thermo absorbans cihazında ölçüldü. One-way ANOVA ile ve post-hoc Tukey ile istatistiksel analizi yapıldı.

2.8. Hücre Canlılığı Testi

Uyarı veya inhibitör uygulaması sonrası hücrelerin hayatta kalma ve çoğalma kapasitelerini ölçmek için *Cell Viability Analysis* (Promega, Madison, WI, ABD) kullanıldı. C6 sıçan glioma hücreleri 96 kuyucuklu tabakta yetiştirildi. İki set halinde deney tekrar edildi ve birinci sette inhibitörler (UO 126 veya LY 294002) 30 dakika öncesinde uygulanıp 4 saat boyunca uyarılar (TPA veya EGF) uygulandı. Sadece inhibitör veya uyarı verildiğinde 4 saat uygulandı. İkinci sette inhibitörler (UO 126 veya LY 294002) 30 dakika öncesinde uygulanıp 24 saat boyunca uyarılar (TPA veya EGF) uygulandı. Sadece inhibitör veya uyarı verildiğinde 24 saat

uygulandı. 96 kuyucuklu tabaklara 100 µl serumsuz medya içine 100 µl cell Titer-Glo reagenti eklendi, 2 dakika sallandı, 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Sonrasında luminesans ölçüldü. One-way ANOVA ile ve post-hoc Tukey ile istatistiksel analizi yapıldı.

Tablo 2.1’de deneyin yapılış aşamaları ve amaçları özetlenmiştir.

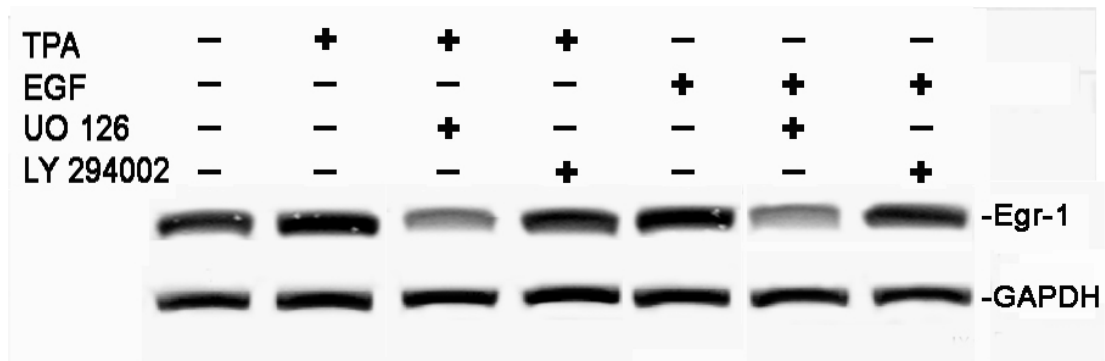
Tablo 1: Deneyin yapılış aşamaları ve amaçları

| Teknik | Değerlendirilen | Amaç |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Egr-1 RT-PCR | Uyaranların ve özel yol inhibitörlerinin Egr-1 ekspresyonuna etkisi | MAPK ve PI3K uyarılmasının ve engellenmesinin Elk-1 transkripsiyon aktivitesine etkisinin değerlendirilmesi |
| Elk-1 ile GAL-Luc Reporter Gen lusiferaz analizi | Uyaranlar varlığında Elk-1 geçici tranfeksiyonu ile Gal:Lusiferaz reporter geninin aktivasyonu | MAPK ve PI3K uyarılmasının ve engellenmesinin Elk-1 transkripsiyon aktivitesine etkisinin değerlendirilmesi |
| Western Blot | Elk-1 Serine 383 Fosforilizasyonu | MAPK ve PI3K yollarının Elk-1 fosforilizasyonuna ve aktivasyonuna etkisinin değerlendirilmesi |
| Western Blot | Akt fosforilizasyonu | Uyaranların PI3K yolunu harekete geçirdiğinin teyit edilmesi |
| Western Blot | Erk 1/2 fosforilizasyonu | Uyaranların Erk 1/2 yolunu harekete geçirdiğinin teyit edilmesi |
| Western Blot | Erk 1/2 fosforilizasyonu | PI3Kinazın ERK 1/2 fosforilizasyonu üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi |
| Hücre canlılığı analizi | Uyaranlar sonrası <i>Cell Viability Assay</i> ile ATP kullanımı ve sağkalımı | Uyaranların Elk-1 yoluyla hücre yaşam ve çoğalmasına etkisinin değerlendirilmesi |
| Kaspaz 3 analizi | Uyaranların Kaspaz 3’ün ayrılmasına etkisi | Elk-1 aktivasyonunun Kaspaz 3 aktivasyonuna ve apoptoza katkılarının değerlendirilmesi |

3.BULGULAR

3.1. C6 Sıçan Glioma Hücrelerinde Elk-1 Alt Yolunda Yer Alan Egr-1 Geninin Ekspresyonunun TPA ve EGF ile Uyarılması

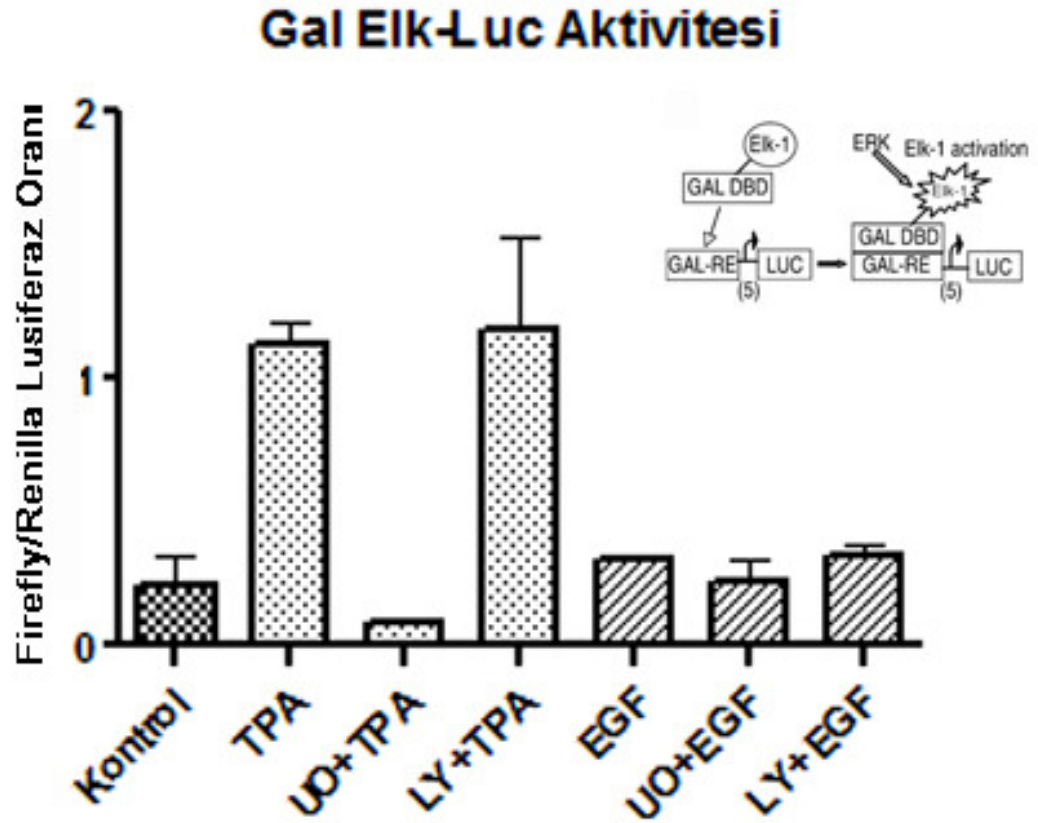
C6 sıçan glioma hücrelerinde Elk-1 yoluyla aktive edilen Egr-1 geninin transkripsiyonunun gerçekleştiği ve Egr-1'in Elk-1'in alt yolunda yer aldığı gösterilmiştir (125). Bu nedenle, Elk-1 transkripsiyon faktörünün büyüme faktörü ve forbol ester ile uyarılıp son yanıtını değerlendirebilmek için Egr-1 geninin ekspresyonu PCR ile test edildi. Forbol esteri olan TPA ile ve EGF ile 2 saat uyarılma sonrası RT-PCR ile Egr-1 ekspresyonu incelendi. Bu sonuçlara göre (EGF 100nM) ve TPA (200 nM) ile uyarılma sonrasında Elk-1 alt yolunda yer alan Egr-1 geninin ekspresyonunda belirgin artış saptandı. İnhibitörler ile birlikte uygulandığında MEK inhibitörü UO 126'nın Egr-1 uyarılmasını tamamıyla geri çevirdiği görülürken, PI3K inhibitörü LY 294002 belirgin bir etkisinin olmadığı görüldü. (Şekil 3.1.1). C6 sıçan glioma hücrelerinde, Elk-1 transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesinde MAPK yolunun önemi teyit edilirken, PI3K yolunun bağımsız olarak etkinliği gösterilemedi.



Şekil 3.1.1: Uyarılar varlığında Elk-1 alt yolunda yer alan Egr-1 aktivasyonu

3.2. C6 Sıçan Glioma Hücrelerinde Elk-1 Transkripsiyon Faktörünün GAL-Luc Reporter Gen Aktivasyonu

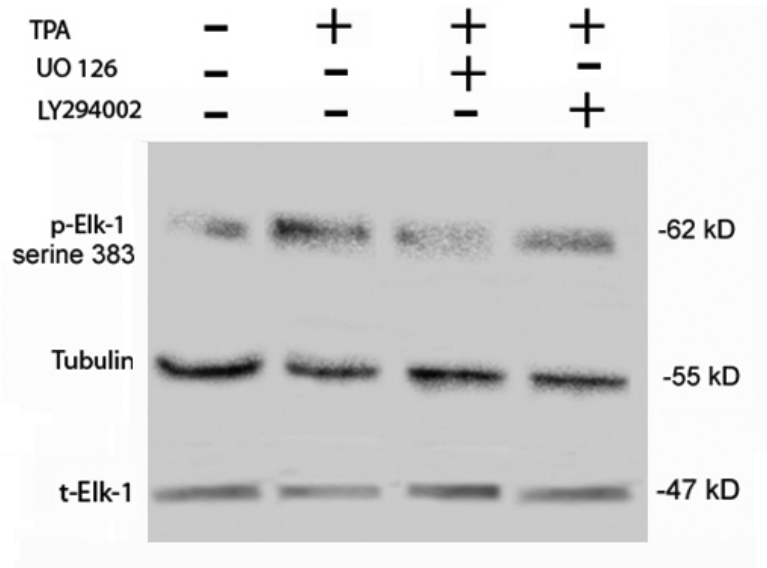
Elk-1 transkripsiyon faktörünün C6 glioma hücrelerinde EGF ve TPA tarafından uyarıldığına gösterilmesi için GAL-bazlı lusiferaz analiz kullanıldı. Geçici olarak transfekte edilen Elk-1 transkripsiyon faktörünün belirlenen bir reporter genin transkripsiyonunu artırdığı bilindiğinden, GAL DBD: Elk-1-aktivasyon domaini ile birleşik ekspresyon vektörü (GAL-RE)₅: *luciferase* reporter konstrukt ile transfekte edildi. Hem TPA hem de EGF Gal:Elk-1 tarafından indüklenen transkripsiyonu arttırdı (One-way ANOVA $F=9.431$, $p=0.0046$) (Şekil 3.2.1). Bu farklılık TPA'ya verilen yanıtta kaynaklanıyordu ve EGF'ten daha belirgindi. İstatiksel olarak da TPA uyarılması sonrası Gal:Lusiferaz aktivasyonunda anlamlı bir artış saptanırken (One-way ANOVA post-hoc Tukey $p < 0.05$), EGF ile uyarılma sonrası anlamlı artış görülmedi. Böylece C6 sıçan glioma hücrelerinde Elk-1'in TPA veya EGF ile uyarılan bir transkripsiyon faktörü olduğu teyit edildi. Egr-1 ekspresyonuna paralel olarak UO 126'nın Gal:luciferase aktivitesini geri çevirdiği, LY 294002'nin etkisi olmadığı görüldü, istatistiksel olarak TPA ile artmış yanıtın UO 126 ile geri çevrildiği görüldü. Gal:luciferaz analiz sonucu C6 glioma hücrelerinde MAPK yolunun Elk-1 transkripsiyonunda önemli olduğu ve PI3K yolunun beklenen aktiviteyi göstermediği teyit edildi.



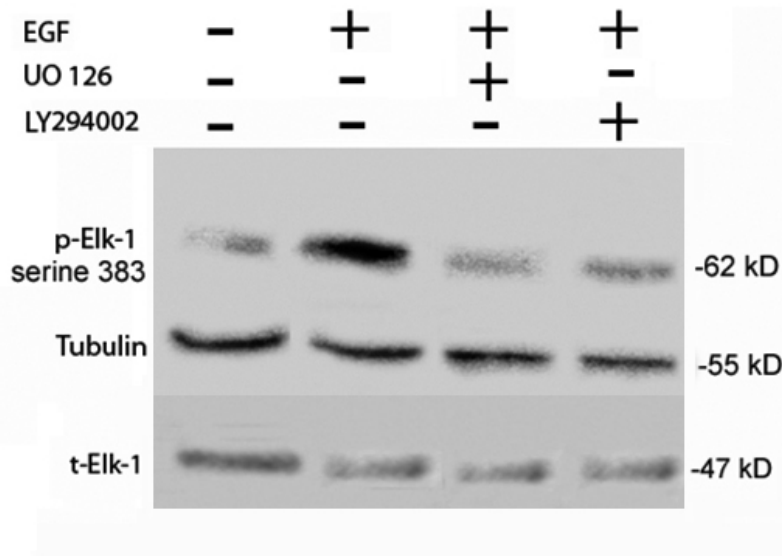
Şekil 3.2.1: Uyarılar varlığında Elk-1 geçici tranfeksiyonu ile Gal:Lusiferaz reporter geninin aktivasyonu (Kontrol ile TPA uygulanan grup, TPA ile UO+TPA uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır.)

3.3. EGF veya TPA İle Uyarılma Sonrası Elk-1 Serine 383 Fosforilizasyonu

EGF glioma hücrelerinde ve diğer kanser hücrelerinde EGF reseptörüne bağlanarak PKC, MAPK ve PI3K yollarıyla Elk-1 aktive eder (1, 172-180). TPA gibi forbol esterlerin insan kaynaklı glioblastoma hücrelerinde (U-251 ve U-1242) Elk-1 aktive ettiği gösterilmiştir (181). C6 sıçan glioma hücrelerinde EGF ve TPA ile uyarılma sonrası Elk-1 serin 383 rezidüsünde fosforilizasyonu değerlendirildi. TPA veya EGF ile uyarılma sonrası Elk-1'in belirgin fosforilizasyonu gözlemlendi (Şekil 3.3.1 ve 3.3.2).



Şekil 3.3.1: TPA ile uyarılma sonrası Elk-1 fosforilasyonunun ve inhibitörlerin etkisinin değerlendirilmesi

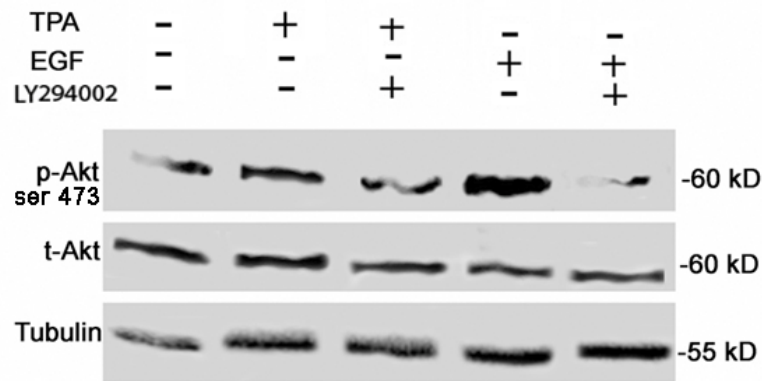


Şekil 3.3.2: EGF ile uyarılma sonrası Elk-1 fosforilasyonunun ve inhibitörlerin etkisinin değerlendirilmesi

Elk-1 fosforilasyonunun hem MAPK hem de PI3K yollarıyla olabildiği bilinmektedir. Elk-1 fosforilasyonunda rol olan yolun ortaya konulması için UO 126 (MEK/MAPK yoluna özel inhibitör) ile ve LY 294002 (PI3K yolu inhibitörü)

verildi. MEK inhibitörü UO 126 ile daha belirgin ve LY 294002 (PI3K yolu inhibitörü) ile daha az olmak üzere uyaranlar tarafından oluşan fosforilizasyonun engellendiği görüldü. (Şekil 3.3.1 ve 3.3.2). C6 sıçan glioma hücrelerinde UO 126 tarafından tama yakın, LY 294002 kısmi olarak fosforilizasyonu inhibe etmesi Elk-1 aktivasyonu için gerekli olan serin 383 fosforilizasyonun MAPK yolu ile daha aktif olarak yapıldığını ve PI3K yolunun daha az katkıda bulunduğunu gösterdi.

PI3K yolunun ana hedefi olduğu bilinen Akt, PI3K tarafından fosforilize edilir ve harekete geçerek alt yolunda çeşitli transkripsyon faktörlerini aktive eder. C6 sıçan glioma hücrelerinde PI3K yolunun uyaranlar ile harekete geçip geçmediğinin gösterilmesi için, PI3K yoluna özel substrat olan Akt fosforilizasyonu değerlendirildi. İnsan glioblastoma hücrelerinde daha önce gösterildiği gibi (182) TPA ve EGF tarafından induklenen Akt fosforilizasyonu, PI3K inhibitörü LY 294002 tarafından engellendi. (Şekil 3.3.3).

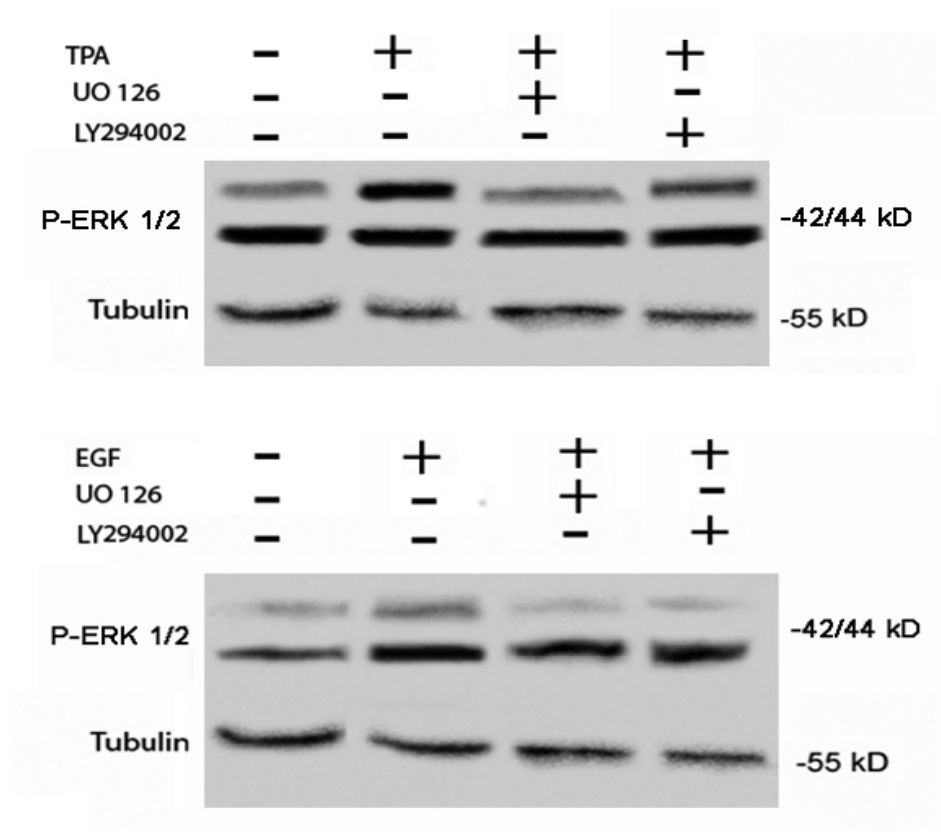


Şekil 3.3.3: TPA veya EGF ile uyarılma sonrası Akt fosforilizasyonun ve inhibitörlerin etkisinin değerlendirilmesi

3.4. PI3Kinazın ERK 1/2 Fosforilizasyonu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

C6 sıçan glioma hücreleri TPA ile uyarıldığında kuvvetli bir şekilde Erk 1/2 fosforilizasyonu sağlar ve daha önceki glioblastoma çalışmalarını teyit ederek UO 126 ile MEK 1/2 düzeyinde inhibe olur. PKC MEK'i direkt olarak fosforilize

ettiğinden, beklendiği gibi, TPA tarafından PKC yoluyla yapılan ERK 1/2 fosforilasyonu LY 294002 tarafından engellenmemektedir. EGF reseptörünün kendi özel ligandı EGF ile uyarılması sonrasında da ERK 1/2 fosforilasyonu gözlemlendi. EGF ile olan ERK 1/2 fosforilasyonu hem UO 126 hem de LY 294002 ile engellendi. EGF reseptör yoluyla uyarılma sonrasında, ERK 1/2 üst yolunda hem Ras/Raf/ MEK hem de PI3 kinazın yer aldığı gösterildi (Şekil 9). Muhtemel olarak MEK noktasında MAPK ve PI3K yolunun etkileştiği dolaylı olarak gösterildi.



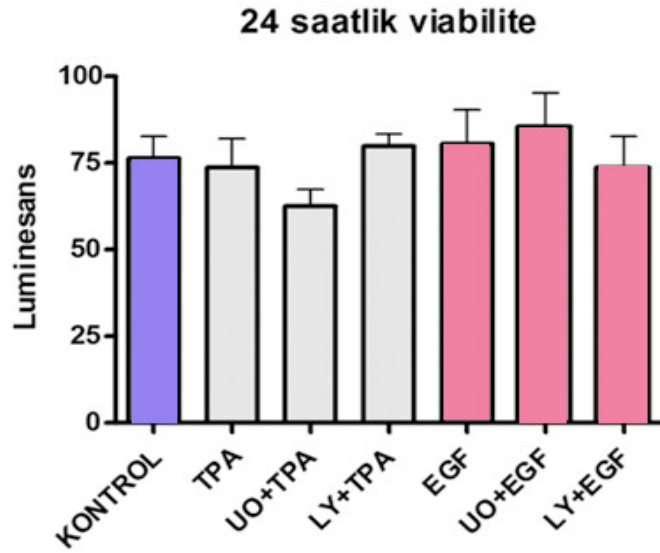
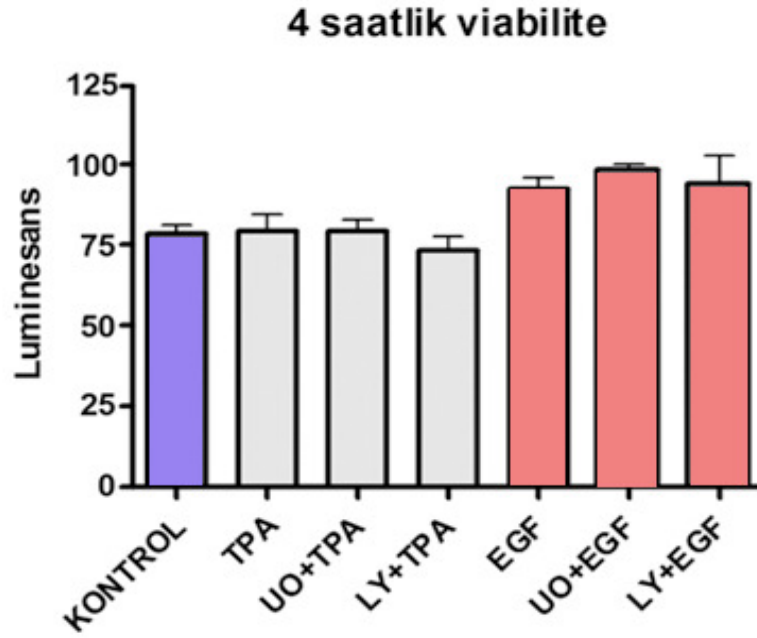
Şekil 3.4.1: TPA veya EGF ile uyarılma sonrası Erk 1/2 fosforilasyonunun ve inhibitörlerin etkisinin değerlendirilmesi

3.5. EGF veya TPA ile Uyarılma Sonrası Hücre Yaşam, Proliferasyon ve Apoptozun Değerlendirilmesi

TPA veya EGF uygulaması sonrası Elk-1 transkripsiyon faktörünün fosforilize olduğu ve alt yolundaki genleri harekete geçirdiği gösterildi. Elk-1

transkripsiyon faktörünün aktivasyonunun fizyolojik yanıtın değerlendirilmesi için bu uyarılar sonrasında Elk-1'in yaşam ve çoğalmaya etkileri ATP hücre canlılığı analizi ile ölçüldü.

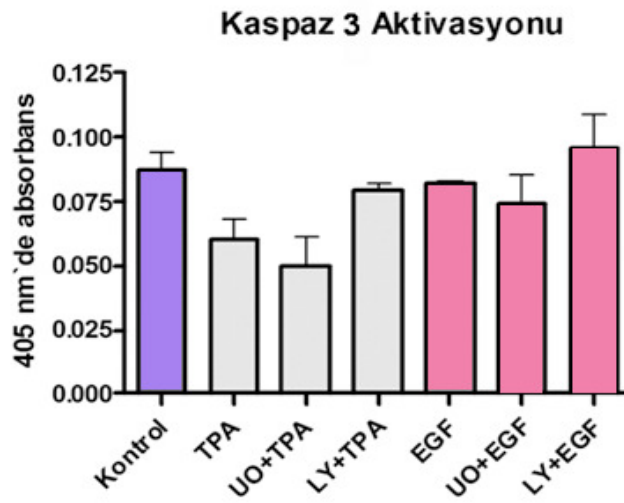
The CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay ile hücre kültürlerinde hücrenin yaşam ve çoğalmasını ATP tüketimine göre ölçen hızlı, basit ve hassas bir yöntemdir. Biyoluminesans prensibi ile kolorimetrik ve florimetrik yöntemlerden daha hassastır. Canlı C6 glioma hücrelerinde mevcut ATP ile yaratılan luminesan sinyal CCD kamerada ölçüldü. Belirtilen şekilde iki ayrı grupta 4 saat ve 24 saat uygulanan TPA C6 glioma hücrelerinin çoğalmasını sağlamadı. Benzer şekilde, kontrol grubuna göre TPA uygulanan hücrelerde ölüm veya apoptoz da gözlenmedi. LY 294002 ve UO 126, TPA varlığında hücre canlılığı ve sağkalımında değişiklik yapmadı. Glioblastoma hücrelerinde çoğalma yanıtı verdiği bilinen EGF, C6 glioma hücrelerine 4 saat veya 24 saat uygulandı. EGF ile uyarılma sonrası hücre çoğalmasında bir artış gözlemlendi ancak istatistiksel olarak önemli bir artış saptanmadı (One-way ANOVA, $F = 0.8972$, $p = 0.5151$). LY 294002 ve UO 126, EGF tarafından uyarılan çoğalmayı azalttı ancak istatistiksel olarak önemli bulunmadı. (Şekil 3.5.1).



Şekil

3.5.1: TPA veya EGF ile uyarılma sonrası C6 sıçan glioma hücrelerinde hücre canlılığının değerlendirilmesi

Elk-1 transkripsiyon faktörünün normal ve neoplastik hücrelerde yaşam ve çoğalma için önemli olduğu bilinmektedir ve C6 sıçan glioma hücrelerinde de Elk-1 uyarılması ile ilk olarak yaşam ve çoğalma fizyolojik yanıtları test edilmiştir. Ancak bu hücrelerde beklenen yanıt alınamadığından Elk-1 transkripsiyon faktörünün uyarılmasının apoptotik yollar üzerindeki etkisine bakmak için kaspaz aktivasyonu çalışıldı. C6 sıçan glioma hücreleri TPA veya EGF ile 4 saat uyarıldı. Bu uyarıların etkisini engellemek için MEK ve PI3K inhibitörleri uygulandı. Kaspaz aktivasyonu sonucu değerlendirildiğinde TPA veya EGF ile uyarılmanın C6 glioma hücrelerinde bir değişikliğe neden olmadığı görüldü (One-way ANOVA, $F = 3.289$, $p = 0.0724$) (Şekil 3.5.2).



Şekil 3.5.2: TPA veya EGF ile uyarılma sonrası C6 sıçan glioma hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonunun ve apoptozun değerlendirilmesi

4. TARTIŞMA

Glioblastomalar çok hızlı büyüyen, beyin dokusuna invazyon gösteren, radyoterapi ve kemoterapiye dirençli agresif tümörlerdir. Tümörün oluşum ve çoğalma mekanizmalarını anlamak uzun süreli tedavi planları geliştirmek için gereklidir. EGF reseptör ve alt yolunda yer alan sinyal iletim yollarının GBM oluşumundaki rolü ortaya konduktan sonra bu yolun iletimini kesmek için monoklonal antikor ve küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörlerinin tek başına veya radyoterapi ile birleştirilmesi klinik kullanıma girmiştir. (11, 17-58). EGFR sistemi; MAPK, PI3K ve PKC sinyal iletim yollarını uyarır ve GBM çoğalmasını ve yaşamasını sağlar. PI3K, GBM yaşamı ile doğrudan ilişkilidir ancak böyle olmasına rağmen PI3K düzeyinde yapılan inhibisyon tedavide beklenen amaca ulaşmamıştır. Gerçek anlamda tedavide başarı sağlanması birden fazla sinyal iletim yolunun kapatılması ile olası görünmektedir.

MAPK yolunun alt hedeflerinden olan Elk-1 transkripsiyon faktörü, tümör hücrelerinin yaşaması ve çoğalmasında rol oynar. İnsan glioblastoma hücrelerinde MAPK ve PKC η tarafından uyarıldığı gösterilmiştir (73, 99, 183). PKC grubu enzimler GBM için hayati öneme sahiptir ve her bir GBM alt tipi PKC izoenzimlerinden hangisini eksprese ediyorsa forbol ester uyarımına karşı çoğalma veya apoptoz yönünde cevap vermektedir (73, 98, 182-185). PKC- η eksprese eden hücrelerde TPA sonrası çoğalma yanıtının MAPK yolu üzerinden Elk-1 transkripsiyonunun artışı olduğu gösterilmiştir (182). Ancak glial tümörlerde bu önemli yaşam transkripsiyon faktörünün PI3K yolu ile ilişkisi bilinmemektedir. PI3K, akciğer bronşial epitel hücrelerinde PI3K yolunun MAPK yolunda Pak-1 ve Raf proteinlerini direkt fosforilize ederek Elk-1 aktivasyonunu gerçekleştirdiği gösterilmiştir (175). MAPK ve PI3K yollarının karşılıklı konuştukları, hücre ve uyarana göre değişiklik göstererek birbirlerini pozitif veya negatif yönde etkiledikleri bilinmektedir (78, 186-188). Bizim çalışmamızda hem TPA hem de EGF, Elk-1 transkripsiyon faktörünün aktivitesinde artışa neden olmuştur. Bu uyarılar MAPK, PI3K ve PKC yollarını da aktive ettiklerinden, her bir yola özel inhibitörler kullanılarak Elk-1 fosforilasyonu ve transkripsiyonu araştırılmıştır. Bizim

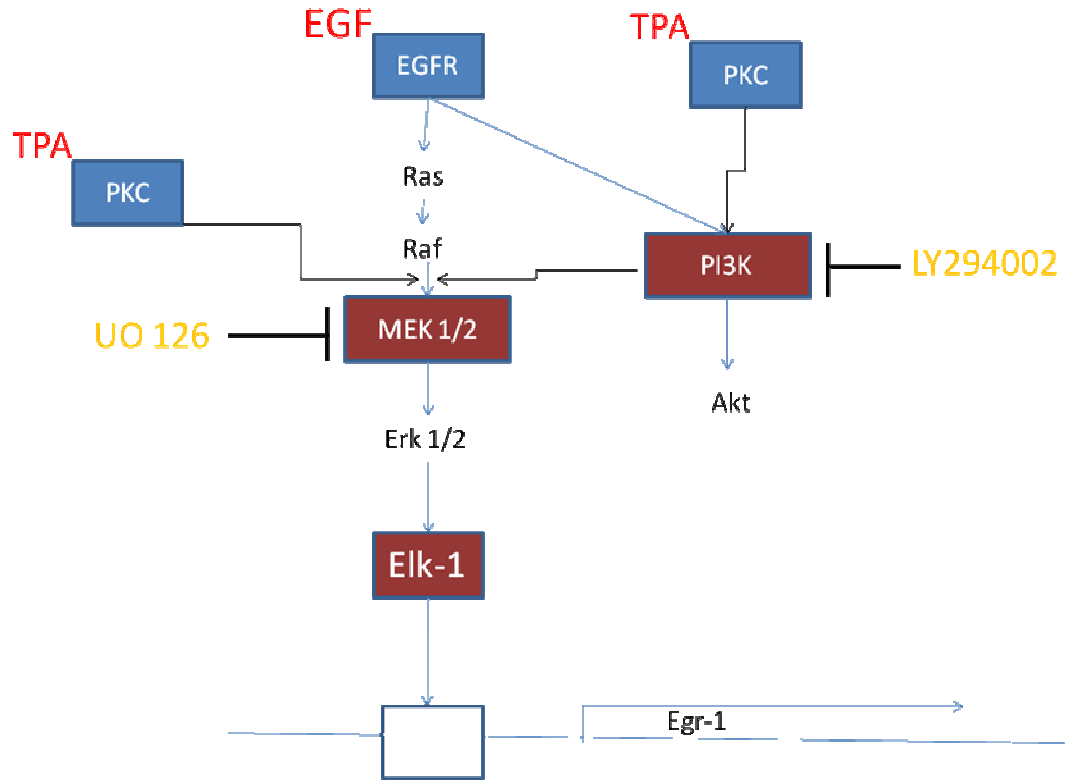
sonuçlarımıza göre, C6 sıçan glioma hücrelerinde, EGF daha çok PI3K yolunu; TPA ise MAPK yolunu aktive etmeyi tercih etmektedir. Veri sunulmamış olsa da C6 sıçan glioma hücrelerinin PKC- η eksprese ettiğini gösterdik. Daha önceki insan GBM hücre dizinlerindeki literatür bulguları da TPA uyarısı sonrası PKC- η eksprese eden hücrelerde, PKC- η ile ilişkili yaşam ve çoğalma avantajının MAPK yolu üzerinden Elk-1 aktivasyonu sayesinde olduğunu göstermiştir (182).

Elk-1 transkripsiyon faktörü bir yaşam ve çoğalma faktörüdür, C6 sıçan glioma hücrelerinde Elk-1 fosforilasyonunun ve transkripsiyonel aktivitesinin TPA ve EGF uyarılarına yanıt olarak harekete geçtiğini bu çalışmada gösterildi. İlginç olarak, inhibitörler uygulandığında, PI3K yolu kesildiğinde fosforilasyonun azalmasına rağmen Elk-1 transkripsiyonel aktivitesinin azalmadığı görüldü. Bir başka deyişle, Elk-1 transkripsiyonel aktivitesinin tamamıyla MAPK yolu aktivasyonu ile paralel olduğu görüldü (Bkz. Şekiller 3.1.1, 3.2.1 ve 3.4.1). Elk-1'in sadece fosforilasyonu değil, de-SUMO'ilyasyonu ve translasyon sonrası diğer Ets-1 üyelerinde olduğu gibi asetilasyonu, glikosilasyonu ve diğerleri en son aktivitesinin belirlenmesini sağlar. Elk-1 ve harekete geçen pek çok sinyal iletim yolunun etkisinin toplamı hücrenin son fizyolojik yanıtını ortaya çıkarır (189).

C6 sıçan glioma hücrelerinde yapılan bu çalışmada, PI3K yolunun MAPK-Elk-1 yolu akışı ile bir etkileşiminin olup olmadığı araştırıldı. Bilindiği gibi, forbol esterleri yoluyla PKC, tirozin kinazlar yoluyla büyüme faktörleri ve PI3K karşılıklı konuşma ile MAPK yolunu pozitif uyarılma yönünde harekete geçirebilirler. Ancak bazı özel durumlarda PI3K yolu MAPK yolunu negatif yönde etkileyebilir. PI3K yolu EGF veya forbol esterleri ile uyarıldığında Elk-1 transkripsiyon faktörünün aktive olduğu hem Gal:lusiferaz reporter gen, hem de alt yolunda yer alan Egr-1 geninin ekspresyonunun artması ile gösterildi. Bu aktivasyonu Elk-1 proteinini serin 383 rezidüsünden fosforileze ederek gerçekleştirdiği görüldü. Bir sonraki aşamada Elk-1 fosforilasyonunun doğrudan PI3K ile değil, MAPK yoluyla olduğu ve etkileşimin MEK düzeyinde gerçekleştiği görüldü. Bu bulgulara benzer bulgular, literatürde, bronşial epitel hücrelerinde de saptanmış ve PI3-kinazın PAK-1'i fosforilize ederek Raf ve sonrasında MEK aktivasyonunu sağladığı, Elk-1 fosforilasyonunun MAPK yoluyla PI3K tarafından yapıldığı gösterilmiştir (175). PI3K yolunun verilen uyarılar ile harekete geçtiğini göstermek için alt yolunda yer

alan özel substratı, Akt fosforilasyonu değerlendirildi. Verilen EGF veya TPA ile PI3K yolunun uyarıldığı ve PI3K özel inhibitörü LY294002 ile bu uyarılmanın tamamıyla geri çevrildiği görüldü. Ancak, kullanılan EGF ve TPA sadece PI3K yoluna özel uyarılar değildir. EGF reseptörü hücre zarında yer alır ve hücrenin içinde birden fazla sinyal iletim yolunu harekete geçirir. EGFR, MAPK ve PI3K yollarını aktive ettiği bilinmektedir. Benzer şekilde forbol esterleri ile uyarılma kapasitesine sahip klasik ve novel pek çok PKC izoformu MAPK yolunu ve PI3K yolunu uyarır (73, 99, 183). Glioma çalışmalarında verilen uyarılar inhibitörleri kadar sinyal iletim yollarının bir molekülüne özel değildir. Verdiğimiz TPA ve EGF ile uyarılan iki ayrı sinyal iletim yolu ortak bir noktada buluşarak Elk-1 ve alt yolunda bulunan Egr-1'i aktive etmiştir. Her iki yolun birleştiği kavşak MEK olarak düşünülmüştür. PI3K yoluyla Elk-1 transkripsiyon faktörünün uyarılmasıyla ilgili önerilen mekanizma Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Bu çalışmadaki sonuçlarımız göstermiştir ki PI3K yolu MAPK üzerinden Elk-1 fosforilasyonunu gerçekleştirebilir ve büyük ihtimalle bu iki yol MEK seviyesinde birleşmektedir. Ancak Elk-1 aktivasyonu ortaya konulmasına rağmen, C6 sıçan glioma hücrelerinde, EGF ve TPA fizyolojik bir yanıt ile sonlanmamıştır. Mevcut sonuçlar ile, EGF veya TPA'ya yanıt olarak hücrelerin yaşam ve çoğalmasında Elk-1 rolünün araştırılması için C6 sıçan glioma hücreleri ideal bir model olmayabilir.



Şekil 4.1: C6 sıçan glioma hücresinde MAPK ve PI3K yolları ile Elk-1 aktivasyonunu göstermek için önerilen şema

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

C6 sıçan glioma hücrelerinde Elk-1 aktivasyonunu yöneten ana yolun MAPK olduğu ve PI3K yolunun etkisini MAPK yolu üzerinden gösterdiği bu çalışmanın sonucunda ortaya konmuştur. Ancak, MAPK yolunda hedef moleküllerin noktasal olarak tayin edilebilmesi için güncel yöntemlerden olan siRNA ile transkripsiyon düzeyinde verilen moleküle özel inhibisyon yapmak olasıdır. Deneyleerin bir sonraki aşamasında MAPK ve PI3K yolunun kesişme noktasındaki hedef molekül bu yöntemle belirlenebilir.

C6 sıçan glioma hücreleri *in vitro* ve *in vivo* koşullarda glioblastoma araştırmaları için kullanılmaktadır. Hem hızla büyüyerek kitle etkisi oluşturduğundan hem de beyin dokusuna invazyon yaptığından glioblastomayı taklit eder (190). Bu çalışmada, Elk-1 fosforilizasyon ve aktivasyonundaki ana akım yolunun MEK-ERK 1/2 olduğu ve birden fazla üst yolun bu ana arterde bileşebileceği gösterildikten sonra, uyarılan Elk-1 transkripsiyon faktörünün C6 sıçan glioma hücrelerinde fizyolojik olarak ne gibi değişiklikler yaptığını belirlemek üzere yapılan hücre canlılığı ve apoptoz analizlerin sonuçları insan glioblastoma hücrelerinden farklılık göstermiştir. Beklenenden farklı olarak EGF ve TPA, C6 sıçan glioma hücrelerinde büyüme ve çoğalma yönünde yanıt vermemiş, aynı zamanda apoptozu da artırmamıştır. Elk-1 çoğalma yönünde bir transkripsiyon faktörüdür ve EGF ve TPA varlığında aktive olduğu bu çalışmada da teyit edilmiştir. Elk-1 uyarılmasının fizyolojik yanıtı dönüşmemesinin nedeni Elk-1 transkripsiyon faktörünün C6 sıçan glioma hücreleri için çok önemli bir yaşam molekülü olmaması olabilir. Hücrenin çoğalması ve apoptozdan kaçışı karmaşık bir oluşum olup, Elk-1 dışındaki transkripsiyon faktörlerinin bileşenlerinin toplamı son yanıtı belirliyor olabilir. Elk-1 transkripsiyon faktörünün aşırı ekspresyonu veya nakavtı ile fizyolojik sonuçların belirlenmesi daha ileri çalışmalar ile anlaşılabilir.

Sıçan C6 glioma hücreleri *in vitro* koşullarda insan glioblastomalarının çoğalma, invazyon gibi özelliklerini gösterebilir ancak Elk-1 transkripsiyon faktörünün bu tümörlerde hedeflenebilecek yaşamsal bir faktör olup olmadığının belirlenmesi insan kaynaklı glioblastoma kültürlerinde çalışılması bir başka çalışma olarak planlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Chen, A., Xu, J., ve Johnson, A.C. (2006) Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. *Oncogene*, 25(2), 278–287.
2. Nagane, M., Huang, H.J.S., ve Cavenee, W.K. (1997) Advances in the molecular genetics of gliomas. *Current Opinion in Oncology*, 9 (3), 215–22.
3. Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., ve diğ erleri (1985) Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature*, 313 (5998), 144–7.
4. Malden, L.T., Novak, U., Kaye, A.H., ve Burgess, A.W. (1988) Selective amplification of the cytoplasmic domain of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Research*, 48(10) , 2711–4.
5. Wong, A.J., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Kinzler, K.W., Hamilton, S.R., ve Vogelstein, B. (1987) Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(19), 6899–903.
6. Ekstrand, A.J., James, C.D., Cavenee, W.K., Seliger, B., Pettersson, R.F., ve Collins, V.P. (1991) Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Research*, 51(8) , 2164–72.
7. Fleming, T.P., Saxena, A., Clark, W.C., Robertson, J.T., Oldfield, E.H., Aaronson, S.A., ve diğ erleri. (1992) Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Research*, 52(16), 4550–3.
8. Houillier, C., Lejeune, J., Benouaich-Amiel, A., Laigle-Donadey, F., Criniere, E., Mokhtari, K. ve diğ erleri. (2006) Prognostic impact of molecular

- markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer*, 106(10), 2218–2223.
9. Mischel, P.S. ve Cloughesy, T.F. (2003) Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathology*, 13(1), 52–61.
 10. Nozaki, M., Tada, M., Kobayashi, H., Zhang, C.L., Sawamura, Y., Abe, H. ve diğerleri. (1999) Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro-oncology*, 1(2), 124–137.
 11. Eller, J.L., Longo, S.L., Kyle, M.M., Bassano, D., Hicklin, D.J., ve Canute, G.W. (2005) Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab augments radiation effects in glioblastoma multiforme in vitro and in vivo. *Neurosurgery*, 56(1), 155-62.
 12. Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N., ve Ullrich, A. (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Current opinion in cell biology*, 11(2), 184–9.
 13. Nishikawa, R., Ji, X.D., Harmon, R.C., Lazar, C.S., Gill, G.N., Cavenee, W.K., ve diğerleri. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7727–31.
 14. Huang, H.J., Nagane, M., Klingbeil, C.K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X.D., ve diğerleri. (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancer is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signalling. *Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2927–35.
 15. Moscatello, D.K., Montgomery, R.B., Sundareshan, P., McDanel, H., Wong, M.Y., ve Wong, A.J. (1996) Transformation and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene*, 13(1), 85–96.
 16. Schlegel, U., Moots, P., Rosenblum, M., Thaler, H., ve Furneaux, H. (1990) Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas. *Oncogene*, 5(12), 1839–42.

17. Dancey, J.E., ve Freidlin, B. (2003) Targeting epidermal growth factor receptor--are we missing the mark? *Lancet*, 362(9377), 62-4.
18. Andersson, U., Johansson, D., Behnam-Motlagh, P., Johansson, M., ve Malmer, B. (2007) Treatment schedule is of importance when gefitinib is combined with irradiation of glioma and endothelial cells in vitro. *Acta Oncologica*, 46(7), 951-60.
19. Huang, P.H., Mukasa, A., Bonavia, R., Flynn, R.A., Brewer, Z.E., Cavenee, W.K., ve diğeri. (2007) Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), 12867-72.
20. Combs, S.E., Schulz-Ertner, D., Roth, W., Herold-Mende, C., Debus, J., ve Weber, K.J. (2007) In vitro responsiveness of glioma cell lines to multimodality treatment with radiotherapy, temozolomide, and epidermal growth factor receptor inhibition with cetuximab. *International Journal Of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 68(3), 873-82.
21. Pelloski, C.E., Ballman, K.V., Furth, A.F., Zhang, L., Lin, E., Sulman, E.P., ve diğeri. (2007) Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 25(16), 2288-94.
22. Martinez, R., Roggendorf, W., Baretton, G., Klein, R., Toedt, G., Lichter, P., ve diğeri. (2007) Cytogenetic and molecular genetic analyses of giant cell glioblastoma multiforme reveal distinct profiles in giant cell and non-giant cell subpopulations. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 175(1), 26-34.
23. Brat, D.J., Shehata, B.M., Castellano-Sanchez, A.A., Hawkins, C., Yost, R.B., Greco, C., ve diğeri. (2007) Congenital glioblastoma: a clinicopathologic and genetic analysis. *Brain Pathology*, 17(3), 276-81.
24. Kapoor, G.S., Christie, A., ve O'rourke, D.M. (2007) EGFR Inhibition in Glioblastoma Cells Induces G(2) /M Arrest and is Independent of p53. *Cancer Biology and Therapy*, 6(4), (elektronik basım)

25. Necesalova, E., Vranova, V., Kuglik, P., Cejpek, P., Jarosova, M., Pesakova, M., ve diğeri. (2007) Incidence of the main genetic markers in glioblastoma multiforme is independent of tumor topology. *Neoplasma*, 54(3), 212-8.
26. Paraskevakou, G., Allen, C., Nakamura, T., Zollman, P., James, C.D., ve Peng, K.W., ve diğeri. (2007) Epidermal growth factor receptor (EGFR) - retargeted measles virus strains effectively target EGFR- or EGFRvIII expressing gliomas. *Molecular Therapy*, 15(4), 677-86.
27. Fountzilas, G., Karkavelas, G., Kalogera-Fountzila, A., Karina, M., Ignatiadis, M., Koukoulis, G., ve diğeri. (2006) Post-operative combined radiation and chemotherapy with temozolomide and irinotecan in patients with high-grade astrocytic tumors. A phase II study with biomarker evaluation. *Anticancer Research*, 26(6C), 4675-86.
28. Halatsch, M.E., Schmidt, U., Unterberg, A., ve Vougioukas, V.I. (2006) Uniform MDM2 overexpression in a panel of glioblastoma multiforme cell lines with divergent EGFR and p53 expression status. *Anticancer Research*, 26(6B), 4191-4.
29. Saikali, S., Avril, T., Collet, B., Hamlat, A., Bansard, J.Y., Drenou, B., ve diğeri. (2007) Expression of nine tumour antigens in a series of human glioblastoma multiforme: interest of EGFRvIII, IL-13Ralpha2, gp100 and TRP-2 for immunotherapy. *Journal of Neurooncology*, 81(2), 139-48.
30. Belda-Iniesta, C., Carpeno, J.C., Saenz, E.C., Gutierrez, M., Perona, R., ve Baron, M.G. (2006) Long term responses with cetuximab therapy in glioblastoma multiforme. *Cancer Biology and Therapy*, 5(8), 912-4.
31. Nieder, C., Adam, M., Molls, M., ve Grosu, A.L. (2006) Therapeutic options for recurrent high-grade glioma in adult patients: recent advances. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 60(3), 181-93.
32. Combs, S.E., Heeger, S., Haselmann, R., Edler, L., Debus, J., ve Schulerterner, D. (2006) Treatment of primary glioblastoma multiforme with

- cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT) --phase I/II trial: study protocol. *BMC Cancer*, 6, 133.
33. Saito, T., Hama, S., Kajiwara, Y., Sugiyama, K., Yamasaki, F., Arifin, M.T., ve diğeri. (2006) Prognosis of cerebellar glioblastomas: correlation between prognosis and immunoreactivity for epidermal growth factor receptor compared with supratentorial glioblastomas. *Anticancer Research*, 26(2B), 1351-7.
 34. Hofer, S., Frei, K., ve Rutz, H.P. (2006) Gefitinib accumulation in glioblastoma tissue. *Cancer Biology and Therapy*, 5(5), 483-4.
 35. Layfield, L.J., Willmore, C., Tripp, S., Jones, C., ve Jensen, R.L. (2006) Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to other prognostic factors. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 14(1), 91-6.
 36. Halatsch, M.E., Schmidt, U., Behnke-Mursch, J., Unterberg, A., ve Wirtz, C.R. (2006) Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treatment Reviews*, 32(2), 74-89.
 37. Lubensky, I.A., Vortmeyer, A.O., Kim, S., Lonser, R.R., Park, D.M., Ikejiri, B., ve diğeri. (2006) Identification of tumor precursor cells in the brains of primates with radiation-induced de novo glioblastoma multiforme. *Cell Cycle*, 5(4), 452-6.
 38. Ganigi, P.M., Santosh, V., Anandh, B., Chandramouli, B.A., Sastry Kolluri, V.R. (2005) Expression of p53, EGFR, pRb and bcl-2 proteins in pediatric glioblastoma multiforme: a study of 54 patients. *Pediatric Neurosurgery*, 41(6), 292-9.
 39. Rao, R.D., Mladek, A.C., Lamont, J.D., Goble, J.M., Erlichman, C., James, C.D., ve diğeri. (2005) Disruption of parallel and converging signaling

pathways contributes to the synergistic antitumor effects of simultaneous mTOR and EGFR inhibition in GBM cells. *Neoplasia*, 7, 921-9.

40. Amos, S., Redpath, G.T., Polar, G., McPheson, R., Schiff, D., ve Hussaini, I.M. (2006) Farnesylthiosalicylic acid induces caspase activation and apoptosis in glioblastoma cells. *Cell Death and Differentiation*, 13(4), 642-51.
41. Heimberger, A.B., Suki, D., Yang, D., Shi, W., ve Aldape, K. (2005) The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *Journal of Translational Medicine*, 3, 38.
42. Haas-Kogan, D.A., Prados, M.D., Lamborn, K.R., Tihan, T., Berger, M.S., ve Stokoe, D. (2005) Biomarkers to predict response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cell Cycle*, 4(10), 1369-72.
43. Lopez-Gines, C., Cerda-Nicolas, M., Gil-Benso, R., Pellin, A., Lopez-Guerrero, J.A., Callaghan, R., ve diğeri. (2005) Association of chromosome 7, chromosome 10 and EGFR gene amplification in glioblastoma multiforme. *Clinical Neuropathology*, 24(5), 209-18.
44. Raizer, J.J. (2005) HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. *Journal of Neurooncology*, 74(1), 77-86.
45. Ghosh, M.K., Sharma, P., Harbor, P.C., Rahaman, S.O., ve Haque, S.J. (2005) PI3K-AKT pathway negatively controls EGFR-dependent DNA-binding activity of Stat3 in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene*, 24(49), 7290-300.
46. Perry, A., Aldape, K.D., George, D.H., ve Burger, P.C. (2004) Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer*, 101(10), 2318-26.
47. Aldape, K.D., Ballman, K., Furth, A., Buckner, J.C., Giannini, C., Burger, P.C., ve diğeri. (2004) Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic

- significance. *Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology*, 63(7), 700-7.
48. Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryō, T., Kochi, M., Nakamura, H., ve diğeri. (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Research*, 63(20), 6962-70.
 49. Zhou, Y.H., Tan, F., Hess, K.R., ve Yung, W.K. (2003) The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clinical Cancer Research*, 9(9), 3369-75.
 50. Hill, C., Hunter, S.B., ve Brat, D.J. (2003) Genetic markers in glioblastoma: prognostic significance and future therapeutic implications. *Advances in Anatomic Pathology*, 10(4), 212-7.
 51. Thomas, C.Y., Chouinard, M., Cox, M., Parsons, S., Stallings-Mann, M., Garcia, R., ve diğeri. (2003) Spontaneous activation and signaling by overexpressed epidermal growth factor receptors in glioblastoma cells. *International Journal of Cancer*, 104(1), 19-27.
 52. Huncharek, M., ve Kupelnick, B. (2000) Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis. *Oncology Research*, 12(2), 107-12.
 53. Feldkamp, M.M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., ve Guha, A. (1999) Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery*, 45(6), 1442-53.
 54. Holland, E.C., Hively, W.P., DePinho, R.A., ve Varmus, H.E. (1998) A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes and Development*, 12(23), 3675-85.
 55. Hayashi, Y., Ueki, K., Waha, A., Wiestler, O.D., Louis, D.N., ve von Deimling, A. (1997) Association of EGFR gene amplification and CDKN2

- (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. *Brain Pathology*, 7(3), 871-5.
56. Mendelsohn, J. ve Baselga, J. (2000) The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*, 19(56), 6550-65.
 57. Baselga, J. (2000) New therapeutic agents targeting the epidermal growth factor receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 18(21 Suppl), 54S-9S.
 58. Ciardiello, F. (2000) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs*, 60 (Suppl 1), 25-32.
 59. Hermanson, M., Funa, K., Koopmann, J., Maintz, A., Waha, A., Westermark, B., ve diğeri. (1996) Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor a receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Research*, 56(1), 164–71.
 60. Westermark, B., Heldin, C.H., ve Nister, M. (1995) Platelet-derived growth factor in human glioma. *Glia*, 15(3), 257–63.
 61. Shamah, S.M., Stiles, C.D., Guha, A. (1993) Dominant-negative mutants of platelet-derived growth factor revert the transformed phenotype of human astrocytoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 13(12), 7203–12.
 62. Guha, A., Dashner, K., Black, P.McL., Wagner, J.A., Stiles, C.D. (1995) Expression of PDGF and PDGF receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop. *International Journal of Cancer*, 60(2), 168–73.
 63. Erlich, R.B., Kahn, S.A., Lima, F.R., Muras, A.G., Martins, R.A., Linden R, ve diğeri. (2007) STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. *Glia*, 55(16), 1690-8.
 64. Nomura, N., Nomura, M., Sugiyama, K., ve Hamada, J. (2007) Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced migration of glioblastoma cells is mediated via p38MAPK/Hsp27 pathway. *Biochemical Pharmacology*, 74(5), 690-701.

65. Lama, G., Mangiola, A., Anile, C., Sabatino, G., De Bonis, P., Lauriola, L., ve diğeri. (2007) Activated ERK1/2 expression in glioblastoma multiforme and in peritumor tissue. *International Journal of Oncology*, 30(6), 1333-42.
66. Dziembowska, M., Danilkiewicz, M., Wesolowska, A., Zupanska, A., Chouaib, S., Kaminska, B. (2007) Cross-talk between Smad and p38 MAPK signalling in transforming growth factor beta signal transduction in human glioblastoma cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 354(4), 1101-6.
67. Mizoguchi, M., Betensky, R.A., Batchelor, T.T., Bernay, D.C., Louis, D.N., Nutt, C.L. (2006) Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology*, 65(12), 1181-8.
68. Quick, Q.A. ve Gewirtz, D.A. (2006) Enhancement of radiation sensitivity, delay of proliferative recovery after radiation and abrogation of MAPK (p44/42) signaling by imatinib in glioblastoma cells. *International Journal of Oncology*, 29(2), 407-12.
69. Pelloski, C.E., Lin, E., Zhang, L., Yung, W.K., Colman, H., Liu, J.L., ve diğeri. (2006) Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma. *Clin Cancer Research*, 12(13), 3935-41.
70. Edwards, L.A., Verreault, M., Thiessen, B., Dragowska, W.H., Hu, Y., Yeung, J.H., ve diğeri. (2006) Combined inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways results in synergistic effects in glioblastoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(3), 645-54.
71. Seo, M.S., Oh, S.Y., Park, M.J., Kim, S.M., Kim, M.Y., Han, S.I., ve diğeri. (2005) Implication of reactive oxygen species, ERK1/2, and p38MAPK in sodium salicylate-induced heat shock protein 72 expression in C6 glioma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 16(5), 841-9.

72. Bhaskara, V.K., Panigrahi, M., Challa, S., Babu, P.P. (2005) Comparative status of activated ERK1/2 and PARP cleavage in human gliomas. *Neuropathology*, 25(1), 48-53.
73. Amos, S., Martin, P.M., Polar, G.A., Parsons, S.J., Hussaini, I.M. (2005) Phorbol 12-myristate 13-acetate induces epidermal growth factor receptor transactivation via protein kinase Cdelta/c-Src pathways in glioblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7729-38.
74. Lachat, Y., Diserens, A.C., Nozaki, M., Kobayashi, H., Hamou, M.F., Godard, S., ve diğ erleri. (2004) INK4a/Arf is required for suppression of EGFR/DeltaEGFR(2-7) -dependent ERK activation in mouse astrocytes and glioma. *Oncogene*, 23(41), 6854-63.
75. Kondo, Y., Hollingsworth. E.F., ve Kondo, S. (2004) Molecular targeting for malignant gliomas (Review) . *International Journal of Oncology*, 24(5), 1101-9.
76. Mawrin, C., Diete, S., Treuheit, T., Kropf, S., Vorwerk, C.K., Boltze. C., ve diğ erleri. (2003) Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. *International Journal of Oncology*, 23(3), 641-8.
77. Schlegel, J., Piontek, G., ve Mennel, H.D. (2002) Activation of the anti-apoptotic Akt/protein kinase B pathway in human malignant gliomas in vivo. *Anticancer Research*, 22(5), 2837-40.
78. Galetic, I., Maira, S.M., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A. (2003) Negative regulation of ERK and Elk by protein kinase B modulates c-Fos transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4416-23.
79. Chakravarti, A., Chakladar, A., Delaney, M.A., Latham, D.E., ve Loeffler, J.S. (2002) The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Research*, 62(15), 4307-15.
80. Funakoshi, M., Sonoda, Y., Tago, K., Tominaga, S., Kasahara, T. (2001) Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and

- phosphatidyl inositol 3-kinase in the IL-1-mediated NF-kappa B and AP-1 activation. *International immunopharmacology*, 1(3), 595-604.
81. Lorimer, I.A. ve Lavictoire, S.J. (2001) Activation of extracellular-regulated kinases by normal and mutant EGF receptors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1538(1), 1-9.
 82. Maity, A., Pore, N., Lee, J., Solomon, D. ve O'Rourke, D.M. (2000) Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Research*, 60(20), 5879-86.
 83. Wu, C.J., Chen, Z., Ullrich, A., Greene, M.I., ve O'Rourke, D.M. (2000) Inhibition of EGFR-mediated phosphoinositide-3-OH kinase (PI3-K) signaling and glioblastoma phenotype by signal-regulatory proteins (SIRPs) . *Oncogene*, 19(35), 3999-4010.
 84. Schlegel, J., Piontek, G., Budde, B., Neff, F., ve Kraus, A. (2000) The Akt/protein kinase B-dependent anti-apoptotic pathway and the mitogen-activated protein kinase cascade are alternatively activated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Letters* 158(1) 103-8.
 85. Kao, G.D., Jiang, Z., Fernandes, A.M., Gupta, A.K., ve Maity, A. (2007) Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21206-12.
 86. Koul, D., Shen, R., Bergh, S., Sheng, X., Shishodia, S., Lafortune, T.A., ve diğerleri. (2006) Inhibition of Akt survival pathway by a small-molecule inhibitor in human glioblastoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(3), 637-44.
 87. Kaper, F., Dornhoefer, N., ve Giaccia, A.J. (2006) Mutations in the PI3K/PTEN/TSC2 pathway contribute to mammalian target of rapamycin activity and increased translation under hypoxic conditions. *Cancer Research*, 66(3), 1561-9.

88. Chow, L.M. ve Baker, S.J. (2006) PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Letters*, 241(2), 184-96.
89. Knobbe, C.B., Trampe-Kieslich, A., ve Reifenberger, G. (2005) Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathology And Applied Neurobiology*, 31(5),486-90.
90. Mizoguchi, M., Nutt, C.L., Mohapatra, G., ve Louis, D.N. (2004) Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathology*, 14(4), 372-7.
91. Messina, S., Leonetti, C., De Gregorio, G., Affatigato, V., Ragona, G., Frati, L., ve diğeri. (2004) Ras inhibition amplifies cisplatin sensitivity of human glioblastoma. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 320(2), 493-500.
92. Chakravarti, A., Zhai, G., Suzuki, Y., Sarkesh, S., Black, P.M., Muzikansky, A., ve diğeri. (2004) The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *Journal of Clinical Oncology*, 22(10), 1926-33.
93. Knobbe, C.B., ve Reifenberger, G. (2003) Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathology*, 13(4), 507-18.
94. Choe, G., Horvath, S., Cloughesy, T.F., Crosby, K., Seligson, D., Palotie, A., ve diğeri. (2003) Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer Research*, 63(11), 2742-6.
95. Klingler-Hoffmann, M., Bukczynska, P., ve Tiganis, T. (2003) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling negates the growth advantage imparted by a mutant epidermal growth factor receptor on human glioblastoma cells. *International Journal of Cancer*, 105(3), 331-9.

96. Chandrasekar, N., Mohanam, S., Gujrati, M., Olivero, W.C., Dinh, D.H., Rao, J.S. (2003) Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells. *Oncogene*, 22(3), 392-400.
97. Kubota, N., Okada, S., Inada, T., Ohnishi, K., ve Ohnishi, T. (2000) Wortmannin sensitizes human glioblastoma cell lines carrying mutant and wild type TP53 gene to radiation. *Cancer Letters*, 161(2), 141-7.
98. Baltuch, G.H., Dooley, N.P., Villemure, J.G., ve Yong, V.W. (1995) Protein kinase C and growth regulation of malignant gliomas. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 22(4), 264–271.
99. Hussaini, I.M., Karns, L.R., Vinton, G., Carpenter, J.E., Redpath, G.T., Sando, J.J., ve diğ erleri. 2000 () Phorbol 12-myristate 13-acetate induces protein kinase C-eta-specific proliferative response in astrocytic tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 22348–22354.
100. Mishima, K., Ohno, S., Shitara, N., Yamaoka, K., ve Suzuki, K. (1994) Opposite effects of the overexpression of protein kinase C gamma and delta on the growth properties of human glioma cell line U251 MG. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201(), 363–372.
101. Schonwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J., ve Parker, P.J. (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Molecular ve Cellular Biology*, 18(2), 790–798.
102. Schaeffer, H.J., ve Weber, M.J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular ve Cellular Biology*, 19(4), 2435-44.
103. Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*, 351 Pt 2, 289-305.
104. Wasylyk, B., Hagman, J., ve Gutierrez-Hartmann, A. (1998) Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(6), 213-6.

105. Sharrocks, A.D. (2001) The ETS-domain transcription factor family. *Nature Reviews. Molecular ve Cellular Biology*, 2(11) 827-37.
106. Treisman, R. (1994) Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Current Opinion In Genetics and Development*, 4(1), 96-101.
107. Dalton, S., ve Treisman, R. (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell*, 68(3), 597-612.
108. Forsdyke, D.R. (1985) cDNA cloning of mRNAs which increase rapidly in human lymphocytes cultured with concanavalin-A and cycloheximide. *Biochemical And Biophysical Research Communication* , 129 (3), 619-25.
109. Edwards, S.A., Darland, T., Sosnowski, R., Samuels, M., ve Adamson, E.D. (1991) The transcription factor, Egr-1, is rapidly modulated in response to retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Developmental Biology*, 148(1), 165-73.
110. Sukhatme, V.P., Cao, X.M., Chang, L.C., Tsai-Morris, C.H., Stamenkovich, D., Ferreira, P.C., ve diğeri. (1988) A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell*, 53(1), 37-43.
111. Liu, C., Rangnekar, V.M., Adamson, E., ve Mercola, D. (1998) Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Therapy*, 5(1), 3-28.
112. Sharrocks, A.D. (2002) Complexities in ETS-domain transcription factor function and regulation: lessons from the TCF (ternary complex factor) subfamily. The Colworth Medal Lecture. *Biochemical Society transactions*, 30(2), 1-9.
113. Baron, V., Adamson, E.D., Calogero, A., Ragona, G., ve Mercola, D. (2006) The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor

- suppressors including TGF 1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Therapy*, 13(2), 115-24.
114. Thyss, R., Virolle, V., Imbert, V., Peyron, J.F., Aberdam, D., ve Virolle, T. (2005) NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *The EMBO Journal*, 24(1), 128-37.
 115. Kronen-Herzig, A., Adamson, E., ve Mercola, D. (2003) Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 3233-8.
 116. Ragione, F.D., Cucciolla, V., Criniti, V., Indaco, S., Borriello, A., ve Zappia, V. (2003) p21Cip1 gene expression is modulated by Egr1: a novel regulatory mechanism involved in the resveratrol antiproliferative effect. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23360-8.
 117. Virolle, T., Adamson, E.D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., ve diğeri. (2001) The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nature Cell Biology*, 3(12), 1124-8.
 118. Yordy, J.S. ve Muise-Helmericks, R.C. (2000) Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene*, 19(55), 6503–6513.
 119. Chung, E.Y., Shin, S.Y., Lee, Y.H. (2007) Amitriptyline induces early growth response-1 gene expression via ERK and JNK mitogen-activated protein kinase pathways in rat C6 glial cells. *Neuroscience Letters*, 422(1), 43–48.
 120. Schratt, G., Weinhold, B., Lundberg, A.S., Schuck, S., Berger, J., Schwarz, H., ve diğeri. (2001) Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Molecular ve Cellular Biology*, 21(8), 2933-43.
 121. Watson, D.K., Robinson, L., Hodge, D.R., Kola, I., Papas, T.S., ve Seth, A. (1997) FLI1 and EWS-FLI1 function as ternary complex factors and ELK1

- and SAP1a function as ternary and quaternary complex factors on the Egr1 promoter serum response elements. *Oncogene*, 14(2), 213-21.
122. Hodge, C., Liao, J., Stofega, M., Guan, K., Carter-Su, C., ve Schwartz, J. (1998) Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31327-36.
 123. Hipskind, R.A., Buscher, D., Nordheim, A., ve Baccarini, M. (1994) Ras/MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways target distinct ternary complex factors. *Genes and Development*, 8(15), 1803-16.
 124. Guha, M., O'Connell, M.A., Pawlinski, R., Hollis, A., McGovern, P., Yan, S.F., ve diğerleri. (2001) Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood*, 98(5), 1429-39.
 125. Shin, S.Y., Lee, J.H., Min, B., ve Lee, Y.H. (2006) The translation inhibitor anisomycin induces Elk-1-mediated transcriptional activation of egr-1 through multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Experimental and Molecular Medicine*, 38(6), 677-85.
 126. Gashler, A.L., Sukhatme, V.P. (1995) Early growth response protein Egr-1.: prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Progress In Nucleic Acid Research And Molecular Biology*, 50, 191–224.
 127. Biesiada, E., Razandi, M., Levin, E.R. (1996) Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18576–81.
 128. Kaufmann, K., ve Thiel, G. (2001) Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor induce expression of Egr-1, a zinc finger transcription factor, in human malignant glioma cells. *Journal of the Neurological Journal of the Neurological Sciences*, 189(1-2), 83-91.

129. Liu, C., Yao, J., Mercola, D., Adamson, E. (2000) The Transcription Factor EGR-1 Directly Transactivates the Fibronectin Gene and Enhances Attachment of Human Glioblastoma Cell Line U251. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20315–20323.
130. Rong, Y., Hu, F., Huang, R., Mackman, N., Horowitz, J.M., Jensen, R.L., ve diğerleri. (2006) Early growth response gene-1 regulates hypoxia-induced expression of tissue factor in glioblastoma multiforme through hypoxia-inducible factor-1-independent mechanisms. *Cancer Research*, 66(14), 7067-74.
131. Morita, K., Ebert, S.N., ve Wong, D.L. (1995) Role of transcription factor Egr-1 in phorbol ester-induced phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 270(19), 11161–11167.
132. Huang, R.P., Fan, Y., de Belle, I., Niemeyer, C., Gottardis, M.M., Mercola, D., ve diğerleri. (1997) Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *International Journal of Cancer*, 72(1), 102-9.
133. Lee, S.G., Su, Z.Z., Emdad, L., Sarkar, D., Franke, T.F., ve Fisher, P.B. (2007) Astrocyte elevated gene-1 activates cell survival pathways through PI3K-Akt signaling. *Oncogene* (elektronik basım)
134. Wang, X., McCullough, K.D., Franke, T.F., ve Holbrook, N.J. (2000) Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14624-31.
135. Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., ve Toker, A. (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*, 275(5300), 665-8.
136. Frank, T.F., Kaplan, D.R., ve Cantley, L.C. (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88(4), 435-7.

137. Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., ve diğerleri. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, 275(5300), 661-5.
138. Contessa, J.N., Hampton, J.L., Lammering, G., ve diğerleri (2002) Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene*, 21(25), 4032-4041.
139. Datta, S.R., Brunet, A., ve Greenberg, M.E. (1999) Cellular survival: A play in three Akts. *Genes and Development*, 13(22), 2905-2927.
140. Datta, K., Bellacosa, A., Chan, T.O., ve diğerleri. (1996) Akt is a Direct Target of the Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(48), 30835-30839.
141. Downward, J. (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2), 262-267.
142. Harada, H., Andersen, J., Mann, M., ve diğerleri. (2001) P70S6 kinase signals cell survival as well as cell growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), 9666-9670.
143. Kuruvilla, F.G., ve Schreiber, S.L. (1999) The PIK-related kinases intercept conventional signaling pathways. *Chemical Biology*, 6(5), R129–R136.
144. Stein, R.C., Waterfield, M.D. (2000) PI3-kinase inhibition: A target for drug development? *Molecular Medicine Today* 6() 347-357.
145. Xiao, G.H., Jeffers, M., Bellacos, A., ve diğerleri (2001) Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), 247-252.
146. Zundel, W., Giaccia, A. (1998) Inhibition of the antiapoptotic pathway PI3K/Akt/bad pathway by stress. *Genes and Development*, 12(13), 1941-1946.

147. Testa, J.R., ve Bellacosa, A. (2001) AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 10983-10985.
148. Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., ve diğ erleri. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal*, 15(23), 6541-51.
149. Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., ve diğ erleri. (2006) SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*, 127(1), 125-37.
150. Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., ve diğ erleri. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282(5392), 1318-21.
151. Rommel, C., Clarke, B.A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossman, R., Reid, K., ve diğ erleri. (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*, 286(5445), 1738-41.
152. Zimmermann, S., ve Moelling, K. (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*, 286(5445), 1741-4.
153. Cantley, L.C., ve Neel, B.G. (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4240-5.
154. Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., ve Brown, R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002) . *Journal of Biological Chemistry*, 269(7), 5241-8.
155. Soroceanu, L., Kharbanda, S., Chen, R., Soriano, R.H., Aldape, K., Misra, A., ve diğ erleri. (2007) Identification of IGF2 signaling through phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3 as a growth-promoting axis in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3466-71.

156. Parsa, A.T., Waldron, J.S., Panner, A., Crane, C.A., Parney, I.F., Barry, J.J., ve diğerleri. (2007) Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nature Medicine*, 13(1), 84-8.
157. Zhou, Y.H., Hess, K.R., Liu, L., Linskey, M.E., ve Yung, W.K. (2005) Modeling prognosis for patients with malignant astrocytic gliomas: quantifying the expression of multiple genetic markers and clinical variables. *Neuro-Oncology*, 7(4), 485-94.
158. Panner, A., James, C.D., Berger, M.S., ve Pieper, R.O. (2005) mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. *Molecular ve Cellular Biology*, 25(20), 8809-23.
159. Hu, X., Pandolfi, P.P., Li, Y., Koutcher, J.A., Rosenblum, M., ve diğerleri. (2005) mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT signaling in glioblastoma. *Neoplasia*, 7(4), 356-68.
160. Wang, H., Wang, H., Zhang, W., Huang, H.J., Liao, W.S., ve Fuller, G.N. (2004) Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Laboratory Investigation*, 84(8), 941-51.
161. Fan, X., Aalto, Y., Sanko, S.G., Knuutila, S., Klatzmann, D., ve Castresana, J.S. (2002) Genetic profile, PTEN mutation and therapeutic role of PTEN in glioblastomas. *International Journal of Oncology*, 21(5), 1141-50.
162. Ermoian, R.P., Furniss, C.S., Lamborn, K.R., Basila, D., Berger, M.S., Gottschalk, A.R., ve diğerleri. (2002) Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. *Clinical Cancer Research*, 8(5), 1100-6.
163. Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Nakamura, H., Hirano, H., Kuratsu, J., ve diğerleri. (2001) Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. *Journal of Neurosurgery*, 95(4), 651-9.
164. Thomas, C., Ely, G., James, C.D., Jenkins, R., Kastan, M., Jedlicka, A., ve diğerleri. (2001) Glioblastoma-related gene mutations and over-expression of

- functional epidermal growth factor receptors in SKMG-3 glioma cells. *Acta Neuropathologica (Berl)*, 101(6), 605-15.
165. Kraus, J.A., Glesmann, N., Beck, M., Krex, D., Klockgether, T., Schackert, G., ve diğerleri. (2000) Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *Journal of Neurooncology*, 48(2), 89-94.
166. Kato, H., Kato, S., Kumabe, T., Sonoda, Y., Yoshimoto, T., Kato, S., ve diğerleri. (2000) Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. *Clinical Cancer Research*, 6(10), 3937-43.
167. Chiariello, E., Roz, L., Albarosa, R., Magnani, I., ve Finocchiaro, G. (1999) Identification of PTEN-related sequences in glioma cells and in non-neoplastic cell lines. *Cancer Letters*, 138(1-2), 1-4.
168. Sano, T., Lin, H., Chen, X., Langford, L.A., Koul, D., Bondy, M.L., ve diğerleri. (1999) Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Research*, 59(8), 1820-4.
169. Zhou, X.P., Li, Y.J., Hoang-Xuan, K., Laurent-Puig, P., Mokhtari, K., Longy, M., ve diğerleri. (1999) Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations. *International Journal of Cancer*, 84(2), 150-4.
170. Steck, P.A., Lin, H., Langford, L.A., Jasser, S.A., Koul, D., Yung, W.K., ve diğerleri. (1999) Functional and molecular analyses of 10q deletions in human gliomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 24(2), 135-43.
171. Chiariello, E., Roz, L., Albarosa, R., Magnani, I., ve Finocchiaro, G. (1998) PTEN/MMAC1 mutations in primary glioblastomas and short-term cultures of malignant gliomas. *Oncogene*, 16(4), 541-5.
172. Malik, R.K., Roe, M.W., Blackshear, P. (1991) Epidermal growth factor and other mitogens induce binding of a protein complex to the c-fos serum response element in human astrocytoma and other cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(13), 8576-8582.

173. Vlotides, G., Cruz-Soto, M., Rubinek, T., Eigler, T., Auernhammer, C.J., ve Melmed, S. (2006) Mechanisms for growth factor-induced pituitary tumor transforming gene-1 expression in pituitary folliculostellate TtT/GF cells. *Molecular Endocrinology*, 20(12), 3321-35.
174. Zhang, Q., Adisheshaiah, P., Kalvakolanu, D.V., ve Reddy, S.P. 2006 () A Phosphatidylinositol 3-kinase-regulated Akt-independent signaling promotes cigarette smoke-induced FRA-1 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 10174-81.
175. Amorino, G.P., ve Parsons, S.J. (2004) Neuroendocrine cells in prostate cancer. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 14(4), 287-300.
176. Chong, M.P., Barritt, G.J., ve Crouch, M.F. (2004) Insulin potentiates EGFR activation and signaling in fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(2), 535-41.
177. Guo, Y.S., Cheng, J.Z., Jin, G.F., Gutkind, J.S., Hellmich, M.R., ve Townsend, C.M. Jr. (2002) Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. Evidence for involvement of ERK5 kinase and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48755-63.
178. Adachi, T., Kar, S., Wang, M., ve Carr, B.I. (2002) Transient and sustained ERK phosphorylation and nuclear translocation in growth control. *Journal of Cellular Physiology*, 192(2), 151-9.
179. Wong, L., Deb, T.B., Thompson, S.A., Wells, A., ve Johnson, G.R. (1999) A differential requirement for the COOH-terminal region of the epidermal growth factor (EGF) receptor in amphiregulin and EGF mitogenic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), 8900-9.
180. Rao, V.N., ve Reddy, E.S. (1993) Elk-1 proteins are phosphoproteins and activators of mitogen-activated protein kinase. *Cancer Research*, 53(15), 3449-54.

181. Uht, R.M., Amos, S., Martin, P.M., Riggan, A.E., ve Hussaini, I.M. (2007) The protein kinase C-eta isoform induces proliferation in glioblastoma cell lines through an ERK/Elk-1 pathway. *Oncogene*, 26(20), 2885-93.
182. Aeder, S.E., Martin, P.M., Soh, J.W., ve Hussaini, I.M. (2004) PKC-eta mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways. *Oncogene*, 23(56), 9062-9.
183. Martin, P.M., Aeder, S.E., Chrestensen, C.A., Sturgill, T.W., ve Hussaini, I.M. (2007) Phorbol 12-myristate 13-acetate and serum synergize to promote rapamycin-insensitive cell proliferation via protein kinase C-eta. *Oncogene*, 26(3), 407-14.
184. Martin, P.M., ve Hussaini, I.M. (2005) PKC eta as a therapeutic target in glioblastoma multiforme. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 9(2) , 299-313.
185. Hussaini, I.M., Carpenter, J.E., Redpath, G.T., Sando, J.J., Shaffrey, M.E., ve Vandenberg, S.R. (2002) Protein kinase C-eta regulates resistance to UV- and gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma cells by preventing caspase-9 activation. *Neuro-Oncology*, 4(1), 9-21.
186. Chaudhary, A., King, W.G., Mattaliano, M.D., Frost, J.A., Diaz, B., Morrison, D.K., ve diğeri. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Current Biology*, 10(9), 551-4.
187. Sun, H., King, A.J., Diaz, H.B., ve Marshall, M.S. 2000 () Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Current Biology*, 10(5), 281-4.
188. King, A.J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S., ve Marshall, M.S. (1998) The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature*, 396(6707), 180-3.
189. Yang, S.H., Jaffray, E., Hay, R.T., ve Sharrocks, A.D. (2003) . Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Molecular Cell*, 12(1), 63–74.

190. Bernstein, J.J., Laws, E.R. Jr., Levine, K.V., Wood, L.R., Tadvalkar ,G., ve Goldberg, W.J. (1991) C6 glioma-astrocytoma cell and fetal astrocyte migration into artificial basement membrane: a permissive substrate for neural tumors but not fetal astrocytes. *Neurosurgery*, 28(5), 652-8.