

Nöron Benzeri Hücre Hatlarında RNA İnterferans Aracılı Gen İfadesi Baskılama Çalışmaları: In Vitro SMA Modelleri

Gene Silencing By RNA İnterference in Neuron-Like Cell Lines: In Vitro SMA Models.

Gamze Bora

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Ankara, Türkiye

Özet: Ökaryotik hücredeki biyolojik olayların açıklanabilmesi amacıyla primer hücrelere ulaşımın kısıtlı olduğu durumlarda hücre hatları kullanılmaktadır. Hücre hatları, primer hücreleri birebir yansıtmamalarına karşın hastalık modeli oluşturmak için sıklıkla ihtiyaç duyulan ve kullanılan hücrelerdir. Bu çalışmada genlerin fonksiyonunun baskılanması prensibine dayanan RNA interferans yöntemi iki farklı nöron benzeri hücre hatında uygulanmış, hücrelerin birbirlerine göre avantajları/dezavantajları, nörodejeneratif bir hastalık olan Spinal müsküler atrofi üzerinden karşılaştırılmıştır. In vitro SMA modeli oluşturmak üzere, nöron benzeri hücrelere farklılaştırılan PC12 ve NSC34 hücre hatlarında SMN gen ifadesi siRNA yöntemi ile baskılanmış, baskılanma Western blot ve immünfloresan boyama yöntemleri ile gösterilmiştir. PC12 ve NSC34 hücre hatlarında SMN gen ifadesi %90'ın üzerinde baskılanabilmiş ve çalışmalar sırasında hücre hatlarının kültür, farklılaşma, transfeksiyon koşulları arasındaki farklar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, ileride nöron benzeri PC12 ve NSC34 hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilecek çalışmalar açısından yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: hücre hatları, PC12, NSC34, RNA interferans, siRNA.

Abstract: In order to explain the biological mechanisms in the eukaryotic cells, cell lines are valuable tools in cases where access to primary cells is limited. Although they do not reflect primary cells exactly, cell lines are often needed and used to model diseases in vitro. In this study, two neuron-like cell lines were used for gene silencing by RNA interference to both evaluate advantages/disadvantages of cells and their potential to be used as an in vitro models for neurodegenerative diseases through spinal muscular atrophy. As in vitro SMA models, SMN gene was knocked-down in both PC12 and NSC34 cell lines and gene silencing was confirmed by Western blot and immunofluorescence stainings. We found that SMN knock-down efficiencies were more than 90% in both PC12 and NSC34 cell lines. We compared culture, differentiation and transfection conditions of cell lines during silencing studies. Our findings will be helpful for further studies using neuron-like PC12 and NSC34 cell lines.

Keywords: cell line, PC12, NSC34, RNA interference, siRNA

ORCID ID of the author: G.B.0000-0002-4206-8332

Received 15.12.2018

Accepted 10.01.2019

Online published 11.01.2019

Correspondence: Gamze BORA, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Ankara, Türkiye.
e-mail: gamzeb@hacettepe.edu.tr

Cite this article as:

Bora G. Gene Silencing By RNA İnterference in Neuron-Like Cell Lines: in Vitro SMA Models,
Osmangazi Journal of Medicine, 2020;42(2):140-147 **Doi:** 10.20515/otd.497543

1. Giriş

Nörodejeneratif bir hastalık olan Spinal müsküler atrofi (SMA) otozomal resesif olarak kalıtılmaktadır. Hastalığa Survival of motor neuron 1 (SMN1) gen mutasyonları neden olmakta ve hastaların %90-94'ünde bu genin 7 ve 8. ekzonlarında homozigot delesyonlar bulunmaktadır (1-3). SMN1 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda omurilikteki alfa motor nöronlar dejenere olarak kas atrofisi fenotipini ortaya çıkarmaktadır. SMN proteini tüm hücrelerde sentezlenmesine karşın eksikliğinden en fazla etkilenen hücrelerin nöronlar olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda SMN proteini eksikliğinde nöronların akzon ve dendrit boyunun kısaldığı, akzonal dallanmanın ve transportun bozulduğu bildirilmiştir (4-8). Temel araştırmalarla, SMA'da olduğu gibi ilerleyici yapısal ve fonksiyonel nöron kayıpları ile seyreden birçok nörodejeneratif hastalığın (Alzheimer, Parkinson ve Amyotrofik lateral skleroz vb) hücresele ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılabilmesi mümkün olmaktadır. Araştırmalardan elde edilen bilgilerin erken tanı ve tedavi hedeflerinin belirlenmesinde kullanılabilir olması bu alandaki teknolojik bilgileri önemli kılmaktadır. Ancak nöron hasarı görülen hastalıklarla ilgili araştırmalarda hasta bireylerden nöron eldesinin mümkün olmaması araştırmaları kısıtlamakta ve bu nedenle öncelikle nöron benzeri hücre hatları ile çalışmalar yürütülmektedir. Hücre hatları, laboratuvar ortamında sürekli bölünme yeteneğine sahip hücreler olup tümör hücrelerinden ya da deneysel olarak sınırsız bölünme özelliği kazandırılan hücrelerden kurulmaktadır (9). Çoğu primer hücreye göre daha homojen hücre popülasyonu içermeleri, uzun süre kültüre edilebilmeleri ve deneysel olarak daha kolay manipüle edilebilmeleri özellikle fonksiyonel genomik araştırmalar açısından avantaj sağlamaktadır. Sık kullanılan nöron benzeri hücre hatları arasında, sıçan adrenal medulla nöroendokrin hücrelerinden (pheochromocytoma) kurulmuş olan PC12 ve fare nöroblastoma-omurilik motor nöron füzyonu ile oluşturulmuş NSC34 yer almaktadır. PC12 hücreleri, kültür ortamına farklılaşmayı indükleyici faktörlerin

eklenmesi ile sempatik nöron, NSC34 hücreleri ise kültürdeki serum oranının azaltılması ile motor nöron benzeri özellik göstermektedir (10-12). Her iki hücre hattı da farklılaştırıldığında nörit adı verilen uzantılar oluşturmakta, bu nedenle hücre farklılaşması ve nörit uzunluklarının analizleri ile ilgili çalışmalarda model olarak kullanılabilir (4, 8, 13).

Gen fonksiyonlarının araştırılmasında hücre hatlarından yararlanılmaktadır. Bu amaçla gen ifadesi deneysel olarak artırılmakta (aşırı ifade-overexpression) ya da azaltılmakta (knock-down), böylece hastalıklar kültür ortamında modellenilebilmektedir. Gen ifadesinin azaltılması amacıyla kullanılan RNA interferans teknolojisi, fonksiyonel genomik alanda çığır açmış olup ökaryotik genlerin fonksiyonlarının açıklanabilmesine imkan sağlayan önemli bir araçtır. RNA interferans-aracılı gen ifadesi baskılama çalışmaları sayesinde ilgilenilen genden sentezlenen protein miktarı azaltılmakta ve proteinin fonksiyonuna ilişkin bilgiler elde edilebilmektedir (14, 15).

Bu çalışmada, nörodejeneratif hastalıklardan Spinal müsküler atrofi üzerine odaklanılmış, in vitro SMA modeli oluşturmak amacıyla PC12 ve NSC34 hücre hatlarında SMN gen ifadesi siRNA ile baskılanmıştır. Hücre hatlarının in vitro SMA modeli olarak kullanılabilir potansiyelleri ile birbirlerine göre avantaj/dezavantajları tartışılmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

Hücre kültürü, transfeksiyon ve farklılaştırma çalışmaları

PC12 hücreleri, DMEM 4,5 g/l D-glukoz (Gibco), %10 at serumu (Gibco), %5 FCS, %2 sodyum pürivat ve %1 penisilin/streptomisin içeren kültür ortamında, 37°C, %5 CO₂ etüvde çoğaltıldı. Hücreler, enjektörden geçirilerek siRNA ile transfekte edildi ve kollajen kaplı kültür kaplarına aktararak, %1 at serumu, %2 sodyum pürivat, %1 penisilin/streptomisin ve 100ng/ml sinir büyüme faktörü (NGF) içeren farklılaşma ortamında 3 ve 7 gün süreyle farklılaştırıldı.

NSC34 hücreleri, DMEM 4,5 g/l D-glukoz, %5 FCS ve %1 penisilin/streptomisin içeren çoğaltma ortamında, 37°C, %5 CO2 etüvde çoğaltıldı. Hücreler düşük serum (%1 FCS) içeren kültür ortamına alındı ve siRNA ile transfekte edilerek 3 gün süreyle farklılaştırıldı. Transfeksiyon ajanı olarak Lipofectamin 2000, SMN gen ifadesinin baskılanması amacıyla sıçan ve/veya fare SMN mRNA'larını tanıyan farklı siRNA'lar (siRNA1:AGAACGGUGACAUGUGUGA, siRNA2:CAGAAGUAAAGCACACAGCAA, siRNA3: AACCUGCUAAGAAGAAUAA,) ve hedefi bulunmayan kontrol siRNA (AUACGAACGGAACGAACAACA) kullanıldı (16). Belirtilen inkübasyon sürelerinin sonunda hücreler immünfloresan boyamalar için fikse edildi ya da Western blot çalışmaları için RIPA (20 mM Tris HCL, 137mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM sodyum ortovanadat, 25 mM beta-glukofosfat, %1 triton-X-100, %1 deoksikolat) tamponu içerisine alındı.

Western blot çalışmaları

Hücreler protein izolasyonu amacıyla proteaz ve fosfataz inhibitörü (Roche) içeren RIPA tamponu içerisinde 15 dk sonike edildi. 14000 rpm'de +4°C'de 20 dk santrifuj sonrası protein konsantrasyonları BCA yöntemi ile ölçüldü. Western blot çalışmaları için %12,5'lük SDS-PAGE hazırlandı ve örnekler eşit konsantrasyonda jelle yüklenerek 120V, 1.5 saat elektroforez gerçekleştirildi. Proteinlerin nitroselüloz membrana transferi, ıslak transfer yöntemi (Biorad) ile 120V, 1 saat olacak şekilde gerçekleştirildi. Membran 1 saat %5 süt tozu içeren TBST-T'de bloklandıktan sonra SMN (BD, 1:1000), alfa tubulin primer antikoları (Sigma, 1:1000) ve HRP konjuge anti-fare sekonder antikor (Amersham, 1:4000) ile inkübe edildi. Membrankemilüminesan görüntüleme solüsyonu (Pierce) ile muamele edildi ve protein bantları CCD kamera (GeneGnome) ile görüntüledi.

İmmünfloresan boyama çalışmaları

PC12 hücrelerinde immünfloresan boyama çalışmaları için kültür kaplarına yerleştirilen steril cam lameller poli-l-lizin (Sigma) ve

laminin (R&D Systems, Cultrex) ile kaplandı. Poli-l-lizin (1:100) ile kaplama için lameller 1 gece 37°C, % 5 CO2 etüvde bırakıldı. Ertesi gün poli-l-lizin uzaklaştırılarak 3 kez steril distile su ile yıkandı. Lamellerin üzerine fare laminin (20 ug/ml) koyularak 1 saat hücre kültür kabini içerisinde bekletildikten sonra laminin uzaklaştırıldı ve hücreler kültür kaplarına transfer edilerek farklılaştırıldı. Farklılaşma süresi sonunda hücreler %100 metanol ile -20°C'de 5dk fikse edildi. Hücreler 1 saat bloklama tamponu (% 10 keçi serumu, % 0.1 Tween 20, %1 BSA) içerisinde oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra aşağıda belirtilen antikolar ile SMN ve tubülin boyamaları gerçekleştirildi. NSC34 hücrelerinde immünfloresan boyamalar için hücreler doğrudan cam lamel içeren kültür kaplarına aktarıldı ve 3 gün süreyle farklılaştırıldı. Hücreler 1 saat bloklama tamponu (%1 BSA, %0,3 Triton X-100) içerisinde bırakıldıktan sonra belirtilen primer ve sekonder antikolar ile inkübe edildi. Hücrelerde çekirdek görüntülenmesi amacıyla 1 dk DAPI (Molecular probes, 1:1000) boyaması gerçekleştirildikten sonra Prolong Anti-Fade (Thermo Fisher) solüsyonu ile preparatlar kapatılarak floresan ataçmanlı upright mikroskopta (Zeiss) uygun filtreler kullanılarak görüntüledi. Hücrelerin nörileri küçük büyütme (10X veya 20X objektif), SMN'in çekirdekte lokalize olduğu nükleer cisimcikler ise büyük büyütme (40X-100X objektif) ile görüntüledi.

Antikolar

İmmünfloresan boyama çalışmalarında kullanılan primer antikolar; fare anti-SMN (BD, 1:100, 1 gece +4C), tavşan anti-SMN (Novus, 1:100,1 gece +4C), fare anti-beta tubülin (Millipore, 1:200, 2 saat oda sıcaklığı), sekonder antikolar; anti-fare Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, 1:500, 1 saat oda sıcaklığı), anti-fare Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher, 1:500, 1 saat oda sıcaklığı), anti-tavşan Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, 1:500, 1 saat oda sıcaklığı).

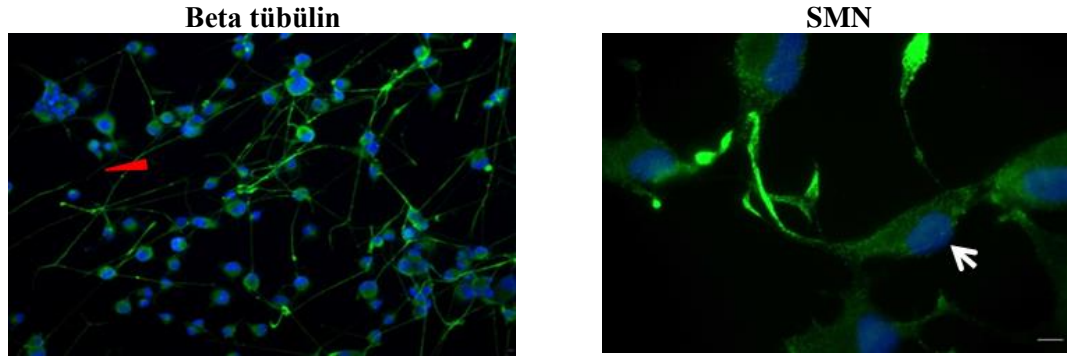
3. Bulgular

Kültür ortamına nöron büyüme faktörü eklenen PC12 hücreleri farklılaşarak 3.günden

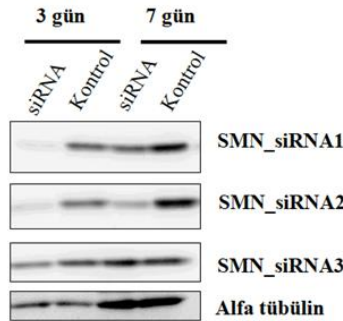
İtibaren hücre gövdesi çapının en az 2 katı uzunluğuna ulaşan nöritleri oluşturmaya başlamaktadır. Farklılaşan hücrelerin 7.günde terminal farklılaşma evresine geldiği ve sempatik nöron benzeri karakter kazandığı bilinmektedir (10, 11). Bu çalışmada, PC12 hücrelerinde nörit uzantılarının mikroskopik olarak görüntülenebilmesi amacıyla immünfloresan yöntemle beta-tübülin boyaması yapılmış ve örnek fotoğraf Şekil 1A'da gösterilmiştir. Immünfloresan analizler sonucunda SMN proteininin PC12 hücrelerinde ifade olduğu, çekirdekte nükleer cisimciklerde, hücre gövdesinde, nöritlerde ve büyüme bölgelerinde yerleşim gösterdiği saptanmıştır (Şekil 1A).

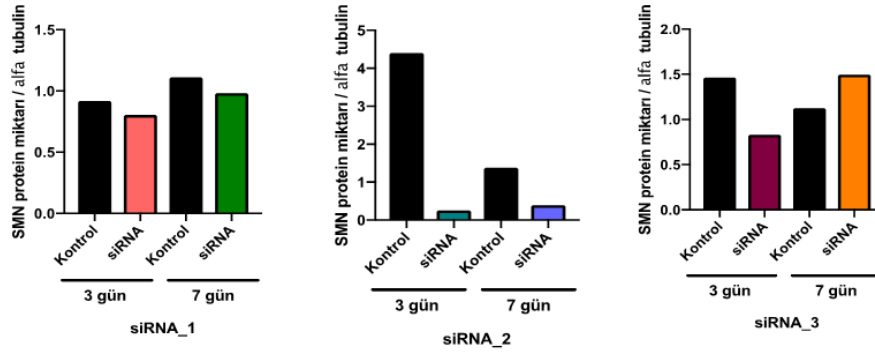
PC12 hücrelerinde in vitro SMA modelinin oluşturulabilmesi amacı ile transfeksiyonlar 3 farklı siRNA dizisi kullanılarak

gerçekleştirilmiş, 3 ve 7 gün süreyle nörona farklılaştırılan hücrelerden protein izole edilerek SMN ifadesi Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, uygulanan siRNA dizilerinin SMN gen ifadesini baskılama etkinliklerinin farklı olduğunu göstermiş, 3 ve 7. günler dikkate alındığında en fazla baskılamanın siRNA2 dizisi ile gerçekleştirilen transfeksiyonlarda olduğu saptanmıştır. SMN ifadesinin, kontrol hücrelere göre 3 gün farklılaşan hücrelerde %94, 7 gün farklılaşan hücrelerde ise %71 oranında baskıldığı gösterilmiştir (Şekil 1B). SMN gen ifadesindeki baskılanma aynı zamanda, SMN'in çekirdekte yerleşim gösterdiği nükleer cisimciklerin sayısındaki azalmanın mikroskopik olarak tespiti ile de kesinleştirilmiştir (Şekil 1C).

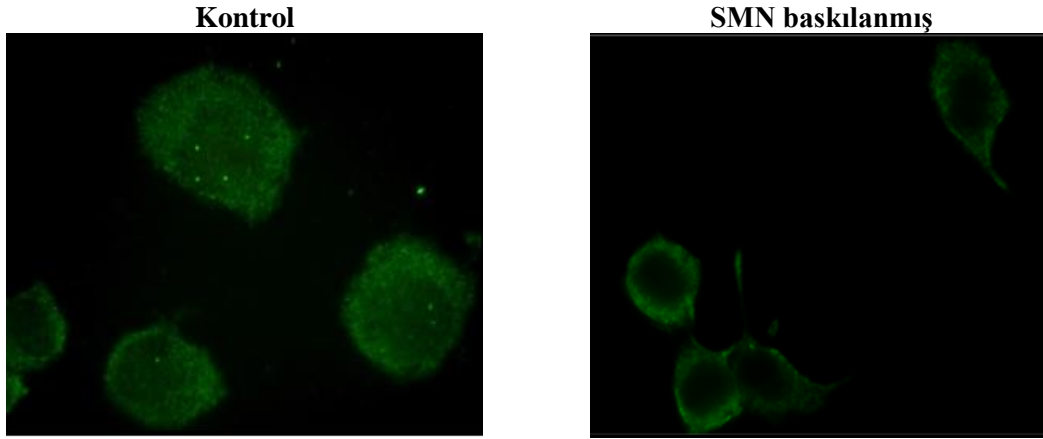


Şekil 1 A). PC12 hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalara ait sonuçlar; Farklılaşmış PC12 hücrelerinde beta tübülün ve SMN protein yerleşimini gösteren örnek immünfloresan boyama fotoğrafları. Nöritler üçgen, çekirdekte SMN'in yerleşim gösterdiği nükleer cisimcikler ok ile gösterilmiştir, bar: 20 um (sol), 10 um (sağ)





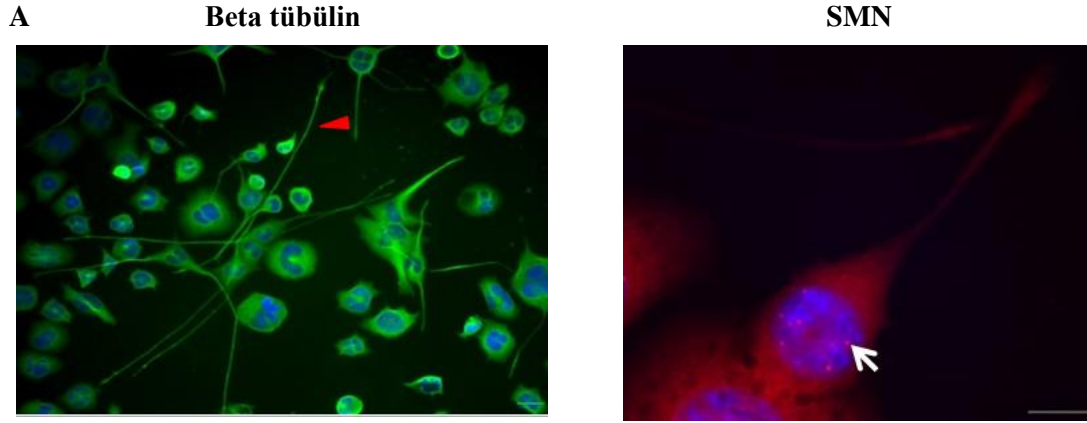
Şekil 1 B). Farklı siRNA dizileri ile SMN gen ifadesinin baskılanmasını gösteren örnek Western blot görüntüleri ve SMN proteinini baskılanma düzeyleri



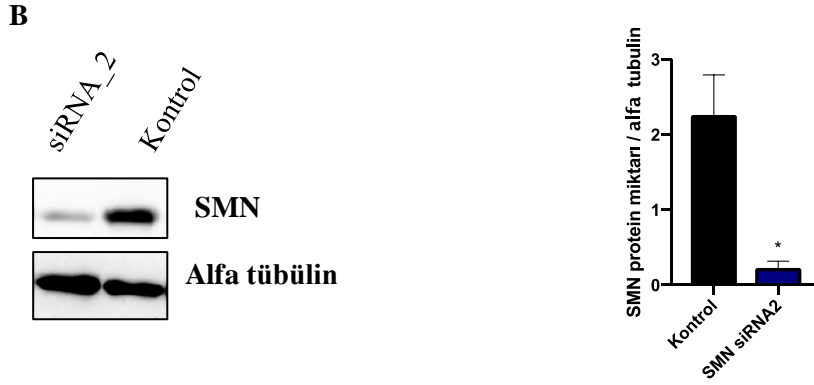
Şekil 1 C). SMN proteininin çekirdekte yerleşim gösterdiği nükleer cisimciklerin siRNA transfeksiyonu sonucu azaldığını gösteren büyütülmüş immünfloresan boyama fotoğrafları.

NSC34 hücreleri kültür ortamındaki serum oranının azaltılması ile farklılaşmakta ve motor nöron benzeri karakter kazanmaktadır (12). Bu hücrelerin kültür ortamında en fazla 3 gün süreyle farklılaştırılabilirler ve 3.günün sonunda uzun nöritlerin oluştuğu saptanmıştır (Şekil2A). Ancak NSC34 hücrelerinin bir kısmının kültür ortamında spontan olarak farklılaşabildiği, farklılaşma ortamı içerisinde olmasına rağmen hücrelerin bir kısmının nörit oluşturmadığı gözlenmiştir. NSC34 hücrelerinde SMN proteininin çoğunlukla çekirdekdeki nükleer cisimciklerde ve hücre gövdesinde yerleşim göstermekle

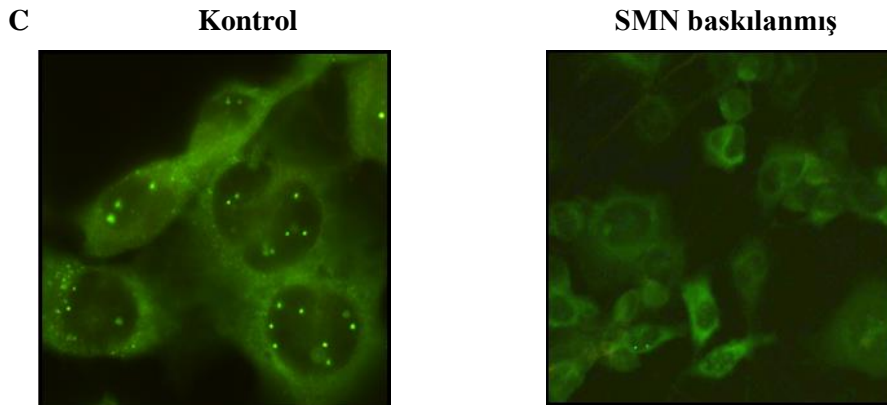
birlikte nöritlerde de bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 2A). NSC34 hücrelerinin baskılanmasında, PC12 hücrelerinde en fazla etkinlikte baskılanmanın sağlandığı siRNA2 dizisi kullanılmış, 3 günlük farklılaşma süresi sonunda SMN gen ifadesinin protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde %90 oranında baskılanabildiği gösterilmiştir (Şekil 2B). SMN gen ifadesindeki baskılanma, mikroskopik olarak SMN proteininin çekirdekte yerleşim gösterdiği nükleer cisimciklerin sayısının azalması ile de kanıtlanmıştır (Şekil 2C).



Şekil 2. NSC34 hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalara ait sonuçlar, **A)** Farklılaşmış NSC34 hücrelerinde beta tübülün ve SMN protein yerleşimini gösteren örnek immünfloresan boyama fotoğrafları. Nöritler üçgen, çekirdekte SMN'in yerleşim gösterdiği nükleer cisimcikler ok ile gösterilmiştir, bar: 20 um (sol) ve 10 um (sağ)



Şekil 2.B) siRNA ile SMN gen ifadesinin baskılanmasını gösteren örnek Western blot görüntüleri ve SMN proteini baskılanma düzeyleri,, n=4 biyolojik tekrar. Mann-Whitney U, * $p < 0.05$, C) SMN proteininin çekirdekte yerleşim gösterdiği nükleer cisimciklerin siRNA transfeksiyonu sonucu azaldığını gösteren büyütülmüş immünfloresan boyama fotoğrafları.



Şekil2. C) SMN proteininin çekirdekte yerleşim gösterdiği nükleer cisimciklerin siRNA transfeksiyonu sonucu azaldığını gösteren büyütülmüş immünfloresan boyama fotoğrafları.

4. Tartışma ve Sonuç

Nörodejeneratif hastalıklar, ilerleyici nöron kayıpları görülen ve tedavi imkanı kısıtlı bir hastalık grubudur. Toplumdaki görülme sıklıkları farklı olmakla birlikte Alzheimer, Parkinson ve Amyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Spinal müsküler atrofi (SMA) bu grup içinde yer almaktadır. Bu hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılabilmesi için hastaların nöron hücrelerinin çalıştırılmasına ihtiyaç duyulmakta, ancak insan primer nöron kültürü kurulması mümkün olmamaktadır. Son yıllarda fibroblast hücrelerinin pluripotent hale getirilmesi ve farklılaştırılması ile insan nöron hücrelerinin eldesi mümkün olmakla birlikte, bu çalışmalar teknik açıdan zor ve yüksek maliyetlidir. Bu nedenle nöron benzeri hücre hatları ile gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen bilgiler, ileri araştırmalar açısından yol gösterici olmaktadır (17-20). RNA interferans-aracılı gen ifadesi baskılama çalışmaları, hücre hatlarında geçici ya da kalıcı şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Geçici baskılama amacıyla hücrelere, small interfering RNA (siRNA) adı verilen, 19-25 nükleotit uzunlukta çift zincirli RNA molekülleri, kalıcı baskılama için ise short hairpin RNA (shRNA) adı verilen diziler içeren vektörler transfekte edilmektedir. Transfeksiyon sonrası siRNA ve shRNA'lar hücrelerin RNA interferans mekanizmasını uyarmakta, hedef genin mRNA'sına özgül olarak bağlanarak protein sentezini engellemektedir (14, 15)

Bu çalışmada, literatürde sık kullanılan PC12 ve NSC34 hücre hatlarında, RNA interferans-aracılı in vitro Spinal müsküler atrofi modeli oluşturulmuş, hücre tiplerinin ve deneysel farklılıkların baskılama üzerindeki etkileri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. İki farklı nöron benzeri hücre hattının siRNA ile baskılama etkinlikleri incelenmiş, siRNA2 dizisinin her iki hücre hattında da SMN gen ifadesini %90'ın üzerinde baskılayabildiği saptanmıştır. RNA interferans çalışmalarında baskılama oranının genellikle %70'in üzerinde olması hedeflenmektedir. Çalışmalar sırasında, PC12 hücrelerinin NSC34 hücrelerine göre kültür ortamında daha homojen farklılaştığı gözlenmiştir. 3 gün farklılaştırılan NSC34 hücrelerinde nöritler

belirgin olarak görüntülenebilirken, PC12 hücrelerinde uzun nöritlerin oluşumu için hücrelerin 7 gün süreyle farklılaştırılması gerekmektedir. Nöritler ışık mikroskopunda görülebilmekle birlikte özellikle farklılaşmanın erken evrelerinde immünfloresan boyama ile daha net görüntü alınabilmektedir. Bu nedenle özellikle nörit boyu analizlerinin gerçekleştirileceği çalışmalarda immünfloresan boyama yöntemi ile nöritlerin takibi gereklidir. NSC34 hücreleri ile çalışmaların daha hızlı bir şekilde yürütülebildiği ve PC12 hücrelerine göre daha kolay transfekte edilebildiği saptanmıştır. PC12 hücrelerinin transfeksiyon etkinliğini arttırmak için, hücreler enjektörden geçirildikten sonra transfekte edilmiş, ancak bu sayede başarılı bir baskılama gerçekleştirilebilmiştir. PC12 hücrelerinde baskılama etkinlikleri incelendiğinde, 3 günlük farklılaşma sonunda gen ifadesinin baskılanabildiği, 7 günlük farklılaşmada ise baskılama oranlarının azaldığı saptanmıştır. Bu nedenle PC12 hücreleri ile gerçekleştirilecek uzun süreli çalışmalarda, siRNA ile geçici baskılama yerine shRNA ile kalıcı baskılama yapılması önerilmektedir.

RNA interferans çalışmalarında gen ifadesinin baskılanması sonucunda ortaya çıkan hücresel cevaplar araştırıldığından, çalışmalara başlarken en az iki farklı siRNA dizisinin tasarlanması ve baskılama etkinliği yüksek olan dizi ile çalışmalara devam edilmesi yararlı olacaktır. Kullanılacak hücre hatlarının özelliklerinin ve çalışılacak hedef proteinlerin bu hücrelerdeki ifade düzeyi/yerleşimlerinin çalışma başlangıcında belirlenmiş olması, baskılama sonucundaki hücresel cevapların doğru değerlendirilebilmesi için gereklidir. Ayrıca hücre hatlarında ilgilenilen genin ifadesindeki baskılama sonucunda farklı biyolojik cevapların oluşabileceği dikkate alınmalıdır (4, 8, 21). Bu nedenle yeni araştırmalar planlanırken birden fazla hücre hattının kullanılarak sonuçların birlikte değerlendirilmesi yararlı olacaktır. PC12 ve NSC34 nöron benzeri hücre hatları ile yaptığımız çalışmalardan elde edilen bulguların, diğer nörodejeneratif hastalıklarla ilgili olarak yürütülen temel araştırmalar

açısından da yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Teşekkürler

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 013D05101004).

KAYNAKLAR

- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Weissenbach J, Munnich A, Melki J. Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene. *Cell*, 1995; 80: 155-65
- Wirth B. An Update of the Mutation Spectrum of the Survival Motor Neuron Gene (SMN1) in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Hum Mutat*. 2000;15:228-37.
- Erdem H, Pehlivan S, Topaloglu H, Ozguc M. Deletion Analysis in Turkish Patients with Spinal Muscular Atrophy. *Brain Dev*. 1999; 21: 86-89.
- Bowerman M, Shafey D, Kothary R. Snn Depletion Alters Profilin II Expression and Leads to Upregulation of the RhoA/ROCK Pathway and Defects in Neuronal Integrity. *J Mol. Neurosci.* ; 2007; 32: 120–31.
- Simic G, Mladinov M, Seso Simic D, et al. Abnormal Motoneuron Migration, Differentiation, and Axon Outgrowth in Spinal Muscular Atrophy. *Acta Neuropathol*. 2008;115:313-326.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, et al. Sendtner M. Snn, the Spinal Muscular Atrophy-determining Gene Product Modulates Axon Growth and Localization of Beta-actin mRNA in Growth Cones of Motoneurons. *J Cell Biol*. 2003; 163:801-12.
- McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE. Knockdown of the Survival Motor Neuron (Snn) Protein in Zebrafish Causes Defects in Motor Axon Outgrowth and Pathfinding. *J Cell Biol*. 2003;162:919-31.
- Bora-Tatar G, Erdem-Yurter H. Investigations of Curcumin and Resveratrol on Neurite Outgrowth: Perspectives on Spinal Muscular Atrophy. *BioMed Res. Int*. 2014;709108: 1-8.
- Freshney RI. Culture of animal cells, A manual of basic techniques. 5th ed, WILEY-LISS 2005.
- Greene LA, Tischler AS. Establishment of a Noradrenergic Clonal Line of Rat Adrenal Pheochromocytoma Cells which Respond to Nerve Growth Factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976; 73:2424-2428
- Stevens, C.F. Culturing Nerve Cells. Culture and experimental use of the PC12 rat pheochromocytoma cell line. U.S.A.:Massachusetts Institute of Technology. 1998
- Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, et al. Neuroblastoma x Spinal cord (NSC) Hybrid Cell Lines Resemble Developing Motor Neurons. *Dev Dyn*. 1992; 194:209–21.
- Van Bergeijk J, Haastert K, Grothe C, Claus P. Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron protein. *Chem. Biol. Drug Des*. 2006; 67:244-247.
- Kim HD, Rossi JJ. RNAi Mechanisms and Applications. *Biotechniques*. 2008; 44:613-616.
- Farrell Jr RE. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. RNAi: take a RISC – role the Dicer, 4th ed, Academic press. 2010
- Hensel N, Ratzka A, Brinkmann H, Klimaschewski L, Grothe C, Claus P. Analysis of the Fibroblast Growth Factor System Reveals Alterations in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *PLoS One*. 2012; 7: 31202.
- Maier O, Böhm J, Dahm M, Brück S, Beyer C, Johann S. Differentiated NSC-34 Motoneuronlike Cells as Experimental Model for Cholinergic Neurodegeneration. *Neurochem Int*. 2013; 62:1029-38.
- Zeng Z, Xu J, Zheng W. Artemisinin Protects PC12 Cells Against β -amyloid Induced Apoptosis Through Activation of the ERK1/2 Signaling Pathway. *Redox Biol*. 2017; 12:625-633.
- Grau CM, Greene LA. Use of PC12 Cells and Rat Superior Cervical Ganglion Sympathetic Neurons as Models for Neuroprotective Assays Relevant to Parkinson's Disease. *Methods Mol Biol*. 2012;846:201-11.
- Bahmad H, Hadadeh O, Chamaa F, et al. Modeling Human Neurological and Neurodegenerative Diseases: From Induced Pluripotent Stem Cells to Neuronal Differentiation and Its Applications in Neurotrauma. *Front Mol Neurosci*. 2017; 10: 50.
- Hensel N, Stockbrügger I, Rademacher S, Broughton N, Brinkmann H, Grothe C, Claus P. Bilateral Crosstalk of Rho- and Extracellular-signal-regulated-kinase (ERK) Pathways is Confined to an Unidirectional Mode in Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Cell Signal*. 2014;26:540-548