



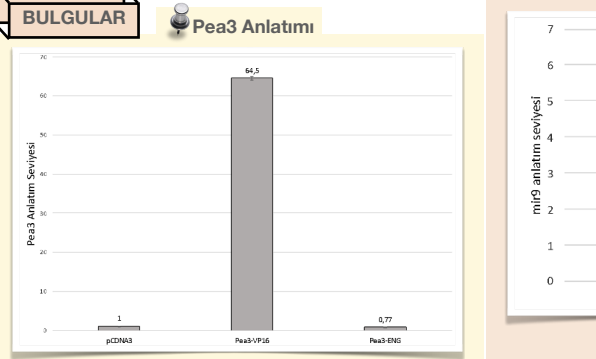
NSC-34 motor nöron hücrelerinde Pea3 transkripsiyon faktörünün miRNA anlatımına etkisi

Nimet Alara N. Çalışkan¹, Başak Kandemir¹
¹Başkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



ÖZET Nöral gelişimde etkili aksonal rehberlik sürecinde aksonların uygun hedeflere hangi mekanizma ve ipuçları gereğince yönlendiği hala incelenmekte ve kılavuz moleküller araştırılmaktadır. Gelişimde rol oynamasının yanı sıra akson uzamasıyla ilişkili genlerin regülasyonunda görev alan ETS domain üyelerinden Pea3 transkripsiyon faktörünün bir aktivatör olmasına rağmen çok sayıda genin anlatımını azalttığı tespit edildiğinden, bunun mikroRNA'ların (miRNA) kılavuz molekül olduğu potansiyel bir mekanizmaya işaret ettiği düşünülmektedir. Buradan hareketle nöral gelişimde etkili miR-9 ve miR-124'ün aksonal rehberlik üzerindeki etkisi ve Pea3 transkripsiyon ailesiyle regülasyon baskılayıcısı olma şeklindeki muhtemel ilişkileri, NSC-34 (fare motor nöron) hücrelerinde incelenmiştir. Çalışma sonucunda her iki mikroRNA'nın anlatımının da Pea3'ün ifadenmesi artarken azaldığı, fakat Pea3'ün başarılı bir şekilde susturulduğu durumda ifadenmelerinin ciddi şekilde arttığı tespit edilmiştir.

YÖNTEM Çalışmada, NSC-34 (fare motor nöron) hücreleri üç grup olarak pCDNA3 (boş, kontrol plazmiti), Pea3-VP16 (Pea3'ün konstitüf aktif füzyonu) ve Pea3-Eng (Pea3'ün kısmi baskılanmış füzyonu) plazmitleriyle transfekte edilerek Pea3'ün farklı düzeylerde anlatımı sağlanmıştır. Transfekte hücrelerden miRNA'ları içerecek şekilde total RNA izolasyonu yapılmış, ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. qPZR ile miRNA anlatım seviyelerine bakılarak yapılan hesaplamalar neticesinde NSC-34 hücrelerinde Pea3 anlatım seviyesine bağlı miR-9 ile miR-124'ün anlatım seviyeleri pCDNA3-kontrol grubuna göre görece olarak belirlenmiştir.



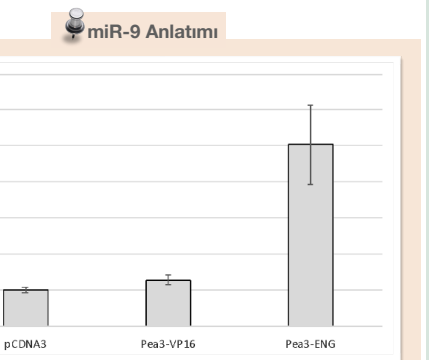
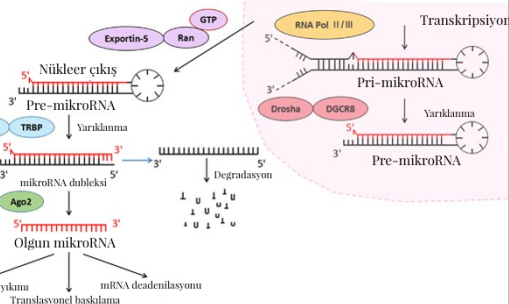
Tablo-1: Pea3 Anlatım Sonuçları

Pea3 Anlatım Sonuçları	Pea3	±SEM
pCDNA3	1	0,1
Pea3-VP16	64,5	0,55
Pea3-Eng	0,77	0,1

GAPDH ile rölatif olan ifadenme hesaplamalarına göre pCDNA3 (boş) ile transfekte edilen hücrelerde anlatım seviyesi değişmemişken, Pea3-VP16'yla transfekte edilen hücrelerin anlatım seviyesinde 64,5 kat artış görülmüştür (Şekil-2). Bununla korale şekilde baskılanmış füzyon grubu hücrelerinin anlatım seviyesi 0,77 kat olarak hesaplanmıştır. Böylece Pea3 transkripsiyon faktörünün, NSC-34 hücrelerindeki Pea3-VP16 ile aşırı anlatımı ve Pea3-Eng ile baskılanması teyit edilmiştir.

SONUÇ Pea3'ün yetişkin farelerin merkezi sinir sisteminde en yaygın bulunan RNA olmakla beraber, motor nöronların tipleri arasında seçici bir anlatıma sahip olduğu bilinmektedir (Kandemir vd., 2014). miR-9 ve miR-124'ün ise omurgalılarda beyin ve omurilikteki nöral farklılaşmada ve migrasyonda görev alması söz konusudur (Radhakrishnan & Anand, 2016). Bu bilgiler ışığında miR-9 ve miR-124 için tespit edilen anlatım seviyelerine bakıldığında her iki miRNA anlatımının Pea3'ün ifadenmesi artarken azaldığı, fakat Pea3'ün başarılı şekilde susturulup anlatımının baskılandığı durumda ifadenme miktarlarının ciddi şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu sebeple miR-9 ve miR-124 ifadenmeleriyle Pea3 anlatımı arasında negatif bir regülasyon ilişkisi bulunduğu değerlendirilmesi yapılmaktadır. Elde edilen anlatım seviyeleri ışığında Pea3 transkripsiyon faktörünün, nöral gelişim süreçlerinde etkili olduğu bilinen miR-9 ve miR-124 anlatımını baskılaması yönünde etki gösterdiği, proliferasyonu baskılayan miRNA'ları (Coolen vd., 2012) baskılayarak proliferasyonu arttırdığı; nöral farklılaşmayı baskılayarak aksonal rehberliği regüle ettiği değerlendirilmesine ortaya çıkmaktadır.

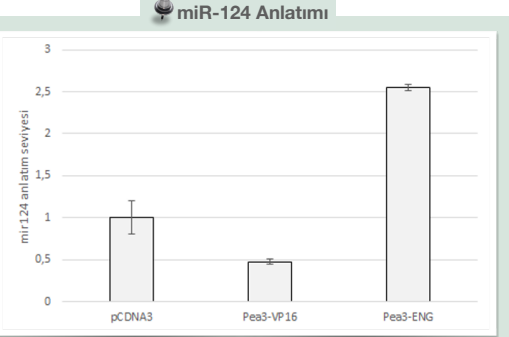
GİRİŞ Akson rehberliği (axonal guidance), nöronların kendilerine uygun hedeflere ulaşabilmek için aksonlarını gönderdiği ve nörolojinin altında incelenen bir süreçtir. Uygun hedeflerine doğru bir şekilde ulaşması ise Sema3, EphA gibi kılavuz moleküller tarafından sağlanmaktadır (Dickson, 2002; Iyer vd., 2014; Nelson vd., 2004). ETS süper ailesine mensup PEA3 ailesinden Pea3 transkripsiyon faktörü ise sinir sisteminin gelişiminde aksonal rehberlik ya da akson-akson etkileşimlerinde görevli genlerle doğrudan/dolaylı ilgili olup, terminal farklılaşmayla birlikte nöral aktivite üzerinde de etkin bir görevdedir (Kandemir vd., 2017). Akson uzamasına yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda PEA3 ailesinin NSC-34 (Fare motor nöron) gibi hücre hatlarında branşlaşma ve nörit uzamasını arttırdığı, akson uzamasında görevli NF-L, NF-M gibi hedef genlerin regülasyonu üzerine etkili olduğuna dair çıktılar bulunmaktadır (Kandemir vd., 2014, s. 3). Pea3'ün nörotrofik faktörler, aksonal uzama ve nöral farklılaşmayla ilişkili genlerin anlatımını değiştirdiği tespit edilmiş; faktörün aktive edici nitelikte olmasına rağmen çok sayıda geni de doğrudan ya da dolaylı olarak baskıladığı görülmüştür (Kandemir vd., 2017). Bu baskılanma mekanizması daha kapsamlı araştırmalarla aydınlatılmaya haiz olup, potansiyel bir Pea3 aracı miRNA (20-22 nükleotidik RNA molekülleri) mekanizmasının aksonal uzamada bir regülasyon sağladığı hipotez edilerek bu proje gerçekleştirilmiştir. Pea3'ün miR200b dışında sinir sisteminde tanımlanmış (Zhang vd., 2013) potansiyel bir miRNA hedefi olmaması sebebiyle, sinir sisteminde varlığı ve işlevi belirlenmiş miRNA'lar arasından motor nöronlarda anlatımı teyit edilmiş, akson uzaması ve kılavuzluğu ile ilişkilendirilip *in siliko* analizlerde Pea3 hedefi olma potansiyeli yüksek olan miR-9 ve miR-124 hedef alınarak çalışmalar yürütülmüştür.



Tablo-2: NSC-34 hücrelerinde Pea3 anlatımına bağlı miR-9 anlatım sonuçları

miR-9 Anlatım Sonuçları	miR-9	±SEM
pCDNA3	1	0,07
Pea3-VP16	1,28	0,13
Pea3-Eng	5,04	1,09

Gerçekleştirilen üç biyolojik ve aynı set içerisinde üç teknik replikalı qRT-PZR sonuçları değerlendirildiğinde, miR-9 ifadenmesinin Pea3-VP16 grubundaki seviyesinin pCDNA3 grubuna göre değişmediği görülmüştür. Pea3'ün kısmi baskılanmış olduğu durumda ise miR-9 anlatım seviyesinin yaklaşık 5 kat arttığı tespit edilmiştir (Şekil-3).



Tablo-3: NSC-34 hücrelerinde Pea3 anlatımına bağlı miR-124 anlatım sonuçları

miR-124 Anlatım Sonuçları	miR-124	±SEM
pCDNA3	1	0,2
Pea3-VP16	0,47	0,02
Pea3-Eng	2,55	0,03

miR-124 anlatım seviyesi incelendiğinde ise Pea3-VP16 olduğu durumda pCDNA3 grubuna göre 0,5 kat azalış gözlenmiştir. Pea3'ün baskılanmış olduğu durumda ise kontrol grubuna göre anlatım seviyesinde 2,5 kat artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil-4).

REFERANSLAR

Coolen, M., Thieffry, D., Drivenes, Ö., Becker, T. S., & Bally-Cuif, L. (2012). MiR-9 Controls the Timing of Neurogenesis through the Direct Inhibition of Antagonistic Factors. *Developmental Cell*, 22(5), 1052-1064. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.03.003>

Dickson, B. J. (2002). Molecular Mechanisms of Axon Guidance. *Science*, 298(5600), 1959-1964. <https://doi.org/10.1126/science.1072165>

Iyer, A. N., Bellon, A., & Baudet, M.-L. (2014). MicroRNAs in axon guidance. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00078

Kandemir, B., Çağlayan, B., Hausott, B., Erdogan, B., Dag, U., Demir, O., Sogut, M. S., Klimaszewski, L., & Kurmaz, I. A. (2014). Pea3 transcription factor promotes neurite outgrowth. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00059

Kandemir, B., Dag, U., Bakir Gungor, B., Durasi, I. M., Erdogan, B., Sahin, E., Sezerman, U., & Aksan Kurmaz, I. (2017). In silico analyses and global transcriptional profiling reveal novel putative targets for Pea3 transcription factor related to its function in neurons. *PLoS ONE*, 12(2), e0170585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170585>

Nelson, P. T., Baldwin, D. A., Szevacek, L. M., Oberholzer, J. C., Tobias, J. W., & Mourletas, Z. (2004). Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nature Methods*, 1(2), 155-161. <https://doi.org/10.1038/nmeth717>

Radhakrishnan, B., & Anand, A. P. (2016). Role of miRNA-9 in Brain Development. *Journal of Experimental Neuroscience*, 10, JEN.S32843. <https://doi.org/10.4137/JEN.S32843>

Zhang, X., Zhang, B., Gao, J., Wang, X., & Liu, Z. (2013). Regulation of the MicroRNA 200b (miRNA-200b) by Transcriptional Regulators PEA3 and ELK-1 Protein Affects Expression of Pin1 Protein to Control Anoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 288(45), https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478016

TEŞEKKÜR Çalışmamıza yaptığı katkılardan dolayı sayın Prof. Dr. Işıl Kurmaz'a teşekkür ederiz. Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 2209-A kapsamında 2020 yılı I. Dönem'de desteklenen projeler arasındadır.