

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAİNİK ASİT ARACILI EKŞİTOTOKSİSİTEDE
HÜCRESEL REDOKS DÜZEYLERİ VE
C-FOS mRNA EKSPRESYONU**

Biyokimya (Eczacılık) Programı

Yüksek Lisans Tezi

**Eczacı
Sinem Ezgi Turunç**

**Danışman
Prof. Dr. Ayfer YALÇIN**

**İZMİR
2007**

ÖNSÖZ

Çalışmalarımdaki değerli katkıları, ilgisi ve desteğinden dolayı başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayfer YALÇIN'a, çalışma materyalinin sağlanmasında katkısı bulunan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Lütfiye KANIT'a, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı'mız Sayın Prof. Dr. Aysun PABUÇCUOĞLU'na ve Anabilim Dalı'mızdaki tüm öğretim görevlisi hocalarım ile öğretim elemanı arkadaşlarıma en içten dileklerle teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda destek olan aileme ve özellikle hayata bağlılığıyla bize bir mucizeyi yaşatan babama çok teşekkür ederim.

İzmir, 2007

Ecz. Sinem Ezgi TURUNÇ

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII

BÖLÜM I GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Genel Bilgiler.....	3
1.1.1. Eksitotoksisite ve Nörodejenerasyon	3
1.1.2. Kainik Asit ve Nörodejenerasyondaki Yeri	5
1.2. Transkripsiyon ve Transkripsiyon Faktörleri	9
1.2.1. Transkripsiyon Faktörlerinin Santral Sinir Sistemindeki Fonksiyonları	12
1.2.2. Akut Faz Genleri (Immediate Early Genes).....	13
1.2.3. Fos Geni ve Fos Proteinleri.....	14
1.2.4. <i>c-fos</i> Ekspresyonunun İndüksiyonu.....	16
1.2.5. <i>c-fos</i> Ekspresyonu ve Eksitotoksisite ile İlişkisi	19
1.3. Glutatyon (GSH) ve HücreSEL Redoks Potansiyelinin Sağlanmasındaki Rolü	22
1.3.1. Glutatyon ve Redoks Potansiyeli.....	25
1.3.2. Glutatyon ve Beyin Dokusu	26
1.3.3. Beyinde Glutatyon Düzeylerinin Değişimi ve Nörodejenerasyon İle İlişkisi.....	28
1.4. γ -Glutamilsistein Etil Esteri (GCEE)	31
1.5. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR).....	32
1.5.1. Real-time PCR' da Kullanılan Floresan Boya (SYBR Green).....	34
1.5.2. Real-time PCR' da Eşik Döngü Değerinin Saptanması.....	36
1.5.3. Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan Referans Genler.....	37
1.5.4. Real-time PCR' da Erime Eğrisi Analizleri	37

BÖLÜM II

2 GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Aletler	39
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
2.3. Kullanılan Çözeltiler	42
2.4. Çalışma Grupları	45
2.4.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması	45
2.5. Kullanılan Yöntemler	46
2.5.1. Örneklerin GSH Miktar Tayini İçin Homojenizasyonu.....	46
2.5.2. GSH Miktar Tayini Yöntemi.....	47
2.5.3. GSH Miktar Tayini Belirlenmesinde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması	47
2.5.4. Protein Miktar Tayini Belirlenmesinde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması	48
2.5.5. Protein Miktar Tayini Yöntemi	48
2.5.6. Beyin Korteks ve Hipokampus Dokusundan Total RNA İzolasyonu	49
2.5.7. Total RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	50
2.5.8. Total RNA'dan Revers Transkripsiyon Yöntemiyle cDNA Sentezi	51
2.5.9. Konvansiyonel ve Eş zamanlı cDNA Amplifikasyonu ve <i>c-fos</i> Ekspresyon Düzeylerinin Saptanması.....	53
2.5.10. Agaroz Jel Elektroforezi	57
2.5.11. Jelin Boyanması ve Görüntülenmesi.....	58
2.5.12. <i>c-fos</i> Ekspresyon Düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Analiz Yöntemine Göre Hesaplanması	59
2.5.13. Erime Eğrisi Analizi	60
2.6. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi	61
2.7. Etik Kurul Onayı	61

BÖLÜM III

3 BULGULAR

3.1. GSH Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi	62
3.2. Protein Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi.....	63
3.3. Beyin Korteks ve Hipokampüs Doku Örneklerinde GSH Düzeyleri	64
3.4. Beyin Korteks ve Hipokampüs Doku Örneklerinden İzole Edilen Total RNA'ların A260/A280 oranları	66
3.5. Beyin Korteks ve Hipokampüs Doku Örneklerinde Konvansiyonel PCR ile elde edilen <i>c-fos</i> Ekspresyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Gösterimi	67
3.6. Beyin Korteks ve Hipokampüs Doku Örneklerinde <i>c-fos</i> Ekspresyon Düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi ile Hesaplanmasına Yönelik Bulgular	68
3.7. Real Time PCR Sonucu Elde Edilen Ürünlerin Erime Eğrisi Analizi	70

BÖLÜM IV

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

4.1. Örnek Seçimiyle İlgili Tartışma.....	73
4.2. <i>c-fos</i> Ekspresyonunun Saptanmasında Seçilen Yöntem İle İlgili Tartışma.....	74
4.3. Beyin Korteks ve Hipokampüs Doku Örneklerinde GSH Düzeyleri İle İlgili Tartışma.....	76
4.4. Beyin Hipokampüs ve Korteks Doku Örneklerinde <i>c-fos</i> Ekspresyonuna Yönelik Tartışma.....	78
ÖZET	81
ABSTRACT	83
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ	99

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
Tablo I	cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları	52
Tablo II	<i>c-fos</i> ve <i>GAPDH</i> primerleri	54
Tablo III	Konvansiyonel cDNA amplifikasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları	54
Tablo IV	Eş zamanlı cDNA amplifikasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları.....	55
Tablo V	GSH standart grafiğini oluşturan absorbans değerleri.....	62
Tablo VI	BSA standart grafiğini oluşturan absorbans değerleri	63
Tablo VII	Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampus ve kortekslerindeki GSH düzeyleri ve ortalama \pm S.H.'ları	65
Tablo VIII	Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampusleri ve kortekslerindeki total RNA A260/A280 oranları (Ortamla \pm S.H.'ları)	66
Tablo IX	<i>c-fos</i> geninin Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampusleri ve kortekslerindeki $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri ve Ortalama \pm S.H.'ları	68
Tablo X	<i>c-fos</i> gen ürününün Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampusleri ve kortekslerindeki Erime Sıcaklıkları (Ortalama \pm S.H.'ları).....	71
Tablo XI	<i>GAPDH</i> gen ürününün Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampus ve kortekslerindeki Erime Sıcaklıkları (Ortamla \pm S.H.'ları).....	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Glutamat reseptörleri	4
Şekil 2. Glutamat ve kainik asitin yapısal benzerliği	5
Şekil 3. Kainik asitin nörodejeneratif etki mekanizması	8
Şekil 4. DNA bağlanma bölgesinin yapısal motifleri.....	11
Şekil 5. <i>c-fos</i> geninin ekspresyonunun induksiyonu	17
Şekil 6. <i>c-fos</i> geninin DNA elementleri	19
Şekil 7. Glutatyonun kimyasal yapısı	23
Şekil 8. Glutatyon Biyosentezi	24
Şekil 9. GSH düzeylerinin değişimi ve nörodejeneratif hastalıkların alt yapısını oluşturan olası mekanizmalar	30
Şekil 10. SYBR Green' in kimyasal formülü.....	34
Şekil 11. SYBR Green' in floresans oluşturma mekanizması	35
Şekil 12. Amplifikasyon eğrisinde CT değerinin gösterilmesi.....	36
Şekil 13. Erime Eğrisi (F/T).....	38
Şekil 14. Erime Eğrisi (-dF/dT).....	38
Şekil 15. Real-time PCR Programı	45
Şekil 16. GSH absorbans- konsantrasyon eğrisi	63
Şekil 17. Protein absorbans- konsantrasyon eğrisi.....	64
Şekil 18. Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin kortekslerindeki GSH düzeylerinin (ortalama ± S.H.) dağılımı	65
Şekil 19. Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampuslerindeki GSH düzeylerinin (ortalama ± S.H.) dağılımı	66
Şekil 20. Beyin korteks ve hipokampus doku örneklerinde <i>c-fos</i> ekspresyonunun agaroz jel üzerinde kalitatif olarak gösterilmesi.....	67
Şekil 21. Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin kortekslerindeki <i>c-fos</i> ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama ± S.H.).....	69

Şekil 22. Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampuslarındaki <i>c-fos</i> ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama \pm S.H.).....	69
Şekil 23. <i>c-fos</i> ' a ait erime eğrisi örneği ($T_m = 73.6$ °C).....	71
Şekil 24. <i>GAPDH</i> ' a ait erime eğrisi örneği ($T_m = 83.53$ °C).....	72

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Eksitotoksisite; glutamat ve aspartat gibi eksitator amino asit reseptörlerinin aşırı uyarımına bağlı olarak gelişen nörodejenerasyonun ve hücre ölümünün meydana geldiği durumdur (18). Eksitotoksisitenin; inme, epileptik tutulumlar ve Parkinson gibi nörodejeneratif santral sinir sistemi hastalıklarında tetikleyici bir faktör olduğu düşünülmektedir (23) .

İyonotropik glutamat reseptör agonisti olan kainik asit (KA); sıçanlarda *in vivo* ve *in vitro* olarak nöronal hasar gelişimine neden olan bir eksitotoksindir. KA tarafından indüklenen eksitotoksisitenin altında yatan hücrel ve moleküler mekanizmalar arasında aşırı serbest radikal üretimi ve apoptotik bir yolağın aktivasyonu yer alır (62).

Serbest radikallerin oluşumu ve oksidatif stres hücreler için genel olarak harabiyet yaratıcıdır. Hücrelerde oksidatif strese karşı ve hücrel redoks dengesini sağlamak üzere görev yapan en temel bileşik glutatyon (GSH) olup yapısında tiyol taşıyan antioksidan bir tripeptiddir (47). Antioksidan savunma kapasitesinin düşük olmasının yanı sıra sürekli olarak oksidatif strese maruz kalan beyin dokusu için GSH düzeylerinin arttırılması nöroprotektif tedavi yaklaşımları açısından stratejik bir önem taşımaktadır. Oksidan bileşikler ve nöronal hücre ölümüne neden olan yollar arasında doğrudan bazı ilişkiler

olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stresin yanı sıra hücrenin redoks durumu da hücresel fonksiyonları belirleyen bir faktördür (4, 5).

γ -glutamilsistein etil esteri (GCEE) GSH sentez öncülü bir bileşiktir. GCEE uygulamasının beyinde GSH düzeylerini arttırdığı ve dolaylı bir antioksidan etki gösterebileceği düşünölmektedir (12, 27).

Nöronların nörotransmitterler veya nörotrofik faktörlerle stimölasyonu; nöronal hücre yaşamı, farklılaşması ve adaptif yanıtların gelişmesinde kritik rol oynayan gen ekspresyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Nörotransmitterlerin salınmasını izleyen dakikalarda “*akut faz genleri/ primer cevap genleri (IEG-immediate early genes)*” adı verilen gen ailesinin ekspresyonu indüklenmektedir (1). *c-fos* geni IEG ailesinin bir üyesi olup glutamat kaynaklı eksitotoksisite ile ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. *c-fos* geninin aşırı ekspresyonunun *in vivo* ve *in vitro* olarak hücre ölümüne neden olabileceğini gösteren çalışmaların ışığında *c-fos* mRNA düzeylerinden eksitotoksisitenin erken bir göstergesi olarak faydalanılabileceği düşünölmektedir (36, 37, 93).

Bu çalışmada, kainik asit ile eksitotoksisite oluşturulan sıçanlarda beyin korteks ve hipokampus dokularında *c-fos* mRNA düzeyleri ile hücresel redoks potansiyelinin en temel göstergesi olan GSH düzeyleri öncelikli olarak araştırılmıştır. Yanısıra, kainik aside karşı GCEE uygulamasının etkinliği aynı parametreler dikkate alınarak araştırılmıştır. *c-fos* mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimin son yıllarda güncel ve göreceli olarak yeni bir moleküler teknik olan real-time PCR ile saptanması hedeflenerek, hem KA hem de GCEE'nin beyin GSH düzeyleri üzerindeki etkisinin boyutları ortaya konulmaya çalışılmıştır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Eksitotoksisite ve Nörodejenerasyon

Glutamat ve aspartat gibi eksitatör amino asitler memeli santral sisteminin (SSS) ana nörotransmitterleridir. Beyinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar, sinir terminallerindeki sinaptik geçişi yönlendirir ve nöron içine iyon geçişini kontrol ederler (8, 31).

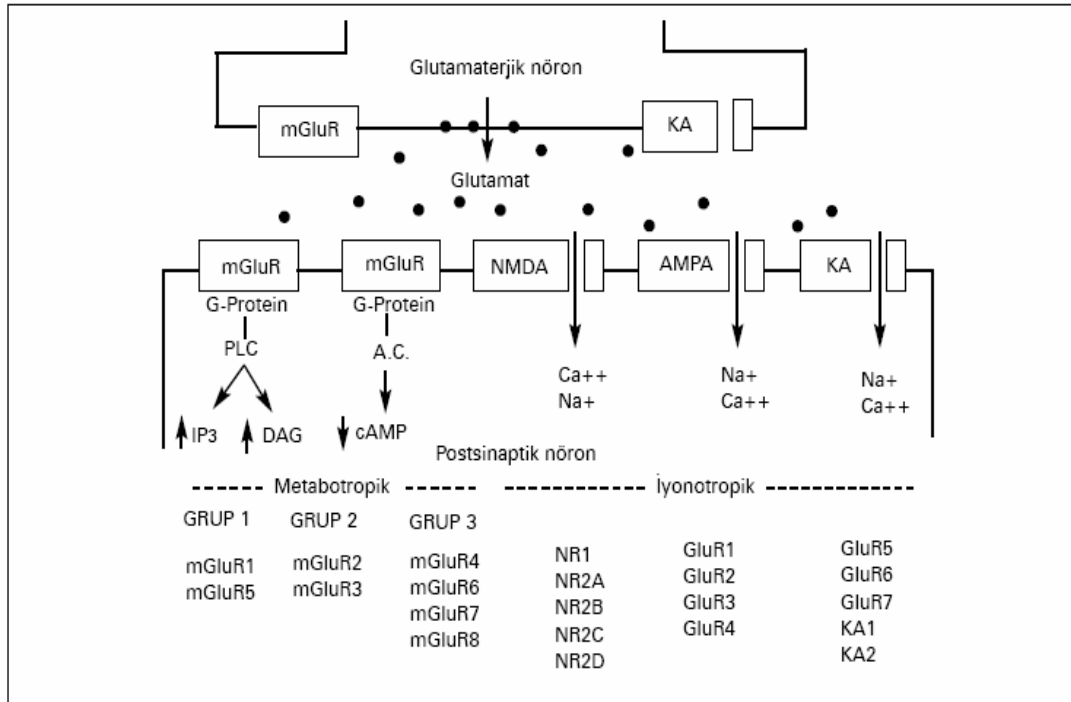
Glutamat ve aspartat postsinaptik hücre yüzeyinde etkilerini belirli reseptörler ile etkileşime girerek oluştururlar (64, 70). Bu reseptörler iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki gruptur. (Şekil 1). İyon kanallarına bağlı olan iyonotropik reseptörler uyarıldıklarında hücre içine iyon geçişini etkilerler. Metabotropik reseptörler ise G proteinine bağlı olup etkilerini ikincil haberciler (inozitol trifosfat (IP₃), intraselüler Ca⁺² salınması) vasıtasıyla göstermektedirler.

İyonotropik reseptörler Na⁺, K⁺ ve Ca⁺²'a olan farklı geçirgenlikleri nedeniyle üçe ayrılmaktadır:

1)NMDA (N-Metil-D-Aspartat) reseptörleri: Na-K-Ca iyon kanalına bağlıdır. Yavaş eksitatör cevaptan sorumludur. Sinir hücrelerine Ca⁺² girişini etkilemektedir.

2)AMPA (Alfa amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropiyonik asit) Reseptörleri: Na-K iyon kanalına bağlıdır. Hızlı eksitatör aşırımdan sorumludur.

3)Kainat Reseptörleri: AMPA reseptörleri gibi Na-K iyon kanalına bağlıdır ve hızlı eksitatör cevaptan sorumludur.



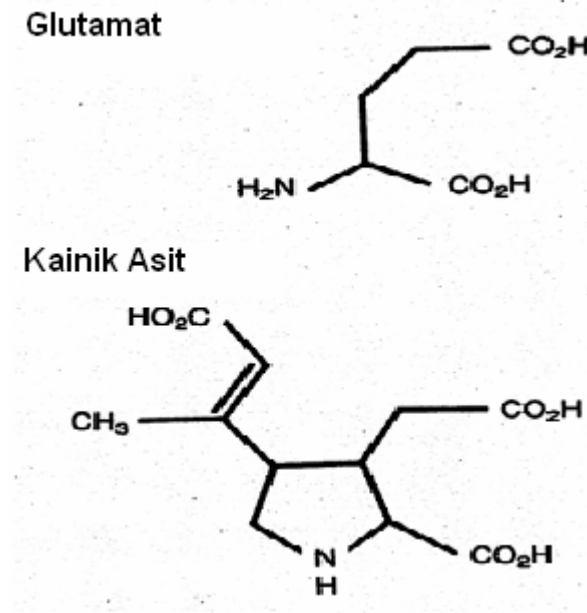
Şekil 1. Glutamat reseptörleri (PLC, fosfolipaz C; IP₃, inozitol trifosfat; DA, Diaçil gliserol; AC, Adenilat siklaz) (64).

Eksitator amino asitler (EAA) normalde sinir iletiminden sorumlu oldukları halde nörotoksisitenin de potansiyel kaynaklarıdır. Eksitotoksisite, eksitator amino asit reseptörlerinin aşırı uyarılmasına bağlı olarak gelişen hücre ölümünün ve buna bağlı olarak da nörodejenerasyonun meydana geldiği durumdur. İnme, epileptik tutulumlar ve Parkinson gibi nörodejeneratif SSS hastalıklarında eksitotoksisitenin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (23, 30).

Glutamat reseptörleri aracılığıyla meydana gelen eksitotoksisitede aşırı depolarizasyon sonucu iyon dengesinin bozulmasına bağlı olarak hücre içi Ca⁺² konsantrasyonu artmaktadır. Hücre içi Ca⁺² düzeylerindeki bu artış da çeşitli lipolitik (lipaz, fosfolipazlar) ve proteolitik enzimleri (Ca⁺² bağımlı proteazlar) aktive ederek hücreyi hem nekrotik hem apoptotik ölüme götüren mekanizmaları tetiklemektedir (19, 50, 96).

1.1.2. Kainik Asit ve Nörodejenerasyondaki Yeri

Kainik asit (KA), bir çeşit kırmızı alg olan “*Digenea simplex*” ‘ten elde edilir ve glutamik asite olan yapısal benzerliği nedeniyle (98) iyonotropik glutamat reseptör agonistidir (Şekil 2).



Şekil 2. Glutamat ve kainik asitin yapısal benzerliği

KA; akut ve subakut epileptik aktiviteye neden olan potansiyel SSS eksitotoksinidir. Sıçanlara 9-15 mg/kg doz aralığında bir KA uygulaması eksitotoksik etkiler oluşturur ve beyinde özellikle hipokampus, amigdala ve talamus bölgelerinde *in vivo* ve *in vitro* hasara neden olur. KA uygulaması sinir hücrelerinin yanı sıra glia, miyelin kılıf ve kan damarlarında da geniş çaplı nöropatolojik değişimlere neden olmaktadır (11, 96).

KA etkilerini iyonotropik glutamat reseptörleri aracılığıyla göstermektedir. Eksitotoksik hasarın ana hatlarını oluşturan biyokimyasal mekanizmalar şu şekilde özetlenebilir (35, 62):

- Ca^{+2} dengesinin bozulması, proteaz ve lipazların aktivasyonu,
- Kalpainler ve kaspazların aktivasyonu sonucu apoptoitik yolların tetiklenmesi (7),
- Nitrik oksit (NO) sentezi ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu sonucu oksidatif stresin gelişmesi (9),
- Akut faz genleri ve diğer transkripsiyon faktörlerinin aşırı indüksiyonu (93).

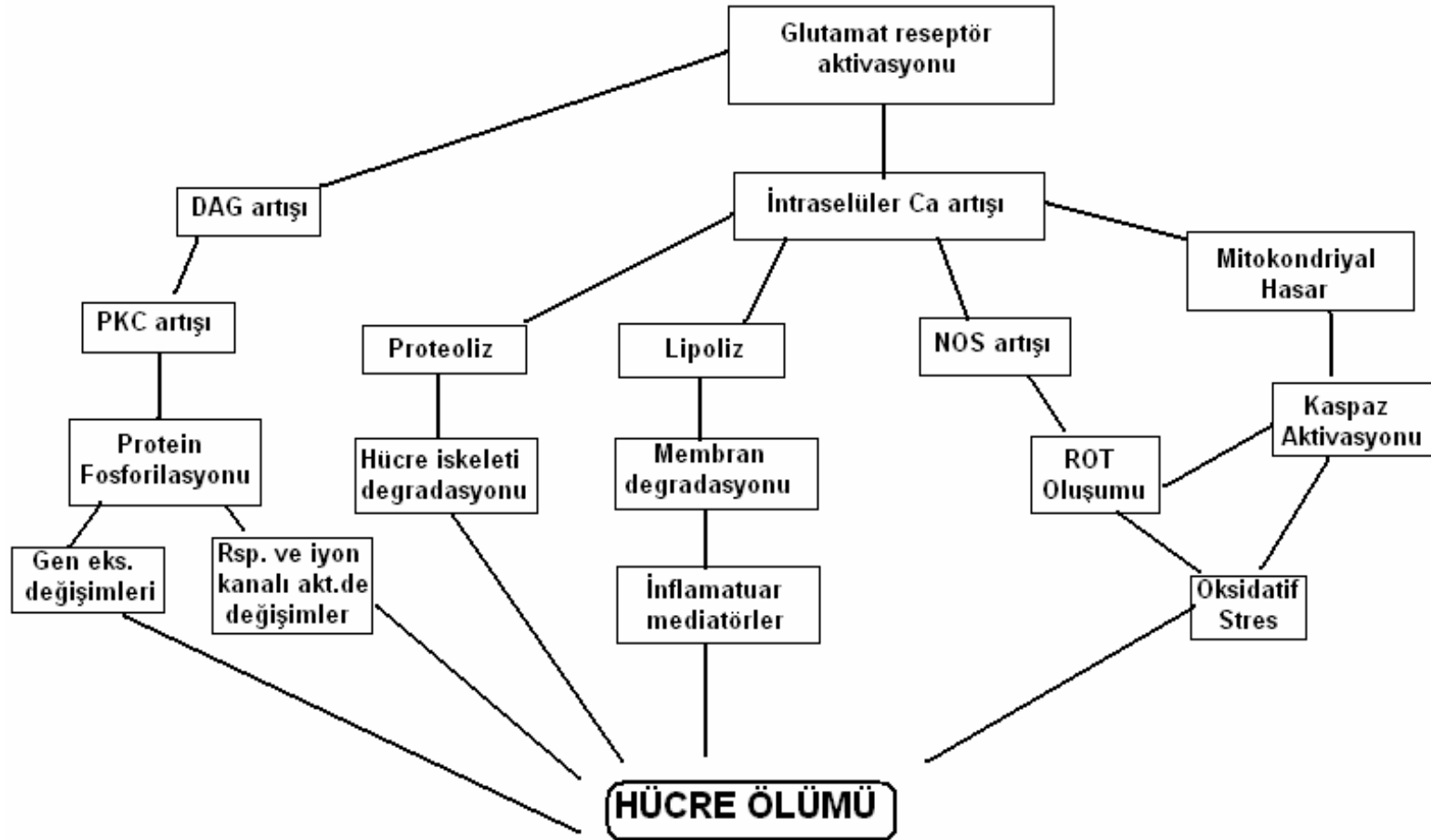
Şekil 3'te KA tarafından tetiklenen nörodejeneratif mekanizma ayrıntılı olarak belirtilmiştir (62). Buna göre:

Glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması sonucu iyon dengesi bozulmakta ve hücre içi Ca^{+2} düzeyleri artmaktadır. Ca^{+2} konsantrasyonunun artışı ile Ca^{+2} 'a bağlı lipolitik (lipaz, fosfolipaz) ve proteolitik enzimler (Kalpain I ve diğer proteazlar) aktive olurlar. Aktive olan proteazlar *c-fos*, *c-jun* gibi akut faz genlerinin anormal transkripsiyonunu indüklerler. Proteolitik enzimler plazma membranını ve hücre iskeletini oluşturan madde ve zincirleri yıkarlar. Lipolitik enzimler ise nöron membranındaki fosfolipidlerden araşidonik asit salınımına ve böylece araşidonik asit döngüsünün başlamasına neden olur. Araşidonik asit döngüsünde prostaglandinler, lökotrienler ve tromboksanlar sentezlenir (7, 18, 31).

Serbest radikaller ve lipid peroksitlerin yapımı sonucu KA kaynaklı $\cdot OH$ (hidroksil) radikali farelerde karaciğerde lipid peroksidasyonunu arttırırken, beyinde de mitokondriyal DNA'ya zarar vermektedir (16).

Mitokondri hücrede en çok serbest radikal üreten organeldir ve nöronal hasarın gelişiminde etkili oksidatif stresin ve serbest radikallerin önemli bir üretim kaynağıdır. Nitrik oksit yapımını takiben meydana gelen $ONOO\cdot$

(peroksinitrit) radikali mitokondriyal enerji sentezini inhibe ederek ATP kaybına öncülük etmekte ve nöronlarda enerji yokluguna yol açmaktadır. Mitokondride aşırı serbest radikal üretimi sonucu kaspaz aktivasyonuna neden olan proapoptotik faktörlerin mitokondriden salınımı apoptotik yolları tetikler ve hücre ölümü gerçekleşir (9, 101).



Şekil 3. Kainik asitin nörodegeneratif etki mekanizması (DAG, diaçilgliserol; PKC, protein kinaz C; NOS, Nitrikoksit sentetaz; ROT, reaktif oksijen türleri)

1.2. Transkripsiyon ve Transkripsiyon Faktörleri

DNA kalıbından RNA moleküllerinin sentezlenmesi işlemine “Transkripsiyon (okuma)” adı verilmektedir. Transkripsiyon işleminde ikili sarmal yapıdaki DNA'nın zincirlerinden birinin gen dizisine eş (komplementer, tamamlayıcı) olan bir mRNA molekülü sentezlenir. mRNA'nın yapısındaki her bir üçlü kodon (genetik şifre); translasyon sırasında doğru amino asitin polipeptid zincire takılmasını sağlayan ilgili tRNA'nın antikodon bölgesine tamamlayıcıdır (40, 58).

Hücre içinde bilgi akışının yani protein sentezinin ilk basamağı transkripsiyondur. Bu nedenle son derece önemli bir hücresel süreçtir. Transkripsiyon süreci bütün hücrelerde aynı temel mekanizmalarla ilerlemesine karşın; ökaryotik hücrelerde prokaryotik hücrelere göre daha karmaşıktır (58, 93).

Ökaryotik transkripsiyon çekirdekte olur ve üç ayrı RNA polimeraz enzimi tarafından yönlendirilir. Ökaryotlarda tüm mRNA'ların transkripsiyonundan sorumlu olan enzim RNA polimeraz II'dir. Transkripsiyonun başlaması ve regülasyonu için son derece özgül DNA bölgelerinin RNA polimeraz tarafından tanınması ve çeşitli protein yapılı faktörler ve DNA üzerindeki bir dizi kontrol elementleri ile ilişkilerin kurulması gerekmektedir. Sentezlenen ilk RNA molekülü çeşitli işlemlerden geçtikten sonra olgun mRNA'ya dönüşür ve translasyonu başlatması için sitoplazmaya geçmesi gerekir (40, 51, 52).

Promotorlar; RNA polimeraz'ın bağlanması için tanınma noktası olarak görev yapan nükleotit dizileri içerirler. Bu diziler transkripsiyonun başladığı

noktadan itibaren yukarı doğru belirli bir alanda yer alırlar. Promotorlar kontrol ettikleri genlerin hemen başında yer alırlar ve genin bir parçasıymış gibi düşünülürler. Genellikle yüzlerce nükleotit uzunluğundadırlar. Genlerin çoğunun promotor bölgesi çok sayıda element içerir. RNA polimeraz II'nin bağlanacağı promotorun kendisi “ TATA kutusu” olarak adlandırılır (52).

Etki arttırıcılar (enhancer); promotorun aktivitesini arttıran genin aşağısı, yukarısı veya içinde bulunup transkripsiyonu kontrol eden elementlerdir.

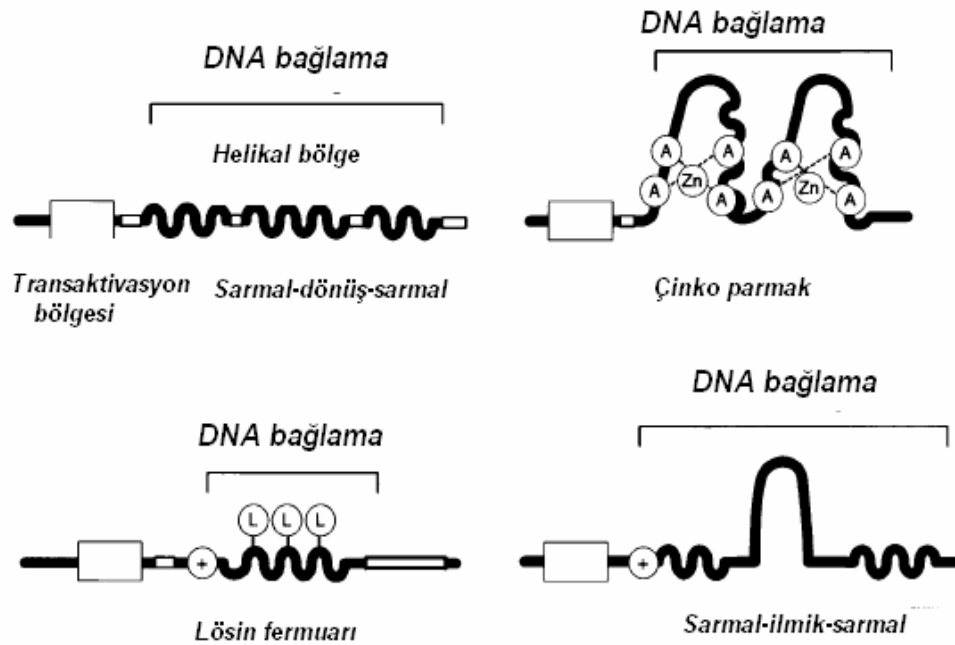
Ökaryotik promotorlar; transkripsiyonu başlatmak için gerekli olan çok sayıdaki protein faktörlerin bağlanma bölgeleridir. Bu protein faktörlere “Transkripsiyon Faktörleri” adı verilir. Bu faktörler, bütün polimeraz II promotorlarına bağlanıp temel transkripsiyon mekanizmasının bir bölümünü oluşturan genel transkripsiyon faktörleri ve özel genlerin ekspresyonunu denetleyen DNA dizilerine bağlanan gene özgü transkripsiyon faktörleri olmak üzere iki şekilde bulunabilirler (40, 94).

Transkripsiyon faktörlerinin en az iki işlevsel bölgesi (domain) bulunmaktadır (51, 97):

- *DNA bağlanma bölgesi (DNA binding domain):* Etki arttırıcıda bulunan özgül DNA dizilerine bağlanır.
- *Karşı-aktivasyon bölgesi (Trans-activating domain):* Protein-protein etkileşimi ile transkripsiyonu aktive eder. RNA polimeraz'a ya da promotordaki diğer transkripsiyon faktörlerine bağlanır.

Transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanma bölgeleri yapısal olarak farklılıklar içermektedir. Bu yapısal motifler aşağıda ve Şekil 4'de belirtildiği gibidir (58):

- Çinko parmak bölgeleri (zinc finger): Çinko iyonuna bağlı α ve β polipeptid zincirlerinden oluşur. Parmak şeklindeki yapının ucu DNA'nın büyük veya küçük oluşuna bağlanır.
- Sarmal-dönüş-sarmal bölgeleri (helix-turn-helix): İki α -heliks polipeptid alt birimden meydana gelir ve yapısı saç tokasına benzemektedir.
- Lösin Fermuar bölgeleri (leucine zipper): İki farklı polipeptit zincir içerir. Bazik yapıdaki lösin amino asitleri dimerleşmeden sorumludur. Fos ve jun gibi onkogenlerin DNA'ya bağlanmaları ve aralarında dimer oluşturarak Aktivatör Protein-1 (AP-1)'i meydana getirmeleri lösin fermuar bölgeleri aracılığıyla olmaktadır.
- Sarmal-ilmik-sarmal bölgeri (helix-loop-helix): Dimerleşme bölgelerinden her birinin bir ilmik ile ayrılmış iki helikal bölgeden oluşması dışında lösin fermuarlara benzerler.



Şekil 4. DNA bağlanma bölgesinin yapısal motifleri (58)

Özgül transkripsiyon faktörlerinin etki arttırıcılara bağlanması, gelişim ve farklılaşma süreçlerinde olduğu gibi hücrelerin hormonlar ve büyüme faktörleri gibi çeşitli uyarılara yanıtı sırasında da ekspresyonun kontrolünden sorumludur (41, 89).

Kromatin yapısını değiştirerek diğer faktörlerin bağlanmasını sağlayan karşı baskılayıcı faktörler (antirepresör) de bulunmaktadır. Transkripsiyonun regülasyonu aktivatörlerle olduğu kadar özgül DNA dizilerine bağlanarak transkripsiyonu önleyen baskılayıcılar (represörler) tarafından da sağlanmaktadır (52, 80).

1.2.1. Transkripsiyon Faktörlerinin Santral Sinir Sistemindeki Fonksiyonları

Nöronların aktivasyonu iki farklı mekanizmanın işleyişiyle iletilen uyarının yayılmasını sağlamaktadır. Bunlardan birisi elektrofizyolojik aktivite olup; hızlı bir şekilde ilerler ve uyarın hakkındaki bilginin iletilmesinden sorumludur. Diğer ikincil habercilerin sinyal yollarının aktivasyonu olup bazı genlerin transkripsiyonunu ve/veya baskılanmasını sağlayan transkripsiyon faktörlerinin üretimini içermekte ve daha sonra gelecek uyarılara nöronların vereceği yanıtları etkilemektedir (94).

Son yıllarda yapılan çalışmalar transkripsiyon faktörlerinin; santral sinir sisteminin gelişiminde ve fonksiyonunda çok önemli bir rol oynamasının yanı sıra çeşitli uyarınlar ve patolojik durumlara karşı adaptif yanıtların geliştirilmesinde de kritik bir rol oynadıklarını göstermektedir. Transkripsiyon faktörlerinin indüksiyonu ve fonksiyonlarının araştırılması sadece gen

ekspresyonunun santral sinir sisteminde nasıl uzun süreli bir etki yarattığını anlamak açısından değil uyarıyı takiben gelişen ikincil haberci sistemleri hakkında bilgi sahibi olmak açısından da önemlidir (1, 93, 99, 107).

Genlerin ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonu; ortam koşulları, hücre çekirdeğinin genel aktivitesi, DNA bağlanma bölgelerinin durumu ve konumu gibi bir dizi faktörden etkilenmektedir (89). Bazı transkripsiyon faktörleri diğer transkripsiyon faktörleri ile lösün fermuarı aracılığıyla birleşerek DNA'ya bağlanmakta (51) ve etkilerini bu şekilde göstermektedir. Transkripsiyon faktörü bir DNA bölgesine bağlandığı zaman ya gen ekspresyonunu başlatmakta ya da düzenleyici DNA bölgesini kapatarak ekspresyonu önlemektedir (80).

1.2.2. Akut Faz Genleri (Immediate Early Genes)

Durgun haldeki 3T3 fibroblastları serum ile stimüle edildikleri zaman hızlı bir şekilde büyür ve mitoz başlar. Bu hücre sel cevap çok sayıdaki genin hızlı bir şekilde indüksiyonuna bağlıdır (52, 55). Serum uygulamasından 30 dakika sonra fibroblastlarda 100'den fazla genin ekspresyonunun indüklendiği ve *c-fos* gibi bazı genlerin mRNA'larının ilk 5-10 dakika içinde dahi saptanabildiği gösterilmiştir. Bu genlerin hızlı indüksiyonu *de novo* protein sentezi olmaksızın ekspresyonlarının gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, "*akut faz/erken cevap veya primer cevap genleri*" (*immediate early genes-IEGs*) olarak isimlendirilmektedirler. IEG'ler fonksiyonel açıdan farklı birçok genomik ürünü kodlarlar. Sitokinler, kemoatraktanlar, sitoplazmik enzimler, liganda bağlı transkripsiyon faktörleri

ve indüklenebilir transkripsiyon faktörleri bu gen ürünlerine örnek olarak verilebilir (40, 94).

Transkripsiyon faktörlerinin genel ve indüklenebilir olmak üzere iki tipi mevcuttur. Genel (yapısal, sürekli) transkripsiyon faktörleri RNA polimeraz II ile birleşip transkripsiyonun başladığı TATA kutusuna bağlanır ve indüklenebilir transkripsiyon faktörlerinin bağlanabilmesi için bir köprü görevi görürler (40).

Hücrel bir stimülasyon sonucu gerçekleşen IEG ekspresyonunun indüksiyonu veya inhibisyonu; hücrede önceden var olan transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Stimüle edilmemiş hücrelerde bulunan ve hiçbir dış uyarı olmadan da DNA'daki düzenleyici bölgelere bağlanan bu proteinlere "genel (sürekli, yapısal) transkripsiyon faktörleri" adı verilmektedir.

İndüklenebilir transkripsiyon faktörleri sınıfından olan IEG ürünleri aşağıda belirtilen *Jun*, *Fos* ve *Krox* gibi gen ailelerinden oluşmaktadır (41, 52, 75, 94):

- *Jun*: *c-Jun*, *JunB*, *JunD*,
- *Fos*: *c-Fos*, *FosB*, *Fra-1* (*fos* ile ilgili antijen 1), *Fra-2* (*fos* ile ilgili antijen 2),
- *Krox*: *Krox20*, *Krox24*.

1.2.3. *Fos* Geni ve *Fos* Proteinleri

Viral "*fos*" geni ilk kez 1982 yılında Finkel-Biskis-Jenkins murin osteojenik sarkoma virüsünün (FBJ_MSV) onkogeni olarak izole edilmiştir

(25). Daha sonrasında bu onkogenin hücrel ürününü olan “*c-fos*” tanımlamıştır (24). Bu tanımlama çerçevesinde 1984 yılında DNA’ya bağlanma ve gen aktivasyonu özellikleri gösteren nükleer proteinler şeklinde karakterize edilmişlerdir. *c-fos* , *c-jun* ve aktivatör protein-1 (AP-1) arasındaki ilişki daha sonra tanımlanmıştır. 1987 yılında ise sıçan cDNA klonundan elde edilen *c-fos*’un fare ve insaninkiyile büyük oranda homoloji gösterdiği bulunmuştur (22).

Fos geni ile ilgili diğer proteinler şunlardır (33, 40, 75, 94):

- **FosB:** 334 amino asit içerir.
- **FosB kısa formu:** 234 amino asitten oluşmaktadır.
- **Fra-1(fos ile ilgili antijen-1):** 275 amino asit içerir.
- **Fra-2 (fos ile ilgili antijen-2):** 326 amino asit içerir.

Fos proteinleri *jun* proteinleri ile heterodimerleşerek transkripsiyon faktör kompleksi olan Aktivatör Protein-1 (AP-1)’i meydana getirirler. Bu heterodimerleşme lösün fermuar bölgeleri aracılığıyla meydana gelmektedir. Bununla birlikte *jun* proteinleri kendi aralarında homodimerler oluştururken, *fos* proteinleri ve ATF proteinleri ile de heterodimerler oluşturabilmektedir (22, 24).

AP-1; hedef gende DNA üzerindeki AP-1 bağlanma bölgesine bağlanarak etkisini göstermektedir. DNA’ya bağlanmada etkili olan lösün fermuarı bölgelerinin yanı sıra bazik sistein rezidülerinden kaynaklanan redoks mekanizmaları da giderek önem kazanan bir konudur (49, 51). Süperoksit ve hidrojen peroksit kaynaklı oksdatif strese bağlı olarak *c-fos* ve *c-jun* ekspresyonunun indüksiyonu AP-1 bağlanma bölgesi vasıtasıyla olmaktadır. Benzer şekilde fenolik ve tiyol antioksidanlar AP-1 aktivasyonunu

hücrel redoks potansiyeline bağı olarak arttırmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalara göre, hücrel tiyoredoksin ve glutasyon içeriğı AP-1'in aktivasyonunu etkilemektedir (4, 42, 49).

AP-1 transkripsiyon kompleksi çoğalma, farklılaşma, apoptozis ve onkojenik transformasyon gibi çeşitli süreçlerde etkili genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. AP-1'in hedef genlerine örnek olarak enkefalin, somatostatin, tirozin hidroksilaz ve kollajenaz genleri verilebilir (88).

Kanser, nörodejeneratif hastalıklar, ateroskleroz ve diyabet gibi olguların patojenezinde temel bir rol oynayan oksidatif strese karşı AP-1, *c-fos* ve *c-jun* gibi hücrel redoks potansiyeline bağı olarak ekspresyonu değışen genlerin ve ilişkili mekanizmaların araştırılması bunlara yönelik tedavi stratejilerinin gelişimine katkı sağlayabilir.

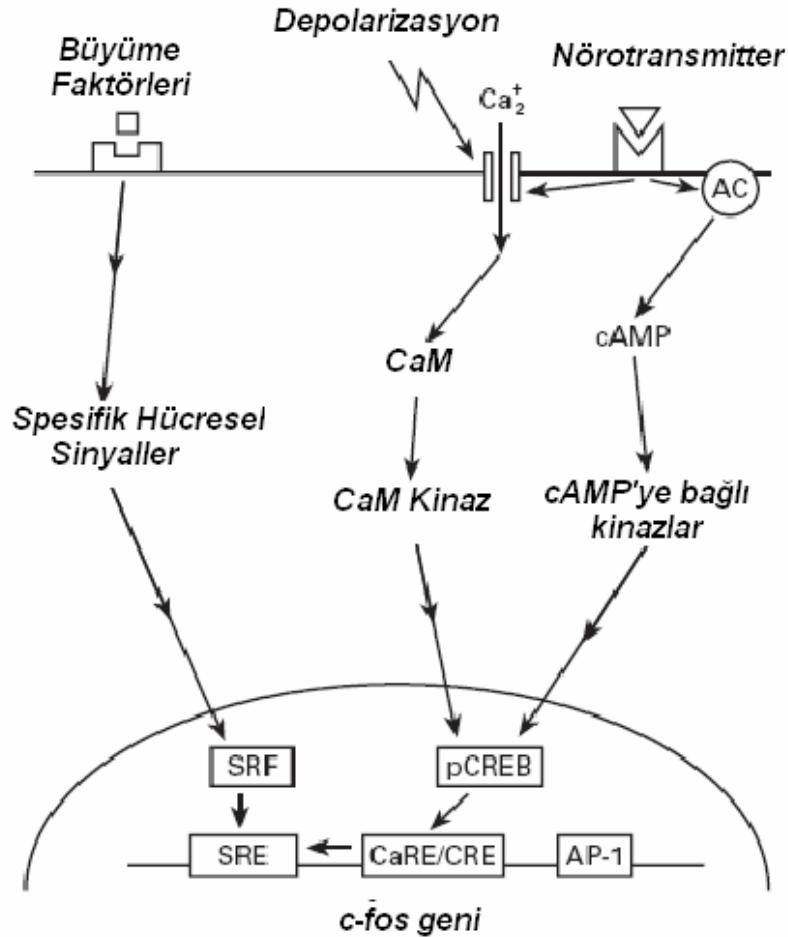
1.2.4. *c-fos* Ekspresyonunun İndüksiyonu

Ekstraselüler bir uyarıya karşı indüklenen *c-fos* ekspresyonu hücrelerde sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyonun regülasyonu ile ilgili süreçlerde önemli roller üstlenmektedir. *c-fos* geninin transkripsiyonu, hücreleri etkileyerek büyüme ve farklılaşmayı sağlayan çok sayıda etken tarafından hızla ve geçici olarak sağlanır (Şekil 5). *c-fos* geni çekirdeksel bir transkripsiyon faktörü olup hücre çoğalması ve farklılaşması sırasında gen ekspresyonunun aşamalı olarak düzenlenmesinde görevlidir (83).

Nöronların nörotransmitter ve nörotrofik faktörlerle stimülasyonu sonucu indüklenen *c-fos* ve diğere akut faz genlerinin ekspresyonu nöronal hücre yaşamı, farklılaşması ve olgun hücrelerin adaptif yanıtlarının gelişiminde kritik

rol oynar. Nöronal hücrelerde transsinaptik stimülasyon ve elektriksel membran aktivitesinin düzenlenmesinden sorumlu olan *c-fos* nöroplastisitenin de belirleyicisidir. Nöroplastisite çeşitli çevresel uyaranlara bağlı olarak beyindeki nöronların ve bu nöronların oluşturduğu sinapsların yapısal özellikleri ve işlevlerindeki değişikliklerdir (1, 103).

Biyolojik karakteristikleri nedeni ile *c-fos* ve diğer IEG'ler bir stimülasyona karşı oluşan nöronal aktivasyonun belirteci olarak *in vitro* ve *in vivo* bir çok çalışmada kullanılmıştır (88).



Şekil 5. *c-fos* geninin ekspresyonunun indüksiyonu (AC, adenilat siklaz; CaM, kalsiyum kalmodulin; CaM kinaz, kalsiyum kalmodulin kinaz; SRF, serum yanıt faktörü; SRE, serum yanıt elementi; CRE, cAMP/Ca²⁺ yanıt elementi; CREB, CRE bağlanma proteini; AP-1, aktivatör protein-1).

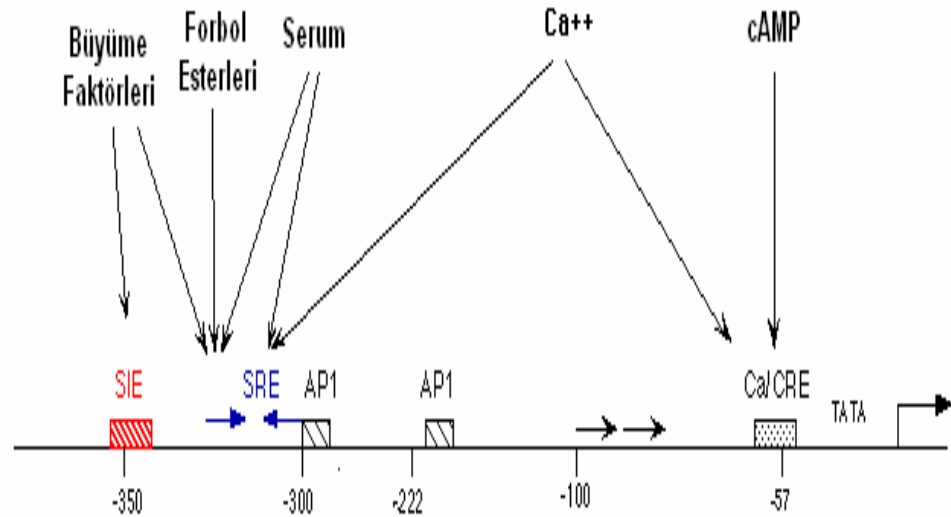
c-fos transkripsiyonu çok çeşitli mitojenler ve farklılaşmayı uyaran maddeler tarafından uyarılabilir. Nörotransmitterler (asetil kolin), hormonlar (insülin, glukokortikoidler) ve büyüme faktörlerinin (EGF-Epidermal büyüme faktörü, NGF-Sinir büyüme faktörü, PDGF-Platelet kaynaklı büyüme faktörü) de dahil olduğu ikincil haberci mekanizmalarının yanı sıra Ras ve mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAP kinaz) yolları ekspresyonun düzenlenmesinde önemli görevler üstlenir (40, 88).

Fos geninin ekspresyonunun indüksiyonundan sorumlu bazı DNA elementleri Şekil 6'da gösterilmiştir (40, 41):

Serum yanıt elementi (SRE-serum respond element): *c-fos*'un forbol esterleri, büyüme faktörleri (EGF, PDGF), insülin ve UV aracılı indüksiyonundan sorumludur. Bu indüksiyon protein kinaz C (PKC)'ye bağımlı veya bağımsız olarak gerçekleşebilir. Ayrıca stimüle olmamış hücrelerde bazal *c-fos* ekspresyonunda ve *c-fos*'un transkripsiyonel olarak baskılanmasında da önemli rol oynar.

c-Sis indüklenebilir element (SIE-*c-Sis* inducible element): PDGF ve EGF gibi büyüme faktörleri tarafından aktive olmaktadır.

cAMP/Ca⁺² yanıt elementi (CRE- cAMP/Ca⁺² response element): *c-jun:c-fos* dimerleri ve CREB (CRE-bağlanma proteini) için bağlanma alanı oluştururken, PC12 hücrelerinde NGF aracılı ekspresyonun indüksiyonunda önemli rol üstlenmektedir. cAMP/Ca⁺² yanıt elementi'nin en önemli özelliği Ca⁺² konsantrasyonunun değişimine bağlı olarak etki göstermesidir.



Şekil 6. *c-fos* geninin DNA elementleri

Ekstraselüler stimülasyon reseptör aracılı bir mekanizma ile ikincil habercilerin aktivasyonuna ve hücre içine kalsiyum girişine neden olur. Sonuç olarak protein kinaz A, protein kinaz C ve MAP kinaz gibi kinazlar aktive olur (59). Bu kinazlar da CREB gibi regülatör elementleri fosforile ederek *c-fos* ekspresyonunun indüklenmesine yol açar (39, 88).

Büyüme faktörlerinin *c-fos*'u aktive etmesi ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK-kinaz) ve MAP-kinaz vasıtasıyla olmaktadır (40, 59).

1.2.5. *c-fos* Ekspresyonu ve Eksitotoksisite ile İlişkisi

Glutamat ve diğer eksitator amino asitlerin (EAA) çeşitli nöropatolojilerdeki rolü son yıllarda giderek önem kazanan bir konudur. EAA reseptörlerinin aşırı stimülasyonunu takiben gelişen intraselüler Ca^{+2} düzeylerindeki artış geri dönüşümsüz nöronal hasara neden olan hücre içi mekanizmaları tetiklemektedir. Hücre içi proteaz, lipaz ve endonükleazların

aktivasyonunun yanı sıra aşırı ROT üretimi ve diffüze olabilen gazların sentezi eksitotoksik hasarın gelişim mekanizmalarındandır (69).

Santral sinir sisteminde EAA reseptörlerinin aktivasyonu normalde öğrenme, hafıza ve nöroplastisite ile ilgili süreçlerde fonksiyon göstermektedir (1).

IEG ailesinin bir üyesi olan *c-fos* nöronal plastisitenin sağlanması ve hafızanın oluşumunda düzenleyici rol oynamaktadır. *c-fos* gen ürünlerinden nükleer fos proteini; çeşitli hücre tiplerinde differansiyasyon ve proliferasyonun düzenlenmesinden sorumlu olan AP-1 transkripsiyon kompleksinin yapısında yer almaktadır (81).

Eksitotoksik kaskadın ilerlemesinin atında yatan diğer bir mekanizma da IEG ailesinin aşırı transkripsiyonudur. Bu genler; hücre aktivasyonu ve yaşamının devamı için gerekli önemli bazı genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (93).

KA sıçanlarda sistemik uygulamada (5-9 mg/kg) temporal lob epilepsisine benzer limbik ve jeneralize tutulumlara neden olmakta ve bu özelliği nedeniyle de nörodejeneratif bir deney modeli olarak kullanılmaktadır. KA'in neden olduğu nörodejenerasyon beyinde hipokampus, korteks ve amigdala gibi bölümlerinde saatler ve bazen günlerce sürebilen geri dönüşümsüz bir nöronal hücre hasarı ve ölümüne yol açmaktadır (76). Nörodejenarasyonun gelişiminde rol oynayan EAA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu nöronlarda hem nekrotik hem apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. KA uygulaması ile birlikte Ca^{+2} 'a bağımlı enzimlerin özellikle de endonükleazların aktivasyonu ile apoptozisin bir belirteci olan DNA fragmentasyonu gelişmektedir. KA'in apoptozis gelişimindeki rolü tam olarak

açıklığa kavuşturulmamış olmasına rağmen nörodejenerasyonun geliştiği ve DNA fragmentasyonunun gözlemlendiği beyin bölgelerinde *c-fos* mRNA düzeylerinde ve AP-1 aktivasyonunda bir artış saptanmıştır (36). *c-fos* düzeylerindeki bu artış epileptik tutulumları takiben nöronlardaki apoptozisin ve eksitotoksik hasarın erken bir belirteci olarak kullanılabilir.

KA kaynaklı eksitotoksik hasarın gelişimi ile *c-fos* düzeylerindeki artış; bazı hücre içi yolların aktivasyonu ve *c-fos* transkripsiyonunu düzenleyen bazı DNA elementelerinin indüksiyonu ile gerçekleşmektedir. MAPK kaskatlarının [ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz, c-Jun N- terminal kinaz (JNK)] aktivasyonu; CRE indüksiyonu ile *c-fos* transkripsiyonunda artışa neden olur. Ayrıca hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin artışı CaM-K (kalsiyum kalmodulin kinaz) aktivasyonu yoluyla ERK ve CRE fosforilasyonuna neden olmaktadır. Proliferatif durumlarda artış gösteren ERK ile strese bağlı olarak artan JNK nöroplastisite ve glutamat kaynaklı eksitotoksisitede önemli rol oynamaktadır (41, 103, 105).

In vivo olarak eksitotoksik lezyon gelişiminde *c-fos* mRNA düzeylerinin artış gösterdiği pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (93). Benzer şekilde artış *in vitro* olarak da gösterilmiş olup hızlı bir biçimde gerçekleşmekte (15-45 dakika içinde) ve belli bir süre sonra da *c-fos* mRNA düzeyleri bazal seviyeye dönmektedir. Eğer eksitotoksik ajan uygulaması uzun süreli ise *c-fos* düzeylerindeki artış devam etmektedir (4-24 saat). Kronik uygulamalarda bu artış 3 ila 10 gün sonra dahi saptanabilmektedir (37).

Membran hasarının tespiti ile nekrotik hücre ölümünün saptandığı laktat dehidrogenaz (LDH) testi ve mitokondriyal disfonksiyonun tespiti vasıtasıyla

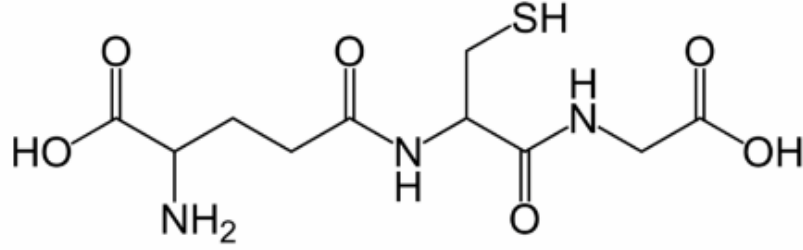
hücre ölümünün erken bir belirleyicisi olan dimetiltiyazol difeniltetrazolyum (MTT) testi eksitotoksik stimülasyon sonucu gelişen nörotoksik hasarın belirlenmesinde sıklıkla başvurulan yöntemlerdir. Rogers ve diğerlerinin yaptığı çalışmada *in vitro* *c-fos* düzeylerinin belli zaman aralıklarında ölçümüne dayanan yeni bir yöntemin, LDH ve MTT testlerine oranla eksitotoksitenin daha spesifik bir belirteci olduğu gösterilmiştir (79).

c-fos düzeylerindeki zamana bağlı olarak gerçekleşen relatif artışın saptanmasına yönelik *in vitro* testler; çeşitli kimyasalların eksitotoksik özelliklerinin olup olmadığının tespit edilmesinde, nöropatolojik hastalıkların tedavilerinde kullanılan EAA antagonist ilaçların klinik araştırmalarında ve nörodejeneratif durumlarda uygulanabilecek antioksidan tedavi stratejilerinin etkinliğinin belirlenmesinde kullanılabilir (37).

1.3. Glutasyon (GSH) ve Hücrel Redoks Potansiyelinin Sağlanmasındaki Rolü

Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun bir çok hastalığın patojenezinde rol aldığını göstermektedir (5, 29, 66).

Suda çözünebilen bir tripeptid olan glutasyon (γ -L-glutamil-L-sisteinilglisin) memeli hücrelerinde en fazla bulunan tiyol bileşiğidir (Şekil 7). Glutasyon; hücrelerde indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur. Glutasyon konsantrasyonu; sitozolde 1-11 mM , çekirdekte 3-15 mM ve mitokondride 5-11 mM civarında olup biyosentezi sitozolde gerçekleşmektedir (67).

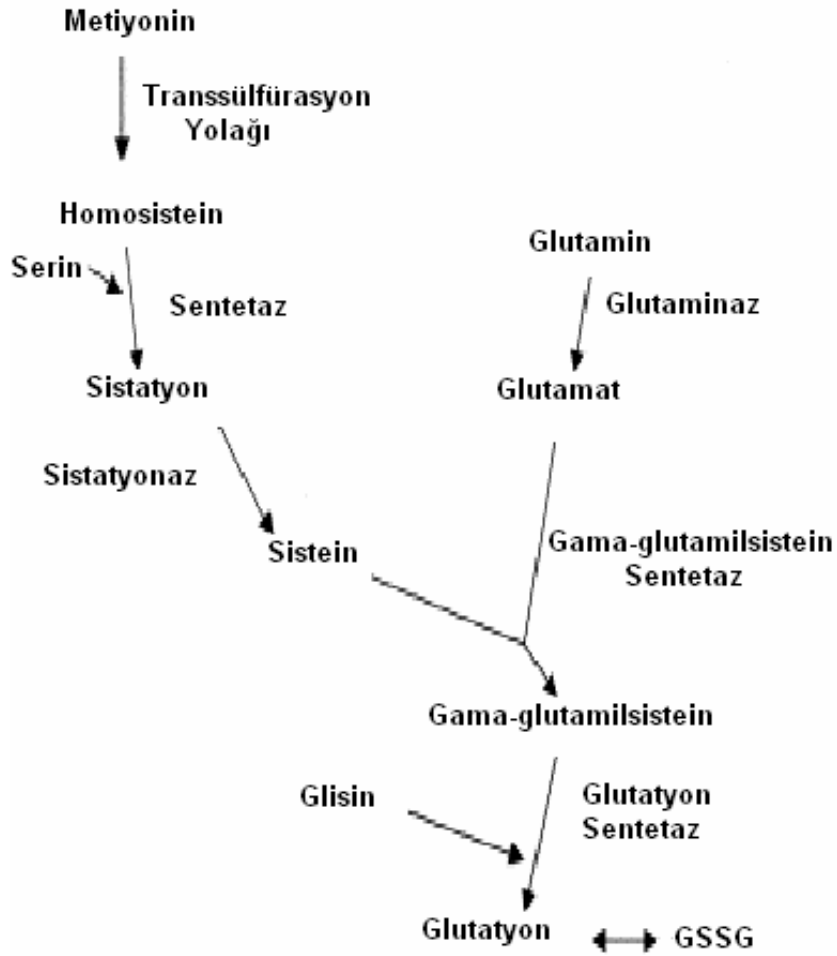


Şekil 7. Glutatyonun kimyasal yapısı

De novo GSH sentezi tüm hücre tiplerinde gerekli amino asitlerin varlığında “ γ -glutamil sistein sentetaz (GCS)” ve “glutatyon sentetaz” enzimleri tarafından sağlanır. γ -glutamilsistein sentetaz glutamat ve sistein amino asitlerini birleştirerek bir dipeptit olan γ -glutamilsisteini oluşturur. Glutatyon sentetaz da γ -glutamilsistein ile glisini birleştirerek glutatyon oluşumunu sağlamaktadır. Her iki enzimin de çalışabilmesi için ATP’ye ihtiyaç vardır. GSH sentezinde hız sınırlayıcı basamak γ -glutamilsistein sentetazdır ve GSH’un kendisi tarafından geri-besleme (feed-back) mekanizmasıyla inhibe olmaktadır (Şekil 8) (77, 85).

GSH sentezi GSSG redüktaz aracılı bir rejenerasyon basamağını da içermektedir. Bir flavoenzim olan GSSG redüktaz; NADPH’tan aldığı elektronları GSSG’ye taşıyarak GSH oluşumunu katalizler (109).

Glutatyon-S-transferaz enzimi ile GSH-S konjugatlarının oluşturulması, Glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi tarafından GSH’tan GSSG oluşumu ve hücre dışına GSH salınımı; hücre içi GSH düzeylerini düşüren olaylardır. GSH; yapısında bulunan sistein amino asidinin tiyol ($-SH$) grubu nedeniyle kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçemez (26).



Şekil 8. Glutatyon Biyosentezi (2).

GSH'un bir antioksidan olarak en önemli görevi serbest radikal temizleyicisi olması ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynamasıdır. GSH; oksidatif strese karşı etkili olan birçok antioksidan enzimin (GPx gibi) koenzimidir. Ayrıca hidroksil ve süperoksit radikalini direkt olarak temizlerken, hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyonu üzerinde de GPx'in katalitik aktivasyonu yoluyla etkilidir. GSH; E vitamini ve C vitamini gibi önemli antioksidanların rejenere olup aktif formlarına dönmesinden de sorumludur (84, 91). GSH'un diğer görevleri arasında proteinlerin tiyol gruplarının indirgenmesi, hücrel tiyol redoks potansiyelinin sağlanması,

çeşitli izomerizasyon reaksiyonlarında koenzim olması ve sistein amino asidinin transportu ve depolanması sayılabilir (102, 109).

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar GSH'un DNA metabolizması, protein sentezi, çeşitli enzimlerin aktivasyonu ve immun fonksiyonun sağlanması, sinyal transdüksiyonu, gen ekspresyonunun regülasyonu ve apoptozis gibi süreçlerde de önemli roller üstlendiğini göstermektedir (46, 86, 87).

1.3.1. Glutatyon ve Redoks Potansiyeli

Her hücrenin belirli bir elektron içeriği ve buna bağlı olarak da hücresel fonksiyonlarını sürdürebilmesi için belirli bir redoks potansiyeli vardır. Hücresel redoks potansiyeli veya redoks dengesi GSH ve tiyoredoksin (TRX) tarafından sağlanmaktadır (tamponlanmaktadır) (4). "GSH/GSSG" oranı hücresel redoks dengesinin bir indikatörüdür (47).

Oksidatif strese bağlı koşullarda GSSG oranı yükselir. GSSG oranındaki artış tiyol grubu içeren protein yapılı reseptörler, protein kinazlar ve transkripsiyon faktörlerinin disülfid gruplarındaki artışlar ile birlikte hücre içi sinyalizasyonda değişikliklere neden olmaktadır.

GSH ve TRX'in indirgenmiş formlarının oluşması GSH redüktaz ve TRX redüktaz enzimleri tarafından sağlanmaktadır (13). Tüm bu redoks sistemi antioksidan savunmada rol üstlenirken hücre içi sinyalizasyon yollarını da etkilemektedir (71, 73). GSH çekirdekte önemli bazı proteinlerin sülfidril gruplarının redüksiyonunu sağlayarak DNA tamir mekanizmaları ve gen ekspresyonunda rol oynamaktadır. Hücre içi redoks

potansiyelinin değişimine bağlı olarak ekspresyonu etkilenen genlere DNA tamir enzimi olan Ref-1, detoksifikasyonda görevli bir dizi enzim , sitokinler, transkripsiyon faktörleri (AP-1), viral proteinler ve bazı büyüme faktörleri örnek verilebilir (42, 46, 87).

1.3.2. Glutasyon ve Beyin Dokusu

Tüm aerobik organizmalar mitokondriyal solunum sırasında ROT'ne maruz kalırlar. Alınan oksijenin yaklaşık %2'lik bir kısmı ROT'ne çevrilmektedir. Vücutta diğer dokularla karşılaştırıldığında oksidatif strese karşı en hassas doku beyindir (32). Bunun nedenleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- a) En fazla oksijen ve glukoz tüketilen organ olması (28, 92),
- b) Yüksek konsantrasyonda demir (Fe^{+2}) ve askorbat içermesi ve herhangi bir hasar durumunda Fe/askorbat karışımının potansiyel bir prooksidan rol oynaması (34),
- c) Lipid peroksidasyonuna yatkın doymamış yağ asitlerini yüksek oranda içermesi (72),
- d) Antioksidan savunma kapasitesindeki yetersizlik (CAT, SOD ve GPx gibi enzimleri düşük düzeyde içermesi) (43).

Nörolojik hastalıkların patolojisinde rol oynayan oksidatif strese karşı beyin dokusunun antioksidan savunma sisteminin geliştirilmesi giderek önem kazanan bir konudur. Beyinde mitokondriyal solunum sonucunda üretilen H_2O_2 'in detoksifikasyonunda en etkili antioksidan savunma sistemi glutasyon peroksidaz ve glutasyon tarafından oluşturulmaktadır (16).

GSH beyin dokusunda milimolar konsantrasyonlarda (1-3 mM) bulunmaktadır. GSH homeostazisinin sağlanması; biyosentez için gerekli amino asitlerin kan-beyin engelini geçebilmesine bağlıdır (109). Glutatyonun beyin dokusundaki sentezi diğer dokularda olduğu gibi γ -glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimleriyle yapılmaktadır. Fakat bu enzimlerin beyindeki aktiviteleri karaciğer ve böbrekteki aktivitelerine göre daha düşüktür (85). Bunun yanı sıra GSH biyosentez prekürsörü olan γ -glutamilsistein ve sistein sentez prekürsörleri kullanılarak beyin GSH düzeyleri arttırılabilir (12, 27).

Nöronlar ve glial hücrelerde GSH düzeylerinin saptanması için çeşitli çalışmalar yapılmış, bu çalışmalar ile astrositlerin GSH içeriğinin nöronlara oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Beyin hücrelerinden az miktarda da olsa GSH salınımının olduğu gösterilmiş ve bu nedenle GSH'un antioksidan fonksiyonunun yanı sıra lökotrien ve glutamat detoksifikasyonunda bir nörotransmitter veya bir nörohormon gibi fonksiyon gösteriyor olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (10, 46).

Yaşlanmaya bağlı olarak görülen GPx ve GSH düzeylerindeki azalma nörodejeneratif hastalıklara yakalanma riskini arttırmaktadır. Oksidatif strese karşı hassas olan beyin antioksidan sistem kapasitesinin azalması nörodejeneratif süreçlerin hızlanmasına neden olmaktadır. Ayrıca Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında beyin GSH düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır (12, 90, 95).

1.3.3. Beyinde Glutasyon Düzeylerinin Değişimi ve Nörodejenerasyon İle İlişkisi

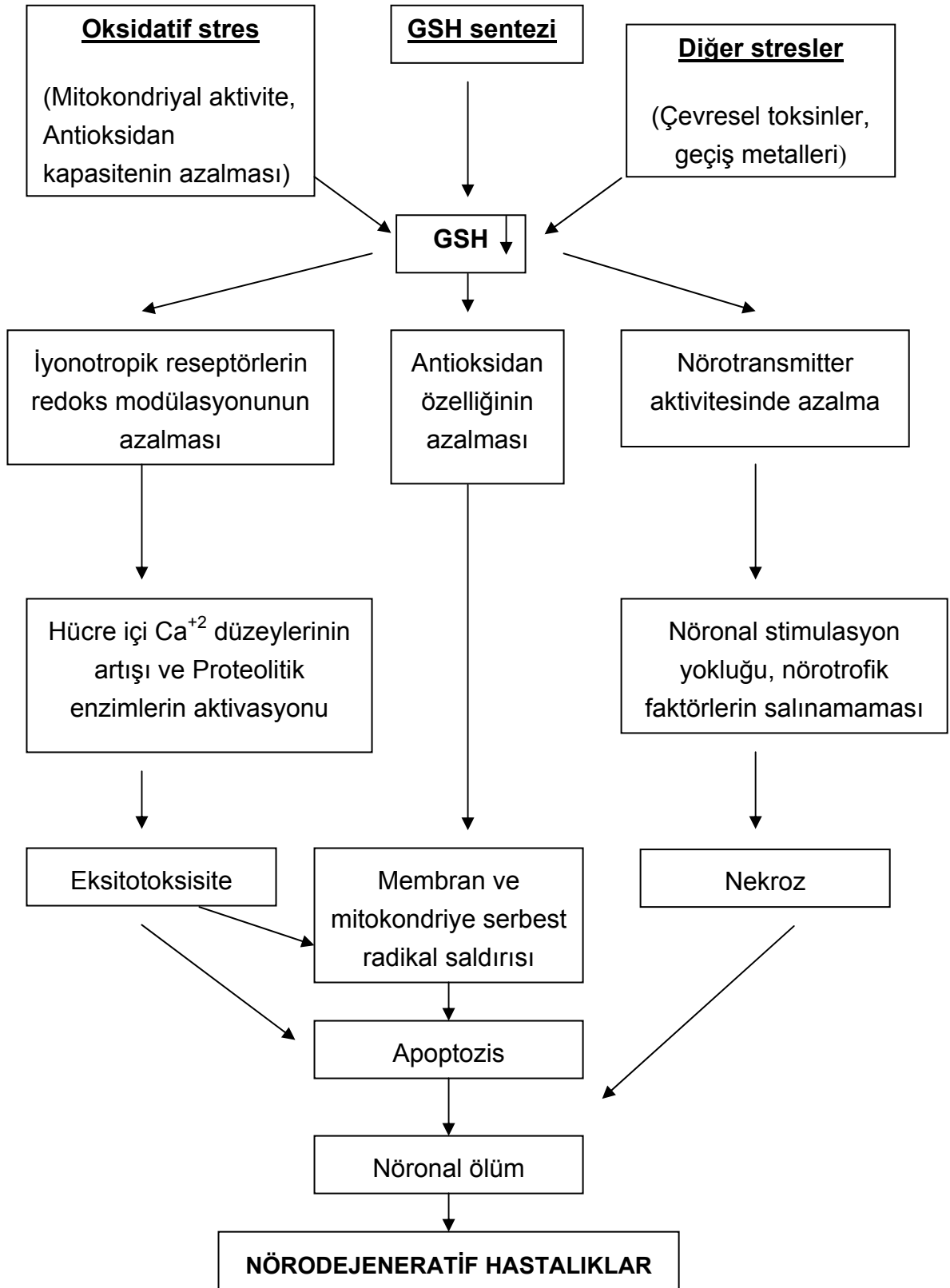
Oksidatif strese bağlı olarak gelişen nörodejeneratif patolojilerin altında yatan mekanizmalar tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bunun yanı sıra gen ekspresyonunun, glutaminerjik eksitotoksik hasarın, nörotrofik faktörler ve nitrik oksit aracılı enflamatuvar süreçlerin etkili olduğu yapılan çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Bir çok biyokimyasal mekanizmanın iç içe olması konunun karmaşıklığının kavranması açısından önemlidir (61, 84).

Serbest radikaller ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması başta yaşlanma olmak üzere Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi bir çok nörodejeneratif bozukluğun oluşmasında önemli rol oynamaktadır (28, 100). Parkinson, ortabeyinde substantia nigrada dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterize bir hastalıktır. Hücreler arası haberleşmede kullanılan dopaminin kaybıyla ortaya çıkan durum Parkinson hastalığının semptomlarının altında yatan mekanizmayı oluşturmaktadır. Dopaminerjik nöron kaybına oksidatif stresin neden olduğu bir çok çalışmayla gösterilmiştir. Diğer önemli bir bulgu da substantia nigrada erken safhalarda dahi saptanabilen GSH kaybıdır. Dopaminerjik hücre kültürü ile yapılan çalışmalarla GSH kaybının mitokondriyal Kompleks-I (NADH ubikinon redüktaz) aktivitesinde azalmayla birlikte mitokondriyal fonksiyonda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (68). Ayrıca Parkinson hastalarının beyin GSH içeriği kontrol grubuyla karşılaştırıldığında % 40-50 oranında daha düşük bulunmuştur. Mitokondriyal

disfonksiyon varlığı Alzheimer hastalığı ve bazı motor nöron hastalıklarında çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (92, 95).

Nörolojik hastalıkların patogeneğinde mitokondrinin önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (16). Nöronların korunması için özellikle mitokondriyal GSH konsantrasyonu önemlidir. Bu nedenle azalmış GSH konsantrasyonu ve düşük ATP üretiminin oksidatif strese ve nöronal kayba neden olduğu düşünülmektedir (101).

GSH yokluğuna bağlı olarak oluşan nörodejeneratif hastalıkların olası mekanizmaları Şekil 9'da gösterilmiştir (5).



Şekil 9. GSH düzeylerinin değişimi ve nörodejeneratif hastalıkların alt yapısını oluşturan olası mekanizmalar (5).

1.4. γ -Glutamilsistein Etil Esteri (GCEE)

Beyin GSH düzeylerinin artırılması reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif strese karşı stratejik bir savunma yöntemidir. Bu artış hücresele GSH havuzunun genişletilmesi veya GSH yıkımının önlenmesi ile sağlanabilir.

GSH biyosentezi prekürsörü olan γ - glutamilsistein kullanılarak sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda beyin dokusunda GSH düzeylerinin arttığı gözlemlenmiştir (12, 27). GSH düzeylerini arttırmak için sistein sentez prekürsörleri kullanılarak yapılan çalışmalarda yüksek konsantrasyondaki sisteinin beyin hücrelerine zararlı etki gösterdiği saptanmıştır. GSH düzeylerini arttırmak için kullanılan diğer ajanlar tiyol içerikli bileşikler ve GSH analoglarıdır (28, 48, 84).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar GCEE'nin GSH düzeylerini arttırarak antioksidan etki yarattığını göstermektedir. GCEE; GSH'a benzer bir mekanizmayla antioksidan özellik gösterir. GSH sentezinin sınırlayıcı basamağı γ -glutamilsistein sentetazdır ve GSH tarafından geri-besleme mekanizmasıyla inhibisyona uğramaktadır. GCEE kullanılarak bu inhibisyon önlenmektedir. GSH'un yapısında bulunan sistein amino asidinin –SH grubu nedeniyle kan-beyin bariyerini kolayca geçemediği bilinmektedir. Ancak, glutatyon etil esterini ve dietil esterini ile yapılan çalışmalar bu esterlerin kan-beyin bariyerini geçmede daha etkili olduklarını ortaya koymuştur. γ -glutamilsistein etil esterinin kullanımı ile γ -glutamilsisteinin plazma membranını daha kolay geçtiği ve hücresele GSH düzeylerini arttırarak beyini oksidatif hasara karşı koruyabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (2, 3).

γ -glutamilsistein sentetaz inhibitörü olan butiyonin sülfoksimin (BSO) uygulanan sıçanlarda GSH düzeyleri düşmektedir. i.p GCEE enjeksiyonunu takiben BSO uygulamasında kontrol grubuna yakın GSH düzeylerinin izlenmesi, GCEE'nin beyin GSH düzeylerini arttırdığının göstergesidir. Ayrıca proteinlerdeki sülfdril grupları ile reaksiyona girerek zarar veren peroksinitrit radikalinin neden olduğu oksidatif stresin GCEE tarafından önlendiği *in vivo* çalışmalarla ortaya konmuştur (27).

GSH düzeylerini arttıran GCEE'nin antioksidan özelliği nedeniyle Alzheimer gibi oksidatif stres kaynaklı nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel bir terapötik ajan olarak tek başına veya diğer ajanlarla kombine bir şekilde kullanılması mümkün olabilir (2, 5).

1.5. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygun koşullarda nükleik asitlerin *in vitro* olarak çoğaltılması işlemidir. Temel olarak; DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotitlerin (primer) hedef DNA'ya bağlanması (annealing-hibridizasyon) ve sonra da zincirin uzayıp çift iplikli DNA sentezinin olması (elongation-uzama) olaylarının belli sayıda tekrarlanmasına dayanır. PCR'da ardı ardına tekrarlanan döngüler sayesinde DNA parçaları üstel olarak artar (14).

PCR'a başladığımız hedef dizinin miktarı ile herhangi bir döngüde elde edilen PCR ürününün miktarı arasında kantitatif bir ilişki vardır. Real-time PCR ise başlangıç miktarına göre oluşan son ürünün kantifikasyonunun

özgün, hassas ve diğer yöntemlere göre daha kolay tespit edilebildiği bir yöntemdir (15).

Her döngünün sonunda yapılan floresans ölçümünün (end-point fluorescence) eş zamanlı olarak izlenmesi ürün oluşumunun göstergesi olarak kullanılır. Konvansiyonel PCR yöntemleri ile karşılaştırıldığında güvenilirliği daha fazla olmasının yanı sıra uygulama açısından kolaylık sağlamakta ve PCR sonrası yapılan agaroz jel elektroforezi gibi ek değerlendirme çalışmalarına gerek duyulmamaktadır (74).

Real-time PCR sisteminin temelini floresan moleküllerin ışınımlarının tespiti ve miktarının belirlenmesi oluşturur. Her bir PCR döngüsünde floresan ışınımın kaydedilmesi ile başlağıçtan itibaren üstel fazda ürün artışına hangi noktada ulaşıldığı eş zamanlı olarak izlenir (53, 56).

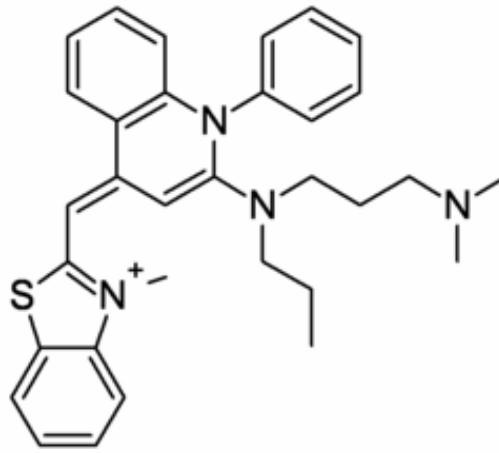
Real-time PCR'da DNA amplifikasyonunu belirlemek için kullanılan floresan yöntemler 3 tanedir (110):

- Hidroliz problemleri: TaqMan,
- Hibridizasyon problemleri: Molecular Beacons,
- DNA bağlayıcı boyalar: SYBR Green.

Bizim çalışmamızda SYBR Green I isimli floresan özellikteki boya kullanılmıştır.

1.5.1. Real-time PCR'da Kullanılan Floresan Boya (SYBR Green)

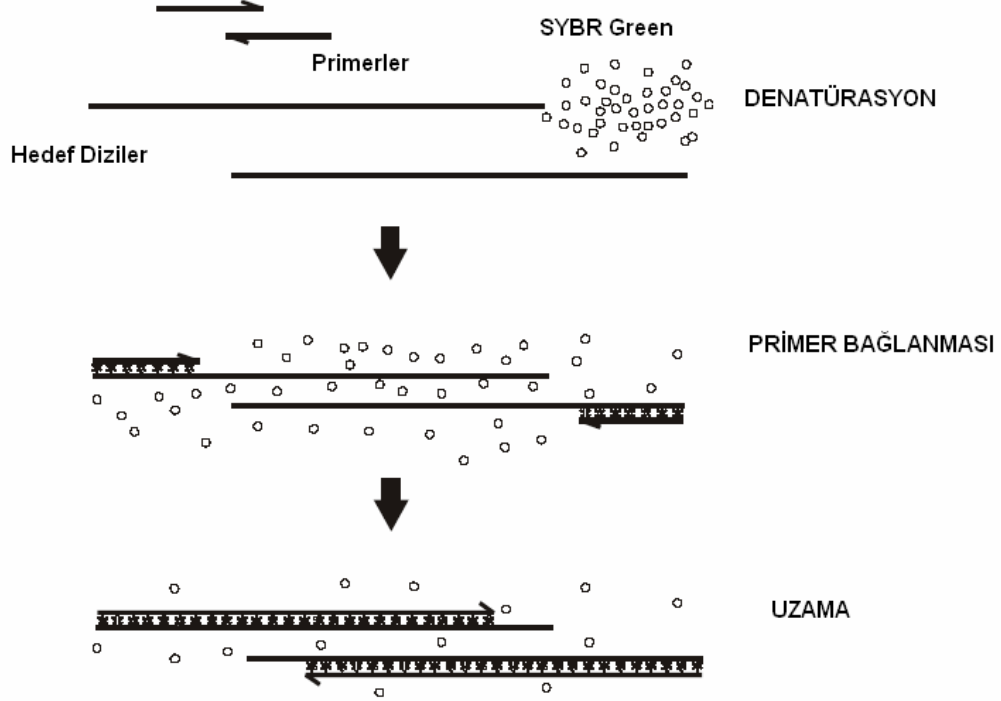
DNA bağlayıcı bir boya olan SYBR Green çift sarmal DNA'nın minör oluğuna bağlanır. 497 nm'de maksimum eksitasyona ve 520 nm'de maksimum emisyonu sahiptir (65). Moleküler formülü ($C_{32}H_{37}N_4S$) aşağıdaki şekildedir (Şekil 10):



Şekil 10. SYBR Green'in kimyasal formülü ([2 - [N - (3-dimetilaminopropil) -N-propilamino] - 4 - [2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiyazol-2-il)-metiliden] - 1-fenil-kuinolinium]⁺).

SYBR Green DNA'ya bağlanmamış halde çok az floresans yayarken çift sarmal DNA'ya bağlandığında yaydığı floresansta büyük bir artış olur. Bu özelliği nedeniyle real-time PCR süresince oluşan ürünün izlenmesi açısından kolaylık sağlar (Şekil 11). Denatürasyon sırasında tek sarmal halindeki DNA'ya bağlanmayan SYBR Green reaksiyon karışımının içinde serbest halde bulunur ve arka-fon (back-ground) floresans dediğimiz az bir floresans yayar. Primerlerin hedef DNA ile hibridize olmasıyla oluşan çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR Green floresans yaymaya başlar. Uzama

gerçekleştikçe çift zincirli DNA molekülündeki artışla SYBR Green'in yaydığı floresans da artacaktır. Diğer döngünün denatürasyon basamağında çift zincir DNA'lar ayrılıp tek zincir olacak ve boya molekülü de serbest kaldığından floresans düşecektir (104).

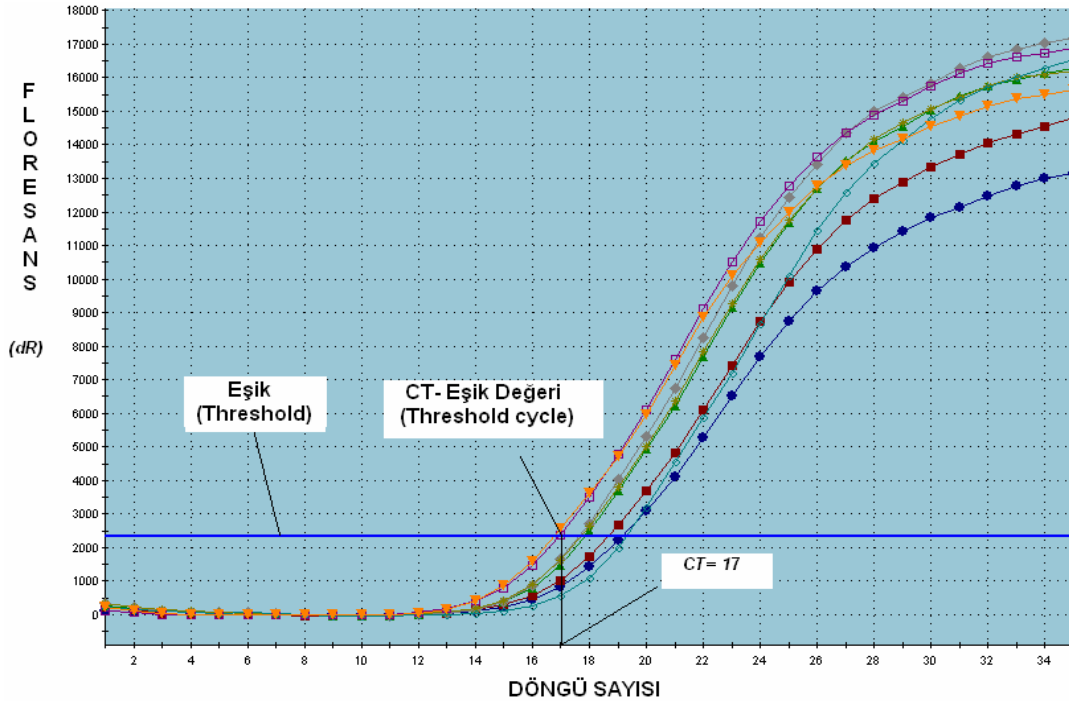


Şekil 11. SYBR Green'in floresans oluşturma mekanizması

SYBR Green'in dezavantajı spesifik olmayan çift zincirli primer dimerlerine veya diğer ürünlere bağlanmasıdır. Bu spesifik olmayan floresans sinyalleri "erime eğrisi (melting-point) analizi" adı verilen bir dizi analiz yapılarak kontrol edilebilmektedir (15, 78).

1.5.2. Real-time PCR'da Eşik Döngü Değerinin (CT- Threshold Cycle) Saptanması

Real-time PCR'da kullanılan boyadan kaynaklanan ölçülebilir ışınım 3-15 döngüde oluşur. PCR ürünlerinde ilk anlamlı artışın olduğu noktaya eşik değer (threshold cycle-CT) adı verilir (Şekil 12). Bu değer sistem çalışmaya başladığından itibaren üstel oranda ürün oluşmasını ve logaritmik lineer faza geçiş noktasını temsil etmektedir. CT değeri gen ekspresyonunun kantifikasyonu açısından önemli bir parametredir. Başlangıçtaki genomik DNA veya cDNA miktarı ne kadar yüksekse ürün artışına bağlı olarak gerçekleşen floresans o kadar fazla olur ve bu nedenle anlamlı artış daha erken gerçekleşir yani CT değeri daha küçük olur (14, 15).



Şekil 12. Amplifikasyon eğrisinde CT değerinin gösterilmesi

1.5.3. Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan Referans Genler

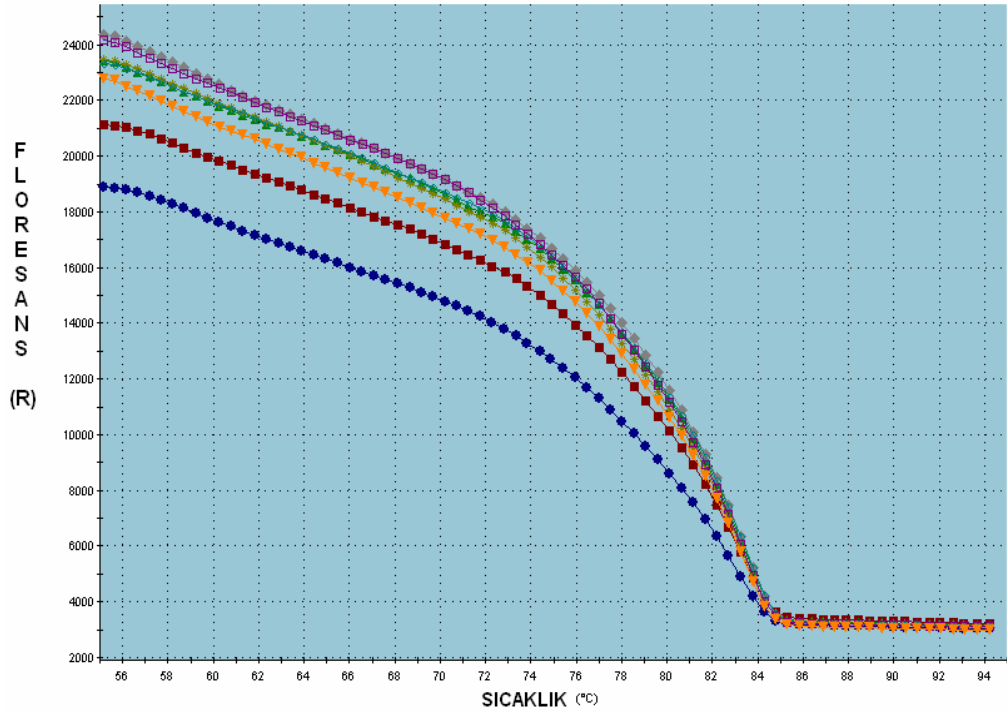
Hücre yaşamının devamı için mutlak suretle eksprese edilmesi gereken, ekspresyon düzeyleri hücreden hücreye veya dokudan dokuya farklılık göstermeyen genlere endojen veya referans gen adı verilir.

Gen ekspresyon çalışmalarında sıklıkla Gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz (*GAPDH*) ve β -*Aktin* gibi genlerin kullanıldığı gözlenmektedir. Bu çalışmada real-time PCR analizleri için referans gen olarak *GAPDH* kullanılmıştır (6, 74).

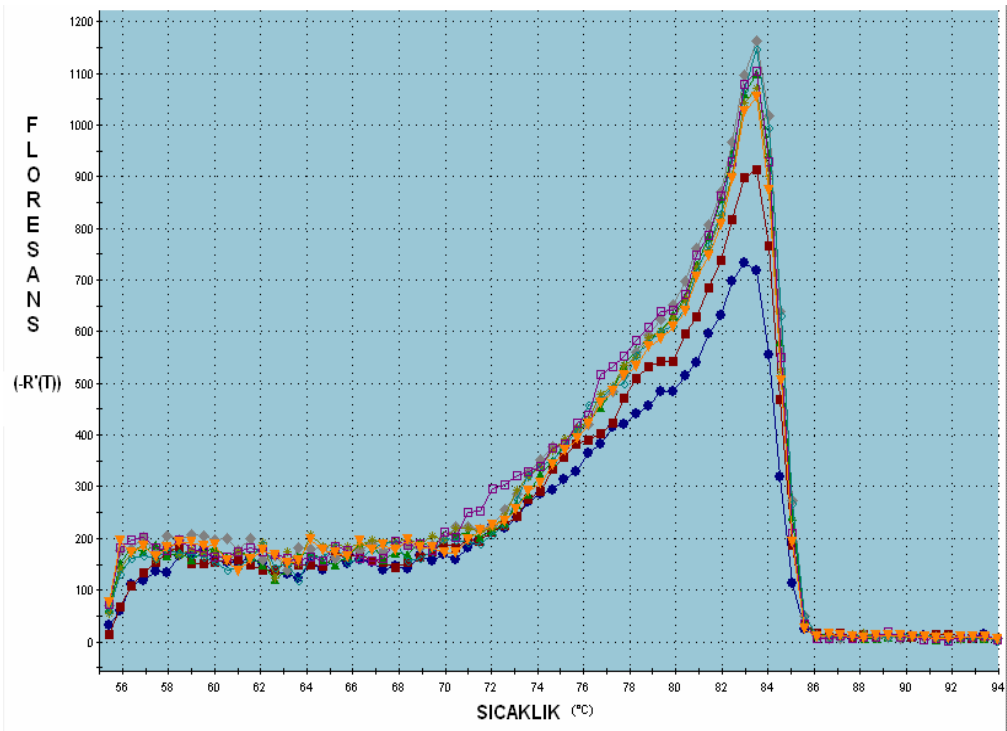
1.5.4. Real-time PCR'da Erime Eğrisi Analizleri

Erime noktası (Melting-point, T_m) bir DNA zincirinin %50'sinin açılması için gerekli sıcaklıktır. Bir DNA fragmentinin erime noktası; fragmentin uzunluğuna ve guanin-sitozin (GC) içeriğine bağlı olarak değişir. Buna göre fragmentlere özel erime noktaları saptanarak amplifikasyon ürünleri tayin edilebilir (74).

Erime eğrisi analizleri ile floresan boya maddesi ve DNA arasındaki spesifik bağlanmalar spesifik olmayan bağlanmalardan ayırt edilip, PCR ürünü hakkında bilgi sağlanabilir (78). Tipik bir erime eğrisi grafiğinde Y eksenini floresansı, X eksenini ısıyı belirtir (Şekil 13). Eğrinin ilk negatif türevi ($-dF/dt$) alınırsa farklılıklar daha belirgin hale gelir (Şekil 14).



Şekil 13. Erime Eğrisi (F/T)



Şekil 14. Erime Eğrisi (-dF/dT)

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Aletler

- -20 °C derin dondurucu- Uğur
- -80 °C derin dondurucu- Sanyo Ultra Low
- Çalkalayıcı- Labnet, Orbit LS
- Güç kaynağı –Thermo, EC250-90
- Hassas terazi- Sartorius, Analytic A-200
- Homojenizatör- B.Braun
- Manyetik karıştırıcı- Nüve, MK 318
- Mikrosantrifüj- Labnet, Spectrafuge 24D
- Otomatik pipetler- Brand Transperfette
- pH metre- İmolab
- Real-Time PCR Cihazı - Stratagene, Mx 3000P QPCR
- Spektrofotometre- Shimadzu, UV-1601
- Su Banyosu- Nüve, BM 302
- Termal Döngü Cihazı (Thermal cycler) –Techne, TC 512
- UV Transilüminatör ve Biocapt bilgisayar yazılımı –Vilber Lourmat
- Vorteks -Nuvemix
- Yatay elektroforez tankı –Thermo EC, EC330 Midicell Primo

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

10 mM dNTPs karışımı: MBI Fermentas (Litvanya)

10X PCR Tamponu: MBI Fermentas (Litvanya)

25 mM MgCl₂: MBI Fermentas (Litvanya)

2-propanol: CH₃CH(OH)CH₃, Merck (Almanya)

5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit): DTNB, Sigma Chemical Co.

(A.B.D.)

5-sülfosalisilik asit-2-hidrat: C₇H₆O₆S.2H₂O, Merck (Almanya)

6X Loading Dye (jel yükleme çözeltisi): MBI Fermentas (Litvanya)

Agaroz: Prona (İspanya)

Apirojen su: Deva İlaç Sanayi (İstanbul)

Bakır sülfat- 5-hidrat: CuSO₄.5H₂O, Merck (Almanya)

Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix: (SYBR Green I boyası, 2.5 mM MgCl₂ , 10 mM dNTP karışımı ve SureStart Taq Polimeraz içerir.), Stratagene (Kanada)

c-fos primerleri: Thermo (A.B.D.)

Dietilpirokarbonat: DEPC, AppliChem Bio. Syn. Services (Almanya)

Etanol: C₂H₅OH, J.T. Baker (Hollanda)

Etidyumbromid: AppliChem Bio. Syn. Services (Almanya)

Etilendiamintetraasetikasit disodyum tuzu-2-hidrat: Na₂EDTA.2H₂O, Riedel-de Haen (Almanya)

Folin-Ciocalteu's Fenol Reaktifi: Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)

GAPDH primerleri: Thermo (A.B.D.)

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus: MBI Fermentas (Litvanya)

Glasiyel asetik asit: CH_3COOH , Merck (Almanya)

Glikojen: MBI Fermentas (Litvanya)

Glutatyon Redüktaz (500U/ml): Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)

Glutatyon: GSH, Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)

Kainik asit: $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_4$, Sigma-Aldrich (Viyana, Avusturya)

Kloroform: CHCl_3 , Merck (Almanya)

Potasyum dihidrojen fosfat : KH_2PO_4 , Merck (Almanya)

Potasyum hidroksit: KOH, Merck (Almanya)

RevertAid™ First Strand cDNA Sentez Kiti: (Random hegzamer primer, 5X reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü, 10 mM dNTP karışımı, 200 U/μl M-MuLV revers transkriptaz) MBI Fermentas (Litvanya)

Sığır serum albumini: BSA, Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)

Sodyum fosfat: Na_3PO_4 , Riedel-de Haen (Almanya)

Sodyum karbonat anhidr: Na_2CO_3 , Merck (Almanya)

Sodyum potasyum tartarat-4-hidrat: $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Merck (Almanya)

TRItidy G: AppliChem Bio. Syn. Services (Almanya)

Trietanolamin: $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$, Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)

Tris(hidroksimetil)aminometan: $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, Merck (Almanya)

Tris-EDTA (TE) Tamponu: AppliChem Bio. Syn. Services (Almanya)

β-nikotinamid adenindinükleotit fosfat: NADPH, Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)

γ-glutamilsistein etil esteri: GCEE, Bachem (Kanada)

2.3. Kullanılan Çözeltiler

1. Glutasyon Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Glutasyon Standart Çözeltisi (1000 nmol/ml):

30.7 mg glutasyon tartılıp 100 ml'lik balon jöjeye konuldu ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 1000 nmol/ml'lik stok hazırlanmış oldu. Stoktan 1M Tris-HCl ile 5-40 nmol/ml'lik dilüsyonlar yapılarak standartlar hazırlandı.

5-Sülfosalisilik asit Çözeltisi (%10'luk homojenizasyon çözeltisi):

10 g 5-sülfosalisilik asit tartılıp 100 ml'lik balon jöjeye konuldu. Balon jöje distile suyla 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.

Stok Çözelti (143 mM Na₃PO₄, 6.3 mM Na₂EDTA.2H₂O pH=7.5):

11.72 g sodyum fosfat ve 1.17 g EDTA disodyum tuzu tartılıp 500 ml'lik balon jöjeye konuldu distile suyla 500 ml'ye tamamlandı. pH'ına bakıldı, 7.5 olduğundan ayarlanma yapılmadı. Çözelti +4 °C'de saklandı.

DTNB (6 mM) (Stok çözelti içinde):

0.118 g DTNB tartılarak stok çözelti ile 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.

NAPDH (0.3 mM) (Stok çözelti içinde):

2.5 mg NAPDH tartılıp stok çözeltiyle 10 ml'ye tamamlandı. Kullanılacağı zaman günlük hazırlandı.

Glutasyon Redüktaz Stok Çözeltisi (50 U/ml):

500 U/ml'lik glutasyon redüktaz çözeltisinden 1:10 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.

2. Protein Miktar Tayini için Kullanılan Çözeltiler**Protein standartı:**

1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde BSA çözeltisi hazırlanarak 20-120 µg/ml'lik standartlar için gerekli dilüsyonlar distile su ile yapıldı.

%2'lik sodyum karbonat çözeltisi (%2 Na₂CO₃):

2 g Na₂CO₃ 0.1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlandı.

%2'lik sodyum potasyum tartarat çözeltisi (%2 Na-K tartarat):

2 g Na-K tartarat distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

0.1 N NaOH çözeltisi:

0.4 g NaOH distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

%1'lik bakır sülfat çözeltisi (%1 CuSO₄):

1 g CuSO₄ distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

Taze Alkali Bakır çözeltisi:

Taze hazırlanmış 100 ml %2'lik Na₂CO₃ çözeltisine 1 ml %2'lik Na-K tartarat ve 1 ml %1'lik CuSO₄ çözeltileri eklenerek taze olarak hazırlandı.

Folin-Ciocalteu's Fenol çözeltisi:

Kullanılacağı gün taze olarak 1:1 oranında distile suyla seyreltildi.

3. Agaroz Jelin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler**Agaroz %1.7:**

150 ml 1X TAE tamponunda 2.55 g agaroz çözüldü. Isıtıcıda jel kıvamına gelene kadar bekletildi.

TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) Tamponu 10X:

1 L'de 48.4 g Tris, 11.4 ml glasiyel asetik asit, 20 ml 0.5 M EDTA içeren pH'sı 7.6 olan çözeltidir.

0.5 M EDTA:

186.1 g/L EDTA içeren pH'sı 8 olan çözeltidir.

Dietilpirokarbonat-su (DEPC-su) (1 L):

1 ml DEPC ve 999 ml distile su karıştırıldı. 24 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak inkübe edildi. Daha sonra otoklavda sterilize edildi. Buzdolabında +4 °C'de saklandı.

2.4. Çalışma Grupları

2.4.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması

Çalışmada 200-250g ağırlığında erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Tüm hayvanlar 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsü olacak şekilde deney gününe kadar bekletildi. KA; %0.9 izotonik NaCl çözeltisinde ve GCEE; ajirojen suda çözülererek hazırlandı. Tüm uygulamalar intraperitoneal (i.p.) olarak yapıldı. Deney hayvanları 4 gruba ayrıldı:

Grup 1- Kontrol grubu (n=5-8): 1 ml/kg olacak şekilde %0.9 izotonik NaCl çözeltisi verildi.

Grup 2- Akut KA grubu (n=5-8): 10 mg/kg KA verildi.

Grup 3- Akut KA + GCEE grubu (n=5-8): 10 mg/kg GCEE ve 10 mg/kg KA aynı zamanda verildi.

Grup 4- Akut GCEE grubu (n=5-8): 10 mg/kg GCEE verildi.

KA ve GCEE uygulamaları sonrasında deney hayvanları 3 saat bekletilip, gözlem altında tutuldu. KA verilen hayvanların epileptik nöbetlerinin şiddeti ve davranışlarındaki farklılıklar takip edildi. Hayvanların hiçbirinde şiddetli limbik konvülsiyonlar gözlemlenmedi. Akut KA uygulanan hayvanlarda enjeksiyonu takiben 20-30 dakika içinde temizlenme hareketiyle birlikte hiperaktivite hali gözlemlendi. Orta şiddetteki nöbetler ile birlikte "ıslak köpek silkinmesi" (wet dog shake) saptandı. Akut KA + GCEE grubunda ise nöbetlerin daha geç başlamasının yanı sıra şiddetinin Akut KA grubuna nazaran daha az olduğu gözlemlendi. 3 saatin sonunda gruptaki tüm sıçanlar eter anestezisi altında dekapite edildi. Beyin korteksleri ve

hipokampüsleri buz üzerinde ayrıldı. Doku örnekleri deney gününe kadar -80 °C'de saklandı.

Elde edilen örneklerle sırasıyla şu deneyler yapılmıştır;

- Glutasyon miktar tayini,
- Total RNA izolasyonu,
- Total RNA konsantrasyonunun belirlenmesi,
- Reverse Transkripsiyon yöntemiyle cDNA (komplementer DNA)

sentezi,

- Konvansiyonel PCR ve Real-time PCR ile cDNA amplifikasyonu,
- Konvansiyonel PCR ile elde ettiğimiz ürünün agaroz jel elektroforeziyle gösterilmesi,
- *c-fos* mRNA ekspresyon düzeylerinin saptanması,
- Real-time PCR'da amplifikasyon ürünlerinin erime eğrisi analizi.

2.5. Kullanılan Yöntemler

2.5.1. Örneklerin GSH Miktar Tayini İçin Homojenizasyonu

Beyin korteksleri ve hipokampüsleri tartıldı. +4 °C'de %10'luk 5-sülfosalisilik asit çözeltisi ile 1:10 (A:H) oranında olacak şekilde homojenize edildi. Homojenizasyon homojenizatörde 1500 rpm'de gerçekleştirildi. Tüm örnekler +4 °C'de 10000xg'de 5 dk. süreyle santrifüj edildi ve supernatantlar ayrıldı. Supernatantların üzerine 6-9 µl trietanolamin eklenerek nötralizasyonu sağlandı. Deneylere supernatantlar kullanılarak devam edildi.

2.5.2. GSH Miktar Tayini Yöntemi (27)

Deney tüplerine 420 µl 0.3 mM NADPH ve 60 µl 6 mM DTNB çözeltisi konuldu. Üzerine ayrılan supernatantlardan 120 µl eklenerek karıştırıldı. Tüpler 37 °C'de 10 dk. bekletildi. Tüplerin üzerine stok GSH redüktaz çözeltisinden 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanmış 5 U/ml'lik GSH redüktazdan 30 µl eklenip tekrar karıştırıldı. Spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Her örnek için 3 kez ölçüm yapıldı. Beyin korteksi ve hipokampusu için GSH miktarları daha önceden konsantrasyonu bilinen GSH çözeltileriyle hazırlanan standart eğri grafiği yardımıyla hesaplandı. GSH miktarı nmol/g protein olarak gösterildi.

2.5.3. GSH Miktar Tayini Belirlenmesinde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Molekül ağırlığı 307.3 olan GSH'tan 30.7 mg tartıldı. Distile suyla 100 ml'ye tamamlandı. Böylece ana stok GSH standardı (1000 nmol/ml) hazırlandı. Bu stok çözeltilerden alınan belirli hacimler 1 M Tris-HCl tamponu (pH=8.3) ile seyreltilerek ml'de 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40 nmol GSH taşıyan standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden alınan 120'er µl, içinde 420 µl 0.3 mM NADPH ve 60 µl 6 mM DTNB bulunan tüplere aktarıldı. Karıştırıldı. 37 °C'de 10 dk. bekletildi. Üzerine 30 µl 5U/ml GSH redüktaz eklendi karıştırılıp spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Her standart örneği için 3 kez ölçüm yapıldı. Okunan

absorbans değeri ve GSH konsantrasyonu arasında standart bir grafik hazırlandı.

2.5.4. Protein Miktar Tayini Belirlenmesinde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması

50 mg sığır serum albumini (BSA) tartıldı. Distile suyla 50 ml'ye tamamlandı. Böylece ana stok protein standardı (1 mg/ml) hazırlandı. Bu stok çözeltiden alınan belirli hacimler distile su ile seyreltilerek ml'de 20, 40, 60, 80, 100, 120 µg protein taşıyan standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden alınan 0.4'er ml üzerine 2 ml taze alkali bakır çözeltisi eklendi. Karıştırıldı. Tüpler 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerlerine 1:1 oranında seyreltilmiş 0.2 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. 1 saatin sonunda 0.4 ml distile su, 2 ml taze alkali bakır çözeltisi ve 0.2 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi içeren köre karşı 750 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Her standart örnek için 3 kez ölçüm yapıldı. Okunan absorbans değeri ve protein konsantrasyonu arasında standart bir grafik çizildi.

2.5.5. Protein Miktar Tayini Yöntemi (60)

Dokuların protein içeriği Lowry yöntemiyle ölçüldü (60). Bu yöntemin prensibi proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile Biüret tepkimesi vermesidir. Alkali çözeltide önce peptid bağları ve bakır tuzları mor renkli bir kompleks oluşturur. Daha sonra Folin-Ciocalteu reaktifinin eklenmesiyle

protein yapısındaki tirozin ve triptofan amino asitleri de indirgenir ve renk oluşumuna katkıda bulunur. Homojenizasyon sonrası elde edilen homojenatlardan 0.4'er ml tüplere aktarıldı. Üzerine 2 ml taze alkali bakır çözeltisi eklendi. Karıştırıldı. Tüpler 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerlerine 0.2 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. 1 saatin sonunda 0.4 ml distile su, 2 ml taze alkali bakır çözeltisi ve 0.2 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi içeren köre karşı 750 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü. Her örnek için 3 kez ölçüm yapıldı. Beyin korteks ve hipokampüs protein miktarları daha önceden konsantrasyonu bilinen BSA çözeltileriyle hazırlanarak tespit edilmiş standart eğri grafiği yardımıyla hesaplandı.

2.5.6. Beyin Korteks ve Hipokampüs Dokusundan Total RNA İzolasyonu (21)

Total RNA izolasyonu için beyin korteksleri ve hipokampüslerinden yaklaşık 60-80 mg 1.5 ml'lik ependorflara alındı. Üzerine 800 µl TriTidy G çözeltisinden eklenerek kalın uçlu enjektörle buz üzerinde doku küçük parçalara ayrıldı. 5 µl glikojen ependorfa eklendi. İnce uçlu enjektörle 15 dk. süreyle homojenizasyon yapıldı. Homojenat üzerine %99'luk buzdolabında bekletilmiş kloroformdan 200 µl eklendi. Şiddetli bir şekilde çalkalandı. Vortekslendi ve 2 dk. bekletildi. 12000xg'de 15 dk. santrifüj edildi. Ependorftaki berrak kısım yani supernatant dikkatli bir şekilde alınarak temiz bir ependorfa aktarıldı. Supernatant üzerine buzdolabında bekletilmiş 400 µl 2-propanol ilave edildi ve karışım 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi.

12000xg'de 15 dk. santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı. Böylece ependorfun alt kısmında beyaz pellet şeklinde RNA elde edildi. Pellet üzerine buzdolabında bekletilmiş soğuk %70'lik etanolden 1 ml ilave edildi. Ependorflar 7500xg'de 10 dk. santrifüj edilerek üstte bulunan etanol dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Ependorflar kapatılmadan etanolün uçması için oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Etanol tamamen uçurulduktan sonra ependorflara 20 µl DEPC-su ilave edilerek pipet ucuyla hafifçe karıştırılarak RNA ile DEPC-suyun karışması sağlandı. Ependorflar 2 dk. süreyle buzun üzerinde bekletildi. Daha sonra 55 °C'lik su banyosunda 5 dk. bekletildi. Elde edilen total RNA'lar revers transkripsiyon yöntemi ile cDNA sentezinin yapılacağı zamana kadar -80 °C'de saklandı.

2.5.7. Total RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Total RNA izolasyonu yapılan örneklerdeki RNA konsantrasyonunun belirlenebilmesi için izole edilen RNA'lar 1:80 oranında apirojen suyla seyreltildi. Bunun için 1 µl RNA örneği ile 79 µl apirojen su 200 µl'lik PCR tüplerinde karıştırıldı. Karışımın absorbansı 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüldü. RNA izolasyonunun kalitesinin belirlenmesinde A260/A280 oranı kullanıldı. Bu oranın 1.6-2 arasında olması izolasyonun doğru şekilde yapıldığını göstermektedir. Total RNA konsantrasyonu da aşağıdaki denklemden yararlanılarak tespit edildi.

Total RNA konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)= [A260 x seyreltme faktörü x RNA koefiensi] /1000 (Seyreltme faktörü: 80, RNA koefiensi: 40)

RT-PCR yöntemiyle cDNA sentezi aşamasında reaksiyona giren RNA miktarının tüm örneklerde eşit olması amacıyla tüm örneklerdeki RNA içeriği 1 µg/µl olacak şekilde ayarlandı. Bunun için elde edilen stok RNA çözeltisinden 4 µl kullanıldığından aşağıdaki denklemden yararlanıldı.

Hesapla bulunan total RNA kons. (µg/µl) x 4 µl RNA örneği = istenen RNA kons. (1 µg/µl) x total hacim

Seyreltme için DEPC-su kullanıldı. Seyreltme için kullanılacak DEPC-su miktarı total hacimden 4 µl çıkarılarak belirlendi ve 4 µl RNA örneği bununla seyreltildi. Böylece cDNA sentezi için 1 µg/µl RNA içeren çözeltiler hazırlanmış oldu.

2.5.8. Total RNA'dan Revers Transkripsiyon Yöntemiyle cDNA Sentezi

(45)

Reaksiyonun prensibi sırasıyla belli bir ısıda ikincil yapılarıdaki RNA'nın açılması; mRNA'nın gelişigüzel bir bölgesine primerin bağlanması; uygun sıcaklık, iyon yükü, pH ve sentez için gerekli nükleotidlerin varlığında primerlerin üzerinden mRNA'nın dizilimine uygun komplementer DNA'nın sentezlenmesi ve yüksek ısıda enzimin inaktive edilerek reaksiyonun durdurulması şeklindedir.

cDNA sentezine sokulacak tüm örneklerdeki total RNA miktarı 1 µg/µl olacak şekilde seyreltilerek hazırlandı ve revers transkripsiyon yöntemiyle cDNA sentezlendi. cDNA sentezi için "RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit" (MBI Fermentas, Litvanya) kullanıldı. Bu kit ile RNA, revers transkriptaz enzimi yardımı ile tek iplikçikli cDNA'ya (komplementer DNA)

evrilmektedir. Bu yöntemde M-MuLV (Moloney-Murine Leukomia Virus) transkriptaz enzimi kullanılmıştır. cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I. cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları

BİLEŞENLER	Miktarlar (Hacim)
Seyreltilmiş RNA rneği (1 µg/µl)	4.0 µl
Random hekzamer primer	1.0 µl
Deiyonize su	6.0 µl
5X reaksiyon tamponu	4.0 µl
Ribonükleaz inhibitörü	1.0 µl
10 mM dNTP karışımı	2.0 µl
M-MuLV revers transkriptaz (200 U/ µl)	1.0 µl
TOPLAM:	20 µl

Buz üzerinde seyreltilmiş RNA rneği, random hekzamer primer ve deiyonize su belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PCR tüplerinde karıştırıldı. Tüpün çeperinde kalan damlacıkların mikrosantrifüj yardımıyla tüpün alt kısmında toplanması sağlandı. Herhangi bir kontaminasyonun önlenmesi açısından proteinlerin denatürasyonu için tüpler 70 C'de 5 dk. inkübasyona bırakıldı. Karışım buz üzerine alındı. Daha sonra sırasıyla belirtilen miktarlarda 5X reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü ve 10 mM dNTP karışımı ilave edildi. Mikrosantrifüj yardımıyla çeperdeki damlaların tüpün alt kısmında toplanması sağlandı. Karışım, primerin RNA kalıbındaki uygun bölgelere bağlanması amacıyla 25 C'de 5 dk. inkübasyona bırakıldı. Ardından

karışıma M-MuLV revers transkriptaz (200 U/ µl) enzimi ilave edildi. Mikrosantrifüjle örneklerin tüpün alt kısmında toplanması sağlandı. Tüpler termal döngü cihazına (thermal cycler) yerleştirildi. PCR programı 42 °C'de 1 saat, 94 °C'de 7 dk. olacak şekilde ayarlandı. 42 °C'de 1 saat süreyle RNA'lar revers transkriptaz enzimi yardımı ile cDNA'ya dönüştürüldü. 94 °C'de 7 dk. süreyle de revers transkriptaz enzimi inaktive edildi. Böylece total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleşmiş oldu. Oluşan cDNA örnekleri "PCR yöntemi ile cDNA'nın çoğaltılması" aşamasına kadar -20 °C'de saklandı.

2.5.9. Konvansiyonel ve Eş zamanlı cDNA Amplifikasyonu ve *c-fos* Ekspresyon Düzeylerinin Saptanması

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans-spesifik primerlerin yardımıyla konvansiyonel metodla ve SYBR Green kullanılarak eş-zamanlı olarak amplifiye edildi. *c-fos* geninin ve *GAPDH* geninin belirlenmesi için primerler kullanıldı (Tablo II).

Tablo II. *c-fos* ve *GAPDH* primerleri

GEN	PRİMER DİZİLERİ <i>İleri (Forward) ve Geri (Reverse)]</i>	AMPLİFİKASYON ÜRÜNÜ	GEN BANKASI NO:
GAPDH	<i>F: 5'-AAG GTC ATC CCA GAG CTG AA- 3'</i> <i>R: 5'-ATG TGA GCC ATG AGG TCC AC- 3'</i>	338 bp (<i>baz çifti</i>)	AF106860
c-fos	<i>F: 5'- GGT AGT TAG TAG CAT GTG AGC- 3'</i> <i>R: 5'- TCA GAC CAC CTCAAC AAT GC- 3'</i>	337 bp (<i>baz çifti</i>)	X06769

Konvansiyonel PCR ile cDNA amplifikasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları aşağıda Tablo III'te gösterilmiştir.

Tablo III. Konvansiyonel cDNA amplifikasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları

BİLEŞENLER	Miktarlar (Hacim)
1/5 seyreltilmiş cDNA	2.0 µl
10X PCR tamponu	5.0 µl
25 mM MgCl ₂	4.0 µl
10 mM dNTP karışımı	1.0 µl
5 pmol forward primer	1.0 µl
5 pmol reverse primer	1.0 µl
Deiyonize su	35.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/ µl)	0.5 µl
TOPLAM:	50 µl

cDNA örneklerini PCR reaksiyonuna sokabilmek için örnekler 1:5 oranında deiyonize suyla seyreltildi. Diğer taraftan 200 µl'lik PCR tüpüne 5 µl

10X PCR tamponu, 4 µl MgCl₂, 1 µl dNTP karışımı, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer ve 35.5 µl deiyonize su eklenerek bir karışım hazırlandı. Seyreltilmiş 2 µl cDNA örneği üzerine hazırlanmış olan karışım yani 47.5 µl ilave edildi. Son olarak 0.5'er µl Taq DNA polimeraz enzimi ilave edilerek tüpler derhal termal döngü cihazına yerleştirildi. Başlangıç denatürasyonu 94 °C'de 3 dakika ve bunu takiben toplam 30 döngü; 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 30 saniye bağlanma (annealing) ve 72 °C'de 45 saniye zincir uzatımı (elongation) gerçekleşecek şekilde PCR programı oluşturuldu. PCR ürünlerinin varlığı daha sonra agaroz jel elektroforeziyle doğrulandı.

Real-time cDNA amplifikasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları aşağıda Tablo IV'te belirtilmiştir.

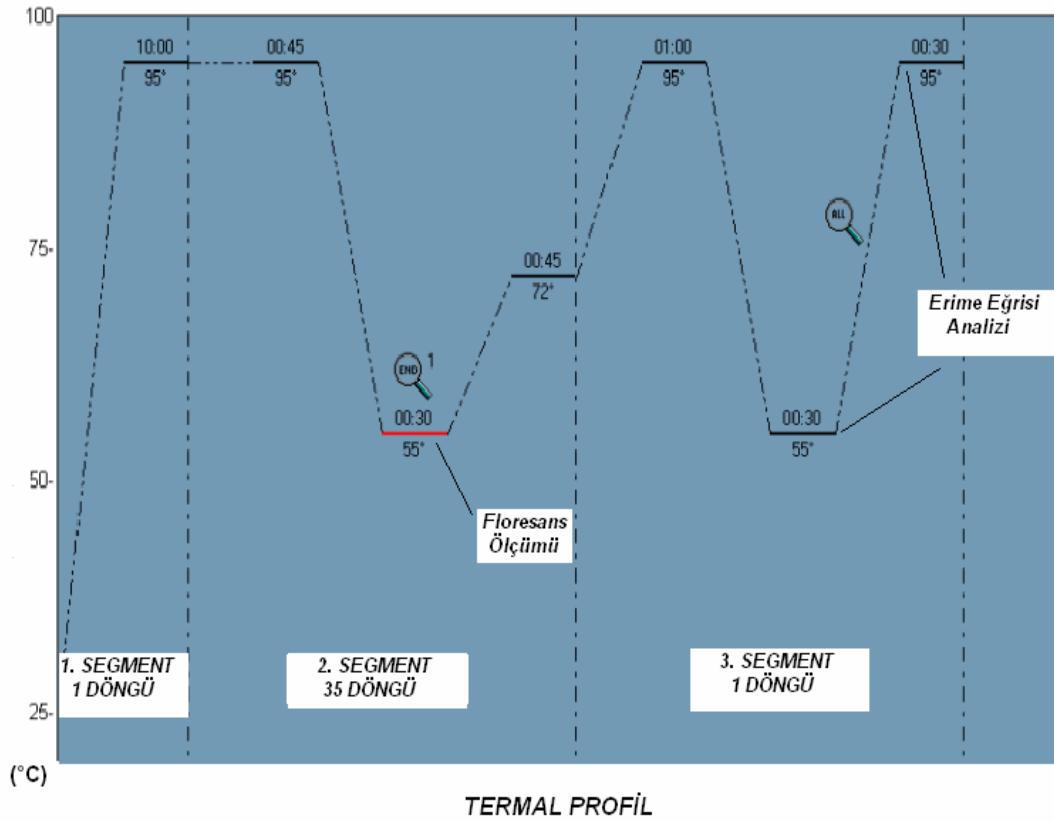
Tablo IV. Eş zamanlı cDNA amplifikasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları

BİLEŞENLER	Miktarlar (Hacim)
1/5 seyreltilmiş cDNA	1.0 µl
2X SYBR Green QPCR Master Mix	12.5 µl
Forward primer	1.0 µl
Reverse primer	1.0 µl
Deiyonize su	9.5 µl
TOPLAM:	25 µl

200 µl'lik PCR tüpünde 1 µl seyreltilmiş cDNA (1:5), 9.5 µl deiyonize su, 1 µl forward primer ve 1 µl reverse primer eklenerek bir karışım hazırlandı. Son olarak 12.5'er µl 2X SYBR Green QPCR Master Mix ilave edilerek tüpler mikrosantrifüjde 5000xg'de 30 saniye döndürüldü. Floresans ölçümünü etkilediğinden kabarcık kalmamasına dikkat edildi.

Real Time PCR programı şu şekilde oluşturuldu (Şekil 15):

1. Segment: 1 döngü; 95 °C -10 dakika
2. Segment: 35 döngü; 95 °C - 45 saniye
55 °C - 30 saniye
72 °C - 45 saniye
3. Segment: 1 döngü; 95 °C - 1 dakika
55 °C - 30 saniye
95 °C - 30 saniye



Şekil 15. Real-time PCR Programı

2.5.10. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez tekniği moleküllerin sahip oldukları net elektrik yükleri ile bu moleküllerin bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkilemesi prensibine dayanır. Moleküllerin büyüklüklerine göre ayrılabilme özellikleri, jel elektroforezinin pek çok amaç için kullanımına olanak sağlamıştır. Nükleik asit fragmanlarının tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir. Bu nedenle çeşitli amaçlar için izole edilen DNA ve RNA'ların tanımlanabilmesi, olası bir kontaminasyonun kontrolü, hangi formda olduğunun belirlenebilmesi, büyüklüğünün saptanabilmesi için agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır.

c-fos gen ekspresyonunun belirlenmesinde de, yatay agaroz jel elektroforez yöntemi (ThermoEC, Primo, Yatay Submarine Jel Elektroforezi) kullanıldı. %1.7'lik agaroz jel hazırlamak için 250 ml'lik erlenin içine 1.7 g toz agaroz tartıldı. Üzerine 0.5X TAE (Tris-asetat-EDTA tamponu) çözeltisinden 100 ml eklendi ve ısıtıcıda 30 dk. süreyle agarozun çözünmesi sağlandı. Jelin oda sıcaklığında 60 °C'ye gelmesi beklendi. Taraklar hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek elektroforez tankına yerleştirildi ve ılık jel çözeltisi etrafı temiz bir bantla çevrilmiş yatay elektroforez tankına döküldü. Yaklaşık yarım saat kadar jelin tamamen donması için beklendi. Elektroforez cihazının tankına 0.5X TAE tampon çözeltisinden dolduruldu. Donmuş olan jelden taraklar dikkatlice çıkartıldı ve jel tanka yerleştirildi. PCR ürünlerinden 15 µl alındı ve ayrı bir PCR tüpünde 3 µl 6X Loading dye (jel yükleme çözeltisi) ile karıştırıldı. Her örnek için ayrı ayrı hazırlanan bu karışımlar kuyucuklara yüklendi. Elde edilecek bantın yerinin doğru tespit edilebilmesi

için ilk kuyucuğa 7 µl GeneRuler™ 100 bç DNA Ladder Plus (marker) yüklendi. Elektroforez işlemi, 75 V'luk potansiyel altında 1 saat 45 dakika süre ile oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

2.5.11. Jelin Boyanması ve Görüntülenmesi

Agaroz jel içindeki DNA'yı görünür hale getirmenin en uygun yolu, floresan özellikteki etidyum bromür boyasını kullanmaktır. Bu boya DNA'nın bazları arasına interkalasyon yapabilen, düzlemsel yapılı halkasal bir grup içerir. DNA tarafından absorblanan 254 nm dalga boyundaki UV ışığı boya molekülüne aktarılır. DNA'ya bağlı boyanın kendisi de 302-366 nm arasındaki ışınları absorblar. Çevreye geri yayılan enerji, görünür ışık bölgesindeki (590 nm dalga boyunda) kırmızı-turuncu ışıktır. Böylece jeldeki DNA bandı görünür hale gelir. Etidyum bromür hem tek ve çift zincirli DNA'yı hem de RNA'yı gözlemek için kullanılabilir. Ancak bu boyanın tek zincirli nükleik asit moleküllerine karşı ilgisi daha azdır.

Elektroforez işleminin ardından jel bir kap içine alındı ve üzerine 200 ml distile su döküldü. Bantların UV ışık altında görünür hale gelebilmesi için distile suya 10 mg/ml stok etidyum bromür çözeltisinden 20 µl ilave edildi ve jel oda sıcaklığında 20 dk. süre ile çalkalayıcıda boyandı. Boyama işleminden sonra jel distile suyla yıkandı. Jel üzerinde oluşan bantlar, UV ışık altında görüntülendi ve bantların fotoğrafı çekildi. Agaroz üzerinde görünen her bir bant hedef gen *c-fos*'un 337 baz çift büyüklüğündeki amplifikasyon ürünüdür.

2.5.12. *c-fos* Ekspresyon Düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Analiz Yöntemine Göre Hesaplanması (57)

Real Time PCR ile elde edilen gen ürünlerinin kantifikasyonu için bir çok yöntem geliştirilmiştir. Çalışmamızda “ Komperatif $\Delta\Delta CT$ ” yöntemi kullanılmıştır.

Kalibratör olarak endojen kontrol de dediğimiz bir referans genden ve karşılaştırma yapabilmek için de kontrol grubundan faydalanılır. Bir hedef genin bir kontrol gene göre relatif ekspresyonuna bakılır. Düşük yoğunlukta sentezlenen genlerin ekspresyon çalışmaları için çok uygun bir yöntemdir.

Referans gen olarak *gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)*, β -*aktin*, *tubulin*, *siklofilin*, *hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT)*, *18S* ve *28S ribozomal RNA*'lardan faydalanılır. Bu genler RNaz koruma yöntemi, Northern Blotting analizi ve konvansiyonel PCR gibi yöntemlerde de referans olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır.

Referans genler her hücre tipinde bulunup hücrenin yaşamının devamı için gereklidirler ve yüksek oranda eksprese olmaktadır. Referans genlerin mRNA'larının stabil olduğu, dokudan dokuya değişiklik göstermediği ve çeşitli deney koşullarında dahi değişmediği düşünülmektedir.

Referans genlerin miktarlarının çeşitli dokularda farklılıklar gösterdiği ve kanser, diyabet gibi hastalık durumlarında ekspresyonlarının değiştiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Çeşitli deney modellerinde farklı referans genler denenerek en uygun olan kullanılabilir.

En sık kullanılan referans genler *GAPDH* ve β -*aktin* olup yöntem optimizasyonu ile ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler önlenabilir. Bazı

araştırmacılar da tek bir referans gen yerine birden fazla referans genin beraber kullanılması gerektiğini savunmaktadır (6, 15).

Biz alışmamızda referans gen olarak *GAPDH*'ı ve kıyaslama için de kontrol grubunu kullandık (57, 111).

$$\text{Kontrol } \Delta\text{CT} = \text{Kontrol CT}_{(c-fos)} - \text{Kontrol CT}_{(GAPDH)}$$

$$\text{Örnek } \Delta\text{CT} = \text{Örnek CT}_{(c-fos)} - \text{Örnek CT}_{(GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = [(\text{Örnek } \Delta\text{CT})_{\text{ort.}} - (\text{Kontrol } \Delta\text{CT})_{\text{ort.}}]$$

$$\text{Hedef gen (c-fos) mRNA miktarı} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

PCR doğası gereği eksponensiyel bir süreç olduğundan değişim 2'nin üstel fonksiyonu şeklinde ifade edilir. Verimi %100 olmadığı zaman mesela % 93 ise 2 yerine 1.93'ün üstel fonksiyonu olarak ifade edilir. Kontrol için elde edilen $\Delta\Delta\text{CT}$ değerleri yaklaşık olarak "0" olduğu için $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ değerleri de "1" 'e yakın olacaktır.

Elde ettiğimiz sonuç ilgilendiğimiz hedef genin örnek grubundaki ekspresyonunun kontrole göre relatif miktarıdır. Bir orantı ifadesi olduğundan birim içermez. Kontrole göre örnekteki hedef genin ekspresyonunun kaç kat arttığını göstermektedir.

2.5.13. Erime Eğrisi Analizi

c-fos ve *GAPDH* amplifikasyon ürünlerinin erime eğrisi analizlerine bakılarak spesifik ürünlerin T_m (erime sıcaklığı) değerleri saptanır. Spesifik olmayan ürünlere özgü farklı T_m değerlerinin olup olmadığına bakılarak real-time PCR işlemi sonucu oluşan ürünlerin kalitesi kontrol edilir (78).

2.6. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi

Sonuçların değerlendirilmesinde Windows SPSS 9.05 programında Tek Faktörlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) kullanılmıştır. İstatistiksel farkın belirlenme aralığı olarak $p<0.05$ kabul edilmiştir.

2.7. Etik Kurul Onayı

Çalışma başlangıcında, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2005/5-3 sayılı ve 08.09.2005 tarihli bir yazıyla söz konusu çalışma için onay alınmıştır.

BÖLÜM III

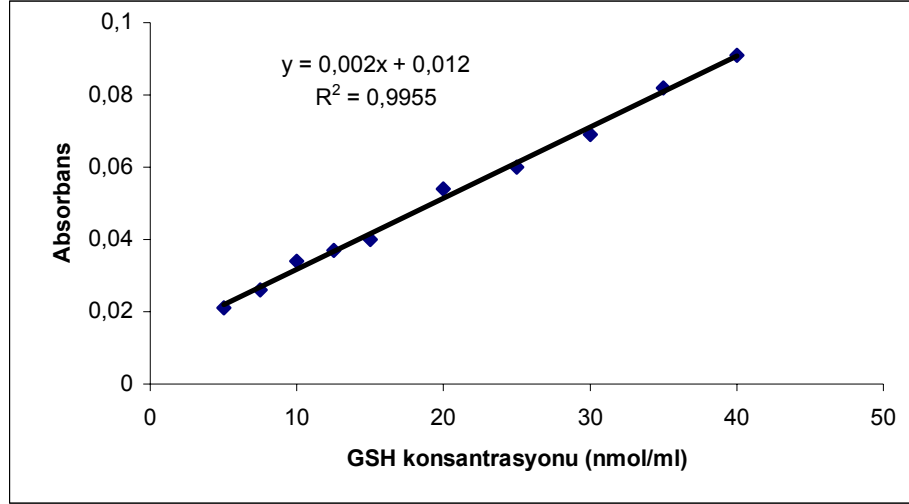
BULGULAR

3.1. GSH Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi

Çeşitli konsantrasyonlarda GSH taşıyan çözeltilerin spektrofotometredeki absorbans değerleri Tablo V'te sunulmuş ve Şekil 16'da bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Tablo V. GSH standart grafiğini oluşturan absorbans değerleri

Glutasyon (GSH) (nmol/ml)	Absorbans Ortalama \pm S.H.
5	0.021 \pm 0.0006
7.5	0.026 \pm 0.0003
10	0.034 \pm 0.0002
12.5	0.037 \pm 0.0004
15	0.040 \pm 0.0002
20	0.054 \pm 0.0002
25	0.060 \pm 0.0003
30	0.069 \pm 0.0004
35	0.082 \pm 0.0003
40	0.091 \pm 0.0003



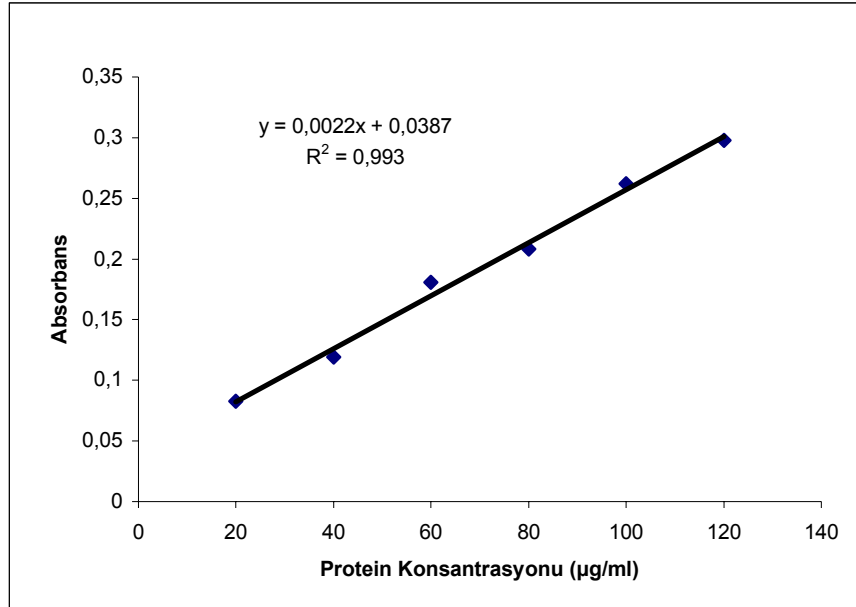
Şekil 16. GSH absorbans- konsantrasyon eğrisi

3.2. Protein Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi

Çeşitli konsantrasyonlarda BSA içeren çözeltilerin spektrofotometredeki absorbans değerleri Tablo VI'da sunulmuş ve Şekil 17'de değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Tablo VI. BSA standart grafiğini oluşturan absorbans değerleri

$\mu\text{g protein/ ml}$	Absorbans Ortalama \pm S.H.
20	0.083 \pm 0.003
40	0.119 \pm 0.001
60	0.181 \pm 0.008
80	0.208 \pm 0.001
100	0.262 \pm 0.001
120	0.298 \pm 0.005



Şekil 17. Protein absorbans- konsantrasyon eğrisi

3.3. Beyin Korteks ve Hipokampus Doku Örneklerinde GSH Düzeyleri

Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin korteks ve hipokampus örneklerinden elde edilen GSH düzeyleri (nmol/g protein) ile ortalama \pm S.H.'lar Tablo VII ile Şekil 18 ve 19'da verilmiştir.

Tablo VII. Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampus ve kortekslerindeki GSH düzeyleri ve ortalama \pm S.H.'ları.

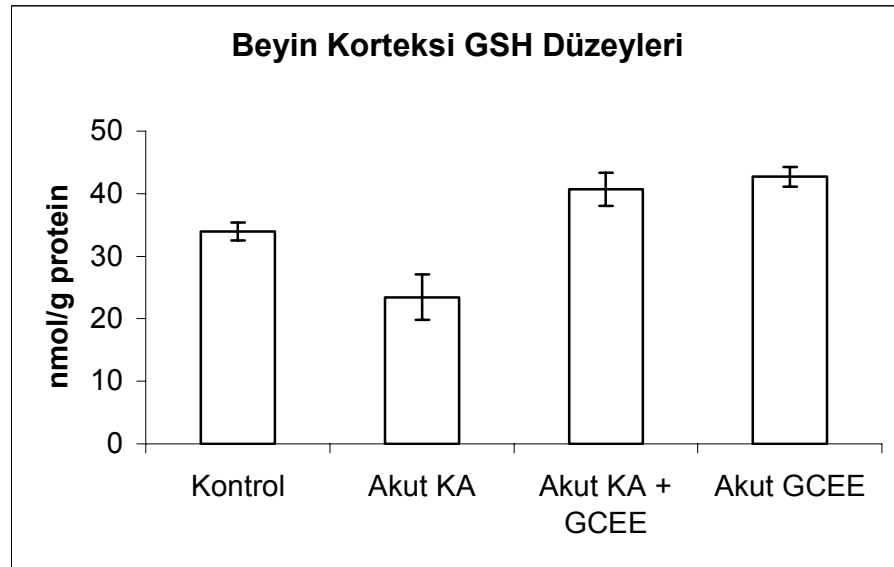
Uygulama	Beyin bölgesi	
	Hipokampus (nmol / g protein)	Korteks (nmol / g protein)
Kontrol (n=5-8)	30.10 \pm 2.213*	33.94 \pm 1.480***
Akut KA (n=5-8)	35.27 \pm 1.654**	23.46 \pm 3.652****
Akut KA + GCEE (n=5-8)	41.39 \pm 2.336	40.68 \pm 2.653
Akut GCEE (n=5-8)	42.01 \pm 1.410	42.7 \pm 1.550

* Kontrol ile Akut KA + GCEE grubu arasında ($p < 0.001$) ve Kontrol ile Akut GCEE grubu arasında ($p < 0.001$) anlamlı bir farklılık vardır.

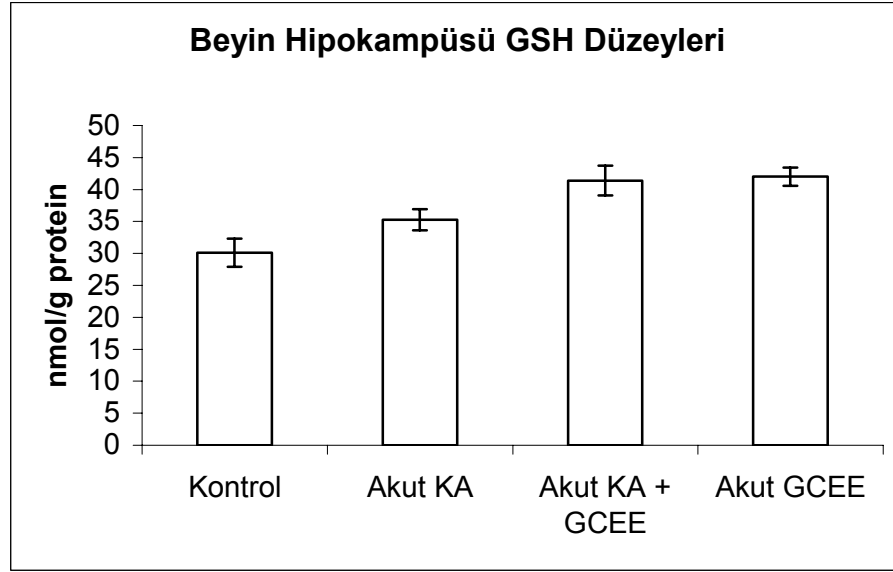
** Akut KA ile Akut KA + GCEE grubu arasında ($p < 0.05$) ve Akut KA ile Akut GCEE grubu arasında ($p < 0.05$) anlamlı bir farklılık vardır.

*** Kontrol ile Akut KA grubu arasında ($p < 0.05$) ve Kontrol ile Akut GCEE grubu arasında ($p < 0.05$) anlamlı bir farklılık vardır.

**** Akut KA ile Akut KA + GCEE grubu arasında ($p < 0.001$) ve Akut KA ile Akut GCEE grubu arasında ($p < 0.001$) anlamlı bir farklılık vardır.



Şekil 18. Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin kortekslerindeki GSH düzeylerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı



Şekil 19. Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampüslerindeki GSH düzeylerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı

3.4. Beyin Korteks ve Hipokampüs Doku Örneklerinden İzole Edilen Total RNA'ların A260/A280 oranları

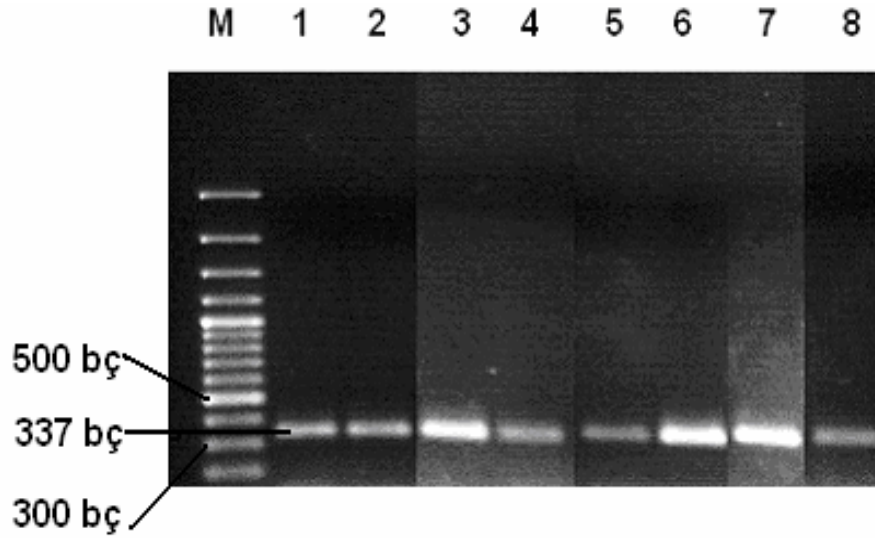
Total RNA izolasyonu yapılan beyin korteksleri ve hipokampüslerindeki total RNA A260/A280 oranı Tablo VIII'de gösterilmiştir.

Tablo VIII. Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampüsleri ve kortekslerindeki total RNA A260/A280 oranları (Ortamları \pm S.H.'ları)

Uygulama	Beyin bölgesi	
	Hipokampüs (A260/A280)	Korteks (A260/A280)
Kontrol (n=4-6)	2.05 \pm 0.032	1.94 \pm 0.074
Akut KA (n=4-6)	1.80 \pm 0.090	1.83 \pm 0.024
Akut KA + GCEE (n=4-6)	1.88 \pm 0.034	1.90 \pm 0.025
Akut GCEE (n=4-6)	1.86 \pm 0.038	1.92 \pm 0.033

3.5. Beyin Korteks ve Hipokampüs Doku Örneklerinde Konvansiyonel PCR ile elde edilen *c-fos* Ekspresyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Gösterimi

Korteks ve hipokampüs dokularında Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait birer örnek ile yapılan konvansiyonel PCR sonucu elde edilen *c-fos* ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi (Şekil 20).



Şekil 20. Beyin korteks ve hipokampüs doku örneklerinde *c-fos* ekspresyonunun agaroz jel üzerinde kalitatif olarak gösterilmesi (M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (marker), 1: Korteks Kontrol, 2: Korteks Akut KA, 3: Korteks Akut KA + GCEE, 4: Korteks Akut GCEE , 5: Hipokampüs Kontrol, 6: Hipokampüs Akut KA, 7: Hipokampüs Akut KA + GCEE, 8: Hipokampüs Akut GCEE).

3.6. Beyin Korteks ve Hipokampus Doku Örneklerinde *c-fos* Ekspresyon Düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi ile Hesaplanmasına Yönelik Bulgular

c-fos ekspresyonunun kantifikasyonu *GAPDH* geni referans olarak kullanılıp kontrol gurubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplaması olan " $2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi" kullanılmıştır. Gruplar ve dokular arasındaki farklılıklar aşağıdaki Tablo IX ile Şekil 21 ve Şekil 22'de gösterilmiştir.

Tablo IX. *c-fos* geninin Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampusleri ve kortekslerindeki $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri ve Ortalama \pm S.H.'ları.

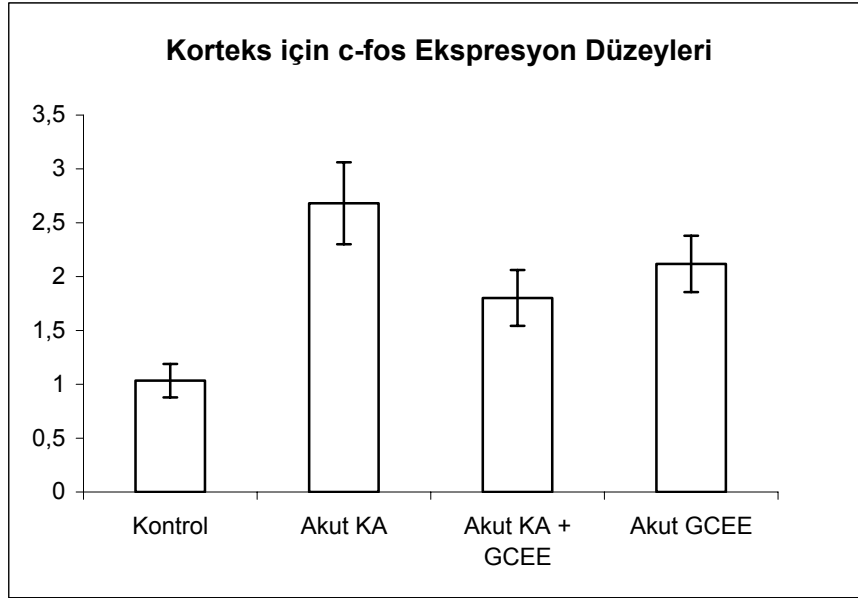
Uygulama	Beyin bölgesi	
	Hipokampus ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	Korteks ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Kontrol (n=4-6)	1.086 \pm 0.226*	1.034 \pm 0.155***
Akut KA (n=4-6)	3.711 \pm 0.805**	2.681 \pm 0.31****
Akut KA + GCEE (n=4-6)	1.407 \pm 0.083	1.802 \pm 0.259
Akut GCEE (n=4-6)	1.436 \pm 0.252	2.118 \pm 0.262

* Kontrol ile Akut KA grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.001$).

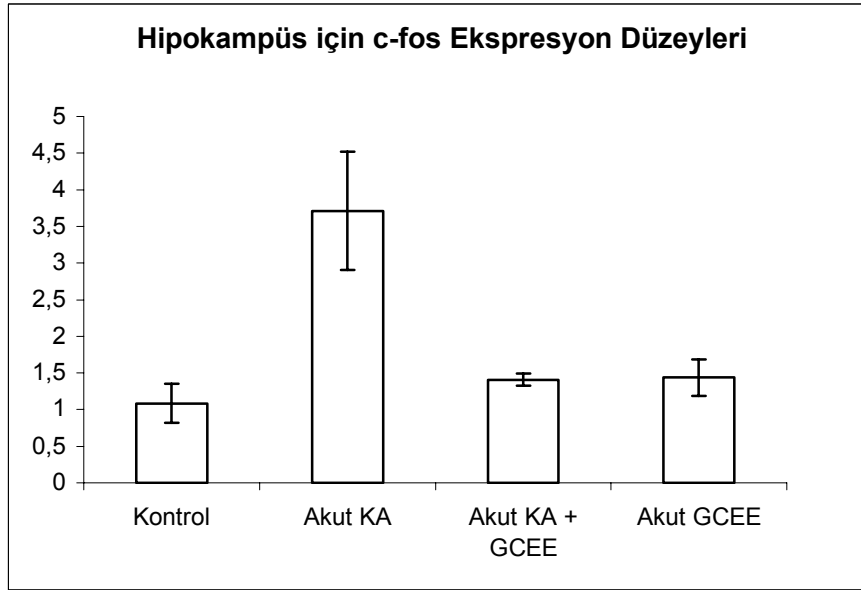
** Akut KA grubu ile Akut KA + GCEE grubu arasında ($p < 0.05$) ve Akut KA ile Akut GCEE grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.05$).

*** Kontrol ile Akut KA grubu arasında ($p < 0.001$) ve Kontrol ile Akut GCEE grubu arasında ($p < 0.05$) anlamlı bir farklılık vardır.

**** Akut KA grubu ile Akut KA + GCEE grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.05$).



Şekil 21. Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin kortekslerindeki *c-fos* ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama \pm S.H.).



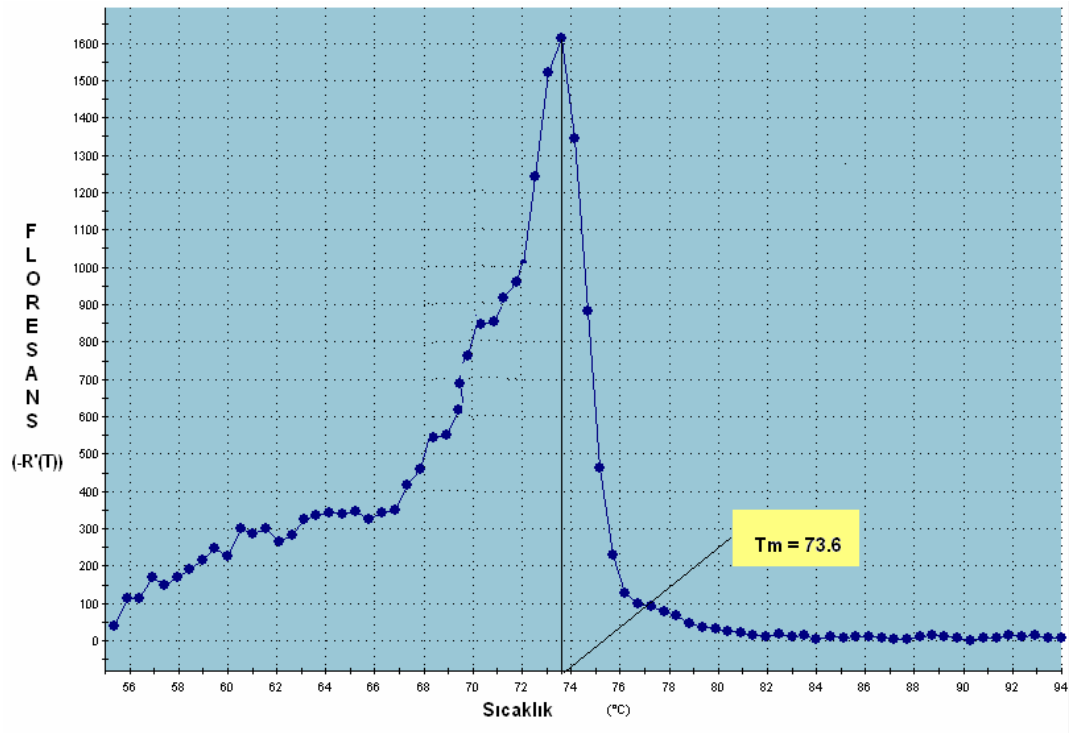
Şekil 22. Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampuslerindeki *c-fos* ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı (Ortalama \pm S.H.).

3.7. Real-Time PCR Sonucu Elde Edilen Ürünlerin Erime Eğrisi Analizi

Real-Time PCR sonucu oluşan korteks ve hipokampus dokularına ait *c-fos* ve *GAPDH* gen ürünlerinin erime eğrisi analizleri sonucu elde edilen erime sıcaklıkları (ortlama \pm S.H.) aşağıdaki Tablo X ve XI'de verilmiştir. *c-fos* ve *GAPDH*'a ait erime eğrisi örnekleri de Şekil 23 ve Şekil 24'te gösterilmiştir.

Tablo X. *c-fos* gen ürününün Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampusları ve kortekslerindeki Erime Sıcaklıkları (Ortalama \pm S.H.'ları).

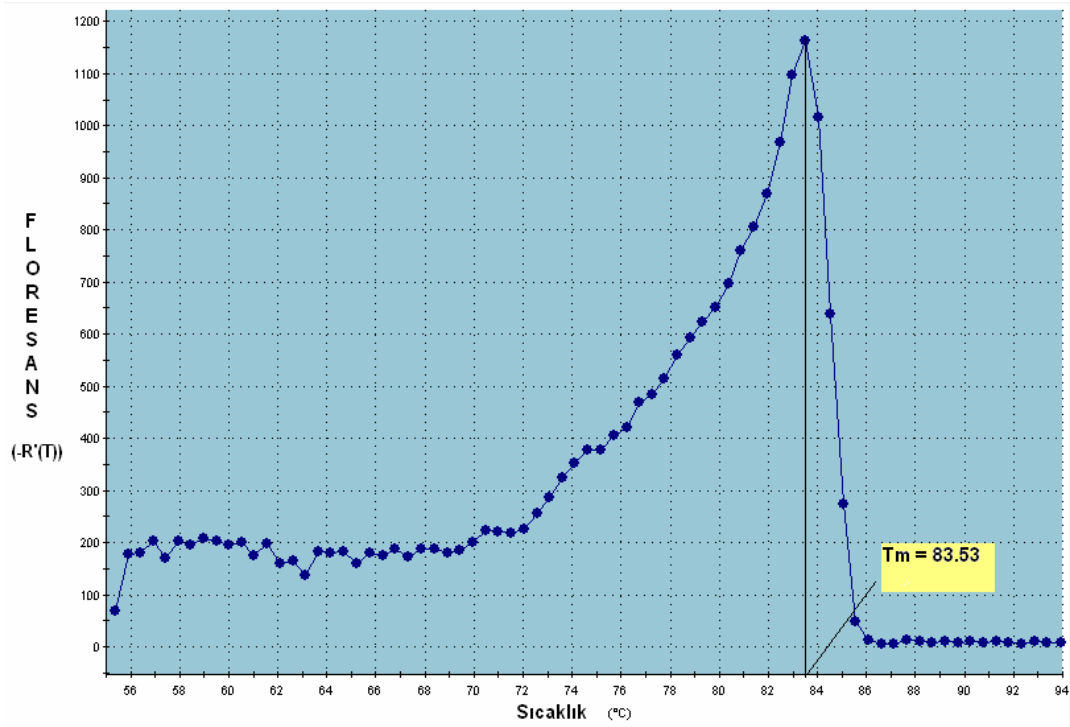
Uygulama	Beyin bölgesi	
	Korteks (<i>c-fos</i> Tm (°C))	Hipokampus (<i>c-fos</i> Tm (°C))
Kontrol (n=4-6)	73.61 \pm 0.000	73.60 \pm 0.000
Akut KA (n=4-6)	73.61 \pm 0.000	73.61 \pm 0.002
Akut KA + GCEE (n=4-6)	73.34 \pm 0.153	73.59 \pm 0.000
Akut GCEE (n=4-6)	73.34 \pm 0.153	73.46 \pm 0.130



Şekil 23. *c-fos*'a ait erime eğrisi örneği (Tm = 73.6 °C)

Tablo XI. *GAPDH* gen ürününün Kontrol, Akut KA, Akut KA + GCEE ve Akut GCEE gruplarına ait beyin hipokampus ve kortekslerindeki Erime Sıcaklıkları (Ortamala \pm S.H.'ları)

Uygulama	Beyin bölgesi	
	Korteks (<i>GAPDH</i> Tm (°C))	Hipokampus (<i>GAPDH</i> Tm (°C))
Kontrol (n=4-6)	84,07 \pm 0,000	83.26 \pm 0.156
Akut KA (n=4-6)	83,80 \pm 0,156	83.53 \pm 0.000
Akut KA + GCEE (n=4-6)	83,27 \pm 0,153	83.53 \pm 0.000
Akut GCEE (n=4-6)	83.53 \pm 0.000	83.53 \pm 0.000



Şekil 24. *GAPDH*'a ait erime eğrisi öneği (Tm = 83.53 °C)

BÖLÜM IV

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

4.1. Örnek Seçimiyle İlgili Tartışma

Kainik asit, beyin hücrelerinde hasar oluşturan ve limbik nöbetlere sebep olan bir eksitotoksindir (98). KA ile sıçanlarda oluşturulan nörodejenerasyon temporal lob epilepsisi ile benzerlikler göstermekte ve eksitoksisite ile ilişkili çeşitli nöropatolojik durumlar için iyi bir deney modeli oluşturmaktadır. KA kaynaklı eksitotoksisitenin nedenleri arasında serbest radikallerin aşırı üretimi, bazı apoptotik yolların aktivasyonu ve *c-fos*'un da üyesi olduğu akut faz genlerinin anormal indüksiyonu yer almaktadır (23, 76).

GSH biyosentezi prekürsörü olan GCEE, beyinde GSH düzeylerini arttırmak suretiyle antioksidan özellik göstermektedir. Doğal yapısı gereği antioksidan kapasitesi düşük olan beyin dokusunun oksidatif stres kaynaklı nöropatolojilere karşı korunmasında GSH düzeylerinin artırılması terapötik açıdan giderek önem kazanmaktadır (12, 27, 35).

Bu çalışmada erkek sıçanlarda akut KA uygulaması ile nörodejenerasyon oluşturulup GSH ve *c-fos* mRNA ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Nörodejenerasyon ve apoptotik mekanizmaların erken bir belirteci olarak düşünülen *c-fos* düzeylerindeki değişimin saptanması için de yeni bir moleküler yöntem olan Real-Time PCR kullanılmıştır. Ayrıca akut

GCEE ve akut KA + GCEE uygulaması ile GCEE'nin GSH düzeylerini arttırmadaki etkinliği sınanmıştır.

4.2. c-fos Ekspresyonunun Saptanmasında Seçilen Yöntem İle İlgili Tartışma

Hücre yaşamının devamı, büyüme ve farklılaşma gibi hücresel süreçler spesifik genlerin ekspresyonlarındaki değişimler vasıtasıyla sağlanmaktadır. Eksprese olan genlerin düzeyleri; hücre siklusunun hangi safhasında olduğuna bağlı olmakla birlikte sitokinler, hormonlar, ilaç veya herhangi bir dış uyarana maruziyet sonucu da değişebilir. Bu nedenle gen ekspresyonu analizleri; spesifik mRNA dizilerinin hassas, kesin ve tekrar edilebilir ölçümlerine olanak sağlamalıdır. Genellikle gen ekspresyonunun kantifikasyonu için Northern Blot Analizi, İn situ hibridizasyon , RNaz Koruma yöntemi ve Revers transkripsiyon PCR (RT-PCR) yöntemleri kullanılmaktadır (15, 74).

RT-PCR; dizisi belli RNA örneklerinden enzimatik olarak amplifikasyonun yapıldığı ve değişik miktarlarda örneklerle çalışma imkanı veren *in vitro* enzimatik bir yöntemdir. RT-PCR yöntemi, gen ekspresyonunun saptanması açısından en hassas yöntemlerden biridir ve farklı örnek populasyonlarındaki mRNA düzeylerini karşılaştırma olanağı sunmaktadır. Deney zamanı açısından çok avantajlı olmamakla birlikte sonuçların spesifikliği nedeniyle en çok tercih edilen yöntem olarak bilinmektedir. Gen ekspresyonun saptanmasında yeni uygulanmaya başlayan diğer bir yöntem de cDNA çipleridir (74, 108).

Çalışmamızda beyin hipokampus ve korteks dokularında *c-fos* geninin ekspresyonunu saptamak üzere RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. RT-PCR yöntemi ile az miktardaki dokudan veya farklı hücre populasyonlarından elde edilen RNA örnekleri ve nadir eksprese edilen RNA örnekleri ile çalışma imkanı sağlanmaktadır. RT-PCR yönteminde M-MuLV (Moloney Murine Leukaemia Virus) revers transkriptaz enzimi yeni sentezlenmiş cDNA iplikçliğini, belirlenmiş primerlerin bağlandığı bölgelerden sentezler. Primer olarak “random” , “oligo-dT” veya “dizi (sekans) spesifik” primerler kullanılabilir. Primer seçimi kantifikasyonu etkilediği için çok önemlidir. Primer olarak oligo-dT kullanılmışsa poly(A)-mRNA'nın 3'-ucundan, random primer kullanılmışsa RNA kalıbı üzerindeki herhangi bir noktadan veya sekans-spesifik bir primer ile primer-bağlanma bölgesinden başlanarak cDNA sentezi gerçekleşir. Sentezlenen tek iplikçikli cDNA'lar daha sonra gerçekleştirilecek herhangi bir PCR amplifikasyonu için kalıp görevi görür (14, 15, 44).

RT-PCR'ın düzgün bir şekilde gerçekleşmesi bazı parametrelere bağlıdır. Revers transkripsiyonu yapılan RNA'lar yüksek kalitede olmalıdır. DNA ve nükleaz içermemeli ayrıca revers transkripsiyonu inhibe edecek herhangi bir madde ile kontamine olmamalıdır. Çalışmamızda kullandığımız RNA'ların A260/A280 oranlarının 1.6-2.0 arasında değişmesi dokulardan yapılan RNA izolasyonlarının doğru olduğunu göstermektedir.

Real-time PCR, konvansiyonel PCR sonrası işlemlere gerek kalmadan ürün kantifikasyonuna olanak sağlar. Konvansiyonel PCR'da elde edilen ürün agaroz veya poliakrilamid jellere uygulanıp floresan veya radyoaktif boyalarla boyanarak dansitometrik olarak analiz edilmektedir. Elektroforetik yöntemlerin dezavantajları; kesinliğinin ve ayrışmanın az olması, düşük

duyarlılık göstermesi, dinamik aralığının dar olması, zaman alıcı bir yöntem olması ve sadece ürün büyüklüğüne bağlı olarak ayırım yapılmasıdır (74, 104).

Çalışmamıza konu olan *c-fos* ve *GAPDH* genlerinin amplifikasyon ürünleri için yapılmış olan erime eğrisi analizi ve jel elektroforezi sonuçları bu genlerin ekspresyonlarının başarılı bir şekilde saptanabildiğinin göstergesidir (65, 78).

4.3. Beyin Korteks ve Hipokampus Doku Örneklerinde GSH Düzeyleri ile İlgili Tartışma

Çalışmamızda akut GCEE uygulanmasının beyin korteksi ve hipokampusünde GSH düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttırdığı saptanmıştır. Aynı zamanda eksitator bir ajan olan KA ve GCEE'nin birlikte uygulanması sonucunda hipokampus ve korteks GSH düzeylerinde akut KA grubuna göre anlamlı artış bulunmuştur.

Ceccon ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada eksitotoksik bir ajan olan KA'in tek başına beyinde GSH içeriğinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (17). Ancak, Gupta ve diğerleri (38) tarafından yapılan bir çalışmada KA uygulanan sıçanların beyin dokusunda GSH düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Gluck ve diğerleri (35) tarafından yapılan bir çalışmada ise 12 mg/kg dozunda KA uygulanmasının beyin korteksindeki GSH düzeylerine etkisi incelenmiş ve 4 saatlik bir süre sonunda GSH düzeyinin 18.5 nmol/g protein olduğu saptanmıştır. Söz konusu çalışmada hiç KA uygulanmamış kontrol grubunun GSH düzeyi 27.1 nmol/g

protein olarak saptanmış ve KA uygulamasının GSH düzeylerinde %68 oranında bir azalmaya neden olabileceği gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda kullandığımız 10 mg/kg'lık KA dozu beyin korteks bölgesinde kontrol grubuna kıyasla %69 oranında bir azalmaya neden olurken hipokampüste anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

Drake ve diğerleri (27) tarafından beyin dokusunda GCEE'nin GSH'a benzer bir şekilde antioksidan bir etki gösterdiği *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir. Aynı çalışmada sıçanlarda i.p. GCEE uygulamasının GSH düzeylerinde %41 oranında bir artışa neden olduğu ve γ -glutamilsistein sentetaz inhibitörü olan butiyonin sülfoksimin (BSO) uygulaması sonucu %40 oranında düşen beyin GSH düzeylerinin, BSO uygulamasını takiben GCEE uygulaması ile beraber arttığı saptanmıştır.

GSH sentezinin sınırlayıcı basamağı γ -glutamilsistein sentetazdır ve GSH tarafından geri-besleme mekanizmasıyla inhibisyona uğramaktadır. GSH sentezine yönelik olarak GCEE kullanımı ile sistein yerine γ -glutamilsistein sağlanmakta ve inhibisyon önlenmektedir (77). Glutatyon etil esteri ve glutatyon dietil esteri plazma membranını geçmede glutatyona göre daha etkilidir (3, 54). Bu nedenle γ -glutamilsisteinin etil esterinin beyin GSH düzeylerini arttırmada daha etkili olması amaçlanmıştır (12, 27).

GSH biyosentez prekürsörlerinden biri olan sistein kullanımı ile GSH düzeylerinin arttığına dair çalışmalar da bulunmaktadır. Ancak, yüksek doz sisteinin toksik etkileri nedeniyle beyin GSH düzeylerini arttırmak için kullanımı uygun bulunmamaktadır. Benzer şekilde N-asetilsistein (NAC) kullanılarak yapılan çalışmalarda beyin GSH düzeylerinin arttığı ve sinaptozomların peroksinitrit ve hidroksil radikali kaynaklı oksidatif strese

karşı korunduğu ortaya konulmuştur. Ancak, N-asetilsistein'in etkinliği hala tartışmalıdır (10, 84).

Sonuç olarak, çalışmamızda GSH biyosentez prekürsörü olan GCEE uygulamasını takiben beyinde artmış bulunan GSH içeriği GCEE'nin potansiyel bir nöroprotektif ajan olarak kullanabileceğine yönelik daha önceki bulguları desteklemektedir.

4.4. Beyin Hipokampus ve Korteks Doku Örneklerinde *c-fos* Ekspresyonuna Yönelik Tartışma

c-fos herhangi bir uyarana karşı ilk yanıt veren genlerdendir. *c-fos*; hücreleri etkileyerek büyüme, farklılaşma ve adaptif yanıtların gelişmesini sağlayan etkenler tarafından transkripsiyonel açıdan hızlı ve geçici olarak uyarılır. Çeşitli mitojenler, büyüme faktörleri, glukokortikoidler, insulin, hücre içi Ca^{+2} düzeyi, nörodejenerasyon, stres, fenolik ve tiyol içeren antioksidanlar *c-fos* ekspresyonunu etkileyen faktörlerdir (18, 20, 88).

c-fos çekirdeksel bir üçüncül haberci olarak değerlendirilir. *c-fos* proteinleri ile *c-jun* proteinlerinin heterodimerleşmesi sonucu oluşan AP-1 transkripsiyon kompleksi hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozisde önemli rol oynamaktadır (22). Oksidatif strese karşı indüklenen *c-fos* ekspresyonu AP-1 aktivasyonu ile olmaktadır. AP-1 aktivasyonu hücrel redoks potansiyeline bağlı olarak artmaktadır. Hücrel tiyoredoksin ve glutatyon içeriğine bağlı olarak gerçekleşen AP-1 aktivasyonu yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (86). Benzer şekilde hücrel redoks potansiyelindeki değişim *c-fos* ekspresyonunu da etkilemektedir (87). Meyer

ve diğerlerinin (63) yaptığı çalışma NAC gibi tiyol sağlayıcı bir birleşimin AP-1'in transaktivasyonunu ve DNA bağlama aktivitesini arttırdığını göstermiştir. Schenk ve diğerlerinin (82) yaptığı çalışmada ise tiyoredoksin ekspresyonunun artışı AP-1'in transkripsiyonel aktivitesini indüklemiştir (42).

Çalışmamızda kullandığımız GSH biyosentez prekürsörü olan GCEE'nin akut uygulamasında, hipokampus ve kortekste *c-fos* ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. GCEE'nin GSH düzeylerini artırıcı etkisi *c-fos* ekspresyon düzeylerinde de artışa neden olmuştur. Literatürde GCEE ile ilgili çok az çalışma vardır. GCEE uygulamasının gen ekspresyonu üzerine olan etkileriyle ilgili hiçbir yayın bulunmamaktadır. Bizim çalışmamız GCEE uygulaması sonucu *c-fos* düzeylerindeki değişimin gösterilmesi açısından bu alanda yapılan *ilk çalışma* olma özelliğindedir.

KA kaynaklı eksitotoksisitede *c-fos* ekspresyonunun arttığını gösteren *in vivo* ve *in vitro* bir çok çalışma yapılmıştır. Willoughby ve diğerlerinin (106) yaptığı çalışmada; i.v. olarak 10 mg/kg KA uygulanmış sıçanlarda *c-fos* indüksiyonu immunohistokimyasal bir yöntem ile ve KA'nin neden olduğu nöbetler de elektroensefalografi (EEG) ile incelenmiştir. *c-fos* indüksiyonu KA enjeksiyonunu takiben en erken 10 dk içinde başlamakta ve bu süre içerisinde KA'ye bağlı tipik davranışsal değişiklikler gözlenmektedir. Diğer önemli bir bulgu da *c-fos* indüksiyonunun ilk olarak hipokampüste daha sonra ise kortekste saptanmış olmasıdır. Bizim çalışmamızda da akut KA uygulaması sonucu hipokampüste saptanan *c-fos* ekspresyonunun kortekse oranla daha fazla olması bu araştırma ile benzerlik göstermektedir.

Griffiths ve diğerklerinin (37) yaptığı çalışmada neokortikal ve serebral nöron hücre kültüründe KA'in düşük (10 μ M) ve yüksek (250 μ M) doz uygulamalarına karşı gelişen *c-fos* ekspresyonundaki değişim Northern Blot ve Dot Blot analizleri ile saptanmıştır. Ayrıca sitotoksisitenin belirlenmesi için LDH aktivitesi ölçülmüştür. Nöronlar 2 (akut) ve 7 gün (kronik) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Her iki grupta da *c-fos* ekspresyonunda artış saptanmıştır. Fakat kronik uygulamada *c-fos* düzeylerindeki artış daha fazla olup LDH düzeylerindeki artış ile paralellik göstermiştir.

Vanhoutte ve diğerklerinin (103) alışması; glutamat kaynaklı eksitotoksisite sonucu *c-fos* ekspresyonundaki artışın CRE fosforilasyonu ve ERK aktivasyonu vasıtasıyla olduğunu göstermektedir.

Goodenough ve diğerkleri (36) tarafından yapılan bir çalışmada ise i.v olarak 12 mg/kg KA uygulanan sıçanlarda beynin çeşitli bölgelerinde apoptotik ölümün bir göstergesi olan DNA fragmentasyonu incelenmiştir. Sözkonusu alışmada DNA fragmentasyonunun *c-fos* indüksiyonun arttığı hipokampüs ve korteks dokularında, AP-1 aktivasyonu ile birlikte gerçekleştiği gösterilmiştir.

Çalışmamızda hipokampüs dokularında saptanmış olan *c-fos* mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında akut KA grubundaki ekspresyon düzeyiyle kontrol , akut KA + GCEE ve akut GCEE arasında anlamlı farklılıklar bulunduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde korteksteki *c-fos* ekspresyon düzeylerine bakıldığında akut KA grubu ile kontrol ve akut KA + GCEE grubu arasında anlamlı farklılıklar bulunmaktadır.

Buna dayanarak, akut KA uygulamasının hipokampüs ve kortekste *c-fos* mRNA ekspresyon düzeyinde neden olduğu artışın eksitotoksisiteye bağlı

nörodejeneratif bir yanıt olabileceği söylenebilir. Bu açıdan bulgularımızın *c-fos*'un nörodejeneratif süreçlerde erken bir belirteç olabileceğine yönelik literatürlerle uyumlu olduğu da görölmektedir.

ÖZET

KAINİK ASİT ARACILI EKŞİTOTOKSİSİTEDE HÜCRESEL REDOKS DÜZEYLERİ VE C-FOS mRNA EKŞPRESYONU

Glutamat kaynaklı ekşitotoksisite epilepsi, inme ve Alzheimer gibi santral sinir sistemi patolojilerinin altında yatan nörodejeneratif süreçlerde tetikleyici bir faktördür. Glutamat reseptörlerinin aşırı stimülasyonu; hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin artışına, reaktif oksijen türlerinin üretimine ve *c-fos* gibi akut faz genlerinin aşırı ekşpresyonuna neden olmaktadır. Glutamat analogu olan kainik asit (KA) beyinde amigdala, korteks ve hipokampus gibi bölgelerde ekşitotoksisiteye neden olmaktadır. Beyindeki antioksidan kapasitenin az olması nedeniyle oksidatif strese karşı savunmada glutatyonun (GSH) önemi büyüktür. GSH biyosentez prekürsörü olan γ -glutamilsistein etil esteri (GCEE) beyinde GSH düzeylerini arttırmaktadır.

Çalışmada Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmış ve deneyler kontrol (n=5-8), akut KA (n=5-8), akut KA + GCEE (n=5-8), akut GCEE (n=5-8) olacak şekilde 4 grupta hipokampus ve korteks dokuları kullanılarak yapılmıştır. KA ile indüklenen ekşitotoksik beyin hasarında *c-fos* mRNA düzeylerinde görülen artış real-time PCR ile saptanmış ve GCEE'nin beyin GSH düzeylerine olan etkisi spektrofotometrik yöntemle gösterilmiştir.

Sonuçlarımıza göre, kontrol grubu ile kıyaslandığında akut KA uygulaması alan grupta hipokampüs ve kortekste *c-fos* ekspresyon düzeyinin anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. *c-fos* mRNA düzeylerindeki bu artış nöronal hücre ölümü ve nörodejenerasyonun erken bir belirteci olarak kullanılabilir. Yanı sıra, KA'e karşı GCEE uygulaması, akut KA grubu ile kıyaslandığında hipokampüs ve korteks GSH düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Bu sonuçlar ışığında GCEE; beyin GSH düzeylerini arttırıcı etkisi nedeniyle nörodejeneratif bozukluklarda antioksidan tedavi amacıyla kullanılabilir.

ABSTRACT

C-FOS mRNA EXPRESSION AND CELLULAR REDOX STATUS IN KAINIC ACID INDUCED EXCITOTOXICITY

Glutamate induced excitotoxicity is a triggering factor that causes neurodegeneration underlying central nervous system (CNS) pathologies like epilepsy, stroke and Alzheimer's disease. Overstimulation of glutamate receptors results in increased levels of intracellular Ca^{+2} , production of reactive oxygen species and overexpression of immediate early genes like *c-fos*. Kainic acid (KA) is an analogue of glutamate and can induce excitotoxicity in specific areas of brain like amygdala, cortex and hippocampus. Because of the inadequate antioxidant capacity of brain, glutathione (GSH) is highly important for defense against oxidative stress. γ -glutamylcysteine ethyl ester (GCEE), GSH biosynthesis precursor, can upregulate GSH levels in brain.

In this study, Sprague-Dawley rats were used and divided into four groups as control (n=5-8), acute KA (n=5-8), acute KA + GCEE (n=5-8) and acute GCEE (n=5-8).

To investigate the effects of KA and GCEE, the levels of GSH and *c-fos* mRNA expressions were measured in rat brain cortex and hippocampus using spectrophotometric, and real-time PCR methods, respectively.

Our results show that acute KA treatment significantly upregulates expression of *c-fos* in hippocampus and cortex when compared to control group. GCEE treatment against KA causes significant increase in GSH levels in cortex and hippocampus when compared with acute KA group. Therefore, we conclude that the up-regulated levels of *c-fos* mRNA can be used as an early biomarker of neuronal death and neurodegeneration.

In addition, GCEE treatment may be helpful as a potential antioxidant agent because of its upregulating effect on brain GSH levels against neurodegenerative processes triggered by KA.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Abraham, W.C., Mason, S.E., Demmer, J., Williams, J.M., Richardson, C.L., Tate, W.P., Lalor, P.A., Dragunow, M. (1993). Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation, *Neuroscience*, 56: 717-727.
2. Anderson, M.E., Luo, J.L. (1998). Glutathione therapy: From prodrugs to genes, *Semin Liver Dis*, 18: 415-424.
3. Anderson, M.E., Meister, A. (1989). Glutathione monoesters, *Anal Biochem*, 183: 16-20.
4. Arrigo, A.P. (1999). Gene expression and the thiol redox state, *Free Radic Biol Med*, 27: 936-944.
5. Bains, S.J., Shaw, C.A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: The role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death, *Brain Res Rev*, 25: 335-358.
6. Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., Clark, B.J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: Analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues, *Physiol Genomics*, 21(3): 389-395.
7. Bartus, R.T., Hayward, N.J., Elliott, P.J., Sawyer, S.D., Baker, K.L., Dean, R.L., Akimaya, A., Straub, J.A., Harbeson, S.L., Li, Z. (1994). Calpain Inhibitor AK295 Protects Neurons from Focal Brain Ischemia, Effects of Postocclusion Intra-arterial Administration, *Stroke*, 25(11): 2265-2270.
8. Beal, M.F. (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses?, *Ann Neurol*, 31: 119-130.

9. Beckman, J.S., Koppenol, W.H. (1996). Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: The Good, The Bad, and Ugly, *Am J Physiol*, 271(5): 1424-1437.
10. Bharath, S., Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalan, S., Andersen, J.K. (2002). Glutathione, iron and Parkinson's disease, *Biochem Pharmacol*, 64: 1037-1048.
11. Bliss, T.V., Collingridge, G.L. (1993). A Synaptic Model of Memory: Long-term Potentiation in the Hippocampus, *Nature*, 361(6407): 31-39.
12. Boyd-Kimball, D., Sultana, R., Abdul, H.M., Butterfield, D.A. (2005). Gamma-glutamylcysteine ethyl ester-induced up-regulation of glutathione protects neurons against Abeta(1-42)-mediated oxidative stress and neurotoxicity: Implications for Alzheimer's disease, *J Neurosci Res*, 79(5): 700-706.
13. Buchanan, B.B., Schurmann, P., Decottignies, P., Lozano, R.M. (1994). Thioredoxin: A multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine, *Arch Biochem Biophys*, 314: 257-260.
14. Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *J Mol Endocrinol*, 25: 169.
15. Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems, *J Mol Endocrinol*, 29: 23-39.

16. Cassarino, D.S., Bennett, J.P. (1999). An Evaluation of the Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: Mitochondrial Mutations and Oxidative Pathology, Protective Nuclear Responses, and Cell Death in Neurodegeneration, *Brain Res Brain Res Rev*, 29(1): 1-25.
17. Ceccon, M., Giusti, P., Facci, L., Borin, G., Imbesi, M., Floreani, M., Skaper, S.D. (2000). Intracellular Glutathione Levels Determine Cerebellar Granule Neuron Sensitivity to Excitotoxic Injury by Kainic Acid, *Brain Res*, 862: 83-89.
18. Choi, D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of nervous system, *Neuron*, 1: 623-634.
19. Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate Neurotoxicity in Cortical Cell Culture, *J Neurosci*, 7(2): 357-368.
20. Choi, H.S., Moore, D.D. (1993). Induction of *c-fos* and *c-jun* gene expression by phenolic antioxidants, *Mol Endocrinol*, 7: 1596-1607.
21. Chomczynski, P. (1993). A Reagent for the Single-step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. *Biotechniques*, 15: 532-537.
22. Cohen, D.R., Curran, T. (1989). The structure and function of the *fos* proto-oncogene, *Crit Rev Oncogene*, 1: 65-88.
23. Coyle, J.T., Puttfarcken, P. (1993). Oxidative Stress, Glutamate, and Neurodegenerative Disorders, *Science*, 262(5134): 689-695.
24. Curan, T., MacConnell, W.P., Van Straaten, F., Verma, I.M. (1983). Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome, *Mol Cell Biol*, 3: 914-921.

25. Curran, T., Teich, N.M. (1982). Identification of a 39.000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus, *Virology*, *116*: 221-233.
26. Dickinson, D.A., Forman, H.J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism, *Biochem Pharmacol*, *64*: 1019-1026.
27. Drake, J., Kanski, J., Varadarajan, S., Tsoras, M., Butterfield, D.A. (2002). Elevation of brain glutathione by GCEE protects against peroxynitrite-induced oxidative stress, *J Neurosci*, *68*: 776-784.
28. Dringen, R. (2000). Metabolism and Functions of Glutathione in Brain, *Prog Neurobiol*, *62*: 649-671.
29. Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiol Rev*, *82*: 47-95.
30. Dunnett, S.B., Bjorklund, A. (1999). Prospects for New Restorative and Neuroprotective Treatments in Parkinson's Disease, *Nature*, *399*(6738): 32-39.
31. Farooqui, A.A., Horrocks, L.A. (1991). Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders, *Brain Res Rev*, *16*: 171-191.
32. Floyd, R.A., Carney, J.M. (1992). Free radical damage to protein and DNA: Mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress, *Ann Neurol*, *32*: 22-27.
33. Foletta, W.C., Sonobe, M.H., Suzuki, T., Endo, T., Iba, H., Cohen, D.R. (1994). Cloning and characterisation of the Mouse fra-2 gene, *Oncogene*, *9*: 3305-3311.

34. Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P., Youdim, M.B. (1994). Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases?, *J Neurochem*, 63(3): 793-807.
35. Gluck, M.R., Jayatileke, E., Shaw, S., Rowan, A.J., Haroutunian, V. (2000). CNS Oxidative Stress Associated with the Kainic acid Rodent Model of Experimental Epilepsy, *Epilepsy Res*, 39: 63-71.
36. Goodenough, S., Davidson, M., Chen, W., Beckmann, A., Pujic, Z., Otsuki, M., Matsumoto, I., Wilce, P. (1997). Immediate early gene expression and delayed cell death in limbic areas of the rat brain after kainic acid treatment and recovery in the cold, *Exp Neurol*, 145: 451-461.
37. Griffiths, R., Malcolm, C., Ritchie, L., Frandsen, A., Schousboe, A., Scott, M., Rumsby, P., Meredith, C. (1997). Association of c-fos mRNA expression and excitotoxicity in primary cultures of mouse neocortical and cerebellar neurons, *J Neurosci Res*, 48(6): 533-542.
38. Gupta, Y.K., Brial, S. (2006). Protective Effect of Vinorelbine Against Kainic Acid Induced Seizures, Oxidative Stress and on the Expression of Heat Shock Proteins in Rats, *Eur Neuropsychopharmacol*, 16: 85-91.
39. Guzowski, J.F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches, *Hippocampus*, 12(1): 86-104.
40. Herdegen, T., Leah, J.D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: Control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins, *Brain Res Rev*, 28: 370-490.

41. Hill, C.S., Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity, *Cell*, 80: 21-199.
42. Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 3633-3638.
43. Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugwara, M., Funk, C.D. (1997). Mice Deficient in Cellular Glutathione Peroxidase Develop Normally and Show No Increased Sensitivity to Hyperoxia, *J Biol Chem*, 272(26): 16644-16651.
44. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S.A., Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations, *Genes Immun*, 4: 279-284.
45. Humphries, A., Carter, D.A. (2004). Circadian dependency of nocturnal immediate-early protein induction in rat retina, *Biochem Biophys Res Commun*, 320(2): 551-556.
46. Janaky, R., Ogita, K., Pasqualotto, B.A., Bains, J.S., Oja, S.S., Yoneda, Y. (1999). Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS, *J Neurochem*, 73: 889-902.
47. Jones, D.P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance, *Methods Enzymol*, 348: 93-112.
48. Kanan, R., Kuhlenkamp, J.F., Ookthens, M., Kaplowitz, N. (1992). Transport of glutathione at blood-brain barrier of the rat: Inhibition by glutathione analogs and age-dependence, *J Pharmacol Exp Ther*, 263: 964-970.

49. Karin, M., Liu, Z.G., Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation, *Cell Biol*, 9: 240-246.
50. Kato, K., Puttfarcken, P.S., Lyons, W.E., Coyle, J.T. (1991). Developmental Time Course and Ionic Dependence of Kainate-Mediated Toxicity in Rat Cerebellar Granule Cell Cultures, *J Pharmacol Exp Ther*, 256(1): 402-411.
51. Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins, *Nature*, 224: 1759-1762.
52. Lau, L.F., Nathans, D. (1985). Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells, *EMBO J*, 4: 3145-3151.
53. Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes, *Nucleic Acids Res*, 21(16): 3761-3766.
54. Levy, E.J., Anderson, M.E., Meister, A. (1993). Transport of glutathione diethyl ester into human cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 9171-9175.
55. Lim, R.W., Varnum, C., Herschman, H.R. (1987). Cloning of tetradecanoil phorbol ester-induced primary response sequences and their expression in density-arrested swiss 3T3 cells and a TPA nonproliferative variant, *Oncogene*, 1: 263-270.
56. Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization, *PCR Methods Appl*, 4(6): 357-362.

57. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method, *Methods*, 4: 402- 408.
58. Lloyd, R.V., Osamura, R.Y. (1997). Transcription factors in normal and neoplastic pituitary tissues, *Microsc Res Tech*, 39(2): 168-181.
59. Lorenzini, A., Tresini, M., Maval-Dewan, M., Frisoni, L., Zhang, H., Allen, R.G., Sell, C., Cristofalo, V.J. (2002). Role of Raf/MEK/ERK and the PI3/Akt (PKB) pathways in fibroblast senescence, *Exp Gerontol*, 37: 1149-1156.
60. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent, *J Biol Chem*, 193: 265-375.
61. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J Nutr Biochem*, 16: 577-586.
62. Mattson, M.P., Mark, R.J. (1996). Excitotoxicity and excitoprotection *in vitro*, *Adv Neurol*, 71: 1-37.
63. Meyer, M., Schreck, R., Baeuerle, P.A. (1993). H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor, *EMBO J*, 12: 2005-2015.
64. Monaghan, D.T., Bridges, R.J., Cotman, C.W. (1989). The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system, *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 29: 365-402.

65. Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, *Biotechniques*, 6: 954-962.
66. Multhaupt, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1997). Reactive oxygen species and Alzheimer's disease, *Biochem Pharmacol*, 54: 533-539.
67. Njalsson, R., Norgren, S. (2005). Physiological and pathological aspects of GSH metabolism, *Acta Paediatrica*, 94: 132-137.
68. Nomura, Y. (2004). Neuronal Apoptosis and Protection, *Biol Pharm Bull*, 27(7): 961-963.
69. Oo, T.F., Henchcliffe, C., James, D., Burke, R.E. (1999). Expression of c-fos, c-jun, and c-jun N-terminal kinase (JNK) in a developmental model of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra, *J Neurochem*, 72(2): 5575-5564.
70. Park, D.S., Obeidat, A., Giovanni, A., Greene, L.A. (2000). Cell Cycle Regulators in Neuronal Death Evoked by Excitotoxic Stress: Implications for Neurodegeneration and Its Treatment, *Neurobiol Aging*, 21: 771-781.
71. Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piomonte, F. (2003). Analysis of glutathione : Implication in redox and detoxification, *Clin Chim Acta*, 333: 119-139.
72. Porter, N.A. (1984). Chemistry of Lipid Peroxidation, *Method Enzymol*, 105: 273-282.
73. Powis, G., Briehl, M., Oblong, J. (1995). Redox signalling and the control of cell growth and death, *Pharmacol Ther*, 68: 149-173.

74. Raeymaekers, L. (2000). Basic principles of quantitative PCR, *Mol Biotechnol*, 15(2): 115-122.
75. Ransone, L.J., Verma, I.M. (1990). Nuclear proto-oncogenes FOS and JUN, *Annu Rev Cell Biol*, 6: 539-557.
76. Riba-Bosch, A., Pérez-Clausell, J. (2004). Response to kainic acid injections: Changes in staining for zinc, FOS, cell death and glial response in the rat forebrain, *Neuroscience*, 125(3): 803-818.
77. Richman, P.G., Meister, A. (1975). Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione, *J Biol Chem*, 250:1422-1426.
78. Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Anal Biochem*, 245(2): 154-160.
79. Rogers, A., Schmuck, G., Scholz, G., Griffiths, R., Meredith, C., Schousboe, A., Campiani, G., Williams, D.C. (2004). Improvements in an in-vitro assay for excitotoxicity by measurement of early gene (c-fos mRNA) levels, *Arch Toxicol*, 79(3): 129-139.
80. Schaefer, T.S., Sanders, L.K., Nathans, D. (1995). Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 β , *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 9097-9101.
81. Schauwecker, P.E., Ramirez, J.J., Steward, O. (2000). Genetic dissection of the signals that induce synaptic reorganization, *Exp Neurol*, 161(1): 139-152.

82. Schenk, H., Klein, M., Erdbrügger, W., Dröge, W., Schulze-Osthoff, K. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*: 1672-1676.
83. Scholf, C., Waring, M., Bergwitz, C., Arseniev, L., Brabant, G. (2002). Cyclic γ -adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated c-fos gene transcription involves distinct calcium pathways in single beta-cells, *Mol Cell Endocrinol*, *186*: 121-131.
84. Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration, *Eur J Biochem*, *267*: 4904-491.
85. Sekura, R., Meister, A. (1977). Gamma-glutamylcysteine Synthetase, Further Purification, "half of the sites" Reactivity, Subunits, and Specificity, *J Biol Chem*, *252* (89): 2599-2605.
86. Sen, C.K. (2000). Cellular thiols and redox-regulated signal transduction, *Curr Top Cell Regul*, *36*: 1-30.
87. Sen, C.K., Packer, L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription, *FASEB J*, *10*: 709-720.
88. Senba, E., Ueyama, T. (1997). Stress induced expression of IEGs in the brain and peripheral organs of the rat, *Neurosci Res*, *29*: 183-207.
89. Setoyama, C., Frunzio, R., Liao, G., Mudryj, M., Crombrughe, B. (1986). Transcription activation encoded by the v-fos gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, *83*: 3213-3217.

90. Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Jenner, P., Marsden, C.D. (1994). Glutathione-related Enzymes in Brain in Parkinson's Disease, *Ann Neurol*, 36(3): 356-361.
91. Sies, H. (1999). Glutathione and its cellular functions, *Free Radic Biol Med*, 27: 916-921.
92. Siesjo, B.K., Agardh, C.D., Bengtsson, F. (1989). Free Radicals and Brain Damage, *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1(3): 165-211.
93. Smeyne, R.J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S.J., Miao, G.G., Schilling, K., Robertson, L.M., Curran, T., Morgan, J.I. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death *in vivo*, *Nature*, 363(6425): 166-169.
94. Sng, J.C., Taniura, H., Yoneda, Y. (2004). A tale of early response genes, *Biol Pharm Bull*, 27(5): 606-612.
95. Sofic, E., Lange, K.W., Jellinger, K., Riederer, P. (1992). Reduced and Oxidized Glutathione in the Substantia Nigra of Patients with Parkinson's Disease, *Neurosci Lett*, 142(2): 128-130.
96. Sperk, G. (1994). Kainic Acid Seizures in the Rat, *Prog Neurobiol*, 42(1): 1-32.
97. Struhl, K. (1989). Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins, *Trends Biochem Sci*, 4: 137-140.
98. Tanaka, T., Tanaka, S., Fujita, T.T., Tkano, K., Fukuda, H., Sako, K., Yonemasu, Y. (1992). Experimental complex partial seizures induced by a microinjection of kainic acid into limbic structures, *Prog Neurobiol*, 38: 317-334.

99. Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Evercooren, A.B.V., Chennoufi, A.B.Y., Seitanidou, T., Babinet, C., Charnay, P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system, *Nature*, *371*: 796-799.
100. Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H. (2003). The Importance of Glutathione in Human Disease, *Biomed Pharmacother*, *57*: 145-155.
101. Turrens J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J Physiol*, *552*: 335-344.
102. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *J Bioceel*, *39*: 44-84.
103. Vanhoutte, P., Barnier, J.V., Guibert, B., Pagès, C., Besson, M.J., Hipkind, R.A., Caboche, J. (1999). Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices, *Mol Cell Biol*, *19*(1): 136-146.
104. Vitzthum, F., Bernhagen, J. (2002). SYBR Green I: An ultrasensitive fluorescent dye for double-stranded DNA quantification in solution and other applications, *Recent Res Devel Anal Biochem*, *2*: 65–93.
105. Walton, M., MacGibbon, G., Young, D., Sirimanne, E., Williams, C., Gluckman, P., Dragunow, M. (1998). Do c-Jun, c-Fos, and amyloid precursor protein play a role in neuronal death or survival?, *J Neurosci Res*, *53*(3): 330-342.

106. Willoughby, J.O., Mackenzie, L., Medvedev, A., Hiscock, J.J. (1997). Fos induction following systemic kainic acid: Early expression in hippocampus and later widespread expression correlated with seizure, *Neuroscience*, 77(2): 379-392.
107. Wollnik, F., Brysch, W., Uhlmann, E., Gillardon, F., Bravo, R., Zimmermann, M., Schlingebisepfen, K.H., Herdegen, T. (1995). Block of c-Fos and JunB expression by antisense-oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock, *Eur J Neurosci*, 7: 388-393.
108. Wong, M.L., Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques*, 39: 75-85.
109. Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J., Turner, N. (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health, *J Nutr*, 134: 489-492.
110. Wu, P., Brand, L. (1994). Resonance energy transfer: Methods and applications, *Anal Biochem*, 218: 1-13.
111. Yalcin, A. (2004). Quantification of Thioredoxin mRNA Expression in the Rat Hippocampus by real-time PCR Following Oxidative Stress, *Acta Biochim Pol*, 51(4): 1059-1065.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Balıkesir’de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Manisa’da tamamladıktan sonra 2000 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’ne girdim ve 2004 yılında mezun oldum. 2004 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans çalışmalarına başladım. Aynı yıl Araştırma Görevlisi olarak aynı bölüme atandım.