

Kardiyomiyoblast Hücre Regülasyonunda Taube Nuss Geninin Fonksiyonel Analizi

Functional Analysis of Taube Nuss Gene in the Regulation of Cardiomyoblast Cells

Ayşe Berna Yüzbaşıoğulları¹ , Bilge Özsait Selçuk² , Evrim Kömürcü Bayrak³ ,
Nihal Erginel Ünaltuna⁴ 

* Bu çalışmanın sonuçları European Society of Human Genetics Conference 2013'de bildiri olarak sunulmuştur.

* Bu çalışma "Subtractive cDNA Hibridizasyon Kütüphanesinden Seçilen Taube Nuss Geninin Fonksiyonel Analizi" adlı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

¹ Uzm. Bio., ²Doç. Dr., ³Prof. Dr., İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² Dr. Öğr. Üyesi., İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: A.B.Y.: 0000-0001-5235-997X;
B.Ö.S.: 0000-0001-6808-6689
E.K.B.: 0000-0003-1271-1208;
N.E.Ü.: 0000-0003-0562-0455;

Sorumlu yazar/Corresponding author:

Bilge Özsait Selçuk,
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-posta: ozsaitb@istanbul.edu.tr

Başvuru/Submitted: 26.11.2019

Revizyon Talebi/Revision Requested: 29.11.2019

Son Revizyon/Last Revision Received: 04.12.2019

Kabul/Accepted: 04.12.2019

Atf/Citation: Yuzbasiogullari AB, Ozsait-Selcuk B, Komurcu-Bayrak E, Unaltuna-Erginel N. Functional Analysis of Taube Nuss Gene in the Regulation of Cardiomyoblast Cells, *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 2(3): 98-104. <https://doi.org/10.26650/JARHS2019-651072>

Öz

Gelişim evrelerinin veya dokuya özgü fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde ve yürütülmesinde farklılaşmış gen ekspresyonu büyük önem taşımaktadır. "Subtractive" hibridizasyon yöntemi dokuya özgü ekspresyonu olan genlerin tespit edilmesi için oldukça etkin bir yöntemdir. Daha önceki çalışmalarda laboratuvarımızda BALB/c ırkı farelerde kalbe özgü ekspresyonu olan genleri içeren "Subtractive" hibridizasyon cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Önemli bir transkripsiyon faktörü olan Taube Nuss (*Tbn*), bu kütüphaneden elde edilen genlerden birisidir. Bu çalışmadaki amacımız, *Tbn* geni ile ilişkili olduğu düşünülen diğer genlerin ekspresyonlarının araştırılması ve *Tbn* yolağının belirlenmesidir. Çalışma kapsamında BALB/c ırkı farelerden elde edilen kalp ve iskelet kası dokularına özgü *Tbn* geninin ekspresyonu Northern Blot analizi ile araştırılmıştır. Ardından, *Tbn* genine özgü siRNA'lar kullanılarak H9c2 rat kardiyomiyoblast hücre soyunda *Tbn* geni sessizleştirilmiştir. Yolak analizleri sonucunda *Tbn* ile ilişkili olabileceği tespit edilen *Pparg*, *Cebpa*, *Taf10* ve *Myocd* genlerinin sessizleştirilen hücrelerdeki ekspresyon değişimleri araştırılmıştır. Bu hücrelerde, *Myocd* gen ekspresyonunun azaldığı ve *Pparg* gen ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, *Tbn* geninin kalp dokusunda düzenleyici bir rol oynadığını işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: siRNA, H9c2, *Tbn*, *Pparg*, *Taf10*

ABSTRACT

Differential gene expression is important in the regulation and maintenance of developmental stages and tissue specific physiological processes. The subtractive hybridization method is an efficient method for the detection of genes that have tissue specific expressions. In our previous work, our team had constructed a BALB/c mice heart tissue specific subtractive hybridization cDNA library. Taube Nuss (*Tbn*), which is a crucial transcription factor, is one of the genes that were isolated from this library. In this study, our aim was to analyze the expression of possible *Tbn* related genes and identify the *Tbn* pathway. In the scope of this study, the *Tbn* gene expression in BALB/c mice heart and skeletal tissue was analyzed with the Northern Blot technique. Then, the *Tbn* gene was silenced in H9c2 rat cardiomyoblast cell line using siRNA specific to the *TBN* gene. The gene expression levels of *Pparg*, *Cebpa*, *Taf10* and *Myocd* genes, which were possibly related to the *Tbn* pathway, were analyzed in silenced cells. We observed that the expression of the *Myocd* gene was decreased, whereas the expression of the *Pparg* gene was increased in these cells. These results suggest that the *Tbn* gene plays a regulatory role in cardiac tissue.

Keywords: siRNA, H9c2, *Tbn*, *Pparg*, *Taf10*

GİRİŞ

Dokuya özgü farklılaşmış gen ekspresyonu, her dokunun kendisine özel işlevini gerçekleştirmesi ve organizmanın canlılığının sağlanması açısından kritik öneme sahiptir. Diğer yandan, dokuya özgü gen ekspresyonunda farklılıklar olması kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet gibi patolojik durumlara neden olabilmektedir.^{1,2} Farklılaşmış gen ekspresyonunun belirlenmesi amacı ile çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi olan “Subtractive” hibridizasyon yöntemi, dokular arasında farklı ekspresyonu olan genlerin tespit edilmesi için oldukça etkin bir yaklaşımdır.^{3,4} Ekibimiz tarafından daha önce yürütülen çalışmalarda BALB/c ırkı fare kalbine özgü transkriptleri içeren “Subtractive” Hibridizasyon cDNA Kütüphanesi (SHK) oluşturulmuş ve takip eden çalışmalarda bu transkriptlerin kalp dokusundaki fonksiyonel rolleri araştırılmıştır.⁴⁻⁶ Taube Nuss (*Tbn*) geni SHK'den elde edilen genlerden birisidir.

Tbn geni fare ve insanda korunmuş olan bir genidir ve embriyonik gelişimde önemli rolü bulunmaktadır.^{7,8} In vitro çalışmalarda, *Tbn* geninin homozigot mutasyonunda embriyonik hücrelerin çoğalmasının engellendiği ve hücrelerin apoptoza girdiği gözlenmiştir.^{8,9} Bu genin insan homoloğu olan *TAF8* geninin ürünü, transkripsiyon faktör II D'nin (TDFIID) bir bileşenidir.^{10,11} TAF (TATA-binding protein (TBP) associated factors) proteinleri işlevleri tam olarak aydınlatılmamış transkripsiyon faktörleridir.¹¹ Hem embriyonik hem de yetişkin hücrelerinde TAF8-TAF10 heterodimerinin fonksiyonel bir TDFIID kompleksinin oluşumunda kilit rol oynadığı gösterilmiştir.^{7,8,11,12} Ayrıca, farelerde TBN proteininin preadipositlerin adipositlere farklılaşması ile ilişkili olduğu ve PPARG ligandı tarafından indüklenebildiği gösterilmiştir.⁷

Bu çalışmadaki amacımız, kalpteki fonksiyonu tam olarak bilinmeyen *Tbn* geni ile ilişkili olduğu düşünülen aday genlerin araştırılması ve hücre içi yolağının belirlenmesidir.

YÖNTEM

1. Doku ve hücrelerin elde edilmesi

Yetişkin BALB/c ırkı erkek fareler ve Sprague-Dawley ırkı erkek sıçanlar İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Deney hayvanları servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiş kalp ve iskelet kası dokuları dissekte edilmiştir.

Dokular bekletilmeden buz soğukluğunda RNAz içermeyen PBS içerisinde iki kere yıkayıp sıvı azotta şok dondurulmuş ve RNA izolasyonu için kullanılabileceği kadar -70°C'de saklanmıştır. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (27.07.2007 / No: 65).

Taube Nuss geninin sessizleştirilmesi amacı ile gerçekleştirilen hücre kültürü deneylerinde ticari olarak temin edilebilecek olan fare kardiyomiyoblast hücre soyu bulunmadığı için H2C9 rat kardiyomiyoblast hücreleri kullanılmıştır. Kardiyomiyoblast hücreleri ATCC'den temin edilmiştir (ATCC hücre no: CRL-1446).

2. RNA izolasyonu ve cDNA Sentezi:

Yetişkin rat ve farelerden elde edilen kalp ve iskelet kası dokularından total RNA izolasyon kiti kullanılarak (RNeasy® Mini RNA izolasyon kiti, Ambion) izolasyon yapılmıştır. RNA kalitesi ve degradasyonu %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. RNA miktarı ise nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Total RNA örneklerinden cDNA sentezlenmesi Iscript cDNA Synthesis Kit (BioRad) ile gerçekleştirilmiştir. cDNA örneklerinin kalitesinin kontrolü amacı ile bir “house keeping gen” olan beta aktin (*Actb*) genine özgü primerler kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

3. Northern Blot Analizi:

Plazmid prob hazırlanması:

Northern blot hibridizasyonunda kullanılmak üzere fare *Tbn* ve *Actb* transkriptine özgü digoksinogenin işaretli DNA probları hazırlanmıştır. Bu amaçla öncelikle gene özgü primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu gerçekleştirilmiş

ve ardından amplifikasyon ürünleri kit (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ampikonlar, pGEM⁺-T Easy vektör sistemi (Promega) kullanılarak klonlanmıştır. Sanger dizileme ile plazmid DNA'ların doğru gen bölgesini içerdiği doğrulanmıştır. Plazmid DNA'larının kalıp olarak kullanıldığı PCR'da gene özgü primerler ve DIG-11-dUTP (DIG-UTP DNA Labelling Kit, Roche) aracılığı ile prob işaretlemesi yapılmıştır. Probların kantitasyonu, otoradyografik görüntülenme yolu ile gerçekleştirilmiştir.

Northern Blot Hibridizasyonu:

SHK'de yer alan *Tbn* transkriptinin kalp ve iskelet ekspresyonunu doğrulamak amacı ile yetişkin farelerin kalp ve iskelet kası dokularında *Tbn* transkriptinin Northern Blot analizi Northern Max Kiti (Ambion) kullanılarak yapılmıştır. Kit prosedürlerine uygun olarak, fare iskelet kası ve kalp dokusundan izole edilmiş total RNA'lar (1 µg) agaroz jelde yürütüldükten sonra nitrosellüloz membran üzerine gece boyu transferi yapılmıştır. Ardından ultra viole ışık ile membrana bağlanmıştır. *Tbn* ve *Actb* genlerine özgü DIG-11-dUTP işaretli problarla (25 ng/ml) gece boyu 50°C'de hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyondan sonra membranlar 0,1 SDS içeren 2X ve 0,5X SSC solusyonları ile yıkanıp CSPD içeren kit (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche Applied Sciences) kullanılarak görüntüleme işlemi otoradyografi ile X-ray film üzerinde yapılmıştır.

4. Taube Nuss geninin sessizleştirilmesi:

H9c2 rat kardiyomiyoblast kücrelerinin kültürü DMEM (%10 FBS) mediumu içerisinde 37°C'de %5 CO₂ basıncında yapılmıştır. 24-kuyulu kültür kaplarında yaklaşık %60 oranında hücre yayılımı olduktan sonra kit ile (RNAi Human/Mouse Starter Kit, Qiagen) *Tbn* geninin sessizleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. siRNA transfeksiyonundan önce yürütülen hücre sitotoksitesinde testlerinde hücrelere zarar vermeyecek etkin siRNA konsantrasyonunun 100 nmol ve lipid transfeksiyon ajanı miktarının 1:4 oranında olduğu tespit edilmiştir. Transfeksiyondan sonra 24. ve 48. saatlerde deney sonlandırılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak siRNA

transfeksiyonu yapılmamış H9c2 hücreleri kullanılmıştır.

5. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ve data analizi

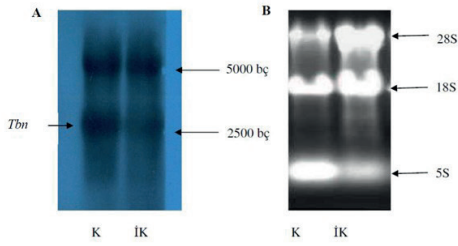
Tbn ve hedef genlerin yetişkin rat kalp ve iskelet dokularındaki ekspresyon seviyelerini araştırmak amacı ile bu dokulardan elde edilen total RNA örnekleri, genlere özgü tasarlanan primerler ve QuantiTect[®] SYBR[®] Green (Qiagen) kiti kullanılarak Light Cycler 480 (Roche) cihazında qRT-PCR analizi yapılmıştır.

Diğer yandan, 24. ve 48. saatlere ait kardiyomiyoblast hücrelerinden izole edilen total RNA örneklerinin gen ekspresyon analizi qRT-PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda *Tbn* ile aynı hücresel yolda yer aldığı düşünülen Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (*Pparg*), CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha (*Cebpa*), TATA-Box Binding Protein Associated Factor 10 (*Taf10*) ve Myocardin (*Myocd*) genlerinin ekspresyon analizi yapılmıştır. Bu deneylerde rat genlerine özgü tasarlanmış primerler kullanılmıştır. Analizlerde kontrol olarak *Gapd* ve *Mapk* genlerinin ekspresyon seviyelerinin ortalamaları kullanılmıştır. Relatif kantitasyon (RQ) seviyeleri $\Delta\Delta CT$ metodu ile hesaplanmıştır. Bu analizlerde transkriptlerin Ct ("treshhold cycle") değerleri kontrol genlerin Ct değerleri kullanılarak normalize edilmiş ve ardından kontrol grubu hücrelerin (siRNA transfeksiyonu yapılmamış hücre grubu) Ct değerleri ile kalibre edilmiştir. $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ değeri relatif kantitasyon (RQ) sayısını vermektedir.

BULGULAR

Yetişkin BALB/c farelerde kalp ve iskelet kası dokuları arasında *Tbn* gen ekspresyonunda farklılığın araştırılması amacı ile Northern Blot yöntemi kullanılmıştır. Northern Blot hibridizasyonu sonrasında fare kalp ve iskelet kaslarından elde edilen transkriptlerin boylarının aynı bant bölgesinde olduğu ve dokulara ait farklı izoform olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1).

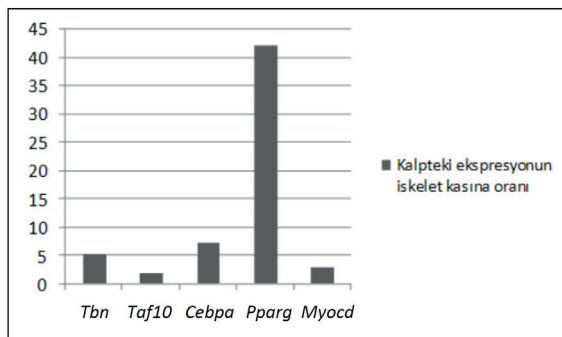
Fareye özgü SHK'deki transkriptlerden biri olan *Tbn*'nin gen sessizleştirme deneyinde H9c2 rat



Şekil 1. *Tbn* transkriptine özgü Northern Blot analizinin görüntüsü. A: Otoradyografi sonucunda kalp ve iskelet kaslarında farklı transkript izoformlarının olmadığı gözlenmiştir. B: Northern Blot hibridizasyonundan önce agaroz jelde yürütülen total RNA'lar kontrol olarak UV ile görüntülenmiştir. K, kalp kası; İK, iskelet kası; bç, baz çifti; 18S, 18S ribozomal RNA; 28S, 28S ribozomal RNA, 5S, 5S ribozomal RNA

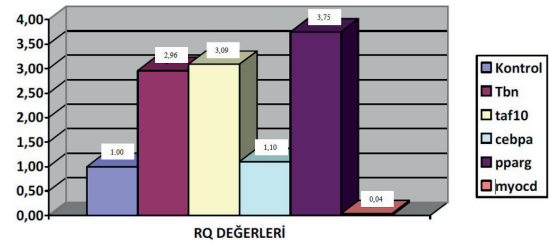
kardiyomiyoblast hücreleri kullanılmıştır. siRNA transfeksiyonundan önce rat Taube Nuss geninin (*Tbn*) ve hedef genlerin (*Pparg*, *Cebpa*, *Taf10* ve *Myocd*) yetişkin rat kalp ve iskelet hücrelerindeki gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Rat kalp ve iskelet kası dokularındaki qRT-PCR analizlerinde, iskelet kasına göre *Tbn* geninin kalp kasında yaklaşık 5 kat daha yüksek ekspresyonunun olduğu gözlenmiştir. Bu şekilde BALB/c kalbine özgü SHK'deki transkriptlerden biri olan *Tbn* gen ekspresyonunun rat kalbinde de benzer şekilde iskelet kasına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. *Pparg*, *Cebpa*, *Taf10* ve *Myocd* hedef genlerinin ekspresyon seviyelerinin kalpte iskelet kasına göre daha fazla olduğu Şekil 2'de gösterilmiştir.

Rat kardiyomiyoblast hücrelerinin *Tbn* genine özgü siRNA ile transfeksiyonundan sonra 24. ve 48.



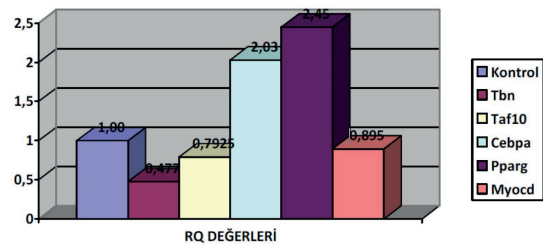
Şekil 2. Rat yetişkin kalp ve iskelet kası dokularında qRT-PCR yöntemi ile hedef genlerin ekspresyon analizi. Grafikteki değerler kalp ve iskelet kası arasındaki relatif kantitasyon (RQ) değerlerinin oranlarını göstermektedir.

saatlerde deney sonlandırılarak örneklerden total RNA izole edilmiştir. Kontrol hücre grubu ile karşılaştırılarak *Tbn* geni ile aynı hücresel yolda yer aldığı düşünülen genlerin qRT-PCR yöntemi ile ekspresyon analizi yapılmıştır. 24 saat sonunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *Tbn* geninin sessizleştirildiği hücrelerde *Myocd* gen ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir (RQ: 0,038). Kontrol hücre ekspresyonu ile karşılaştırıldığında *Pparg*, *Cebpa* ve *Taf10* genlerinin ekspresyonunda ise sırasıyla 3,75, 1,1 ve 3,09 kat artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Transfeksiyondan 24 saat sonra kardiyomiyoblast hücrelerinde gen ekspresyon analizi.

Transfeksiyondan 48 saat sonra kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında *Tbn* gen ekspresyonunun yaklaşık 2 kat azaldığı ve *Taf10* ekspresyonunun da *Tbn*'ye eşlik ederek azaldığı gözlenmiştir. Diğer yandan, *Pparg* ekspresyonunda 48. saatte 24. saate göre %34,6 oranında azalma olsa da yüksek seviyesini koruduğu, buna karşılık *Cebpa* ekspresyonunun 24. saate kıyasla %84,5 oranında yükseldiği belirlenmiştir. 24. saatte yüksek oranda baskılanmış olan *Myocd* gen ekspresyonunun ise 48. saatte 22,37 kat artarak kontrol hücre seviyesine yaklaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Transfeksiyondan 48 saat sonra kardiyomiyoblast hücrelerinde gen ekspresyon analizi.

TARTIŞMA

Subtractive Hibridizasyon cDNA kütüphaneleri doku veya hücre dizilerinde farklı olarak eksprese edilen genlerin izolasyonu ve tanımlanmasında güçlü bir yaklaşım sağlamaktadır. Laboratuvarımızda daha önceki deneyler sonucunda oluşturulmuş olan Subtractive Hibridizasyon cDNA Kütüphanesi, BALB/c fare iskelet kası dokusuna kıyasla kalpte daha yüksek oranda ekspresyonu olan genleri içermektedir.⁴ Taube Nuss geni de bu kütüphaneden izole edilmiş olan genlerden birisidir. *Tbn* geni fare transkriptom veritabanındaki bilgilere göre beyin, timus, plasenta ve embriyoda eksprese olan, fare ve insanda yüksek oranda korunmuş olan bir genidir.^{7,13} Bu çalışmada, Northern Blot analizleri sonucunda kalbe özgü yeni bir transkript izoformu saptanmamıştır. Bununla beraber, qRT-PCR yöntemi ile ratlarda *Tbn* geninin yetişkin kalp dokusundaki ekspresyonunun iskelet kasına oranla 5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

24. ve 48. saatlerde yapılan analizlerin sonuçları karşılaştırıldığında sessizleştirilen *Tbn* geninin 24. saatte kontrol hücrelerine göre yaklaşık 3 kat fazla ekspresyonunun olduğu, 48. saatte ise kontrol hücrelerdeki ekspresyonun yaklaşık yarısı kadar olduğu gözlenmiştir. Transfeksiyon sonucunda sessizleştirilen genlerin ekspresyonunun yaklaşık olarak %70'in altında olması beklenmektedir. 24. saatte kontrol hücrelerin yaklaşık 3 katı kadar yükselmesi ve TDFIID kompleksinde beraber yer aldığı *Taf10* ekspresyonunun da benzer bir seviyede olması transkripsiyon sürecinin devam ettirilebilmesi için hücrelerde erken evrede bir kompensasyon mekanizmasının devreye girdiğini düşündürmektedir. 48. saatte *Taf10* ekspresyonu kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında %74,35 kat daha azalmış olduğu gözlenmektedir. *Tbn* geninin siRNA transfeksiyonundan sonra 24 saatten daha kısa sürede analiz edilerek baskılanma zamanının ve dinamik değişiminin takip edilmesi ve bu ekspresyon değişimlerinin protein seviyelerine yansımalarının nasıl olduğunu gösterecek ek deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

Tbn geni, insanda *TAF8* (TATA-Kutusu Bağlayıcı Protein İlişkili Faktör 8) veya *TAFII43* (Transkripsiyon Başlatma Faktörü TFIID 43 KDa Alt Birimi) olarak

da adlandırılmaktadır. *Tbn*'nin etkileşimde bulunduğu genler hakkında halen yeterli bilgi bulunmamaktadır. TFIID kompleksinde *TAF8* ve *TAF10* proteinleri heterodimer olarak bağlanarak etki göstermektedir.¹¹ Bizim çalışmamızda da kardiyomiyoblast hücrelerinde *Tbn* geninin sessizleştirilmesinden sonra kontroller ile karşılaştırıldığında *Tbn* ve *Taf10* genlerinin ekspresyonlarının 24. ve 48. saatlerde benzer seviyelerde ve yönde değişim gösterdikleri tespit edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, TBN proteinin 3T3-L1 fare embriyonik fibroblastlarında PPARG ligantı ile indüklenbildiği gösterilmiştir.⁷ Özellikle PPARG'nın yoğun ekspresyonunun olduğu NIH-3T3 hücre soyunda yapılan çalışmalarda PPARG ligantı ile indüksiyon sonucunda trigliserid birikimi ile adiposit farklılaşmasının olduğu gösterilmiştir.¹⁴ Bu mekanizma, adiposit farklılaşma sürecinde yine etkili olan CEBPA indüksiyonu ve de insüline duyarlı glukoz transportu sürecinden farklıdır.¹⁴ TBN'nin NIH-3T3 soyunda da PPARG ligantı ile indüksiyonunun olması bu transkripsiyon proteinin insüline duyarlı transporttan ziyade trigliserid birikimi ile ilişkili olduğunu işaret etmektedir.⁷ Bu bulgular, TBN proteininin adipogenezde rol alan genlerin düzenlenmesinden sorumlu bir transkripsiyon faktörü olduğunu göstermektedir.⁷ Diğer yandan, C2C12 fare miyoblastlarında yürütülen çalışmalarda tam-uzunlukta *TAF8* ekspresyonu yapan retroviral vektörlerle transfeksiyon sonrasında, hücrelerin morfolojik farklılaşmasında ve araştırılan farklılaşma belirteci olan miyogenin ekspresyonunda bir değişim olmadığı gözlenmiştir.⁷ Bu nedenle, *TAF8*'in adiposit farklılaşma sürecine özgü bir transkripsiyon faktörü olduğu önerilmiştir.⁷ İlginç olarak aynı çalışmada, transfekte edildiği hücrelerde *TAF8* ile yarışmalı yapısından dolayı *TAF8* ile ters etki gösteren *TAF8* Histon Katlanma (*TAF8* HF) domaininin adiposit farklılaşmasını ve *Pparg* ve *Cebpa* ekspresyonlarını inhibe ettiği tespit edilmiştir.⁷ Bizim çalışmamızda, rat kardiyomiyoblast hücrelerine *Tbn* siRNA transfeksiyonundan 24 saat sonra, *Pparg* ekspresyonunun kontrol hücrelere kıyasla yaklaşık 4 kat fazla olduğu, *Cebpa* ekspresyonunun ise yaklaşık olarak kontrol hücrelerindeki ile benzer oranda olduğu

belirlenmiştir. Ancak, *Tbn* sessizleştirilmesinden 48 saat sonra *Pparg* ekspresyonu kontrol hücrelerine göre hala yüksek olmakla beraber %34 oranında azalmıştır. Diğer yandan, transfeksiyondan 48 saat sonra *Cebpa* ekspresyonunda %84,5 oranında artış olmuştur. Bu bulgular, C2C12 fare miyoblastlarında yürütülen çalışmalara zıt yönde ancak, adiposit hücrelerinden elde edilen sonuçlara benzer olarak *Tbn* geninin kardiyomiyoblastlarda *Pparg* ve *Cebpa* genlerinin düzenlemesinde rol aldığını düşündürmektedir.

Nükleer bir protein olan MYOCD, kalp, aorta ve düz kas içeren dokularda kodlanmaktadır. Kardiyogenez ve düz kas hücrelerinin farklılaşmasında rol aldığı belirtilmiştir.^{15,16} Miyoblast farklılaşmasında rolü olabileceği öne sürülen *Pparg*'nın kas farklılaşmasına etki mekanizmasının araştırılması amacı ile yapılan çalışmada, aşırı ekspresyonu sonucunda C2C12 fare miyoblastlarında miyogenik farklılaşmanın inhibe olduğu gözlenmiştir.^{17,18} Bizim çalışmamızda, kardiyomiyoblast hücrelerinde *Tbn* sessizleştirilmesini takip eden 24. saatte, hücrelerde *Myocd* gen ekspresyonu yüksek oranda baskılanmış, 48. saatte ise ekspresyonu yaklaşık olarak kontrol hücrelerinin seviyesine ulaşmıştır. *Pparg* ekspresyonu ise kontrole kıyasla 24. ve 48. saatlerde sırasıyla yaklaşık 4 ve 3,5 kat yükselmiştir. *Pparg*'nın bu yüksek seviyeleri özellikle 24. saatte *Myocd* transkriptinin aşırı baskılanmasından sorumlu olabilir. Diğer yandan, bu tablonun *Tbn* baskılanması ile mi yoksa *Pparg* ekspresyon artışı ile mi ilişkili olduğunun tespit edebilmesi amacı ile farklı deneysel tasarımlarla transkript ekspresyon dinamiklerinin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, hücre kültürü deneyleri sadece H9c2 rat kardiyomyoblast hücre soyunda gerçekleştirilmiştir. Deneylerin başka dokulara ait hücre soyları kullanılarak tekrarlanması ve kalbe özel ekspresyon özelliklerinin doğrulanması gerekmektedir. Diğer yandan, bu deneylerin bir ön çalışma niteliğinde olması ve grup sayılarının istatistiksel analizler için yeterli olmaması nedeni ile analiz sonuçları sadece değişim oranları (RQ) şeklinde verilmiş, istatistiksel anlamlılık seviyeleri verilememiştir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Taube Nuss, nispeten yakın zamanda keşfedilmiş ve etki mekanizması halen tam olarak bilinmeyen bir proteindir. Daha önceki yayınlarda *Tbn* geninin embriyonik dönemde eksprese olduğu ve transkripsiyon faktörü olarak rol oynadığı belirtilmiştir. *Tbn* geninin yetişkin fare ve rat kalbinde de eksprese olduğuna dair bulgularımız bu genin yetişkin hayatta da önemli bir rol oynadığını vurgulamaktadır. Diğer yandan, bu ön çalışmada *Tbn* sessizleştirilmesinden sonra *Pparg*, *Cebpa*, *Taf10* ve *Myocd* gen ekspresyonlarında değişim olması *Tbn* geninin kardiyomiyoblastlarda da bu genler ile ilişkide olabileceğini göstermektedir. Çalışmamız bu yönü ile özgüldür ancak, bu çalışmanın genişletilerek protein ekspresyonlarının analiz edilmesi ve diğer hücre soylarında yapılan deneylerle desteklenmesi gerekmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- N.E.Ü., E.K.B., B.Ö.S.; Veri Toplama- E.K.B., B.Ö.S.; Veri Analizi/Yorumlama- A.B.Y, N.E.Ü, E.K.B., B.Ö.S.; Yazı Taslağı- A.B.Y.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- B.Ö.S. E.K.B.; Son Onay ve Sorumluluk- A.B.Y, N.E.Ü, E.K.B., B.Ö.S.; Malzeme ve Teknik Destek- N.E.Ü, B.Ö.S. E.K.B.; Süpervizyon- B.Ö.S. E.K.B.

Author Contributions: Conception/Design of Study- N.E.Ü., E.K.B., B.Ö.S.; Data Acquisition- A.B.Y, N.E.Ü, E.K.B., B.Ö.S.; Data Analysis/Interpretation- A.B.Y, N.E.Ü, E.K.B., B.Ö.S.; Drafting Manuscript- A.B.Y.; Critical Revision of Manuscript- B.Ö.S. E.K.B.; Final Approval and Accountability- A.B.Y, N.E.Ü, E.K.B., B.Ö.S.; Technical or Material Support- N.E.Ü, B.Ö.S. E.K.B.; Supervision- B.Ö.S., E.K.B.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Yüksek Lisans Tez Projesi, No: 2140 ve TYL-2019-34037).

Financial Disclosure: This study was supported by the Research Fund of Istanbul University (Master's Degree, Thesis Project, No: 2140 and TYL-2019-34037).

KAYNAKLAR

1. Calore M., De Windt L.J., Rampazzo A. (2015): Genetics meets epigenetics: genetic variants that modulate noncoding RNA in cardiovascular diseases, *J Mol Cell Cardiol*, 89: 27-34.
2. Elia L., Condorelli G. (2015): RNA (Epi)genetics in cardiovascular diseases, *J Mol Cell Cardiol*, 89: 11-16.
3. Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert P.D. (1996): Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12): 6025-30.
4. Özsait B. (2003): "Subtractive" Hibridizasyon Kütüphanesinden izole edilen ve kalp gelişiminde rolü olduğu düşünülen genlerin analizi, *Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
5. Komurcu-Bayrak E., Ozsait B., Erginel-Unaltuna N. (2012): Isolation and analysis of genes mainly expressed in adult mouse heart using subtractive hybridization cDNA library, *Mol Biol Rep*, 39(8):8065-74.
6. Ozsait Selcuk B., Kömürcü Bayrak E., Erginal Ünaltuna N. (2016): Higher Expression level of Bat3 is associated with silencing of Midn gene in primary mouse cardiomyocytes, *Turk J Biol*, 40: 1295-1302.
7. Guermah M., Ge K., Chiang C.M., Roeder R.G. Guermah M., Ge K., Chiang C.M., Roeder R.G. (2003): The TBN protein, which is essential for early embryonic mouse development, is an inducible TAFII implicated in adipogenesis, *Mol Cell*, 12: 991-1001.
8. Voss A.K., Thomas T., Petrou P., Anastassiadis K., Schöler H., Gruss P. (2000): Taube Nuss is a Novel Gene Essential for the Survival of Pluripotent Cells of Early Mouse Embryos, *Development*, 127: 5449-61.
9. Brison D.R., Schultz R.M. (1997): Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha, *Biol Reprod*, 56: 1088-96.
10. Demény M.A., Soutoglou E., Nagy Z., Scheer E., Jánosházi A., Richardot M., Argentini M., Kessler P., Tora L. (2007): Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes, *PLoS One*, 2(3):e316.
11. Trowitzsch S., Viola C., Scheer E., Conic S., Chavant V., Fournier M., Papai G., Ebong I.O., Schaffitzel C., Zou J., Haffke M., Rappsilber J., Robinson C.V., Schultz P., Tora L., Berger I. (2015): Cytoplasmic TAF2-TAF8-TAF10 complex provides evidence for nuclear holo-TFIID assembly from preformed submodules, *Nat Commun*, 14(6): 6011.
12. Tatarakis A., Margaritis T., Martinez-Jimenez C.P., Kouskouti A., Mohan W.S. 2nd, Haroniti A., Kafetzopoulos D., Tora L., Talianidis I. (2008): Dominant and redundant functions of TFIID involved in the regulation of hepatic genes, *Mol Cell*, 31: 531-543.
13. Mouse ENCODE Consortium. (2014): A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome, *Nature*, 515(7527):355-64.
14. El-Jack A.K., Hamm J.K., Pilch P.F., Farmer S.R.. (1999): Reconstitution of Insulin-sensitive Glucose Transport in Fibroblasts Requires Expression of Both PPAR γ and C/EBP α , *J Biol Chem*, 274: 7946-51.
15. Gordon J.W. (2018): Regulation of cardiac myocyte cell death and differentiation by myocardin, *Mol Cell Biochem*, 437(1-2): 119-131.
16. Raphael L., Talasila A., Cheung C., Sinha S. (2012): Myocardin overexpression is sufficient for promoting the development of a mature smooth muscle cell-like phenotype from human embryonic stem cells, *PLoS One*, 7(8): e44052.
17. Singh J., Verma N.K., Kansagra S.M., Kate B.N. Dey C.S. (2007): Altered PPAR γ expression inhibits myogenic differentiation in C2C12 skeletal muscle cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 294: 163-171.
18. He K., Wu G., Li W.X., Guan D., Lv W., Gong M., Ye S., Lu A. (2017): A transcriptomic study of myogenic differentiation under the overexpression of PPAR γ by RNA-Seq, *Sci Rep*, 7(1):15308.