

ÖNSÖZ

Türkiye Cumhuriyeti Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen "LETM1 gen ekspresyonu ile JNK aktivasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması" başlıklı ve NKUBAP.00.10.AR.13.01 numaralı projemize ait sonuç raporu sunulmaktadır. Çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlar bir mitokondriyal iç membran proteini olan LETM1' in ekspresyon düzeyinin artırılmasının JNK fosforilasyonunda da artışa neden olduğuna işaret etmektedir. Diğer taraftan bu tip çalışmalarda kullanılan madde ve malzemelerin fiyatlarının yüksek oluşu bütçe koşulları çerçevesinde elde edilen verilerin detaylı bir incelemesine olanak sağlamamaktadır. Bu nedenle bu çalışmadan elde edilen ön verilerin yeni proje destekleri ile devam ettirilmesi öncelikli hedefimizdir. Bu çalışma kapsamında yardımlarını eksik etmeyen tüm Biyoloji Bölümü öğretim elemanlarına, çalışmaya aktif olarak katılarak büyük yarar sağlayan lisansüstü öğrencilerimize ve projemizi destekleyen Üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Başkanlığına proje ekibi olarak teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	1
İÇİNDEKİLER.....	2
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ	3
ÖZET	4
ABSTRACT	5
GİRİŞ.....	6
YÖNTEM	9
Hücre kültürü ve <i>in vitro</i> transfeksiyon.....	9
Hücre canlılığının tayini	9
Western Blot.....	9
SONUÇLAR.....	10
KAYNAKLAR	12

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1. LETM1 kodlayan plazmid ile transfeksiyonu takiben HeLa hücrelerinde LETM1, JNK ve fosfo-JNK (pJNK) düzeyleri. 1,2 ve 3. cü kuyular LETM1 ile transfekte hücreler, 4 kuyu kontrol grubunu ifade etmektedir. En alt sırada internal kontrol olarak kullanılan aktin verilmiştir. 10

Şekil 2. LETM1 ile transfekte hücrelerde MTS ile belirlenen hücre canlılığı..... 10

ÖZET

LETM1 (Leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1) proteini hücre içi iyon homeostazisi ve oksidatif fosforilasyon zinciri biyogenezinde rol oynayan bir mitokondriyal iç membran proteinidir. Proteinin fonksiyonuna yönelik çalışmalar daha ziyade Ca^{2+} ve K^+ taşınmasına yönelik olmakla birlikte maya homoloğunda protein sentezi ile olan ilişkisi ele alınmaktadır. Bir üçüncü çalışma alanı olarak hücre ölümündeki rolünü sorgulayan çalışmalar ise sınırlı sayıdadır.

Proje çalışmamız kapsamında LETM1 ekspresyonundaki artışın JNK fosforilasyonu üzerine etkisinin olup olmadığı ele alınmıştır. Bu çerçevede Lipofektamin ile HeLa hücrelerinin transfeksiyonunu takiben LETM1 ve JNK düzeyleri western blot yöntemi ile test edilmiştir. Ayrıca LETM1 ekspresyonundaki artışın hücre canlılığına etkisi MTS ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda Lipofektin aracılı transfeksiyon sonrası LETM1 ekspresyonunun arttığı ve bu hücrelerde JNK fosforilasyonunun değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca hücre canlılığının da LETM1 ekspresyonundaki artışa paralel olarak azaldığı görülmüştür.

LETM1 aşırı ekspresyonunun JNK yolağındaki rolü laboratuvarımızda halen devam etmekte olan bir araştırma konusudur. Bu amaçla yeni projeler ile LETM1 fonksiyonu hakkında daha fazla veri alınması planlanmaktadır.

ABSTRACT

LETM1 (Leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1) is a mitochondrial inner membrane protein which plays role in intracellular ion homeostasis and biogenesis of oxidative phosphorylation. In general, most of the current studies focusing on the Ca and K transport function and its role in protein synthesis in its yeast homologue of LETM1. There are limited number of studies questioning its role in cell death.

In this study, effect of increased expression of LETM1 on phosphorylation of JNK studied. JNK and LETM1 levels were tested by western blotting after Lipofectamine transfection of HeLa cells. Also effect of increased LETM1 levels on cell viability was tested by MTS.

According to our data, LETM1 levels were significantly increased and phosphorylation status of JNK was changed in transfected HeLa cells. Also, cell viability was significantly decreased in regard to increase in LETM1 levels.

Effect LETM1 overexpression on JNK cascade is still under investigation in our laboratory. We are planning to extend our research with new funds to gain more data on the LETM1 function.

GİRİŞ

LETM1 (Leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1) proteini ilk olarak Wolf-Hirschhorn sendromunda tanımlanmış ve hastaların neredeyse tamamında geninin delesyonlu olduğu bildirilmiş bir mitokondriyal iç membran proteinidir (Endele, Fuhry et al. 1999; Rauch, Schellmoser et al. 2001). Gerek LETM1 gerekse onun maya homologu olan Mdm38 ve MRS7 üzerine yapılan çalışmalarda proteinin K^+/Ca^{2+} homeostazisi ve oksidatif fosforilasyon zinciri biyogenezinde rol aldığı ve eksikliği ve/veya aşırı ekspresyonunun mitokondriyal morfoloji üzerine etkili olduğu belirtilmiştir (Nowikovsky, Pozzan et al.). Proteinin yapısı genel olarak iyi korunmuş ve türler arasında büyük benzerlik göstermektedir. İnsan LETM1 proteini iki Ca^{2+} bağlama domeni (EF hand), iki "coiled-coil" domeni ve mitokondri iç membranını kat eden transmembran domen ile mitokondriyal matrikse uzaman N-terminalinden oluşmaktadır (Bernardi 1999; Nowikovsky, Froschauer et al. 2004; Dimmer, Navoni et al. 2008). Matrikste yer alan bu kısmın mitokondriyal ribozomlarla ilişkili olduğu ve dolayısıyla mitokondriyal protein sentezi ve oksidatif fosforilasyon zinciri biyogenezinde rol oynadığı bildirilmektedir. Bu yapının bozulmasının sitokrom b, Atp6 ve kompleks III proteinlerinin yerleşimini etkilediği bildirilmiştir (Frazier, Taylor et al. 2006; Nowikovsky, Reipert et al. 2007; Tamai, Iida et al. 2008). Jiang ve ark., (Jiang, Zhao et al. 2009), Letm1' in bir mitokondriyal içmembran protein olarak Ca^{2+}/H^+ antiporter protein olduğunu ve aşırı ekspresyonunda pH bağımlı Ca^{2+} alımının 5 kat arttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde LETM1 baskılanmasının mitokondriyal Ca^{2+} alımını anlamlı derecede düşürdüğünü bildirmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar LETM1 ekspresyonuna bağlı mitokondri morfolojisindeki değişimlerin sekonder olduğunu ve hücre tipine bağlı olarak meydana geldiğini vurgulamışlardır. Çalışmacılar makalelerinde LETM1' in Ca^{2+} homeostazisindeki rolü ile apoptotik veya nekrotik hücre ölümünün indüklenebileceğini belirtmişlerdir. Dimmer ve ark., (Dimmer, Navoni et al. 2008), LETM1 ekspresyonunun HeLa hücrelerinde baskılanmasının mitokondriyal fragmentalizasyona yol açtığını ve kaspaz aktivasyonundan bağımsız, Bcl-2 aşırı ekspresyonuna duyarsız nekrotik hücre ölümüne yol açtığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan Piao ve ark., (Piao, Li et al. 2009), LETM1 geninin adenoviral transdüksiyonu sonrası HeLa hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edildiğini ve bu aşırı ekspresyonun nekrotik hücre ölümüne yol açtığını bildirmişler ancak, Dimmer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Dimmer, Navoni et al. 2008) LETM1 baskılanması sonucu ortaya çıkan fenotipin neden aşırı ekspresyonla da gözlemlendiğini açıklayamamışlardır. Çalışmada nekrotik hücre ölümünün solid tümörlerin ortak noktası olmasından hareketle çeşitli kanserlerdeki ekspresyonu incelenmiş ve aşırı ekspresyonun olduğu bildirilmiştir. Çalışmacılar LETM1 aşırı ekspresyonu ile ilişkili mitokondriyal fonksiyon yitiminin, artan glikolitik aktivite ile birlikte PTEN oksidasyonu ile PI3-kinaz/PKB yolağının aktive olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırma grubu bir diğer çalışmada ise LETM1'in karboksi terminal modülatör proteinle ilişkili olduğu ve adenoviral transdüksiyon sonrası aşırı eksprese ettirilen LETM1 proteininin apoptotik hücre ölümüne yol açtığını bildirmiştir (Piao, Li et al. 2009). Araştırmacılar LETM1 aşırı ekspresyonuna bağlı apoptotik

hücre ölümü için LETM1'in tek başına yeterli olmadığını sadece staurosporin ve aktinomisin D gibi apoptotik ajanlara hassasiyeti arttırarak etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar karboksi modulator protein aktivasyonunun Akt yolağının bir inhibitörü olması noktasına değinmişler ancak Akt aktivasyonunu değlendirmemişlerdir. Bir diğerk çalışmada ise adenovirüs yolu ile LETM1 gen ekspresyonunun arttırılmasının mitokondriyal ATP üretimini azaltarak AMP-ile aktive olan protein kinaz (AMPK) aktivasyonuna yol açtığını ve Akt/mTOR yolağının inhibe olduğunu belirtmiştir. Ayrıca *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde LETM1 aşırı ekspresyonunun apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu ve adenoviral transdüksiyon sonrası ekspresyonu artan LETM1 proteininin tek başına bu etkiden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (Hwang, Piao et al. 2010). Bu çalışmalarında araştırmacılar, LETM1'in akciğerkanserinin gelişimine etkisini araştırmışlar ve fare akciğerk modelinde adenoviral LETM1 uygulamasının tümörün gelişimini yavaşlattığını ve tümör kitlesinde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. LETM1'in fonksiyonu ve hücre ölümüyle ilişkisini gösteren çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkili olmakla beraber tüm çalışmalarda mitokondriyal morfoloji ile ilgisi olduğu ve aşırı ekspresyonunun mitokondriyal ATP üretiminde azalmaya yol açtığı belirtilmektedir. Bu çalışmalar LETM1' in hücre ölümündeki rolünün anlaşılabilmesi için aşırı ekspresyon veya baskılanmanın nasıl bir hücre içi mekanizmayı harekete geçirdiğinin araştırılması gerekliliğini açıkça ortaya koymaktadır (Nowikovsky, Pozzan et al.). Özellikle aynı tipte uygulamaların hem proapoptotik hem de antiapoptotik etkilerinin gözlenmiş olması proteinin her iki şekilde de etkili olabilecek protein partnerleri olduğunu (ANT ailesi, Bcl ailesi gibi) ya da her iki şekilde de hücre sel cevap oluşturabilecek yolları aktive ettiğini düşündürmektedir.

c-jun N-terminal kinaz (JNK) mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) süper ailesinin bir üyesidir. JNK başta c-jun olmak üzere p53, ATF2, c-Myc gibi transkripsiyon faktörleri ile Bcl2, Bcl-xL, Bad ve Bim gibi proteinleri fosforiller (Bogoyevitch and Kobe 2006). JNK aktivasyonu hücre sel stres ile MAPK kinazlar aracılığı ile proteinin Thr¹⁸³ ve Tyr¹⁸⁵ bakiyelerinden fosforilasyonu ile gerçekleşir. JNK aktivasyonunda endoplazmik retikulum stresi ile ortaya çıkan Ca²⁺ serbestleşmesinin önemli rolü olduğu ve serbestleşen Ca²⁺' un mitokondri tarafından alınmasının apoptotik hücre ölümünde önemli olduğu bilinmektedir (Verma and Datta 2012). Ayrıca mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak ROS artışı ve ATP sentezindeki düşüşte aynı yolağın aktive edilmesinde rol oynaktadır (Silva, Wong et al. 2009; Wang, Yuan et al. 2013). JNK' nın gerek sitosolik kalsiyum homeostazisi ile ilgisi gerekse mitokondriyal disfonksiyona cevaben aktivasyonu bu yolağın LETM1 ekspresyonundaki değışimlere cevaben aktive olabileceğini düşündürmüş ve bu kapsamda proje önerimiz şekillendirilmiştir. Hipotezimizi test etmek amacıyla HeLa hücrelerinde *in vitro* transfeksiyonu takiben LETM1 gen ekspresyonunun transfekte olmamış hücrelere kıyasla arttırılması sağlanarak her iki hücre grubunda da JNK fosforilasyonu western blot yöntemi ile protein düzeyinde incelenmiştir. Bir ön çalışma niteliğindeki çalışmamızdan elde edilen sonuçlar LETM1 ekspresyonundaki artışın

JNK fosforilasyonunu da etkilediği yönündedir. Elde edilen verilerin hücresel etkilerinin anlaşılması için daha detaylı çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

YÖNTEM

Hücre kültürü ve *in vitro* transfeksiyon

Proje kapsamında HeLa hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS), penisilin/streptomisin ve L-glutamin içeren D'MEM besiyerinde T75 hücre kültürü kaplarında yetiştirilmiştir. Hücre pasajları PBS ile yıkamayı takiben tripsin/EDTA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan tüm malzeme ve kimyasallar Sigma (ABD) veya SantaCruz (ABD) firmalarından temin edilmiştir. İnsan LETM1 kodlayan plazmid DNA Prof. Wolfgang G. Graier' den (Graz Tıp Fakültesi, Avusturya) temin edilmiştir. *E.coli* JM107 suşuna transformasyon sonrası bakteri kültürlerinden izole edilen plazmidlerin konsantrasyonu spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Transfeksiyon amacıyla hücreler, bir gün önceden 300.000 hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyucuklu kültür kaplarına pasajlanmıştır. Transfeksiyon OPTIMEM içerisinde antibiyotik ve FBS içermeyen ortamda LİPOFEKTİN (İnvitrogen, ABD) kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılığının tayini

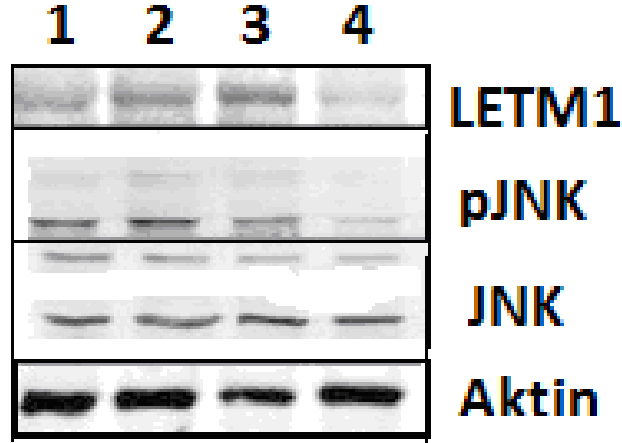
Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla MTS testi gerçekleştirilmiştir. Transfekte ve transfekte olmamış kontrol hücrelerine hazırlanan MTS solüsyonundan karanlık bir ortamda eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edilmiş ve oluşan renk 490 nm'de mikropilaka okuyucuda ölçülmüştür.

Western Blot

Transfeksiyonu takip eden 48. saatte hücreler PBS ile yıkamayı takiben kazınarak soğuk PBS içerisinde toplanmış ve 10000 rpm, 5 dakika santrifüj ile ayrılmıştır. Her grupta hücreler 50 µl proteaz inhibitör kokteyli içeren RIPA tamponu ile parçalanarak total protein miktarı BCA yöntemi ile sığır serum albumini kullanılarak elde edilmiş olan standart eğriye üzerinden spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Lizatlardan her bir kuyuya 5 µg protein olacak şekilde %7,5 SDS-PAGE jelle yükleme yapılarak oda sıcaklığında 2 saat yürütülmüştür. Jelde ayrılan proteinler PVDF membrana oda sıcaklığında 40V akımda %10 metanol içeren tris glisin tamponu içerisinde transfer edilmiştir. LETM1, JNK ve fosfo-JNK protein düzeylerinin belirlenmesi amacıyla membranlar uygun antikolar ile mumele edilerek kemilüminesans substrat varlığında X-ray filmlerde gösterilmiştir. Western blot tayinleri için fare veya tavşan antikolarına özgün western breeze kit (İnvitrogen, ABD) kullanılmıştır. Kullanılan tüm antikolar Novus, ABD' den temin edilmiştir. Aynı membran üzerinde birden fazla proteinin tayininde membranlar öncelikle "stripping buffer" ile yıkanmış ve ilgilenilen diğer protein için tayin işlemi tekrar edilmiştir. Tüm western blot çalışmalarında Beta-aktin internal kontrol olarak kullanılmıştır.

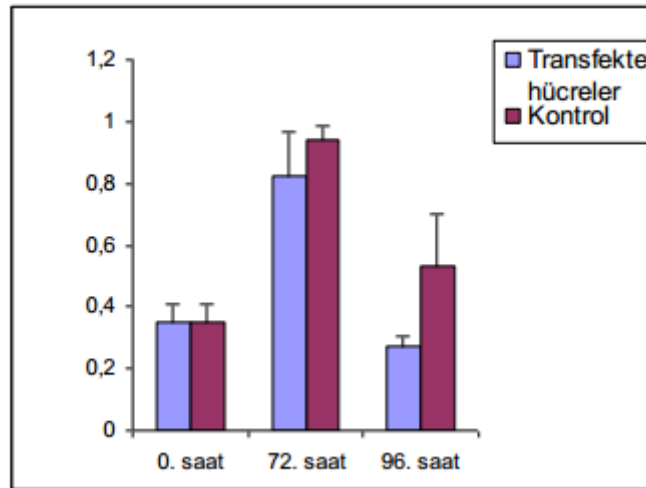
SONUÇLAR

Lipofektin aracılı in vitro transfeksiyon sonrası elde edilen sonuçlar LETM1 ekspresyonunun HeLa hücrelerinde arttığını göstermektedir (Şekil 1). Bu örneklerde fosforile JNK düzeyleri kontrol grubundan belirgin şekilde fazladır (Şekil 1).



Şekil 1. LETM1 kodlayan plazmid ile transfeksiyonu takiben HeLa hücrelerinde LETM1, JNK ve fosfo-JNK (pJNK) düzeyleri. 1,2 ve 3. cü kuyular LETM1 ile transfekte hücreler, 4 kuyu kontrol grubunu ifade etmektedir. En alt sırada internal kontrol olarak kullanılan aktin verilmiştir.

LETM1 ile transfekte hücrelerde hücre canlılığının mevcut literatürle uyumlu olarak azaldığı belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. LETM1 ile transfekte hücrelerde MTS ile belirlenen hücre canlılığı.

Sonuç olarak elde edilen veriler LETM1 ekspresyonundaki artışı JNK fosforilasyon düzeyinde değişime neden olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer taraftan hücre canlılığının azalması literatürle uyumlu gözükmekle beraber elde edilen sonuçların MTS gibi metabolik aktiviteye dayanan bir yöntem yerine FACS ile doğrulanması gerekmektedir. Bu proje kapsamında bu Şekilde bir metodoloji gerekli alt yapı olanaklarının olmaması nedeniyle kullanılamamıştır. Üniversitemiz bünyesinde oluşturulan merkezi araştırma laboratuvarı hizmete girmiş ve gelecek çalışmalarımız için gerekli alt yapı olanaklarına sahiptir. Bu deneylerin belirtilen merkezde tekrarlanması planlanmaktadır. Ayrıca JNK yolağında etkili diğer faktörlerin belirlenmesi ve elde edilen sonuçların daha detaylı olarak ele alınması gelecek çalışmalarımız için planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Bernardi, P. (1999). "Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition." Physiol Rev **79**(4): 1127-55.
- Bogoyevitch, M. A. and B. Kobe (2006). "Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases." Microbiol Mol Biol Rev **70**(4): 1061-95.
- Dimmer, K. S., F. Navoni, et al. (2008). "LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability." Human Molecular Genetics **17**(2): 201-214.
- Endele, S., M. Fuhry, et al. (1999). "LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca²⁺-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients." Genomics **60**(2): 218-225.
- Frazier, A. E., R. D. Taylor, et al. (2006). "Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery." J Cell Biol **172**(4): 553-64.
- Hwang, S. K., L. Piao, et al. (2010). "Suppression of lung tumorigenesis by leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1." PLoS One **5**(9): e12535.
- Jiang, D., L. Zhao, et al. (2009). "Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter." Science **326**(5949): 144-7.
- Nowikovsky, K., E. M. Froschauer, et al. (2004). "The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome." Journal of Biological Chemistry **279**(29): 30307-30315.
- Nowikovsky, K., T. Pozzan, et al. "Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the pathophysiology of LETM1." J Gen Physiol **139**(6): 445-54.
- Nowikovsky, K., S. Reipert, et al. (2007). "Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy." Cell Death Differ **14**(9): 1647-56.
- Piao, L., Y. Li, et al. (2009). "Regulation of OPA1-mediated mitochondrial fusion by leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein-1 plays a role in apoptosis." Cell Signal **21**(5): 767-77.
- Piao, L., Y. W. Li, et al. (2009). "Association of LETM1 and MRPL36 Contributes to the Regulation of Mitochondrial ATP Production and Necrotic Cell Death." Cancer Research **69**(8): 3397-3404.
- Rauch, A., S. Schellmoser, et al. (2001). "First known microdeletion within the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region refines genotype-phenotype correlation." Am J Med Genet **99**(4): 338-42.

- Silva, J. M., A. Wong, et al. (2009). "Inhibition of mitochondrial function induces an integrated stress response in oligodendroglia." Neurobiol Dis **34**(2): 357-65.
- Tamai, S., H. Iida, et al. (2008). "Characterization of the mitochondrial protein LETM1, which maintains the mitochondrial tubular shapes and interacts with the AAA-ATPase BCS1L." J Cell Sci **121**(Pt 15): 2588-600.
- Verma, G. and M. Datta (2012). "The critical role of JNK in the ER-mitochondrial crosstalk during apoptotic cell death." J Cell Physiol **227**(5): 1791-5.
- Wang, J., L. Yuan, et al. (2013). "Momordin Ic induces HepG2 cell apoptosis through MAPK and PI3K/Akt-mediated mitochondrial pathways." Apoptosis.