

**LETM1 İLE TRANSFEKTE EDİLEN
HÜCRELERDE APOPTOTİK BELİRTEÇLERİN
İNCELENMESİ**

Serdar FINDIK

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Cenk ARAL

2013

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LETM1 İLE TRANSFEKTE EDİLEN HÜCRELERDE APOPTOTİK
BELİRTEÇLERİN İNCELENMESİ**

Serdar FINDIK

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Cenk ARAL

TEKİRDAĞ-2013

Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. Cenk ARAL danışmanlığında, Serdar FINDIK tarafından hazırlanan “LETM1 ile transfekte edilen hücrelerde apoptotik belirteçlerin incelenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Başkanı :Yrd. Doç. Dr. Cenk ARAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Duygu Yaşar ŞİRİN

İmza :

Üye :

İmza :

Üye :

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LETM1 İLE TRANSFEKTE HÜCRELERDE APOPTOTİK BELİRTEÇLERİN İNCELENMESİ

Serdar FINDIK

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Cenk ARAL

LETM1 hücre için kalsiyum ve potasyum homestazisi, mitokondriyal protein sentezi ve hücre ölümünde rol oynadığı gösterilmiş 83,4 kD ağırlığında mitokondri iç membranında lokalize bir transmembran proteindir. Yakın bir geçmişte yapılan LETM1' in hücre ölümündeki rolüne ilişkin az sayıda çalışma, elde edilen sonuçlar bakımından büyük farklılıklar içermektedir. Bu çalışmanın amacı LETM1 ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde hücre canlılığının belirlenmesi ve hücrelerin ölümü halinde sürecin apoptotik olup olmadığını araştırmaktır. Tez, LETM1'in fonksiyonunun aydınlatılmasına yönelik yürüttüğümüz çalışmalar için bir ön çalışma niteliğindedir. Bu amaçla HeLa hücrelerinde pLETM1 transfeksiyonu gerçekleştirilmiş. LETM1 ekspresyonu western blot yöntemi ile tayin edilerek hücre canlılığına etkisi belirli zaman aralıklarında MTS tayini ile incelenmiştir.

Elde edilen verilere göre LETM1 ekspresyonu pLETM1 ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde başarılı bir şekilde artmaktadır. LETM1' in aşırı ekspresyonu sonucu hücre canlılığının kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir.

Literatürde LETM1 ekspresyon düzeylerinin hücre canlılığı üzerine etkisine dair veriler çelişkilidir. Tez çalışmamız kapsamında elde edilen veriler aşırı ekspresyonun hücre canlılığını azalttığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: LETM1, transfeksiyon, mitokondri, hücre canlılığı

2013, 51 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

INVESTIGATION OF APOPTOTIC MARKERS IN LETM1-TRANSFECTED CELLS

Serdar FINDIK

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Cenk ARAL

LETM1 is a 83,4 kDa mitochondrial inner membrane localized protein which plays an important role in potassium and calcium homeostasis, mitochondrial protein synthesis and cell death. Recent studies on the relationship between LETM1 and cell viability show inconsistent data. The aim of this study is to determine the cell viability in LETM1 transfected HeLa cells and to determine whether cell death is apoptotic in the case of reduction in cell viability. The thesis is a preliminary study for our ongoing research on LETM1 function. For this purpose, HeLa cells; transfected have been with pLETM1. The expression levels of LETM1 are examined by western blotting and cell viability is determined with MTS cell proliferation assay.

According to our data, LETM1 expression has successfully increased in HeLa cells transfected with pLETM1. Cell viability significantly decreases in transfected cells when compared to control cells.

The current literature about the effects of LETM1 expression on cell viability is inconsistent. Our data clearly indicates that LETM1 over-expression results in a decrease in cell viability.

Keywords: LETM1, transfection, mitochondria, cell viability

2013, 51 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans öğrenimimde bilgi birikimini ve deneyimlerini benimle paylaştan ve bilimsel desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Cenk ARAL'a;

Tez çalışmamın deney ve hazırlanma aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN, Doç. Dr. Rıfat BİRCAN, Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK, Yrd. Doç. Dr. Nadim YILMAZER, Yrd. Doç. Dr. Deniz ŞİRİN, Arş. Gör. Göksel TIRPANCI, Arş. Gör. Levent CAN, Arş. Gör. Ozan ÜRGÜT ve değerli çalışma arkadaşlarım Hande AKALIN, Aysel EREN, Esra ULU, Gürkan AKYILDIZ ve diğer tüm Biyoloji A.D. mesuplarına;

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmamın gerek yorgunluğunu ve stresimi atmamda gerekse her türlü teknolojik desteği bana sağlayan ağabeyim Salih FINDIK ve kuzenim Serkan FINDIK'a;

Tez çalışmamda kullandığım örneklerin sağlanmasında yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Suna ÖZBAŞ TURAN (Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi) ve LETM1 kodlayan plazmidlerin temini için Sayın Prof. Dr. Wolfgang G. GRAIER'e (Graz Tıp Fakültesi, Avusturya);

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca maddi manevi hiçbir desteği benden esirgemeyen ve yüksek lisans öğrenimimi tamamlamamda şüphesiz en büyük payı olan sevgili ailem ve tez çalışmalarım nedeniyle çok ihmal ettiğim biricik sevgilim Ayşe BAYKAN'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından NKUBAP.00.10.YL.12.05 numaralı proje ile desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Abs:	Absorbans
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1
APS:	Amonyum persülfat
atm:	Atmosfer
Bak:	Bcl-2 antogonist/öldürücü homologu
Bax:	Bcl-2 bağımlı X proteini
BCA:	Biçinkonik asit
Bcl-2:	B hücre lenfoma 2
Bid:	BH3 ile etkileşen ölüm agonist domeni
BSA:	Sığır serum albumin
Ced-4:	Hücre ölümü-4
Ced-9:	Hücre ölümü-9
Cyt-c:	Sitokrom c
DF:	Seyreltme faktörü
dH ₂ O:	Distile su
DMEM:	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr:	Etidyum bromür
ICE:	İnterlökin 1β dönüştüren enzim
KCl:	Potasyum klorür

kD:	Kilo dalton
LB:	Luria Broth
LBA:	Luria broth agar
LETM1:	Leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1
LETM2:	Leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-2
mA:	Miliamper
MCU:	Mitokondriyal Ca ⁺² uniporter
mRNA:	haberci RNA
Na ₂ CO ₃ :	Sodyum karbonat
NCLX:	Na ⁺ /Ca ⁺² antiport protein
OD:	Optik yoğunluk
ONPG:	Ortho-nitrofenil-β-D-galaktozid
ort:	Ortalama
PAGE:	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS:	Fosfat tuz tamponu
pDNA:	Plazmit DNA
RNaz:	Ribonükleaz
rpm:	Dakikada ki devir sayısı
RyR:	Riyanodin reseptör
SD:	Standart sapma
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
siRNA:	küçük baskılayıcı RNA
SV40:	Simian virüs 40

TAE:	Tris asetik asit edta
TEMED:	N,N,N',N-tetra metil etilen diamin
TNF:	Tümör nekroz faktör
TNFR-1:	TNF resöptör-1
TRAIL:	TNF ilişkili apoptoz indükleyen ligand
U:	Ünite
UV:	Ultraviyole
WHS:	Wolf-Hirschorn sendromu
X-Gal:	5-bromo-4-kloro-3-indol- β -D-galaktopiranozid

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖZSÖZ	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	iv
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. LETM1 Hakkında Genel Bilgiler	3
2.1.1. LETM1 geni ve proteini	3
2.1.2. LETM1' in potasyum ve kalsiyum transportundaki rolü	5
2.1.3. LETM1 ve hücre ölümü	9
2.2. Apoptoz Hakkında Genel Bilgiler	12
2.2.1. Apotozun moleküler mekanizması	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. Kullanılan cihazlar	16
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	17
3.1.3. Kullanılan kitler ve hazır tampon çözeltiler	19
3.1.4. Kullanılan besiyerleri	20
3.1.5. Kullanılan tampon ve çözeltiler	20
3.1.6. Kullanılan plazmid DNA'lar	24
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Transformasyon	25
3.2.2. Plazmid DNA izolasyonu ve karakterizasyonu	25

3.2.3. Hücre kültürü.....	26
3.2.4. Total protein tayini	27
3.2.5. Transfeksiyon	28
3.2.6. β -galaktosidaz tayini.....	28
3.2.7. LETM1 transfeksiyon sonrası yapılan kontroller.....	29
3.2.7.1. LETM1 tayini	29
3.2.7.2. Hücre canlılığın belirlenmesi (MTS testi)	30
3.2.7.3. Sitokrom c serbestleşmesi	30
3.2.7.4. Total DNA izolasyonu.....	30
3.2.8. İstatiksel yöntemler.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
4.1. Plazmid DNA Transformasyon Bulguları	32
4.2. pDNA İzolasyon ve Karakterizasyon Bulguları.....	32
4.3. Hücre Kültürü Bulguları.....	33
4.4. Total Protein Tayini.....	33
4.5. Transfeksiyon	35
4.6. β -galaktosidaz Tayini	35
4.7. pLETM1 Transfeksiyonu Sonrası Yapılan Kontroller	38
4.7.1. LETM1 tayin bulguları.....	38
4.7.2. Hücre canlılığı testi (MTS) bulguları	38
4.7.3. Sitokrom c serbestleşmesi bulguları	41
4.7.4. Total DNA izolasyon bulguları	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
6. KAYNAKLAR.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. LETM1 proteininin mitokondriyal iç membran üzerindeki yerleşimi ve fonksiyonel kısımlarının şematik görünümü	4
Şekil 2.2. Mitokondriyal K ⁺ homeostazisi. RC, solunum zinciri; Kc, potasyum kanalı; KHE, K ⁺ /H ⁺ antiportu	7
Şekil 2.3. Mitokondriyal Ca ²⁺ taşınması. SR/ER; Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum. SERCA; Sarkoplazmik ER Ca ²⁺ ATPaz, OMM; Mitokondriyal dış membran, IMM; Mitokondriyal iç membran, VDAC; voltaj-bağımlı anyon kanalı, IP ₃ R; inositol 1,4,5-trifosfat reseptörü, RyR; ryanodin reseptör, MCU; Mitokondriyal Ca ²⁺ uniporter, NCLX; Na ⁺ /Ca ²⁺ antiport proteini	8
Şekil 2.4. Apoptotik hücrede görülen morfolojik değişiklikler.....	13
Şekil 2.5. Apotozun dış ve iç yolları.....	14
Şekil 3.1. Kullanılan plazmid DNA haritaları: Amp ^r (Ampisilin); ampisiline direnç geni; ori: replikasyon orijini; lacZ: β-galaktosidaz kodlayan bölge; EcoRI, HindIII, BamHI, SmaI, PstI: restiksiyon enzim kesim noktaları; Neomycin: neomisine direnç geni; ori: replikasyon orijini; ORF: açık okuma bölgesi	25
Şekil 4.1. Transforme pSV-β-galaktosidaz ve pLETM1	32
Şekil 4.2. Plazmid DNA agaroz jel elektroforezi: 1. ve 4. kuyular DNA belirteç; 2. kuyu kuyu izole pLETM1; 3. pLETM1 + SmaI enzimi; 5. kuyu izole pSV-β-Galaktosidaz ; 6. kuyu pSV-β-Galaktosidaz + HindIII enzimi.....	33
Şekil 4.3. BSA standart eğrisi.....	34
Şekil 4.4. Hücre özütlerinin PAGE görüntüleri.....	35
Şekil 4.5. β –galaktosidaz standart eğrisi	36
Şekil 4.6. pSV-β-Galaktosidaz ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde ve kontrol hücrelerinde β-Galaktosidaz aktivitesi	37
Şekil 4.7. pSV-β-galaktosidaz ile transfeksiyon sonrası X-gal ile boyanan hücrelerde β-galaktosidaz eksprese eden mavi renkli hücrenin görünümü.....	37
Şekil 4.8. 1,2: 48. saat pLETM1 transfekte hücreler; 3,4: 48. saat transfekte olmamış kontrol hücreleri; 5,6: 72. saat pLETM1 transfekte hücreler; 7: 72. saat transfekte olmamış kontrol hücreleri; 8,9: 96. saat pLETM1 transfekte hücreler; 10,11: 96. saat kontrol hücreleri	38
Şekil 4.9. HeLa hücrelerinde MTS ile belirlenen büyüme eğrisi	39

Şekil 4.10. pLETM1 transfekte, transfekte olmamış kontrol hücreleri ve kontrol hücresi + transfeksiyon ajanı ile yapılan MTS test grafiği.....	40
Şekil 4.11. Besiyeri değişimi sonrası MTS test grafiği	40
Şekil 4.12. Mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyon ayırımı S: sitoplazmik fraksiyon; M: mitokondriyal fraksiyon	41
Şekil 4.13. Total DNA %0,8 agaroz jel görüntüsü. 1. kuyu: pLETM1 transfeksiyon sonrası 72. saat örneği, 2. kuyu: pLETM1 transfeksiyon sonrası 96. saat örneği, 3. 4. ve 5. kuyular: transfekte olmamış kontrol hücreleri.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu.....	26
Çizelge 3.2. ONPG testi kontrol ve örnek içerikleri.....	29
Çizelge 4.1. BSA standart eğrisi verileri	34
Çizelge 4.2. β –galaktosidaz standart eğrisi verileri.....	35
Çizelge 4.3. <i>pSV-β-Galaktosidaz</i> ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde ve kontrol hücrelerinde β -Galaktosidaz aktivite verileri	36
Çizelge 4.4. HeLa hücrelerinde 72 saat süreyle MTS ile belirlenen canlılık değerleri.....	38
Çizelge 4.5. pLETM1 transfekte, transfekte olmamış kontrol hücreleri ve kontrol hücresi + transfeksiyon ajanı ile yapılan MTS test verileri.....	39
Çizelge 4.6. Besiyeri değişimi sonrası MTS test verileri	40

1. GİRİŞ

Mitokondri hücrenin enerji üretim merkezi olmasının yanı sıra, apoptoz, sinyal iletimi, demir metabolizması, steroidogenez ve Ca^{2+} regülasyonu gibi pek çok hücrenel olayda önemli rol oynayan bir organeldir (Jiang ve ark. 2009; Wallace 2005; Wang 2001). Normal mitokondri fonksiyonunda bozulmaya neden olan değişikliklerin doğrudan veya dolaylı olarak çok sayıda patolojide rol oynadığı yapılan çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (Aral ve ark. 2006; DiMauro ve Schon 2003; Wallace 2005). Mitokondrilerin apoptotik hücre ölümünün intrinsek yolağında sahip oldukları önemli rol, bu süreçte sorumlu komponentlerin belirlenmesi ve bu sayede hücre ölümünün önemli olduğu kanser gibi hastalıklarda yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi bakımından dikkati çekmektedir. Mitokondriyal apoptoz, hücrenel proteinlerin mitokondri membranına translokasyonu ile mitokondriyal membran permeabilizasyonunun sağlanması ve mitokondriden sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF), smac/DIABLO ve kaspazlar gibi proapoptotik faktörlerin sitoplazmaya serbestleşmesi ile karakterizedir. Bu aşamalardan mitokondriyal membran permeabilizasyonu hücreyi ölüme götüren süreçte “dönüşü olmayan nokta” olarak tanımlanmaktadır (Costantini ve ark. 2000; Fulda ve ark. 2010). Buna ek olarak mitokondriyal morfolojinin bu süreçte önemli rol oynadığı ve mitokondriyal membran permeabilizasyonu ile yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir (Frank ve ark. 2001; Karbowski ve Youle 2003; Scorrano ve ark. 2002; Wu ve ark. 2011; Yaffe 1999).

LETM1 (Leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1) geni ilk olarak Wolf-Hirschhorn sendromunda tanımlanmış ve hastaların neredeyse tamamında geninin delesyonlu olduğu bildirilmiştir. LETM1 geni 4. kromozom üzerinde lokalize olup bir mitokondriyal iç membran proteini kodlamaktadır (Endele ve ark. 1999; Rauch ve ark. 2001). Bu protein maya homoloğu olan mdm38 proteininde olduğu gibi iki Ca^{2+} bağlama domeni (EF hand) taşımaktadır ve mitokondriyal morfolojinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Bernardi 1999; Nowikovsky ve ark. 2004). LETM1 proteinin fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalar hücre içi iyon homeostazisinde önemli rol oynadığını göstermiştir ancak, bir kısım çalışma bu süreçte potasyum taşınmasındaki rolüne değinirken, diğer çalışmalarda kalsiyum taşınmasında rol oynadığı bildirilmektedir (Nowikovsky ve ark. 2012).

Son yıllarda LETM1 proteinin hücre ölümünde de önemli rol oynayabileceği yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiş ve özellikle karsinogenez süreci açısından ele alınmıştır. Diğer taraftan LETM1' in hücre ölümündeki rolünü ele alan sınırlı sayıdaki çalışma da çelişkilidir.

Proteinin potasyum veya kalsiyum taşınmasındaki rolünü ele alan çalışmalarda gerek genin aşırı ekspresyonu, gerekse baskılanmasının sonucunda hücre ölümüne hiç değinilmediği halde, gen ekspresyon düzeylerinin baskılanmasının nekrotik hücre ölümüne yol açtığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Buna karşılık aynı fenotip genin aşırı ekspresyonunda da görülmüş ve takip eden çalışmalarda hücre ölümünün nekrotik değil apoptotik olduğu bildirilmiştir (Dimmer ve ark. 2008; Hwang ve ark. 2010a; Piao ve ark. 2009a; Piao ve ark. 2009b).

LETM1' in hücre içerisindeki fonksiyonunun araştırılması bölümümüzde ele alınmaktadır. Bu çerçevede öncelikle genin aşırı ekspresyonunun hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi ve eğer bir etki varsa bunun apoptotik olup olmadığının anlaşılabilmesi bir ön çalışma olarak bu tezin kapsamına alınmıştır. Bu amaçla öncelikle transfeksiyon için plazmid DNA' ların hazırlanması, *in vitro* transfeksiyon optimizasyonu, gen ekspresyonu tayini ve hücre canlılığının belirlenmesi ile apoptotik belirteçlerin tayini ele alınmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

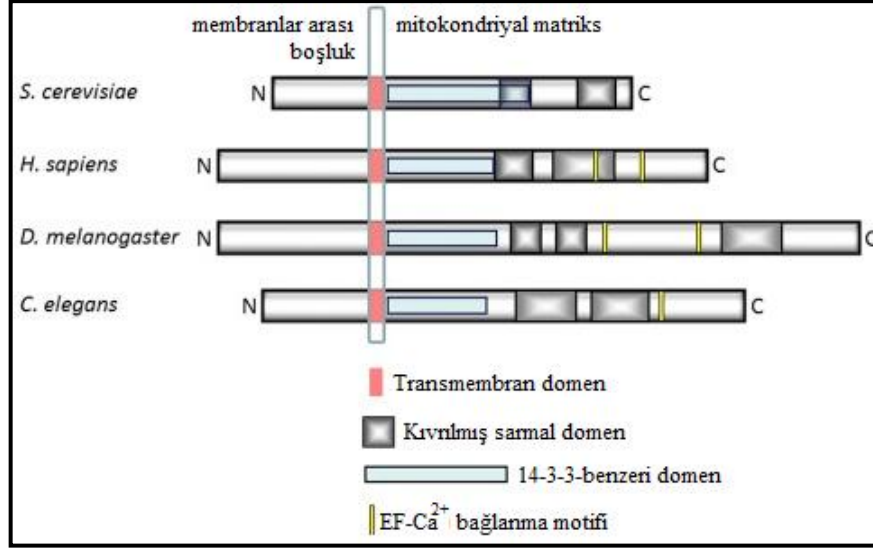
2.1. LETM1 Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. LETM1 geni ve proteini

İnsan LETM1 geni 4. kromozomun kısa kolunun 1. bölgesinin 6. bantı 3. subbantında (4p16.3) lokalizedir ve 14 ekzondan oluşmaktadır. Genin kodladığı LETM1 proteini ilk olarak Wolf-Hirschhorn sendromunda (WHS) tanımlanmış ve hastaların neredeyse tamamında genin delesyonlu olduğu bildirilmiştir (Endele ve ark. 1999; Rauch ve ark. 2001). Bu gen bölgesinin delesyonunun hastalıkta görülen nöbetlerle ilişkili olduğunu öne sürülmüş, ancak daha sonra yapılan çalışmalar bu proteinin patolojide tek etmen olmadığını göstermiştir (Maas ve ark. 2008; Nowikovsky ve ark. 2004; Schlickum ve ark. 2004).

İnsan LETM1 proteini 83,4 kD moleküler ağırlığa sahip ve 739 amino asitten oluşan bir mitokondriyal iç membran proteinidir (Zollino ve ark. 2003). Proteinin tüm aşağı ökaryotlar, hayvan ve bitkilerde korunmuş olduğu ve çalışılan tüm türlerde benzer yapısal özellikler gösterdiği bulunmuştur. Bu yapı mitokondri iç membranının üzerinde yer alan ve amino terminale yakın hidrofobik bir kısım ve mitokondri matriksinde yerleşmiş olan karboksi ucunu da kapsayan büyük bir hidrofilik kısma karakterizedir. Karboksi terminal kısmının primer amino asit dizisi en az 2 tane kıvrılmış sarmal ve 2 tane Ca^{+2} bağlayan EF el benzeri motife sahip olduğunu göstermektedir. Ancak Ca^{+2} bağlanma motifi mayada gözlenmemiştir. Yine mitokondriyal matriks tarafında yerleşim gösteren ve 14-3-3 proteinlere benzeyen bir domen de (14-3-3-benzeri domen) protein yapısında yer almaktadır. Ancak bu bölge α -heliks sayısı bakımından orijinal yapıdan farklılıklar göstermektedir (Şekil 2.1) (Nowikovsky ve ark. 2004).

Yapılan çalışmalar da mitokondriyal lokalizasyon için gerekli hedefleme dizisinin amino terminalde yer aldığını ve bu hedefleme dizisi ile proteinin mitokondriyal yerleşimli olduğu belirtilmektedir (Nowikovsky ve ark. 2012). Diğer taraftan son yıllarda karboksi terminalde yer alan AEVK aminoasit dizisinin endoplazmik retikulum retensiyon sinyali olduğu ve proteinin mitokondriyal olduğu kadar endoplazmik retikulumda da yerleşim gösterebildiği bildirilmektedir (Kuum ve ark. 2012).



Şekil 2.1. LETM1 proteininin mitokondriyal iç membran üzerindeki yerleşimi ve fonksiyonel kısımlarının şematik görünümü (Nowikovsky ve ark. 2012)

Saccharomyces cerevisia iki adet LETM1 maya ortoloğu kodlamaktadır. Bunlar YOL027c ve YPR125w' dur. YOL027c 65 kD ağırlığında bir protein kodlamaktadır ve mitokondriyal dağılım ve morfoloji üzerine etkili olduğu için Mdm38 olarak adlandırılmıştır (Dimmer ve ark. 2002). *Drosophila melanogaster* homoloğu 113,6 kD' luk ağırlığından dolayı LETM1 protein ailesinin en büyük üyesidir. Bu protein insan LETM1 proteini ile % 42 dizi homolojisi göstermektedir (McQuibban ve ark. 2010).

İnsanda gen duplikasyonu ile oluştuğu düşünülen LETM1 benzeri LETM2 geni de tanımlanmıştır. Sıçan LETM1 homoloğu ile ilgili yapılan çalışmalar LETM1'in çalışılan tüm dokularda eksprese edildiğini oysa LETM2'nin sadece testis ve spermde eksprese edildiğini ortaya koymuştur (Tamai ve ark. 2008). Endelev ve ark., (Endele ve ark. 1999)'nın yaptığı çalışmada insan LETM1 ekspresyonu transkripsiyon düzeyinde incelenmiş ve çalışılan tüm yetişkin ve fetal dokularda belirlenmiştir. Bu çalışmada LETM1 mRNA' sının alternatif poliadenilasyon veya alternatif transkripsiyon başlama noktalarına bağlı olarak 4 farklı uzunlukta olabildiği bildirilmiştir ancak intron-ekzon kesimi için alternatif kesilme (alternatif splicing) görülmemiştir. Translasyon başlangıç kodununun birinci ekzonda yerleşimli olduğu yine aynı çalışmada bildirilmiştir.

LETM1' in fonksiyonu üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Genel olarak LETM1' in hücre içinde oynadığı roller 3 ana başlıkta ele alınabilir. Bunlar kalsiyum ve potasyum/hidrojen antiportu, protein sentezi ve hücre ölümüdür. Yaptığımız tez çalışması

kapsamında ele alınan LETM1 aşırı ekspresyonu ve hücre ölümü ilişkisi açısından protein sentezindeki rolü konumuz dışında olduğu için ayrıca ele alınmamış ancak iyon transportu ve hücre ölümü rolleri aşağıda verilmiştir.

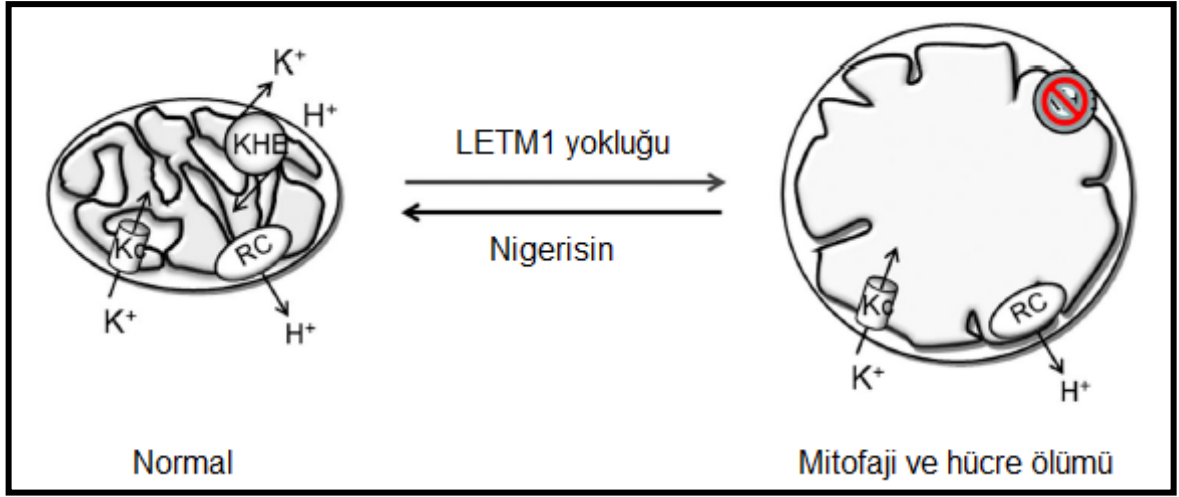
2.1.2. LETM1' in potasyum ve kalsiyum transportundaki rolü

Mitokondri küçük moleküllere karşı geçirgenliği farklı olan iki membranla çevrilidir. Dış membrandan metabolit ve iyonların geçişi esas olarak voltaj bağımlı anyon kanalı üzerinden gerçekleştiği halde iç membran trafiği substrata özgün taşıyıcılar aracılığı ile sağlanır (Bernardi 1999; Blachly-Dyson ve Forte 2001). Bu aktif taşıma sisteminin yanı sıra mitokondriyal membranın negatif yükü, katyonların pasif difüzyonla geçişine neden olur ve bu iyon akışının düzenlenmemesi mitokondride osmotik basıncın artmasına ve sonuçta organelin parçalanmasına neden olur (Bernardi 1999). Mitokondri iç membranında pasif difüzyona karşı elektronötral karşılıklı transferi sağlayan taşıyıcı sistemlerin varlığı ilk olarak 1961 yılında önerilmiştir (Nowikovsky ve ark. 2004). Bu antiport taşıyıcılar (katyon-proton, anyon-hidroksil) membran potansiyeline bağlı katyon sızıntısını ve mitokondriyal fizyolojideki değişimler sonucu ortaya çıkacak katyon dengesizliklerinin düzenlenmesini ve böylece katyon dağılımının sürekli dengede kalmasını sağlarlar. Hücre içerisinde ve mitokondride en fazla bulunan iki katyon olan Na^+ (5mM) ve K^+ (150 mM) için iki farklı antiport sisteminin varlığı düşünülmüş ve K^+/H^+ antiport proteininin yaklaşık 82 kD ağırlığında olduğu bildirilmiştir (Jezek ve ark. 1990; Li ve ark. 1990).

Mitokondriyal K^+/H^+ antiport proteini olarak LETM1' in ve onun maya homologu olan YOL027' nin rolünü ele alan ilk çalışma Nowikovski ve arkadaşları tarafından 2004 yılında gerçekleştirilmiş ve bu proteinin katyon antiportunda rol aldığı belirlenmiştir (Nowikovsky ve ark. 2004). 2005 yılında aynı araştırma grubu tarafından LETM1 üzerinde K^+ ve H^+ taşınmasının karşılıklı ve elektronötral özelliği farklı deneysel yöntemlerle test edilerek ileri düzeyde karakterize edilmeye çalışılmıştır (Froschauer ve ark. 2005). Diğer taraftan, LETM1' in mitokondri membranını kat eden tek bir transmembran domene sahip olması bu şekilde bir antiport görevi görmesi için şaşırtıcı olarak ifade edilmiştir. Bununla uyumlu olarak Hasegawa ve van der Blik (Hasegawa ve van der Blik 2007) ko-immünopresipitasyon yöntemi ile LETM1' in *in vivo* homodimer oluşturabildiğini ve kromatografik yöntemlerle LETM1' in yaklaşık 550 kDa ağırlığında bir kompleksin parçası olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar LETM1' in 7 veya daha fazla LETM1 proteini ile bir araya gelerek büyük bir homokompleks oluşturabileceğini ve bu

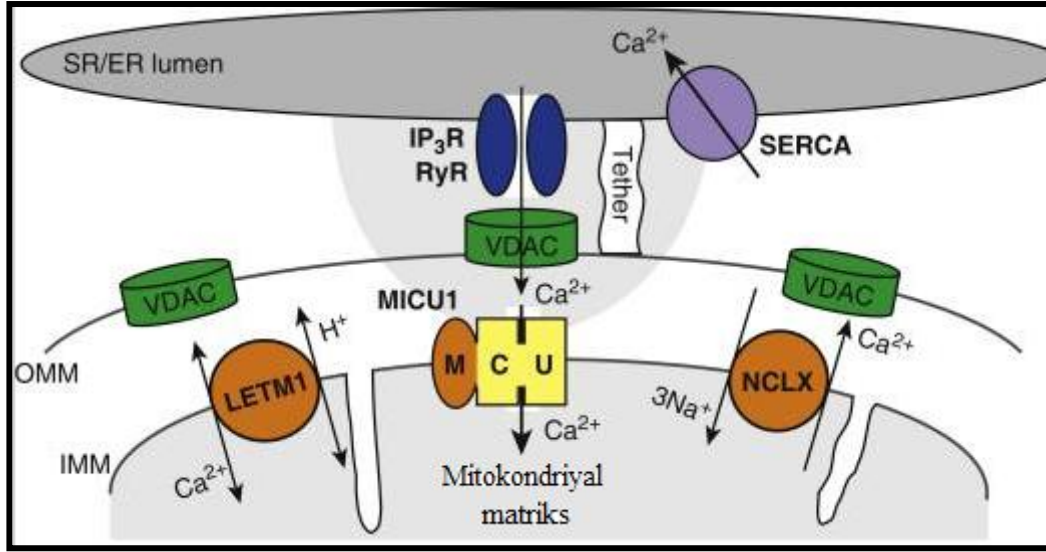
komplekslerin antiport sistemini oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ko-immünopresipitasyon çalışmalarında oksidatif fosforilasyon zinciri komponentlerinin görülememesine dayanarak bu yapının mitokondriyal protein sentezi ile ilişkili olmayacağını öne sürmüşlerdir. Ayrıca LETM1 aşırı ekspresyonu veya siRNA ile gen ekspresyonunun azaltılması sonucu mitokondriyal matiks hacminin etkilendiğini ve bu durumun K^+/H^+ taşınmasıyla uyumlu olduğunu bildirmişlerdir (Hasegawa ve van der Blik 2007). Sonuç olarak LETM1 veya onun homoloğu olan *mdm38*' in baskılanması ekstrem mitokondriyal matiks şişmesine ve krista yapısının bozulmasına yol açarken bu proteinlerin aşırı ekspresyonu mitokondriyal kontraksiyona ve krista şişmesine yol açmaktadır (Hasegawa ve van der Blik 2007; Nowikovsky ve ark. 2007).

Dimmer ve ark., (Dimmer ve ark. 2008) bu çalışmalarla uyumlu olarak LETM1' in yüksek molekül ağırlıklı kompleksler şeklinde bulunduğunu ve ekspresyon düzeylerindeki azalma sonucu ortaya çıkan morfolojik değişimlerin nigerisin ile geri dönüşebildiğini bildirmişlerdir. Biyolojik membranlarda K^+/H^+ transportu sağlayan bir farmakolojik ajan olan nigerisin bu etkisi LETM1'in mitokondriyal morfoloji üzerine rolü ile bu antiport mekanizmasının rolünü kanıtlar niteliktedir. Ayrıca LETM1 ile onun maya ve *Drosophila* homologlarının baskılanması ile potasyum homeostazisinin bozulmasının mitofajiye yol açtığı konfokal mikroskopi ve elektron mikroskobisi ile gösterilmiştir (McQuibban ve ark. 2010; Nowikovsky ve ark. 2007). LETM1 kaybı ve mitokondriyal şişme/mitofaji arasındaki ilişki ve nigerisin aracılığı ile geri dönüşüm Şekil 2.2.' de özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Mitokondriyal K⁺ homeostazisi. RC, solunum zinciri; K_c, potasyum kanalı; KHE, K⁺/H⁺ antiportu (Nowikovsky ve ark. 2012)

Mitokondriyal Ca²⁺ alımı iç membran üzerinden iyi regüle edilmiş kanallar aracılığı ile gerçekleşir. Mitokondriyal matriks içerisinde Ca²⁺ miktarının artışı trikarboksilik asit siklusunu enzimleri ve ATP sentaz aktivitesinde artışa neden olurken, yüksek seviyelere ulaştığında hücre ölümüne yol açar (Giacomello ve ark. 2007; Hajnoczky ve ark. 1995; Rasola ve Bernardi 2007; Szabadkai ve Duchon 2008). Mitokondriyal Ca²⁺ taşınmasında rol oynayan dört farklı mekanizma tanımlanmıştır. Bunlar mitokondriyal Ca²⁺ uniporter (MCU), NCLX, ryanodin resöptör (RyR) ve LETM1' dir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Mitokondriyal Ca^{2+} taşınması. SR/ER; Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum. SERCA; Sarkoplazmik ER Ca^{2+} ATPaz, OMM; Mitokondriyal dış membran, IMM; Mitokondriyal iç membran, VDAC; voltaj-bağımlı anyon kanalı, IP_3R ; inositol 1,4,5-trifosfat reseptörü, RyR; ryanodin reseptör, MCU; Mitokondriyal Ca^{2+} uniporter, NCLX; $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport proteini (Hajnoczky ve Csordas 2010)

Kalsiyum-mitokondri ilişkisini ele alan 1960'larda yapılan çalışmalar izole edilmiş mitokondride yüksek miktarda Ca^{2+} alımının varlığını ortaya koymuş ancak bunun çok yüksek Ca^{2+} konsantrasyonları (10-100 μM) gerektirdiği gösterilmiştir (Deluca ve ark. 1962; Vasington ve Murphy 1962). Diğer taraftan hücrede Ca^{2+} konsantrasyonundaki çok düşük değişiklikler mitokondriye aktarılmaktadır. Daha sonra yapılan çalışmalarda endoplazmik/sarkoplazmik retikulum ile mitokondri arasındaki Ca^{2+} akışının inositol 1,4,5-trifosfat reseptörleri ve ryanodin reseptörleri ile sağlandığı ve bu organeller arası ilişkide mitofusin 2 gibi tether proteinlerinin rol oynadığı bildirilmiştir (O-Uchi ve ark. 2012).

Mitokondriyal Ca^{2+} transportunda rol oynayan en önemli etmen iç membran potansiyeli ve Ca^{2+} gradientidir. Mitokondriyal Ca^{2+} uniporter Ca^{2+} 'un içeri alınmasında rol oynarken değişen katyon konsantrasyonu iki H^+ iyonunun solunum zinciri üzerinden dışarı çıkarılması ve bu sayede ATP üretimi ile kompanse edilir (Alam ve ark. 2012). Diğer taraftan mitokondriyal Ca^{2+} dengesinin sağlanmasında Ca^{2+} 'un sitozole serbestleşmesi yine bir antiport mekanizması ile sağlanır. Mitokondri içerisine Na^+ alınması karşılığında sitozole Ca^{2+} serbestleştiren sodyum-kalsiyum değiştirici (NCX) mitokondri iç membranında tanımlanmıştır (O-Uchi ve ark. 2012).

Jiang ve ark., (Jiang ve ark. 2009) 2009 yılında insan LETM1 proteininin *Drosophila* homologunun mitokondriyal Ca^{2+}/H^{+} antiportu rolünü tanımlamışlardır. Araştırmacılar LETM1 taşıyan lipozomlarda bu transportu incelemişler ve bu iki katyonun karşılıklı taşınımını göstermişlerdir. Diğer taraftan Nowikovski ve ark., (Nowikovsky ve ark. 2012) bu bulgunun doğruluğuna şüpheyle yaklaşmakta ve transportun elektroforetik olabileceğini bildirmektedirler. Ayrıca araştırmacılar LETM1' in bu şekilde bir antiport rolü olmasını membranı kat eden tek bir domen nedeniyle mümkün olamayacağını bildirmektedirler. Ancak mitokondriyal K^{+}/H^{+} taşınmasını ele alan çalışmalarda gösterilen ve yukarıda kısaca özetlenen büyük molekül ağırlıklı homo-/hetero-komplekslerin varlığını tartışmamışlardır. LETM1' in Ca^{2+} transportundaki rolünü ele alan diğer çalışmalarda LETM1' in baskılanması ya da arttırılmasının membran potansiyeli ve/veya K^{+} homeostazisi üzerine etkilerinin göz önüne alınmamış olması da bu rolü sorgulanabilir kılmaktadır (Hajnoczky ve Csordas 2010; Nowikovsky ve ark. 2004; Waldeck-Weiermair ve ark. 2011). Sonuç olarak LETM1' in Ca^{2+} taşınmasındaki rolü kesin olarak belirlenmemiştir ve daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

2.1.3. LETM1 ve hücre ölümü

LETM1' in yukarıda kısaca özetlenen fonksiyonlarına ek olarak hücre ölümü üzerine etkileri de ilgi çekici bir araştırma alanıdır. Bu süreçte LETM1' in rolünün incelenmesi beklendiği üzere ağırlıklı olarak karsinogenez ile ilgili olarak ele alınmış ve yapılan çalışmalar genelde bu çerçevede değerlendirilmiştir. LETM1' in eğer varsa hücre ölümündeki rolü yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar çerçevesinde ele alındığında tartışmalıdır.

Jiang ve ark., (Jiang ve ark. 2009) hücre içi kalsiyum ve potasyum dengesindeki bozulmaların nekrotik veya apoptotik hücre ölümüne neden olabileceğini bildirmişler ancak LETM1 gen ekspresyonunun HeLa hücrelerinde 3 güne kadar baskılanmasının hücrelerin genel durumu üzerinde (morfolojik veya sayıca) bir değişiklik yaratmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar tekrarlayan siRNA uygulamalarıyla 3 günü aşan süreyle LETM1 ekspresyonunun baskılanmasının ise HeLa hücrelerinin yaklaşık %20' sinde morfolojik değişikliklere yol açtığını vurgulamışlar ancak hücre ölümüne dair bir veri sunmamışlardır. Araştırmacıların kısa ve uzun dönemde LETM1 baskılanmasını ve etkilerini ele almış olmaları hücre canlılığını değerlendirmemiş olma olasılığını düşürmektedir ve bu bakımdan çalışmada hücre canlılığı üzerine bir etki görülmemiş sonucu çıkarılabilmektedir. Benzer şekilde LETM1' in endotelial hücre hatlarında baskılanması ile de hücre ölümünün gözlemlendiğine dair bir bilgi mevcut değildir (Waldeck-Weiermair ve ark. 2011). Tamai ve ark.,

(Tamai ve ark. 2008) ise LETM1' in mitokondriyal morfolojideki rolünü ele alan çalışmalarında HeLa hücrelerinde gerek LETM1 gen ekspresyonunun baskılanması, gerekse transfeksiyon ile aşırı eksprese edilmesine yönelik deneyler gerçekleştirmişler ancak bu iki durum için de hücre canlılığına dair bir veri sunmamışlardır. Bu çalışmaların ortak özelliği hiç birinin kapsamının hücre ölümü olmamasıdır ve bu nedenle hücre canlılığına ilişkin bir bilgi verilmemiş olabilir.

Hasegawa ve van der Blik (Hasegawa ve van der Blik 2007) LETM1 HeLa hücrelerinde siRNA transfeksiyonu ile LETM1 ekspresyonunun baskılanmasının hücre ölümüne neden olduğunu bildirmişler ancak aynı çalışmada COS7 hücrelerinde LETM1 cDNA transfeksiyonu ile ekspresyon artışı için böyle bir bulguya rastlamamışlardır. Ayrıca araştırmacılar *Caenorhabditis elegans*' da LETM1 baskılanmasının larval dönemde letal olduğunu belirtmişlerdir.

Dimmer ve ark., (Dimmer ve ark. 2008) LETM1 ekspresyon düzeylerinin hücre canlılığına etkisini ele almışlar ve HeLa hücrelerinde RNAi transfeksiyonunu takip eden 24. saatte hücre canlılığında bir azalmanın belirteci olan anneksin V/propidium iyodür (PI) boyanmasında PI artışını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu süreçte kaspaz aktivasyonunun önemli bir belirteci olan PARP kesiminin olmadığını göstermişler ve hücre ölümünün apoptotik değil nekrotik olduğunu belirtmişlerdir. Nekrotik hücre ölümünün daha kesin ispatı amacıyla çalışmada Bcl-2 aşırı eksprese eden ve bu yolla apoptoza dirençli hücre hatlarında çalışmalarını tekrarlamışlar ve hücre ölümünün apoptotik yollardan olan kaspaz aktivasyonundan bağımsız ve Bcl-2 ekspresyonuna dirençli olduğunu vurgulamışlardır.

Piao ve ark., (Piao ve ark. 2009a) LETM1' in hücre canlılığı üzerine etkisini incelemek amacıyla HeLa hücrelerini adenoviral vektörler kullanarak transdükte etmişler ve LETM1 aşırı ekspresyonunu takip eden 3. günde hücre ölümünün görüldüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar hücrelerin anneksin V/PI boyanmasında yüksek PI değerlerinin hücre ölümünün nekrotik olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada nükleer apoptoz indükleyici faktör (AIF) translokasyonunun görülmeyişi ve hücre ölümünün bir kaspaz inhibitörü olan z-vad uygulamasından etkilenmemesi nekrotik hücre ölümünün bir kanıtı olarak sunulmuştur. Çalışma kapsamında nekrotik hücre ölümünün nedenleri üzerinde durulmuş ve LETM1 aşırı ekspresyonunun mitokondriyal biyogenezi anlamlı derecede düşürdüğü ve ATP üretiminin de anlamlı derecede düştüğü ve nekrotik hücre ölümünün bir sebebi olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar gerek nekrotik hücre ölümü, gerekse

mitokondriyal ATP üretimindeki düşüşün kanserin önemli bir özelliği olmasından hareketle meme, kolon, özafagus, akciğer, over, rektum, mide ve serviks kanseri örneklerinde LETM1 ekspresyonunu incelemişler ve kanserde bu proteinin ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan araştırmacılar elde ettikleri tüm bu bulguları Dimmer ve arkadaşlarının (Dimmer ve ark. 2008) verileriyle kıyasladıklarında aynı fenotipin nasıl LETM1' in hem kaybı hem de aşırı ekspresyonu ile ortaya çıkabildiğini açıklayamamışlardır.

Aynı araştırma grubu, aynı yıl yayımlanan 2. makalelerinde bir önceki çalışmalarında kullandıkları adenovirüs aracılıklı gen transferini takiben HeLa hücrelerinde LETM1 aşırı ekspresyonunun strausporin ve aktinomisin gibi apoptotik ajanlara duyarlılığı arttırdığını ve bu yolla apoptotik hücre ölümünde rol oynadığını belirtmişlerdir (Piao ve ark. 2009b). Araştırmacılar LETM1' in HEK293 hücre hattında karboksi terminal modülatör protein (CTMP) ile ilişkili olduğunu, HeLa hücrelerinde ise apoptoza hassasiyetin artmasından sorumlu olabileceğini vurgulamışlar ve bir önceki çalışmalarında olduğu gibi bu çalışmada da hücre ATP düzeylerinin LETM1 aşırı ekspresyonu ile düştüğü ancak mitokondriyal membran potansiyelinin değişmediği göstermişlerdir. Sonuç olarak LETM1'in hücre ölümünde rol oynayan bir protein olduğu tartışılmışsa da bir önceki çalışmalarında elde ettikleri bulgulara değinmemişler ve nekrotik veya apoptotik hücre ölümü şeklinde ortaya çıkan iki farklı fenotipi tartışmamışlardır.

İlginç olarak yukarıda kısaca özetlenen 2 çalışmayı yürüten araştırma grubu LETM1' in hücre ölümündeki rolünü ele alan 3. çalışmalarında yine adenoviral vektörler aracılığı ile LETM1 gen ekspresyonunu arttırmışlar ve bu ekspresyon artışının tek başına apoptotik hücre ölümü için yeterli olduğunu bildirmişlerdir (Hwang ve ark. 2010b). Yine önceki çalışmalarından farklı olarak araştırmacılar HeLa hücrelerinde LETM1 aşırı ekspresyonunun mitokondriyal membran potansiyelini düşürdüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca çalışma kapsamında K-Ras^{LA1} fare akciğer kanser modelinde LETM1 taşıyan adenovirüsler aerosol yolla verildiğinde tümör gelişimini baskıladığı bildirilmektedir. Diğer taraftan araştırmacılar daha önce kanserin bir özelliği olarak LETM1' in aşırı ekspresyonunu gösterirken bu çalışmada tedavi edici özelliğini vurgulamışlar ancak bu çelişkiyi tartışmamışlardır.

Shin ve ark., (Shin ve ark. 2013) LETM1 ve CTMP genlerini 2A peptid dizisi ile bağlayarak H-ras12V fare hepatosellüler karsinom modelinde in vivo gen tedavisi denemişlerdir. Araştırmacılar oluşturdukları vektör ile gen aktarımının her iki protein içinde aşırı ekspresyon sağladığını ve kanser gelişimini yavaşlattığını bildirmişlerdir. Bu iki proteinin bir arada ekspresyonunun arttırılmasının apoptotik hücre ölümüne yol açtığı

bildirilmiş ve her bir proteinin tek başına ekspresyonunun arttırılmasından daha kuvvetli bir apoptotik cevap sağlanabildiği vurgulanmıştır. Araştırmacılar bu ikili gen aktarım vektörünün kanser tedavisi için umut vaat edici olduğunu belirtmişlerdir.

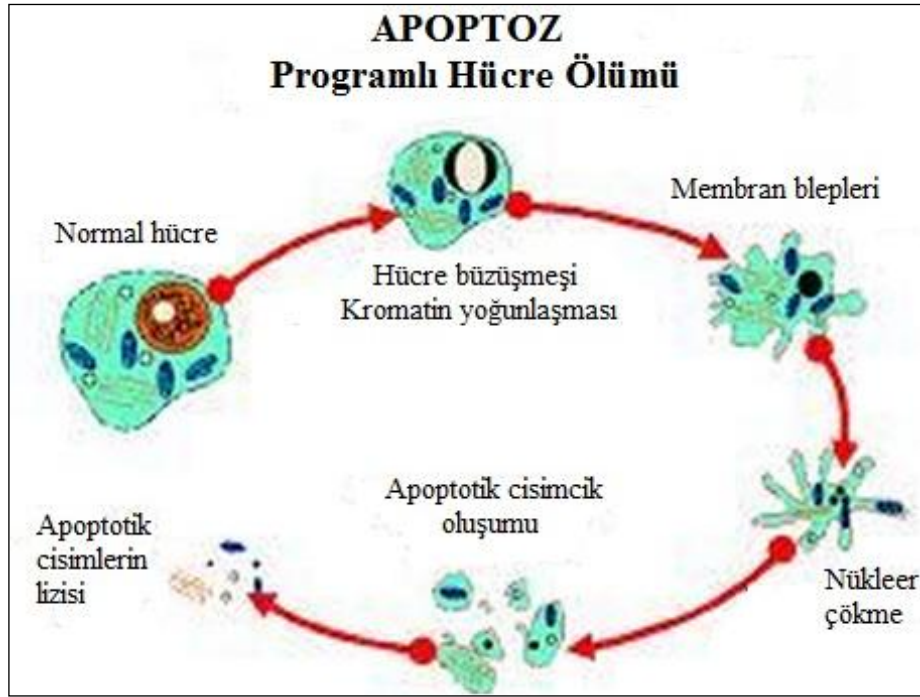
2.2. Apoptoz Hakkında Genel Bilgiler

Ondokuzuncu yüzyıldan bu yana yapılan pek çok çalışmada çok hücreli organizmaların fizyolojik gelişim süreçlerinde özellikle embriyogenez ve metamorfoz sırasında hücre ölümünün önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır (Lockshin ve Zakeri 2001). Programlı hücre ölüm terimi 1964 yılında tanımlanmaya başlanmış ve ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kendi kendini yok etme olarak tanımlanmıştır (Kerr ve ark. 1972). Eski bir Yunan terimi olan apoptoz kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten düşmesi anlamına gelmektedir. Apoptoz çok hücreli organizmaların doku ve hücre popülasyonlarının düzenlenmesinde aktif rol oynayan bir süreçtir (Leist ve Jaattela 2001).

Çok hücreli organizmalarda biyolojik sistemlerin gelişimi ve düzenlenmesi sırasında hücreler arasında karmaşık bir etkileşim vardır. Bazen tek bir hücrenin kendini feda etmesinin bütün olarak bakıldığında organizmanın lehine olduğu görünmektedir; gelişim sırasında pek çok hücre programlı hücre ölümü ile doku ve organların oluşumuna katkı sağlamaktadır (Meier ve ark. 2000). Gelişim ve metamorfogenezde hasarlı ve tehlikeli hücrelerin apoptoz ile ortadan kaldırılması bu sürecin düzenli olarak çalışmasının hayati öneme sahip olduğunu göstermektedir (Hutchins ve Barger 1998). Yetişkin bir organizmada hücre sayılarının dengede tutulabilmesi için apoptoz ile hücre çoğalmasının dengede olması gerekir (Rathmell ve Thompson 2002). Farklılaşma, proliferasyon, bağışıklık sistemi gibi biyolojik süreçler birlikte düşünüldüğünde apoptozun biyolojik olarak çok büyük öneme sahip olduğu görülmektedir. Apoptotik mekanizmaların bozukluğu veya düzensizliği çeşitli patolojik şartlarla alakalıdır. Bu anomaliler kanser, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklar ile viral/bakteriyel ve hatta parazitik enfeksiyonlarında yayılmasına sebep olabilir (Fadeel ve ark. 1999).

Apoptotik hücreler kalıplaşmış morfolojik değişiklikler ile tanımlanabilmektedirler; hücreler küçülür, deforme olur, komşu hücrelerle ilişkisini kaybeder, kromatin yoğunlaşır, çekirdek zarı ve plazması parçalanır ve son olarak içlerinde sitoplazma, sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da olan apoptotik cisimler oluşur (Şekil 2.4) Apoptotik cisimler makrofajlar tarafından yutulur ve böylece inflamatuvar tepkiye neden

olmadan doku ortadan kaldırılmış olur. En belirgin değişim normalde hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde yer alan negatif yüklü fosfolipidlerin birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıdır. Bu morfolojik karakteristik değişiklikler meydana gelen biyokimyasal ve moleküler olayların bir sonucudur (Saraste ve Pulkki 2000).



Şekil 2.4. Apoptotik hücrede görülen morfolojik değişiklikler (Gültekin ve ark. 2008)

Apoptotik hücre ölümünde nekrotik hücre ölümünün tersine hücrelerde şişme, membran bütünlüğü kaybı ve inflamasyon gözükmemektedir. Nekroz sırasında hücre içeriği hücre içerisinde kontrolsüzce bırakıldığı için çevredeki hücreler zarar görmekte ve bu dokularda güçlü bir inflamatuvar yanıt oluşmaktadır (Leist ve Jaattela 2001).

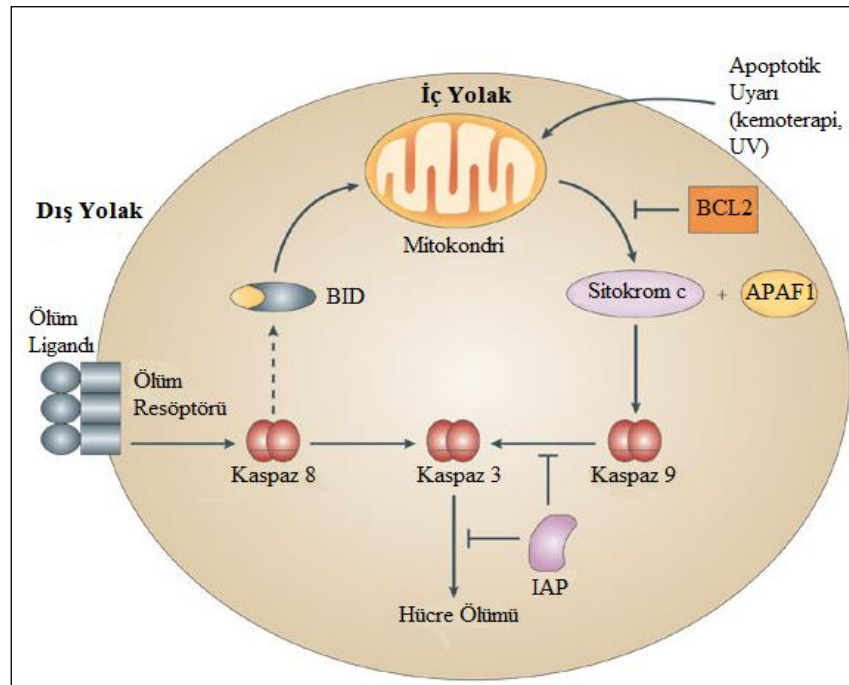
Apoptoz sıkı bir şekilde düzenlenir ve aynı zamanda çok sayıda hücre ölüm faktörünün etkileşmesi ile gerçekleşmektedir. Apoptoz dışarıdan veya hücre içinde çeşitli uyarımlarla tetiklenebilir. DNA tamir mekanizmalarında ki hatalar, sitotoksik ilaçlarla tedavi ve radyasyon gibi birçok sebep hücreyi apoptoza götürebilmektedir (Hengartner 1999).

2.2.1. Apoptozun moleküler mekanizması

Apoptozun moleküler mekanizmasının anlaşılması üzerine yapılan ilk çalışmalar hermafrodit bir nematod olan *C. elegans* üzerinde yapılmıştır. Yapılan çalışmalar bu canlının

1090 tane hücresinden 131 tanesinin değişmez bir şekilde programlı hücre ölümüne maruz kaldığını göstermektedir (Hengartner 1999). *C. elegans*' ta programlı hücre ölümü bir proteaz aktive edici faktör olan ced-4'ün ced-3'ü aktif hale getirmesi sonucu gerçekleşmektedir. Bu iki gen *C. elegans*' ta programlı hücre ölümünden sorumlu genlerdir (Richardson ve Kumar 2002). ced-3 inflamasyonda rol alan memeli interlökin 1 β dönüştüren enzim (ICE) ile ilişkili bir protein kodlar. Memeli hücrelerinde bu enzim apoptozu indüklemektedir. ICE'nin daha sonra yapılan çalışmalarda kaspaz-1 olduğu anlaşılmıştır (Creagh ve Martin 2001). Ced-9, ced-4'ün inhibisyonunu sağlar ve ced-9 bu apoptozis yolağının başlangıcındaki EGL-1 (proapoptotik memeli Bcl-2 homoloğu) proteini tarafından inhibe edilir. EGL-1 mitokondride ced-9'a bağlandığında *C. elegans*' ta ölüm süreci başlar (Richardson ve Kumar 2002).

Memeli hücrelerinde apoptoz birkaç yolla indüklenir. Hücrelerin bu uyarılara verdiği yanıt, gelen uyarının türüne göre değişmektedir. Çünkü apoptoz sırasında birçok sinyal gönderilir ve bu sinyaller farklı hücrelerde farklı biçimde algılanırlar ve süreç de bu farklılıklara göre işler. Memeli hücrelerinde iki tane büyük apoptotik yolak belirlenmiştir; bunlar dış yolak (ölüm almaçları) ve iç yolak (mitokondri)'tır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Apotozun dış ve iç yolları (Adrain ve ark. 1999)

Dış yolakta görevli olan ölüm almaçları tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesine aittir (Sartorius ve ark. 2001). Dışsal apoptoz sinyallerinin iletimine aracılık eden hücre yüzeyinde lokalize ölüm almaçlarına belirli ligandların bağlanması sonucu apoptotik sinyaller hücreye iletilmiş olur. TNFR-1, Fas/CD95 ve TRAIL' ölüm almaçlarına örnek olarak verilebilir. Bütün TNFR ailesi üyelerinde sisteyince zengin bir domen bulunmaktadır ve bu domen ligandlara tanıma bölgesi sağlamaktadır (Naismith ve Sprang 1998).

İç ölüm yolağında temel görevi mitokondri üstlenmektedir. Bu yolak iyonize radyasyon, DNA hasarı, büyüme faktörü azlığı, oksidatif stres ve kemoterapik ilaçların oluşturduğu etkiler sonucu aktive olmaktadır (Kaufmann ve Earnshaw 2000). Bu ölüm yolağında aktive edilmiş reseptörlerden gelen sinyal kendi başına hücre ölümünün yürütülebilmesi için yeterince kaspaz sinyal akışını üretmez. Bu durumda sinyalin mitokondri-bağımlı apoptotik yollar ile amplifiye edilmesi gerekmektedir. Kaspaz sinyal akışı ve mitokondri arasındaki bağlantı Bcl-2 aile üyesi olan Bid tarafından sağlanmaktadır. Bid'in kaspaz-3 tarafından kesilmesi ölüm aktivitesini artırır ve mitokondri içinde uyumlu bir şekilde çalışan proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri olan Bax ve Bak proteinleri mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımını teşvik ederler (Luo ve ark. 1998). Sitokrom c, Apaf-1 ve prokaspaz-9 birleşir ve apoptozomu oluşturur böylelikle prokaspaz-9 aktivasyonu gerçekleşmiş olur (Acehan ve ark. 2002). Aktifleşen kaspaz-9 kaspaz çağlayanı (cascade) oluşturarak diğer kaspazların aktifleşmesini sağlar ve bunun sonucunda hücre ölümü gerçekleşir (Slee ve ark. 1999).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Biyogüvenlik kabini (class II), Nüve, Türkiye

Buzdolabı +4⁰C, Profilo, Türkiye

CO₂ etüv, Thermo, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)

Çalkalayıcılı su banyosu, Nüve, Türkiye

Derin dondurucu -20⁰C, Vestel, Türkiye

Dikey elektroforez tankı, Bio-rad, ABD

Fotoğraf makinesi, Canon, Japonya

Güç kaynağı, Cleaver, İngiltere

Hassas terazi, Ohaus, ABD

Isıticılı manyetik karıştırıcı, WiseStir, Kore

İnkübatör, Incucell, Almanya

İnvert mikroskop, Olympus, Almanya

Mikrosantrifüj, Sigma, Almanya

Mikroskoba bağlı fotoğraf sistemi, Olympus, Almanya

Neubauer lamı, Marienfeld, Almanya

Otoklav, Hirayama, Japonya

Otomatik pipet seti, Axygen axypet, ABD

pH metre, Hanna HI221, Romanya

Mikroplaka okuyucu, Mindray, Almanya

Soğutmalı santrifüj, Nüve, Türkiye

Tank blot, Biorad, ABD

Transillüminatör, Vilber Lourmat, Fransa

Vorteks, WiseMix, Kore

Yatay elektroforez tankı, Thermo, ABD

Yatay elektroforez tankı, Cleaver, İngiltere

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Agar, OXOID, İngiltere

Agaroz, Sigma, ABD

Akrilamid, Sigma, ABD

Amfoterisin B, Sigma, ABD

Amonyum per sülfat (APS), Sigma, ABD

Bis-akrilamid, Ambresco, ABD

Sığır serum albumini (BSA), Sigma, ABD

Coomassie brilliant mavisi, Fisher scientific, ABD

Dibazik sodyum fosfat, Sigma, ABD

Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma, ABD

DMEM, Pan, Güney Afrika

DNA belirteç 1 kb, MBI Fermentas, Litvanya

Etidyum bromid, Sigma, ABD

Etil alkol, Sigma, ABD

Etilendiamin tetraasetik asit (Na₂EDTA), Sigma, ABD

Fetal Sığır Serum (FBS), Pan, Güney Afrika

Formaldehit, Sigma, ABD

Glasiyal asetik asit, Sigma, ABD

Glutaraldehit, Sigma, ABD

Hidroklorik asit (HCl), Sigma, ABD

Hind III, Thermo, Almanya

IGEPAL, Sigma, ABD

L-glutamin, Sigma, ABD

Magnezyum klorür, Kimetsan, Türkiye
Maya özütü, OXOID, İngiltere
Metanol, Sigma, ABD.
Monobazik sodyum fosfat, Sigma, ABD
Nitroselüloz membran, Amersham, Almanya
Ortho-nitrofenil- β -D-galaktozid, ICN, ABD
Penisilin/Streptomisin, Sigma, ABD
Potasyum ferrisiyanit, Sigma, ABD
Potasyum ferrosiyanit, Sigma, ABD
Potasyum fosfat, Merck, Almanya
Potasyum klorür, Sigma, ABD
Proteaz inhibitör kokteyl tablet, Roche, Almanya
SmaI, Fermantas, Finlandiya
Sodyum hidroksit, Sigma, ABD
Sodyum karbonat, Sigma, ABD
Sodyum klorür, Sigma, ABD
TEMED (N,N,N',N-tetra metil etilen diamin), Sigma, ABD
Tripan mavisi, Fluka, ABD
Tripsin, Sigma, ABD
Trypton, LABM, İngiltere
Tris, Sigma, ABD
X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indol- β -D-galaktopiranozid), Sigma, ABD
X-ray developer, Omko kimya, Türkiye
X-ray fiksatif, Omko kimya, Türkiye
X-ray filmi, Ultra cruz, ABD
X-treme gene 9, Roche, Almanya

β -galaktosidaz, Roche, Almanya

β -mercaptoethanol, Ambresco, ABD

3.1.3. Kullanılan kitler ve hazır tampon çözeltiler

Plazmid DNA izolasyon kiti (Roche, Almanya)

Kit içerisinde bulunan resüspanسیون solüsyonu 0,15 ml RNaz ilavesi, yıkama solüsyonu ise 35 ml %96'lık etanol ilavesi ile kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kit içerisinde yer alan lizis, nötralizasyon ve elüsyon tamponları olduğu gibi kullanılmıştır.

RIPA tamponu (Santa Cruz, ABD)

İçerikleri aşağıda verilen solüsyonlardan, 1 ml solüsyon I içerisine 10'ar μ l solüsyon II, III ve IV eklenmesiyle kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Solüsyon I: 1X lizis tamponu: 1X TBS, %1 nonident P-40, %0,5 sodyum deoksikolat, %0,1 SDS, %0,004 sodyum azid

Solüsyon II: DMSO içerisinde çözündürülmüş PMSF

Solüsyon III: DMSO içerisinde çözündürülmüş proteaz inhibitör kokteyli

Solüsyon IV: Sodyum ortovanadat

BCA total protein tayin kiti (Thermo Price, Almanya)

Kit içerisinde bulunan “working reagent A” maddesinden 50 birim ve “working reagent B” maddesinden 1 birim alınarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kullanılmıştır.

MTS hücre canlılığı kiti (Promega, ABD)

Kit içerisinde bulunan “MTS” maddesinden 20 birim ve “PMS” maddesinden 1 birim alınarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kullanılmıştır.

Yükleme tamponu (Fermantas, Litvanya)

Tris-HCl pH 7,6

% 0,03 bromfenol mavisi

% 0,03 ksilen siyanol FF

% 60 gliserol

60 mM EDTA

3.1.4. Kullanılan Besiyerleri

Luria broth (LB)

% 1 Tripton

% 0,5 Maya Özütü

% 1 NaCl

10 g tripton, 5 g maya özütü ve 10 g NaCl tartılarak temiz bir balon joje içerisinde son hacim 1 L olacak şekilde dH₂O içerisinde çözüldürüldü ve 121°C, 1 atmosfer (atm) basınç altında otoklavda sterilize edilmiştir (Fang ve ark. 1992).

Luria broth agar (LBA)

1 L LB besiyeri içerisine 15 g agar eklenerek hazırlandı ve 121°C, 1 atm basınç altında otoklavda sterilize edilmiştir (Fang ve ark. 1992).

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

% 10 fetal sığır serum

% 1 L-glutamin

100 µg/ml Penisilin – streptomisin

100 µg/ml Amfoterisin B

500 ml steril DMEM içerisine 50 ml FBS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penisilin-streptomisin ve 5 ml amfoterisin B ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir (Cherng ve ark. 1996).

3.1.5. Kullanılan tampon ve çözeltiler

CaCl₂-MgCl₂ solüsyonu

3,25 g MgCl₂ ve 0,6 g CaCl₂ tartılıp bir miktar dH₂O'da çözüldürüldü ve son hacim 200 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavda 1 atm basınç ve 121°C' de 15 dakika sterilize edilmiştir (Tang ve ark. 1994).

0,1 M CaCl₂ solüsyonu

1,47 g CaCl₂ tartılıp bir miktar dH₂O' da çözüldürüldü ve son hacim 100 ml' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavda 1 atm basınç ve 121°C' de 15 dakika sterilize edilmiştir (Tang ve ark. 1994).

50X Tris-asetik asit-EDTA tamponu (TAE)

242 g Tris

57,1 ml Glasiyal asetik asit

100 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0)

18,6 g Na₂EDTA tartılarak bir miktar dH₂O ile pH 8,0'da çözüldürüldü ve son hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır. 242 g Tris 500 ml dH₂O içerisinde çözüldürüldü. Hazırlanan Tris solüsyonu içerisinde 57,1 ml glasiyal asetik asit ile daha önce hazırlanan 100 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0) eklenerek son hacim dH₂O ile 1 L' ye tamamlanarak ve filtre kağıdından geçirilerek süzölmüştür. Jel elektroforezi için hazırlanan bu çözeltili uygun hacimlerde dH₂O ile 50 kat sulandırılarak (1X) kullanılmıştır (Mifflin ve ark. 1987).

0,1 M Sodyum fosfat tamponu

84 ml 0,2 M Na₂HPO₄

16 ml 0,2 M NaH₂PO₄

100 ml dH₂O

3,6 g Na₂HPO₄ tartılıp bir miktar dH₂O' da çözüldü ve son hacmi 100 ml' ye tamamlanmıştır. 2,4 g NaH₂PO₄ tartılıp bir miktar dH₂O' da çözüldü ve son hacmi 100 ml' ye tamamlanmıştır. 84 ml Na₂HPO₄ ve 16 ml NaH₂PO₄ karıştırılıp son hacim dH₂O ile 200 ml' ye tamamlanmıştır (pH 7,5) (Sambrook ve Russel).

100X Mg⁺² solüsyonu

100 µl 1M MgCl₂

375 µl 4,5 M β-merkaptöethanol

425 µl dH₂O

0,95 g MgCl₂ tartılarak bir miktar dH₂O ile çözüldü ve son hacmi 10 ml' ye tamamlandı. Ana stoğu 14,2 M olan β-merkaptöethanol' den 375 µl alınıp temiz bir ependorfa koyuldu. Daha önceden hazırlanmış olan MgCl₂ solüsyonundan da 100 µl alınarak ilave edildi ve son hacim dH₂O ile 1 ml' ye tamamlanmıştır (Sambrook ve Russel).

Ortho-nitrofenil-β-D-galaktozid (ONPG) solüsyonu

1g ONPG tartılıp bir miktar 0,1M sodyum fosfat tamponu içerisinde çözüldürölüp son hacim 0,1 M sodyum fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanmıştır (Sambrook ve Russel).

1 M sodyum karbonat çözeltisi

11,98 g Na_2CO_3 tartılıp bir miktar dH_2O 'da çözündürülüp son hacim dH_2O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

β -galaktosidaz 50 Ünite/ml (U/ml)

1500 U/ml konsantrasyondaki ana stoktan 2 μl alınarak üzerine 58 μl 0,1M sodyum fosfat tamponu eklenmiştir (Sambrook ve Russel).

PBS tamponu

8 g NaCl

0,2 g KCl

0,24 g KH_2PO_4

1,78 g Na_2HPO_4

Yukarıda belirtilen maddeler belirtilen miktarlarda tartılarak bir miktar dH_2O ' da çözündürülmüştür. Daha sonra pH 7,4 ayarlandı ve son hacim dH_2O ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavda 1Atm basınç ve 121°C ' de 15 dakika sterilize edilmiştir (Sambrook ve Russel).

50 mg/ml X-Gal çözeltisi:

0,1 g X-Gal 2 ml DMSO içerisinde çözündürülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir (Sambrook ve Russel).

X-Gal boyama tamponu

1M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

0,1 M $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$

1M MgCl_2

47,15 ml PBS

250 μl $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 2,5 ml $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ve 100 μl MgCl_2 ölçülüp son hacim PBS ile 50 ml'ye tamamlanmıştır (Alvarez-Dolado ve ark. 2003) .

Stok akrilamid çözeltisi (%30)

73 g akrilamid ve 2 g bis-akrilamid tartılarak dH_2O içerisinde son hacim 250 ml olacak şekilde çözündürülmüştür.

Stok ayırma jel tamponu:

45,4 g tris ve 1 g SDS tartılarak dH₂O içerisinde son hacim 250 ml olacak şekilde çözdürüldü ve HCl ile pH 8,8' e ayarlanmıştır.

Stok paketleme jel tamponu

15,5 g tris ve 1 g SDS tartılarak dH₂O içerisinde son hacim 250 ml olacak şekilde çözdürüldü ve HCl ile pH 6,8' e ayarlanmıştır.

Amonyum persülfat (%10)

0,1 g APS 1 ml dH₂O içerisinde çözdürülmüştür.

Elektroforez tamponu

28,8 g glisin, 6 g tris ve 20 g SDS tartılarak son hacim 2 L olacak şekilde dH₂O içerisinde çözdürülmüştür (pH 8,3).

Stok örnek tamponu (2X)

0,92 g SDS, 2 ml β-merkaptoethanol, 4 ml gliserol, 0,3 g tris ve 0,002 g brom fenol mavisi tartılarak 20 ml dH₂O içerisinde çözdürülüp pH 6,8'e ayarlanmıştır.

Boyama çözeltisi

0,25 g commasie brilliant blue R-250 125 ml metanol içerisinde çözdürülüp daha sonra bu çözeltinin üzerine 25 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml dH₂O ilave edilmiştir.

Boya çıkartma çözeltisi

100 ml metanol, 100 ml glasiyal asetik asit ölçülüp bir şişe içerisine konuldu ve son hacim dH₂O ile 1 L' ye tamamlanmıştır.

%9 Yükleme jeli

6 ml stok akrilamid çözeltisi, 5 ml stok ayırma çözeltisi ve 9 ml dH₂O bir erlen içerisinde konulur. Daha sonra taze hazırlanan APS' den 50-75 µl ve 10-15 µl TEMED eklenmiştir.

%5 Yürütme jeli

0,75 ml stok akrilamid çözeltisi, 1,25 ml stok paketleme çözeltisi ve 3 ml dH₂O bir erlen içerisine konulur. Daha sonra taze hazırlanan APS' den 30 µl ve 10 µl TEMED eklenmiştir.

Total DNA lizis tamponu

Final konsantrasyonun da 20 mM tris (pH 8), 20 mM EDTA(pH 8), 200 mM NaCl ve %1 SDS olacak şekilde hazırlanmıştır (Jain ve Magrath 1991; Williams ve ark. 1989).

Tampon A

Final konsantrasyonu 50 mM tris (pH 7,4), 20 mM NaCl, 2mM EDTA, %1 IGEPAL, 1mM PMSF olacak şekilde hazırlandı ve her 10 ml'de bir adet inhibitör kokteyl tableti çözündürülmüştür.

Tampon B

Final konsantrasyonu 10 mM HEPES (pH 7,4), 42 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1mM PMSF, 0,25 M sukroz olacak şekilde hazırlandı ve her 10 ml'de bir adet inhibitör kokteyl tableti çözündürülmüştür.

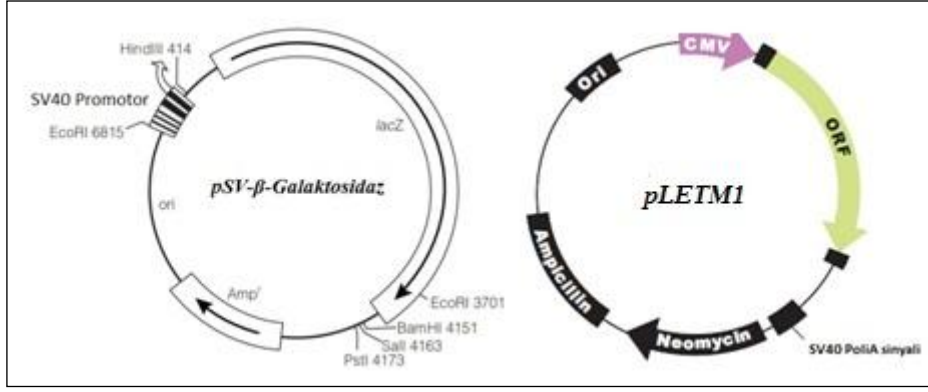
3.1.6. Kullanılan plazmid DNA'lar

pSV-β-Galaktosidaz

6820 baz çiftinden oluşan pSV-β-Galaktosidaz Promega (ABD) 'dan temin edilmiştir. Plazmid üzerinde simian virüs 40 (SV40) promotörü ile beraber β-galaktozidaz kodlayan Lac Z geni ve ampisiline direnç geni bulunmaktadır (Şekil 3.1.).

pLETM1

7998 baz çiftinden oluşan pLETM1, Prof. Dr. Wolfgang G. Graier (Graz Tıp Fakültesi, Avusturya)' den temin edilmiştir. Plazmid üzerinde sitomegalovirüs promotörü ile birlikte insan LETM1 komplementer DNA' sını klonlanmıştır. Ayrıca SV40 poliadenilasyon sinyal dizisi ile ampisilin ve neomisine direnç genleri yer almaktadır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Kullanılan plazmid DNA haritaları: Amp^r (Ampisilin); ampisiline direnç geni; ori: replikasyon orijini; lacZ: β-galaktosidaz kodlayan bölge; EcoRI, HindIII, BamHI, SmaI, PstI: restiksiyon enzim kesim noktaları; Neomycin: neomisine direnç geni; ori: replikasyon orijini; ORF: açık okuma bölgesi

3.2. Yöntemler

3.2.1. Transformasyon

Öncelikle 100 ml LB besiyeri içine tek koloni *E.coli JM107* suşundan ekim yapılarak bir gece 37°C’ de inkübe edildi. Daha sonra LB besiyerinde üreyen bu hücrelerden 25 ml bir steril tüpe aktarılıp 4100 rpm’ de 10 dakika +4°C’ de santrifüj edildi; dikkatlice süpernatant dökülüp tüpler kurutma kağıda 1 dakika ters çevrildi. Daha sonra her 25 ml LB besiyerinde üremiş hücre için 30 ml CaCl₂-MgCl₂ solüsyonu eklenip pellet süspande edildi. Süspande edilen hücreler tekrar 4100 rpm’ de 10 dakika +4°C’ de santrifüj edildi. Pellet buz soğukluğundaki 2 ml 0,1M CaCl₂ ile süspande edilip hücreler buz içerisinde gece boyu +4°C’ de bırakıldı (Tang ve ark. 1994).

Transformasyon için, 200µl kompotent hücreye 5 µl (1-50 ng arası) plazmid ilave edilerek buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Süre sonunda 42°C’ de 90 saniye ısı şoku uygulandı. Hacim 800 µl LB ilave edilerek 1ml’ye tamamlandı ve 37°C’ de etüvde bir saat inkübe edildi. Süre sonunda kültürden 200 µl, uygun antibiyotiği içeren LBA besiyerine yayıldı ve bir gece 37°C’ de inkübe edildi (Tang ve ark. 1994).

3.2.2. Plazmid DNA izolasyonu ve karakterizasyonu

Plazmid DNA izolasyonu için transforme bakteriler LBA besiyerinden, 150 ml LB sıvı besiyerine ekilerek bir gece 37°C’de inkübe edildi. Hücre yoğunluğu 600 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülerek 1,0-2,0 Abs aralığında olan kültürlerden plazmid DNA izolasyonu Fermantas Gene Jet Mini Prep kiti kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapılmıştır.

İzole edilen pLETM1 SmaI ve pSV-β-galaktosidaz Hind III restriksiyon enzimi kullanılarak Çizelge 3.1’de verilen konsantrasyonlar göz önünde bulundurularak kesildi ve oluşan bantlar % 0,8 agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi ve UV transilluminatör üzerinde fotoğrafı çekildi.

Çizelge 3.1. Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu.

Reaksiyon içeriği	Miktar (µl)
pDNA	2
10X Reaksiyon tamponu	2
Restriksiyon enzimi	1
dH ₂ O	15

Çalışmamız boyunca izole edilen plazmid DNA’ların konsantrasyonu, UV spektrofotometresi kullanılarak 260 nm’de belirlendi. Konsantrasyon miktarının hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\text{DNA konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times K \times \text{DF}$$

Burada OD₂₆₀, 260 nm dalga boyundaki absorbans değerini; DF, seyrelme katsayısını; K, 260 nm dalga boyunda 1 OD değeri veren DNA konsantrasyonunu (µg/ml) göstermektedir. DNA’nın saflığını belirlemede OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranından yararlanılır. Bu oranın 1,8-2,0 arasında olması izole edilen DNA’nın yüksek saflıkta olduğunu gösterir (Temizkan, G. ve ark., 1999).

3.2.3. Hücre kültürü

İnsan servikal karsinoma hücreleri olan HeLa hücreleri Yrd. Doç. Dr. Suna Özbaş Turan (Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi)’den temin edilmiştir. Hücreler 25 cm² yüzey alanına sahip T-25 hücre kültürü kaplarında 5 ml DMEM içerisinde kültüre edilmişlerdir. Hücreler rutin olarak haftada bir kez pasajlanmıştır. Pasajlama işleminde besiyerinin uzaklaştırılmasını takiben hücreler 5 ml PBS ile yıkanmış ve hücre kültürü kabına adhere olarak yaşayan hücreler süspande edilmesi için 1 ml Tripsin-EDTA ilave edilerek 2-3 dakika beklenmiştir. Hücreler 900 rpm hızda 3 dakika steril tüpler içerisinde çöktürülerek pellet 1 ml DMEM içerisinde süspande edilmiş ve 1/10 oranında yeni hücre kültürü kaplarına pasajlanmıştır.

Transfeksiyon deneyleri için belirli sayıda hücre 96 kuyucuklu veya 24 kuyucuklu mikrolaplara ekilmiştir. Bu amaçla tripsinizasyon sonrasında 100 µl hücre süspansiyonu ayrı

bir endorf tüp içerisinde eş hacim tripan mavisini ile karıştırılarak Neubauer lamında canlı hücreler sayılmıştır. Mililitredeki toplam hücre sayısı;

Her bir alandaki hücre sayısı $\times 10^4 \times 2$ formülünden hesaplanmış ve kuyucuklara istenen sayıda hücre ekilmiştir. 96 kuyucuklu mikrolakalar için 100 μ l, 24 kuyucuklu mikrolakalar için 500 μ l besiyeri ilave edilerek inkübe edilmiştir.

Tüm hücre kültürü çalışmaları boyunca hücreler morfoloji, sayı ve karakterizasyon kontrolü amacı ile günlük olarak invert mikroskopta kontrol edilmiştir.

3.2.4. Total protein tayini

Total protein tayini kantitatif olarak biçinkonik asit yöntemi (BCA) ve kalitatif olarak poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile gerçekleştirilmiştir.

BCA

Total protein miktarı Thermo Price BCA Protein Assay Kit kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapılmıştır. Biçinkonik asit (BCA) protein tayin yönteminde bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu solüsyon protein solüsyonuna ilave edildiğinde, proteinin peptid bağları ile etkileştiğinde Cu^{++} iyonları Cu^+ iyonlarına dönüşür ve kompleksin rengini mora çevirir. Oluşan bu mor renk 562 nm' de spektrofotometrede ölçülerek kolorimetrik olarak protein miktar tayini yapılır. Bu yöntem kullanılarak 20-2000 μ g/ml protein konsantrasyon aralığı ölçülebilir (Smith ve ark. 1985; Wiechelman ve ark. 1988). Protein tayini çalışmaları için öncelikle 150-900 μ g/ml konsantrasyon aralığında BSA steril su içerisinde hazırlanarak protein tayini gerçekleştirilmiş ve standart eğri oluşturulmuştur.

Hücrelerden total protein tayini amacıyla öncelikle hücreler 50 μ l RIPA tamponu içerisinde parçalanmış ve total protein miktarı bu lizatın 10 μ l'si kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

PAGE

24 kuyucuklu mikrolakalarda kültüre edilmiş transfekte ve transfekte olmamış kontrol HeLa hücrelerinin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 100 μ l RIPA lizis tamponu eklenip 37°C'de 30 dakika bekletildi ve hücreler kazınarak temiz bir endorfa aktarıldı. Aktarılan hücre lizatları maksimum rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatanttan 2 birim alınıp üzerine 1 birim 2X yükleme tamponu ilave edildi ve bu karışım 5 dakika kaynar suda (95-100 °C) bekletildi. Sürenin

sonunda Bölüm 3.1.5.'de belirtildiği şekilde hazırlanan jelle örneklerden 4,5 µl yüklendi ve 70 V, 28 mA, 80 dakika yürütüldü. Poliakrilamid jel boyama çözeltisi içerisine alındı ve 30 dakika çalkayıcı üzerinde boyandı; sürenin sonunda jel boya çıkartma çözeltisine alındı ve 15 dakika bu çözelti içerisinde tutularak bantların görünür hale gelmesi sağlandı.

3.2.5. Transfeksiyon

Transfeksiyon çalışmalarında Roche X-tremeGENE 9 DNA transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. Öncelikle hücre sayısı Bölüm 3.2.3'de belirtildiği şekilde belirlenerek 24 kuyucuklu mikrolakalara $1,5 \times 10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda bir ependorf tüp içerisinde 3 µl X-treme gene 9 ve 1 µg pDNA (pSV-β-galaktosidaz veya pLETM1) karıştırılmış ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 10 µl eklenmiş ve kültürler 37°C CO₂ etüvde inkübe edilmiştir.

3.2.6. β-galaktosidaz tayini

Transfeksiyon sonrası β-galaktosidaz tayini, ONPG testi ve X-Gal boyama yöntemleri ile belirlenmiştir.

ONPG testi

Bu test, ONPG ayrışmasını katalize eden β-galaktosidaz enziminin varlığının belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. β-galaktosidaz ortamda bulunan basit galaktozid'leri (laktoz dahil) ayrıştıran ve indüklenebilen intrasellüler bir enzimdir (Swamy).

Bütün örnekler Çizelge 3.2'de belirtilen maddeler belirtilen miktarlarda eklenmiş ve daha sonra 37°C derecede 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her örneğe 500 µl 1M Na₂CO₃ ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra spektrofotometre ile 420 nm'de ölçümler yapılmıştır (Sambrook ve Russel). Öncelikle 5-50 U/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan β-galaktosidaz enzimi kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur. pSV-β-galaktosidaz ile transfeksiyon sonrası tayin için hücreler 50 µl RIPA tamponu içerisinde parçalandıktan sonra lizatın 40 µl'si kullanılarak β-galaktosidaz tayini gerçekleştirilmiştir. ONPG test sonuçları OD420/total protein miktarı (mg)/inkübasyon süresi (saat) olarak standartize edilmiştir.

Çizelge 3.2. ONPG testi kontrol ve örnek içerikleri

	Kör (µl)	Kontrol (µl)	Örnek (µl)
100X Mg ⁺² Solüsyonu	3	3	3
1X ONPG	66	66	66
Hücre özütü	30	30	30
0.1M Sodyum fosfat	201	201	201
β –galaktosidaz	-	1	-

X-Gal boyama

Transfekte edilen hücrelerin üzerinde ki besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl glutaraldehit ile 15 dakika hücreler fikse edildi. Daha sonra 100 µl PBS ile hücreler 1 dakika yıkanıp, PBS hücrelerden uzaklaştırıldı; tekrar 200 µl PBS ile yıkandı ve 10 dakika bekletildi. Sürenin sonunda PBS hücrelerden uzaklaştırıldı ve 100 µl X-Gal boyama solüsyonu ilave edilerek 37°C’ de 24 saat inkübatöre kaldırıldı (Alvarez-Dolado ve ark. 2003). β-galaktosidaz ekspresyonun belirteci olan mavi renge boyanmanın varlığı invert mikroskopta incelendi ve görüntüleme sistemi ile fotoğrafları çekildi.

3.2.7. LETM1 transfeksiyon sonrası yapılan kontroller

3.2.7.1. LETM1 Tayini

LETM1 tayini western blotting ve dot blot yöntemi ile belirlendi. Western blotting ve dot blot yöntemi arasındaki temel fark dot blot yönteminde SDS-PAGE aşamasının olmamasıdır. Bu amaçla pLETM1 ile transfekte edilen hücreler RIPA tamponu ile parçalanarak Bölüm 3.2.4’ te belirtildiği şekilde PAGE yapıldı. Daha sonra proteinlerin yürütüldüğü poliakrilamid jeller tank blot sistemine alınarak +4°C’ de gece boyu transfer tamponunun içerisinde 0,22 µm nitroselüloz membrana aktarım gerçekleştirildi (30 V, 187 mA). Blotlama işleminin ardından membran temiz bir kaba alındı ve 5 dakika aralıkla iki kez 20 ml otoklavlı dH₂O ile yıkandı. Membranın üzerine bölüm 3.1.5.’da belirtildiği şekilde hazırlanan blocker solüsyondan 10 ml ilave edilip yarım saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Sürenin sonunda örnekler anti LETM1(1/500 sulandırılmış) ve anti aktin antikoları (1/1500 sulandırılmış) ilave edilerek 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Sürenin sonunda 5 dakika aralıklarla üç kez 20 ml antikor yıkama solüsyonu ile temizlenen membrana 10 ml sekonder antikor ilave edilerek 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Tekrar 5 dakika aralıklarla 3 kez antikor yıkama solüsyonu ile membran yıkanmasından sonra 2 kez iki dakika aralıklarla 20 ml otoklavlı dH₂O ile membran yıkandı; bu işlemden sonraki basamaklar

karanlık odada gerçekleştirildi. 2,5 ml chemiluminescent substrat ile membran 5 dakika muamele edildikten sonra membran filme ekspoz olması için kasetin içindeki filmin üzerine yerleştirildi ve 1 dakika beklendi. Sürenin sonunda film sırasıyla 1 dakika developer, 30 saniye su ve 30 sn fiksatifte yıkandı.

3.2.7.2. Hücre canlılığın belirlenmesi (MTS testi)

Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla MTS testi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem metabolik olarak aktif, canlı hücreler tarafından üretilen dehidrogenaz enzimleri ile bir tetrazolium bileşiği olan MTS' nin (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, iç tuzu) formazana dönüşmesi ile oluşan mor rengin kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır.

Hücre canlılığı testi 24 kuyucuklu veya 96 kuyucuklu mikrolakalar da 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 mikrolakaya okuyucuda ölçülmüştür.

3.2.7.3.Sitokrom c serbestleşmesi

24 kuyucuklu mikrolakara ekilen transfekte ve transfekte olmamış kontrol HeLa hücreleri tripsinize edilerek ependorfa aktarıldı ve hücreler 5 dakika 800 rpm +4°C' de santrifüj edildi ve daha sonra pellet bölüm 3.1.5.'da anlatıldığı gibi hazırlanan 100 µl tampon B ilave edilerek hücreler süspande edildi ve hücreler 15 kez insülin enjektöründen geçirildi ve 800 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant sitozolik fraksiyon pellet mitokondriyal fraksiyon olarak iki ayrı ependorfa aktarıldı. Sitozolik fraksiyona 100 µl tampon A ilave edilerek 15 dakika buza gömüldü. Mitokondriyal fraksiyona da 100 µl tampon A ilave edilerek hücreler süspande edildi ve 15 dakika 37°C' de inkübe edildikten sonra maksimum rpm'de santrifüj edildi (Kim ve ark. 2003) ve bu lizatlar üzerinden dot blot yapıldı.

3.2.7.4. Total DNA izolasyonu

Total DNA 24 ve 96 kuyucuklu mikrolakalar da kültüre edilmiş transfekte ve transfekte olmamış kontrol HeLa hücrelerinden elde edilmiştir. Kuyucuklarda ki besiyeri uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine total DNA lizis tamponu eklenip hücreler kazınarak temiz bir ependorfa aktarıldı. Bu hücrelerin üzerine final konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde RNase A ilave edilip 37°C' de 1 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda final konsantrasyonu 12,5 µg/ml olacak şekilde proteinaz K ilave edilip 1 saat 50°C'de inkübe edildi (Jain ve Magrath 1991; Williams ve ark. 1989). Elde edilen genomik

DNA %0,8'lik agoroz jelde yürütüldü ve SYBR Green I Nükleik asit jel boyası ile boyandı ve UV transillimnatr ile görüntülendi.

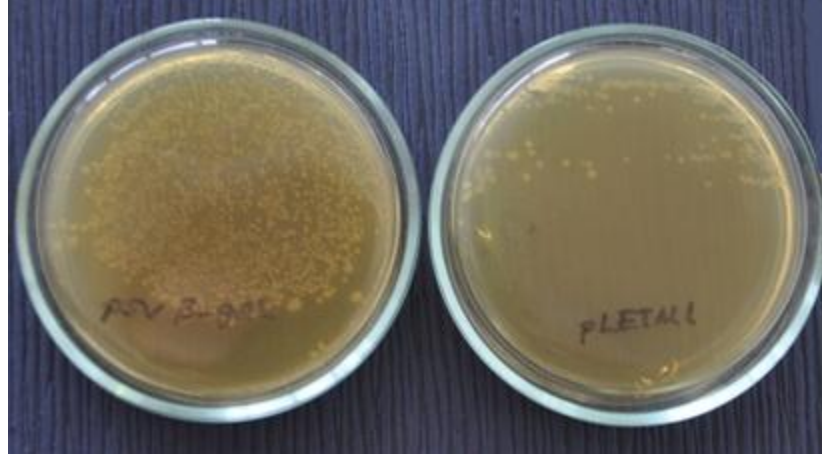
3.2.8. İstatiksel yöntemler

Tez alışması kapsamında elde edilen veriler arasında ki farkların anlamlılığı SPSS 15.0 programı kullanılarak student T test ile incelenmiş ve $p < 0,05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULAR

4.1. Plazmid DNA Transformasyon Bulguları

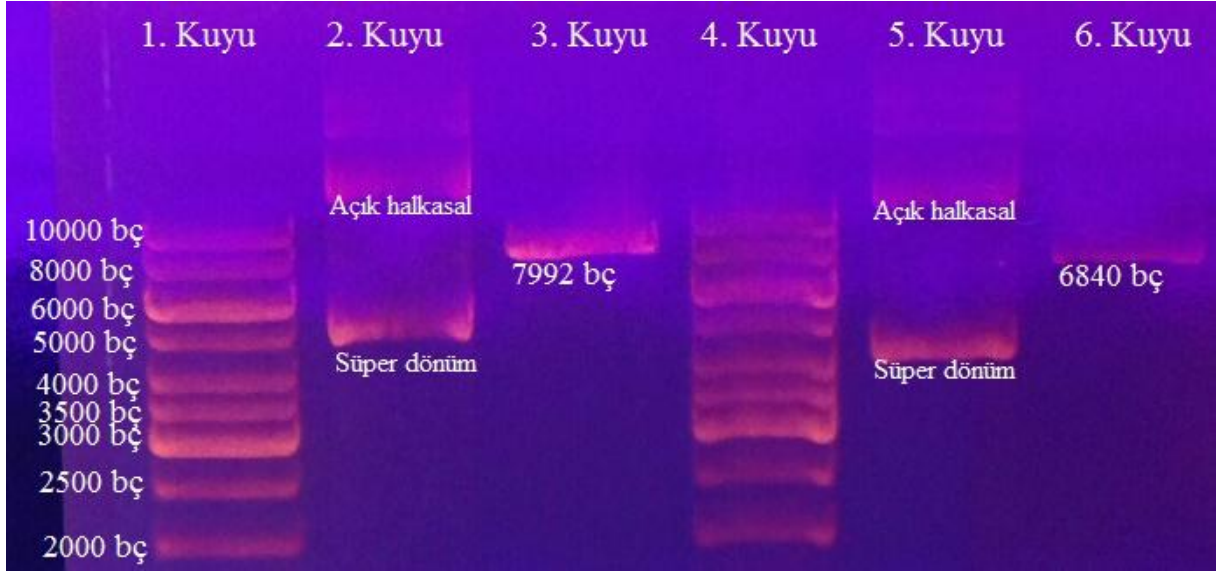
β -galaktozidaz kodlayan pSV- β -Galaktozidaz ve LETM1 kodlayan pLETM1 plazmidleri Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde *E.coli. JM107* suşuna transforme edilerek, plazmid taşıyan bakteri kolonileri antibiyotik içeren besiyerinde seçilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Transforme pSV- β -galaktosidaz ve pLETM1

4.2. pDNA İzolasyon ve Karakterizasyon Bulguları

Sıvı besiyerinde üretilen bakterilerden Bölüm 3.2.2’de belirtildiği şekilde izole edilen plazmid DNA’lar restriksiyon enzimleri ile kesilerek jel elektroforezinde incelenmiştir. Tek noktadan kesilen plazmidlerin doğrusal formda, izole edilen plazmidlerin ise açık halkasal ve süper sarmal formlarda bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.2). Her iki plazmid için de OD260/OD280 oranı 1,8 civarında tespit edilmiş ve plazmid DNA konsantrasyonu 150-330 μ g/ml aralığında ölçülmüştür.



Şekil 4.2. Plazmid DNA agaroz jel elektroforezi: 1. ve 4. kuyular DNA belirteç; 2. kuyu izole pLETM1; 3. pLETM1 + SmaI enzimi; 5. kuyu izole *pSV-β-Galaktosidaz* ; 6. kuyu *pSV-β-Galaktosidaz* + HindIII enzimi

4.3. Hücre Kültürü Bulguları

Kültür ortamında HeLa hücreleri Bölüm 3.2.3’de belirtildiği şekilde çoğaltılmıştır. Tüm tez çalışması süresince normal çoğalma özellikleri gösteren hücrelerde deneyler gerçekleştirilmiştir.

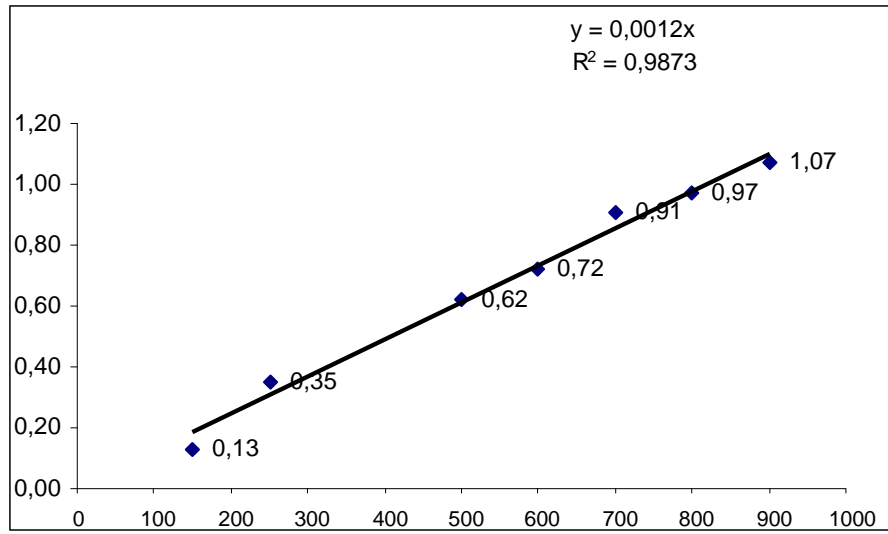
4.4. Total Protein Tayini

BCA

Bölüm 3.2.4.’da bahsedildiği gibi sığır serum albumini kullanılarak Çizelge 4.1.’da belirtilen konsantrasyonlarda örnekler hazırlanarak Şekil 4.3.’da gösterildiği gibi standart eğri oluşturulmuştur.

Çizelge 4.1. BSA standart eğrisi verileri

BSA Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama absorbans (562 nm)	Standart sapma (SD)
150	0,125	0,034
250	0,346	0,071
500	0,617	0,059
600	0,719	0,047
700	0,913	0,132
800	0,967	0,015
900	1,073	0,011



Şekil 4.3. BSA standart eğrisi

PAGE

Hücre kültürü çalışmaları sonucu elde edilen hücre özütlerin %9'luk PAGE'de yürütülmüş ve fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Hücre özütlerinin PAGE görüntüleri

4.5. Transfeksiyon

Yöntemler kısmında anlatıldığı gibi yapılan transfeksiyon deneylerinde en uygun transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi için 24. saat, 48. saat, 72. saatler için ayrı ayrı transfeksiyon deneyleri yapılmış ve transfeksiyon etkinliği belirlenmiştir.

4.6. β -galaktosidaz tayini

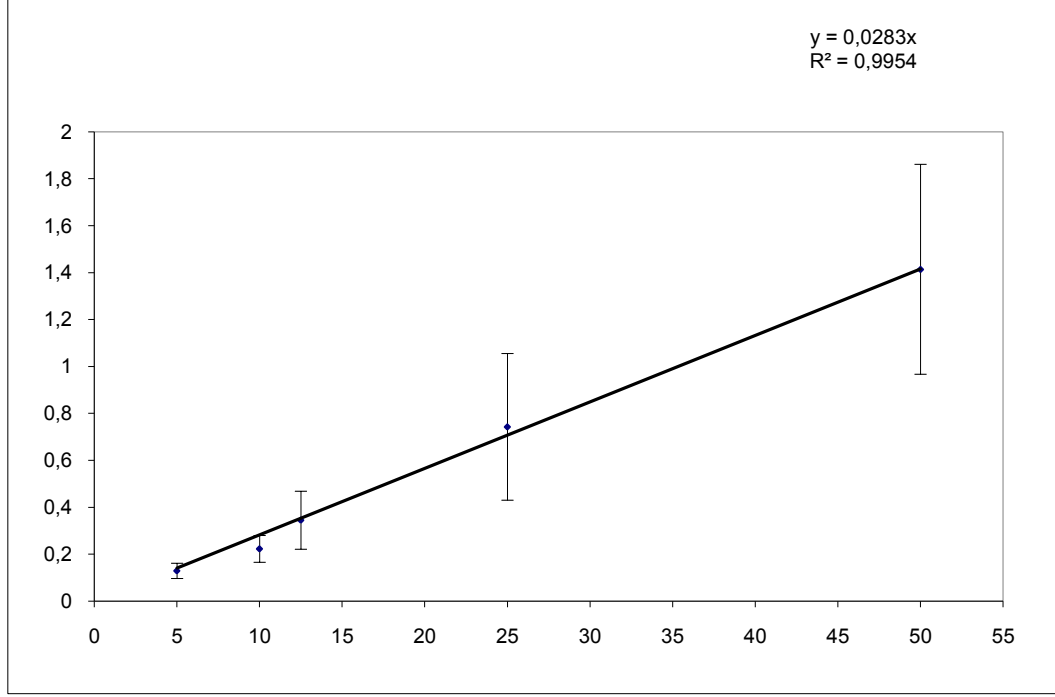
Yöntemler kısmında bahsedildiği gibi ONPG testi ve X-Gal boyama olmak üzere iki farklı test ile β -galaktosidaz tayini gerçekleştirilmiştir.

ONPG testi

Yöntemler kısmında bahsedildiği gibi β –galaktosidaz enzimi kullanılarak Çizelge 4.2.'de her konsantrasyon için örnek için n=6 sayıda örnek hazırlanarak Şekil 4.5.'de gösterildiği gibi standart eğri oluşturulmuştur.

Çizelge 4.2. β –galaktosidaz standart eğrisi verileri

Enzim konsantrasyonları (U/ml)	420 nm	SD
5	0,129	0,029
10	0,222	0,051
12,5	0,345	0,114
25	0,742	0,284
50	1,414	0,405

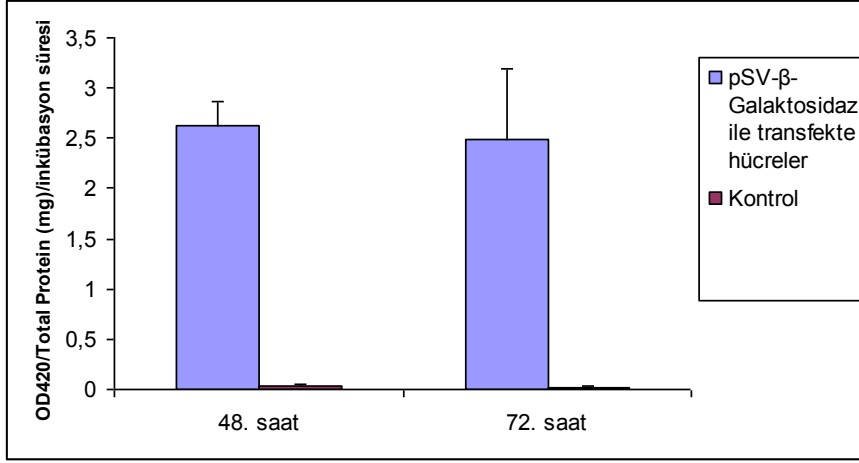


Şekil 4.5. β-galaktosidaz standart eğrisi

HeLa hücrelerinin *pSV-β-Galaktosidaz* ile transfeksiyonunu takip eden 48 ve 72. saatlerde β-galaktosidaz aktivitesi ONPG testi ile belirlenmiştir. Her iki zaman aralığında da β-galaktosidaz aktivitesinin kontrol hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.6.)

Çizelge 4.3. *pSV-β-Galaktosidaz* ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde ve kontrol hücrelerinde β-Galaktosidaz aktivite verileri (OD420/total protein (mg)/inkübasyon süresi)

	48. Saat	72. Saat
<i>pSV-β-Galaktosidaz</i> ile transfekte hücreler	2,627	2,494
Kontrol	0,029	0,02



Şekil 4.6. pSV-β-Galaktosidaz ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde ve kontrol hücrelerinde β-Galaktosidaz aktivitesi

X-Gal Boyama

In vivo transfeksiyon çalışmaları sonucu HeLa hücrelerinde β-Galaktosidaz gen ekspresyonunu belirlemek için yöntemler kısmında anlatıldığı gibi X-Gal boyama yapılarak mikroskopik görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır (Şekil 4.7.). Kontrol grubunda mavi boyanan hücreye rastlanmazken pSV-β-Galaktosidaz transfekte edilen hücrelerin mavi renkte boyandığı görülmüştür.

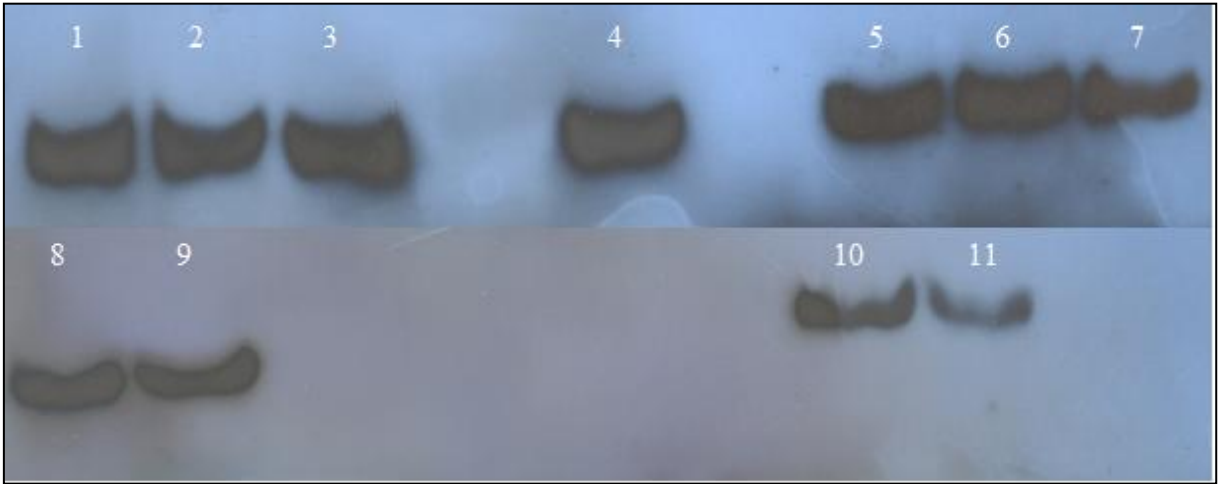


Şekil 4.7. pSV-β-galaktosidaz ile transfeksiyon sonrası X-gal ile boyanan hücrelerde β-galaktosidaz ekspresyon eden mavi renkli hücrenin görünümü. (Ok işareti ile gösterilmektedir)

4.7. pLETM1 transfeksiyonu sonrası yapılan kontroller

4.7.1. LETM1 Tayin Bulguları

Transfekte ve transfekte olmamış kontrol hücrelerinden Bölüm 3.2.6.2’de anlatıldığı şekilde 48, 72 ve 96. saatlerde elde edilen hücre lizatlarıyla yapılan western blotting sonuçları Şekil 4.8’de gösterilmektedir. Buna göre LETM1 miktarının transfeksiyon sonrası 72 ve 96. saatlerde kontrol grubuna göre belirgin şekilde arttığı görülmüştür.



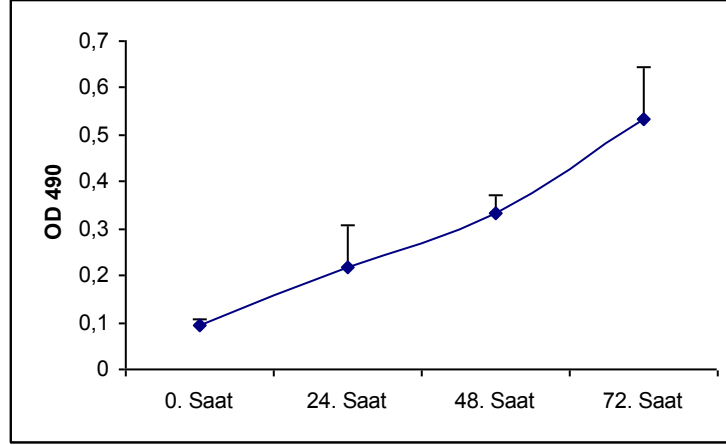
Şekil 4.8. 1,2: 48. saat pLETM1 transfekte hücreler; 3,4: 48. saat transfekte olmamış kontrol hücreleri; 5,6: 72. saat pLETM1 transfekte hücreler; 7: 72. saat transfekte olmamış kontrol hücreleri; 8,9: 96. saat pLETM1 transfekte hücreler; 10,11: 96. saat kontrol hücreleri

4.7.2. Hücre Canlılığı Testi (MTS) Bulguları

Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.7.2.’da belirtildiği şekilde MTS testi yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle hücrelerin genel büyüme özelliğini belirlemek amacıyla 24 kuyucuklu mikropalakalara $1,5 \times 10^4$ hücre ekilmiş ve hücre canlılığı 0, 24, 48 ve 72. saatlerde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hücre sayısının arttığı gözlenmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.9.)

Çizelge 4.4. HeLa hücrelerinde 72 saat süreyle MTS ile belirlenen canlılık değerleri

	OD490	SD
0. Saat	0,092	0,014
24. Saat	0,217	0,09
48. Saat	0,335	0,037
72. Saat	0,535	0,11

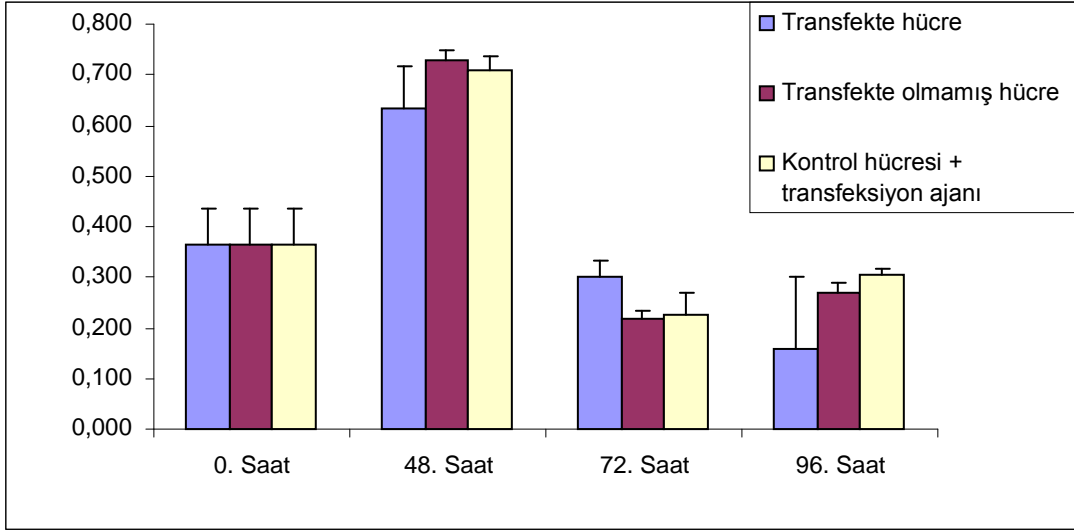


Şekil 4.9. HeLa hücrelerinde MTS ile belirlenen büyüme eğrisi

pLETM1 ile transfeksiyon sonrası hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla transfeksiyonu takip eden 48, 72 ve 96. saatlerde MTS testi uygulanmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak transfekte olmamış hücreler ile sadece X-tremeGENE ile muamele edilen hücreler kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.5. ve Şekil 4.10.'da verilmiştir. Elde edilen verilere göre hücre canlılığı 96. saatte gerek kontrol grubu, gerekse transfeksiyon grubu için azalmaktadır. Ancak bu azalma LETM1 ile transfekte hücrelerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.5. pLETM1 transfekte, transfekte olmamış kontrol hücreleri ve kontrol hücresi + transfeksiyon ajanı ile yapılan MTS test verileri

	0. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
Transfekte hücre	0,365	0,633	0,301	0,157
Transfekte olmamış hücre	0,365	0,730	0,218	0,270
Kontrol hücresi + transfeksiyon ajanı	0,365	0,711	0,226	0,303

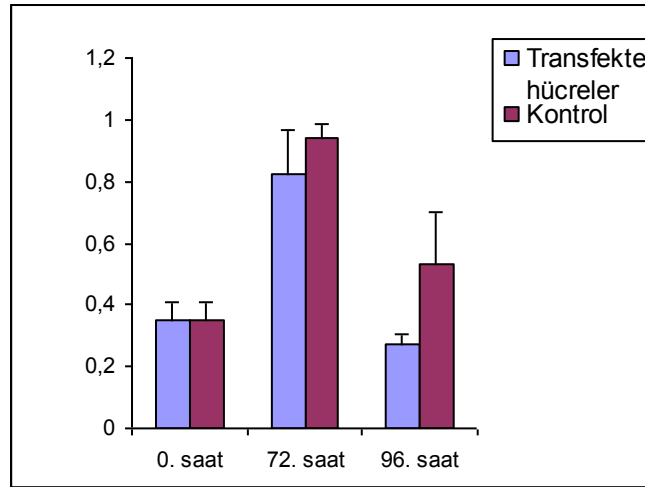


Şekil 4.10. pLETM1 transfekte, transfekte olmamış kontrol hücreleri ve kontrol hücresi + transfeksiyon ajanı ile yapılan MTS test grafiği

Elde edilen bu verilerin hücrelerin uzun süre aynı besiyeri içerisinde bulunmasının yol açıp açmadığını test etmek amacıyla transfeksiyonu takip eden 48. saatte besiyeri değiştirilerek deney tekrarı yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.6. ve Şekil 4.11.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Besiyeri değişimi sonrası MTS test verileri

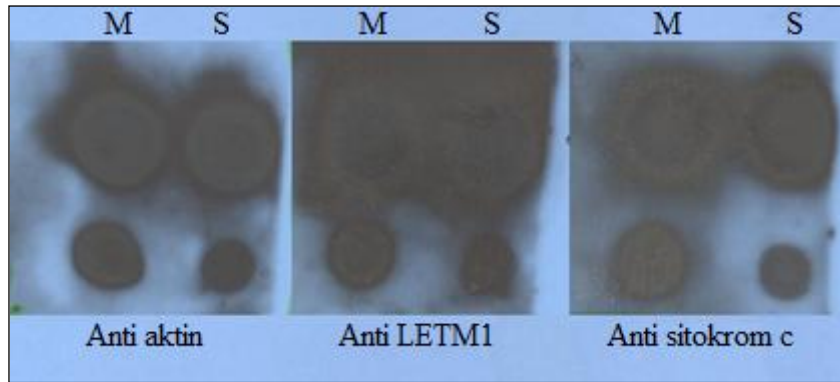
	0. saat	72. saat	96. saat
Transfekte hücreler	0,351	0,825	0,273
Kontrol	0,351	0,938	0,534



Şekil 4.11. Besiyeri değişimi sonrası MTS test grafiği

4.7.3. Sitokrom c serbestleşmesi bulguları

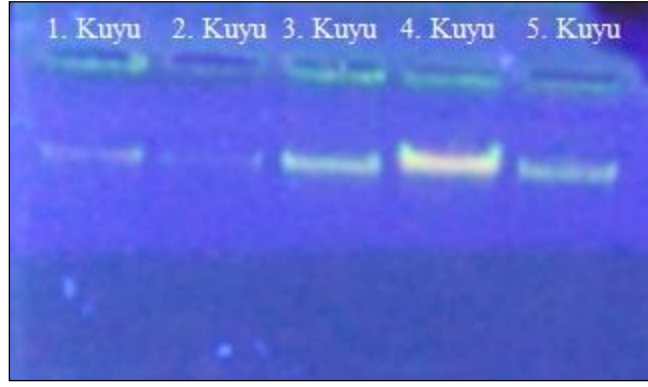
Hücre ölümünün apoptotik olup olmadığının belirlenebilmesi amacıyla sitokrom c serbestleşmesinin belirlenmesi planlanmıştır. Bu amaçla mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyon bölüm 3.2.7.3.'da anlatıldığı şekilde ayrılarak her iki fraksiyonda da Aktin, LETM1 ve sitokrom C incelenmiştir. Elde edilen veriler çerçevesinde beklenen fraksiyonların, kullanılan yöntemle etkin şekilde ayrıldığı görülmüş (Şekil 4.11.) ve laboratuvar olanaklarımızın sınırlı olması nedeniyle bu deneyler devam ettirilememiştir.



Şekil 4.12. Mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyon ayırımı S: sitoplazmik fraksiyon; M: mitokondriyal fraksiyon

4.7.4. Total DNA izolasyon bulguları

Transfekte ve transfekte olmamış kontrol HeLa hücrelerinden elde edilen total DNA'lar %0,8'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV translüminatör üzerinde fotoğrafı çekildi (Şekil 4.12.). Jel görüntüsü sonucu bir apoptoz belirteçi olan DNA merdiven paterni gözükmedi.



Şekil 4.13. Total DNA %0,8 agaroz jel görüntüsü. 1. kuyu: pLETM1 transfeksiyon sonrası 72. saat örneği, 2. kuyu: pLETM1 transfeksiyon sonrası 96. saat örneği, 3. 4. ve 5. kuyular: transfekte olmamış kontrol hücreleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mitokondriyal membran permeabilizasyonunun intrensek apoptozisin önemli bir basamağı olduğunun gösterilmesinden itibaren mitokondri gerek hücre ölümü gerekse hücre sağ kalımı bakımından önemli bir organel olarak görülmeye başlanmıştır. Mitokondrinin hücre içi en önemli fonksiyonu ATP üretimidir. Buna ek olarak mitokondri hücrenin maruz kalacağı streslere karşı oluşturulacak cevapların koordinasyonunda da büyük öneme sahiptir. Bu süreçler arasında otofaji, kontrollü nekroz gibi apoptotik olmayan hücre ölümü ve apoptozis sayılabilir.

Mitokondri ve hücre ölümündeki rolü üzerine yapılan çalışmalar arasında son yıllarda bir mitokondriyal iç membran proteini olan LETM1 ilgi çekmektedir. İlk olarak Wolf-hirschhorn sendromunda proteini kodlayan kromozom bölgesinin kaybıyla dikkati çeken proteinin hücre içerisindeki rolü kesin olarak tanımlanmış değildir. Bu fonksiyonlar; hücre içi iyon homeostasisi, mitokondriyal protein sentezi ve hücre ölümü olarak 3 ana grupta toplanabilir; (Nowikovsky ve ark. 2012). Hücre ölümünde önemli bir role sahip olan iyon homeostasisi, özellikle kalsiyumun regülasyonu önemlidir. Diğer taraftan yapılan çalışmalar LETM1' in bir Ca^{2+}/H^{+} antiportu olduğuna işaret etse de, bu taşınmanın K^{+}/H^{+} olduğunu savunan çalışmalar mevcuttur (Hasegawa ve van der Bliik 2007; Jiang ve ark. 2009; Nowikovsky ve ark. 2004; Nowikovsky ve ark. 2012). LETM1' in K^{+} veya Ca^{2+} taşınmasındaki rolünü ele alan bu çalışmalar genel olarak genin *in vitro* transfeksiyon sonrası aşırı ekspresyonu ve/veya siRNA transfeksiyonu sonrası ekspresyonun baskılanması yöntemlerine dayanmaktadır. Bu çalışmaların büyük kısmında ise her iki durumdada hücre canlılığına yansıyan bir sonuç rapor edilmemiştir. Bu çalışmalardan sadece iki tanesinde LETM1 ekspresyonunun baskılanmasının uzun sürede ve nekrotik karakterde hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (Dimmer ve ark. 2008; Hasegawa ve van der Bliik 2007).

LETM1' in hücre canlılığı üzerine etkisini ele alan ilk çalışma Piao ve ark.' na aittir (Piao ve ark. 2009a). Araştırmacılar adenoviral vektör kullanarak LETM1 gen ekspresyonunun arttırılmasının nekrotik hücre ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma kapsamında çeşitli kanser örnekleri de incelenmiş ve incelenen tüm kanser dokularında LETM1' in en az adenoviral transdüksiyon sonrası olduğu kadar yüksek düzeyde LETM1 eksprese ettiği bildirilmiştir. Diğer taraftan neden LETM1 baskılanması ve arttırılmasının aynı fenotipe yol açtığı açıklanamamıştır. Araştırmacılar daha sonra aynı adenoviral vektör sistemini kullanarak çalışmalar yapmışlar ancak bu çalışmalarda çeşitli

düzeylede apoptotik hücre ölümü gerçekleştiğini ve bu özelliği nedeniyle kanser tedavisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Hwang ve ark. 2010b; Piao ve ark. 2009b). Son olarak 2013 yılında Shin ve ark., (Shin ve ark. 2013) LETM1-CTMP genlerini taşıyan vektörler kullanarak fare hepatosellüler karsinom modelinde *in vivo* gen tedavisi denemişler ve tümör gelişiminin anlamlı şekilde baskılanabildiğini ifade etmişlerdir.

Yukarıda kısaca özetlenen ve Bölüm 2' de kapsamlı olarak verilen tüm bu çalışmalar LETM1' in hücre içindeki fonksiyonuna yönelik daha fazla araştırmaya gereksinim olduğunu ortaya koymaktadır. Bölümümüzde bu kapsamda başlatılan çalışmalar için bir ön çalışma niteliğinde olan bu tez çalışması başlatılmış ve öncelikle viral olmayan yöntemlerle sağlanan LETM1 ekspresyonundaki artışın hücre canlılığına etkisi ele alınmıştır.

Kullanılan transfeksiyon yöntemi için gen ekspresyonundaki artışın kontrol edilmesi için öncelikle B-galaktozidaz kodlayan plazmid DNA kullanılarak deneyler yapılmış ve 48 ve 72. saatlerde yüksek ekspresyon düzeylerinin elde edilebildiği gerek enzimatik gerekse sitolojik boyama yöntemleri kullanılarak gösterilmiştir. Daha sonra LETM1 kodlayan plazmid DNA' nın transfeksiyonu sonrası 72 ve 96. saatlerde LETM1 düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin biçimde arttığı görülmüştür. Yine bu hücrelerde hücre canlılığının da LETM1 aşırı eksprese eden grupta kontrol grubuna göre belirgin şekilde azalma olduğu belirlenmiştir. Hücre canlılığındaki bu azalmada geçen süre içerisinde besiyeri değişimi olmamasının bir etkisi olup olmadığı göz önünde bulundurularak 48. saatte besiyeri değiştirilmiş ve yine LETM1 aşırı ekspresyonunun hücre canlılığında azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Tez çalışması kapsamında, hücre ölümünün niteliğini anlayabilmek amacıyla DNA fragmentasyonu ve sitokrom c serbestleşmesi ele alınmıştır. Transfeksiyonu takip eden 72 ve 96. saat örneklerinde DNA fragmentasyonu görülmemiştir. Bu durum tek başına yeterli bir dayanak olmamakla beraber, hücre ölümünün apoptotik olmayacağına işaret edebilir. Diğer taraftan sitokrom c serbestleşmesi laboratuvarımızdaki imkanların sınırlı düzeyde kalması sebebiyle incelenememiştir.

Sonuç olarak elde edilen veriler viral olmayan yöntemlerle LETM1 gen ekspresyonunun arttırılmasının hücre canlılığında etkili olduğu destekler niteliktedir. Proteinin hücre içindeki rolünün aydınlatılması için daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

6. KAYNAKLAR

- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, 9:423-432.
- Adrain C, Slee EA, Harte MT, Martin SJ (1999). Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem*, 274:20855-20860.
- Alam MR, Groschner LN, Parichatikanond W, Kuo L, Bondarenko AI, Rost R, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF (2012). Mitochondrial Ca²⁺ uptake 1 (MICU1) and mitochondrial Ca²⁺ uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, 287:34445-34454.
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425:968-973.
- Aral C, Kaya H, Ataizi-Celikel C, Akkiprik M, Sonmez O, Gulluoglu BM, Ozer A (2006). A novel approach for rapid screening of mitochondrial D310 polymorphism. *BMC Cancer*, 6:21.
- Bernardi P (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 79:1127-1155.
- Blachly-Dyson E, Forte M (2001). VDAC channels. *IUBMB Life*, 52:113-118.
- Cherng JY, van de Wetering P, Talsma H, Crommelin DJ, Hennink WE (1996). Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm Res*, 13:1038-1042.
- Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G (2000). Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 92:1042-1053.
- Creagh EM, Martin SJ (2001). Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans*, 29:696-702.
- Deluca HF, Engstrom GW, Rasmussen H (1962). The action of vitamin D and parathyroid hormone in vitro on calcium uptake and release by kidney mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48:1604-1609.
- DiMauro S, Schon EA (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*, 348:2656-2668.
- Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F, Messerschmitt M, Weinbach N, Neupert W, Westermann B (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 13:847-853.
- Dimmer KS, Navoni F, Casarin A, Trevisson E, Ende S, Winterpacht A, Salviati L, Scorrano L (2008). LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability. *Hum Mol Genet*, 17:201-214.
- Ende S, Fuhry M, Pak SJ, Zabel BU, Winterpacht A (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*, 60:218-225.

- Fadeel B, Gleiss B, Hogstrand K, Chandra J, Wiedmer T, Sims PJ, Henter JI, Orrenius S, Samali A (1999). Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 266:504-511.
- Fang FC, Libby SJ, Buchmeier NA, Loewen PC, Switala J, Harwood J, Guiney DG (1992). The alternative sigma factor katF (rpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:11978-11982.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*, 1:515-525.
- Froschauer E, Nowikovsky K, Schweyen RJ (2005). Electroneutral K⁺/H⁺ exchange in mitochondrial membrane vesicles involves Yo1027/Letm1 proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1711:41-48.
- Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 9:447-464.
- Giacomello M, Drago I, Pizzo P, Pozzan T (2007). Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ*, 14:1267-1274.
- Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E (2008). Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyol Dern Arş*, 36:120-130.
- Hajnoczky G, Csordas G (2010). Calcium signalling: fishing out molecules of mitochondrial calcium transport. *Curr Biol*, 20:R888-891.
- Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, 82:415-424.
- Hasegawa A, van der Bliek AM (2007). Inverse correlation between expression of the *Wolfs Hirschhorn* candidate gene *Letm1* and mitochondrial volume in *C. elegans* and in mammalian cells. *Hum Mol Genet*, 16:2061-2071.
- Hengartner MO (1999). Programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Recent Prog Horm Res*, 54:213-222; discussion 222-214.
- Hutchins JB, Barger SW (1998). Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anat Rec*, 253:79-90.
- Hwang SK, Piao L, Lim HT, Minai-Tehrani A, Yu KN, Ha YC, Chae CH, Lee KH, Beck GR, Park J, Cho MH (2010a). Suppression of lung tumorigenesis by leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1. *PLoS One*, 5.
- Hwang SK, Piao L, Lim HT, Minai-Tehrani A, Yu KN, Ha YC, Chae CH, Lee KH, Beck GR, Park J, Cho MH (2010b). Suppression of lung tumorigenesis by leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1. *PLoS One*, 5:e12535.
- Jain VK, Magrath IT (1991). A chemiluminescent assay for quantitation of beta-galactosidase in the femtogram range: application to quantitation of beta-galactosidase in lacZ-transfected cells. *Anal Biochem*, 199:119-124.

- Jezek P, Mahdi F, Garlid KD (1990). Reconstitution of the beef heart and rat liver mitochondrial K⁺/H⁺ (Na⁺/H⁺) antiporter. Quantitation of K⁺ transport with the novel fluorescent probe, PBFI. *J Biol Chem*, 265:10522-10526.
- Jiang D, Zhao L, Clapham DE (2009). Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Science*, 326:144-147.
- Karbowski M, Youle RJ (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ*, 10:870-880.
- Kaufmann SH, Earnshaw WC (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*, 256:42-49.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26:239-257.
- Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh JM, An CS, Choi JY, Cheng SL (2003). Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*, 278:21920-21929.
- Kuum M, Veksler V, Liiv J, Ventura-Clapier R, Kaasik A (2012). Endoplasmic reticulum potassium-hydrogen exchanger and small conductance calcium-activated potassium channel activities are essential for ER calcium uptake in neurons and cardiomyocytes. *J Cell Sci*, 125:625-633.
- Leist M, Jaattela M (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:589-598.
- Li XQ, Hegazy MG, Mahdi F, Jezek P, Lane RD, Garlid KD (1990). Purification of a reconstitutively active K⁺/H⁺ antiporter from rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 265:15316-15322.
- Lockshin RA, Zakeri Z (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:545-550.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94:481-490.
- Maas NM, Van Buggenhout G, Hannes F, Thienpont B, Sanlaville D, Kok K, Midro A, Andrieux J, Anderlid BM, Schoumans J, Hordijk R, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR (2008). Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high resolution array comparative genome hybridisation (CGH). *J Med Genet*, 45:71-80.
- McQuibban AG, Joza N, Megighian A, Scorzeto M, Zanini D, Reipert S, Richter C, Schweyen RJ, Nowikovsky K (2010). A Drosophila mutant of LETM1, a candidate gene for seizures in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Hum Mol Genet*, 19:987-1000.
- Meier P, Finch A, Evan G (2000). Apoptosis in development. *Nature*, 407:796-801.
- Mifflin TE, Bowden J, Lovell MA, Bruns DE, Hayden FG, Groschel DH, Savory J (1987). Comparison of radioactive (³²P and ³⁵S) and biotinylated probes for detection of cytomegalovirus DNA. *Clin Biochem*, 20:231-235.
- Naismith JH, Sprang SR (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci*, 23:74-79.

- Nowikovsky K, Froschauer EM, Zsurka G, Samaj J, Reipert S, Kolisek M, Wiesenberger G, Schweyen RJ (2004). The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem*, 279:30307-30315.
- Nowikovsky K, Pozzan T, Rizzuto R, Scorrano L, Bernardi P (2012). Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the pathophysiology of LETM1. *J Gen Physiol*, 139:445-454.
- Nowikovsky K, Reipert S, Devenish RJ, Schweyen RJ (2007). Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ*, 14:1647-1656.
- O-Uchi J, Pan S, Sheu SS (2012). Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: molecular identities of mitochondrial Ca²⁺ influx mechanism: updated passwords for accessing mitochondrial Ca²⁺-linked health and disease. *J Gen Physiol*, 139:435-443.
- Piao L, Li Y, Kim SJ, Byun HS, Huang SM, Hwang SK, Yang KJ, Park KA, Won M, Hong J, Hur GM, Seok JH, Shong M, Cho MH, Brazil DP, Hemmings BA, Park J (2009a). Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death. *Cancer Res*, 69:3397-3404.
- Piao L, Li Y, Kim SJ, Sohn KC, Yang KJ, Park KA, Byun HS, Won M, Hong J, Hur GM, Seok JH, Shong M, Sack R, Brazil DP, Hemmings BA, Park J (2009b). Regulation of OPA1-mediated mitochondrial fusion by leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein-1 plays a role in apoptosis. *Cell Signal*, 21:767-777.
- Rasola A, Bernardi P (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*, 12:815-833.
- Rathmell JC, Thompson CB (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, 109 Suppl:S97-107.
- Rauch A, Schellmoser S, Kraus C, Dorr HG, Trautmann U, Altherr MR, Pfeiffer RA, Reis A (2001). First known microdeletion within the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region refines genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet*, 99:338-342.
- Richardson H, Kumar S (2002). Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *J Immunol Methods*, 265:21-38.
- Saraste A, Pulkki K (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, 45:528-537.
- Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH (2001). Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem*, 2:20-29.
- Schlickum S, Moghekar A, Simpson JC, Steglich C, O'Brien RJ, Winterpacht A, Endeley SU (2004). LETM1, a gene deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome, encodes an evolutionarily conserved mitochondrial protein. *Genomics*, 83:254-261.

- Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*, 2:55-67.
- Shin JY, Chung YS, Kang B, Jiang HL, Yu DY, Han K, Chae C, Moon JH, Jang G, Cho MH (2013). Co-delivery of LETM1 and CTMP synergistically inhibits tumor growth in H-ras12V liver cancer model mice. *Cancer Gene Ther*, 20:186-194.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, 144:281-292.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150:76-85.
- Szabadkai G, Duchon MR (2008). Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling. *Physiology (Bethesda)*, 23:84-94.
- Tamai S, Iida H, Yokota S, Sayano T, Kiguchiya S, Ishihara N, Hayashi J, Mihara K, Oka T (2008). Characterization of the mitochondrial protein LETM1, which maintains the mitochondrial tubular shapes and interacts with the AAA-ATPase BCS1L. *J Cell Sci*, 121:2588-2600.
- Tang X, Nakata Y, Li HO, Zhang M, Gao H, Fujita A, Sakatsume O, Ohta T, Yokoyama K (1994). The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res*, 22:2857-2858.
- Vasington FD, Murphy JV (1962). Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J Biol Chem*, 237:2670-2677.
- Waldeck-Weiermair M, Jean-Quartier C, Rost R, Khan MJ, Vishnu N, Bondarenko AI, Imamura H, Malli R, Graier WF (2011). Leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1 (Letm1) and uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2/3) contribute to two distinct mitochondrial Ca²⁺ uptake pathways. *J Biol Chem*, 286:28444-28455.
- Wallace DC (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 39:359-407.
- Wang X (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15:2922-2933.
- Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 175:231-237.
- Williams TM, Burlein JE, Ogden S, Kricka LJ, Kant JA (1989). Advantages of firefly luciferase as a reporter gene: application to the interleukin-2 gene promoter. *Anal Biochem*, 176:28-32.
- Wu S, Zhou F, Zhang Z, Xing D (2011). Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. *FEBS J*, 278:941-954.
- Yaffe MP (1999). Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol*, 1:E149-150.

Zollino M, Lecce R, Fischetto R, Murdolo M, Faravelli F, Selicorni A, Butte C, Memo L, Capovilla G, Neri G (2003). Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. *Am J Hum Genet*, 72:590-597.

ÖZGEÇMİŞ

Serdar FINDIK 04.04.1987 tarihinde Bayrampaşa/İSTANBUL'da doğdu. İlköğrenimini Hacılbey İlköğretim Okulunda, lise eğitimini Tuğlacılar Lisesinde Merkez/TEKİRDAĞ'da tamamladı. Lisans eğitimini Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde 2010 yılında tamamladı. 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresinde “Türk meme kanseri hastalarında glukokortikoid resöptör gen polimorfizmlerinin araştırılması” başlıklı poster sunumunu gerçekleştirdi. 2010 yılından günümüze Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.