

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

**NÖROFİBROMATOSİZ TİP 1 (NF1) İLE İLİŞKİLİ  
TÜMÖRLERDE AMİLOİD PREKÜRSÖR PROTEİNİ  
(APP) VE sAPP'NİN ROLÜ VE SCHWANN  
HÜCRELERİNİN BÖLÜNME HIZINA ETKİSİ**

**Dr. Esra SERDAROĞLU**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2009**

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

**NÖROFİBROMATOSİZ TİP 1 (NF1) İLE İLİŞKİLİ  
TÜMÖRLERDE AMİLOİD PREKÜRSÖR PROTEİNİ  
(APP) VE sAPP'NİN ROLÜ VE SCHWANN  
HÜCRELERİNİN BÖLÜNME HIZINA ETKİSİ**

**Dr. Esra SERDAROĞLU**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

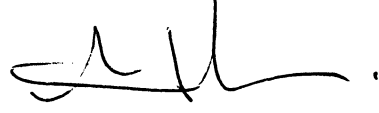
**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Şükriye AYTER**

**ANKARA  
2009**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Şükriye Ayter  
(Danışman) Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Hayat Yurter  
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Figen Söylemezoğlu  
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Ali Varan  
Hacettepe Üniversitesi



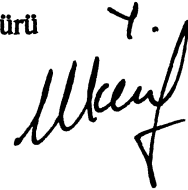
Üye: Yrd. Doç. Dr. Oya Sena Aydos  
Ankara Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'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

Her zaman bilgisi, nezaketi ve deneyimi ile bana yol gösteren tez danışmanım sayın Prof. Dr. Şükriye Ayter'e,

Güler yüzlü katkıları ve yorumları ile beni aydınlatan jüri üyesi hocalarım sayın Prof. Dr. Hayat Yurter, Prof. Dr. Figen Söylemezoğlu, Prof. Dr. Ali Varan ve Yrd. Doç. Dr. Oya Sena Aydos'a,

Doktora eğitimim boyunca desteklerini hissettiğim başta sayın Prof. Dr. Meral Özgüç olmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma,

Doktora tezim süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Gülsev Kale'ye,

Hacettepe'de başlatılan Tıp Doktoru – Bilim Doktoru MD-PhD bütünleşik programının ilk mezunu olarak, bize bu eğitim fırsatının sunulmasında emeği geçen tüm kurucu hocalarıma, MD-PhD koordinatörlerine ve üniversite yöneticilerine,

Doktora eğitimim boyunca her zaman yardımını ve desteğini arkamda hissettiğim; zamanını, emeğini özveriyle MD-PhD öğrencileri için harcayan sayın Doç. Dr. Alev Özön'e,

Eğitimim boyunca destekleyen ve cesaretlendiren, deneyler esnasında ELISA tekniklerini öğrenmeye yardımcı olan sayın Prof. Dr. Can Ömer Kalaycı'ya,

Deney sonuçlarının yorumlanmasında yardımcı olan sayın Doç. Dr. Çetin Kocaefe'ye,

Schwann hücre kültürleri ile olan deneyimlerini benimle paylaşan sayın Prof. Dr. Patrick Wood, Prof. Dr. Eric Legius ve Dr. Hilde Brems'e,

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım, her zaman yardımları ve içtenlikleriyle yanımda olan çalışma arkadaşlarım Ar. Gör. Yunus Kasım Terzi ve Bio. Burcu Şirin'e, Tıbbi Biyoloji Bölümü öğrencileri ve asistanlarına, neşe kaynağım sevgili dostlarıma,

Beni her zaman ve her koşulda destekleyen, hayattaki en önemli şansım olan sevgili aileme içtenlikle ve büyük bir mutlulukla teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir. (H.Ü.B.A.B. 08 D05 101 009)

## ÖZET

**Serdaroğlu, E. Nörofibromatozis tip 1 (NF1) ile ilişkili tümörlerde Amiloid Prekürsör Proteini ve sAPP'nin rolü ve Schwann hücrelerinin bölünme hızına etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2009.** NF1 (Nörofibromatozis tip 1) yaygın görülen otozomal dominant bir hastalıktır. Hastalığın karakteristik bulgularından olan nörofibromlar cilt, ciltaltı ve pleksiform olmak üzere çeşitli tiplere sahiptir. İyi huylu olan nörofibromlar kaşıntı, ağrı ve estetik şikayetler yanında kötü huylu tümörlere dönüşebilme özelliğine sahiptirler. Nörofibromlar heterojen kitlelerdir, ancak tümörjenik yapıdan Nf1-/- Schwann hücreleri sorumlu tutulmaktadır. Nf1 gen ürünü nörofibrominin yokluğu Ras yolağının hiperaktivasyonuna neden olduğu için tümör oluşturduğu düşünülmektedir. Ancak son literatür bilgileri ışığı altında APP'nin (Amiloid Prekürsör Proteini) de tümör oluşumunda rol oynadığı belli tümörler için gösterilmiştir. APP ekspresyonu Ras yolağı tarafından pozitif kontrol edilmektedir. APP sentez sonrası membrana yerleşmekte ve  $\alpha$  sekretazlar aracılığı ile kesime uğrayarak hücre dışında sAPP $\alpha$ 'yı oluşturmaktadır. sAPP $\alpha$  da bir büyüme faktörü gibi davranmakta ve Ras yolağını uyarmaktadır. NF1 tümörlerinde Ras yolağı zaten hiperaktiftir, APP ve sAPP'nin de fazla olması beklendiğinden tümör gelişiminde etkin olma olasılığı diğer tümörlerden daha yüksektir. Ayrıca, APP'nin etkileştiği moleküller arasında nörofibrominin de bulunduğu melanosit hücrelerinde deneysel olarak gösterilmiştir. sAPP $\alpha$ 'nın, farklı kanser tipleriyle olan ilişkisi ve bazı hücre hatlarında Ras yolağını uyarıcı etkisinin bulunması sebebiyle, bu proje kapsamında NF1 tümörlerindeki rolünü göstermek üzere çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nörofibromatozis tip 1 (NF1), nörofibromin, Ras, APP, sAPP $\alpha$

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje no: 08 D05 101 009) tarafından desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Serdaroğlu, E. The effect of Amyloid Precursor Protein ( APP ) and sAPP expression on the proliferation of Schwann cells in NF1 related tumors. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2009.** NF1 (Neurofibromatosis type 1) is a common autosomal dominant disorder. Neurofibromas, characteristic features of the disease, have cutaneous, subcutaneous and plexiform types. Neurofibromas are benign, but cause pain, pruritus, aesthetical problems and besides could develop malignancy. Neurofibromas are heterogenous according to cell types, but it is known that Nf1 -/- Schwann cells are responsible for tumorigenic progression. Absence of NF1 gene product neurofibromin, results in hyperactivation of ras pathway, which is thought to cause tumor formation. In recent studies APP (amyloid precursor protein) is shown to play a role in various types of tumors. Ras pathway positively regulates APP expression. After synthesis, APP locates to the cell membrane where it is cleaved by  $\alpha$  secretases to yield an extracellular peptide called sAPP $\alpha$ . sAPP $\alpha$  functions like a growth factor and induces Ras pathway. In NF1 tumors Ras pathway is already activated, so it is expected that APP and sAPP $\alpha$  levels are also elevated and they may have an even more important role in NF1 tumors than other types of malignancies. Also, in melanocytes neurofibromin was shown to be one of the proteins interacting with APP. Due to the fact that sAPP $\alpha$  is involved in different types of tumors and found to activate Ras pathway in various cell lines, in this project the role of sAPP in NF1 related tumors was studied.

**Key Words:** Neurofibromatosis type 1 (NF1), neurofibromin, Ras, APP, sAPP $\alpha$

Supported by Hacettepe University Research Fund (Project no: 08 D05 101 009)

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nörofibromatozis tip 1	3
2.2. NF1 geni ve protein ürünü nörofibromin	3
2.3. NF1 hastalığının tanı kriterleri	5
2.4. Nörofibromların klinik ve patolojik özellikleri	7
2.5. Nörofibromlarda Schwann hücrelerinin rolü	9
2.6. Nörofibrominin APP ile etkileşimi	11
2.7. APP	12
2.8. APP'nin işlenmesi	13
2.9. APP'nin görevleri	14
2.10. sAPP	15
2.11. APP ve kesim ürünü sAPP'nin Ras yolağıyla ilişkisi	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzeme ve solüsyonlar	18
3.1.A. Hücre Kültürü	18
3.1.B. İmmünfloresan Boyama	19
3.1.C. Bölünme Deneyi	19
3.1.D. Hücreden RNA izolasyonu	20
3.1.E. cDNA Sentezi	20
3.1.F. Kantitatif RT-PCR	20

3.1.G. Yarı-kantitatif RT-PCR	20
3.1.H. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	21
3.1.I. Protein izolasyonu	21
3.1.J. Protein miktar tayini	22
3.1.K. Ras aktivite düzeyi testi	22
3.1.L. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	22
3.1.M. Western Blot	23
3.2. Yöntemler	24
3.2.A. NF1 + / - ve NF1 - / - Schwann hücre kültürü kurulması	24
3.2.B. Normal Schwann hücre kültürünün elde edilmesi	25
3.2.C. Kültür kaplarının kaplanması	25
3.2.D. Pasajlama	26
3.2.E. Mikoplazma Testi	27
3.2.F. İmmün boyama	27
3.2.G. Bölünme deney protokolü	28
3.2.H. RNA izolasyonu	30
3.2.I. cDNA sentezi	31
3.2.J. RT-PCR	31
3.2.K. ELISA	33
3.2.L. Protein izolasyonu	34
3.2.M. BCA ( <i>Bicinchoninic acid</i> ) Protein miktar tayini	34
3.2.N. Ras aktivitesi	35
3.2.O. SDS jel	36
3.2.P. Western blot	36
4. BULGULAR	38
4.1. Schwann hücre kültürünün kurulması	38
4.2. Hücrelerin bölünme hızlarının karşılaştırılması	44
4.3. Hücrelerin APP ifade düzeylerinin karşılaştırılması	48
4.4. Hücrelerin ortamlarına salgıladıkları sAPP alfa peptidi düzeylerinin karşılaştırılması	50
4.5. Hücrelere sAPP bloke eden monoklonal antikor uygulanmasının hücre bölünme hızına etkisi	52

4.6. Hücrelerin Ras aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması ve APP bloke edici antikor uygulanmasının Ras aktivitesi düzeyleri üzerindeki etkisi	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	63

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A4/22C11 antikoru	sAPP bloke eden monoklonal antikör
AICD	<i>APP intracellular domain</i>
APP	<i>Amyloid beta A4 protein precursor</i>
APPL	<i>APP-like</i>
APS	Amonyum Persülfat
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	Bovine serum albumin
CLS	<i>cafe au lait</i> lekeleri
CTF	<i>carboxy terminal fragment</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DEPC	Dietil pirokarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EIA	<i>enzyme immunoassay</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (enzim ilintili immün test)
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EVI 2A-2B	<i>ecotropic viral integration site</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fütal dana serumu
GRD	GAP ile ilgili bölge
Grb2	<i>growth factor receptor 2</i>
GAP	guanozin trifosfat az aktive eden protein
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HRP	<i>Horseradish</i> Peroksidaz
Ht	Nf1 +/- Schwann hücresi, heterozigot
IBMX	3-izobütül-1-metilksantin
KO	Nf1 -/- Schwann hücresi, homozigot mutant, <i>knockout</i>
KPI	Kunitz tipi serin proteaz inhibitör bölgesi

MAP kinaz	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MPNST	Malin periferik sinir kılıfı tümörleri
NF1	Nörofibromatozis tip 1 hastalığı
Nf1	NF1 geni
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NKI-beteb	melanozom boyası
OMGP	<i>oligodendrocytemyelin glycoprotein</i>
P/S	penisilin/streptomisin
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC12 hücreleri	feokromositoma hücre hattı
PKC	protein kinaz C
RBD bölgesi	Ras binding domain, aktif Ras proteinini tanıyan bölge
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
sAPP $\alpha$ (alfa)	<i>secretory N-terminal ectodomain of APP alpha</i>
sAPP $\beta$ (beta)	<i>secretory N-terminal ectodomain of APP beta</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH2	<i>Src homology 2</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>
TMB	<i>Tetra Methyl Benzidine</i>
WT	wild type, normal genotipli Schwann hücresi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
2.1. Ras sinyal yolağının uyardığı alt basamaklar	5
2.2. Normal sinir kılıfı ile nörofibromun karşılaştırılması	7
2.3. Nf1 -/- Schwann hücrelerinin aşırı bölünmesinin nörofibrom oluşumuna sebep olması	10
2.4. Nörofibrom oluşumu	10
2.5. APP'nin işlenmesi	14
3.1. Ras/Raf/MEK/ERK yolağı.	35
4.1. S100 ve DAPI ile Schwann hücrelerinin immün boyaması (100x büyütme)	40
4.2. S100 ve DAPI ile Schwann hücrelerinin immün boyaması (40x büyütme)	40
4.3. Normal genotipe sahip Schwann hücrelerinin (WT) kültür ortamındaki faz mikroskopi görüntüsü	41
4.4. Nf1 +/- Schwann hücrelerinin (heterozigot) kültür ortamındaki faz mikroskopi görüntüsü	42
4.5. Nf1 -/- Schwann hücrelerinin (KO) kültür ortamındaki faz mikroskopi görüntüsü	43
4.6. <i>CyQuant NF</i> Bölünme Deney kiti kullanılarak hesaplanan standart eğri çizimi 45	
4.7. Hücre sayısının zamana bağlı değişimi-1	47
4.8. Hücre sayısının zamana bağlı değişimi-2	47
4.9. Normal Schwann hücrelerinin APP ifadesi	49
4.10. NF1 -/- Schwann hücrelerinin APP ifadesi	49
4.11. sAPP $\alpha$ ELISA deney kiti için standart eğri çizimi	51
4.12. Ortamdaki sAPP alfa salgı miktarının karşılaştırılması	52
4.13. sAPP bloke eden antikor eklenen ortamda inkübe edilen hücrelerin <i>CyQuant NF</i> Bölünme Deney kiti ile ölçülen hücre sayılarının grafik olarak incelenmesi	53
4.14. Normal ve Nf1 -/- Schwann hücrelerinin normal ve antikor içeren ortamlarda aktif Ras düzeyi	54

**TABLolar DİZİNİ****Sayfa**

3.1. Bölünme eğrisi standardizasyonu için kullanılan kültür kabının şematizasyonu	29
3.2. Protein konsantrasyonu ölçümü için kullanılan standart eğri örnekleri	34
4.1. <i>CyQuant NF</i> Bölünme Deney kiti kullanılarak yapılan hücre sayımı deneyinde standart eğri çizimi için kullanılan hücre sayıları, elde edilen ortalama floresan şiddeti ve hesaplanan standart sapma değerleri	45
4.2. <i>CyQuant NF</i> Bölünme Deney kiti kullanılarak yapılan bölünme deneyi sonuçları	46
4.3. Scion Image programında ifade düzeylerini gösteren bantların yoğunluklarına göre değerlendirilmesi	50
4.4. sAPP $\alpha$ ELISA deney kiti sonuçları	51
4.5. sAPP bloke edici antikor eklenen ortamda inkübasyon sonrası <i>CyQuant NF</i> Bölünme Deney kiti ile ölçülen hücre sayıları	53

## 1. GİRİŞ

Nörofibromatozis tip 1 (NF1, von Recklinghausen hastalığı) kalıtsal kanser sendromu ve nörokutan hastalıklar arasında sayılan ve 1/3000 görülme sıklığı ile yaygın görülen bir hastalıktır (1). Otozomal dominant kalıtım gösterir. Nf1 geni, 17. kromozomun 17q11.2 bölgesinde bulunan insan genomundaki en büyük genlerden biridir. Bu gendeki mutasyonlar NF1 hastalığına yol açar. Nf1 geninin ifadesi vücutta yaygın olarak görülmekle birlikte özellikle sinir sisteminde düzeyi yüksektir. Nf1 geninden sitoplazmik protein “nörofibromin” kodlanır. Nörofibrominin ekzon 21-27a’yı kapsayan bölgesi, Ras-GTP’yi Ras-GDP’ye çevirerek inaktivasyon yapar.

Nörofibrominin kaybı hücrede mitojenik Ras sinyal yolağının devamlı aktivasyonu ve hücre proliferasyonuna yol açar. Nf1 geni, Ras ile etkileşimi nedeni ile tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılır. NF1 ile ilişkili tümörlerde Ras-GTP düzeyinin ve Ras yolağı sinyalinin arttığı gösterilmiştir. Ras yolağı, hücre proliferasyonu, farklılaşma, sağ kalım ve apoptozis gibi hücrenin biyolojik fonksiyonlarını düzenler (2).

NF1, periferik sinir sistemini tutar. Hastalığın karakteristik bulgularından biri nörofibrom oluşumudur. Nörofibromlar periferik sinirdeki hücreleri içeren kompleks tümörlerdir. Nörofibromda Schwann hücreleri, fibroblastlar, perinöral hücreler ve mast hücreleri bulunur. Nörofibrom oluşumu esnasında bir grup Schwann hücresinde Nf1 kaybı (Nf1 -/- Schwann hücresi) (LOH, loss of heterozygosity) gerçekleşmesi tümöre yol açmaktadır. Nf1 -/- Schwann hücreleri çevredeki Nf1 +/- hücrelerden gelen uyarılarla aşırı bölünmeye itilir ve periferik sinir kılıfındaki mikroçevrenin etkisiyle tümör karakteri gösterirler (3).

Tez çalışmamızda nörofibrom oluşumunda Amiloid prekürsör proteininin (APP) Schwann hücrelerinin bölünme hızına etkisi araştırılmıştır. 21. kromozomda yer alan APP geninin ifadesi vücutta yaygın olarak görülmekle birlikte özellikle merkezi sinir sistemi hücrelerinde ifade düzeyi yüksektir. Ayrıca tiroid gibi çeşitli organların epitel hücrelerinde ve epidermiste ifade edildiği bilinmektedir. APP’nin

insan Schwann hücrelerinde ifadesi ve işlenmesi ile ilgili bir literatür bilgisi bulunmamaktadır.

APP, hücrelerde amiloid üreten ve üretmeyen iki farklı yolak ile kesilip işlenebilir. APP normal koşullar altında izlediği amiloid üretmeyen yolda alfa sekretaz tarafından kesilerek salgılanan sAPP $\alpha$  (secretory N-terminal ectodomain of APP alpha) peptidini oluşturur (4). sAPP $\alpha$  nöroprotektif bir ajandır, keratinositlerin ve tiroid hücrelerinin büyümesi ile ilişkilendirilmiştir. APP ifadesi nöronal hücre bölünmesi, malinleşmesi ve kolorektal kanser hücrelerinin çoğalmasına neden olur. APP ve sAPP $\alpha$ 'nın bölünme üzerindeki etkilerinin Ras yolağı aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (5-9).

Tezimizde, Ras yolağının hiperaktivitesinin yol açtığı bir hastalık olan NF1, APP ve Ras yolağı arasındaki ilişkinin anlaşılması için model olarak seçilmiştir. Nörofibromdan izole edilen NF1 +/- ve NF1 -/- Schwann hücreleri, kontrol normal genotipli Schwann hücrelerle karşılaştırılmıştır. İnsan Schwann hücrelerinde APP ifadesi, kesim ürünü sAPP $\alpha$  salgısı ve bölünme üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuçlar nörofibrom oluşumu açısından değerlendirilmiş ve nörofibrom tedavisi için bir hedef molekül olarak APP'nin önemli olduğu öne sürülmüştür.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nörofibromatozis tip 1

Nörofibromatozis tip 1 (NF1), diğer adıyla von Recklinghausen hastalığı kalıtsal kanser sendromu grubunda yer alan ve başta sinir sistemi olmak üzere diğer organ ve sistemleri de etkileyebilen otozomal dominant bir hastalıktır. Görülme sıklığı 1/3000'dir (1,10). Hastalığın penetransı tam, ekspresyonu değişkendir. Klinik bulgular bir hastadan diğerine, aileden aileye, hatta aynı aile içinde bireyler arasında bile farklılık gösterebilir (11). NF1 hastası olan tek yumurta ikizleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, klinik tablonun açığa çıkmasında kişinin genetik özelliklerinin ve modifiye edici genlerin etkisinin olduğu ortaya konmuştur (12).

### 2.2. Nf1 geni ve protein ürünü nörofibromin

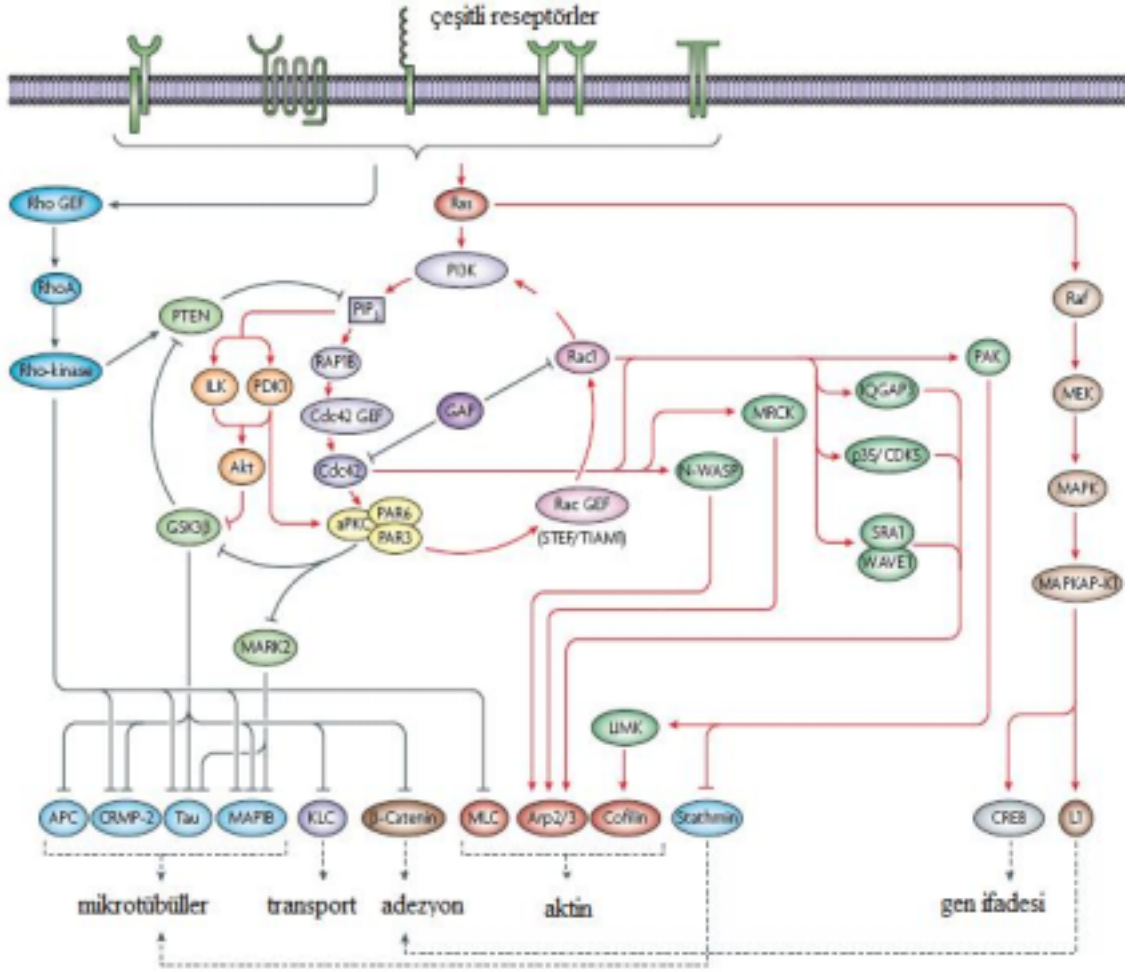
NF1 17. kromozomun 17q11.2 bölgesinde Nf1 genindeki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar. Nf1 geni 350 kilobaz uzunluğunda insan genomundaki en büyük genlerden biridir. 11-13 kilobazlık 60 ekzon içeren mRNA kodlar. 8457 bp uzunluğunda bir okuma çerçevesi olan Nf1 geni yaklaşık 327 – 350 kDa ağırlığında ve 2818 amino asit uzunluğunda olan nörofibromin kodlar. Ekzonlarının bir kısmı (9a, 10a-2, 23a, 48a gibi) alternatif „splicing“ sonucu oluşur (13). Bu ekzonlar okuma çerçevesinin kaymasına neden olmaz, ancak nörofibrominin izoformlarının oluşumunda rol oynar.

Nf1 geni evrim boyunca çok korunmuştur. İnsan ve fare arasında %98, insan ve drozofila arasında % 68 benzerlik mevcuttur, bu da hücre için önemli bir protein kodladığına işaret eder. İntron 27b içinde üç tane fonksiyonel gen bulunur. EVI2A, EVI2B (ecotropic viral integration site) ve OMGP (oligodendrocyte myelin glycoprotein) isimli bu genler Nf1 geninin tersi yönünde transkribe olur. OMGP, insan merkezi sinir sisteminde myelin oluşumu esnasında ifade edilir. Hücre adezyon molekülü olarak çalışır. İn vitro olarak fibroblastlar için inhibitör olduğu ve nöron proliferasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (14,15). OMGP'nin komşuluğunda bulunan

EVI2A ve EVI2B, murin Evi-2A ve Evi-2B'nin homologudur. NF1 hastalarında görülebilen lösemilerle ilişkili olabilecekleri öne sürülmektedir (11). Nf1 geninde intron 39 içinde AK3 (adenilat kinaz 3) adlı bir de "pseudogen" bulunur ve Nf1 ile aynı yönde ifade olur.

Nf1 geninin ifadesi vücutta yaygın olarak görülmekle birlikte özellikle sinir sisteminde düzeyi yüksektir. Nf1 geninden sitoplazmik protein "nörofibromin" kodlanır. Nörofibromin 2818 amino asitten oluşan 327 kilodalton moleküler ağırlıkta bir proteindir. Nf1 geninde meydana gelen alternatif "splicing" ile nörofibromin izoformları oluşur. Bu izoformlar NF1 klinik tablosunun çeşitliliği ve gelişimsel basamaklar ile ilişkilidir (16).

Nörofibrominin ekzon 21-27a'yı kapsayan bölgesi, guanozin trifosfataz aktive eden proteinlerin (GAP) katalitik bölgesiyle homoloji gösterir. Ekzon 21-27a bölgesi GAP ile ilgili bölge (GRD) olarak adlandırılır. GRD, Nf1 geninin fonksiyonu net olarak tanımlanan tek bölgesidir. Nörofibromin GRD bölgesiyle Ras-GTP'yi Ras-GDP'ye çevirerek inaktivasyon yapar. Nörofibrominin kaybı hücrede mitojenik Ras sinyal yolağının devamlı aktivasyonu ve hücre proliferasyonuna yol açar. Ras ile etkileşimi nedeni ile tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılır. NF1 ile ilişkili tümörlerde Ras-GTP düzeyinin ve Ras yolağı sinyalinin arttığı gösterilmiştir (17). Ras proteini; Raf/MEK/ERK ve PI3K/Akt yolaklarını kontrol eder. Bu yolaklar hücre proliferasyonu, farklılaşma, sağkalım ve apoptozis gibi hücrenin biyolojik fonksiyonlarını düzenler (2). Ras sinyalinin aşırı uyarılması durdurulamayan bölünme, invazyon, metastaz ve apoptozun engellenmesine yol açar.



Şekil 2.1. Ras sinyal yolağının uyardığı alt basamaklar (18).

### 2.3. NF1 hastalığının tanı kriterleri

NF1, periferik sinir sistemini tutar, belirtilerin sıklıkla ciltte gözlenmesinden dolayı nörokutan bir hastalık olarak anılır. Birçok hastada belirtiler orta şiddettedir ve hastanın normal yaşamını sürdürmesine olanak verir. Temel bulguları, ciltte “café au lait” lekeleri (CLS) adı verilen açık kahverengi lekeler, nörofibromlar, “Lisch nodülü” (iris hamartomları), aksiller ve inguinal çillenme, zeka geriliği ve öğrenme bozukluğu gibi bilişsel problemler, hipertansiyon ve konjenital kalp bozuklukları gibi kardiyovasküler sistemi tutan bulgular, skolyoz gibi iskelet deformiteleri, boy kısalığı ve makrosefali gibi gelişimsel problemler ve tümör gelişimine yatkınlıktır.

NF1 hastalarında >%99 oranında gözlenen iki bulgu vardır. Bu bulgular, CLS ve kütanöz nörofibromlardır (10). CLS adı verilen açık kahverengi lekeler vücudun farklı bölgelerinde yer alabilir, çeşitli boyutlarda olabilir. CLS ve aksiler veya inguinal bölgede görülen çillenmelerin sebebi melanosit sayısındaki artış değil, melanin pigmentinin melanozom halinde fagolizozomlarda aşırı birikmesidir. Bu lizozomlar sadece melanositlerin içinde değil aynı zamanda keratinositlerde, Langerhans hücrelerinde ve makrofajlarda da görülebilir. Nörofibromlar periferik sinirde oluşan iyi huylu tümörlerdir. Nörofibromlarda yoğun olarak Schwann hücreleri bulunur, ayrıca fibroblastlar, mast hücreleri, perinöral hücreler de nörofibromlarda yer alır. Nörofibromların sayısı bazı hastalarda yüzlerce olabilir. Bu karakteristik özellikler aynı zamanda tanı kriterleri arasında da yer alır (Tablo 2.1).

**Tablo2.1.** NF1 klinik tanı kriterleri. 2 veya daha fazla kriterin varlığı tanı koydurucudur (19) .

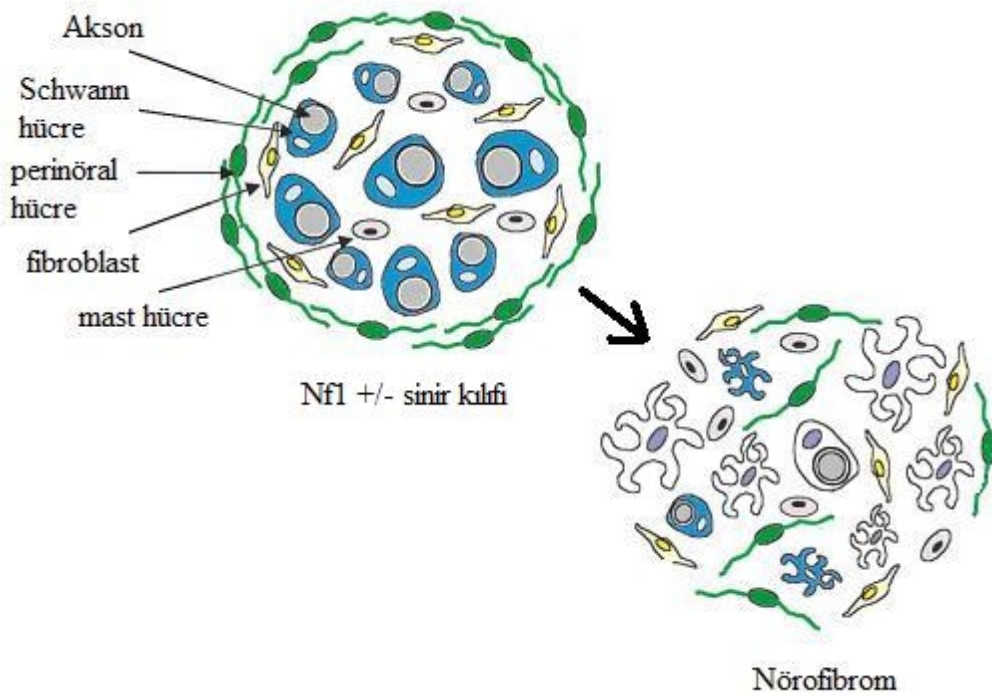
#### **NF1 klinik tanı kriterleri**

(NIH consensus development conference 1988)

- 6 veya daha fazla cafe au lait lekesi
  - Çocuklarda çapı >0.5 cm
  - Erişkinlerde çapı >1.5 cm
- 2 veya daha fazla sayıda kütanöz/subkütan nörofibrom ya da 1 tane pleksiform nörofibrom
  - Aksiler veya inguinal çillenme
  - Optik gliom
  - 2 veya daha fazla Lisch nodülü (iris hamartomu)
  - Kemik lezyonları
    - Sfenoid kemik displazisi
    - Uzun kemiklerde deformiteler +/- psödoartroz
  - NF1 tanısı almış birinci derece akraba

## 2.4. Nörofibromların klinik ve patolojik özellikleri

Nörofibromlar periferik sinirdeki hücreleri içeren kompleks tümörlerdir. Hastalarda klinik ve estetik sorunlara yol açan nörofibromlar, periferik sinir kılıfının iyi huylu tümörleridir. Bu tümörler, kutanöz, subkutan ve pleksiform olarak sınıflandırılır.



**Şekil 2.2.** Normal sinir kılıfı ile nörofibromun karşılaştırılması (20,21). Nörofibromlar, periferik sinir kılıfında bulunan hücre çeşitlerini ve Nf1 -/- Schwann hücreleri içerir. Nörofibromdaki Schwann hücreleri sinir kılıfından farklı olarak aksonlardan ayrılmıştır.

NF1 hastalarının >%99'unda kutanöz nörofibromlara rastlanır ve hastalığın temel karakteristik bulgularından biridir. Genellikle ergenlik çağında gelişir. Nörofibromların sayısı aileler ve hastalar arasında farklılık gösterir (22,23). Bu tümörlerin malin transformasyona uğradığına dair bir bulguya rastlanmamıştır. Fakat hastanın yaşam kalitesini bozduğu durumlarda (batma, kaşıntı ve yerleşimi

nedeniyle) cerrahi olarak çıkarılabilirler. Cerrahi sonrası hipertrofik skar gelişimi ve nörofibromun tekrarlama riski vardır.

Subkutan nörofibromlar palpasyonla hissedilebilir, etkilenen sinirde hassasiyet veya ağrı yaratabilir (23). Nadiren malin dönüşüm görülür. Cerrahi müdahalede bulunulması nörolojik sorunlara yol açabilir.

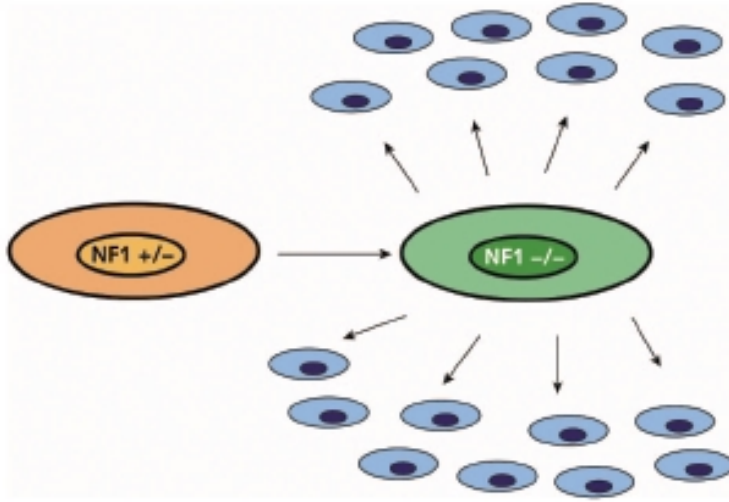
Pleksiform nörofibromlar diffüzdür, sinir boyunca büyürler, birden çok sinir dalı ve pleksusu kaplayabilirler (23). Çevre yumuşak dokulara yayılabilir ve kemik hipertrofisine yol açabilir. Üzerindeki deride geniş pigmentasyon bulunabilir. Büyüme hızı öngörülemez, özellikle ergenlikte ve hamilelikte hızlı büyüme gösterir. Fasiyal pleksiform nörofibromlar hayatın ilk 3 yaşında gelişerek görünüm bozukluklarına yol açar (22). Pleksiform nörofibromlar sinire ve çevre dokulara sıkı yapışıklık gösterdiği ve aşırı damarlandığı için cerrahi olarak çıkarılmaları çok zordur. Özellikle fasiyal pleksiform nörofibromların çıkarılmasında hayatı tehdit edici kanamalar meydana gelebilir. Kutanöz ve subkutan nörofibromların aksine, pleksiform nörofibromlar büyüme ve malin forma dönüşme potansiyeline sahiptir.

NF1 hastalarında yaşam boyu %8-13 oranında malin periferik sinir kılıfı tümörleri (MPNST) görülme riski vardır. Genellikle 20-35 yaş arasında gelişir (24). Bu kanserlerin tanısı zordur, yaygın metastaz ve kötü prognoz gösterir (25). MPNST genellikle pleksiform nörofibromlardan köken alır. İnsan tümörleri ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, MPNST oluşumunda NF1 kaybının yanı sıra p53 gibi başka bir tümör baskılayıcı genin kaybı da gösterilmiştir (26-29). Ayrıca tümör baskılayıcı özellikte iki gen olan p16/Ink4a ve p14ARF genlerini kodlayan Ink4a lokusundaki mutasyonlar da insan MPNST örneklerinde gösterilmiştir (30-32). p16/Ink4a; hücre döngüsünün negatif düzenleyicisi olarak, p14ARF ise p53 aktivatörü olarak çalıştıklarından MPNST'deki malin dönüşüme katkıda bulunurlar (33). Bunların dışında bu tümörlerde, Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) amplifikasyonu ya da aşırı ifadesinin de etkisi olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (34).

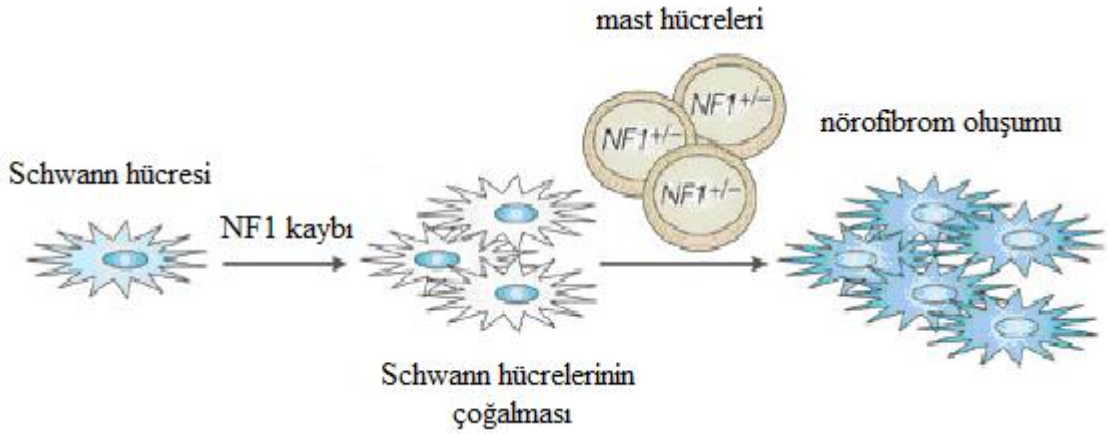
## 2.5. Nörofibromlarda Schwann hücrelerinin rolü

Nörofibromda Schwann hücreleri, fibroblastlar, perinöral hücreler ve mast hücreleri bulunur. Nörofibrom oluşumu hakkındaki temel soru hangi hücre ya da hücrelerdeki Nf1 kaybının (LOH, loss of heterozygosity) tümöre yol açtığıdır. Nörofibromlardan yapılan hücre kültürü çalışmalarında Schwann hücrelerinde Nf1 eksikliği gösterilmiştir (35,36). Nf1 +/- fareler spontan olarak nörofibrom veya MPNST geliştirmemektedir. Fakat Cichowski ve grubu, Nf1 -/- hücrelerle kimerik olan Nf1 +/- farelerde çok sayıda pleksiform nörofibrom oluştuğunu göstermiştir. Nörofibromlar da büyük ölçüde Nf1 -/- Schwann hücrelerinden oluşmaktadır (26). Bu farelerdeki tümör sayısı kimerizm oranına bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışma sonucunda, Nf1 +/- farelerde nörofibrom gelişimi için wild-type Nf1 allelinin kaybının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışma farelerde nörofibrom modeli kuran ilk çalışma olmakla birlikte, nörofibrom oluşturan asıl hücrenin kökenini açıklayamamıştır. Ayrıca bu fareler hastalığın karakteristik özelliklerinden biri olan kutanöz nörofibromları da oluşturmamıştır.

Schwann hücrelerindeki Nf1 eksikliğinin nörofibrom oluşturduğu hipotezini test etmek için Zhu ve grubu kondisyonel Nf1-mutant allel içeren farelerle çalıştı (3,37). Bu fareler Cre rekombinazı sadece periferik sinir sistemi Schwann hücrelerinde ifade eden transgenik Krox20-Cre farelerle çiftleştirildiler (38,39). Bu şekilde, Cre-aracılı rekombinasyonla sadece Schwann hücrelerinde Nf1 inaktivasyonu gerçekleştirildi (3). Araştırmacılar, Schwann hücrelerinde nörofibromin kaybı (Nf1 -/-) ve Schwann hücre dışındaki hücrelerde Nf1 heterozigotluğu (Nf1 +/-) görüldüğü durumda tümöral gelişimin olduğunu saptadılar. Bu çalışma sonucunda Schwann hücrelerinin nörofibrom oluşturan temel hücreler olduğu ve Schwann hücrelerinde Nf1 inaktivasyonunun yalnızca çevredeki hücrelerin Nf1 +/- olduğu durumda nörofibrom oluşturduğu gösterildi.



**Şekil 2.3.** Nf1 -/- Schwann hücrelerinin aşırı bölünmesinin nörofibrom oluşumuna sebep olması (40).



**Şekil 2.4.** Nörofibrom oluşumu. Nörofibrom oluşumunun nedeni Schwann hücrelerindeki Nf1 kaybıdır. Schwann hücrelerinin bölünme artışı çevredeki Nf1 +/- hücrelerin salgıları da rol oynar (41).

Schwann hücreleri periferik sinir kılıfındaki mikroçevrenin etkisiyle tümör karakteri gösterirler. İkinci alleli de inaktive olan Schwann hücreleri, çevredeki Nf1 +/- hücrelerden gelen uyarılarla aşırı bölünmeye itilir. Nf1 +/- mast hücrelerinin aşırı çoğaldığına işaret eden çalışmalar nörofibromda rastlanılan bu hücre tipine dikkat çekmiştir. Nf1 -/- Schwann hücrelerinin „kit ligand“ salarak heterozigot mast hücrelerini periferik sinir kılıfına çektiği ve bu mast hücrelerinin salgılarının tümör

oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Mikroçevre kapsamında mast hücre salgıları ve çeşitli hücre dışı matriks moleküllerinin tümör gelişimine etkisi de yoğun olarak çalışılan bir konudur (42,43).

## 2.6. Nörofibrominin APP ile etkileşimi

2006 yılında De Schepper ve grubu tarafından yayınlanan araştırmada Gal-4-bazlı maya-iki-hibrid vektör sistemi kullanılarak nörofibrominin GRD bölgesi; beyin cDNA kütüphanesine karşı tarandı. Taramanın ardından yapılan seçim deneyleri sonucunda belirlenen etkileşimlerden birinin APP (Amyloid precursor protein) ile olduğu gösterildi (44).

APP'nin beyinde aksonal iletimde rol alması ve melanozom iletimi ve melanin salınımında rol oynadığının düşünülmesi, APP ile etkileşimin önemli bir görevi olabileceği fikrini doğurdu. NF1 hastalarında hem lezyonlu hem de lezyonsuz deride melanosit yoğunluğu yüksektir ve melanositlerde makromelanozomlar gözlenir. Epidermiste APP'nin ifade edildiği ve özellikle de melanositlerde yüksek olduğu bilinmektedir. İnsan melanositlerindeki durumun gözlenmesi amacıyla total melanosit hücre lizatları nörofibromin antikoru ile immünçöktürmeye uğratıldı, nörofibromin ile birlikte çöken proteinlere APP antikoruyla western blot uygulandı. Böylece nörofibromin ile APP'nin birlikteliği gösterildi. Aynı deney sistemi, APP ile çöken proteinlere nörofibromin antikoru ile western blot yapılarak doğrulandı. Primer insan epidermal melanosit kültürlerinde RNA ve protein düzeyinde iki genin ürünleri de tespit edildi. İmmünfloresan boyama yapılarak, melanozom spesifik glikoproteinleri boyadığı için melanozom belirteci olarak kullanılan NKI-beteb'in hem APP hem NF1 ile kolokalize olduğu gösterilmiştir. Nf1 +/- primer insan epidermal melanosit kültürlerinde immünfloresan boyamalar ve "immunogold transmission" elektron mikroskopi ile yapılan incelemeler sonucunda Nf1 +/- durumda melanozom ile APP kolokalizasyonunun da bozulduğu görülmüştür (44).

Hem nörofibromin hem de APP'nin hücre iskeleti elemanlarından kinesin-1 ile ilişki kurduğu bilinmektedir. Herzog ve grubunun 2004 yılında yaptıkları bir

çalışmada melanozomların dendritlere kinesin aracılı mikrotübüler taşınımında APP'nin rol oynadığı gösterilmiştir (45).

De Schepper ve grubu gösterdikleri APP ve nörofibromin birlikteliğinin, melanozom komplekslerinin oluşumunda ve veziküler trafikte rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (44). Diwakar ise melanozom membranında nörofibrominin gösterilmesinin Ras yolağının buradan düzenlenip düzenlenmediği açısından incelenmesi gerektiğini vurgulamıştır (46). Ayrıca, NF1 hastalarında melanositlerin parakrin büyüme faktörlerine aşırı cevabının, melanozomda APP ve nörofibrominin görülmemesi sonucu ortaya çıkabileceğini ileri sürmüşlerdir.

NF1 hastalarında görülen öğrenme güçlüğü fare modellerinde çalışılmış ve Ras hiperaktivitesi ve artmış GABA (gama-amino-bütirik asit) aracılı inhibisyonla ilişkilendirilmiştir. Hippokampal nöronlarda yapılan bir çalışmada, nörofibrominin APP ile bir kompleks oluşturup filamin proteinleri aracılığıyla dopamin reseptörüyle (Drd3) iletişim kurduğu "in silico" olarak gösterilmiştir. APP proteinin nörofibrominle olan bu ilişkisi NF1 hastalarındaki öğrenme güçlüğüne açıklanmasına da ışık tutacaktır (47).

## 2.7. APP

Amiloid prekürsör proteini (APP), ilk olarak Alzheimer hastalığının karakteristik bulgularından biri olan senil plakların oluşumundaki rolü ile tanımlandı. Senil plaklarda bulunan beta amiloid 40-42 aminoasit uzunluğunda 4 kDa ağırlığında bir peptit olup APP isimli proteinin işlenmesi sonucu oluşur. 21. kromozomda yer alan APP geninin ifadesi Alzheimer oluşumunda etkilidir. Down sendromlu hastalarda Alzheimer benzeri bir patoloji görülmesi APP geninin trizomi 21 ilişkili duplikasyonu ile açıklanmıştır (48).

APP, tip-1 transmembran glikoprotein olup büyük bir hücre dışı bölge, hidrofobik transmembran bölge ve kısa bir sitoplazmik kuyruktan oluşur. Vücutta yaygın olarak ifade edilmekle birlikte özellikle merkezi sinir sistemi hücrelerinde

ifade düzeyi yüksektir. Ayrıca tiroid gibi çeşitli organların epitel hücrelerinde ve epidermiste ifade edildiği bilinmektedir.

Memelilerde APP protein ailesinin 3 üyesi bulunmaktadır: APP ve iki adet APP benzeri protein; APLP1 ve APLP2. APLP1 yalnızca beyin dokusunda ifade edilir. Başka canlılarda da APP homologları gösterilmiştir. *Caenorhabditis elegans*'ta APL1 (APP-like-1), *Drosophila*'da APPL (APP-like) ve *Xenopus*'ta homolog proteinler bulunur (49-51). Bu proteinler arasında fizyolojik bir benzerlik de olduğu APPL-null *drosophilalarda* davranışsal fenotipin insan APP'si ile düzeltilmesi sayesinde gösterildi.

APP, 21q21.3'te yerleşiktir ve ifadesi farklı hücrelerde forbol esterleri, tiroid hormonları, retinoik asit gibi çeşitli uyarılardan etkilenir. 19 ekzonu vardır. Ekzon 7 ve 8 alternatif "splicing"e uğratılarak 365 - 770 amino asit uzunluğunda, 100 – 135 kDa ağırlığında izoformlar elde edilir. Bu izoformlardan APP695 ifadesi beyin dokusunda yüksektir, APP751 ve APP770 polipeptitleri nöron dışı hücrelerde yaygın olarak ifade edilir. APP izoformları işlev açısından da sınıflandırılabilir. Ekzon 7 Kunitz tipi serin proteaz inhibitör bölgesi (KPI) kodlar. APP751 ve APP770 hücre dışı kısmında KPI içerirken, APP695 KPI bölgesi içermez. APP translasyon sonrası N- ve O- glikozilasyon, fosforilasyon ve tirozin sülfasyonu şeklinde değişime uğrar (52).

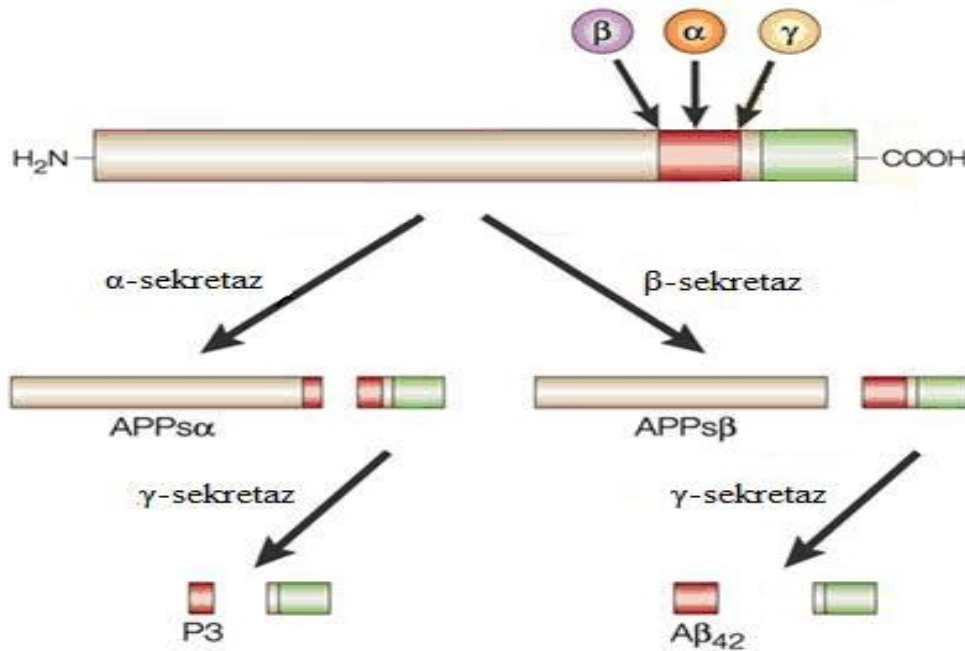
## 2.8. APP'nin işlenmesi

APP, hücrelerde amiloid üreten ve üretmeyen iki farklı yolak ile kesilip işlenebilir. APP çoğunlukla amiloid üretmeyen yolağı izler.

APP; alfa sekretaz tarafından kesilerek amino ucundan büyük amiloid üretmeyen bir peptid oluşturur. Bu peptid, sAPP $\alpha$  (secretory N-terminal ectodomain of APP alpha); yüzeyden salınır ve nöroprotektif bir ajandır. sAPP, melanositler ve melanoma hücrelerindeki melanin salınımını etkilemenin yanı sıra, Ras yolağının uyarılmasına sebep olan bir büyüme faktörü gibi de çalışır (6,53). APP'nin kesim

sonucu oluşan karboksi ucu ise CTF (carboxy terminal fragment) ismini alır. CTF'nin gama sekretaz tarafından kesime uğratılmasıyla p3 ve AICD (APP intracellular domain) oluşur.

APP'nin alfa sekretaz kesiminden kaçtığı durumlarda amiloid üreten yolak devreye girer. Bu yolak beta sekretaz kesimiyle başlar. APP, beta sekretaz tarafından kesilirse amino terminalinden sAPP $\alpha$ 'dan 17 aminoasit daha kısa olan sAPP $\beta$  oluşur. sAPP $\beta$ 'nin sAPP $\alpha$  gibi nöroprotektif olduğu, ancak etkisinin çok daha düşük düzeyde olduğu düşünülmektedir. APP, beta sekretaz tarafından kesildikten sonra gama sekretaz ile kesilerek nörotoksik peptid amiloid-beta peptidini ve AICD'yi oluşturur (54,55). Amiloid beta peptidi, Alzheimer hastalarının serebral korteksinde görülen senil plaklarda ve nörofibriler ağda bulunur (56).



Şekil 2.5. APP'nin işlenmesi (57).

## 2.9. APP'nin görevleri

APP'nin sentezi, taşınması, moleküler organizasyonu iyi bilinse de amiloid-beta'nın uyardığı hücre ölümü, APP'nin normal hücrelerde işlevi ve kanser oluşumundaki rolü ile sAPP'nin görevleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

APP karboksî ucu aracılığıyla sinyal iletiminde rol alır. APP, karboksî ucunun selektif fosforilasyonu sayesinde sinyal iletiminde rol alan proteinlerin fosfotirozin bağlama bölgeleri ya da SH2 (Src homology 2) bölgeleri ile etkileşime girer. İnsan beyin hücrelerinde ve nöroblastom hücre kültürlerinde APP ile SH2 bölgesine sahip adaptör protein Grb2 (growth factor receptor 2)'nin etkileşimi tanımlanmıştır. Grb2, hücre yüzeyindeki büyüme faktörü reseptörlerini Ras sinyali ve hücre proliferasyonu ile ilişkilendirir. Alzheimer hastalarının beyin dokusu örneklerinde Grb2'nin APP ile etkileşimi artmıştır (58).

APP'nin kesim ürünü sAPP son çalışmalarda keratinositlerin ve tiroid hücrelerinin büyümesi ile ilişkilendirilmiştir (6,7). sAPP epidermal melanositlerde ve melanoma hücrelerinde dendrit motilitesinin ve melanin salınımının düzenleyicisi olarak çalışır (9). APP ifadesi nöronal hücre bölünmesi, malinleşmesi ve kolorektal kanser hücrelerinin çoğalmasına neden olur (5,8,59).

## 2.10. sAPP

APP'nin hücre dışı kısmıyla ilgili yapılan fonksiyonel çalışmalarda hücre yüzeyi reseptörü olduğu, hücre adezyonu, nörit uzaması ve sinaps oluşumunda rol oynadığı öne sürülmüştür (5,60,61).

Normal koşullarda sAPP, APP'nin transmembran bölgesinin yakınından alfa sekretaz tarafından kesilir, Alzheimer hastalığı gibi patolojik durumlarda ise beta sekretaz tarafından kesilir. sAPP'nin tiroid hücrelerinin ve fibroblastların hücre zarlarına bağlandığı gösterilmiştir (53). Fibroblastlar ve tiroid hücrelerinin sAPP ile inkübasyonu hücre çoğalmasını artırmaktadır. Tiroid epitel hücrelerinde (FRTL-5) yapılan çalışmalarda sAPP'nin büyümeyi artırıcı etkisinin MAP kinaz fosforilasyonu aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (53). Hücre döngüsüne etkilerinin yanı sıra sAPP'nin hücre morfolojisi üzerinde de etkileri vardır. sAPP, nöroblastom hücrelerinde nörit uzantılarının artmasına neden olmaktadır (62).

### 2.11. APP ve kesim ürünü sAPP'nin Ras yolağıyla ilişkisi

Pankreatik kanser hücrelerinde APP'nin proteolitik kesiminde artış gözlenmiştir. Bu artışın pankreatik kanserde hücre büyümesi ve göçü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. APP ifadesi, normal erişkin pankreasında asinar ve adacık hücrelerinde lokalizedir, duktal epitelde bulunmaz. SAGE (serial analysis of gene expression) kütüphaneleriyle yapılan çalışmalarda APP transkriptleri pankreatik kanserde saptanırken normal duktal epitelde transkriptlere rastlanmamaktadır. Pankreatik adenokarsinom oluşumu esnasında, duktal epitelde bir seri genetik değişiklik meydana gelmekte ve APP aşırı ifadesi oluşmaktadır. Hem pankreatik kanser örneklerinde hem de pankreatik kanser hücre hatlarında immünohistokimya sonuçları bu bulguyu desteklemektedir. APP promotörünün aktivitesinin ve APP ifadesinin artışı fizyolojik sistemlere sitokin ve büyüme faktörü eklenmesiyle de gözlenmiştir (63,64).

Pankreatik kanser kökenli BxPC3 hücrelerinde sAPP sinyalinin blokajı, kanser hücre kümelerinin toplam sayısını azaltır, kümeleşmeyi ortadan kaldırarak tek tek tanımlanabilen hücre görünümünü sağlar. Bu hücrelerin ekzojen sAPP ile inkübasyonu kanser hücre çoğalmasını artırır. Çoğalmayı artırıcı bu etki, FRTL-5 tiroid epiteli hücrelerinde olduğu gibi MAP kinaz yolağıyla açıklanabileceği gibi, protein kinaz c aktivasyonu, Akt fosforilasyonu veya büyüme faktörü sinyal yollarının uyarılması ile de gerçekleşebilir (65-68). sAPP deri keratinositlerinin büyümesini artırır ve göç etmelerini uyarır (6,69).

APP ifadesi oral skuamöz hücre kanserlerinde gösterilmiş ve kötü prognoz ile ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Oral skuamöz hücre kanseri hattında (OECM-1) APP ifadesi engellendiğinde, sağkalım ve proliferasyonda belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Bu etkinin sAPP üretiminin azalması sonucu olduğu düşünülmektedir (7). Hücre zarında henüz tanımlanmamış bir APP reseptörünün bulunduğu ve otokrin uyarıyla MAPK yolağının aktive edildiği, böylece fenotipik değişimlerin meydana geldiği öne sürülmüştür (69).

Onkojenik stres hücrelerde protein kinaz C (PKC) veya Ras yollarını uyarabilir. Bu iki yolak da APP ifadesini artırmaktadır (48). Ayrıca PKC alfa sekretazı aktive ederek sAPP alfa üretimini uyarır (48). Ras yolağı ve APP ilişkisini inceleyen bir çalışma da 2007 yılında yayınlanmıştır. Nizzari ve grubu bu çalışmada APP'nin Grb2 adaptör proteini ile iletişim kurduğunu ve bu iletişimin bölünen hücrelerde gözlenip apoptotik durumlarda kaybolduğunu tartışmışlardır (58). APP'nin adaptör Grb2 ile sentrozomda veziküler yapılarla ilişki kurduğu gösterilmiştir. Bu iletişimin hedefinin Erk 1,2 olduğu ve bu nedenle APP'nin hücre döngüsünü düzenlemede rol oynayabileceği öne sürülmüştür.

Fare feokromositoma hücre hattı PC12 hücrelerinde NGF (nerve growth factor)'in APP'nin ifade düzeyleri, mRNA izoformları, lokalizasyonu, yıkımı, salgılanmak üzere işlenmesi üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Villa ve grubu NGF'in büyüme faktörleri bFGF (basic fibroblast growth factor) ve EGF (epidermal growth factor) gibi Ras-bağımlı bir mekanizma kullanarak APP mRNA seviyesini artırdığını tespit etmiştir (48). PC12 hücrelerinin ras için dominant inhibitör mutasyona sahip ve normal Ras'ın işlev göremediği alt-klonu M-M17-26 ile yapılan deneylerde NGF'in APP ifadesini artırmak için Ras'a ihtiyaç duyduğu bulunmuştur. Ras, Raf ve MAP kinazın dominant negatif mutantları ile yapılan çalışmalar APP ifadesi için sadece Ras'ın değil tüm Ras-MAPK yolağının aktivasyonunun gerektiğini göstermiştir. APP ile Ras yolağının birbirleri üzerindeki etkisinin insan örneklerinde çalışılması gerektiği, bu bilginin Alzheimer başta olmak üzere bir çok hastalık için yol gösterici sonuçlar doğuracağı tartışılmaktadır.

Ras yolağıyla doğrudan ilişkili bir patoloji olan NF1 hastalığındaki tümörlerde APP'nin rolü olabileceği hipotezi öne sürülmüş, tez çalışmamızda nörofibrom oluşumundan sorumlu Schwann hücreleri APP ifadesi, işlenmesi ve bölünme özellikleri açısından incelenmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzeme ve solüsyonlar

##### 3.1.A. Hücre Kültürü

Kullanılan hücreler:

Normal insan Schwann hücreleri (Prof. Dr. Patrick Wood'un laboratuvarından temin edildi.)

Nörofibromdan izole edilen Schwann hücreleri (NF1 +/- ve NF1 -/-) (Prof Dr. Eric Legius'un laboratuvarından temin edildi.)

Kullanılan Kültür Ortamları:

Schwann hücre kültürü ortamı (+/- forskolin):

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco/Invitrogen)
- %10 FCS (Fetal calf serum) (Gibco/Invitrogen)
- 1x P/S (penisilin/streptomisin) (Sigma)
- 0.5 mM IBMX (3-izobütil-1-metilksantin) (Sigma)
- 10 nM beta-hergulin (R&D Systems EUROPE Ltd.)
- 2.5 µg/ml insülin (Sigma)
- 0.5µM forskolin (Sigma)

*N2-supplement* medium: (Serum içermeyen medium)

- DMEM F12 (Gibco/Invitrogen)
- 1x P/S (Sigma)
- 0.5 mM IBMX (Sigma)
- *N2-supplement* (1:100 dil) (Gibco/Invitrogen)

Hücre dondurma ortamı:

- %40 DMEM (Gibco/Invitrogen)
- %40 FCS (Gibco/Invitrogen)
- %20 DMSO (Dimetil sülfoksit) (Applichem)

Kültür kabı kaplamak için gereken malzemeler:

Poli-L-lizin (Sigma)

Laminin (Gibco/Invitrogen)

Hücre pasajlanmasında kullanılan malzemeler:

1x PBS (Phosphate buffered saline) (Sigma)

Versen (Gibco/Invitrogen)

Tripsin – EDTA (Biochrom)

### 3.1.B. İmmünfloresan Boyama

Triton-X-100 (Sigma) : 0.2%/PBS (v/v)

Keçi serumu (Sigma) : 10%/PBS (v/v)

Dana serum albümini (Sigma) : 10%/PBS (w/v)

Tween 20 (Sigma) : 0.1%/PBS (v/v)

Antikorlar:

Tavşan poliklonal S-100 (DaKo)

Keçi anti-tavşan AF 568 (Molecular Probes)

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma)

Prolong Antifade Kit (solmayı engelleyici) (Molecular Probes)

1X PBS (pH 7.4) : Phosphate buffered saline

NaCl (Carlo Erba) 140 mM

KCl (Carlo Erba) 3 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Carlo Erba) 0.9 mM

NaHPO<sub>4</sub> (Merck) 6.4 mM

### 3.1.C. Bölünme Deneyi

*CyQuant NF* Bölünme Deney Kiti kullanılmıştır. (Invitrogen)

5X HBSS tamponu (Hank's balanced salt solution)

*CyQuant NF* boya solüsyonu

96 kuyucuklu plate (Greiner)  
dH<sub>2</sub>O

### **3.1.D. Hücreden RNA izolasyonu:**

Trizol (Invitrogen)  
Kloroform (Merck)  
İzopropanol (Merck)  
Etanol (Merck)  
Diethyl pirokarbonat (DEPC) (Appllichem)

### **3.1.E. cDNA Sentezi**

*Quantiscript Reverse Transcriptase* (QIAGEN)  
5x *Quantiscript RT* tamponu (QIAGEN)  
RT primer karışımı (QIAGEN)

### **3.1.F. Kantitatif RT-PCR**

2X SYBR green jump start mix (Sigma)  
25 µM MgCl<sub>2</sub> (Sigma)  
10 µM insan beta aktin primeri (Iontek)  
F: 5'-CGCAAAGACCTGTACGCCAAC-3' 55.20 nmol 10pmol/µl  
R:5'-GAGCCGCCGATCCACACG-3' 49.94 nmol 10 pmol/µl

### **3.1.G. Yarı-kantitatif RT-PCR**

10x PCR Tamponu (Fermentas)  
25 µM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas)  
dNTP (Fermentas)  
Taq DNA polimeraz (rekombinant) enzim 5u / µl (Fermentas)  
dH<sub>2</sub>O

10 uM insan APP primeri (Metabion International AG)

F: 5'-AAGCCACAGAGAGAACCACCAGCATT-3' (Ekzon 6)

R: 5'-GCTTGACGTTCTGCCTCTTCCCATT -3' (Ekzon 10)

50 bp moleküler ağırlık belirleyicisi (Fermentas, SM0371, *Gene Ruler 50bp DNA Ladder*) (DNA fragmentleri: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 baz çifti)

### 3.1.H. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

İnsan sAPP $\alpha$  deney kiti kullanılmıştır. (IBL- Immunobiological laboratories)

96 kuyucuklu fare anti- insan sAPP $\alpha$ (2B3) antikoruna kaplanmış kültür kabı	
HRP (horse radish peroksidaz) konjuge fare anti-insan monoklonal APP (10D1) antikoruna	0.4 ml
Rekombinant insan sAPP $\alpha$ Proteini	0.5 ml x 2
EIA tampon (enzyme immunoassay): %1 BSA, %0.05 Tween 20, PBS	30 ml
Antikor için soüsyon: %1 BSA, %0.05 Tween 20, PBS	12 ml
Kromojen: TMB solüsyonu (Tetra Methyl Benzidine)	15 ml
Durdurma solüsyonu: 1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12 ml
Yıkama tamponu: %0.05 Tween 20, PBS	50 ml

### 3.1.I. Protein izolasyonu

Blending buffer (çözücü tampon)

Tris-HCl 0.5M pH 6.8

EDTA 0.5 M

SDS %20

H<sub>2</sub>O

Proteaz inhibitör tablet

### 3.1.J. Protein miktar tayini

BCA Protein Deneş Kiti (Pierce, Cat. No. 23225)

### 3.1.K. Ras aktivite düzeyi testi

*Ras Assay Reagent* (Raf-1 RBD, agaroz) (Millipore)

Fare anti-ras antikoru, klon RAS10 (Millipore)

Mg<sup>2+</sup> lizis / yıkama tamponu (Millipore)

### 3.1.L. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofözezi

%12 akrilamid jel

%30 akrilamid / bisakrilamid	4 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml
dH <sub>2</sub> O	3.3 ml
%20 SDS pH 7.2	100 ul
%10 APS	100 ul
TEMED	4 ul

%5 akrilamid jel

%30 akrilamid bisakrilamid	0.5 ml
Tris-HCl 1M pH 6.8	380 ul
dH <sub>2</sub> O	2.1 ml
%20 SDS pH 7.2	30 ul
%10 APS	30 ul
TEMED	3 ul

% 10'luk Amonyum Persülfat (APS) (Amersham) : 0.1 g./ml. (w/v)

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Amersham)

Tris Baz (Sigma)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)

### 3.1.M. Western Blot

Yürütme tamponu (pH 8.6):

Tris baz $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (Sigma)	0.124 M
Glisin (Sigma)	1.250 M
$\text{dH}_2\text{O}$	

Yıkama tamponu (TBS, pH 7.4)

Tris baz	20 mM
NaCl	137 mM

Transfer tamponu

Tris baz	3,04 g
Glisin	14,4 g
$\text{dH}_2\text{O}$	1 litre

TBS-T

TBS yıkama tamponu	
% 0.1 Tween 20 (v/v) (Sigma)	

Bloklama tamponu

Süt tozu	1 g
TBS-T	10 ml

Birincil ve ikincil antikor sulandırma solüsyonu

Süt tozu	0.5 g
TBS-T	10 ml

Birincil antikor:

Fare anti-ras antikorü, klon RAS10 (Millipore)

İkincil antikor :

HRP ile işaretli anti-fare (Sigma)

Nitroselüloz membran (Sigma)

İki renkli protein moleküler ağırlık belirleyicisi (Biorad marker)

Coomassie brilliant blue R-250 (Amersham)

Ponceau S. solüsyonu (Sigma)

### 3.2. Yöntemler

Tez çalışması kapsamında normal, NF1 + / - ve NF1 - / - Schwann hücrelerinin bölünme hızları, APP ifadeleri, sAPP üretimleri, Ras yolağı aktivitesi düzeyleri incelenmiş, sAPP bloke edici antikor uygulanarak hücreler bölünme hızı ve Ras yolağı aktivitesi açısından tekrar değerlendirilmiştir.

#### 3.2.A. NF1 + / - ve NF1 - / - Schwann hücre kültürü kurulması

NF1 hastasından çıkarılan nörofibrom, laboratuvarında önce küçük parçalara bölünerek çevre dokulardan ayrılır, sonra 2 hafta forskolinli ortamda kültüre edilir. (ön inkübasyon) 2 haftanın sonunda ön inkübasyon ortamı kollajenaz ve dispaz içeren ayrıştırma ortamı ile değiştirilir. Bu ortam içerisinde nörofibrom daha da küçük parçalara bölündükten sonra bir gece 37°C'de inkübe edilir. Ertesi gün, ucu inceltilmiş pastör pipeti yardımıyla nörofibrom tamamen parçalanır ve santrifüjle hücreler çöktürülür. Elde edilen hücreler, Schwann hücre kültürü kurmak üzere çalışılmaya devam edilebileceği gibi, bu aşamada elde edilen hücreler dondurma ortamı eklenerek dondurulup başka deneyler için saklanabilir. Nörofibromdan izole edilen ve 2 ml dondurma ortamında dondurularak saklanan Schwann hücreleri Belçika Leuven Üniversitesi'nden temin edildi. Dondurulan hücreler kuru buz içerisinde yollanarak, yolculuk esnasında hücrelerin çözülüp ölme riskine karşı önlem alındı. Donmuş halde gelen hücreler 37°C'de çözüldü. Üzerine 4 ml kültür ortamı eklenip 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra çöken hücreler 10 ml forskolinli Schwann hücre ortamında tekrar kaldırıldı. Hücreler Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücreleri elde etmek için, iki adet 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına 5'er ml olacak şekilde bölündü.

Nf1 +/- hücrelerin ortamı 3-4 günde bir forskolinli ortamla değiştirildi. Nf1 -/- hücrelere ise, forskolinli Schwann hücre kültür ortamı eklenip bir gece bekletildikten sonra, bir kez PBS ile yıkayıp serum içermeyen *N2-supplement* ortamı ilave edildi. Nf1 -/- hücreler 24 saat *N2-supplement* ortamında tutulduktan sonra forskolinsiz Schwann hücre kültür ortamında çoğaltılmaya devam edildi. 3-4 günde bir ve

pasajlama sırasında, bir gece forskolinli ortamda tutma, ardından 24 saat *N2-supplement* ortamında bekletme, sonrasında forskolinsiz ortama geçme protokolü tekrarlandı.

### **3.2.B. Normal Schwann hücre kültürünün elde edilmesi**

Normal Schwann hücreleri, organ donörlerinin sural sinirlerinden ayrıştırılmaktadır. Çevre dokulardan ayrılan fasiküllere, nörofibromlardan Schwann hücre izolasyonunda kullanılan yöntemler uygulanarak normal Schwann hücre kültürü kurulur. Bu şekilde izole edilen Schwann hücreleri Miami Üniversitesi, “The Miami Project to Cure Paralysis and the Department of Neurological Surgery” bölümünden temin edildi. Normal Schwann hücrelerinin ortamı 3-4 günde bir forskolinli ortamla yenilendi.

### **3.2.C. Kültür kaplarının kaplanması:**

Schwann hücrelerin tutunmalarını sağlamak amacıyla kültür kaplarının poli-L-lizin ve laminin ile kaplanması gerekmektedir.

1. 100µg/ml Poli-L-Lizin konulup oda sıcaklığında 30-60 dakika bekletildi. 35 mm çapındaki petri kapları için 3 ml, 25 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip küçük kültür kapları için 5 ml konuldu.
2. 1-3 kez PBS ile yıkandı..
3. 4 µg/ml Laminin konulup 37°C’de 1 saat veya 4°C’de bir gece bekletildi.
4. 1-3 kez PBS ile yıkandı.
5. Hazırlanan kültür kapları 4°C’de bir hafta kadar saklanabilir.

Bu işlemler esnasında kültür kaplarının yüzeyine pipetle temas etmemeye dikkat edilmelidir, çünkü çizilen yüzeyler fibroblastlar tarafından doldurulmaktadır.

### 3.2.D. Pasajlama

Hücreler kültüre edildikleri kültür kaplarının yüzeyini kapladıkları zaman (confluency) aşırı yoğunluğun yaratacağı kontak inhibisyonunu önlemek, hücrelerin çoğalmasını sağlamak ya da dondurarak saklayabilmek amacıyla pasajlama yapmak gerekmektedir. Pasajlama protokolü normal, Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücreleri için aynıdır.

Schwann hücreleri 25 cm<sup>2</sup> alana sahip hücre kültür kaplarının yüzeyini 3 – 4 haftada kaplamaktadır. 25 cm<sup>2</sup> yüzey alanı olan kültür kaplarında yüzey kaplandığında hücre sayısı yaklaşık 700 bine ulaşmaktadır. Pasajlama işlemi ile hücreler, iki yeni 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına bölünür.

Pasajlama işlemlerinde; hücre kültür ortamı pipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra, bir kez PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 2 ml versen eklenip geri çekildi. 1 ml tripsin-EDTA solüsyonu konuldu. Daha sonra 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 2-3 dakika inkübe edilerek hücrelerin kalkması sağlandı. Hücrelerin kalktığı mikroskop altında gözlemlendikten sonra hücrelerin üzerine tripsini inaktive etmek amacıyla 2 ml hücre kültür ortamı eklendi ve hücreler 15 ml'lik tüp içerisinde toplandı. Hücreler bu aşamada hemasitometre kullanılarak sayıldı.

#### **Toplam hücre sayısı = Hemasitometrede sayılan hücre miktarı x hacim**

Tüpte toplanan hücreler 2000 rpm.'de 10 dakika santrifüj edildi, böylece hücrelerin dibe çökmesi sağlandı, süpernatant atıldı. Hücreler kullanılış amaçlarına göre (pasajlama / dondurma) gerekli solüsyon 15 ml'lik tüpün dibine çöken hücrelerin üzerine eklendi.

Dondurulacak hücrelerin üzerine 1 ml toplam hacim olaşak şekilde %40 DMEM (400 µl), %40 FCS (400 µl), %20 DMSO (200 µl) eklendi. Pipetaj yardımıyla hücreler kaldırıldı ve *cryo* tüplere konularak dondurulmaları sağlandı.

Pasajlanacak hücreler ise hücre kültür ortamı hücre sayısına göre seyreltilerek kültür kaplarına aktarıldı.

### **3.2.E. Mikoplazma Testi:**

Başka bir laboratuvardan temin edilen Schwann hücreleri ile çalışmaya başlamadan önce, hücre kültür laboratuvarımızı olası bir kontaminasyon riskinden korumak amacı ile DAPI boyaması yapılarak mikoplazma testi uygulanmıştır.

Mikoplazma testi için, 35 mm çapında ve içerisinde lamel bulunan petri kabı, hücrelerin yapışmasını sağlamak amacıyla Poli-L-Lizin ve Laminin ile kaplandı. Gönderilen hücrelerden bir miktar alınarak 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde kültüre edildi. Bu şekilde hücrelerin lamele yapışması beklendi. Bu süre sonunda besi yeri atılarak hücreler 1x PBS ile yıkandı. Sonrasında %4'lük paraformaldehit ile hücreler lamelin üzerine fikse edildi. İki defa 1x PBS ile yıkandıktan sonra DAPI boyaması yapılarak hücrelerdeki genetik materyal işaretlendi. Ana stok konsantrasyonu: 0,1 µg/mL olan DAPI boyası 1/1000 oranında sulandırılarak kullanıldı. Hücrelere 1 dakika DAPI boyası uygulandıktan sonra tekrar 1x PBS ile yıkandı. İşlem tamamlandıktan sonra lamel, lam üzerine kapatılarak floresan mikroskopta mikoplazma enfeksiyonu yönünden incelendi ve fotoğrafı çekildi. Bu çalışma sonucunda hücrelerde mikoplazma kontaminasyonunun olmadığı tespit edilmiştir.

### **3.2.F. İmmün boyama:**

Schwann hücreleri nörofibromdan izole edildikleri için kültür ortamında başka tip hücrelerin de bulunma ihtimali vardır. Özellikle kolay bölünebildiklerinden fibroblastlar kültür kabında büyük yer kaplayarak yavaş bölünen Schwann hücrelerinin çoğalmasına fırsat tanımayabilir. Bu nedenle Schwann hücrelerine özel bir besleme ortamı ve protokolü kullanılmasının yanı sıra kültürdeki hücrelerin gerçekten Schwann hücreleri olduklarını göstermek adına Schwann hücrelere özgül bir protein olan S-100'e özgü antikorla immünfloresan boyama yapıldı.

Boyama yapılan hücreler Poly-L-Lysin ve Laminin ile kaplanan 35 mm çapında içinde lamel bulunan petrielerde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde kültüre edildi. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra %4'lük paraformaldehit ile lamellerin üzerine fikse edildi ve 0.2% Triton X-100/PBS kullanılarak geçirgenliği artırıldı. Daha sonra % 10 keçi serumu, % 10 sığır serum albümini ve % 0.1 Tween20/PBS içeren solüsyon ile hücreler bloke edildi. Birincil antikor olarak 1/3000 derişimde tavşan poliklonal S-100 antikor (DaKo) kullanıldı. İkincil antikor olarak keçi anti-tavşan antikor AF 568 (Invitogen Molecular Probes) kullanıldı. Birincil ve ikincil antikor boyama sonrası çekirdekler için DAPI boyaması yapıldı. Lameller, ProLong Antifade Kit (Molecular Probes) kullanılarak lam üzerine yapıştırıldı ve kurumaları için karanlıkta 10-12 saat bekletildikten sonra değerlendirildi.

### **3.2.G. Bölünme deney protokolü:**

Normal, Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücrelerinin bölünme hızlarının karşılaştırılması ve ortama APP antikor eklenmesinin hücre sayıları üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla *CyQuant NF Proliferation Kit* kullanıldı. Bu kitte hücre DNA içeriği floresan boya bağlanması aracılığıyla ölçülmektedir. Floresan şiddeti ile hücre sayısını korele etmek için, öncelikle belirli sayıda hücre ile ölçüm yapılır ve standart eğri çizilir. Standart eğri çizimi için uygun olan hücre sayıları aşağıda verilmiştir. Hücreler ilave edilmeden önce kuyucuklar, kültür kabı kaplanmasındaki yöntem esas alınarak poli-L-lizin ve laminin ile kaplandı.

1. Hücreler kuyucuklara ilave edildi. Standart eğri çizimi için en az 4 saat boyunca, diğer deneyler için 2, 5 veya 8 gün süresince hücreler forskolinli ortamda inkübe edildi. Hücreler 24 saat boyunca yüzeye yapıştıktan sonra APP antikor 1:100 derişimde eklendi ve 24 saat sonra ölçüme alındı. Deneyler ikili veya üçlü tekrarlar halinde çalışıldı.
2. Ölçüm yapılacağında hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırıldı.

3. 5x konsantrasyonda bulunan tampon HBSS (Hank's balanced salt solution) distile su ile dilüe edilerek 1x olacak şekilde her deney öncesinde taze hazırlandı.
4. 1x konsantrasyondaki tamponun mililitresine 2 µl olacak şekilde *CyQuant NF dye reagent* isimli boya ilave edildi ve böylece 1x boya bağlanma solüsyonu hazırlandı.
5. 1x boya bağlanma solüsyonundan kuyucuklara 100'er µl konuldu.
6. Kültür kapları 37°C'de 30-60 dakika inkübe edildi.
7. Floresan şiddeti, 485 nm'de uyarım ve 530 nm'de emisyon tespiti ile *SpectraMax M2 microplate reader* aletinde ölçüldü. Boya bağlanma solüsyonu ile inkübasyondan sonra 2 saat içinde ölçüm yapılması gerekmektedir.

**Tablo 3.1.** Bölünme eğrisi standardizasyonu için kullanılan kültür kabının şematizasyonu. Kutularda yazılı sayılar, kuyucuklardaki hücre sayılarını ifade etmektedir. Bölünme eğrisinin standardizasyonu için 0 ila 20000 hücre üçlü tekrar halinde 96-kuyucuklu kültür kabına aşağıda gösterildiği şekilde konmuştur.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0	15000	0	15000	0	15000					
B		100	20000	100	20000	100	20000					
C		250		250		250						
D		500		500		500						
E		1000		1000		1000						
F		2500		2500		2500						
G		5000		5000		5000						
H		10000		10000		10000						

Bölünme deneyleri için hazırlanan örnekler her hücre tipi için hemositometre ile sayılarak hazırlanan 1000 hücreden oluşmaktadır. 2., 5. ve 8. günlerde yapılan ölçümler için ayrı plateler kullanıldı. Kullanılan kuyucuklar poli-L-lizin ve laminin ile kaplandı.

### **3.2.H. RNA izolasyonu:**

RNA izolasyonu için trizol ile RNA ayrıştırma metodu kullanıldı.

1. Yüzeyi tamamen hücrelerle kaplanmış 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabı üzerine 1 ml trizol eklendi ve 1,5 ml'lik ependorf tüpe alındı.
2. Kloroform (49) : izoamil alkol (1) oranında solüsyon hazırlandı. Buz üstündeki örneklere 200 µl eklendi. Tüpler elle 2 dakika kadar çalkalandı.
3. 13000 rpm'de +4C'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
4. Santrifüj sonrasında en üstteki beyaz şeffaf faz ayrı bir ependorf tüpe alındı ve üzerine 500 µl izopropanol eklendi. Şeffaf faz RNA içermektedir, alttaki fazlar ise DNA veya protein izolasyonu için kullanılabilir.
5. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dakika -20°C'de inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası 13000 rpm'de +4C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
7. Pelet üzerine 1 ml DEPC (Diethyl pyrocarbonate) içeren %70 etanol eklenerek karıştırıldı. Buz üzerinde 3 dakika bekletildi.
8. 7500 rpm'de +4C'de 3 dakika santrifüj yapıldı.
9. Etanol atıldı, tüp kapağı açık bırakılarak kurutuldu.
10. Pelet üzerine 15 µl nükleaz içermeyen distile su eklendi. Buz içerisinde 1 – 2 saat bekletildi.
11. Elde edilen RNA örneği – 80 C'de saklanabilir.

İzole edilen RNA'nın saflığı ve miktarı spektrofotometrik olarak, 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki optik dansite ölçülerek hesaplandı. RNA saflığı, optik dansite (280) / optik dansite (260) oranına göre belirlendi.

### 3.2.I. cDNA sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA, *Quantiscript reverse transcriptase* enzimi ve *random* primer kullanılarak sentezlendi.

1. Toplam 14 µl olacak şekilde 1 µg RNA, 2 µl *gDNA (genomic DNA) wipeout buffer (7x)* ve RNaz içermeyen distile su karışımı hazırlandı.
2. 42 C'de 5 dakika inkübe edildi.
3. Örnekler buza alındı ve *mastermix* eklendi.  
*Mastermix:* *Quantiscript reverse transcriptase* 1µl  
*5x quantiscript RT buffer* 4µl  
*RT primer mix* 1µl oranında hazırlandı.
4. 42 C'de 30 dakika, 95 C'de 5 dakika inkübe edildi.
5. Örnekler -20C'de saklandı.

### 3.2.J. RT-PCR

RT PCR, ilgilenilen genin ifadesinin cDNA'nın kalıp olarak kullanılması aracılığıyla analiz edilmesidir. PCR ürünü agaroz jelde yürütülür ve elde edilen bandın yoğunluğu, her dokuda ifade edildiği bilinen kontrol genlerin (house keeping) ifadesi ile karşılaştırılır. Bu yöntemle yarı-kantitatif RT-PCR denilir. Bu yöntemle herhangi bir genin bir dokuda ifade edilip edilmediği ve ifadedeki değişikliğin analizi yapılır.

Hücrelerden izole edilen RNA örneklerinin cDNA'ya çevrimi sonrasında örneklerin yoğunluklarını dengelemek amacıyla sadece insan beta aktin primerleri kullanılarak kantitatif RT PCR reaksiyonu kondu ve örnekler birbirlerine göre standardize edildikleri zaman APP ifadeleri açısından karşılaştırıldı. Ön deneylerde

APP'nin bu hücrelerde birden çok izoformunun ifade edildiği gözlemlendiği için birbirlerine göre standardize edilen örnekler APP ifadesi için yarı-kantitatif RT PCR ile incelenmiştir.

Kantitatif RT PCR reaksiyonu:

Örnek sayısına göre bir karışım hazırlandı. Tüplere 19 µl olacak şekilde karışım dağıtıldı. Ardından 1'er µl cDNA eklendi.

2x *SYBR green jump start mix* – 10µl

25 µM MgCl<sub>2</sub> – 2,4 µl

Beta aktin primer *Forward* – 0,8 µl

Beta aktin primer *Reverse* – 0,8 µl

dH<sub>2</sub>O – 5 µl

Reaksiyon koşulları:

94°C 2 dakika, (94°C 1 saniye, 60°C 15 saniye) x 45 döngü

Yarı-kantitatif RT PCR reaksiyonu:

Örnek sayısına göre bir karışım hazırlandı. Tüplere önce 30,6 µl dH<sub>2</sub>O, ardından karışımdan 15,4 µl dağıtıldı. Tüplere en son 4'er µl cDNA eklendi.

10x PCR Tamponu – 5 µl

25 µM MgCl<sub>2</sub> – 4 µl

dNTP karışımı – 2 µl

APP primer *Forward* – 2 µl

APP primer *Reverse* – 2 µl

Taq polimeraz enzim – 0,4 µl

Reaksiyon koşulları:

94°C 2 dakika, (94°C 25 saniye, 55°C 30 saniye, 72°C 30 saniye) x 35 döngü

### 3.2.K. ELISA

Normal, NF1 + / - ve NF1 - / - Schwann hücrelerinin ortama salgıladıkları APP kesim ürünü sAPP alfa'nın tespiti ve hücreler arasında karşılaştırmalı bir değerlendirilme yapılması için insan sAPP $\alpha$  deney kiti kullanıldı. Hücreler arasındaki ölçümleri standardize etmek için, kendi protokollerine göre beslenmekte olan hücreler 24 saat boyunca serum içermeyen N2 ortamında tutuldu. 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabındaki hücreler için 3 ml N2 ortamı eklendi. N2 ortamının kullanılmasının nedeni Schwann hücre ortamındaki serum içeriğinin sonuçları etkilemesini önlemektir.

1. İnsan sAPP alfa peptidi içeren liyofilize haldeki standart tüpü 500  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O ile çözülerek 50 ng/ml sAPP alfa standart solüsyonu elde edildi.
2. Standart solüsyonun 0 – 25 ng/ml konsantrasyonları arasında 8 dilüsyonu EIA tamponu ile hazırlandı. Dilüsyonlar; 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,13 ng/ml, 1,56 ng/ml, 0,78 ng/ml, 0,39 ng/ml ve 0 konsantrasyonda sAPP alfa içermektedir.
3. Standart dilüsyonları, ölçülecek örnekler ve kör solüsyonlar 100'er  $\mu$ l olacak şekilde kuyucuklara konuldu ve bir gece 4°C'de inkübe edildi.
4. 40x derişimdeki yıkama tamponu dH<sub>2</sub>O ile seyreltildi.
5. 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar 7 defa yıkandı.
6. Her kuyucuk için 100  $\mu$ l olacak şekilde, sAPP antikor; kit içerisindeki antikor solüsyonu ile 30 kat sulandırıldı.
7. 100  $\mu$ l işaretli antikor solüsyonu kuyucuklara eklendi ve 30 dakika 4°C'de inkübe edildi.
8. 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar 9 defa yıkandı.
9. Kuyucuklara 100'er  $\mu$ l kromojen konuldu, 30 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. Kuyucuklara 100'er  $\mu$ l durdurma solüsyonu eklendi. Kuyucuklardaki sıvıların sarı renge döndüğü gözlemlendi.
11. 450 nm'de ölçüm gerçekleştirildi

### 3.2.L. Protein izolasyonu

Hücre kültüründen protein izolasyonu yapmak için öncelikle hücre içeriğini çözücü tampona alınır. Hücreler kültür kabı yüzeyini kaplayınca üzerlerindeki ortam uzaklaştırıldı ve 1x PBS ile yıkandı. Çözücü tampon ilave edilerek hücreler kazıyıcılar yardımıyla tampon içinde toplandı. Tampon içinde çözülmüş hücre içeriği -20°C’de saklanabilir. Oda sıcaklığında buz üstünde çalışılan örnekler 10 kez sonikasyona uğratıldı. Tüpler 4°C’de 30 dakika boyunca 13000 rpm’de santrifüj edildi. Protein içeren süpernatant yeni bir tüpe alınarak -20°C’ye kaldırıldı.

### 3.2.M. BCA (*Bicinchoninic acid*) Protein miktar tayini

Protein örneklerinin konsantrasyonlarını saptamak için öncelikle standart eğri çizimi gerekmektedir.

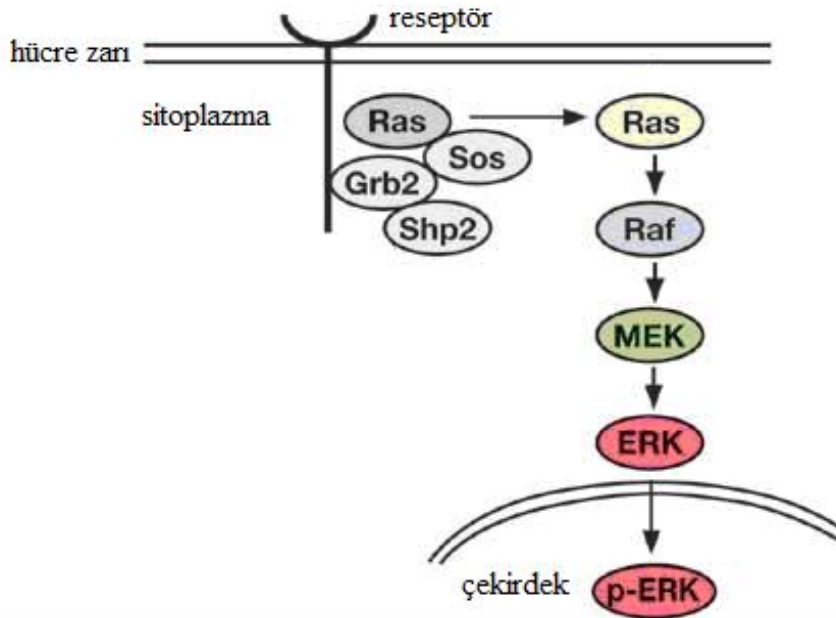
**Tablo 3.2.** Protein konsantrasyonu ölçümü için kullanılan standart eğri örnekleri.

	BSA (2mg/ml)	%1 SDS	Konsantrasyon
Blank	-	50 µl	
1	2,5 µl	47,5 µl	0,1 mg/ml
2	5 µl	45 µl	0,2 mg/ml
3	10 µl	40 µl	0,4 mg/ml
4	20 µl	30 µl	0,8 mg/ml
5	30 µl	20 µl	1,2 mg/ml

Ölçülecek örnekler 2,5 µl protein + 47,5 µl %1 SDS şeklinde 1/20 oranında seyreltildi. *Working reagent* (49x reagent A + 1x reagent B) hazırlanarak örneklerin ve standartların üzerine 1'er ml eklendi. 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. *NanoDrop1000* Spektrofotometre cihazında 280 nm. dalga boyunda konsantrasyon ölçümü yapıldı.

### 3.2.N. Ras aktivitesi

Ras aktivitesi, immün çöktürme ve western blot teknikleri esasına dayanan “Millipore Ras aktivitesi deney kiti” kullanılarak saptandı. Hücre lizatlarından 5x konsantrasyonda bulunan  $Mg^{2+}$  lizis / yıkama tamponu  $dH_2O$  ile sulandırıldı ve proteaz inhibitör tableti eklenerek hazırlandı. Bu deneyde 35  $\mu g$  protein kullanıldı. Protein örnekleri 1x  $Mg^{2+}$  lizis / yıkama tamponu eklenerek 1 mililitreye tamamlandı. Örneklere 30  $\mu l$  Raf-1 RBD bölgesi (*Ras binding domain*, aktif Ras proteinini tanıyan bölge) takılı agaroz solüsyonu konuldu ve 4°C’de 60 dakika inkübe edildi. 4°C 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj ile agaroz ve bağlı proteinler çöktürüldü. Peletin üstüne 3 kez 500  $\mu l$  1x  $Mg^{2+}$  lizis / yıkama tamponu konuldu ve 4°C 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı. Son yıkamanın ardından örnekler *NuPage sample reducing agent* ve *sample buffer* içinde çözülerek SDS jelde yürütüldü.



**Şekil 3.1.** Ras/Raf/MEK/ERK yolağı. Raf, Ras – GTP formunu tanıyıp uyarılmaktadır (70).

### 3.2.O. SDS jel

Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrışmalarını sağlamak için SDS-PAGE kullanıldı. Proteinler, iki katmanlı jel (resolving ve stacking) sistemi hazırlanarak SDS poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı.

%12 oranında akrilamid içeren jel, dikey jel elektroforezi sisteminin (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell BIO-RAD) iki camını arasına pipet yardımıyla döküldü. Bu işlem sırasında ikinci katmanı oluşturan %3 akrilamid jelin dökülmesi için 3 cm boşluk bırakıldı. %12 akrilamid jel solüsyonu döküldükten sonra %3 akrilamid jel dökülmeden önce, üzerine bir miktar distile su eklenerek jel yüzeyinin kuruması önleni ve daha düzgün bir yüzey elde edildi. *Resolving* jel polimerize olduktan sonra, üzerine *stacking* jel dökülerek 0.75 mm. kalınlığında 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi.

Örnekler yüklenirken *NuPage sample reducing agent* ve *sample buffer* ile karıştırıldı, kaynayan suda 4 dakika bekletildi. Örnekler 80 voltta 30 dakika boyunca yürütüldü. Örnekler ayrıştırıcı olan % 12 akrilamid jele ulaşınca voltaj 120 volta çıkartılarak 2 saat elektroforez gerçekleştirildi. Örneklerin ne kadar süre yürütüleceğine belirteçin açılmasına bakılarak karar verildi. Böylelikle proteinler SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı.

### 3.2.P. Western blot

SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılan proteinlerin nitrosellulöz membrana transferi için 4 adet 3M *Whatman* kağıdı ve 1 adet nitroselüloz membran, 9 cm eninde ve 11 cm boyunda olacak şekilde kesildi ve transfer tamponu içinde 5 dakika bekletildi. Protein elektroforezi tamamlandıktan sonra *Electroblotting* (Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell From BIO-RAD) aleti içine sırasıyla 2 adet *Whatman* kağıdı, membran, jel ve son olarak tekrar 2 adet *Whatman* kağıdı arada hava kabarcığı bırakılmadan üst üste yerleştirildi. Protein

örneklerinin jel üzerinden nitroselüloz membrana transferi 30 volt, 372 mA'de 16-18 saatte gerçekleştirildi.

Transfer tamamlandıktan sonra jel, *Coomassie brilliant blue* R-250 solüsyonu ile boyanarak protein örneklerinin tamamının jel üzerinden nitroselüloz membrana transfer edildiği anlaşıldı. Protein örneklerinin eşit miktarda yüklendiğinin kontrol edilebilmesi için nitroselüloz membran *Ponceau S.* solüsyonu ile boyandı ve tüm kuyucuklarda yüklemenin eşit olduğu gözlemlendi.

Transfer tamamlandıktan sonra nitroselüloz membran özgül olmayan bağlanmaları engellemek adına bloklama solüsyonunda 1 saat bekletildi. Ardından membran gece boyunca +4°C'de fare anti - ras (1/1000) birincil antikoru ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membran, TBST yıkama solüsyonu ile 6 kez 5'er dakika boyunca çalkalanarak yıkandı ve bağlanmayan antikor uzaklaştırıldı.

Birincil antikor ile inkübasyon sonrası membran, birincil antikora karşı hazırlanmış ve HRP ile işaretli anti-fare (1:3000, Sigma) ikincil antikoru ile 1 saat muamele edildi. BCL kemilüminesans işaretleyici kullanılarak bantlar film üzerinde otoradyografik olarak görüntülendi.

## 4. BULGULAR

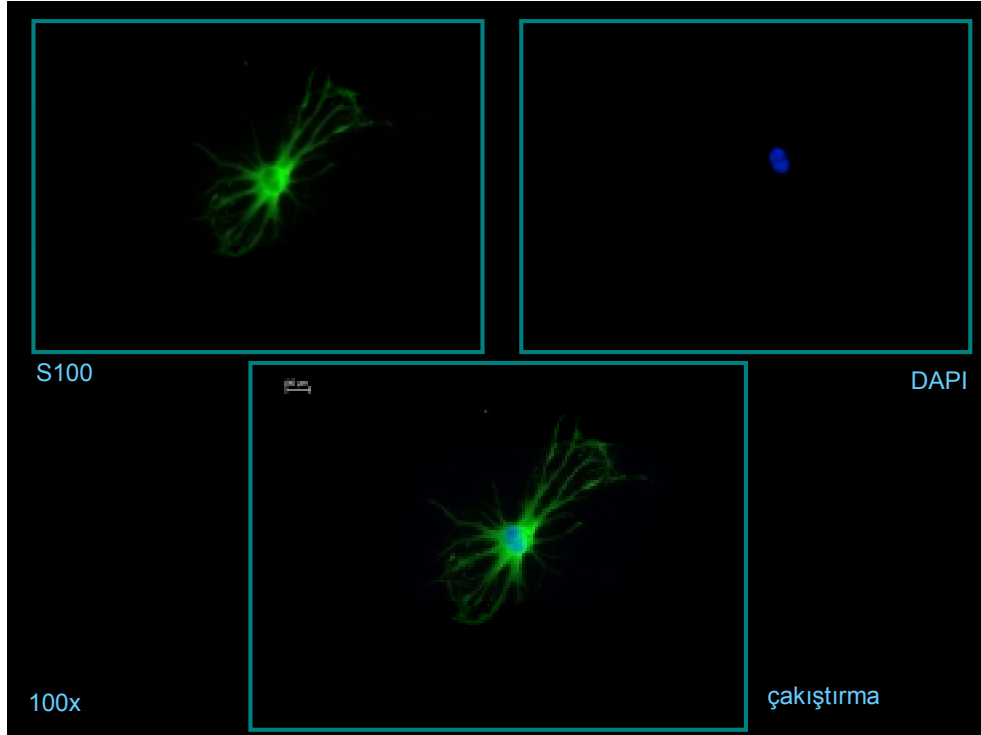
### 4.1. Schwann hücre kültürünün kurulması

Tez kapsamında normal, Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücre kültürleri ile çalışıldı. Bu hücreler, kültür kapları poli-L-lizin ve laminin ile kaplandıklarında yüzeye yapışmaktadır. Kültür kaplarının poli-L-lizin ve laminin ile kaplanmasının morfolojik olarak ve bölünme açısından en iyi sonucu verdiği gösterilmiştir (71,72).

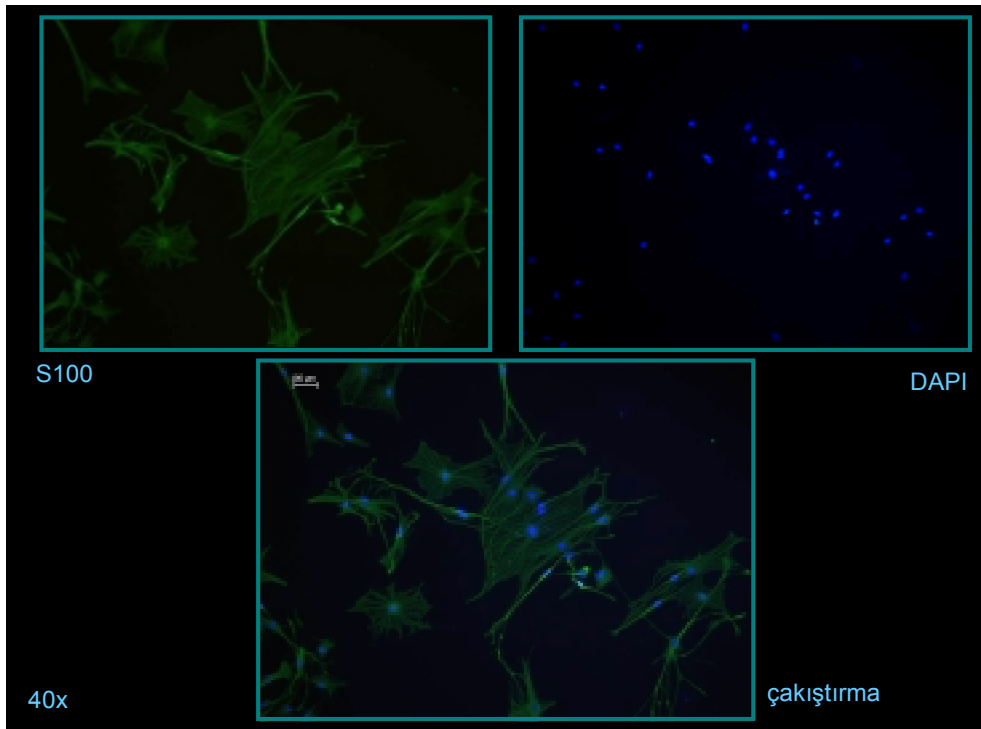
Schwann hücrelerinin beslenmesi ortama özel faktörlerin eklenmesini gerektirmektedir. Bu faktörler, organizmada aksonların etrafına sarılmak suretiyle tutunan ve akson kaynaklı faktörlerle uyarılarak canlılığını sürdüren Schwann hücrelerinin kültürde çoğalmasını sağlar. Böylece, daha hızlı çoğalabilen fibroblastların kültür kabını doldurmaları önlenir. Beta heregülün, aksondan Schwann hücrelerine yapılan uyarıyı kültür ortamında gerçekleştirir (73). Beslenme ortamına konan IBMX, cAMP düzeyini artırır, kültür kabındaki Schwann hücre oranının %98-99'a ulaşmasını sağlar (74). İnsülin, besleme ortamına her zaman taze olarak eklenir, IBMX ile beraber çalışarak Schwann hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasını sağlar (75,76). Ortama taze olarak 2,5 ng/ml insülin ilave edilmesi bölünme hızını %30 artırır. İnsülin konsantrasyonunun 2,5 ng/ml'den daha fazla artırılması bölünme hızında daha fazla bir artışa yol açmamaktadır. Poli-L-lizin ve laminin kaplı kültür kapları ve insülinli ortamda kültüre edilen Schwann hücrelerinin *senescense*'e girmesi gecikmektedir.

Normal ve Nf1 +/- Schwann hücrelerinin beslenme ortamına, Nf1 -/- Schwann hücrelerinden farklı olarak forskolin eklenmektedir. Forskolin, Schwann hücrelerinin farklılaşmasını uyarır. Nörofibromdan izole edilen heterojen Schwann hücre popülasyonundaki Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücreleri olarak birbirinden ayrılmasını sağlar. Nf1 -/- Schwann hücreleri tümörün köken aldığı hücreler oldukları için ortamda forskoline ihtiyaç duyulmamaktadır. Nf1 -/- hücrelerinin Nf1 +/- hücrelerden ayrılma protokolü yöntemlerde anlatıldığı gibi üç basamaklıdır.

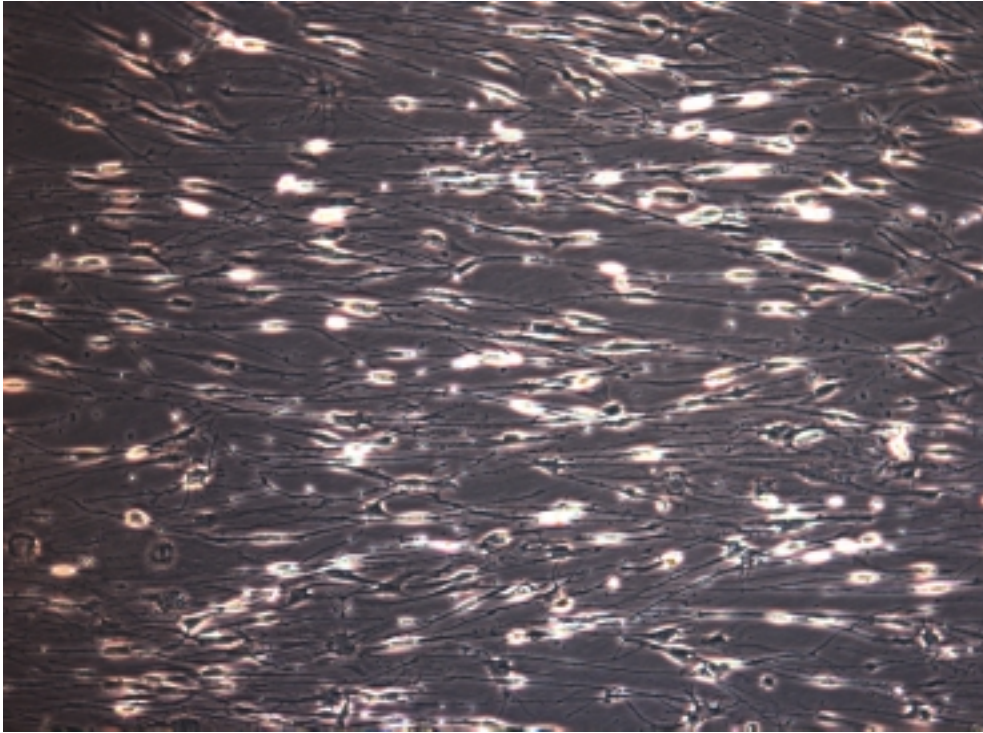
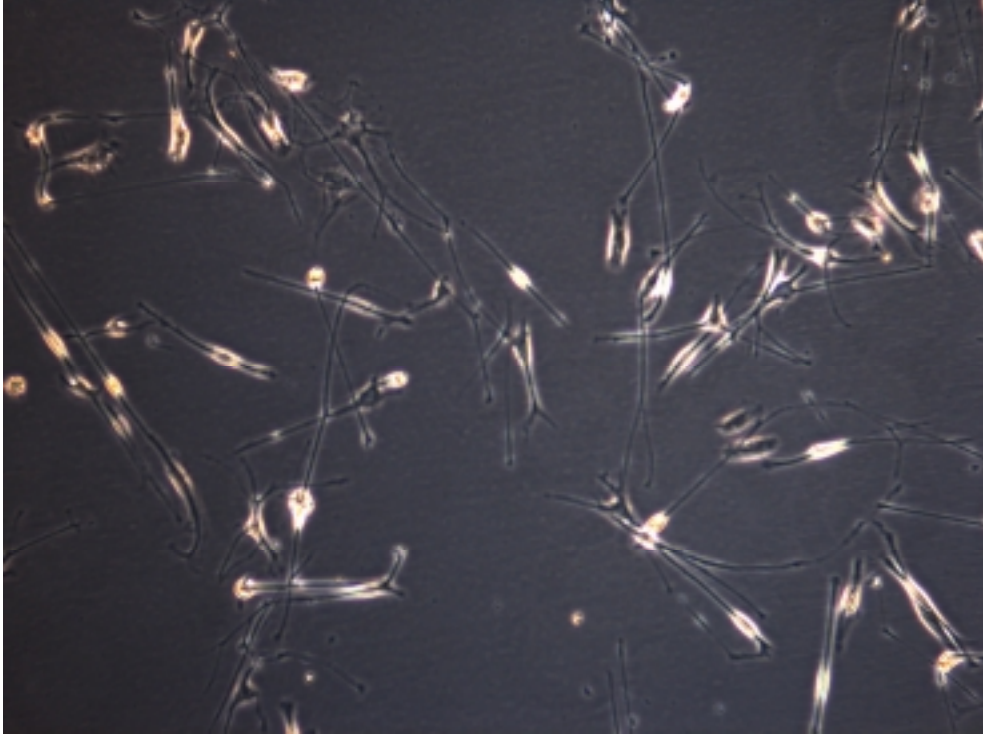
Periferik sinirden izole edilen Schwann hücrelerinin kültüre edildikleri kaplarda fibroblastların da çoğalma riski bulunmaktadır. Fibroblastların çoğalması ise yavaş bölünme eğilimindeki Schwann hücrelerinden önce boş alanların fibroblastlarca kaplanmasına neden olacaktır. Yapılan çalışmalarda kültür kurulduğu zaman ortalama % 7 fibroblast hücre içeriği olmasına karşın, kullandığımız yöntemlerle pasaj sayısı ilerledikçe kültürdeki hücrelerin % 100'e yaklaşan oranını Schwann hücreleri oluşturmaktadır. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda 4. ve 5. pasajdaki hücreler kullanıldı. Ayrıca Schwann hücrelerine özgül S100 proteinine karşı antikorlar ile immün boyama yapılarak kültür kabındaki hücrelerin gerçekten Schwann hücreleri olduğu gösterildi.



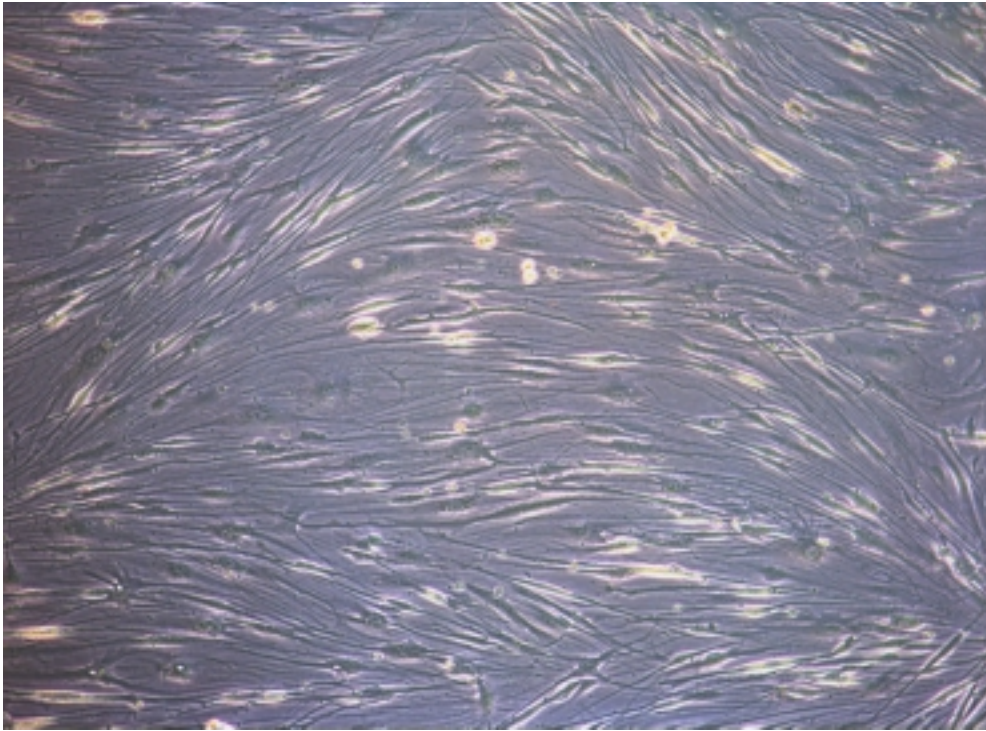
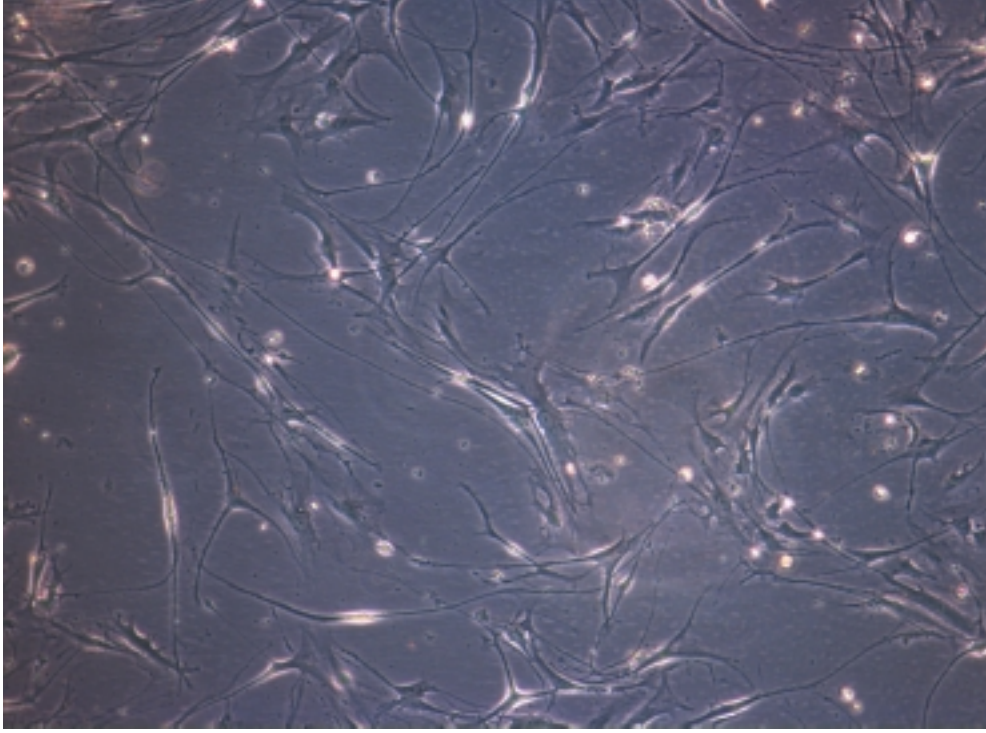
**Şekil 4.1.** S100 ve DAPI ile Schwann hücresinin immün boyaması. (100x büyütme)



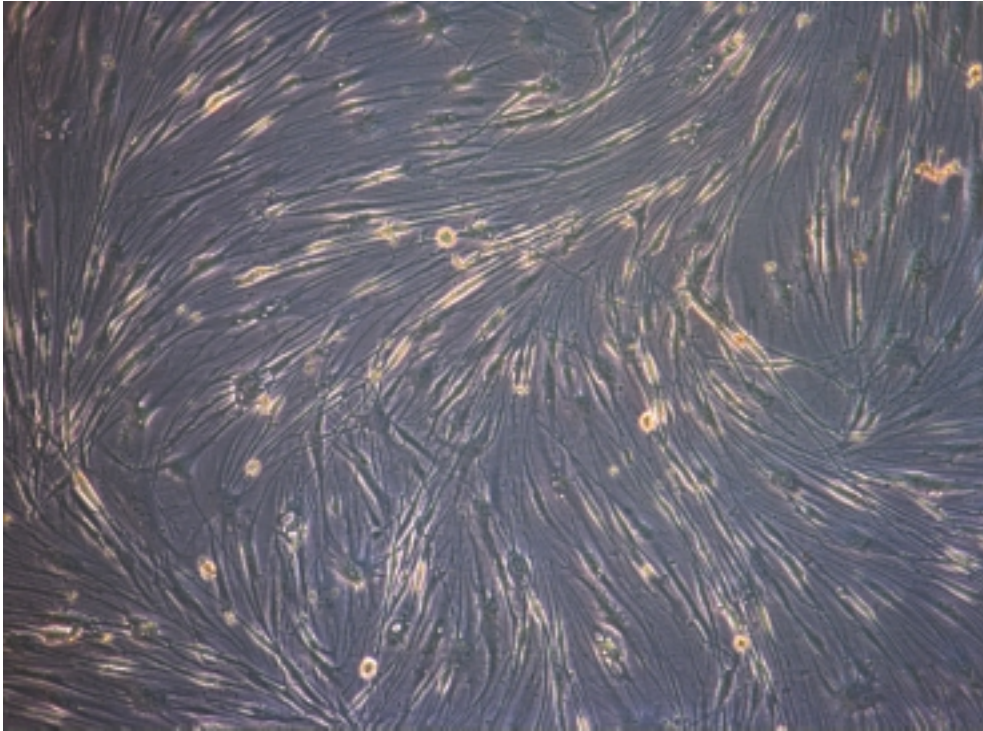
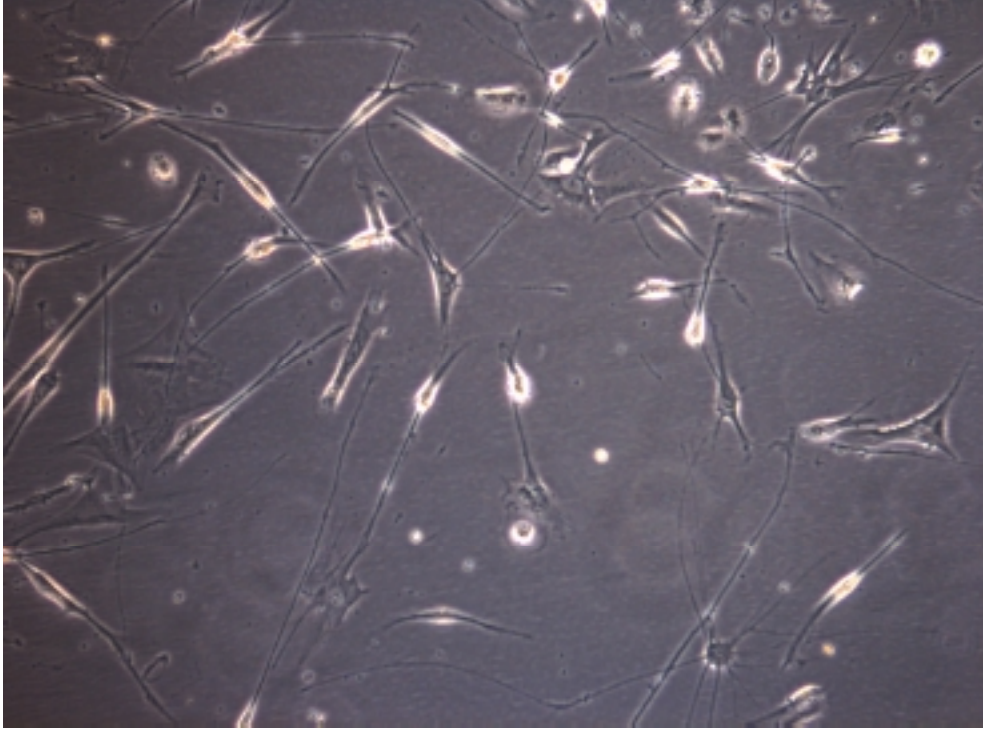
**Şekil 4.2.** S100 ve DAPI ile Schwann hücrelerinin immün boyaması. (40x büyütme)



**Şekil 4.3.** Normal genotipe sahip Schwann hücrelerinin (WT) kültür ortamındaki faz kontrast mikroskopi görüntüsü. (10x büyütme)



**Şekil 4.4.** Nf1 +/- Schwann hücrelerinin (heterozigot) kültür ortamındaki faz kontrast mikroskopi görüntüsü. (10x büyütme)



**Şekil 4.5.** Nf1  $-/-$  Schwann hücrelerinin (KO) kültür ortamındaki faz kontrast mikroskopi görüntüsü. (10x büyütme)

#### 4.2. Hücreslerin bölünme hızlarının karşılaştırılması

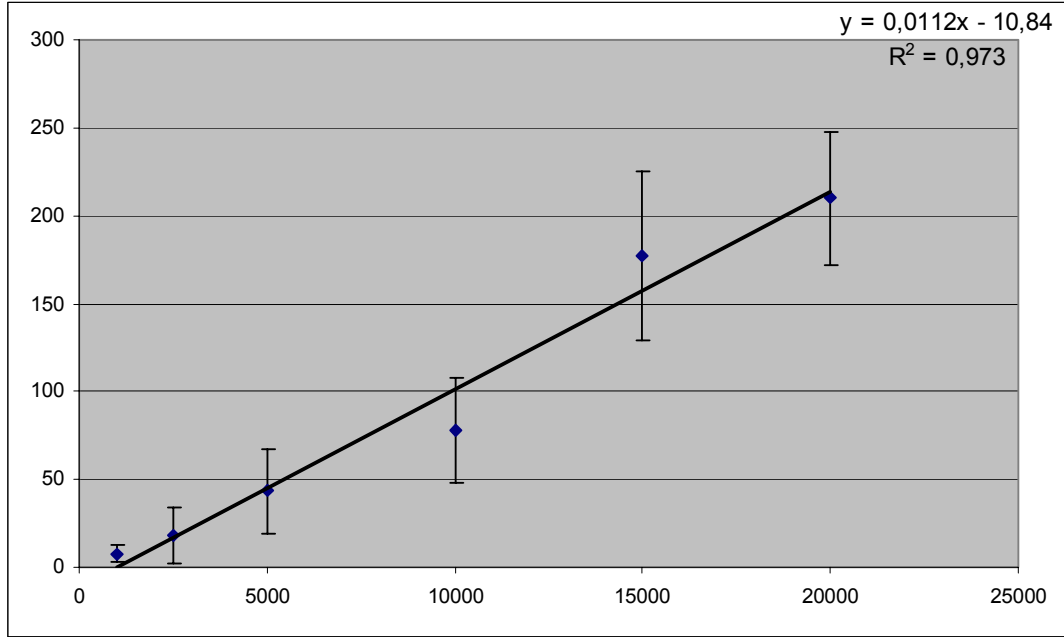
Bu çalışma kapsamında normal, Nf 1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücre kültürlerinin bölünme hızları birbirleriyle kıyaslandı. Hücreslerin bölünme profilleri üzerindeki gözlemlerimiz sonucu, hücre sayılarının 48., 120. ve 192. saatlerde ölçülmesi planlandı.

Hücre sayılarının ölçümünde objektif ve kantitatif değerlendirmeyi sağlaması için *CyQuant NF* Bölünme Deney kiti kullanıldı. Bu kit, hücrenin çekirdek materyalini floresan boya ile işaretleyen bir sistem kullanmaktadır. Floresan şiddeti ile hücre sayılarını korele etmek amacıyla öncelikle standart eğri çizimi gerçekleştirildi.

Standart eğri çizimi için kullanılan hücre sayıları ve ölçülen floresan şiddeti değerleri tabloda verilmiştir.

**Tablo 4.1.** *CyQuant NF* Bölünme Deney kiti kullanılarak yapılan hücre sayımı deneyinde standart eğri çizimi için kullanılan hücre sayıları, elde edilen ortalama floresan şiddeti ve hesaplanan standart sapma değerleri. Ölçümler üçlü tekrar şeklinde yapıldı.

Hücre sayısı	Ortalama floresan şiddeti	Standart sapma
1000	7,617	4,678
2500	18,48067	15,9894
5000	43,36533	24,08219
10000	78,398	29,92412
15000	177,0733	48,25863
20000	210,2533	37,86602

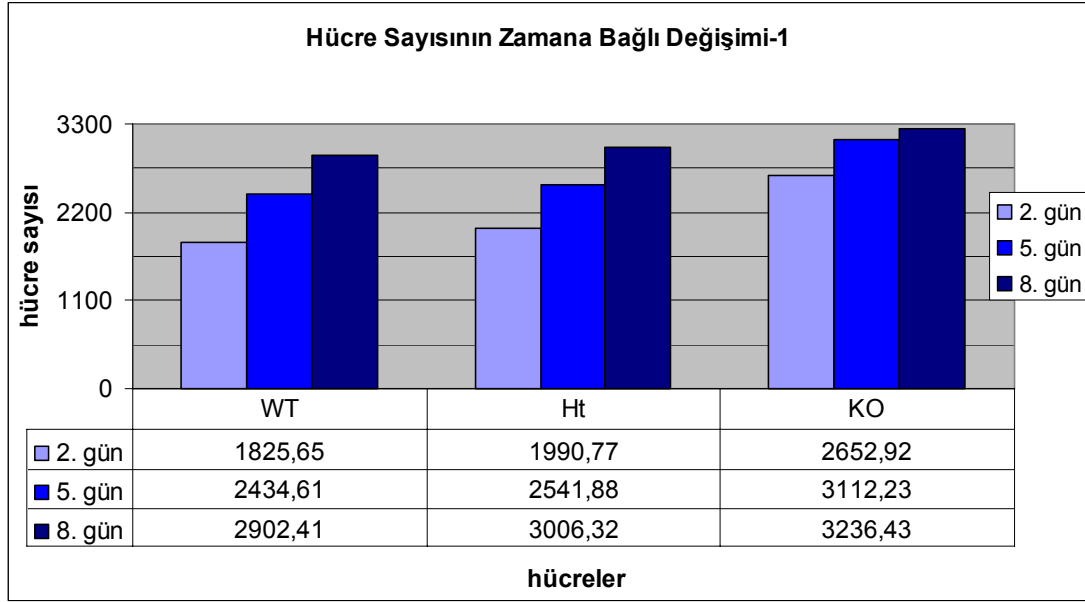


**Şekil 4.6.** *CyQuant NF* Bölünme Deney kiti kullanılarak hesaplanan standart eğri çizimi. Bu deney sonucunda  $R^2 = 0,973$  bulunmuştur. Eğriden hesaplanan denklem  $y = 0,0112x - 10,84$  (y:hücre sayısı, x:floresan şiddeti) bundan sonraki ölçümlerde bulunan floresan şiddeti değerleri x kabul edilerek kullanıldı ve y ile ifade edilen hücre sayıları hesaplandı.

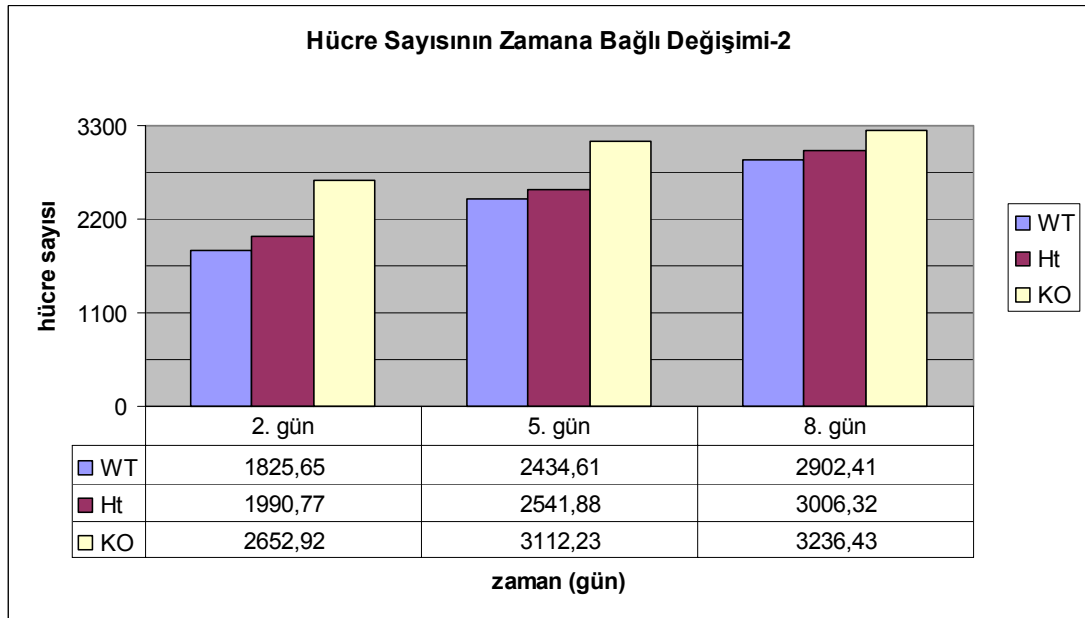
**Tablo 4.2.** *CyQuant NF* Bölünme Deney kiti kullanılarak yapılan bölünme deneyi sonuçları. Tabloda ölçüm yapılan saatler, ölçüm yapılan hücre tipleri ve deneyin tekrar sayısına göre ölçüm sonuçları verilmiştir. WT: normal genotipli Schwann hücresi, Ht: Nf1 +/- Schwann hücresi, KO: Nf1 -/- Schwann hücresi

48 saat (2 gün)				
hücreler	1	2	3	ortalama
WT	1887,83	1967,20	1621,93	1825,65
Ht	1990,12	1962,62	2019,58	1990,77
KO	2520,18	3345,00	2093,57	2652,92
120 saat (5 gün)				
hücreler	1	2	3	ortalama
WT	2246,43	1961,25	3096,16	2434,61
Ht	2626,46	2479,49	2519,67	2541,88
KO	4158,39	2966,07	2212,23	3112,23
192 saat (8 gün)				
hücreler	1	2		ortalama
WT	3119,91	2684,91		2902,41
Ht	2922,98	3089,67		3006,32
KO	3924,24	2548,62		3236,43

Yapılan ölçümler, hücre sayılarının zamana bağlı değişimini göstermek adına aşağıdaki grafiklerde görselleştirilmiştir. İlk grafikte, hücrelerin kendi içlerinde ölçülen günlerdeki hücre sayıları karşılaştırıldı. İkinci grafikte, ölçülen günlerde farklı hücrelerin hücre sayıları birbirleriyle karşılaştırıldı.



**Şekil 4.7.** Hücre sayısının zamana bağlı değişimi-1. WT: normal genotipli Schwann hücresi, Ht: Nf1 +/- Schwann hücresi, KO: Nf1 -/- Schwann hücresi



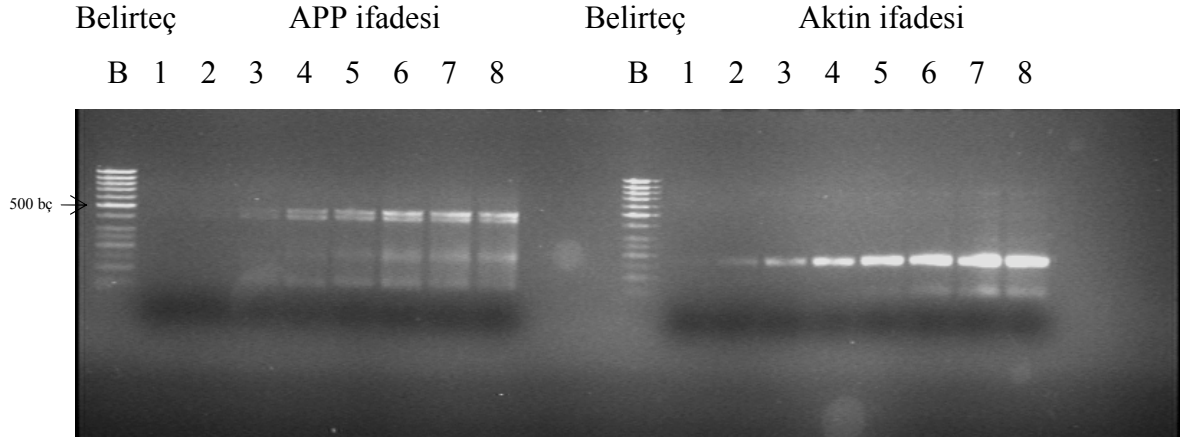
**Şekil 4.8.** Hücre sayısının zamana bağlı değişimi-2. WT: normal genotipli Schwann hücresi, Ht: Nf1 +/- Schwann hücresi, KO: Nf1 -/- Schwann hücresi

### 4.3. Hücrelerin APP ifade düzeylerinin karşılaştırılması

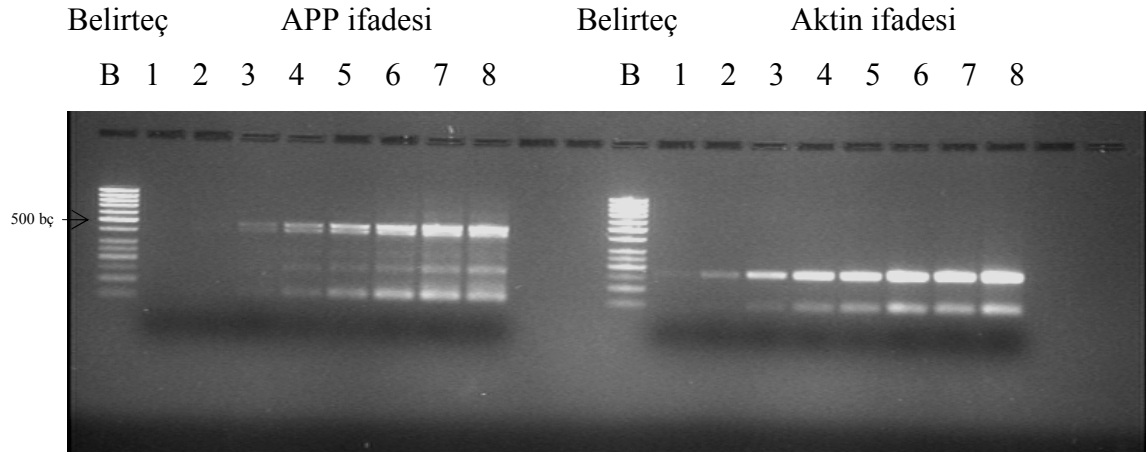
İnsan Schwann hücrelerinde APP varlığını ve ifadesini gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Normal ve Nf1 -/- hücreler APP geni ifadeleri açısından incelendi ve izoformlar açısından değerlendirildi. Kantitatif RT PCR yöntemi ile *housekeeping* gen aktin ifadesi açısından eşitlenen örnekler, yarı kantitatif RT PCR yöntemi ile APP ifadeleri açısından değerlendirildi. APP ifadesi için yarı kantitatif RT PCR kullanılmasının nedeni; APP geninin farklı izoformlarının ifade edilmesinin teknik olarak kantitatif ölçümün yapılmasını engellemesidir. Yarı kantitatif RT PCR ile cDNA örnekleri PCR reaksiyonundan sonra % 2 agaroz jelde yürütüldü ve 50 bç belirteç kullanılarak bantlar değerlendirildi.

APP primerleri, vücutta en yaygın olarak bulunan üç izoform olan 770, 751 ve 695 izoformlarının tespitini sağlaması dikkate alınarak seçildi. İnsan Schwann hücrelerinde bu üç izoformun da ifade edildiği gösterildi.

% 2 agaroz jelde yürütülen örneklerin bantları aşağıda verilmiştir. Nf1 -/- Schwann hücrelerinde APP izoformlarının ifadesinin normal Schwann hücrelerinden daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca bant yoğunluklarına sayısal değer vererek karşılaştırma imkanı sağlayan *Scion Image* isimli bilgisayar programı kullanılarak elde edilen bant şiddeti değerleri tabloda verilmiştir.



**Şekil 4.9.** Normal Schwann hücresinin APP ifadesi. Belirteç olarak 50 bç moleküler ağırlık belirleyicisi: Fermentas DNA *Ladder* (DNA fragmentleri: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 baz çifti) kullanılmıştır. Bantlar RT PCR deneyinde 20 – 34. döngülerdeki APP ve aktin ifadelerini göstermektedir. (B: belirteç, 1: 20. döngü, 2: 22. döngü, 3: 24. döngü, 4: 26. döngü, 5: 28. döngü 6: 30. döngü, 7: 32. döngü, 8: 34. döngü)



**Şekil 4.10.** NF1 <sup>-/-</sup> Schwann hücresinin APP ifadesi. Belirteç olarak 50 bç moleküler ağırlık belirleyicisi: Fermentas DNA *Ladder* (DNA fragmentleri: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 baz çifti) kullanılmıştır. Bantlar RT PCR deneyinde 20 – 34. döngülerdeki APP ve aktin ifadelerini göstermektedir. (B: belirteç, 1: 20. döngü, 2: 22. döngü, 3: 24. döngü, 4: 26. döngü, 5: 28. döngü 6: 30. döngü, 7: 32. döngü, 8: 34. döngü)

**Tablo 4.3.** Scion Image programında ifade düzeylerini gösteren bantların yoğunluklarına göre değerlendirilmesi. Tabloda bantların temsil ettiği ifade, bant alanı ve yoğunluğu verilmiştir. Örneklerde aynı yoğunlukta aktin bandı elde edilmiştir. Bant alanları tüm ölçümlerde aynı değerdedir. WT: normal genotipli Schwann hücresi, KO: Nf1 -/- Schwann hücresi

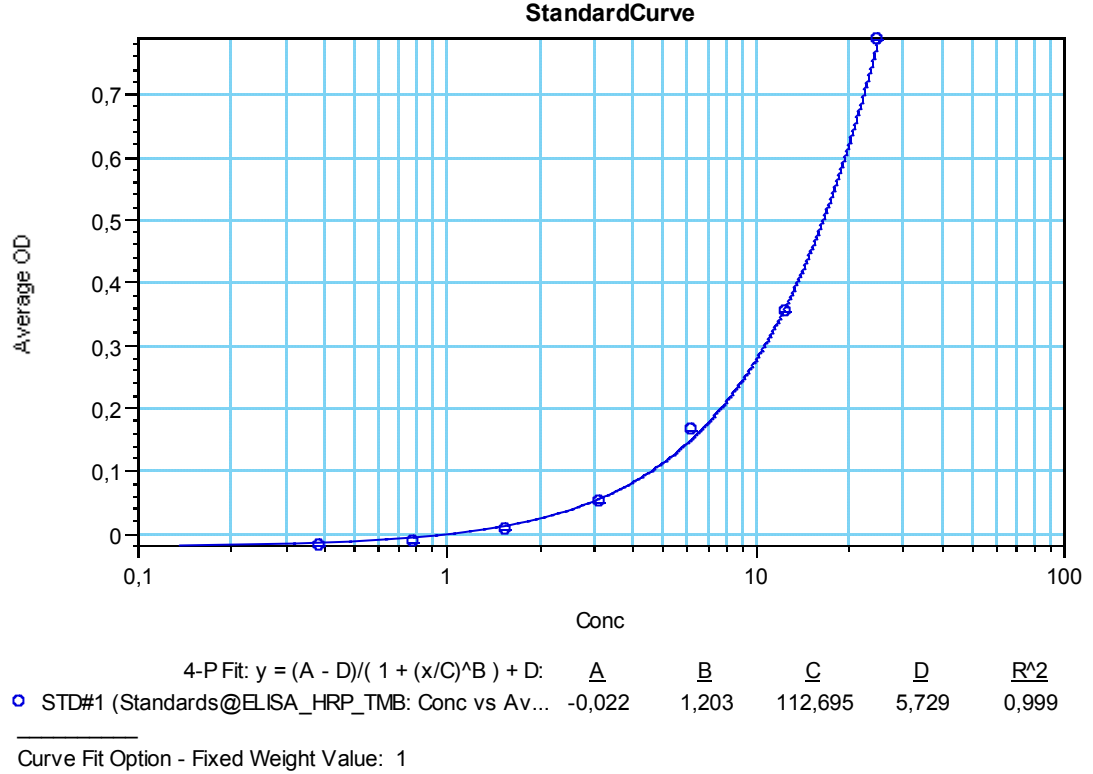
Hücre tipi	Bant	Bant uzunluğu	Bant yoğunluğu
Normal (WT)	Aktin	164 baz çifti	217
	APP 770	469 baz çifti	174
	APP 751	412 baz çifti	167
	APP 695	244 baz çifti	145
Nf1 -/- (KO)	Aktin	164 baz çifti	217
	APP 770	469 baz çifti	205
	APP 751	412 baz çifti	186
	APP 695	244 baz çifti	151

#### 4.4. Hücrelerin ortamlarına salgıladıkları sAPP alfa peptidi düzeylerinin karşılaştırılması

Çalışmamız kapsamında normal, Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücreleri ortama salgıladıkları sAPP alfa peptidi düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Hücreler kültür kabının yüzeyini tamamen kapladıklarında 24 saat boyunca serum içermeyen N2 ortamında inkübe edildiler. Hücrelerin ortamları alınıp sAPP alfa salgısı değerlendirilmesi için ELISA deneyinde kullanıldı. Hücrelerden ise protein izolasyonu yapıldı. Hücrelerin ortamlarına salgıladıkları sAPP alfa düzeyleri birbiriyle karşılaştırılırken değerlendirmenin standardizasyonu hücrelerden elde edilen toplam protein içerikleri göze alınarak yapıldı.

İnsan sAPP $\alpha$  deney kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüm yapılırken, kit içeriğinde bulunan sAPP alfa standartı ile standart eğri çizilmesi gerekmektedir.

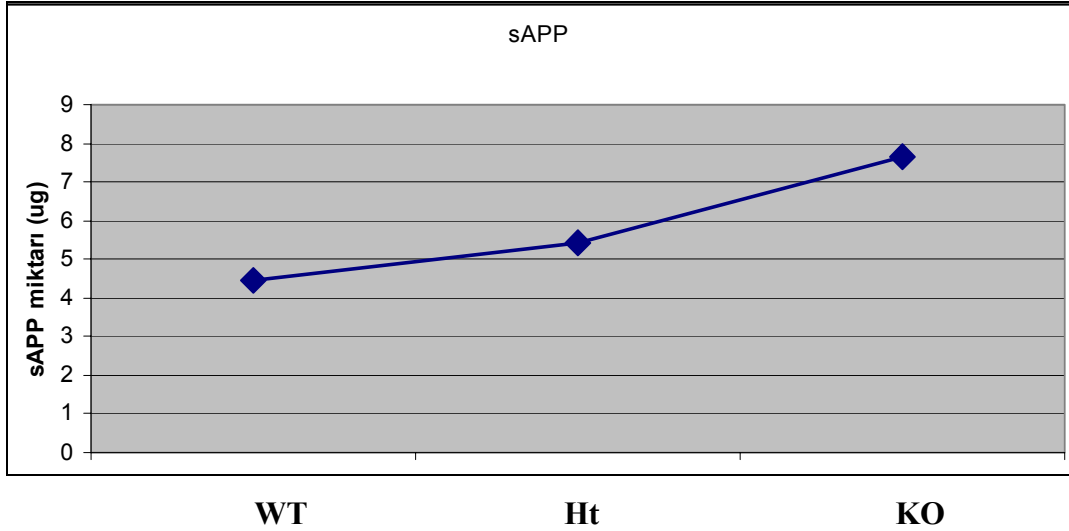
Standart eğri, absorbans ile sAPP alfa konsantrasyonu arasında bir korelasyon kurulmasını sağlar.



**Şekil 4.11.** sAPP $\alpha$  ELISA deney kiti için standart eğri çizimi.  $R^2 = 0,999$  hesaplanmıştır.

**Tablo 4.4.** sAPP $\alpha$  ELISA deney kiti sonuçları. Ölçülen konsantrasyonlar kültür kabından izole edilen toplam protein konsantrasyonuna göre standardize edilmiştir. Kültür kaplarında bulunan ortamın hacmi 3 ml'dir. WT: normal genotipli Schwann hücresi, Ht: Nf1 +/- Schwann hücresi, KO: Nf1 -/- Schwann hücresi

	Toplam protein	Konsantrasyon	Toplam hacim = 3 ml'deki miktar
Wt	3mg/ml	1,49 ng/ul	4,47 ug
Ht	3 mg/ml	1,81 ng/ul	5,43 ug
KO	3,3mg/ml	2,55 ng/ul	7,66 ug



**Şekil 4.12.** Ortamdaki sAPP alfa salgı miktarının karşılaştırılması. WT: normal genotipli Schwann hücresi, Ht: Nf1 +/- Schwann hücresi, KO: Nf1 -/- Schwann hücresi

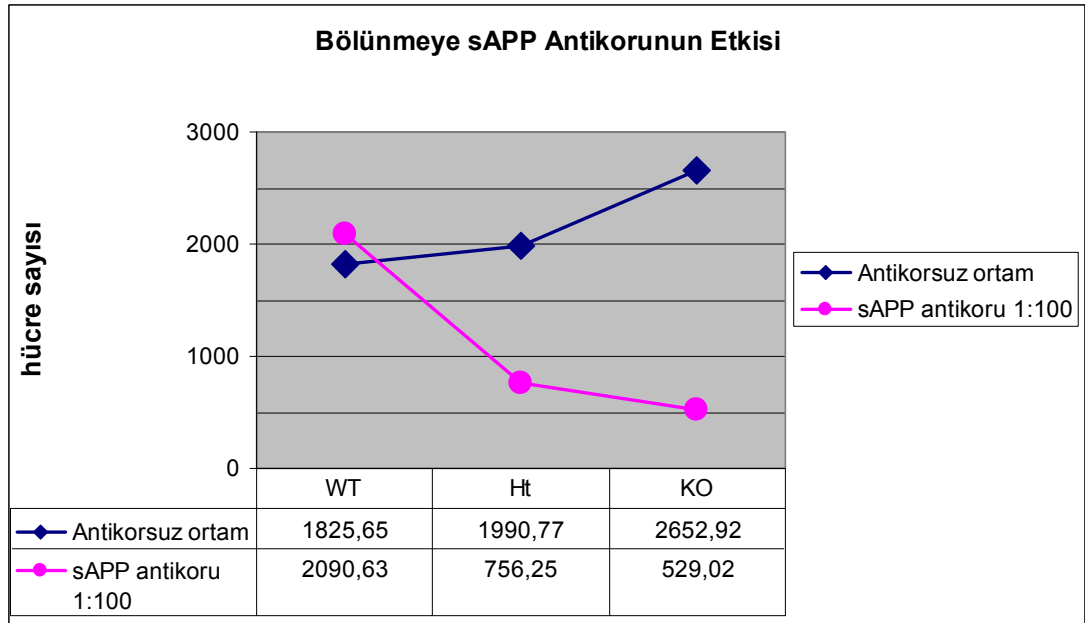
#### 4.5. Hücelere sAPP bloke eden monoklonal antikor uygulanmasının hücre bölünme hızına etkisi

A4/22C11 monoklonal antikorunu sAPP'ye bağlanmaktadır. Daha önceki çalışmalarda, bu antikorun sAPP'nin hücre bölünmesini uyarıcı etkisini azalttığı gösterilmiştir (5-7,9). Bizim çalışmamızda 1:100 derişimdeki A4/22C11 monoklonal antikorunu ile hücreler 24 saat inkübe edildi (5) ve aynı hücrelerin antikor uygulanmayan örnekleri ile hücre sayılarındaki değişim açısından *CyQuant* NF bölünme deney kiti ile kıyaslandı.

sAPP antikorunun hücre ortamına ilave edilmesi; hücrelerin bölünme hızında azalmaya neden olmuş, aynı süre sonunda normal ortamda inkübe edilen hücelere kıyasla daha düşük sayıda hücre sayımları elde edilmiştir.

**Tablo 4.5.** sAPP bloke edici antikor eklenen ortamda inkübasyon sonrası *CyQuant NF* Bölünme Deney kiti ile ölçülen hücre sayıları. Ortamdaki antikorun derişimi 1:100'dür (5). WT: normal genotipli Schwann hücresi, Ht: Nf1 +/- Schwann hücresi, KO: Nf1 -/- Schwann hücresi

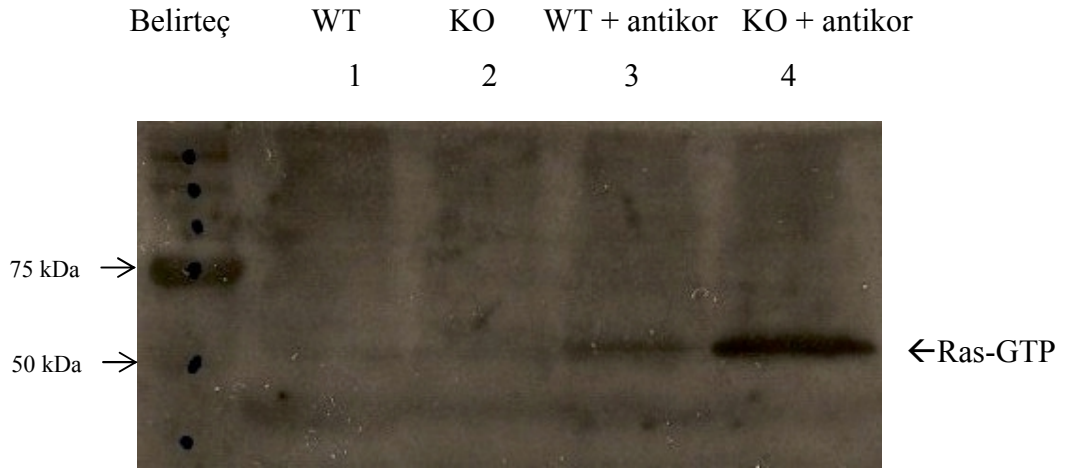
sAPP bloke edici antikor (1:100) ile inkübasyon sonrası				
hücreler	1	2	3	Ortalama
WT	1417,86	2763,39		2090,625
Ht	472,77	1039,73		756,25
KO	793,30	446,87	346,87	529,02



**Şekil 4.13.** sAPP bloke eden antikor eklenen ortamda inkübe edilen hücrelerin *CyQuant NF* Bölünme Deney kiti ile ölçülen hücre sayılarının grafik olarak incelenmesi. Ortamdaki antikorun derişimi 1:100'dür (5). WT: normal genotipli Schwann hücresi, Ht: Nf1 +/- Schwann hücresi, KO: Nf1 -/- Schwann hücresi

#### 4.6. Hücrelerin Ras aktivitesi düzeylerinin karşılaştırılması ve APP bloke edici antikor uygulanmasının Ras aktivitesi düzeyleri üzerindeki etkisi

Nörofibromin Ras yolağının negatif düzenleyicisi olarak çalışır. Aktif Ras formu Ras-GTP'nin inaktif olan Ras-GDP'ye dönüşümünü hızlandırarak yolağın aşırı uyarılmasını engeller. Nörofibrominin yokluğunda, hücrelerde bu yolak negatif kontrolden kaçtığı için aşırı aktiftir. Ras-GTP düzeyi yükselir ve uyarı devam eder. Tez çalışması kapsamında hücrelerin farklı durumdaki Ras aktivite düzeylerini karşılaştırabilmek amacıyla immün çöktürme ve western blot teknikleri kullanıldı. İmmün çöktürme sadece aktif Ras formunu tanıyıp ona bağlanan *Raf1-Ras binding domain (RBD)* taşıyan agaroz solüsyonu ile yapıldı. Raf1, Ras yolağında Ras'ın aktifleşince uyardığı bir alt basamağındaki proteindir. Hücrelerin protein içeriği RBD takılı agaroz ile inkübe edilerek yalnızca aktif Ras formunun bağlanıp çökmesi sağlandı. Çöken pelet western blot yöntemiyle monoklonal Ras antikoruna boyanarak aktif Ras formunun görselleştirilmesi gerçekleştirildi. Ras – GTP, immünçöktürme sonrasında RBD ve ara gruplara takılı olarak 50 – 75 kDa arasında bant vermiştir.



**Şekil 4.14.** Normal ve *Nf1*  $-/-$  Schwann hücrelerinin normal ve antikor içeren ortamlarda aktif Ras düzeyi. Normal ve *Nf1*  $-/-$  Schwann hücrelerinin normal ortamda inkübe edilen örnekleri belirteçin yanındaki 1. ve 2. kuyucuklardadır. 3. ve 4. kuyucuklarda ise aynı tip hücrelerin 24 saat 1:100 derişimdeki sAPP bloke eden A4/22C11 monoklonal antikorunda inkübe edilen örnekleri bulunmaktadır. Belirteç

olarak iki renkli protein moleküler ağırlık belirleyicisi (*Biorad, Precision Plus Protein Standarts, Dual Color* marker, protein bantları: 200, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10kDa) kullanıldı.

Elde edilen sonuçlar yukarıdaki şekilde görülmektedir. Deney sonuçlarına göre sAPP uyarısının baskılanması hücrelerde kompensatuar bir Ras aktivitesi artışına yol açmaktadır. Her iki hücre tipinde de antikor ile baskılanmış örnekte daha güçlü bir Ras aktif form bandı elde edilmiştir. Nf1 -/- Schwann hücreleri sAPP baskılayıcı antikorun etkisine daha duyarlı olup daha belirgin kuvvette bir aktif Ras formu bandı vermiştir.

## 5. TARTIŞMA

Nörofibromatozis tip 1 (NF1), yaklaşık 3000'de 1 görülme sıklığıyla yaygın bir otozomal dominant hastalıktır. NF1 hastalığı, 17. kromozomda bulunan Nf1 genindeki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar. Nf1 gen ürünü nörofibrominin kaybı ile, hücrede Ras sinyal yolağının devamlı aktivasyonu ve hücre proliferasyonu görülür.

NF1, klinik olarak birinci derecede periferik sinir sistemi olmak üzere, vücudun çeşitli organ ve sistemlerini tutar. Temel karakteristik bulgularından biri nörofibrom oluşumudur. Nörofibromlar, periferik sinir kılıfının iyi huylu tümörüdür. Nörofibromda Schwann hücreleri, fibroblastlar, perinöral hücreler ve mast hücreleri bulunur. Nörofibromlar birden fazla tipte hücre içermelerine rağmen, tümöral oluşumun kaynağının Nf1 -/- Schwann hücreleri (KO) olduğu bilinmektedir (36). NF1 hastalarının ikinci alleli de inaktif olan Schwann hücreleri (Nf1 -/-), çevredeki Nf1 +/- hücrelerden gelen uyarılarla aşırı bölünmeye itilir. Çeşitli hücre dışı matriks moleküllerinin ve hücre salgılarının (tümör mikroçevresi) tümör gelişimine etkisi yoğun bir biçimde araştırılmaktadır. Büyüme faktörleri, kit ligandı ve mast hücre salgıları nörofibrom oluşumu açısından çalışılmakta, Ras yolağı ile olası ilişkiler kurulmaya çalışılmaktadır (42,43).

Ras yolağı ile etkileşimi gösterilen proteinlerden biri de Alzheimer / amiloid prekürsör proteini (APP)'dir. APP ve kesim ürünü sAPP $\alpha$ , Ras yolağını uyarır. APP'nin adaptör protein Grb2 ile ilişkili olduğu ve Erk1-2 sinyalini uyardığı gösterilmiştir (58,77,78). Alzheimer hastalarının beyin örneklerinde Ras yolağının üyesi Raf-1 aktivitesinde artış saptanmıştır (79). Ras yolağının da APP ifadesi üzerine etkileri incelenmektedir. Ras yolağı elemanlarından Erk1-2; APP mRNA ifadesini artırmaktadır (48).

APP'nin Alzheimer hastalığı dışında ilişkilendirildiği hastalıklar arasında çeşitli kanserler bulunmaktadır. APP ve sAPP alfa oral skuamöz hücreli ve pankreatik kanserlerde fazla ifade edilmektedir (5,80). APP, nöron ve keratinosit

hücre kültürlerinde büyüme faktörü gibi davranmakta, bölünmeyi artırmaktadır (54,55). Bu bilgiler ışığında APP ve kesim ürünü sAPP $\alpha$ 'nın Ras yolağı ile karşılıklı etkileşim altında olduğu ve bölünmeyi uyarıcı etkilerinde bu ilişkilerinin önem taşıdığı düşünülmektedir.

Tez çalışmamızın çıkış noktası, APP ile Ras yolağı arasındaki ilişkiyi Ras yolağının aşırı aktivasyonunun neden olduğu bir hastalık olan NF1'de incelemektir. Hastalığın en önemli bulgularından biri olan periferik sinir kılıfı tümörleri nörofibromlar üzerinde çalışılmıştır. NF1 hastalarının Nf1 +/- Schwann hücreleri ve nörofibrom oluşumunu tetikleyen Nf1 -/- Schwann hücreleri Ras yolağının aşırı uyarıldığı durumu göstermek amacıyla kontrol Schwann hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Kontrol Schwann hücreleri NF1 hastası olmayan, periferik nöropati benzeri sonuçları etkileyebilecek rahatsızlığı bulunmayan bireylerden izole edilmiştir.

Schwann hücreleri organizmada olduğu gibi kültür şartlarında da yüksek bölünme hızı göstermemektedir. Schwann hücrelerinin bölünme hızlarını ve sağ kalımlarını artırmak amacıyla bazı araştırmacılar hücreleri % 6-10 CO<sub>2</sub> içeren etüvlerde inkübe etmek gerektiğini savunmaktadır. Genel olarak hücre kültürleri % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvlerde inkübe edilmektedir. Fakat, Schwann hücreleri gibi organizmada kanlanması nispeten daha az olan yerlerdeki hücrelerin kültürleri esnasında CO<sub>2</sub> oranını yükseltmenin faydalı olduğu gözlenmektedir. Deneylerimiz esnasında genel olarak kullanılan % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvlerde çalışıldığında Schwann hücrelerinin yaklaşık 3-4 haftalık sürede kültür kabını kapladığı gözlemlenmiştir. Etüv % 10 CO<sub>2</sub> oranına ayarlandığında ise Nf1 -/- Schwann hücrelerinin yüzeyi kaplaması için yaklaşık 2 hafta süre yeterli olmaktadır, normal hücrelerde yüzeyi kaplamada bir hızlanma olmamıştır.

Tez çalışmamızın ilk basamağında, normal, Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücreleri bölünme özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Tümör oluşturma karakteri kazanan, Ras yolağı hiperaktif Nf1 Schwann hücreleri, normal hücrelere göre aynı şartlar altında daha yüksek hücre sayısına ulaşmıştır. Aynı sayıda hücre ile

başlanan deneyde, ölçüm yapılan 2., 5. ve 8. günlerin hepsinde hücre sayıları küçükten büyüğe doğru normal, Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücreleri şeklinde sıralanmıştır. 8. güne kadar üç hücre tipinde de hücre sayısında giderek artış gözlenmiştir. Bu deneyler ile; normal, Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücrelerinin hücre kültürü şartlarında bölündükleri, bölünmenin beklendiği üzere Nf1 heterozigot hücrelerde normal hücrelerden yüksek, Nf1 homozigot mutant hücrelerde ise en yüksek olduğu bulunmuştur.

İnsan Schwann hücrelerinde APP varlığını ve ifadesini gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Tez çalışmamızda Schwann hücrelerinde APP gen ifadesinin varlığını araştırmak ve izoformlarını tespit etmek amacıyla RT PCR tekniği kullanılmıştır. APP izoformları, 7 ve 8 numaralı ekzonların alternatif “*splicing*”i ile oluşur. Bu izoformlardan APP695 ifadesi beyin dokusunda yüksektir, APP751 ve APP770 polipeptitleri nöron dışı hücrelerde yaygın olarak ifade edilir. Deney sistemimizde, 6 ve 10 numaralı ekzonların dizilerinden uygun primerler seçilerek izoformların 7 ve 8. ekzonları içerip içermemelerine göre farklı uzunlukta bant oluşturmaları sağlanmıştır.

Yarı kantitatif RT PCR sonrası %2’lik agaroz jelde yürütülen örneklerin değerlendirilmesinin objektifliğini artırmak adına, reaksiyon öncesi örnekler aynı düzeyde *housekeeping* gen ifade edecek derişimde ayarlanmıştır. PCR reaksiyonu ve jelde yürütme sonrası çekilen fotoğraflar *Scion Image* programı kullanılarak bant parlaklıklarına göre değerlendirilmiştir. Aynı olduğu bilinen *housekeeping* gen ifadesi aynı yoğunlukta bant veren fotoğraflar APP ifadesinin karşılaştırılması için seçilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, Schwann hücreleri, APP geninin en yaygın 3 izoformu olan 695, 751 ve 770 formlarını ifade etmektedir. Normal ve Nf1 -/- Schwann hücreleri karşılaştırıldığında, nörofibrominin kaybının görüldüğü hasta hücrelerinde APP ifadesinin daha fazla olduğu görülmüştür. 3 izoform için de bu fark gözlenmiştir. Tümör oluşturan hücre tipinde (Nf1 -/-) normal genotipli hücreye göre

APP gen ifadesinin daha fazla olması, bu genin ürünü olan proteinin tümör oluşumuna katkısı olduğu hipotezimizi desteklemektedir.

APP proteinin alfa sekretazlar tarafından kesilmesi sonucu oluşan hücre dışı salgısı sAPP alfa'nın proliferasyonu artıran bir etkisinin olduğu farklı hücrelerde gösterilmiştir (5,9,54,55,80). Çalışmalarımız sırasında Schwann hücrelerinde APP ifade düzeyleri karşılaştırıldıktan sonra, kesim ürünü sAPP alfa üretimleri protein düzeyinde kıyaslanmıştır. Buna göre, kesim ürünü sAPP alfa'nın düzeyi; normal, NF1 +/- ve NF1 -/- Schwann hücrelerinde sırasıyla artmaktadır, en düşük sAPP alfa normal hücrelerde bulunurken, en yüksek bulunan tümör geliştiren homozigot mutant hücrelerdedir. Bu bulgu, RNA düzeyinde yapılan deneyle uyumludur ve hipotezimizi desteklemektedir.

Nörofibrom oluşturan hücrelerin bölünme hızının, APP ifadesinin ve sAPP alfa üretiminin normal hücrelerden daha fazla olduğunun gösterilmesinin ardından, sAPP alfa etkisinin baskılanmasının sonuçları incelenmiştir. sAPP alfa bloke edici antikor uygulanması sonucu, hücre sayım değerleri; en yüksek normal Schwann hücrelerde, en düşük ise Nf1 -/- Schwann hücrelerde tespit edilmiştir. Normal Schwann hücre ortamındaki bölünme hızının normalden homozigot mutante gidildikçe artmasına rağmen, antikor uygulanmış ortamdaki hücrelerin tam tersi bir sonuç göstermeleri tümör oluşturan Schwann hücrelerinin ortamdaki sAPP alfa salgısının etkilerine hedef olduğunu göstermektedir. sAPP alfa'nın nörofibrom oluşumunda rol aldığı yönündeki hipotezimize uygun olarak, sAPP alfa baskılanmasının bölünmeyi azaltıcı etkisi en çok nörofibrom oluşumunu tetikleyen hücre tipinde gözlenmiştir.

APP ifadesi ve işlenmesinin Nf1 -/- Schwann hücrelerde normal hücrelere oranla daha yüksek olması ve bu bulgunun bölünme hızıyla paralel gitmesi, nörofibrom oluşumundaki bölünme artışında APP'nin rolü olduğunu göstermiştir.

Ras yolağı çeşitli sinyal iletimleri ile ilişki halinde bir yolaktır. Çeşitli büyüme faktörleri tarafından uyarılan hücrede Ras GDP-GTP dönüşümüyle aktifleşir

ve alt basamağındaki elemanları indükler. Ras yolağının uyarımı, NF1 hastalığında olduğu gibi en tepeden aktif Ras formu üzerinden olabileceği gibi; yolağın son efektör peptidine kadar herhangi bir düzeyden uygulanabilir (81).

Deneylerin bu aşamasında, sAPP alfa'nın bölünme üzerindeki artırıcı etkisinin gözlenmesinin, aktif Ras düzeyi üzerinden gidip gitmediği sorusu gündeme getirilmiştir. Normal ve Nf1 -/- Schwann hücreleri normal ortamda ve sAPP bloke edici antikor içeren ortamda inkübe edilerek aktif Ras düzeyi açısından karşılaştırılmıştır. NF1 -/- hücrenin, normal Schwann hücreyle aktif Ras düzeyi açısından farkı teorik olarak bilinmesine rağmen; deney sonuçlarında bantlar arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Hücrelerin normal ortamdaki örnekleriyle sAPP antikor eklenmiş ortamdaki örnekleri karşılaştırıldığında ise belirgin bir fark göze çarpmaktadır. sAPP alfa'ya bağlanarak hücrelere etki etmesini engelleyen ve bölünmeyi azaltan monoklonal antikor uygulanması, aktif Ras formu düzeyinde artışa neden olmuştur. Aktif Ras formu, antikor uygulanan Nf1 -/- hücrelerde normal Schwann hücrelerinden daha fazla yükselmiştir. Bu deney sonucunda, APP'nin kesim ürününün bölünmeyi artırıcı etkisinin, Ras-GTP düzeyini direk artırmak yoluyla olmadığı düşünülmektedir. Aktif Ras'ın alt basamaklarında gerçekleşen olası bir APP etkisi antikorlu ortamda engellendiğinde; yolağın aktivitesini korumak için daha üst basamaklarda (aktif Ras formu düzeyinde) bir artış görülüyor olabilir. Bu nedenle, sAPP'nin Ras yolağı ile ilişkisi; sinyal iletiminde rol alan diğer basamakların araştırılmasıyla daha da aydınlatılacaktır.

Nörofibromdan izole edilen hücrelerde APP ifadesi ve işlenmesi yüksek bulunmuş, sAPP alfa etkisi bloke edildiğinde bölünme hızının azaldığı gösterilmiştir. APP, NF1 hastalığında görülen tümörler için yeni tedavi çalışmalarında hedef bir molekül olabilir. NF1 dışında Ras yolağının hiperaktivasyonu ile giden diğer patolojiler, özellikle tümörler için de (81) APP'nin önemi araştırılmalı ve tedavi için kullanılabilir bir hedef olarak değerlendirilmelidir. sAPP $\alpha$  oluşturan  $\alpha$ -sekretazlar da yeni bir tedavi hedefi oluşturabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Normal, Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücreleri, hücre kültürü şartlarında bölünme hızları açısından değerlendirilmiştir. Beklendiği üzere, normal hücrelerin en yavaş, Nf1 -/- hücrelerin ise en hızlı bölündüğü gösterilmiştir.
- İnsan Schwann hücrelerinde APP varlığını ve ifadesini gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Tez çalışmamız ile Schwann hücrelerinin APP ifade ettiği ve APP işlenmesiyle oluşan kesim ürünü sAPP alfa ürettiği gösterilmiştir.
- APP ifadesinin normal genotipli hücreye göre Nf1 -/- Schwann hücrelerinde daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Nörofibromdan izole edilen, tümör oluşumu ile ilişkilendirilen hücre tipinde (Nf1 -/- Schwann hücresi) APP gen ifadesinin, normal genotipli Schwann hücresinden daha yüksek olması; APP'nin nörofibrom oluşumunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir.
- APP proteinin alfa sekretazlar tarafından kesilmesi sonucu oluşan hücre dışı salgısı sAPP alfa, bölünmeyi uyarıcı bir etkiye sahiptir. Normal, Nf1 +/- ve Nf1 -/- Schwann hücreleri sAPP alfa salgıları açısından karşılaştırıldığında, en düşük düzey normal hücrelerde, en yüksek düzey ise Nf1 -/- hücrelerde bulunmuştur. Bu bulgu, Schwann hücrelerinde gösterdiğimiz APP ifadesi ile uyumludur ve APP ifadesi ile işlenmesinin uyumluluğunu göstermektedir. Ayrıca, sAPP alfa üretimi ile hücre bölünme hızlarının hücreler arasında paralel gitmesi (normal hücrelerde en düşük, Nf1 -/- hücrelerde en yüksek) sAPP alfa'nın Schwann hücreleri için proliferatif etki gösterdiği hipotezimizi desteklemektedir.
- sAPP alfa'nın nörofibrom oluşumunda rol aldığı ve Schwann hücrelerinin bölünmesini artırdığı yönündeki hipotezimize uygun olarak, sAPP alfa baskılanmasının bölünmeyi azaltıcı etkisi en çok Nf1 -/- Schwann hücrelerinde gösterilmiştir.

- Schwann hücrelerinde APP ve sAPP alfa'nın bölünmeyi uyarıcı etkisinin, direk olarak aktif Ras formu düzeyini artırmak yoluyla olmadığı sonucuna varılmıştır. APP ve Ras yolağı arasındaki ilişkinin aydınlatılması için yolağın diğer basamakları üzerinde de benzer deneyler yapılması gerekmektedir.
- Ras yolağının hiperaktivasyon modeli olan NF1 -/- Schwann hücrelerinde APP ifade ve işlenmesinin yüksek bulunması, APP'nin bu hücrelerde Ras yolağı tarafından kontrol edildiğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, başka hücrelerde de kurulan Ras yolağı – APP ilişkisini destekler niteliktedir.
- Nf1 -/- Schwann hücrelerinde, Nf1 +/- ve normal Schwann hücrelerine göre daha yüksek bölünme hızı görülmektedir. Nf1 -/- hücreler daha yüksek düzeyde APP ifade etmektedir. APP işlenmesi sonucu elde edilen sAPP alfa'nın salgılanması, Nf1 +/- ve normal hücrelerden daha fazladır. Nf1 -/- hücrelerde, sAPP alfa bloke edici antikorun bölünme üzerinde azaltıcı etkisi diğer hücrelerden daha belirgindir. Tez çalışmamızın bulgularıyla, nörofibrom oluşumundan sorumlu tutulan Nf1 -/- Schwann hücrelerinin yüksek bölünme hızında APP ifadesi ve işlenmesinin etkisi olabileceği düşünülmektedir.
- Bundan sonraki çalışmalarımızda, nörofibromdan izole edilen hücrelerde sAPP alfa üretimini engelleyen alfa sekretaz inhibitörlerinin etkilerinin çalışılması, böylece APP'nin nörofibromlar için tedavi hedefi olup olamayacağının incelenmesi planlanmaktadır. (4)
- Takip eden çalışmalarda Ras yolağının da etkilendiği farklı tümör tiplerinde bölünme ile APP arasındaki ilişkinin araştırılması planlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Brems, H., Beert, E., de Ravel, T., Legius, E. (2009) Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *Lancet Oncol*, 10 (5), 508-515.
2. Yu, X., Chen, S., Potter, O.L., Murthy, S.M., Li, J., Pulcini, J.M. ve diğerleri. (2005) Neurofibromin and its inactivation of Ras are prerequisites for osteoblast functioning. *Bone*, 36 (5), 793-802.
3. Zhu, Y., Ghosh, P., Charnay, P., Burns, D.K., Parada, L.F. (2002) Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science*, 296 (5569), 920-922.
4. Hooper, N.M., Turner, A.J. (2002) The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*, 9 (11), 1107-1119.
5. Hansel, D.E., Rahman, A., Wehner, S., Herzog, V., Yeo, C.J., Maitra, A. (2003) Increased expression and processing of the Alzheimer amyloid precursor protein in pancreatic cancer may influence cellular proliferation. *Cancer Res*, 63 (21), 7032-7037.
6. Hoffmann, J., Twisselmann, C., Kummer, M.P., Romagnoli, P., Herzog, V. (2000) A possible role for the Alzheimer amyloid precursor protein in the regulation of epidermal basal cell proliferation. *Eur J Cell Biol*, 79 (12), 905-914.
7. Ko, S.Y., Lin, S.C., Chang, K.W., Wong, Y.K., Liu, C.J., Chi, C.W. ve diğerleri. (2004) Increased expression of amyloid precursor protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 111 (5), 727-732.
8. Meng, J.Y., Kataoka, H., Itoh, H., Koono, M. (2001) Amyloid beta protein precursor is involved in the growth of human colon carcinoma cell in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, 92 (1), 31-39.
9. Quast, T., Wehner, S., Kirfel, G., Jaeger, K., De Luca, M., Herzog, V. (2003) sAPP as a regulator of dendrite motility and melanin release in epidermal melanocytes and melanoma cells. *FASEB J*, 17 (12), 1739-1741.
10. Ferner, R.E., Huson, S.M., Thomas, N., Moss, C., Willshaw, H., Evans, D.G., Upadhyaya, M., Towers, R., Gleeson, M., Steiger, C., Kirby, A. . (2007) Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J. Med. Genet.*, 44, 81-88.
11. Shen, M.H., Harper, P.S., Upadhyaya, M. (1996) Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J. Med. Genet.*, 33 (1) 2-17.

12. Easton, D.F., Ponder, M.A., Huson, S.M., Ponder, B.A. (1993) An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet*, 53 (2), 305-313.
13. Trovo-Marqui, A.B., Tajara, E.H. (2006) Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet*, 70 (1), 1-13.
14. Habib, A.A., Gulcher, J.R., Hognason, T., Zheng, L., Stefansson, K. (1998) The OMgp gene, a second growth suppressor within the NF1 gene. *Oncogene*, 16 (12), 1525-1531.
15. Wang, K.C., Koprivica, V., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R.L. ve diğerleri. (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*, 417 (6892), 941-944.
16. Skuse, G.R., Cappione, A.J. (1997) RNA processing and clinical variability in neurofibromatosis type I (NF1). *Hum Mol Genet*, 6 (10), 1707-1712.
17. Cichowski, K., Jacks, T. (2001) NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell*, 104 (4), 593-604.
18. Arimura, N., Kaibuchi, K. (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8 (3), 194-205.
19. NIH consensus development conference (1988). [Bildiri].
20. McLaughlin, M.E., Jacks, T. (2002) Thinking beyond the tumor cell: Nf1 haploinsufficiency in the tumor environment. *Cancer Cell*, 408-410.
21. Ylä-Outinen, H. (2002). Nf1 tumor suppressor in skin: Expression in response to tissue trauma and in cellular differentiation. University of Oulu.
22. Korf, B.R. (1992) Diagnostic outcome in children with multiple cafe au lait spots. *Pediatrics*, 90 (6), 924-927.
23. Korf, B.R. (1999) Plexiform neurofibromas. *Am J Med Genet*, 89 (1), 31-37.
24. Evans, D.G., Baser, M.E., McGaughran, J., Sharif, S., Howard, E., Moran, A. (2002) Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*, 39 (5), 311-314.
25. Ferner, R.E., Gutmann, D.H. (2002) International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer Res*, 62 (5), 1573-1577.
26. Cichowski, K., Shih, T.S., Schmitt, E., Santiago, S., Reilly, K., McLaughlin, M.E. ve diğerleri. (1999) Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science*, 286 (5447), 2172-2176.

- 27.Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M.,Harris, C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54 (18), 4855-4878.
- 28.Vogel, K.S., Klesse, L.J., Velasco-Miguel, S., Meyers, K., Rushing, E.J.,Parada, L.F. (1999) Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. *Science*, 286 (5447), 2176-2179.
- 29.Carroll, S.L.,Ratner, N. (2008) How does the Schwann cell lineage form tumors in NF1? *Glia*, 56 (14), 1590-1605.
- 30.Berner, J.M., Sorlie, T., Mertens, F., Henriksen, J., Saeter, G., Mandahl, N. ve diğ erleri. (1999) Chromosome band 9p21 is frequently altered in malignant peripheral nerve sheath tumors: studies of CDKN2A and other genes of the pRB pathway. *Genes Chromosomes Cancer*, 26 (2), 151-160.
- 31.Kourea, H.P., Orlow, I., Scheithauer, B.W., Cordon-Cardo, C.,Woodruff, J.M. (1999) Deletions of the INK4A gene occur in malignant peripheral nerve sheath tumors but not in neurofibromas. *Am J Pathol*, 155 (6), 1855-1860.
- 32.Nielsen, G.P., Stemmer-Rachamimov, A.O., Ino, Y., Moller, M.B., Rosenberg, A.E.,Louis, D.N. (1999) Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. *Am J Pathol*, 155 (6), 1879-1884.
- 33.Sherr, C.J. (2004) Principles of tumor suppression. *Cell*, 116 (2), 235-246.
- 34.DeClue, J.E., Heffelfinger, S., Benvenuto, G., Ling, B., Li, S., Rui, W. ve diğ erleri. (2000) Epidermal growth factor receptor expression in neurofibromatosis type 1-related tumors and NF1 animal models. *J Clin Invest*, 105 (9), 1233-1241.
- 35.Kluwe, L., Friedrich, R.,Mautner, V.F. (1999) Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes Chromosomes Cancer*, 24 (3), 283-285.
- 36.Serra, E., Rosenbaum, T., Winner, U., Aledo, R., Ars, E., Estivill, X. ve diğ erleri. (2000) Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations. *Hum Mol Genet*, 9 (20), 3055-3064.
- 37.Zhu, Y., Romero, M.I., Ghosh, P., Ye, Z., Charnay, P., Rushing, E.J. ve diğ erleri. (2001) Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. *Genes Dev*, 15 (7), 859-876.

38. Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A.B., Seitanidou, T. ve diğeri. (1994) Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*, 371 (6500), 796-799.
39. Voiculescu, O., Charnay, P., Schneider-Maunoury, S. (2000) Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. *Genesis*, 26 (2), 123-126.
40. Theos, A., Korf, B.R. (2006) Pathophysiology of neurofibromatosis type 1. *Ann Intern Med*, 144 (11), 842-849.
41. Rubin, J.B., Gutmann, D.H. (2005) Neurofibromatosis type 1 - a model for nervous system tumour formation? *Nat Rev Cancer*, 5 (7), 557-564.
42. Mashour, G.A., Driever, P.H., Hartmann, M., Drissel, S.N., Zhang, T., Scharf, B. ve diğeri. (2004) Circulating growth factor levels are associated with tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. *Clin Cancer Res*, 10 (17), 5677-5683.
43. Viskochil, D.H. (2003) It takes two to tango: mast cell and Schwann cell interactions in neurofibromas. *J Clin Invest*, 112 (12), 1791-1793.
44. De Schepper, S., Boucneau, J.M., Westbroek, W., Mommaas, M., Onderwater, J., Messiaen, L. ve diğeri. (2006) Neurofibromatosis type 1 protein and amyloid precursor protein interact in normal human melanocytes and colocalize with melanosomes. *J Invest Dermatol*, 126 (3), 653-659.
45. Herzog, V., Kirfel, G., Siemes, C., Schmitz, A. (2004) Biological roles of APP in the epidermis. *Eur J Cell Biol*, 83 (11-12), 613-624.
46. Diwakar, G., Hornyak, T.J. (2006) Cafe-au-lait patches and senile plaques: How APp the connection? *J Invest Dermatol*, 126 (3), 547-550.
47. Donarum, E.A., Halperin, R.F., Stephan, D.A., Narayanan, V. (2006) Cognitive dysfunction in NF1 knock-out mice may result from altered vesicular trafficking of APP/DRD3 complex. *BMC Neurosci*, 7, 22.
48. Villa, A., Latasa, M.J., Pascual, A. (2001) Nerve growth factor modulates the expression and secretion of beta-amyloid precursor protein through different mechanisms in PC12 cells. *J Neurochem*, 77 (4), 1077-1084.
49. Okado, H., Okamoto, H. (1992) A *Xenopus* homologue of the human beta-amyloid precursor protein: developmental regulation of its gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 189 (3), 1561-1568.
50. Daigle, I., Li, C. (1993) *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (24), 12045-12049.

51. Luo, L., Tully, T., White, K. (1992) Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *Appl* gene. *Neuron*, 9 (4), 595-605.
52. Zheng, H., Koo, E.H. (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*, 1, 5.
53. Popp, G.M., Graebert, K.S., Pietrzik, C.U., Rosentreter, S.M., Lemansky, P., Herzog, V. (1996) Growth regulation of rat thyrocytes (FRTL-5 cells) by the secreted ectodomain of beta-amyloid precursor-like proteins. *Endocrinology*, 137 (5), 1975-1983.
54. Siemes, C., Quast, T., Kummer, C., Wehner, S., Kirfel, G., Muller, U. ve diğeri. (2006) Keratinocytes from APP/APLP2-deficient mice are impaired in proliferation, adhesion and migration in vitro. *Exp Cell Res*, 312 (11), 1939-1949.
55. Wirths, O., Thelen, K.M., Lutjohann, D., Falkai, P., Bayer, T.A. (2007) Altered cholesterol metabolism in APP695-transfected neuroblastoma cells. *Brain Res*, 1152, 209-214.
56. Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis*, 3 (1), 75-80.
57. LaFerla, F.M. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 3 (11), 862-872.
58. Nizzari, M., Venezia, V., Repetto, E., Caorsi, V., Magrassi, R., Gagliani, M.C. ve diğeri. (2007) Amyloid precursor protein and Presenilin1 interact with the adaptor GRB2 and modulate ERK 1,2 signaling. *J Biol Chem*, 282 (18), 13833-13844.
59. Nakagawa, T., Kabuto, M., Kubota, T., Kodera, T., Sato, K. (1999) Production of amyloid beta protein precursor as a proteinase inhibitor by human astrocytic tumors. *Anticancer Res*, 19 (4B), 2963-2968.
60. Gakhar-Koppole, N., Hundeshagen, P., Mandl, C., Weyer, S.W., Allinquant, B., Muller, U. ve diğeri. (2008) Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur J Neurosci*, 28 (5), 871-882.
61. Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietrzik, C.U., Filippov, M.A. ve diğeri. (2007) The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*, 27 (29), 7817-7826.

62. Jin, L.W., Ninomiya, H., Roch, J.M., Schubert, D., Masliah, E., Otero, D.A. ve diğeri. (1994) Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J Neurosci*, 14 (9), 5461-5470.
63. Ge, Y.W., Lahiri, D.K. (2002) Regulation of promoter activity of the APP gene by cytokines and growth factors: implications in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 973, 463-467.
64. Nishimura, I., Takazaki, R., Kuwako, K., Enokido, Y., Yoshikawa, K. (2003) Upregulation and antiapoptotic role of endogenous Alzheimer amyloid precursor protein in dorsal root ganglion neurons. *Exp Cell Res*, 286 (2), 241-251.
65. Ishiguro, M., Ohsawa, I., Takamura, C., Morimoto, T., Kohsaka, S. (1998) Secreted form of beta-amyloid precursor protein activates protein kinase C and phospholipase Cgamma1 in cultured embryonic rat neocortical cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 53 (1-2), 24-32.
66. Cheng, G., Yu, Z., Zhou, D., Mattson, M.P. (2002) Phosphatidylinositol-3-kinase-Akt kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of amyloid precursor protein. *Exp Neurol*, 175 (2), 407-414.
67. Luo, J.J., Wallace, M.S., Hawver, D.B., Kusiak, J.W., Wallace, W.C. (2001) Characterization of the neurotrophic interaction between nerve growth factor and secreted alpha-amyloid precursor protein. *J Neurosci Res*, 63 (5), 410-420.
68. Mook-Jung, I., Saitoh, T. (1997) Amyloid precursor protein activates phosphotyrosine signaling pathway. *Neurosci Lett*, 235 (1-2), 1-4.
69. Schmitz, A., Tikkanen, R., Kirfel, G., Herzog, V. (2002) The biological role of the Alzheimer amyloid precursor protein in epithelial cells. *Histochem Cell Biol*, 117 (2), 171-180.
70. Root, A.W., Lifshitz, F. (2006) Germline KRAS, BRAF, and MAPK Mutations in Noonan and Cardio-Facio-Cutaneous-Syndrome. *Growth, Genetics & Hormones*, 22 (3).
71. Casella, G.T., Bunge, R.P., Wood, P.M. (1996) Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia*, 17 (4), 327-338.
72. Hanemann, C.O., Rosenbaum, C., Kupfer, S., Wosch, S., Stoegbauer, F., Müller, H.W. (1998) Improved culture methods to expand Schwann cells with altered growth behaviour from CMT1A patients. *Glia*, 23 (2), 89-98.

73. Birchmeier, C., Nave, K.A. (2008) Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia*, 56 (14), 1491-1497.
74. Rutkowski, J.L., Tennekoon, G.I., McGillicuddy, J.E. (1992) Selective culture of mitotically active human Schwann cells from adult sural nerves. *Ann Neurol*, 31 (6), 580-586.
75. Schumacher, M., Jung-Testas, I., Robel, P., Baulieu, E.E. (1993) Insulin-like growth factor I: a mitogen for rat Schwann cells in the presence of elevated levels of cyclic AMP. *Glia*, 8 (4), 232-240.
76. Stewart, H.J., Bradke, F., Taberner, A., Morrell, D., Jessen, K.R., Mirsky, R. (1996) Regulation of rat Schwann cell P0 expression and DNA synthesis by insulin-like growth factors in vitro. *Eur J Neurosci*, 8 (3), 553-564.
77. Russo, C., Venezia, V., Repetto, E., Nizzari, M., Violani, E., Carlo, P. ve diğerleri. (2005) The amyloid precursor protein and its network of interacting proteins: physiological and pathological implications. *Brain Res Brain Res Rev*, 48 (2), 257-264.
78. Venezia V., N.M., Repetto E., Violani E., Corsaro A., Thellung S, Villa V., Carlo P., Schettini G., Florio T., Russo C. (2006) Amyloid precursor protein modulates ERK-1 and -2 signaling. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1090, 455-465.
79. Mei, M., Su, B., Harrison, K., Chao, M., Siedlak, S.L., Preville, L.A. ve diğerleri. (2006) Distribution, levels and phosphorylation of Raf-1 in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 99 (5), 1377-1388.
80. Provenzano, M.J., Yu, L., Hitchler, M.J., Fitzgerald, M.P., Robinson, R.A., Wayne, S. ve diğerleri. (2007) AP-2 participates in the transcriptional control of the amyloid precursor protein (APP) gene in oral squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*, 83 (2), 277-282.
81. Denayer, E., de Ravel, T., Legius, E. (2008) Clinical and molecular aspects of RAS related disorders. *J Med Genet*, 45 (11), 695-703.