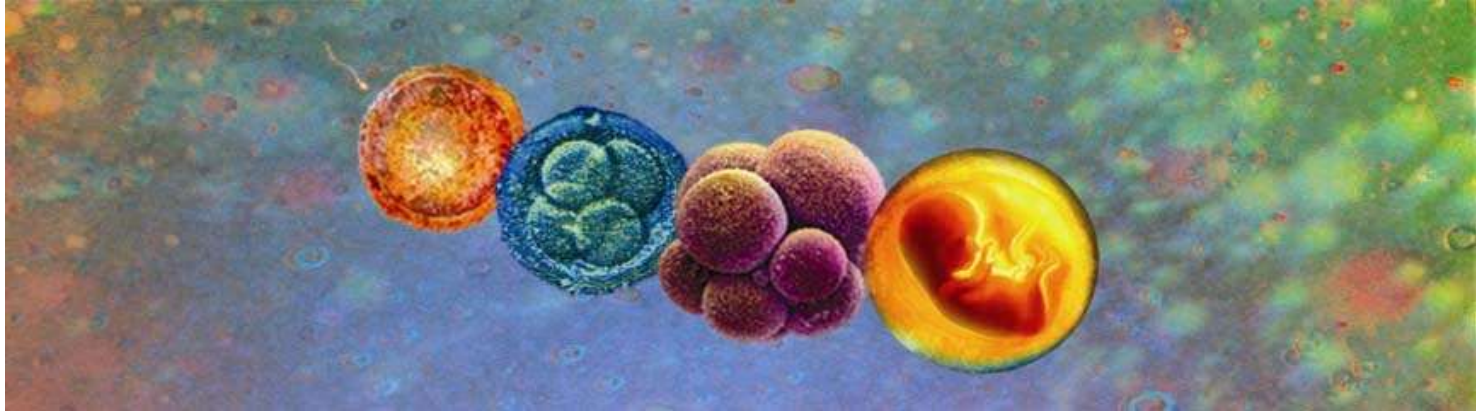




P27RF-Rho Proteininin Preimplantasyon Embriyolarındaki Lokalizasyonu Ve Ekspresyon Oranları



Sivas Biyokimya Günleri

Dr. İsmail Sari¹, Yard. Doç. Dr. Erkan Gümüş², Yard. Doç. Dr. Meral Yılmaz³

¹ Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

² Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

³ Cumhuriyet Üniversitesi, CÜTFAM

Giriş

•Embriyonal gelişimin **preimplantasyon** (implantasyon öncesi) evresi, döllenme ile uterus duvarına yapışma arasında geçen süredir. Ortalama 6 gündür.

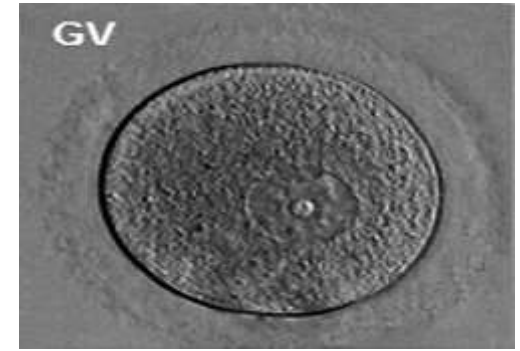
- Fare embriyoları **bir hücreli** safhadan **32 ve daha** fazla hücre içeren **blastosist** safhasına gelmesi yaklaşık olarak **3.5-4** gün sürer.
- **Fare embriyolarının hücre döngüleri** hayvanın **soyuna** bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir .
- Yumurta gelişim aşamaları şöyle sıralanmaktadır:

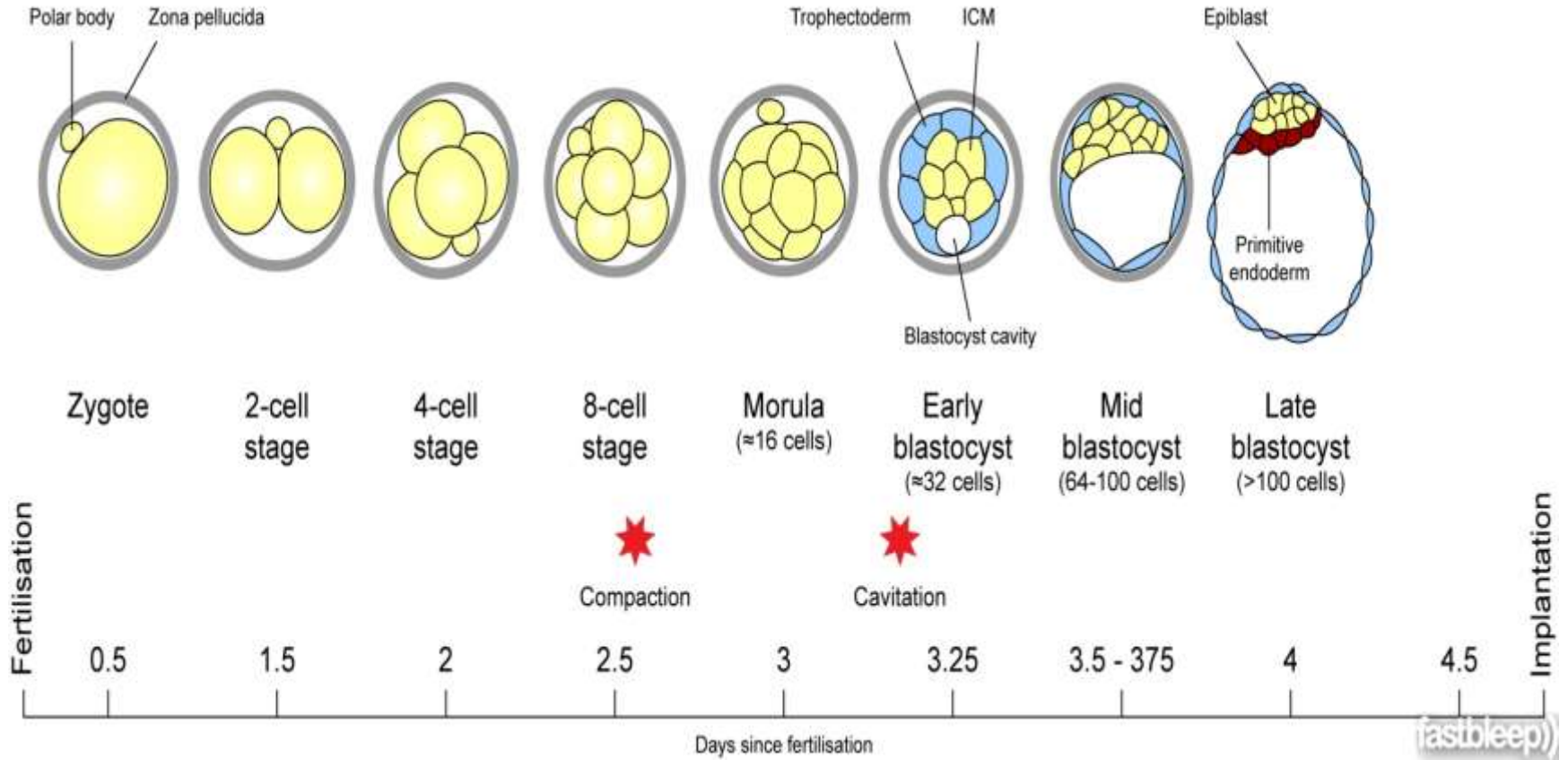


GV (Germinal Vesicle) – (Olgunlaşmamış): mayoz bölünmenin profaz I aşamasındaki yumurta hücresidir. Yumurta içinde rahatlıkla görülen Germinal vezikül ile anlaşılır.

M1(Metafaz 1) – (Olgunlaşmamış): Yumurta içinde **GV görünmez**. Kutup cisimciği henüz oluşmamıştır.

M2(Metafaz 2) – (Olgun): Kutup cisimciği **görünür** ve bu yumurtanın gelişiminin Metafaz-2 aşamasında olduğunu gösterir. ***Yumurtanın döllenme işleminden önceki olgunluğunu tamamladığını ve spermle birleşmeye hazır olduğunu gösterir.*** **Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI), İn vitro fertilizasyon (IVF)** gibi teknikler bu aşamada uygulanır.





Şekil 1: Preimplantasyon gelişimi

Preimplantasyon embriyosu döllenmiş bir zigottan blastosist aşamasına kadar **protein sentezi, enerji gereksinimleri ve amino asit alımında** değişikliklere maruz kalan farklı metabolik safhalardan geçer.

- Memeli preimplantasyon embriyogenezinin moleküler kontrolü, **deneyler için zamanlanmış embriyoların yeterli miktarda elde edilme** zorluğundan dolayı büyük oranda açıklanamamıştır.
- Bununla birlikte, bu periyodun temelini oluşturan **gen ekspresyonunu, moleküler ve biyokimyasal** değişiklikler hakkındaki bilgiye sahip olmak memeli gelişimini anlamak için önemlidir.

Rho protein ailesi

- Rho protein ailesi **aktin hücre iskeleti** ve **bazı önemli genlerin ekspresyonunu** düzenleyerek birçok hücresel fonksiyonun gerçekleşmesinde görev alırlar. Bu protein, **küçük G protein ailesine** dâhildir.
- Küçük G proteinleri **hücre farklılaşması, bölünmesi ve hücre iskeletinin kontrolü** gibi çeşitli hücresel olaylarda rol alırlar.



Şekil 2: Rho Etkinliğinin düzenlenmesi: guanine nucleotide exchange factor (**GEF**), GTPase-activating protein (**GAP**) and guanine nucleotide dissociation inhibitor (**GDI**).

- Rho proteinlerinin aktivasyonuna ve hücre uyarısına verdikleri yanıtların düzenlenmesinde **guanin nükleotid exchange faktör (RhoGEFs)**' leri aracılık etmektedir.
- Rho proteinlerinin aktivasyonu ise **GDP ayrışma inhibitörleriyle** antagonize edilmektedir.

p27kip1

- Rho proteinlerinin bu düzenleyicilerine ek olarak, **bir hücre döngüsü düzenleyicisi olarak p27kip1** adında bir proteinin sitoplazmaya geçtiğinde **Rho A aktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir.**
- Sitoplazmada p27kip1 **GDP-Rho A'ya** bağlanır ve daha sonra *GEF'lere bağlanmasını engeller* .

p27RF-Rho (p27kip1 releasing factor from RhoA, LAMTOR; (late endosomal/lysosomal adaptor, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and mammalian target of rapamycin (MTOR) activator 1)

- Son zamanlarda, **p27Kip1'** e bağlanarak bu proteinin **GDP-RhoA'** ya bağlanmasını engelleyen **p27RF-Rho (LAMTOR)** adında yeni bir protein tanımlanmıştır.
- p27RF-Rho proteininin, **p27kip1'** e bağlandığı ve bu şekilde **bu proteinin RhoA' ya bağlanmasını engellediği** saptanmıştır. Bunun sonucunda da **RhoA' ların daha sonraki aktivasyonlar** için serbest hale geldikleri tespit edilmiştir.
- p27RF-Rho proteininin, p27kip1 tarafından engellenen **serbest RhoA' ların aktivasyonunu artırarak aktin yapısının düzenlenmesini sağladığı** ortaya konulmuştur.

- Daha önce yapılan bir çalışmada **p27RF-Rho tümör hücrelerinde** ekspresyonunun arttığı görülmüştür.
- Bununla birlikte, **Rho proteinleri sitokinez, hücre polaritesi ve adezyonunun** devamlılığı gibi farklı hücresel fonksiyonları da düzenlemektedir. Bu nedenle, tümör hücrelerinin metastazı sırasında **p27RF-Rho** proteininin Rho proteinlerinin aktivasyonunu düzenleme potnsiyeline sahip olması nedeni ile, **günümüzde geliştirilecek kanser tedavilerinde önemli bir potansiyel hedef olabileceği ileri sürülmektedir.**

Amaç

Bu çalışmada, kanser ve hücre döngüsünde önemli fonksiyonlar üstlendiği fark edilen bu proteinin preimplantasyon embriyolarındaki lokalizasyon ve ekspresyon oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

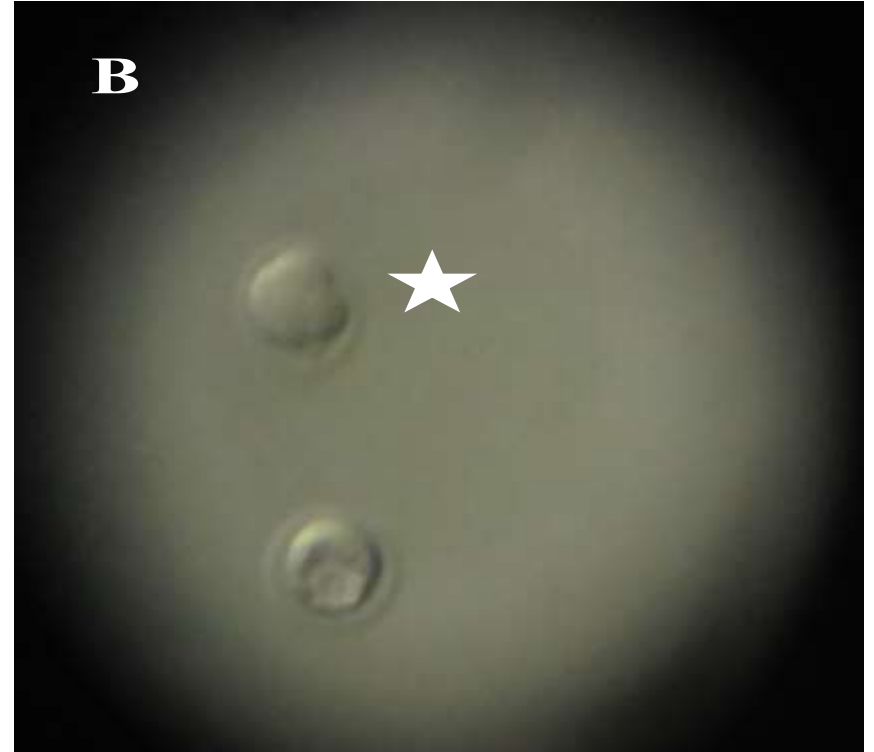
•**Çalışma Gurubu:** Araştırmamızda 8 adet 8-12 haftalık dişi *swiss albino* fare ve 12-24 haftalık damızlık erkek fareler kullanılmıştır. Fareler Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilmiştir. Normal diyetle beslenen farelere, oda ısısında, **12 saat karanlık** ve **12 saat aydınlık** periyotlar oluşturularak **östrus** evresine girmeleri sağlanmıştır.

•Gerek **immatür oosit** toplanacak fareler gerekse **süperovulasyon sonrası matür oositleri** ve **çiftleşme ardından preimplantasyon embriyoları** toplanması için fareler 200 mg/kg **pentotal sodyum** intraperitoneal yoldan enjekte edilerek ötenazi ile öldürmüştür.

- **İmmünofloresan İnceleme:** immatür, Matür Oosit ve preimplantasyon embriyolarındaki p27RF-Rho proteinin ekspresyon tespiti için **primer antikor** olarak ***Rabbit poliklonal LAMTOR1***(ThermoFisher, PA5-23086; 1:100) ve **sekonder antikor** olarak da ***keçi anti tavşan CY3 konjugeli sekonder antikor*** (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Cy3), ab6939;1:500) kullanıldı. **Kromatin dağılımını** göstermek amacıyla ***DAPI*** (**4',6-diamidino-2-phenylindole**) inkübasyonunu takiben tüm örnekler floresan mikroskopta (Olympus BX51) incelendi.
- Yapılan immünofloresan boyamalarda, tüm oosit ve preimplantasyon embriyoları için **negatif kontrol boyamaları** gerçekleştirildi.

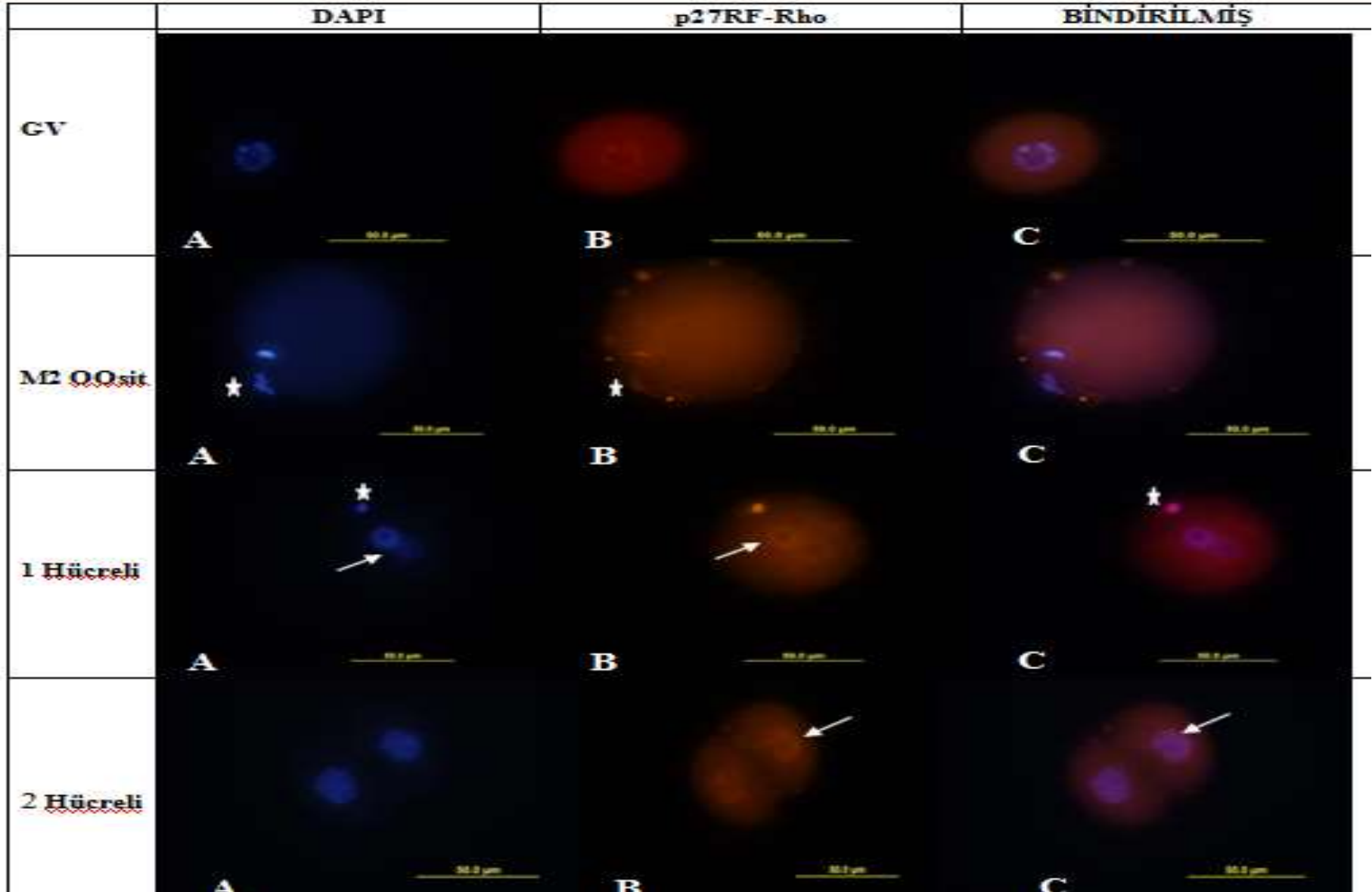
- **Oositlerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi:** Çalışma gruplarından toplanan immatür, Matür Oosit ve preimplantasyon embriyolarındaki total RNA izolasyon kiti (RNeasyMinElutespin kolon kit; Qiagen) ile üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde total RNA izole edildi. Elde edilen RNA' ların, nanodrop (Maestrogen) cihazı ile kalite ve miktar tayini yapıldı İzole edilen RNA örneklerinin A_{260}/A_{280} oranının 1.8 civarında olmasına dikkat edildi. Daha sonra bu örneklerde cDNA sentezi için First Strand cDNA sentez kiti kullanıldı ve bu kitin standart protokolü takip edildi. Elde edilen cDNA' lar RT-PCR için kullanılabilecek kadar -80 °C'de saklandı.
- **LAMTOR Geninin Ekspresyon Düzeyinin RT-PCR ile Analizi:** Bu genin ekspresyon düzeyi optimize RT² SYBR GreenqPCRMastermix kiti (Qiagen) ve yine aynı firmanın her bir gene ait optimize olarak dizayn ettiği, garantili primer çiftleri kullanılarak RT-PCR cihazında **$\Delta\Delta C_T$ metodu** kullanılarak analiz edildi. Deneylerde tüm cDNA örnekleri aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde **3'er** kez çalışıldı. Bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanıldı. Çalışmada housekeeping gen (**GAPDH**) iç kontrol olarak kullanıldı.
- **RT- PCR Ürünlerinin Özgüllüğünün Belirlenmesi:** Real-Time PCR reaksiyonu sonrasında amplifiye edilen PCR ürünlerinin özgüllüğü RT-PCR cihazında Erime Eğrisi Analizi kullanılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

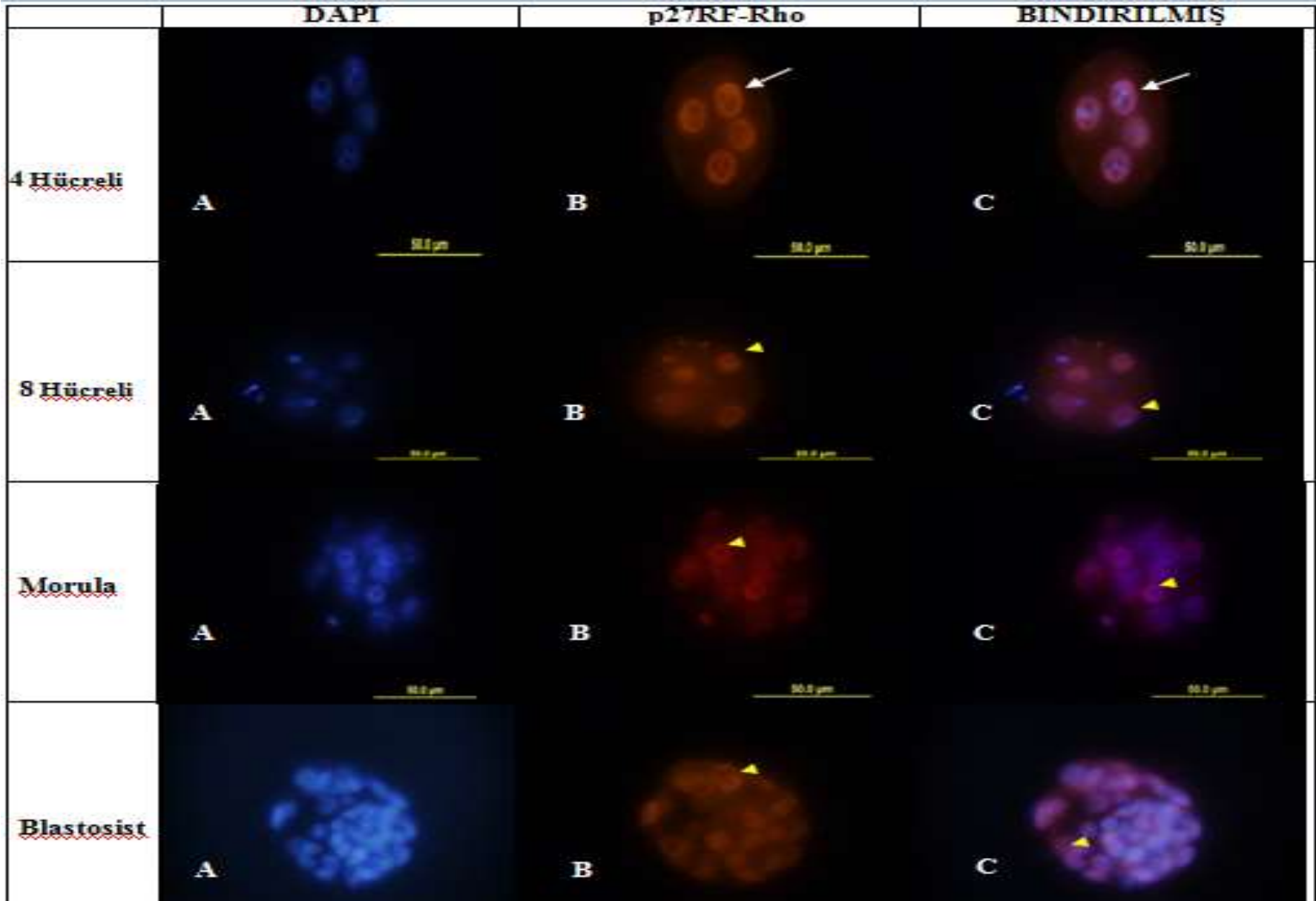


Şekil 3. Farklı gelişim aşamalarında fare embriyoları. hCG enjeksiyonundan **60 saat** sonra **dört hücreli** embriyolar **(A)**. hCG enjeksiyonundan **80 saat** sonra **morula safhasında kompakt embriyo (B, yıldız)**. hCG enjeksiyonundan **95 saat** sonra **blastosist** safhasında preimplantasyon embriyosu **(B)**

İmmünfloresan Bulgular:



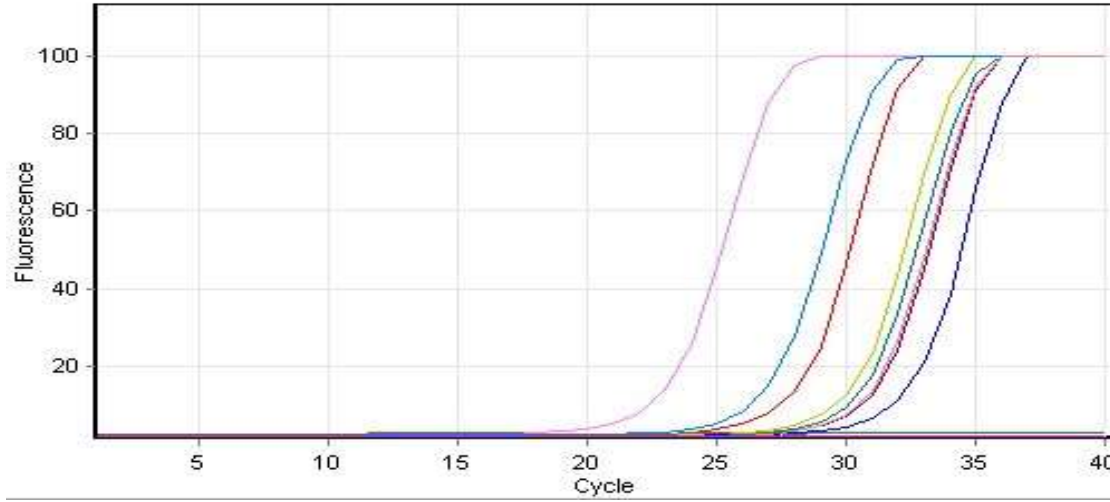
Şekil 4: Fare oosit ve farklı gelişim aşamalarındaki embriyolarda **DNA** (mavi) ve **p27RF-Rho** (kırmızı) immünfloresan yöntem yardımıyla floresan mikroskopta görüntülendi. **yıldız**; polar cisimcik, **beyaz ok**: nükleus ve/veya nükleoplazma.



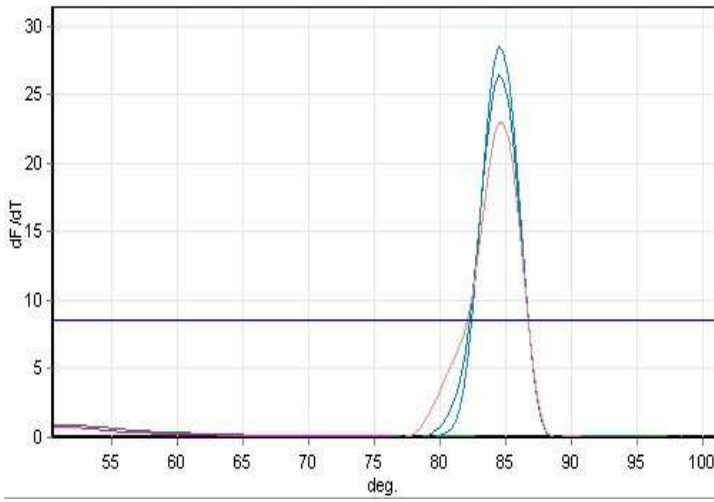
Şekil 5: Fare oosit ve farklı gelişim aşamalarındaki embriyolarda **DNA** (mavi) ve **p27RF-Rho** (kırmızı) immünfloresan yöntem yardımıyla floresan mikroskopta görüntülendi. **yıldız**; polar cisimcik, **beyaz ok**: nükleus ve/veya nükleoplazma.

- İmmunofloresans inceleme sonucunda; p27RF-Rho protein ekspresyonunun genel olarak oosit ve blastomerlerde **kromatin dağılımının** bulunduğu bölgelerde ve daha az boyanma şiddetinde oosit ve **blastomerlerin sitoplazmalarında** eksprese olduğu izlendi.

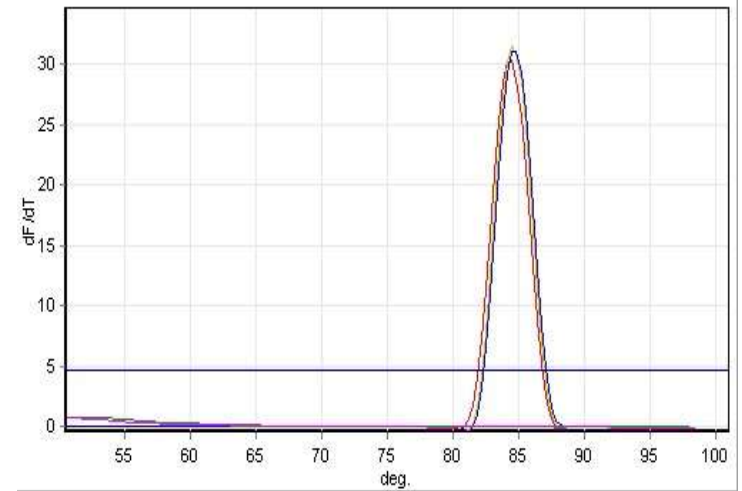
Real Time PCR Bulguları



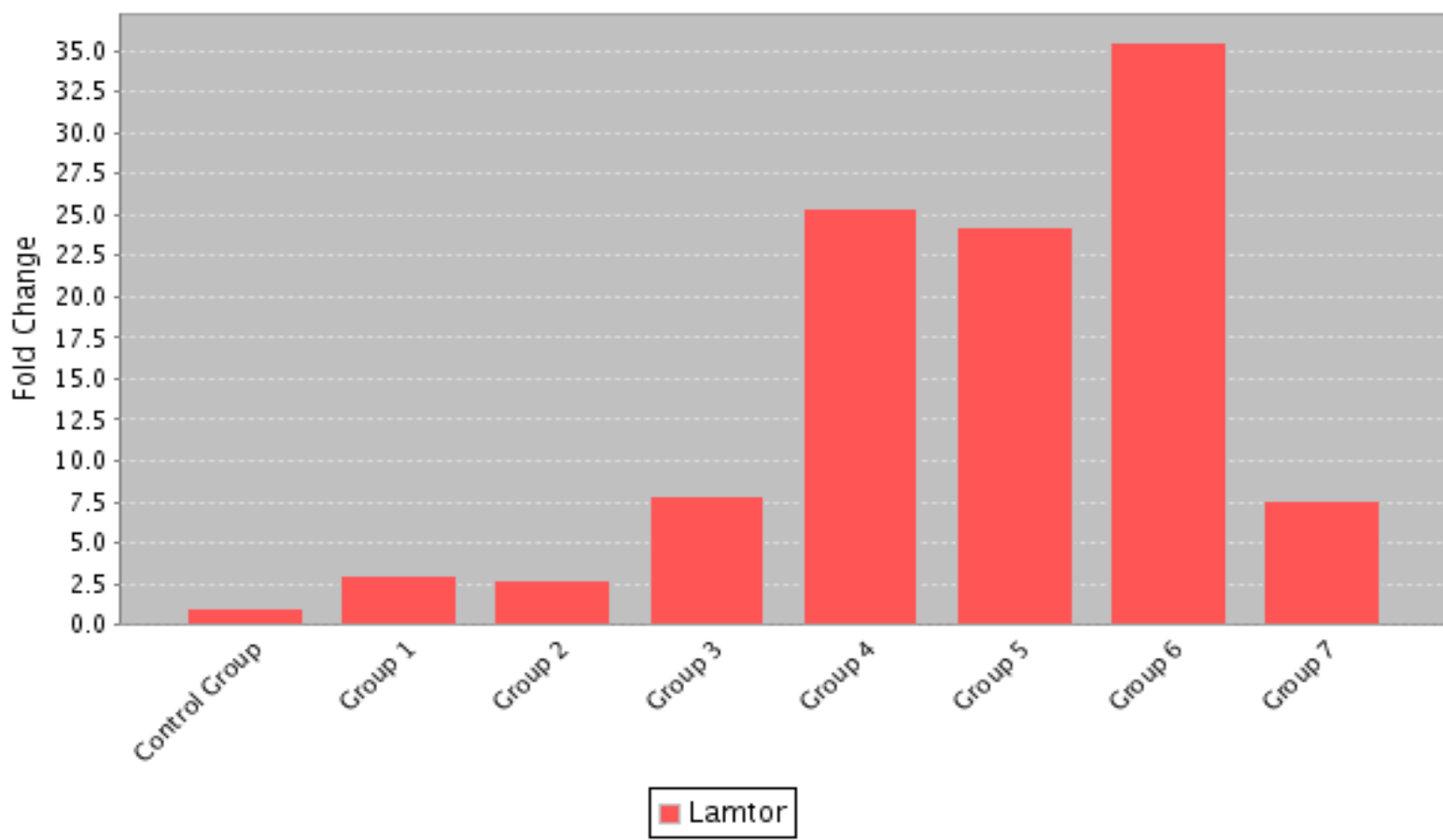
Şekil 7. *Gapdh* ve *LAMTOR1* geninin amplifikasyon eğrisi



Şekil 8. *Gapdh* genine ait elde edilen bazı PCR ürünlerinin erime eğrisi analizi.



Şekil 9. *LAMTOR1* genine ait elde edilen bazı PCR ürünlerinin erime eğrisi analizi.



Şekil 10. Kontrol gurubu (GV Oosit) temel alınarak çalışma gruplarında, *LAMTOR1* geninin ifade düzeylerinin karşılaştırılması.

RT-PCR inceleme ile elde edilen verilere göre; *LAMTOR1* geni ifade düzeylerinde, **grup I' de** (M2 Oosit) **2.99**, **grup II' de** (1 hücreli embriyo) **2.73**, **grup III' de** (2 hücreli embriyo) **7.84**, **grup IV' de** (4 hücreli embriyo) **25.46**, **grup V' de** (8 hücreli embriyo) **24.25**, **grup VI' da** (Morula) **35.50** ve **grup VII' de** (Blastosist) **7.62** kat artış saptanmıştır ($p < 0.05$).

Tartışma ve Sonuç

1. Yapılan literatür taramasında oosit ve preimplantasyon embriyolarında p27RF-Rho (LAMTOR1) protein ekspresyon oranları ve dağılımları ile ilgili **herhangi bir çalışmaya** rastlanmamıştır.
2. LAMTOR1 proteininin **aktin yeniden şekillenmesi , farklılaşma, organellerin taşınması, hücre hareketi** ile ilişkili olduğuna işaret eden çalışmalar bulunmaktadır.

- Çalışmamızda, ekspresyon oranları dikkate alındığında, kontrol grubuna göre (GV oosit) **MII oosit ve 1 hücreli embriyo** aşamalarında *LAMTOR1* ekspresyonunu yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. Bu durum, **her iki aşamada I. ve II. polar cisimciklerin oluşmasında mikroflament organizasyonu** için benzer oranlarda *LAMTOR1* proteinine ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.
- Ayrıca, **1-8 hücreli** embriyolarda dikkat çekici bir ekspresyon artışı görülmüştür. Bu artışın hücre bölünme safhası yani oluşan **hücre sayısı ile doğru orantılı** olduğu düşünülmüştür. **Morula** aşamasında (yaklaşık 35 kat) bu oranın en üst düzeye ulaşması, **blastosist** aşamasında ise bu oranın düşmesi bu proteinin **farklılaşma** açısından öneme sahip olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak, Oosit ve preimplantasyon embriyolarında LAMTOR1'in lokalizasyon ve ekspresyon oranları değerlendirildiğinde, mikroflament organizasyonu ile ilişkili olarak bu proteinin hücre bölünmesi ve farklılaşmasında aktif rol oynadığı düşünülebilir

KAYNAKLAR

- Johnson M, Everitt B. Essential Reproduction. Blackwell Scientific Publications, Third edition, ISBN: 0-632-02183-7, Sayfa: 75-101, 1988.
- Sadler, WT. Langman Medikal Embriyoloji (Çeviri: Basaklar A.C.). Palme yayıncılık, dokuzuncu baskı. ISBN: 975-8982-12-5, sayfa: 3-50, 2005.
- Scultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. BioEssays 15: 531-538, 1993.
- Niakan KK1, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RA. Human pre-implantation embryo development. Development. 2012 Mar;139(5):829-41.
- Rothstein JL, Johnson D, DeLoia JA, Skowronski J, Solter D, and Knowles B. Gene expression during preimplantation mouse development. Genes & development 6:1190-1201 © 1992 by Cold Spring Harbor Laboratory. ISSN 0890-9369/92.
- Whitten, W.K. (1956): Nature, 177:96-97.
- Whitten, W.K. (1957): Nature, 179:1081-1082.
- Özdemir A, ARK M. Rho Kinaz ve Apoptoz. Mersin Univ Sağlık Bilim Derg. 2009, 2(2).
- Hoshino D, Tomari T, Nagano M, Koshikawa N, and Seiki M. A Novel Protein Associated with Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase Binds p27(kip1) and Regulates RhoA Activation, Actin Remodeling, and Matrix Invasion. J. Biol. Chem. 2009, 284:27315-27326.
- Konecny FA. Review of cellular and molecular pathways linking thrombosis and innate immune system during sepsis. J Res Med Sci. 2010, 15(6): 348-358.
- Øverbye A, Skotland T, Koehler CJ, Thiede B, Seierstad T, Berge V, Sandvig K, Llorente A. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. Oncotarget. 2015 Oct 6;6(30):30357-76.
- Guillaumot P, Luquain C, Malek M, Huber A-L, Sabine Brugiere S, Garin J, Grunwald D, Regnier D, Petrilli V, Lefai E, Manie SN. Pdpr, a Protein Associated with Late Endosomes and Lysosomes and Implicated in Cellular Cholesterol Homeostasis. PLoS ONE 5(6): e10977.
- Malek M, Guillaumot P, Huber A-L, Lebeau J, Petrilli V, Kfoury A, Mikaelian I, Rennoand T, Manie SN. LAMTOR1 depletion induces p53-dependent apoptosis via aberrant lysosomal activation. Cell Death and Disease. 2012, 3, e300.
- Cheong HT, Takahashi Y, Kanagawa H. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. Biol Reprod. 1993 May;48(5):958-63.
- Goddard MJ, Pratt HP. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the '2-cell block'. J Embryol Exp Morphol. 1983 Feb;73:111-33.
- Płaszczyc A, Nilsson J, Magnusson L, Brosjö O, Larsson O, Vult von Steyern F, Domanski HA, Lilljebjörna H, Fioretosa T, Tayebwa J, Mandahl N, Norda KH, Mertens F. Fusions involving protein kinase C and membrane-associated proteins in benign fibrous histiocytoma. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2014 (53): 475-481.
- Takahashi Y, Nada S, Mori S, Soma-Nagae T, Oneyama C, Okada M. The late endosome/lysosome-anchored p18-mTORC1 pathway controls terminal maturation of lysosomes. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 27;417(4):1151-7.
- Hoshino D, Koshikawa N, Seiki M. A p27(kip1)-binding protein, p27RF-Rho, promotes cancer metastasis via activation of RhoA and RhoC. J Biol Chem. 2011 Jan 28;286(4):3139-48.

İLGİNİZ İÇİN
TEŞEKKÜRLER.....