

Karboksipeptidaz E'nin Nöroproteksiyondaki Rolünün Hücresel Mekanizmalarının İncelenmesi

Proje No: 111T449

Doç.Dr. Tülin Yanık

ÖNSÖZ

Karboksipeptidaz E (CPE) bir eksopeptidazdır. Yapılan araştırmalar bu enzimin aynı zamanda intrasellüler bir reseptör olduğunu da göstermiştir. CPE'nin nakavt fare çalışmalarında farelerin şişmanlık, tip2 diyabet gib hasarlarının yanısıra nörolojik problemleri taşımasıyla EST (expressed sequence tags) veritabanından insanda bulunan CPE kaynaklı mutasyon taramaları yapılmış ve molekülün pro kısmında üç adenin insersiyonuyla oluşan mutasyon bir Alzheimer hastasında bulunmuştur. Yeni 9 amino asitin proteinin sinyal sekanslarını oluşturan kısmına eklendiği ve iki adet glutamin (Q) amino asit tekrarından dolayı proje grubu tarafından bu mutasyon "QQ-CPE" olarak adlandırılmıştır. EST veritabanından bulunan bu mutasyonun hatalı tarama değilde gerçek olduğunu böbrek tümörü olan bir farklı hastada bulunması (mutasyonun somatik kökenli olup olmadığı dikkate alınmadan) mutasyonun gerçek olduğunu kanıtlaması açısından önemlidir. Tamamlanan proje, QQ-CPE mutasyonun hücresel mekanizmalarının ve dolayısıyla yabancıl (WT) CPE'nin aydınlatılmasını içermektedir.

Sonuçlarımıza göre, hem WT hemde QQ-CPE nöroblastoma hücrelerinde ifade edilmiştir. WT-CPE hücrede normal bir şekilde hücre dışına sekresyonla atılabilir ve hücre içi trafiği normaldir. QQ-CPE hücre içi değregasyona uğrar ve hücre dışına sekresyonu olmaz. QQ-CPE hücrede lizozomlarda değredasyona uğrar. Bu durum WT-CPE'nin hücre içindeki akışını ve sekresyonunu bozduğu için hücrede WT-CPE'nin gerçekleştirdiği görevleri; hormonların aktifleştirilmesi, prohormonların trafiği gibi aksattığı için nöronların devamlılığını zaman içinde aksatıp nörodejenerasyona yol açabilir. Ayrıca, QQ-CPE'nin ER strese yol açtığı ve enzimatik özelliğinin olmadığı da sonuçlandırılmıştır.

İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	i
İçindekiler.....	ii
Tablo ve Şekil listeleri.....	iii
Özet.....	iv
İngilizce özet (Abstract).....	v
Sonuç Raporu Ana Metni.....	vi
1. Giriş.....	vi
2. Literatür Özeti.....	1
2.1. Kaynaklar.....	5
3. Gereç ve Yöntem.....	12
4. Bulgular.....	17
5. Tartışma/Sonuç.....	27

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1: WT ve QQ CPE DNA ve protein dizini.....	4
Şekil 2: Boş, WT ve QQ CPE Western blot analizi.....	13
Şekil 3: Lizozomal inhibasyon.....	18
Şekil 4: pepA kullanılarak yapılan lizozomal yıkım.....	18
Şekil 5: Proteazomal yıkım.....	19
Şekil 6: WT ve QQ CPE proteazomal ve lizozomal yıkım.....	20
Şekil 7: CHOP'ın Western blot yöntemiyle EV, boş vektör, WT ve QQ CPE transfekt edilmiş N2A'de analizi.....	20
Şekil 8: WT, QQ CPE transfekte edilmiş N2A hücrelerinin apoptotik durumları.....	21
Şekil 9: Akridin Turuncu hücrelerinin konfokal mikroskopisiyle görüntülenmesi.....	22-25
Tablo 1: Akridin Turuncu boyaması yapılan N2A hücrelerinin kantitatif değerleri.....	26

ÖZET

Karboksipeptidaz E (CPE)'nin endokrin ve nöroendokrin hücrelerinde hem bir ekzopeptidaz hemde hücre içi reseptör olarak değişik roller aldığını ispatlamıştır. Yeni yayınlarda CPE'nin bu görevlerinin yanında farelerde nöronların korunmasını ve hipokampal nöronların devamlılığını sağlayan yeni fonksiyonlarının olduğu da gösterilmiştir. CPE'nin nöronların korunması üzerindeki fonksiyonunun mekanizması henüz bilinmemektedir. Önerilen projede, CPE'nin nörodejenerasyondaki rolünün hücresel mekanizmalarını aydınlatmayı amaçlamaktadır.

İnsanlarda rastlanan nörodejenerasyon hastalıklarındaki CPE mutasyon taramaları EST veri-bankası kullanılmıştır. Üç adenzinin (A) CPE genine eklenmesiyle oluşan, ikisi glutamin (Q) 9 yeni amino asitin proteine eklenmesiyle oluşan mutant CPE, QQ-CPE olarak adlandırılmıştır. Hipotezimize göre, CPE nöronları ER stresine karşı koruyarak apoptozu ve böylece nörodejenerasyonu engellemektedir. CPE'nin palmitat asite maruz kalmış insan pankreas adacıklarındaki beta hücrelerini ER stresine karşı korumayı gerçekleştirdiği bilinmektedir.

Araştırma sonuçlarımıza göre hem WT hemde QQ CPE cDNA'ları, nöron hücre hatlarında ifade edilmiş ve bu proteinlerin biyosentezi incelenmiştir. QQ-CPE'nin hücre mekanizmaları incelenerek, hücre içi lokasyonu, trafiği, hücre içi dağıtımı, yıkımı, ER stres bağlantısı ve enzim aktivitesi test edilerek bu durumun hücre degradasyonuna ve apoptozu neden olup olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlarımız, nörodejeneratif hastalıklarda görülen, nöronların ölmesinin CPE tarafından nasıl engellendiğini belirlenmesine katkı sağlayarak literatüre yeni ve önemli bir bilgi eklemiştir. CPE'nin fonksiyonlarının bilinmesi endokrin ve sinir sistemi bağlantılı bir çok hastalık için önemlidir. Çalışma sonuçlarımız henüz tam anlaşılmayan nörodejeneratif hastalıkların hücresel mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler:

Karboksipeptidaz E, Endoplazmik Reticulum (ER) Stress, Nörodejenerasyon, Apoptoz

ABSTRACT

Over A body of work has indicated that Carboxypeptidase E (CPE) expressed in the nervous and endocrine systems, plays multiple roles that are both an exopeptidase and a sorting receptor. In addition, its new functions in neuroprotection and maintenance of hippocampal neuronal survival in adult mice have been published. The cellular mechanisms of CPE in neuroprotection have not been studied so far. All these findings suggest that we should extend our studies to determine if CPE might be important for neuroprotection in humans. Proposed study is aimed to understand the role of CPE in neurodegeneration. By searching the EST database for genetic mutations in the human CPE gene, we did potentially identified a new mutations in humans linked to neurodegenerative diseases. We will name it as the QQ CPE protein.

In this study, we hypothesized that the mutant QQ CPE is dysfunctional and cause endoplasmic reticulum (ER) stress and hence apoptosis. It was shown that CPE degradation contributes to palmitate-induced beta-cell ER stress and apoptosis. Combined with studies showing that CPE has function in neuroprotection, and its absence leads to neurodegeneration, we investigated the role of CPE in protecting against ER stress. WT and QQ CPE constructs were overexpressed in neuronal cell lines and their biosynthesis and processing was investigated. Cellular mechanisms of QQ CPE such as its cellular location, trafficking and sorting, degradation and QQ-CPE related ER stress and apoptosis were analyzed. Understanding CPE structure and function is relevant to many health issues in endocrinology, and neuroscience. Our studies would lead to understanding the role of CPE in neuronal protection and better understanding in neurodegenerative diseases.

Key Words:

Carboxypeptidase E, Endoplasmic Reticulum (ER) Stress, Neurodegeneration, Apoptosis.

SONUÇ RAPORU ANA METNİ

1. GİRİŞ

Projemizde, gerçekleştirilmesi hedeflenen 4 amaç belirlenmişti; proje sonunda bu amaçlara ulaşılmıştır. Öncelikle, WT ve QQ CPE'nin hücre biyosentezinin, aktifleştirilmesinin ve hücre dışına salınmasının hücre hatlarında incelendi.. Sonuçlarımıza göre mutant CPE'nin molekül yapısı değiştiği halde biyosentezinde herhangi bir aksaklık görülmemektedir. Ancak, QQ CPE'nin salınımlarının hasara uğramış ve ayrıca, WT CPE salınımlarınıda engellemiştir. Bu durum nöronlarda hormonların biyolojik aktifleştirilmelerini aksatacaktır. Daha sonra, QQ CPE'nin enzimatik aktivitesinin *in-vitro* olarak belirlenmesi gerçekleştirilmiş ve sonuçta mutant CPE'nin hormonların aktifleşmesini sağlayan peptidaz fonksiyonlarının olmadığını tespit edilmiştir.

Nörodejenerasyonun hücresel mekanizmalarında genel kabul gören mekanizmalardan biri ER stress, degradasyon ve apoptozdur. QQ-CPE'nin ER stresinde incelenmesinde, mutant proteinin proteazomlarda yıkıldığını ön görmüştük. Ancak, deney sonuçlarımızda QQ-CPE'nin hücre içi yıkımının lizozomlarda gerçekleştiğini gösterildi. WT ve QQ CPE proteinlerinin hücrede fazla ifade edildiğinde hücrenin bu duruma uyumu için fazla ifade edilen proteinlerin protezomlara gönderildiği belirlenmiştir. Uzun süreli ER stres artan apoptoza ve buda nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılı olabilir. Mutant CPE taşıyan hücrelerde apoptozun artmasını sadece hücre mekanizmalarının değişmesini göstererek belirledik.

Projede, yürütücünün dışında iki bursiyer ve ayrıca hak sahipliği olan bir yurt dışı danışman yer almıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Nörotrofinlerin ve nöropeptit/nörohormonların sinir sisteminde; nörotransmitter (8, 9), nöromodülatör (10, 11) ve trofik faktörler (12) olarak birçok davranışı düzenlemede nöral rejenerasyonda (13), büyüme ve farklılaşmada (14) önemli görevleri vardır. Sentezlendiğinde biyo-aktif olmayan bu pro-proteinler bir grup enzim tarafından biyo-aktif peptitlere dönüştürülürler. Bu enzimler pro-proteinleri çift bazik aminoasit bölgelerinin karboksil kısımlarından veya bunların arasından kesen prohormon konvörtazlar (PC) ile açıkta kalan son iki bazik aminoasiti keserek proteini biyo-aktif hale dönüştüren karboksipeptidaz E (CPE) dir (15). İnsan CPE molekülü 476 aminoasitten oluşan bir pre-proproteindir. İlk 25 aminoasit (1-25) molekülün sinyal peptitini oluşturur. Aminoasitler, 26-476 proprotein (biyo-aktif olmayan), 43-476 ise biyo-aktif proteinin kodlarıdır (GenBank accession number NP_001864). CPE'nin iki ayrı formu bulunur. Bunlardan biri, TGN (trans-golgi ağı) zarında bulunan ve lipid raftla ilişkili (46), 55 kDa moleküler ağırlığında, hücre içi reseptör fonksiyonu olan (23, 24) örneğin, proopiomelanocrotin (POMC) ve proBDNF (beyin nörofik faktör) için ve TGN zarındaki raft ilişkisiyle regüle edilen salgı yolaklarına (RSP) gönderilerek salgı keseciklerindeki hormon paketlenmesi sırasında olan görev alan (45) diğeri ise, enzimatik özellikteki çözünebilir formudur (22). Zar formunun bir kısmı C-terminalindeki ~21 amino asitin salgı keseciklerinde ayrılmasıyla çözünebilir formuna dönüştürülür ve böylece enzim salgı keseciklerinin içinde yer alır (47).

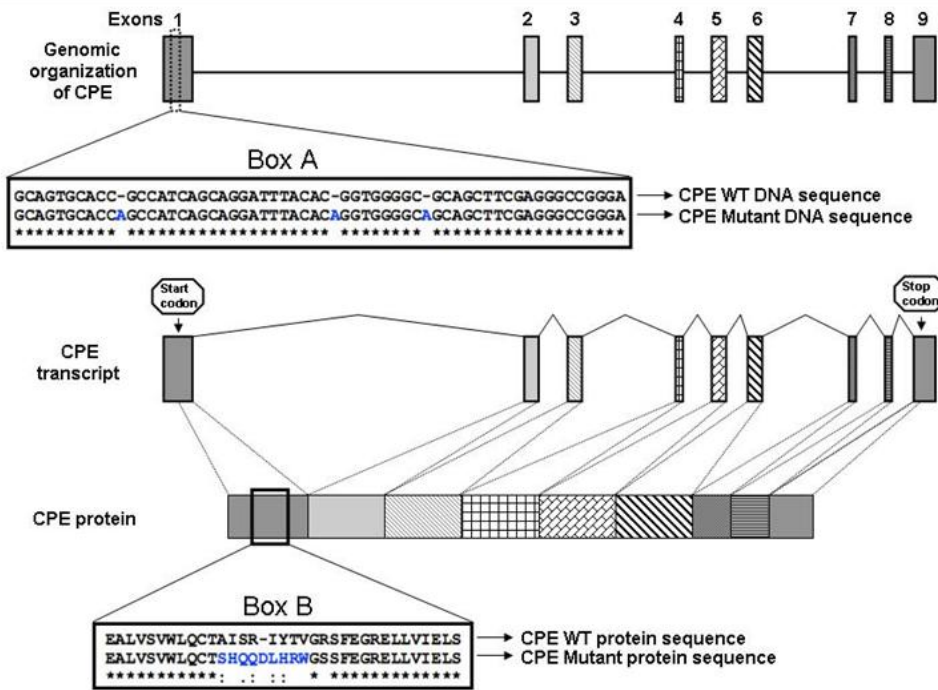
CPE molekülünün peptiderjik nöronlarda ve endokrin hücrelerinde RSP keseciklerine bulunması şu sebeplerden dolayı önemlidir. **1)** salgı keseciklerinde asidik pH'la hormonları aktive eden enzimlerin oto-aktivasyonu, **2)** pro-nöropeptit/peptit hormon biyolojik olarak aktif hale dönüştürülebilmesi, **3)** biyolojik olarak aktif peptitlerin kontrollü bir şekilde salgılanması. Hücre içinde nöropeptitlerin, nörotrofik faktörlerin ve peptit hormonların RSP'ye gitmesinde ve burada aktive edilmesinde herhangi bir aksaklık, aktif olmayan pro-proteinlerin kontrolsüz salgılanmasına neden olur ve buda bu peptitlere bağlı fonksiyonlarda aksaklıklara neden olarak insanda hastalık oluşmasına neden olabilir. Örneğin, literatürde insanda pro-insülinin aktive edilmesindeki eksiklikten dolayı ailesel hiperproinsülinemi (16), kokain ve amfetaminle regüle edilen transkriptin (CART) aktive edilme problemlerinden dolayı obezite (17) ve pro-BDNF'teki problemlerden dolayı bellek bozuklukları (18) bildirilmiştir. Bu örneklerdeki aksaklıklar tek gen mutasyonları sonucu ortaya çıkmış ve mutasyondan dolayı yapısı değişen pro-proteinler CPE tarafından TGN'den kontrollü salgı yolaklarına taşınamamıştır. Trofik faktör olan Pro-BDNF'in CPE'ye bağlanamayıp kontrolsüz salgılanan yolaklara gitmesi, proBDNF'in p75 reseptörüne bağlanmasıyla apoptoza, bu durumda uzun süreli depresyona (19) ve nöronal yaşamda karışıklığa neden olduğu da gösterilmiştir (20).

Son yıllardaki birçok çalışma CPE'nin sinir sisteminde ve endokrin sistemde ifade edildiğini ve bir peptidaz olmasının yanı sıra bir çok enzimatik olmayan rollerinde olduğunu göstermiştir (21). Transmembran CPE formunun sitoplazmik kuyruğunun, adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve BDNF keseciklerinin, post-Golgi dağıtım sistemiyle salınım bölgelerine gönderilmesi için mikrotübüle dayalı taşıma sistemine bağlanmasında rol aldığı gösterilmiştir (25, 26). Bu nedenle, CPE'nin endokrin sisteminin ve sinir sisteminin işleyişinde önemli bir etkisi olduğu ileri sürmekteyiz. Ayrıca, CPE geni nakavt edilmiş (CPE KO) farelerde diyabet, kısırlık ve obezite gibi endokrinolojik bozuklukların (27) yanı sıra, düşük kas tonusu (27) ve retinogramlarında glutamat iletimine bağlı β -dalgasının düşmesi (28) gibi nörolojik bozuklukların yanısıra kemik yoğunluğunda azalma (67) görülmüştür. CPE KO farelerde, CPE'nin olmayışı aktiviteye bağlı BDNF salgılanmasının azalmasına neden olmuştur (24). CPE'si olmayan mutant bir *C. elegans*'ta nöromusküler yoldaki asetilkolin (Ach) nörotransmisyonunda bozukluk gözlemlenmiştir (29). Ayrıca, CPE-KO farelerde CPE'nin olmayışı, bu hayvanların hafızasında, sinaptik fizyolojisinde ve hipokampüsün hücresel yapısında çok önemli değişikliklere neden olmuştur (1). Yetişkin CPE-KO hayvanlarla yapılan davranışsal testlerde; örneğin, Morris su tankında, obje tercihinde ve yiyecek seçimi testlerinde bellek kazanımında bozukluklar olduğunu gösterilmiştir (27). CPE KO farelerde uyarılmış uzun süreli öğrenme potansiyeli yoktur. Bunlara ek olarak, Woronowich ve arkadaşlarının (2008) gösterdiği gibi 4 haftalık veya daha yaşlı, fakat 3 haftalık olmayan, CPE KO farelerin, normalde yüksek seviyelerde CPE ifade eden hipokampal CA3 bölgesindeki piramidal nöronlarında önemli ölçüde dejenerasyon görülmüştür. İmmünohistokimya sonuçlarına göre, CPE KO farelerin CA3 alanında nöronal işaretleme, NeuN, azalırken, gliosisin işareti olan glial işaretleme, GFAP, arttığı belirlenmiştir. Kalbindin boyaması, bu farelerde, mosi fiberlerin CA1 bölgesine ulaşmadan önce erken bitişini göstermiş ve bu nedenle, CPE'nin yokluğu, CA3 nöronlarının dejenerasyonuna, hipokampüsün hücre yapısında karışıklığa ve bellek bozukluklarına neden olmuştur. Benzer sonuçlar, CPE proteinindeki tek bir mutasyona (Ser202Pro) sahip olan farelerde de görülmüştür (31). Ser202Pro mutasyonu, CPE'nin enzim aktivitesini düşürmüştür (30-32). Ex-vivo çalışmalar, CPE'nin fazla ifade edilmesinin, kültür ortamındaki hipokampal nöronları H₂O₂ oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünden koruduğunu göstermiştir (1). Bu bulgular, yetişkin hipokampal CA3 nöronlarının normal kognitif fonksiyonları devam ettirmeleri için hayatta kalmasında CPE'nin önemini göstermektedir. Ayrıca, geçici global iskemiden sonra hipokampüsün CA3 bölgesinde, bu nöronların hayatta kalmalarıyla ilgili olarak, CPE ekspresyonunda daha fazla ve sürekli bir artış olduğu belirtilmiştir (33). CA1 bölgesindeki nöronlarda, CPE ekspresyonunda geçici bir artış gözlemlenmiş ve bu nöronların daha

savunmasız olduğu belirtilmiştir (33). Ayrıca, son bir araştırmaya göre CPE'nin yeni ve ilginç bir rolü daha keşf edilmiştir (53). Bu çalışmada CPE'nin dopamine tranportunun (DAT) C-terminaline bağlandığı ve böylece DAT bağlantılı dopamine geri emilimine neden olduğu gösterilmiştir. CPE, DAT'ın hiper fosforilasyonuna neden olarak, DAT'ın stabilitesine ve sonuç olarak DAT'ın hücre membranına lokasyonuna neden olmaktadır (53). Zhang ve arkadaşları (2009), CPE'nin dopamine bağlı hastalıklarda örneğin, ilaç bağımlılığı ve şişmanlıkta önemli olacağını belirtmişlerdir. Başka yeni bir araştırmaya göre Caruso ve ark (2010), hipotalamustaki alfa melanokortin hormonunun (alfa-MSH) inflamasyondan kaynaklanan nörodejenerasyonu engelleyebildiğini göstermişlerdir. Alfa MSH bir prepro-protein olan POMC ürünüdür (15). PC ve CPE enzimleri kullanılarak POMC alfa MSH'e dönüştürülür, ayrıca; CPE POMC için hücre içi reseptördür (23). CPE enzim aktivitelerinin aksaması da CPE'nin diğer nöronların korunmasını sağlayan nöropeptit/hormonların (55) fonksiyonlarını gerçekleştirememelerine neden olabilir.

CPE'nin yetişkin farelerde nöronların korunması, hipokampal nöronların hayatta kalması, öğrenme ve bellek kazanımında önemli görevleri olduğunu göstermiştir. Fakat, CPE'nin bu işlemleri nasıl kontrol ettiği bilinmemektedir. Tüm bu bulgular CPE'nin insanda nöronların korunmasında önemli bir rolü olup olmadığını belirlemek için araştırmalarımızı genişletmemiz gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle, proje ekibi tarafından CPE'de görülmüş ve nörodejenerasyonla alakalı insan CPE genindeki genetik mutasyonlar için tarama yapılmış ve ETS veri-tabanından insan CPE'si nükleotid dizisini (giriş numaraları NM_001873.2 ve NM_013494.3) kullanılarak bir mutasyon bulunmuştur. Ayrıca, yinelenmeyen (non-redundant) nükleotid dizini veritabanıyla GenBank'ı EST veritabanını (dbEST) karşılaştırdık. Alzheimer hastalığından ölen bir hastanın beyin korteks doku tipinde bulunan EST dizisi (Genbank giriş numarası DA134138) BLAST yöntemiyle manuel taranarak bulunmuştur CPE mutasyonu NCBI veritabanının Build 36.3'ünün NT_016354 kontig bölgesinde, *Homo sapiens* 4. kromozom genomik 90848734, 90848754 ve 90848762 bölgelerinde 3 adenozin (A) eklenmesiyle oluşmuştur. Bu üç A'nın CG bazları arasına eklenmesi ile oluşan mutasyon, CPE'nin pro bölgesinde ikisi glutamin (Q) amino asiti olan 9 yeni amino asitin CPE'ye eklenmesine neden olur (Şekil 1). Bu nedenle yeni mutant CPE formu, QQ CPE olarak adlandırılmıştır. Şekil 1'de QQ CPE'nin biyoinformatik analizi gösterilmektedir (analiz çizimi, projemizde yurt dışı danışman olan Dr. P. Loh araştırma grubu tarafından çizilmiştir). QQ CPE sadece tek bir hastada değil böbrek tümöründen ölen başka bir hastada da tespit edilmiştir (52). Yeni aminoasit eklenmesi sonucu oluşan bu tip bir mutasyonun en az iki ayrı vakkada görülmesi mutasyonun doğruluğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca, genom araştırmaları ileri düzeyde dizileme teknikleriyle yapılmıştır (52).

Sekil 1: QQ CPE biyoinformatik analizi:



Figür 1: Biyoinformatik analizler sonucunda ortaya çıkan mutant ve yabancı tür (WT) CPE'nin DNA ve protein dizinini gösteren diagram. Box A daha açıkça gösterilmiş mutasyonun bulunduğu DNA dizini ve Box B ayrıntılı gösterilmiş aminoasit dizini. Box A 'da maviyle yazılmış nükleotitler CPE geninin genomik kısmındaki eklenmiş adenozin nükleotitlerini ve Box B 'de maviyle yazılmış aminoasitler mutasyondan dolayı değişen aminoasitleri göstermektedir.

CPE mutasyonları insanlarda görülen hastalıklarla ilişkilidir. Diyabetli (34, 35) ve kardiyovasküler problemleri olan hastalarda (36-38) CPE mutasyonları bulunmuştur. Bu mutasyonlarda CPE enzim aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir (35) ancak diğer mutasyonlarda CPE fonksiyonlarının nasıl değiştiği gösterilmemiştir. Jeffrey ve ark (2008)'nin yaptığı çalışmaya göre, CPE palmitat asite maruz kalmış pankreatik beta hücrelerinde ER stresin ve apoptozun engellenmesini sağlamıştır (50). Bu çalışma hiperlipidemiadan dolayı ortaya çıkan beta hücrelerinin ölmesiyle oluşan diyabette CPE'nin önemli bir rolü olduğunu ileri sürmektedir.

Diğer mutasyonlarda ilgi çekici olması ve çalışılması gerektiği halde proje ekibi CPE'nin nörodejenerasyondaki rolünü belirlemek üzere bu projeyi başlatmıştır. CPE'nin yokluğu, yetişkin fare nöronlarında nörodejenerasyona neden olduğundan (1), ve CPE geninin fazla ifade edilmesi nöronları (1) ve palmitat asite maruz kalmış pankreatik beta hücrelerini apoptoza karşı koruduğundan (50) bu projede CPE genine adenozin ekleriyle ortaya çıkan ve potansiyel hatalı olan QQ CPE mutantın (Şekil 1) yaşlanmayla ortaya çıkan nörodejenerasyon bozukluklarına neden olabilir. QQ-CPE mutasyonunun hücrel

mekanizmalarını CPE'nin yeni ve farklı bir rolü olan nöroproteksiyonu daha iyi anlamımızı sağlayacaktır.

2.1. Kaynaklar:

1. Woronowicz, A., H. Koshimizu, S.Y. Chang, N.X. Cawley, J.M. Hill, R.M. Rodriguiz, D. Abebe, C. Dorfman, V. Senatorov, A. Zhou, Z.G. Xiong, W.C. Wetsel, and Y.P. Loh, 2008. Absence of carboxypeptidase E leads to adult hippocampal neuronal degeneration and memory deficits. *Hippocampus*.e-published.
2. Gusella, J.F., N.S. Wexler, P.M. Conneally, S.L. Naylor, M.A. Anderson, R.E. Tanzi, P.C. Watkins, K. Ottina, M.R. Wallace, A.Y. Sakaguchi, and et al., 1983. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306(5940): p. 234-8.
3. Koide, R., T. Ikeuchi, O. Onodera, H. Tanaka, S. Igarashi, K. Endo, H. Takahashi, R. Kondo, A. Ishikawa, T. Hayashi, and et al., 1994. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet*, 6(1): p. 9-13.
4. Nagafuchi, S., H. Yanagisawa, E. Ohsaki, T. Shirayama, K. Tadokoro, T. Inoue, and M. Yamada, 1994. Structure and expression of the gene responsible for the triplet repeat disorder, dentatorubral and pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet*, 8(2): p. 177-82.
5. Fischbeck, K.H., A. Lieberman, C.K. Bailey, A. Abel, and D.E. Merry, 1999. Androgen receptor mutation in Kennedy's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354(1386): p. 1075-8.
6. Holmes, S.E., E. O'Hearn, A. Rosenblatt, C. Callahan, H.S. Hwang, R.G. Ingersoll-Ashworth, A. Fleisher, G. Stevanin, A. Brice, N.T. Potter, C.A. Ross, and R.L. Margolis, 2001. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet*, 29(4): p. 377-8.
7. Lehmann, D.J., H.T. Butler, D.R. Warden, M. Combrinck, E. King, J.A. Nicoll, M.M. Budge, C.A. de Jager, E. Hogervorst, M.M. Esiri, J. Ragoussis, and A.D. Smith, 2003. Association of the androgen receptor CAG repeat polymorphism with Alzheimer's disease in men. *Neurosci Lett*, 340(2): p. 87-90.
8. Jan, L., Y. Jan, and M. Brownfield, Peptidergic transmitters in synaptic boutons of sympathetic ganglia, in *Nature*. 1980. p. 380-382.

9. Aronin, N., M. Difiglia, and S. Leeman, Brain peptides, B.M. Krieger DT, and Martin JB, Editor. 1983, Wiley and Sons: New York.
10. Barker, J. and H. Gainer, Peptide regulation of bursting pacemaker activity in a molluscan neurosecretory cell, in Science. 1974. p. 1371-1373.
11. Gilles, G., E. Kinton, and P. Lowry, Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin, in Nature. 1982. p. 355-357.
12. Radulovic, J., A. Ruhmann, T. Liepold, and J. Spiess, 1999. Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. J Neurosci, 19(12): p. 5016-25.
13. Verhaagen, J., P. Edwards, F. Jennekens, P. Schotman, and W. Gispen, 1986. Alpha-melanocyte-stimulating hormone stimulates the outgrowth of myelinated nerve fibers after peripheral nerve crush. Journal of Experimental Biology, 92(2): p. 415-454.
14. Zachary, I., P. Woll, and E. Rozengurt, 1987. A role for neuropeptides in the control of cell proliferation. Developmental Biology, 124(2): p. 295-308.
15. Steiner, D.F., 1998. The proprotein convertases. Curr Opin Chem Biol, 2(1): p. 31-9.
16. Dhanvantari, S., F.-S. Shen, T. Adams, C.R. Snell, C. Zhang, R.B. Mackin, S.J. Morris, and Y.P. Loh, 2003. Disruption of a Receptor-Mediated Mechanism for Intracellular Sorting of Proinsulin in Familial Hyperproinsulinemia. Mol Endocrinol, 17(9): p. 1856-1867.
17. Yanik, T., G. Dominguez, M.J. Kuhar, E.M. Del Giudice, and Y.P. Loh, 2006. The Leu34Phe ProCART mutation leads to cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) deficiency: a possible cause for obesity in humans. Endocrinology, 147(1): p. 39-43.
18. Egan, M.F., M. Kojima, J.H. Callicott, T.E. Goldberg, B.S. Kolachana, A. Bertolino, E. Zaitsev, B. Gold, D. Goldman, M. Dean, B. Lu, and D.R. Weinberger, 2003. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell, 112(2): p. 257-69.
19. Woo, N.H., H.K. Teng, C.J. Siao, C. Chiaruttini, P.T. Pang, T.A. Milner, B.L. Hempstead, and B. Lu, 2005. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. Nat Neurosci, 8(8): p. 1069-77.

20. Lee, R., P. Kermani, K.K. Teng, and B.L. Hempstead, 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294(5548): p. 1945-8.
21. Fricker, L.D. and S.H. Snyder, 1983. Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephalin-synthesizing carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.*, 258(18): p. 10950-5.
22. Hook, V.Y.H. and Y.P. Loh, 1984. Carboxypeptidase B-like converting enzyme activity in secretory granules of rat pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: p. 2776-2780.
23. Cool, D.R., E. Normant, F.-S. Shen, H.-C. Chen, L. Pannell, Y. Zhang, and Y.P. Loh, 1997. Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: Genetic obliteration leads to endocrine disorders in *Cpe^{fat}* mice. *Cell*, 88(1): p. 73-83.
24. Lou, H., S.-K. Kim, E. Zaitsev, C.R. Snell, B. Lu, and Y.P. Loh, 2005. Sorting and Activity-Dependent Secretion of BDNF Require Interaction of a Specific Motif with the Sorting Receptor Carboxypeptidase E. *Neuron*, 45(2): p. 245-255.
25. Park, J.J., N.X. Cawley, and Y.P. Loh, 2008. A bi-directional carboxypeptidase E-driven transport mechanism controls BDNF vesicle homeostasis in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*, 39(1): p. 63-73.
26. Park, J.J., N.X. Cawley, and Y.P. Loh, 2008. Carboxypeptidase E cytoplasmic tail-driven vesicle transport is key for activity-dependent secretion of peptide hormones. *Mol Endocrinol*, 22(4): p. 989-1005.
27. Cawley, N.X., J. Zhou, J.M. Hill, D. Abebe, S. Romboz, T. Yanik, R.M. Rodriguiz, W.C. Wetsel, and Y.P. Loh, 2004. The carboxypeptidase E knockout mouse exhibits endocrinological and behavioral deficits. *Endocrinology*, 145(12): p. 5807-19.
28. Zhu, X., K. Wu, L. Rife, N.X. Cawley, B. Brown, T. Adams, K. Teofilo, C. Lillo, D.S. Williams, Y.P. Loh, and C.M. Craft, 2005. Carboxypeptidase E is required for normal synaptic transmission from photoreceptors to the inner retina. *J Neurochem*, 95: p. 1351-1362.
29. Jacob, T.C. and J.M. Kaplan, 2003. The EGL-21 carboxypeptidase E facilitates acetylcholine release at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *J Neurosci*, 23(6): p. 2122-30.

30. Naggert, J.K., L.D. Fricker, O. Varlamov, P.M. Nishina, Y. Rouille, D.F. Steiner, R.J. Carroll, B.J. Paigen, and E.H. Leiter, 1995. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet*, 10(2): p. 135-42.
31. Varlamov, O., E.H. Leiter, and L. Fricker, 1996. Induced and spontaneous mutations at Ser202 of carboxypeptidase E. Effect on enzyme expression, activity, and intracellular routing. *J Biol Chem*, 271(24): p. 13981-6.
32. Cawley, N.X., Y.M. Rodriguez, A. Maldonado, and Y.P. Loh, 2003. Trafficking of mutant carboxypeptidase E to secretory granules in a beta-cell line derived from Cpe(fat)/Cpe(fat) mice. *Endocrinology*, 144(1): p. 292-8.
33. Jin, K., S.H. Graham, T. Nagayama, P.C. Goldsmith, D.A. Greenberg, A. Zhou, and R.P. Simon, 2001. Altered expression of the neuropeptide-processing enzyme carboxypeptidase E in the rat brain after global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(12): p. 1422-9.
34. Utsunomiya, N., S. Ohagi, T. Sanke, H. Tatsuta, T. Hanabusa, and K. Nanjo, 1998. Organization of the human carboxypeptidase E gene and molecular scanning for mutations in Japanese subjects with NIDDM or obesity. *Diabetologia*, 41(6): p. 701-5.
35. Chen, H., S. Jawahar, Y. Qian, Q. Duong, G. Chan, A. Parker, J.M. Meyer, K.J. Moore, S. Chayen, D.J. Gross, B. Glaser, M.A. Permutt, and L.D. Fricker, 2001. Missense polymorphism in the human carboxypeptidase E gene alters enzymatic activity. *Hum Mutat*, 18(2): p. 120-31.
36. Jia, E.Z., J. Wang, Z.J. Yang, T.B. Zhu, L.S. Wang, H. Wang, C.J. Li, B. Chen, K.J. Cao, J. Huang, and W.Z. Ma, 2007. Association of the mutation for the human carboxypeptidase E gene exon 4 with the severity of coronary artery atherosclerosis. *Mol Biol Rep*.
37. Jia, E.Z., J. Wang, Z.J. Yang, T.B. Zhu, L.S. Wang, B. Chen, K.J. Cao, J. Huang, and W.Z. Ma, 2008. Molecular scanning of the human carboxypeptidase E gene for mutations in Chinese subjects with coronary atherosclerosis. *Mol Cell Biochem*, 307(1-2): p. 31-9.
38. Wang, J., Y. Zhang, Z.J. Yang, T.B. Zhu, L.S. Wang, B. Chen, K.J. Cao, J. Huang, W.Z. Ma, and E.Z. Jia, 2008. Association of human carboxypeptidase E exon5 gene polymorphisms with angiographical characteristics of coronary atherosclerosis in a Chinese population. *Acta Pharmacol Sin*, 29(6): p. 736-44.

39. Ambrose, C.M., M.P. Duyao, G. Barnes, G.P. Bates, C.S. Lin, J. Srinidhi, S. Baxendale, H. Hummerich, H. Lehrach, M. Altherr, and et al., 1994. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet*, 20(1): p. 27-38.
40. Dragatsis, I., P. Dietrich, and S. Zeitlin, 2000. Expression of the Huntingtin-associated protein 1 gene in the developing and adult mouse. *Neurosci Lett*, 282(1-2): p. 37-40.
41. Perutz, M.F., T. Johnson, M. Suzuki, and J.T. Finch, 1994. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(12): p. 5355-8.
42. Scherzinger, E., R. Lurz, M. Turmaine, L. Mangiarini, B. Hollenbach, R. Hasenbank, G.P. Bates, S.W. Davies, H. Lehrach, and E.E. Wanker, 1997. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*, 90(3): p. 549-58.
43. Gomis-Ruth, F.X., V. Companys, Y. Qian, L.D. Fricker, J. Vendrell, F.X. Aviles, and M. Coll, 1999. Crystal structure of avian carboxypeptidase D domain II: a prototype for the regulatory metallo-carboxypeptidase subfamily. *Embo J*, 18(21): p. 5817-26.
44. Dhanvantari, S., I. Arnaoutova, C.R. Snell, P.J. Steinbach, K. Hammond, G.A. Caputo, E. London, and Y.P. Loh, 2002. Carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, is anchored to secretory granules via a C-terminal transmembrane insertion. *Biochemistry*, 41(1): p. 52-60.
45. Zhang, C.-F., S. Dhanvantari, H. Lou, and Y.P. Loh, 2003. Sorting of carboxypeptidase E to the regulated secretory pathway requires interaction of its transmembrane domain with lipid rafts. *Biochem J*, 369(Pt 3): p. 453-60.
46. Dhanvantari, S. and Y.P. Loh, 2000. Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *J Biol Chem*, 275(38): p. 29887-93.
47. Fricker, L.D., B. Das, and R.H. Angeletti, 1990. Identification of the pH-dependent membrane anchor of carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10). *J Biol Chem*, 265(5): p. 2476-82.
48. Parkinson, D., 1990. Two soluble forms of bovine carboxypeptidase H have different NH₂-terminal sequences. *J Biol Chem*, 265(28): p. 17101-5.

49. Lou, H., A.M. Smith, L.C. Coates, N.X. Cawley, Y.P. Loh, and N.P. Birch, 2007. The transmembrane domain of the prohormone convertase PC3: a key motif for targeting to the regulated secretory pathway. *Mol Cell Endocrinol*, 267(1-2): p. 17-25.
- 50- Kristin D. Jeffrey, Emilyn U. Alejandro, Dan S. Luciani, Tatyana B. Kalynyak, Xiaoke Hu, Hong Li, Yalin Lin, R. Reid Townsend, Kenneth S. Polonsky, and James D. Johnson Carboxypeptidase E mediates palmitate-induced β -cell ER stress and apoptoz 2008. *Proc Natl Acad Sci U S A*. June 17; 105(24): 8452–8457.
51. Stephen O'Rahilly and I.Sadaf Farooqi 2006. Genetics of obesity *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 361(1471): 1095–1105.
52. Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, Yamamoto J, Sekine M, Tsuritani K, Wakaguri H, Ishii S, Sugiyama T, Saito K, Isono Y, Irie R, Kushida N, Yoneyama T, Otsuka R, Kanda K, Yokoi T, Kondo H, Wagatsuma M, Murakawa K, Ishida S, Ishibashi T, Takahashi-Fujii A, Tanase T, Nagai K, Kikuchi H, Nakai K, Isogai T, Sugano S. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res*. 2006. Jan;16(1):55-65.
- 53- Heping Zhang, Shupeng Li, Min Wang, Brian Vukusic, Zdenek B Pristupa, and Fang Liu. 2009. Regulation of dopamine transporter activity by carboxypeptidase E *Mol Brain*.; 2: 10.
54. Cawley NX, Yanik T, Woronowicz A, Chang W, Marini JC, Loh YP. 2010. Obese carboxypeptidase E knockout mice exhibit multiple defects in peptide hormone processing contributing to low bone mineral density. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Aug;299 (2):E189-97.50
- 55- Caruso C, Sanchez M, Durand D, de la Cruz Perez M, Gonzalez PV, Lasaga M, Scimonelli TN. 2010 alpha-Melanocyte-stimulating hormone modulates lipopolysaccharide plus interferon-gamma-induced tumor necrosis factor-alpha expression but not tumor necrosis factor-alpha receptor expression in cultured hypothalamic neurons. *J Neuroimmunol*. Jul 7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20619468.
- 56- Chunyan Xu, Beatrice Bailly-Maitre, and John C. Reed 2005 Endoplasmic reticulum stress:cell life and death decisions *The Journal of Clinical Investigation* 115:2656-2664
- 57- Koshimizu H, Senatorov V, Loh YP, Gozes I. 2009 Neuroprotective protein and carboxypeptidase E. *J Mol Neurosci*. Sep;39(1-2):1-8. Epub 2009 Jan 23. Review.
- 58- Lee KP et al. 2008 *Cell* 132:89-100
- 59- Boya P and Kroemer, GK 2008 Lysosomal membrane permeability in cell death.

Oncogene 27: 6434–6451

60- Plá V, Paco S, Ghezali G, Ciria V, Pozas E, Ferrer I, Aguado F. 2013 Secretary sorting receptors carboxypeptidase E and secretogranin III in amyloid β -associated neural degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 23(3):274-84. doi: 10.1111/j.1750-3639.2012.00644.x. PMID: 22998035.

61- Cawley NX, Wetsel WC, Murthy SR, Park JJ, Pacak K, Loh YP. New roles of carboxypeptidase E in endocrine and neural function and cancer. *Endocr Rev.* 2012 Apr;33(2):216-53. doi: 10.1210/er.2011-1039. Epub 2012 Mar 7. Review. PubMed PMID: 22402194; PubMed Central PMCID: PMC3365851.

62- Koshimizu H, Senatorov V, Loh YP, Gozes I 2009 Neuroprotective protein and carboxypeptidase E. *J Mol Neurosci* **39**:1–8

63- Cheng Y, Cawley NX, Yanik T, Liu C, Murthy S, Loh Y 2011 Carboxypeptidase E in neuroprotection: links to neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Program of 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, D.C., (Abstract 48.01/O11)*

64- Kasikci F, Cawley,NX, Yanik T, Loh P (2013) Investigation Of The Cellular Mechanisms Underlying the Carboxypeptidase E Mutation Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013 Volume 280, Issue Supplement s1 Pages 1–661

3- GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre hatları:

N2A: Fare nöroblastoma hücreleri. CPE sentezlemeyen bu hücreler hormon salgı yolları olduğu için nörohormonlar ve onları aktiveştiren enzimlerin incelenmesi için uygun (45) ve sık kullanılan bir modeldir

COS7: Maymun böbrek hücreleri. CPE veya CPE benzeri moleküllerin aktivitelerini içermezler. Bu hücrelerin regüle edilen salgı yolları (RSP) yoktur; bu nedenle, CPE gibi normalde RSP'ye gönderilen proteinler sürekli olarak kontrolsüz salınımla hücre kültürü büyüme ortamına salgılanırlar. Enzim aktivitesi çalışmalarında negative kontrol grubu olarak seçilmiştir.

Molekül modelleri: Normal ve mutant CPE'yi pcDNA3.1 plasmidi içine koyarak elde edilen cDNA konstraktı Loh lab., National Institutes of Health (NIH), USA tarafından oluşturulmuş ve proje yürütücüsüne hediye edilmiştir.

YÖNTEM

Western Blot analizi: Yanik ve ark. (17)'da ve uygulandığı gibi (ayrıntılar ilgili bölümdedir). Moleküllerin sentezi, aktiveştirilmesi ve hücre dışına salınmasıyla ilgili deneyler. Bozulan proteinlerin hücre içi yıkım mekanizmalarının incelenmesi.

Immunofloresans mikroskop: Yanik ve ark. (17)'da, Cawley ve ark (32)'da uygulandığı gibi (ayrıntılar ilgili bölümdedir). CPE'nin hücre içi lokasyonlarını belirlenmesiyle ilgili deneyler.

Yüksek basınçlı likid kromatografisi (HPLC): Cawley ve ark (27)'de uygulandığı gibi (ayrıntılar ilgili bölümdedir). Enzim aktivasyonunu belirlenmesini sağlayan deneyler.

ELİSA deneyleri: Apoptozun belirlenmesiyle ilgili deneyler.

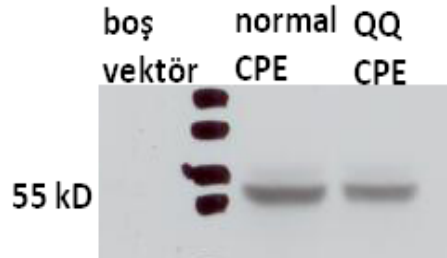
Projedeki amaçlarımıza uygun olarak belirlediğimiz yöntemin sıralaması aşağıdaki gibidir.

1. Normal CPE'nin QQ-CPE'le biyosentez, aktiveştirilmesinin ve hücre dışına salınmasının karşılaştırılması (hücre içi trafiği ve dağıtımı).
2. Normal ve QQ-CPE mutantın enzimatik fonksiyonlarının incelenmesi.
3. QQ-CPE'nin hücre içi yıkımı ve endoplazmik retikulum (ER) stresindeki etkisinin belirlenmesi.
4. CPE'nin nörodejenerasyondaki rolünün incelenmesi.

2.2. CPE ve QQ CPE'nin biyosentezi ve hücre dışına salınmasının incelenmesi.

3.1.1. Hücre kültürü: CPE'nin biyosentezini ve N2A hücrelerine transfeksiyonunu belirlemek için Western blot methodu kullanıldı. N2A hücreleri kontrol olarak β -galactosidase (LacZ) kodlayan (mock), normal CPE ve QQ CPE cDNA konstraklarıyla (5 ug) Lipofactemine-2000 (Invitrogen) transfeksiyon ajanıyla 24 saat inkübe edildi. Hücreler DMEM (+L-glutamin) ve 10% FBS içeren sıvı ortamlarda karbondioksit inkübatörlerinde büyütüldü. Tripsinle kültürdeki hücrelerin alınmasından sonra 3 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilerek tripsin uzaklaştırıldı. Hücreler proteaz inhibitörü (1X mini proteaz inhibitör kokteyli; Roche Molecular Biochemicals) içeren hücre zarını parçalayan M-PER (Roche) solüsyonuyla parçalandı ve hücre içindeki çözünebilir proteinler hücrelerin 10,000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmesiyle elde edildi. Santrifüjden sonra süpernatanttaki protein örneklerinin Bradford (Bio-Rad) yöntemiyle miktarları belirlendikten sonra eşit ağırlıktaki protein miktarları Western blot methoduyla analiz edildi (17). Blotlar, anti-CPE (1:8,000, Santa-Cruz) antikolarıyla inkübe edildikten sonra Western blot sinyallerinin görüntülenmesi için horseradish peroxidaz (1:10,000) ile bağlanmış keçi anti-tavşan IgG ikincil antikorunu kullanılarak geliştirilmiş kemiluminesans (Pierce) kullanıldı.

Proje önerisinde sunduğumuz şekil 2'deki veri değişik zamanlarda da tekrar edilerek benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu veriler 1. raporda da sunulmuştur. Verilerimiz boş vektör transfekt edilen hücrelerde CPE sentezlemediğini de göstermekte ve WT ve QQ CPE ifadelerinde herhangi bir aksaklık görülmediğini göstermektedir.



Şekil 2: Boş vektör, normal ve QQ CPE Western Blot analizi: boş vektör ve CPE cDNA konstrakları Neuro2A hücrelerine transfekt edilmiştir. Proteinlerin blotlarda belirlenmesi için anti-CPE kullanılmıştır.

3.1.2. Sekresyon çalışmaları: Hücreler altı-kuyulu petri kutularında üç kere ayrı ayrı ekildikten sonra transfekt edildi. Bazal ve uyarılmış salgılamasının belirlenmesi ve ölçülmesi yapıldı. Bazal salgılama için 2 ardaşık 30 dakikalık periyotlarda 37°C'de 1 ml'lik bazal salgılama sıvısı hücrelerle bekletilerek her 30 dakikanın sonunda 1 ml'lik hücre sıvısı toplanıp ependorf tüplere konulup buzda bekletildi. Bazal periyotlardan sonra uyarılmış salgılama için hücreler 1 ml'lik %0.01 BSA içeren 50mM KCl/DMEM'le uyarılacak üçüncü bir

30 dakikalık inkübasyonda tutuldu. Bazal ve uyarılmış büyüme ortamının eşit kantatif miktarları CPE immünoreaktivitesi anti-CPE kullanılarak Western Blot methodu kullanılarak analiz edildi (17, 32). Western blotta görülen immünoreaktif normal veya QQ mutant CPE bantları bu proteinlerin hangi hücre içi salgınım yollarında olduğunu göstermiştir.

3.2 . Normal ve QQ CPE'nin enzimatik aktivitesinin *in-vitro* olarak belirlenmesi.

Hücreler 24 saatlik transfeksiyondan sonra BSA eklenmiş midyumla değiştirilerek 24 saat daha inkübasyon yapıldı. Daha sonra midyum alınıp, ölü hücreleri ve hücre atıklarını çöktürmek ve supernatant elde etmek için 10,000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Negatif kontrol olarak, transfekt edilmemiş COS7 hücreleri, pozitif kontrol olarak ise normal CPE kodlayan plazmitler kullanıldı.

Analiz: Aktif adrenokortikotropin hormonu (ACTH) oluşmasında CPE rol oynar. Analizler, 1mM CoCl₂ varlığında ve yokluğunda 50 mM sodyum asetat, pH 5.5, yapıldı. CPE tarafından oluşturulan ürünler yüksek basınçlı likid kromatografisi (HPLC, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi, ODTÜ, Ankara) ile analiz edildi.

3.3. CPE'nin ER stresindeki etkisinin belirlenmesi.

Hipotezimize göre CPE nöronları CPE'nin bozulmasından yada etkisinin azalmasından dolayı oluşabilecek ER stresinden koruyarak nörodejenerasyonu engellemektedir. Bunu test etmek için öncelikle QQ CPE'nin hücre içi yıkımı daha sonra ER stresini belirlenmesi planlanmıştır.

3.3.1. WT ve QQ CPE'nin hücre içi yıkılmasının incelenmesi.

WT ve QQ CPE cDNA konstraklarıyla (5 ug) N2A hücreleri trasfekt edildikten sonra ptoeazomlar N-acetyl-leu-leu-methional (MG132, Sigma) ile lizozomlar ise sistein proeaz inhibitörü, kathepsin A, H, L (E64d, Sigma) ile hem ayrı hemde birlikte hücrelere eklenecektir. İmmunoblot yöntemiyle ve anti CPE kullanılarak bozulmanın protezom yada lizozom kaynaklı olup olmadığı belirlenecektir.

3.3.2. ER stresinin incelenmesi

CHOP analizi

ER stresin oluştuğunun gösterilemesinde etkin bir yöntemdir. C/EBP Homoloji Protein (CHOP) yada diğer adıyla, büyümeyi engelleyen ve DNA'yı indükleyen protein 153 (GADD153), katlanmamış protein respons (UPR)'da proteinin 3 kolundan birine bağlanarak ER'daki streste hücrenin buna tepki oluşturmasını sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücrelerde UPR yada yanlış katlanmış protein miktarı arttığında bu hücrenin devamı için bir tehlike olup bu durum ER stress olarak adlandırılır. Hücre bu stresten çıkmak için değişik yollar ararken bir çok sinyal oluşturur. BU sinyaller genellikle şaperon proteinlerinin ifadelerinin artması, NFkB sinyalleri ve CHOP ile apoptosis indüklenmesi. CHOP 27 kD ağırlığında C/EBP dominant negatif inhibitörüdür. Bu proteinin amino terminali transkripsiyon aktivasyonu, C-terminali ise DNA'ya bağlanan leusin fermuarı dimerizasyon özelliğini taşımaktadır. Normalde homodimer olarak aktif olan C/EBP'ye CHOP dominant negatif olarak bağlanarak bağlanır. Bu heterodimer DNA'ya bağlanmayı azaltır. CHOP hücrede stres durumu yokken sitozolde bulunur ve seviyeleri düşüktür. ER stresinde, ER stresin aktive ettiği kinaz PERK, eIF α faktörünün fosforilasyonuna ve sonuç olarak ATF4 mRNA seviyelerini artırır. ATF4 CHOP promoterine bağlanarak CHOP ifadesini sağlar ve böylece ER streste CHOP miktarı artar. ER-stres bağlı apoptozun artmasına nede olan mekanizmaları bilimemle birlikte pro-survival protein Bcl-2'nun supres ettiği düşünülmektedir. CHOP aktivitesine nörodejenerasyon ve kanser gibi hastalıklarda sıkça rastlanmaktadır (MESO Scale Discovery, USA, CHOP assay kit protocol).

Deneylerimizde ER stresi göstermek için CHOP aktivitesi WT ve QQ CPE transfekte edilmiş hücrelerde anti-CHOP kullanılarak Western blot yöntemiyle belirlenmiştir.

3.4. CPE'nin nörodejenerasyondaki rolünün incelenmesi.

N2A hücrelerinde WT yada QQ CPE transfeksiyonundan sonra oluşabilecek hücre ölümleri ile nörodejenerasyon bağlantısı kurulması planlanmıştır. İki yöntemle apoptoz belirlenmeye çalışılmıştır.

3.4.1. ELISA, apoptoz: WT ve QQ CPE'nin apoptoza uğradığını belirlemek için hücre-ölümü ELISA kitlerini (Roche, Tenay A.Ş., Ankara) kullandık. WT ve QQ CPE ve proteazom, lizozomların inhibe edildiği hücre hatlarının hücre içerikleri kullanılarak kit aracılığıyla

apoptotik hücreler kantitatif olarak belirlendi. Boş vektör transfekt edilmiş hücreler bu kitlerde negatif kontrol olarak kullanıldı.

N2A hücreleri tripsin ile toplandıktan sonra liziz tampon çözeltisi ile süspansiyone edildi. Oda sıcaklığında bu karışımı 30 dakika inkübasyondan sonra 200g de 10 dakika santrifüj ederek süpernatant ayrıldı. Kuyucukları 5% BSA ile 1 saat bloklandı. Süpernatantlar 20 L er bir kuyucuklara eklendi ve 80 L immunoreagent de eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklar tampon çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Analiz için 100 L ABTS solüsyonu eklendi ve fotometrik analiz için gerekli renk oluşana kadar bekledikten sonra ABTS stop solüsyonu ile reaksiyonlar durduruldu. ELISA okuyucusunda 405 nm de örneklerin absorbansı bulundu.

Kitin yönergelerine göre, apoptotik hücrelerin hesaplamasında arka plan değerlerini ölçüm değerlerimizden çıkarttıktan sonra (inkübasyon tampon çözeltisi) sitoplazmaya salınan mono ve oligonükleozomlar için (güçlendirme faktörü) hesaplaması gerçekleştirildi.

Güçlendirme faktörü = örneklerin mU'su (ölen/ölmüş hücreler) / negatif kontrol'ün mU'su

$mU = \text{absorbance} \times 10^{-3}$

3.4.2. Akridin Turuncu Deneyleri

Apoptotik hücrelerin görüntülenmesinde akridin turuncu (AT) deneyleri de uygulanmıştır. Proje önerisinde yer almayan bu deneyler apoptotik hücrelerin görüntülenmesi amacını taşımaktadır. AT hücre permabilitesi olan ve nükleik asitlere bağlanan bir boyadır. Çift zincirli DNA'ya bağlandığında yeşil floresans ışığı yayar ve tek zincirli DNA'ya bağlandığında kırmızı floresans ışığı yayar.

N2A hücreleri hücre kültüründe lameller üzerinde büyütülmüştür. WT ve QQ-CPE transfeksiyonu yapılan bu hücrelere AT verilip 1 saat inkübasyonu sağlanmıştır. PBS ile yıkamalardan sonra lameller lamellar üzerine yapıştırılmıştır. Görüntüleme işlemi konfokal mikroskopta gerçekleştirilmiştir. AT boyaması lizozomal lokasyonunda işaret edebilir (59).

4. BULGULAR

Önceki rapor dönemlerindeki bulgularımızı şöyle sıralayabiliriz.

- 1- WT ve QQ CPE'nin nöron hücre hatlarında biyosentezi, aktiveştirilmesi ve hücre dışına salınması..
- 2- Immunofloresans mikroskopla QQ-CPE'nin hücre lokasyonunun belirlenmesi.
- 3- CPE enzim aktivitesi sonuçları.
- 4- QQ-CPE'nin hücre içi yıkımı ile ilgili deneyler başlatılmıştır.
- 5- QQ-CPE'nin hücre içi agregatlarının oluşumu test edilmiştir.

Son Dönem İçindeki Bulgularımız:

İş-Zaman Çizelgesi : Projenin son 6 aylık kapsamında yapılan işlerin zamanlaması aşağıdaki tabloda verilmiştir:

İş No 1: Hücre içi WT ve QQ CPE yıkım deneyleri

- ✓ Lizozomal yıkım
- ✓ Proteosomal yıkım

İş No 2: ER stres deneyleri, CHOP analizi

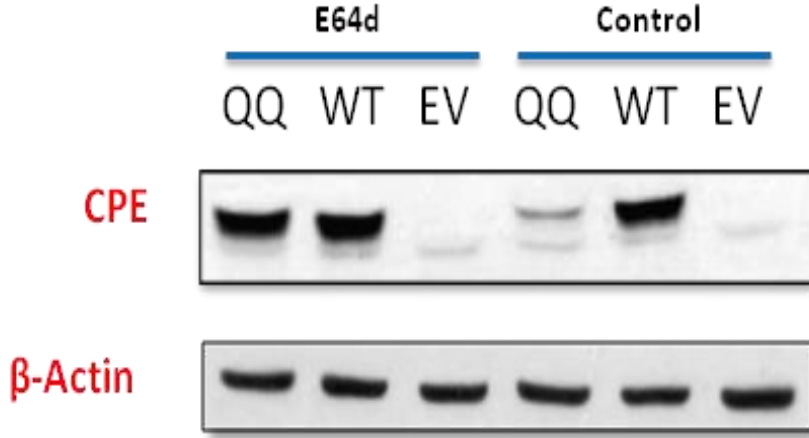
İş No 3: Apoptoz deneyleri

- ✓ ELISA, hücre-ölümü kiti
- ✓ Akridin turuncu analizi

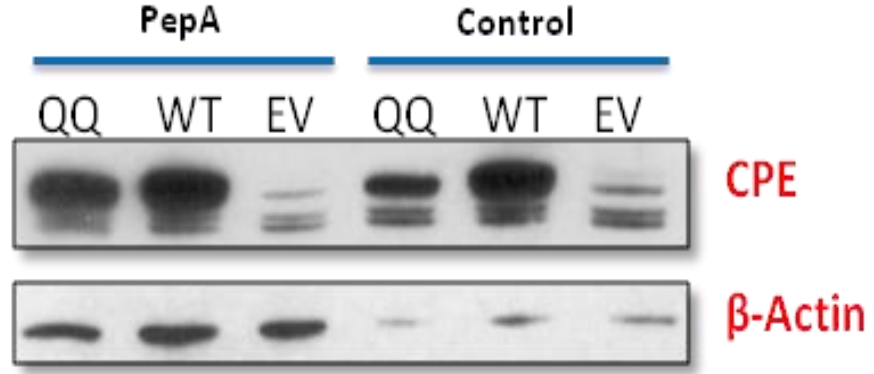
İş No	1-2. Ay	3-4. Ay	5-6. Ay
1	*	*	
2		*	*
3			*

4.1 QQ CPE'nin hücre içi yıkım mekanizmaları

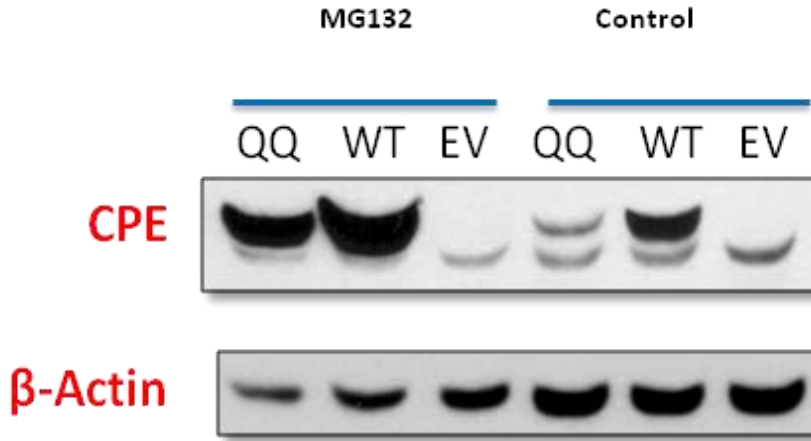
Son dönem verilerimizde QQ CPE'nin hücre içi yıkımıyla ilgili çalışmalarımızı sonlandırdık. Bulgularımıza göre QQ CPE hücre içi yıkıma uğramaktadır. Bu yıkım öncelikle lizozomlarda gerçekleşmektedir (Şekil 3). WT ve QQ CPE transfekt edilen hücrelerde proteazomlar inhibe edildiğinde hem WT hemde QQ CPE hücre içi yıkıma uğramaktadır (Şekil 4). Deneyler n=3 defa tekrarlanmıştır. Ayrıca, deneylerde lizozomal inhibasyonu artırmak için pepstatin A (pepA) proteazı da eklenmiştir. pepA, kathepsin D, E inhibitörüdür. pepA eklenmiş hücrelerde de Şekil 3'teki sonuçlara benzer veriler elde edilmiştir (Şekil 4). CPE nin proteazomal yıkımı da incelenmiştir (Şekil 5). MG132 ile proteazomları inhibe edilen hücrelerde hem WT hemde QQ CPE miktarlarında kontrol hücrelere göre büyük bir artış görülmektedir (Şekil 5). Kontrol amacıyla hem proteazomları hemde lizozomları inhibe edilmiş hücrelerde WT ve QQ CPE ifadeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 6). Şekil 6'da görüldüğü gibi hücre içi yıkık yollarının inhibe edilmesi daha çok QQ-CPE'yi etkilemektedir. Tüm deneyler n=3 şeklinde tekrarlanmıştır.



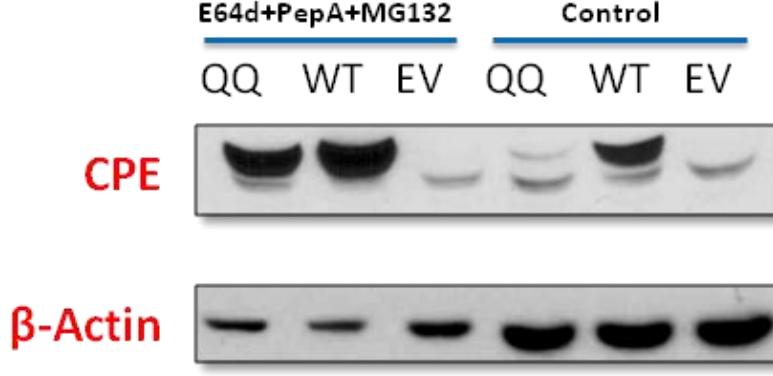
Şekil 3: Lizozomal inhibasyon. EV: boş vektör, WT: yabanıl, QQ-CPE transfekte edilmiş N2A hücreleri 20 μ M E64d kullanılarak lizozomları inhibe edilmiştir. Lizozomlar inhibe edildiğinde ifadeleri artırılmış QQ-CPE hücrede agregatlar oluşturmaktadır. WT CPE'de önemli bir değişiklik görülmemektedir. β -actin değerleri internal kontrol olarak aynı hücrelerden ve aynı immoblottan elde edilmiştir.



Şekil 4: pepA kullanılarak yapılan lizozomal yıkım. EV: boş vektör, WT: yabancı, QQ-CPE transfekte edilmiş N2A hücreleri 2 μ M pepA kullanılarak lizozomları kısmen inhibe edilmiştir. QQ-CPE ifadelerinin artması QQ CPE'nin lizozomlarda yıkıldığını gösterir. WT CPE'de önemli bir değişiklik görülmemektedir. β -actin değerleri internal kontrol olarak aynı hücrelerden ve aynı immoblottan elde edilmiştir.



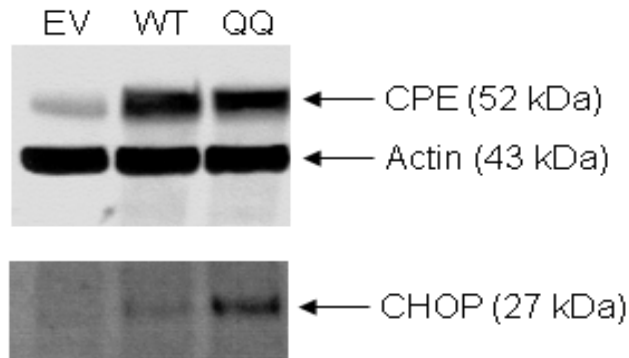
Şekil 5: Proteazomal yıkım. MG132 ajanıyla N2A hücrelerinin proteazomları inhibe edilmiştir. Kontrol hücelere göre proteazomları inhibe edilen hücrelerde hem WT hemde QQ CPE miktarında artma görülmüştür. EV: boş vektör. β -actin değerleri internal kontrol olarak aynı hücrelerden ve aynı immoblottan elde edilmiştir.



Şekil 6: WT ve QQ CPE proteazomal ve lizozomal yıkım. MG132, pepA ve E64d kullanılarak hücre içi yıkım yollarını inhibe edilmiştir. QQ CPE miktarları WT CPE'ye göre daha artmış ve böylece yıkıma uğramıştır. EV: boş vektör. β-actin değerleri internal kontrol olarak aynı hücrelerden ve aynı immoblottan elde edilmiştir.

4.2 QQ-CPE'in ER stresinin incelenmesi

QQ CPE'nin ER strese neden olup olmadığı CHOP analizinin Western blot yöntemiyle incelenmesi gerçekleştirilmiştir. CHOP analizinin detayları raporun 3.3.2 bölümünde açıklanmıştır. CHOP analiz sonucu Şekil 7'de gösterilmiştir. CHOP seviyelerinin QQ CPE transfeksiyonu yapılmış hücrelerde artması bu hücrelerde ER stres arttığını gösterir. Deneyler n=3 defa tekrarlanmıştır.



Şekil 7: CHOP'ın Western blot yöntemiyle EV, boş vektör, WT ve QQ CPE transfekt edilmiş N2A'de analizi. CHOP seviyeleri QQ CPE ile transfekt edilmiş hücrelerde önemli derecede artmıştır. Bu durum ER strese bağlı hücre ölüm yollarının arttığını gösterir. n=3.

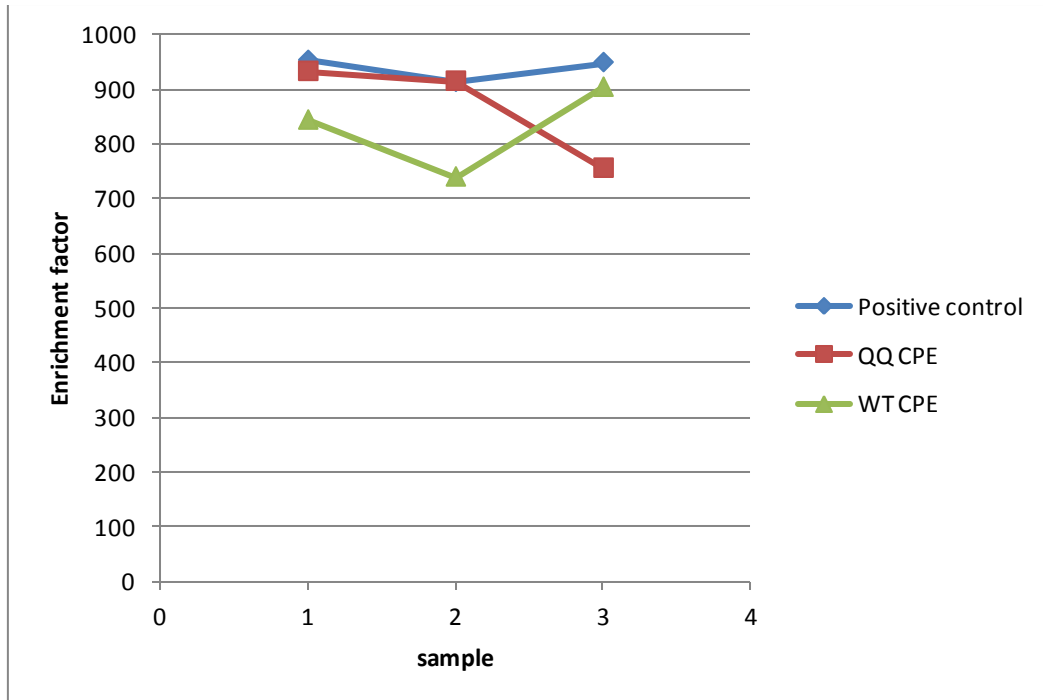
4.3 QQ CPE'nin apoptoza yol açmasının incelenmesi

4.3.1 Hücre ölümünü belirleyen ELISA deneyleri

Hipotezimize göre QQ-CPE nöronların ölümüne yol açmaktadır. Hücre yıkımının mekanizmalarının belirlenmesinden sonra hücrelerde apoptoz oluşumu ELISA apoptoz kiti (Şekil 8) ve akridin orange (Şekil 9) deneyleriyle gösterilmiştir. Deney tekrarı n=3'dür. Bu deneylerin inhibasyona uğraayn hücrelerle yapılması ön görülmüş ancak raporun teslim tarihine yetişmemiştir. Bu deneylerin tekrarı ve inhibasyona uğramış hücrelerin sonuçları yazım aşamasında olan yayın için kullanılacaktır.

Güçlendirme faktörü :

Enrichment Factor (mU)			
Örnekler	1	2	3
Pozitif kontrol	952	912	948
QQ CPE	932	914	755
WT CPE	843	739	903

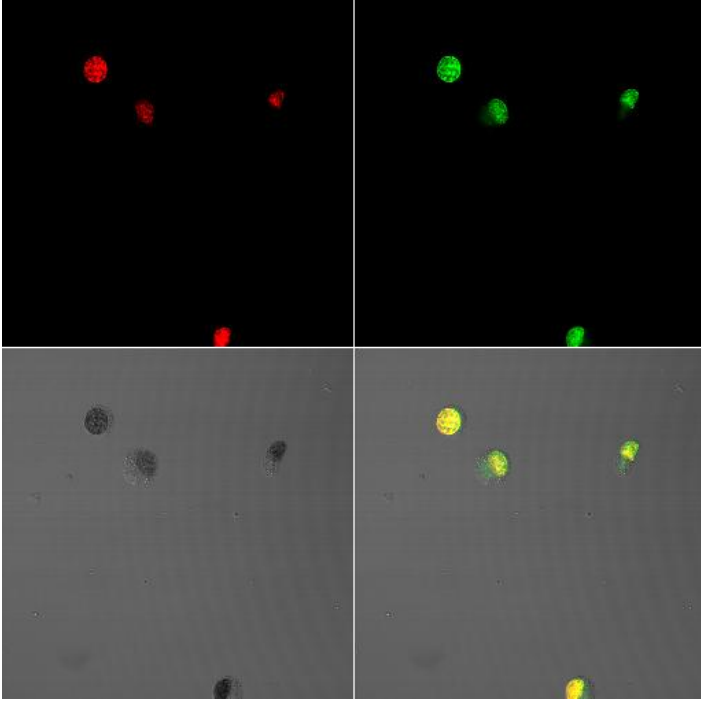


Şekil 8: WT, QQ CPE transfekte edilmiş N2A hücrelerinin apoptotik durumları. Pozitif kontrol 600 mU dan fazla değer verdiğinde apoptoz gerçekleşmektedir. Hem QQ hemde WT CPE de apoptoz görülmekle birlikte QQ CPE deki apoptoz oranları WT'e göre daha fazladır.

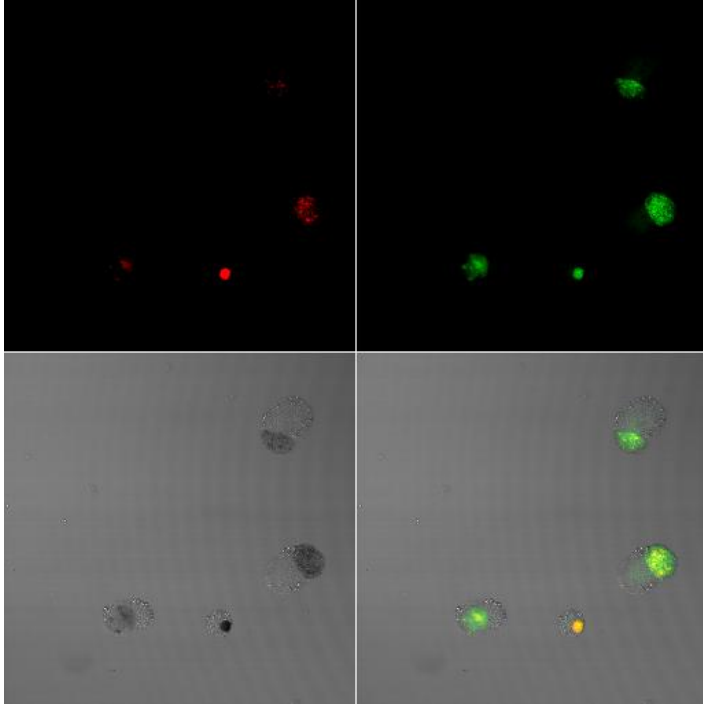
4.3.2 Akridin Turuncu deneyleri.

Akridin Turuncu (AT) ile boyanmış ve konfokal mikroskobide görüntülemesi gerçekleştirilen EV, boş vektör, WT ve QQ CPE ile transfekte edilmiş ve MG132 ile inhibe edilmiş N2A hücreleri Şekil 9'da gösterilmiştir. AT'nin tek zincirli DNA'ya bağlanması kırmızı çift zincirli DNA'ya bağlanması yeşil renk olarak yayılır. Ölü hücreler konfokal mikroskopinin aynı katmanları birleştirmesi sonucu ortaya çıkan panelin sağ alt tarafında görülen turuncu renkli hücrelerdir.

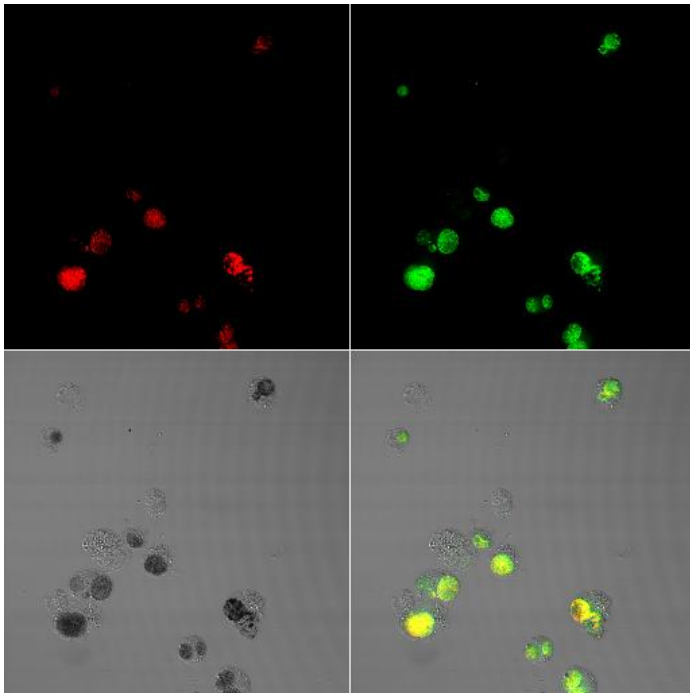
a- EV-DMSO



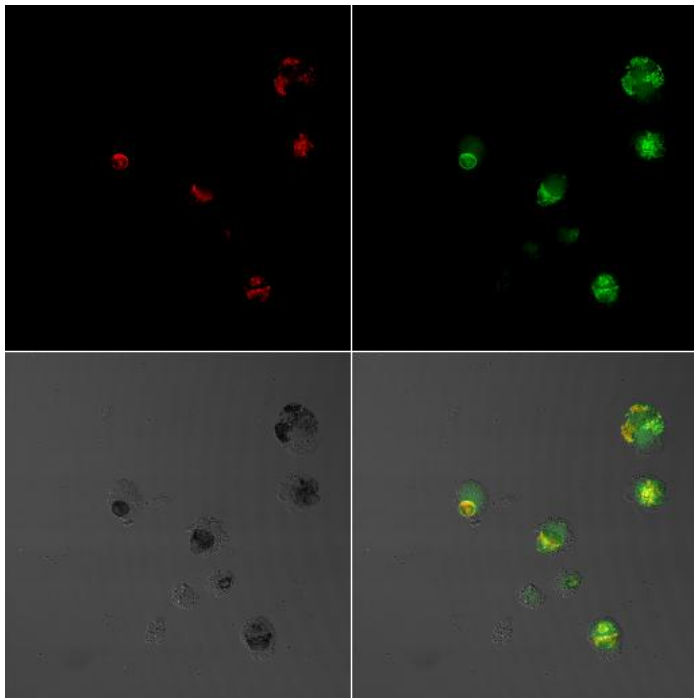
b- EV proteazom inhibasyonu +DMSO



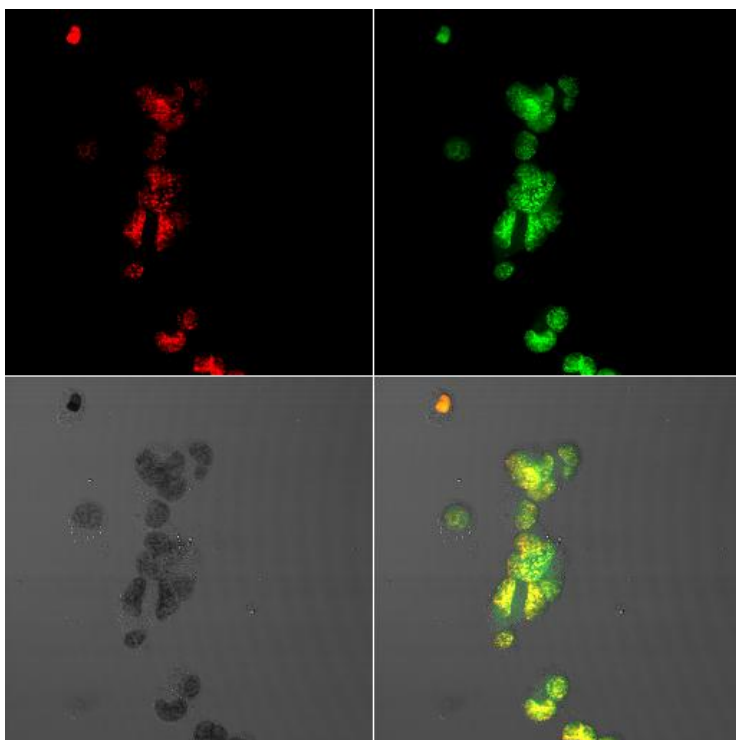
c- WT DMSO



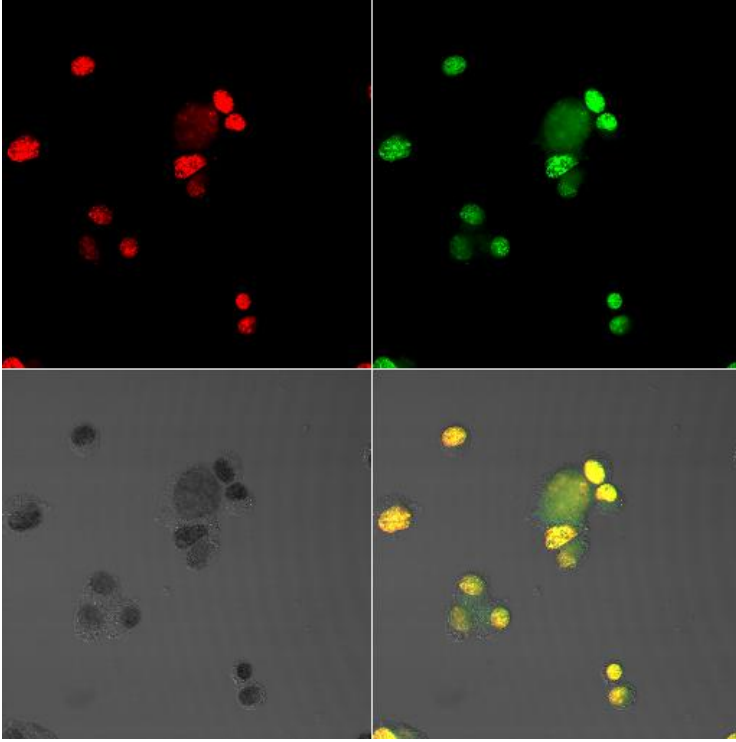
d- WT proteazom inhibasyonu +DMSO



e- QQ DMSO



f- QQ -CPE proteazom inhibasyonu+DMSO



Şekil 9: Akridin Turuncu hücrelerinin konfokal mikroskopisiyle görüntülenmesi. Hücreler; a- EV DMSO, b-EV+MG132, c-WT DMSO, d- WT+MG132, e-QQ DMSO, f-QQ+MG132 ile transfekte edilmiş ve kontrol hücrelerine DMSO ilave edilmiştir. Proteinlerin hücre içi yıkımı için MG132 kullanılmıştır. MG132 ile inhibe edilmiş ve QQ CPE tranfekte edilmiş hücrelerde akridin boyaması (sarı) EV ve WT transfekte edilen hücrelerden fazladır.

EV-kontrol	35	7	20
EV_MG132	32	9	28
WT- kontrol	30	5	16,7
WT- MG132	28	4	14,3
QQ- kontrol	30	12	40
QQ- MG132	32	15	47
	I	II	III

Tablo 1: Akridin Turuncu boyaması yapılan N2A hücrelerinin kantitatif değerleri. I- 1 cm² de sayılan hücre sayısı. II- akridin tutucuyuyla boyanan hücre sayısı, III- akridin turuncu hücrelerin 1cm² deki yüzde miktarı.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

CPE bir eksopeptidaz olarak bulunmuştur. Son yıllardaki çalışmalar CPE'nin enzimatik rolünden farklı bir çok rollerini ortaya çıkarmıştır (61). CPE KO farelerde şişmalık, infertilite, zayıf kemik kütlesi ve nörolojik hasarlar (1) tespit edilmiştir. CPE nöronların korunmasında (62) ve nöronların yapılanmasında (61) önemli roller almaktadır. KO fare modelinde görülen nörolojik aksaklıklardan (1) yola çıkarak oluşturulan hipotezimize göre (63, 64) CPE nöronları nörodejenerasyondan korumaktadır. Ancak, CPE'nin bu nöroprotektif rolünün hücrenel mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır. İnsanlarda görülen nörodejeneratif hastalıklarda taranan mutasyonlarda Alzheimer hastasının beyin dokusundan bir EST (The Helix Research Institute, Japan) datası bulunmuştur. Üç adenin insersiyonuyla oluşan (QQ CPE) mutasyon 9 yeni amino asitin CPE'nin N-terminusuna eklenmesine neden olmaktadır.

Önerilen projede bu mutasyonun hücrenel mekanizmaları çalışılarak normal CPE'nin de nöroproteksiyondaki rolünün hücrenel mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Projeden elde edilen verilere göre QQ CPE'nin enzimatik özelliği yoktur. CPE'nin hücre dışına sekresyonu regüle edilen yolaklar tarafından olmaktadır. Bunun tersine QQ CPE'nin hücre dışına sekresyonu gerçekleşmemektedir. İlginç olarak QQ CPE, WT CPE ile birlikte ko-transfeksiyon yapıldığında QQ CPE normal CPE'nde hücre dışına salınmasını engellemektedir. Bu durumda QQ CPE insanda bir allede görülse bile WT CPE'nin hücre içi mekanizmasını engelleyerek normal CPE'nin gerçekleştirdiği nöroproteksiyon fonksiyonlarını hasara uğratacaktır.

Nörodejenerasyonun kabul gören hücrenel mekanizmalarından biri ER stres, proteinlerin degradasyonu ve apoptozdur. Projede QQ CPE'nin bu mekanizmaları araştırıldı. Verilerimize göre, QQ CPE lizozomlarda yıkılmaktadır. Ancak, bu proteinlerin fazla ifadelerinde hücre bu fazla sentezlenen proteinleri proteazomlara göndererek burada yıkıma uğratmaktadır. Deneylerimizde kullandığımız hem lizozom hemde proteazom inhibe edilen hücrelerde QQ CPE'nin daha çok hasara uğradığını da görmekteyiz.

ER stres ve apoptoz sonuçlarımıza göre, QQ CPE ER strese yol açmaktadır. Ayrıca, QQ CPE transfekt edilen hücrelerde apoptoza uğrayan hücre sayılarında artış görülmektedir.

Sonuç olarak, enzimatik özelliği olmayan, hücre dışına sekresyonu hasara uğrayan, normal CPE'nin hücre içi akıbetini değiştiren QQ-CPE ER stres, lizozomal hücre içi yıkım ve apoptozla nöronların ölümüne neden olarak nörodejenerasyona neden olmaktadır.

- ✓ Projede Dış Danışman olarak yer alan Dr. Peng Y. LOH, National Institute of Child and Human Development (NICHD), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD,

USA projede hak sahipliğine sahiptir. Proteinlerin cDNA konstruklarının hediyesi LOH lab tarafından gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Projemiz yayına hazır haldedir.