

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**miR-124'ün BEYİN GELİŞİMİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan  
Keziban KORKMAZ BAYRAMOV**

**Danışman  
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

**Doktora Tezi**

**Mart 2019  
KAYSERİ**

**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**miR-124'ün BEYİN GELİŞİMİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**(Doktora Tezi)**

**Hazırlayan**

**Keziban KORKMAZ BAYRAMOV**

**Danışman**

**Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

**Bu tez, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi**  
**tarafından TDK-2017-7371 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Mart 2019**

**KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Keziban KORKMAZ BAYRAMOV

İmza:

**YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

“miR-124’ün Beyin Gelişimi Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması ” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Keziban KORKMAZ BAYRAMOV

İmza

Danışman

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

İmza

Genetik Ana Bilim Dalı Başkanı

**Prof. Dr. Munis DÜNDAR**

İmza

**KABUL ONAY SAYFASI**

**Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL** danışmanlığında **Keziban KORKMAZ BAYRAMOV** tarafından hazırlanan “miR-124’ün Beyin Gelişimi Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması” adlı bu çalışma jürimiz tarafından **Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

14/03/2019

**JÜRİ:**

Danışman : Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL  
Üye : Prof. Dr. Çetin SAATÇI  
Üye : Prof. Dr. Sibel KARAÜZÜM  
Üye : Doç. Dr. Serpil TAHERİ  
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Zuhal ALTINTAŞ

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

14/03/2019

**Prof. Dr. Bilal AKYÜZ**

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocalarım özellikle tez danışmanım Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL, Prof. Dr. Munis DÜNDAR ve Prof. Dr. Çetin SAATÇİ'ye,

Konu ile ilgili bilgisini, tecrübelerini paylaşan ve araştırmacı ruhu aşıl原因an çok kıymetli hocam Prof. Dr. Minoo RASSOULZADEGAN'a,

Doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Serpil TAHERİ'ye, Doç. Dr. Zuhale HAMURCU'ya ve Doç. Dr. Elif Funda ŞENER'e,

Laboratuvar çalışmalarımda destekleri olan Moleküler Biyolog Zeynep YILMAZ'a, Biyomühendis Ecmel MEHMETBEYOĞLU'na, Uzm. Bio. Esra TUFAN ve Uzm. Bio. Fatma AYBUĞA'ya, Bio. Selda TAŞDEMİR'e, Fare Bakım Teknikeri Celalettin GÖKTEŞ'a ve Stajyer Mehmet MEMİŞ'e,

Beni bu kariyer yoluna yönlendiren öğretmenlerime,

Eğitim hayatım boyunca kaygı dolu yüreğine rağmen beni destekleyen canım ANNEME, sevgi ve güvenini bakışlarında hissettiğim, bugünümü göremeyen BABAANNEME, kardeşlik duygusunun önemini tüm sıcaklığıyla yüreğimde hissettiren KARDEŞLERİME,

Gurur duyacağı bugünümü görmek kısmet olmayan, iyi insan olmanın önemini aşıl原因an yüreği merhamet dolu canım BABAMA,

Tez yazım sürecimde çok ihmal ettiğim, ilham kaynağım biricik kızım MİNOO'ya ve bu süreçte kızıma ikinci aile olan AKYEL ailesine,

Her zaman yanımda olan, bıkmadan usanmadan bu araştırmanın istatistiksel analiz çalışmalarına çok büyük emek veren sevgili eşim Uzm. Dr. Ruslan BAYRAMOV'a

Sonsuz teşekkür ederim.

# miR-124'ün BEYİN GELİŞİMİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Keziban KORKMAZ BAYRAMOV**

**Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Doktora Tezi, Mart 2019**

**Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

## ÖZET

Memeli vücudunun büyüklüğünü doğum öncesi ve doğum sonrası dönemlerde farklı şekillerde düzenlenen genetik ve epigenetik mekanizmalar belirlemektedir. miR-124 hem gelişmekte olan hem de olgun beyindeki pronöronal rolü ile iyi tanınan ve beyinde, özellikle de hipokampusta bol bulunarak belirli genlerin ifadesini doğrudan etkileyebilen epigenetik bir faktördür. Evrimsel süreçte dizisinin ve ekspresyon paterninin korunmuş olması Merkezi Sinir Sistemi (MSS) gelişiminde kritik öneme sahip olduğuna işaret etse de miR-124'ün nöronal gelişimdeki rolü tam olarak açıklanamamaktadır.

Çalışmamızda Balb/c ırkı farelerin postnatal çalışma kapsamında miR-124-3p mikroenjeksiyonu sonucunda (miR-124\*) dünyaya gelen yavruların 120 gün boyunca haftalık yem tüketimleri ve kilo takipleri yapılmış, 2 aylık olduklarında açık alan, delikli tahta, yeni nesne tanıma, Y labirent, kuyruktan asma, sosyal alan, bilye gömme ve koku deneyi gibi davranış deneyleri uygulanmıştır. Prenatal çalışma kapsamında ise 19,5 günlük embriyodan hipokampus çıkarılıp hem RNA izole edilmiş hem de kültürü yapıp Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) uygulanan (EGF(+)) ve uygulanmayan (EGF(-)) gruplara ayrılarak NS (NS) elde edilmiştir. NS'in sayı ve alan ölçümleri yapıldıktan sonra RNA izole edilmiştir. Böylece hem hipokampus hem de EGF (+) ve EGF (-) NS'de *Sox8*, *Sox9*, *Sox10*, *Dcx* ve *Neurod1* mRNA ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

*Sox8* ekspresyonu hipokampusta miR-124\* dişilerde arttığı miR-124\* erkekte ise azaldığı saptanırken, miR-124\* erkeğin NS'inde EGF (-) iken artmış ancak EGF (+) iken değişmediği saptanmıştır. *Sox9* ekspresyonu hipokampusta miR-124\* erkekte artarken, miR-124\* dişide azalmıştır, NS'de ise EGF (-) iken kontrole kıyasla miR-124\* dişide ekspresyon seviyesi değişmezken, miR-124\* erkekte azalmıştır. *Sox10* ekspresyon seviyesi hipokampusta miR-124\* erkekte kontrol erkeklerden ( $p<0,05$ ) ve miR-124\* dişiden ( $p<0,05$ ) daha yüksek bulunmuştur, NS'de ise hem EGF (-) hem de EGF (+) iken

kontrol dişiye kıyasla miR-124\* dişide *Sox10* ekspresyon seviyesi azalırken, miR-124\* erkeklerde EGF (-) iken değişmemiş, EGF (+) iken azalmıştır. *Dcx* ekspresyonu miR-124\* dişide artmışken miR-124\* erkekde azalmıştır, NS'de ise miR-124\* dişide EGF (-) iken değişmezken, EGF (+) iken azalmıştır ancak miR-124\* erkekde EGF (-) ve EGF (+) iken değişmemiştir. *Neurod1* ekspresyonu miR-124\* dişide ve miR-124\* erkekde artmıştır, NS'de ise miR-124\* dişide EGF (-) iken azalırken, EGF (+) iken değişmemiştir, miR-124\* erkekde ise EGF (-) iken *Neurod1* ekspresyonu artarken EGF (+) iken azalmıştır.

Bu alışma ile miR-124-3p'nin döllenmiş yumurtaya mikroenjekte edilmesi sonucu oluşan epigenetik bir modifikasyonun (paramutasyon) varlığı Balb/c farelerde ilk kez ispatlanmıştır. Saptanan vücut büyüklüğü kalıtımı Mendel genetiği ile açıklanamamaktadır. Bu alışma, alternatif bir model olarak mir-RNA aracılı epigenetik modifikasyon modelini nermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** miR-124-3p; beyin; davranış deneyleri; nrosfer; hipokampus; mRNA ekspresyonu



## INVESTIGATION of the EFFECT of miR-124 on BRAIN DEVELOPMENT

**Keziban KORKMAZ BAYRAMOV**

**Erciyes University, Institute of Health Sciences**

**PhD. Thesis, Mart 2019**

**Supervisor: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

### ABSTRACT

The size of the mammalian body is determined by genetic and epigenetic mechanisms via different pathways during the prenatal and postnatal periods. miR-124 is one of the epigenetic tools affecting expression of specific genes is well recognized for proneuronal role in the brain and found to be in abundance in the brain, especially in the hippocampus. Although the conservation of the sequence and expression pattern in the evolutionary process indicates that it is critical function in the development of the central nervous system, the role of miR-124 in neuronal development is fully elucidated.

In the present work, within the postnatal study of the Balb/c mice offspring born after miR-124-3p microinjection (miR-124\*), weekly feed consumption and weight tracking of the offspring for 120 days and at 2-month-old behavioural experiments such as open field, hole-board, novel object, Y maze, tail suspension, social field, marble burying and odour test were performed.

Within the prenatal study, hippocampus was removed from 19.5 days old embryos which were cultured and used for RNA isolation. Neurosphere (NS) was obtained from this culture which were divided into epidermal growth factor (EGF) applied (EGF (+)) and non- applied (EGF (-)) groups. After the counting and area measurements of NS RNA isolation were performed. Thus, expression levels of *Sox8*, *Sox9*, *Sox10*, *Dcx* and *Neurod1* mRNA were investigated in both hippocampus and EGF (+) and EGF (-) NS.

While the *Sox8* expression increased in miR-124\* females hippocampus, it was found to be decreased in miR-124\* males, whereas in NS of miR-124\* male it increased in EGF (-) but not in EGF (+) group. *Sox9* expression in the hippocampus was increased in miR-124\* males, decreased in miR-124\* females, whereas in NS from EGF (-) group it was decreased in miR-124\* M, while the expression level in miR-124\* females did not change in comparison with control. *Sox10* expression was higher in the hippocampus than the control male ( $p<0.05$ ) and miR-124\* females ( $p<0.05$ ), in miR-124\* males, whereas in

NS both EGF (-) and EGF (+) group *Sox10* expression level was decreased in miR-124\* F compared to control female, while it was not different in miR-124\* males NS from EGF (-) it was decreased in EGF (+) group. While *Dcx* expression was increased in miR-124\* females, it was decreased in miR-124\* M, while in miR-124\* females NS EGF (-) group it was not changed, in EGF (+) it was decreased, and in miR-124\* males EGF (-) and EGF (+) it was not changed. Expression of *Neurod1* was increased in miR-124\* females and miR-124\* males, whereas in NS it decreased in EGF (-) in miR-124\* females, but not in EGF (+), in miR-124\* males NS EGF (-) it was increased but in EGF (+) was decreased.

In this study, the existence of an epigenetic modification (paramutation) as a result of microinjection of miR-124-3p into the fertilized egg demonstrated for the first time in Balb/c mice. Increased body size heritability cannot be explained by Mendelian genetics. This study suggests an alternative model of mirRNA-mediated epigenetic modification.

**Keywords:** miR-124-3p; brain; behavioural experiments; neurosphere; hippocampus; mRNA expression

## İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	xii
TABLO LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. EPİGENETİK.....	4
2.1.1. EPİGENETİĞİN TARİHÇESİ.....	5
2.1.2. EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER.....	5
2.1.2.1. DNA METİLASYONU.....	6
2.1.2.2. HİSTON DEĞİŞİMLERİ.....	8
2.1.2.3. NON-HİSTON DEĞİŞİKLİKLERİ.....	9
2.1.2.3.1. MikroRNA'lar.....	9
2.2. SİNİR SİSTEMİ.....	17
2.2.1. SİNİR SİSTEMİ HÜCRELERİ.....	17
2.2.1.1. NÖRONLAR.....	18
2.2.1.2. GLİA HÜCRELERİ.....	21
2.2.2. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ.....	22
2.2.2.1. OMURİLİK.....	22
2.2.2.2. BEYİN.....	23
2.3. DAVRANIŞ.....	30
2.3.1. BEYİN VE DAVRANIŞ.....	30
2.3.2. NÖRON VE DAVRANIŞ.....	35
2.3.3. FARELER VE DAVRANIŞ.....	37
2.4. TRANSGENİK.....	38
2.5. GENLER.....	39

2.5.1. <i>Sox8</i> (SRY (Sex Determining Region Y)-box 8).....	40
2.5.2. <i>Sox9</i> (SRY (Sex Determining Region Y)-box 9).....	40
2.5.3. <i>Sox10</i> (SRY (Sex Determining Region Y)-box 10).....	40
2.5.4. <i>Dcx</i> (doublecortin) .....	41
2.5.5. <i>Neurod1</i> (neurogenic differentiation 1).....	41
3. YÖNTEM ve FARELER .....	43
3.1. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI.....	43
3.2. FARELER ve YAŞAM KOŞULLARI.....	44
3.2.1. Kilo Takibi ve Davranış Deneyi için Mikroenjeksiyon ile Üretilen Fareler .	44
3.2.2. Embriyodan Direk Hipokampus Çıkarmak için Mikroenjeksiyon ile Üretilen Fareler .....	44
3.2.3. Embriyonik Hipokampusden Primer Hücre Kültürü için Mikroenjeksiyon ile Üretilen Fareler.....	45
3.3. YÖNTEM.....	45
3.3.1. Mikroenjeksiyon Yöntemi.....	45
3.3.2. Kilo Takibi.....	47
3.3.3. Davranış Deneyleri.....	47
3.3.3.1. Açık Alan Testi.....	47
3.3.3.2. Delikli Tahta.....	48
3.3.3.3. Yeni Nesne Tanıma .....	48
3.3.3.4. Y Labirent Deneyi .....	48
3.3.3.5. Kuyruktan Asma Deneyi.....	49
3.3.3.6. Sosyal Alan Deneyi .....	49
3.3.3.7. Bilye Gömme Deneyi .....	50
3.3.3.8. Koku Deneyi.....	51
3.2.4. Embriyodan Hipokampus Çıkarılması .....	51
3.2.5. Primer Hücre Kültürü.....	52
3.2.6. Cinsiyet Tayini.....	53
3.2.6.1. DNA İzolasyonu .....	53
3.2.6.2. PCR.....	54
3.2.7. NS Sayımı ve NS Alan Ölçümü.....	55
3.2.8. RNA İzolasyonu.....	55
3.2.8.1. Hipokampusden RNA İzolasyonu .....	55

3.2.8.2. Primer Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu .....	56
3.2.9. cDNA Sentezi .....	57
3.2.10. Pre-Amplifikasyon Yöntemi (Ön Çoğaltma).....	58
3.2.11. Gen Ekspresyonu .....	59
3.2.12. İstatiksel Analizler .....	60
4. BULGULAR .....	61
4.1. Farelerde Fenotipik Bulgular .....	61
4.2. Davranış Deneyi Bulguları.....	62
4.2.1. Açık Alan Deneyi Bulguları .....	62
4.2.2. Delikli Tahta Deneyi Bulguları.....	63
4.2.3. Yeni Nesne Tanıma Bulguları .....	63
4.2.4. Y Labirent Deney Bulguları .....	65
4.2.5. Kuyruktan Asma Deneyi Bulguları.....	67
4.2.6. Sosyal Alan Deneyi Bulguları .....	67
4.2.7. Bilye Deneyi Bulguları.....	68
4.2.8. Koku Deneyi Bulguları .....	69
4.2.9. Davranış Deneylerinin Değerlendirilmesi.....	70
4.3. Kilo Takibi Bulguları.....	71
4.3.1. Yem Yeme Bulguları .....	77
4.4. NS Sayısı ve Alan Bulguları .....	78
4.5. mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları .....	80
4.4.1. Hipokampus'te mRNA Ekspresyon Analiz Bulguları.....	80
4.4.2. Primer Hücre Kültüründe mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları .....	82
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	86
6. KAYNAKLAR.....	101
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

## KISALTMALAR

<b>cDNA</b>	komplementer DNA
<b><i>Dcx</i></b>	doublecortin
<b>dk.</b>	dakika
<b>DMEM/F12</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>Gh</b>	Büyüme Hormonu
<b>HBS</b>	Hanks' Balanced Salt
<b>Igf1</b>	İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü 1
<b>ITS</b>	İnsulin-Transferrin-Selenium-A
<b>ml</b>	mililitre
<b>mRNA</b>	Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>MSS</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b><i>Neurod1</i></b>	Neurogenic Differentiation 1
<b>NFW</b>	Nuclease-Free Water
<b>NS</b>	Nörosfer
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>Pen Strep</b>	Penicillin-Streptomycin
<b>pHEMA</b>	Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)
<b>qPCR</b>	Kantitatif PCR
<b>Real-Time PCR</b>	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>SAM</b>	S-adenosil metiyonin

<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>sn.</b>	Saniye
<b>Sox10</b>	Sex Determining Region Y)-box 10
<b>Sox8</b>	Sex Determining Region Y)-box 8
<b>Sox9</b>	SRY (Sex Determining Region Y)-box 9
<b>SRY</b>	Sex Determining Region Y



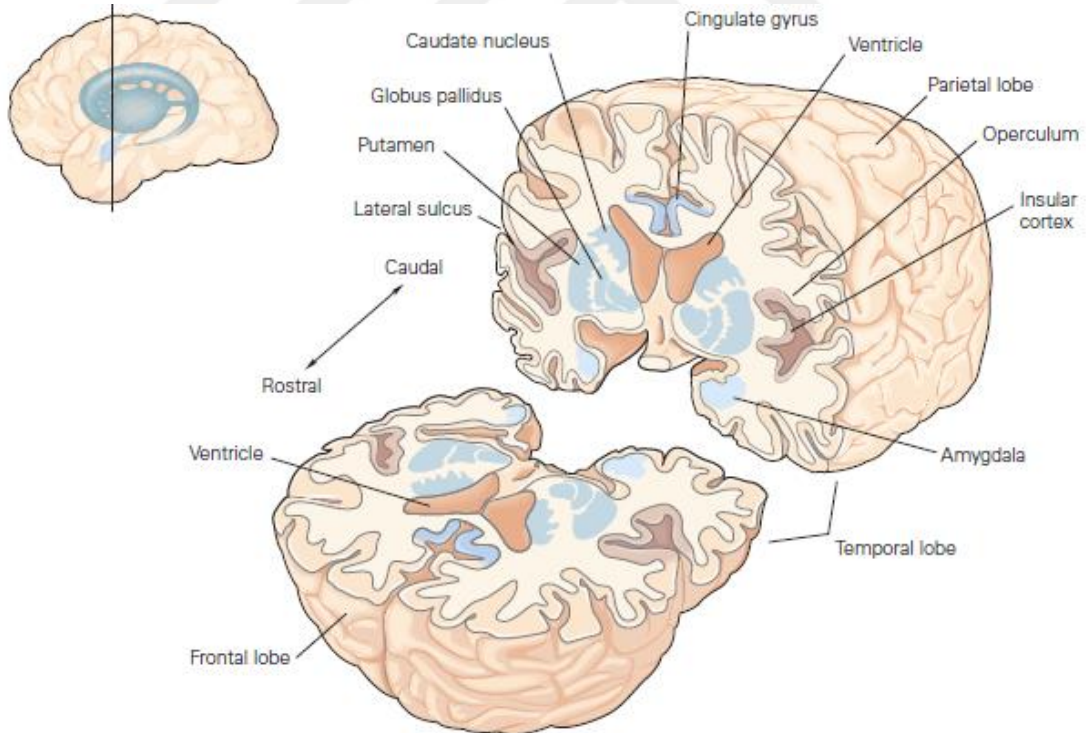
## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. miR-124-5p ve miR124-3p'nin dizisi. ....	17
Tablo 2. Cinsiyet tayini için gerekli primer dizileri. ....	54
Tablo 3. PCR işlemi için gerekli malzemeler ve miktarları. ....	54
Tablo 4. Cinsiyet tayini için kullanılan PCR programı. ....	54
Tablo 5. Hipokampusten RNA izole edilen örnekler için karışım miktarları. ....	57
Tablo 6. Kültürden RNA izole edilen örnekler için karışım miktarları.....	57
Tablo 7. cDNA sentezi için PCR programı. ....	57
Tablo 8. Pre-Amplifikasyon işlemi için gerekli malzemeler ve miktarları. ....	58
Tablo 9. Pre-amplifikasyon için PCR programı.....	59
Tablo 10. Gen ekspresyon çalışması için gerekli malzemeler ve miktarları. ....	59
Tablo 11. Gen ekspresyon çalışması için kullanılan PCR programı. ....	60
Tablo 12. Davranış deneylerinin genel olarak değerlendirilmesi .....	70
Tablo 13. NS sayısı, alanı ve oranının kıyaslanması.....	80
Tablo 14. Hipokampuste gruplar arası <i>Sox8</i> , <i>Sox9</i> , <i>Sox10</i> , <i>Dcx</i> ve <i>Neurod1</i> mRNA gen ekspresyonu değerlendirilmesi .....	82
Tablo 15. Gruplar arası cinsiyete göre <i>Sox8</i> , <i>Sox9</i> , <i>Sox10</i> , <i>Dcx</i> ve <i>Neurod1</i> mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi. ....	85



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Çalışmanın Tasarımı.....	3
Şekil 2. DNA metilasyon mekanizması.....	7
Şekil 3. Promotör bölgesinde metile ve unmetile durum. Promotör bölgesindeki CpG adacıklarının unmetile oluşu geni aktif kılarken, metile oluşu geni sessizleştirir.....	8
Şekil 4. La ribonükleoprotein domen ailesi üyesi 7 (LARP7 veya PIP7S) geninin intronik bölgesinden kodlanan bir intronic mikroRNA olan miR-302'nin biyogenezini.....	14
Şekil 5. Nöron Yapısı ve Kısımları.....	19
Şekil 6. Nöronlar hücre gövdesinden köken alan çıkıntıların sayısına göre unipolar, bipolar veya multipolar olarak sınıflandırılır.....	20
Şekil 7. Çoğu nöron, şekline bakılmaksızın, farklı sinyal türlerinin üretildiği dört fonksiyonel bölgeye sahiptir. Çoğu nöronun fonksiyonel organizasyonu, bir model nöron üzerinde şematik olarak gösterilmiştir.....	21
Şekil 8. Başlıca glia hücre tipleri.....	22
Şekil 9. MSS'nin başlıca bölümleri. Çizimler, beynin sol tarafının ve beynin sağ tarafının medial yüzeyinin yandan görünüşünü göstermektedir.....	23
Şekil 10. İnsan ve Fare beyinin karşılaştırmalı görüntüsü.....	24
Şekil 11. Büyük loblar ve insan serebral korteksinin bazı önemli kısımları. Sol taraftaki beynin sol tarafının lateral görüntüsü ve sağda ise beynin sağ tarafının medial görüntüsü yer almaktadır.....	27



Şekil 12. Beyin yarımkürelerinin ortasındaki yapılar.....	28
Şekil 13. Hipokampus adı görünümünün 'deniz atına'na olan benzerliğinden dolayı verilmiştir.....	29
Şekil 14. Farede yetişkin hipokampusun şematik gösterimi ve embriyonik hipokampusun çalışma esnasında alınan fotoğrafı.....	30
Şekil 15. A) Beyin kabuğunun lobu gösterilmiştir. B) Dile dahil olan alanlar.....	33
Şekil 16. Diz refleksi duyu ve motor nöronların basit bir sirkülasyonu ile kontrol edilir.....	36

Şekil 17. Yakınsak ve uzaksak nöronal bağlantılar beynin önemli bir organizasyon özelliğidir. A) Duyusal sistemlerde her bir reseptör nöron genellikle işlemin ikinci aşamasını temsil eden çeşitli nöronlarla temas eder. Sonraki işlem aşamalarında gelen bağlantılar daha da uzaklaşır. Bu, tek bir bölgeden duyuşal bilginin omurilikte ve beyinde daha geniş bir alana dağıtılmasını sağlar. B) Buna karşılık, motor nöronlar giderek birbirini izleyen bağlantıların hedefleridir. Motor nöronunu aktive etmek için birçok presinaptik hücreden bu düzenleme girişi gereklidir .	37
Şekil 18. Cinsiyet tayini jel görüntüsü: M: Markır (100bç-3000bç), 1.,2. ve 6. embriyoların cinsiyeti erkek iken 3.,4. ve 5. embriyoların cinsiyeti dişidir. 7. örnek kontrol diş, 8. örnek kontrol erkektir.	55
Şekil 19. Embriyoların farklı günlerde alınmış fotoğrafları.	61
Şekil 20. Gruplara göre açık alan deneyi bulguları.	62
Şekil 21. Açık alanda gruplara göre total hareket ve hız kıyaslaması.	62
Şekil 22. Gruplar arasında defekasyon ve delik sayısının kıyaslanması.	63
Şekil 23. Gruplar arasında yeni nesne ile geçirilen vaktin kıyaslanması.	63
<b>Şekil 24.</b> Diskriminasyon indeksinin gruplar arası kıyaslanması.	64
Şekil 25. Gruplar arasında total hareket ve hız kıyaslanması.	64
Şekil 26. Gruplar arası rotasyon sayısı, kollara total giriş ve Y labirent puan kıyaslaması (2. gün).	65
Şekil 27. Gruplar arasında 1. gün ve 2. gün total giriş sayısının kıyaslanması.	66
Şekil 28. Gruplar arası 1. gün ve 2. gün açısından Y labirent puanının kıyaslanması.	66
Şekil 29. Gruplar arası Y labirent puanı (alternasyon puanı) kıyaslaması.	67
Şekil 30. Gruplar arası kuyruktan asılma sonrası hareketlilik süresinin kıyaslanması.	67
Şekil 31. Gruplar arasında fareli kafes (eski nesne) faresiz kafesde (yeni nesne) geçirilen zamanın kıyaslanması.	68
Şekil 32. Gruplar arası gömülen bilye sayısının kıyaslanması.	68
Şekil 33. Koku varlığında gruplar arası açık alan davranışının kıyaslanması.	69
Şekil 34. Koku varlığı ve yokluğunda merkezde geçirilen zamanın kıyaslanması.	69
Şekil 35. Günlere göre Kontrol ve miR-124* erkek ve dişileri arasındaki ağırlık kıyaslaması.	71
Şekil 36. Fareler 7 günlük olduklarında kontrol ve miR-124* arasındaki ağırlığın kıyaslanması. (Henüz cinsiyet ayrımı yapılamamaktadır.)	72
<b>Şekil 37.</b> Fareler 21, 28 ve 35 günlük olduklarında kontrol ve miR-124* arasındaki ağırlığın cinsiyetlere göre kıyaslanması.	73
Şekil 38. Fareler 42, 49 ve 56 günlük olduklarında kontrol ve miR-124* arasındaki ağırlığın cinsiyetlere göre kıyaslanması.	74
Şekil 39. Fareler 63, 70 ve 77 günlük olduklarında kontrol ve miR-124* arasındaki ağırlığın kıyaslanması.	74
Şekil 40. Fareler 84, 91 ve 99 günlük olduklarında kontrol ve miR-124* arasındaki ağırlığın kıyaslanması.	75
Şekil 41. Fareler 106, 113 ve 120 günlük olduklarında kontrol ve miR-124* arasındaki ağırlığın kıyaslanması.	76
Şekil 42. Günlere göre en çok etkilenen erkek paramutant ve kontrol farelerin kıyaslanma grafiği.	76
Şekil 43. Günlere göre en çok etkilenen diş paramutant ve kontrol farelerin kıyaslanma grafiği.	77
Şekil 44. Gruplar arası tüketilen yem miktarının kıyaslanması.	77
Şekil 45. 12, 16 ve 21. günlerde NS'lerin görüntüsü.	78
Şekil 46. Günlere göre NS sayısının kıyaslanması.	79

Şekil 47. Gruplar arası NS alan kıyaslanması.....	79
Şekil 48. Gruplar arası NS başına düşen alan kıyaslanması. ....	80
Şekil 49. Hipokampuste <i>Sox8</i> , <i>Sox9</i> ve <i>Sox10</i> genlerinin mRNA ekspresyon kıyaslaması .....	81
Şekil 50. Hipokampuste <i>Dcx</i> ve <i>Neurod1</i> genlerinin mRNA ekspresyon kıyaslaması. ....	81
Şekil 51. Kontrol grubu ve paramutantlarda EGF varlığı ve yokluğunun <i>Sox8</i> , <i>Sox9</i> ve <i>Sox10</i> gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması. ....	83
Şekil 52. Kontrol grubunda ve paramutantlarda EGF varlığı ve yokluğu durumunda <i>Dcx</i> ve <i>Neurod1</i> gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması.....	83
Şekil 53. Primer Hücre Kültüründe <i>Sox8</i> , <i>Sox9</i> ve <i>Sox10</i> gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması. ....	84
Şekil 54. Primer Hücre Kültüründe <i>Dcx</i> ve <i>Neurod1</i> gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması. ....	84
Şekil 55. Gruplar arası cinsiyete göre <i>Sox8</i> , <i>Sox9</i> , <i>Sox10</i> , <i>Dcx</i> ve <i>Neurod1</i> mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması. ....	85

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Deoksiribonükleik Asit (DNA) dizisinde değişiklik olmadığı halde kalıtsal fenotipte oluşan değişiklikleri ifade eden epigenetik terimi (1) modern anlamı ile DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesini doğrudan etkileyen değişikliklerin incelenmesini ifade etmektedir (2). Epigenetik mekanizmalar transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel ve/veya translasyonel ve post-translasyonel seviyede değişimler ile bir genin aktivitesini değiştirebilirler. Post-transkripsiyonel mekanizmalardan olan mikro RNA'lar (miRNA), küçük kodlanmayan RNA'ların en iyi karakterize olmuş alt tipini oluştururlar (3). DNA'dan transkribe olup, translasyona uğramayan ve protein sentezinde diğer genlerin fonksiyonlarını düzenleyen miRNA'lar, tek-iplikli RNA'ların bir formudur ve 18 ile 25 nükleotid uzunluğundadır. Özetle miRNA'lar proteine kodlanan diğer genlerin ifadesini düzenleyen genlerdir. miRNA'lar gelişim, protein salınımı ve gen düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir (4).

Transgenik fareler üretmek için en yaygın olarak kullanılan teknik olan mikroenjeksiyon yöntemi, insan hastalıklarının hayvan modellerini oluşturmak için kullanılan çok güçlü bir yöntemdir (5). Bu yöntemde, genetik materyal (DNA, total RNA, miRNA vb.) döllenenmiş bir yumurtanın pronükleusuna fiziksel olarak mikroenjekte edilir. Enjekte edilen embriyolar daha sonra yalancı gebelik hissi yaşayan annelerin oviduktlarına transfer edilir. Bu taşıyıcı anneler manipüle edilmiş yavruları dünyaya getirirler (5, 6). Küçük RNA'ların kullanıldığı mikroenjeksiyon deneyleri, küçük RNA'nın yeni nesile ebeveyn etkilerini taşıyabileceğine dair ikna edici kanıtlar sağlamıştır. Herhangi bir küçük RNA türünün mikroenjeksiyonu, bir şekilde metabolizmayı etkileyebilmektedir (3). Yaklaşık 20 nükleotid uzunluğundaki küçük bir RNA molekülü olan miR-124'ün mikroenjeksiyonu sonucunda hem prenatal hem postnatal dönemde daha iri fenotipe sahip farelerin oluştuğunu gözlemleyen Minoo Rassoulzadegan ve ekibi yaptıkları çalışma ile küçük RNA'ların önemini ortaya koymuşlardır (7). Farelerde oluşan bu iri

fenotipin hangi moleküler mekanizmaları etkilediği merak ederek Minoo Rassoulzadegan'ın yönlendirmesi ile bu tez çalışması planlanmıştır.

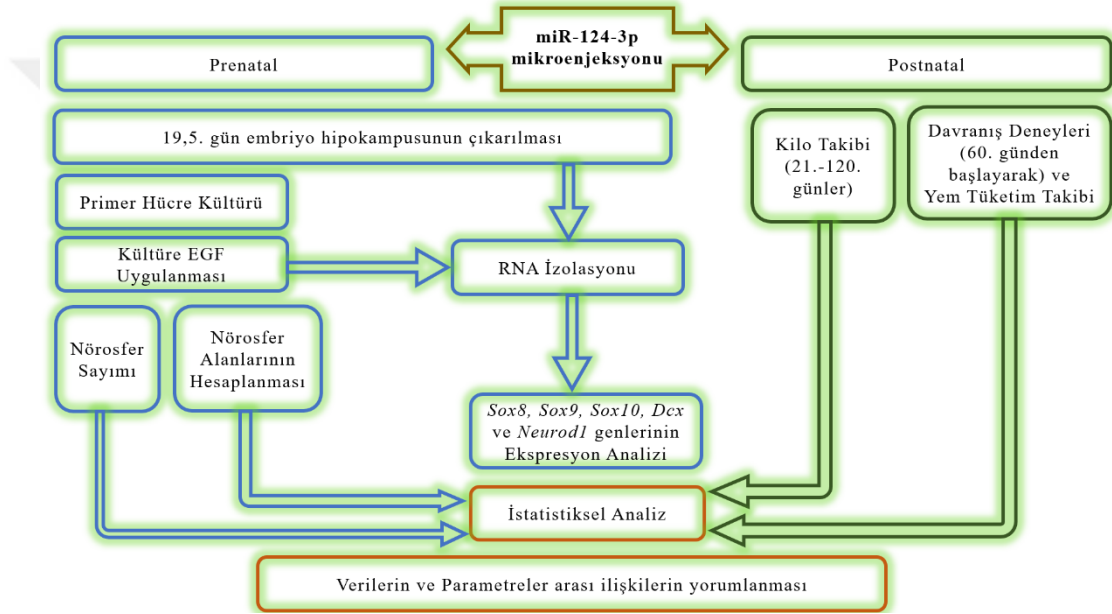
miR-124, hem gelişmekte olan hem de olgun beyindeki pronöronal rolü ile iyi tanınan ve (8) özellikle de hipokampusta en bol bulunan mikro RNA'dır (9). Evrimsel süreçte miR-124'ün sekansının ve ekspresyon paterninin korunmuş olması MSS gelişiminde kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymaktadır (10). Ancak, buna rağmen miR-124'ün nöronal gelişimdeki işlevleri tartışmalı bir konudur (11). Bu tartışmalı konuyu aydınlatabilmek adına bu tez çalışmasında öncelikli olarak beyinin hangi kısmı üzerinde çalışmamız gerektiğine karar verildi. Daha önce yaptığımız çalışma ile miR-124-3p ekspresyonunun hipokampusta yüksek olduğunu tespit etmemiz (9) sebebiyle hipokampus ile çalışma kararı aldık. Bir büyüme faktörü olan EGF kullanımının daha iri fenotipe yol açan moleküler mekanizma ile ilgili bilgi verici olacağını düşünerek hipokampustan primer hücre kültürü oluşturmayı hedefledik.

Farelerde hipokampusun E17,5. günde gelişmeye başlayıp E19,5. günde gelişimini tamamladığı bilgisinden yola çıkarak miR-124\* embriyolardan E19,5. günde hipokampus dokusu çıkarılmıştır. miR-124-3p mikroenjekte embriyolarda hipokampus dokusunun kendi doğasındaki ekspresyon profilini görmek için direk hipokampus dokusundan RNA izole edilmiştir. Hipokampus dokusunun EGF ile muamele edilmesi sonucu oluşacak ekspresyon profilini ölçmek için de hipokampustan primer hücre kültürü yapılarak NS (3 boyutlu şekilde büyüyüp gelişebilen yapı) elde edilmiştir. miR-124-3p mikroenjeksiyonun NS gelişimine etkisi olup olmadığını araştırmak için hem NS'ler sayılmış hem de NS'lerin alanları ölçülmüştür. Özetle, miR-124\* embriyoların hem hipokampus dokularında hem de hipokampus kökenli NS'lerinde Sox ailesi genlerinden Sex Determining Region Y (SRY)- box 8 (*Sox8*), SRY- box 9 (*Sox9*), SRY- box 10 (*Sox10*), Doublecortin (*Dcx*) ve Neurogenic differentiation 1 (*Neurod1*) mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

miR-124-3p mikroenjeksiyonu sonucu postnatal dönemde daha iri fenotipe fareler elde edilip edemeyeceğimizi gözlemlemek için mikroenjeksiyondan sonra doğan farelerin 21. günden 120. güne kadar haftalık olarak ağırlıkları takip edilmiştir. Bu farelerin iri fenotipe sahip olmaları yanında macera arayışı içinde olan fareler olduklarını da düşünmemiz sebebiyle davranışlarını da ölçmek istedik. Kilo takibi yaptığımız fareler 2 aylık olduklarında, açık alan, delikli tahta, yeni nesne tanıma, Y labirent, kuyruktan asma,

sosyal alan, bilye gömme ve koku deneyi gibi davranış deneyleri uygulanmıştır. Ayrıca, miR-124- 3p mikroenjeksiyonu sonucu oluşan iri fenotipin farelerin tükettikleri yem miktarına bağlı olarak oluşup oluşmadığını tespit etmek için tüketilen günlük yem miktarı da takip edilmiştir. Çalışmanın tasarımı ve adım adım basamakları Şekil 1’de verilmiştir.

miR-124 mikroenjekte edilmiş (paramutant/miR-124\*) fareler hem prenatal hem postnatal dönemde daha iridir ve davranış olarak da kontrollerinden belirgin şekilde farklı davranan davranmaktadır. Bu tez çalışması ile bu duruma neden olan moleküler mekanizmayı aydınlatmayı amaçlamaktayız.



**Şekil 1.** Çalışmanın Tasarımı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. EPİGENETİK

Son yirmi yılda genetik alanında yaşanan gelişmeler sayesinde bir zamanlar hayal gibi kabul gören gelişmelerin çoğunun günümüzde kolaylıkla uygulanabilir olduğunu görmekteyiz. Bildiğimiz genetik çözümlerinin ötesine geçebilen ve yepyeni bir çalışma alanı meydana getiren epigenetik son yıllarda gizemi çözülmeye başlayan yeni mekanizmalarıyla birlikte birçok moleküler biyoloğun ilgi odağı olmuştur (1).

‘Epigenetik’ terimi DNA dizisinde değişiklik olmadığı halde kalıtsal fenotipte oluşan değişiklikleri ifade etmektedir (1). Modern anlamda ‘Epigenetik’ DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesini doğrudan etkileyen değişikliklerin incelenmesi anlamına gelmektedir (2). Genlerin ne kadar süre, ne zaman ve nerede çalışacağını belirleyen epigenetik mekanizmalar (1) transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel ve/veya translasyonel ve post-translasyonel seviyede değişimler ile bir genin aktivitesini değiştirebilirler (12).

Epigenetiğin tarihsel evrim ve gelişimsel biyolojiyi kapsayan çalışmalar ile bağlantılıdır. Ancak son 50 yıl boyunca, "epigenetik" teriminin anlamı, ökaryotlarda gen ifadesinin düzenlenmesinin altında yatan moleküler mekanizmalara ilişkin artan bilgilerimize paralel bir şekilde evrim geçirmiştir (13). Bir organizmanın tüm somatik hücrelerinde aynı DNA dizisi var olmasına rağmen gen ifadesi farklı hücre türleri arasında büyük farklılıklar göstermektedir. DNA dizisindeki değişimler ile açıklanamayan genin fonksiyonundaki mitotik ve/veya mayotik bu kalıtsal değişiklikler epigenetiğin tanımını oluşturmaktadır (13). Özetle; ‘Epigenetik’ nükleik asit dizisinde değişiklik olmaksızın transkripsiyonel aktiviteyi etkileyebilen DNA molekülü ve onunla ilişkili histon modifikasyonlarıdır (14). Bu tanımdan yola çıkıldığında, belirli bir DNA'nın nükleotid diziliminde herhangi bir değişiklik yapmadan kromatin yapısında önemli değişiklikler yapabilen DNA, DNA'ya bağlanan proteinler ve histon modifikasyonlarını epigenetiğin çalışma alanını oluşturmaktadır (12).

‘Epigenetik’ terimi, genomik damgalama ve paramutasyon gibi birçok fenomeni kapsamaktadır (1) İlk olarak bitkilerde tanımlanan ve bir genin bir allelinde meydana gelen genetik değişikliğin normal alleli kalıtsal olarak etkilemesi olarak tanımlanan ‘Paramutasyon’ yani susturma işlemi bitkilerde bildirilenden farklı olarak, farelerde lokus transkripsiyonunun epigenetik artışı olarak tanımlanmıştır (6, 7, 15-18). Burada dikkat çeken durum ise paramutant allel ve ilişkili fenotipin, sonraki nesillere geçebilmesidir ki bu durum epigenetik kalıtım olarak adlandırılmaktadır (12, 15).

### **2.1.1. EPIGENETİĞİN TARİHÇESİ**

Gelişimsel biyolog olan Conrad Waddington ‘epigenetik; gelişim sırasında genotipin fenotipi nasıl meydana getirdiğini inceleyen bilim dalıdır’ diyerek 1940’lı yılların başlarında ilk kez Epigenetik terimini kullanmış olmuştur (19). Conrad’ın bu hipotezine moleküler mekanizma olarak Holliday ve Pogh 1970’li yılların başında sitozin-guanin dinükleotitlerinin (CpG) metilasyonunu kapsayan DNA modifikasyonlarını önermişlerdir (13, 20).

1990’larda epigenetik şöyle tanımlanmıştır; DNA metilasyonu ve kromatin yeniden düzenlenmesini içine alan, DNA dizisinde bir değişiklik olmaksızın oluşan gen ifadesindeki kalıtsal değişikliklere epigenetik denir. Daha yüksek düzeyde kromatin katlama düzeni ve çekirdeksel matrikse bağlanma, nükleozomlar etrafındaki DNA paketlenmesi, histon kuyruklarının kovalent modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikütinasyon) ve DNA metilasyonunu içeren kromatin etkileri”nin çalışması olarak ‘epigenomik’ terimi türetilmiştir (1).

### **2.1.1. EPIGENETİK DEĞİŞİKLİKLER**

Epigenetik değişiklikler, çok hücreli bir organizmada her hücre türünün varlığı ve bir sonraki hücrelere bilgi taşınması için gerekli kendilerine özgü genlerin, farklı yetişkin hücrelerde ifade olmasını sağlar. Epigenetik modifikasyonlar genellikle organizmanın ömrü boyunca gerçekleşir; Bununla birlikte, bu değişiklikler germ hücrelerinde ortaya çıkarsa bir sonraki nesle aktarılabilir Paramutasyon, bookmarking, imprinting, gen susturulması, X kromozom inaktivasyonu, yeniden programlama, maternal özellikler, kanserojen süreçler, teratojenik etkiler, histon modifikasyonlarının düzenlenmesinin epigenetik süreçleri içerdiği bilinmektedir. Üç büyük epigenetik modifikasyon mekanizması; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA (miRNA)’lardır (12).



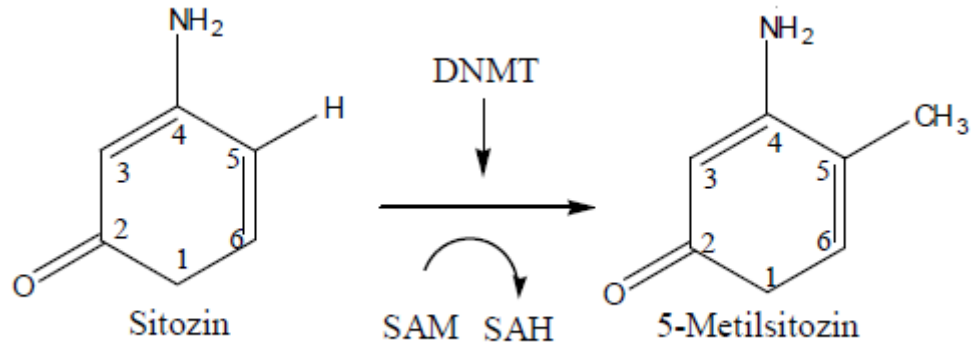
### 2.1.2.1. DNA METİLASYONU

DNA düzeyindeki modifikasyonların en çok çalışılanı, bilineni ve işlevsel olanı olarak kabul gören DNA metilasyonu (21), ilk olarak 1948 yılında tanımlanmıştır ve memeli genomunda rastlanan epigenetik olaylarının en yaygınıdır (22).

DNA sentezlendikten sonra DNA bazlarına metil gruplarının (-CH<sub>3</sub>) bağlanması olarak tanımlanan (1) DNA metilasyonunun etkileri hala tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen (21), gen ifadesi ve kromatin organizasyonunda önemli rolü olan bir epigenetik değişikliktir (1). Ayrıca, hücre döngüsünü kapsayan süreç boyunca spesifik hücrelerin özel bir epigenetik hafızası olarak işlev görür, histonların aktivitesini ve ifadesini de düzenleyebilir (12).

Yüksek kararlılığa sahip olan DNA metillenmesi (12), enzimatik bir değişimdir; DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b gibi DNA metil transferaz enzimleri aracılığı ile gerçekleşir (22) ve bu süreçte sitozinler (C) 5'-metil sitozine dönüşür (12, 14).

Hücrelerin içinde S-adenosil metiyonin (SAM) önemli bir metil grubu vericisidir (12, 15). DNA metilasyonu; SAM'daki metil grubunun, guaninden (G) önce bulunan sitozine (C) transferi ile katalizlenir ve böylece 5-metil sitozin (5mC) oluşur (**Şekil 2**). A, T, G, C'den sonra beşinci baz olarak adlandırılan 5mC'in oluşumu kovalent kimyasal bir değişikliktir (15, 22). **Şekil 2**'de özetlendiği gibi; DNA metiltransferazların (*DNMT1*, 3a ya da 3b) aracılığı ile sitozinin beşinci karbonuna SAM'daki bir metil grubunun (-CH<sub>3</sub>) transferi sonucu 5-metilsitozin oluşmaktadır (14). DNA metiltransferazları aktive eden SAM artışı, hipermetilasyonu tetikler. Metiltransferazların etkisiyle SAM'dan S-adenozil homosistein (SAH) oluşur. SAM/SAH oranı metilasyon durumunun metabolik göstergesi olup metilasyon potansiyeli olarak da ifade edilmektedir (22).



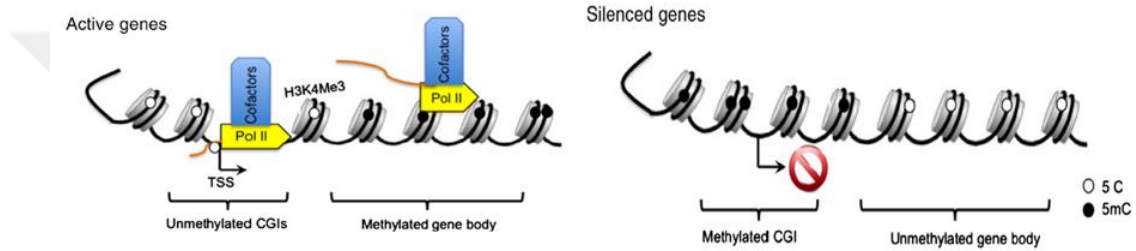
**Şekil 2.** DNA metilasyon mekanizması.

Folatlar, B grubu vitaminler ve kolinler (beslenmede gerekli olan renksiz bazik madde) metil grubu vericileridir (22). Bu sebeple folik asit ve B12, re-metilasyonda pasif ve aktif mekanizmalar yoluyla de-metillenmiş SAM'ın çekiciliğinde belirleyici rol oynamaktadır. Bir dizi çalışma, bu etkili faktörlerin DNA metilasyon kalıplarını değiştirerek gen ekspresyon düzeyinde farklılıklara yol açtığını göstermiştir. Araştırmalar ayrıca, yaşamın ilk yıllarındaki beslenme durumunun, yetişkinlikte DNA metilasyon örüntüsünü ve gen ekspresyon düzeylerini etkileyebildiğini doğrulamıştır. Ayrıca sitozin tortularındaki CpG dizilerinin metilasyon paternleri kalıtsal olabilir, dokuya ve türe özgü özellikler olarak hareket edebilir. İnsanda CpG dizisi taşıyan DNA'nın %70-80'inin genellikle metile, metilasyon ve ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin ise cis ve trans olduğu rapor edilmiştir. Tamamen çok etkileyici bir epigenetik ajan olan DNA metilasyonu, mutasyonların gelişimine, DNA'nın hatasız ve dayanıklı olmasına, gen ifadelerinde ve kromatin modifikasyonlarında farklılığa sebep olabilir (12).

Çoğu hayvan ve bitkinin DNA'sı, genellikle sitozin olmak üzere, metillenmiş bazlar içerir. Metillenmiş bir ökaryot DNA'sında bulunan sitozin bazlarının yaklaşık %5'i metil gruplarına sahiptir (1). CpG dinükleotidlerin çoğunluğu genomda kodlanmayan ve tekrarlayan bölgelerde yoğunluktadır ve ağır metile durumdadır. Buna karşılık, CpG dinükleotidleri bakımından yoğun genin promotör bölgesini kapsayan merkezi bölgeler normal olarak metille değildir. Ancak dokuya özgü genleri, imprinted genleri ve X kromozomunun inaktivasyonuna sebep olan genleri kapsayan istisnalar da vardır. (14). Özetle; inaktif durumda olan memeli X kromozomlarındaki gibi, inaktif DNA, aktif şekilde transkripsiyon geçiren DNA ile karşılaştırıldığı zaman bazı istisnalar olmasına rağmen, genellikle inaktif DNA'da çok fazla oranda metillenme olduğu tespit edilmiştir.

Farklı dokularda yer alan aynı genlerin karşılaştırılması, bu genlerin ifade edilmedikleri hücrelerde, genelde daha yoğun bir biçimde metillendiklerini göstermektedir (1).

Kanserde ise bu motif değişir; genetik kararsızlığa sebep olan sitozinlerde metilasyon kaybolurken promotör bölgesindeki CpG adacıklarında anormal gen sessizleşmesine yol açan hipermetilasyon söz konusudur (Şekil 3). Ayrıca enhanser bölge gibi promotör bölgesi dışında oluşan DNA metilasyonu kodlanan genin yanı sıra kodlanmayan RNA'ların düzenlenmesinde önemli bir faktördür (14).



**Şekil 3.** Promotör bölgesinde metile ve unmetile durum. Promotör bölgesindeki CpG adacıklarının unmetile oluşu geni aktif kılarken, metile oluşu geni sessizleştirir.

### 2.1.2.2. HISTON DEĞİŞİMLERİ

Ökaryotlarda DNA'nın paketlenmesinden sorumlu olan histon proteinleri, yüksek oranda pozitif yüklü amino asit (lizin ve arjinin) içerdikleri için negatif yüklü DNA'ya sıkıca bağlanırlar (23). DNA'dan sadece DNA'nın kendini eşlemesi sırasında geçici olarak ayrılıp transkripsiyon sırasında DNA ile birlikte kalırlar (24).

Kromatin yapı ve fonksiyonunu değiştirdiği için gen ifadesini değiştiren epigenetik düzenleyiciler olarak bilinen histon değişimleri (12, 22) bir diğer kapsamlı şekilde incelenmiş epigenetik damgalamayı oluşturmaktadır (14). Asetile, metile, fosforile ve ubiquitine eden bir dizi histon modifiye edici enzim vardır, histonlar ve bu eylemlerin kombinasyonu kromatinin yapısını transkripsiyonel olarak aktif (ökromatin) ya da inaktif (heterokromatin) olarak değiştirmektedir. Histon asetiltransferazlar (HAT'ler), histon kuyruklarındaki lizin amino asitini asetilleyerek transkripsiyonu aktive ederler. Ancak bu geri dönüşümlü bir süreçtir. Histon deasetilazlar (HDAC) ise asetil grubunu çıkararak transkripsiyonu baskırlar. Bunlara ek olarak, histone mono-, di- veya trimetilasyon,

histon fosforilasyonu ve histon ubiquitasyonu, kromatin düzenlemesinin ve transkripsiyonel düzenleme dahil epigenetik süreçlerin geniş bir yelpazesinin daha ileri seviyeye ulaşmasını sağlar (14).

### **2.1.2.3. NON-HİSTON DEĞİŞİKLİKLERİ**

Kalıtımın diğer non-histon mekanizması yapısal kalıttır. Deneysel olarak değişen hücresel kalıpları, hücrelerin sonraki nesline taşınmaktadır ve mevcut yapılar yeni yapılar için şablon olarak görev aldığı görülmektedir (12).

Non-histon değiştiriciler olarak bilinen bir grup molekül, genlerin aktivitesini (doğrudan veya dolaylı olarak) etkilemek için gerekli RNA transkriptleridir. Çok sayıda biyolojik aktiviteye aracılık eden kodlamayan RNA'lar bu gruba dahildir (12).

#### **2.1.2.3.1. MikroRNA'lar**

miRNA'lar, küçük kodlanmayan RNA'ların en iyi karakterize olmuş alt tipidir (3). Küçük, tek-iplikli RNA'ların bir formu olan miRNA'lar 18 ile 25 nükleotid uzunluğundadır. DNA'dan transkribe olurlar, translasyona uğramazlar ve protein sentezinde diğer genlerin fonksiyonlarını düzenlerler. Dolayısı ile miRNA'lar proteine kodlanan diğer genleri modüle eden genlerdir. İnsan genomunda tanımlanan ve yeni kabul gören binlerce genin yanı sıra transfer RNA'ları (tRNA), ribozomal RNA'ları (rRNA'lar) ve küçük nükleolar RNA'ları (snoRNA'lar), kodlayan genler düşünüldüğünde genomun yaklaşık % 95'inin kodlanmayan DNA'dan oluşmaktadır. Bu dizilerdeki değişiklikler sıklıkla klinik ve çevresel malfonksiyonlar ile ilişkilidir. Bu kodlanmayan dizilerin bazıları RNA interferans (RNAi) benzeri mekanizmalar yoluyla RNA-aracılı gen sessizleşmesinden sorumludur. Genlerin potansiyel olarak önemli bir sınıfını oluşturan miRNA'lar açık okuma çerçevesinden önemli ölçüde yoksundurlar ve son ürün olarak RNA'ya kodlandıkları görülür. Bu miRNA'lar gelişim, protein salınımı ve gen düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. Bunlardan bazıları doğal olarak antisense RNA'yı oluştururken diğerleri daha karmaşık bir yapıya sahiptirler. Bu miRNA'ların bozukluğu hastalıkların anlaşılmasını sağlar (4).

##### **2.1.2.3.1.1. İntergenik miRNA'lar**

Küçük, tek-iplikli miRNA'lar, proteine kodlanacak hedef mRNA transkriptinin ters komplementeridir. Bu miRNA'lar hedef protein kodlayan genin ifade olmasını inhibe edebilirler. miRNA'lar ilk olarak *C. elegans*'da 18-23 nt uzunluğunda ve hedef

transkriptin 3' translasyona uğramayan bölgesine (UTR) komplementer olan lin-4 (25) ve let-7 (26) gibi RNA molekülleri olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak solucanın gelişimi bu RNA'lar ile düzenlenmiştir. Akabinde miRNA'ların solucanlardan sineklere ve insana kadar çok çeşitli organizmalarda bulunduğu tespit edilmiştir (4, 27).

miRNA'ların DNA'dan transkribe olduğu, translasyona uğramadığı fakat diğer genlerin ekspresyonunu regüle ettiği düşünülmektedir. miRNA'ların ilkin transkriptleri (pri-miRNA'lar), en az bir saç tokası benzeri miRNA prekürsörü içeren uzun RNA transkriptleridir. *pri-miRNA*'lar Drosha ribonükleazı tarafından çekirdekte *pre-miRNA*'lara işlenirler (28) ve Exportin-5 tarafından çekirdekten çıkarılırlar (29) 60-90 nt uzunluğundaki *pre-miRNA*'lar stem ve loop (halka) yapılarını oluşturup sitoplazmik RNA III enzimi olan Dicer tarafından kesilerek *pre-miRNA*'dan miRNA'yı çıkarır. miRNA ve siRNA'lar çift-iplikli RNA (dsRNA) ve saç tokası yapıları hesaba katıldığında yakından ilişkili gibi görünüyorlar. siRNA, hem miRNA'nın hem de komplementerini içeren RNA molekülünün çift formu olarak düşünülebilir. Bu nedenle, siRNA'ları bir tür miRNA öncüsü olarak düşünebiliriz (4).

miRNA'lar bir ya da daha fazla mRNA'nın genelde 3'UTR bölgesine komplementer olarak genin ifadesini baskırlar (3). miRNA'ların mRNA hedeflerine bağlanmasıyla proteine translasyon baskılanır. Bazı durumlarda, RNAi'ye benzer bir süreç vasıtasıyla miRNA'nın bağlanması yoluyla dsRNA'nın oluşumu mRNA transkriptinin degradasyonunu tetikler, oysa diğer durumlarda miRNA mRNA'yı degrade etmeden proteine translasyonunu durdurur. Çünkü miRNA'ların çoğu kısmi komplementer olarak gen fonksiyonunu baskırlar; bir miRNA birden çok mRNA'yı hedef alabilir ve birçok miRNA aynı mRNA'yı hedef alabilir ve böylece çeşitli doku ve hücrelerde gen ifadesinin yoğunluğu koordine edilir. Bu durum, miRNA-mRNA arasındaki ağların, tanımlanmasının ve tek bir miRNA'nın fonksiyonunun tanımlanabilmesinin zor ve karmaşık olabileceği anlamına gelmektedir (3). Bu nedenle, miRNA'lar protein kodlayan genlerin ince ayarında belirli bir fonksiyona sahiptir. Gerçekten de miRNA'ların keşfi genomun ötesinde genlerin nasıl düzenlendiğini anlamamızı sağlamıştır (4)

Bir hücredeki miRNA'ların yaklaşık 200 mRNA'nın fonksiyonunu düzenleyebileceği gösterilmiştir. miRNA'lar insan kaynaklı protein kodlayıcı genlerin yaklaşık% 60'ını düzenleyebilir ve birçok miRNA, CpG adalarında metilasyon veya histon modifikasyonları veya ikisi tarafından epigenetik olarak ayarlanır (12).

### 2.1.2.3.1.2. İtronik miRNA'lar

Bazı küçük düzenleyici RNA'lar intronik RNA parçalarından üretilmektedir. Örneğin, snoRNA'lar ribozomal proteinleri nükleolar proteinleri kodlayan genlerin intronik segmentlerinden üretilirler. Buna ek olarak bazı küçük RNA'lar ekzonları protein kodlama kapasitesini kaybetmiş genlerden sentezlenmektedir. Bu tip intronların işlenmesinde RNase III-ilişkili enzimler, eksonükleolitik kırma ve muhtemelen RNA-aracılı bölünmeye ihtiyaç duyulur. Bu yüzden intronik miRNA, protein kodlayan intronlardan işlenen miRNA'ların yeni bir sınıfıdır (4).

İtronik miRNA'lar ve önceden tanımlanan intergenik miRNA'lar arasındaki en büyük fark şudur; intronik miRNA'ların biyogenezinde Pol-II ve spliceosomal bileşenlere gerek duyulmaktadır.

Hem intronik hem intergenik miRNA'lar RNA interferans-ilişkili gen susturulmasının etkileyicisi olarak bilinen ve RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) olarak adlandırılan aynı oluşum sürecini paylaşabilirler (30, 31).

İtronik miRNA'ların aşağıdaki şartları yerine getirmesi gerekir. Birincisi, kodlanan gen transkripti ile aynı promotörü paylaşmalıdırlar.

İkinci olarak, proteine kodlanmayan bölgede lokalize olmalıdırlar. Üçüncüsü, kodlanan gen ile eş zamanlı transkribe olup intronların kesilip çıkarılma süreci ile transkriptten çıkmalı ve olgun miRNA'yı oluşturmalıdır(4).

Şu anda tanımlanan miRNA'ların bazıları, genin intron bölgesinden kodlanır ancak, proteine kodlanacak transkriptin tersine bir yönlendirme içindedirler. Bu miRNA'lar proteine kodlanacak gen transkripti ile aynı promotörü paylaşmadıklarından ve aynı transkriptten kesilip çıkarılmadıklarından dolayı bu miRNA'ların intronik miRNA'lar olduğu düşünülmemektedir. Bu miRNA'ların promotörleri antisense iplikte lokalizedir, muhtemelen bu transkript antisense miRNA için potansiyel bir hedef olarak kullanılmaktadır. Bu gibi miRNA'lara en güzel örnek genin intronunun antisense bölgesinde lokalize bir intergenik miRNA olan let-7c'dir (4).

### 2.1.2.3.1.3. Transpozon ve İtronik miRNA'lar

İntronik ve diğerkodlanmayan RNA'lar, ökaryotlarda gen ekspresyonunu regüle ederler. Bakteri ve organellerin genomlarındaki, Grup II intronlar retrotranspozan elementleri içerirler. Retrotranspozan elemanlar bu tip intronları mobil hale getirirler. Dolayısıyla, bu intronlar ters olarak doğrudan bir DNA hedef bölgesine eklenirler ve ardından ters transkribe olurlar. DNA'ya yerleştirildikten sonra, konakçıya zararı minimuma indirmek için genin transkriptinden çıkarlar (4).

Evrimsel bir bakış açısı ile transpozonlar büyük olasılıkla çok eski ve ortak bir ata genomuna sahiptirler. Tıpkı parazitler gibi bencilce ve birkaç kez konak genomuna girerler. Transpozonların bu özellikleri retrovirüslere benzerler. Çok fazla transpozon aktivitesi genomu yok edici derecede zarar verebilir. Transpozonların ve virüslerin aktivitelerine karşı tepki vermek için, bazı organizmalar bir mekanizma geliştirerek transpozonların ve virüslerin aktivitesini ortadan kaldırır veya susturur. Örneğin, bakteriler genomları ile birleşik retrovirüs ve transpozonları çıkarmak için sıklıkla kendi genlerini silerler. Ökaryotlarda ise transpozon aktivitesini azaltma yolu miRNA'lardır. miRNA, immun sistemde antikor üretiminin çeşitliliğine ya da daha önce geçirilmiş hastalık ile mücadele mekanizmasına benzer şekilde virüslere karşı direnç geliştirebilirler (4).

Aynı zigottan köken alan ikizler DNA'larında aynı genetik bilgiyi taşırlar. Tek yumurta ikizleri arasındaki herhangi bir farklılık, yaşamın ilerleyen zamanlarında genetik değişiklikler yerine çoğunlukla çevresel etkilerden kaynaklanır. Fakat monozigotik ikizler aynı DNA dizisinin tümünü paylaşmayabilirler. Kadın monozigotik ikizler, X kromozomunun rasgele olarak inaktive olması sebebiyle birbirlerinden farklı olabilirler. Yani, X'e bağlı herhangi bir hastalık rastgele inaktivasyon nedeniyle bir ikizde ağır kliniğe sebep olurken diğeri etkilenmeden kalabilir. Monozigotik ikizlerdeki bu heterojen belirtilerin sebebi miRNA'lar ya da intronik genlerin insersiyonudur (4).

Sınıf II transpozonlar kopyala-yapıştır özelliğine sahiptirler. Transpozozas enzimi transpozonun sonuna bağlanır ve kesildikten sonra yapışkan uç oluşacak şekilde genomu hedef alır. Bu iki bileşen ligaz enzimi tarafından birleştirilir. Transpozonlar, genoma çoklu kopyalarını bırakarak genomun boyutunu arttırırlar. Transpozonlar, miRNA'lar aracılığıyla gen düzenlenmesini sağlayarak genom için avantaj sağlarlar. Transpozonlar, protein kodlayan genin intronuna girdiklerinde, uygun şartlar sağlanırsa transpozonların bir kısmı ya da onların ikincil yapıları intronik miRNA'ları oluşturabilirler (4).

### 2.1.2.3.1.2. miRNA BİYOGENEZİ ve MEKANİZMASI

miRNA'lar, genomun tamamına dağılmış durumdadır. Çoğu ekzonik ya da intronik bölgelerde lokalizedir (32). miRNA'ların bir kısmının biyogenezini RNA polimeraz II (33) diğerlerinin ise RNA polimeraz III enzimi tarafından transkribe olmalarıyla başlar (33, 34).

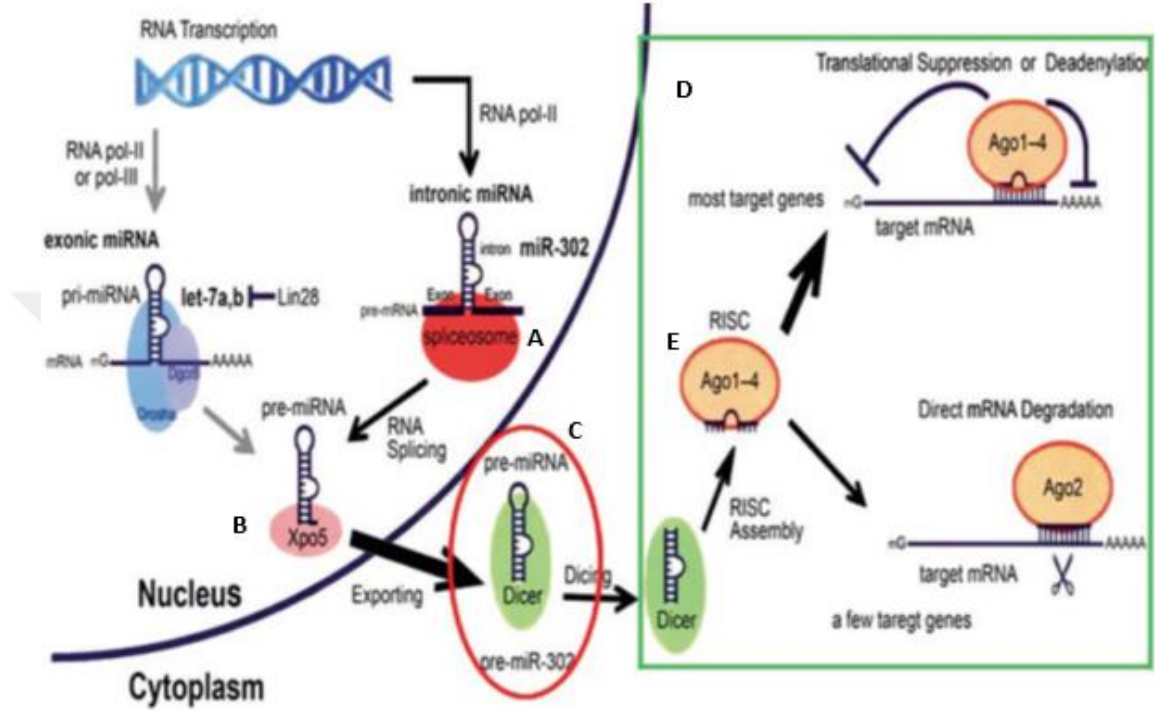
Omurgalılarda miRNA biyogenezini beş adımdan oluşmaktadır. İlki, miRNA'lar RNA polimeraz II tarafından DNA'dan (33, 35) primer miRNA'ya (*pri-miRNA*'lar, 300-1000 bç) transkribe olurlar. İkinci adım, uzun *pre-miRNA*'lar Drosha benzeri endonükleazlar ve Drosha mikroişlemci kompleksi (DGCR8) ve/veya splayozomal bileşenler tarafından işlenirler. *pre-miRNA*'lar, ardışık bir ya da daha fazla miRNA'yı bünyesinden ayırmak için çift iplikli RNA ile kusurlu eşleşen bölgeleri içeren bir özel saç tokası ikincil yapısına sahiptir. Bu adım ekzon ya da intronda lokalize *pri-miRNA*'nın kökenine bağlıdır (28, 35). DGCR8, stem-loop saç tokası yapısını tanır, ayırır ve çekirdekte öncül miRNA ya da *pre-miRNA*'yı (70-90 bç) serbest bırakır. Üçüncü adım, *pre-miRNA* Ran-GTP ve bir reseptör olan Exportin-5 tarafından çekirdekte atılır (29, 36). Dördüncü adım, sitoplazmada Dicer benzeri endonükleazlar, 22 bç'lik bir miRNA dubleksini oluşturmak için RNaz III enzimi (Dicer) ve kofaktörü olan transaktivasyona duyarlı RNA-bağlayıcı protein (TRBP/TARBP2) tarafından *pre-miRNA*'ya ayırır. İki iplikten sadece biri (kılavuz ya da öncü iplik) miRNA'dır; diğer kopyasına miRNA (yolcu iplik) denir. Olgun miRNA, hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesi ile arasında kısmi tamamlayıcılık temelli olarak translasyonu bloke edebilir. Son olarak, olgun miRNA, RNA interferans ilişkili gen susturmasını gerçekleştiren RISC faktörünü oluşturan bir ribonükleoprotein ile birleşir (37, 38). miRNA'lar bazı genleri regüle ederek RNA'nın susturulmasıyla ilgili kendi mekanizmaları da dahil olmak üzere negatif geribildirim kendinden kontrollü bir şekilde düzenlerler (39, 40) (**Şekil 4**).

Geniş anlamda, intronik miRNA'nın hem 5' UTR hem de 3' UTR kısımları intron uzantısı olarak görülebilir; ancak, onların işlenmesi, translasyon sırasında çerçeve içi intron olarak adlandırılan proteine kodlanan iki ekzon arasındaki intronlardan farklıdır. Çerçeve içi intronların aslında çok büyük ve işe yaramayan bölgeler olduğu düşünülüyordu, fakat intronik miRNA'ların keşfi ile bu basmakalıp yanılığın terk edilmiştir.

İntronik miRNA'larda olduğu gibi *pre-miRNA* benzeri hairpinler oluşturan Drosha / DGCR8 bağımsız yollar da vardır. Bu standart dışı miRNA'lar Ago-1-4'e dahil



edilmişlerdir. Standart dışı miRNA'lara diğer bir örnek olan *Pri-mir-451* Drosha/DGCR8 tarafından 18 bç'lik *pre-mir-451*'e işlenip Ago2'ye dahil olur (41). Son zamanlarda, Drosha/DGCR8 ve Dicer tarafından işlenmekten kaçan agotronların standart miRNA biyogenez yolacağını atlayarak miRNA benzeri türler oluşturdukları görülmüştür (42).



**Şekil 4.** La ribonükleoprotein domen ailesi üyesi 7 (LARP7 veya PIP7S) geninin intronik bölgesinden kodlanan bir intronic mikroRNA olan miR-302'nin biyogenezini.

miR-302'nin biyogenezini sırasında, birincil miRNA öncülleri (*pri-miRNA*) ilk olarak tip II RNA polimerazlar (RNA) tarafından LARP7 geni transkriptleri ile birlikte transkribe edilir. Daha sonra, *pri-miR-302* hücresel splayozomlar (Şekil 4-A) tarafından saç tokası benzeri pre-miRNA'yı (Şekil 4-C) oluşturmak için kesilip çıkarılır. Sonrasında, miRNA öncülleri Exportin-5 (Xpo5) (Şekil 4-B) tarafından çekirdekten ihraç edilmektedir. Sitoplazmada, Dicer-benzeri RNaseIII endoribonükleazlar tarafından olgun miR-302'ye (21-23 nt) işlenir. Sonuç olarak, olgun miR-302'ler, RNA kaynaklı susturma kompleksinde (RISC) (Şekil 4-E) argonaute proteinleri (Ago1-4) ile bir araya gelerek spesifik olarak gen susturma işlemini gerçekleştirirler (Şekil 4-D) (4).

#### 2.1.2.3.1.2.1. RISC Kompleksinin Oluşumu

RISC veya RNA kaynaklı susturucu kompleksin, birçok ilişkili proteinle karmaşık bir ilişkisi vardır. Bu proteinler, bir RNA ve bir RNA'ya bağlanan protein ile birleşen ribonükleoprotein olduklarından dolayı RNA içerirler. Bu şekilde bir ribonükleoprotein, miRNA ya da siRNA da olduğu gibi tek iplikli RNA fragmentinin bir ipliği ile birleşir. Tek iplik, mRNA transkripti üzerindeki komplementerini tanımakta RISC için kalıp olarak işlev görür. RISC kompleksi içindeki proteinlerden birisi, daha az kararlı olan 5' ucu seçen ve RISC'e entegre olup mRNA'nın bölünmesini aktive eden Argonat idi (43).

Argonat proteini üzerine küçük RNA'ların yüklenmesinde ATP hidrolizi kadar birkaç yardımcı faktörün desteğiyle olur (44). mRNA'yı hedef almak için RISC içine dsRNA'yı yüklemek için gerekli esensiyel yapıyı oluşturan RISC yükleme kompleksi, dicer, TRBP (İnsan immün yetmezlik virüsü transaktivasyonuna yanıt RNA-bağlayıcı protein) ve Argonat 2'den oluşmaktadır. Daha önceden tarif edildiği gibi Dicer, doğrudan RNAi'ye yüklü dsRNA fragmenti üreten bir RNase III endonükleazıdır. TRBP proteini üç çift iplikçikli RNA bağlama domaini taşımaktadır. Argonat 2 bir RNaz'dır ve RISC'in katalitik merkezinde yer alır. Argonat proteinin diğer üyeleri de küçük RNA'ları yükler (41).

miRNA dubleksleri, tercihen olgun miRNA'yı alıkoyup yıldız iplikçığı çıkaran Argonat proteinlerine yüklenir. Ago proteinleri miRNA'ların rehberliğinde transkriptleri hedef alıp destabilize ve/veya translasyonel baskılamaya aracılık ederler (45). Hayvan miRNA/Ago kompleksi tercihen 5' uçtaki 2-8 nükleotit uzunluğundaki komplementer sayesinde hedefi tanır (46, 47) Argonat proteininin, Prolil-hidroksilasyonu, fosforilasyon, ubiquitination ve poly-ADP-ribosilasyonu gibi posttranslasyonel değişiklikleri global ya da spesifik seviyede miRNA aktivitesini değiştirebilir.

#### **2.1.2.3.1.2.2. RISC Montajının Diğer Bazı Molekülleri**

Birçok faktör miRNA'ların biyojenezini ve mekanizmasını değiştirebilir. RISC montajının çoklu ve sıralı adımları, ısı şoku proteinlerinin (Hsc70 / Hsp90) şaperon görevi görmesine yardımcı olur (48). GW182 (molekül ağırlığı ve Glisin ve triptofan tekrarlarının varlığı nedeniyle bu şekilde adlandırılmış) Argonat proteini ile etkileşir ve miRNA aracılı gen susturulması için gereklidir (49). TRBP' ve Dicer ile TRBP arasındaki arayüze benzer şekilde, memeli miRNA'larının düzenlenmesinde uygun miRNA uzunluğu ve iplik seçimine katkıda bulunan PACT,(kinaz R-aktive edici protein) Dicer-PACT komplekslerini oluşturur (50). ADAR1 (RNA'ya özgü adenosin deaminaz 1) çift

iplikli RNA'da hidrolitik deaminasyon ile adenosini inosine katalize eder. Sonuç olarak, ADAR1 RNA kararlılığını, splicing ve miRNA-hedef etkileşimini etkileyerek miRNA'ları düzenleyebilir (51). Diğer yandan, bazı mRNA'lar ADAR1'i düzenleyebilir. Muhtemelen, ADAR1'in aşırı ifade olması miRNA ile çifttarafli bir feedback döngüsü oluşturur (52). PARN [poli (A) spesifik ribonükleaz], p53 ifadesinin düzenlenmesinin arkasındaki, kontrollü miRNA bağımlı mRNA yok edilmesinde önemli bir rol oynayarak kodlanmayan birçok RNA'nın biyogenezini kolaylaştırır (53, 54). Dinamik olarak gelişen bir Dicer domain olan N-terminal helikaz, ATPase aktivitesinin aracılık ettiği bir mekanizma aracılığıyla Dicer aile proteinleri ile RNA uzunluğunu ayırt etmek için miRNA hedeflerinin tanınması için kendi kendine dimerize olabilir (55, 56). eIF1A, Ago2 merkezli RNA-kaynaklı susturucu komplekslerin (RISC) ve Ago2'ye bağlı miRNA biyogenezinin yeni bir bileşenidir (57).

### **2.1.2.3.1.2.3. Gen İfadesinin Susturulması**

miRNA'lar, mRNA'yı spesifik olarak tanımak için RISC'i yönlendirirler ve RISC hedef mRNA'lara bağlandığı zaman miRNA-mRNA arasında Watson-Crick baz eşleşmesi sayesinde yüksek derecede bir complementasyon (6-8 nt) oluşur ve mRNA'nın translasyonel olarak baskılanması ile sonuçlanır (58). Alternatif olarak, merkezi uyumsuzluklar bozulmayı önler, hedef mRNA'lara RISC'lerin bağlanmasının olası mekanizmaları ile translasyonel baskılanma kolaylaştırır ve tanıma aşamasında ya da 60S ribozomal iyileşme sırasında cap bölgesinin takılması baskılar. RISC, mRNA'yı sirküler olmaktan ya da RISC'in hedef mRNA'ya bağlanmasından da koruyabilir ayrıca, RISC ribozomdan erken ayrılmayı kolaylaştırarak başlangıç sonrası evrede translasyonu baskılayabilir (59).

### **2.1.2.3.1.3. miR-124-3p**

miR-124 mikroRNA öncüsü, sineklerde (60), nematod solucanlarında (61), farede ve insanda tespit edilen küçük bir kodlanmayan RNA molekülüdür (62). miR-124, nöronal hücrelerde bolca ifade olur. Nöral hücrelerde miR-124 ekspresyonunu değiştirmeye yönelik deneyler farklılaşmayı etkilemiş görünmemektedir (63). Bununla birlikte, diğer sonuçlar nöronal farklılaşma sırasında miR-124 için bir rol tarif ettiğinden, bu sonuçlar tartışmalıdır (64).

miR-124 fare beyninden (62) ve embriyonik kök hücrelerden (65) birbirinden bağımsız gruplar halinde klonlanmıştır. Özetle; miR-124'ün (7) Kromozom 14 üzerinde mir-124-

1 (MI0000716), kromozom 3 üzerinde mir-124-2 (MI0000717) ve kromozom 2 üzerinde mir-124-3 (daha önce miR-124a olarak bilinen, MI0000150) olmak üzere önceden tahmin edilmiş 3 saç tokası modeli vardır. Hepsi birbiriyle yakından ilişkili insan homologlarına sahiptir (MI0000443, MI0000444 ve MI0000445). miR-124-3p sekansı **Tablo 1**'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** miR-124-5p ve miR124-3p'nin dizisi.

miRNA Adı	Sekansı	MIMAT Kodu
mmu-miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	MIMAT0000134

## 2.2. SİNİR SİSTEMİ

### 2.2.1. SİNİR SİSTEMİ HÜCRELERİ

Sinir sistemi iki ana hücre sınıfından oluşur; sinir hücreleri/nöronlar ve glial hücreler/glia. Nöron ve glia hücreleri birçok ortak özelliği taşırlar. Ancak, nöronlar hassas ve hızlı bir şekilde vücudun uzak bölgelerindeki diğer hücreler ile iletişim kurarlar. Nöronlara bu yeteneği şu iki özellik sağlar. Birincisi, nöronlar yüksek derecede morfolojik ve işlevsel asimetri gösterirler (66). Her bir nöron kısa, çok sayıdaki dentritleri ve uzun tek bir aksone sahiptir (67). Uyarıyı dentritler alırken, aksonlar bir diğerine uyarıyı taşırlar. İkincisi, nöronlar hem elektriksel hem de kimyasal olarak uyarılabilirler. Nöronların hücre zarı özel proteinler — iyon kanalları ve reseptörler — içerirler bu sayede, özel inorganik iyonların akışı kolaylaşır ve böylece zar boyunca voltajı değiştirecek olan elektrik akımı meydana getirilmiş olur. Yükteki bu değişiklikler akson boyunca aksiyon potansiyelleri şeklinde bir depolarizasyon dalgası oluşturabilir böylece her zamanki gibi bir sinyal nöron içinde dolaşmış olur. Glia ise daha az uyarılabilir, ancak membranları proteinlerin yanı sıra iyonların alımını kolaylaştıran transporter proteinler de içerir. Bu transporter proteinler hücre dışı boşluktan nörotransmitter molekülleri taşıyarak nöronal fonksiyonu düzenler (66).

Yaklaşık olarak 100 farklı tipte nöron vardır. Bu sitolojik çeşitlilik de molekülerde seviyede görülür. Nöronların hepsi aynı genleri taşırsalar da, her birinin ekspresyonu kısıtlı olabilir, böylece sadece belirli moleküller üretilir. Büyük oranda bu ekspresyon

hücrenin gelişimsel sürecine bağlıdır. Aslında her bir hücre kendi yaptığı moleküller dizisidir (66).

### 2.2.1.1. NÖRONLAR

Nöronlar, sinir sisteminin sinyal üniteleridir. Tipik bir nöron, morfolojik olarak tanımlanmış dört bölgeden oluşur: (1) hücre gövdesi, (2) dendritler, (3) akson, ve (4) presinaptik terminaller (**Şekil 5**). Her bölgenin sinyal üretmede ayrı bir rolü vardır ve diğer sinir hücreleri ile iletişim kurarlar. Hücre gövdesi veya soma hücrenin metabolik merkezidir. Hücrenin genlerini taşıyan çekirdeği, endoplazmik retikulumu ve hücrenin proteinlerini sentezleyen çekirdek uzantısını kapsar. Hücre gövdesi birkaç kısa dendrit ve uzun tek bir akson olmak üzere iki farklı uzantı taşır. Dendritler, ağaç gibi dallanmıştır ve diğer sinirlerden gelen sinyalleri alır. Aksonlar ise hücre gövdesinden biraz uzağa uzanır ve sinyali diğer sinirlere taşır. Bir akson 0,1 mm ila 2 m arasında değişen mesafelerde elektrik sinyallerini iletebilir. Aksiyon potansiyeli olarak adlandırılan bu elektrik sinyalleri, başlangıç segmenti olarak adlandırılan aksonun başlangıcına yakın özel tetikleme bölgesinde başlar (66).

Aksiyon potansiyelinin hızını arttırmak için aksonlar miyelin kılıf adı verilen bir yağ maddesi ile yalıtım sağlanacak şekilde sarılır. Aksiyon potansiyelinin rejenere olduğu aksonun yalıtılmış noktalarında kılıf, Ranvier boğumları tarafından düzenli aralıklar ile kesilir (66).

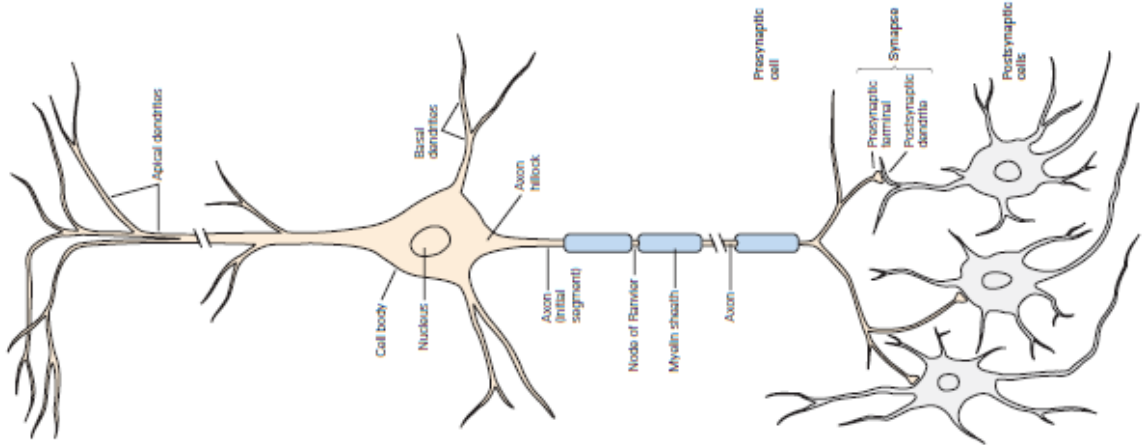
Diğer nöronlar ile sinaps denilen özel iletişim bölgelerinde iletişim kurmak için aksonlar ince dallara bölünür. Bir sinyali transfer eden sinir hücresi presinaptik hücre olarak adlandırılırken sinyali alan hücreye ise post sinaptik hücre denir. Presinaptik hücreler sinyali, aksonun dalları üzerinde olup presinaptik uç ya da sinir ucu denilen ve özel olarak genişleyen bölgelerinden iletir. Presinaptik ve postsinaptik nöronlar sinaptik yarığın içinde ve çok dar bir alanda birbirinden ayrılırlar. Presinaptik uçların çoğu postsinaptik nöronların dentriti ile sonlanır, fakat uçlar hücre gövdesi ya da daha az sıklıkla postsinaptik nöronların aksonunun başlangıç ya da bitişi ile de sonlanabilir (66).

Nöronlar unipolar, bipolar ve multipolar olmak üzere üç büyük grupta sınıflandırılmıştır (**Şekil 6**). Unipolar nöronlar, tek bir birincil işlemde geçerek çok sayıda dallanma oluşturan en basit nöronlardır. Bir dalı akson olarak hizmet ederken diğer dalı alıcı yapılar olarak işlev görür. Bu tip hücreler omurgalılarının otonom sinir sisteminde baskın sayıdadır. Bipolar nöronlar çevreden sinyali alan bir dentritik yapı ve MSS'ye bilgiyi

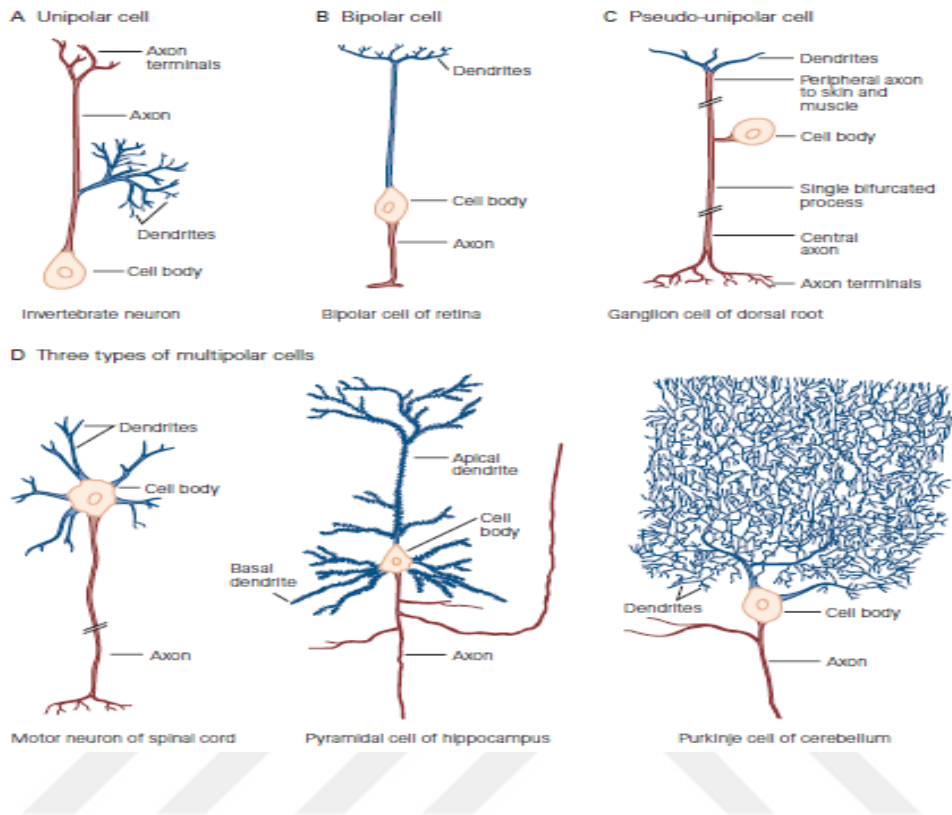
taşıyan bir akson olmak üzere iki farklı süreçten oluşan oval şekilli hücrelerdir. Duyu nöronlarının çoğu bipolardır. Dokunma, basınç ağrıyla omuriliğe ileten resöptör nöronlar psödo-unipolar olarak adlandırılan bipolar nöronların bir varyantıdır (66).

Multipolar nöronlar omurgalıların sinir sisteminde baskın sayıdadır. Tipik bir akson ve hücre gövdesinin etrafının çeşitli noktalarından çıkan çok sayıda dentritik yapıya sahip olan multipolar nöronların şekilleri çok farklıdır. Genellikle dallanma derecesi, diğer nöronların üzerlerinde yaptıkları sinaptik temaslar ile koreledir. Bir spinal duyu nöronu, dentritler 9000, hücre gövdesi 1000 toplamda 100000 iletiyi alır. Beyincikte bir Purkinje hücresinin dentritik ağacı, bir milyon iletiyi alacak kadar büyük ve gürdür (66).

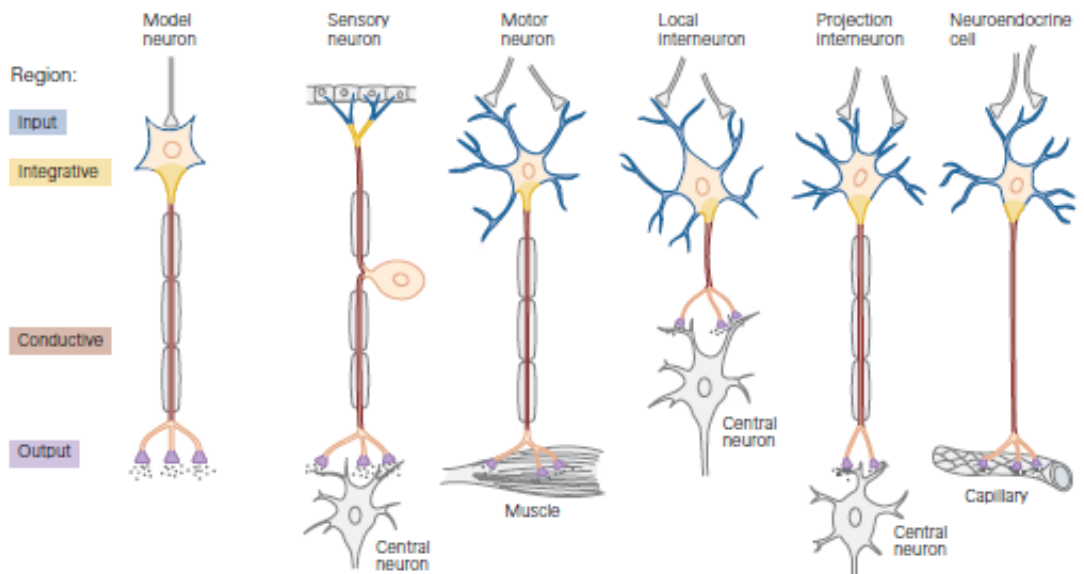
Sinir hücreleri duyu nöronları, motor nöronlar ve ara nöronlar olmak üzere fonksiyonel olarak 3 gruba ayrılırlar (Şekil 7). Duyu nöronları vücudun çevresel algılayıcılarından bilgiyi alır ve sinir sistemine taşır. Bazı birincil duysal nöronlar afferent nöronlar olarak da adlandırılır. Afferent terimi, bilgi algılanırsa da algılanmasa da bilginin çevreden sinir sistemine alınmasını sağlar. Motor nöronlar komutları beyin ya da omurilikten kaslara ya da bezlere taşır. Ara nöronlar çok sayıdadır, tasarım ve yerel olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Tasarım ara nöronlar beyinin bir bölgesinden diğer bölgesi gibi önemli mesafelere sinyali iletmek için uzun aksonlara sahipken yerel ara nöronlar birbirine yakın nöronlar arası iletişimi sağlamak için kısa aksonlara sahiptir (66).



Şekil 5. Nöron Yapısı ve Kısımları (66)



**Şekil 6.** Nöronlar hücre gövdesinden köken alan çıkıntıların sayısına göre unipolar, bipolar veya multipolar olarak sınıflandırılır (66).



**Şekil 7.** Çoğu nöron, şekline bakılmaksızın, farklı sinyal türlerinin üretildiği dört fonksiyonel bölgeye sahiptir. Çoğu nöronun fonksiyonel organizasyonu, bir model nöron üzerinde şematik olarak gösterilmiştir.

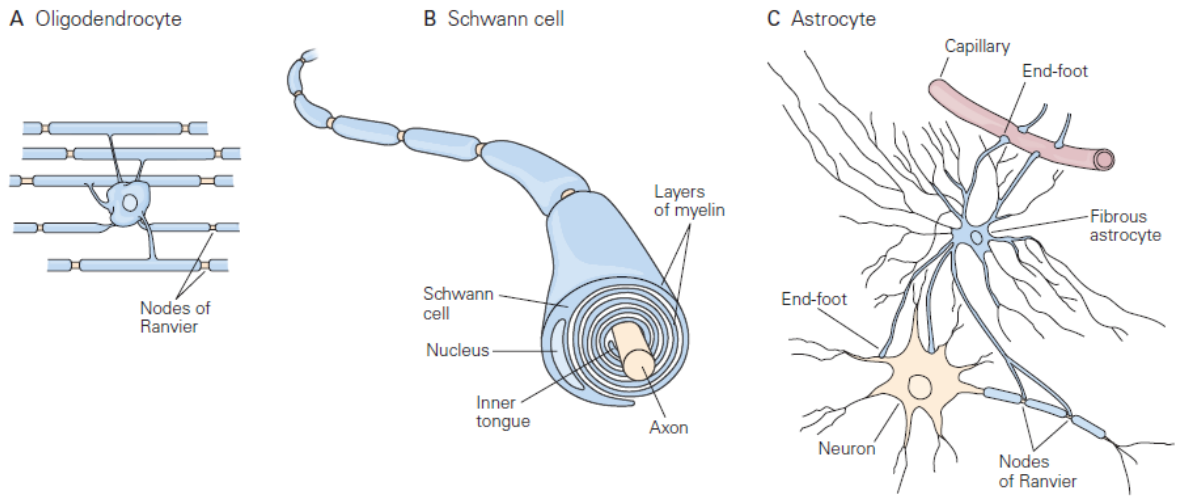
Giriş sinyali, bütünleyici ve iletken sinyaller elektrikseldir ve hücreye bütünleşiktir, oysa çıkış sinyali, hücre tarafından sinaptik yarığa atılan bir kimyasal maddedir. Tüm nöronlar tüm bu özellikleri paylaşmaz; Örneğin, lokal interneuronlar çoğu kez iletken bir bileşenden yoksundur (66)

### 2.2.1.2. GLİA HÜCRELERİ

Omurgalıların MSS’de glia hücreleri, nöronlardan 2-10 kat daha çok sayıdadır. Bu hücrelerin adı Yunanca tutkal kelimesinden köken almaktadır. Glia hücreleri nöronun gövdesi, akson ve dentritinin etrafını sarar. Glialar morfolojik olarak nöronlardan farklıdır, dentrit ve akson oluşturmazlar. Ayrıca işlevsel olarak da farklıdırlar. Aynı emrionik öncü hücrelerden oluşsalar da nöronlar ile aynı zar özelliklerine sahip değillerdir. Yani elektrikselsel olarak uyarılmazlar (66).

Omurgalı sinir sisteminde glialar iki ana sınıfa ayrılabilir: mikrogliya ve makrogliya. Mikrogliya hücreleri, yaralanma, enfeksiyon ya da dejeneratif hastalıklar söz konusu olduğunda fagosit olan ve antijen sunan immun sistem hücreleridir. Makrogliya hücrelerinin üç ana türü vardır: oligodendrositler, Schwann hücreleri ve astrositler. İnsan beyninin tüm hücrelerinin % 80’i makrogliya’dır; bunların da yaklaşık olarak yarısı oligodendrosit yarısı astrositlerdir (**Şekil 8**). Oligodendrositler ve Schwann hücreleri, nispeten az işlem görmüş küçük hücrelerdir (66). Oligodendrositler MSS’de bulunurken Schwann hücreleri çevresel sinir sisteminde bulunur. Her iki hücre de aksonun zarını sıkıca saran miyelin kılıfı oluşturur (68). Astrositler, glial hücrelerin üçüncü ana sınıfını oluşturur, düzensiz ve kabaca yıldız şekilli olmasından dolayı bu ismi almıştır. İki ana tipi vardır; protoplazmik astrositler gri maddede bulunurken Fiberli astrositler beyaz maddede bulunur. Protoplazmik astrositler sinir hücresi gövdeleri ve sinapsları örterken, Fiberli astrositler aksonların Ranvier düğümlerine temas eder. Astrositlerin fonksiyonları hala gizemini korumaktadır (66).





Şekil 8. Başlıca glia hücre tipleri.

### 2.2.2. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ

Modern nörobilim önemli ölçüde şu iki ilkeye dayanmaktadır. Birincisi beyin fonksiyonel olarak özel alanlar şeklinde organize olmuştur. İkincisi omurgalı sinir sisteminin farklı yerlerindeki nöronlar aslında tüm sinir sistemindeki nöronlar ile oldukça benzerdir. Beyinin farklı bölgelerini fonksiyonel olarak birbirinden ayıran ya da bir beyini diğerinden ayıran şey aslında her birindeki nöron sayısı ve nöron tipidir (66). MSS beyin ve omurilikten oluşur.

#### 2.2.2.1. OMURİLİK

Omurilik MSS'nin en kaudal ve birçok açıdan en basit kısmıdır. Kafatasının tabanından ilk bel omuruna doğru uzanır. Beden ve uzuvların kas, eklem, derisinden duyuusal bilgiyi alır. Uzunluğu boyunca omurilik büyüklüğü ve şekli gövde ya da uzuvlardaki motor sinirlerin ortaya çıkıp çıkmamasına bağlı olarak değişir (66).

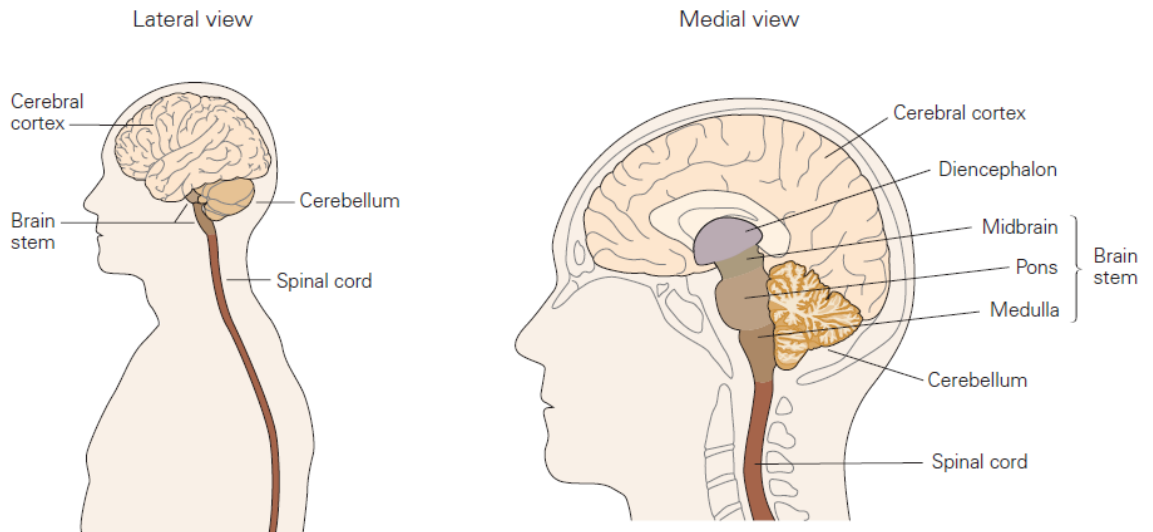
Omurilik, beyaz madde ve onu çevreleyen gri madde olmak üzere iki kısımdan oluşur. Sinir hücre gövdelerini kapsayan gri madde dorsal ve ventral boynuzdan ( gri madde enine kesitlerde H şeklinde görüldüğü için) oluşur. Dorsal boynuz çevreden verileri alan sistemli bir duyu nöronu düzenlemesini kapsarken ventral boynuz bir grup ara ve motor nöronu kapsar. Motor nöronların aksonları spesifik kaslara ulaşır. Beyaz madde, miyelinli aksınların uzunlamasına yükselen ve alçalan sistemlerinin bir parçasından ibarettir.

Yükselen yolaklar duyuşsal bilgiyi beyine taşıırken, alçalan yolaklar motor komutları ve ayarlayıcı sinyalleri beyinden kasa taşıır (66).

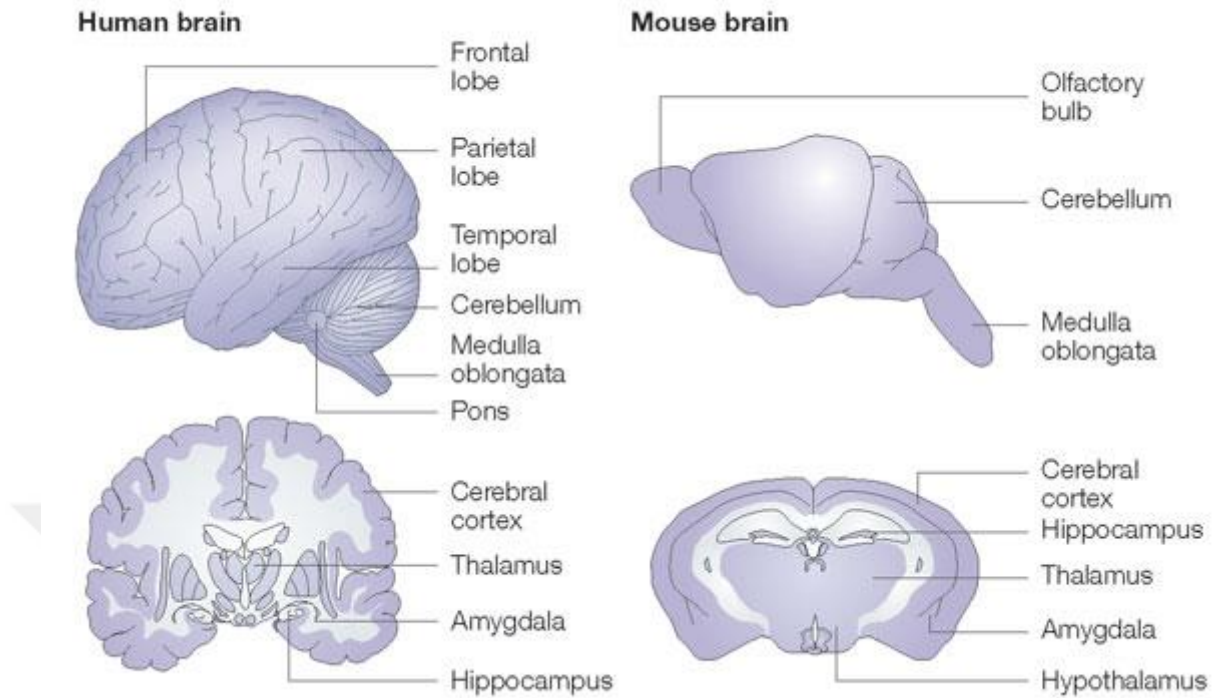
Omurilikten gelen sinir lifleri, her biri bir duyu ve bir motor bölgesine sahip 31 spinal sinir tarafından sarılır. Duyu bölgesi (dorsal kök) kas ve deriden omuriliğe bilgi taşıır ve kordonun dorsal yönünde sonlanır. Farklı akson sınıfları içindeki dorsal kök ağrı, sıcaklık, dokunma ve iç organlardaki duyuşsal bilgiyi taşıır. Motor bölge (ventral kök) kordonun ventral yönünden ortaya çıkar ve kaslara giden motor nöronların aksonlarını içerir. Omuriliğin belirli hizalarındaki ventral kökler sempatik ve parasempatik aksonları içerir. Omuriliğin motor nöronları; motor aktivitesini kontrol eden tüm yüksek beyin seviyelerinde harekete geçmesi zorunlu olan “nihai ortak yol”u kapsar (66).

#### 2.2.2.2. BEYİN

Omuriliğe rostral uzanan beyin, 6 bölgeden oluşur: medulla, pons, orta beyin, beyincik (cerebellum), diensefalon ve serebral hemisferler veya telencephalon (**Şekil 9**). Bu bölümlerin her biri beyin her iki yarıküresinde hafif bilateral farklılıklar ile bulunur. Altı bölümün her biri anatomik ve fonksiyonel olarak farklı alana bölünmüştür. Beynin anatomisi son derece karmaşıktır ve birçok parçasının yapısı ve ara bağlantıları hala tam olarak anlaşılammıştır (66). **Şekil 10**'da fare ve insan beyinin kısımları gösterilmiştir.



**Şekil 9.** MSS'nin başlıca bölümleri. Çizimler, beyin sol tarafının ve beyin sağ tarafının medial yüzeyinin yandan görünüşünü göstermektedir (69).



**Şekil 10.** İnsan ve Fare beyinin karşılaştırmalı görüntüsü (69).

#### 2.2.2.2.1. MEDULLA

Beynin en kaudal kısmı olan medulla omuriliğin doğrudan uzantısıdır ve hem organizasyon hem de işlevsel olarak omuriliğe benzerdir. Medulladaki nöronal gruplar kan basıncı ve solunumun düzenlenmesini sağlar. Ayrıca, medulla tat alma, işitme, boyun ve yüz kaslarının kontrolü yanında dengenin korunmasına aracılık eden yolların ilkin bileşenleri olan nöronal grupları da kapsar (66).

#### 2.2.2.2.2. PONS

Medulla oblongata ve talamusu birbirine bağlayan beyin sapının bir parçasıdır. Ponsun ventral kısmı beyin kabuğundan beyinciğe gelen duyu ve hareket ile ilgili bilgiyi alan nöron gruplarını (pontin çekirdekleri) kapsar. Ponsun dorsal kısmı solunum, tat ve uyku için gerekli yapıları içerir (66).

#### 2.2.2.2.3. ORTA BEYİN

Beyin sapının en küçük kısmı olan orta beyin, ponslara rostral uzanır. Orta beyindeki çekirdekler motor sistem bileşenleri (özellikle beyincik, bazal ganglion ve beyin yarım küreleri) arasında önemli bir bağlantı sağlar. Örneğin, substantia nigra istemli hareketleri düzenleyen bazal ganglionun bir kısmına önemli girdi sağlar. Ayrıca, orta

beyin işitme ve görme sisteminin bileşenlerini de içerir. Son olarak, orta beyinin birkaç bölgesi verir göz hareketlerini kontrol eden ekstraoküler kaslar ile bağlantılı yolları meydana getirir (66).

Beyin sapının beş farklı işlevi vardır. İlki, omurilik duyuya, gövde ve uzuvların motor kontrolüne aracılık ettiği zaman, beyin sapı baş boyun ve yüzün duyu ve motor kontrolüne aracılık eder. Beyin sapının duyuusal girişi ve motor çıkışı 31 spinal sinirin fonksiyon olarak analogu olan 12 kranial sinir tarafından taşınır. İkincisi, beyin sapı işitme, denge, tat alma gibi özelleşmiş bir kaç duyudan bilginin giriş yerini oluşturur. Üçüncüsü, beyin sapındaki özelleşmiş nöronlar örneğin kalp debisinde ve kan basıncındaki azalış, barsak kasılmasında artış ve gözbebeğinde küçülme gibi parasempatik kasılma ve gevşemelere aracılık eder. Dördüncüsü, beyin sapı MSS'nin diğer kısımlarına duyu ve motor bilgisini taşıyan yollardaki artış ve azalışı kapsar. Beşincisi, nöronlar nispeten yaygın bir ağ gibi beyin sapının çekirdeği boyunca dağılır (66).

#### **2.2.2.2.4. BEYİNCİK**

Beyincik pons üzerinde uzanır ve birkaç loba belirgin yarıklar ile ayrılmış durumdadır. Beyincik duruşu sağlamak ve baş, göz, omuz hareketlerinin koordinasyonu için önemlidir. Ayrıca, motor öğrenme becerisi ve motor çıkışının dk. ayarı içinde gereklidir. Yakın zamana kadar, beyincik tamamen bir motor yapısı gibi düşünülüyordu, fakat onun beyin kabuğu ile iletişimi hakkındaki yeni anatomik bilgiler ve fonksiyonel görüntüleme sistemleri gösterdi ki; beyincik dil gelişimi ve diğer bilişsel fonksiyonlar içinde gereklidir. Beyincik beyinin diğer tüm altbölümlerinden (beyin yarımküreleri de dahil) daha çok nöron içermektedir. Bununla birlikte beyinciğin, iç devresi sistemi iyi anlaşılmalıdır çünkü nispeten az sayıda nöronlu tipidir. Beyincik omurilikten somatik duyu hakkında bilgiyi, iç kulağın vestibüler organından denge hakkında bilgiyi ve pontin çekirdeği yoluyla beyin kabuğunun çeşitli kısımlarından motor ve duyu bilgisini alır (66).

#### **2.2.2.2.5. DIENSEFALON**

Diensefalon talamus ve hipotalamus olmak üzere iki büyük altbölüm içerir. Talamus beyin yarımkürelerinin duyu kısmına çevreden gelen duyuusal bilgisinin (koku alma dışında) yollarında temel bir bağlantıdır. Bir zamanlar sadece duyuusal bilgi için neokorteksi ziyaret eden bir merkezi olduğu düşünülüyordu, fakat hangi duyu bilgisinin neokortekse ulaştığı çok açıktır. Talamus hareket ve kavrama ile ilişkili olan beyin

kabuğunun kısımları ile beyincik ve bazal ganglionu bağlar. Retiküler oluşum gibi diencephalon da dikkat ve bilinç seviyelerinin artış/azalışı ile ilgili bölgelere sahiptir (66).

Hipotalamus talamusa ventral uzanır ve homeostazi, birkaç üreme davranışını düzenler. Örneğin somatik büyümede, yemede, içmede ve hipofiz bezinden salınan hormonlar tarafından düzenlenen anne davranışlarında önemli bir role sahiptir. Beyinde davranışların başlaması ve sürdürülmesinde temel bir bileşendir. Son olarak, hipotalamusta bir grup nöron suprakiazmatik nükleus, sirkadiyen ritim, gece/gündüz gibi döngüsel davranışları düzenler (66).

#### **2.2.2.2.6. BEYİN YARIMKÜRELERİ**

Beyin yarımküreleri insan beyininin en büyük kısmını oluşturmaktadır. Beyin kabuğundan ve üç derin-uzanan (bazal ganglion, amigdala ve hipokampal oluşum) yapıdan oluşur. Beyin yarımküreleri hafıza ve duygu da dahil bilişsel işlevlere sahiptir. Yarımkürenin medyal yüzeyi üzerinde görünür olan korpus kallozum ile iki yarımküre birbirine bağlıdır. Korpus kallozum esas olarak beyinin sağ ve sol benzer bölgelerini bağlayan büyük akson demetlerinden oluşan birleşme noktasının en büyüğüdür (66). Amigdala duygu, hiokampüs hafıza, bazal ganglion hareketin kontrolü hareketeye yönelik hafıza oluşumu ile alakadardır (69).

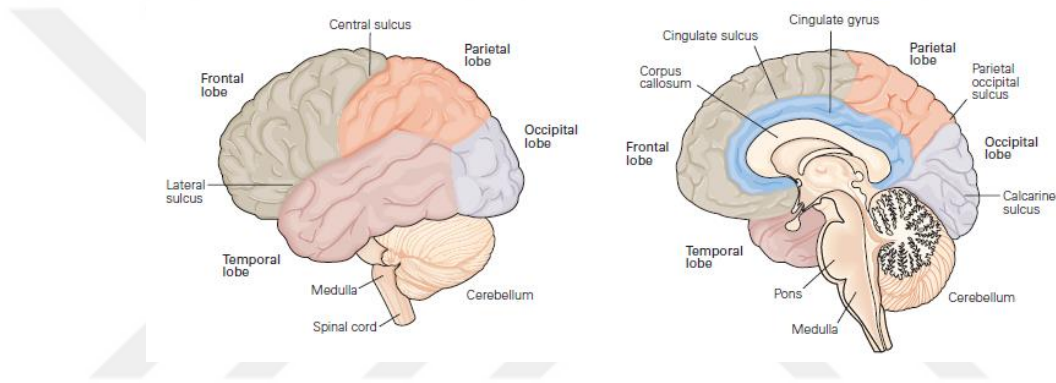
Omurilik, beyin sapı ve diensefalon birçok yaşam sürdürme işlevine aracılık eder iken beyin yarımkürelerinin ince dış tabakası olan beyin kabuğu ise günlük yaşamda eylemlerin planlanması ve yürütülmesinden sorumludur. Beyin kabuğu 4 büyü lobdan oluşur; frontal, parietal, temporal ve oksipital. Her bir lob birçok farklı fonksiyonel alt bölge içerir. Örneğin temporal lob, işitsel, görsel veya hafıza işlevleri gibi farklı bölgelere sahiptir (66).

Korpus kollazumun dorsal yüzeyini sarıp duygu ve biliş düzenlenmesini sağlayan cingular korteks ve frontal, parietal ve temporal lobların aşırı büyümesini sağlayıp homeostazinin düzenlenmesi, duygu ile ilgili olan insular korteks (insula) olmak üzere beyin kabuğunun iki ek bölgesi daha vardır. Operkulum olarak adlandırılan lateral sulkus içine gömülü insula beyin yarımkürelerinden sarkan kısmını oluşturur (66).

Beynin her iki tarafındaki serebral korteks genellikle benzer olsa da, iki taraftaki korteksin bazı alanları işlevsel olarak farklıdır. Örneğin, sağ elini kullanan insanlarda, sol serebral

korteksteki kısımlar dil için uzmanlaşmışken, beynin sağ tarafı görsel-uzaysal bilgi işlemeyle daha ilişkilidir (**Şekil 11**) (66).

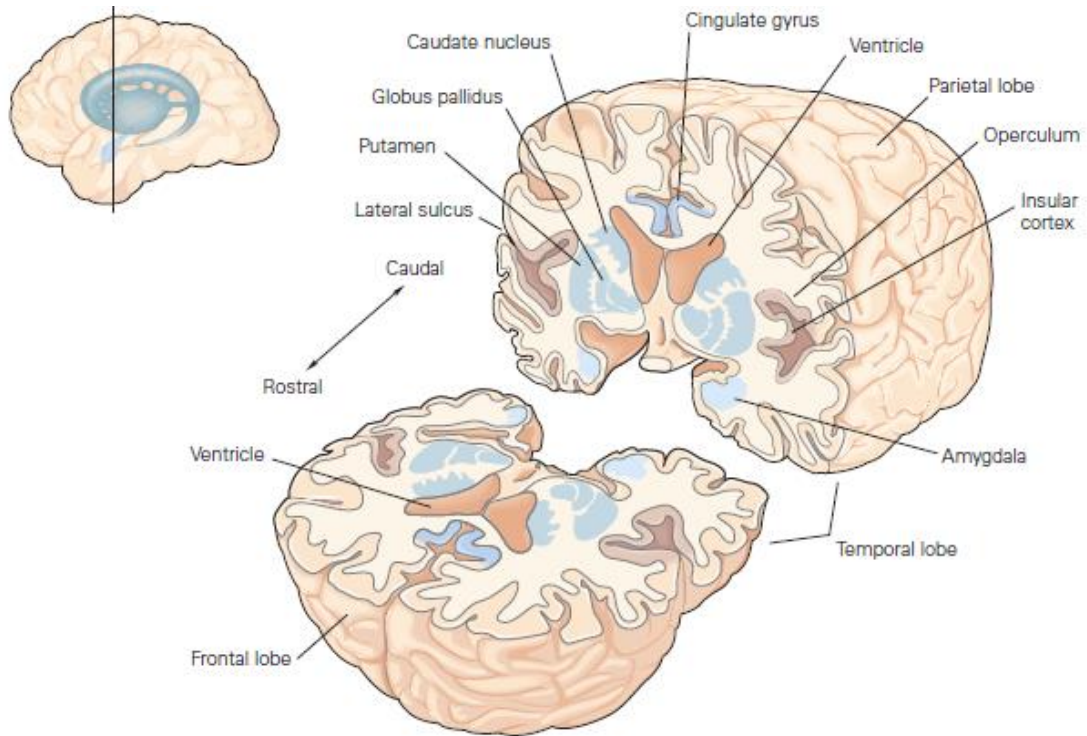
19. yüzyıl ortalarında Pierre Paul Broca, beynin sıvı dolu ventriküllerini çevreleyen ve serebral korteksin sınırında sürekli bir bölge oluşturan frontal, parietal ve temporal lobların bölümlerine dikkat çekti. Bu bölgeye limbik lob adını verdi (Latin limbus, sınır). Limbik lob, artık serebral korteksin en önemli alt bölümlerinden biri olarak kabul edilmemektedir. Bununla birlikte, corpus callosum'u çevreleyen ve Broca'nın limbik lobunun çoğunu kaplayan singulat girus inektis korteks gibi neokorteksin ayrı bir bölümüdür (66, 70).



**Şekil 11.** Büyük loblar ve insan serebral korteksinin bazı önemli kısımları. Sol taraftaki beynin sol tarafının lateral görüntüsü ve sağda ise beynin sağ tarafının medial görüntüsü yer almaktadır (71).

Nöronal sistemin farklı fonksiyonel bileşenleri, birbirinden ayrı yollar vasıtasıyla yani başka bir popülasyonda sona eren farklı bir nöron popülasyonundan gelen aksonların yolları vasıtasıyla birbirine bağlanır. Bu yollardan bazıları çok büyüktür ve beyinde çıplak gözle görülebilir. Çoğu yollar ise neredeyse hiç belirgin değildir ancak nöroanatomik izleme teknikleriyle gösterilebilirler (66).

Beyin yarımkürelerinin ortasındaki yapılar; bazal gangliyonlar (caudate nucleus ve globus pallidus) ve insular korteks. Beyinde ventrikül denilen büyük boşluklar beyin-omurilik sıvısı ile doludur (**Şekil 12**) (72).



**Şekil 12.** Beyin yarımkürelerinin ortasındaki yapılar (72).

#### 2.2.2.2.6.1. HİPOKAMPUS

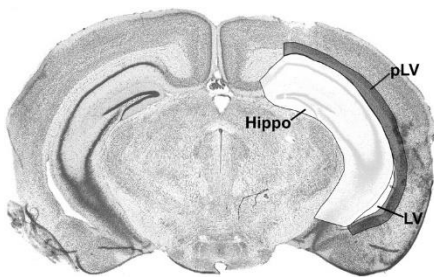
Temporal lobun medial kısmında bulunan ve lateral ventrikülün temporal hornu ile yakın komşuluk içinde olan hipokampus, üzerinde en fazla klinik ve laboratuvar çalışma yapılan beyin bölümünü oluşturmaktadır. Hafıza, konumlama, yön bulma ve duygulanımda gibi önemli rolleri vardır (73). İnsanda yaklaşık 5-8 cm uzunluğunda olan hipokampus ratlarda hemen hemen bir üzüm tanesinin çekirdeği kadardır, farelerde ise çok daha küçük olan bu bölge çalışmamızda gebeliğin 19. Günündeki embriyolardan çıkarılmıştır.

Beyin kesitlerinde C harfi şeklinde görülen hipokampus denizatına benzerliğinden dolayı “hipokampus” adını almıştır (Şekil 13). Dış yüzü koçboynuzuna benzediğinden dolayı bir zamanlar “cornu ammonis” olarak da anılmıştır. Ammon koçbaşı bir Mısır Tanrısına verilen isimdir. Bundan dolayı hipokampusun bölümleri CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak kısaltılarak adlandırılmıştır (73).



**Şekil 13.** Hipokampus adı görünümünün 'deniz atına'na olan benzerliğinden dolayı verilmiştir.

İnsanda hipokampusun embriyonel dönemde gelişimi bölgede bulunan öncü nöronların (nöronal progenitör hücreler) çoğalması ve göç etmesi ile başlar. Embriyonik dönemin 13-14. Haftasında gelişmeye başlayan hipokampus Embriyonik dönemin 18-20. Haftalarda erişkin hipokampuse benzemeye başlar (74). Farede hipokampus embriyonik dönemin 17,5 gününde öncü nöronların göç etmesi ile başlar ve E19,5 günde erişkin hipokampuse benzer (Şekil 14).





**Şekil 14.** Farede yetişkin hipokampusun şematik gösterimi ve embriyonik hipokampusun çalışma esnasında alınan fotoğrafı.

Uzun yıllar hipokampus üzerinde yapılan çalışmalar sürdürülmüş olmasına rağmen, yapısının karmaşık oluşu ve beyinde birçok bölge ile yakın ilişki içinde olması sebebiyle fonksiyonu tam olarak aydınlatılamamıştır.

Tarihsel olarak bakıldığında, 1948 yılına kadar hipokampusun yalnızca koku alma ile ilgili bir merkez olduğu düşünülürken hipokampusun fonksiyonları üzerine ilk bilimsel çalışmalar 1957 yılında Scoville ve Milner'in hipokampusun insan hafızasında önemli rol oynadığını bulması ile başlamıştır (75). 2000'li yıllardan itibaren ise araştırmacılar hipokampusun kendi içindeki bağlantılarına ve çevre dokular ile olan etkileşimlerine odaklanmışlardır (76)

Ventral talamus, hipotalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller gönderen hipokampus hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinden önce davranışların şekillenmesine katkı sağlamaktadır (73).

## **2.3. DAVRANIŞ**

### **2.3.1. BEYİN VE DAVRANIŞ**

Biyolojik bilimlerden bugün ki beklentimiz; hissettiğimiz, harekete geçtiğimiz, öğrendiğimiz ve hatırladığımız beyin süreçlerini ve bilincin biyolojik temelini anlamaktır. Geçtiğimiz birkaç on yıl boyunca, biyolojik bilimlerdeki dikkate değer birleşme, bu büyük mücadeleyi ele almak için bir aşama oluşturmuştur. Genlerin dizilenebilmesi ve proteinlere kodlanan amino asit dizisinin çıkarılabilirliği olması, sinir sistemindeki proteinler ile vücutta başka yerlerde rastlanan proteinler arasındaki beklenmedik benzerlikleri ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak, hücrelerin işlevi için hücre sel sinir bilimini de içeren tüm hücre biyolojisine ortak bir kavramsal çerçeve sağlayan bir genel plan oluşturma düşüncesi mümkün hale gelmiştir (66).

Akıl ve beden ayrı varlıklar olarak görülmediği bir yaklaşım, tüm davranışların beyin işlevinin sonucu olduğu görüşüne dayanır. Genelde akıl denilen şey, beyin tarafından yürütülen bir dizi işlemdir. Beyin sadece yürüyüş ve yeme gibi basit motor davranışları değil aynı zamanda, düşünme, konuşma ve sanat eserleri yaratma gibi kompleks bilişsel eylem ve davranışları da kontrol eder (66).

Beyindeki milyarlarca bireysel sinir hücresi davranış ve bilişsel durumları nasıl oluşturmaktadır ve bu hücreler çevre tarafından nasıl etkilenmektedir? Beyin aktiviteleri açısından davranışı açıklamak, sinir biliminin görevidir ve insan davranışlarını açıklamak için nöral bilimin ilerlemesi şarttır (66).

Sinir bilimi sürekli olarak temel sorularla yüzleşmelidir. Beynin belirli bölgelerinde belirli bir zihinsel süreç mi gerçekleştiriliyor, yoksa beyini bir bütün olarak mı ele almak gerekir? Eğer bir zihinsel süreç farklı beyin bölgelerince kontrol edilebiliyorsa, bu beyin bölgeleri arasındaki anatomik ve fizyolojik ilişki nedir? Her bir bölgeyi bir bütün olarak incelemek mi yoksa bireysel sinir hücrelerini incelemek mi bu ilişkinin anlaşılmasını sağlayabilir? Bu soruları cevaplamak için, modern sinir biliminin, bilişsel davranışların insanlarda en bilineni olan dili nasıl tanımladığı önemlidir. Bunu yaparken, beyinde insanlarda en gelişmiş olan beyin korteksine odaklanılmaktadır (66).

Bazı çalışmalar, belirli davranış türlerinin beynin belirli bölgelerini kapsadığına dair doğrudan kanıt sağlamaktadır. Sonuç olarak, Gall'in orjinal fikri olan beyinde farklı bölgelerin farklı işlevler için özelleşmiş olduğu düşüncesi günümüzde modern beyin biliminin köşe taşlarından biridir (77).

MSS, bilateral ve esasen simetrik olan iki ana kısımdan (beyin ve omurilik), beyin ise medulla oblongata, pons, beyincik, orta beyin, diensefalon ve beyin yarım küreleri olmak üzere yedi ana yapıdan oluşur. Radyografik görüntüleme teknikleri, bu yapıların yaşayan insanlarda görüntülenmesini mümkün kılmaktadır. Beyin görüntüleme şu anda insanlar kontrollü koşullar altında herhangi bir şey ile meşgulken beynin farklı bölgelerindeki metabolik aktiviteyi ölçebilmektedir. Bu tür çalışmalar, belirli davranış türlerinin beynin belirli bölgelerini içerdiğine dair doğrudan kanıt sağlamaktadır. Sonuç olarak, Gall'in farklı bölgelerin farklı işlevler için özel olduğu fikri şu anda modern beyin biliminin köşe taşlarından biridir (66).

Her lobun özel bir işlevi vardır. Frontal lob büyük ölçüde kısa süreli hafıza, gelecekteki eylemleri planlama ve hareket kontrolü ile parietal lob bedensel duyum ile oksipital lob görme ile temporal lob duyma, öğrenme, hafıza ve duygu ile ilgilidir (66).

İki önemli özellik beyin kabuğunun organizasyonunu karakterize eder. İlk olarak, her yarım küre öncelikle vücudun zıt tarafındaki duysal ve motor süreçlerle ilgilidir. Böylece vücudun sol tarafındaki omuriliğe ulaşan duysal bilgi, beyin kabuğuna giden yolda sinir sisteminin sağ tarafına geçer. Benzer şekilde, sağ yarıküredeki motor bölgeleri

vücudun sol yarısının hareketleri üzerinde kontrol sağlar. İkinci özellik, beyin yarımküreleri görünüşte benzer olmalarına rağmen, ne yapısal anlamda tam olarak simetrik ne de eşdeğer fonksiyona sahiptir (66).

İlk olarak bilişsel açıdan önemli olduğu düşünülen korteks alanlarının dil ile ilgili olduğu anlaşılmıştır. Bu bilgi çoğu zaman, beyin yarımkürelerindeki bir kan damarının tıkanması/yırtılması veya bir felç sonucu beyin dokusunun belirli bölgelerinin kaybı sonucu ortaya çıkan bir dil bozukluğu olan afazi çalışmalarından gelmektedir. Afazi tezi ile ilgili önemli keşiflerin çoğu 19. yüzyılın son yarısında hızla artmıştır. Birlikte ele alındığında, bu ilerlemeler insan davranışının sinir bilimindeki en heyecan verici ve önemli bölümlerden birini oluşturur (66).

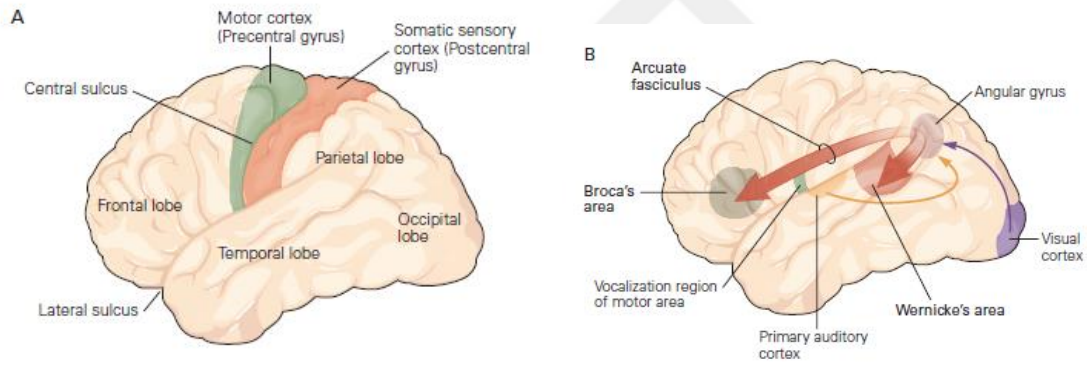
Fransız nörolog Pierre Paul Broca, beynin dil ile ilgili belirli alanlarını tanımlayan ilk kişi olmuştur. Gall'in beyindeki daha yüksek işlevleri haritalama çabalarından etkilenmemiştir, ancak kafatasındaki çarpımlarla ilgili davranışları ilişkilendirmek yerine, post mortem bulunan beyin lezyonları ile afazinin klinik kanıtlarını ilişkilendirdi. 1861'de şöyle yazmıştı: "Eğer hiçbir frenolojik (kafatası) bilim olmasaydı, kafadaki çatlakların değil kortekste ki kıvrımların felsefesi olduğunu düşünürdüm." Bu kavrayışa dayanarak Broca, Gall'in frenolojiden ayırt ettiği zihinsel süreçler bilimi olan nöropsikolojiyi kurdu (66, 70).

1861'de Broca, bir inme sonucu konuşamayan Leborgne adlı bir hastayı anlatırken hasta dilimizi çok iyi anlamasına rağmen konuşamıyor demiştir. Bu hastada konuşabilme yeteneğini etkileyecek dil, ağız veya ses tellerinde motor bozukluk söz konusu değildir. Aslında, hasta izole sözler söyleyebilmişti, ısıklık çalmıştı ve zorluk çekmeden bir melodi söyleyebilmişti. Hasta ne dilbilgisine uygun şekilde konuşabiliyor ne tam bir cümle kurabiliyor ne de yazılı olarak fikirlerini ifade edebiliyordu. Bu hastanın beyninin postmortem muayenesinde, şimdi Broca'nın alanı olarak adlandırılan frontal lobun posterior bölgesinde bir lezyon saptandı (Şekil). Broca, bu bölgedeki lezyonları olan sekiz benzer hastayı inceledi ve her vakada lezyonun sol serebral hemisferde yerleşik olduğunu farketti. Broca 1864'te "Sol yarımküremizle konuşuyoruz!" keşfini duyurmuştur (70, 78).

Broca'nın çalışması, diğer özel davranışlarla ilişkili kortikal bölgelere yönelik bir araştırmayı tetiklemiştir. 1870'te Gustav Fritsch ve Eduard Hitzig, köpeklerin karakteristik bacak hareketlerinin, bir pençenin uzatılması gibi, precentral gyrusun farklı

bölgelerinin elektriksel olarak uyarılmasıyla üretilen bir pati hareketi gibi üretilmediğini bilimsel topluluğa göstermiştir. Bu bölgeler, kontralateral motor kortekste değişmez bir şekilde yer almaktadır. Yazı ve yetenekli hareketler için en çok kullanılan sağ el, konuşmayı da kontrol eden sol yarımküre tarafından kontrol edilmektedir. Birçok insanda, bu nedenle, sol yarım küre baskın olarak kabul edilir (66).

1876'da "Klasik Afazi Semptom-Kompleksi: Bir Anatomik Temel Üzerinde Psikolojik Bir Çalışma" yayınlayan Karl Wernicke bu çalışması ile konuşmadan ziyade anlamada başarısızlığın olduğu başka bir afazi türünü tanımlamıştır. Broca'nın hastaları dili anlayabiliyordu ama konuşamıyordu, Wernicke'nin hastası ise kelimeleri kullanabiliyordu ancak dili anlayamıyordu. Yani bu yeni tip afazinin yeri Broca'nın tanımladığı yerden farklıydı: Lezyon, temporal lobun parietal ve oksipital loblarla karşılaştığı korteksin arka kısmında meydana gelmişti (Şekil 15) (66).



**Şekil 15.** A) Beyin kabuğunun lobu gösterilmiştir. B) Dile dahil olan alanlar.

Wernicke'nin bölgesi dil için işitsel girdiyi işler ve konuşmayı anlamak için önemlidir. İşitsel girdiyi diğer duylardan gelen bilgilerle birleştiren angular girusun ve birincil işitsel korteksin yanında yer alır. Anlaşılır konuşma yapılmasını Broca'nın alanı kontrol ediyor. Bu bölge, kelimeleri oluşturan ağız ve dil hareketlerini kontrol eden motor alana yakındır. Wernicke'nin alanı, Broca'nın alanıyla kısmen kavisli fasikülden yapılmış iki yönlü bir yolla iletişim kurar (78).

Bu keşif ile Broca, Fritsch ve Hitzig ve Wernicke, o zamanlar iki baskın beyin fonksiyonu teorisini uzlaştırmaya ve genişletmeye çalışan bir dil modelini formüle etmiştir. Wernicke, tek bir davranışın farklı bileşenlerinin beyin çeşitli bölgelerinde

işlenebileceğini fark ederek şimdi sinir biliminin merkezi bir ilkesi olan dağıtılmış işleme fikrini geliştiren ilk kişi olmuştur (66).

Duygunun, tüm beyin aktivitesinin bir ifadesi olduğuna inanılıyordu. Yakın zamanda bu görüş değiştirildi. Duyguları yöneten nöral sistemler duygusal, motor ve bilişsel sistemler kadar kesin olarak haritalanmamış olsa da, insan beyindeki veya deney hayvanlarının beynindeki belirli kısımlarının uyarılmasıyla farklı duygular ortaya çıkarılabilir (66).

Bazı afazik hastalar sadece belirgin bilişsel kusur yaşamazlar, aynı zamanda tonlama gibi dilin duyusal yönleriyle de sorun yaşarlar. Sol temporal bölgedeki Wernicke'nin alanına karşılık gelen sağ temporal alandaki hasar, konuşmanın duygusal yönlerini kavramak gibi rahatsızlıklara yol açar; örneğin, bir insanın ses tonundan memnun olup olmadığını o açıklamadan anladığımız gibi. Aksine, Broca'nın alanına karşılık gelen sağ cephedeki hasar, konuşmanın duygusal yönlerini ifade etmede zorluklara yol açmaktadır (66). Bu nedenle dil için gerekli olan bazı nöronlar da sağ yarımkürede mevcuttur.

Gerçekten de ironi, mecaz ve nükte gibi konuşmanın duygusal içeriği olan dilin anlamsal inceliklerini değerlendirmek için sağlam bir sağ yarım kürenin gerekli olduğuna dair şu an önemli bir kanıt vardır. Müziğin keyfini çıkarma ve gerçekleştirme yeteneğinin sağ yarımküredeki sistemleri kapsadığını gösteren ön kanıtlar da vardır (66).

Son olarak, duygu düzenlenmesine dahil olan bir diğer önemli yapı, serebral hemisferlerin derinlerinde yer alan amigdaladır. Duygudaki rolü, epilepsi üreten temporal lob içindeki lezyonların etkileri üzerine yapılan çalışmalarla keşfedilmiştir. İrritatif lezyonların sonuçları, inme veya yaralanma sonucu ortaya çıkan yıkıcı lezyonların tam tersidir. Yıkıcı lezyonlar, genellikle ilgili fonksiyonel sistemlerin ayrılması yoluyla fonksiyon kaybına neden olurken, epilepsinin neden olduğu elektriksel aktivite epileptik nöbetin meydana geldiği bölgelerde, etkinliği artırabilir. Amigdala nöbetleri durumunda, artan aktivite, aşırı duygu ifadesine yol açar (66).

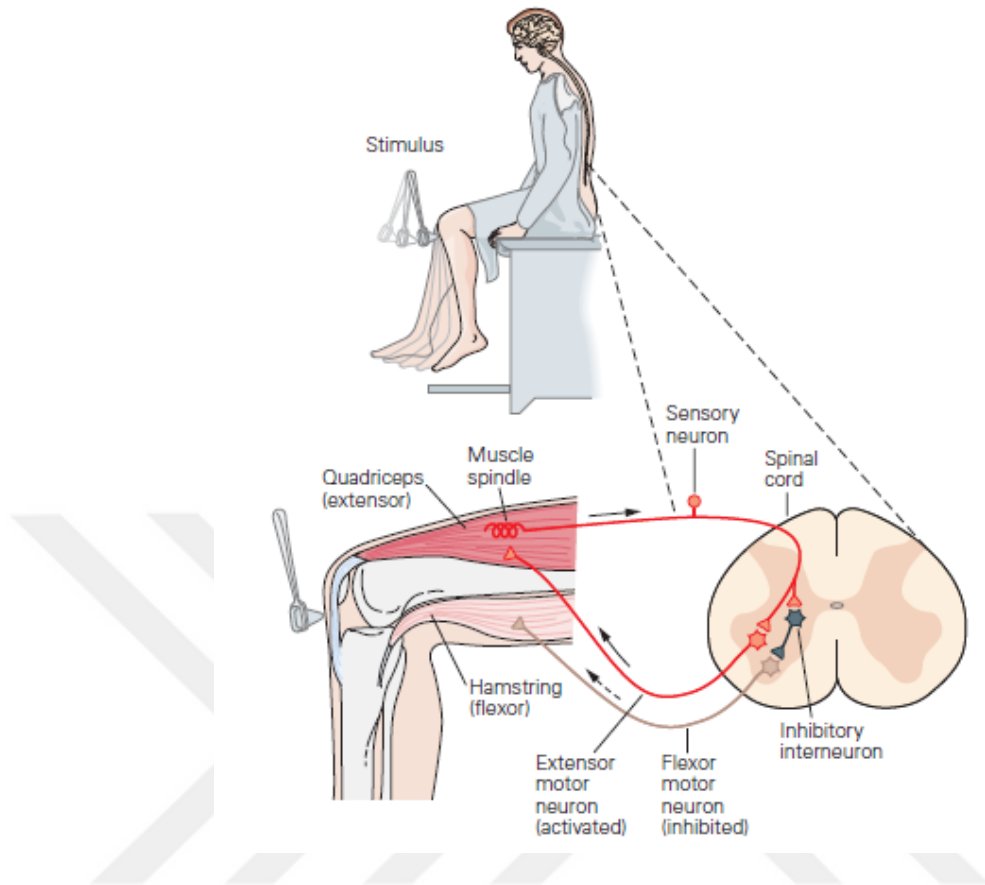
Tüm zihinsel işlevlerin alt işlevlere ayrılabilirdiği noktasını göstermek için nesnelere, insanlar ve olaylar hakkındaki bilgileri nasıl öğrendiğimizi, sakladığımızı ve geri çağırdığımızı düşündüğümüzde basit iç gözlem bize yol gösterir. Bilgimizin her bir parçası, bellek-koşucu uyaranlarla veya tek başına hayal gücüyle bile hatırlanabilmek için saklanmaktadır. Örneğin, büyükanneniz hakkında bildiğiniz her şey, onu şahsen görüp görmediğinizle, sesini duyduğunuzda ya da sadece onu düşünürken eşit ölçüde erişilebilir olan eksiksiz bir temsil içinde saklamışız gibi görünmektedir. Ancak tecrübemiz, bilginin

bellekte nasıl saklandığına dair sadık bir rehber değildir. Büyükanne hakkında bilgi tek bir temsil olarak değil, ayrı kategorilere ayrılarak ayrı ayrı depolanmaktadır. Beynin bir bölgesi, görsel tanıma yeteneğini tetikleyen değişmez fiziksel özellikler hakkında bilgi depolanmaktadır. Yüzünün değişken yönleri hakkında bilgi - sosyal iletişim ile ilgili ifadesi ve dudak hareketleri – beyinin başka bir bölgesinde saklanırken sesini tanımak için başka bir bölgede aracılık edebilmektedir (66).

Belirli bir zihinsel aktivitenin beyinde nasıl işlendiğini analiz etmek için, sadece beyin hangi bölgelerinde hangi aktivitelerin gerçekleştiğini değil, aynı zamanda zihinsel aktivitenin nasıl ifade olduğunu belirlemek de amaçlanmıştır. Sadece son on yılda bu mümkün hale gelmiştir. Bilişsel psikolojinin kavramsal araçlarını yeni fizyolojik teknikler ve beyin görüntüleme yöntemleri ile birleştirerek, beyin belirli davranışlarla ilgili bölgelerinin görselleştirilmesine başlanmıştır. Bu davranışların nasıl daha basit zihinsel operasyonlar tarafından tanımlanabileceğini ve beyin birbirine bağlı bölgeleriyle nasıl eşleştirildiği fark edilmeye başlanmıştır. Gerçekten de bugün nöral bilimde ortaya çıkan heyecan, sonunda, zihinsel işlevlerin organını deneysel olarak incelemek ve nihayetinde insan davranışının altında yatan biyolojik ilkeleri yormak için uygun araçlara sahip olduğumuz inancından kaynaklanmaktadır. Gerçekten de, bugün nöral bilimdeki deneysel kanıtlar, zihinsel işlevlerin deneysel organını keşfetmek için ve insan davranışlarının altında yatan biyolojik prensipleri anlamak için uygun araçlara sahip olunmasından ileri gelmektedir (66).

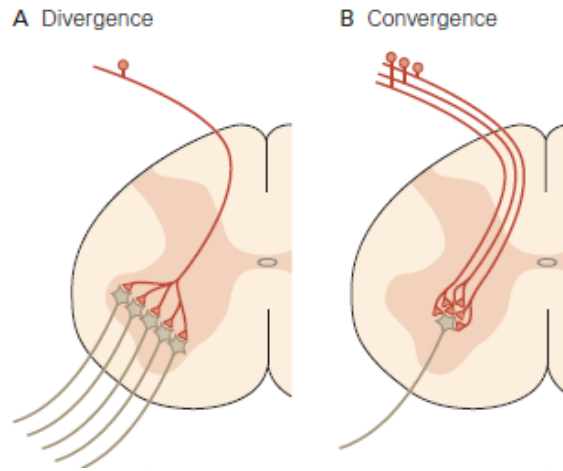
### **2.3.2. NÖRON VE DAVRANIŞ**

Her davranışa, birbirine bağlı belirli nöron setleri aracılık etmektedir ve her nöronun davranışsal işlevi, diğer nöronlarla olan bağlantıları tarafından belirlenir. Buna en basit örnek diz refleksidir. Bacaktaki kuadriseps (dörtbaşı kas) kasların uzayıp gerginleşmesinin geçici bir dengesizliğe sebep olmasıyla bu refleks başlar. Bu gerilme, motor nöronlara iletilen duyuşsal bilgiyi ortaya çıkarır, bu da denge gerilmeleri için ekstansör kaslara komutlar gönderir. Bu refleks klinik olarak yararlıdır, ancak altta yatan mekanizma önemlidir çünkü kuadrisepslerde sürekli olarak normal konumunu korur ve ayakta durduğumuzda ya da yürüdüğümüzde dizlerimizin burkulmasını önler (Şekil 16) (66).



**Şekil 16.** Diz refleksi duysal ve motor nöronların basit bir sirkülasyonu ile kontrol edilir.

Sadece bir kasın gerilmesi (kuadriseps) her biri 45 ila 50 motor nöronla doğrudan temas eden birkaç yüz duysal nöronu harekete geçirir. Bir nöronun birçok hedef hücreyi aktive ettiği bu bağlantı şekli, ıraksama (divergence) yani birbirinden uzaklaşma olarak adlandırılır (**Şekil 16**). Sinir sisteminin girdi aşamalarında özellikle yaygındır; tek bir nöron sinyallerini birçok hedef hücreye dağıtarak, geniş ve çeşitli bir etki gösterebilir. Aksine, diz refleksi döngüsündeki tek bir motor hücresi, yaklaşık 130 duysal hücreden 200 ila 450 girdi alır. Bu bağlantı şekli, yakınsama (Convergence) yani bir nokta birleşme olarak adlandırılır (Şekil ). Sinir sisteminin çıktı aşamalarında yaygındır; Birçok duysal nöronun bilgi alan bir hedef motor hücresi, birçok kaynaktan bilgi toplayabilmektedir. Yakınsama ayrıca bir motor nöronun sadece yeterli sayıda duysal nöronun birlikte harekete geçmesi durumunda aktif hale gelmesini sağlar (66).



**Şekil 17.** Yakınsak ve uzaksak nöronal bağlantılar beynin önemli bir organizasyon özelliğidir. A) Duyusal sistemlerde her bir reseptör nöron genellikle işlemin ikinci aşamasını temsil eden çeşitli nöronlarla temas eder. Sonraki işlem aşamalarında gelen bağlantılar daha da uzaklaşır. Bu, tek bir bölgeden duyusal bilginin omurilikte ve beyinde daha geniş bir alana dağıtılmasını sağlar. B) Buna karşılık, motor nöronlar giderek birbirini izleyen bağlantıların hedefleridir. Motor nöronunu aktive etmek için birçok presinaptik hücreden bu düzenleme girişi gereklidir (66).

Diz refleksi gibi bir gerilme refleksi, eksitator (uyarıcı) sinapslarda bağlanan iki nöron sınıfı tarafından üretilen basit bir davranıştır. Ancak beyindeki tüm önemli sinyaller uyarıcı değildir. Birçok nöron, inhibitör sinyaller üretir. Basit diz refleksinde bile duyusal nöronlar hem eksitator hem de inhibitör bağlantıları kurarlar. Bacakta bulunan uzatıcı kaslardaki eksitator bağlantılar, bu kasların büzülmesine neden olurken, inhibitör interneuronlarla bağlantı, antagonist fleksör kasların kasılmasını engeller. Devrenin bu özelliği, ileri besleme inhibisyonunun bir örneğidir (**Şekil 17**). Diz sarsıntısı refleksinde, ileri besleme (feed-forward) inhibisyonu karşılıklıdır, bu da fleksör ve ekstansör yollarının her zaman birbirini engellediğine kanıttır (66).

### 2.3.3. FARELER VE DAVRANIŞ

Farelerde interaktif davranışları ölçmek için birçok standart davranış testi vardır. Bu davranış deneylerinden en uygun olanını seçmek için, farelerin sosyal davranışlarını ve davranışsal testlerin neyi ölçmeye çalıştığını iyi kavramak gereklidir.



Fareler, toplumsal türler olarak kabul edilir, genel olarak, grup yaşamını tercih ederler. Bu şekilde birlikte yaşayan türler etkileşime girerek grup yaşamına izin veren ve kolaylaştıran çeşitli davranışlar geliştirmektedirler. Çevresel koşullar ve bireysel özellikler (örn. Cinsiyet, yaş, üreme durumu, genetik arka plan, vb.), bir grup içinde ortaya çıkan sosyal etkileşim biçiminin ve miktarının belirlenmesinde önemlidir. Ayrıca, duyuşsal ve motor beceriler ve sağlık durumu, hayvanlarda sosyal davranışların ifadesini etkileyebilir. Örneğin, bir hayvan hasta veya acı çekiyorsa etkileşimde bulunmaya daha az istekli olabilir. Ayrıca fare iletişiminde son derece önemli olan koku duyusundaki bozukluklar da farelerin davranışlarında farklanmaya yol açabilir.

Böcekler, balıklar, kertenkeleler, kurbağalar ve insanlar dahil olmak üzere birçok memeli gibi birçok hayvan türünde de agresif davranış görülebilir. Bu durum, geniş yelpazede koruma, hayvanların hayatta kalma ve bu davranışın muhtemel kalıtımındaki agresif davranışların önemini vurgulamaktadır. Tipik agresif davranış modelleri türler arasında farklılık gösterse de, kemirgenler, primatlar ve insanlar arasındaki saldırganlığın nörobiyolojisinde birkaç uyum vardır. Kemirgen modelleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, insanlardaki saldırganlığın nörogenetik mekanizmasını anlamamıza yardımcı olabilir (79).

Farelerde sosyallik çok boyutlu uyarlanabilir ve fonksiyonel bir cevaptır. Karmaşıklığı nedeniyle, araştırmacıların kolayca çoğaltılabilecek iyi tanımlanmış davranış analizlerini kullanmaları önemlidir (80). Sosyal davranış, insan taklit kültürünün temel unsurlarını oluşturan, özellikle belirgin ya da karşılıklı etkileşimlerle temsil edilen bir dizi ayırt edici ve karmaşık yapıyı kapsar. Geleneksel olarak psikoloji alanında ele alınan sosyal davranış kavramı, sinirsel sistemdeki son gelişmeleri, sinirsel sistemlerin tanımlanmasına vesile olan devrelerin, genlerin ve farklı sosyal bilişsel özelliklerin altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılmasını da kapsar (81).

Son yapılan çalışmalar hipokampusun sosyal bellek ve davranıştaki rolünün yoğun bir araştırma konusu olduğunu vurgulamaktadır (82).

## **2.4. TRANSGENİK**

Transgenik hayvan genetik materyali doğal olmayan bir yolla değiştirilmiş organizma demektir. Çoğunlukla hastalık modellemesi amacıyla mikroenjeksiyon yöntemi ile üretilen ilk transgenik fare Gordon JW ve ark. (83) tarafından 1980 yılında yapılmıştır.

Ülkemizde ise ilk transgenik çalışma doktora tezi düzeyinde Haydar Bağış tarafından rodentlerde gerçekleştirilmiştir (84).

Transgenik fare teknolojisi, gen fonksiyonunu çalışmak ve insan hastalıklarının hayvan modellerini oluşturmak için güçlü bir yöntemdir. Halen, transgenik fareler üretmek için en yaygın olarak kullanılan yöntem, pronükleer mikroenjeksiyon yöntemidir. Bu yöntemde, genetik materyal (DNA, total RNA, miRNA vb.) döllenmiş bir yumurtanın pronükleusuna fiziksel olarak mikroenjekte edilir. Enjekte edilen embriyolar daha sonra yalancı gebelik hissi yaşayan annelerin oviduktlarına transfer edilir. Bu taşıyıcı anneler manipüle edilmiş yavruları dünyaya getirirler (5).

Mikroenjeksiyon işlemi için dişi ve erkek pronükleusunun birbirine en yakın olduğu an beklenmektedir. Böylece bir hücreli aşamadaki embriyoların pronükleuslarının en büyük yani en belirgin oldukları zaman seçilmiş olur (85). Mikroenjeksiyon yapılırken dişiye göre ortalama iki kat büyüklükteki erkek pronükleusuna 1-2 pikolitre olacak şekilde genetik materyal transferi sağlanmaktadır. Pronükleusun iki katı büyüklüğe ulaşması mikroenjeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin göstergesidir (86). Aktarım başarısını etkileyen önemli diğer parametre ise mikroenjekte edilen genetik materyalin yoğunluğudur. Yüksek konsantrasyon embriyolar için toksiktir ve embriyolar tolere edemediklerinden ölümle sonuçlanmaktadır. Mikroenjeksiyon sırasında ortam ısısının işlemin başarısını etkileyen önemli bir diğer parametre olduğu bilindiğinden çalışma sırasında embriyoların içinde bulunduğu lamın temas ettiği mikroskop zemini inkübatör ile ısıtılmaktadır. Bunlara ek olarak, uygulamayı yapan araştırmacının deneyimli olmasının bu yöntemin başarılı şekilde gerçekleşmesini sağlayan bir diğer parametredir. Ayrıca, mikroenjeksiyon işleminin başarılı şekilde gerçekleştirilmesi kadar, mikroenjekte embriyoların taşıyıcı dişilere transferi de yöntemin başarısı üzerinde çok önemli etkiye sahiptir (86).

Küçük RNA'ların kullanıldığı mikroenjeksiyon deneyleri, küçük RNA'nın yeni nesile ebeveyn etkilerini taşıyabileceğine dair ikna edici bir kanıt sağlamıştır. Herhangi bir küçük RNA türünün mikroenjeksiyonu, bir şekilde metabolizmayı etkileyebilmektedir. Örneğin, mikroenjeksiyon deneyi için negatif kontrol olarak karmaşık moleküller yerine özel çevresel zorlu şartlar altında değişmeyen bir küçük RNA tipi kullanılması epigenetik kalıtımda küçük RNA'ların etkisinin belirlenmesine yardımcı olacaktır (3).

## 2.5. GENLER

Sox ailesi, 10 alt gruba (A-J) ayrılmıştır. *Sox8*, *Sox9* ve *Sox10* genleri SoxE alt grubunu oluşturmaktadır (68, 87, 88). Periferik ve merkezi sinir sistemlerinde, kök hücre kapasitesi, özelleşme, sağ kalım, soy ilerlemesi, glial farklılaşma ve homeostaz düzenleyicileri olarak önemli roller oynarlar. Fonksiyonlar sıklıkla örtüşür, ancak bazen antagonisttir. SoxE proteinleri transkripsiyon düzenleyicileri, kromatin değiştiren kompleksler ve transkripsiyonel sistem bileşenleri ile dinamik olarak etkileşir. Diğer transkripsiyon faktörleri ve mikro RNA'lar ile düzenleyici devreler kurarak, SoxE proteinleri omurgalı sinir sisteminin çeşitli hücre soylarında ve aynı hücre soyundaki farklı gelişim aşamalarında farklı işlevleri yerine getirir (89).

### **2.5.1. *Sox8* (SRY (Sex Determining Region Y)-box 8)**

*Sox8* geni farelerde 17. Kromozomda A3.3; 17 12.69 cM'de lokalize 3 ekzonlu bir gendir. Bu gen, embriyonik gelişimin düzenlenmesinde ve hücre kaderinin belirlenmesinde yer alan SOX (SRY-ilişkili HMG-box) transkripsiyon faktörleri ailesini kodlamaktadır. *Sox8*, SRY-box gen ailesinin bir üyesidir ve DNA'yı bağlama ve bükme yeteneğine sahip olan HMG-box (high mobility group box) transkripsiyon faktörünü kodlayarak hedef genlerin trans-aktivasyonuna izin vermektedir (87). Kodlanan protein, başka proteinlerle bir protein kompleksi oluşturduktan sonra bir transkripsiyon aktivatörü olarak hareket edebilir. Beyin gelişimi ve işlevinde rol oynayabilen bu protein, alfa-talasemi ile ilişkili bir sendromda bulunan bilişsel sakatlığa katkıda bulunabilir. Bu protein ayrıca insan hepatoselüler karsinomların çoğunda yüksek oranda eksprese edilir ve hücrel proliferasyonu ve artmış tümör büyümesini teşvik eder. *Sox8*, sertoli hücrelerinin bir ürünüdür ve yetişkin erkek fertilitésinin korunması için kritik bir öneme sahiptir.

### **2.5.2. *Sox9* (SRY (Sex Determining Region Y)-box 9)**

*Sox9* geni farelerde 11. Kromozomda 11 E2; 11 77.27 cM'de lokalize 3 ekzonlu bir gendir. Bu gen tarafından kodlanan protein, HMG-box sınıfı DNA-bağlayıcı proteinlerin diğer üyeleri ile birlikte CCTTGAG dizisini tanır. Kondrosit farklılaşması sırasında etki gösterir ve steroidojenik faktör 1 ile anti-Muellerian hormon (AMH) geninin transkripsiyonunu düzenler. Yetersizlikler sıklıkla cinsiyette tersine dönme ile birlikte iskeletsel malformasyon sendromu olan kampomelik displaziye yol açar.

### **2.5.3. *Sox10* (SRY (Sex Determining Region Y)-box 10)**

*Sox10* geni farelerde 15. Kromozomda 15 E1; 15 37.7 cM'de lokalize 4 ekzonlu bir gendir. *Sox10*, schwann hücreleri ve oligodendrositlerin düzenleyici ağında görevli birkaç önemli önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir (68). Bu gen, embriyonik gelişimin düzenlenmesinde ve hücre kaderinin belirlenmesinde yer alan SOX transkripsiyon faktörleri ailesini kodlamaktadır. Kodlanan protein, başka proteinlerle bir protein kompleksi oluşturduktan sonra bir transkripsiyon aktivatörü olarak hareket edebilir. Schwann hücrelerinde ve oligodendrositlerde, *Sox10* soy ilerlemesi, nihayi farklılaşma, gelişimsel miyelinasyon ve miyelin bakımı için gereklidir.

#### **2.5.4. *Dcx* (doublecortin)**

*Dcx* geni farelerde X. Kromozomunda X; X F2'de lokalize 7 ekzonlu bir gendir. Bu gen, doublecortin ailesinin bir üyesini kodlar. Bu gen tarafından kodlanan protein bir sitoplazmik proteindir ve mikrotübülleri bağlayan iki çift kordonu içerir. Gelişmekte olan kortekste, kortikal nöronlar, son farklılaşmalarının bulunduğu bölgeye ulaşmak için uzun mesafelerde göç etmelidirler. Kodlanan proteinin mikrotübüllerin organizasyonu ve stabilitesini düzenleyerek nöronal migrasyonu yönlendirdiği düşünülmektedir. Özetle, *Dcx* embriyonik ve postnatal gelişim sırasında merkezi ve çevresel sinir sistemi boyunca nöronların göçünü ifade etmektedir (90). *Dcx* ve *LIS1* geni açısından nakavt farelerinde yapılan çalışmalar, bu iki genin moleküler etkileşiminin hem nöronal göçte hem de nörogenezde önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çekirdeğin yer değişimi ve glial mitotik bölünmedeki mitotik ipliğin radyal olarak konumlanmasında bu iki genin kortikal bir rolü olduğu da düşünülmektedir. Bu gen için üç farklı izoformu kodlayan çoklu transkript varyantları bulunmuştur.

#### **2.5.5. *Neurod1* (neurogenic differentiation 1)**

*Neurod1* geni farelerde 2. Kromozomda 2 C3; 2 47.58 cM'de lokalize 2 ekzonlu bir gendir. Bu gen, basic helix-loop-helix (bHLH) transkripsiyon faktörlerinin NeuroD ailesinin bir üyesini kodlar. Protein, diğer bHLH proteinleri ile heterodimerler oluşturur ve E-box olarak bilinen spesifik bir DNA dizisi içeren genlerin transkripsiyonunu aktive eder. İnsülin geninin ekspresyonunu düzenler ve bu gendeki mutasyonlar tip II diabetes mellitus ile sonuçlanır.



### 3. YÖNTEM ve FARELER

#### 3.1. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

Kullanılan Cihaz ve Aletler

1. LihgtCycler 480 II (Roche)
2. Santrifüj Cihazı Mikro 22 (Hettich Zentrifugen)
3. Termal Cycler PCR Cihazı (SensoQuest)
4. Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Sigma)
5. Vorteks Cihazı (Heidolph)
6. Isıtıcı Blok TH2 (HLC Biotech)
7. Mikropipet (Gilson Eppendorf)
8. T-Shaker (Euroclone)
9. Distile Su Cihazı (Diret-Q. UV Millipore)
10. Etüv CO<sub>2</sub> (Nüve)
11. Binoküler Mikroskop (Leica)
12. Sterio Mikroskop (Leica)
13. Laminar Hava Kabini (TelStar)
14. Mikrotom (Leica RM 2155)
15. +4°C Buzdolabı (Siemens)
16. -20°C Dondurucu (Beko)
17. -80°C Dondurucu (Binder)
18. Otoklav (Aıp)

19. Eppendorf Thermomixer (Comfort)
20. Hassas Terazı (G Adam Equipment)
21. Centrifuge (Beckman Coulter Allegra)
22. Biotech Biospec-Nano (Shimadzu)
23. Su Banyosu (Nüve)
24. Thermal Cyclers (Bio-Rad)
25. Çeker Ocak (Hedlab)
26. Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad)
27. Plate Santrifüj (Peqlab)
28. Mikropipetler

### **3.2. FARELER ve YAŞAM KOŞULLARI**

Çalışmamızda Balb/c ırkı fareler kullanılmıştır. Bu fareler, Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezinde en uygun koşullarda barındırılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız farelerimize, minimum kafes alanı: 180cm<sup>2</sup> ve minimum kafes yüksekliği: 12cm<sup>2</sup> şartlarında olacak biçimde ve doğumlarından itibaren bütün ihtiyaçları karşılanacak şekilde barınma olanağı sağlanmıştır. Farelerin hayatta kalmaları için en uygun yaşam şartları olan 20-24C° yaşam alan sıcaklığı ve %45-70 nisbi nem miktarı sağlanmıştır.

#### **3.2.1. Kilo Takibi ve Davranış Deneyi için Mikroenjeksiyon ile Üretilen Fareler**

miR-124-3p mikroenjeksiyonu sonucu 24 yavru fare doğmuştur. Bunlardan 10 tanesi erkek, 14 tanesi dişidir. Kontrol grubunda ise 8 erkek ve 9 dişi fare olmak üzere 17 yavru dünyaya gelmiştir. Bu farelerin hem kilo takipleri hem davranış deneyleri yapılmıştır.

#### **3.2.2. Embriyodan Direk Hipokampus Çıkarmak için Mikroenjeksiyon ile Üretilen Fareler**

miR-124\* embriyolar taşıyıcı annelere transfer edildikten sonra transfer gününe 0,5. gün denilerek 19 gün sonra (E19,5) taşıyıcı anne ve kontrol anne sakrifiye edilmiştir. miR-124-3p mikroenjekte taşıyıcı annenin uterusundan 5 embriyo (1 erkek,4 dişi), kontrol

grubunda ise 9 embriyo (4 erkek, 5 dişi) çıkarılmıştır. Kontrol grubuna hamile olan dişi farelerden birinin doğumunun başladığı ve 8 yavru (5 erkek, 3 dişi) doğurduğu gözlemlenmiştir. Hem embriyoların hem de yavruların hipokampusu çıkarılarak RNA izole edilmiştir. Yani bu grup için hem Doğum Öncesi (DÖ) hem Doğum Sonrası (DS) gen ekspresyon verileri elde edilmiştir.

### **3.2.3. Embriyonik Hipokampusden Primer Hücre Kültürü için Mikroenjeksiyon ile Üretilen Fareler**

miR-124\* embriyoları taşıyıcı annelere transfer edildikten sonra transfer gününe 0,5. gün denilerek 19 gün sonra (E19,5) taşıyıcı anne ve kontrol anne sakrifiye edilmiştir. miR-124-3p mikroenjekte taşıyıcı annenin uterusundan 7 embriyo (6 erkek,1 dişi), kontrol grubundan ise 11 embriyo (6 erkek, 5 dişi) çıkarılmıştır.

## **3.3. YÖNTEM**

### **3.3.1. Mikroenjeksiyon Yöntemi**

Bu çalışma için iki grup fareye ihtiyaç vardır. İlk grubu embriyo topladığımız sağlıklı erkek ile çiftleşen sağlıklı dişiler oluştururken, ikinci grubu vazektomize erkek (Vaz deferens kanalları cerrahi operasyon ile kesilmiş fareler) ile çiftleşen sağlıklı dişiler (taşıyıcı anne) oluşturur. Bir gün önce çiftleşmeye atılan fare gruplarının çiftleşip çiftleşmediğini kontrol etmek için ertesi gün erkenden vajinal tıkaç takibi yapılmıştır. Sağlıklı erkek ile çiftleşen sağlıklı dişiler o gün öğleden sonra sakrifiye edilmiştir ve oviductları daha önceden 37°C’de inkübe edilen M2 medium (Sigma, Almanya) içine alınmıştır. Sterio mikroskop (Leica, Almanya) altında embriyoyu barındıran ampulla belirgin halde görülünce pensler aracılığı ile ampulla yırtılmıştır ve ağız pipeti yardımıyla embriyolar yeni M2’ye transfer edilmiştir. Pronükleusları kaynaşmadan önce fakat en belirgin olduğu evrede yakalanması için embriyolar M16 medium (Sigma, Almanya) içine ağız pipeti ile taşınıp 37°C’de % 0,5 CO<sub>2</sub> ‘de (Panasonic, Japonya) inkübe edilmiştir. O sırada invert mikroskop (Nikon, Japonya) açılmıştır. Mikroenjekte edilecek olan uaaggcacgcggugaaugcc dizisine sahip sentetik mmu-miR-124-3p (MIMAT 0000134, Sigma, 1/10 oranında seyreltilmiştir ve çalışma sürecinde daima buz üzerinde tutulmuştur. Çukur lam üzerine alınan M2 medium üzerine M2 ile doyurulmuş mineral yağı (Sigma, Almanya) eklenerek lam üzerinde embriyolar için yaşam alanı oluşturulmuştur. Embriyoya zarar vermeden tutabilmek için 1,0mm Odx 0,58mm ID



borosilikat cam kapiller (Harvard, Amerika) Micro Puller (Narishige, Japonya) kullanılarak 97,6°C'de çekilmiştir ve Micro Forge (Narishige, Japonya) kullanılarak tutucu pipete son şekli verilmiştir. Kullanıma hazır olan tutucu pipet invert mikroskop (Nikon, Japonya) altında yaşam alanı oluşturulmuş lam içine tutucu kollar yarımıyla yerleştirilmiştir. Bu ortama 15'şerli gruplar halinde embriyolar yine ağız pipeti yardımıyla taşınmıştır. Mikroenjeksiyon için en son olarak gerekli olan mikroenjeksiyon pipetini yapmak için 1,0mm Odx 0,78mm ID borosilikat cam kapiller (Harvard, Amerika) Micro Puller (Kopf, Amerika) istenen inceliğe uygun sıcaklıkta çekilmiştir. Hazır haldeki mikroenjeksiyon pipeti çözülmüş haldeki miRNA ya da total RNA solüsyonu içerisinde 1-2 dk. bekletildikten sonra mikroenjeksiyon pipeti ucunda çok küçük bir damlacığın oluşması durumunda solüsyondan çıkarılıp yaşam alanı oluşturulmuş lam içine yine tutucu kollar yardımıyla yerleştirilmiştir. Joystick'ler yardımıyla aynı düzleme alınan tutucu pipet, embriyolar ve mikroenjeksiyon pipeti artık mikroenjeksiyon için hazır hale getirilmiştir. Mineral yağ yardımıyla (Sigma, Almanya) tutucu pipette oluşturulan itme-güçü kullanılarak embriyo rahatça tutulmuştur ve CO<sub>2</sub> yardımıyla mikroenjeksiyon pipetinde oluşan itme gücüyle de miRNA ya da total RNA embriyonun erkek pronükleusuna basılmıştır. Mikroenjekte edilen solüsyonun embriyo içinde oluşturduğu şişkinliğin görünür olması sayesinde embriyoya miRNA ya da total RNA'yı verdiğimizden emin hale geldik. Mikroenjeksiyon bittikten sonra embriyolar ağız pipeti ile taşıyıp 37°C'de % 0,5 CO<sub>2</sub> 'de (Panasonic, Japonya) inkübe edilmiştir. Ağız pipeti yardımıyla Sterio mikroskop (Leica, Almanya) altında mikroenjeksiyon sonrası ölen embriyolar M16 (Sigma, Almanya) içinde bırakılmış ve yaşayan embriyolar M2 medium (Sigma, Almanya) içine taşınmıştır. Ağız pipetine önce bir kaç tane hava kabarcığı, sonra M2 medium (Sigma, Almanya) ile birlikte mevcut embriyoların hepsi ve en sonunda da tekrar hava kabarcıkları çekilmiştir.

Taşıyıcı anneyi anestezi altına alabilmek için 150µl %2 Rompun (Bayer, Amerika) ve 150µl Ketalar (Pfizer, Amerika) 2ml %0,9 NaCl içinde çözülmüştür. Hazırlanan bu solüsyondan her bir fareye 300µl intraperitoneal olarak enjeksiyon yapılmıştır. Anestezik madde etkisini göstermeye başlayınca farenin sırt kısmı tıraşlanmıştır. Sırt kısmından makas yardımıyla üç kat kesilen taşıyıcı annenin oviductu pens ile kesilen kısımdan dışarı çıkarılmıştır. Fare Sterio mikroskop (Leica, Almanya) altına taşıyıp oviductu ile ovaryumu üzerindeki zar pensler yardımıyla yırtılmıştır. Belirgin haldeki infundibulum pens ile tutulup ağız pipeti ile embriyolar oviduct içine transfer edilmiştir. Transfer

yaparken embriyolar görünmemektedir. Ancak hava kabarcıkları görülebilirler dolayısıyla hava kabarcığının oviduct içinde görünmesi embriyoların da oviduct içinde olduğu anlamına gelmektedir. Transfer sonrası farenin sırt kısmı 26mm ve 75 cm sütür (Surgisorb, İngiltere) ile dikilmiştir (6, 7). Taşıyıcı anne, mikroenjeksiyon bilgileri ve çiftleşme/çalışma tarihi yazılan kafese yerleştirilmiştir. İşlemden 21 gün sonra dünyaya gelen F0 nesli yavrular 21 gün anne sütü ile beslendikten sonra cinsiyetlerine göre ayrılarak yeni kafeslere alınmıştır. Cinsiyet ayrımı yapılan fareler haftalık olarak tartılmıştır ve iki aylık olduklarında da davranış deneyleri yapılmaya başlanmıştır.

### **3.3.2. Kilo Takibi**

miR-124-3p mikroenjeksiyonu yapılan embriyoların taşıyıcı anneleri ortalama 21 gün sonra doğum yapmışlardır. Mikroenjeksiyon sonucu doğan fareler ve kontrol grubu fareler ilk olarak aktifliklerinin gözlenmesi açısından videoya alınmadan önce 7. günde tartılmışlardır. Ancak, 21 günlük olmadan yavruları dokunmak yavruların sağlığı açısından risk taşımaktadır. Bu hayvanlarda kannibalizm görüldüğü için yavrularına yabancı koku sindiği durumda anneler yavrularını öldürmektedir. Bu yüzden fareler 21 günlük olmadan tekrar tartım yapılmamıştır. Yirmi bir günlük olduklarında cinsiyet ayrımı yapılan fareler, kilo ve davranış deneylerinin doğru takip edilmesi açısından tırnakları kesilerek numaralandırılmışlardır. Bu yüzden 21. günün sonunda haftalık olarak 3 ay (120 günlük) boyunca tartılmışlardır.

### **3.3.3. Davranış Deneyleri**

miR-124\* fareler ve kontrol grubu fareler 2 aylık olduklarında davranış deneyleri yapılmaya başlanmıştır. Deney başlamadan önce deneyin yapılacağı odaya getirilen fareler 15-30 dk. boyunca ortamda tutulmuştur. Böylece ortam habitasyonu sağlanmıştır.

#### **3.3.3.1. Açık Alan Testi**

Düzenek tabanı çizgilerle ayrılmış, etrafı duvarla çevrili, üstü açık, kare seklinde bir kutudur. Bu düzenekte hayvanın merkezde mi yoksa kenarda mı gezdiği önemlidir. Açık alan düzeneğinde hayvanın anksiyetesini tetikleyen iki durum vardır; Birincisi, hayvanın kendi ortamından alınarak bilmediği başka bir ortama konulması, İkincisi ise kemirgenlerin doğasında olan geniş alan korkusudur. Az hareket eden, merkeze geçmeyen ve az defekasyon (dışkılama) yapan farede açık alan korkusu vardır ve

streslidir, rahat bir şekilde açık alanda gezen fare ise fazla stresli değildir ve korkuyu nispeten yenmiştir (91, 92).

16 eşit kareden ortada bulunan 4 kare merkez olarak kabul edilmektedir. Merkez ve periferde durma süreleri ve giriş sayıları ölçülmüştür.

### **3.3.3.2. Delikli Tahta**

Zemini 2.2 cm çapında, 16 delikten oluşan bir düzendir. Hayvanın duygu durumu, anksiyetesi strese karşı cevabının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Testin esası hayvanın başını deliklerin içine sokmasına dayanır. Bu testte fareler delikli tahta üzerine koyularak 5 dk boyunca kafasını bu deliklere sokma sayısı kaydedilmiştir. Baş sokma davranışının azalması anksiyetenin artmasının, bu davranışın artması ise anksiyetenin azalması (anti-anksiyete) olarak yorumlanmaktadır (93).

### **3.3.3.3. Yeni Nesne Tanıma**

Açık alan testini yaptığımız düzeneğe fareden büyük olmayacak şekilde iki aynı nesne yerleştirilmiştir. Birinci gün farenin nesnelerin yanında kaldığı süre ve yanlarına gitme sayıları hesaplanmıştır. İkinci gün objelerden biri değiştirilmiş ve yeni nesne koyulmuştur. Farenin yeni ve aşına oldukları nesnelerin yanında kalma süre ve yanlarına gitme sayıları ve diskriminasyon indeksi ölçülmüştür. Toplamda yeni nesne ile geçirilen zaman ile toplamda aşına nesle ile geçirilen zaman arasındaki fark toplam zamana oranlanıp 100 ile çarpıldığında elde edilen veriye diskriminasyon indeksi denilmektedir. Özetle fareler toplam zamanın yüzde kaçını yeni nesne ile geçirmiş bunun ölçüldüğü durumdur. Bu deney ile farelerin öğrenme ve hafıza fonksiyonları ölçülmektedir. Bu deneyde farelerden beklenen davranış, yenilik konusundaki içgüdüleri nedeniyle, alıştıklarının dışında yeni bir nesneyi keşfetmek için yeni nesne ile daha fazla zaman harcamalarıdır (94).

### **3.3.3.4. Y Labirent Deneyi**

Y-Labirent testi spasyal hafızanın ölçülmesinde kullanılmaktadır. Y şeklinde 3 kolu bulunmaktadır. 40 cm uzunluğunda, 3 cm genişliğinde kolları ve 12 cm yüksekliğinde duvarları bulunmaktadır. Kollar simetrik olarak ve 120 derece açı ile diğerinden ayrılır. Labirentin tabanı ve duvarları siyah pleksiglastan yapılmıştır. Y labirentin etrafına ipuçları yerleştirilmektedir. Fare başlangıçta kollardan birinin ucuna yerleştirilir. Her 3 kola girme sayısı 5 dk. boyunca kaydedilir. Normalde fare her bir kolu ziyaret eder veya

bazı kollara girmez. Ayrıca rotasyonel girişler hesaplanır. Bunun için kollar A, B, C harfi olarak isimlendirilir. Ardışık olarak her 3 kolu ziyaretleri sayılır. Alternasyon olarak isimlendirilir. Ziyaretler ABCCAB olabilir. Ardışık ziyaretlerde ABC, CAB, BCA olabilir. BAB olduğunda sayılmaz. Rotasyon (alternasyon) yüzdesi hesaplanır: % Rotasyon = [(Rotasyon sayısı) / (Total kol girişleri-2)] x100. Kol giriş sayıları lokomotor aktivitenin göstergesidir. Kısa süreli spasyal çalışan bellek ölçmek için, eğitim (15 dk.) ve test (5 dk.) bölümü olmak üzere iki uygulama yapılır. İlk gün kol kapalı şekilde farenin 15 dk gezinmesine izin verilmiştir. Süre bitiminde kol açılıp fare tekrar bırakılmış ve 5 dk kayıt alınmıştır. Ertesi gün kol kapalı iken farenin 15 dk gezinmesine izin verilmiştir. Süre bitince fare Y labirentten kafesine alınmış ve 3 saat beklenmiştir. Süre bitiminde kol açılmış fare ortama bırakılmış ve 5 dk kayıt alınmıştır. Test uygulamasında bütün kollar ulaşılabilir. Kollarda kalma süresi, kollara giriş sayısı, rotasyon sayısı hesaplanır. Deney aralarında tüm kollar %70 etanol ile silinir. Yeni kola giriş yüzdesi [(yeni kolda geçirilen süre/total kolda geçirilen zaman)] x100 olarak hesaplanır (95).

### 3.3.3 5. Kuyruktan Asma Deneyi

Kuyruktan asma deneyi otizm modeli farelerde ilk kaçış yönelimli hareketlerden sonra, kaçınılmaz stresli bir duruma yerleştirildiğinde hareketsiz bir duruş geliştirdiklerini gözlemlemeye dayanmaktadır. Kuyruktan asma sırasında stresli durum, kuyrukları tarafından kontrol edilemeyen bir şekilde asılmanın hemodinamik stresini içerir ve otizm modellerinde hareket ve kaçış kabiliyetlerinin az olduğu görülmektedir (96).

Deney düzeneği 3 farklı farenin eş zamanlı olarak deneye alınabilecek şekilde oluşturulmuştur. Farelerin birbirini görmeyecek şekilde 25 cm yükseklikte kalın karton benzeri levhalar kesilerek fareler arasına yerleştirilmiştir. Fareler beyaz renk olduğu için arka planda siyah zemin kullanılmıştır. 12 cm uzunluğunda bantlar kesilerek farenin kuyrukları zarar görmeyecek şekilde kuyruk ucuna yapıştırılarak deney düzeneğine asılmıştır. Fareler 6 dk. boyunca video kamera ile görüntü altına alınmıştır. Kayıtlar bilgisayar ortamında izlenerek 6 dk boyunca farenin hareketli ve hareketsiz kaldığı süreler hesaplanmıştır (96).

### 3.3.3.6. Sosyal Alan Deneyi

Sosyal Test, MSS bozukluklarının kemirgen modellerinde genel sosyallik ve sosyal yenilikteki ilgi biçimindeki bilişi değerlendirir (97). Kemirgenler normalde başka bir kemirgenle (sosyallikle) daha fazla zaman geçirmeyi tercih eder ve yeni bir yabancıyı tanıdık olandan (sosyal yenilik) daha fazla araştırırlar. Bu eğilimlere dayanarak, kemirgenlerin sosyallik ve sosyal yenilikteki eksikliklerle tanımlanmasına yardımcı olabilir.

Bu test, otistik özellikler sergileyen transgenik hayvanlarda sosyal davranışlardaki açıklıkları nicelleştirmektedir (98).

Crawley'in sosyallik ve sosyal yenilik testi, dikdörtgen, üç bölmeli bir kutudan oluşmaktadır. Her bir oda 19 x 45 cm'dir ve bölünmüş duvarlardan, her bir odaya serbest erişim sağlayan açık berrak pleksiglastan yapılmış bir orta bölmesi olan sistemdir (98).

Deneye başlamadan önce deneyin yapılacağı odaya alınan fareler deney düzeneği ortamına alışması için 30 dk. bekletilir. Ardından bir bölmeye farelerden bir tanesi konulur. Diğer bölme boş bırakılırken asıl olarak deneye alınan fare orta bölmeye bırakılarak 5 dk. boyunca kamera sistemiyle kayıt altına alınıp, bölmedeki fareye olan ilgisi belirlenen parametreler doğrultusunda EthoVision sistemi ile veriler oluşturulup istatistiksel analizi yapıp kontrol grubuna göre karşılaştırması yapılmıştır.

### **3.3.3.7. Bilye Gömme Deneyi**

Marble Buried (Bilye gömme) deneyi yaygın olarak kemirgenlerde neofobi (kemirgenlerin yeni nesneye olan çekingenliği) (99), anksiyete (99, 100), obsesif-kompulsif (101) (102) veya tekrarlayıcı davranışları ölçmek için kullanılır. Ayrıca testin, yeni antidepresanlar (103, 104), anksiyolitikler (105, 106) ve antipsikotiklerin (107, 108) taranması için tahmini geçerliliğe sahip olabileceği de öne sürülmüştür. Bilye gömme deneyinde performans da genel kazma davranışı ile ilişkilidir. Genel olarak sosyal merakın ve yeni nesnelere olan korkunun ölçüldüğü bu deneyde ölçülen temel yapı hala belirsizdir.

Bu davranış muhtemelen kemirgenlerin tipik bir savunma gömme türüdür (97). Öyle görünüyor ki, fareler bilyeleri apaçık göremiyorlar (98), bu yüzden daha belirgin renkte bilye seçimi gömülmeyi arttırmaktadır (109, 110).

C57/BL6 ırkı farelerin, bilyelerin yaklaşık % 75'ini 30 dk.lık bir sürede gömmesi beklenebilirken; bu durum, suş, yaş ve cinsiyete göre değişebilir (100).

Bu davranışın nöronal sistemde hangi bölge ile ilişkili olduğu henüz aydınlatılamamıştır. Ancak, hipokampusun ve septumun çok etkilenen bölgeler olduğu düşünülmektedir çünkü bu bölgelerdeki lezyonlar kazmayı azaltmaktadır (100).

Normalde farelerimizin bakımında kullandığımız mısır koçanlarını, boş bir kafes içerisine 5 cm yükseklikte olacak şekilde konulmuştur. 20 adet bilye her sırada 4 bilye olacak şekilde 5 sıra şeklinde dizilmiştir. Deneye alınan fare kafesin bir köşesinden bırakılmıştır ve fareye 30 dk. boyunca keşif için izin verilmiştir. 30 dk.'nın sonunda fare kafesten alınarak bu süre boyunca mısır koçanı altına gömdüğü toplam bilye sayısı sayılarak not edilmiştir.

### **3.3.3.8. Koku Deneyi**

Bu deney için açık alan deney düzeneği ve programı kullanılmıştır. Alanın tam merkezine kabuk tarçın bırakılarak açık alan deney prosedürü uygulanmıştır. Kemirgenler doğası gereği periferde vakit geçirmektedir ancak fareler tarçın kokusuna rağmen periferde kalmayı sürdürecekler mi bunu gözlemek için koku deneyi tasarlanmıştır.

### **3.2.4. Embriyodan Hipokampus Çıkarılması**

Hippokampus çıkarılırken aşağıdaki prosedürler takip edilmiştir:

1. miR-124-3p mikroenjekte embriyolar taşıyıcı anneye transfer edildikten sonra gebelik gerçekleşen taşıyıcı anneler gebeliğin 19. gününde sakrifiye edilmiştir.
2. Uterusun tamamı çıkarılıp Phosphate Buffered Saline (PBS) ile petri kabına taşınmıştır.
3. Pensler yardımı ile uterus yırtılarak embriyolar çıkarılıp PBS'li yeni petriye alınmıştır.
4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile cinsiyet tayini için her bir embriyonun kuyruk kısmından doku alınıp DNA izole edilmiştir (Yöntem 3.2.6.1. numaralı başlık altında açıklanmıştır).
5. Aynı embriyonun baş kısmı kesilip total beyin çıkarılmıştır.
6. Lam üzerine alınan total beyin 2-3 dk -20°C dolapta bekletilmiştir.
7. Buz aküsü zeminde olacak şekilde binoküler mikroskop altında beyin yarımküreleri ön beyine doğru kaldırılarak hipokampus 100'lük pipet ucuyla aspire edilmiştir.

### 3.2.5. Primer Hücre Kültürü

Hipokampusten primer hücre kültürü yapılırken aşağıdaki prosedürler takip edilmiştir:

1. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) (Sigma, Almanya) kültüre başlamadan bir gün önceden hazırlanmıştır. 300mg pHEMA %95 Etanol ile su banyosunda (65 °C) ara ara vorkteks yapılarak çözdürülmüştür.
2. Laminar hava kabini içinde 24 well-plate'in her bir kuyucuğuna 200 µl pHEMA pipetlenmiştir. Plate kapağı açık şekilde alkolün uçması için bir gece kabinde bırakılmıştır.
3. Ertesi gün sabah erkenden E19,5 günlük gebe farelerin embriyoları aspire edilmiştir
4. Aspire edilen dokular 1ml Hanks' Balanced Salt (HBS) solüsyonu içine alınmıştır.
5. Dokular resüspanse edilip 1000 rpm'de 2 dk oda ısısında santrifüj edilmiştir.
6. Ekim için Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Sigma, Almanya) medium kullanılmıştır. DMEM/F12 mediuma; %10 oranında Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma, Almanya), %1 oranında Penicillin-Streptomycin (Pen Strep) (Gibco, Life Technologies) ve L-Glutamine (200 mM) (Gibco, Life Technologies) eklenerek kullanıma hazır medium elde edilmiştir.
7. Supernatant atılıp hücreler 500 µl hazır medium ile resüspanse edilerek pHEMA kaplı well plate'e ekilmiştir. %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37 °C'de inkübe edilmiştir.
8. Ertesi gün tekrar pHEMA hazırlanmış ve 24 well plate 200 µl pHEMA ile kaplanmış ve kapak açık şekilde laminar hava kabininde bir gece inkübe edilmiştir.
9. İki gün sonra hücreler steril pastör pipeti ile çekilip 1 ml HBS ile yıkanmıştır.
10. Hücreler resüspanse edilip 1000 rpm'de 2 dk oda ısısında santrifüj edilmiştir.
11. Supernatant atılıp % 0,25 Trypsin-EDTA (Gibco, Life Technologies) eklenmiştir ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir.
12. Üzerine 500 µl hazır medium eklenip 1000 rpm'de 2 dk oda ısısında santrifüj edilmiştir.
13. Supernatant atılıp hücreler 1 ml hazır medium ile resüspanse edilmiştir.

14. pHEMA kaplı plate kuyucuklarına her örnek iki kez ekilmiştir.
15. Ekimden 5 gün sonra çift ekilen kuyucuklardan birine 1 ml hazır medium eklenirken diğer kuyucuğa 20 ng/ml Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve Insulin-Transferrin-Selenium-A (ITS) eklenmiştir.
16. Kültürün 12, 16 ve 21. günlerinde fotoğraf alınmıştır.
17. Fotoğraf alındıktan sonra kültür sonlandırılmıştır.

### 3.2.6. Cinsiyet Tayini

#### 3.2.6.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu yapılırken aşağıdaki prosedür takip edilmiştir:

1. Her embriyonun kuyruğundan doku ayrı ayrı ependorf tüplere alınmıştır.
2. Doku üzerine 1M Tris, 0,5M EDTA, %4'lük Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) , dH<sub>2</sub>O ve proteinaz K dan hazırlanan liziz bufferdan 300µl eklenmiştir.
3. Örnekler 55° C de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
4. İnkübasyondan sonra 100 µl Amonyum asetat eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.
5. Örnekler 4000 rpm'de 20dk santifüj edilmiştir.
6. Süpernatant temiz bir ependorfa alınmıştır ve 500 µl izopropanol eklenmiştir.
7. 5dk oda ısısında inkübe edilmiştir.
8. İnkübasyon sonrası 4000 rpm'de 10 dk santifüj yapılmıştır.
9. Supernatant atılmıştır ve oluşan pellete 1000 µl %70 etanol eklenmiştir.
10. 4000 rpm'de 10 dk santifüj yapılmıştır.
11. Oluşan pelletten alkol uzaklaşması için 10 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Pellet kuruduktan sonra pellet 100 µl Nuclease-Free Water (NFW) (Qiagen, Almanya) ile çözülmüştür.
12. +4°C buzdolabında 10-15 dk bekletildikten sonra Biospec Nano (Shimadzu) kullanılarak DNA konsantrasyon ölçümü yapılmıştır.



### 3.2.6.2. PCR

Cinsiyet tayini için embriyonun kuyruk dokusundan DNA izolasyonu yapıldıktan sonra PCR işlemi yapılmıştır. Kullanılan primerlerin dizisi **Tablo 2**'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Cinsiyet tayini için gerekli primer dizileri.

Gen	Primer (5'- 3')		Baz çifti
	Forward	Reverse	
Sry	TGCACAATTGTCTAGAGAGC	ACTGCAGAAGGTTGTACAGT	329
Pax6	CTTTCTCCAGAGCCTCAAT	GCAACAGGAAGGAGGGGGAGA	150

PCR işlemi yapılırken Thermo marka DNA Polimeraz kullanılmıştır. Kullanılan malzemeler ve miktarları **Tablo 3**'te verilmiştir.

**Tablo 3.** PCR işlemi için gerekli malzemeler ve miktarları.

Malzeme	Miktar
<b>PCR Buffer(10x)</b>	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 µl
dNTP	4 µl
Sry3	0,5 µl
<b>Sry5</b>	0,5 µl
<b>H499</b>	0,5 µl
H500	0,5 µl
Distile Su	31 µl
Taq	0,5 µl

**Tablo 3**'e göre PCR karışımı hazırlanıp 45 µl tüplere dağıtılmıştır ve 5 µl DNA eklenip **Tablo 4**'deki PCR programı ile çalışma başlatılmıştır.

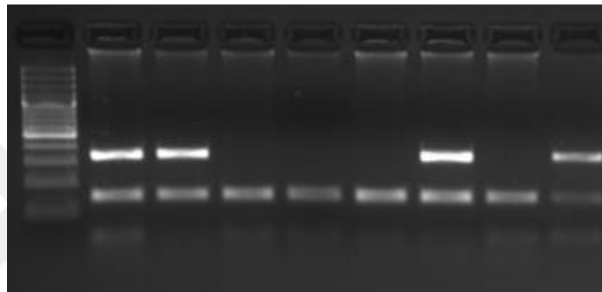
**Tablo 4.** Cinsiyet tayini için kullanılan PCR programı.

95 °C	5 dk	30 döngü
94 °C	1 dk	
57 °C	45 sn	

72 ° C	1 dk	
72 ° C	10 dk	
4°C	∞	

PCR ürünlerinin görüntülenme işlemi için %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. Jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ve İmage Lab analiz programı kullanılarak jel görüntülenmiştir. **Şekil 18'**de jel görüntüsü gösterilmiştir.

M 1 2 3 4 5 6 7 8



**Şekil 18.** Cinsiyet tayini jel görüntüsü: M: Markır (100bç-3000bç), 1.,2. ve 6. embriyoların cinsiyeti erkek iken 3.,4. ve 5. embriyoların cinsiyeti dişidir. 7. örnek kontrol dişi, 8. örnek kontrol erkektir.

### 3.2.7. NS Sayımı ve NS Alan Ölçümü

Kültürün 12, 16 ve 21. günlerinde NS'lerin fotoğrafları alınmıştır. Image J programı kullanılarak hem NS sayısı hesaplanmıştır hem de NS'lerin alan ölçümleri yapılmıştır.

### 3.2.8. RNA İzolasyonu

#### 3.2.8.1. Hipokampusden RNA İzolasyonu

Hipokampüsten RNA İzolasyonu yapılırken aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

1. Aspire edilen hipokampus dokusuna 1 ml TriPure Isolation Reagent (Roche, Almanya) eklenmiştir.
2. İyice vorteks yapıldıktan sonra 200 µl Kloroform eklenip 15 sn vorteks yapılmıştır.
3. 12000 g'de 20 dk +4 °C santrifüj edilmiştir.
4. Aköz faz yeni ependorf tüpe alınmıştır.

5. 500 µl İzopropanol eklenip iyice vortekslenmiştir ve -20 °C dolapta bir gece bekletilmiştir.
6. 12000 g'de 10 dk +4 °C santrifüj edilmiştir ve süperntant atılmıştır.
7. Pellete 1 ml %75 Etanol eklenip alt-üst edilmiştir.
8. 7500 g'de 5 dk +4°C santrifüj edilmiştir ve süperntant atılmıştır.
9. Tekrar pellete 1 ml %75 Etanol eklenip alt-üst edilmiştir.
10. 7500 g'de 5 dk +4°C santrifüj edilmiştir ve süperntant atılmıştır.
11. Pellet 30 NFW (Qiagen, Almanya) ile çözülmüştür.
12. Biospec Nano (Shimadzu) kullanılarak RNA konsantrasyon ölçümü yapılmıştır.

### 3.2.8.2. Primer Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu

Primer hücre kültüründen RNA İzolasyonu yapılırken aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

1. Plate üzerindeki her kuyucuk pastör pipeti yardımı ile eppendorf tüplere taşınmıştır.
2. Eppendorf tüpler 1000 rpm'de 2 dk oda ısısında santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır.
3. Pellete 1 ml TriPure Isolation Reagent (Roche, Almanya) ve 1 µl (20ng/ml) Glikojen eklenmiştir.
4. İyice vorteks yapıldıktan sonra 200 µl Kloroform eklenip 15 sn vorteks yapılmıştır.
5. 12000 g'de 20 dk. +4 °C santrifüj edilmiştir.
6. Aköz faz yeni ependorf tüpe alınmıştır.
7. 500 µl İzopropanol eklenip iyice vortekslenmiştir ve -20 °C dolapta bir gece bekletilmiştir.
8. 12000 g'de 10 dk +4 °C santrifüj edilmiştir ve süperntant atılmıştır.
9. Pellete 1 ml %75 Etanol eklenip alt-üst edilmiştir.
10. 7500 g'de 5 dk +4°C santrifüj edilmiştir ve süperntant atılmıştır.
11. Tekrar pellete 1 ml %75 Etanol eklenip alt-üst edilmiştir.
12. 7500 g'de 5 dk +4°C santrifüj edilmiştir ve süperntant atılmıştır.

13. Pellet 30 µl NFW (Qiagen, Almanya) ile çözülmüştür.
14. Biospec Nano (Shimadzu) kullanılarak absorbans ölçümü yapılmıştır.

### 3.2.9. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, EvoScript cDNA Kiti (Roche, Almanya) kullanılarak firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır.

Hipokampusten RNA izole edilen örnekler için reaksiyon karışımı Tablo 5'e göre hazırlanmıştır.

**Tablo 5.** Hipokampusten RNA izole edilen örnekler için karışım miktarları.

İçindekiler	Her bir örnek için
Reaction Buffer (5X)	4 µl
dH <sub>2</sub> O	9 µl
RNA	5 µl

Kültürden RNA izole edilen örnekler için reaksiyon karışımı Tablo 6'ya göre hazırlanmıştır.

**Tablo 6.** Kültürden RNA izole edilen örnekler için karışım miktarları

İçindekiler	Her bir örnek için
Reaction Buffer (5X)	4 µl
RNA	14 µl

Reaksiyon Buffer ve RNA örneklerinin bulunduğu tüpler 5 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Bu süre sonunda her bir örnek üzerine 2 µl Enzim karışımı eklenmiştir. Ardından da Thermal Cycler cihazına **Tablo 7**'de yer alan program kurulmuştur ve çalışma başlatılmıştır.

### PCR Programı;

**Tablo 7.** cDNA sentezi için PCR programı.

42 °C	15 dk.
-------	--------

85°C	5 dk.
65°C	15 dk.
4°C	∞

PCR sonunda elimizde 20 µl cDNA ürünü oluşmuştur.

Elde edilen cDNA örnekleri Pre-Amplifikasyon için kullanılmıştır.

### 3.2.10. Pre-Amplifikasyon Yöntemi (Ön Çoğaltma)

Pre-Amplifikasyon için cDNA Pre-AMP Master Kit (Roche, Almanya) kullanılmıştır. Ön çoğaltma yapılırken ekspresyon için kullanılacak olan her bir primer/probe (Integrated DNA Technologies, Belçika) 1/10 oranında seyreltilmiştir. Sonrasında seyreltilen her bir genden 1,4 µl alınarak ve ependorf tüpe primer karışımı hazırlanmıştır (**Tablo 8**).

**Tablo 8.** Pre-Amplifikasyon işlemi için gerekli malzemeler ve miktarları.

İçindekiler		Primer mix
Primerler	% 10 <i>Actb</i>	1,4 µl
	% 10 <i>Sox8</i>	1,4 µl
	% 10 <i>Sox9</i>	1,4 µl
	% 10 <i>Sox10</i>	1,4 µl
	% 10 <i>Dcx</i>	1,4 µl
	% 10 <i>Neurod1</i>	
	Pre-Amp Master Mix	5 µl
NFW	1 µl	
cDNA	5 µl	

Karışım hazırlandıktan sonra her bir PCR tüpüne 20 µl dağıtılmıştır. Daha sonra üzerlerine 5 µl cDNA eklenmiştir ve PCR cihazına aşağıdaki program (Tablo 9) kurulup çalışma başlatılmıştır.

### PCR Programı;

**Tablo 9.** Pre-amplifikasyon için PCR programı

95 °C	1 dk.	
95 °C	15 sn	13 döngü
60 °C	4 dk.	
4 °C	∞	

PCR sonunda 25 µl Pre-Amp cDNA ürünü elde edilmiştir.

### 3.2.11. Gen Ekspresyonu

LightCycler 480 II (Roche, Almanya) Real-Time PCR cihazı kullanılmıştır. Gen ekspresyon çalışması yapılırken aşağıdaki prosedür takip edilmiştir.

1. Pre-Amp cDNA ürünü 1/40 oranında NFW ile seyreltilmiştir.
2. Aşağıda yer alan tablodaki (**Tablo 10**) miktarlarda reaksiyon plate (Roche, Almanya) üzerine dağıtılmıştır.

**Tablo 10.** Gen ekspresyon çalışması için gerekli malzemeler ve miktarları.

2X Probe Master Mix	10 µl
Primer/Probe	1 µl
NFW	4 µl
Pre-amp cDNA	5 µl

3. LightCycler 480 II (Roche, Almanya) Real-Time PCR cihazına aşağıdaki program kurulmuştur (**Tablo 11**) ve çalışma başlatılmıştır.

**Tablo 11.** Gen ekspresyonu çalışması için kullanılan PCR programı.

95 °C	10 dk	45 döngü
95 °C	10 sn	
60 °C	30 sn	
72 °C	1 dk	
40 °C	30 sn	

4. Her bir örnek çift çalışılmıştır.
5. House-keeping gen olarak actin, beta kullanılmıştır.
6. Ekspresyonu araştırılan genlere ait bilgiler aşağıdaki gibidir.
7. Veriler delta delta ct metodu kullanılarak normalize edilmiştir.

### 3.2.12. İstatiksel Analizler

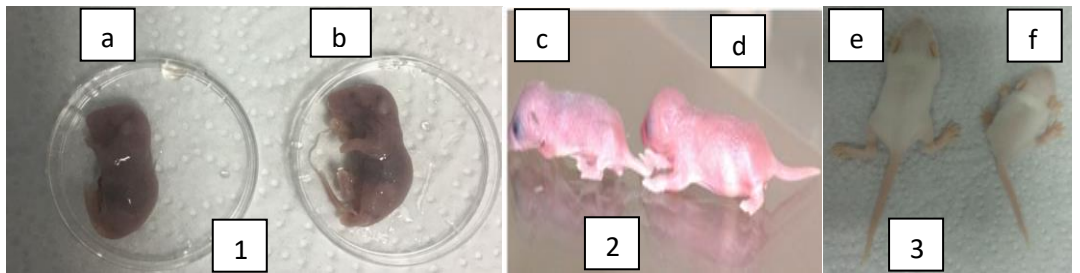
Verilerin analizi IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2013) yazılımı ile yapılmıştır. Verilerin dağılımına histogram, qq plot ve Shapiro-Wilk testi ile bakılmıştır. İki grup arası verilerin karşılaştırılmasında bağımsız t-testi ve bağımlı t-testi testleri kullanılmıştır. 3 ve daha çok gruptan oluşan kıyaslamalarda ANOVA ve anlamlı olma durumunda ikili karşılaştırılma için Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Özet istatistik olarak birim sayısı (n), yüzde (%), ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir.  $p < 0,05$  (miRNA analizi için  $p < 0,01$ ) anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir. Grafiklerin yapımında GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA, USA) yazılımı kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

miR-124-3p mikroenjeksiyonu sonucu 24 yavru fare doğmuştur. Bunlardan 10 tanesi erkek, 14 tanesi dişidir. Kontrol grubunda ise 8 erkek ve 9 dişi fare olmak üzere 17 yavru dünyaya gelmiştir. Bu farelerin hem kilo takipleri hem davranış deneyleri yapılmıştır.

### 4.1. Farelerde Fenotipik Bulgular

miR-124-3p mikroenjeksiyonu sonucunda farelerin hem prenatal hem postnatal dönemde daha iri oldukları gözlemlenmiştir. Birinci resimdeki embriyolar E19,5 günlüktür; soldaki (a) kontrol embriyo iken sağdaki (b) miR-124-3p mikroenjekte edilmiş embriyodur. İkinci resimdeki doğumdan sonra 2 günlük yavru farelerdir; soldaki (c) kontrol yavru iken sağdaki (d) miR-124-3p mikroenjekte edilmiş yavrudur. Üçüncü resimdeki ise doğumdan sonra 7 günlük yavru farelerdir; soldaki (e) miR-124-3p mikroenjekte edilmiş yavru iken sağdaki (f) kontrol yavrudur (**Şekil 19**). Ayrıca taşıyıcı annelerin uterusları çıkarıldığında iki embriyonun bir plasenta içinde (ikizlik) olduğu durumlar da fenotipik gözlemlerimiz arasındadır.



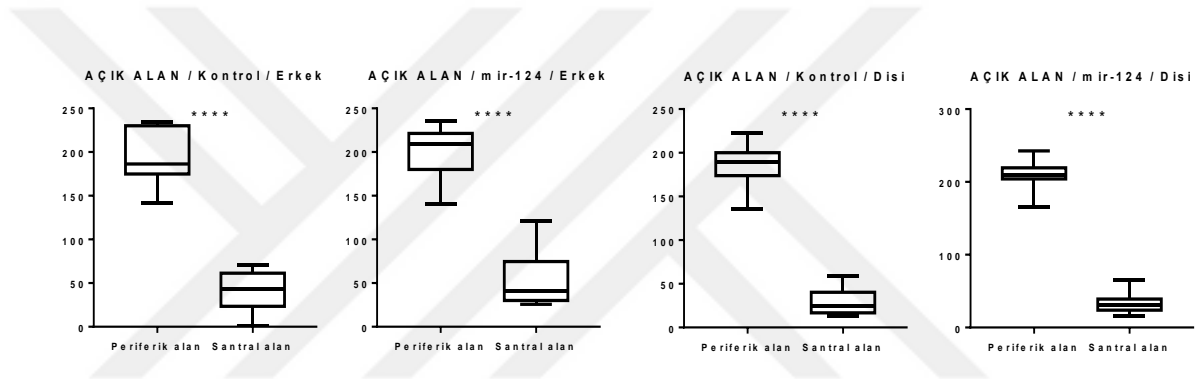
**Şekil 19.** Embriyoların farklı günlerde alınmış fotoğrafları.



## 4.2. Davranış Deneyi Bulguları

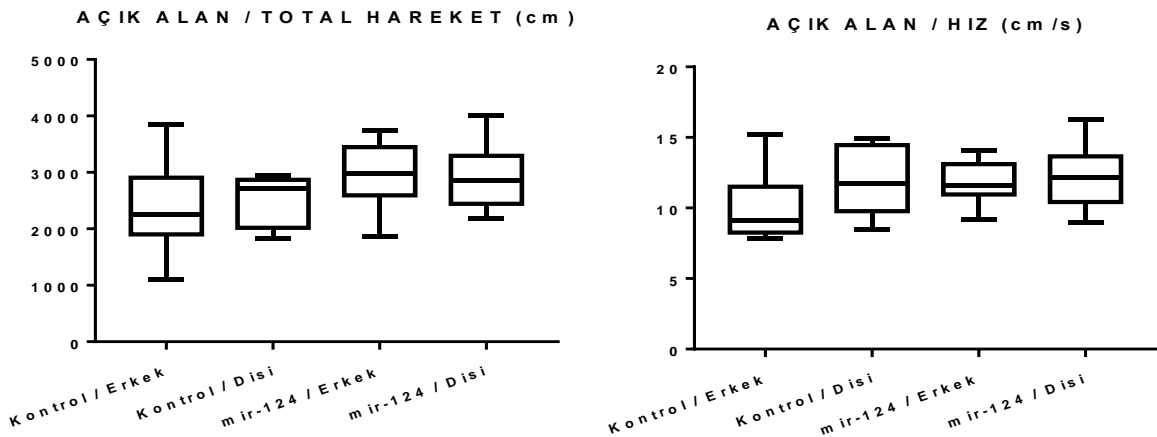
### 4.2.1. Açık Alan Deneyi Bulguları

Açık alan deneyinde cinsiyet ayrımı olmaksızın sağlıklı bir fare santral (merkez) yerine periferde (kenarlar) zaman geçirmeyi tercih etmektedir. Kontrol grubumuz için açık alan deney bulgularına bakıldığında hem erkek hem de dişi farelerin santral alana kıyasla periferde daha çok zaman geçirdiği saptanmıştır ( $p < 0,0001$ ). Bu bulgu açık alan deneyimizin doğru şekilde yapıldığını ispatlar niteliktedir. miR-124\* farelerimizde kontrol grubumuz ile aynı davranışı sergileyerek santral alana kıyasla periferde daha çok zaman geçirmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. Gruplara göre açık alan deneyi bulguları.

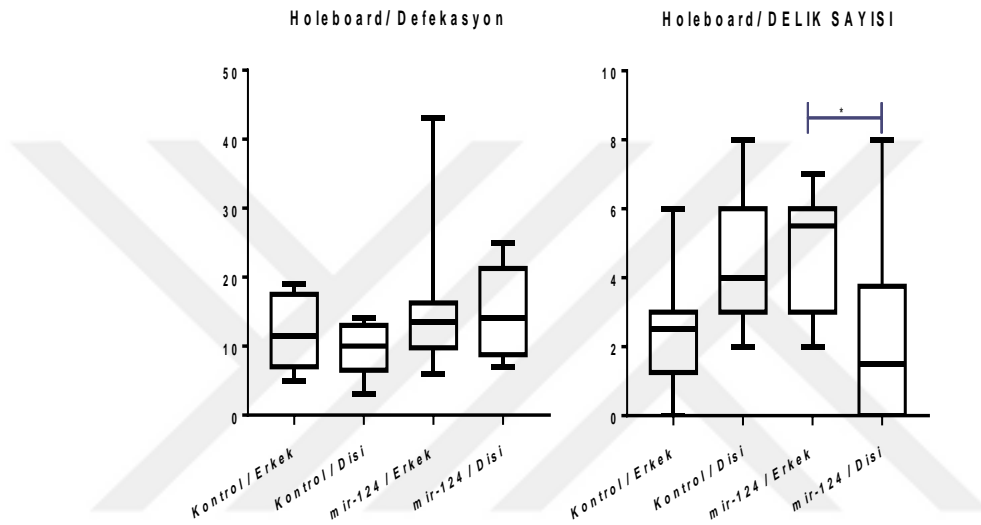
Gruplar arasındaki total hareket ve hız bakıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanamasa da miR-124\* erkekler kontrol erkeklerden hem totalde daha çok yol kat etmiştir hem de daha hızlıdır (Şekil 21).



Şekil 21. Açık alanda gruplara göre total hareket ve hız kıyaslaması.

#### 4.2.2. Delikli Tahta Deneyi Bulguları

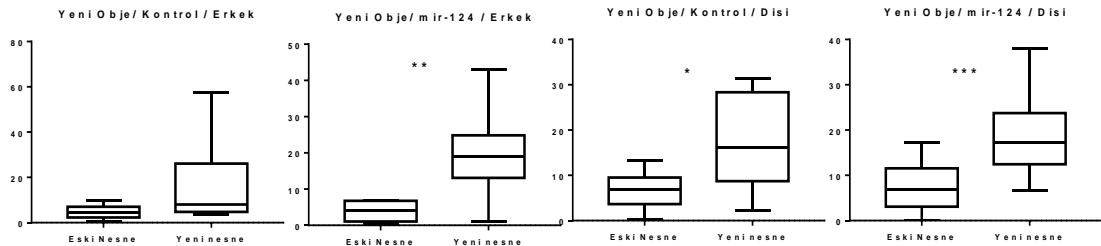
Delikli tahta deneyinde baş sokma sayısı azaldıkça anksiyetenin arttığı düşünülmektedir. Ayrıca fareler stres altında iken dışkılama davranışı sergilemektedir. Defekasyon sayısı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır. Baş sokma sayısı açısından ise miR-124\* erkeklerle kıyasla miR-124\* dişilerde anksiyetenin arttığı saptanmıştır ( $p<0,05$ ) (Şekil 22).



Şekil 22. Gruplar arasında defekasyon ve delik sayısının kıyaslanması.

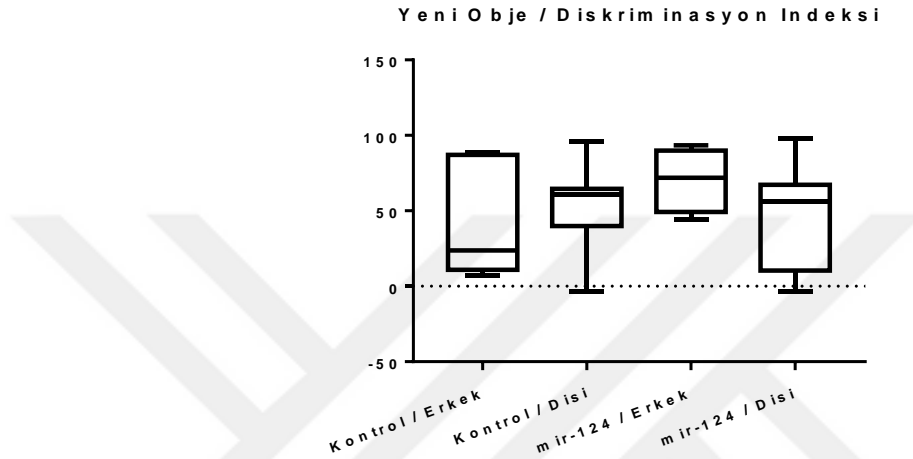
#### 4.2.3. Yeni Nesne Tanıma Bulguları

Yeni nesneye olan ilgiyi kıyasladığımız deneyde kontrol ile kıyaslandığında miR-124\* erkekler yeni nesne yanında daha fazla zaman geçirmiştir ( $p<0,01$ ). Kontrol dişi farelere kıyasla ( $p<0,05$ ) miR-124\* dişiler ( $p<0,001$ ) yeni nesne yanında daha çok vakit geçirmişlerdir (Şekil 23).



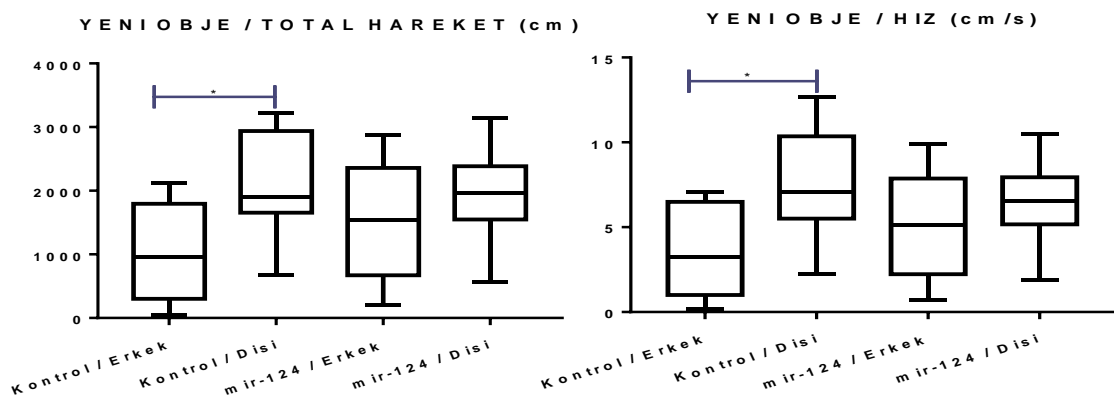
Şekil 23. Gruplar arasında yeni nesne ile geçirilen vaktin kıyaslanması.

Farelerin toplam zamanın yüzde kaçında yeni nesne ile vakit geçirdiklerini ölçen diskriminasyon indeksine bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamış olsa da kontrol dişiler ile miR-124\* dişiler arasında diskriminasyon indeksi açısından fark gözlenemezken miR-124\* erkeklerin kontrol erkeklere kıyasla yeni nesne ile daha çok zaman geçirdiği saptanmıştır (Şekil 24).



Şekil 24. Diskriminasyon indeksinin gruplar arası kıyaslanması.

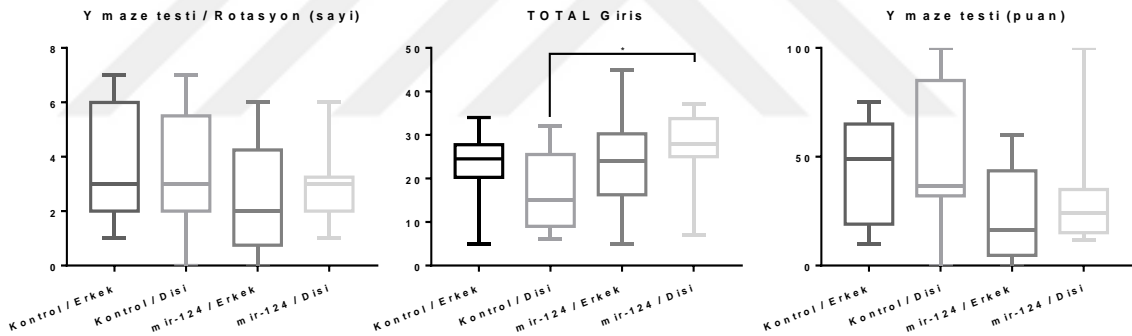
Yeni nesne deneyinde farelerin total hareketine bakıldığında kontrol dişilerin kontrol erkeklerden daha fazla hareket ettiği hem daha hızlı olduğu saptanmıştır ( $p < 0,05$ ) benzer şekilde miR-124\* dişiler de miR-124\* erkeklerden daha fazla ve daha hızlı hareket etmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır (Şekil 25).



Şekil 25. Gruplar arasında total hareket ve hız kıyaslanması.

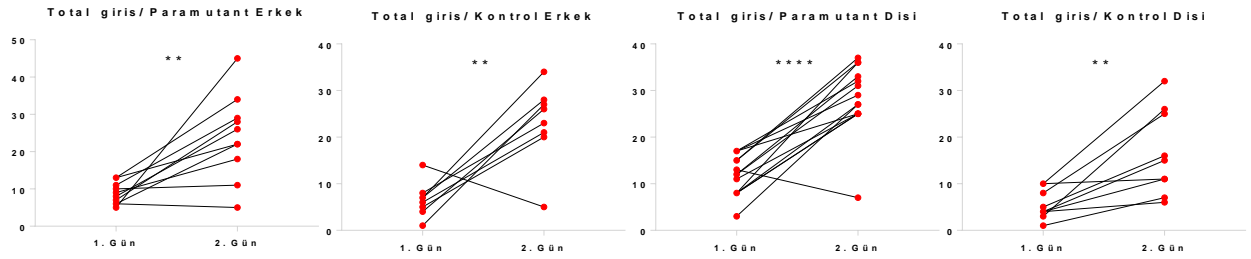
#### 4.2.4. Y Labirent Deney Bulguları

Kısa süreli spasyal belleği ölçmek için kullandığımız Y labirent deneyinde birinci gün 15 dk. eğitimin ardından hemen 5 dk. test, ikinci gün ise 15 dk. eğitimden sonra 3 saat ara ve arkasından 5 dk. test uygulanmaktadır. Y labirent deneyinin 2. gün verilerinin kullanılarak elde edildiği bulgulara bakıldığında miR-124\* erkeklerin kontrol grubu erkeklerinden daha az rotasyon yaptığı ancak bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. miR-124\* dişiler ise kontrol dişiler ile benzer profil sergilemiştir. Kollara total giriş sayıları açısından miR-124\* dişi ile erkekler arasında istatistiksel bir fark saptanamazken, miR-124\* dişiler kontrol dişilerden daha çok giriş yapmıştır ( $p<0,05$ ). Y labirent puanı (ayrıntılı bilgi 3.3.3. 4.Y Labirent Deneyi) hesaplandığında ise Y labirent puanının miR-124\* erkek ve dişilerin kontrol erkek ve dişilerden daha düşük olduğu saptanmıştır ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir (**Şekil 26**).



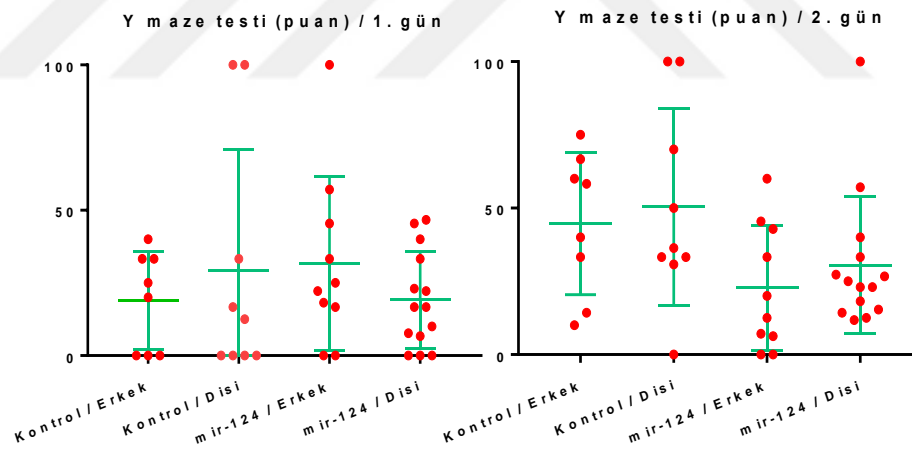
**Şekil 26.** Gruplar arası rotasyon sayısı, kollara total giriş ve Y labirent puan kıyaslaması (2. gün).

Kısa süreli spasyal belleği ölçmesi sebebiyle çalışmamız için önem arz eden Y labirent deneyinde, 2. gün verilerinin ortalamaları alınarak istatistiksel analiz yapılması sebebiyle her bir fareyi gözden kaçırmamak adına deneyin 1. gün verilerini de kullanarak ek istatistiksel analizlere baş vurulmuştur. Günlere göre kollara total giriş sayısı kıyaslandığında, 2. gün kollara giriş sayısında paramutant ve kontrol erkeklerde artış saptanmıştır ( $p<0,01$ ). Bu bulguya ek olarak kontrol dişilere ( $p<0,01$ ) kıyasla miR-124\* dişiler ( $p<0,0001$ ) 2. gün kollara daha çok giriş yapmıştır (**Şekil 27**).



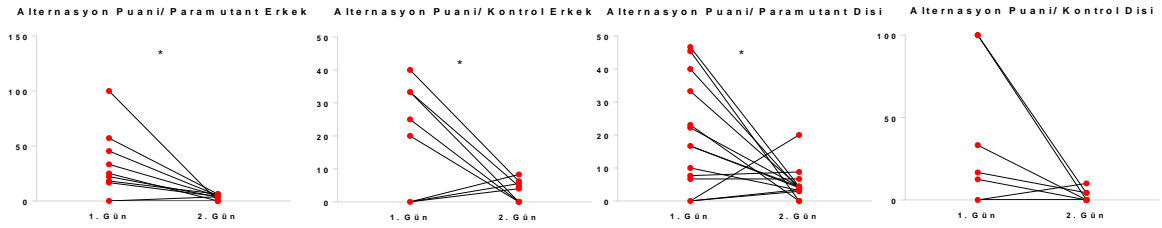
**Şekil 27.** Gruplar arasında 1. gün ve 2. gün total giriş sayısının kıyaslanması.

Kısa süreli spasyal bellek kendi içinde kıyaslandığında, 1. gün miR-124\* erkeklerin kontrol erkeklerden daha başarılı olduğu ancak 2. gün bu durumun tam tersine davrandıkları saptanmıştır. miR-124\* dişilerin ise hem 1. gün hem de 2. gün kontrol dişilerden daha başarısız görünmesine rağmen 1. güne kıyasla 2. gün öğrenmesinin daha iyi olduğu saptanmıştır (Şekil 28).



**Şekil 28.** Gruplar arası 1. gün ve 2. gün açısından Y labirent puanının kıyaslanması.

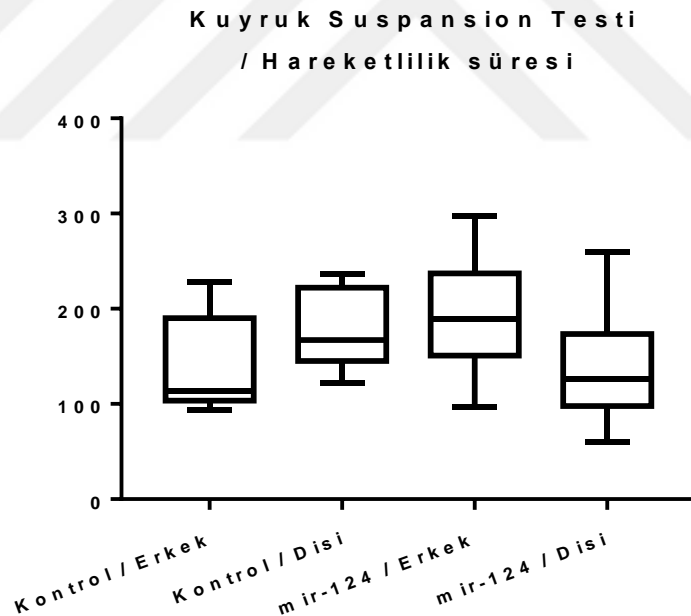
Çalışmamızın epigenetik bir çalışma olması sebebiyle paramutant bazı bireylerin daha çok etkilenip farklı davranacağını düşünerek verileri daha doğru değerlendirebilmek adına 1. gün ve 2. gün alternasyon puanı açısından yeniden istatistiksel analiz yapılmıştır. 2. gün paramutant ve kontrol erkeklerde azalış saptanırken ( $p < 0,05$ ), miR-124\* dişilerin de alternasyon puanı kontrol dişilerden daha azdır ( $p < 0,05$ ) (Şekil 29).



Şekil 29. Gruplar arası Y labirent puanı (alternasyon puanı) kıyaslaması.

#### 4.2.5. Kuyruktan Asma Deneyi Bulguları

Kuyruktan asılan kontrol erkeklere kıyasla miR-124\* erkekler daha uzun süreli olarak kurtulmak için hareket ederken kontrol dişilerin aksine miR-124\* dişiler daha az süreli olarak kurtulmaya çalışmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır (Şekil 30).

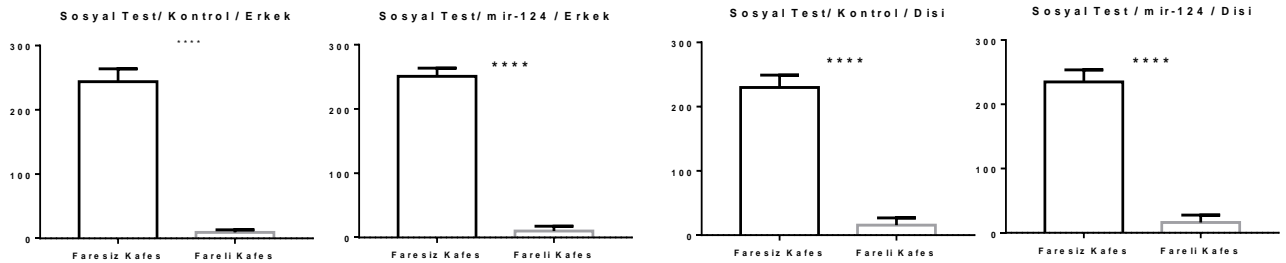


Şekil 30. Gruplar arası kuyruktan asılma sonrası hareketlilik süresinin kıyaslanması.

#### 4.2.6. Sosyal Alan Deneyi Bulguları

Sosyal alan deneyinde kontrol grubunun hem erkek hem de dişi fareleri faresiz kafeste (yeni nesne) daha çok zaman geçirmiştir ( $p < 0,0001$ ). Bu veri deneyin güvenilir yapıldığının ispatı niteliğindedir. miR-124\* erkek ve dişi farelerde kontrol grubu erkek

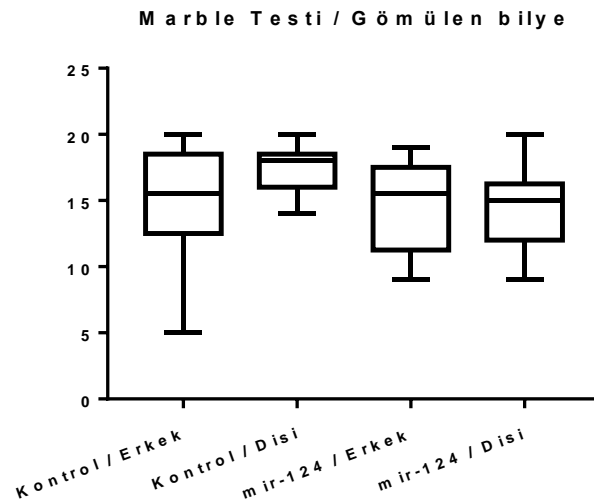
ve dişi fareler ile benzer profil sergilemiştir. Bu yüzden gruplar arasında istatistiksel farklılık saptanamamıştır (**Şekil 31**).



**Şekil 31.** Gruplar arasında fareli kafes (eski nesne) faresiz kafesde (yeni nesne) geçirilen zamanın kıyaslanması.

#### 4.2.7. Bilye Deneyi Bulguları

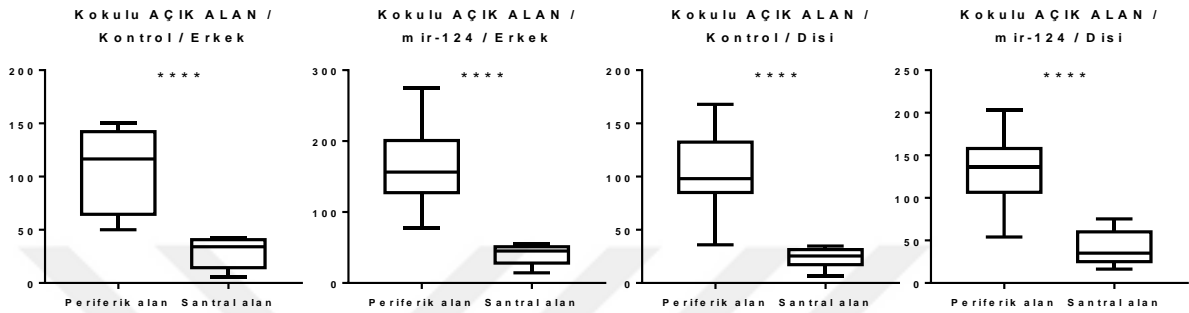
İstatistiksel olarak anlamlılık saptanamamış olsa da miR-124\* erkekler kontrol erkeklerle benzer davranırken miR-124\* dişiler kontrol dişilere kıyasla daha az bilye gömmüştür (**Şekil 32**).



**Şekil 32.** Gruplar arası gömülen bilye sayısının kıyaslanması.

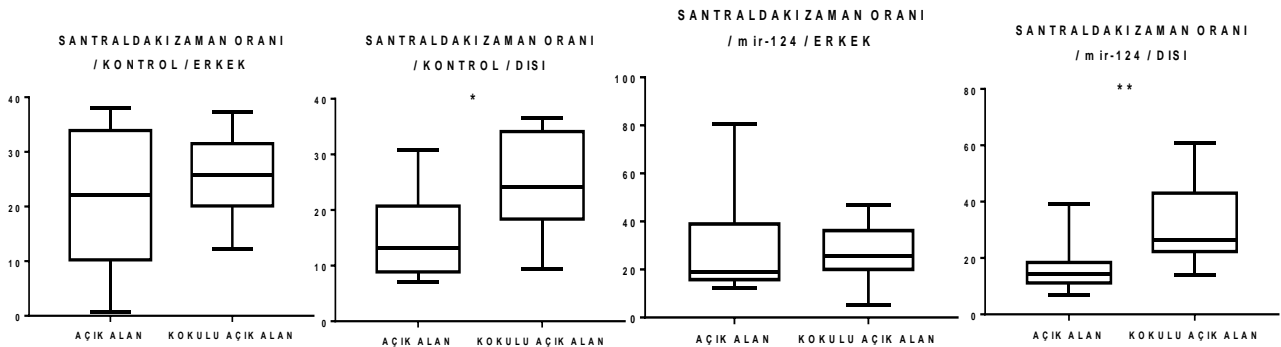
#### 4.2.8. Koku Deneyi Bulguları

Açık alan deneyine ek olarak merkeze kabuk tarçın koyduğumuz koku deneyinin bulgularına bakıldığında hem kontrol hem de paramutant farelerimiz santral alana kıyasla periferde daha çok zaman geçirdiği saptanmıştır ( $p<0,0001$ ) (Şekil 33).



Şekil 33. Koku varlığında gruplar arası açık alan davranışının kıyaslanması.

Koku varken ve yokken merkezde geçirilen zaman gruplar arasında kıyaslandığında, kontrol erkekler ve miR-124\* erkekler az da olsa koku varlığında merkezde daha çok zaman geçirirler de istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır. Kontrol dişilerin ( $p<0,05$ ) ve miR-124\* dişilerin ( $p<0,01$ ) koku varlığında merkezde daha çok zaman geçirdiği saptanmıştır (Şekil 34).



Şekil 34. Koku varlığı ve yokluğunda merkezde geçirilen zamanın kıyaslanması.



#### 4.2.9. Davranış Deneylerinin Değerlendirilmesi

Davranış deneyleri genel olarak değerlendirilmek istendiğinde aşağıdaki tablo ortaya çıkmıştır (**Tablo 12**). Tabloya dikkatle bakıldığında kontrol grubu ve erkek ve dişileri arasında farklılık göze çarparken miR-124\* erkek ve dişileri arasında bu fark azdır. Cinsiyet farklılığı kaynaklı olduğunu düşündüğümüz bu farklanma kontrolde normal doğasında iken paramutantlarda bu denge değişmiş görünmektedir.

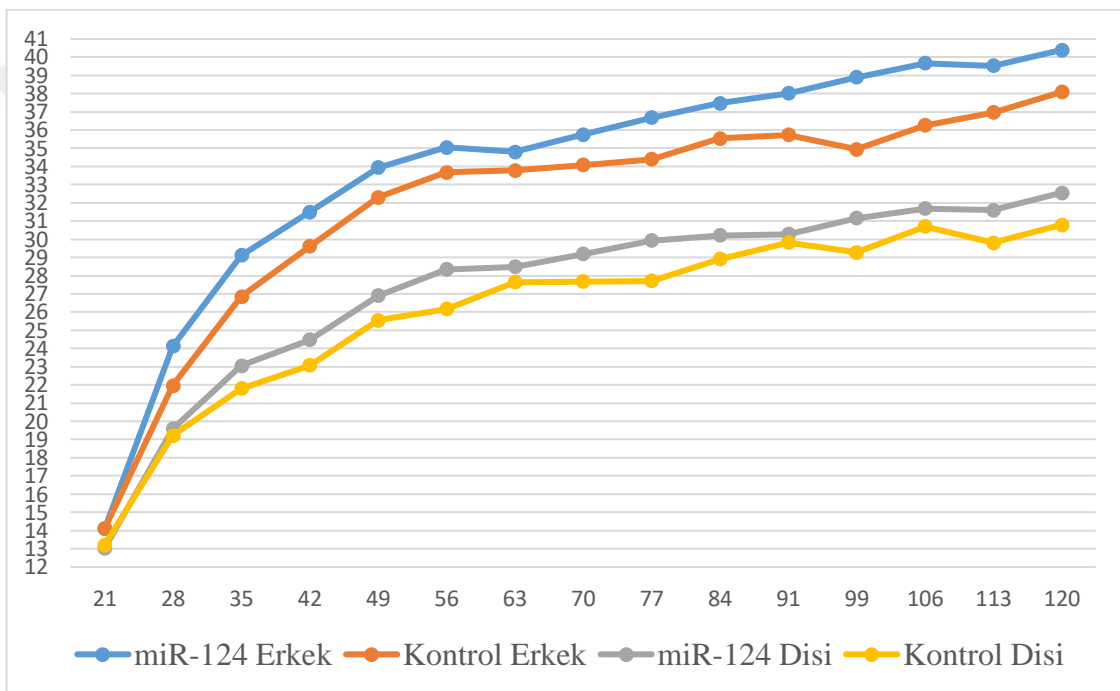
**Tablo 12.** Davranış deneylerinin genel olarak değerlendirilmesi

Deney Adı	Ölçülen Parametre	Kontrol Erkek	Kontrol Dişi	miR-124* Erkek	miR-124* Dişi
<b>Açık Alan</b>	Merkezde geçen zaman	+	+	+	+
	Total Yol	+	++	+++	+++
	Hız	+	++	++	++
<b>Delikli Tahta</b>	Defekasyon	+	+	++	++
	Delik Sayısı	+	++	++++	-
<b>Yeni Nesne</b>	Yeni nesnede geçen	+	+++	++	+++
	Total Yol	+	++	++	++
	Hız	+	++	++	++
	Diskriminasyon indeks	+	++	+++	++
<b>Y Labirent</b>	Rotasyon Sayısı	+	+	+	+
	Total Giriş	++	++	+	+
	Formül	++	++	+++	++
<b>Kuyruktan Asma</b>	Hareketlilik Süresi	+	++	+++	+
<b>Sosyal</b>	Fareli/Faresiz geçen zaman	+	+	+	+
<b>Bilye Gömme</b>	Gömülen Bilye Sayısı	+	++	+	+
<b>Koku</b>	Merkezde geçen zaman	+	+	+	+

	Koku/Kokusuz kıyaslama	+	+	+	++
--	---------------------------	---	---	---	----

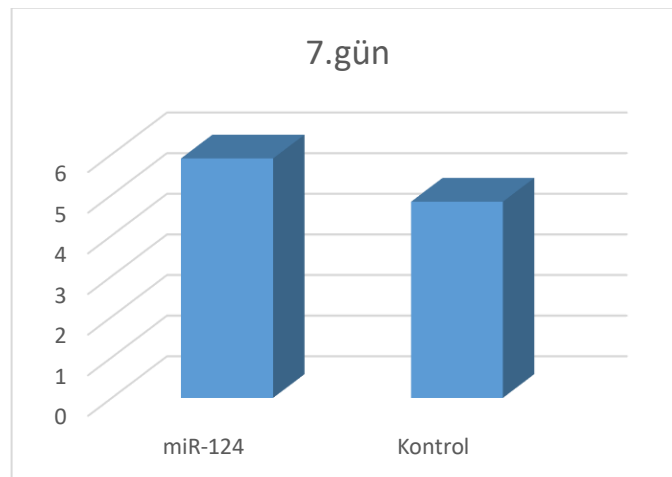
### 4.3. Kilo Takibi Bulguları

miR-124\* fareler ve kontrol grubu fareler ilk olarak 7. günde tartıldıktan sonra 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 77, 84, 91, 99, 106, 113 ve 120. günde tartılmışlardır. Tartımlar sonucu miR-124\* hem dişi hem de erkek farelerin kontrol erkek ve dişilerden daha ağır oldukları **Şekil 35**'teki grafikte bariz olarak belirgindir.



**Şekil 35.** Günlere göre Kontrol ve miR-124\* erkek ve dişileri arasındaki ağırlık kıyaslaması.

Kontrol ve miR-124\* fareler doğdukları günden itibaren gözlemlendiklerinde; cinsiyet ayrımı yapılanaya kadar miR-124\* farelerin kontrol grubu farelere kıyasla daha iri oldukları görülmüştür. Özellikle 7. gün ağırlık verilerine bakıldığında bu durum açıkça göze çarpmaktadır (**Şekil 36**).

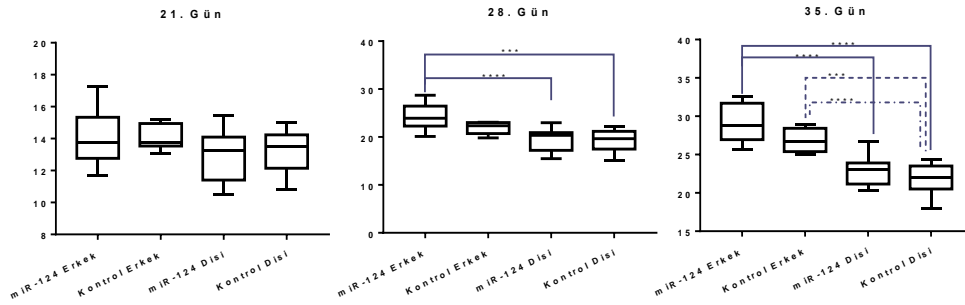


**Şekil 36.** Fareler 7 günlük olduklarında kontrol ve miR-124\* arasındaki ağırlığın kıyaslanması. (Henüz cinsiyet ayrımı yapılamamaktadır.)

Fareler, 21 günlük olduklarında kontrol erkeklerin miR-124\* erkeklerden ve kontrol dişilerin miR-124\* dişilerinden çok az da olsa daha ağır oldukları fark edilmiştir (**Şekil 37**).

Fareler 28 günlük olduklarında ise miR-124\* erkeklerinin ağırlıklarında hızlı bir artış olduğu göze çarpmaktadır. Bu durum kontrol erkekler arasında istatistiksel bir farklılık olarak yansımamaktayken, miR-124\* erkeklerin paramutant ( $p < 0,0001$ ) ve kontrol grubu ( $p < 0,001$ ) dişilerinden daha ağır oldukları saptanmıştır (**Şekil 37**). Ancak erkek ve dişi fareler arasında bu tarz bir ağırlık farkı normaldir. Erkek fareler her zaman dişi farelerden daha ağırdır.

Fareler, 35. güne ulaştıklarında ise miR-124\* erkeklerin ağırlıklarındaki artışın devam ettiği görülmektedir fakat bu artışın kontrol grubu erkekleri ile arasında istatistiksel bir farklılık oluşturmamaktadır. miR-124\* erkeklerin 28. günde olduğu gibi paramutant ( $p < 0,0001$ ) ve kontrol grubu ( $p < 0,0001$ ) dişilerinden daha ağır olduğu saptanırken 35. günde kontrol grubu erkeklerinin de paramutant ( $p < 0,0001$ ) ve kontrol grubu ( $p < 0,001$ ) dişilerinden daha ağır oldukları saptanmıştır. Bu durum kontrol grubu erkeklerinin miR-124\* erkekleri bir hafta geriden izlediğinin kanıtıdır (**Şekil 37**). Özetle miR-124\* erkeklerinin ağırlık olarak 28. günde sergilediği ağırlık farkını kontrol grubu erkekleri 35. günde sergilemektedir. Ayrıca günler ilerledikçe paramutantların hem erkek hem de dişi farelerinde kontrole kıyasla ağırlık artışı göze çarpmaktadır (**Şekil 37**).

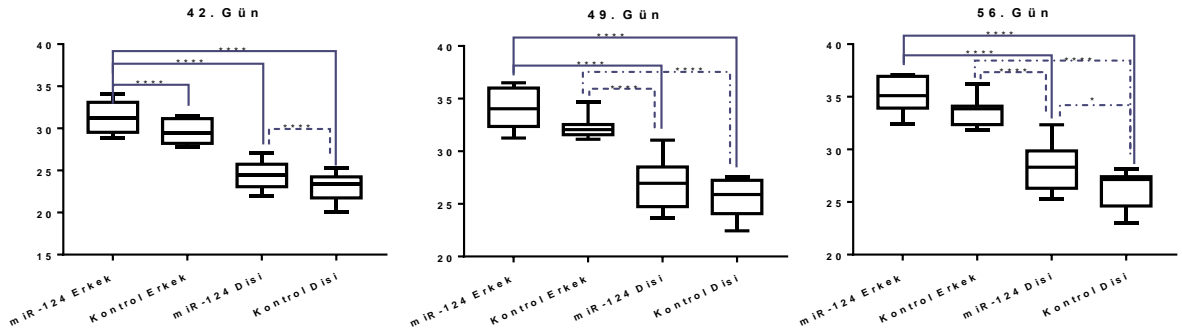


**Şekil 37.** Fareler 21, 28 ve 35 günlük olduklarında kontrol ve miR-124\* arasındaki ağırlığın cinsiyetlere göre kıyaslanması.

miR-124\* erkeklerin 42. günde kontrol grubu erkeklerinden ( $p < 0,0001$ ) daha ağır olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda miR-124\* dişilerin de kontrol grubu dişilerinden ( $p < 0,0001$ ) daha ağır oldukları da 42. günün bulguları arasındadır. Özetle, miR-124\* erkek ve dişilerin kontrollerinden daha ağır oldukları 42. günde bariz görülmektedir (**Şekil 38**).

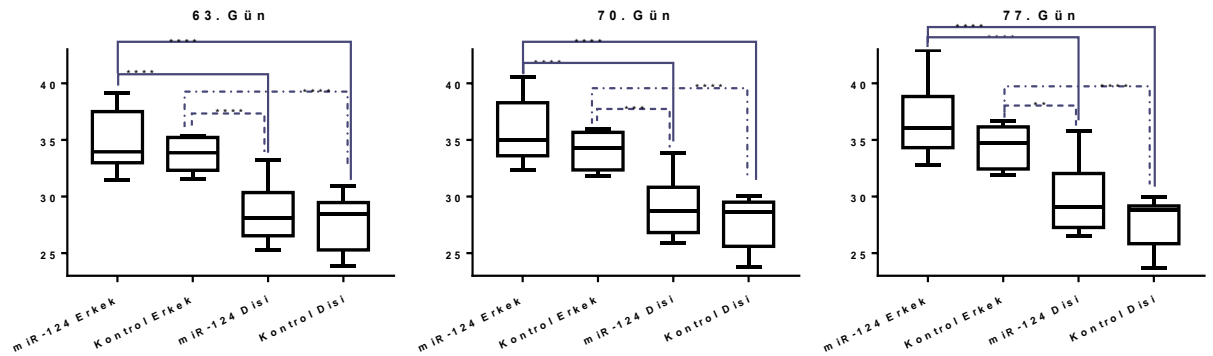
Fareler 49 günlük olduklarında; hem miR-124\* erkeklerin hem de kontrol grubu erkeklerin paramutant ( $p < 0,0001$ ) ve kontrol grubu ( $p < 0,0001$ ) dişilerinden daha ağır oldukları saptanmıştır. Bu durum kontrol grubu erkeklerinin miR-124\* erkekleri bir hafta geriden izlediğinin ikinci kez kanıtıdır (**Şekil 38**). Özetle miR-124\* erkeklerin ağırlık olarak 42. günde sergilediği farklanmayı kontrol grubu erkekleri 49. Günde sergilemektedir.

Farelerin 56 günlük ağırlık bulguları 49 günlük bulgular ile aynı iken bu duruma ek olarak miR-124\* dişilerin kontrol grubu dişilerden daha ağır oldukları saptanmıştır ( $p < 0,05$ ) (**Şekil 38**). Özetle; 42, 49 ve 56. günlerde kontrol grubu farelere kıyasla miR-124\* erkek ve dişiler ağırlık artışı istikrarlı şekilde sürdürmektedir.



**Şekil 38.** Fareler 42, 49 ve 56 günlük olduklarında kontrol ve miR-124\* arasındaki ağırlığın cinsiyetlere göre kıyaslanması.

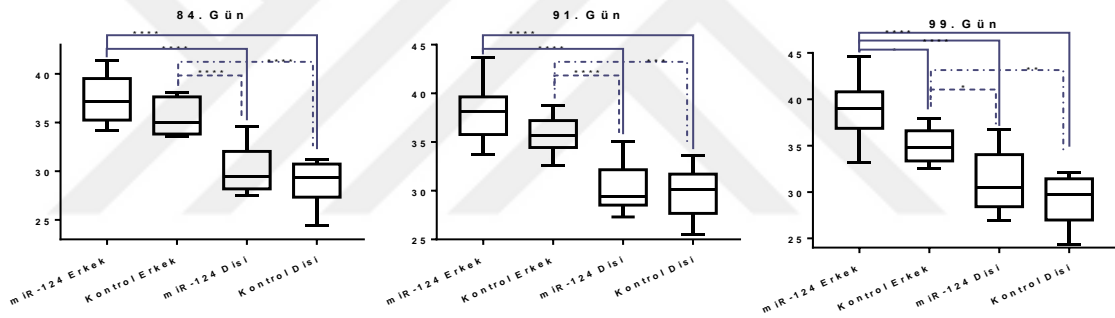
Fareler 63 günlük olduklarında; miR-124\* erkeklerin miR-124\* dişilerden ( $p < 0,0001$ ) ve kontrol grubu dişilerden ( $p < 0,0001$ ) daha ağır olduğu saptanırken kontrol grubu erkeklerinin de miR-124\* dişi ( $p < 0,0001$ ) ve kontrol grubu dişilerinden ( $p < 0,0001$ ) daha ağır olduğu saptanmıştır. Fareler 70 ve 77. günde 63. Günde sergiledikleri görüntüyü sergilemektedir. Ancak kontrol grubu erkeklerinin miR-124\* dişilerden 70. günde ( $p < 0,001$ ) ve 77. günde ( $p < 0,01$ ) daha ağır oldukları saptanmıştır (Şekil 39). Dişi farelerin ağırlık açısından 63. günden itibaren bir dalgalanma sergilediği gözlenmektedir. Bu durumun sebebi dişi farelerin yaklaşık 2 aylıkken eşeyssel olgunluğa erişmesi olabilir.



**Şekil 39.** Fareler 63, 70 ve 77 günlük olduklarında kontrol ve miR-124\* arasındaki ağırlığın kıyaslanması.

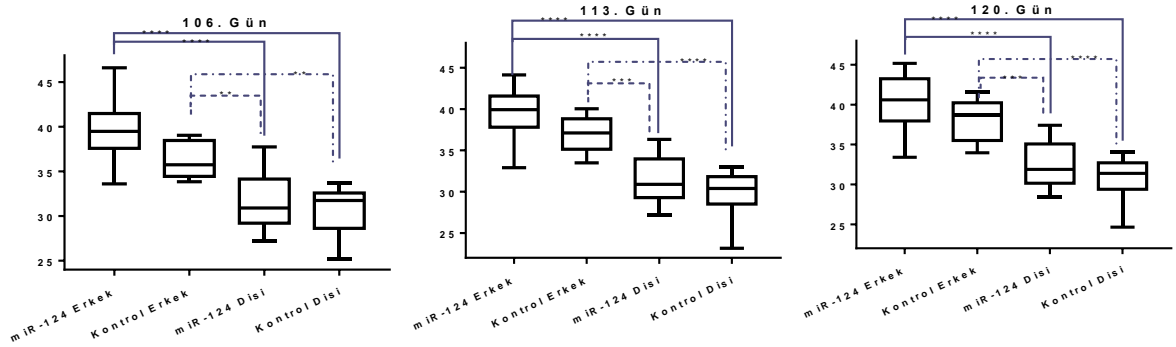
Fareler 84 günlük olduklarında; miR-124\* erkeklerin miR-124\* dişi ( $p < 0,0001$ ) ve kontrol grubu ( $p < 0,0001$ ) dişilerinden daha ağır oldukları saptanırken kontrol grubu erkeklerinin de paramutant ( $p < 0,0001$ ) ve kontrol grubu dişilerinden ( $p < 0,0001$ ) daha ağır oldukları saptanmıştır. Fareler 91 günlük iken ortalama olarak 84 günlükken sergiledikleri gibi bir görüntü sergilemişlerdir (Şekil 40).

Fareler 99 günlük olduklarında; miR-124\* erkeklerin tıpkı 84 ve 91. Günlerde olduğu gibi miR-124\* dişi ( $p<0,0001$ ) ve kontrol grubu ( $p<0,0001$ ) dişilerinden daha ağır oldukları göze çarpmaktadır. Kontrol grubu erkeklerinin de miR-124\* dişiler ( $p<0,05$ ) ve kontrol grubu dişilerinden ( $p<0,01$ ) daha ağır oldukları saptanmıştır. Ancak bu durum 84 ve 91. Günlerde olduğu gibi değildir. Bu durumun sebebi dişilerde eşeyssel olgunluk kaynaklı gelişen hormonal durum olabilir. Ayrıca, miR-124\* erkekler ile kontrol grubu erkekleri kıyaslandığında miR-124\* erkeklerin kontrol grubu erkeklerinden daha ağır oldukları saptanmıştır ( $p<0,05$ ). miR-124\* erkek farelerin 84, 91 ve 99. günlerde kontrol grubu erkeklerinden daha ağır oldukları çok açık belirgin iken miR-124\* dişiler ile kontrol grubu dişiler kıyaslandığında miR-124\* dişilerde yine bir dalgalanma göze çarpmaktadır (Şekil 40).



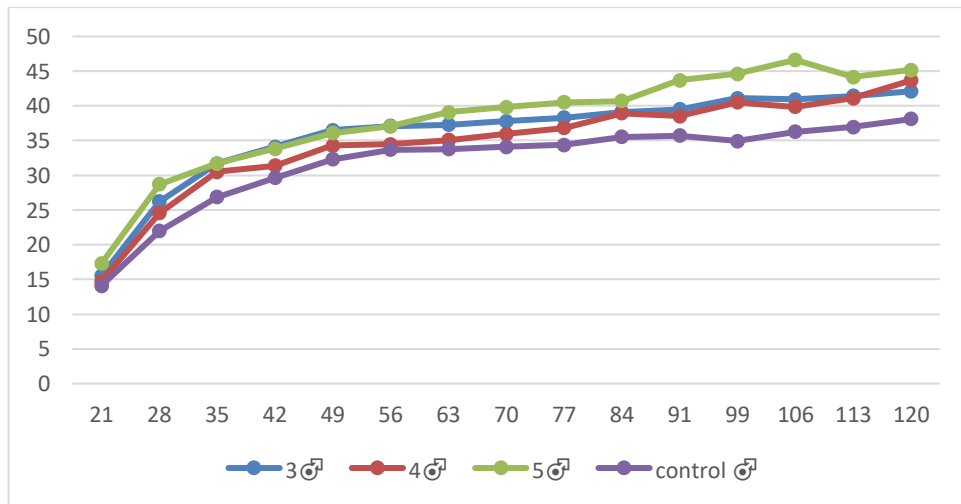
**Şekil 40.** Fareler 84, 91 ve 99 günlük olduklarında kontrol ve miR-124\* arasındaki ağırlığın kıyaslanması.

miR-124\* erkek farelerin 106, 113 ve 120. günlerde kontrol grubu erkekleri ile birlikte paramutant ve kontrol grubu dişilerinden de daha ağır oldukları durumu sürdürdükleri görülmektedir. Bununla birlikte miR-124\* erkeklerinin tıpkı diğer günlerde olduğu gibi kontrol grubu erkeklerinden daha ağır oldukları durumu korudukları gözlenirken miR-124\* dişilerde ağırlık açısından yine bir dalgalanma söz konusudur (Şekil 41).

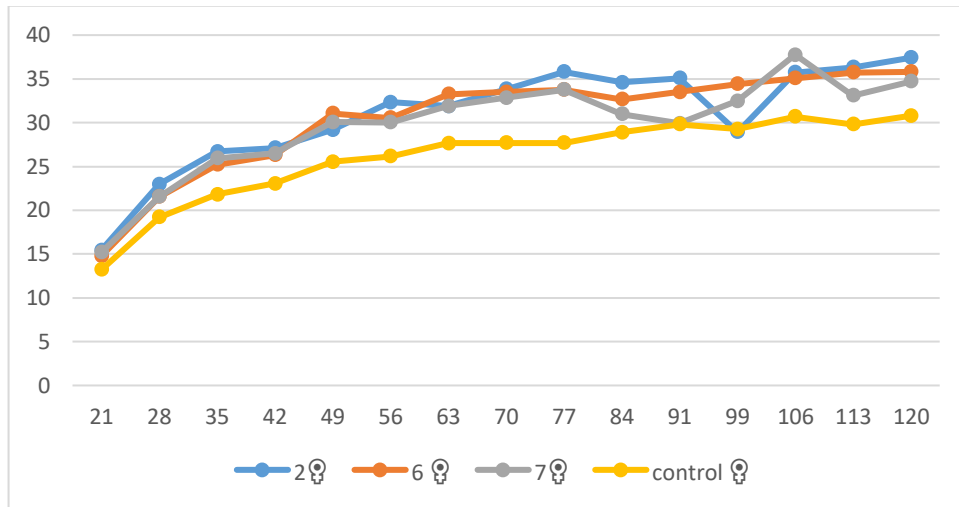


**Şekil 41.** Fareler 106, 113 ve 120 günlük olduklarında kontrol ve miR-124\* arasındaki ağırlığın kıyaslanması.

Paramutant ve kontrol grubu farelerin 120 gün boyunca haftalık olarak tartılmaları sonucu elde ettiğimiz ağırlık verilerinin ham haline dikkatle baktığımızda paramutant farelerin ağırlık dağılımlarının tıpkı bir yelpaze gibi farklı olduğu görülmüştür. Bu durum bazı paramutantların daha çok etkilenirken bazılarının daha az etkilenmiş olabileceğini düşündürmüştür. miR-124\* erkek farelerden 3, 4 ve 5 numaralı fareler kontrole kıyasla daha ağırdır (Şekil 42). miR-124\* dişi farelerden 2, 6 ve 7 numaralı fareler kontrole kıyasla daha ağırdır (Şekil 43).



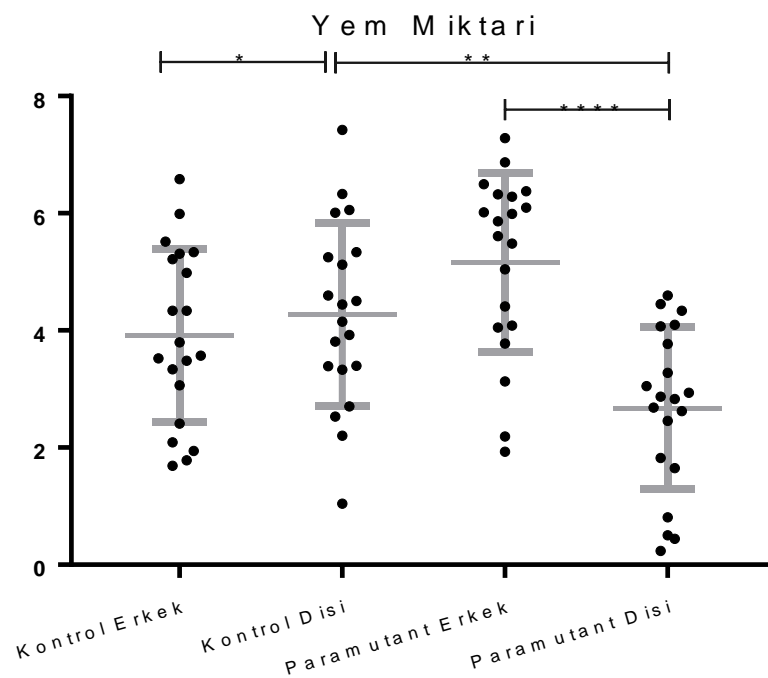
**Şekil 42.** Günlere göre en çok etkilenen erkek paramutant ve kontrol farelerin kıyaslanma grafiği.



**Şekil 43.** Günlere göre en çok etkilenen dişi paramutant ve kontrol farelerin kıyaslanma grafiği.

#### 4.3.1. Yem Yeme Bulguları

Her bir gruptan 5 erkek ve 5 dişi farenin 5 gün boyunca yemleri tartılarak günlük ne kadar yem tükettikleri veriye ulaşılmıştır. Kontrol grubu dişiler, kontrol grubu erkeklerden ( $p < 0,05$ ), miR-124\* dişilerden ( $p < 0,001$ ) ve miR-124\* erkekler ise miR-124\* dişilerden ( $p < 0,0001$ ) daha fazla yem tüketmiştir (Şekil 44).

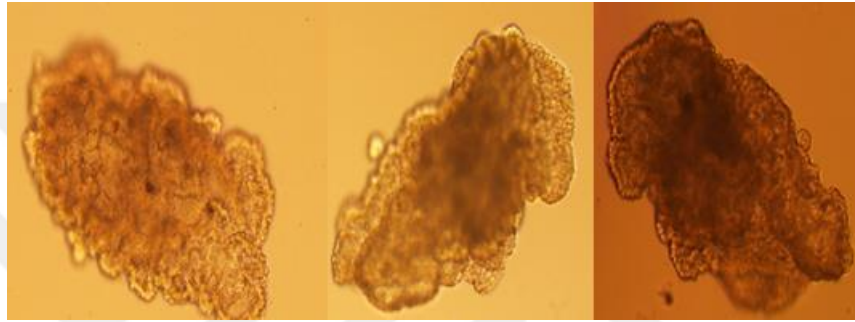


**Şekil 44.** Gruplar arası tüketilen yem miktarının kıyaslanması.



#### 4.4. NS Sayısı ve Alan Bulguları

miR-124-3p mikroenjekte taşıyıcı annenin uterusundan 7 embriyo (6 erkek,1 dişi), kontrol grubundan ise 11 embriyonun (6 erkek, 5 dişi) hipokampus dokusu primer hücre kültürü için çıkarılmıştır. Kültürün 12, 16 ve 21. günlerinde NS'lerin fotoğrafları alınmıştır (**Şekil 45**). Image J programı kullanılarak hem NS sayısı hesaplanmıştır hem de NS'lerin alan ölçümleri yapılmıştır.

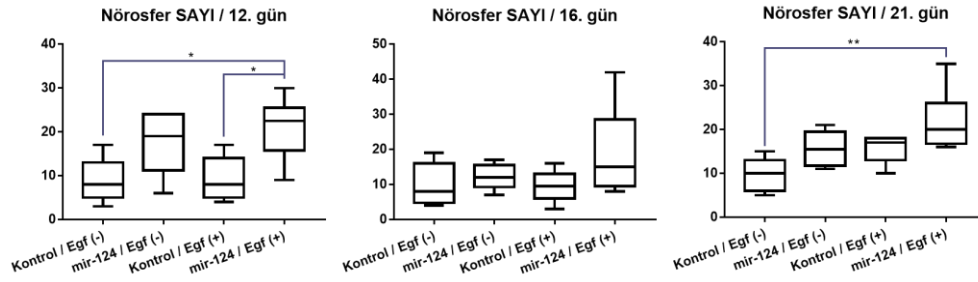


**Şekil 45.** 12, 16 ve 21. günlerde NS'lerin görüntüsü.

NS'ler 12 günlükken; EGF (+) paramutant embriyoların NS sayısı, EGF (-) ( $p < 0,05$ ) ve EGF (+) ( $p < 0,05$ ) kontrol grubundaki NS sayısından daha çok olduğu saptanmıştır. Ayrıca EGF varlığı kontrol grubunda NS sayısını etkilememiş görünürken, paramutatlarda EGF varlığında NS sayısı artmış görünmektedir ancak, istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanamamıştır (**Şekil 46**).

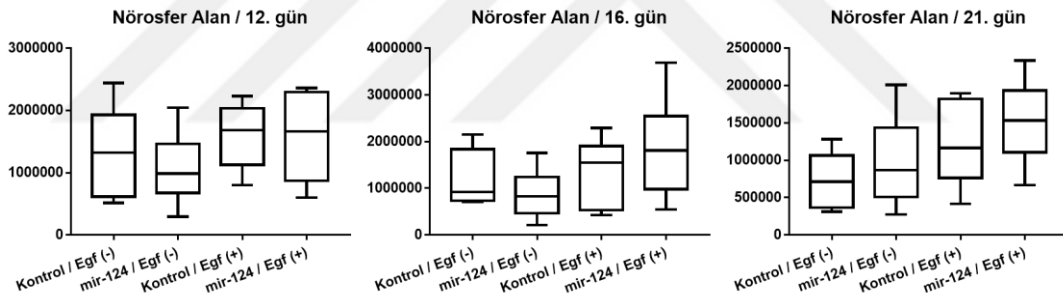
NS'ler 16 günlükken; EGF (+) paramutantların NS sayısı EGF (-) kontrol grubuna kıyasla daha fazla olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır. Ayrıca, EGF (+) paramutantların NS sayısı EGF (+) kontrol grubuna kıyasla daha fazladır ancak, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır. Ayrıca 12 günlük NS'lerde olduğu gibi 16 günlük NS'lerde de kontrol grubunda EGF varlığı NS sayısı etkilememiş görünürken, paramutatlarda EGF varlığında NS sayısı artmış görünmektedir. Ancak istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanamamıştır (**Şekil 46**).

NS 21 günlükken; EGF (+) paramutatlarda, EGF (-) kontrole kıyasla daha fazla NS saptanmıştır ( $p < 0,01$ ). Ayrıca 12. Güne kıyasla 21. günde EGF varlığında tıpkı paramutatlarda gibi kontrol grubunda da NS sayısı arttığı görülmektedir. Ancak istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanamamıştır (**Şekil 46**).



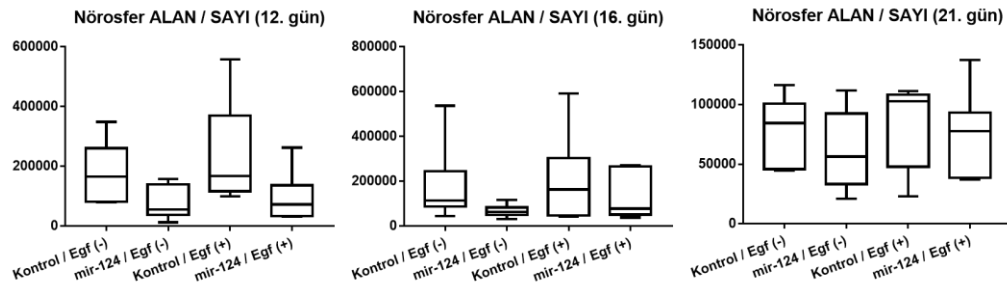
**Şekil 46.** Günlere göre NS sayısının kıyaslanması.

NS'lerin 12, 16 ve 21. Günlerde EGF varlığında hem kontrol hem de paramutantlarda alan büyüklüğü artmaktadır ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır. 12. Güne kıyasla 16 ve 21. Günlerde EGF varlığında paramutantlarda alan büyüklüğünün kontrol ile kıyasla arttığı görülmektedir (Şekil 47).



**Şekil 47.** Gruplar arası NS alan kıyaslanması.

NS başına düşen alan büyüklüğü bulgularına bakıldığında 12, 16 ve 21. günlerde EGF hem varken hem de yokken paramutantların alanının kontrollerden daha küçük olduğu saptanmıştır. Ancak bu durumda istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır (Şekil 48).



**Şekil 48.** Gruplar arası NS başına düşen alan kıyaslanması.

NS'lerin sayı, alan ve sayı/alanlarının değerlendirilip tablo oluşturulmuştur. Paramutantlarda EGF varlığı yokluğu fark etmeksizin NS sayısının arttığı gözlenmiştir. NS alan bulgusuna bakıldığında 12, 16 ve 21. günlerde EGF (+) iken kontrol grubuna kıyasla paramutantlarda NS alanı daha fazla artmıştır. NS oran bulgusuna bakıldığında ise 12, 16 ve 21. günlerde kontrole kıyasla paramutantlarda bu oran azalmıştır. Azalmış görünme sebebi, paramutantlarda NS sayısı fazla olmasıdır (**Tablo 13**).

**Tablo 13.** NS sayısı, alanı ve oranının kıyaslanması.

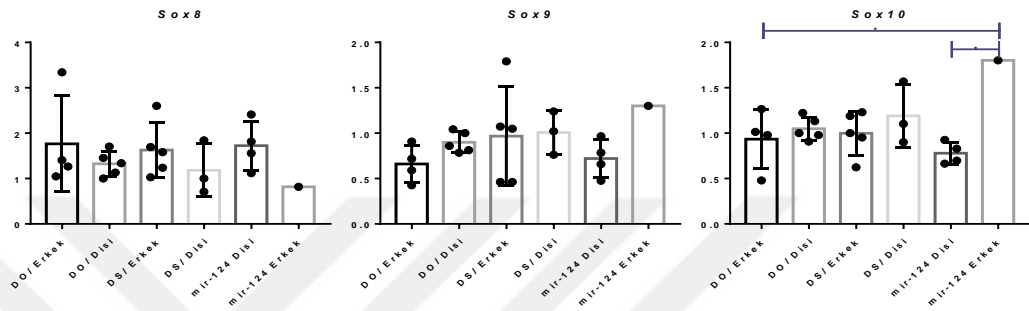
Parametre	Grup Adı	12. gün		16. gün		21. gün	
		EGF(-)	EGF(+)	EGF(-)	EGF(+)	EGF(-)	EGF(+)
Sayı	Kontrol	+	+	+	+	+	++
	Paramutant	++	+++	++	+++	++	+++
Alan	Kontrol	++	+++	+	++	+	+++
	Paramutant	+	+++	+	+++	++	++++
Oran	Kontrol	+++	+++	++	+++	+++	++++
	Paramutant	++	++	+	+	+	++

#### 4.5. mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları

##### 4.4.1. Hipokampus'te mRNA Ekspresyon Analiz Bulguları

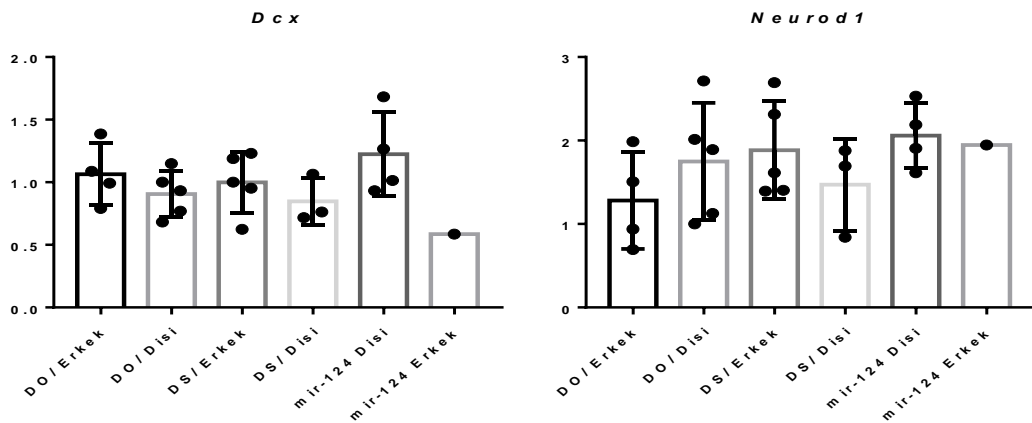
miR-124\* 5 embriyo (1 erkek, 4 dişi), kontrol grubunda ise DÖ 9 embriyo (4 erkek, 5 dişi) ve DS 8 yavru (5 erkek, 3 dişi) hipokampustan mRNA ekspresyon çalışması için kullanılmıştır.

Gruplar arasında hem erkek hem de dişiler için *Sox8* ve *Sox9* gen ekspresyon seviyesine bakıldığında istatistiksel bir anlamlılık saptanamamıştır. miR-124\* erkeğin *Sox10* gen ekspresyon seviyesinin DÖ erkeklerinden ( $P<0,05$ ) daha yüksek olduğu saptanırken benzer şekilde miR-124\* erkeğin *Sox10* gen ekspresyon seviyesinin miR-124\* dişilerden ( $p<0,05$ ) de yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 49).



Şekil 49. Hipokampusta *Sox8*, *Sox9* ve *Sox10* genlerinin mRNA ekspresyon kıyaslaması

Gruplar arasında hem erkek hem de dişiler için *Dcx* ve *Neurod1* gen ekspresyon seviyesine bakıldığında istatistiksel bir anlamlılık saptanamamıştır (Şekil 50).



Şekil 50. Hipokampusta *Dcx* ve *Neurod1* genlerinin mRNA ekspresyon kıyaslaması.

Kontrol erkekler ile miR-124\* erkekler kıyaslandığında, miR-124\* erkeklerde *Sox8* ve *Dcx* mRNA ekspresyon seviyesi azalırken *Sox9*, *Sox10* ve *Neurod1* mRNA ekspresyonu artmıştır. Kontrol dişiler ile miR-124\* dişiler kıyaslandığında miR-124\* dişilerde *Sox9* ve *Sox10* mRNA ekspresyon seviyesi azalırken, *Sox8*, *Dcx* ve *Neurod1* mRNA

ekspresyon seviyesi artmıştır (**Tablo 14**). MiR-124\* dişilerdeki *Sox9* mRNA ekspresyon seviyesindeki azalış tahmin algoritmasında *Sox9* geninin %67 oranında miR-124-3p'nin hedefi olmasını doğrular niteliktedir (111).

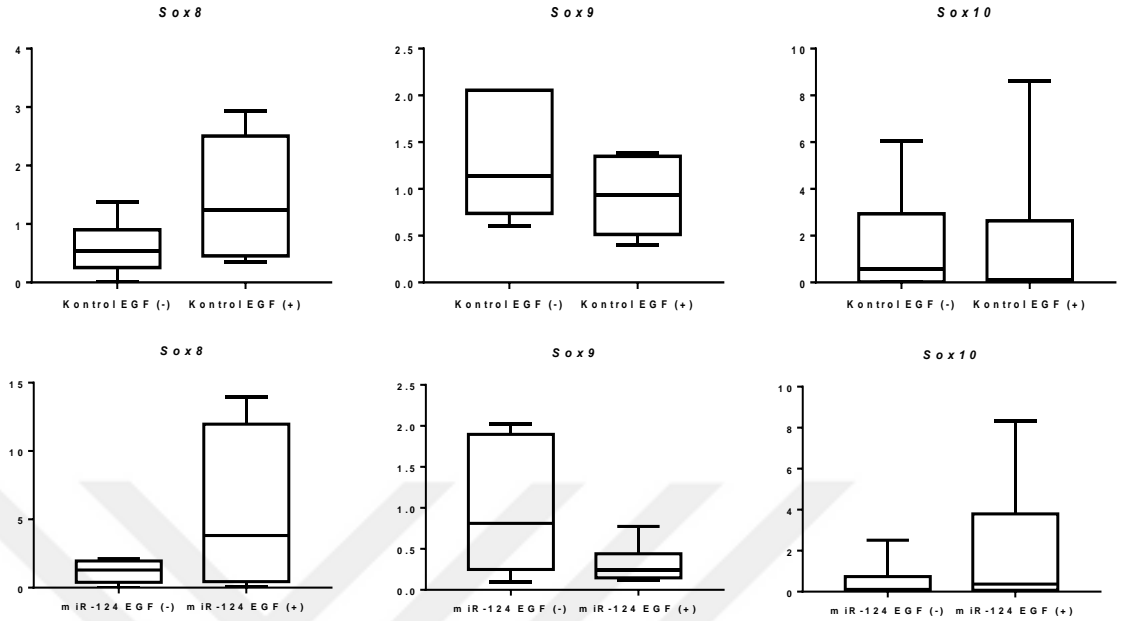
**Tablo 14.** Hipokampusta gruplar arası *Sox8*, *Sox9*, *Sox10*, *Dcx* ve *Neurod1* mRNA gen ekspresyonu değerlendirilmesi

Gen Adı	Kontrol Erkek	miR-124* Erkek	Kontrol Dişi	miR-124* Dişi
<i>Sox8</i>	+++	+	++	+++
<i>Sox9</i>	+	+++	++	+
<i>Sox10</i>	++	+++	++	+
<i>Dcx</i>	+++	+	++	+++
<i>Neurod1</i>	+	++	++	+++

#### 4.4.2. Primer Hücre Kültüründe mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları

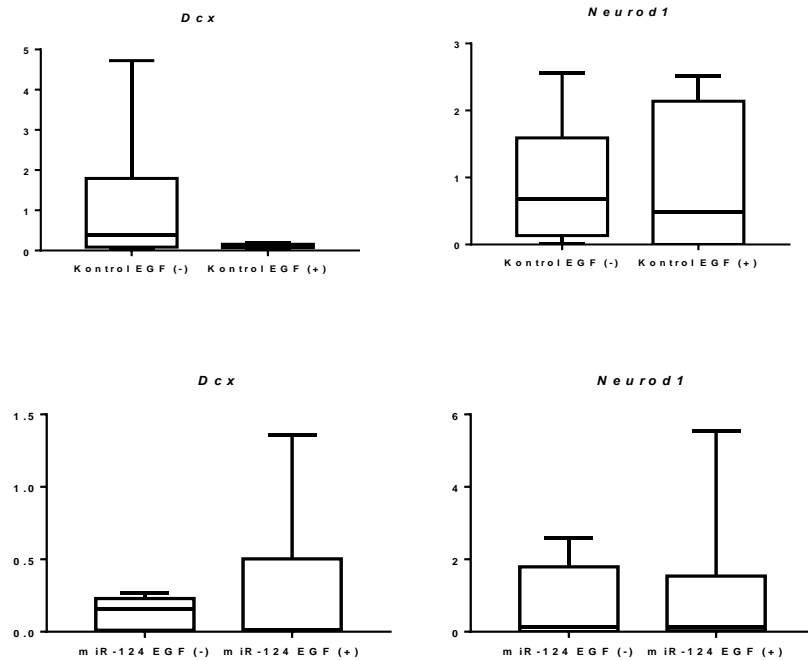
miR-124-3p mikroenjekte taşıyıcı annenin uterusundan 7 embriyo (6 erkek,1 dişi), kontrol grubundan ise 11 embriyo (6 erkek, 5 dişi) primer hücre kültüründen mRNA ekspresyon çalışması için kullanılmıştır.

EGF (+) kontrol grubunda ve paramutantlarda *Sox8* gen ekspresyonu artarken, *Sox9* ve *Sox10* gen ekspresyonlarının azaldığı görülmektedir (**Şekil 51**).



**Şekil 51.** Kontrol grubu ve paramutantlarda EGF varlığı ve yokluğunun *Sox8*, *Sox9* ve *Sox10* gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması.

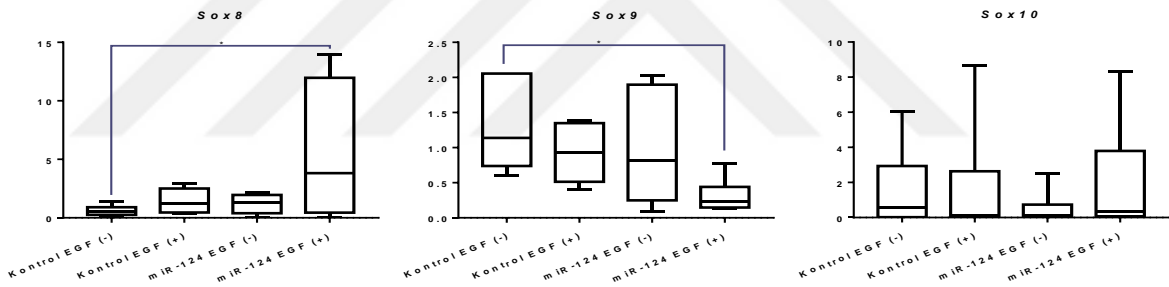
EGF (+) kontrol grubunda *Dcx* ve *Neurod1* gen ekspresyonunda azalış varlığı görülmektedir. EGF (+) paramutantlarda ise *Dcx* gen ekspresyonunda artış görülürken, *Neurod1* gen ekspresyonunda çok az da olsa azalış görülmektedir (Şekil 52).



**Şekil 52.** Kontrol grubunda ve paramutantlarda EGF varlığı ve yokluğu durumunda *Dcx* ve *Neurod1* gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması.

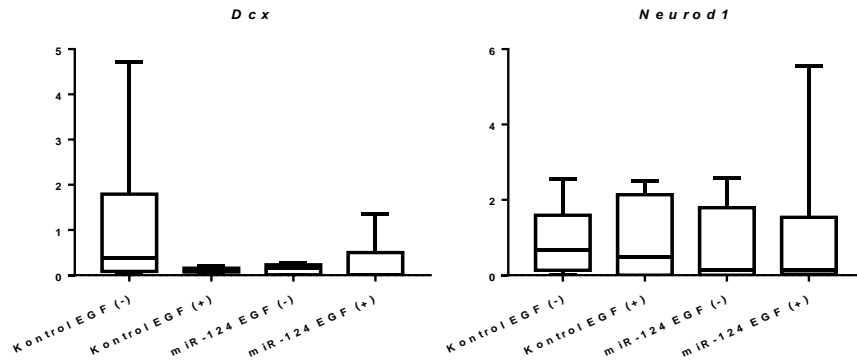
Gruplar arasında *Sox8*, *Sox9* ve *Sox10* gen ekspresyon seviyelerine bakıldığında; *Sox10* geni ekspresyon seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanamazken, EGF(+) paramutantlarda *Sox8* geni ekspresyon seviyesinin kontrol EGF(-) grubundan ( $p<0,05$ ) yüksek olduğu saptanmıştır. Genel olarak EGF varlığında *Sox8* geni ekspresyon seviyesinde bir artış göze çarpmaktadır. Ayrıca EGF(-) iken kontrol grubuna kıyasla paramutantlarda *Sox9* geni ekspresyon seviyesindeki azalış EGF (+) miR-124\* grubunda da devam etmiştir.

EGF(+) miR-124\* *Sox9* geni ekspresyon seviyesinin ise EGF (-) kontrol grubundan ( $p<0,05$ ) düşük olduğu saptanmıştır. Genel olarak EGF varlığında *Sox9* geni ekspresyon seviyesindeki azalış dikkat çekmektedir. Ayrıca EGF (-) iken kontrol grubuna kıyasla paramutantlardaki *Sox9* geni ekspresyon seviyesindeki azalış EGF (+) paramutant grupta da devam etmiştir. Bu durum tahmin algoritmasında *Sox9* geninin %67 oranında miR-124-3p'nin hedefi olduğunu doğrular niteliktedir (111) (Şekil 53).

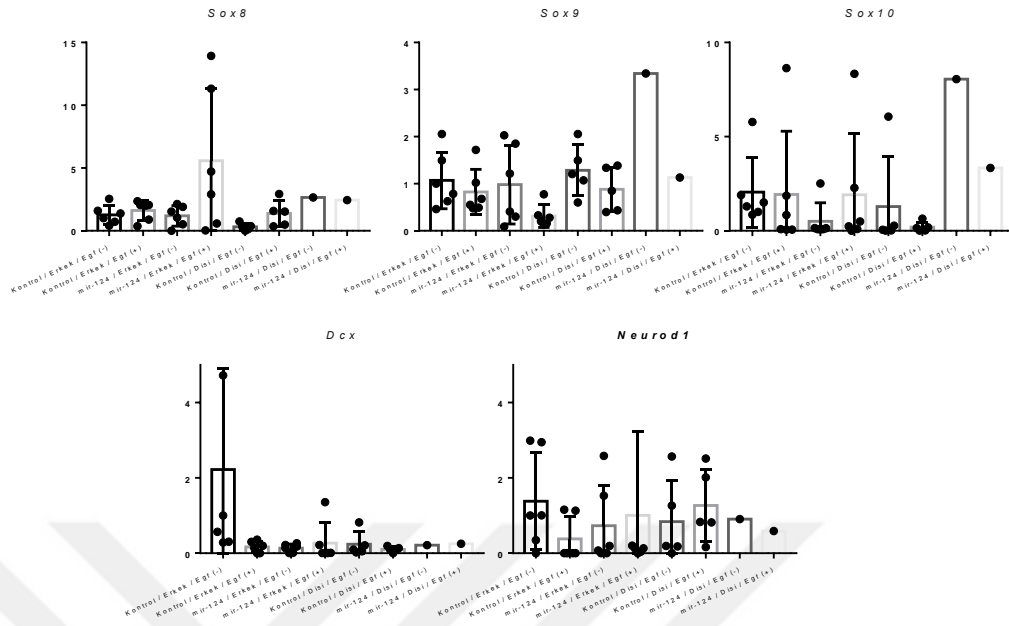


**Şekil 53.** Primer Hücre Kültüründe *Sox8*, *Sox9* ve *Sox10* gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması.

Gruplar arasında erkekler açısından *Dcx* ve *Neurod1* gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır (Şekil 54).



**Şekil 54.** Primer Hücre Kültüründe *Dcx* ve *Neurod1* gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması.



**Şekil 55.** Gruplar arası cinsiyete göre *Sox8*, *Sox9*, *Sox10*, *Dcx* ve *Neurod1* mRNA ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması.

**Tablo 15.** Gruplar arası cinsiyete göre *Sox8*, *Sox9*, *Sox10*, *Dcx* ve *Neurod1* mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi.

Doku	Örnek	<i>Sox8</i>		<i>Sox9</i>		<i>Sox10</i>		<i>Dcx</i>		<i>Neurod1</i>	
		Egf(-)	Egf(+)	Egf(-)	Egf(+)	Egf(-)	Egf(+)	Egf(-)	Egf(+)	Egf(-)	Egf(+)
NS	KE	++	+++	+++	++	+++	+++	++++	+	++++	+
	KD	+	++	++++	+++	++	+	+	+	++	+++
	PE	++	>6	+++	+	+	+++	+	+	++	+++
	PD	++++	++++	>6	+++	>6	++++	+	+	++	+



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dölllenmiş fare embriyosuna 0,5. günde miR-124-3p mikroenjeksiyonu yapıldığında (paramutant/miR-124\*) hem prenatal hem de postnatal dönemde belirgin şekilde fark edilen iri fenotipli fareler oluşmaktadır (**Şekil 19**). O halde yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki bir RNA parçası fenotiptik olarak gözlemlenebilen bir değişime yol açabilmektedir. Bu bulgu, DNA dizisinde bir değişiklik olmaksızın gen ifadesindeki kalıtsal değişiklikler olarak basitçe tanımladığımız epigenetiğin aslında ne kadar güçlü bir mekanizma olduğunu açıklar niteliktedir. Bu konu ile ilgili literatürde Minoo Rassoulzadegan ve ekibinin 2009 yılında yaptığı çalışma harici başka çalışma yoktur. Bahsi geçen çalışmada miR-124\* embriyoların embriyonik dönemden başlayıp yetişkinlik dönemine kadar devam eden ve daha sonra birkaç kuşak boyunca miras kalan, olağandışı büyük bir vücut büyüklüğü, sergiledikleri belirtilmiştir (7). Bu iri fenotipin oluşmasının altında yatan moleküler mekanizmaya olan merakımız, bizi bu tez çalışmasını yapmaya teşvik etmiştir.

miR-124 beyinde en bol bulunan mikro RNA'dır (8). Bu yüzden miR-124\* farelerin farklı bir davranış fenotipi geliştireceğini tahmin etmekteyiz. Hipotezimizi test etmek için bir dizi davranış testi yaptık. Bu testlerin bulguları dahilinde şu yorumları yaptık:

Baş sokma sayısı ve defekasyon davranışlarının ölçüldüğü delikli tahta deneyinde, baş sokma sayısı ile anksiyete arasında tersine bir ilişki varlığı yorumu yapılmaktadır (93). Buna ek olarak, baş sokma sayısı ile eksploratori (keşifçi) davranış arasında doğru orantı olduğu da bu testin bir diğer yorumlanma şeklidir (112). Ayrıca, fareler stres altında iken dışkılama davranışı sergilemektedir (113). Defekasyon sayısı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamış olmasına rağmen miR-124\* erkeklerin kontrol erkeklerden, miR-124\* dişilerin ise kontrol dişilerden daha fazla dışkıladığı barizdir (**Şekil 22**). Bu durum paramutant farelerin stres koşullarından daha çok etkilendiklerini yani strese daha duyarlı olduklarını göstermektedir. Baş sokma sayısı açısından ise istatistiksel anlamlılık saptanamamış olmasına rağmen miR-124\* erkeklerin

kontrol erkeklerden daha fazla baş soktuğu dikkat çekerken, miR-124\* dişilerin ise kontrol dişilerden daha az baş soktuğu saptanmıştır. Bu durumu, miR-124\* dişiler anksiyetik davranırken, miR-124\* erkekler stres kaynaklı gelişen anksiyetik durumdan hızlıca çıkıp meraklı davranarak keşif davranışı sergiledikleri yönünde yorumlamaktayız. Ayrıca miR-124\* erkeklere kıyasla miR-124\* dişilerin anksiyetik davrandıkları saptanmıştır ( $p<0,05$ ) (**Şekil 22**). Özetle, stres durumunda paramutant farelerin daha hassas olduklarını, daha çabuk etkilendiklerini ancak, kontrollerden daha çabuk toparlandıklarını, özellikle de erkek paramutantların dişi paramutatlardan daha hızlı şekilde depresif ve anksiyetik durumdan çıktıklarını düşünmekteyiz. ter Horst, de Kloet ve ark. göre (109, 114) stresli ve stressiz deney koşullarında duygusallık ve bilişsel yeteneklerdeki cinsiyet farklılıklarına odaklanan çalışmalarında, östrojen ve progesteron gibi kadın seks hormonlarının, davranış üzerindeki cinsiyet farklılıklarına katkıda bulunan duyguları ve bilişleri etkilediğini vurgulamışlardır. Ayrıca, kadınların östrus döngüsünün fazı ile ilgili olarak strese, erkeklere göre farklı tepki verdiklerini belirtmişlerdir. Örneğin, dişi farelerin yeni bir ortamda erkeklerden daha az kaygılı olduğunu vurgularken proöstrus (Kızgınlık döngüsünün gonadotropin hormonlarının etkisi altında yumurtalıkta kimi değişikliklerin gözleendiği ilk evresi) dişilerinin diğer östrus fazlarındaki dişilerden ise daha az endişeli olduğunu eklemişlerdir. İlginç bir şekilde, dişi fareler, erkeklere göre yeni ortamlarda daha az kaygı benzeri davranış ve uyarılma gösterirler. Genel olarak, erkekler dişilerden daha az yürümeye, donmaya ve defekasyon yapmaya eğilimlidir (115). **Şekil 22**'deki defekasyon ve delik sayısını gösteren grafik kontrol grubumuz için bu bilgileri desteklerken paramutantlar için tam aksi bir durum söz konusudur. Özetle ter Horst, de Kloet ve ark.'ın belirttiği gibi bizim çalışmamızdaki kontrol dişiler kontrol erkeklere kıyasla daha az stresli (defekasyon sayısı az) ve daha az kaygılıdır (baş soktuğu delik sayısı fazla). Ancak miR-124\* erkek ve dişilerin stresi nerdeyse aynıken ( defekasyon sayısı yaklaşık ) miR-124\* dişilerimiz daha fazla kaygılıdır. Bu sebeple miR-124\* farelerde davranış açısından ( stres ve anksiyete) erkek ve dişiler arasındaki mevcut farklılıkların ortadan kalkmasına yani erkek ve dişilerin benzer davranış sergilemesine yol açabilen gen/genlerin etkilenmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Öğrenme ve hafıza fonksiyonlarının ölçüldüğü yeni nesne tanıma deneyinde (94) miR-124\* erkeklerin ( $p<0,05$ ), kontrol dişilerin ( $p<0,01$ ) ve miR-124\* dişilerin ( $p<0,001$ ) yeni nesne yanında daha fazla zaman geçirdikleri saptanmıştır (**Şekil 23**). Tropp and Markus'a

(116) göre erkekler kadınlara kıyasla mekansal yetilerde daha üstündür. Ancak, stres erkeklerde mekansal hafızayı bozarken, kadınlar stres etkeni türüne bağlı olarak mekansal yeteneklerini geliştirirler (115). **Şekil 23**'teki grafiğe dikkatle bakıldığında deney sırasında oluşan stres kaynaklı olarak kontrol erkeklerin öğrenme hafızanın bozulmuştur (kontrol dişiler yeni nesne yanında daha fazla zaman geçirmiştir  $p<0,01$ ). Benzer şekilde miR-124\* dişilere ( $p<0,001$ ) kıyasla miR-124\* erkeklerde ( $p<0,05$ ) kötü performans sergilemiştir. Ancak bu etki kontrolden kat ve kat farklıdır. Bu sebeple miR-124\* farelerde davranış açısından (öğrenme ve hafıza) erkek ve dişiler arasındaki mevcut farklılığa pozitif katkıda bulunan gen/genlerin etkilenmiş olabileceğini de düşünmekteyiz. Tianyuan Ye ve ark. (68) göre farelerin yenilik konusundaki içgüdüleri nedeniyle, alışıklarının dışında yeni bir nesneyi keşfetmek için yeni nesne ile daha fazla zaman harcayacaklarını düşünmektedirler. Bu bilgiden yola çıkıp diskriminasyon indekslerine baktığımızda, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamış olsa da kontrol dişiler ile miR-124\* dişiler arasında diskriminasyon indeksi açısından fark gözlenemezken miR-124\* erkeklerin kontrol erkeklere kıyasla yeni nesne ile daha çok zaman geçirdiklerini saptamış bulunmaktayız (**Şekil 24**). miR-124-3p mikroenjeksiyonu sonucu daha iri fareler elde etmemizin yanında macera arayışı içinde olan fareler elde ettiğimizi düşündüğümüz çalışmamızda, miR-124\* erkeklerin yeni nesne yanında kontrol erkeklerden daha fazla zaman geçirdikleri (**Şekil24**), toplamda daha çok yol kat ettikleri ve daha hızlı oldukları (**Şekil 25**) bariz belirgindir. Bu durum miR-124\* erkeklerin öğrenme ve hafıza fonksiyonları açısından daha iyi olduklarını göstermektedir. miR-124\* dişilerin ise davranış deneylerinin yapılışı sırasında oluşan stresi tolere edemedikleri için öğrenme ve hafıza konusunda kontrol dişiler ile aynı profili sergilediklerini düşünmekteyiz.

Kısa süreli spasyal belleği ölçmek için kullandığımız Y labirent deneyinde miR-124\* dişiler kontrol dişiler kadar rotasyon sayısına sahiptir ve buna ek olarak kollara total giriş sayıları açısından miR-124\* dişiler kontrol dişilerden daha çok giriş yapmıştır ( $p<0,05$ ) (**Şekil 26**). Bu bulgular miR-124\* dişilerin daha aktif olduğunun göstergesidir. Ancak Y labirent puanı hesaplandığında elde ettiğimiz rotasyon (fareden hep ileri giderek her üç kolu arka arkaya ziyaret ettiği durum) yüzdesinin miR-124\* dişilerde kontrol dişilerden daha düşük olduğu saptanmıştır (**Şekil 26**). Ancak miR-124\* erkeklere kıyasla miR-124\* dişilerin rotasyon yüzdesi daha yüksektir. Bu bulgu miR-124\* dişilerin kısa süreli spasyal belleğinin miR-124\* erkeklerden daha iyi olduğunun göstergesidir. Y labirent deneyinde

birinci gün 15 dk. eğitimin ardından hemen 5 dk. test, ikinci gün ise 15 dk. eğitimden sonra 3 saat ara ve arkasından 5 dk. test uygulanmaktadır. Kısa süreli spasyal belleği kendi içinde kıyaslamak istediğimizde, 1. gün miR-124\* erkeklerin kontrol erkeklerden daha başarılı olduğu ancak 2. gün bu durumun tam tersine davrandıkları saptanmıştır. miR-124\* dişilerin ise hem 1. gün hem de 2. gün kontrol dişilerden daha başarısız görünmesine rağmen 1. güne kıyasla 2. gün öğrenmesinin daha iyi olduğu saptanmıştır (**Şekil 28**). Epigenetiğin sanki bir yelpaze gibi varyasyon gösterdiği durum göz önüne alındığında verilerin ortalamalarının alınması durumunun bazı etkilenmiş bireyleri gözden kaçırmamıza sebep olduğunu daha önceki çalışmalarımızda tecrübe etmiş bulunmaktayız. Bu sebeple çalışmamızda Y labirent deneyi için 1. gün ve 2. gün verileri kullanılarak ek istatistiksel analizler yapılmıştır. Kollara total giriş sayısı açısından 1. güne kıyasla 2. gün hem paramutant hem kontrol erkekler daha fazla giriş yaparken, miR-124\* dişiler kontrol dişilerden daha çok giriş yapmıştır ( $p < 0,01$ ) (**Şekil 27**). Alternasyon puanı açısından ise paramutantların daha başarılı olduklarını ancak, 2. gün tam tersine davrandıklarını görmekteyiz. miR-124\* erkeklerin hepsinde 2. gün alternasyon puanı açısından azalış söz konusu iken kontrol grubu erkeklerinde artışlar da göze çarpmaktadır (**Şekil 26**). miR-124\* dişiler ise 1. güne kıyasla 2. gün daha az alternasyon puanına sahiptir ( $p < 0,05$ ) (**Şekil 29**). Bu bulgular sebebiyle paramutantların 1. gün çok aktif davranıp daha yüksek alternasyon puanına sahipken 2. gün zeki insanların çabuk sıkılmasına benzer bir davranış sergilediklerini düşünmekteyiz.

Kemirgenlerde doğası gereği açık alan korkusu vardır. Açık alan deney düzeneğinde az hareket eden, merkeze geçmeyen fare için açık alan korkusu vardır ve streslidir yorumu yapılmaktadır (92). Özetle cinsiyet ayrımı olmaksızın sağlıklı bir fareye açık alan deneyi uygulandığında santral (merkez) yerine periferde (kenarlar) zaman geçirmeyi tercih etmektedir. Hem kontrol grubu hem de paramutant farelerin kenarlarda daha çok zaman geçirdiği saptanmıştır ( $p < 0,0001$ ). miR-124-3p mikroenjeksiyonu sonucu macera arayışı içinde olan fareler elde ettiğimizi düşündüğümüz çalışmamızda paramutant fareler kontrol grubu ile aynı davranışı sergilemiştir ve bu yüzden açık alan deneyi çalışmamız için bilgi verici olmamıştır (**Şekil 20**). Ancak, gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanamasa da miR-124\* erkekler kontrol erkeklerden totalde daha çok yol kat etmiştir ve daha hızlıdır (**Şekil 21**). Bu durum yeni nesne tanıma deneyindeki total hareket ve hız verisi ile aynıdır.

Aqrabawi ve ark. (117) fareler ile yaptıkları çalışma sonucunda evrimsel süreçte gelişmiş bir özellik olarak kabul gören koku farklılıklarını koklayarak ayırt etme özelliği ile hafıza arasında çok güçlü bir bağlantı olduğunu saptamışlardır. Henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da beyinde ön koku çekirdeği (anterior olfactory nucleus ) olarak bilinen bölgenin, koku duyusu ve yer- zaman bütünleşmesini sağlayan bilgileri depoladığını belirtmişlerdir (117). miR-124\* farelerin macera arayışı içinde olan fareler olduğunu düşündüğümüz çalışmamızda açık alan deneyi bilgi verici olmayınca aynı deney düzeneği kullanılarak koku deneyi tasarlanmıştır. Açık alan deneyine ek olarak merkeze kabuk tarçın koyduğumuz koku deneyinde hem kontrol hem de paramutant farelerimizin santral alana kıyasla periferde daha çok zaman geçirdiği saptanmıştır ( $p < 0,0001$ ) (**Şekil 33**). Koku varken ve yokken merkezde geçirilen zaman gruplar arasında kıyaslandığında hem kontrol hem de miR-124\* erkekler koku varlığında merkezde daha çok zaman geçirmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır. Kontrol ( $p < 0,05$ ) ve miR-124\* dişilerin ( $p < 0,01$ ) koku varlığında merkezde daha çok zaman geçirdikleri saptanmıştır. (**Şekil 34**). Çalışmamız epigenetik bir çalışma olduğundan bazı farelerin daha çok etkilenmiş olma ihtimalini göz önünde bulundurarak fareleri bireysel olarak gözlemlemek adına koku davranış deneyinin videolarını izlediğimizde, paramutant 13. Dişinin tarçına olan ilgisi dikkatimizi çekmiştir. Merkezde bulunan tarçını sıkça ziyaret eden 13. Dişi, bununla da yetinmeyip tarçını beraberinde periferik bölgeye götürerek tarçınla vakit geçirmeye devam etmiştir.

Genel olarak sosyal merakın ve yeni nesnelere olan korkunun ölçüldüğü bilye gömme deneyinde performans genel kazma davranışı ile ilişkilidir. Kazarak gömme davranışı muhtemelen kemirgenlerin tipik bir savunma mekanizmasıdır (118). Bu davranışın nöronal sistemde hangi bölge ile ilişkili olduğu henüz aydınlatılamamıştır ancak, hipokampusun ve septumun etkilenen bölgeler olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu bölgelerdeki lezyonlar kazma davranışını azaltmaktadır. (119). Çalışmamızda bilye gömme deneyi sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamış olsa da miR-124\* erkekler kontrol erkeklere benzer davranırken miR-124\* dişiler kontrol dişilere kıyasla daha az bilye gömmüştür (**Şekil 32**). Çalışmamız epigenetik bir çalışma olduğundan bazı farelerin daha çok etkilenmiş olma ihtimalini göz önünde bulundurarak ve dişilerde azalmış bilye gömme davranışının hipokampusteki bir lezyon kaynaklı olabileceğini düşünerek bilye gömme davranış deneyinin ham verilerini incelediğimizde paramutant 7. dişi dikkatimizi çekmiştir. En az bilye gömme sayısına

sahip olduğunu fark ettiğimiz 7. dişi, nerdeyse en çok kilo alan (21. günde), koku deneyinde tarçın kokusuna en çok giden ve merkezde en çok zaman geçiren, yeni nesne tanıma deneyinde toplamda en çok yol kat eden ve en hızlı olan fare olarak karşımıza çıkmıştır.

miR-124-3p mikroenjeksiyonu ile hem prenatal hem postnatal dönemde daha iri fenotipe sahip fareler elde ettiğimiz gözlemini desteklemek için 120 gün boyunca haftalık olarak farelerin ağırlıklarını tartarak şu yorumları yaptık.

Mino Rassoulzadegan ve ekibinin 2009 yılında yaptığı çalışmada miR-124 mikroenjeksiyonu sonucu doğan B6D2 ırkı 8 erkek, 12 dişi ve kontrol farelerin 50 gün boyunca kilo takibini yapmışlardır. Bu takip sonunda paramutant farelerin yaklaşık %30 daha iri olduklarını göstermişlerdir (7). Bizim çalışmamızda ise Balb/c ırkı fare kullanılmıştır ve miR-124\* fareler ile kontrollerinin 120 gün boyunca haftalık olarak ağırlıkları takip edilmiştir. miR-124\* erkek farelerin kontrollere kıyasla %24-44, miR-124\* dişi farelerin ise %17-35 etkilendikleri saptanmıştır (28. gündeki tartım verileri dikkate alınarak hesaplanmıştır). Ayrıca 120 gün boyunca haftalık olarak tartım sonucu elde ettiğimiz veriler ışığında 7. günde daha ağır oldukları belirgin olan paramutant farelerimizin (**Şekil 36**), 21. günde kontrolden daha ağır değilken (**Şekil 37**) ilerleyen haftalardaki hızlı kilo artışları dikkatimizi çekmiştir. Bu duruma ilişkin hipotezimiz şu şekildedir; fareler için gözlerinin henüz açılmaya başladığı zamana karşılık gelen 7. günde, paramutant farelerimiz kontrolden daha aktif davranıp daha fazla anne sütü tüketmişlerdir. Dolayısı ile paramutant farelerimiz daha fazla beslenebildiği için daha ağır ve daha iri görünmektedir (**Şekil 19**). Fareler 21 günlük olduklarında kontrol grubunun daha ağır olma sebebini ise şöyle açıklayabiliriz; anne fareler, artık kendileri beslenebilecek durumda olan yavru farelere süt vermek istemediği için paramutant fareler depresyona girerek anne sütü harici beslenmeyi kabul etmemektedir. Bu sebeple kontrol grubu fareler paramutant farelerden daha ağırdır. Ancak 21. günden sonra hızla kilo artışı sergileyen paramutant farelerimizin (**Şekil 37**) depresyondan çıkıp daha aktif şekilde beslenmeye başladıklarını düşünmekteyiz. Paramutant farelerimizin daha aktif olduklarının göstergelerinden ilki; **Şekil 19-2d**'deki paramutant yeni doğan farenin annesini emmeye başladığının ispatı olan karnındaki beyazlıktır. Kontrol farede bu beyazlık yoktur. İkinci gösterge ise açık alan deneyindeki total hareket grafiğidir. miR-124\* erkek ve dişiler toplamda daha fazla yol almıştır (**Şekil 21**), buna ek olarak da hem

açık alan (**Şekil 21**) hem de yeni nesne tanıma deneyinde (**Şekil 25**) miR-124\* erkekler daha hızlı davranmışlardır.

Paramutant fareler günlük daha çok yem tükettiği için daha ağır ve iri olabilir mi? Sorusu aklımıza takıldığı için paramutant ve kontrol grubu farelerin her gün yemleri tartılarak günlük ne kadar yem tükettikleri veriye ulaşılmıştır. miR-124\* erkekler kontrol erkeklerden günlük çok daha fazla yem tüketirken, miR-124\* dişiler ise kontrol dişilerden çok daha az günlük yem tüketmiştir (**Şekil 44**). Günlük olarak yapılan tartımın oluşturduğu stresin etkisini erkeklerin kolayca atlatarak yem tüketimine devam ederken, miR-124\* dişilerin stresin etkisinden çıkamayarak yem tüketmek istemediğini düşünmekteyiz.

Erişkin insan beyinde nörogenezin sadece Merkezi Sinir Sisteminde (MSS), hem embriyonik hem de yetişkin nöronal dokuları tanımlamak için kullanılan Subventriküler bölgede (SVZ) ve hipokampusun dentat giruslarında olduğu bilinmektedirken, diğer beyin alanlarında da sinir progenitör / kök hücrelerin bulunup bulunmadığı hala net değildir (120). Ayrıca, hipokampusun hafıza, özellikle de kısa süreli hafıza ile ilgili olduğu bilinmektedir (121). Kısa süreli hafıza, yeni bilgilerin depolanma kapasitesini ifade etmektedir. Bu nedenle mekanizma ne olursa olsun sağ (görsel hafıza) ve sol (sözel hafıza) hipokampus olmadan uzun süreli anıların kalıcı olması mümkün değildir. Hipokampus ventral talamus, hipotalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller göndererek hareketlerin davranış biçimine dönmesinden önce, limbik sistemi etkilemektedir. Böylece hipokampusun, gelen duyuşal sinyalleri içerisinden geçiren ek bir kanal rolü oynayarak davranışların şekillenmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (73). O halde, davranış deneyleri yaparak ölçmeye çalıştığımız parametrelerin hemen hepsinin hipokampusten köken alan davranışların sonucu olduğu çıkarımını yapabiliriz. Bu çıkarıma ek olarak erişkin dönemde bile nörogenezin yalnız bu bölgede devam ettiği bilgisi çalışmamızı hipokampus üzerine yönlendirmemize sebep olmuştur.

Nöron hücrelerine tutunabilecekleri bir ortam sağlandığında bu hücreler glia hücrelerine dönüşmektedir. Bu sebeple hipokampus kaynaklı primer hücre kültürü yaparken hücrelerin yüzeye tutunamayacağı bir ortam oluşturarak nörosfer (NS) elde ettik. Primer nöron kültürleri *in vivo* sistem ile daha çok benzerlik taşımaya rağmen, beyin dokusu geliştirebilmekten mahrumdur. Bu durum, astrosit, sinir progenitör hücreleri ve

nöronlardan oluşan beyne daha yakın benzerlik gösteren bir sistemin inşasını gerektirmiştir. Dolayısıyla, NS'ler denilen üç boyutlu (3D) kültür sistemleri, sinirbilim araştırmalarında yeni araçlar olarak ortaya çıkmıştır. NS'ler, nöronal iletişim, çeşitli kimyasal ve biyokimyasal işaretler ve doku heterojenliği gibi özelliklerle hücre ortamı daha iyi temsil eden bir kültür sistemi oluşturduğuna inanılan, serbest yüzen bir sinir progenitör hücre kültürüdür. NS'lerin olağanüstü öneme sahip olma sebebi, nöronların yanı sıra glial hücrelere farklılaşabilme kapasitesine sahip kendi kendini yenileyebilen multipotent hücreler olan sinirsel progenitör hücrelerin ifadelerindeki artıştır. Nöronal progenitör hücrelerin varlığı nedeniyle, NS kültür sistemi, sinir kök hücrelerinin özelliklerini test etmek için önem kazanmıştır. Hem birincil nöron kültürü hem de NS'ler, bir dizi nöronal ve nöronal olmayan biyobelirteç vasıtasıyla iyi karakterize edilmiştir. NS'lerin, korteks ile ilişkili gelişimin erken aşamasını taklit eden glial hücrelere daha da farklılaşan, doğal nöronal progenitör hücrelerin zengin bir popülasyonu içerdiği bulunmuştur. Bu yöntemin, kimyasal sinirbilimlerdeki araştırma ilerlemelerini kolaylaştırmak için hızlı ve kolay yüksek miktarda nöron verimi elde etmek için önceki yöntemlere / protokollere kıyasla daha ileri bir gelişme olduğunu not etmek önemlidir. NS oluşumu, özel ortam formülasyonları (bazıları ticari olarak bile temin edilebilir) ve EGF gibi bazı büyüme faktörlerini gerektiren sıkıcı ve zorlu bir süreçtir (122). Özetle, nöronal kök hücrelerin serbest yüzen kümelerinden oluşan bir kültür sistemi olan NS'ler, nöronal progenitör hücrelerini *in vitro* araştırmak için bir yöntem sağlar (120). Biz de miR-124\* E19,5 günlük hipokampus dokusunu kültüre ederek NS elde ettik. NS'ler 12 günlükken; EGF (+) paramutant embriyoların NS sayısının, kontrol grubunda EGF (-) ( $p < 0,05$ ) ve EGF (+) ( $p < 0,05$ ) iken NS sayısından daha çok olduğu saptanmıştır. Ayrıca istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanamamış olsa da EGF varlığı kontrol grubunda NS sayısını etkilememiş görünürken, paramutantlarda EGF varlığında NS sayısını artırdığı saptanmıştır. Buna ek olarak NS 21 günlükken; EGF (+) paramutantlarda, EGF (-) kontrole kıyasla daha fazla NS saptanmıştır ( $p < 0,01$ ) (**Şekil 46**). Ayrıca istatistiksel olarak anlamlılık saptanmasa bile EGF varlığında 12, 16 ve 21. günlerde NS alanının büyüdüğü saptanmıştır (**Şekil 47**) Bütün bu bulgular miR-124 mikroenjeksiyonu sonucu hem prenatal hem de postnatal dönemde daha iri olan paramutantların EGF gibi bir büyüme faktörüne daha duyarlı olduklarının ispatı niteliğindedir. Grandjean ve ark. (7) tarafından yapılan çalışmada erken embriyonik safhada paramutantlarda büyüme kontrolünde fonksiyonu bilinen genlerden ne Gh (Büyüme Hormonu), Igf1 (insülin-



benzeri büyüme faktörü 1) ve Igf2 ne de onların reseptörleri aşırı eksprese bulunmamıştır. O halde paramutant farelerin daha iri olmasına yol açan, miR-124-3p'nin hedef ya da hedeflerinin yer aldığı ve araştırılmayı bekleyen başka bir yolak söz konusu olabilir.

miR-124, hem gelişmekte olan hem de olgun beyindeki pronöronal rolü ile iyi tanınan mikro RNA'dır (9). Evrimsel süreçte miR-124'ün sekansının ve ekspresyon paterninin korunmuş olması MSS gelişiminde kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymaktadır (10). Ancak, buna rağmen miR-124'ün nöronal gelişimdeki işlevleri tartışmalı bir konudur (11). Örneğin, Cao ve ark. (123) sadece miR-124'ün inhibisyonunun veya aşırı ekspresyonunun, nöronal farklılaşmayı önemli ölçüde değiştirmediğini gösterirken Visvanathan ve ark. (10) aynı modeli kullanarak, miR-124'ün nöronal farklılaşmayı desteklediğini bulmuşlardır. Visvanathan ve ark. (10) civciv nöronal tüpünün sinir progenitörlerinde transfeksiyon ile miR-124'ün aşırı ifade olmasını sağlamışlardır. In situ hibridizasyon ile miR-124'ün aşırı eksprese olduğunu ve *SCPI* (small C-terminal domain phosphatase 1) ekspresyonunun ise azaldığını saptamışlardır. *SCPI* mRNA'sının 3'UTR bölgesinde, evrimsel olarak korunmuş miR-124 dizisi ile uyumlu bölgeler bulunmuştur. Bu bulgu ile miR-124'ün en azından kısmen nöronal anti-REST / *SCPI* yolunu bloke ederek nörogenezi kolaylaştırdığı yönünde bir öneride bulunmuşlardır. Xue ve ark. (124) yaptıkları çalışma ile Polypyrimidine tract-binding protein (*Ptbp*) ifadesi azalmış hücre hattında (HeLa ve N2A) nörit (nöron gövdesinde akson ya da dendrit oluşumu) oluşum ve gelişiminin arttığını göstermişlerdir. Bu sebeple *Ptbp*'nin düzenlediği bazı splicing olaylarının direk olarak nöronal fenotip gözlenmesine yol açabileceğini belirtmişlerdir (124). Ayrıca Visvanathan ve ark.'ını destekler şekilde miR-124'ün REST yolağına antagonist çalışarak *Ptbp1*'i hedef alıp nörona özgü splicing mekanizmasını başlattığını belirtmişlerdir. Bunlara ek olarak Mokabber ve ark. (125) saç folikül kök hücresi kullanarak mimic miR-124 transfeksiyonu yaptıkları çalışmalarında miR-124 ekspresyonu azaldığı için *Sox9* ve Polypyrimidine tract-binding protein 1 (*Ptbp1*) mRNA ekspresyon seviyesinin arttığını tespit etmişlerdir. miR-124'ün *Sox9* ve *Ptbp1*'i baskılaması ile nörona özgü oluşumu destekleyen Polypyrimidine tract-binding protein 2 (*Ptbp2*)'nin arttığını böylece nöronal farklılaşmanın başladığını göstermişlerdir.

Merkezi ve Çevresel Sinir Sisteminde SoxE proteinlerinin fonksiyonları 1990'larda ve 2000'lerin başında büyük ölçüde belirlenirken, son on yılda bu işlevlerin altında yatan moleküler mekanizmalara dair önemli bilgiler edinilmiştir. SoxE proteinleri, hücre tipine

ve gelişim evresine göre değişen çok sayıda transkripsiyon faktörünün yardımıyla etkileşir. Ayrıca kromatin modifiye ve yeniden şekillendirme sistemlerini dahil ederek kromatin yapısını etkilemektedir. Transkripsiyon sürecindeki etkileri bile çok farklıdır. Şaşırtıcı bir şekilde, SoxE proteinleri, ya doğrudan ya da mikro RNA'lar aracılığıyla partnerlerinin ifadesini etkilemektedirler (89). Ancak bu sistem içinde *Sox8* geninin rolü hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Sock ve ark. (126) 129/Sv ırkı *Sox8* ifadesi silinmiş fare kullandıkları çalışmalarında farelerin 100 gün süreyle ağırlık takibini yapmışlardır. Homozigot nakavt erkek ve dişi farelerin kontrol grubundan %30 daha küçük ve %10 daha kısa olduklarını saptamışlardır (126). Grandjean ve ark. (7) yaptıkları çalışmada paramutantlarda oluşan iri fenotipe, Gh, Igf1 ve Igf2 genlerinin sebep olmadığını tespit edince *Sox8*'in aday gen olabileceğini düşünmüşlerdir. Kantitatif PCR (qPCR) ile erken embriyonik dönemden yetişkinliğe kadar (E2,5- E6,5- E15,5- E16,5 ve yetişkin) *Sox8* mRNA ekspresyon seviyeni araştırmışlardır. E2,5 günde paramutantlarda *Sox8* gen ekspresyonu tespit edilemezken diğer embriyonik günlerde kontrol ile aynı seviyede eksprese olmuştur. Ancak doğumdan yetişkin döneme doğru *Sox8* gen ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak *Sox8*'in ikincil indüklenme ile yetişkin döneme kadar hızlanan büyümenin korunmasında rol oynayabileceği varsayımında bulunmuşlardır (7). Bizde çalışmamızda, miR-124\* E19,5 günlük hipokampus dokusunda *Sox8* mRNA ekspresyon seviyesinin kontrollerine kıyasla miR-124\* dişilerde arttığını miR-124\* erkeklerde ise azaldığını tespit ettik. Hipokampus dokusunu kültüre ederek elde ettiğimiz NS'lerde ise kontrollerine kıyasla miR-124\* dişide hem EGF (-) hem de EGF (+) iken *Sox8* mRNA ekspresyon seviyesi artarken, miR-124\* erkeklerde EGF (-) iken artmış ancak EGF (+) iken ekspresyon seviyesi değişmemiştir (**Tablo 14-15**). NS için tek bir dişi örnek varlığını göz önüne aldığımızda, EGF (+) iken miR-124\* erkeklerde *Sox8* mRNA ekspresyon seviyesinin EGF (-) kontrol grubundan ( $p < 0,05$ ) yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca, EGF (-) iken miR-124\* erkeklerde ve kontrol erkeklerde *Sox8* mRNA ekspresyonunun azaldığı dikkat çekmektedir (**Şekil 51**). Bu durum tahmin algoritmasında *Sox8* geninin %65 oranında miR-124-3p'nin hedefi olduğunu doğrular niteliktedir (111, 127). EGF varlığında miR-124\* erkeklerde *Sox8* mRNA ekspresyon seviyesinin arttığı saptanmıştır (**Şekil 51**).

Bir diğer SoxE proteini olan *Sox9*'un miR-124 ile ilişkili olup olmadığı Grandjean ve ark. (7) tarafından araştırılmıştır. İlk embriyonik aşamalarda *Sox9*'un ifadesini değiştirerek elde ettikleri bilgi ile erken embriyonik büyümede *Sox9*'un rolüne dair bağımsız bir kanıt

elde etmişlerdir (7). *Sox9* geninin bir allelinin fonksiyonel olmadığı mutasyonun taşıyıcılığı durumunda doğumu takiben ölüm gözlenmesinden (128) dolayı ilk önce, zigottaki *Sox9* mRNA'sına karşı si-RNA molekülleri mikroenjekte edilerek *Sox9* geninin ekspresyonunu azaltmaya çalışmışlardır (7). Embriyoların küçük boyutta ve gelişimlerinin büyük ölçüde anormal olması sonucu E10.5'te yaygın malformasyonlar ve E11.5 inaktive edici mutasyonların öldürücü etkisi sebebiyle erken ölüm gözlemlenmişlerdir. *Sox9*'un erken gelişim sırasında gerekli olduğu açık olsa da, hücre çoğalması ve büyüme kontrolü üzerinde belirli bir etki tespit edemediklerini belirtmişlerdir (7). Bunun üzerine *Sox9* ekspresyonunun baskılanmasının aksi durumun nasıl bir etki oluşturacağı merak konusu olmuştur. Grandjean ve ark. (7) *Sox9* geninin ekspresyon seviyesini arttırmak için, *Sox9* cDNA sekansını (tamamı), bir hücreli embriyoda yüksek ekspresyon seviyelerini harekete geçiren CMV1 promotörünün aşağı kısmına mikroenjeksiyon yöntemi ile insert etmişlerdir. Mikroenjeksiyondan sonra E7.5'te toplanan embriyoların, normal morfolojiyle, kontrollerden daha büyük bir boyuta sahip olduğu gösterilmiş olsa da gelişim daha sonra E11.5'te tutuklanmıştır (7).

Grandjean ve ark. (7) miR-124 mikroenjeksiyonu sonrası qPCR ile erken embriyonik dönemden yetişkinliğe kadar (E2,5- E6,5- E15,5- E16,5 ve yetişkin) *Sox9* mRNA ekspresyon seviyesini araştırdıkları çalışmalarında embriyogenez ilerledikçe, toplam RNA'daki *Sox9* transkript seviyelerinin kontrollerin seviyelerine gerilediğini tespit etmişlerdir. Böbrek ve pankreas gibi yüksek büyüme oranına sahip olan organlarda *Sox9* geninin yüksek ekspresyonu görülmeye devam etmiştir, ancak bu durum vücudun diğer bölgeleri için geçerli olmamıştır. Artmış büyüme oranları ve hücre çoğalmasının tüm vücut için koordine bir şekilde sürdüğünü tespit eden araştırmacılar (7) geç embriyogenez ve postnatal büyümede dev fenotipin oluşmasına yol açan genetik ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması için bizi bu tez çalışmasını yapmaya teşvik etmiştir. *Sox9* ekspresyonunun lokusa özgü modülasyon ile ilişkili embriyo aşırı büyümesi, genin ilk gelişim döneminde embriyonik kök hücrelerin proliferasyonunun kontrolünde merkezi bir rol oynadığının göstergesidir. Ayrıca, hamileliğin ilk bölümünde hızlanan büyüme ile oluşturulan kök hücrelerin büyük havuzlarının yetişkin “dev” fenotipini üretmeye yeterli olduğu tartışılabilir bir konudur (7). Bir transkripsiyon faktörü olarak *Sox9*'un progenitörlerde gen ekspresyonu ve düzenleyici mekanizmaları aktive ederek hem prenatal hem postnatal süreçte bir dizi farklılaşma yolunu açabileceğini düşünmekteyiz. Bu sebeple miR-124\* E19,5 günlük embriyolarda hipokampus ve hipokampus kökenli

NS'lerde *Sox9* mRNA ekspresyon seviyesini araştırdık. miR-124\* erkek hipokampusunda kontrol erkeklere kıyasla *Sox9* mRNA ekspresyonu artarken, dişilerde azalmıştır. NS'lerde ise EGF (-) iken kontrole kıyasla miR-124\* dişide *Sox9* mRNA ekspresyon seviyesi değişmezken, miR-124\* erkeklerde azalmıştır (**Tablo 14-15**). miR-124\* erkeklerde EGF (+) miR-124\* grubunda *Sox9* mRNA ekspresyon seviyesinin EGF (-) kontrol grubundan ( $p < 0,05$ ) dūřuk olduğu saptanmıştır. Genel olarak EGF varlığında *Sox9* geni ekspresyon seviyesindeki azalış dikkat çekmektedir (**şekil 51**). Bu durum tahmin algoritmasında *Sox9* geninin %67 oranında miR-124-3p'nin hedefi olduğunu doğrular niteliktedir (111). EGF (+) iken, miR-124\* dişide mRNA ekspresyonu artarken miR-124\* erkeklerde değişmemiştir (**Tablo 14-15**). miR-124\* dişideki bu artış tek bir diři örnek olması kaynaklı olabilir.

Bir diğer SoxE protein ailesi üyesi olan Sox10, schwann hücreleri ve oligodendrositlerin düzenleyici ağında görevli birkaç önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir (68). Başka proteinlerle bir protein kompleksi oluşturduktan sonra bir transkripsiyon aktivatörü olarak hareket edebilir. Schwann hücrelerinde ve oligodendrositlerde, *Sox10* soy ilerlemesi, nihai farklılaşma, gelişimsel miyelinasyon ve miyelin bakımı için gereklidir. Bu sebeple miR-124\* E19,5 günlük embriyolarda hipokampus ve hipokampus kökenli NS'lerde *Sox10* mRNA ekspresyon seviyesini araştırdık. Hipokampuste paramutant erkeğin *Sox10* mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol erkeklerden ( $p < 0,05$ ) daha yüksek olduğu saptanırken benzer şekilde paramutant erkeğin *Sox10* mRNA ekspresyon seviyesinin miR-124\* dişilerden ( $P < 0,05$ ) de yüksek olduğu saptanmıştır. miR-124\* dişilerde ise kontrole kıyasla *Sox10* gen ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (**şekil 49**). NS'lerde ise hem EGF (-) hem de EGF (+) iken kontrol dişiye kıyasla miR-124\* dişilerde *Sox10* mRNA ekspresyon seviyesi azalmıştır. miR-124\* erkeklerde ise kontrol erkeklere kıyasla EGF(-) iken *Sox10* mRNA ekspresyon seviyesi değişmezken, EGF (+) iken azalmıştır (**Tablo 15**).

Nöronlarda eksprese olan mikrotübüle bağlı bir protein olan Doublecortin (*Dcx*), embriyonik ve postnatal gelişim sırasında merkezi ve çevresel sinir sistemi boyunca mikrotübüllerin organizasyonu ve stabilitesini düzenleyerek nöronların göçünü yönlendirdiği düşünölmektedir (90). İlginç bir şekilde, Nosten ve ark. (129) *Dcx* nakavt C57BL/6 ırkı farelerin süttten kesime kadar normal postnatal büyüme hızı gösterdiğini ancak 4 aylıkken vücut ağırlığının anlamlı derecede dūřuk olduğunu göstermiştir.

Germain ve ark. (130) tarafından daha büyük bir kohortta yapılan çalışma ile de *Dcx* nakavt C57BL/6 ırkı farelerin yetişkin ağırlığına oranla daha yavaş bir yetişkin büyüme hızı gösterdiği ve kontrol farelere kıyasla vücut ağırlıklarında %3-7 oranında azalma tespit edilmiştir. *Dcx* nakavt fareler daha küçük ise (129, 130), paramutant farelerimiz daha iri olduğuna göre *Dcx* transkriptinin aşırı ifade olmasını beklemekteyiz. Biz de çalışmamızda miR-124\* E19,5 günlük embriyolarda hipokampus ve hipokampus kökenli NS'lerde *Dcx* mRNA ekspresyon seviyesini araştırdık. Hipokampüste kontrollere kıyasla miR-124\* dişilerde *Dcx* mRNA ekspresyonu beklediğimiz gibi fazlayken, miR-124\* erkekte ekspresyon azalmıştır ancak bu azalışın gerçek bir azalış olup olmadığı tek bir erkek örneğimizin varlığı sebebiyle net değildir. NS'lerde ise kontrol dişilere kıyasla miR-124\* dişide EGF (-) iken *Dcx* mRNA ekspresyonu değişmezken, EGF (+) iken azalmıştır. Kontrol erkeklere kıyasla miR-124\* erkeklerde EGF (-) ve EGF (+) iken *Dcx* mRNA ekspresyonu değişmemiştir (**Tablo 14-15**).

Liu ve ark. (11) kurbağalar ile yaptıkları çalışmada mikroenjeksiyon yöntemi ile embriyonun 8 hücreli evresinde blastomerlere miR-124 ve anti-miR124 mikroenjekte etmişlerdir. miR-124 aşırı eksprese iken *Neurod1* ekspresyonunun azaldığını, miR-124 ekspresyonu azaldığında ise *Neurod1* ekspresyonunun arttığını qPCR ile göstermişlerdir. miR-124, *Neurod1* geninin 3'-UTR bölgesindeki korunmuş miR-124 bağlanma bölgesi ile etkileşime girerek pronöronal biyobelirteç olan *Neurod1* geninin ekspresyonunu negatif olarak düzenlemektedir. Bu bulgular ile miR-124'ün hücre proliferasyonu ve optik vezikül ile ön beyindeki nörogenezin baskılanması için gerekli ve yeterli olduğu yorumunu yapmışlardır. Hem embriyonik hem de yetişkin merkezi sinir sistemlerinde iyi bilinen bir nörojenik faktör ve pronöronal belirteç olan *Neurod1* (5) mRNA ekspresyon seviyesini bizde miR-124-3p mikroenjekte E19,5 günlük embriyoların hipokampus ve hipokampus kökenli NS'lerinde araştırdık. Hipokampüste kontrollere kıyasla miR-124\* dişilerde ve miR-124\* erkekte beklediğimizin aksine *Neurod1* mRNA ekspresyonu artmıştır. miR-124'ün *Neurod1* geninin 3'UTR bölgesini hedef aldığı bilgisinin tahmin algoritmaları (127, 131) ve yayında (11) yer alması bizim verilerimiz ile örtüşmese de bu çalışma ile miR-124\* embriyoların hipokampus dokusunda *Neurod1* mRNA ekspresyon profilini göstermiş olduk. miR-124 beyinin başka bölgelerinde *Neurod1*'i hedef alıyor olabilir. NS'lerde ise kontrol dişilere kıyasla miR-124\* dişide EGF (-) iken *Neurod1* mRNA ekspresyonu azalırken, EGF (+) iken değişmemiştir. Ancak bu grupta tek bir miR-124\* dişi varlığı bu bulgu bilgi verici olmayabilir. Kontrol erkeklere kıyasla miR-124\*

erkeklerde EGF (-) iken *Neurod1* mRNA ekspresyonu artarken EGF (+) iken *Neurod1* mRNA ekspresyonu azalmıştır (**Tablo 14-15**). Elde ettiğimiz bu bulguya dayanarak miR-124'ün hipokampusta *Neurod1*'i hedef alması için EGF gibi bir büyüme faktörünün ortamda bulunmasına ihtiyaç duyuyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Bulgularımız dahilinde hipokampus dokusunun etkilendiği aşıkardır. Ancak beyinde daha efektif şekilde etkilenen başka bir bölge olduğunu düşünmekteyiz. Bu bölge anksiyete, sosyal davranış ve keşif duygusu ile ilişkili olan (112) prefrontal korteks ya da büyüme hormonlarının salgılandığı hipotalamus olabilir.

Çalışmamızdaki davranış deney verilerini değerlendirdiğimiz (**Tablo 12**)'ye dikkat ile bakıldığında, kontrol erkek ve dişiler arasında cinsiyet farklılığı kaynaklı olduğunu düşündüğümüz fark ilginç bir şekilde miR-124\* erkek ve dişiler arasında ortadan kalkmış görünmektedir. Bu bulgu miR-124'ün cinsiyet hormon/hormonlarını hedef alıyor olabileceğini düşündürmüştür. miR-124 hedeflerini bu durumu gözeterek incelediğimizde *Dmrt1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor like family A1) geninin % 99 oranında miR-124'ün hedefi olduğu görülmektedir (111). Grandjean ve ark. (7) miR-124 mikroenjekte edilmiş embriyolarda ikizliğe rastladıklarını vurgulamışlardır. Bizde çalışmamız sırasında miR-124\* embriyolarda sıkça ikizlik gözlemledik. İlginç bir şekilde Balciuniene ve ark. (132) çalışmalarında, *Dmrt1* nakavt farelerde belirgin anatomik eksiklik olmadığını, canlı ve üretken olduklarını, erkeklerin %25'inin diğer erkekler ile çiftleşmek ister davranış sergilediğini ve en önemlisi dişilerin yumurtalıklarının polifoliküler (birden fazla yumurta taşıma durumu) olduğunu göstermişlerdir. Dişilerin polifoliküler oluşu, miR-124\* embriyolarda sıkça rastladığımız ikizlik durumunu açıklar niteliktedir.

Grandjean ve ark. (7) miR-124\* B6D2 ırkı farelerin %30 daha iri olduklarını bulduğu çalışmalarında miR-124\* erkek ve dişileri sağlıklı kontrol grubu fareler ile çaprazlayarak elde ettiği nesillerde de daha iri fenotipin F2 nesline kadar devam ettiğini ancak F3 neslinde paramutantlarda ağırlığın normale döndüğünü belirtmişlerdir. Bizde çalışmamızda miR-124\* erkekleri miR-124\* dişiler ile çiftleştirerek elde ettiğimiz F1 ve F2 neslinde ilginç bir şekilde küçülme tespit ettik (kullanılmayan veri). *Sox8* nakavt (126) ve *Dcx* nakavt (129, 130) farelerde gözlemlenen küçülme bilgisini dikkate aldığımızda, miR-124'ün direk olmasa da dolaydan hedef aldığı gen/genlerin buna yol açtığı düşünmekteyiz.

Grandjean ve ark. (7) floresan işaretli miR-124 kullanarak mikroenjeksiyon yapmışlardır. İşlemden 1 saat sonra çekirdekten atılmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu sebeple moleküler çalışmamızı prenatal dönemde yaptık ve prenatal dönemde yapılacak olan çalışmaların bu gizemi çözmeye daha yakın olacağını düşünmekteyiz.

## Sonuç

miR-124- 3p mikroenjeksiyonu sonucu hem prenatal hem postnatal dönemde daha iri ve davranış olarak kontrollerinden belirgin şekilde farklı davranan paramutant farelerin oluşturulduğu çalışmamız konusu ve literatürde yalnız tek benzer yayın bulunması sebebiyle orijinaldir. Paramutant farelerin daha iri oluşuna ve bilişsel yetilerinin daha gelişmiş olmasına yol açan epigenetik mekanizmaların aydınlatılabilmesi için epigenetiğin mevcut gizemini korumasına engel olacak şekilde yeni teknolojik gelişmelere hem de çok iyi tasarlanmış yeni projelere ihtiyaç vardır. Bu kadar orijinal bir konu ile çalışmanın avantajı yanında epigenetik gibi henüz tam olarak anlaşılamamış ve karmaşık bir konunun içinde olmamızın dezavantajlarını yaşamaktayız. Epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasını sağlayacak yeni teknolojik tekniklerin kısa zamanda gelişmesini umut ederek gizemini koruyan bu konunun aydınlatılabilmesi için araştırılmasının doğru olacağını öngördüğümüz başlıklar:

1. Bulgularımız dahilinde hipokampus dokusunun etkilendiği aşıkardır. Ancak beyinde daha efektif şekilde etkilenen başka bir bölge olduğunu düşünmekteyiz. Bu bölge anksiyete, sosyal davranış ve keşif duygusu ile ilişkili olan prefrontal korteks ya da büyüme hormonlarının salgılandığı hipotalamus olabilir.
2. Paramutant farelerin hem kardeşleri hem de dışardan sağlıklı fareler ile çiftleştirilmesi ile yeni nesillerin elde edilip bunlarda kilo takibi ve davranış deneylerinin yapılması iri fenotipin nesillere geçişindeki gizemi aydınlatılabilir.
3. İri fenotipin metabolik hız ile ilişkisi olup olmadığının araştırılabilmesi için yeni mikroenjeksiyon planları yapıp doğan yavrular metabolik kafeslerde takip edilebilirler.
4. miR-124-3p mikroenjeksiyonunun miR-124-3p ekspresyon seviyesinin arttırıp arttırmadığı araştırılabilir. Yetişkin evrede miR-124-3p ekspresyon seviyesinin kontrol ile aynı seviyelerde olduğunu tespit ettik (kullanılmamış veri). Floresan

işaretili miR-124'ün mikroenjeksiyondan 1 saat sonra çekirdekten atılması sebebiyle yeni planlanacak çalışmaların prenatal dönemde yapılmasının daha uygun olacağını ön görmekteyiz.

5. *Sox8* ve *Dcx* nakavt farelerde gözlemlenen küçülme bilgisini dikkate aldığımızda, miR-124'ün direk olmasa da dolaydan hedef aldığı gen/genlerin buna yol açıyor olabilir. Dolayısı ile sadece miR-124 hedeflerine odaklanmak gizemini koruyan moleküler mekanizmaların aydınlatılma sürecini zorlaştırabilir.
6. miR-124-3p'nin %99 oranında *Dmrta1* genini hedef alarak sık rastladığımız ikizliğe yol açtığını düşünmekteyiz. Hipokampuste dahil olmak üzere beyinin diğer kısımlarında *Dmrta1* mRNA ekspresyonu araştırılabilir. Ancak miR-124'ün bu geni hedef aldığından tam olarak emin olmak için western blot yöntemi ile *Dmrta1* protein düzeyinin ölçülmelidir.
7. miR-124-3p'nin %100 hedef aldığı *Ptbp1* ve %99 hedef aldığı *Ptbp 2* [110, 130] genleri splicing mekanizmalarını etkileyerek iri fenotipe ve bilişsel yetilerde gelişime sebep oluyor olabilir.
8. miR-124-3p'nin *Scp1* %100 hedef aldığı geninin kodladığı protein nöronal sessizleşmeye yol açmaktadır. Hipokampuste dahil olmak üzere beyinin diğer kısımlarında *Scp1* mRNA/protein ekspresyonu araştırılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Can Mİ,Aslan A, Epigenetic Mechanisms and Some Recent Studies. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi* 2016. 6(2): p. 445-452.
2. Gayon J, From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes rendus biologies* 2016. 339(7-8): p. 225-230.



3. Donkin I, Barrès R, Sperm epigenetics and influence of environmental factors. *Molecular metabolism* 2018. 14: p. 1.
4. Ying SY, Chang DC, Lin SL, The MicroRNA. *Methods Mol Biol*, 2018. 1733: p. 1-25.
5. Liu C, Xie W, Gui C, Du Y, Pronuclear microinjection and oviduct transfer procedures for transgenic mouse production, in *Lipoproteins and Cardiovascular Disease* 2013, Springer. p. 217-232.
6. Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, et al., RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2006. 441(7092): p. 469.
7. Grandjean V, Gounon P, Wagner N, Martin L, et al., The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth. *Development* 2009. 136(21): p. 3647-3655.
8. Sun Y, Luo ZM, Guo XM, Su DF, et al., An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. *Front Cell Neurosci* 2015. 9: p. 193.
9. Karabulut S, Bayramov KK, Bayramov R, Ozdemir F, et al., Effects of post-learning REM sleep deprivation on hippocampal plasticity-related genes and microRNA in mice. *Behavioural brain research* 2018.
10. Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, et al., The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes & development* 2007. 21(7): p. 744-749.
11. Liu K, Liu Y, Mo W, Qiu R, et al., MiR-124 regulates early neurogenesis in the optic vesicle and forebrain, targeting NeuroD1. *Nucleic Acids Res* 2011. 39(7): p. 2869-79.
12. Moosavi A, Ardekani AM, Role of epigenetics in biology and human diseases. *Iranian biomedical journal* 2016. 20(5): p. 246.
13. Felsenfeld G, A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2014. 6(1): p. a018200.
14. Mansouri L, Wierzbinska JA, Plass C, Rosenquist R. Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biological impact. in *Seminars in Cancer Biology* 2018. Elsevier.
16. Rassoulzadegan M, Cuzin F. From paramutation to human disease: RNA-mediated heredity. in *Seminars in cell & developmental biology* 2015. Elsevier.
17. Kiani J, Grandjean V, Liebers R, Tuorto F, et al., RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2. *PLoS genetics* 2013. 9(5): p. e1003498.
18. Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, Grandjean V, et al., RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Developmental cell* 2008. 14(6): p. 962-969.
19. Waddington CH, The genetic control of wing development in *Drosophila*. *Journal of Genetics* 1940. 41(1): p. 75-113.
20. Holliday R, Pugh JE, DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 1975. 187(4173): p. 226-232.
21. Güngör Ö, Ünal N, Epigenetic and genomic imprinting. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2015. 55(2): p. 73-81.
22. Korkmaz K, ENDOMETRİUM KANSERİNDE FOSFATAZ VE TENSİN HOMOLOG (PTEN) GENİ PROMOTÖR METİLYASYONU. 2013, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü p. 83.
23. Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL, Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reproductive toxicology* 2007. 23(3): p. 297-307.
24. Nestler EJ, Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 2014. 76: p. 259-268.

25. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell* 1993. 75(5): p. 843-854.
26. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP, An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001. 294(5543): p. 858-862.
27. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, et al., New microRNAs from mouse and human. *Rna* 2003. 9(2): p. 175-179.
28. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, et al., The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 2003. 425(6956): p. 415.
29. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, et al., Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004. 303(5654): p. 95-98.
30. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, et al., Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *cell* 2004. 117(1): p. 69-81.
31. Tang G, siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in biochemical sciences* 2005. 30(2): p. 106-114.
32. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, et al., Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic acids research* 2005. 33(8): p. 2697-2706.
33. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, et al., MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 2004. 23(20): p. 4051-4060.
34. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL, RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural and Molecular Biology* 2006. 13(12): p. 1097.
35. Lin S-L, Chang D, Wu D-Y, Ying S-Y, A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochemical and biophysical research communications* 2003. 310(3): p. 754-760.
36. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR, Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 2003. 17(24): p. 3011-3016.
37. Chen L-L, Carmichael GG, Decoding the function of nuclear long non-coding RNAs. *Current opinion in cell biology* 2010. 22(3): p. 357-364.
38. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD, Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *cell* 2003. 115(2): p. 209-216.
39. Hammond SM, An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. 87: p. 3-14.
40. Ha M, Kim VN, Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014. 15(8): p. 509-24.
41. Yang J-S, Lai EC, Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular cell* 2011. 43(6): p. 892-903.
42. Daugaard I, Hansen TB, Biogenesis and function of ago-associated RNAs. *Trends in Genetics* 2017. 33(3): p. 208-219.
43. Watson JD, Molecular biology of the gene. 2008.
44. Dueck A, Meister G, Assembly and function of small RNA–Argonaute protein complexes. *Biological chemistry* 2014. 395(6): p. 611-629.
45. Meister G, Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics* 2013. 14(7): p. nrg3462.
46. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM, Principles of microRNA–target recognition. *PLoS biology* 2005. 3(3): p. e85.
47. Jee D, Lai EC, Alteration of miRNA activity via context-specific modifications of Argonaute proteins. *Trends in cell biology* 2014. 24(9): p. 546-553.
48. Nakanishi K, Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2016. 7(5): p. 637-660.
49. Eulalio A, Triteschler F, Büttner R, Weichenrieder O, et al., The RRM domain in GW182 proteins contributes to miRNA-mediated gene silencing. *Nucleic acids research* 2009. 37(9): p. 2974-2983.

50. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, et al., Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Molecular cell* 2015. 57(3): p. 397-407.
51. Großhans H, Chatterjee S, MicroRNAs and the regulated degradation of mature animal miRNAs, in *Regulation of microRNAs* 2010, Springer. p. 140-155.
52. Cho CJ, Myung S-J, Chang S, AdAR1 and microRNA; A hidden crosstalk in cancer. *International journal of molecular sciences* 2017. 18(4): p. 799.
53. Skeparnias I, Anastasakis D, Shaukat A-N, Grafanaki K, et al., Expanding the repertoire of deadenylases. *RNA biology* 2017. 14(10): p. 1320-1325.
54. Zhang X, Devany E, Murphy MR, Glazman G, et al., PARN deadenylase is involved in miRNA-dependent degradation of TP53 mRNA in mammalian cells. *Nucleic acids research* 2015. 43(22): p. 10925-10938.
55. Svobodova E, Kubikova J, Svoboda P, Production of small RNAs by mammalian Dicer. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 2016. 468(6): p. 1089-1102.
56. Fitzgerald ME, Vela A, Pyle AM, Dicer-related helicase 3 forms an obligate dimer for recognizing 22G-RNA. *Nucleic acids research* 2014. 42(6): p. 3919-3930.
57. Yi T, Arthanari H, Akabayov B, Song H, et al., eIF1A augments Ago2-mediated Dicer-independent miRNA biogenesis and RNA interference. *Nature communications* 2015. 6: p. 7194.
58. Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W, Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna* 2004. 10(10): p. 1518-1525.
59. Carthew RW, Sontheimer EJ, Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *cell* 2009. 136(4): p. 642-655.
60. Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM, Computational identification of Drosophila microRNA genes. *Genome biology* 2003. 4(7): p. R42.
61. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, et al., The microRNAs of Caenorhabditis elegans. *Genes & development* 2003. 17(8): p. 991-1008.
62. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, et al., Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology* 2002. 12(9): p. 735-739.
63. Cao X, Pfaff SL, Gage FH, A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes & development* 2007. 21(5): p. 531-536.
64. Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR, MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* 2009. 460(7255): p. 642.
65. Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA, Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Developmental cell* 2003. 5(2): p. 351-358.
66. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, et al., Principles of neural science Vol. 4. 2000: McGraw-hill New York.
67. Korkmaz Ö, Mahiroğlu A, Beyin, bellek ve öğrenme. *Kastamonu Eğitim Dergisi* 2007. 15(1): p. 93-104.
68. Turnescu T, Arter J, Reiprich S, Tamm ER, et al., Sox8 and Sox10 jointly maintain myelin gene expression in oligodendrocytes. *Glia* 2018. 66(2): p. 279-294.
69. Freund TF, Buzsáki G, Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996. 6(4): p. 347-470.
70. Broca P, Sur le siège de la faculté du langage articulé (15 juin). *Bulletins de la Société Anthropologique de Paris* 1865. 6: p. 377-393.
71. Martin JH, Neuroanatomy text and atlas. 2012: McGraw Hill Professional.
72. England MA, Wakely J, Color atlas of the brain and spinal cord: an introduction to normal neuroanatomy 2006: Elsevier Health Sciences.
73. İZCİ Y, ERBAŞ YC, Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg* 2015. 25(3): p. 287-95.

74. Standring S, Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice. 2015: Elsevier Health Sciences.
75. Scoville WB, Milner B, Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology neurosurgery, and psychiatry*, 1957. 20(1): p. 11.
76. Wixted JT, Squire LR, Jang Y, Papesh MH, et al., Sparse and distributed coding of episodic memory in neurons of the human hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014: p. 201408365.
77. Gall FJ, Anatomie et physiologie du système nerveux en général et du cerveau en particulier; avec des observations sur la possibilité de reconnaître plusieurs dispositions intellectuelles et morales de l'homme et des animaux par la configuration de leur têtes (Vol. 3). 1818.
78. Geschwind N, Selected papers on language and the brain. Vol. 16. 2012: Springer Science & Business Media.
79. Takahashi A, Miczek KA, Neurogenetics of aggressive behavior: studies in rodents, in *Neuroscience of aggression*. 2013, Springer p. 3-44.
80. Rodriguiz RM, Colvin JS, Wetsel WC, Neurophenotyping genetically modified mice for social behavior, in *Proprotein Convertases* 2011, Springer. p. 343-363.
81. Ko J, Neuroanatomical substrates of rodent social behavior: the medial prefrontal cortex and its projection patterns. *Frontiers in neural circuits* 2017. 11: p. 41.
82. Cilz NI, Cymerblit-Sabba A, Young WS, Oxytocin and Vasopressin in the Rodent Hippocampus. *Genes, Brain and Behavior* 2018: p. e12535.
83. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, et al., Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1980. 77(12): p. 7380-7384.
84. Bağış H, Transgenik rodent üretimi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine* 2013. 81: p. 2.
85. Keefer C, Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Animal Reproduction Science*, 2004. 82: p. 5-12.
86. ARSLAN K, AKYÜZ B, Gen transfer teknolojileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2009. 6(1): p. 77-82.
87. Singh A, Harada S, Mishina Y, Downstream genes of Sox8 that would affect adult male fertility. *Sexual Development* 2009. 3(1): p. 16-25.
88. Kordes U, Cheng Y-C, Scotting PJ, Sox group E gene expression distinguishes different types and maturational stages of glial cells in developing chick and mouse. *Developmental brain research* 2005. 157(2): p. 209-213.
89. Weider M, Wegner M. SoxE factors: transcriptional regulators of neural differentiation and nervous system development. in *Seminars in cell & developmental biology* 2017. Elsevier.
90. Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA, Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 1999. 23(2): p. 257-271.
91. Hall CS, Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative psychology* 1934. 18(3): p. 385.
92. Silvero-Isidre A, Morinigo-Guayuan S, Meza-Ojeda A, Mongelos-Cardozo M, et al., Protective effect of aspirin treatment on mouse behavior in the acute phase of experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology research* 2018. 117(1): p. 189-200.
93. Haj-Mirzaian A, Nikbakhsh R, Ramezanzadeh K, Rezaee M, et al., Involvement of opioid system in behavioral despair induced by social isolation stress in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019. 109: p. 938-944.

94. Ye T, Meng X, Wang R, Zhang C, et al., Gastrodin Alleviates Cognitive Dysfunction and Depressive-Like Behaviors by Inhibiting ER Stress and NLRP3 Inflammasome Activation in db/db Mice. *International journal of molecular sciences* 2018. 19(12): p. 3977.
95. Coelho-Santos V, Cardoso FL, Magalhães A, Ferreira-Teixeira M, et al., Effect of chronic methylphenidate treatment on hippocampal neurovascular unit and memory performance in late adolescent rats. *European Neuropsychopharmacology* 2018.
96. Moy SS, Nadler JJ, Poe MD, Nonneman RJ, et al., Development of a mouse test for repetitive, restricted behaviors: relevance to autism. *Behavioural brain research* 2008. 188(1): p. 178-194.
97. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, et al., Assessment of social interaction behaviors. *Journal of visualized experiments: JoVE* 2011(48).
98. Sato A, Mizuguchi M, Ikeda K, Social interaction test: a sensitive method for examining autism-related behavioral deficits. *Protocol Exchange* 2013. 10.
99. Ho Y-J, Eichendorff J, Schwarting RK, Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behavioural brain research* 2002. 136(1): p. 1-12.
100. Nicolas LB, Kolb Y, Prinssen EP, A combined marble burying–locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *European journal of pharmacology* 2006. 547(1-3): p. 106-115.
101. Gyertyan I, Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying. *Behavioural pharmacology* 1995.
102. Hedlund PB, Sutcliffe JG, The 5-HT<sub>7</sub> receptor influences stereotypic behavior in a model of obsessive-compulsive disorder. *Neuroscience letters* 2007. 414(3): p. 247-251.
103. Dekeyne A, Behavioural models for the characterisation of established and innovative antidepressant agents. *Therapie* 2005. 60(5): p. 477-484.
104. Palucha A, Pilc A, Metabotropic glutamate receptor ligands as possible anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacology & therapeutics* 2007. 115(1): p. 116-147.
105. Shimazaki T, Iijima M, Chaki S, Anxiolytic-like activity of MGS0039, a potent group II metabotropic glutamate receptor antagonist, in a marble-burying behavior test. *European journal of pharmacology* 2004. 501(1-3): p. 121-125.
106. Li X, Morrow D, Witkin JM, Decreases in nestlet shredding of mice by serotonin uptake inhibitors: comparison with marble burying. *Life sciences* 2006. 78(17): p. 1933-1939.
107. Egashira N, Harada S, Okuno R, Matsushita M, et al., Involvement of the sigma<sub>1</sub> receptor in inhibiting activity of fluvoxamine on marble-burying behavior: comparison with paroxetine. *European journal of pharmacology* 2007. 563(1-3): p. 149-154.
108. Pinel JP, Treit D, Burying as a defensive response in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 1978. 92(4): p. 708.
109. Parker LA, Defensive burying of flavors paired with lithium but not amphetamine. *Psychopharmacology* 1988. 96(2): p. 250-252.
110. Deacon RM, Rawlins JNP, Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behavioural brain research* 2005. 156(2): p. 241-249.
111. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ, miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008. 36(Database issue): p. D154-8.
112. Mirza R, Sharma B, Selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  protects propionic acid induced autism-like phenotypes in rats. *Life sciences* 2018. 214: p. 106-117.
113. Akıllıoğlu K, Kocahan S, Melik EB, Melik E, Zengin Çevrenin Beyin Fonksiyonlarındaki Yeri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2009. 18(1).
114. Ter Horst J, De Kloet E, Schächinger H, Oitzl M, Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. *Cell Mol Neurobiol* 2012. 32(5): p. 725-735.

115. ter Horst JP, de Kloet ER, Schachinger H, Oitzl MS, Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. *Cell Mol Neurobiol* 2012. 32(5): p. 725-35.
116. Tropp J, Markus EJ, Sex differences in the dynamics of cue utilization and exploratory behavior. *Behavioural brain research* 2001. 119(2): p. 143-154.
117. Aqrabawi AJ, Browne CJ, Dargaei Z, Garand D, et al., Top-down modulation of olfactory-guided behaviours by the anterior olfactory nucleus pars medialis and ventral hippocampus. *Nature communications* 2016. 7: p. 13721.
118. Handley SL, Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1991. 38(1): p. 63-67.
119. Dringenberg HC, Levine Y, Menard JL, Electrical stimulation of dorsal, but not ventral hippocampus reduces behavioral defense in the elevated plus maze and shock-probe burying test in rats. *Behavioural brain research* 2008. 186(1): p. 143-147.
120. Vaysse L, Labie C, Canolle B, Jozan S, et al., Adult human progenitor cells from the temporal lobe: another source of neuronal cells. *Brain injury* 2012. 26(13-14): p. 1636-1645.
121. Woollett K, Maguire EA, Exploring anterograde associative memory in London taxi drivers. *Neuroreport* 2012. 23(15): p. 885-8.
122. Khan J, Das G, Gupta V, Mohapatra S, et al., Neurosphere Development from Hippocampal and Cortical Embryonic Mixed Primary Neuron Culture: A Potential Platform for Screening Neurochemical Modulator. *ACS chemical neuroscience* 2018. 9(11): p. 2870-2878.
123. Cao X, Pfaff SL, Gage FH, A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes Dev* 2007. 21(5): p. 531-6.
124. Xue Y, Ouyang K, Huang J, Zhou Y, et al., Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *cell* 2013. 152(1-2): p. 82-96.
125. Mokabber H, Najafzadeh N, Mohammadzadeh Vardin M, miR-124 promotes neural differentiation in mouse bulge stem cells by repressing Ptbp1 and Sox9. *Journal of cellular physiology* 2018.
126. Sock E, Schmidt K, Hermanns-Borgmeyer I, Bösl MR, et al., Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Molecular and cellular biology* 2001. 21(20): p. 6951-6959.
127. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *cell* 2005. 120(1): p. 15-20.
128. Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, et al., Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001. 98(12): p. 6698-6703.
129. Nosten-Bertrand M, Kappeler C, Dinocourt C, Denis C, et al., Epilepsy in Dcx knockout mice associated with discrete lamination defects and enhanced excitability in the hippocampus. *PLoS One* 2008. 3(6): p. e2473.
130. Germain J, Bruel-Jungerman E, Grannec G, Denis C, et al., Doublecortin knockout mice show normal hippocampal-dependent memory despite CA3 lamination defects. *PLoS One* 2013. 8(9): p. e74992.
131. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, et al., Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005. 37(5): p. 495-500.
132. Balciuniene J, Bardwell VJ, Zarkower D, Mice mutant in the DM domain gene Dmrt4 are viable and fertile but have polyovular follicles. *Molecular and cellular biology* 2006. 26(23): p. 8984-8991.



T.C.  
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
(EÜHADYEK)



Tarih: 16.11.2016

Toplantı Sayısı: 10

Karar No:16/132

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 16.11.2016 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
Serpil SARIÖZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	KATILMADI
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	DeneySEL Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	KATILMADI
Asiye GÖKBELLEN	Yardımlı Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D.'dan Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL tarafından sunulan "miR-124'ün Beyin Gelişimi Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması." başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 16.11.2016  
Etik kurul Başkan Vekili : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA  
İmza :

## paramutant

### ORIGINALITY REPORT

6%

SIMILARITY INDEX

5%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

%

STUDENT PAPERS

### PRIMARY SOURCES

1

[fbd.beun.edu.tr](http://fbd.beun.edu.tr)

Internet Source

1%

2

[norosirurji.dergisi.org](http://norosirurji.dergisi.org)

Internet Source

1%

3

[louis14.nrl.navy.mil](http://louis14.nrl.navy.mil)

Internet Source

<1%

4

[gbm.bo.astro.it](http://gbm.bo.astro.it)

Internet Source

<1%

5

BİÇER, Asuman, TURHAN, Hasan, ARAS, Dursun, TOPALOĞLU, Serkan, BAŞER, Kazım, ŞAŞMAZ, Hatice and KORKMAZ, Şule. "İzole koroner arter ektazisi bulunan hastalarda QT dispersiyonu artışı", Türk Girişimsel Kardiyoloji Vakfı, 2009.

Publication

<1%

6

[sagens.erciyes.edu.tr](http://sagens.erciyes.edu.tr)

Internet Source

<1%

7

[www.nny.edu.tr](http://www.nny.edu.tr)

Internet Source

<1%



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Keziban KORKMAZ BAYRAMOV

Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 20/05/1986 - SORGUN

Medeni Durumu : Evli

Tel : 0546 596 72 92

e-posta : [kzbnkorkmaz66@gmail.com](mailto:kzbnkorkmaz66@gmail.com)

Adres : Mevlana Mah. 15 Temmuz Cad. Park Apartmanı Kat:1 No:105  
Talas/ KAYSERİ

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Erciyes Üniversitesi	2019
Yüksek lisans	Erciyes Üniversitesi	2013
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi	2010

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
6	Erciyes Üniversitesi	Memur