

Nörodejenerasyonda Forkhead BOX O1 Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Araştırılması

Ali BAYRAM^{a1}, Remzi YİĞİTER²

¹Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Elazığ, Türkiye

²Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Ana Bilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

ÖZET

Amaç: Multipl skleroz, demiyelinizasyon ve akson hasarı ile karakterize olan, nörodejeneratif bir hastalıktır. Multipl skleroz hastalığı üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Ancak tüm bu çalışmalara rağmen Multipl sklerozun nedeni tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda transkripsiyon faktörlerinin forkhead ailesine ait miyojenik büyüme ve farklılaşmasında rol alan *forkhead box O1* gen ifadesinin Multipl skleroz hastalığı üzerinden nörodejenerasyon ile ilişkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Nöroloji Polikliniği'nde takip edilen 93 Multipl skleroz hastası çalışma kapsamına alındı. Kontrol grubunu nörodejeneratif herhangi bir hastalığı bulunmayan 93 gönüllü oluşturdu. Hasta ve gönüllülerden alınan periferik kanlardan RNA izolasyonunu yapıldı. *forkhead box O1* gen ifade düzeyleri RT-PCR yöntemi ile araştırıldı. Elde edilen veriler Mann-Whitney U testi yöntemi ile analiz edildi.

Bulgular: Bu çalışma sonuçlarına göre Multipl sklerozlu hastalardaki kan *forkhead box O* genlerinden *forkhead box O1*'in ifadesi sağlıklı kontrol grubuna göre farklılık göstermedi ($p>0,05$).

Sonuç: Bu bulgular nörodejeneratif bir hastalık olan Multipl skleroz tedavi ve tanısında daha ileri moleküler çalışmaların devamının gerekliliği ve nörodejenerasyonun baskılanmasında görevli diğer genlerin araştırılmasının önemli olacağını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nörodejenerasyon, RT-PCR, *forkhead box O1* Geni

ABSTRACT

Investigation of Forkhead BOX O1 gene expression in Neurodegeneration with RT-PCR

Objective: Multiple sclerosis, is a neurodegenerative disease characterized by demyelination and axonal damage. There have been many studies on multiple sclerosis disease. However, in spite of all these studies, the exact cause of Multiple sclerosis is unknown. In our study, we investigated the relationship between *forkhead box O1* a member of Homo sapiens forkhead box O gene family which has effect on growth and differentiation of myogenic that belongs to Forkhead Family and Multiple sclerosis disease.

Material and Method: The study group comprised 93 patients with the diagnosis of Multiple sclerosis who have applied to Gaziantep University Faculty of Medicine, and Department of Neurology. 93 healthy individuals without any neurodegenerative disease are included as controls. RNA was obtained from peripheral blood samples of patient and control groups. We analyzed *forkhead box O1* gene expression levels using RT-PCR. The data obtained were analyzed with Mann-Whitney U test.

Results: According to the results of analysis there is no difference between *forkhead box O1* rates in patients with multiple sclerosis and healthy control group ($p>0,05$).

Conclusions: These findings suggest that it would be important to investigate the necessity of the continuation of the treatment and diagnosis of Multiple sclerosis further molecular studies and other genes in charge of the suppressing neurodegeneration.

Key Words: Neurodegeneration, RT-PCR, *forkhead box O1* Gene

Klinik ve patolojik tanımlaması ilk kez 1868 yılında Charcot tarafından yapılan Multipl skleroz (MS) hastalığı ile ilgili 140 yılı aşkın zamandan bu yana birçok çalışma yapılmasına karşın hala oluşum mekanizması çözülememiştir (1). Ancak bağışıklık yanıtında nedeni bilinmeyen düzensizlikler sonucu, miyelin kaybıyla sonuçlanan bir süreç yaşandığı bilinmektedir (2). Dolayısıyla MS'le ilgili yapılacak genetik çalışmalarda, bağışıklık yanıtı etkileyen genler iyi irdelenmelidir.

Forkhead box (FOXO) proteinleri bir transkripsiyon faktör ailesidir ve apoptozis, hücre büyümesi, gelişimi, çoğalması ve sağ kalımında etkili

olan genlerin ekspresyonunu kontrol ederler (3). FOXO proteinlerinin esas belirleyici özelliği 80-100 aminoasit den oluşan "winged helix" olarak da bilinen hedef genlerin DNA'larına bağlanabilen forkhead box bölgesidir (4). Bu sayede hedef genleri aktive ya da inhibe ederler (4).

Forkhead box ailesi genleri ile sinir hasarı hastalıkları arasındaki ilişkiler üzerine herhangi bir çalışmayla karşılaşılmamıştır. Bu araştırma MS ile FOXO1 geni arasındaki muhtemel ilişkiyi ortaya koymayı amaçlayan ilk çalışmadır. Bu bağlamda MS hastalığının prognozu, FOXO genlerinin yolları ve MS hastalığında FOXO genleri işlevlerinin incelenmesi hedeflenmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM**Hastalık Tanısı ve Örneklerin Toplanması**

Çalışma öncesi Fırat Üniversitesi etik kurulundan onay (sayı: 97132852/050.01.04) ve hasta ya da hasta ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onay formu ile izin alındı. Bu çalışmada, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji kliniğine başvuran, MS tanısı almış 93 hasta ile nörodejeneratif herhangi bir hastalığı olmayan sağlıklı 93 kişi kontrol grubu olarak kullanıldı.

MS tanısı için klinik bulgular yanında, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) 'de beyin lezyonlarının zamansal ve uzaysal dağılımı, beyin-omurilik sıvısı (BOS) incelemesi, uyarılmış potansiyeller gibi yardımcı tanısal incelemeler yapıldı. MS'li hastalardan 93 tanesi on sekiz yaş üstü yetişkin grubuydu. Hasta grubunda 1 tek epizot, 7 tek atakla olası MS, 10 sekonder progresif, 6 primer progresif ve 69 relapsing remitting tanısı almış hasta vardı. Çalışılan gruplar ile ilgili bilgiler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarına ait yaş ortalamaları

	Örnek Sayısı	Yaş ortalaması	tek epizot	tek atakla olası MS	sekonder progresif	primer progresif	relapsing remitting
Hasta grubu	93	35.79	1	7	10	6	69
Kontrol grubu	93	32.98	-	-	-	-	-

Araştırma Yöntemleri

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji kliniğinde toplanan hasta ve kontrol grubuna ait periferik kanlar uygun soğuk zincir koşullarında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Moleküler Genetik Laboratuvarına getirildi. Burada kan örneklerinden RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra elde edilen RNA örneklerinden Ters Transkriptaz PCR yöntemi ile cDNA çevrimi gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu High Pure RNA izolasyon kiti (RocheDiagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. RNA örneklerden cDNA sentezi First Strand cDNA sentez (AMV) kiti (RocheDiagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Hedef genlerin ifade tayini için Tablo 2'de verilen primer ve probler tasarlandı.

Tablo 2. Hamarat gen (housekeeping gen) ve hedef genlerin primer dizileri ve nükleotid numaraları.

Gen	Primer Dizisi	NCBI nükleotid no
ACTB	5'-ACCACACCTTCTACAATGAGC-3' 5'-CAGCCTGGATAGCAACGTAC-3'	NM_001101.3
FOXO1	5'-AGACAACGACACATAGCTGG-3' 5'-AGGGAGTTGGTAAAGACATC-3'	NM_002015.3

Primer ve problemlerin tasarımı için www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl web sayfası kullanıldı. Buradan elde edilen diziler Pubmed NCBI nükleotid dizileri ile karşılaştırılarak doğrulukları tespit edildi. Primerler IDT (Integrated DNA Technologies, Belçika) firmasına sentez ettirildi. Çalışmada Universal ProbeLibrary (UPL) problemleri kullanıldı (RocheDiagnostics, Mannheim, Almanya). UPL problemleri 8-9 nükleotidlik kısa dizileri olarak, kilitli nükleotid (LockedNucleicAcid; LNA) teknolojisi kullanıldı. Real time PCR tepkimesi için 14 µl ditile su, 0,2 µl UPL probe (10 µM), 0,4 µl forward primer (10 µM), 0,4

µl reverse primer (10 µM), 4 µl Lightcycler Taqmanmaster (faststartTaq DNA polimeraz, tampon, MgCl₂, dNTP karışımı), 1 µl örnek cDNA karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım kapiller tüplere aktarıldı. Kapiller tüpler LightCycler® 2.0 real time PCR cihazına yerleştirildi. 95 °C'de 10 dakika denatürasyon yapıldı. Daha sonra 45 döngü amplifikasyon için 95 °C 10 s denatürasyon, 60 °C 30 s annealing, 72 °C 60 s ekstansiyon yapıldı. Son aşamada bir döngü 40 °C 30 s tutulup PCR sonlandırıldı.

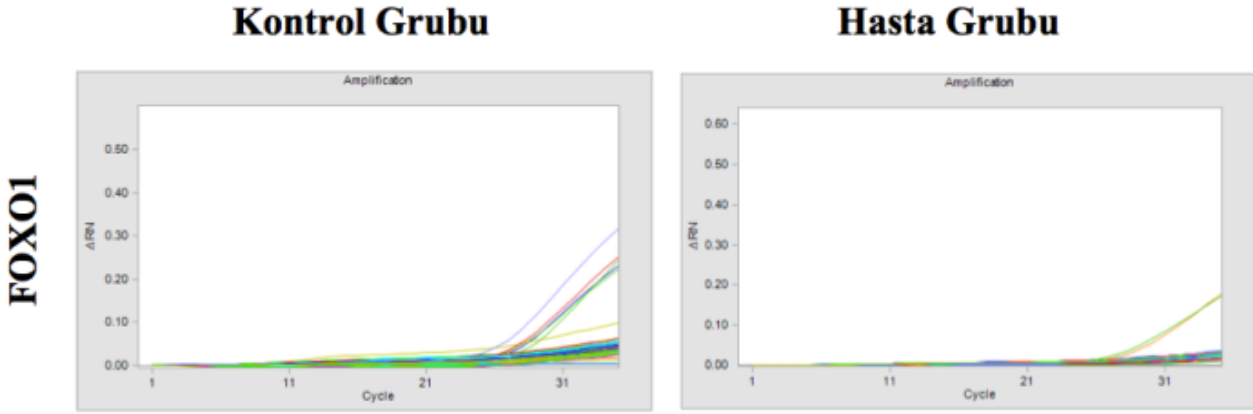
İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler Graphpad InStat programı kullanılarak, nonparametrik Mann-Whitney testi ile yapıldı. Örneklerin oluşturdukları pikler, Ct değerleri ve kopya sayıları ayrı ayrı analiz edilerek istatistiki hesaplamaları yapıldı. Nicel analiz sonucunda elde edilen değerler üzerinden ATCB ile normalleştirme sağlandı. Hasta/Kontrol oranları şeklinde göreceli nicel değerleri hesaplanarak Mann-Whitney U testi ile istatistiksel analizler yapıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında (p<0.05) değerlendirildi.

BULGULAR

Her örnek için iki kez real time PCR reaksiyonu yapılarak sonuçlar kontrol edildi. Oluşan reaksiyon eğrileri ile her örneğin çoğalma döngüleri hesaplandı (Şekil 1).

Örnekler için anlık çoğaltımın başladığı eğriler tespit edildi. Her örnek için hedef gen CT (Threshold Cycle) ve hamarat gen CT değerleri tespit edilip ΔCT oranları hesaplandı. Sonuçlar 2-ΔΔCt yöntemiyle hesaplandı.



Sekil 1. Kontrol ve hasta grubu FOXO1 gen ekspresyonu RT-PCR analiz sonuçları. FOXO1 gen ifadesi hamarat gen kadar tüm hücrelerde ifade edilmektedir.

TARTIŞMA

MS'de immün düzeneklerle ilgili genlere ait özelliklerin yüksek oranda bulunması, bu hastalıkta immün sistemi içine alan bir anormalliği düşündürmektedir (5). Periferik kan ve beyin omurilik sıvısı bulgularının yanı sıra, hayvan modellerinde oluşturulan merkezi sinir sistemi patolojisi ve miyelin hasarı, MS patogenezinde bağışıklık tepkisi yollarının rol oynadığı varsayımını desteklemektedir (6).

Hastalığın oluşum seyrinde bir dizi faaliyet sonucu sitokinler, makrofajlar, mikroglial gibi diğer bağışıklık hücrelerini alana çeker ve bu hücreler TNF- α veya IFN- β gibi proinflatuvar sitokinleri salgılayarak miyelin kılıfının doğrudan doğruya fagositik hasarını başlatırlar (7). Hastalık, merkezi sinir sisteminde miyelin kaybından, oligodendrositlerin tam kaybına kadar değişen doku kaybına, ağır mikroglia veya astrosit çoğalmasına ve aksonal kesilerin oluşmasına neden olmaktadır (8). Çalışmamızda özellikle bu moleküler mekanizmalardan bazılarının MS'li hastalardaki ifadelerinin etkisini araştırmayı hedefledik. Çünkü bu moleküler mekanizmaların etkisi hastalığın gidişatını önemli bir şekilde etkilemektedir.

Forkhead box ailesi genleri transkripsiyon faktörü olmalarından dolayı moleküler mekanizmalarda oldukça etkilidirler. Bu etkilerini çeşitli genlerle etkileşim halinde gerçekleştirirler. Örneğin SIRT1, dört adet

bilinen FOXO proteinlerinden üçünü, yani Foxo1, Foxo3a ve Foxo4'ü deasetilize eder (9). SIRT1 programlı hücre ölümüne neden olan stresi düşürerek ve DNA onarımının açılımını ve hücre döngüsü kontrol geçişlerini artırarak nöronlardaki ve fibroblastlardaki Foxo3a'yı etkilemektedir (9). Bu bağlamda özellikle nörodejenerasyonun şiddetini arttıran veya azaltan proteinlerin ifadesi hastalığın tanı ve tedavisinde önemli açılımlar sağlayabilir.

Çalışmamızda MS'li hastalarda nörodejenerasyonun şiddetini etkileyeceğini düşündüğümüz FOXO1 gen ifadesini araştırdık. Ancak hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edemedik.

Sonuç olarak, nörodejenerasyona yol açan bağışıklık yanıtı son derece karmaşık ve birçok mekanizmanın etkisi altındadır. FOXO genlerinin MS üzerinde muhtemel etkisinin net olarak ortaya konabilmesi için tüm FOXO genlerinin ekspresyonunun bu hastalık üzerinde çalışılması gerekmektedir. Bunun üzerine ilerleyen zaman diliminde FOXO ailesine ait diğer genlerinde çalışılmasına karar verilmiştir.

Multipl skleroz hastalığı gerek klinik özellikleri, gerek tedavi ve tanı yöntemleri açısından hala aydınlatılması gereken bir hastalıktır.

KAYNAKLAR

1. Kumar DR, Aslinia F, Yale SH, Mazza JJ. Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology. Clin Med Res 2011; 9: 46-49.
2. Ranjan D, Bruce T. Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology. Current Opinion in Neurology 2014; 27: 271-278.
3. Kannike K, Sepp M, Zuccato C, Cattaneo E, Timmusk T. Forkhead Transcription Factor FOXO3a Levels Are Increased in Huntington Disease Because of Overactivated Positive Autoregulatory Loop. The Journal of Biological Chemistry 2014; 289: 32845-32857.
4. Eckersa JC, Kalen AL, Sarsour EH et al. Forkhead Box M1 Regulates Quiescence-Associated Radioresistance of Human Head and Neck Squamous Carcinoma Cells. Radiation Research 2014; 82: 420-429.
5. de Paula A Sousa, Malmegrim KC, Panepucci RA et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation reduces abnormalities in the expression of immune genes in multiple sclerosis. Clinical Science 2014; 1282: 111-120.
6. Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. Journal of Autoimmunity 2014; 48: 134-142.

7. Balasa R, Bajko Z, Maier S, Motaitianu A. The dual role of transforming growth factor beta in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Romanian Journal of Neurology* 2014; 16: 103-107.
8. Conzales GG, Avellana AV, Alli C, Baron VA. Myelination of the central nervous system, *From Basic Immunology to Immun-Mediated Demyelination*. Springer 1999: 101-115.
9. Kim DH, Park MH, Lee EK et al. The roles of FoxOs in modulation of aging by calorie restriction. *Biogerontology* 2014; 16: 1-14.