

# Ras Protein Ailesi: Hücresel İşlevi, Moleküler Kontrolü, Onkogenezdaki Rolü

## [Ras Family of Proteins: Cellular Function, Molecular Control, and its Role in Oncogenesis]

Pelin Telkoparan,  
Uygar H. Tazebay

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilkent  
Üniversitesi, Bilkent 06800 Ankara

**Yazışma Adresi**  
[Correspondence Address]

**Uygar H. Tazebay**

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,  
Bilkent Üniversitesi, Bilkent 06800 Ankara  
Tel: +90-312-2902419  
Faks: +90-312-2665097  
E-mail: tazebay@fen.bilkent.edu.tr

Kayıt Tarihi : 24 Mayıs 2011; Kabul Tarihi : 22 Temmuz 2011

[Registered: 24 May 2011; Accepted: 22 July 2011]

### ÖZET

Ras protein ailesine dahil olan küçük GTPaz'lar hücre biyolojisinin her alanında son derece kritik roller üstlenerek, hücrelerin bölünmesini, farklılaşmasını, hücre içi protein taşınması ve lokalizasyonunu, hücre iskeletinin organizasyonunu, büyüme faktörü sinyal iletimini, ve gen ifadesini düzenlemektedirler. Hücre dışından gelen sinyallere bağlı olarak, Ras ailesi proteinleri GTP ve GDP bağlı formları ile iki konformasyon arası gidip gelirken, GTP bağlı aktif Ras proteinleri hücre içerisindeki çeşitli Ras efektörü proteinleri etkiler, ve bunları konformasyonel değişikliğe uğratırlar. Bunun sonucu olarak, hücre dışından gelen sinyal hücre içerisinde bir fosforillenme şelalesinin başlamasına yol açar ve hücre içi sinyal iletimi tetiklenir. Ras ailesi proteinlerinin işlevsel döngüleri incelendiğinde, bu küçük GTPaz'ların, GTPaz Aktive eden Proteinler (GAP) ve Guanin Nükleotid Değişim Faktörleri (Guanine Nucleotide Exchange Factors, veya GEF) tarafından düzenlendikleri görülmektedir. GAP'lar, bu GTPaz'ların aktiviteğini başlatarak veya artırarak aktif Ras-GTP'leri inaktif Ras-GDP'lere çevirirken, GEF proteinleri Ras-GDP ile etkileşir ve GDP'nin proteinden uzaklaştırılarak, Ras'ın hücre içi derişimi yüksek olan GTP'yi bağlamasına, ve yeniden aktive edici işlev kazanmasına olanak sağlarlar. Ras proteinlerini aktive eden bazı mutasyonların GTP hidrolizini engelleyerek anormal Ras-GTP formlarının hücre içerisinde birikmesine yol açtığı ve bu yolla kontrol dışı hücre çoğalmasını tetiklediği bilinmektedir. Ras genlerinde aktivasyona yol açan bu tür mutasyonlar insanlarda tüm kanserlerin %30'unda görülmekte, ve Ras ailesi genlerinde oluşan mutasyonların sıradışı proliferasyon ve tümörleşmedeki önemli rolüne dikkat çekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ras ailesi, küçük G-proteinler, RasGEF, RasGAP, onkogenezi

### ABSTRACT

Small GTPases belonging to Ras family of proteins have key roles in regulating nearly every aspect of cell biology, such as cell division, cellular differentiation, vesicular transport and localization of cargo proteins, cell morphology, and gene expression. Depending on the extracellular signals, Ras family members oscillate between GTP-bound (active) and GDP-bound (inactive) conformations, and in the active form they interact with downstream effector molecules, leading to conformational changes in those effectors. As a result, extracellular signals trigger cellular responses, by means of initiation of a phosphorylation cascade. Functional cycles of Ras family of proteins include interactions with GTPase Activating Proteins (GAPs), and with Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs) that regulate these small GTPases. GAP proteins activate intrinsic GTP hydrolysis activities of these small G-proteins, and convert active Ras-GTP to inactive Ras-GDP. On the other hand, GEF proteins interact with inactivated Ras-GDP molecules, and convert those inactivated molecules back to activated Ras-GTP, by triggering dissociation of GDP, and reassociation of Ras with GTP which is found at higher concentrations as compared to GDP in the cell cytoplasm. It is well known that mutations in Ras that block these molecules in GTP-bound forms by impairing GTP hydrolysis activity could trigger an uncontrolled and aberrant cellular proliferation. This type of mutations in Ras genes causing uncontrolled activation of the protein, are found in approximately 30% of human cancers overall, and they indicate the significance of mutations in genes encoding Ras family members in cellular proliferation related to *de novo* oncogenesis in human.

**Key Words:** Ras family, small G-proteins, RasGEF, RasGAP, oncogenesis

## Giriş

Sarkoma virüsü, 1916 yılında tavuklardan elde edilen tümör ekstrelerinin sağlıklı tavuklardaki çeşitli dokulara enjekte edildiklerinde kanser oluşumuna yol açtıklarını gösteren Peyton Rous tarafından bulunmuş, ve bu virüs araştırmacının adı ile, yani *Rous Sarkoma Virüsü* (RSV) olarak adlandırılmıştır. Bundan yıllar sonra, 1970 ve 1980'lerde yapılan araştırmalar sıçan kaynaklı Harvey ve Kirsten kemirgen sarkoma retrovirüslerinin *Ras* (**rat** sarkoma virüsü) olarak adlandırılan ortak bazı genlerin aktivasyonu sonucunda kanser patojenezine yol açtıklarını göstermiştir. Bu çalışmaları takiben, bazı viral genlerin homologlarının fare ve insan hücrelerinde de bulunduğu anlaşılmış, ve homologlar *H-Ras* (Harvey virüsü *Ras*) ve *K-Ras* (Kirsten virüsü *Ras*) olarak adlandırılmışlardır [1]. Bu çalışmalardan kısa süre sonra, *Ras* genlerinin mutasyona uğramış alelleri mesane, kolon ve akciğer kanseri hücre hatlarında tespit edilmiş, ve *Ras*'ın onkogenik aktivitesine dair ilk ipuçları elde edilmiştir [2-4]. İlk olarak akciğer kanseri örneklerinde de aktif *Ras* mutant alelleri rastlanması, *Ras* aktivasyonunun sadece hücre hatlarında *in vitro* oluşmadığının ilk kanıtı olmuştur [5,6]. Bu çalışmaları takiben, *Ras* onkogenleri ve kanser çeşitleri arasında özgün bağlantılar bulunmuş, ve *K-Ras* mutasyonlarının pankreas ve kolon kanserlerinde yaygın olduğu [7,8], buna karşılık *H-Ras* mutasyonlarının mesane kanserlerinde [9], *N-Ras* mutasyonlarının da lenf kanserleri ve melanomalarda sıklıkla görüldüğü belirlenmiştir [10-13]. Genel olarak bahsetmek gerekirse, *Ras* genlerindeki aktivasyona yol açan mutasyonlar insanlarda tüm kanserlerin %30'unda görülmektedir [14]. *K-Ras* mutasyonlarının kolon ve safra yolu kanserlerinin %32'sinde, pankreas kanserlerinin

ise yaklaşık %60'ında görülmesi son derece çarpıcıdır, ve bu bulgular *Ras* onkogenlerindeki mutasyonların kanserleşmenin erken safhalarındaki önemli rolüne işaret etmektedir (bkz. Tablo 1).

*Ras* proteinlerinin GTP molekülünü bağladıkları ve içsel GTPaz aktiviteleri olduğu 1980'li yıllarda ortaya çıkarılmıştır [15]. *Ras* onkoproteinlerini aktive eden mutasyonların, proteinin GTPaz aktivitesini bozarak GTP hidrolizini engelleyen mutasyonlar oldukları, ve bunun sonucunda normal dışı aktivitelere sahip *Ras*-GTP formlarının birikerek hücre çoğalmasını tetikledikleri yine bu yıllarda elde edilen bulgularla ortaya konulmuştur [16-18]. Yine 1984'de yayınlanan bir çalışma, *Ras*'ın GTP hidrolizi aktivitesinin EGF'e bağlı olarak arttığını göstermiş ve *Ras* aktivitesinin bu proteinle etkileşen başka proteinler tarafından kontrol edilebildiği ile ilgili önemli veriler sunmuştur [19]. *Ras* aktivitesinin, bu proteine özgü antikorlarla bloke edildiği çalışmalarda, *Ras*'ın hücre dışı mitojenler tarafından aktive edilen sinyal iletimindeki önemli rolü açıkça ortaya konulmuştur. Bu çalışmalar ilk defa, NIH 3T3 fibroblast hücrelerinin serum varlığında çoğalmasının, ve PC12 hücrelerinin büyüme faktörleri varlığında farklılaşmalarının *Ras*'ın aktivasyonu yolu ile olduğunu göstermiştir [20,21].

Bu derlemede, öncelikle *Ras* aktivasyonunun moleküler mekanizması üzerinde durarak, *Ras* G-proteinlerinin işlevlerini bu proteinleri etkinleştirerek ve etkisizleştirerek düzenleyen temel faktörleri anlatacağız. Daha sonra, *Ras*'ın efektörleri ve aktive ettiği sinyal iletim yollarına değinerek, bunlara detaylı örnekler vermeyi amaçlıyoruz. Son olarak, *Ras* proteinlerinin onkogenezdaki rolüne değinerek, mutasyona uğramış *Ras* proteinlerinin kanserleşmedeki etkilerini inceleyeceğiz.

**Tablo 1.** İnsan Kanserlerinde *H-Ras*, *N-Ras* ve *K-Ras* Gen Mütasyonları

<b>Kanserli Doku veya Organ:</b>	<b><i>H-Ras</i> mütasyon %</b>	<b><i>K-Ras</i> mütasyon %</b>	<b><i>N-Ras</i> mütasyon %</b>
<b>Safra yolu</b>	% 0	% 33	% 1
<b>İdrar kesesi</b>	% 11	% 4	% 3
<b>Meme</b>	% 0	% 4	% 0
<b>Serviks</b>	% 9	% 9	% 1
<b>Kolon</b>	% 0	% 32	% 3
<b>Endometriyum</b>	% 1	% 15	% 0
<b>Böbrek</b>	% 0	% 1	% 0
<b>Karaciğer</b>	% 0	% 8	% 10
<b>Akciğer</b>	% 1	% 19	% 1
<b>Melanoma</b>	% 6	% 2	% 18
<b>Miyeloid lösemi</b>	% 0	% 5	% 14
<b>Over</b>	% 0	% 17	% 4
<b>Pankreas</b>	% 0	% 60	% 2
<b>Tiroid</b>	% 5	% 4	% 7

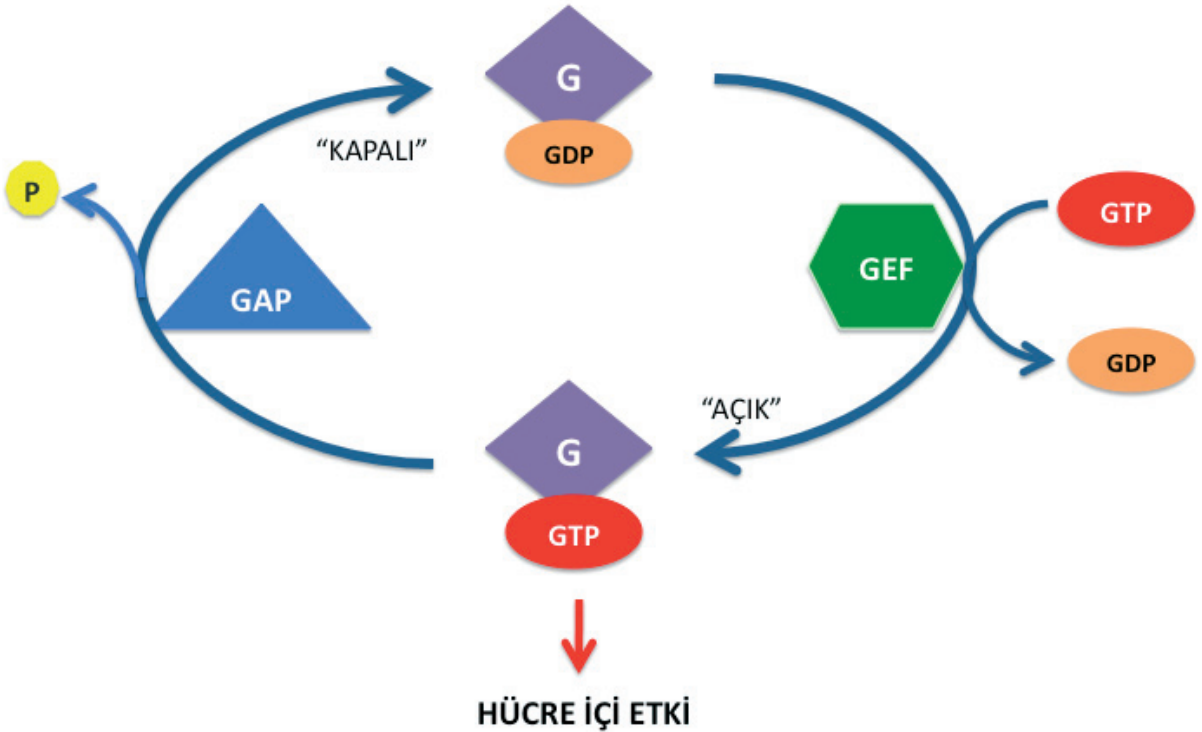
Veriler Sanger Enstitüsü Kanser Somatik Mütasyonları web sitesinde bulunmaktadır (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>); ayrıca bkz. [14].

## Ras Aktivasyonunun Moleküler Mekanizması

Ras protein ailesine dahil olan küçük GTPaz'lar hücre biyolojisinin her alanında son derece kritik roller üstlenerek, hücrelerin bölünmesini, farklılaşmasını, hücre içi protein trafiğini (taşınmasını), hücre iskeletinin organizasyonunu, büyüme faktörü sinyal iletimini, ve gen ifadesini düzenlemektedirler [22,23]. Ras ailesi proteinleri GTP bağlı veya GDP bağlı formları ile, iki konformasyon arasında gidip gelerek hücre içerisindeki çeşitli proteinleri etkiler ve onların da konformasyonlarının değişmesine ve fosforillenmelerine yol açarak hücre içi sinyal iletimini tetiklerler (Şekil 1) [24; ayrıca bkz. Şek. 1]. Ras'ın bağlanan GTP'yi hidrolizinden sonra, proteine bağlı kalan GDP'nin uzaklaştırılması için Guanin Değişim Faktörlerine (GEF; Guanine Exchange Factor) ihtiyaç vardır. GEF proteinleri Ras-GDP ile etkileşir ve GDP'nin proteinden uzaklaşarak, Ras'ın hücre içi derişimi daha fazla olan GTP'yi bağlayabilmesine olanak tanır [25]. Bağlanan GTP Ras'ın içsel GTPaz aktivitesi ile ve bunun yanı sıra, Ras'a bağlanan GTPaz Aktive edici Proteinler'in (GAP) etkisi ile hidrolize uğrar [26,27]. Ras'ın GTP bağlı konformasyonu, bu proteinin bağlandığı sinyal iletiminin daha alt basamağında bulunan moleküllerin (efektörlerin) de konformasyonel değişiklik geçirmelerine ve fosforillenerek sinyal iletimine katılmalarına yol açar [24]. Bu durum, Şekil 1'de "hü-

re içi etki" olarak gösterilmektedir. Efektör proteinlerin aktivasyonu ile ilgili bulgular bir alt bölümde ayrıntılı olarak sunulmaktadır (bkz. *Ras'ın efektörleri ve Ras sinyal iletim yolağı*).

Hücre zarında bulunan ve içsel tirozin kinaz aktivite-leri olan, veya diğer tirozin kinazlarla etkileşimleri olan reseptörlerden gelen sinyaller Ras proteinlerinin aktivasyonuna yol açarlar [28]. Bu modellerde, Ras'ın aktivasyonunu sağlayacak ve içlerinde Ras'a özgün GEF (en iyi bilinen örneği SOS-1), adaptör protein Grb2, ve Ras bulunan komplekslerin tutunması için fosfotirozinlerin görev yaptığı kabul edilmektedir. Tirozin kinazlarla doğrudan etkileşimleri olmayan Serpentin reseptörleri ise, src-benzeri kinazları, veya ligandlardan bağımsız olarak reseptör kinazları aktive etmek sureti ile Ras aktivasyonuna yol açarlar [29,30]. Kalsiyum iyonları ( $Ca^{2+}$ ) ve diasilgliserol (DAG) molekülleri ise Ras'ı, doğrudan Ras'a özgün GEF'leri aktive etmek sureti ile etkin hale getirmektedirler. Buna bir örnek olarak, özellikle beyin dokusunda ifadesi görülen ve  $Ca^{2+}$  bağlı kalmodülün molekülleri tarafından doğrudan aktive edilen RasGRP (Ras-Guanine Release Protein) ile etkileşmek sureti ile ortaya çıkan Ras aktivitesi verilebilir [31]. RasGRP aynı zamanda DAG molekülleri ile arasındaki doğrudan etkileşimlerle de etkin hale gelir, ve ifade edildiği dokularda Ras aktivitesine yol açar [32].



**Şekil 1.** Ras ailesi G-proteinlerin işlevsel döngüleri. Şemada mor renk ile işaretlenmiş G-proteinler GTP (kırmızı elips) bağlı oldukları durumda etkindirler ve bu hallerde hücre içi etkileri ortaya çıkar. Şekilde mavi üçgen ile gösterilmekte olan GAP'lar GTP-bağlı Ras ailesi G-proteinleri ile etkileşerek GTP hidrolizini tetiklerler ve gamma fosfatın (sarı yuvarlak) uzaklaşarak GTP'nin GDP'ye (turuncu elips) dönüşümünü sağlarlar. Bu hallerde, GDP-bağlı G-protein etkisini kaybeder ve sinyal iletim sistemi "kapalı" konuma gelir. Şemada yeşil renkli altıgen ile gösterilen GEF'ler ise G-proteine bağlı kalmış olan GDP'nin uzaklaşarak yerine GTP bağlanmasını sağlayarak sistemi yeniden etkin konuma getirirler ve sinyal iletiminin yeniden "açık" hale gelmesini sağlarlar.

## Ras'ın Ektörleri ve Ras Sinyal İletim Yolağı

GTP bağı konformasyondaki Ras ailesi proteinleri, sinyal yolağının alt basamaklarında bulunan efektör proteinlere doğrudan bağlanarak bu proteinleri (ektörleri) aktif hale geçirirler. Çok sayıda proteinin aktif GTP-Ras'a bağlandığı literatürde belirtilmektedir. Ancak bunların içerisinde sadece belirli bir sayıda protein için Ras efektörü olduklarına dair biyokimyasal ve genetik bulgular ortaya konulabilmiş ve efektör oldukları kesin şekilde bilimsel verilerle ortaya konulmuştur [24,33]. Bilinen Ras efektörlerini şu üç gruba ayırmak doğru olur: 1) RAF ("Ras Associated Factor") ve MAPK/ERK ("Mitogen Activated Protein Kinase" ve "Extracellular Signal Regulated Kinase") kaskadındaki efektörler; 2) Fosfoinozid-3-kinaz (Phosphoinositide-3-kinase; PI3-K) ve Ral ("Ras-like"; Ras benzeri protein) kaskadındaki efektörler; 3) Çeşitli farklı fonksiyonlara sahip Ras efektörleri.

Raf1, Ras efektörü olarak tanımlanan ilk proteindir [34]. Memelilerde A-Raf, B-Raf ve Raf-1 olarak adlandırılmış üç tane Raf izoformu vardır. Aktif haldeki GTP-Ras, bir serin/treonin kinaz olan Raf1'in fosforillenmesine yol açar, ve MAPK/ERK (MEK) ile başlayarak ERK1/2 ile devam eden ve E26-transkripsiyon faktörünün (ETS) aktivasyonuna yol açan sinyal yolağının fosforillenme şelalesi ile aktive olmasını tetikler [35]. Kontrolsüz olarak aktif hale gelen Raf-MEK-ERK sinyal iletiminin kemirgen hücre hatlarının onkogenik transformasyonu için yeterli olduğu, ve benzer bir bozulmanın insanda kanserleşmeye yol açtığı gösterilmiştir [36,37].

Ras'ın efektörü olarak tanımlanabilen bir diğer protein PI-3 kinazdır. Bu enzim, düzenleyici rol oynayan p85 ve katalitik aktiviteye sahip olan p110 proteinlerinden oluşan bir heterodimer olarak görev yapar. GTP-Ras, doğrudan p110'a bağlanarak heterodimeri etkinleştirir [38]. Aynı Raf1 örneğinde olduğu gibi, PI3-K aktivitesinin de Ras'a bağlı onkogenik transformasyon için gerekli olduğu tanımlanmıştır [38]. Öte yandan, Ras'ın apoptozu engelleyici etkilerinin de PI3-K proteininin AKT (ser/tir kinaz)/Protein Kinaz B ve bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB proteinleri üzerinden çalışan kontrollü hücre ölümü (*anoikis*) karşıtı rolü ile açıklanmaktadır [39]. Önce maya ikili-hibrid deneyleri, bunun ardından da yapılan bağışik-çökeltme deneyleri ile, Ras benzeri (Ras-like) bir GTPaz olan Ral'ın aktivasyonuna yol açan bir nükleotid değişim faktörü (RalGEF) olan RalGDS proteininin de Ras'ın efektörleri arasında olduğu ortaya konulmuştur [40,41]. Buna ek olarak, bu proteinin homologları Rgl ve Rlf'nin de Ras efektörleri olduğu ve her üç proteinin de (RalGDS, Rgl ve Rlf) Ral üzerinde nükleotid değişim etkilerinin olduğu gösterilmiştir [42-44]. İlginç bir şekilde, Ral'ın insülin ve epidermal büyüme faktörü ("epidermal growth factor; EGF") varlığındaki aktivasyonu, dominant-negatif Ras proteinleri tarafından inhibe edilmiş ve bu sonuç Ral-RalGDS yolağının Ras'ın altında çalıştığını kanıtlamıştır [45].

Yapılan çalışmalarda, yukarıdaki efektörlere ek olarak FosfolipazC-epsilon ("Phospholipase-Cε"; PLCε), T-hücreleri invazyon ve metastaz faktörü-1 ("T-Cell Invasion and Metastasis-1"; TIAM-1), Ras etkileşim/girişim proteini ("Ras interaction/interference protein-1"; RIN1), Afadin Proteini (AF-6), ile Ras etkileşim bölgesi bulunan proteinler ailesinin de ("Ras association domain-containing family"; RASSF) Ras efektörleri olduğu belirlenmiştir. Kelley ve arkadaşlarının çalışması [46], PLCε proteininin Ras'ın doğrudan efektörü olduğunu gösteren önemli bir çalışmadır. PLCε aktivasyonu, fosfatidil-inozitol(4,5)-fosfat'ın inozitol-1,4,5-trisfosfat ve DAG'a dönüşmesine ve böylece sırası ile Ca<sup>2+</sup> salınımına ve PKC'nin aktivasyonuna yol açmaktadır [33]. Öte taraftan, TIAM-1 proteininin de bir Ras efektörü olduğu Lambert ve arkadaşları [47] tarafından belirlenmiştir. TIAM-1 geni delesyona uğratılmış fareler Ras yolağının aktivasyonu ile oluşan deri kanseri türüne dayanıklı hale gelmiş, bu sonuç da bahsedilen deri kanserlerinin Ras aktivasyonu ile ortaya çıkabilmesi için TIAM-1 proteinine ihtiyaç olduğunu, dolayısı ile TIAM-1'in Ras yolağının bir parçası olarak görev yaptığını ortaya çıkarmıştır [47,48]. Bunlara ek olarak, AF-6, RIN1 ve RASSF proteinleri Ras efektörleri oldukları gösterilmiş olmakla beraber, yukarıdakilere kıyasla işlevleri ile ilgili daha az bilimsel veriye erişilmiş faktörlerdir. Bu efektörlerden AF-6, mikrotübül ve aktin bağlayıcı protein motifleri taşımaktadır, ve hücre iskeleti ile etkileşerek hücrenin polaritesini belirlemektedir [49,50]. Bir başka efektör olan RIN1'in ise Ras'a yüksek afinite ile bağlanarak Raf1 ile bir yarışa girdiği, dolayısı ile Raf-MEK-ERK yolağına antagonist olacak şekilde çalıştığı belirlenmiştir [51]. Bu grupta ele aldığımız üçüncü tür efektör olan RASSF proteinlerinin ise memelilerde MST1 ve MST2 ile etkileşerek siklin E (*cyclin-E*) aktivitesini engellediği, ve hücre döngüsünün durmasına ve apoptozu yol açtığı gösterilmiştir [52,53].

## GEF ve GAP Proteinlerinin Ras Aktivitesinin Düzenlenmesindeki Rolü

GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factors/Guanin Nükleotid Değişim Faktörü) ve GAP (GTPase Activating Proteins/GTPaz Aktive Edici Proteinler) proteinleri Ras ailesine bağlı küçük-GTPaz enzimlerinin aktivitesini kontrol ederek hücre işlevleri düzenleyen proteinlerdir. Genel olarak GEF'ler GTPaz'lara bağlı kalan GDP'nin uzaklaşarak yerini GTP'ye bırakmasını, GAP'lar ise G-proteinlerdeki içsel GTP hidroliz aktivitesine ek olarak GTP hidrolizinin artmasını (bazen tetiklenmesini) sağlayan proteinlerdir [54]. Önemli bir nokta, GEF'lerin ve GAP'ların çok bölgeli ("multidomain") proteinler oluşları ve bu protein bölgelerinden bazıları sayesinde hücre dışından gelen sinyallere bağlı olarak aktivitesinin düzenleniyor olmasıdır [55]. GEF ve GAP'ların aktivitesinin bu sinyallere bağlı düzenlenmeleri, G-proteinlerin aktivitesini de düzenlemekte, ve bir anlamda hücre dışından gelen sinyallerin G-proteinlere aktarılmasını



sağlamaktadırlar. Yukarıdaki çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre GEF/GAP proteinlerinin etkinlikleri translayon sonrası modifikasyonlar, ikinci habercilerin bağlanması, protein-protein etkileşimleri, protein-lipid etkileşimleri gibi etkileşimlere bağlı olarak değişmekte ve bu da kendi kontrolleri altında olan G-proteinlerinin aktivitesine yansımaktadır. Bu etkileşimler sonucunda GEF/GAP aktiviteleri üç şekilde düzenlenmektedir: 1) GEF/GAP'ların hücre içerisinde özel bir bölüme veya endoplazmik retikulum veya Golgi gibi organellere translokasyonu ve buradaki bir G-proteininin aktivasyonu; 2) proteinin bölgesel olarak modifiye olması ve otoinhibisyona yol açan bir bölgenin pozisyon değiştirerek GEF/GAP'ların aktive olmasına (ve etkilediği G-proteini aktive etmesine) olanak tanınması; 3) katalitik bölgede alosterik değişimlerin oluşarak GEF/GAP ile G-protein arasında etkileşiminin olanaklı kılınması [55].

### Ras Mutasyonlarının Onkogenizdeki Rolü

Ras genlerinde aktivasyona yol açan mutasyonların tüm insan kanserlerinin %30'unda görüldüğünü yukarıda vurgulamıştık [14]. Aslında nörofibramin-1 (NF1) ve *PTPNI1* genlerinde oluşan ve Ras yolağı aktivitesini bozan mutasyonlar, bu yolağın aktivitesindeki artışların sadece kansere değil, gelişimsel bozukluğa yol açan hastalıkların oluşumuna da etki edebildiğini göstermektedir [56,57]. Değişik Ras genlerindeki mutasyonların farklı kanserlerde yaygın olarak ortaya çıktıkları belirlenmiştir. Örneğin K-Ras mutasyonları pankreas, kolorektal, endometriyal, safra yolu, akciğer, ve serviks kanserlerinde daha sık görülmekteyken, K-Ras ve N-Ras mutasyonlarına miyelomalarda, N-Ras ve H-Ras mutasyonlarına da sırası ile melanomlarda ve idrar kesesi kanserlerinde rastlanmaktadır (bkz. Tablo 1; [58,59]). Çoğu durumda, amino asit değişikliğine yol açan somatik mutasyonlar Ras proteininin 12, 13, ve 61'inci amino asitlerinde tespit edilmektedir. Bu mutasyonlar, proteinin GTPaz aktivitelerini bozmakta ve GAP'lara karşı direnç gelişimine yol açarak GTP-bağlı formda kalan mutant Ras proteinlerinin hücrede birikimine yol açmaktadırlar [60]. H-Ras ve ona bağlı GAP proteinlerinin (p120GAP) üç boyutlu yapılarının belirlenmesi, onkogenik Ras proteinlerinin aktivasyon mekanizmaları ile ilgili önemli bilgiler vermiştir [27]. GAP proteinlerinde son derece korunmuş olan bir arjinin (arjinin parmağı olarak da bilinmektedir) Ras'ın fosfat bağlayıcı bölgesi ile etkileşmektedir. Bu etkileşim, Ras-GTP hidroliz aşamasına geçişin kararlılığını sağlayarak hidroliz reaksiyonunun katalizlenmesine yol açar. Glutamin 61, GTP hidrolizi için gerekli olduğundan, bu pozisyonadaki bir değişiklik GTP hidrolizini bloke etmektedir [61]. Benzer bir sonuç, yani Ras'ın beklenmedik şekilde aktivasyonu, glisin 12 pozisyonunun prolin dışında herhangi bir amino aside dönüştüğü mutasyonlarda da görülmektedir. Ras'ın 12. kodonundaki değişiklikler, katalitik arjinine dokunacak etkiler yapmakta ve GTP-GDP dönüşümünü bloke etmektedirler [62,63].

Onkogenik Ras proteinleri, kendi altlarındaki efektör proteinlerin aktivitelerini etkileyerek yolağın normal dışı çalışmasına ve kanser hücrelerinin kontrolsüz hücre büyümesi, kontrolsüz farklılaşma ve apoptoza direnç gibi özellikler kazanmalarına yol açarlar. Yapılan çalışmalar PI3-K, Raf-MEK-ERK ve RalGDS efektörlerindeki aktivasyonların hepsinin Ras tarafından indüklenen hücre transformasyonuna etki ettiğini göstermiştir [64]. Ras'taki 12. kodon (glisin) değişikliklerinin tamamı hücre transformasyonuna yol açmakla birlikte, farklı mutasyonların hücre morfolojileri üzerindeki etkilerinin farklı olduğu belirlenmiştir. G12V ve G12R mutanlarının çok etkili transformasyon fenotipleri varken, G12S ve G12D mutasyonlarının transformasyon etkileri olmakla beraber bu etkiler daha az belirgindir [65]. Bu noktada ifade edilmesi gereken, Ras ifade düzeyinin, hücre orijini ve özelliklerinin, ve diğer bazı genlerdeki değişikliklerin Ras mutasyonlarının sonuçlarına önemli etkiler ettiklerinin bilinmekte olduğudur. Aslında primer hücrelerde ifade ettirilen onkogenik Ras, hücrelerdeki p16<sup>INK4a</sup>, p19<sup>INK4d</sup>, ve TP53 genlerinde fonksiyonlarını bozan mutasyonlar olmadığı durumlarda senesansa yol açmaktadır [66]. Deney fareleri ile yapılan çalışmalarda, onkogenik K-Ras<sup>G12D</sup> veya K-Ras<sup>G12V</sup> allelerini tam olarak K-Ras lokusundan ifade eden transgenik hayvanların akciğer kanseri ve T-hücre lenfomasına yakalandıkları belirlenmiştir [59]. Mutan K-Ras alellerinin doku spesifik olarak ifade edildiği transgenik farelerde, gelişen pankreastaki ifadelerinin pankreas kanseri öncü lezyonlarına yol açtığı belirlenmiştir [67]. Interferon kontrolünde olacak şekilde Mx1 promotörü kontrolüne yerleştirilen mutant K-Ras alelleri, hematopoetik hücreler ve interferona yanıt veren diğer hücre tiplerinde ifade edildiklerinde, transgenik hayvanların tamamının insan juvenil ve kronik myelomonositik lösemi (JMMM ve KMML) modelleri oluşturacak şekilde myeloproliferatif bozukluklar geliştirdikleri belirlenmiştir [68,69].

GEF ve GAP proteinlerinde ifade veya protein aktivitesi düzeylerinde oluşabilecek düzenlenme bozuklukları da Ras ailesi G-proteinlerinin aktivitelerini farklı şekillerde bozarak farklı dokularda kanser oluşumunu ve metastazı tetikleyebilir ve/veya hızlandırabilirler [70]. Bu nedenlerle çeşitli GEF ve GAP proteinlerinin de ilaç hedefleri olarak ele alınarak, bunların aktivitelerini modüle edici küçük moleküller aranması, yeni ilaçların keşfine yol açacak deneysel yaklaşımlar olarak ele alınmaktadır.

### Sonuç

Ras ve Ras ailesi proteinleri hücre içi sinyal iletimin anahtarları olarak görev yapmakta, ve hücrelerdeki çoğalma, farklılaşma, ve hücre ölümü fonksiyonlarını düzenlemektedirler. Ras proteinleri, kütlelerine (yaklaşık 21 kD) ve enzimatik aktivitelerine bakılarak küçük GTPaz'lar olarak adlandırılmışlardır. Ras aktivitesi GTP hidrolizi ile kontrol edilir, ve GDP bağlı formu etkisizken, GTP bağlı formu etkin bir enzim olarak görev yapmaktadır. Bu aktivitenin düzenlenmesinde GTPaz Aktive edici Proteinler (GAP), ve Guanin Değişim Faktörleri

(GEF; Guanine Exchange Factors) görev alırlar. GAP ve GEF'ler çeşitli ligandlara bağlı olarak farklı hücre tiplerinde aktive olur, ve kontrolleri altındaki G-proteinlerin etkilerini düzenlerler. Buna bağlı olarak ortaya çıkan etkileşimlerde, efektör proteinler fosforillenerek etkin hale geçer ve sinyal iletim yollarının çalışmasını sağlarlar. Bu yollar arasında en bilinenleri MAPK/ERK, ve PI3-Kinaz sinyal iletim yollarıdır. Ras genlerinde aktivasyona yol açan mutasyonlar hücre çoğalmasını tetiklemekte olup, yapılan tüm çalışmalar bir araya getirilerek incelendiği zaman bu tür mutasyonların insanlardaki kanserlerinin %30'unda görüldüğü belirlenmektedir.

## Teşekkür

U. H. Tazebay'ın bilimsel çalışmaları TÜBİTAK (TBAG Proje noları 109-T-049 ve 109-T-925), Feyzi Akkaya Bilimsel Etkinlikleri Destekleme Vakfı, TÜBA-GEBİP, ve Bilkent Üniversitesi tarafından desteklenmektedir. P. Telkoparan, TÜBİTAK (TBAG Proje no: 109-T-925) tarafından desteklenmektedir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar U. H. Tazebay ve P. Telkoparan'ın konuyla ve/veya herhangi başka bir yazar ile ilgili maddi veya manevi bir çıkar ilişkisi yoktur.

## Kaynaklar

- [1] DeFeo D, Gonda MA, Young HA, Chang EH, Lowy DR, *et al.* (1981) Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3328-3332.
- [2] Parada LF, Tabin CJ, Shih C, ve Weinberg RA. (1982) Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297: 474-478.
- [3] Der CJ, Krontiris TG, ve Cooper GM. (1982) Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3637-3640.
- [4] Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S, ve Barbacid M. (1982) T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes *Nature* 298: 343-347.
- [5] Santos E, Martin-Zanca D, Reddy EP, Pierotti MA, Della-Porta G, ve Barbacid M. (1984) Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* 223: 661-664.
- [6] Nakano H, Yamamoto F, Neville C, Evans D, Mizuno T, *et al.* (1984) Isolation of transforming sequences of two human lung carcinomas: structural and functional analysis of the activated c-K-ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 71-75.
- [7] Hirai H, Okabe T, Anraku Y, Fujisawa M, Urabe A, *et al.* (1985) Activation of the c-K-ras oncogene in a human pancreas carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 127: 168-174.
- [8] Hand PH, Thor A, Wunderlich D, Muraro R, Caruso A, *et al.* (1984) Monoclonal antibodies predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5227-5231.
- [9] Fujita J, Yoshida O, Yuasa Y, Rhim JS, Hatanaka M, *et al.* (1984) Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. *Nature* 309: 464-466.
- [10] Gambke C, Signer E, ve Moroni, C. (1984) Activation of N-ras gene in bone marrow cells from a patient with acute myeloblastic leukemia. *Nature* 307: 476-478.
- [11] Bos JL, Toksoz D, Marshall CJ, Verlaan-de Vries M, Veeneman GH, *et al.* (1985) Amino acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukemia. *Nature* 315: 726-730.
- [12] Sklar MD, ve Kitchingman GR. (1985) Isolation of activated ras transforming genes from two patients with Hodgkin's disease. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 11: 49-55.
- [13] Padua RA, Barrass NC, ve Currie GA. (1985) Activation of N-ras in a human melanoma cell line. *Mol. Cell. Biol.* 5: 582-585.
- [14] Schubert S, Shannon K, ve Bollag G. (2007) Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Canc.* 7: 295-308.
- [15] Shih TY, Papageorge AG, Stokes PE, Weeks MO, ve Scolnick EM. (1980) Guanine nucleotide binding and autophosphorylating activities associated with the p21 src protein. *Nature* 287: 686-691.
- [16] McGrath JP, Capon DJ, Goeddel DV, ve Levinson AD. (1984) Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature* 310: 644-649.
- [17] Gibbs JB, Sigal IS, Poe M, ve Scolnick EM. (1984) Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5704-5708.
- [18] Sweet RW, Yokoyama S, Kamata T, Feramisco JR, Rosenberg M, ve Gross M. (1984) The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 311: 273-275.
- [19] Kamata T, ve Feramisco JR. (1984) Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of ras oncogene proteins. *Nature* 310: 147-150.
- [20] Mulcahy LS, Smith MR, ve Stacey DW. (1985) Requirement of ras proto-oncogene function during serum stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* 310: 147-150.
- [21] Hagag N, Haleboua S, ve Viola M. (1986) Inhibition of growth factor induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. *Nature* 319: 680-682.
- [22] Takai Y, Sasaki T, ve Matozaki T. (2001) Small GTP binding proteins. *Physiol. Rev.* 81: 153-208.
- [23] Hancock JF. (2003) Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4: 373-384.
- [24] Bos JL. (1998) All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1, and Ral. *EMBO J.* 17(23): 6776-6782.
- [25] Gilman AG. (1987) G-proteins: transducers of receptor generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649.
- [26] Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, ve Kuriyan J. (1998) The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394: 337-343.
- [27] Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, ve Wittinghofer A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277: 333-338.
- [28] Pronk GJ, ve Bos JL. (1994) The role of p21 ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1198: 131-147.
- [29] Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, ve Ullrich A. (1997) Signal characteristics of G-protein transactivated EGF receptor. *EMBO J.* 16: 7032-7044.
- [30] Lopez-Ilasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, ve Wetzker R. (1997) Linkage of G-protein coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI3-kinase gamma. *Science* 275: 394-397.

- [31] Farnsworth CL, Freshney NW, Rosen LB, Ghosh A, Greenberg ME, *et al.* (1995) Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature* 376: 524-527.
- [32] Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, *et al.* (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide releasing protein with calcium and diacylglycerol binding motifs. *Science* 280: 1082-1086.
- [33] Karnoub AE, ve Weinberg RA (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 517-531.
- [34] Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, ve Wolfman A. (1993) Complexes of RasGTP with Raf-1 and mitogen activated protein kinase kinase. *Science* 260: 1658-1661.
- [35] Niault TS, Baccarini M. (2010) Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis* 31: 1165-1174
- [36] White MA, Nicolette C, Minden A, Polverino A, Van Aelst L, *et al.* (1995) Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* 80: 533-541.
- [37] Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, ve Velculescu VE. (2002) Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch repair status. *Nature* 418: 934.
- [38] Rodriguez-Viciana P, Varne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, *et al.* (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89: 457-467.
- [39] Mayo MW, Wang CY, Cogwell PC, Rogers-Graham KS, Lowe SW, *et al.* (1997) Requirement of NF- $\kappa$ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* 278: 1812-1815.
- [40] Hofer F, Fields S, Schneider C, ve Martin GS. (1994) Activated Ras interacts with Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11089-11093.
- [41] Spaargaren M, ve Bischoff JP. (1994) Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras and rap. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12609-12613.
- [42] Kikuchi A, Demo SD, Ye ZH, Chen YW, ve Williams LT. (1994) ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7483-7491.
- [43] Wolthuis RM, Bauer B, van't Veer LJ, de Vries-Smits AM, Cool RH, *et al.* (1996) RalGDS-like factor Rlf is a novel Ras and Rap1A associating protein. *Oncogene* 13: 353-362.
- [44] Wolthuis RM, de Ruiter ND, Cool RH, ve Bos JL. (1997) Stimulation of gene induction and growth by the Ras effector Rlf. *EMBO J.* 16: 6748-6761.
- [45] Wolthuis RM, Zwartkruis F, Moen TC, ve Bos LJ. (1998) Ras dependent activation of the small GTPase Ral. *Curr. Biol.* 8: 471-474.
- [46] Kelley GG, Kaproth-Joslin KA, Reks SE, Smrcka AV, ve Wojcikiewicz RJ. (2006) G-protein-coupled receptor agonists activate endogenous phospholipase C-epsilon and phospholipase-C-beta3 in a temporally distinct manner. *J. Biol. Chem.* 281: 2639-2648.
- [47] Lambert JM, Lambert QT, Reuther GW, Malliri A, Siderovski DP, *et al.* (2002) Tiam 1 mediates Ras activation of Rac by a PI3K-independent mechanism. *Nature Cell Biol.* 4: 621-625.
- [48] Malliri A, van der Kammen RA, Clark K, van der Valk M, Michiels F, *et al.* (2002) Mice deficient in the Rac activator Tiam 1 are resistant to Ras-induced skin tumors. *Nature* 417: 867-871.
- [49] Ponting JP, ve Benjamin DR. (1996) A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem. Sci.* 21: 422-425.
- [50] Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, Obaishi H, Wada M., *et al.* (1997) Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell to cell adhesion junction *J. Cell. Biol.* 139: 517-528.
- [51] Han L, ve Colicelli JA. (1995) A human protein selected by interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf-1. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1318-1323.
- [52] Vos MD, Ellis CA, Elam C, Ulku AS, Taylor BJ, *et al.* (2003) RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* 278: 28045-28051.
- [53] Tommasi S, Dammann R, Zhang Z, Wang Y, Liu L, Tsark WM., *et al.* (2005) Tumor susceptibility of RASSF1a knock-out mice. *Cancer Res.* 65: 92-98.
- [54] Yaman E, Gasper R, Koerner C, Wittinghofer A, ve Tazebay UH. (2009) RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide exchange. *FEBS J.* 16: 4607-4616.
- [55] Bos JL, Rehmann H, ve Wittinghofer A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G-proteins. *Cell* 129: 865-877.
- [56] Cichowski K, ve Jacks T. (2001) NF-1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 104: 593-604.
- [57] Tartaglia M, ve Gelb BD. (2005) Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6: 45-68.
- [58] Bos JL. (1989) Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49: 4682-4689.
- [59] Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, *et al.* (2001) Somatic activation of K-Ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410: 1111-1116.
- [60] Trahey M, ve McCormick, F. (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238: 542-545.
- [61] Der CJ, Finkel T, ve Cooper GM. (1986) Biological and biochemical properties of human RasH genes mutated at codon 61. *Cell* 44: 167-177.
- [62] Colby WW, Hayflick JS, Clark SG, ve Levinson AD. (1986) Biochemical characterization of polypeptides encoded by mutated human Ha-ras-1 genes. *Mol. Cell. Biol.* 6: 730-734.
- [63] Franken SM, Scheidig AJ, Krengel U, Rensland H, Lautwein A, *et al.* (1993) Three-dimensional structures and properties of a transforming and a non-transforming glycine-12 mutant of p21H-ras. *Biochemistry* 32: 8411-8420.
- [64] Repasky GA, Chenette EJ, ve Der CJ. (2004) Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol.* 14:639-47.
- [65] Seeburg PH, Colby WW, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD. (1984) Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* 312 :71-5.
- [66] Serrano M. (1997) The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res.* 237:7-13.
- [67] Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, *et al.* (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4: 437-450.
- [68] Braun BS, Tuveson DA, Kong N, Le DT, Kogan SC, *et al.* (2004) Somatic activation of oncogenic K-ras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 597-602.
- [69] Chan IT, Kutok JL, Williams IR, Cohen S, Kelly L, *et al.* (2004) Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease. *J. Clin. Invest.* 113: 528-538.
- [70] Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, ve Der CJ. (2010) Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer* 10: 842-857.