



DOI: doi: 10.14744/hnhj.2017.50251
Haydarpaşa Numune Med J 2017;57(3):125–134

Klinik Çalışma Original Article

Aksolotl Rejenerasyonunun Farklı Evrelerinde miRNA Profilinin Bulunması ve Bulunan miRNA'ların Görevlerinin In-siliko Analizi

Turan Demircan^{1,2}, Mahmut Erhan Avşaroğlu², Gürkan Öztürk^{3,2}, İlknur Keskin^{4,2}

¹İstanbul Medipol Üniversitesi, Uluslararası Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER), İstanbul

³İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

⁴İstanbul Medipol Üniversitesi, Uluslararası Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Özet

Giriş ve Amaç: Rejenerasyon, fonksiyonel bir kayıp yaşamadan hasarlı dokunun, organın ya da uzvun restore edilmesi işlemidir. Su semenderlerinden olan Aksolotl kendisini öldürmeyecek iç organ, merkezi sinir sistemi ve uzuv hasarlarını başarı ile tamir edebilmektedir. miRNA'lar hedef mRNA'ların translasyon düzeyini düşürerek yazılım sonrası gen ifadesinin kontrolünde önemli roller üstlenirler. Biz de bu çalışmada Aksolotl'un kuyruk rejenerasyonu sırasında değişen miRNA profilini ve bu miRNA'ların moleküler yollara olası etkilerini araştırdık.

Yöntem ve Gereçler: 6-8 aylık 60 adet Aksolotl'un kuyruk bölgesinden ampütasyon yapılmış ve hayvanlar 4 gruba ayrıldı. Ampütasyondan hemen sonra (0. gün) ve rejenerasyonun 1., 4. ve 7. günü örnek toplandı. Toplanan örneklerden yeni nesil dizileme yöntemi ile miRNA tespiti yapıldı. Bulunan miRNA'lar içinde rejenerasyonun farklı evrelerinde miktarı anlamlı olarak değişenlerin hangi yolları regüle ettiği analiz edildi.

Bulgular: Bulunan miRNA'lar içinden 52 tanesinin miktarı 1.5 kat ve üzeri değiştiği (arttığı veya azaldığı) için bu miRNA'lar yolak analizlerinde kullanıldı. Rejenerasyon ile birlikte artış gösteren miRNA'ların hemostazla ilişkili yolları regüle ettiği görüldü. Rejenerasyon sürecinde azalış gösteren miRNA'ların ise hücre bölünmesi ve hücre bölünmesinin kontrolü ile ilgili yolları regüle ettiği bulundu.

Tartışma ve Sonuç: miRNA'lar canlılıkta birçok görev (hemostaz, gelişim, büyüme ve hastalık durumunun regülasyonu vb.) üstlenirler. miRNA profilinin değişmesi rejenerasyonun başarı ile sürmesi ve tamamlanması için gerekli bir mekanizmadır.

Anahtar sözcükler: Aksolotl; kuyruk rejenerasyonu; miRNA.

İletişim (Correspondence): Dr. Turan Demircan, İstanbul Medipol Üniversitesi, Uluslararası Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Telefon (Phone): +90 532 547 83 74 **E-Posta (E-mail):** tdemircan@medipol.edu.tr

Başvuru Tarihi (Submitted Date): 02.05.2017 **Kabul Tarihi (Accepted Date):** 19.06.2017



Identification of miRNA Profile and In-Silico Analysis of Identified miRNA Functions at Different Stages of Axolotl Tail Regeneration

Abstract

Introduction: Regeneration is the process of the restoration of an injured organ, extremity, or tissue without functional loss. Axolotl, a species of aquatic salamander, can perform successful regeneration after a non-lethal injury to internal organs, the central nervous system, and extremities. miRNAs targeting mRNAs have essential roles in post-transcriptional regulation by decreasing the translational level. This study was an investigation of changes in the miRNA profile and the effect of miRNAs on molecular pathways during tail regeneration.

Methods: 60 axolotls 6 to 8 cm in length was amputated and the animals were randomly divided into 4 groups. Tissue samples were taken just after amputation (day 0 sample), and on the first, fourth, and seventh day of regeneration. miRNAs were identified in the collected samples using next generation sequencing. Among the identified miRNAs, those demonstrating significant change at different stages of regeneration were analyzed to explore the pathways regulated.

Results: Of the identified miRNAs, 52 that changed (increased or decreased) by 1.5 times or more were used in molecular pathway analysis. It was found that miRNAs upregulated during regeneration controlled homeostatic pathways, while downregulated miRNAs controlled the cell cycle and cell cycle regulating pathways.

Discussion and Conclusion: miRNAs act in fundamental processes, such as homeostasis, development, growth, and regulation of disease. A shift in the miRNA profile is necessary to achieve progress and the successful accomplishment of regeneration.

Keywords: Axolotl, tail regeneration, miRNA.

Hayvan ve bitki hücrelerinde bulunan mikro RNA'lar (miRNA), tek zincirli, küçük protein kodlamayan RNA'lar sınıfından olup mesajcı RNA'ları (mRNA) hedeflemek yoluyla hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alırlar. Genellikle 19-22 nükleotid uzunluğunda olan miRNA'lar, gen ifadesini transkripsiyon sonrası düzenleyerek moleküler yollar üzerinde regülatif görevler üstlenirler. miRNA'ların üretilme şekli ve etki mekanizmaları buldukları canlı türüne göre farklılık gösterebilmektedir [1].

Canlıların genomunda miRNA'ları kodlayan genler olabildiği gibi, kimi miRNA'lar da protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde bulunabilmektedir [2]. miRNA kodlayan genlerin çoğunluğunun transkripsiyonu RNA polimeraz II tarafından gerçekleştiriliyor olsa da [3] bazı miRNA'ların transkripsiyonunda RNA polimeraz III görev almaktadır [4]. miRNA genlerinin ilgili RNA polimerazlar tarafından transkripsiyonu ile miRNA biyogenezini başlatmış olur [3].

miRNA'yı içeren genin transkripte edilmesi sonucu oluşan uzun transkript pri-miRNA olarak adlandırılır. Pri-miRNA dizisinin 5' ucu şapkalı olup, 3' ucu da poliadeniledir [5]. Üretilen pri-miRNA'da oluşan gövde-ilmek yapısı ile miRNA olgunlaşma süreci başlamış olur. pri-miRNA'nın ilk kırılma basamağı çekirdekte gerçekleşir. Çekirdekte bulunan RNA yıkıcı enzim (RNAaz) III olan Drosha, pri-miRNA'ya DGCR8/PASHA proteinleri aracılığı ile bağlanarak mikroişlemci kompleksini oluşturur. Mikroişlemci kompleksi pri-miRNA'nın gövde-ilmek yapısının 5' ve 3' ucunu kesim reaksiyonu ile serbest bırakarak 60-70 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA yapısını oluşturur [6]. Pre-miRNA çekirdekten si-

toplazmaya Exportin-5 tarafından taşınır ve kırılma işlemleri sitoplazmada bir diğer RNAaz III enzimi olan Dicer ile devam eder. Dicer, RNA'ya bağlanan protein olan TRBP2 ile kompleks oluşturup pre-miRNA'yı endonükleolitik aktivite sonucu keser [7]. Bu işlem sonucu 5' ucunda monofosfat ve 3' ucunda birbirine tamamlayıcı olmayan açık uçlu iki nükleotidli iki zincirli miRNA çifti (miRNA dupleksi) oluşur. miRNA dupleksi oluşmasını takiben miRNA aracılığı ile gen susturma işleminde rol alan Argonaute proteini ile etkileşir [5].

miRNA dupleksi ile Argonaute proteininin etkileşiminin tam olarak doğru konumda olduğu durumda kullanılacak olan miRNA kılavuz (guide) miRNA, diğer zincirdeki miRNA ise yolcu (passenger) miRNA olarak adlandırılır. Kılavuz miRNA komplekste kalırken, yolcu miRNA seçilerek kompleks dışı bırakılır, böylece kılavuz miRNA - Argonaute protein kompleksi mikro RNA aracılı susturma kompleksini (miRISC) oluşturmuş olur. RISC kompleksi bu haliyle hedef mRNA'ya bağlanır ve mRNA'nın translasyona girmesini engelleyerek genin ifade miktarını azaltmış olur. Regüle edilecek mRNA'nın spesifik olarak hedeflenmesi kılavuz miRNA'nın hedef mRNA'ların 3' ucundaki okunmayan bölgelerine (3'-Untranslated Region-UTR) bağlanması ile olmaktadır [1,8].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile insan için 1900'e yakın miRNA tanımlanmıştır [9]. Tanımlanan miRNA'ların abiyotik stres [10], metabolik hastalıklar [11], yara iyileşmesi [12], inflamasyon [13] ve kanser [14] gibi durumlarda miktarının değiştiği gözlenmiştir. miRNA miktarının farklı durumlar için değişim göstermesi biyolojik rollerine işaret ettiği gibi,

çeşitli hastalıklarda erken tanı ve teşhis konulmasında biyo-belirteç olarak kullanılabilirlerinin de önünü açmıştır [15]. Örneğin, kanserin farklı türlerinde miktarı değişen miRNA'ların varlığı gösterilmiş olup bu miRNA'ların ifade düzeyinin modülasyonu ile kanserin gelişiminin engellenmesi hedeflenmekte, buna ek olarak da kanser türlerinde miktarı değişen miRNA'ların biyo-belirteç olarak kullanılması ile kanser tanısını konmasına dönük çalışmalar sürmektedir [16,17]. Hücre bölünmesi, hücre çoğalması ve hücre farklılaşması gibi olayların koordineli bir şekilde gerçekleştiği rejenerasyon sürecinde de miRNA'ların düzenleyici görevler üstlenmiş olması beklenmektedir.

Rejenerasyon, biyolojik olarak hasar gören ya da yok olan uzvun yeniden inşa edilmesi veya üretilmesidir. Rejenerasyonun kusursuz olarak gerçekleşmesi için kök hücreler ve kök hücre benzeri hücrelerin çoğalması gerekmektedir [18]. Rejeneratif büyümenin kontrollü bir biçimde gerçekleşmesi ilk olarak hasar ile uyarılan ölüm yollarının aktivasyonu ile başlar. Hasarın hemen sonrasında ölüm yolları aktive edilerek hasarlı bölge etrafındaki hasara maruz kalmış hücreler yok edilir [19]. Bu aşamayı takiben kök hücre ve kök hücre benzeri hücreleri bulandıran ve rejenerasyonu gerçekleştirecek olan blastema adı verilen rejenerasyona özgü bir doku oluşur [20]. Blastema formu içerdiği farklı hücre popülasyonunun koordinasyonu ile farklılaşma olaylarını gerçekleştirerek rejenere olacak yapının minyatür halini oluşturur. Bu aşamadan sonra oluşan minyatür yapı hasar öncesi boyuta ulaşana kadar büyümeye devam eder [21]. Rejenerasyonun kusursuz bir şekilde sonlanması; geriye farklılaşma (dediferensiyon), hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma (rediferensiyon) ve büyüme sürecinde rol alan JNK, TLR, JAK/STAT, Hippo/YAP, Wnt/ β -catenin sinyal yolları; epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü β (TGFB), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü'nün (PDGF) ifadelerinin düzenlenmesi ile gerçekleşir [22]. Bahsi geçen yolların regüle edilmesinde ve bu yollarda görevli genlerin ifade düzeyinin kontrol edilmesinde miRNA'lar görev alırlar.

Rejenerasyon birçok bitki ve hayvanda gözlenmekle beraber, fonksiyonel restorasyon düzeyi canlılar arasında önemli farklar göstermektedir. Süngerler ve sölenler gibi kimi omurgasız organizmalarda rejenerasyon kapasitesi yüksek olup, bu etkinlik seviyesi omurgalı canlılarda balıklardan memelilere doğru gidildikçe azalmaktadır [20,23]. Memeli canlılarda rejenerasyonun gerçekleşmesi daha çok doku düzeyinde meydana gelirken, amfibi sınıfından olan semenderler yüksek derecede rejenerasyon kapasitesine sahiptirler. Semenderler ampüte olmuş ya da hasara maruz kalmış uzuv ve organlarını yeniden meydana getirebilirler [24]. Bu canlılar arasında en çok bilineni ve çalışılanı sucül bir semender

olan Aksolotl'dur. Yetişkin bireylerin embriyonik gelişimsel döneme benzer özellikler göstermeleri sebebiyle bu canlılar rejenerasyon araştırmaları için elverişli bir model olmaktadır. Bu canlılar uzuvlarını, kalplerini, beyinlerini, omuriliklerini ve diğer iç organlarını yenileyebilmektedirler [20,25]. Aksolotlar ile yapılan çalışmalarda uzuv rejenerasyonuna ek olarak, bağ dokusu, kas dokusu, sinir dokusu ve omurilik gibi kompleks yapıları barındırdığı için kuyruk rejenerasyonu uygun bir model olarak tercih edilmektedir [26,27]. Kuyruk rejenerasyonunda görevli moleküler mekanizmaların anlaşılmasında miRNA'ların görevlerinin anlaşılması da önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, Aksolotl kuyruk rejenerasyonunun farklı evrelerinde rol alan miRNA'lar araştırıldı. Ampütasyon öncesi miRNA profili, ampütasyonu izleyen rejenerasyonun 1., 4. ve 7. günlerindeki miRNA profili ile karşılaştırıldı. Anlamlı farklılık gösteren 124 miRNA'nın ($p < 0.05$) rejenerasyon boyunca üstlenmiş olduğu olası görevler için in-siliko analizler yapıldı. Rejenerasyonun farklı 'an'larında miktarı değişen bu miRNA'lar içinden yalnız bir zaman aralığında veya ortak zaman aralıklarında miktarı değişen miRNA'lar analiz edilerek miRNA profilinin zamana bağlı dinamik yapısı gösterildi. Ayrıca 52 miRNA'nın miktar değişimi 1.5 kattan daha fazla olduğu için daha yakından araştırıldı ve bu miRNA'ların hedeflediği genlerin gruplandığı yollar rejenerasyon ile bağlantılı olarak incelendi.

Gereç ve Yöntem

Hayvan Bakımı, Ampütasyon ve Örnek Toplanması

Araştırmada kullanılan Aksolotllar, Ambystoma Genetic Stock Center'den (AGSC) tedarik edilmiş olup İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde (MEDİTAM) büyütülen canlılardan köken almaktadır. Kullanılan 6-8 aylık 60 Aksolotl için gerekli Yerel Etik Kurul izni alınmıştır (Ek no: E.2303). Aksolotllar 18°C ile 20°C arası sıcaklıkta her iki günde bir pellet yem (JBL novolotl) verilecek şekilde canlılar için en uygun sıvı ortam koşulu olan Holtfreter solüsyonlu akvaryumlarda beslendi. Aksolotllar cerrahi operasyon öncesi %0.1 Benzocaine (E1501_SIGMA) solüsyonu içinde anesteziye alındı. Kuyruk rejenerasyonunu sağlayacak olan blastemanın ampütasyon sonrası 0. gün, 1. gün, 4. gün ve 7. gün örneği alındı. Örnek alma işlemi Aksolotlların kloak kısmına yakın kuyruk kısmından ampüte edilen bölge/toplam boy oranı 1/5 olacak şekilde bisturi kullanılarak yapıldı. Blastema örnekleri her gün aynı bölgeden olacak şekilde ampütasyon yerinden proksimal kısma doğru yaklaşık 500 mikron kalınlıkta toplandı. Toplanan blastema örnekleri sıvı nitrojenle donduruldu. Toplanan blastema örnekleri her

gün için 3 gruba ayrıldı, her grup 5'er hayvandan örnekleri içerecek şekilde oluşturuldu.

RNA İzolasyonu ve Örneklerin Sekanslanması

Aksolotl kuyruk blastema örnek gruplarından TRIzol ayırıcı (Invitrogen-Cat No: 15596026) kullanılarak ticari firmanın önerdiği protokole uygun şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Örnek gruplarının üzerine 1ml TRIzol ayırıcı eklendi ve örnekler homojenizatör ile homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası elde edilen lizat 12000 g 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant yeni tüpe alındı. Sonrasında nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrılması için 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Örneklerin üzerine lizis için 200 µl kloroform (Sigma Aldrich-c2432) eklendi ve örnekler 3 dakika inkübe edildi. Blastema örneklerinin lizatları 12000 g 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan 3 fazdan RNA'ları içeren üst faz yeni tüp içerisine alındı ve RNA izolasyon basamağına geçildi. RNA içeren faz üzerine 500 µl 2-propanol (Sigma Aldrich - 278475) eklendi ve 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 12000 g 4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası elde edilen total RNA pelletine zarar verilmeden süpernatant alındı. RNA'ları içeren pellet %75'lik etanol ile çözüldü. Solüsyonlar 15 saniye vorteks ile karıştırılıp 7500 g 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet 5 dakikalığına kurumaya bırakıldı. Pellet 20 µl nükleaz içermeyen su ile çözüldü. İzolasyon sonrası elde edilen RNA'ların konsantrasyonu *qubit assay* ile ölçüldü. Ölçümlerde 100 ng/µl üzeri konsantrasyon elde edildi. Ters transkripsiyon aşaması için 1-10 ng/µl miRNA kullanıldı. Ters transkripsiyon aşaması, PCR aşaması ve sekanslama aşaması ticari firmanın protokolüne (SMARTer smRNA-Seq Kit for Illumina) uygun olarak gerçekleştirildi. miRNA kütüphanesi oluşturmak için ilk önce örnekler 0.25 µl Poly-A, 0.25 µl RNAaz inhibitörü, 2.5 µl smRNA mix 1 ve 1 µl ATP eklendi ve 16 °C'de 5 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrası her örneğe 1'er µl 3 uçlu small RNA dT

primer eklendi. 6.5 µl smRNA mix 2, 0.5 µl RNAaz inhibitörü ve 2 µl primescriptRT kullanılarak master mix hazırlandı. Ters transkripsiyon aşaması 42 °C'de 60 dakika, 72 °C'de 10 dakika sıcaklık döngülerinde gerçekleştirildi. 24 µl Nuclease-Free Water, 50 µl 2X SeqAmp PCR Buffer ve 2 µl SeqAmp DNA Polymerase kullanılarak PCR aşaması için master mix hazırlandı. PCR reaksiyonu ilk olarak 98 °C'de 1 dakika ve sonrasında 17 döngü olacak şekilde 98 °C'de 10 saniye ve 60 °C'de 5 saniyede sıcaklık aralıklarında gerçekleştirildi. Elde edilen miRNA'lar Illumina MiSeq desktop sequencer ile sekanslandı.

miRNA'ların Bulunması ve Fonksiyonlarının İn-Siliko Analizi

Sekanslama sonuçları CLC Workbench programında işlenerek miRBase veritabanındaki 9 dizilere karşılık gelen miRNA'lar bulundu. 0., 1., 4. ve 7. gün olmak üzere her gruba ait veriler ayrı ayrı olacak şekilde elde edildi. Elde edilen miRNA'lar Venn diyagramda (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) farklı günlerde veya sadece o güne özgü ifade edilen miRNA'lar olarak gruplandırıldı. miRNA'ların hedeflediği genlerin tespiti için miRPathV3 [28] kullanılarak hedef genler Tarbase [29], TargetScanHuman 7.1 [30] ve microT-CDS [31] veri tabanlarında arandı. Bir sonraki basamak olarak miRNA'ların öbeklendiği yollar miRPathV3 aracılığı ile KEGG yolak veri tabanında [32] bulundu ve miktarı değişen yollar bir sıcaklık haritasında (heatmap) gösterildi.

Bulgular

miRNA'ların Tespiti ve Karakterizasyonu

Yeni nesil dizileme yöntemi ile Aksolotl örneklerinden ampütasyon öncesi (0. gün) ve rejenerasyonun 1., 4. ve 7. günü için miRNA profillemesi yapıldı. Sekanslama sonuçları miRNA veri bankası olan miRBase 9 ile karşılaştırılıp 0. güne göre

Tablo 1. Miktarı 1.5 kat ve üzeri değişen miRNA'lar

Ampütasyon Öncesine Göre Değişim	miRNA Listesi
Miktarı artan insan miRNA ortologları	mir-4485, mir-1285a, mir-4512-1, mir-3690-2, mir-3686, mir-1307, mir-566, mir-548b, mir-7851, mir-517c, mir-8075, mir-3689c, mir-320b-1, mir-548i-3, mir-8485, mir-601
Miktarı azalan insan miRNA ortologları	mir-3689a//mir-3689b, mir-3689a//mir-3689f, mir-941-1, mir-3689d-2, mir-3677, mir-3960, mir-1268b, mir-941-1//mir-941-2//mir-941-3, mir-548i-1//mir-548i-2, mir-1285-1, mir-3689e, mir-3689b, mir-1273a, mir-450a-1, mir-3689a, mir-619, mir-8072, mir-1302, mir-1299, mir-5095, mir-5096, mir-7641-2, mir-7641-1, mir-7641, mir-1973, mir-6087, mir-7641-1//mir-7641-2 mir-3156-2, mir-3939, mir-4294, mir-4440, mir-4792, mir-500b, mir-616, mir-630, mir-941-2//mir-941-3, mir-9462

miktarı 1., 4. ve ya 7. günde anlamlı olarak değişen ($p<0.05$) 124 miRNA bulundu. Bu miRNA'lar içinden ampütasyon öncesi ile karşılaştırıldığında 1., 4. veya 7. günde 1.5 kattan daha fazla değişim gösteren (artan veya azalan) 52 miRNA tespit edildi (Tablo 1). Bu miRNA'lar arasında ampütasyon öncesine göre 7. günde en büyük artışı mir-601, mir-8485 ve mir-548i-3'in gösterdiği bulundu (Tablo 1). Rejenerasyonun 7. gününde ampütasyon öncesine göre miktarı en çok düşen miRNA'ların ise mir-3689 ailesinin üyelerinin (mir-3689a, mir-3689b ve mir-3689f) olduğu görüldü (Tablo 1).

Rejenerasyonun Farklı Evrelerinde Miktarı Değişen Mirna'ların Tespiti

Bir sonraki adımda, ampütasyon öncesine göre miktarı artan miRNA'ların 1., 4. ve 7. günde ortak olup olmadıkları araştırıldı. Her zaman aralığındaki miRNA'lar birbirleriyle kıyaslandı ve farklı zaman dilimlerinde miktarı artan miRNA'lar Venn diyagramında gösterildi (Şekil 1).

Bu karşılaştırmaya göre miRNA'ların yaklaşık %43'ü her üç zaman aralığında da (1., 4. ve 7. günde) ortak olarak ampütasyon öncesine göre artma eğilimi gösterdi (Şekil 1). 1. ve 4. günde ampütasyon öncesine göre miktarı artan ortak miRNA'ların oranının %2, 1. ve 7. günde %12, 4. ve 7. günde ise %3 olduğu bulundu (Şekil 1). Karakterize edilmiş miRNA'ların %40'ünün ise yalnızca 1. gün, yalnızca 4. gün veya yalnızca 7. günde artış gösterdiği görüldü (Şekil 1). Venn diyagramında oranları gösterilmiş miRNA'ların listesi Tablo 2'de verilmiştir.

Aynı testler ampütasyon öncesine göre rejenerasyonun 1., 4. veya 7. gününde miktarı azalan miRNA'lar için de yapıldı (Şekil 2).

Analizlerin sonuçlarına göre ampütasyon öncesi ile kıyaslandığında miktarı azalan miRNA'ların %10'u 1., 4. ve 7. günde ortak olarak azaldı (Şekil 2). 1. ve 4. günde ampütasyon öncesine göre miktarı azalan ortak miRNA'ların oranı-

Tablo 2. Miktarı artış gösteren miRNA'ların zamansal analizi

miRNA'ların Arttığı Zaman Aralıkları	miRNA İsimleri
1.,4. ve 7. günlerde ortak olarak artan	mir-601, mir-601, mir-8485, mir-3141, mir-548i-3, mir-320b-1, mir-368c, mir-8075, MIR7768b, mir-706, mir-6720, MIR2602b, MIR1171, mir-517,c mir-665, mir-2966, mir-7851, mir-703, MIR156e, MIR2112, mir-1307, mir-281, mir-3069, mir-3686, mir-548b, mir-566, mir-6651
1. ve 4. günlerde ortak olarak artan	mir-8072
1. ve 7. günlerde ortak olarak artan	mir-1434, mir-4332, mir-8934-1, MIR2106, MIR6423, mir-9123, mir-4512-1
4. ve 7. günlerde ortak olarak artan	mir-3690-2, mir-9277
Yalnızca 1.günde artan	mir-7641-1, MIR2916, mir-1973, mir-6240, mir-6087, MIR5144, mir-2892, mir-2887-2, mir-3535, mir-6497, mir-2152, MIR164f
Yalnızca 4.günde artan	MIR396c, mir-5096, mir-2137, mir-5095, mir-3689a, mir-619, mir-1299, mir-941-4
Yalnızca 7.günde artan	mir-4485, MIR5645d, mir-1599, mir-1285a

Tablo 3. Miktarı azalış gösteren miRNA'ların zamansal analizi

miRNA'ların Azaldığı Zaman Aralıkları	miRNA İsimleri
1.,4. ve 7. günlerde ortak olarak azalan	mir-1273a, MIR8598, mir-8915, mir-6236, mir-2904, mir-7641-3, mir-1285, mir-7641-2, mir-1285-1, mir-7641
1. ve 4. günlerde ortak olarak azalan	mir-1599, mir-4485, mir-1285a, MIR5645d
1. ve 7. günlerde ortak olarak azalan	mir-5096, MIR396c, mir-3689a, mir-3689e, mir-450a-1, mir-619, mir-3689b, mir-941-2, mir-2137, mir-5095, mir-1299, mir-548i, mir-1302
4. ve 7. günlerde ortak olarak azalan	mir-1973, MIR5144, mir-6240, mir-2892, mir-2152, mir-6087, mir-7641-1, mir-6497, MIR2916, mir-2887, mir-3535, MIR164f, mir-235, MIR164f//MIR5144
Yalnızca 1.günde azalan	mir-3690-1, MIR169a, MIR6173, mir-1273, mir-1777a, mir-3156, mir-409a, mir-630, MIR408, mir-524, mir-7174, mir-9256a, mir-941-3, mir-9328, mir-9462, mir-4294, MIR7779, MIR5654a//MIR5654b, mir-9252, MIR8665, MIR482d, mir-3939, mir-616, MIR2608, mir-9323, mir-4440, mir-9277
Yalnızca 4.günde azalan	mir-4332, mir-1434, MIR2106, MIR6423, mir-9123, mir-8934-1, mir-7105, MIR2641, mir-4792, mir-738, mir-6964, MIR482c, mir-42,9 mir-500b, mir-4512, mir-234, MIR156h, MIR159a, MIR8626
Yalnızca 7.günde azalan	mir-8072, mir-1268b, mir-3960, mir-3677, mir-2889, mir-3689d-2, mir-941-1, MIR1524, mir-3689a//mir-3689f, mir-3689a//mir-3689b

nın %4, 1. ve 7. günde %13, 4. ve 7. günde ise %14 olduğu bulundu (Şekil 2). Yalnızca tek bir rejenerasyon zaman aralığında miktarı değişen miRNA'ların oransal dağılımı; yalnızca 1. gün %27, yalnızca 4. gün %19 ve yalnızca 7. gün %10 olarak bulundu. Venn diyagramında oransal dağılımı gösterilen miRNA'ların isimleri Tablo 3'de listelenmiştir.

Miktarı Değişen miRNA'ların Görev Aldığı Yolakların Bulunması

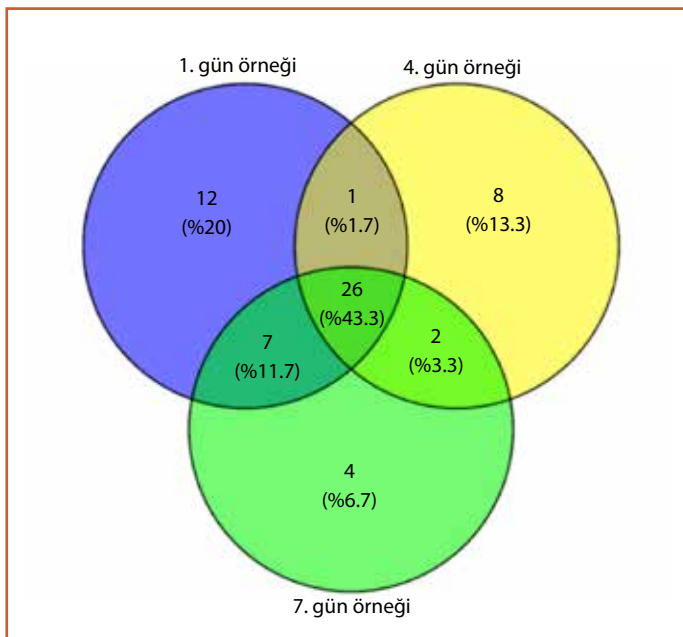
Çalışmanın bir diğer adımı olarak rejenerasyonun 7. gününde ampütasyon öncesine göre miktarı anlamlı olarak artan ve azalan miRNA'ların hedef genleri Tarbase, Targetscan ve microT-CDS veri tabanları kullanılarak arandı. miRNA'lar tarafından hedeflenen genlerden yola çıkılarak miRNA'ların ilişkili olduğu yolaklar analiz edildi. Rejenerasyonun 7. gününde miktarı artan miRNA'ların rol aldığı yolaklar içinde Hippo ve fosfoinositol sinyalleşme yolakları, yağ asidi anabolizma yolağı, RNA katabolizması yolakları, glikozaminoglikan yıkım yolağı, amino asit metabolizması yolağı ve kalsiyum geri emilimi yolağı gibi homeostazda önemli görevlere sahip yolaklar olduğu görüldü (Şekil 3). Ayrıca aminoasit metabolizması, diğer glikan biyosentezi ve endositoz yolaklarının da rejenerasyonun 7. gününde miktarı artan miRNA'lar ile ilişkili yolaklar olduğu bulundu (Şekil 3). Aynı şekilde, ampütasyon öncesine göre rejenerasyonun 7. gününde miktarı anlamlı olarak azalan miRNA'ların hedef genleri araştırıldı. Miktarı azalan miRNA'ların hedef genlerinin gruplandığı yolaklar analiz edildi (Şekil 4). Bu yolaklar

içinde kanser yolakları, sinyalleşme yolakları, inflamasyonun aktifleştirdiği viral yolaklar ile hücre döngüsü ve ölümü yolakları dikkate değer yolaklar olarak bulundu (Şekil 4).

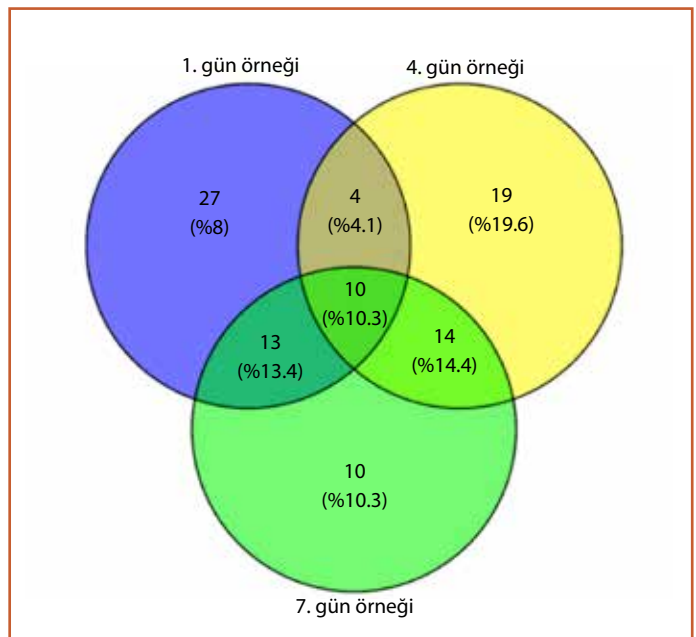
Tartışma

Rejenerasyon canlıda oluşan bir hasar sonrası fonksiyonel restorasyon sürecine verilen isimdir [33]. Canlılar farklı yenilenme kapasitesine sahip olmakla beraber, omurgalılarda yenilenme kapasitesi çoğunlukla doku düzeyinde görülmektedir [34]. İstisnai yenilenme kapasitesi ile amfibi sınıftan olan Aksolotl, rejenerasyon çalışmaları için uygun bir model sistemdir. Aksolotl iç organlarını, sinir sistemini ve ekstremiteler rejenerasyonunu başarı ile gerçekleştirebilmektedir. Aksolotl kuyruk uzvu hasarlarında, epitel doku, bağ dokusu, kas dokusu ve sinir dokusunu (omurilik) onarabilmekte ve bu iyileşme sonrasında fonksiyon kaybı yaşamamaktadır [35]. Fonksiyonel restorasyon, her basamağında kontrol ve regülasyonun görüldüğü kompleks bir süreçtir. Regülatif mekanizmalardan biri de, yazılım sonrası gen ifadesini kontrol eden miRNA'lar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir [36].

Bu çalışmada, Aksolotl'un kuyruk bölgesi omuriliği de içerecek şekilde kesilmiş ve rejenerasyonun farklı evrelerinde toplanan örneklerde değişen miRNA profiline bakılmıştır. Yeni nesil dizileme sonucunda $p < 0.05$ güven aralığında bulunan miRNA'lar miRBase veri tabanında aranmış ve 124 miRNA tanımlanabilmektedir. Dizileme sonucunda miRBase veri tabanında tanımlanamayan RNA sekanslarının varlığı



Şekil 1. Ampütasyon sonrasında (0. güne) göre miktar artışı gösteren miRNA'lar.



Şekil 2. Ampütasyon sonrasında (0. güne) göre miktar azalışı gösteren miRNA'lar.

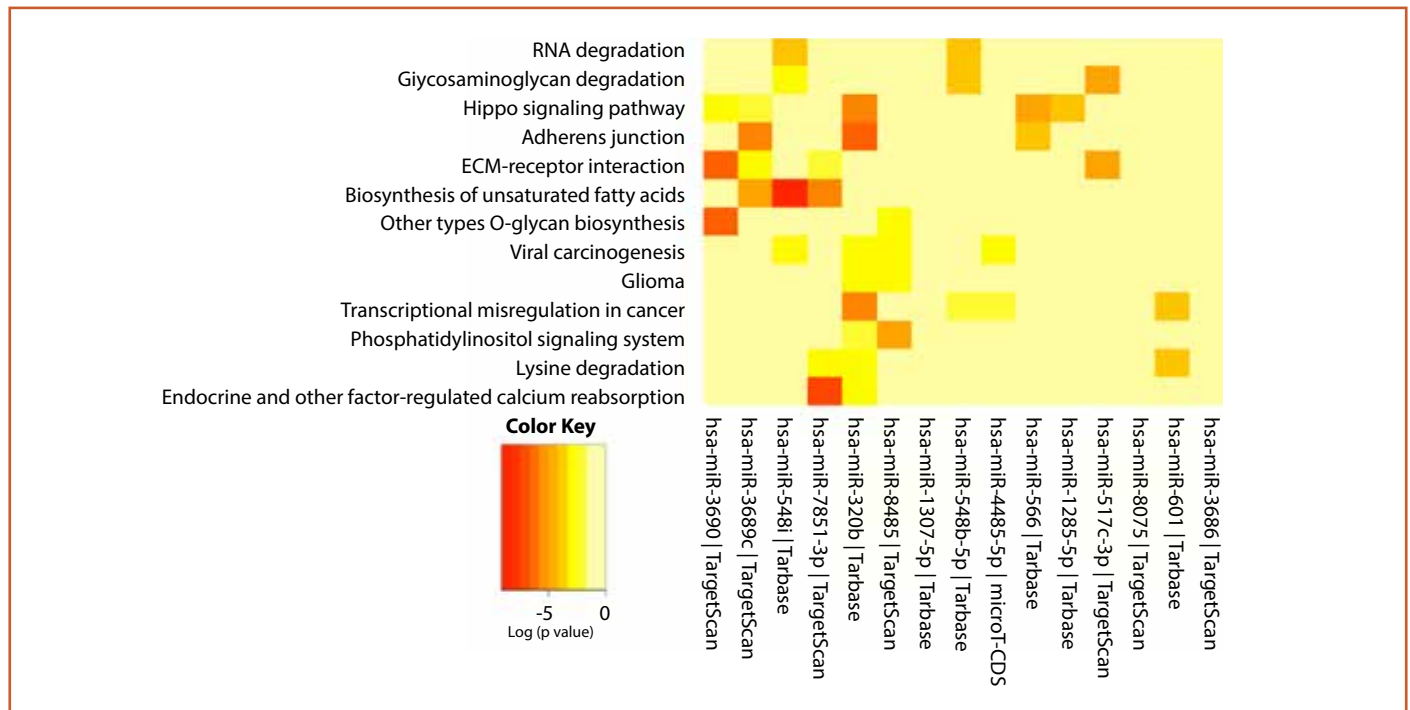
nın iki olası nedeni şunlardır: Aksolotl'a özgü miRNA'ların geniş bir karakterizasyonu henüz yapılamadığı için veri tabanları Aksolotl miRNA'larını kapsayıcı bir şekilde içermektedir, bu sebeple de dizileme sonucunda elde ettiğimiz kimi Aksolotl miRNA'ları henüz tanımlanmamış olabilir. Bir diğer ikna edici olasılık da miRNA dışındaki küçük RNA ailesinin başka elemanlarının da (örneğin Piwi ile etkileşen RNA'lar- piRNA'lar) dizilenmiş olabileceği ve bu küçük RNA grubu elemanlarının miRNA veri tabanında herhangi bir karşılığının olmamasıdır.

Rejenerasyonun ilk aşamalarında (1., 4. ve 7. gün) alınan örnekler 0. gün örneği ile kıyaslanmış ve 124 miRNA arasında 1.5 kattan büyük değişim gösterenler Şekil 1'de gösterilmiştir. Artış gösteren miRNA'lar arasında en dikkat çekenler mir-601, mir-8485 ve mir-548i-3 dür. mir-8485'in NRXN1 genini regüle etmesiyle sinir sistemi gelişimi negatif yönde etkilenmektedir [37]. Rejenerasyonun ilk aşamalarında tersine farklılaşma görüldüğü için farklılaşmış hücreler kök hücreye dönerler. Bu süreçte artan mir-8485 miktarının sinir sistemi farklılaşmasını baskıladığı düşünülebilir. mir-601'in hücre bölünmesini bir çok kanser türünde miktarının arttığı ve kanser dokularında biriktiği gösterilmiştir [38,39]. mir-548i görevleri tam anlaşılmayan miRNA'lardan olmakla beraber embriyonik kök hücrelerde tespit edilmiştir [40]. Rejenerasyon sürecinde oluşan blastema dokusu kök hücre aktivitesinin yoğun olarak görüldüğü bir bölgedir ve hücre

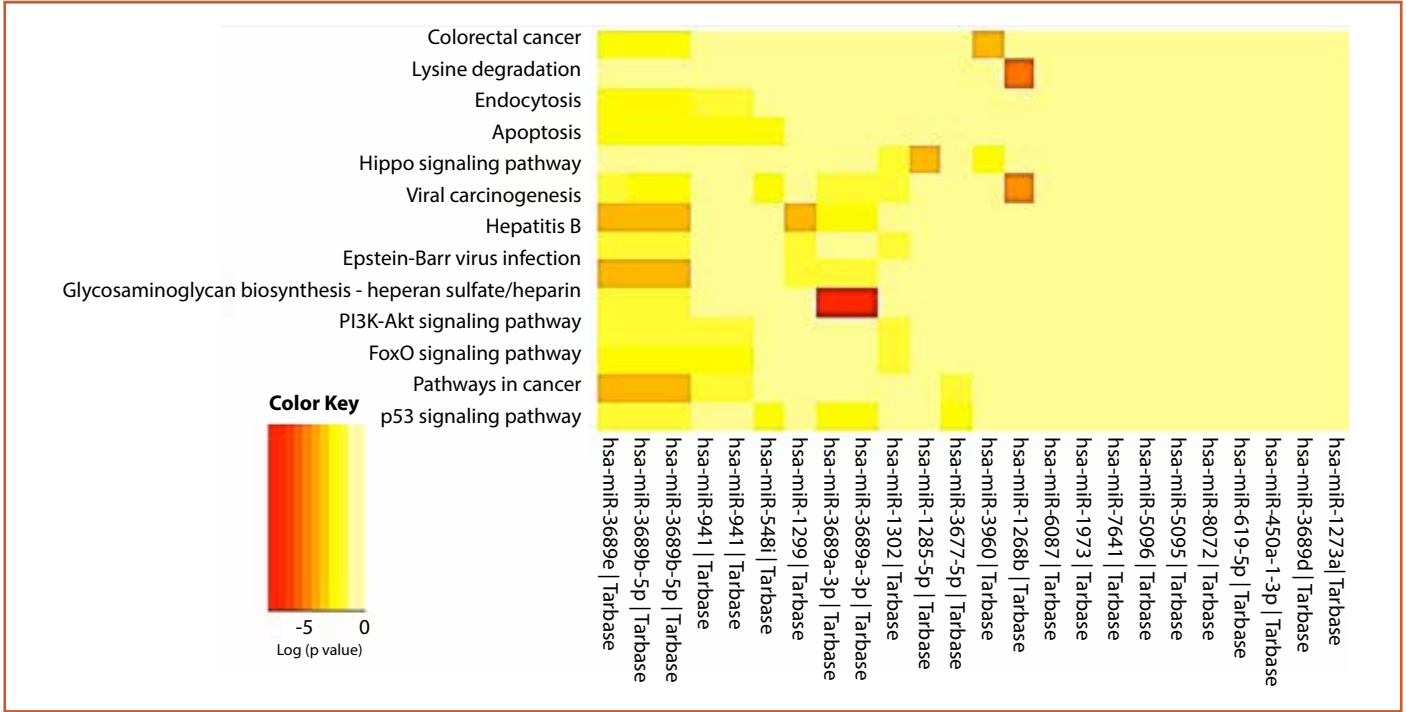
bölünmesini pozitif yönde etkileyen mir-601'in ve embriyonik kök hücrelerde bulunan mir-548i'nin miktarının artması yenilenmeyi pozitif yönde etkiler.

Rejenerasyon sürecinde miktarı azalan miRNA'lar içinde en büyük değişimi mir-3689 ailesinin üyeleri göstermiştir (mir-3689a, mir-3689b ve mir-3689f). Bu ailenin üyelerinin memelilerde ne görevler üstlendiği henüz tam olarak bilinmemektedir [41]. In siliko analizler, mir-3689'in SMAD2 ve SMAD3 RNA'larını hedefleyerek TGFβ yolağı üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir [42]. Aksolotl uzuv rejenerasyonunda TGFβ sinyal yolağının aktivitesinin artıyor olması [43], bulgularımızda mir-3689'in miktarının azalmış olmasının Aksolotl kuyruk rejenerasyonu için önemini açıklamaya yardımcı olmaktadır. SMAD2 ve SMAD3 RNA'larının mir-3689 tarafından regüle edilmeyecek olması ile, rejenerasyon sürecinde TGFβ sinyal yolağı aktif tutulacak, böylece yenilenme sürecinin başarıyla sonuçlanması mümkün olacaktır.

miRNA'ların bir dokuda tespit edilen miktarı dinamik olup biyolojik bir sürecin farklı evrelerinde değişiklik gösterebilmektedir [44]. Değişen miRNA miktarı ile gen ifadesinin yazılım sonrası kontrolü arasında doğrudan bir ilişki olduğu göz önüne alındığında, rejenerasyonun farklı günlerinde miktarı değişen miRNA'ların nasıl bir yönelim izlediğini anlamak için bu evrelerde ortak olan ve olmayan miRNA'lar listelenmiştir. Yapılan analizlere göre ampütasyon öncesi duruma göre artış gösteren miRNA'ların yalnızca %40'ı her



Şekil 3. Miktarı artan miRNA'ların etkilediği moleküler yollar.



Şekil 4. Miktarı artan miRNA'ların etkilediği moleküler yollar.

üç zaman dilimi için (1., 4. ve 7. gün) artış göstermiştir. Her üç örnek grubunda ortak olarak mir-601, mir-8485 ve mir-5481-3'ün bulunması ampütasyondan hemen sonra dediferensiyon ve hücre bölünmesi aktivitelerinin başladığını ve 7. günde de bu aktivitelerin devam ettiğini göstermektedir. Azalma gösteren miRNA'ların yalnızca %10'u her üç örnek grubunda azalmıştır. Ortak olarak azalış gösteren miRNA'ların sınırlı bir grubu oluşturması rejenerasyonun farklı evrelerine spesifik miRNA'ların kendi zaman aralığında ifadesinin değiştiğini anlatır. Tek bir zaman dilimine (1. veya 4. veya 7. gün) bakıldığında, azalış veya artış gösteren miRNA'ların büyük çoğunluğunun rejenerasyonun ilk gününde olduğu bulunmuştur. Bu durum miRNA'ların dinamik bir ifade motifi olduğunu ve ampütasyona cevap olarak miRNA'ların miktarının rejenerasyonun ilk gününde hızlıca değiştiğini göstermesi açısından çarpıcıdır.

miRNA'ların hedeflediği genlerin gruplandığı yolların bulunması miRNA'ların olası rolleri hakkında bize fikir vermektedir. miRNA'ların miktarının artması ile hedefledikleri genler negatif olarak regüle edilecek, dolayısıyla bu genlerin gruplandığı yollar da negatif olarak regüle edilmiş olacaktır. Yaptığımız analizler sonucunda rejenerasyon ile birlikte miktarı artan miRNA'ların hedeflediği genler Hippo ve fosfoinositol sinyalleşme yolları, yağ asidi anabolizma yolağı, RNA katabolizması yolları, glikozaminoglikan yıkım yolağı, amino asit metabolizması yolağı ve kalsiyum geri emilimi yolağı gibi yollarda görevli genlerdir. Hippo yolağı gibi hücre bölünmesini yavaşlatan yolların negatif

regüle edilmesi ile hücre bölünmesini yavaşlatacak moleküler mekanizmaların aktivitesinin düşürüldüğü görülmüştür. Rejenerasyon ile birlikte azalma gösteren miRNA'ların hedef genleri daha aktif translasyona girebilecektir. Bu genlerin öbeklendiği yollar da bu sayede daha aktif çalışacaktır. Yapılan analizlere göre kanser yolları, sinyalleşme yolları, inflamasyonun aktifleştiği viral yollar ile hücre döngüsü ve ölümü yolları azalan miRNA profiline uygun şekilde aktivitesi artan yollar olarak öne çıkmaktadır. Rejenerasyonun başarısı için hücre bölünmesini tetikleyecek kanser yollarının aktivitesinin artması anlamlı bir bulgudur. Yine ampütasyon ile beraber başlayan inflamasyon süreci de değişen yollar içinde bulunmuştur. Bu analizler ışığında miRNA'lar tarafından hedeflenen genlerin görev aldıkları yolların, rejenerasyon sürecinde miktarı değişen miRNA'lar aracılığı ile regüle edildiği düşünülmektedir.

Sonuç

miRNA'ların hücre ve canlıların homeostaz, gelişim, büyüme ve hastalık durumunda regüle edici rolleri olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Rejenerasyonda profili değişen miRNA'ların bulunması ve karakterize edilmesi fonksiyonel restorasyon sürecinin daha iyi anlaşılmasına ve bu sürecin kontrol edilebilmesine olanak tanıyacaktır. Bu çalışmada, yenilenme kapasitesi yüksek su semenderi Aksolotl'un kuyruk rejenerasyonunda miktarı artan ve azalan miRNA'larının profili çıkarılmıştır. Ayrıca bu miRNA'ların hedefledikleri olan genlerin öbeklendiği yollar araştırılmış ve bu yollar

ile rejenerasyon arasındaki bağ gösterilmiştir. Bu çalışmada bulunan miRNA'ların, rejenerasyonun daha iyi anlaşılmasına katkı koyacağını düşünmekteyiz.

Etik Kurul Onayı: Etik kurul onayı alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Bildirilmemiştir.

Yazarlık Katkıları: Konsept: T.D., Dizayn: T.D., M.E.A., G.Ö., Veri Toplama veya İşleme: T.D., M.E.A., İ.K., Analiz veya Yorumlama: T.D., G.Ö., Literatür Arama: T.D., M.E.A., İ.K., Yazan: T.D., M.E.A.

Kaynaklar

- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–33.
- Hubé F, Ulveling D, Sureau A, Forveille S, Francastel C. Short intron-derived ncRNAs. *Nucleic Acids Res* 2017;45:4768–81.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051–60.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:1097–101.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006;125:887–901.
- Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:376–85.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350–5.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D68–73.
- Gao X, Zhang F, Hu J, Cai W, Shan G, Dai D, et al. MicroRNAs modulate adaption to multiple abiotic stresses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci Rep* 2016;6:38228.
- Meydan C, Shenhar-Tsarfaty S, Soreq H. MicroRNA Regulators of Anxiety and Metabolic Disorders. *Trends Mol Med* 2016;22:798–812.
- Sen CK, Ghatak S. miRNA control of tissue repair and regeneration. *Am J Pathol* 2015;185:2629–40.
- Lee HM, Kim TS, Jo EK. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Rep* 2016;49:311–8.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259–69.
- Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:467–77.
- Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 2006;20:2202–7.
- Gurtner A, Falcone E, Garibaldi F, Piaggio G. Dysregulation of microRNA biogenesis in cancer: the impact of mutant p53 on Drosha complex activity. *J Exp Clin Cancer Res* 2016;35:45.
- Carlson BM. Principles of Regenerative Biology. 1st ed. Academic Press; 2007.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008 May;453:314–21.
- Tanaka EM, Reddien PW. The cellular basis for animal regeneration. *Dev Cell* 2011;21:172–85.
- Brockes JP, Kumar A. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008;24:525–49.
- Sun G, Irvine KD. Control of growth during regeneration. *Curr Top Dev Biol* 2014;108:95–120.
- Sánchez Alvarado A. Regeneration and the need for simpler model organisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004;359:759–63.
- Simon A, Tanaka EM. Limb regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2013;2:291–300.
- Roy S, Gatién S. Regeneration in axolotls: a model to aim for! *Exp Gerontol* 2008;43:968–73.
- Gearhart MD, Erickson JR, Walsh A, Echeverri K. Identification of Conserved and Novel MicroRNAs during Tail Regeneration in the Mexican Axolotl. *Int J Mol Sci* 2015;16:22046–61.
- Demircan T, Keskin I, Dumlu SN, Aytürk N, Avşaroğlu ME, Akgün E, et al. Detailed tail proteomic analysis of axolotl (*Ambystoma mexicanum*) using an mRNA-seq reference database. *Proteomics* 2017;17.
- Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res* 2015;43:W460–6.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007;27:91–105.
- Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 2015;4.
- Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res* 2013;41:W169–73.
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 2017;45:D353–61.
- Galliot B, Crescenzi M, Jacinto A, Tajbakhsh S. Trends in tissue repair and regeneration. *Development* 2017;144:357–64.
- Tanaka EM. Regeneration: if they can do it, why can't we? *Cell* 2003;113:559–62.
- McCusker C, Gardiner DM. The axolotl model for regeneration and aging research: a mini-review. *Gerontology* 2011;57:565–71.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;9:102–14.
- Fan Z, Chen X, Chen R. Transcriptome-wide analysis of TDP-43 binding small RNAs identifies miR-NID1 (miR-8485), a novel miRNA that represses NRXN1 expression. *Genomics*

- 2014;103:76–82.
38. Wang Q, Huang Z, Ni S, Xiao X, Xu Q, Wang L, et al. Plasma miR-601 and miR-760 are novel biomarkers for the early detection of colorectal cancer. *PLoS One* 2012;7:e44398.
39. Yang M, Liu R, Sheng J, Liao J, Wang Y, Pan E, et al. Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2013;29:169–76.
40. Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res* 2008;18:610–21.
41. Guerra-Assunção JA, Enright AJ. Large-scale analysis of microRNA evolution. *BMC Genomics* 2012;13:218.
42. Jima DD, Zhang J, Jacobs C, Richards KL, Dunphy CH, Choi WW, et al; Hematologic Malignancies Research Consortium. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood* 2010;116:e118–27.
43. Lévesque M, Gatién S, Finnson K, Desmeules S, Villiard E, Pilote M, et al. Transforming growth factor: beta signaling is essential for limb regeneration in axolotls. *PLoS One* 2007;2:e1227.
44. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834–8.