

KALBE ÖZGÜ “SUBTRACTİVE” HİBRİDİZASYON CDNA KÜTÜPHANESİNDEN ELDE EDİLEN *MFN2*, *MT-ATP6*, *MIDN* VE *KPNB1* GENLERİNİN YETİŞKİN, NEONATAL VE EMBRİYONİK DOKULARDAKİ EKSPRESYON ANALİZİ

EXPRESSION ANALYSIS OF MFN2, MT-ATP6, MIDN AND KPNB1 GENES ISOLATED FROM HEART-SPECIFIC SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION CDNA LIBRARY IN ADULT, NEONATAL AND EMBRYONIC TISSUES

Bilge Özsait-Selçuk, Evrim Kömürcü-Bayrak, Muhammed Abdulvahid Kalkan, Gizem Çelebi, Nihan Erginel-Ünaltuna

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı

Bu çalışma İ.Ü. BAP Birimi tarafından desteklenmiştir.
(Proje no: T-1063/19022001, T-902/02062006, BYP-11540, BYP-3135)

Sorumlu Yazar : Bilge Özsait-Selçuk

Yazışma adresi : İstanbul Üniversitesi

Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,

Genetik Anabilim Dalı, Vakıf Gureba Cad.

34080, Şehremini/İSTANBUL

Tel : 0532 381 2780

E-mail adres : ozsaitb@istanbul.edu.tr

ÖZET

Amaç: Eş zamanlı eksprese olan genlerin belirlenmesinde ve farklılaşmış gen ekspresyonunun tanımlanmasında dokuya özgü moleküler yolların belirlenmesi önem taşımaktadır. Daha önceki çalışmalarımızda, “subtractive” hibridizasyon cDNA kütüphanesi (SHL) oluşturulmuş ve ardından bu transkriptlerin kalp dokusundaki rollerinin tanımlanabilmesi amacı ile çok sayıda fonksiyonel çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmadaki amacımız, SHL’den seçilen dört transkriptin çoklu doku ve farklı evrelerdeki total embriyo dokularındaki ekspresyon özelliklerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Toplam 16 farklı yetişkin BALB/c fare dokusu, neonatal kalp ve iskelet kası dokusu ve 5 farklı embriyonik döneme ait dokularda total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. SHL’den elde edilen dört genin, mitofusin-2 (*Mfn2*), mitokondriyal ATP sentaz 6 (*mt-Atp6*), midnolin (*Midn*) ve karyoferin (importin) beta 1 (*Kpnb1*) genlerinin qRT-PCR yöntemi ile gen ekspresyon analizi yapıldı. Ek olarak, *mt-Atp6* geninin ekspresyonu çoklu doku Northern blot analizi ile araştırıldı.

Bulgular: Araştırılan dört transkriptin neonatal dönemde iskelet kasına oranla kalp dokusundaki ekspresyon seviyelerinin daha fazla olduğu tespit edildi. Yetişkin kalp ve iskelet dokularında da benzer yapı gözlemlendi. Diğer yandan, *mt-Atp6* ve *Mfn2* genlerinin diğer tüm dokular ile karşılaştırıldığında kalp dokusunda daha fazla ekspresyonunun olduğu belirlendi.

Sonuç: Farklı dokular ve embriyonik dönemler arasında farklılaşmış gen ekspresyonlarının olması, bu dört transkriptin hücre fizyolojisinde önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. SHL’den izole edilen bu transkriptlerin seviyelerinin sağlıklı dokularda ve embriyonik gelişim dönemlerinde gösterilmesi, kalp fizyolojisi ile ilişkili metabolik yollardaki işlevlerinin tanımlanması için önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: “Subtractive” hibridizasyon, qRT-PCR, *Mfn2*, *mt-Atp6*, *Midn*, *Kpnb1*.

ABSTRACT

Objective: Identification of differential gene expression and determination of co-expressed genes is important in the characterization of tissue specific molecular pathways. In our previous studies, we constructed a heart-specific subtractive hybridization cDNA library (SHL) and conducted several functional studies in order to analyze the role of the isolated transcripts in heart tissue. In this study, our aim was to investigate the expression patterns of four selected transcripts from SHL in multiple tissues and, total embryos tissues of different stages.

Materials and Methods: Total RNA isolation and cDNA synthesis were performed from 16 different tissues, 5 different stages of total embryos and neonatal heart and skeletal muscle of BALB/c mice. The expression profiles of SHL isolated four genes, mitofusin-2 (*Mfn2*), mitochondrial ATP synthase 6 (*mt-Atp6*), midnolin (*Midn*) and karyopherin (importin) beta 1 (*Kpnb1*) were analyzed by quantitative real time PCR. Additionally, Northern blot analysis of *mt-Atp6* in multiple tissues was performed.

Results: Gene expression levels of the four transcripts were higher in neonatal heart than in neonatal skeletal muscle. Similar pattern was observed in adult heart and skeletal muscle. However, *mt-Atp6* and *Mfn2* genes were over-expressed in heart tissue compared to all other tissues and embryonic stages.

Conclusion: Differential expression of the transcripts among different tissues as well as in different embryonic stages suggests that these four genes have crucial roles in cellular physiology. Demonstration of the gene expression levels of the transcripts in the SHL in healthy tissues and embryonic development will contribute to the identification of the function of the genes in related metabolic pathways.

Keywords: Subtractive hybridization, qRT-PCR, *Mfn2*, *mt-Atp6*, *Midn*, *Kpnb1*.

Giriş:

Doku veya hücre tipine özgü transkript profili, o doku veya hücrenin yapısal ve işlevsel özelliğini yansıtmaktadır. Gelişimsel evrelerde ve yetişkin dokularda gen ekspresyonunun kontrolü çok çeşitli hücresel yollarla ile düzenlenmektedir. Dokuya özgü gen ekspresyonunda başkalaşım olması (değişmesi, kaybolması, ortaya çıkması), çeşitli moleküler patolojiler ve kardiyovasküler sistem hastalıkları da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir (1, 2).

Gen ekspresyonunun analizinde ve yeni genlerin tespit edilmesinde çok farklı yöntemler kullanılmaktadır (3). Diğer yandan, yöntem seçiminde çalışmanın yapısı ve amacı önem taşımaktadır. "Subtractive" Hibridizasyon, doku veya hücreler arasında ekspresyon düzeyinde farklılık olan genlerin belirlenmesinde oldukça etkin bir yaklaşımdır (4, 5). Temel olarak, farklı kaynaklardan elde edilen cDNA topluluğunun birbirine hibridizasyonu ve hibridize olmayanların (dokuya özgü olanlar) hibridize olanlardan (ortak olarak bulunanlar) ayrılması esasına dayanmaktadır (4). Bu yöntem, çeşitli dokularda eksprese olan genlerin tanımlanmasında kullanılmıştır (4-8). Ekibimiz tarafından yürütülen önceki çalışmalarda, kalbe özgü transkriptleri belirlemek amacı ile BALB/c fare kalp dokusuna özgü bir "subtractive" hibridizasyon cDNA kütüphanesi (SHL) oluşturulmuştur (5). Daha sonraki çalışmalarda, bu kütüphaneden seçilen genlerin işlevleri embriyonik, neonatal ve yetişkin dönemlerde ve hücre kültürü modellerinde (5, 9, 10) araştırılmıştır.

Bu çalışmada amacımız, SHL'den seçilen dört geninin, mitofusin-2 (*Mfn2*), mitokondriyal ATP sentaz 6 (*mt-Atp6*), midnolin (*Midn*) ve karyoferin (importin) beta 1 (*Kpnb1*) genlerinin, yetişkin, neonatal ve embriyonik evrelerdeki ekspresyon seviyelerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem:**Biyoinformatik analiz**

Araştırılan *Mfn2*, *mt-Atp6*, *Midn* ve *Kpnb1* genleri, kalbe özgü SHL'de yüksek oranda temsil edilmelerinin yanı sıra biyoinformatik analizler ve literatür taramaları sonucuna göre seçilmişlerdir. Biyoinformatik analizlerde NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Ensembl (<http://www.ensembl.org>), "Mouse Genom Informatics" (MGI, <http://www.informatics.jax.org>) ve ayrıca "Functional Annotation of Mouse" (FANTOM-<http://www.gsc.riken.go.jp/e/FANTOM>) organizasyonlarının internet erişimine açık bilgi bankalarından yararlanıldı. Yolak analizlerinde, MGI, KEGG ("Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes", <http://www.genome.jp/kegg/>), Biocarta (<http://www.biocarta.com/>), ProteinLounge (www.proteinlounge.com) gibi internet erişimli yolak ve protein bilgi bankalarından yararlanıldı.

Deneysel hayvanlar ve dokular

Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarımızda kurban edilmiş BALB/c farelerin dokuları kullanıldı (5, 9, 10). Bu çalışmalarda dokular, servikal dislokasyon ile sakrifikasyonun hemen ardından dissekte edilmiştir. Buz soğukluğunda RNaz içermeyen fosfat tamponlu solusyonda (PBS)'de iki kere yıkandıktan sonra sıvı azotta şok dondurulmuş ve RNA izolasyonu yapılabildiği kadar -70°C'de saklanmıştır. Deneysel hayvanlar uygulamaları etik kurallara uygun şekilde yürütülmüştür (İstanbul Üniversitesi Deneysel Araştırma Enstitüsü Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu (DHEK) 3.01.2006 tarih ve 05 no'lu Etik Kurul Kararı).

Deneysel hayvanlar ve dokular

RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Toplam 16 yetişkin BALB/c fare dokusu (kalp, iskelet kası, akciğer, karaciğer, beyin, dalak, böbrek, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak, mesane, testis, seminal vesikül, over, plasenta, uterus), beş farklı embriyonik evreden (E7, E9, E10,5, E13, E15) total embriyo dokusu ve neonatal dönem kalp ve iskelet kası dokusundan total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon, ToTALLY RNA Total RNA Isolation Kit (Ambion, USA) kullanılarak, minör değişiklikler ile ticari kitin önerdiği şekilde yürütüldü. RNA kalitesi ve miktarı Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak değerlendirildi. cDNA sentezi 1 µg total RNA ve SuperScript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, USA) kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi

SHL'den izole edilen *Mfn2*, *mt-Atp6*, *Midn* ve *Kpnb1* genlerinin dokulardaki ekspresyon seviyeleri kan-

titatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi ile LightCycler 480 (Roche Applied Science) cihazı ve 480 SYBR Green I Master Kit (Roche, Mannheim, Germany) kullanılarak analiz edildi. Gene özgü primerlerin tasarlanması manuel olarak Oligoanalyzer 3.1 (IDT Technologies, <http://www.idtdna.com>) ve GeneWalker (Cybergene AB, <http://www.cybergene.se/primerdesign/genewalker/genewalker11.html>) algoritmaları kullanılarak yapıldı. Primerlerin dizi homolojileri BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ve NCBI Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) veritabanlarında karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Primer dizileri Tablo 1’de verilmiştir.

Gen ekspresyon datasının normalizasyonu için gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (*Gapdh*) gen ekspresyon seviyelerinin ortalaması kullanıldı. Tüm örnekler çift olarak çalışıldı ve daha ileri analizler için Ct (“threshold cycle”) değerlerinin ortalaması kullanıldı. Ekspresyon datasının analizi karşılaştırmalı Ct metodu (2^{-DDCt}) metodu ile yapıldı ve sonuçlar relatif kantasyon olarak verildi. Çoğaltılan ürünlerin özgüllüğü çözülme eğrisi analizi ile gerçekleştirildi.

Ek olarak, Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; 11) veritabanındaki mikroarray sonuçları taranarak araştırılan dört transkriptin farklı dokulardaki ekspresyon seviyeleri elde ettiğimiz sonuçlar ile karşılaştırıldı.

Northern blot analizi

mt-ATP6 genin çoklu doku Northern Blotlama analizi, Northern Max Kit (Ambion) kullanılarak ve ticari kit tarafından önerilen prosedürlerde minör uyarlamalar yapılarak yürütüldü. Kısaca, dokulara ait 10-15 µg total RNA örneği agaroz jelde yürütüldükten sonra gece boyu nitroselülöz membrana blotlandı ve hemen ardından ultraviyole ile membrana bağlandı. *mt-Atp6* probu digoxigenin-11-UTP alkali-labile (Roche Applied Sciences, Germany) kiti kullanılarak işaretlendi. Deteksiyon için CSPD ve DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche Applied Sciences) kullanıldı. Sonuçların görüntülenmesi için otoradiyografi yapıldı. Sonuçların normalizasyonu için 18S ve 28S ribozomal RNA’ların elektroforez band yoğunlukları kullanıldı.

Bulgular:

Mfn2, *mt-Atp6*, *Midn* ve *Kpnb1* transkriptlerinin qRT-PCR yöntemi ile analizi

SHL’den seçilen dört transkriptin ekspresyonları, 14 yetişkin dokusunda, 4 embriyonik evre dokusunda ve neonatal dönem kalp ve iskelet kası dokularında araştırıldı. Araştırılan tüm genlerde yetişkin ve neonatal dönemde iskelet kasına oranla kalp kasında daha yüksek oranda ekspresyon olduğu tespit edildi (Şekil 1-4).

mt-ATP6 geninin, diğer dokular ile karşılaştırıldığında yetişkin kalp dokusunda en yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 1). *Mfn2* geni için de benzer sonuçlar elde edildi (Şekil 2). Diğer yandan, araştırılan dokular arasında *Midn* transkriptinin en yüksek oranda kalın bağırsakta (%13,8; Şekil 3) ve *Kpnb1* transkriptinin ise overde (%14,2; Şekil 4) ekspresyonunun olduğu gözlemlendi.

Ek olarak, araştırdığımız transkriptlerin GEO mikroarray deneylerinden elde edilen ekspresyon bilgileri Şekil 1-4’de sunulmuştur.

mt-Atp6 transkriptinin Northern blot analizi

Kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi ile araştırılan genler arasında kalpte en yüksek oranda ekspresyonu olduğu tespit edilen *mt-ATP6* geninin çoklu doku Northern blot analizi yapıldı. Toplam 16 dokuda (kalp, iskelet kası, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek, beyin, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak, testis, seminal vesikül, over, uterus, plasenta ve E10,5 total embriyo) Northern blotlama yöntemi ile *mt-Atp6* geninin ekspresyon seviyeleri araştırıldı. Dokuların seçiminde yöntem için gerekli olan uygun yüksek RNA kalitesi ve toplam miktarı (µg) rol oynadı. Bu çalışmada farede yaklaşık olarak 1.9 kb uzunluğunda doku-spesifik bir *mt-Atp6* izoformu tespit edildi. Çoklu doku Northern blotlama sonucunda, bu izoformun kalp dokusundaki doku-spesifik ekspresyonu belirgin olarak gözlenmektedir (Şekil 5).

Tartışma ve Sonuç:

Bu çalışmada kalp dokusunda özgü SHL'den izole edilen dört transkriptin BALB/c ırkı farelerde yetişkin, neonatal ve embriyonik dönemlerde çeşitli dokulardaki ekspresyonları araştırılmıştır. Transkriptler arasında *mt-ATP6* ve *Mfn2* genlerinin yetişkin dokular arasında en yüksek oranda kalp kasında ekspresyonunun olduğu gözlemlendi. Ek olarak, Northern blot analizinde *mt-ATP6* transkriptinin yine kalp kasında yüksek oranda ekspresyonu olan doku-spesifik bir izoformu tespit edildi.

ATP6, oksidatif fosforilasyon sisteminde ATP sentezini sağlayan F_0F_1 ATPaz'ın (kompleks V) mitokondriden kodlanan bir alt birimidir. Kalp kası yüksek enerji ihtiyacı olan bir doku olması nedeni ile mitokondriyal disfonksiyonlardan olumsuz etkilenmektedir. Kalp kasında yüksek oranda ekspresyonunun olduğu gösterilen (12) *mt-ATP6*'nın mutasyonu infantil hipertropik kardiyomyopati (OMIM: 500006) ile ilişkilendirilmiştir (13). Daha önceki yayınlarla ve GEO bilgileri ile aynı doğrultuda olarak, kalbe özgü SHL kütüphanesinden elde ettiğimiz *mt-ATP6* transkriptinin, diğer dokular ile karşılaştırıldığında yetişkin kalp dokusunda daha yüksek oranda ekspresyonunun olduğunu tespit ettik. Ek olarak, çoklu doku Northern blot analizi sonuçlarımız qRT-PCR sonuçlarını doğrulamaktadır. Bu analizde tespit edilen yaklaşık 1.9kb uzunluğundaki doku-spesifik izoformun kalbin yüksek enerji ihtiyacını karşılamaya yönelik bir moleküler mekanizma ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Kalp kasında yüksek oranda ekspresyonunu tespit ettiğimiz bir diğer SHL transkripti *Mfn2*'dir. Daha önceki çalışmalarımızda *Mfn2* geninin değişik dönemlerdeki total fare embriyolarında ve embriyonik kalp dokularında ekspresyon analizini yapmış ve en yüksek oranda 13 günlük kalp dokusunda ekspresyonunun olduğunu tespit etmiştik (9). Mitokondri morfolojisi ve dinamiğinin düzenlenmesinde yer alan *Mfn2* proteini (14), kas, karaciğer ve hipotalamik nöronlarda enerji metabolizmasını ve insülin sinyallemesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır (15). Ek olarak endoplazmik retikulum stresinin modülasyonu ile ilişkili moleküler mekanizmalarda yer aldığı gösterilmiştir (16). Mitokondri dinamiğinin dü-

zenlenmesine eşlik eden Drp-1 ve *Mfn2*'nin dis-regülasyonu kalp yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir (17). *Mfn2* geninin çeşitli mutasyonları aynı zamanda Charcot-Marie-Tooth tip 2 hastalığı ile de ilişkilendirilmiştir (18).

Midnolin, ubiquitin benzeri domaini olan ve gelişimsel olarak düzenlenen nükleolar bir proteindir (19). Orijinal olarak gelişmekte olan fare embriyolarının mezensefalonunda tespit edilmekle beraber hücre içindeki fonksiyonu henüz bilinmemektedir (19). *Midn* geninin yetişkin dönemde kalp, akciğer, karaciğer ve böbrek gibi çok sayıda dokuda ekspresyonu gözlenirken, embriyonik dönemde bu dokularda ekspresyonu bulunmamaktadır (19). Bu bulgular, *Midn* geninin embriyonik ve yetişkin dönemlerde farklı mekanizmalar ile düzenlendiğini önermektedir. Kalbe özgü SHL'den izole ettiğimiz *Midn* geninin, kalpteki işlevi henüz kesin olarak gösterilmiş değildir. *Midn* geninin kalpteki olası fonksiyonunu araştırmak amacı ile daha önce yürüttüğümüz deneylerde primer neonatal BALB/c fare kardiyomyoblast hücrelerinde *Midn* genini siRNA transkripsiyonu ile sessizleştirerek, *Midn* ile ilişkili olan genleri araştırmış ve hücrel stres ile ilişkili bazı genler ile ilişkisini tespit etmiştik (10). Aynı çalışmada, *Midn* geninin sessizleştirilmesinin ardından, RNA ekspresyonunun erken dönemde yükselmeye başladığı ve 48. saate *Midn* ekspresyonunun yaklaşık 4 katı oranda arttığını gösterdik (10). Bu bulgular, *Midn* geninin kalp fizyolojisi açısından önem taşıdığını işaret etmektedir. Diğer yandan, bu çalışmada diğer yetişkin dokuların ekspresyonu ile karşılaştırıldığında *Midn* ekspresyonunun kalp dokusunda %5 oranında olduğu, en yüksek ekspresyonlarının ise kolon ve ardından embriyonik dönemlerde olduğunu gözledik.

Ökaryotlarda, karyoferin (importin) beta süperairesinin proteinleri makromoleküllerin nükleositooplazmik transportunda rol almaktadır. Karyoferin beta genlerinin, değişik doku ve hücre tiplerinde farklı ekspresyon özelliklerinin olduğu tespit edilmiştir (20). Diğer yandan, *Kpnb1* ekspresyonunun spermatogenez (21) ve erken embriyo gelişiminde (20) düzenlendiği gösterilmiştir. Ek olarak, *Kpnb1* ekspresyon ürünü olan Kap β 1 proteinin mitozda düzenleyici rol oynadığı ve mitotik ağ oluşumunda gerekli olan proteinlerin

işlevi için aracı olduğu tespit edilmiştir (22). Çalışmamızda yetişkin iskelet kasına göre yaklaşık 1.5 kat fazla ekspresyonu olan *Kpnb1* transkriptinin ekspresyon seviyesinin tüm dokular arasında yaklaşık %5 olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, çalışmamızda kalbe özgü SHL'den izole edilen dört transkriptin ekspresyon seviyeleri araştırıldığında, tüm transkriptlerin yetişkin ve neonatal dönemlerde iskelet kasına göre kalp dokusunda daha yüksek oranda ekspresyonun olduğu gözlemlendi. Ekspresyon sonuçları GEO mikroarray sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Embriyonik dönemler arasında fare kalbinin gelişme sürecinde erken dönemi içeren E9'da tüm transkriptlerin başlangıç dönemine göre (E7) daha yüksek oranlarda ekspresyonlarının olduğu, ilerleyen dönem-

lerde ise gen işlevinin önemini yansıtacak şekilde gen ekspresyonunda farklılaşmalar olduğu tespit edildi. Bu durum dört transkriptin de ekspresyonlarının gelişim sürecinde sıkı düzenlenme mekanizmaları ile kontrol edildiğini yansıtmaktadır. Çalışmanın sınırlı kalan yönü, bu analizlerin total embriyolarda yapılmış olması, embriyonik kalp dokusundaki ekspresyonun direkt olarak incelenememiş olmasıdır.

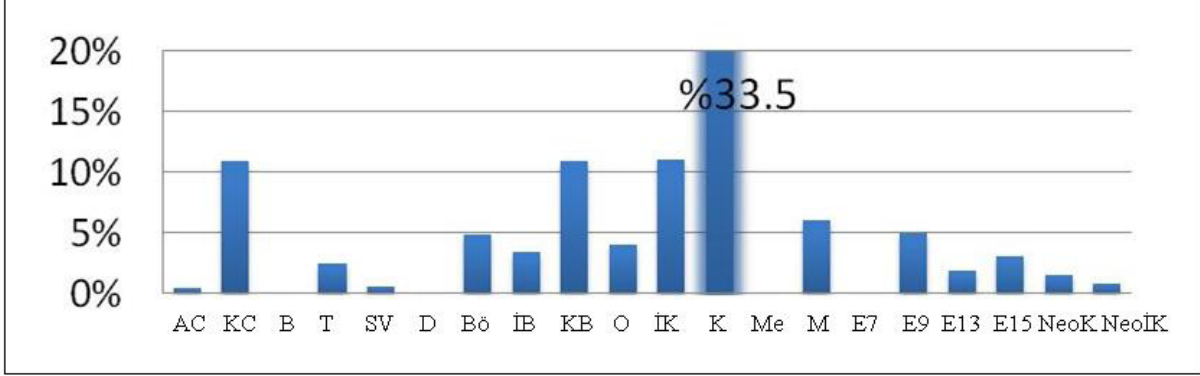
“Subtractive” hibridizasyon cDNA kütüphanesinden elde edilen transkriptlerin ekspresyon seviyelerinin sağlıklı doku ve embriyonik gelişimdeki karakteristiğinin belirlenmesi, kalp fizyolojisi ile ilişkili metabolik yollardaki işlevlerinin tanımlanması açısından önem taşımaktadır.

Tablo 1: Gene özgü-primer dizileri

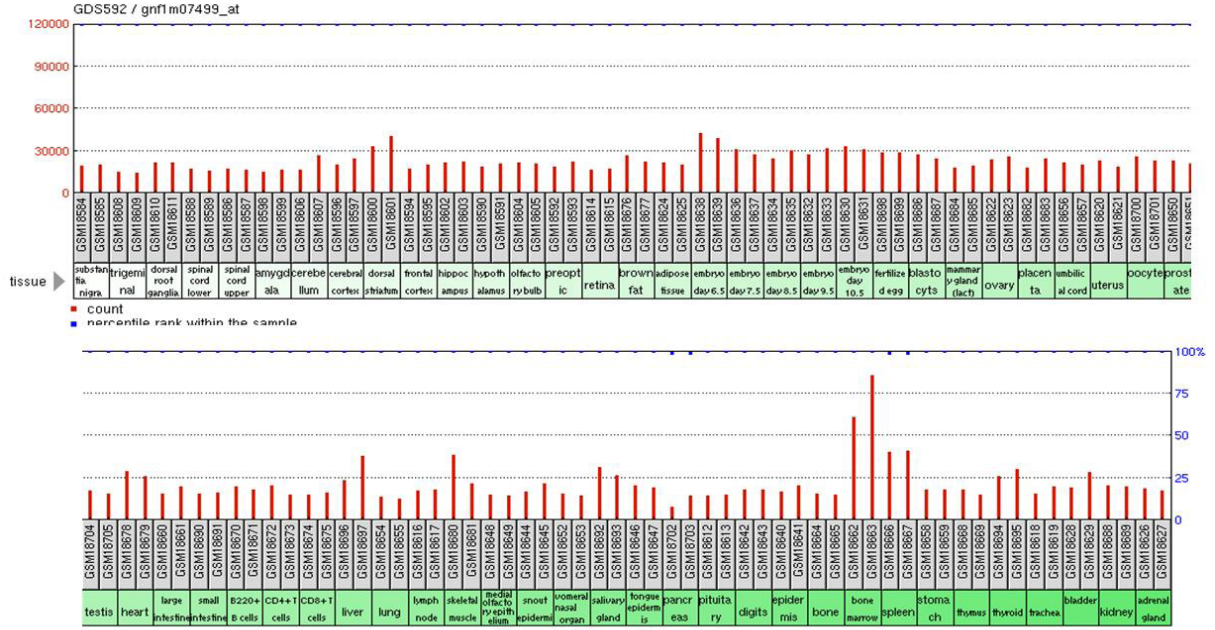
Genler		Primer Dizileri
<i>mt-ATP6</i>	Forward	5'-catgatttatcacaattat-3'
	Reverse	5'-ataggctaattgtttca-3'
<i>Mfn2</i>	Forward	5'-cagtgctcacgtagtcccagtg-3'
	Reverse	5'-gtttcgaatatgatcagcagag-3'
<i>Kpnb1</i>	Forward	5'-aaggagaactctggagttaga-3'
	Reverse	5'-tccaaatggttattttatcagat-3'
<i>Midn</i>	Forward	5'-aagctgcctgtgatatgtcca-3'
	Reverse	5'-gatacccacagccgatt-3'

Şekil 1: *mt-ATP6* geninin farklı fare dokularındaki ekspresyon seviyeleri

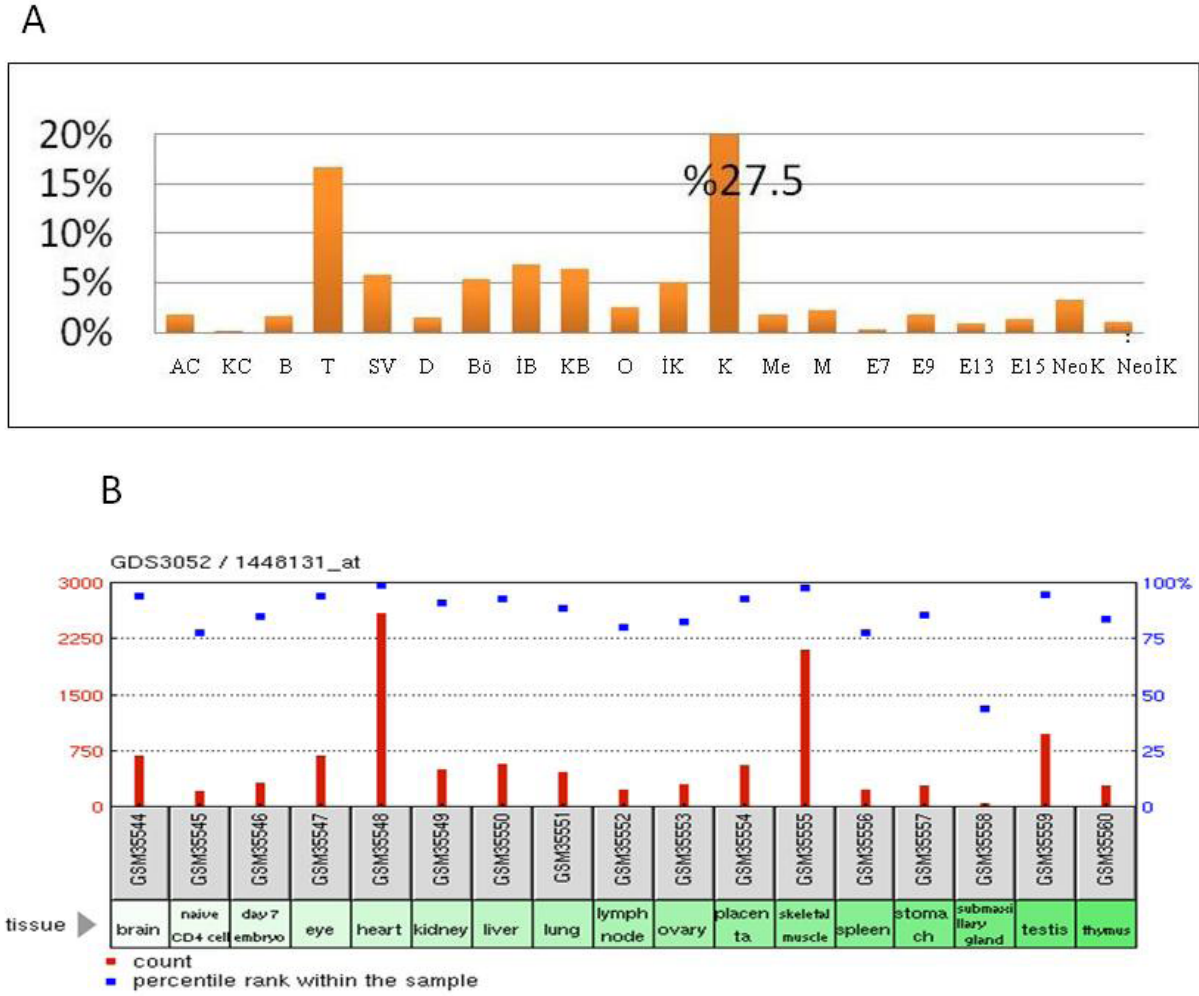
A



B



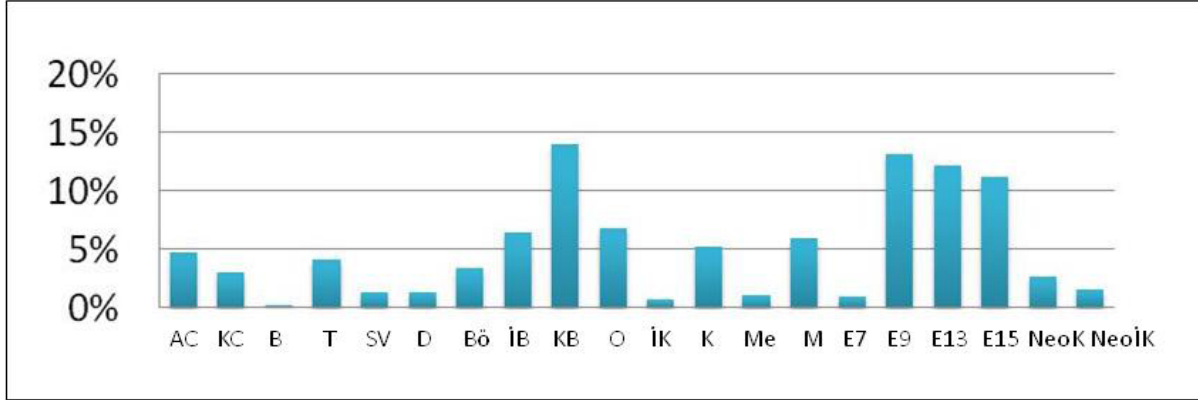
A) qRT-PCR yöntemi sonucunda elde edilen gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında *mt-ATP6* geninin en yüksek orandaki ekspresyonunun kalp dokusunda olduğu gözlenmektedir. B) Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) mikroarray sonuçlarında *mt-ATP6* geninin çeşitli dokulardaki ekspresyon seviyeleri görülmektedir. AC, akciğer; KC, karaciğer; B, beyin; T, testis; SV, seminal vesikül; D, dalak; Bö, böbrek; İB, ince bağırsak; KB, kalın bağırsak; O, over; İK, iskelet kası; K, kalp; Me, mesane; M, mide; E, fare embriyonik gelişim günü; NeoK, neonatal dönem kalp; NeoİK, neonatal dönem iskelet kası.

Şekil 2: *Mfn2* geninin farklı fare dokularındaki ekspresyon seviyeleri

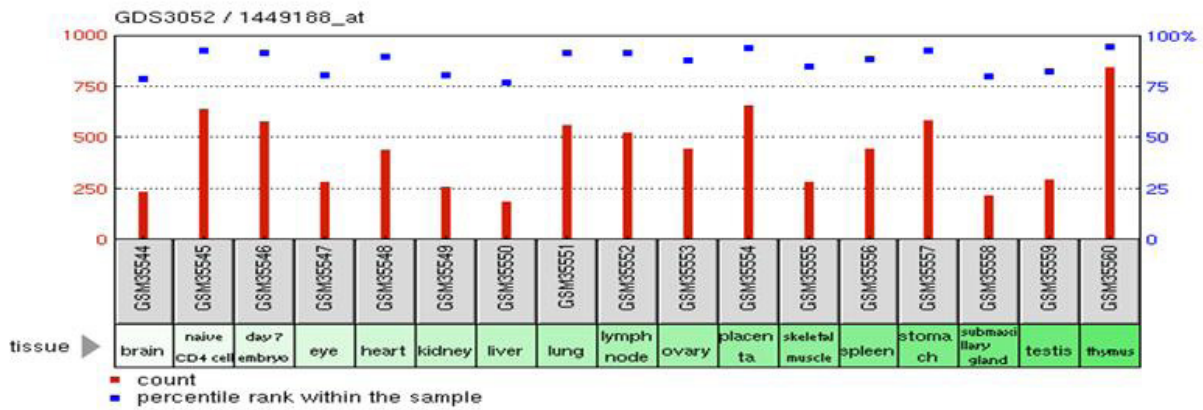
A) qRT-PCR yöntemi sonucunda elde edilen gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında *Mfn2* geninin en yüksek ekspresyonunun kalp dokusunda olduğu gözlenmektedir (%27,5). B) Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) mikroarray sonuçlarında *Mfn2* geninin en yüksek orandaki ekspresyonu kalp dokusundadır. AC, akciğer; KC, karaciğer; B, beyin; T, testis; SV, seminal vesikül; D, dalak; Bö, böbrek; İB, ince bağırsak; KB, kalın bağırsak; O, over; İK, iskelet kası; K, kalp; Me, mesane; M, mide; E, fare embriyonik gelişim günü; NeoK, neonatal dönem kalp; NeoİK, neonatal dönem iskelet kası

Şekil 3: *Midn* geninin farklı fare dokularındaki ekspresyon seviyeleri

A



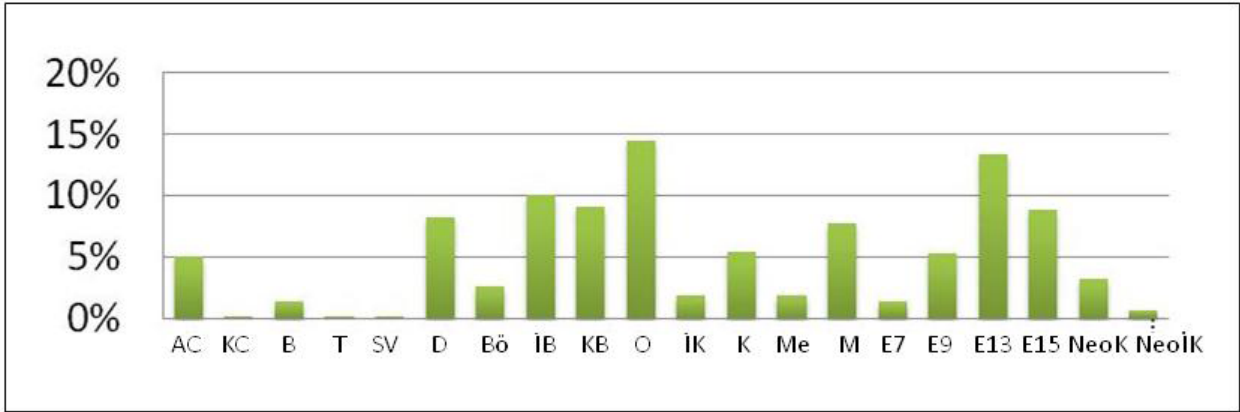
B



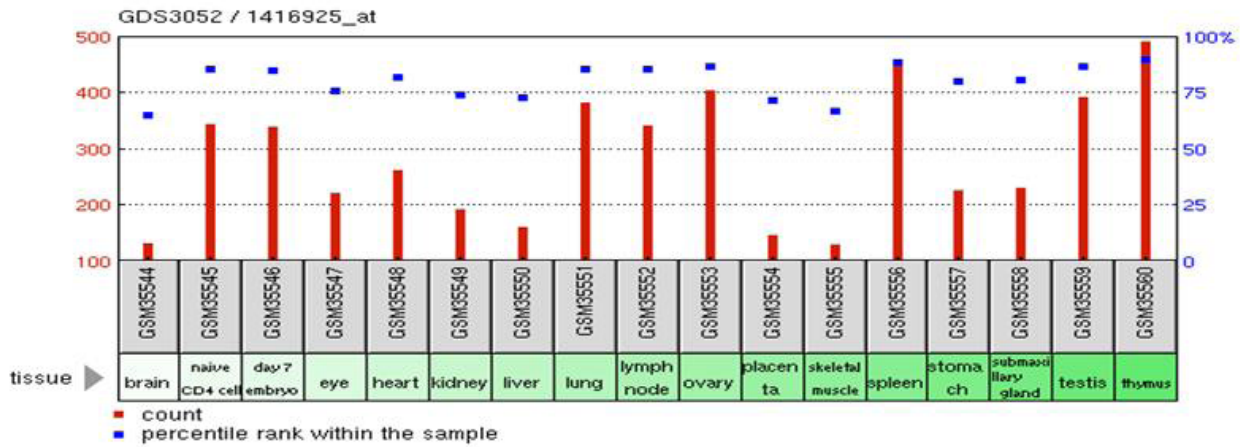
A) qRT-PCR yöntemi ile araştırılan dokularda *Midn* genine ait ekspresyon seviyeleri gözlenmektedir. B) Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) mikroarray sonuçlarında *Midn* geninin çeşitli dokulardaki ekspresyon seviyeleri görülmektedir. AC, akciğer; KC, karaciğer; B, beyin; T, testis; SV, seminal vesikül; D, dalak; Bö, böbrek; İB, ince bağırsak; KB, kalın bağırsak; O, over; İK, iskelet kası; K, kalp; Me, mesane; M, mide; E, fare embriyonik gelişim günü; NeoK, neonatal dönem kalp; NeoİK, neonatal dönem iskelet kası.

Şekil 4: *Kpnb1* geninin farklı fare dokularındaki ekspresyon seviyeleri

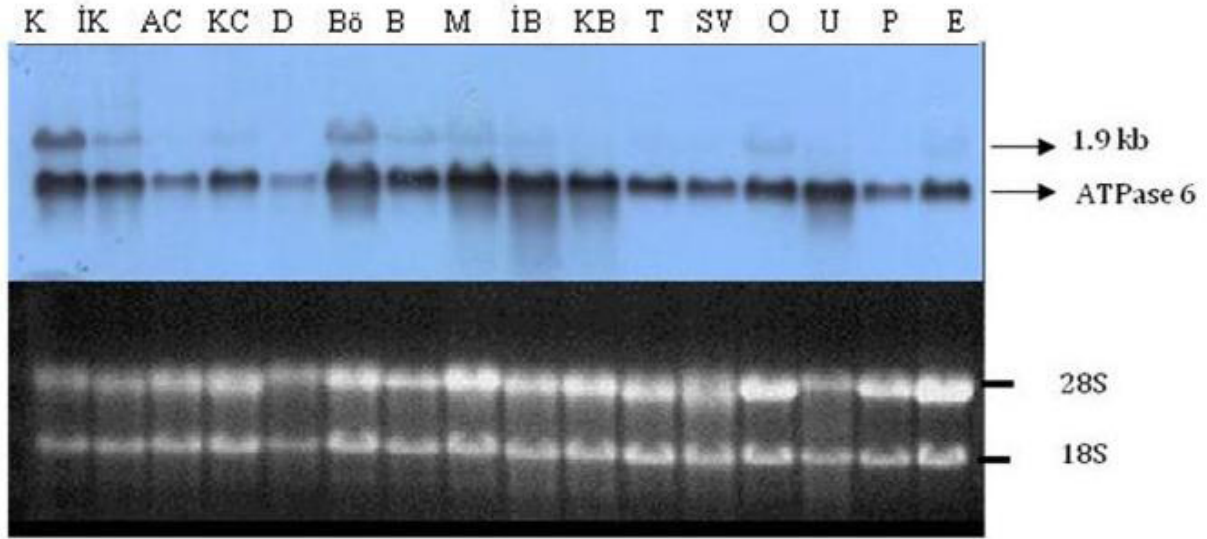
A



B



A) qRT-PCR yöntemi ile araştırılan dokularda *Kpnb1* genine ait ekspresyon seviyeleri gözlenmektedir. B) Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) mikroarray sonuçlarında *Kpnb1* geninin çeşitli dokulardaki ekspresyon seviyeleri görülmektedir. AC, akciğer; KC, karaciğer; B, beyin; T, testis; SV, seminal vesikül; D, dalak; Bö, böbrek; İB, ince bağırsak; KB, kalın bağırsak; O, over; İK, iskelet kası; K, kalp; Me, mesane; M, mide; E, fare embriyonik gelişim günü; NeoK, neonatal dönem kalp; NeoİK, neonatal dönem iskelet kası.

Şekil 5: Northern blot yöntemi ile *mt-ATP6* RNA'sının fare dokularındaki ekspresyonunun araştırılması

mt-ATP6 genine ait 1,9 kb uzunluğundaki doku-spesifik izoform en yoğun olarak kalp dokusunda gözlenmektedir. Agaroz jele her örnek için 10-15 µg total RNA yüklenmiştir ve 18S ve 28S rRNA bantlarının yoğunlukları kontrol olarak kullanılarak ekspresyon oranları hesaplanmıştır. K, kalp; İK, iskelet kası, AC, akciğer; KC, karaciğer; D, dalak; Bö, böbrek; B, beyin; M, mide; İB, ince bağırsak; KB, kalın bağırsak; T, testis; SV, seminal vesikül; O, over; U, uterus; P, plasenta; E, E10,5 total embriyo.

Kaynaklar

- [1]. Calore M, De Windt LJ, Rampazzo A. Genetics meets epigenetics: genetic variants that modulate noncoding RNA in cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol* 2015;89: 27-34.
- [2]. Elia L, Condorelli G. RNA (Epi)genetics in cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol* 2015;89: 11-16.
- [3]. Stanton L.W. Methods to Profile Gene Expression. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:49-54.)
- [4]. Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissuespecific cDNA probes and libraries 1996; PNAS USA 93:6025-6030.
- [5]. Komurcu-Bayrak E, Ozsait B, Erginel-Unaltuna N. Isolation and analysis of genes mainly expressed in adult mouse heart using subtractive hybridization cDNA library. *Mol Biol Rep* 2012;39:8065-8074.
- [6]. Hara E, Yamaguchi T, Tahara H, Tsuyama N, Tsurui H, Ide T, Oda K. DNA-DNA subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-Latex and PCR: identification of cellular genes which are overexpressed in senescent human diploid fibroblasts. *Anal Biochem* 1993;214:58-64.
- [7]. von Stein OD, Thies WG, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2598-2602.
- [8]. Zhang H, Zhou L, Yang R, Sheng Y, Sun W, Kong X, Cao K. Identification of differentially expressed genes in human heart with ventricular septal defect using suppression subtractive hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:135-144.
- [9]. Özsait Selçuk B. "Subtractive" hibridizasyon kütüphanesinden izole edilen ve kalp gelişiminde rolü olduğu düşünülen genlerin analizi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2003.
- [10]. Özsait Selçuk B, Kömürcü Bayrak E, Erginal Ünaltuna N. Higher Expression level of Bat3 is associated with silencing of Midn gene in primary 2 mouse cardiomyocytes. *Turk J Biol* 2016;40: 1295-1302.
- [11]. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6062-7
- [12]. Hwang DM, Dempsey AA, Wang RX, Rezvani M, Barrans JD, Dai KS, Wang HY, Ma H, Cukerman E, Liu YQ, Gu JR, Zhang JH, Tsui SK, Wayne MM, Fung KP, Lee CY, Liew CC. A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: toward a compendium of cardiovascular genes. *Circulation*. 1997;96(12):4146-203.
- [13]. Ware, S. M., El-Hassan, N., Kahler, S. G., Zhang, Q., Ma, Y.-W., Miller, E., Wong, B., Spicer, R. L., Craigen, W. J., Kozel, B. A., Grange, D. K., Wong, L.-J. Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes. *J. Med. Genet.* 2009;46: 308-314.
- [14]. Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*. 2001 Mar;114(Pt 5):867-74
- [15]. Yang C, Aye CC, Li X, Diaz Ramos A, Zorzano A, Mora S. Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. *Biosci Rep*. 2012 Oct;32(5):465-78.
- [16]. Zorzano A, Hernández-Alvarez MI, Sebastián D, Muñoz JP. Mitofusin 2 as a driver that controls energy metabolism and insulin signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Apr 20;22(12):1020-31.
- [17]. Givvimani S, Pushpakumar S, Veeranki S, Tyagi SC. Dysregulation of Mfn2 and Drp-1 proteins in heart failure. *Can J Physiol Pharmacol*. 2014 Jul;92(7):583-91
- [18]. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bisar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali E L,

- Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature Genet.* 36: 449-451, 2004.
- [19]. Tsukahara M, Suemori H, Noguchi S, Ji ZS, Tsunoo H . Novel nucleolar protein, midnolin, is expressed in the mesencephalon during mouse development. *Gene.* 2000; 254: 45-55.
- [20]. Quan Y, Ji ZL, Wang X, Tartakoff AM, Tao T. Evolutionary and transcriptional analysis of karyopherin beta superfamily proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(7):1254-69.
- [21]. Loveland K L, Hogarth C, Szczepny A, Prabh S M, Jans DA. Expression of nuclear transport importins β 1 and β 3 is regulated during rodent spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 2006;74, 67-74.
- [22]. Nachury MV, Maresca TJ, Salmon WC, Waterman-Storer CM, Heald R, Weis K. Importin β is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell.* 2001;104:95-106.

