

Hücre Döngüsü Düzenleyici Protein Olan HN1'in SHSY-5Y Hücrelerinde Parkin ile Antagonistik İlişkisi

Sevda Altun¹, Aadil Javed¹, Gülseren Özduman¹, Kemal Sami Korkmaz¹

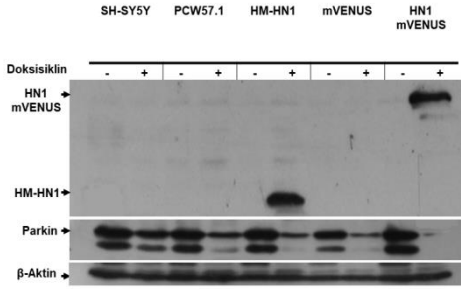
¹Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Kanser Biyolojisi Laboratuvarı, Bornova, İzmir

Giriş: Hücre döngüsü, hücrelerin düzgün bir şekilde bölünmesi için birçok molekül tarafından düzenlenen sistemdir. Hematolojik ve Nörolojik Ekspres 1 (HN1)'in hücre döngüsünün ilerleyişinin düzenlenmesinde önemli rolü olduğu gözlemlenmiştir [1,2]. E3 Ubikitin ligaz olan Parkin'nin de hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin yıkımında önemli rolü olduğu bilinmektedir [3]. Bu çalışmada, SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattı model olarak kullanılarak, HN1'in Parkin proteininin işlevi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

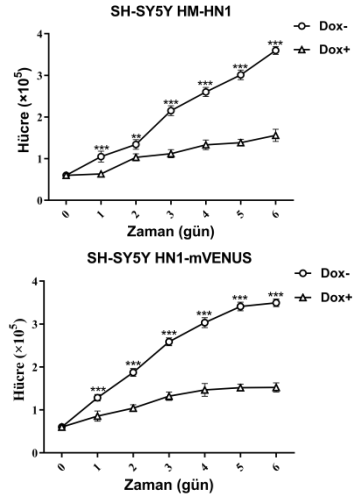
Materyal ve Metotlar: SHSY-5Y hücrelerinde HN1'in yüksek ifadesini sağlamak için, doksisisiklin (dox) ile uyarılabilir Tet-ON lentivirüs HN1 vektör sistemi kurulmuştur. SHSY-5Y-pCW57.1(kontrol)/HM-HN1 ve SHSY-5Y-mVENUS(kontrol)/HN1-mVENUS hücreleri hazırlanmıştır. HN1 yüksek ifadesinin, SHSY-5Y hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi Tripan mavisi yöntemi ile belirlenmiştir. HN1 yüksek ifadesinin, Parkin ve hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin seviyeleri üzerindeki etkisi western blotlama yöntemiyle gösterilmiştir. Senkronizasyon deneylerinde G1 fazı hücreleri serum starvasyonuna, S hücreleri timidin çift bloklamaya, G2 hücreleri ise Nokodazol (N) veya Cdk1 inhibitör (C) uygulamasına maruz bırakılmıştır.

Bulgular

A)

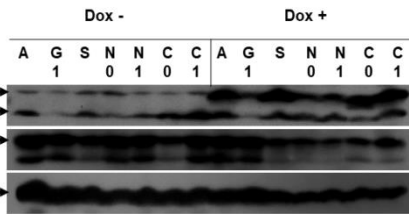


B)

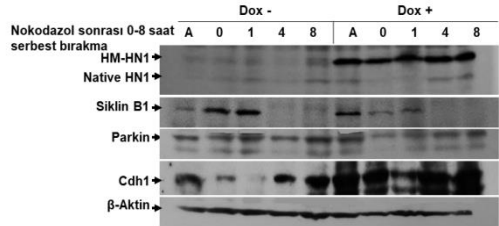


Şekil 1: A) SHSY-5Y lentivirüs HN1 vektörlerinin western blot yöntemleriyle kontrolü. **B)** SHSY-5Y HM-HN1/HN1-mVENUS hücrelerinde HN1 aşırı ifadesinin hücre proliferasyonu üzerine etkisi. İstatistiksel değişimler (*) sembolü ile gösterilmiştir (p > 0.05; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

A)



B)



Şekil 2: A) Hücre döngüsünün farklı fazlarında senkronize hücrelerde HN1 aşırı ifadesinin Parkin protein seviyesine etkisi. **B)** HN1 aşırı ifadesinin G2/M geçişini düzenleyen moleküllerin (Parkin, siklin B1 ve Cdh1) protein seviyelerine olan etkisine western blot ile gösterilmesi.

Tartışma ve Sonuç: SHSY-5Y hücrelerinde, hücre döngüsü düzenleyici protein olan HN1'in hücre döngüsünün farklı fazlarında farklı seviyelere sahip bir protein olduğu belirlenmiştir. HN1 yüksek ifadesinin Parkin'nin koaktivatörü olan Cdh1'i stabilize etmesi, HN1'in Parkin üzerindeki etkisinin anlaşılmasında kilit bir noktadır. HN1'in yüksek ifadesiyle Parkin'in seviyesinin azalması, HN1'in Parkin ile antagonistik bir ilişkisi olduğunu gösterir.

Kaynaklar

1. Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). Cell cycle control after the eukaryotic kingdom. *Trends in cell biology*, 23(7), 345-356.
2. Varisli, L., Gonen-Korkmaz, C., Debelac-Butuner, B., Erbaykent-Tepedelen, B., Muhammed, H. S., Boğurcu, N., ... & Korkmaz, K. S. (2011). Ubiquitously expressed hematological and neurological expressed 1 downregulates Akt-mediated GSK3β signaling, and its knockdown results in deregulated G2M transition in prostate cells. *DNA and cell biology*, 30(6), 419-429.
3. Lee, S. B., Kim, J. J., Nam, H. J., Gao, B., Yin, P., Qin, B., ... & Zhang, J. (2015). Parkin regulates mitosis and genomic stability through Cdc20/Cdh1. *Molecular cell*, 50(1), 21-34pp.

Bu çalışma, "FGA-2021-22438" kodlu "Kromozomal Ayrılma Mekanizmalarına HN1 Katkısının Araştırılması" konulu proje olarak Ege Üniversitesi BAP Komisyonu tarafından desteklenmiştir. Çalışmalarımıza verdikleri destekten dolayı Ege Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederiz.