

**NKUBAP.00.10.AR.14.12 nolu proje**

**LETM1 ekspresyonuna bağlı JNK fosforilasyonundaki değişimde PERK' in  
rolünün araştırılması**

**Yürütücü: Doç. Dr. Cenk ARAL**

**Araştırmacı: Doç. Dr. Rifat BİRCAN**

**2015**

## ÖNSÖZ

Türkiye Cumhuriyeti Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen "LETM1 ekspresyonuna bağlı JNK fosforilasyonundaki değişimde PERK' in rolünün araştırılması" başlıklı ve NKUBAP.00.10.AR.14.12 numaralı projemize ait sonuç raporu sunulmaktadır. Bu proje daha önce NKUBAP tarafından desteklenen "LETM1 Gen Ekspresyonu ile JNK Aktivasyonu Arasındaki İlişkinin Araştırılması" başlıklı projemizin devamı niteliğinde olup moleküler biyoloji alanında yapılan çalışmaların yüksek maliyeti nedeniyle ayrı bir proje önerisi olarak sunulmuştur. LETM1 ekspresyonundaki artışa paralel olarak belirlenen JNK fosforilasyonundaki artış tek başına bilimsel bir anlam ifade etmemekte ve bu nedenle bu proteinin hedefinde yer alan c-jun fosforilasyonunun doğrulanması ve endoplazmik retikulum stresi ile ilişkili bir protein olan PERK in bu süreçte rolünün varlığı incelenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada tüm deneyler tekrar edilerek JNK fosforilasyonuna ek olarak c-jun fosforilasyonu belirlenmiş ancak PERK fosforilasyonunda bir değişim gözlenmemiştir. 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 .....	3
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ.....	4
ÖZET .....	5
ABSTRACT .....	6
GİRİŞ .....	7
YÖNTEM .....	11
<b>Hücre kültürü ve <i>in vitro</i> transfeksiyon</b> .....	11
<b>Western Blot</b> .....	11
SONUÇLAR .....	13
KAYNAKLAR .....	15

## TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

**Şekil 1.** LETM1 kodlayan plazmid ile transfeksiyonu takiben HeLa hücrelerinde LETM1 ve aktin düzeyleri. 1 ve 2 kontrol, 3 ve 4 ise transfekte hücre grubunu ifade etmektedir..... 13

**Şekil 2.** LETM1 ile transfekte hücrelerde fosfo-cJun ve PERK. 1 ve 2. kuyular transfekte hücreleri, 3. kuyu ise kontrol grubunu ifade etmektedir. .... 14

## 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 homologunda protein sentezi ile olan ilişkisi ele alınmaktadır. Bir üçüncü çalışma alanı olarak hücre ölümündeki rolünü sorgulayan çalışmalar ise sınırlı sayıdadır.

Proje çalışmamız kapsamında geçmiş projemizde belirlemiş olduğumuz JNK aktivasyonun da endoplazmik retikulum stresinde rol oynayan PERK' in rolü ele alınmış ayrıca c-jun fosforilasyonu incelenmiştir. Bu çerçevede Lipofektamin ile HeLa hücrelerinin transfeksiyonunu takiben LETM1 ve c-jun ve PERK düzeyleri western blot yöntemi ile test edilmiştir.

Çalışmamızda Lipofektin aracılı transfeksiyon sonrası LETM1 ekspresyonunun arttığı ve bu hücrelerde c-jun fosforilasyonu belirlenmiştir. Ancak PERK proteininin varlığı gösterildiği halde bu proteinin fosforilasyonu görülmemiştir.

LETM1 ekspresyonundaki değişimlerin hücresel etkilerinin incelenmesine yönelik çalışmalarımız TÜBİTAK destekli projemiz kapsamında devam etmektedir. Bu çerçevede gerek hücre içi sinyal iletim yollarının belirlenmesi gerekse mitokondriyal fonksiyon üzerine etkilerin çalışılması 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 PERK and c-jun in the light of the data obtained from our previous study. LETM1, c-jun and PERK levels were tested by western blotting after Lipofectamine transfection of HeLa cells.

According to our data, LETM1 levels were significantly increased and phosphorylated c-jun was detected in transfected HeLa cells. On the other hand PERK phosphorylation did not observed.

Cellular effects of LETM1 expression are still under investigation in our laboratory with the project granted by TUBITAK. In this regard, we are planning to determine intracellular signal cascades as well as mitochondrial function in response to LETM1 expression changes.

## 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 proteini (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.). 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 uzanan 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 iç membran proteini 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. Diğer taraftan son yıllarda yapılan çalışmalar bu aşınmanın LETM1' in bir direkt fonksiyonu olmaktan ziyade değişen potasyum taşınmasının bir sonucu olarak elektroforetik olarak gerçekleştiğini göstermektedir. 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 gözlendiğini 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 değerlendirmemişlerdir. Bir diğer çalışmada ise adenovirüs yolu ile LETM1 gen ekspresyonun 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 arttan LETM1 proteininin tek başına bu etkiden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (Hwang, Piao et al. 2010). Bu çalışmalarında araştırmacılar, LETM1'in akciğer kanserinin gelişimine etkisini araştırmışlar ve fare akciğer 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 hücrel 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 hücrel stres ile MAPK kinazlar aracılığı ile proteinin Thr<sup>183</sup> ve Tyr<sup>185</sup> bakiyelerinden fosforilasyonu ile gerçekleşir. JNK aktivasyonunda endoplazmik retikulum stresi ile ortaya çıkan Ca<sup>2+</sup> serbestleşmesinin önemli rolü olduğu ve serbestleşen Ca<sup>2+</sup> 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). Mitokondrinin enerji üretim merkezi olmasının yanı sıra programlı hücre ölümünde oynadığı önemli rol JNK yolağı ile mitokondri arasındaki ilişkiyi de ilgi çekici hale getirmektedir. Mitokondrinin hücre ölümündeki rolünün Bax ve Bak aracılığı ile mitokondriyal membran potansiyelinin değişmesi ve sitokrom c, Smac/DIABLO ve apoptoz indükleyici faktörün (AIF) mitokondriyal permeabilite tranzisyon parlarından sitozole geçerek kaspaz aktivasyonuna ve sonuçta hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Bu süreçte meydana gelen pro-apoptotik mekanizmalar tam anlamıyla çözümlenmiş değildir. Bu süreçte rol oynayan önemli bir faktör kalsiyumdur. Endoplazmik retikulumdan Ca<sup>2+</sup> serbestleşmesi JNK fosforilasyonunu uyarır ve Bad fosforilasyonuna yol açar. Ayrıca JNK fosforilasyonunu takiben daha fazla Ca<sup>2+</sup> salınımına neden olur ve Bak/Bax'ın mitokondriyal membranda por oluşturmasına ve sitokrom c serbestleşmesine neden olur. Serbestleşen sitokrom c kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonu ile hücreyi apoptoza götürür. Serbestleşen Ca<sup>2+</sup> aynı zamanda kaspaz 12' yi de etkileyerek bu sürece dahil olur.

LETM1' in aşırı ekspresyonunun gerek apoptotik hücre ölümünde rolü olabileceğinin gösterilmiş olması gerekse direkt veya indirekt olarak (elektroforetik) sitozolik Ca<sup>2+</sup> düzeylerini etkilediğinin belirlenmesi bu süreçte JNK' nin dahil olabileceğini düşündürmüştür. Bu çerçevede üniversitemiz tarafından desteklenen bir önceki projemizde LETM1 ekspresyonundaki artışın JNK fosforilasyonu üzerine etkili olduğu

belirlenmiştir. Diğer taraftan proje bütçemiz sınırları içerisinde JNK fosforilasyonunun gösterilmesinden öteye gidilememiştir. Bu çalışma bu bakımdan tamamlanan projemize ek olarak kısa süreli planlanmıştır. Çalışma kapsamında öncelikle JNK fosforilasyonu ile ilişkili bir protein olan c-jun fosforilasyonu ve endoplazmik retikulum stresinde rol oynayan PERK fosforilasyonu ele alınmıştır.

## 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 LİPOFEKTAMİN (İnvitrogen, ABD) kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

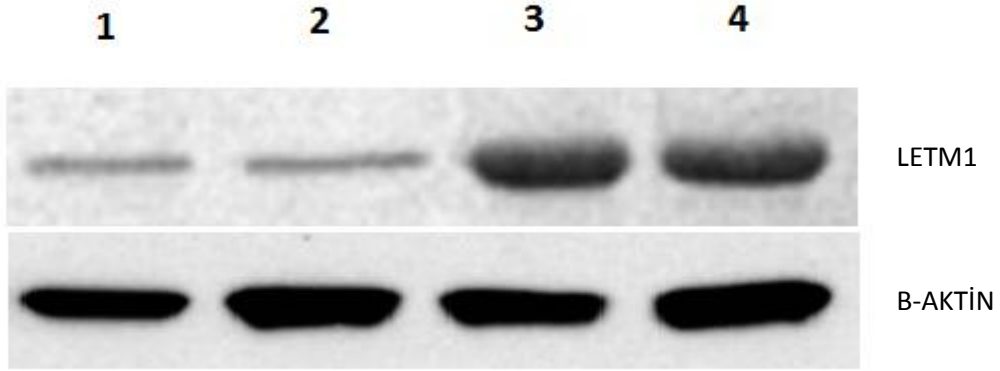
### Western Blot

Transfeksiyonu takip eden 48. saatte hücreler PBS ile yıkamayı takiben kazınarak soğuk PBS içerisinde toplanmış ve 14000 rpm, 10 dakika santrifüj ile ayrılmıştır. Her grupta hücrelere 50 µl proteaz inhibitör kokteyli içeren RIPA tamponu ile eklenerek buz içerisinde 30 dakika inkübasyonu takiben hücre lizatı 14000 rpm hızda 10 dakika santrifüj ile ayrılmıştır. Süpernatantta total protein miktarı Bradford yöntemi 4x Bradford reaktifi (BioRAD) kullanılarak standart eğri üzerinden spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Lizatlardan her bir kuyuya 20 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, c-Jun, PERK ve fosfo-PERK protein düzeylerinin belirlenmesi amacıyla membranlar uygun antikolar ile muamele edilerek kemilüminesans substrat varlığında X-ray filmlerde gösterilmiştir. Aynı membranlarda molekül ağırlığı birbirinden farklı örnekler için membranlar renkli belirteçlerin yardımı ile uygun boyutlarda kesilerek çalışılmıştır. 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 10 dakika yıkanmış ve ilgilenilen diğer protein için tayin işlemi tekrar edilmiştir. Tüm western blot çalışmalarında Beta-aktin internal kontrol olarak kullanılmıştır.

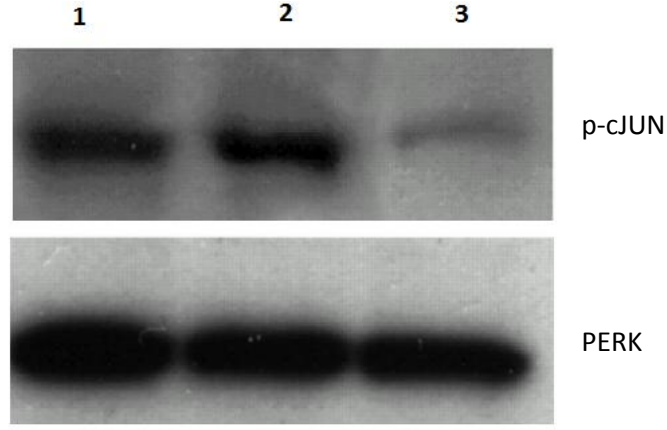
## SONUÇLAR

Çalışmamız kapsamında HeLa hücrelerinde LETM1 gen ekspresyonu lipofektamin transfeksiyonu ile başarılı şekilde arttırılmıştır. Bu aşamada kullanılan kontrol proteini olan B-aktinin LETM1 gen ekspresyonuna bağlı olarak değişmediği gerek protein düzeyide, gerekse mRNA düzeyinde halen devam etmekte olan TÜBİTAK projemiz kapsamında gösterilmiş olup çalışmanın sağlıklı değerlendirilmesi açısından uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Transfeksiyon sonrası LETM1 düzeylerinde değişim Şekil 1' de gösterilmiştir.



**Şekil 1.** LETM1 kodlayan plazmid ile transfeksiyonu takiben HeLa hücrelerinde LETM1 ve aktin düzeyleri. 1 ve 2 kontrol, 3 ve 4 ise transfekte hücre grubunu ifade etmektedir.

LETM1 ile transfekte hücrelerde JNK fosforilasyonunun hedeflerinden biri olan c-jun fosforilasyonu western blot yöntemi ile incelenmiş ve fosforile c-jun transfekte hücrelerde gösterilmiştir. Diğer taraftan endoplazmik retikulum stresinde rol oynayan bir protein olan PERK gerek transfeksiyon gerekse kontrol grubunda gösterildiği halde fosfo-PERK her iki grupta da görülmemiştir (Şekil 2).



**Şekil 2.** LETM1 ile transfekte hücrelerde fosfo-cJun ve PERK. 1 ve 2. kuyular transfekte hücreleri, 3. kuyu ise kontrol grubunu ifade etmektedir.

Çalışma kapsamında incelenen ve bir endoplazmik retikulum stres proteini olan PERK fosforilasyonuna rastlanmamıştır ancak bu süreçte rol oynayan IRE1 ve ATF6 gibi diğer yolların aktivasyonuna ilişkin bir veri bulunmamaktadır. LETM1 ekspresyonundaki değişimlerin rolünün araştırılmasında bu proteinin plazmid DNA transfeksiyonu ile ekspresyonunun artırılmasının elde edilen veriler çerçevesinde yetersiz kaldığı görülmektedir. Diğer taraftan siRNA kullanılarak gen ekspresyonunun baskılanması ve hücresel değişimlerin bu çerçevede incelenmesi proteinin rolünün sorgulanması bakımından çok daha verimlidir. Bu nedenle laboratuvarımızda gen LETM1 ekspresyonunun artırılması yolu terk edilerek siRNA uygulamaları ile gen ekspresyonunun baskılanması yolu benimsenmiştir ve devam etmekte olan çalışmalarımız bu yöntem çerçevesinde sürdürülmektedir.

## 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 Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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.