



**LETMİ BASKILANAN FARE  
EMBRİYONİK FİBROBLAST  
HÜCRELERİNDE OKSİDATİF  
FOSFORİLASYON  
KOMPLEKSLERİNİN BN-PAGE  
YÖNTEMİ İLE  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Şeyma DEMİRKESEN**

**Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Cenk ARAL**

**2017**

**T. C.**  
**NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**LETM1 BASKILANAN FARE EMBRİYONİK FİBROBLAST HÜCRELERİNDE  
OKSİDATİF FOSFORİLASYON KOMPLEKSLERİNİN BN-PAGE YÖNTEMİ İLE  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Şeyma DEMİRKESEN**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. CENK ARAL**

**TEKİRDAĞ-2017**

**Her hakkı saklıdır**



Bu tez TÜBİTAK tarafından 115S455 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Cenk ARAL danışmanlığında, Şeyma DEMİRKESEN tarafından hazırlanan “Letm1 Baskılanan Fare Embriyonik Fibroblast Hücrelerinde Oksidatif Fosforilasyon Komplekslerinin BN-PAGE Yöntemi İle Değerlendirilmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Yrd. Doç. Dr. Can ERZİK

*İmza :*

Üye : Doç. Dr. Cenk ARAL

*İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

*İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### LETM1 BASKILANAN FARE EMBRİYONİK FİBROBLAST HÜCRELERİNDE OKSİDATİF FOSFORİLASYON KOMPLEKSLERİNİN BN-PAGE YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

**Şeyma DEMİRKESEN**

Namık Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Cenk ARAL

İç mitokondri membranında gerçekleşen iyon ve elektron transportu, ATP sentezi, mitokondriyal membran potansiyeli ve buna benzer birçok biyolojik süreçte rolü olduğu düşünülen Letm1 proteini, 83,5 kDa moleküler ağırlığa sahip olup, mitokondri iç membranında yer almaktadır. Mitokondri iç membranı iyon transportunda rol oynayan proteinlerle birlikte, ATP sentezinde rol oynayan OXPHOS kompleks proteinlerini de içermektedir. Bir bütün olarak bakıldığında iç membran boyunca meydana gelen iyon alış-verişi ve OXPHOS protein komplekslerinin ATP üretimi olayları birbiri ile ilgilidir. Literatürde Letm1 proteininin kompleks yapılar üzerindeki etkisinin, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ve değişimleri ile karakterize olan kanser hücre hatlarında gerçekleştirildiği az sayıda çalışma vardır. Ancak elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Bu çalışmanın amacı ise immortalize fare embriyonik fibroblast hücreleri (MEF) kullanılarak, *LETM1* ifadesi baskılandığında OXPHOS kompleks proteinlerinin ifadelerindeki değişimin analiz edilmesidir. Bu amaçla *LETM1* ifadesi baskılandığında, OXPHOS kompleks protein ifadelerindeki değişim SDS-PAGE ve BN-PAGE teknikleri kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda kullanılan iki farklı teknik sonucunda MEF hücrelerinde kompleks I, III ve IV'ün protein ifadelerinde anlamlı bir değişikliğin olmadığı gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Letm1, BN-PAGE, SDS-PAGE, OXPHOS

2017, 52 sayfa

## **ABSTRACT**

MSc Thesis

### **EVALUATION OF THE MITOCHONDRIAL OXIDATIVE PHOSPHORYLATION COMPLEXES USING BN-PAGE TECHNIQUE ON LETM1 SILENCED MOUSE EMBRYONIC FIBROBLAST CELLS**

**Şeyma DEMİRKESEN**

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cenk ARAL

Letm1 protein which is thought to have a role on in many biological processes such as ion and electron transport, ATP synthesis, and mitochondrial membrane potential, has a molecular weight of 83,5 kDa and is located inside the mitochondrial inner membrane. The mitochondrial inner membrane contains proteins that play a role in the ATP synthesis, as well as proteins that play a role in ion transport. Taken as a whole, ion transport through the inner membrane and ATP synthesis from OXPHOS complexes, are related to each other. There are few studies in the literature where the effect of the Letm1 protein on complex structures is carried out in cancer cell lines characterized by mitochondrial dysfunctions and alterations. But the results are contradictory. The aim of this study is to analyze the expression of OXPHOS complex proteins by immortalized mouse embryonic fibroblast cells (MEF) when LETM1 expression is suppressed. For this purpose, the expression level of OXPHOS complex proteins were analyzed using SDS-PAGE and BN-PAGE techniques after LETM1 suppression. As a result of this study, it has been shown that there is no significant change in level of complexes I, III and IV when used two different techniques in MEF cells.

**Keywords:** Letm1, BN-PAGE, SDS-PAGE, OXPHOS

**2017, 52 pages**

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iii
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	v
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	vi
<b>KISALTMALAR</b> .....	viii
<b>ÖNSÖZ</b> .....	x
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	4
2.1 Mitokondri .....	4
2.1.1 Mitokondri hakkında genel bilgiler .....	4
2.1.2 Mitokondriyal membran ve membran komponentlerinin yapı ve özellikleri .....	6
2.2 Oksidatif Fosforilasyon Zinciri Kompleks Proteinleri .....	7
2.2.1 Kompleks I.....	8
2.2.2 Kompleks III.....	10
2.2.3 Kompleks IV.....	11
2.3 LETM1 Geni ve Proteini .....	13
2.4 BN-PAGE.....	18
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	22
3.1 Materyal.....	22
3.1.1 Kullanılan cihazlar.....	22
3.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler .....	23
3.1.3 Kullanılan siRNA ve antikolar .....	25
3.1.4 Kullanılan kitler, tamponlar ve çözeltiler .....	25
3.1.5 Kullanılan bilgisayar programları.....	28
3.2 Yöntemler .....	28
3.2.1 Hücre kültürü .....	28
3.2.2 Letm1 gen ekspresyonunun baskılanması .....	28

3.2.3 Mitokondri izolasyonu.....	29
3.2.4 Protein miktar tayini .....	29
3.2.5 SDS-poliakrilamid jel elektroforezi.....	29
3.2.6 Blue native poliakrilamid jel elektroforezi (BN-PAGE) .....	30
3.2.7 İmmünblot yöntemi .....	30
3.2.8 İstatistiksel analizler .....	31
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>32</b>
4.1 Bradford Yöntemi Kullanılarak BSA Standart Eğri Grafiğinin Oluşturulması.....	32
4.2 MEF Hücrelerinde <i>LETM1</i> İfadesinin Baskılanması ve Mitokondriyal Protein İzolasyonu.....	33
4.3 LETM1 İfadesi Baskılanan Hücrelerde ve Kontrol Grubunda DDM ve Digitonin Kullanılarak Protein/Deterjan Oranının Optimizasyonu .....	34
4.3.1 DDM tayini.....	34
4.3.2 Digitonin tayini .....	35
4.4 Farklı Konsantrasyonlarda Protein Bant Kalınlıklarının Analizi .....	36
4.5 Letm1 İfadesinin Baskılanmasının Solunum Zinciri Kompleks Proteinleri Üzerindeki Etkisinin Analiz Edilmesi.....	39
4.5.1 BN-PAGE yöntemi ile kompleks proteinlerin analizi .....	39
4.5.2 SDS-PAGE yöntemi ile kompleks proteinlerin ifadelerini değerlendirilmesi .....	40
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>42</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>46</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>51</b>

## ÇİZELGE DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1: Deterjan tipleri ve miktarlarının gösterilmesi (Krause 2006) .....	21
Çizelge 4.1: BSA standartlarının konsantrasyon ve absorbans değerlerinin gösterilmesi .....	32
Çizelge 4.2: Mitokondriyal proteinlerin ortalama konsantrasyon değerleri.....	33



## ŞEKİL DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1.1 : Elektrokimyasal potansiyel oluşumunun gösterilmesi (Alberts ve ark. 2015) .....	1
Şekil 2.1 : İlk mitokondri elektron mikroskobu görüntüsü (Sjostrand 1953, Palade 1961).....	4
Şekil 2.2 : Mitokondriyal genom yapısı (Taanman 1999).....	5
Şekil 2.3 : Mitokondri membran yapısının gösterilmesi. IBM: iç membranın dış membrana yakın kısmı (Alberts ve ark. 2015).....	7
Şekil 2.4 : Solunum zinciri kompleks proteinleri I, II, III, IV ve V'in membran lokalizasyonu ve işlevi (Lichter 2015).....	8
Şekil 2.5 : Kompleks I proteinin krista membranındaki yerleşiminin gösterilmesi (Alberts ve ark. 2015) .....	10
Şekil 2.6 : Kompleks III proteininin yapısının gösterilmesi (Alberts ve ark. 2015) .....	11
Şekil 2.7 : Kompleks IV proteininin krista membranındaki yerleşiminin gösterilmesi (Alberts ve ark. 2015) .....	12
Şekil 2.8 : Letm1'in korunmuş organizasyonu ve mitokondri iç membranındaki lokalizasyonu. NTD: Amino terminal domen, TM: transmembran domen, CTD: karboksil domen (Shao ve ark. 2016) .....	13
Şekil 2.9 : Mitokondriyal hacim dengesinin nigerisin ile dengelenmesi (Dimmer ve ark. 2008) .....	15
Şekil 2.10:BN-PAGE tekniği kullanılarak membrana bağlı kompleks proteinlerin ayrımının gösterilmesi (Eubel ve ark. 2005) .....	19
Şekil 4.1 : Farklı BSA konsantrasyonları kullanılarak çizilen standart eğri grafiği.....	32
Şekil 4.2 : Letm1 ifade düzeyinin siRNA transfeksiyonu sonrası MEF hücrelerinde belirlenmesi.....	34
Şekil 4.3 : Protein miktarı/DDM oranının belirlenmesi. K: Kontrol, S: Letm1 RNAi .....	35
Şekil 4.4 : Digitonin miktarının belirlenmesi .....	35
Şekil 4.5 : Protein/Digitonin oranının belirlenmesi. 1, 3, 5, 7 kontrol, 2, 4, 6, 8 Letm1 RNAi	36
Şekil 4.6 : Farklı protein konsantrasyonu bant kalınlıklarının SDS-PAGE ile analizi .....	36
Şekil 4.7 : Protein bant kalınlıklarının image J programı ile elde edilen analiz sonuçları .....	37
Şekil 4.8 : Farklı protein konsantrasyon değerlerinde kontrol hücrelerinin BN-PAGE tekniği ile analiz edilmesi.....	38
Şekil 4.9 : Protein bant kalınlıklarının image j programı ile analiz sonuçları .....	38
Şekil 4.10:Kompleks protein ifadelerinin BN-PAGE tekniği ile analizi .....	39

Şekil 4.11:BN-PAGE yöntemi sonrası kompleks protein ifadelerinin image j programı kullanılarak analiz edilmesi .....	40
Şekil 4.12:Kompleks protein alt birimlerinin ifadelerindeki değişimin SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmesi .....	41
Şekil 4.13:SDS-PAGE yöntemi sonrası kompleks protein alt birim ifadelerinin image j programı kullanılarak analiz edilmesi.....	41



## KISALTMALAR

ADP	: Adenozin Difosfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
bç	: Baz Çifti
BN-PAGE	: Blue-nativ Poliakrilamid Jel Elektrofözezi
BSA	: Sığır Serum Albümin
Ca <sup>+2</sup>	: Kalsiyum İyonu
CBB	: Coomassie Brilliant Boyası
CTD	: Karboksi Domen
cyt b	: Sitokrom b
cyt c	: Sitokrom c
DDM	: N-dodesil-β-D-maltoz
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNaz	: DNA Nükleaz
DPBS	: Dulbecco'nun Fosfat Tamponu
EGTA	: Etilen Glikol Bistetraasetik Asit
FBS	: Fetal Sığır Serumu
Fe-S	: Demir-Sülfür Ünitesi
FMN	: Flavin Mononükleotid
H <sup>+</sup>	: Hidrojen İyonu
HCL	: Hidroklorik Asit
HRP	: Horse Radish Peroksidaz
IBc	: Mitokondri İzolasyon Tamponu
ISP	: Demir-Sülfür proteini
K <sup>+</sup>	: Potasyum İyonu
kb	: Kilo Baz
LETM1	: Leucine Zipper and EF-Hand Containing Transmembrane Protein 1
mDa	: Mega Dalton
MEF	: Fare Embriyonik Fibroblast Hücresi
MOPS	: Morfolino Propan Sülfonik Asit
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
NaHCO <sub>3</sub>	: Sodyum Bikarbonat

NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NEAA	: Esansiyel Olmayan Aminoasit Karışımı
NTD	: Amino Terminal Domen
OXPPOS	: Oksidatif Fosforilasyon
P <sub>i</sub>	: İnorganik Fosfat
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
PVDF	: Poly Vinylidene Difluoride
QH <sub>2</sub>	: Ubikinon
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: RNA Nükleaz
rRNA	: Ribozomal RNA
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
siRNA	: Small İnterfering RNA
TBS	: Tris Tuz Tamponu
TBS-T	: Tween-20 içeren Tris Tuz Tamponu
TCA	: Trikarboksilik Asit
TG	: Tris-Glisin
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleoik Asit
WHS	: Wolf-Hirschhorn Sendromu
WHSCR	: Wolf-Hirshhorn Kritik bölgesi
WHSCR2	: 2. Wolf-Hirshhorn Kritik bölgesi
ΔP	: Membran Potansiyeli

## ÖNSÖZ

Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji bölümünde yürüttüğüm tez çalışmam boyunca derin bilgilerini bana aktaran, her konuda yardımını ve desteğini esirgemeyen çok kıymetli hocam sayın Doç. Dr. Cenk ARAL başta olmak üzere, tez çalışmam boyunca her konuda desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Naciye Gülkız ŞENLER, Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN, Doç. Dr. Rıfat BİRCAN'a ve bölümümdeki çok kıymetli bütün hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca her anlamda desteğini ve yardımını esirgemeyen, başta çok kıymetli ailem olmak üzere, çok sevdiğim arkadaşlarım Ezgi Melek KERMAN ve Halime İLHAN'a ve her anlamda sabrını ve sevgisini esirgemeyen sevgili eşim Ersen DEMİRKESEN'e en içten sevgilerimi sunarım.

Gerçekleştirmiş olduğum yüksek lisans tez çalışması TÜBİTAK tarafından 115S455 numaralı proje ile desteklenmiştir. Çalışmanın tamamlanabilmesi için sağladığı finansal destek ve burs imkanı için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

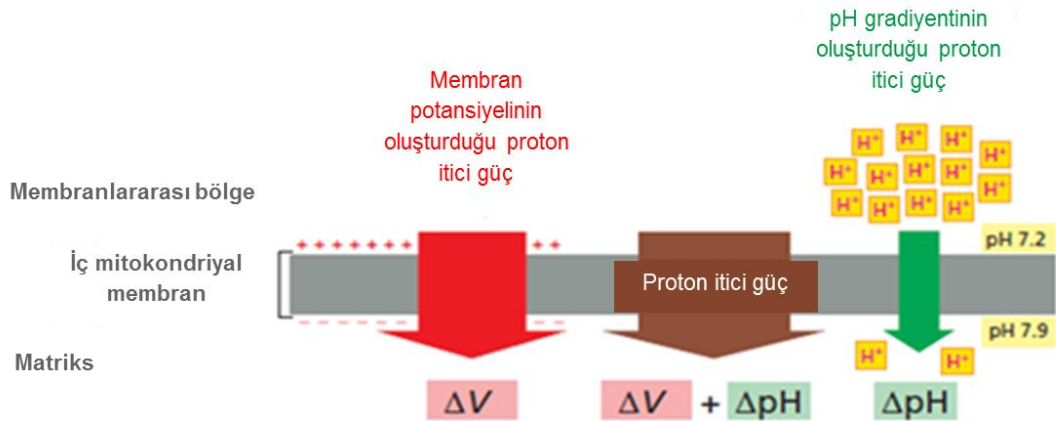
Aralık, 2017

Şeyma DEMİRKESEN

## 1. GİRİŞ

Sitoplazma içerisinde yer alan organellerden biri olan mitokondriler, hücre içerisinde bulunan ve yaşamsal fonksiyonları yerine getiren basit organizmalar olarak tanımlanmalarından sonra Yunanca mitos (iplik) ve chondros (granül) tanımından yola çıkılarak mitokondri olarak adlandırılmıştır (Altmann 1890, Benda 1898). Mitokondrilerin oksidatif fosforilasyon tepkimeleri, Krebs döngüsü, yağ asitlerinin  $\beta$  oksidasyonu gibi metabolik ve biyoenerjetik reaksiyonlarda rol oynadıkları anlaşıldıktan sonra, yapılarına dair araştırmalar hız kazanmıştır (Ernster ve Schatz 1981). Mitokondriler iç ve dış membran olmak üzere başlıca iki membran yapısına sahiptir. İç membranın matrikse doğru kıvrılan kısmı krista membranı olarak adlandırılmakta iken, iç membrandan farklı olarak bazı kompleks proteinlerini içermektedir (Palade 1953, Sjostrand 1953).

Mitokondriyal enerji üretimi, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) kompleksleri üzerinde gerçekleşen elektron transferi ve protonların iç membran boyunca dışarı ve içeri translokasyonu ile gerçekleşmektedir. Farklı biyokimyasal yollardan elde edilen yüksek enerjili elektronlar OXPHOS zinciri kompleks proteinleri ile solunum zinciri boyunca aktararak, moleküler oksijenin suya indirgenmesi sağlanmaktadır. Bu süreçte açığa çıkan enerji matriksten membranlar arası boşluğa protonların pompalanmasını sağlamak ve böylece membran boyunca proton gradiyenti oluşturulmaktadır. Bunun sonucunda oluşan membran potansiyeli ve pH farkı proton itici gücü oluşturmakta ve bu güç ATP sentezi, iyon transportu, mitokondriyal proteinlerin translokasyonu gibi süreçlerde rol oynamaktadır (Şekil 1.1) (Mitchell 1966, Hatefi 1985).



Şekil 1.1. Elektrokimyasal potansiyel oluşumunun gösterilmesi (Alberts ve ark. 2015)

Bir bütün olarak oksidasyon ve ADP'nin fosforilasyonu ile ATP sentezi oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır. OXPHOS kompleks yapıları, NADH oksidoredüktaz (kompleks I), süksinat oksidoredüktaz (kompleks II), ubikinol-sitokrom c redüktaz (kompleks III), sitokrom c oksidaz (kompleks IV), ve ATP sentaz (kompleks V) olmak üzere beş farklı protein kompleksinden oluşmaktadır (Sazanov 2015). Mitokondri dinamik bir yapıya sahiptir. Krista membranında OXPHOS kompleksleri haricinde  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  gibi iyonların geçişini sağlayan iyon kanalları ve farklı işlevlere sahip birçok protein yer almaktadır. Krista membranında gerçekleşen elektron transportu ve ATP sentezi olaylarının yanı sıra, mitokondri membran potansiyelinin korunmasında birden fazla faktör rol oynamaktadır. Bunlardan birisinin de *LETM1* tarafından kodlanan Letm1 proteini olduğu düşünülmektedir (Nowikovsky ve ark. 2004).

Letm1 aşağı ökaryotlarda, hayvanlarda ve bitkilerde yüksek oranda korunmuş bir proteindir. Mitokondri iç membranında yer alan Letm1 proteininin hidrofobik olan amino terminal kısmı iç membranda lokalize olurken, hidrofilik karboksil ucu ise matrikste bulunmaktadır (Nowikovsky ve Bernardi 2014). İlk olarak Wolf-Hirschhorn sendromunda (WHS) tanımlanan LETM1 geninin delesyonu, WHS sendromuna neden olmakta ve hastalarda mikrosefali, mental yetersizlik, konuşma problemleri ve epileptik nöbetlerin ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (Dimmer ve ark. 2008).

Letm1 proteininin fonksiyonu ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen, yapılan çalışmalar birbirleri ile çelişkilidir. Letm1'in  $K^+/H^+$  antiportu olduğu ile ilgili çalışmalar olup, Letm1 ifadesi baskılandığında HeLa hücrelerinde mitokondriyal hacim dengesinin bozulduğu ve bunun bir iyonofor olan nigerisin ile normale döndürüldüğü gösterilmiştir (Dimmer ve ark. 2008, Nowikovsky ve ark. 2009). Aynı zamanda Letm1'in  $Ca^{+2}/H^+$  değişiminde de rolünün olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Jiang ve ark. 2009, Tsai ve ark. 2014, Shao ve ark. 2016). Yapılan bu çalışmalar kapsamında Letm1 fonksiyonuna dair kesin bir bilginin bulunmamasına rağmen, Letm1 ifadesi baskılanan HeLa hücrelerinde mitokondri krista sayının azaldığı kesin olarak bilinmektedir. Krista membranında aynı zamanda enerji üretiminde rol oynayan OXPHOS kompleksleri de yer almaktadır. Bu nedenle Letm1 ifadesi baskılandığında, OXPHOS kompleks proteinlerinin durumunda herhangi bir değişikliğin olup olmadığı araştırıldığında, kompleks I, III ve IV'ün ifadesinde herhangi bir değişikliğin olmadığı gözlemlenmiştir (Dimmer ve ark. 2008). Ancak farklı bir grup tarafından Letm1 ifadesi baskılanan HeLa hücrelerinde kompleks proteinlerinden olan I ve IV ün neredeyse

oluşmadığı, kompleks III'ün ise ifadesinde azalmanın olduğu belirtilmiştir (Tamai ve ark. 2008).

Bu çalışmalar sonrasında elde edilen sonuçların tutarlılık göstermeyip, çalışmaların mitokondriyal fonksiyon bozuklukları veya değişimleri ile karakterize kanser hücre hatlarında gerçekleştirilmiş olması ve çalışma sayısının sınırlı sayıda olması dikkati çekmektedir. Bu tez kapsamında immortalize fare embriyonik fibroblast hücrelerinde LETM1 ifadesi baskılanarak OXPHOS kompleks proteinlerinin ifadelerindeki değişimin analiz edilmesi hedeflenmiştir.

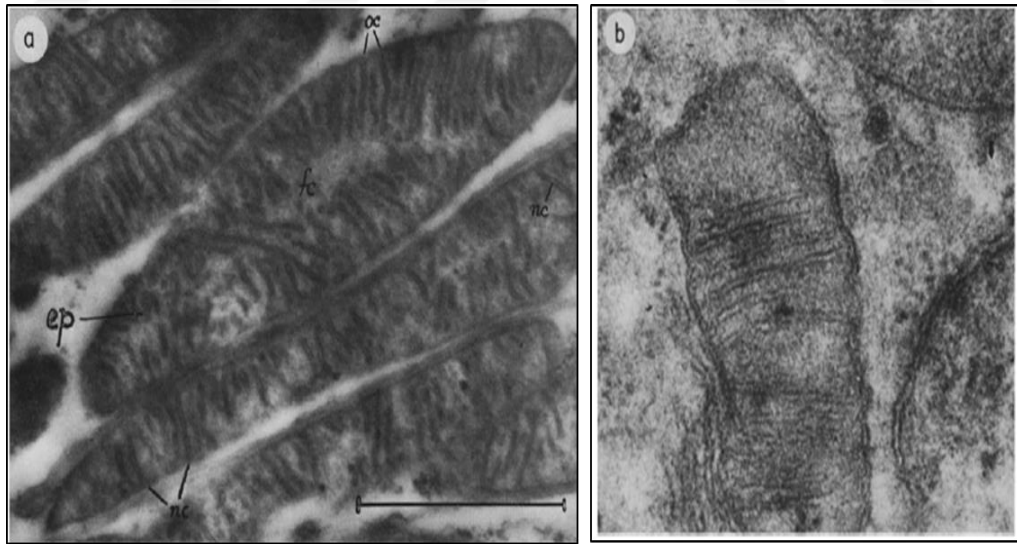


## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Mitokondri

#### 2.1.1 Mitokondri hakkında genel bilgiler

Sitoplazma içerisinde yer alan organellerden biri olan mitokondri, ilk olarak 1857 yılında Rudolph Albert von Kölliker tarafından kas hücrelerinde görülen granüller olarak tanımlanmıştır (Fye 1999). Altmann (1890), bu yapıları bioblast olarak adlandırmış ve bu yapıların hücre içerisinde oldukça yaygın bulunduğunu ve aynı zamanda hücre içerisinde yaşayan ilk organizmalar olduğunu belirtmiştir. Altmann'ın bu fikri, aradan geçen uzun zaman sonunda bakteriler ve mitokondriler arasındaki benzerlikten dolayı, mitokondrilerin aslında simbiyotik yaşamın ilk örneklerinden olup olmadığı sorusunun tartışılmasıyla dikkat çekmiştir (Altmann 1890). Mitokondri adlandırılması ilk olarak 1898 yılında Benda tarafından yapılmış, yunanca mitos (iplik) ve chondros (granül) kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur (Benda 1898). 1900'lü yılların ortalarına kadar mitokondriyal fonksiyon ve yapı üzerine farklı araştırmacılar tarafından deneyler yapılmış, ilk olarak 1945 yılında mitokondri elektron mikroskobu görüntüsü alınmıştır (Claude ve Fullam 1945). Şekil 2.1 de ilk mitokondri elektron mikroskobu görüntüsü yer almaktadır.

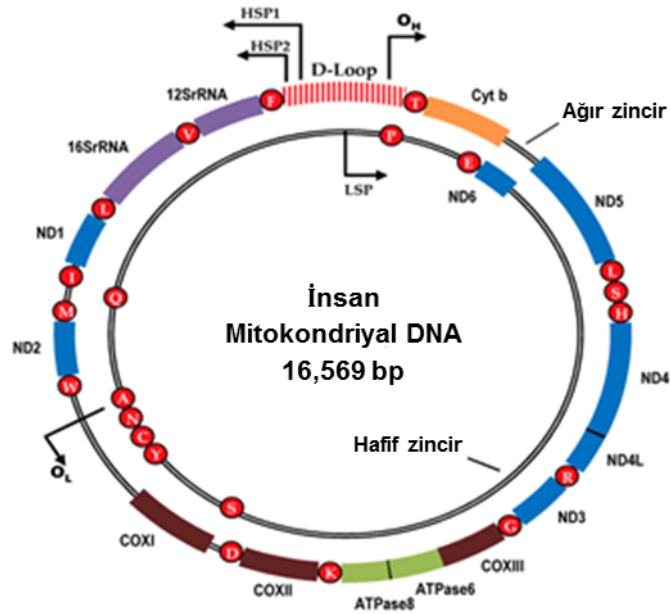


Şekil 2.1. İlk mitokondri elektron mikroskobu görüntüsü (Sjostrand 1953, Palade 1961)

Yüksek çözünürlüklü detaylı mitokondri görüntülemesi, 1950'li yılların başında ince kesit alınarak yapılan görüntüleme tekniğinin bulunması ile Palade ve Sjöstrand tarafından gerçekleştirilmiştir (Sjostrand 1953, Palade 1961). Alınan görüntüler sonunda mitokondrilerin iç

ve dış olmak üzere iki farklı membran yapısına sahip olduğu belirlenmiş ve bu bölgeler arasındaki kısım membranlar arası bölge olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda iç membranın çevrelediği bölge matriks ve iç membranın matrikse doğru kıvrılan kısımları ise krista membranı olarak adlandırılmaktadır.

Mitokondriler iki farklı membran yapısından oluşmanın yanı sıra aynı zamanda nükleer genomdan ayrı olmak üzere kendi genetik materyalini de (mitokondriyal DNA, (mtDNA)) içermektedir. Ökaryotlarda mitokondri matriksinde yer alan mtDNA halkasal şekilde çift zincirli yapıya sahip olup, yaklaşık 16,6 kb çiftinden oluşmaktadır (Anderson ve ark. 1981). İnsan mtDNA'sı 37 gen bölgesi içerir ve kodlanan 13 farklı proteinin hepsi mitokondriyal solunum zincirinde görevli kompleks proteinlerle ilişkilidir (Wolstenholme 1992). Buna ek olarak iki rRNA (16s ve 12s) ve 22 tRNA molekülü mtDNA tarafından kodlanmaktadır. mtDNA yapısı enerjinin korunumunun sağlanması için, oldukça farklı organizasyona sahiptir. Gen yapısında intron bölgeleri yer almazken, hem rRNA hem de tRNA molekülü alışılmadık derecede küçüktür. Ayrıca genler arasında boşluklar ya yoktur ya da birkaç bazdan oluşmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar mtDNA'nın bilinenden daha fazla gen içeriğine sahip olduğunu ve bu genlerin küçük polipeptidleri ve mikro RNA'lar gibi bazı RNA'ları kodladığını göstermiştir. Ancak bu genlerin ve ürünlerinin fonksiyonlarına ilişkin bilgiler sınırlıdır. Şekil 2.2 de mtDNA yapısı gösterilmektedir.



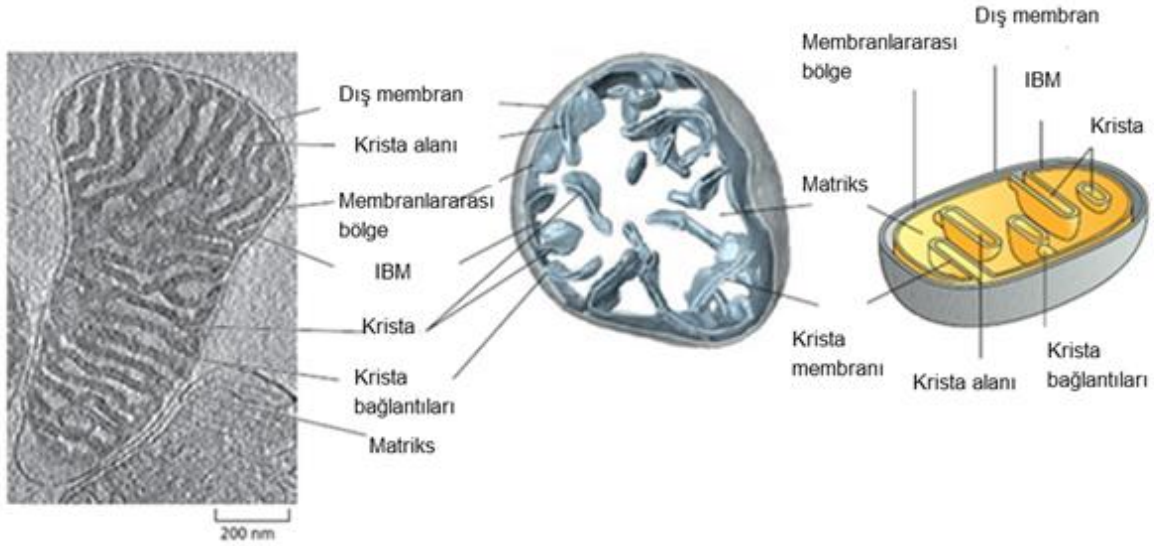
Şekil 2.2. Mitokondriyal genom yapısı (Taanman 1999)

## 2.1.2 Mitokondriyal membran ve membran komponentlerinin yapı ve özellikleri

Mitokondriler hücre sel faaliyetlerin devam edebilmesi için gerekli olan yaşamsal işlemlerin çoğunda görev alırlar ve bu gibi süreçlerin kontrolünden sorumlu iç ve dış olmak üzere iki farklı membran yapısından oluşmaktadır. Mitokondri membranı yapısal olarak da diğer membranlardan ayrılmaktadır. Mitokondriyal membranlar plazma membranına kıyasla çok az miktarda kolestrol içerir. İç mitokondri membranı ise ökaryotik hücre membranında bulunmayan kardiolipin içerir. Kardiolipinin solunum zinciri kompleks yapıları için önemli olduğu bilinmektedir. Dış mitokondri membranı porinler aracılığı ile iyonlara ve küçük yüksüz moleküllere karşı geçirgen özelliktedir (Bayrhuber ve ark. 2008). Bu yapılar aynı zamanda voltaj bağımlı anyon kanalları olarak da adlandırılmaktadır. Proteinler gibi büyük moleküllerin membrandan geçişi özel translokazlar aracılığı ile sağlanmaktadır. Çünkü dış membranın sahip olduğu porlu yapı membran potansiyelinin oluşmasına engel olmaktadır. Bilinen dış membran proteinlerinin tamamı nükleus tarafından kodlanıp, sitozolde ribozomlar tarafından sentezlenmektedir.

Dış membranın aksine iç membran oldukça kuvvetli bir bariyer görevi görür ve bütün iyon ve moleküllere karşı geçirgen değildir. İç membranda iyonların geçişi membran transport protein sistemleri yardımı ile gerçekleşmektedir. Bu iyon seçiciliği, membran potansiyelinin yaklaşık 180 mV olmasını sağlamaktadır. Mitokondri iç ve dış membranı üç farklı alanın oluşmasına neden olmaktadır. Mitokondri iç membranının çevrelediği en iç kısım, mitokondri matriksi olarak adlandırılmaktadır ve matriks pH'sı 7,9-8 arasında yüksek bir değere sahiptir (Llopis ve ark. 1998). mtDNA tarafından gerçekleştirilen DNA replikasyonu, transkripsiyon, protein sentezi ve çeşitli enzimatik işlemler matrikste gerçekleşmektedir. Aynı zamanda sitrik asit döngüsü enzimleri matrikste yer aldığından, matriks protein yoğunluğu 500 mg/ml olacak şekilde yüksek bir orana sahiptir.

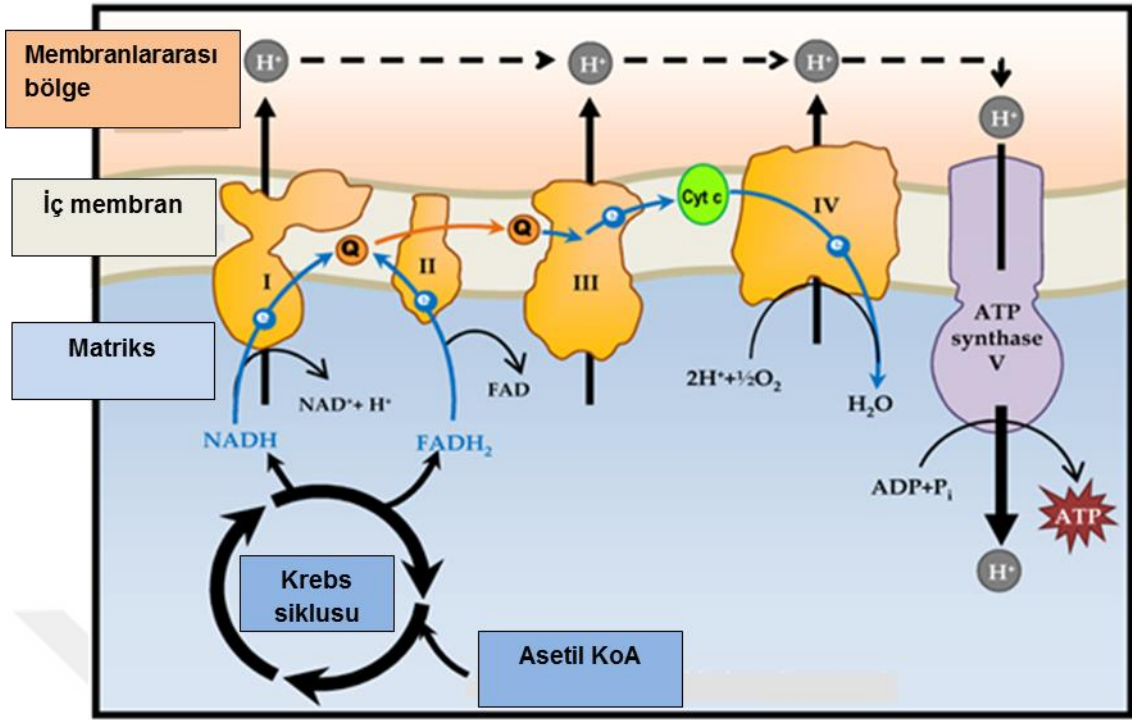
İç membranın invajinasyonu ile oluşan kısım krista membranı olarak adlandırılır. Krista membranı tamamıyla matrikse gömülüdür. Bu kısım oksidatif fosforilasyondan sorumlu olan bütün kompleks yapılarını içermektedir. Krista membranları arasında kalan kısım krista lümeni olarak adlandırılmakta ve küçük elektron taşıyıcı sistem olan sitokrom c burada yer almaktadır. Krista membranı ilk olarak bölüm 2.1.1 de bahsedildiği üzere 1950'li yılların başında ince kesit alınarak yapılan görüntüleme tekniğinin bulunması ile elektron mikroskobu ile ortaya çıkmıştır. Kristalar disk şeklinde lameller gibi tübüler şekilde ya da iç membrana bakan kısımdan matrikse doğru uzantılar şeklinde de olabilmektedir (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Mitokondri membran yapısının gösterilmesi. IBM: iç membranın dış membrana yakın kısmı (Alberts ve ark. 2015)

## 2.2 Oksidatif Fosforilasyon Zinciri Kompleks Proteinleri

Mitokondriler çeşitli fonksiyonlarda rol almanın yanı sıra, ökaryotik hücrelerde enerji metabolizmasının merkezidirler. Bu organeller anabolik yolda gerekli olan öncülerin üretilmesi ve aynı zamanda besinlerdeki enerjiden ATP sentezinin gerçekleşmesi için gerekli olan oksidatif katabolizma basamaklarında da görev alırlar. Mitokondriyal enerji üretimi ve enerjinin tüketimi olayları, bir grup protonik aktivite sonucunda birbirleri ile bağlantılıdır. Solunum zincirinde moleküler oksijenin suya indirgenmesi için respirasyon zinciri substratlarından sağlanan elektron akışı ve buna karşılık protonların hareketi ile ATP sentezi, iyon translokasyonu ve proteinlerin importu gerçekleşir. Oksidatif enerjinin proton itici güç oluşturmak için dönüşmesi ve oluşan protonik güçten ATP sentezi gerçekleşmesi işlemi mitokondri iç membranında yer alan OXPHOS kompleks proteinleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Mitokondri krista membranında lokalize olan OXPHOS sistemi, NADH oksidoredüktaz (Kompleks I), süksinat oksidoredüktaz (kompleks II), ubikinol-sitokrom c redüktaz (Kompleks III), sitokrom c oksidaz (Kompleks IV), ATP sentaz (Kompleks V) kompleksleri ile elektron taşıyıcı sistemler olan sitokrom c ve ubikinondan oluşmaktadır (Acin-Perez ve ark. 2008). Şekil 2.4 de OXPHOS kompleks proteinleri ve ATP sentaz gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Solunum zinciri kompleks proteinleri I, II, III, IV ve V'in membran lokalizasyonu ve işlevi (Lichter 2015)

Mitokondriyal enerji üretimi, OXPHOS komplekslerinin krebs siklusu,  $\beta$ -oksidasyon mekanizması, aminoasit metabolizması ve glikoliz gibi biyokimyasal yollardan elde edilen yüksek enerjili elektronların kullanılarak moleküler oksijenin suya indirgenmesi ile başlamaktadır. Kompleks I, II, III ve IV arasında gerçekleşen elektron transferi sonucunda moleküler oksijenin suya indirgenmesi sağlanmaktadır. Bu süreçte açığa çıkan enerji, protonların matriksten membranlar arası boşluğa pompalanmasını sağlamakta ve membranlar arası bölgede proton gradiyentinin artışına neden olmaktadır. Protonların membranlar arası bölgede yoğunluğunun artışı ile oluşan proton gradiyenti farkı elektrokimyasal potansiyelin oluşmasını sağlar (Mitchell 1966, Hatefi 1985). Oluşan bu potansiyel fark proton itici gücü oluşturup, protonların ATP sentaz aracılığı ile membranlar arası bölgeden matrikse taşınmasını sağlar. Bu mekanizmaya karşılık ADP ve  $P_i$  molekülleri birleşerek ATP sentezlenir. Bir bütün olarak oksidasyon ve ADP'nin fosforilasyonu ile ATP sentezinin gerçekleşmesi oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır.

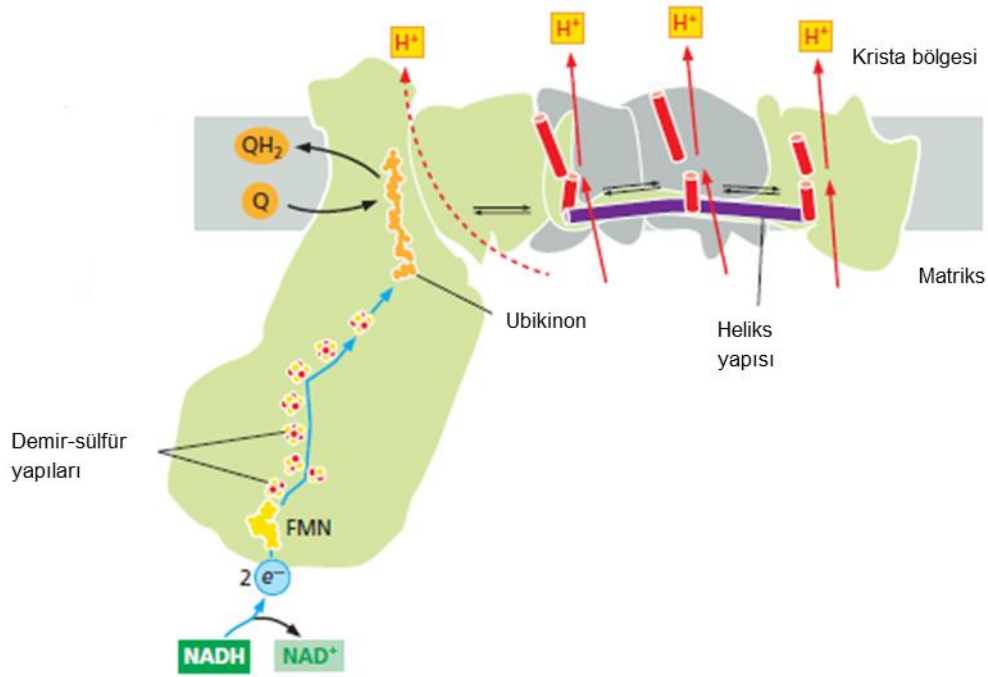
### 2.2.1 Kompleks I

Kompleks I ilk olarak 1962 yılında sığır kalbindeki mitokondrilerden izole edilmiştir (Hatefi ve ark. 1962a). Hatefi ve ark. (1962) daha sonra enzimin üç farklı fonksiyonel

kısımdan oluştuğunu bildirmiş ve bunları flavin mononükleotid (FMN), demir-sülfür ünitesi (Fe-S) ve membrana bağlı olan kısım olarak adlandırmışlardır. Kompleks I, on dört tane merkezi alt birimden oluşmakta ve bu birimler biyoenerjetik fonksiyonlarda rol oynamaktadır. Bu on dört merkezi birimden yedi tanesi hidrofilik, yedi tanesi hidrofobik kısım olup, hidrofobik kısımdaki alt birimler mtDNA tarafından kodlanmaktadır (Wirth ve ark. 2016). Hidrofilik kısımdaki proteinler ise redoks sisteminde aktif şekilde rol oynayıp, FMN ve Fe-S birimlerinden oluşmaktadır. Hidrofobik membran kolu iç mitokondri membranında gömülü olup, hidrofilik periferik kol ise matrikse doğru yer almaktadır. Polipeptid kompleksinin merkezinde yer alan bu proteinler bakterilerden insanlara kadar korunmuş proteinlerdir. Aynı zamanda merkezdeki polipeptidlerin etrafında yer alan 30 ek alt birim daha vardır ve rolleri tam olarak net değildir (Angerer ve ark. 2011).

Yaklaşık 1 mDa moleküler ağırlığa sahip olan kompleks I, solunum zincirindeki en büyük ve ilk kompleks yapısıdır. Mitokondri matriksinde krebs siklusunda üretilen NADH'ın oksidasyonunda rol oynayarak, iki elektronun ubikinon aracılığı ile moleküler oksijene aktarılmasında görev alır. Bu sırada mitokondri matriksinden, membranlar arası bölgeye pompalanan H<sup>+</sup> iyonları ile proton itici güç açığa çıkıp, kompleks V aracılığı ile ATP sentezi gerçekleşmektedir. Bu süreçte 4H<sup>+</sup> membranlar arası bölgeye aktarılırken, 2 e<sup>-</sup> kompleks zinciri aracılığı ile moleküler oksijenin indirgenmesinde rol oynar (Althoff ve ark. 2011). Meydana gelen bu mekanizmanın akışı  $NADH + H^+ + Q + 4H^+ (matriks) \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+ (membranlar\ arası\ bölge)$  şeklinde gösterilmektedir.

Fonksiyon açısından kompleks I üç farklı kısma ayrılmaktadır. Elektron alıcı kısım ya da dehidrogenaz kısmı (N modülü) olarak adlandırılan birinci kısım, NADH'tan elektronların kabulünde rol oynar. Elektron aktarıcı ya da hidrogenaz (Q modülü) kısmı, elektronları ubikinona aktarır. Proton translokasyon (P modülü) kısmı olarak bilinen 3. kısım ise, protonların iç membrandan pompalanmasında görev alır. N ve Q modülleri matriks kolunda yer alırken, P modülü membranda yer almaktadır (Şekil 2.5) (Lazarou ve ark. 2009).



Şekil 2.5. Kompleks I proteininin kristal membranındaki yerleşiminin gösterilmesi (Alberts ve ark. 2015)

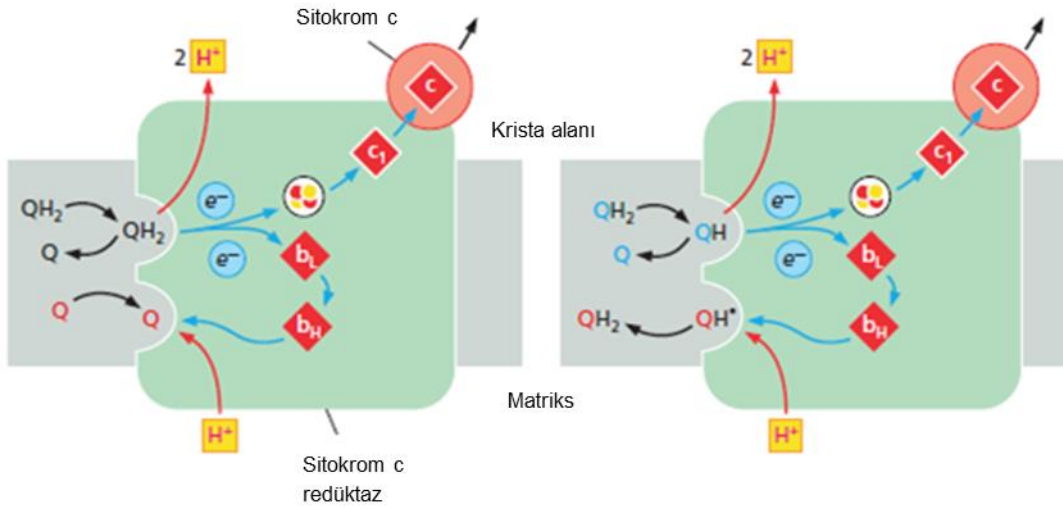
Sığır kalbi model sistemleri kullanılarak yapılan araştırmalar sonucunda kompleks I alt birimleri karakterize edilmesine rağmen, halen alt birimlerin işlevleri tam olarak netlik kazanmış değildir.

### 2.2.2 Kompleks III

Kompleks III, elektron zinciri kompleks proteinleri arasında en erken keşfedilen protein kompleksidir. 1922 yılında sitokrom b saptanmış ve ilk kompleks III protein izolasyonu, sığır mitokondrisinden 1962 yılında gerçekleştirilmiştir (Hatefi ve ark. 1962b). 1965 yılında ise moleküler ağırlığı rapor edilip (Tzagoloff ve MacLennan 1965), 32 yıl sonra sığır mitokondriyal  $bc_1$  kompleksinin kristal yapısı 1997 yılında açıklanmıştır (Xia ve ark. 1997).

Kompleks III, Sitokrom  $bc_1$  kompleksi (cyt  $bc_1$ ,  $bc_1$ ) ya da sitokrom c oksidoredüktaz olarak adlandırılmaktadır. Kompleks III yapısı genel olarak üç alt birime ayrılıp, sitokrom b (cyt b), sitokrom c (cyt  $c_1$ ) ve Rieske (2Fe-2S) proteininden oluşmaktadır. Mitokondri iç membranında yer alan oligomerik bir protein olan kompleks III proteini dimer yapıda olup, her

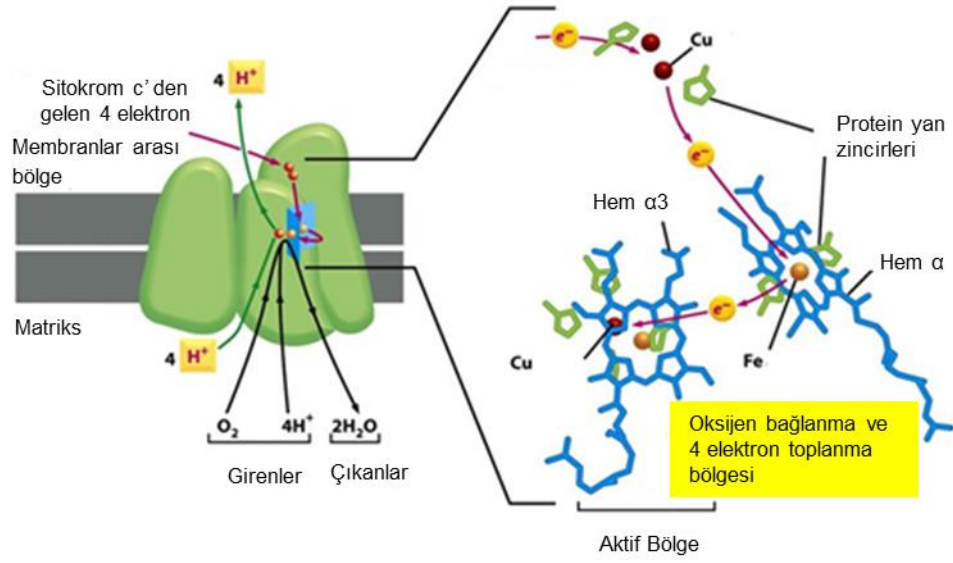
bir monomer 11 farklı polipeptid alt birimden oluşmakta ve monomerlerin moleküler ağırlığı yaklaşık 240 kDa ağırlığındadır. Sitokrom *bcl* kompleksi elektron transfer reaksiyonunda lipofilik substrat olan ubikinondan (QH<sub>2</sub>) sitokrom c'ye elektron aktarımını sağlarken, protonların membranlar arası bölgeye translokasyonunu katalizler. Sonuçta QH<sub>2</sub> molekülü okside olurken, dört proton pompalanıp, iki molekül sitokrom c indirgenir (Belevich ve ark. 2007). Gerçekleşen bu reaksiyon  $2\text{cyt.c (okside olan)} + \text{QH}_2 + 2\text{H}^+ (\text{matriks}) \longrightarrow 2\text{Cyt.c (indirgenen)} + \text{Q} + 4\text{H}^+ (\text{membranlar arası bölge})$  şeklinde gösterilmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kompleks III proteininin yapısının gösterilmesi (Alberts ve ark. 2015)

### 2.2.3 Kompleks IV

Mitokondride gerçekleşen elektron transferi sisteminin son basamağı olan kompleks IV yada sitokrom c oksidaz olarak adlandırılan protein kompleksi, sitokrom c havuzundan gelen dört elektronu iki su molekülü oluşturmak için oksijen molekülüne verirken, aynı anda dört protonun membranlar arası bölgeye gönderilmesini sağlar (Pfanner ve Neupert 1987). Kompleks IV tarafından katalizlenen tepkime  $4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$  olarak gösterilmektedir. Bu kompleks yapı tarafından protonlar membranın negatif (N) tarafından pozitif tarafına (P) gönderilirken, oksijen molekülünün indirgenmesi için gerekli olan elektronlar ise P tarafından sağlanmaktadır. Bu durum suyu oluşturmak için bir oksijen molekülünün indirgenmesinde iki pozitif yükün membranın N kısmından, P kısmını geçişi ile dengelenmiştir (Şekil 2.7).



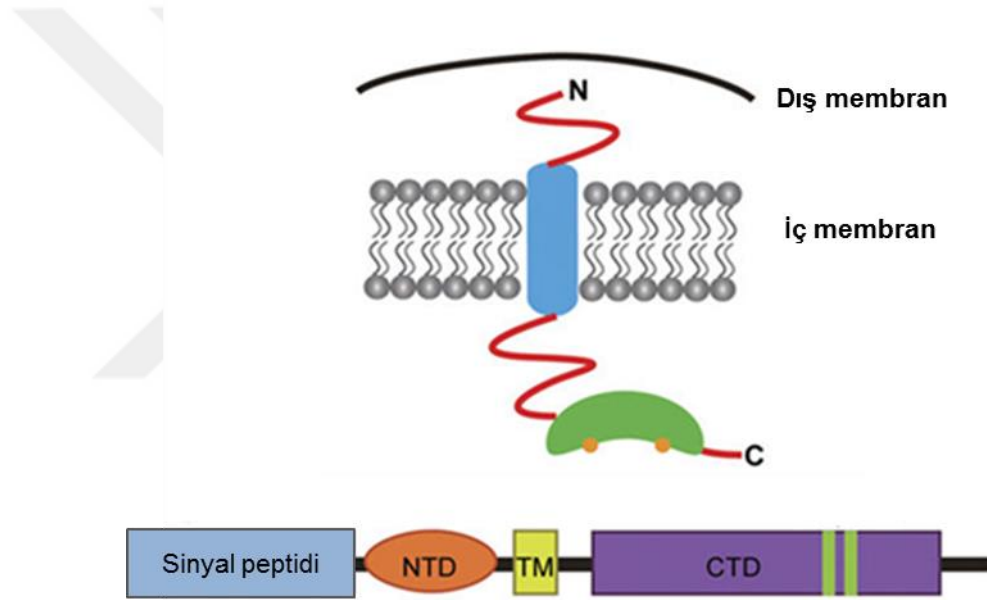
**Şekil 2.7.** Kompleks IV proteininin krista membranındaki yerleşiminin gösterilmesi (Alberts ve ark. 2015)

Oksijen molekülünün suyu oluşturmak için indirgenmesi, otomatik olarak membran potansiyelinin ( $\Delta P$ ) oluşmasını sağlar. Ayrıca oksijenin elektronlara yüksek afinite göstermesi ile, su molekülüne indirgenmesinde yüksek oranda serbest enerjinin salınmasını sağlayabilmektedir. Böylece oksijenin suya dönüşmesi ve hücresel respirasyonun evrimine bakıldığında, organizmanın anaerobik metabolizmadan çok fazla enerji elde etmesi sağlanmıştır.

Kompleks IV 210 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve 13 alt birimden oluşup, 3 alt birim mtDNA, 10 alt birim ise nükleer genom tarafından kodlanmaktadır (Li ve ark. 2006). Bu protein kompleks yapısı oksidatif fosforilasyonun düzenlendiği temel merkezdir ve aktivasyon mekanizmasında meydana gelen problemler birçok mitokondriyal hasar kaynaklı ortaya çıkan hastalıklarla ilişkilidir (Barrientos ve ark. 2002).

### 2.3 LETM1 Geni ve Proteini

Leucine zipper, EF-hand-containing transmembran protein 1 (*LETM1*) ilk olarak Endelev ve ark. (1999) tarafından tanımlanan bir gen olup, 4. kromozomun kısa kolunda yer alarak, 15 ekzondan oluşmaktadır. 739 aminoasit yapısından oluşan ve 83,5 kDa moleküler ağırlığa sahip olan Letm1 proteini, transmembran heliks yapısına, membranlar arası bölgede yer alan amino terminal domen (NTD) ve mitokondri matriksinde lokalize olan karboksil terminal domene (CTD) sahip bir mitokondri iç membran proteinidir. CTD iki tane EF-el benzeri  $Ca^{+2}$  bağlanma motifi içerir ve lösün fermuar yapısına sahip membrana bağlı bir protein ailesine bağlıdır (Endele ve ark. 1999). Şekil 2.8 de Letm1 protein yapısı ve mitokondri membranındaki lokalizasyonu gösterilmiştir.



**Şekil 2.8.** Letm1'in korunmuş organizasyonu ve mitokondri iç membranındaki lokalizasyonu . NTD: Amino terminal domen, TM: transmembran domen, CTD: karboksil domen (Shao ve ark. 2016)

*LETM1* ilk olarak Wolf Hirschhorn sendromunda (WHS; MIM 194190) tanımlanmıştır. WHS birden çok bitişik gende meydana gelen hasarların neden olduğu, doğum öncesi ve doğum sonrası büyüme gerilikleri, zeka gerilikleri ve çeşitli gelişimsel bozukluklarla karakterize bir hastalıktır (Hirschhorn ve ark. 1965). Hastalığa neden olan genlerin bulunduğu WHS kritik bölgesi (WHSCR), *D4S166* ve *D4S3327* arasında kalan 165 kilobazlık bölgeyi temsil edip (Wright ve ark. 1997), *LETM1* bu bölgenin dışında yer alarak WHSCR'ye 80 kb çiftinden daha kısa mesafede yer almaktadır. *LETM1* delesyonunun WHS hastalarında

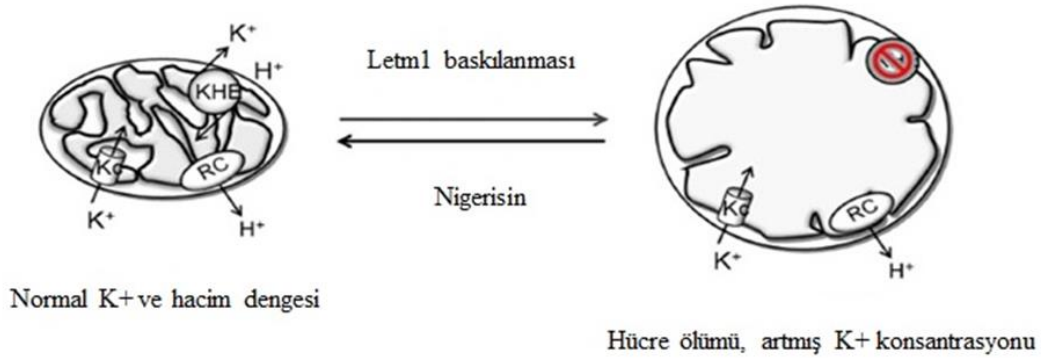
gözlemlendiği ilk olarak Endeale ve ark. (1999) tarafından gösterilmiştir (Endeale ve ark. 1999). Daha sonra *LETMI* delesyonuna sahip WHS hastasında, tam karakterize WHS hastalarındaki gibi nöbetlerin gözlenmediği, daha iyi motor aktivitesine sahip olduğu ve hastalığın daha yavaş ilerlediği Rauch ve ark. tarafından rapor edilmiştir. Buldukları bulgular sonucunda hastada WHSCR bölgesini içeren delesyonun olduğu ancak bu bölgenin *LETMI*'i içermediğini bildirmişlerdir. Buradan yola çıkılarak hastalıkta ikinci bir WHS-kritik bölgesinin olduğu (WHSCR2) ve *LETMI*'in bu bölgede yer alarak WHS patogenezinde rol oynadığı belirtilmiştir (Rauch ve ark. 2001).

*LETMI* ile ilgili çalışmalar henüz protein fonksiyonunun tam olarak bilinmemesinden dolayı oldukça yeni iken, Dimmer ve ark.'nın (2002) *Saccharomyces cerevisiae* da yaptıkları çalışma *LETMI* fonksiyonu açısından önemli bir keşif olmuştur. Bu grup mayalarda mitokondriyal fonksiyonlarda rol alan genleri taradıklarında MDM38 (Yol027) geninin yeni bir gen olup, bu gen tarafından kodlanan proteinin mitokondri iç membranında yer aldığını ve fonksiyonunun bilinmediğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda MDM geninin bilinen diğer proteinlerle benzer yapıya sahip olmadığını, mutant fenotipe sahip mayalarda mitokondriyal morfoloji üzerinde rolünün olduğu belirtilmiştir. Yaptıkları araştırma kapsamında *MDM38* tarafından kodlanan proteinin, Caggese ve ark. (1999) tarafından *Drosophila* da mitokondriyal proteinlerin karakterizasyonu için yapılan çalışmada ortaya çıkarılan *CG4589* geninin ürünü ile benzer yapıya sahip olduğunu belirtip, her iki ürünüde iki  $Ca^{+2}$  bağlanma bölgesinin olduğunu ve lösün fermuar motifi içerdiğini bildirmişlerdir (Caggese ve ark. 1999, Dimmer ve ark. 2002).

Mayalarda bulunan Yol027 geninin insanlarda bulunan *LETMI* geni ile benzer yapıya sahip olması, *Letm1* fonksiyonunun açığa çıkarılması için Yol027 geni üzerine yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur. Nowikovsky ve ark. (2004) *Letm1*'in mitokondrideki fonksiyonunu aydınlatılabilmek için, %40 homolojiye sahip olan Yol027 geninin mitokondrideki fonksiyonunu incelemişlerdir. Bu çalışma kapsamında Yol027 geni bakımından mutant olan mayalarda,  $K^{+}$  iyon dengesinin bozuk olduğu ve bunun sonucunda mutant hücrelerin mitokondrilerinde ozmotik şişme ve şekil bozukluklarının gözlemlendiği rapor edilmiştir (Nowikovsky ve ark. 2004).

Memeli hücrelerinde tek değerlikli katyon transportu iki antiport sistemi ile sağlanmaktadır. Bunlardan belirgin olanı  $Na^{+}$  seçici antiport sistemi olup, diğeri seçici olmayan sistemdir ve her iki sistemde de katyonların  $H^{+}$  ile elektronötral olarak taşınımı

sağlanmaktadır. Potasyumun ozmotik olarak aktif bir katyon olup, sitoplazma ve mitokondri matriksinde oldukça fazla bulunması,  $K^+$  iyonunun diğer iyonlara göre hücrede taşınım sırasında daha fazla tercih edilmesini sağlamaktadır.  $K^+$  iyon dengesi hücrelerde  $K^+/H^+$  antiport sistemi ile dengede tutulmaktadır (Bernardi 1999). Katyon dengesinin sağlanması amacı ile hücrelerde katyon/proton antiport sistemlerinin olup, katyon kaçaklarının ve mitokondri hacminin kontrol edildiği ilk olarak Mitchell tarafından önerilmiştir (Mitchell 1961). Ancak katyon dengesinin kontrolü gerçekleşemediğinde mitokondrideki  $K^+$  miktarının artması, mitokondri hacminin artmasına ve morfolojisinin bozulmasına neden olur. Buradan yola çıkılarak Nowikovsky ve ark, (2004) mayalarda ortaya çıkan mitokondriyal morfoloji bozukluklarının,  $K^+/H^+$  sistemindeki dengenin bozulduğundan kaynaklandığını belirtip, ortama iyonofor olan nigerisin eklemişler ve mutant hücrelerde mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının normale döndüğünü göstermişlerdir. Mayalarda gerçekleşen çalışma sonucunda benzer yapıya sahip olan Letm1’inde  $K^+/H^+$  değişiminde rolünün olabileceği ilk kez bu çalışma ile belirtilmiştir (Nowikovsky ve ark. 2004). Daha sonra Froschauer ve ark tarafından Letm1’in  $K^+/H^+$  transportunda rolü olduğu benzer çalışma ile gösterilmiştir (Şekil 2.9) (Froschauer ve ark. 2005).



**Şekil 2.9.** Mitokondriyal hacim dengesinin nigerisin ile dengelenmesi (Dimmer ve ark. 2008)

Mayalarda yapılan çalışmalar sonrasında Hasegawa ve Blik (2007) Letm1’in fonksiyonlarını tanımlamak için model organizma olan *C.elegans* tan yararlanmışlardır. *C.elegans* ile insan Letm1 proteini %79 homolojiye sahiptir. Bu grup *C.elegans* da Letm1 ifadesini baskıladıklarında mitokondrinin şiştiğini, Letm1 ifadesi arttırıldığında ise mitokondrinin küçüldüğünü ve böylece iç ve dış membranın birbirinden uzaklaştığını göstermişlerdir. Letm1 ifadesinin *C.elegans* da mitokondriyal hacmin dengesinin

korunmasında önemli olduğunu belirtip yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi Letm1'in bir  $K^+/H^+$  antiportu olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca larva fazındaki *C.elegans* da Letm1 ifadesini susturdularında larvaların öldüğünü belirtip, *LETMI* baskılanmasının lethal olduğunu belirtmişlerdir (Hasegawa ve van der Blik 2007).

Letm1'in bir  $K^+/H^+$  antiportu olduğu öne sürülürken, aynı zamanda mitokondriyal membran potansiyeli üzerinde de etkisinin olduğu daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Nowikovsky ve ark. 2004). Bunlara ek olarak mitokondri dinamik bir yapıya sahiptir ve iç membranında iyon geçişini sağlayan kanal sistemleri dışında solunum kompleks proteinleri de bulunmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkılarak Letm1 proteini ve mitokondriyal solunum zinciri kompleks proteinleri arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığı ilk olarak Dimmer ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Bu grup HeLa hücreleri kullanarak yaptıkları çalışmada Letm1 proteinin bir  $K^+/H^+$  antiportu olduğunu bildirip, *LETMI* gen ifadesinin baskılanması ile solunum zinciri kompleks proteinlerinden olan Kompleks I, III, IV ve V'in ifadesinde ve yapısında herhangi bir değişikliğin olmadığını göstermişlerdir (Dimmer ve ark. 2008).

Bu çalışma ile benzer özelliklere sahip başka bir çalışmada ise, HeLa hücrelerinde Letm1 ifadesi baskılandığında mitokondriyal fragmentasyonların oluştuğu ve krista sayısındaki azalmanın, mitokondriyal fisyon ve füzyon mekanizmasından bağımsız olduğu gösterilmiş ve Letm1 ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca Letm1 ifadesinin baskılanmasının mitokondri membran potansiyelini etkileyerek, oksidatif fosforilasyondan sorumlu komplekslerden olan kompleks I ve IV ün neredeyse oluşmadığını, kompleks III'ün ifadesinde ise azalmanın olduğu gösterilmiştir (Tamai ve ark. 2008).

Letm1 proteininin bir  $K^+/H^+$  antiportu olduğu düşünülüp, mitokondriyal fonksiyonu nasıl etkilediği ile ilgili çalışmalar devam ederken, 2009 yılında *Drosophila* da yapılan çalışma Letm1'in  $Ca^{+2}/H^+$  geçişinde rolünün olup olmadığını sorgulanmasına neden olmuştur. Jiang ve ark (2009) *Letm1* ile benzer yapıya sahip olan *CG4589*'un gen ifadesi baskılandığında, mitokondride  $Ca^{+2}$  alımının azaldığını ve bu durumu hücrelerin  $H^+$  iyonu salınımını arttırarak eşlediğini göstermişlerdir (Jiang ve ark. 2009).

Kalsiyum ökaryotlarda oldukça işlevsel olup, hücrel olayların cevaplanmasında rol oynayan ikincil habercidir. Hücrede sinirsel iletim veya kas kontrolü gibi kısa süreli kontrollerde rol oynadığı gibi, hücre bölünmesi veya organel gelişmesi gibi daha uzun süreli biyolojik işlemlerde de rol oynamaktadır (Berridge ve ark. 2003). Özel olarak hücrel  $Ca^{+2}$

sinyalinin iletilmesinde çeşitli iyon kanalları, pompalar ve değiştiriciler görev almaktadır. Mitokondriyal  $Ca^{+2}$  transportu, mitokondrinin hücre metabolizması ve hücre ölümü üzerinde önemli role sahip olmasına neden olur (Hajnoczky ve Csordas 2010). Mitokondri matriksinde bulunan kalsiyum miktarı arttığında, ATP sentaz ve TCA döngüsündeki enzimlerin aktivitesi artırılmaktadır. Ancak mekanizmada herhangi bir sorun çıktığında, fazla miktardaki kalsiyum hücre ölümünü tetiklemektedir.

Yapılan son çalışmalarda Letm1'in mitokondriyal  $Ca^{+2}$  dinamiğinde rol oynadığının gösterilmesi ile bu yöndeki çalışmalar da artmıştır (Waldeck-Weiermair ve ark. 2011, Alam ve ark. 2012). Floresan proteini olan pericam yardımı ile mitokondri matriksindeki pH ve  $Ca^{+2}$  değişikliği takip edildiğinde, Letm1 baskılanan hücrelerde  $Ca^{+2}/H^{+}$  değişimin bozulduğu gösterilmiştir (Jiang ve ark. 2009). Bunun üzerine Tsai ve ark (2014), Letm1 proteinini saflaştırarak protein-lipozom yapısını oluşturmuşlardır. Oluşturdukları bu proteo-lipozom kompleksinin çeşitli floresan boyalar yardımı ile  $Ca^{+2}$  iyon dengesi üzerine etkisine baktıklarında, Letm1'in bir  $Ca^{+2}/H^{+}$  antiportu olduğunu ve bir  $Ca^{+2}$  iyonuna karşı iki  $H^{+}$  molekülünün değişimini katalizlediğini belirtmişlerdir. Bu çalışma ile Letm1'in bir  $Ca^{+2}/H^{+}$  antiportu olduğunu ve  $Ca^{+2}$  regülasyonunun  $K^{+}$  homeostazi da dahil olmak üzere mitokondride gerçekleşen birçok proste rolünün olduğu belirtilmiştir (Tsai ve ark. 2014). Ayrıca matriksteki yüksek  $Ca^{+2}$  miktarının,  $Ca^{+2}$  tarafından aktive edilen mitokondriyal  $K^{+}$  kanallarının aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir (Szabo ve ark. 2012).

Shao ve ark (2016) yaptıkları çalışma ile  $Ca^{+2}/H^{+}$  değişiminin moleküler mekanizmasını aydınlatmaya çalışmışlardır. Yapılan çalışma ile saflaştırılan Letm1 proteinin hekzamer yapıda olduğu ve bu yapının hem bazik hem de asidik ortam şartlarında korunduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada Letm1 ifadesi baskılanan HeLa hücrelerinde mitokondriyal  $Ca^{+2}$  seviyesinin arttığını ve Letm1 aşırı ifadesinin ise  $Ca^{+2}$  seviyesini normale döndürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca yapılan biyokimyasal ve yapısal çalışmalar sonucunda oligomerize halde bulunan Letm1'in pH 8 değerinde açık konformasyona sahip olup  $Ca^{+2}$  geçişine izin verdiği, asidik pH da ise kapalı pozisyonda olup  $Ca^{+2}$  iyon geçişine engel olduğu elektron mikroskobu görüntüleri ile gösterilmiştir. Bulunan bulgular eşliğinde Letm1'in iyon dengesinin sağlanmasında, bilinen iyon transport sistemlerinden farklı olarak spesifik bir mekanizmasının olabileceği bildirilmiştir (Shao ve ark. 2016) .

Letm1 geninin keşfinden bu güne kadar yapılan çalışmalar kapsamında Letm1'in  $K^{+}/H^{+}$  ve  $Ca^{+2}/H^{+}$  değişiminde rolünün olduğu ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu

çalışmalar eşliğinde Letm1 proteininin kesin rolü ile ilgili bilgiler netlik kazanmış değildir. Letm1 protein ifadesi eksikliğinde gerçekleşen mitokondriyal şişme ve bu etkinin nigerisin ile tekrar düzeltilmesinin sadece Letm1'in  $K^+/H^+$  antiportu olduğu için açıklanabileceğini savunan ve gösteren gruplar vardır. Diğer taraftan son zamanlarda yapılan çalışmalar ile Letm1'in  $Ca^{+2}/H^+$  değişimindeki rolünün, biyokimyasal ve yapısal olarak gösterildiği çalışmalarda mevcuttur. Her iki durumda da letm1'in iyon dengesindeki rolünün anlaşılabilmesi için daha çok çalışmanın olması gerektiği belirtilmiştir (Nowikovsky ve Bernardi 2014, Tsai ve ark. 2014, Shao ve ark. 2016).

Diğer taraftan Letm1 ile kanser arasındaki ilişkiyi ele alan çalışmalarda bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbirleri ile uyumlu değildir.

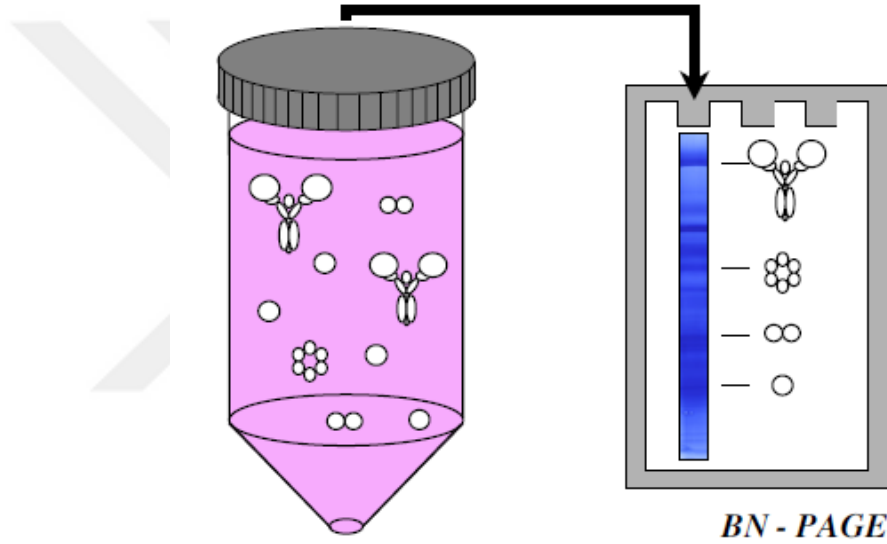
## **2.4 BN-PAGE**

Prokaryotik ve ökaryotik sistemlerde genom analizlerinin aydınlatılması işleminden sonra biyokimyanın öncelikli görevi, ortaya çıkarılan gen ürünlerinin işlevlerinin belirlenmesi olmuştur. Genellikle çoğu proteinler fonksiyonlarını diğer proteinlerle birlikte stabil yada geçici etkileşime girerek ve bu etkileşimleri homo veya hetero-oligomerik kompleks yapıları oluşturarak gerçekleştirirler (Ellis 2001).

Hücrel proteinlerin %20-30'u kadarı integral membran proteinleri olup, çözünür proteinlerin yüksek bir kısmı periferik olarak membran proteinleri ile interaksiyon halinde bulunmaktadır (Wallin ve von Heijne 1998). Membran proteinleri genellikle yüksek moleküler ağırlığa sahip kompleksler halinde membrana bağlı bulunurken ayrıca oksidatif solunum zincirinde yer alan kompleks proteinleri enzimatik olarak aktif yapılardır (Helms 2002). Bu yapıların elektroforetik sistemler kullanılarak ayrımları oldukça zordur. Bunun en önemli nedenlerinden biri, membrana bağlı proteinlerin hidrofobik kısımlarının olup, bu proteinlerin solubilize olabilmeleri için deterjanların kullanılmasının gerekli olmasıdır. Ancak kullanılan deterjanın doğru seçimi komplekslerin denatüre olmadan ayrılmasını sağladığından deterjan seçimi oldukça önemlidir.

Blue nativ jel elektroforez yöntemi (BN-PAGE), ilk olarak mitokondriden izole edilen membran kompleks sistemlerinin tayini için Schögger ve von Jagow tarafından ortaya konulmuş bir yöntemdir. Bu yöntemin temel fikri membran proteinlerinin düşük iyonik güçte deterjanlar kullanılarak membrandan ayrılmalarını sağlamak ve coomassie mavisi G250 boyası ile örneklerin nativ jelde yürütülmesi işlemidir (Schagger ve von Jagow 1991).

BN-PAGE tekniğinde ilk olarak denatüre edici olmayan deterjanlar yardımı ile protein komplekslerinin solubilizasyonu gerçekleştirilirken, solubilize olan proteinlerin anoda göç edebilmeleri için proteinlere coomassie mavisi G250 (CBB) boyası eklenir. CBB proteinlerin negatif yükü yüklenmelerini sağlar (Wittig ve Schagger 2008). Membrandan solubilize olan protein kompleks yapılarının gradiyent özellikteki poliakrilamid jelde moleküler ağırlıklarına göre yürütülmesinin ardından, immunblot tekniği ile proteinlerin biyolojik membrana transferi gerçekleştirilmektedir (Eubel ve ark. 2005). Solubilize olan proteinlerin BN-PAGE tekniği kullanılarak ayrıştırılması Şekil 2.10 da gösterilmiştir. Aynı zamanda moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, western blot tekniğinin yanı sıra coomassie mavisi boyası yardımı ile jelin boyanması sağlanarak protein bant analizi yapılabilmektedir.



**Şekil 2.10.** BN-PAGE tekniği kullanılarak membrana bağlı kompleks proteinlerin ayrımının gösterilmesi (Eubel ve ark. 2005)

Membran proteinlerinin solubilizasyonu amacı ile kullanılan deterjanlar iyonik, iyonik olmayan ve zwitteriyonik olmak üzere başlıca üç gruba ayrılır. İyonik deterjanlar, solubilizasyon sırasında protein-protein etkileşimlerine zarar verdiklerinden bu işlem için uygun değildirler. Sıklıkla kullanılan bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) iyonik bir deterjan olup, proteinlerin denatürasyonunun sağlanmasında kullanılmaktadır. İyonik deterjanların aksine, iyonik olmayan grupta yer alan deterjanlar lipid-lipid yapılarının ya da lipid-protein yapılarının yıkılmasını sağlamaktadırlar. Bu tip deterjanlar proteinlerin doğal hallerini koruyarak izolasyonlarının gerçekleştirilmesi için gerekli olan deterjan tipleridirler (Speers ve Wu 2007). Bu yüzden BN-PAGE tekniğinde sıklıkla kullanılan deterjanlar, iyonik

olmayan n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM), Digitonin veya Triton X-100 gibi daha az etkili deterjanlardır. Son sınıf olan zwitteriyonik deterjanlar ise genellikle izoelektrik fokuslama yöntemine dayalı PAGE sisteminde kullanılmaktadır (Banerjee ve ark. 1995).

Bir diğer önemli nokta ise kullanılan deterjanın miktarıdır. Membran proteinleri hidrofobik doğaları gereği, membran lipid yapıları ile interaksiyon halindedirler ve membran protein komplekslerinin izolasyonu sırasında protein-lipid veya lipid-lipid yapılarının oluşması kaçınılmazdır. Bu yapıların oluşmaması için kullanılan deterjan miktarının tayini protein-protein yapılarına zarar vermeden, bu yapıları membrandan ayırmayı sağlamaktadır. Böylece lipid agregatlarının oluşumu önlenmiş olmakta ve sadece istenilen protein kompleksi membrandan ayrılabilir. Tipik bir izolasyon için kullanılan deterjan miktarı, %0,5 ile %2 arasında olmakta iken, BN-PAGE yönteminde kullanılan deterjanın tipine ve kompleks proteinin izole edileceği organizma veya dokuya göre göre oldukça farklı miktarlar kullanılabilir (Krause 2006). İyonik olmayan üç deterjan tipinde BN-PAGE yönteminde kullanılabilir iken, digitonin diğer deterjanlara göre kullanım konsantrasyonu açısından 1,5-8g deterjan/protein olacak şekilde geniş bir konsantrasyon aralığına sahiptir. Diğer deterjanlar ile kıyaslandığında protein-protein interaksiyonunun korunmasında daha etkindir. (Reisinger ve Eichacker 2008). Çizelge 2.1 de farklı izolasyon tipleri için kullanılan farklı deterjan konsantrasyonları verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Deterjan tipleri ve miktarlarının gösterilmesi (Krause 2006)

<b>Triton X-100</b>	
Saccharomyces cerevisiae	1 g/g protein
Sığır kalbi	%2,5 (a/h)
Maya ve sıçan karaciğeri	%1 (a/h)
<b>DDM</b>	
Sığır kalbi	1,8 g/g protein
İnsan embriyonik böbrek hücreleri	%1,3 (a/h)
<b>Digitonin</b>	
Sıçan karaciğeri, böbrek, beyin	8 g/g protein
Sığır kalbi	3 g/g protein
Maya hücresi	2 g/g protein

Proteinlerin solubilizasyonu sağlandıktan sonra, kompleks yapıların yüksek ayırma gücü ile ayrılmalarını sağlamak için gradiyent jeller kullanılmaktadır. Kullanılan jellerin akrilamid konsantrasyon gradiyenti aralığı %3 ile %16 değerinde farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanıp, komplekslerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmaktadır. Gradyent jeller kullanılarak 0,1-1 MDa aralığındaki komplekslerin ayrımı sağlanırken, poliakrilmid yerine agaroz jel kullanılarak 10 MDa'a kadar süper komplekslerin denatüre olmadan ve aktif şekilde ayrılmaları sağlanabilmektedir (Henderson ve ark. 2000).

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1 Kullanılan cihazlar**

Biyogüvenlik kabini (class II), Heal Force, Çin

Buzdolabı +4<sup>0</sup>C, Beko, Türkiye

CO<sub>2</sub> etüv, Thermo, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)

CO<sub>2</sub> etüv, Eppendorf, ABD

Dikey elektroforez tankı, Bio-Rad, ABD

Distile su cihazı, Milipore, Almanya

Güç kaynağı, Wealtec, Tayvan

Hassas terazi, Ohaus, ABD

Hemostometre, Marienfeld, Almanya

Isıtıcı çalkalayıcı blok, Biosan, Letonya

Isıtıcı manyetik karıştırıcı, WiseStir, Kore

İnvert mikroskop, Olympus, Almanya

Mekanik karıştırıcı, Velp, İtalya

Mikrospin, Biosan, Letonya

Otoklav, Tekbal, Türkiye

Otomatik pipet seti, Axygen, ABD

Otomatik pipet seti, Eppendorf, ABD

Pipet tabancası, Capp, Danimarka

pH metre, Hanna, Romanya

Soğutmalı santrifüj, Tehtnica, Slovenya

Spektrofotometre, Shimadzu, Japonya

Su banyosu, Nüve, Türkiye

Tüp karıştırıcı, Hasvet, Türkiye

Vakum, Biosan, Letonya

Vakum, Rocker, Tayvan

Vorteks, Wise Mix, Kore

### **3.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler**

%10 Hazır Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid (SDS-PAGE) jel, CBS Scientific, ABD

%12 Hazır SDS-PAGE jel, CBS Scientific, ABD

%3-12 Hazır native jel, Invitrogen, ABD

%5 süt tozu

0,22 µm steril filtre, Merck Millipore, Almanya

Amfoterisin B, Gibco, ABD

Coomassie brillant mavisi, Fisher Scientific, ABD

Digitonin, Novex, ABD

Dimetil sülfoksit (DMSO), Santa Cruz, ABD

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco, ABD

Dulbecco'nun fosfat tamponu (DPBS), Life Technologies, ABD

Etil alkol, Sigma, ABD

Etilen glikol-bis (β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraasetik asit (EGTA), Sigma, ABD

Esansiyel olmayan aminoasit karışımı (NEAA), Gibco, ABD

Fetal sığır serum (FBS), Gibco, ABD

Glisin, Sigma, ABD

G-250 mavisi, Novex, ABD

Hidroklorik asit (HCl), Sigma, ABD

L-glutamin, Sigma, ABD

Lipofectamin 2000, Invitrogen, ABD

Metanol, Fluka, ABD

Morfolino propan sülfonik asit (MOPS), Sigma, ABD

N-Dodesil--D-Maltosid, (DDM), Novex, ABD

Native protein belirteci, Novex, ABD

Nitroselüloz membran, Novex, ABD

Opti-MEM, Gibco, ABD

Penisilin/streptomisin, Gibco, ABD

Poly vinylidene difluoride (PVDF) membran, Santa Cruz, ABD

Ponceau kırmızısı, Sigma, ABD

Potasyum klorür, Sigma, ABD

Proteaz inhibitör karışımı, Sigma, ABD

Protein belirteci, Invitrogen, ABD

Sodyum dodesil sülfat (SDS), Mp, ABD

Sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>), Sigma, ABD

Sodyum hidroksit, Sigma, ABD

Sükroz, Sigma, ABD

Tripan mavisi, Gibco, ABD

Tripsin, Sigma, ABD

Tris, Sigma, ABD

Üridin, Sigma, ABD

Western kemilüminisans görüntüleme solüsyonu, Invitrogen, ABD

X –ray developer, Impact, Türkiye

X –ray fiksatif, Impact, Türkiye

X –ray film, Kodak, ABD

X –ray film, SantaCruz, ABD

$\beta$ -mercaptoethanol, Ambresco, ABD

### **3.1.3 Kullanılan siRNA ve antikorlar**

#### **siRNA**

Çalışma kapsamında LETM1 gen ekspresyonunun baskılanması amacıyla gene özgü tasarlanan bir çift siRNA, Ambion (ABD) firmasından liyofilize olarak temin edilmiştir. Kullanılan siRNA dizileri şu şekildedir;

siRNA-1: 5'-auuccugcugccuguaguatt-3'

siRNA-2: 5'-ccacuuaauaauucuuaatt-3'

200  $\mu$ M hazırlanan siRNA-1 ve siRNA-2 stok solüsyonlarından, son konsantrasyon 20  $\mu$ M olacak şekilde seyreltme yapılarak solüsyonlar hazırlanmıştır. siRNA solüsyonları, son konsantrasyon 0,4  $\mu$ M olacak şekilde kullanılmıştır.

#### **Antikorlar**

Çalışmada kullanılan birincil ve ikincil antikorlar şu şekildedir;

Letm1, Novus (ABD), GRP75, Santa Cruz (ABD), Kompleks I, III ve IV, Abcam (İngiltere). İkincil antikorlar ise Santa Cruz, (ABD) firmasından alınmıştır.

### **3.1.4 Kullanılan kitler, tamponlar ve çözeltiler**

#### **RIPA tamponu (Santa Cruz, ABD)**

Hazır olarak alınan RIPA tamponunun içerisinde %1 fenilmetilsülfonil florid (pmsf), %1 proteaz inhibitör kokteyli, %1 sodyum ortovanadat olacak şekilde kokteyl hazırlanmış ve uygun miktarda kullanılmıştır.

#### **HRP-konjuge kemilüminesans görüntüleme substrat kit (İnvitrogen, ABD)**

Hazır olarak alınan kit içerisinde bulunan reaktif A ve reaktif B eşit oranda karıştırılarak kullanılmıştır.

#### **Bradford protein belirteci (Bio-Rad, ABD)**

Bradford reaktifi, üretici firma direktifleri doğrultusunda 1/5 oranda distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

### **Native-PAGE protein hazırlama kit (Novex, ABD)**

Hazır olarak alınan kitin içerisinde bulunan %10 DDM ve %5 Digitonin 1:8 protein/deterjan (g/g) oranında olacak şekilde, 4x örnek yükleme tamponu 1x konsantrasyonunda, %5 G-250 mavisi boyası ise 1/8 (v/v) oranda olacak şekilde kullanılmıştır.

### **1x Tris-Glisin (TG) tamponu (Bio-Rad, Almanya)**

1x TG tamponu, hazır olarak alınan 10x TG tamponunun 200 ml metanol ile 1000 ml distile su içerisinde seyreltilmesiyle hazırlanılarak kullanılmıştır.

### **1x SDS jel elektroforez tamponu (CBS scientific, ABD)**

Hazır olarak alınan 20x SDS tamponu son hacim 500 ml olacak şekilde distile su ile seyreltilerek, 1x SDS jel elektroforez tamponu hazırlanmıştır.

### **1x BN-PAGE anot elektroforez tamponu (Novex, ABD)**

Hazır olarak alınan 20x yürütme tamponu son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile seyreltilerek, 1x anot BN-PAGE tamponu hazırlanmıştır.

### **1x BN-PAGE katot elektroforez tamponları (Novex, ABD)**

Hazır olarak alınan 20x yürütme tamponunun, 10 ml 20x katot katkısı ile 200 ml distile su içerisinde seyreltilmesi ile, 1x koyu katot BN-PAGE tamponu hazırlanmıştır.

Hazır olarak alınan 20x yürütme tamponu, 1 ml 20x katot katkısı ile 200 ml olacak distile su içerisinde seyreltilmesi ile, 1x açık katot BN-PAGE tamponu hazırlanmıştır.

### **1x Fosfat tuz tamponu (PBS)**

Hazır olarak alınan 10x DPBS tamponu, son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile seyreltilerek, 1x PBS tamponu hazırlanmıştır.

### **10x Tris tuz tamponu (TBS)**

60,6 g Tris ve 87,6 g NaCl pH değeri 7,4 olacak şekilde ayarlanıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile seyreltilmiştir.

### **1x Tween-20 içeren Tris tuz tamponu (TBS-T)**

100 ml 10x TBS tamponu, 5 ml %10 tween-20 ilavesi ile 1000 ml distile su içerisinde seyreltilerek, 1x TBS-T tamponu hazırlanmıştır.

### **0.1 M Tris-MOPS çözeltisi**

12,1 g Tris-base 500 ml distile suda çözündürülmüş ve MOPS kullanılarak pH 7,4'e ayarlandıktan sonra, son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

### **0.1 M EGTA-Tris çözeltisi**

38,1 g EGTA 500 ml distile suda çözündürülmüş ve Tris ile pH değeri 7,4'e ayarlanarak son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

### **1 M süzkroz çözeltisi**

342,42 g süzkroz tartılıp, çözeltinin hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

### **Mitokondri izolasyon tamponu (IBc)**

10 ml 0,1 M Tris-MOPS, 1 ml 0,1 M EGTA-Tris, 20 ml 1 M süzkroz kullanılarak son hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile seyreltilmiş, mitokondri izolasyon tamponu hazırlanmıştır. pH 7,4 değerinde ayarlanmıştır.

### **%5 süt çözeltisi**

5 g süt tozu tartılarak, çözeltinin hacmi 1x TBS-T ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

### **DMEM besiyeri**

Yapılan hücre kültürü çalışmalarında %10 FBS, 100 µg/ml penisilin-streptomisin, 2 mM L-glutamin, 0,625 µg/ml amfoterisin B, 50 µg/mL üridin, 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1x esansiyel olmayan aminoasit karışımı ve toz besiyerinden oluşan karışım kullanılmıştır. pH değeri 7,2'ye ayarlandıktan sonra, 0,22 µm por çapına sahip filtre ile sterilize edilmiştir.

### **Transfer DMEM**

Transfeksiyon sırasında kullanılan besiyeri 2 mM L-glutamin, 50 µg/mL üridin, 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1x esansiyel olmayan aminoasit karışımı ve toz besiyerinden oluşmaktadır.

### **Opti-MEM Besiyeri**

Transfeksiyon işleminde siRNA ve lipofektamin 2000 karışımlarının hazırlanmasında, serum içeriği azaltılmış Opti-MEM besiyeri tercih edilmiştir. Hazır olarak satın alınmış ve direk olarak kullanılmıştır.

### 3.1.5 Kullanılan bilgisayar programları

Microsoft Office, (ABD), Image J, (ABD). SPSS (ABD)

## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 Hücre kültürü

Fare embriyonik fibroblast hücreleri (MEF), DMEM besiyerinde, %5 CO<sub>2</sub> ve 37<sup>0</sup>C sıcaklık koşullarının sağlandığı inkübatörde büyütülmüşlerdir. Hücreler %90-95 yoğunluğa sahip olduklarında pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir. Pasaj işleminde ilk olarak hücre büyütme kaplarındaki besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler 10 ml 1x PBS tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra T-75 büyütme kaplarına 1ml tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Eş hacimde besiyeri eklenerek tripsin inaktive edilmiş ve hücreler 1500 rpm hızında 3 dakika santrifüj ile çöktürülmüştür. Üst faz uzaklaştırılarak hücreler besiyeri içerisinde süspande edilmiştir. Temiz bir tüp içerisinde 50 µl hücre süspansiyonu, 150 µl tripan mavisi boyası ile karıştırılarak hemositometre yardımı ile hücre sayısı hesaplanmıştır.

### 3.2.2 Letm1 gen ekspresyonunun baskılanması

Fare embriyonik fibroblast hücreleri 9x10<sup>3</sup> hücre/cm<sup>2</sup> kuyu olacak şekilde 100 cm<sup>2</sup> hücre büyütme kabına ekilmiş ve 10 ml DMEM besiyeri ortama eklenmiştir. 24 saat sonra hücreler kontrol grubunu oluşturmak üzere negatif kontrol siRNA ve *LETM1* ifade düzeyini baskılamak amacı ile bir çift gene özgü tasarlanan siRNA ile muamele edilmiştir. Transfeksiyon için kullanılacak kokteyl karışım aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır;

Tüp 1: Opti-MEM besiyeri + siRNA-1 + siRNA-2

Tüp 2: Opti-MEM besiyeri + Lipofektamin 2000

Hazırlanan tüpler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 1. tüp, 2. tüpe damla damla eklenmiştir. İşlem tamamlandıktan sonra siRNA-lipofektamin kompleksinin oluşması için oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. İlk olarak hücrelerin üzerine belirli hacimde transfer DMEM besiyeri eklenmiş daha sonra hazırlanan karışımdan uygun miktar damla damla eklenmiştir. 6 saatlik inkübasyon sonrasında hücreler 1x PBS tamponu ile yıkanıp ardından DMEM besiyeri ile muamele edilmişlerdir. 48 saatlik inkübasyon süresini takiben kontrol ve deney grubu hücrelerinden mitokondri protein izolasyonu yapılmıştır.

### 3.2.3 Mitokondri izolasyonu

Bölüm 3.2.2 de anlatıldığı şekilde transfeksiyon işlemi yapılmış ardından MEF hücrelerinden mitokondri izolasyonu yapılmak üzere Frezza ve ark.'nın (2007) tanımladığı yöntem kullanılmıştır. İlk olarak büyütme kaplarındaki besiyeri uzaklaştırılmış ve 1x PBS ( $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  içermeyen ortam) tamponu ile hücreler yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından hücreler kazıyıcı aparat ile kazınarak, 15 ml'lik santrifüj tüplere konulmuştur. 600 g hızında 10 dakika  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj işleminin ardından üst faz uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine 3 ml IBC tamponu eklenmiştir. Örnekler mekanik hücre karıştırıcısına bağlı teflon uçlu hücre parçalayıcısı yardımı ile 1600 rpm hızında 25 vuruşluk 2 set olmak üzere muamele görmüşlerdir. İşlem sonrasında örnekler tekrar 600 g hızında 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz 2 ml'lik ependorflara alınarak mitokondrinin çöktürülmesi için 7000 g hızda 10 dakika  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst faz atılmış ve 200  $\mu\text{l}$  IBC tamponu ile pellet yıkanmıştır. 7000 g hızında 10 dakika  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj işlemi sonrası üst faz uzaklaştırılmış ve pellet 40  $\mu\text{l}$  IBC tamponu ile süspende edilmiştir (Frezza ve ark. 2007).

### 3.2.4 Protein miktar tayini

İzole edilen proteinlerin miktar tayinleri, Bradford protein belirteci kullanılarak belirlenmiştir (Bradford 1976). İlk olarak Bradford protein belirteci, 1/5 oranda distile su kullanılarak seyreltilmiştir. Ardından 1 ml Bradford protein belirteci ve 20  $\mu\text{l}$  örnek olacak şekilde karışım hazırlanmış ve spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Miktar tayini belirlenirken sığır serum albümini (BSA) ile 25, 125, 250, 500 ve 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  konsantrasyonlarında standartlar hazırlanmış ve bu standartlara göre bir eğri grafiği çizilmiştir. Eğrinin eğimini kullanarak protein miktarı tayini gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometre'nin sıfırlanmasını sağlamak için 1 ml Bradford reaktifi ve 20  $\mu\text{l}$  distile su kullanılmıştır.

### 3.2.5 SDS-poliakrilamid jel elektroforezi

Protein izolasyon ve konsantrasyon tayini işlemlerinin mitokondriyal protein örnekleri ise 3  $\mu\text{g}/\text{kuyu}$  olacak şekilde hesaplanmış, 2x laemmlili örnek yükleme boyası ile birlikte uygun miktarda karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika denatüre edilerek proteinlerin lineer yapıda ve negatif yükle yüklenmeleri sağlanmıştır. Yükleme için hazır olan örnekler %10 SDS-PAGE jele yüklenmiş, SDS içeren yürütme tamponu yardımı ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmışlardır. 110V'da 1 saat 30 dakika yürütme işlemi

yapıldıktan sonra, oda sıcaklığında 40V'da 2 saat örneklerin PVDF membrana transferi sağlanmıştır. İmmünblotlama işlemi Bölüm 3.2.7 de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.6 Blue native poliakrilamid jel elektroforezi (BN-PAGE)**

Mitokondriyal protein izolasyonu bölüm 3.2.3 de anlatıldığı gibi gerçekleşip ardından protein miktar tayini yapıldıktan sonra, örneklerin hazırlanması iki farklı iyonik olmayan deterjan olan DDM ve Digitonin ile ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. İlk olarak mitokondriyal örnekler 100 µg protein konsantrasyonunda olacak şekilde yeni bir mikrofüj tüpüne konulmuş ve 10.000 rpm hızında 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından örneklerin üst fazı atılarak pelletin üzerine 1:8 (w/w) oranında protein/deterjan (digitonin veya DDM) , %1 (w/v) proteaz inhibitör karışımı, 4x örnek yükleme tamponu ve RNaz/DNaz içermeyen su kullanılarak hazırlanan solüsyondan 24 µl eklenmiştir. 4<sup>0</sup>C'de 1 saat inkübe edilerek 18.500g hızda 30 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan çökeltilinin üst fazı alınarak, coomassie G250 mavisini boyası ile 1/8 (v/v) oranında karıştırılmıştır. Ardından %3-12 gradiyente sahip native jele 8 µl protein belirteci ve 20 µg örnek olacak şekilde yüklenmiştir. Anot ve katot tamponu olmak üzere iki farklı tampon sistemi kullanılmış, ilk olarak koyu katot ve anot tamponu ile birlikte örnekler 150 voltta 45 dakika yürütülmüştür. Ardından sistemdeki katot tamponu az miktarda coomassie mavisini içeren açık katot tamponu ile değiştirilerek 250 voltta 90 dakika elektroforez işlemine devam edilmiştir. Yürütme işleminden sonra +4<sup>0</sup>C'de 25V'da örnekler gece boyu PVDF membrana transfer edilmiştir. Transfer sonrası PVDF membran %10 asetik asit ile 15 dakika muamele edilip proteinlerin membrana fikse edilmesi sağlanmıştır. İmmünblotlama Bölüm 3.2.7 de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7 İmmünblot yöntemi**

Protein jel elektroforezi sonrasında PVDF membrana transfer edilen örnekler, %5 süt tozu ile hazırlanan bloklama solüsyonu ile 1 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun ardından membranlar 1x TBS-T yıkama solüsyonu ile 3 kere 5 dakika olmak üzere yıkanmış ardından membranlar 1:1000 anti-complex I, 1:1000 anti-complex III, 1:1000 anti-complex IV, 1:1000 anti-LETM1, 1:1000 anti-GRP-75 antikorları ile gece boyu +4<sup>0</sup>C'de inkübe edilmişlerdir. Membranlar farklı birincil antikorlar ile muamele edildikten sonra, 5 dakika 3 kez 1x TBS-T ile yıkanıp, anti-fare veya anti-tavşan olmak üzere uygun olan 1:2500 oranındaki ikincil antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat bekletilmişlerdir. İnkübasyonun ardından membranlar 5 dakika 3 kez 1x TBS-T ve 2 dakika 1 kez dH<sub>2</sub>O ile yıkanmış ardından HRP bağlı substrat ile muamele edilmişlerdir. Oluşan kemilüminitik ışımaya Kodak veya Santa Cruz filmi

kullanılarak, geliştirici ve sabitleyici solüsyonlar yardımı ile filme aktarılmıştır. Protein düzeylerindeki değişimler Image J yazılımı (<https://imagej.nih.gov/ij/>) kullanılarak bilgisayar ortamında analiz edilmiştir (Schneider ve ark. 2012).

### **3.2.8 İstatistiksel analizler**

Yapılan istatistiksel analiz işlemleri IBM SPSS programı kullanılarak bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir.



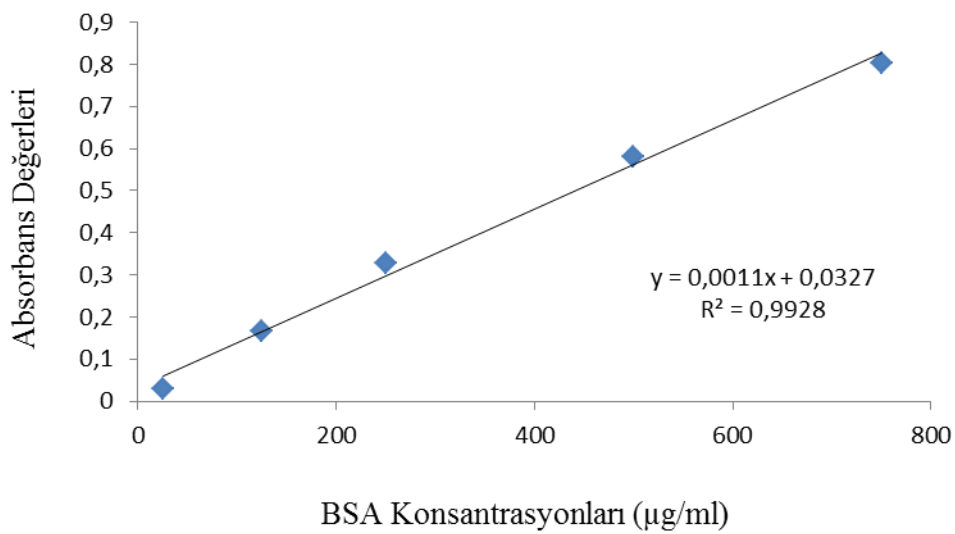
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1 Bradford Yöntemi Kullanılarak BSA Standart Eğri Grafiğinin Oluşturulması

Yapılan çalışma kapsamında kullanılacak olan mitokondriyal protein konsantrasyonunun belirlenebilmesi için Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi Bradford yönteminden yararlanılmıştır. Yöntem kapsamında protein standartı olarak kullanılan BSA, 25, 125, 250, 500 ve 750 µg/ml konsantrasyonların da olacak şekilde hazırlanmış ve 595 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinden standart eğri grafiği çizilmiş (Şekil 4.1) ve grafiğin eğimi kullanılarak, protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** BSA standartlarının konsantrasyon ve absorbans değerlerinin gösterilmesi

BSA konsantrasyonları (µg/ml)	25	125	250	500	750
Absorbans değerleri (595 nm)	0,029	0,167	0,329	0,582	0,804



**Şekil 4.1.** Farklı BSA konsantrasyonları kullanılarak çizilen standart eğri grafiği

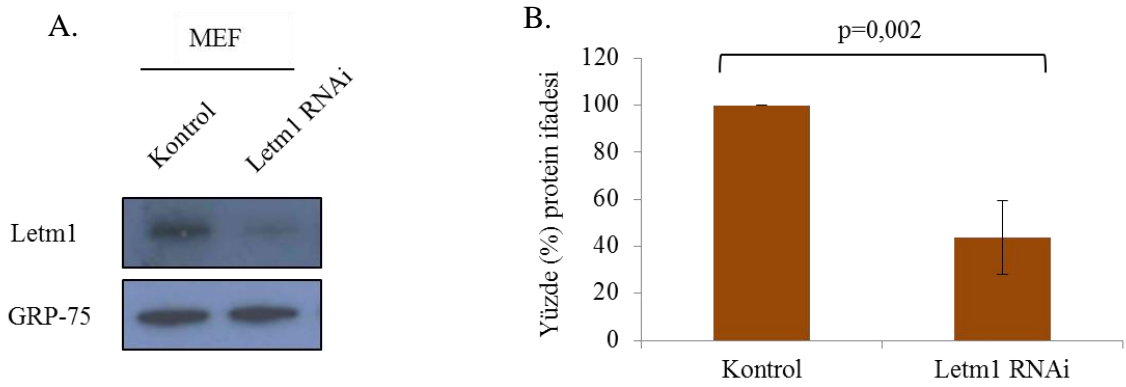
## 4.2 MEF Hücrelerinde *LETMI* İfadesinin Baskılanması ve Mitokondriyal Protein İzolasyonu

Deney grubu olarak kullanılacak olan *LETMI* ifadesi baskılanmış hücre grubunu oluşturmak için Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde MEF hücrelerine transfeksiyon işlemi uygulanmıştır. 48 saat sonra hücrelerden Bölüm 3.2.3’de anlatıldığı şekilde mitokondriyal protein izolasyonu yapılmış, kontrol ve Letm1 RNAi örneklerinin ortalama mitokondriyal protein konsantrasyonları Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Mitokondriyal proteinlerin ortalama konsantrasyon değerleri

MEF hücresi	Kontrol	Letm1 RNAi
Ortalama protein konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	7,07	7,35

Elde edilen mitokondriyal protein örneklerinde Letm1 ifadesinin belirlenebilmesi için mitokondriyal proteinler 3  $\mu\text{g}$  olacak şekilde hazırlanmış ve Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı üzere SDS-PAGE yöntemi ile muamele edilmişlerdir. Film sonuçları Şekil 4.2-A’da gösterilmiş ve elde edilen protein ifadesi bant kalınlıkları image j analiz programı kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.2-B). Yapılan analiz sonucunda mitokondriyal protein örneklerinde Letm1 ifadesinin %56,2 oranında azaldığı saptanmıştır  $p=0,002$ . GRP-75 kontrol proteini olarak kullanılmıştır.



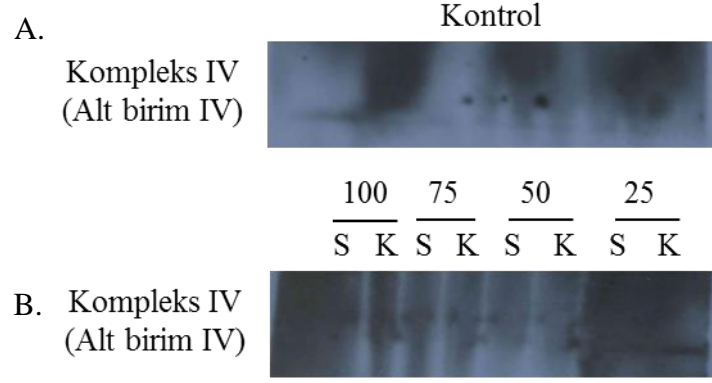
**Şekil 4.2.** Letm1 ifade düzeyinin siRNA transfeksiyonu sonrası MEF hücrelerinde belirlenmesi

### 4.3 LETM1 İfadesi Baskılanan Hücrelerde ve Kontrol Grubunda DDM ve Digitonin Kullanılarak Protein/Deterjan Oranının Optimizasyonu

#### 4.3.1 DDM tayini

Mitokondriyal solunum zinciri kompleks yapıları mitokondri krista membranında bulunmakta ve birden fazla alt birimden oluşmaktadırlar. Enzimatik olarak aktif olan bu yapıların denatüre olmadan native jelle yüklenebilmesi için iyonik olmayan deterjanlar kullanılmaktadır. DDM sıklıkla kullanılan deterjanlardan biri olup, yapılan çalışma kapsamında 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4 g/g oranında protein/DDM olacak şekilde 50 µg protein kullanılmış ve örnekler Bölüm 3.2.6'de anlatıldığı şekilde blue-native jel elektroforezi ile yürütülmüşlerdir. Yapılan çalışma sonucunda protein agregatlarının oluştuğu ve agregatların jelde yürütülmesi işlemi sonucunda nokta şeklinde protein bantlarının meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.3-A).

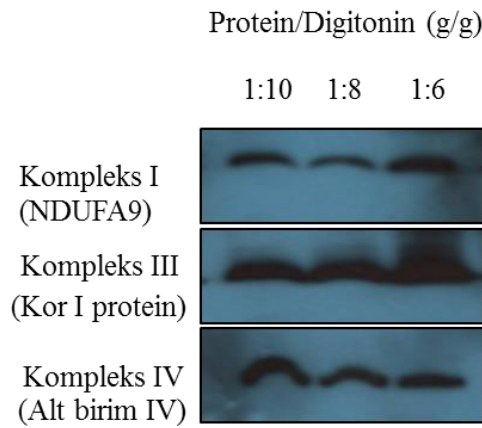
Agregat oluşturmada doğru oranda protein ve deterjan birleşimini oluşturup, örneklerin poliakrilamid jelde düzgün ilerleyebilmelerinin sağlanması için 1:2,5 oranında seçilen DDM miktarına karşılık, farklı protein konsantrasyonları denenmiştir. 25, 50, 75 ve 100 µg miktarında olmak üzere protein örnekleri hazırlanmış ve BN-PAGE tekniği ile sonuçlar elde edilmiştir. 25 µg hariç bütün örneklerde agregat oluşumu belirlenmiştir (Şekil 4.3-B).



**Şekil 4.3.** Protein miktarı/DDM oranının belirlenmesi. K: Kontrol, S: Letm1 RNAi

#### 4.3.2 Digitonin tayini

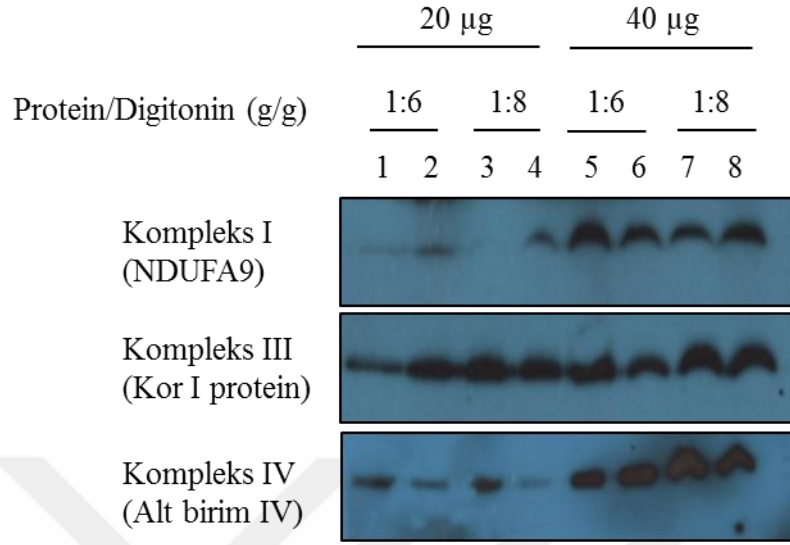
Membran komplekslerinin denatüre olmadan membrandan ayrılmaları için kullanılan iyonik olmayan bir diğer deterjan ise digitonindir. DDM ile ortaya çıkan protein agregat oluşumunu gidermek amacı ile proteinler digitonin ile muamele edilmişlerdir. İlk olarak protein/digitonin oranının belirlenmesi amacı ile 1:6, 1:8, 1:10 g/g oranları kullanılmıştır. 50 µg mitokondriyal protein örnekleri Bölüm 3.2.6’de anlatıldığı şekilde BN-PAGE tekniği ile analiz edilmiştir. Kompleks I, III ve IV protein ifadelerine bakılarak 1:6 ve 1:8 digitonin uygulanan örneklerde, bant kalınlıklarının, daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Digitonin miktarının belirlenmesi

Elde edilen sonuçlar kapsamında 20 ve 40 µg konsantrasyonlarında mitokondriyal protein örnekleri, 1:6 ve 1:8 digitonin oranıyla birlikte muamele edilmişlerdir. Şekil 4.5’de

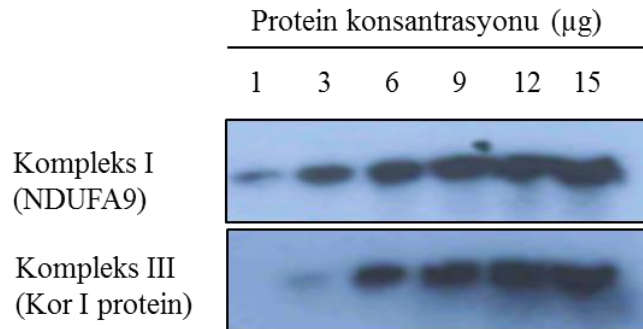
gözüktüğü üzere 20 µg protein örneklerinin 1:8 oranında digitonin ile solubilize edildiğinde protein bantlarının daha iyi çözünürlükte elde edildiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. Protein/Digitonin oranının belirlenmesi. 1, 3, 5, 7 kontrol, 2, 4, 6, 8 Letm1 RNAi

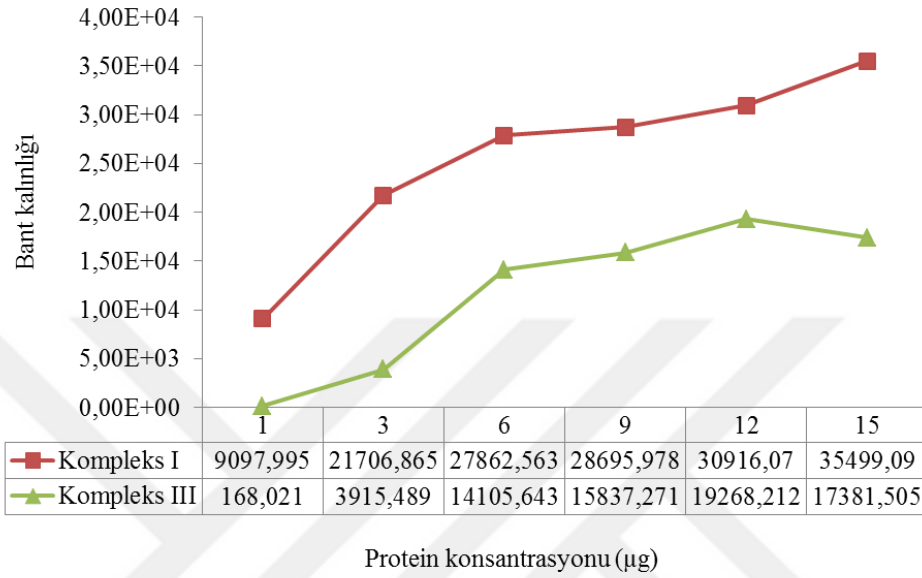
#### 4.4 Farklı Konsantrasyonlarda Protein Bant Kalınlıklarının Analizi

Mitokondriyal protein konsantrasyonu SDS PAGE için 3 µg olarak belirlenmiştir. Kullanılan bu protein miktarlarında alınan bant görüntülerinin fazla satüre olmadığından emin olmak için farklı konsantrasyonlarda mitokondriyal örnekler hazırlanarak SDS jelle yüklenmiştir. 1, 3, 6, 9, 12 ve 15 µg olacak şekilde kontrol örnekleri Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı şekilde elektroforez işleminden geçmiş, ardından Bölüm 3.2.7’de anlatılan immünblot işlemi uygulanmıştır. Kompleks I ve III antikorları ile membran muamele edilmiş ve protein ifadeleri Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



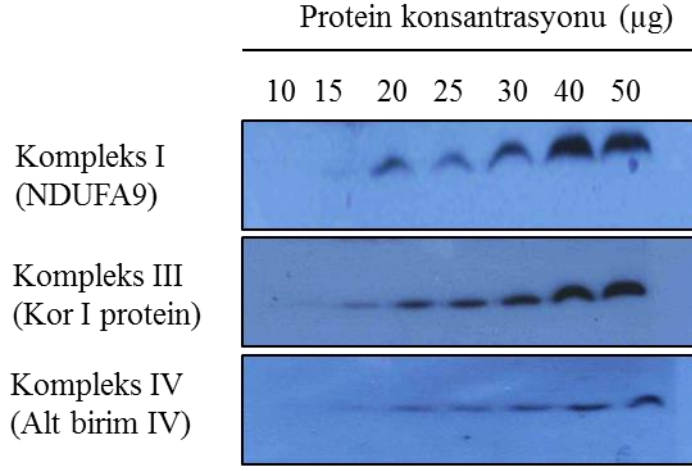
Şekil 4.6. Farklı protein konsantrasyonu bant kalınlıklarının SDS-PAGE ile analizi

Elde edilen protein ifadelerinin image J programı ile bant kalınlıkları analiz edilmiş ve yapılan analiz sonucunda kullanılan 3 µg protein konsantrasyonunun lineer değerler arasında kaldığı gözlemlenmiştir.



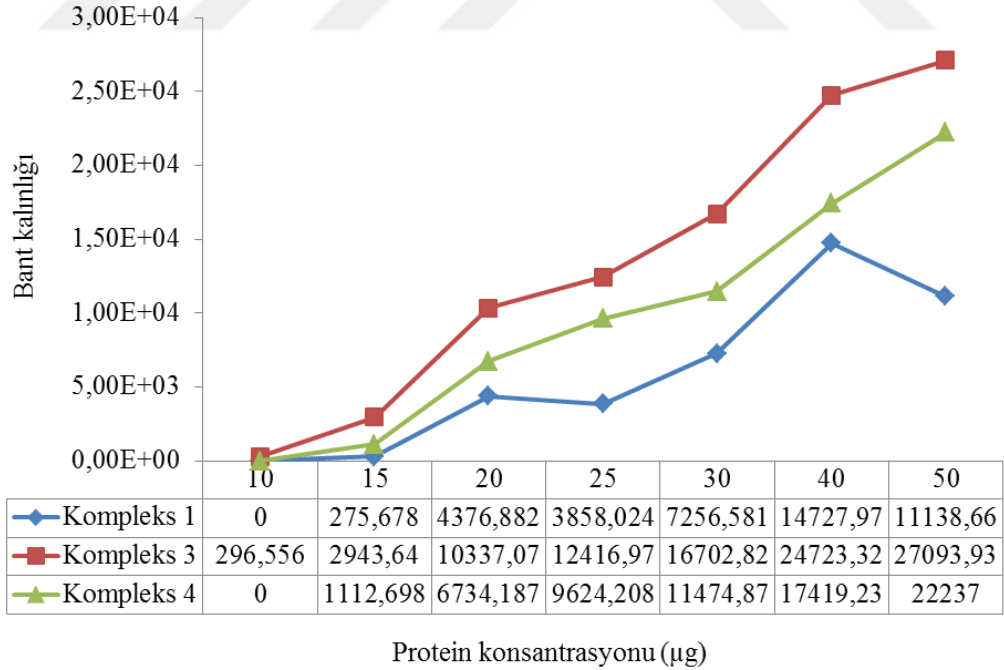
Şekil 4.7. Protein bant kalınlıklarının image J programı ile elde edilen analiz sonuçları

Kullanılan bir diğer yöntem olan BN-PAGE tekniğinde ise, protein konsantrasyonu 20 µg olacak şekilde belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlar kullanılarak bant kalınlığının analizi işlemi blue native jel kullanılarak 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 50 µg olacak şekilde örnekler hazırlanıp, Bölüm 3.2.6’de anlatıldığı şekilde elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından immünblot işlemi yapılmış ve membranlar kompleks I, III ve IV antikoları ile muamele edilmişlerdir. Elde edilen protein bant kalınlıkları Şekil 4.8’de gözlendiği gibidir.



**Şekil 4.8.** Farklı protein konsantrasyon değerlerinde kontrol hücrelerinin BN-PAGE tekniği ile analiz edilmesi

Şekil 4.8’de gösterilen bant kalınlıkları image J programı kullanılarak analiz edilmiş, analiz sonuçlarına göre çizilen grafikte, kullanılan 20  $\mu\text{g}$  konsantrasyonunun her üç kompleks proteini içinde lineer değerde olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.9) .

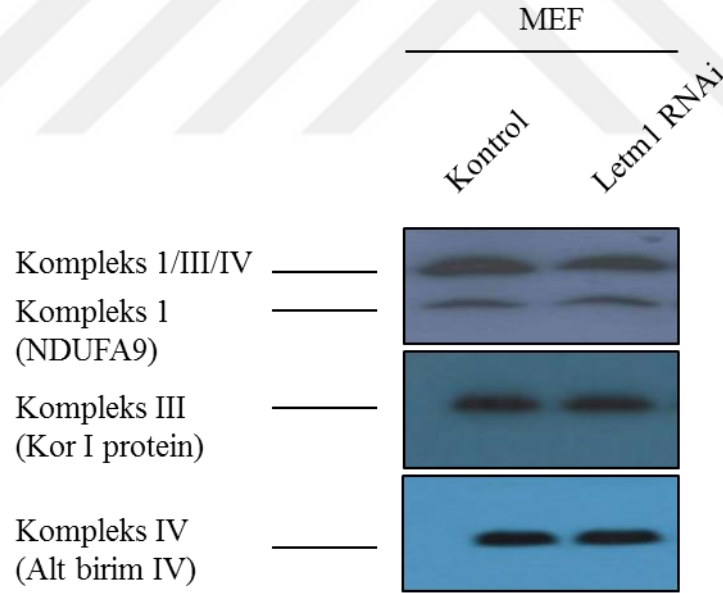


**Şekil 4.9.** Protein bant kalınlıklarının image j programı ile analiz sonuçları

## 4.5 Letm1 İfadesinin Baskılanmasının Solunum Zinciri Kompleks Proteinleri Üzerindeki Etkisinin Analiz Edilmesi

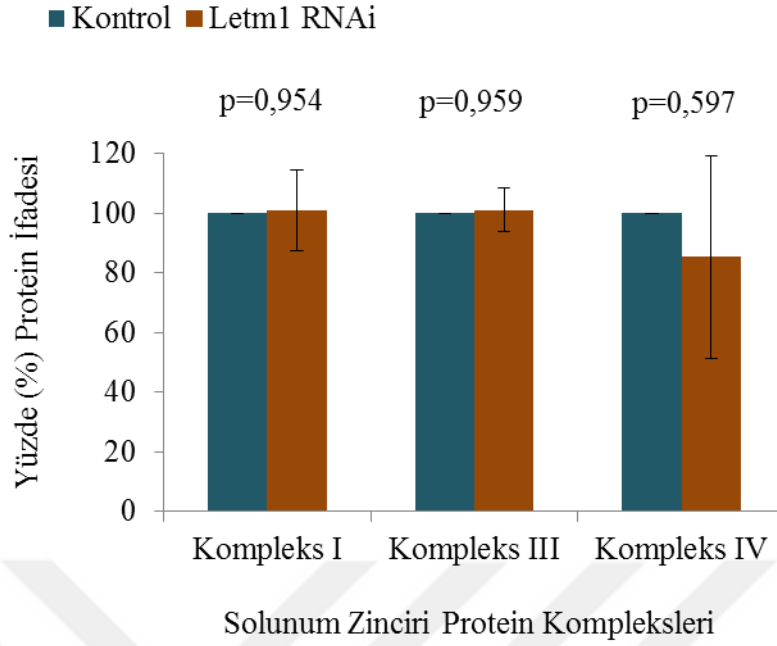
### 4.5.1 BN-PAGE yöntemi ile kompleks proteinlerin analizi

Solunum zinciri kompleks proteinleri farklı çok sayıda protein alt birimlerinin bir araya gelerek meydana getirdiği enzimatik olarak aktif yapılardır. Bu yapıların aralarındaki etkileşimin bozulmaması için kullanılan düşük iyonik güçte deterjanlar, kompleks yapıların sadece mitokondri membranından ayrılmaları sağlamakta, komplekslerin alt birimleri arasında herhangi bir denatürasyona neden olmamaktadır. Bu amaçla uygulanan BN-PAGE tekniğinde 20 µg mitokondriyal protein örnekleri 1:8 oranında digitonin ile solübilize edilip Bölüm 3.2.6'de anlatıldığı şekilde elektroforez işlemi yapılmıştır. Gece boyu transfer işleminden sonra kompleks I, III ve IV antikoru ile membran muamele edilmiş ardından görüntü alınmıştır. Elde edilen sonuçlar kapsamında kontrol grubu ile kıyaslandığında Letm1 RNAi örneklerinde herhangi bir değişimin olmadığı MEF hücrelerinde gözlemlenmiştir. Şekil 4.10'da kompleks protein ifadeleri gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Kompleks protein ifadelerinin BN-PAGE tekniği ile analizi

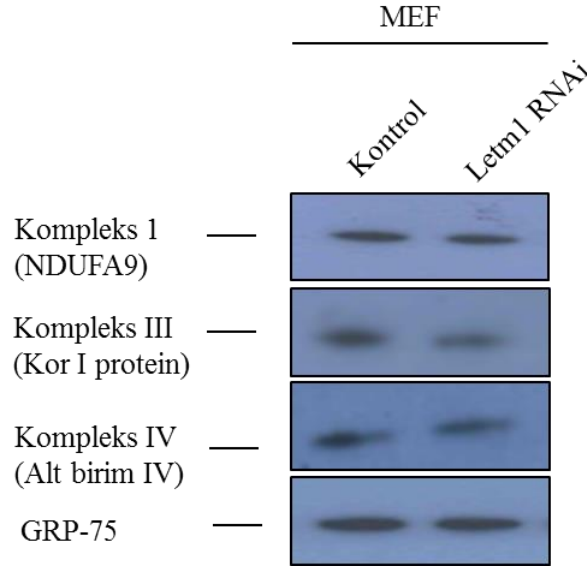
Bant kalınlıklarının analizi ise image J programı kullanılarak yapılmış ve Şekil 4.11 de grafik şeklinde verilmiştir. Elde edilen sonuçların anlamlılığı ise blok anova testi ile belirlenmiştir.



**Şekil 4.11.** BN-PAGE yöntemi sonrası kompleks protein ifadelerinin image j programı kullanılarak analiz edilmesi

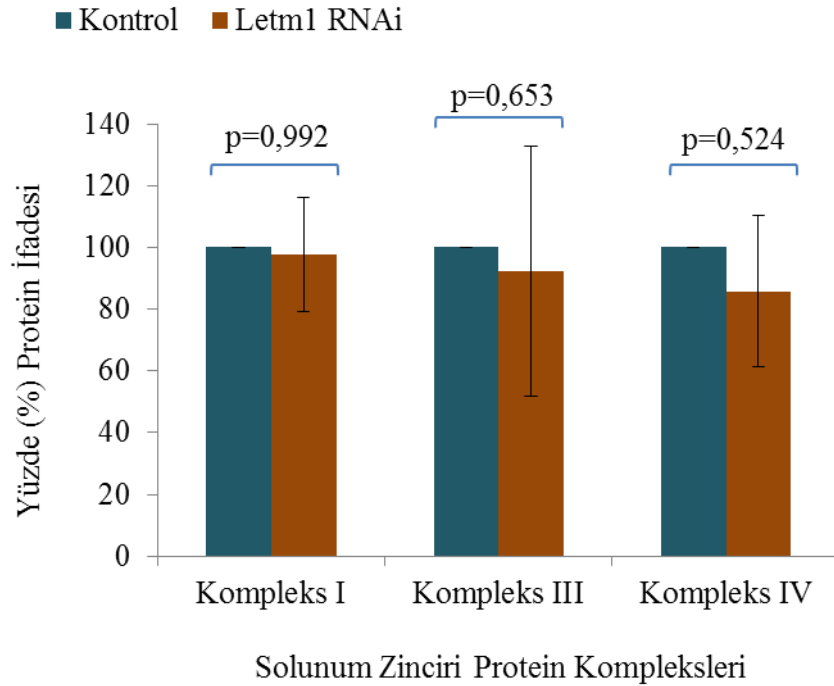
#### 4.5.2 SDS-PAGE yöntemi ile kompleks proteinlerin ifadelerini değerlendirilmesi

Kompleks proteinlerin BN-PAGE yöntemi ile analiz edilmesinden sonra, kompleks alt birimlerinin SDS-PAGE ile ifadelerine bakılmıştır. Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı şekilde mitokondriyal protein örnekleri 3 µg olacak şekilde hazırlanmış ve poliakrilamid jele yüklenmiştir. İmmünblot işlemi ise bölüm 3.2.7’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Kompleks I, III ve IV antikorumları ile membran muamele edilmiş ve protein ifadeleri kodak film kullanılarak elde edilmiştir. Kompleks I, III ve IV alt birimlerinde herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** Kompleks protein alt birimlerinin ifadelerindeki değişimin SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmesi

Bant kalınlıklarının analizi ise image J programı kullanılarak yapılmış ve şekil de grafik şeklinde verilmiştir. Elde edilen sonuçların anlamlılığı ise blok anova testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** SDS-PAGE yöntemi sonrası kompleks protein alt birim ifadelerinin image j programı kullanılarak analiz edilmesi

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyokimyasal yollardan elde edilen substratların indirgenmesi ile ortaya çıkan elektronlar, OXPHOS kompleks proteinleri aracılığı ile oksijen molekülünün suya indirgenmesi için transfer edilirken, aynı zamanda protonların iç membran boyunca dışarı ve içeri translokasyonunun da gerçekleşmesini sağlamaktadır. Protonların translokasyonu sırasında oluşan pH farklı ve membran potansiyeli, proton itici gücü oluşturup bu güç ATP sentezi, iyon transportu, mitokondriyal proteinlerin translokasyonu gibi süreçlerde rol oynamaktadır (Hatefi ve ark. 1962a, Mitchell 1966).

ATP üretiminde rol oynayan OXPHOS zinciri kompleksleri, kompleks I, II, III, IV ve kompleks V olarak adlandırılan ATP sentazdan meydana gelmektedir. Bu protein komplekslerinden I, III ve IV esas proton pompalarıdır ve elektrokimyasal gradiyentin oluşmasında rol oynarlar. Mitokondri krista membranında OXPHOS kompleks protein yapılarının yanı sıra, aynı zamanda  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  gibi iyonların geçişini sağlayan iyon kanalları ve farklı işlevlere sahip bir çok protein lokalize olmuştur. Bir bütün olarak bu yapıların mitokondri membran potansiyelinin korunmasında rol oynadıkları bilinmektedir (Nowikovsky ve ark. 2004).

Mitokondri morfolojisi üzerinde rol oynayarak, membran potansiyeli ile de ilgisinin olduğu düşünülen proteinlerden biri de Letm1 proteindir. Letm1 yüksek oranda korunmuş olan ve mitokondri iç membranında yer alan bir proteindir. İlk olarak WHS'da tanımlanmış ve tanımlanmasından sonra fonksiyonu üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda Letm1'in  $K^+/H^+$  antiportu olup, LETM1 gen ifadesinin baskılanması ile mitokondriyal hacmin arttığı, krista yapısında şekil bozukluklarının olduğu ve mitokondriyal fragmentasyon gibi çeşitli sorunların gözlemlendiği gösterilmiştir (Dimmer ve ark. 2008, Nowikovsky ve ark. 2009). Diğer bir taraftan son zamanlarda yapılan çalışmalarda Letm1'in mitokondriyal  $Ca^{+2}$  dinamiğinde rol oynadığının gösterilmesi ile Letm1'in  $Ca^{+2}/H^+$  antiportu olduğuna dair farklı çalışmalar bulunmaktadır (Tsai ve ark. 2014, Quan ve ark. 2015, Shao ve ark. 2016). Letm1'in iyon değişimi üzerindeki fonksiyonuna dair bilgiler netlik kazanmamışken, Letm1 ifade eksikliğinde mitokondriyal morfolojide bozuklukların ortaya çıkması ve membran potansiyelinin değişmesi, Letm1'in kompleks protein yapıları üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığının sorgulanmasına neden olmuştur. Letm1 homoloğu olan MDM38 mutant mayalarda kompleks ifadelerindeki değişim analiz edildiğinde, kompleks III ve IV protein ifadesinin azaldığı Frazier ve ark (2006) tarafından

gösterilmiştir. Ayrıca mayalarda gerçekleşen bu çalışma sonucunda Letm1 proteininde kompleks protein ifadeleri üzerinde rolünün olabileceği belirtilmiştir (Frazier ve ark. 2006).

Buna dair ilk olarak Dimmer ve ark. (2008) LETM1 gen ifadesinin baskılanması ile solunum zinciri kompleks proteinlerinden olan kompleks I, II, III ve V'in protein ifadesinde herhangi bir değişikliğin olmadığını HeLa hücrelerinde göstermişlerdir (Dimmer ve ark. 2008). Kompleks protein yapılarının bütünlüğünün korunmasında Letm1 protein varlığının bir öneminin olmadığını belirtmişlerdir. Ancak bir başka grubun yaptıkları çalışmada ise Letm1 ifadesinin baskılanmasının mitokondri membran potansiyelini etkileyerek, kompleks I ve IV protein ifadesinin yok denecek kadar az olup, kompleks III'ün protein ifadesinde ise azalmanın olduğu gösterilmiştir (Tamai ve ark. 2008). Letm1 inaktivasyonu arttıkça kompleks protein yapılarının bütünlüğünün bozulmasının, mitokondriyal morfolojideki diğer bozukluklara göre oldukça yavaş olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Letm1 ifadesini baskıladıklarında hücrelerin yarısında mitokondriyal morfolojide sorunlar oluşmuşken, protein kompleks yapılarının stabilitesinde herhangi bir problem saptanamamıştır. Bütün bunların değerlendirilmesi ile Letm1 baskılanması sonucu kompleks protein yapılarının stabilitesindeki değişimin hemen gözlenmemesi ve bu durumun ortaya çıkan erken etkilerin gizlenmesine neden olabileceği belirtilip, Letm1'in protein kompleks yapısı stabilitesi ile ilgisinin olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca Quan ve ark. (2015) pankreatik  $\beta$  hücrelerinde Letm1 ve mitokondriyal kalsiyum uniportunun (MCU) ifadesinin baskılanması ile, mitokondride meydana gelen  $Ca^{+2}$  alımının ve salınımının bozulduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte her iki protein ifadesinin eksikliğinde kompleks I, III ve IV protein ifadelerinin ve kompleks IV proteininin aktivitesinin de azaldığını belirtmişlerdir. Letm1 ifadesinin azalmasının pankreatik  $\beta$  hücreleri mitokondriyal kompleks proteinleri üzerindeki negatif etkisinin nedeninin ise, protein ifadesinin azalması ile ortaya çıkan artmış süperoksit seviyesinin mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına neden olduğu (Hart ve ark. 2014) ve bu durumunda mitokondriyal biyoenerjetik, respirasyon aktivitesi ve metabolizma ile segresyon arasındaki dengenin bozulmasında rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (Quan ve ark. 2015).

Yapılan bu çalışmaların mitokondriyal fonksiyon bozuklukları veya değişimleri ile karakterize kanser hücre hatlarında gerçekleştirilmiş olması ve çalışma sayısının sınırlı sayıda olması dikkati çekmektedir. Bu çalışmada Letm1 ifadesinin baskılanması sonucunda OXPHOS kompleks proeinlerinden esas proton pompaları olan I, III ve IV'ün protein ifadesinde herhangi bir değişikliğin olup olmadığı MEF hücreleri kullanılarak BN-PAGE ve SDS-PAGE tekniği ile değerlendirilmiştir.

İlk olarak Letm1 gen ifadesi transfeksiyon işlemi ile %56,2 oranında baskılanmıştır. Gen ifadesi baskılanan hücrelerde OXPHOS kompleks protein ifadelerinin analizi için BN-PAGE tekniği kullanılmıştır. BN-PAGE tekniğindeki önemli noktalardan biri doğru deterjan seçimidir. Bu yüzden literatürde sıklıkla kullanılan iyonik olmayan deterjanlardan olan DDM ve digitonin kullanılarak optimizasyon işlemi yapılmıştır. DDM ile farklı konsantrasyonlarda solubilize edilen mitokondriyal protein örneklerinde protein agregatlarının oluştuğu ve örneklerin western blot tekniği sonrasında yapılan analizlerde nokta şeklinde bantların olduğu gözlemlenmiştir. Digitoninin diğer iyonik olmayan deterjanlara göre kullanım konsantrasyonu açısından geniş bir konsantrasyon aralığına sahip olduğu literatürde yer almaktadır. Digitonin konsantrasyon aralığı 1:10, 1:8, 1:6 g protein/g deterjan olacak şekilde belirlenip farklı konsantrasyonlarda protein örnekleri ile solubilize edilmiştir. Protein bant kalınlıkları değerlendirildiğinde, protein örneklerinin konsantrasyonunun 20 µg olmasına ve 1:8 oranında digitonin ile solubilize edilmesine karar verilmiştir. Kullanılan mitokondriyal protein konsantrasyonlarının SDS-PAGE ve BN-PAGE tekniğinde lineer değerler arasında olup olmadığının kontrolü için farklı konsantrasyonlarda mitokondriyal proteinler her iki teknikte kullanılarak analiz edilmiştir. Kullanılan OXPHOS kompleks protein konsantrasyonlarının her iki teknik içinde lineer değerler arasında kaldığı gösterilmiştir.

Yapılan optimizasyon işlemleri sonrasında OXPHOS kompleks protein ifadeleri BN-PAGE tekniği ile analiz edildiğinde, Letm1 siRNA grubunda kompleks I ve III'ün protein ifadesinin kontrol grubu ile aynı düzeyde olduğu gösterilmiştir. Ancak Letm1 siRNA grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında kompleks IV ifadesi %15 oranında azalmıştır. Bant kalınlıklarının istatistiksel olarak analizi yapıldığında bu farkın anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçların desteklenmesi amacı ile aynı zamanda proteinlerin denatürasyonunu sağlayan yöntem olan SDS-PAGE yöntemi kullanılarak, kompleks protein alt birimlerine de bakılmıştır. SDS-PAGE örneklerinde Letm1 siRNA grubunda kompleks I, III ve IV'ün, kontrol grubu ile kıyaslandığında protein ifadelerinde anlamlı bir değişikliğin olmadığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak Letm1 gen ifadesi baskılanan MEF hücrelerinde OXPHOS zinciri kompleks proteinlerinden olan kompleks I, III ve IV'ün protein ifadesinde kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir değişikliğin olmadığı hem SDS-PAGE hem de BN-PAGE tekniği kullanılarak istatistiksel olarak gösterilmiştir. Yukarıda da kısa özetlenen çalışmalardan farklı olarak elde edilen bu sonuçların nedenlerinden birisinin kullanılan hücre hattının kanser hücre hattı olmaması olabilir. Ayrıca farklı laboratuvarların kullandıkları farklı transfeksiyon

yöntemleri ve nihayetinde LETM1 gen ifadesinde farklı düzeylerde azalma sağlamaları da bu farklılığın oluşmasında rol oynayabilir. Diğer taraftan Letm1 gen ifadesinin baskılanması sonucunda protein aktivitesi üzerinde herhangi bir değişikliğin olup olmadığı ise bilinmemektedir. Kompleks yapılar enzimatik olarak aktif yapılar olduklarından protein aktivasyonlarının da belirlenmesinin bu süreçte önemli rolü olduğu düşünülmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

- Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*, 32:529-539.
- Alam MR, Groschner LN, Parichatikanond W, Kuo L, Bondarenko AI, Rost R, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF (2012). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake 1 (MICU1) and mitochondrial ca<sup>2+</sup> uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, 287:34445-34454.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2015). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 1465, New York.
- Althoff T, Mills DJ, Popot JL, Kuhlbrandt W (2011). Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>. *The EMBO journal*, 30:4652-4664.
- Altmann R (1890). *Die Elementarorganismen Und Ihre Beziehungen Zu Den Zellen*. Leipzig: Veit & comp., 145
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457-465.
- Angerer H, Zwicker K, Wumaier Z, Sokolova L, Heide H, Steger M, Kaiser S, Nubel E, Brutschy B, Radermacher M, Brandt U, Zickermann V (2011). A scaffold of accessory subunits links the peripheral arm and the distal proton-pumping module of mitochondrial complex I. *Biochem J*, 437:279-288.
- Banerjee P, Joo JB, Buse JT, Dawson G (1995). Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. *Chem Phys Lipids*, 77:65-78.
- Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rotig A, Rustin P, Tzagoloff A (2002). Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene*, 286:53-63.
- Bayrhuber M, Meins T, Habeck M, Becker S, Giller K, Villinger S, Vonnrhein C, Griesinger C, Zweckstetter M, Zeth K (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:15370-15375.
- Belevich I, Bloch DA, Belevich N, Wikstrom M, Verkhovsky MI (2007). Exploring the proton pump mechanism of cytochrome c oxidase in real time. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:2685-2690.
- Benda C (1898). Ueber die spermatogenese der verbebraten und höherer evertabrateten, II. Theil: Die histogenese der Spermien. *Arch Anat Physiol*:393-398.
- Bernardi P (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 79:1127-1155.

- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:517-529.
- Caggese C, Ragone G, Perrini B, Moschetti R, De Pinto V, Caizzi R, Barsanti P (1999). Identification of nuclear genes encoding mitochondrial proteins: isolation of a collection of *D. melanogaster* cDNAs homologous to sequences in the Human Gene Index database. *Mol Gen Genet*, 261:64-70.
- Claude A, Fullam EF (1945). An Electron Microscope Study of Isolated Mitochondria : Method and Preliminary Results. *J Exp Med*, 81:51-62.
- 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.
- Ellis RJ (2001). Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*, 26:597-604.
- Ende S, Fuhry M, Pak SJ, Zabel BU, Winterpacht A (1999). LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2+)-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics*, 60:218-225.
- Ernster L, Schatz G (1981). Mitochondria: a historical review. *The Journal of cell biology*, 91:227s-255s.
- Eubel H, Braun HP, Millar AH (2005). Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods*, 1:11.
- Frazier AE, Taylor RD, Mick DU, Warscheid B, Stoepel N, Meyer HE, Ryan MT, Guiard B, Rehling P (2006). Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol*, 172:553-564.
- Frezza C, Cipolat S, Scorrano L (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc*, 2:287-295.
- Froschauer E, Nowikovsky K, Schweyen RJ (2005). Electroneutral K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in mitochondrial membrane vesicles involves Yol027/Letm1 proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1711:41-48.
- Fye WB (1999). Rudolf Albert von Koelliker. *Clin Cardiol*, 22:376-377.
- Hajnoczky G, Csordas G (2010). Calcium signalling: fishing out molecules of mitochondrial calcium transport. *Current biology : CB*, 20:R888-891.
- Hart L, Rauch A, Carr AM, Vermeesch JR, O'Driscoll M (2014). LETM1 haploinsufficiency causes mitochondrial defects in cells from humans with Wolf-Hirschhorn syndrome:

- implications for dissecting the underlying pathomechanisms in this condition. *Dis Model Mech*, 7:535-545.
- Hasegawa A, van der Blik 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.
- Hatefi Y (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual review of biochemistry*, 54:1015-1069.
- Hatefi Y, Haavik AG, Griffiths DE (1962a). Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase. *J Biol Chem*, 237:1676-1680.
- Hatefi Y, Haavik AG, Griffiths DE (1962b). Studies on the electron transfer system. XLI. Reduced coenzyme Q (QH<sub>2</sub>)-cytochrome c reductase. *J Biol Chem*, 237:1681-1685.
- Helms V (2002). Attraction within the membrane. Forces behind transmembrane protein folding and supramolecular complex assembly. *EMBO Rep*, 3:1133-1138.
- Henderson NS, Nijtmans LG, Lindsay JG, Lamantea E, Zeviani M, Holt IJ (2000). Separation of intact pyruvate dehydrogenase complex using blue native agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 21:2925-2931.
- Hirschhorn K, Cooper HL, Firschein IL (1965). Deletion of short arms of chromosome 4-5 in a child with defects of midline fusion. *Humangenetik*, 1:479-482.
- Jiang D, Zhao L, Clapham DE (2009). Genome-wide RNAi screen identifies *Letm1* as a mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Science*, 326:144-147.
- Krause F (2006). Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis*, 27:2759-2781.
- Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT, McKenzie M (2009). Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochim Biophys Acta*, 1793:78-88.
- Li Y, Park JS, Deng JH, Bai Y (2006). Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J Bioenerg Biomembr*, 38:283-291.
- Lichter T (2015). *Molecular Considerations and Evolving Surgical Management Issues in the Treatment of Patients with a Brain Tumor*. InTechs, 432, New York.
- Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:6803-6808.
- Mitchell P (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191:144-148.

- Mitchell P (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 41:445-502.
- Nowikovsky K, Bernardi P (2014). LETM1 in mitochondrial cation transport. *Front Physiol*, 5:83.
- 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<sup>+</sup> homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem*, 279:30307-30315.
- Nowikovsky K, Schweyen RJ, Bernardi P (2009). Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochimica et biophysica acta*, 1787:345-350.
- Palade GE (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 1:188-211.
- Palade GE (1961). Blood capillaries of the heart and other organs. *Circulation*, 24:368-388.
- Pfanner N, Neupert W (1987). Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *J Biol Chem*, 262:7528-7536.
- Quan X, Nguyen TT, Choi SK, Xu S, Das R, Cha SK, Kim N, Han J, Wiederkehr A, Wollheim CB, Park KS (2015). Essential role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter in the generation of mitochondrial pH gradient and metabolism-secretion coupling in insulin-releasing cells. *J Biol Chem*, 290:4086-4096.
- 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.
- Reisinger V, Eichacker LA (2008). Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *J Proteomics*, 71:277-283.
- Sazanov LA (2015). A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16:375-388.
- Schagger H, von Jagow G (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 199:223-231.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9:671-675.
- Shao J, Fu Z, Ji Y, Guan X, Guo S, Ding Z, Yang X, Cong Y, Shen Y (2016). Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) forms a Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Sci Rep*, 6:34174.
- Sjostrand FS (1953). Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature*, 171:30-32.

- Speers AE, Wu CC (2007). Proteomics of integral membrane proteins--theory and application. *Chem Rev*, 107:3687-3714.
- Szabo I, Leanza L, Gulbins E, Zoratti M (2012). Physiology of potassium channels in the inner membrane of mitochondria. *Pflugers Arch*, 463:231-246.
- Taanman JW (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*, 1410:103-123.
- 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.
- Tsai MF, Jiang D, Zhao L, Clapham D, Miller C (2014). Functional reconstitution of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Letm1. *J Gen Physiol*, 143:67-73.
- Tzagoloff A, MacLennan DH (1965). Studies of the electron-transfer system. LXIV. Role of phospholipid in cytochrome oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 99:476-485.
- 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 Ca<sup>2+</sup> uptake pathways. *J Biol Chem*, 286:28444-28455.
- Wallin E, von Heijne G (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, 7:1029-1038.
- Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V (2016). Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta*, 1857:902-914.
- Wittig I, Schagger H (2008). Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*, 8:3974-3990.
- Wolstenholme DR (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol*, 141:173-216.
- Wright TJ, Ricke DO, Denison K, Abmayr S, Cotter PD, Hirschhorn K, Keinanen M, McDonald-McGinn D, Somer M, Spinner N, Yang-Feng T, Zackai E, Altherr MR (1997). A transcript map of the newly defined 165 kb Wolf-Hirschhorn syndrome critical region. *Human molecular genetics*, 6:317-324.
- Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J (1997). Crystal structure of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from bovine heart mitochondria. *Science*, 277:60-66.

## ÖZGEÇMİŞ

Şeyma Demirkese 1990 yılında İstanbul da doğdu. 2008 yılında Çorlu Mehmet Akif Ersoy Anadolu lisesinde eğitimini tamamladıktan bir yıl sonra İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü burslu kazandı. 2013 yılında Lisans eğitimini tamamladıktan sonra 2013-2015 yılları arasında Yeditepe üniversitesinde Doktora programında yer aldı. 2015-2016 yılları arasında TÜBİTAK'ta bursiyer olarak devam etti. 2016 yılında Namık Kemal Üniversitesi Biyoloji bölümüne yatay geçiş yaparak halen eğitimine devam etmektedir.

2011-2012 lisans eğitimi sırasında "MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri Roskovitin ve Purvalanol A Tarafından Tetiklenen Poliamin Katabolizması ve Apoptotik Düzenlemede NF- $\kappa$ B'nin Rolü" adlı 2209 kodlu TÜBİTAK projesinde araştırmacı olarak görev almıştır.

2011-2013 yılları arasında gerçekleştirdiği çalışma kapsamında 2015 yılında Turkish Journal of Biology dergisinde "CDK inhibitors-induced SSAT expression requires NF- $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$  in MCF-7 breast cancer cells" adlı makalesi yayınlanmıştır.

2012 yılında gerçekleştirilen "Polyamines: Biological and Clinical Perspectives" başlıklı uluslararası kongrede "PPAR  $\gamma$  is the critical upstream factor in cyclin dependent kinase inhibitors, Roscovitine and Purvalanol A - induced SSAT upregulation in MCF-7 cells" başlıklı poster sunmuştur.

2012-2013 yıllarında "Siklooksijenaz-2 inhibitörü olan diklofenak sodyumun, kolon kanseri hücrelerinde poliamin katabolizmasına etkisinin araştırılması" adlı lisans tez çalışmasını tamamlamıştır.

2015 yılında "Cartilage Regeneration of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Novel Chitosan-Based Hydrogel Scaffold" adlı çalışmasını poster sunumu olarak 2.si düzenlenen "Stem Cell and Cellular Therapies" başlıklı uluslararası kongrede sunmuştur.

2016 yılında SANKO üniversitesinde gerçekleştirilen, "Innovation in Medicine Summit-2" başlıklı kongrede "Cartilage regeneration of human adipose-derived mesenchymal stem cells on hydrogels." adlı poster bildirisi bulunmaktadır.

2017 yılında Türk Biyokimya Derneği tarafından düzenlenen Uluslararası Biyokimya Kongresinde “LETM1 Baskılanmasının Oksidatif Stres Üzerindeki Rolü” başlıklı sözlü bildiri sunmuştur.

2017 yılında Almanya, Berlin’ de düzenlenen “8th World Congress on Targeting Mitochondria” başlıklı uluslararası kongrede sunulan “Melatonin reverses oxidative stress in LETM1 silenced mouse embryonic fibroblast cells” başlıklı posterde yer almıştır.

2016 yılından itibaren “ LETM1-baskılanmış hücrelerde oksidatif stres ve buna bağlı mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının melatonin uygulaması ile iyileştirilmesi” başlıklı TÜBİTAK 1001 projesinde Bursiyer olarak yer almaktadır.

2010-2011 yıllarında İstanbul Kültür Üniversitesi Başarı ödülü, 2011-2012 yıllarında onur belgesi almıştır. 2013 bahar, 2014 bahar, 2014 güz döneminde Yeditepe Üniversitesinde Moleküler Biyoloji Teknikleri II kodlu Laboratuvar dersinde asistan olarak yer almıştır.