



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.  
2012; 26 (2): 87 - 90  
http://www.fusabil.org

Sibel ÜNLÜ  
Emel SAĞLAR

Hacettepe Üniversitesi,  
Fen Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü  
Ankara, TÜRKİYE

### İn vitro Gama Radyasyon Maruziyeti Sonrası Periferal Kan Lenfositlerinde MDM2 Gen Ekspresyon Değişikliğinin Araştırılması

**Amaç:** Murine double minute 2 (MDM2) p53 tümör baskılayıcı genini negatif olarak kontrol altında tutar ve E3 ubiquitin ligaz aktivitesi ile p53'ü yıkar. Bu çalışmada insan periferal lenfositlerinde in vitro olarak farklı gama radyasyon dozlarından meydana gelen DNA hasarının MDM2 gen seviyesine etkisi araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Gen ekspresyon değişiklikleri, B2M referans gen olarak kullanılarak kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu ile (KRT PZR) değerlendirilmiştir. Bu amaçla genç, sağlıklı ve sigara içmeyen 10 kişiye ait kan örnekleri toplanmıştır. Her birey için beş tüpe bölünen örneklerden ilki kontrol olarak ayrılmış diğer dördü sabit gama kaynağında ( $^{60}\text{Co}$ ) 0327 kGy/sa doz hızına göre hesaplanmış 0.5 Gy, 1 Gy ve 3 Gy gama radyasyonuna maruz bırakılmıştır.

**Bulgular:** Sonuçlar eşik değerinin aşıldığı döngü değerlerine (CT) göre REST 2009 (Relative Expression Software Tool V. 2.0.13) programında değerlendirilmiş, hedef genin ve referans genin CT değerleri arasındaki farklılıklara göre hesaplanmıştır.

**Sonuç:** KRT PZR sonuçları MDM2 geninin maruz kalan dozlarda up-regüle olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar MDM2 geninin iyonize radyasyonun etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** MDM2, KRT PZR, iyonize radyasyon

#### Investigation of MDM2 Gene Expression Changes in Peripheral Blood Lymphocytes After In-Vitro Gamma Radiation Exposure

**Objective:** The murine double minute 2 (MDM2) negatively controls the p53 tumor suppressor gene and destroys the p53 with E3 ubiquitin ligase activation. In this study, effect of DNA damage caused by different in vitro gamma radiation doses in peripheral human lymphocytes on MDM2 gene expression was investigated.

**Material and Methods:** Gene expression changes were evaluated with quantitative real time polymerase chain reaction (QRT PCR) using B2M as a reference gene. For this reason, whole blood samples of ten young, healthy and non-smoking donors were collected. The first tube of the blood samples which were divided in five tube for each individual, was used as control and other four tubes were irradiated using a constant gamma irradiation source ( $^{60}\text{Co}$ ) giving the doses of 0.5 Gy, 1 Gy and 3 Gy, which were calculated according to dose rate of 0,0327 kGy/h.

**Results:** Results were expressed in terms of the threshold cycle value (CT) in REST 2009 (Relative Expression Software Tool V. 2.0.13) program and the difference between the CT values of the target gene and the reference gene was calculated.

**Conclusions:** QRT PCR results showed that MDM2 gene was up-regulated after radiation exposure. The results of the present study suggest that MDM2 gene can be used to determine the effects of exposure to ionized radiation.

**Key Words:** MDM2, QRT PCR, ionizing radiation.

Geliş Tarihi :06.08.2012  
Kabul Tarihi :22.11.2012

#### Yazışma Adresi Correspondence

Sibel ÜNLÜ  
Hacettepe Üniversitesi,  
Fen Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü,  
Ankara-TÜRKİYE

unlusibel@gmail.com

#### Giriş

İyonize radyasyonun dolaylı veya direkt olarak DNA hasarına yol açtığı bilinmektedir ve DNA'da nispeten kolay olan tek zincir kırıklarına yol açtığı gibi, onarımı oldukça güç olan ve çoğunlukla onarımı mümkün olmadığı için hücre ölümüne neden olan çift zincir kırıkları, alkali-labile lezyonlar, protein çapraz bağlanmaları ve purin-pirimidin bazlarının hasarı gibi çok çeşitli lezyonlara yol açmaktadır (1, 2). İyonize radyasyon maruziyetinin ardından DNA'da meydana gelen hasarlardan dolayı memeli hücrelerinde birçok yolak devreye girmektedir (3). Bu hasarlar hücre kontrol noktalarında işlev gösteren yolakları aktive eder ve hücrelerin G1 ve G2 fazına doğru ilerlemesini inhibe ederek S fazına geçiş sürecini geciktirir (4). DNA hasarı, hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan p53 tümör baskılayıcı geninin çok fazla miktarda eksprese olmasına neden olur. TP53 çok kısa ömürlü bir proteindir (5). Genomun stabilitesini sağlayan p53 geni

DNA hasarında aktive olarak siklusun G1'den S'e geçmesini engeller ve bu şekilde hücreye hasarın onarılması için gerekli olan zamanı sağlamış olur. p53 ekspresyonunun artmasıyla birlikte pek çok genin transkripsiyonunda stimüle edilir. Meydana gelen hasar onarıldıysa p53 tümör baskılayıcı geninin önemli bir düzenleyicisi olan Murine double minute 2 (mdm2) geni aktive olur. MDM2 proteini E3 ubiquitin ligaz aktivitesi ile p53'ü N-terminal trans-aktivasyon domaininden tanıyarak proteozomal yıkımına sebep olur ve p53'ün transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder (6). Bu şekilde hücre döngüsünü negatif olarak düzenler (7). Hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde MDM2 proteininin p53'e bağlanma yerinde asetilasyon ve fosforilasyon gibi yapısal değişiklikler olur ve MDM2 p53'ü bağlayamaz (8). Dolayısıyla serbest p53 siklusun durmasını sağlar. Hasarın onarılamaması durumunda p53 hücreyi apoptoza sürükler. Bu çalışmada insan periferik lenfositlerinde in vitro olarak farklı gama radyasyon dozlarından kaynaklanan DNA hasarının MDM2 gen seviyesine etkisi araştırılmıştır. Lenfositler insan vücudundaki en radyosensitif hücrelerden biri olduğu için tercih edilmiştir (9). MDM2 geninin ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler, B2M referans gen olarak kullanılarak kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu ile (KRT PZR) değerlendirilmiştir.

## Gereç ve Yöntem

### Hastalar

Herhangi bir hastalığı olmayan, sigara kullanmayan genç ve sağlıklı 10 gönüllünün periferik kanları venipunktür aracılığı ile toplanmış ve her bir olgunun kan örneği 5 ayrı lityum heparin içeren tüpe bölünmüştür. İlk tüp kontrol olarak ayrılmış, diğer dört tüp sabit gama kaynağı kobalt 60 (Co<sup>60</sup>) kullanılarak iyonize radyasyona maruz bırakılmıştır. Her bireye ait dört farklı tüp 0.0327 kGy/sa doz hızına göre hesaplanmış 0.5 Gy, 1 Gy and 3 Gy dozlarda ışınlanmıştır.

### Lenfositlerin ayrılması

Lenfositler sağlıklı bireylerden heparinle alınan periferik kandan Histopaque-1077 (Sigma, Amerika) ile yoğunluk gradiyenti uygulanarak izole edilmiştir. Kan örneği Histopaque-1077 üzerine eşit hacimde ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 400xg'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Lenfositleri içeren ara faz başka bir temiz tüpe aktarılmış, ardından fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile karıştırılmış ve 250xg'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır.

### RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi

Total RNA, RNeasy plus mini kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak lenfositlerden izole edilmiştir. RNA örneklerinin miktarı GeneQuant 1300 spektrofotometrede (GE Healthcare) 260 ve 280 nm dalga boyunda kuvarz kuvvetler kullanılarak ölçülmüş ve örnekler -80°C'de saklanmıştır. cDNA, QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak sentezlenmiştir.

Genomik DNA'nın eliminasyon reaksiyonu 2 µl gDNA wipeout tamponu kullanılarak, 14 µl toplam hacimde, 1 µg kalıp RNA ve RNase içermeyen su ile 42°C'de 2 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Reverse transkripsiyon reaksiyonu ise 1 µl quantiscrypt reverse transkriptaz, 4 µl 5x quantiscrypt RT tamponu, 1 µl RT primer mix ve 14 µl kalıp RNA kullanılarak ve 42°C'de 15 dakika ve 95°C'de 3 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır. MDM2 geninin amplifikasyonu için kullanılan primerler ve prob şöyledir: ileri primer 5'GAGCTTGGCTGCTTCTGGG'3; geri primer 5'TCGGCTTCTTGCTCCATCTT'3; prob 5'CCTGTGTGGCCCTGTGTGTCGG'3. Kantitatif Real Time polimeraz zincir reaksiyonu 2 µl cDNA, 5 µl 2x QuantiFast RT-PZR master mix (Qiagen), her primerden 1 µl ve 1 µl prob kullanılarak toplam 10 µl reaksiyon hacminde ve RotorGene RG6000 real-time PZR aletinde (Corbett Research, Sydney, Australia) çalışılmıştır. Reaksiyon koşulları 5 dakika 94°C'de denatürasyon ve ardından 45 döngü 94°C'de 10 saniye ve 60°C'de 30 saniyedir.

### İstatistiksel analiz

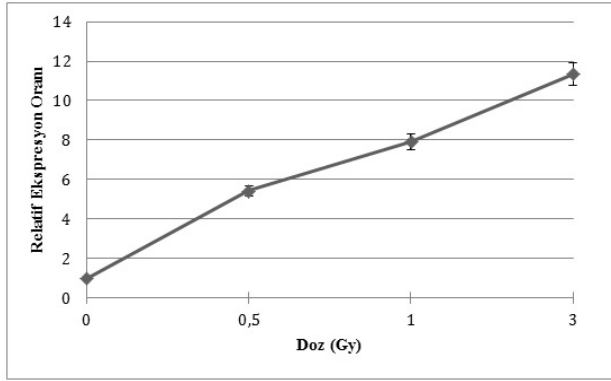
Gerçek-zamanlı PZR reaksiyonu sonunda elde edilen CT değerleri REST 2009 (Relative Expression Software Tool V. 2.0.13 ) programında standart mod'da referans gen (B2M) normalizasyonu ile değerlendirilmiştir. MDM2 geninin ekspresyon düzeyleri ile maruz bırakılan gama radyasyonu dozu arasındaki ilişkinin belirlenmesinde SPSS 16.0 istatistiksel analiz paket programı kullanılarak, "Spearman Sıra Korelasyonu Analizi" ile değerlendirilmiştir.

### Bulgular

Gerçek-zamanlı PZR analizi sonucunda her örnek için kontrol geni olan B2M ve MDM2 genlerine ait CT değerleri tespit edilmiştir. Bu değerler REST 2009 yazılımı kullanılarak değerlendirilmiş ve söz konusu genlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. In-vitro gama radyasyona maruz kalan periferik kan lenfositlerinde MDM2 ekspresyon değişimi Tablo 1'de gösterilmiştir. Sonuçlar aynı zamanda grafiksel olarak Şekil 1'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kontrol örneklerinde up regüle olmadığı gözlenen MDM2 örneklerinin artan dozlarla birlikte linear bir artış gösterdiği belirlenmiştir. MDM2 ekspresyon düzeyi artışı ile maruz kalınan doz arasındaki ilişkinin istatistiksel analizi sonucunda, ekspresyon düzeyleri ile doz artışı arasında istatistiksel olarak, olumlu, çok güçlü ve anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (Spearman r: 0.920, p=0.001).

**Tablo 1.** In-vitro gama radyasyona maruz kalan periferik kan lenfositlerinde MDM2 ekspresyon değişimi.

Gen	0.5 Gy	Soruç	1 Gy	Sonuç	3 Gy	Sonuç
MDM-2	5.421	UP	7.930	UP	11.346	UP



**Şekil 1.** In-vitro gama radyasyonuna maruz kalan periferel kan lenfositlerinde MDM2 ekspresyon değişiminin grafiksel gösterimi.

### Tartışma

Bu çalışmada, sağlıklı bireylere ait periferel kan örnekleri toplanmış, in vitro olarak iyonize radyasyona maruz bırakılan kan örneklerinden lenfositler ayrıştırılmış ve bu lenfositlerde radyasyonun meydana getirdiği DNA hasarının etkisi iyonize radyasyon cevabının önemli bir bileşeni olan MDM2 geninin ekspresyonu ile değerlendirilmiştir. Gen ekspresyon çalışması KRT PZR ile yapılmıştır. KRT PZR kantitatif verilerin elde edilmesinde yüksek hassasiyetle çalışan güvenilir, hızlı, az miktarda örnek gerektiren ve geniş doz aralığı değerlendirebilme kapasitesinde olan bir ölçme yöntemidir. Periferel kan lenfositlerinde gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi lenfositlerin iyonize radyasyona olan hassasiyeti göz önüne alındığında mevcut radyasyon biyodozimetrlere alternatif olarak önerilmektedir (10).

### Kaynaklar

1. Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Comet assay in the assessment of the human genome damage induced by  $\gamma$  radiation in vitro. *Radiol Oncol* 2004; 38: 43-47.
2. Jeggo P, Lobrich M. Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry* 2006; 122: 124-127
3. Zdzienicka MZ. Mammalian mutants defective in the response to ionizing radiation-induced DNA damage. *Mutat Res* 1995; 336: 203-213.
4. Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 2003; 22: 5834-5847.
5. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997; 387: 299-303.
6. Uhrinova S, Uhrin D, Powers H. et al. Structure of free MDM2 N-terminal domain reveals conformational adjustments that accompany p53-binding. *J Mol Biol* 2005; 350: 587-598.

Bu çalışmanın sonucunda p53'ün inhibitörü olan MDM2 geninin ekspresyonunun radyasyona maruz kaldıktan sonra hızla değiştiği gözlemlenmiştir. MDM2'nin aşırı ekspresyonunun sebebinin, radyasyona cevap olarak hücre döngüsünün G1 fazında tutuklu kalmasına aracılık eden p53'ün aktivitesini inhibe etmek ve böylelikle hücre ölümünü baskılamak olduğu düşünülebilir (11). MDM2 ekspresyonu azaltılmış olan farelerde yapılan çalışmalarda, MDM2 seviyesinin sadece %20 azaltılmış olan farelerin hepsinin iyonize radyasyona maruz kaldıktan sonra öldüğü, buna karşılık olarak aynı dozu alan yabani tip farelerin %50'sinin hayatta kaldığı gösterilmiştir (12).

MDM2, p53'ün hem transkripsiyonunu ve hem de degradasyonunu kontrol eder. Yapılan ilk çalışmalarda p53'ün ısı duyarlı formu, MDM2 ekspresyonunun yabani tip p53 aktivitesi yüksekken induklendiğini göstermek için kullanılmıştır (13, 14). Bundan kısa süre sonra da ultraviyole ve iyonize radyasyonun MDM2 ekspresyonunu p53 bağımlı olarak indükleyebileceği bulunmuştur (15, 16). Ancak düşük doz iyonize radyasyonun etkisi hücrelerde hala tam olarak anlaşılamamıştır (17). MDM2, radyasyona cevap olarak kontrolsüz hücre ölümünün önlenmesinde kritik bir role sahiptir. MDM2, p53'ü iki yolla yıkabilir. İlk yolda direk olarak p53'ün amino terminal ucuna bağlanır ve p53'ün bazal transkripsiyon sistemi ile etkileşimini bloke eder (18,19). İkinci yoldaysa ubiquitin aktivitesi ile p53'ün yıkımını sağlar ve buna ilaveten nükleustan sitoplazmaya translokasyonunu teşvik eder. Sitoplazmada ise p53 bir transkripsiyon faktörü olarak işlevini yerine getiremez (5, 20-22). p53'ün yıkılması veya bloke edilmesi için her halükarda MDM2'nin p53'e direk olarak bağlanması gerekir.

Sonuç olarak radyasyona cevabın düzenlenmesinde MDM2'nin kantitatif değeri oldukça önem taşımaktadır.

7. Chen D, Li M, Luo J, Gu W. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* 2003; 278: 13595-13598.
8. Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* 2002; 277: 50607-50611.
9. Gamulin M, Kopjar N, Grgić M, et al. Genome damage in oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy. *Croat Med J* 2008; 49: 515-527.
10. Paul S, Amundson SA. Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 71(4): 1236-1244.
11. Perry ME. Mdm2 in the Response to Radiation. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 9-19.
12. Mendrysa SM, McElwee MK, Michalowski J, et al. Mdm2 is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 462-473.

13. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* 1993; 12: 461–468.
14. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993; 7: 1126–1132.
15. Perry ME, Piette J, Zawadzki JA, Harvey D, Levine AJ. The mdm2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 11623–11627.
16. Chen CY, Oliner JD, Zhan Q, et al. Interactions between p53 and Mdm2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2684–2688.
17. Vasil'ev SA, Stepanova E, Kutenkov OP, et al. DNA double-strand breaks in human lymphocytes after single irradiation by low doses of pulsed X-rays: non-linear dose-response relationship. *Radiats Biol Radioecol* 2012; 52: 31-38.
18. Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, et al. Oncoprotein Mdm2 conceals the activation domain of tumor suppressor p53. *Nature* 1993; 362: 857–860.
19. Thut CJ, Goodrich JA, Tjian R. Repression of p53-mediated transcription by Mdm2: a dual mechanism. *Genes Dev* 1997; 11: 1974–1986.
20. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein Mdm2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997; 420: 25–27.
21. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387: 296–299.
22. Freedman D, Levine AJ. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by Mdm2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 7288–7293.