



T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROBİLİM ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**OTİSTİK SPEKTRUM BOZUKLUĞUNUN GENETİK ALTYAPISININ
VE MOLEKÜLER SİNYAL YOLAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Zeynep KALKAN

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Belkıs Atasever ARSLAN

İSTANBUL-2015

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROBİLİM ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**OTİSTİK SPEKTRUM BOZUKLUĞUNUN GENETİK ALTYAPISININ
VE MOLEKÜLER SİNYAL YOLAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Zeynep KALKAN

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Belkıs Atasever ARSLAN

İSTANBUL-2015

EK 1. TEZ ONAY SAYFASI

ÜSKÜDARÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

..... Anabilim DalıYüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafındantarihinde yapılan sınavda Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: “Prof. Dr. İ. Tayfun UZBAY”

İmza

Üsküdar Üniversitesi

Danışman: “Yrd. Doç. Dr. Belkıs Atasever ARSLAN”

İmza

Üsküdar Üniversitesi

Üye: “Prof. Dr. O. Uğur SEZERMAN”

İmza

Acıbadem Üniversitesi

ONAY

Bu tez, yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih vesayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Şule GÖK
Enstitü Müdür Vekili

ÖZET

Otizm, Otizm spektrum bozukluğu (OSB)'nin yaygın bir alttipidir. Nörogelişimsel hastalıklar grubunda yer alan OSB'nin oluşmasında özellikle belirli gen bölgelerindeki polimorfizm, mutasyon gibi değişiklikler sorumludur. Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada, glutamat düzeyinin OSB'de belirleyici bir faktör olduğu gösterilmiştir. Glutamaterjik nörotransmisyonunda meydana gelen değişiklikler, glutamat reseptör genlerindeki mutasyonlar ve ekspresyonunu etkileyen faktörler nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirilmektedir. Ayrıca bazı beyin bölgelerinde (amigdala-hipokampus) glutamat düzeyinin, otistik bireylerde, sağlıklı bireylere oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda yetişkin otistik bireylerde de artmış glutamat düzeyi gözlenmiştir. Glutamat düzeyindeki artış, glutamaterjik nörotransmisyonunun bozukluğuyla ilişkili olabilmektedir. Son zamanlardaki çalışmalar, immün-bağımlı proteinleri kodlayan genler ve OSB arasındaki ilişkiyi vurgulamakta, ayrıca beyin gelişimindeki ve sinaptik fonksiyonlardaki uzun süreli nöroimmün sistem anomalilerini göstermektedir. Otizmin etiolojisinde rol oynayan etmenler henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak tıbbi bozuklukların da sıklıkla bu sendrom ile beraberliği biyolojik etiolojinin varlığını iyice ortaya çıkartmaktadır. Genetik faktörler otizmde oldukça önemli olmasına rağmen, etiolojisini açıklamak için tek başına yeterli değildir. Çevresel etmenlerle birlikte genetik faktörler hastalığın açığa çıkmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda, nöron kök hücrelerini kullanarak otizmin hücresel modellemesini oluşturmayı ve biyoinformatik olarak GRID2 (Glutamat reseptör, iyonotropik delta 2) geni ile etkileşime giren ve anlatımını etkileyen proteinleri saptayarak, hücre kültürü koşullarında, bu etkileşimi canlandırmayı, böylece GRID2 gen anlatımındaki değişimleri GZ (Gerçek Zamanlı) PCR yöntemi ile göstermeyi amaçladık. Yaptığımız biyoinformatik analizler TNF- α 'nın GRID2 gen ifadesindeki azaltıcı etkinin, Cdc42 ve GOPC genlerini aktive ederek bunu gerçekleştirdiğini göstermektedir. TNF- α bu etkisini farklılaşmamış nöral kök hücrelerde de göstermekle birlikte, farklılaşmış nöronlarda bu etkisini 2 kat arttırmıştır. Biz TNF- α stimülasyonu ile oluşturduğumuz nörodejenerasyon modelinde TNF- α sinyal yolağı üzerinden kaspaz-3'ün GRID2 reseptör gen ifadesini azalttığını bulduk. Bulduğumuz sonuçlar, GRID2 gen ifadesindeki artışın kaspaz-3'ü ve dolayısıyla nörodejenerasyonu baskılayıcı etkisi olacağını göstermektedir. Nöronlarda

retrovirüsle GRID2 geninin miRNA enfeksiyon tekniği kullanılarak gen ifadesinin arttırılmasının nörodejenerasyonu engelleyici etkisi olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca *in vitro* olarak TNF- α sinyal yolağı ile ilgili bulduğumuz sonuçlar, otizmde TNF- α düzeyindeki artışın biyogöstergeç olabileceği görüşünü güçlendirici niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Otizm, Glutamat, GRID2, TNF- α , Nörogelişim.



ABSTRACT

Autism is the one of the most common subtypes of autism spectrum disorder (ASD). Changes such as polymorphism or mutation in particular gene regions are known to be responsible for occurring ASD that takes part in the group of neurodevelopmental diseases. In many studies it has shown the glutamate level is a determining factor in autism. Variations in glutamatergic neurotransmission, mutations and multiple factors that effects glutamate receptor gene's expression are associated with neurodevelopmental disorders. Supportively found, in autistic individuals in some brain regions (amygdala-hippocampus) glutamate level is higher than healthy individuals. Also in adult autistic individuals, increased glutamate level is observed. This increase in glutamate level, might be related to glutamatergic neurotransmission anomaly. Studies point the relationship between immune-dependent coding genes and ASD, additionally these studies show long term neuroimmunological anomalies in brain development and synaptic functions. Although factors play role in autism etiology are not clearly known yet. But biological etiology clearly show up when medical defects are commonly come out with autism symptoms. Unison of genetic and environmental factors causes autism. In our study, we aimed modelling autism , bioinformatically determining proteins interact with GRID2 (glutamate receptor, ionotropic, delta 2) gene and effect its expression by using neural stem cells . Furthermore, we aimed simulate this interaction in cell culture conditions and show changes in GRID2 gene expression with Real-Time polymerase chain reaction (RT-PCR). We gained substantial results by stimulate cells with tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Our bioinformatics analysis showed, TNF- α regulates GRID2 gene expression by activating Cdc42 and GIPC genes. TNF- α 2 times effective on differentiated neurons compared to neural stem cells. Our data showed that increasement in gene expression of GRID2 has effect on caspase-3 consequently it is suppressor on neurodegeneration. We suggest that, increased gene expression level of GRID2 can show inhibitory effect on neurodegeneration in neurons when miRNA infection technique with retrovirus is used. Moreover, our finding that is related to *in vitro* TNF- α signal pathway showed that increasement in TNF- α level in autism can be biomarker.

Keywords: Autism, Glutamate, GRID2, TNF- α , Neurodevelopment.



TEŞEKKÜR

Bu tez alıŐması sűresince, engin bilgisi ve deneyimiyle bana yol gűsteren ve desteęini hibir zaman esirgemeyen deęerli danıŐman hocam sayın Yrd.Do.Dr. Belkis Atasever ARSLAN'a;

Emek ve desteğini esirgemeyen sayın Prof.Dr. Uğur SEZERMAN'a ve ekibine;

Buęűnlere gelmemi saęlayan, hep yanımda olan ve beni her konuda destekleyip bana gűvenen canım annem, canım babam ve kardeŐlerime; hayatımı paylaŐtıęım hep yanımda ve destekçim olan sevgili eŐime;

Son olarak da her daim yanımda hissettięim arkadaŐlarıma sonsuz teŐekkűrlerimi sunarım...

Zeynep KALKAN

EK 2. BEYAN FORMU

Bu çalışmanın kendi tez çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Tarih
Adı Soyadı
İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
EK 2. BEYAN FORMU	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ixi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Yaygın Gelişimsel Bozukluklar.....	2
2.1.1. Otizm	2
2.1.2. Otizmin Etiyolojisi	3
2.2. Otizm ve Beyin Gelişimi	3
2.2.1. Nörotransmitterler	4
2.2.2. Glutamat	5
2.2.2.1. Glutamat Reseptör Ailesi	6
2.2.2.2. Glutamat Eksitotoksitesisi ve Nörodejenerasyon	9
2.2.3. GRID2	10
2.3. Otizm ve Nöroinflamasyon.....	11
2.3.1 Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α).....	13
2.4. Santral Sinir Sistemi (SSS).....	13
2.4.1. Nöron.....	14
2.4.2. Serebral korteks	15
2.4.3. Limbik yapılar	15

2.4.4. Serebellum	16
2.4.5. Bazal Gangliyonlar ve Talamus.....	16
2.5. Otizmde İşlevsel Beyin Görüntülemesi	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları	18
3.1.1. Hücre Kültürü İçin Gerekli Cihazlar ve Kimyasal Malzemeler	18
3.1.1.1. Laminar Akımlı Kabin (Laminar flow hood)	18
3.1.1.2. CO2 İnkübatörü	18
3.1.1.3. Mikroskop	19
3.2. Hücre Kültürü	19
3.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması	19
3.4. SH-SY5Y Hücre Hattına TNF- α Uygulaması	19
3.5. RNA izolasyonu	20
3.6. RNA'dan cDNA Hazırlanması.....	20
3.7. RT (Real-Time) PCR	20
3.8. P53 ve Kaspaz-3 Protein düzeylerinin ELISA Kit ile Spektrofotometrik Analizi.....	21
3.9. BIOGRID Biyoinformatik.....	21
4. BULGULAR	22
4.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması Deneyi	22
4.2. İzole edilen RNA'ların Agaroz Jel Elektroforez Yöntemiyle Gösterilmesi.	24
4.3. P53 ve Kaspaz-3 Protein Düzeylerinin Ölçümü	24
4.4. Real-Time PCR ile GRID2 Gen Ekspresyon Düzeyindeki Değişikliklerin Ölçümü.....	26
4.5. BIOGRID ile Yapılan Biyoinformatik Analiz ile TNF- α 'nın GRID2 Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etki Mekanizmasının Gösterilmesi.....	27

5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
7. KAYNAKLAR.....	36
EK 3. ÖZGEÇMİŞ.....	40



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Glutamaterjik nörotransmisyonun sinapslardaki işleyişi. (5)

Şekil 2: Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılmasını anlatan şema. (8)

Şekil 3: Glutamat eksitotoksitesinin sinapstaki gösterimi. (9)

Şekil 4: GRID2 geninin kromozomal lokasyonu ve ekzon, intron ve promotör bölgelerinin gösterimi (10)

Şekil 5: Nöron hücresinin elektron mikroskop görüntüsü. (14)

Şekil 6: %10 FBS içeren DMEM/F12 medyum içerisinde büyütülen kontrol grubu SH-SY5Y hücrelerinin (A) ve 10 μ M RA ile muamele edilerek farklılaştırılmaya başlanan SH-SY5Y hücrelerinin (B) 1. gündeki ışık mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları. (23)

Şekil 7: %10 FBS içeren DMEM/F12 medyum içerisinde büyütülen kontrol grubu SH-SY5Y hücrelerinin (A) ve 10 μ M RA ile muamele edilerek farklılaştırılmaya başlanan SH-SY5Y hücrelerinin (B-C) 7. gündeki ışık mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları (24)

Şekil 8: SH-SY5Y hücrelerinde RA uygulaması sonrasındaki 7. günde gözlemlenen morfolojik değişiklikler olan, akson oluşumu ve gövdenin üçgenleşmesinin ışık mikroskobu ile gösterilmesi. (24)

Şekil 9: İzole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez sonucunun görüntülenmesi. (25)

Şekil 10: Kaspaz-3 protein düzeyinin RA ve TNF uygulaması sonrasındaki değişimi. (26)

Şekil 11: p53 protein düzeyinin RA ve TNF uygulaması sonrasındaki değişimi. (27)

Şekil 12: RA ve TNF uygulamasından sonra, GRID2 geninin ekspresyonundaki azalma grafiği. (28)

Şekil 13: BioGRID^{3,4} interaksiyon havuzundan alınan TNF- α etkileşim ağı. (29)

Şekil 14: TNF- α 'nın GRID2 ekspresyonunu baskıladığını gösteren yolağın şeması. (30)

Şekil 15: TNF - α 'nın kaspaz 3 düzeyindeki değişimi etkilemesinin olası yolları. (30)

Şekil 16: Tnf - α 'nın p53 düzeyindeki değişimi etkilemesinin olası yolları. (31)

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Spektrofotometrik ölçüm sonucunda elde edilen değerlerin ortalamalarının ve standart sapmalarının tablo halinde gösterimi. (26)



Parantez içindeki rakamlar şekil ve tabloların bulunduğu sayfaları ifade etmektedir.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA: Alfa Amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik Asit

DMEM: Dulbecco's Modified Eagled Medium

DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

EAAT1: Uyarıcı Aminoasit Taşıyıcı 1

FBS: Fetal Bovine Serum

fMRI: Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme

GRID2: Glutamat Reseptör İyonotropik, Delta2

GLU: Glutamat

GZ-PZR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

IL-1: İnterlokın-1

IL-6: İnterlokın-6

iGluRs: İyonotropik Glutamat Reseptörleri

mGluRs: Metabotropik Glutamat Reseptörleri

NMDA: N-metil D-aspartat

OSB: Otizm Spektrum Bozukluğu

RA: Retinoik Asit

SSS: Sanrtal Sinir Sistemi

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör Alfa

YGB: Yaygın Gelişimsel Bozukluklar

1. GİRİŞ

Otizm, Otizm spektrum bozukluğu (OSB)'nun yaygın bir alttipidir. Nörogelişimsel hastalıklar grubunda yer alan OSB'nin oluşmasında özellikle belirli gen bölgelerindeki polimorfizm, mutasyon gibi değişikliklerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Otizm, günümüzde rastlanan en yaygın nörolojik bozukluktur ve Hastalıkları Kontrol Etme ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control Prevention)'nin 2012 verilerine göre 88'de 1 görülme sıklığı vardır. Bu yaygınlık bilgileri Birleşik Devletler kaynaklı iken, ülkemizde otistik bozukluğun yaygınlığına ilişkin henüz yeterli bilimsel veri bulunmamaktadır.

Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada, glutamat düzeyinin OSB'de belirleyici bir faktör olduğu gösterilmiştir. Glutamaterjik nörotransmisyonunda meydana gelen değişiklikler, glutamat reseptör genlerindeki mutasyonlar ve ekspresyonunu etkileyen faktörler nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirilmektedir (Shinohe ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda bazı beyin bölgelerinde (amigdala-hipokampus) glutamat düzeyinin, otistik bireylerde, sağlıklı bireylere oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda yetişkin otistik bireylerde de artmış glutamat düzeyi gözlenmiştir (Shimmura ve ark., 2011). Glutamat düzeyindeki artış, glutamaterjik nörotransmisyonunun bozukluğuyla ilişkili olabilmektedir.

Bu tez çalışması sürecinde, nöroblastomadan farklılaştırılan nöron hücreleriyle otizmin hücre modellemesini oluşturmayı amaçlamaktayız. Biyoinformatik olarak GRID2 (Glutamat reseptör, iyonotropik delta 2) geni ile etkileşime giren ve anlatımını etkileyen proteinler saptanarak, hücre kültürü koşullarında, bu etkileşimi canlandırmayı ve GRID2 gen anlatımındaki değişimleri GZ (Gerçek Zamanlı) PCR yöntemi ile göstermeyi amaçlamaktayız.

Glutamat reseptör sayısının otizm için bir biyobelirteç olarak kullanılmasına ilişkin destekleyici birçok çalışma yapılmıştır. Fakat GRID2 geninin anlatımını etkileyen faktörlerin hücre kültürü koşullarında gerçekleştirilmesiyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Yapacağımız bu çalışma ile otizmin GRID2 geni ile ilişkisini aydınlatıp, yeni ilaç keşifleri ve klinik uygulamalar ile ilgili çalışmalara katkı sağlamayı umuyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yaygın Gelişimsel Bozukluklar

Yaygın gelişimsel bozukluklar (YGB), sosyal ilişki, iletişim ve bilişsel gelişimde gecikme ya da yetersizlik ile karakterize olan ve yaşamın çok erken yaşlarda başlayan nöropsikiyatrik bozukluklardır. YGB Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından 5 grupta sınıflandırmıştır ve otizm de bu gruplardan biri olarak gösterilmiştir. Otizm spektrum bozukluğu (OSB), DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) kriterlerine göre tanı alan ve hakkında en çok araştırma yapılan bozukluklardan birisidir (Şener ve Özkul, 2013).

2.1.1. Otizm

Otizm, Otizm spektrum bozukluğu (OSB)'nin yaygın bir alttipidir. Nörogelişimsel hastalıklar grubunda yer alan OSB'nin oluşmasında özellikle belirli gen bölgelerindeki polimorfizm, mutasyon gibi değişikliklerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Otizm, günümüzde rastlanan en yaygın nörolojik bozukluktur ve Hastalıkları Kontrol Etme ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control Prevention)'nin 2012 verilerine göre 88'de 1 görülme sıklığı vardır. Bu yaygınlık bilgileri Birleşik Devletler kaynaklı iken, ülkemizde otistik bozukluğun yaygınlığına ilişkin henüz yeterli bilimsel veri bulunmamaktadır.

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB); belirtileri yaşamın ilk yıllarında ortaya çıkan ve yaşam boyu devam eden, etkileşim ve iletişim alanında belirgin gecikme ve sapmalar ve kısıtlayıcı ilgi alanları ile kendini gösteren karmaşık gelişimsel bir bozukluktur. OSB aynı zamanda heterojen bir grup üzerinde etkili olup, etiyojisi ve fenotipi açısından oldukça karmaşık, büyük bir hızla yayılarak gitgide daha fazla insanı etkileyen nörogelişimsel bir bozukluktur (Ardhanareeswaran ve Volkmar, 2015)

Otizm, yaşamın ilk 3 yılında ortaya çıkan ve kişinin sosyal, entelektüel ve dil açısından toplumla ilişkisini hemen hemen tamamen yok eden bir durumdur (Şener ve Özkul, 2013).

2.1.2. Otizmin Etiyolojisi

Otizmin etiolojisi oldukça karmaşıktır. Etiyolojisinde rol oynayan etmenler henüz tam olarak bilinmemekle birlikte tıbbi bozuklukların da sıklıkla bu sendrom ile beraberliği biyolojik etiolojinin varlığını iyice ortaya çıkartmaktadır. İkizlerle uyum oranlarını araştıran çalışmalara göre otizm %60-90 kalıtımsaldır. Genetiğin katkısını keşfeden çalışmalar bu bozukluğa birden fazla genin sebep olduğunu ortaya koymuştur. Sitogenetik çalışmalarla birlikte OSB'li bireylerde 15q ve 7q gibi bölgelerde kromozom anomalileri saptanmıştır. Ayrıca sitogenetik çalışmalar, tüm genom araştırmalarıyla birlikte daha ileri araştırmalar için birkaç aday gen sunmuştur. Ancak, tüm bilinen genetik varyasyonların otizme katkısı yaklaşık %5-15'tir (Rogers ve ark., 2013). Bu nedenle genetik faktörlerin otizmde oldukça önemli olmasına rağmen, etiolojisini açıklamak için tek başına yeterli değildir. Prenatal ve perinatal travmalar da otizmde rol oynamaktadır. Gelişmekte olan beyin, özellikle gelişimin erken dönemlerinde çevresel hasara duyarlıdır (Rice ve Baron, 2000). Etil alkol gibi belirli kimyasallara prenatal ve neonatal dönemde maruz kalmak otizmle benzer nöropsikolojik hasarlara yol açmaktadır (Landrigan, 2010). Bütün bunlar göz önünde bulundurulursa, otizm fenotipinin ortaya çıkışı, belirlenmiş ve henüz belirlenememiş genetik yatkınlık ve çevresel travmaların birlikte rol aldığı söylenebilmektedir. Otizmin etiolojisini anlamadaki eksikliğe rağmen OSB'li hastalardaki davranışsal, nöroanatomik ve genetik bozukluklar, otizmin semptomlarını anlamak için yardımcı olmaya yeterlidir. Sonuç olarak, heterojen bir etiyojiye sahip olduğu düşünülen otizmin çok sayıda birbiri ile etkileşen gen nedeniyle ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. Olası etiyojik etmenler arasında genetik, biyokimyasal, nöroanatomik, ailesel ve çevresel bazı etmenler yer almaktadır.

2.2. Otizm ve Beyin Gelişimi

Gelişimin erken dönemlerinde işlevsel ağlar, aksonların hedeflerine ulaşmaları, ve ulaşmaları için kullanmaları gereken yolların oluşumu ve sinaptik bağlantıların göreve

spesifik olarak yeniden düzenlenmeleri sayesinde meydana gelmektedir (Greenough ve ark., 1987). Bu dönemde, nöronlar, nöronal uzantılar ve sinapslar ihtiyaç duyulandan daha fazladır. (Levitt, 2003). Meydana gelen bu ilk devreler, gelişimin ileri dönemlerinde kşşye çevreye bağımlı olarak uyum geliştiri ve değişikliklere uğrarlar (Feldman ve Knudsen, 1998). “Deneyim–bağımlı” (experience-dependent) organizasyon diye tanımlanan bu süreç, bir arındırma-yeniden düzenleme işlemidir ve talamokortikal ve intrakortikal eksitator girdi ve inhibitör bağlantılarla oluşmaktadır (Belmonte ve ark., 2004). Bu ikinci dönemi anlamak için yapılan hayvan çalışmalarında, bu dönemin başlangıcı, yüksek kapasitede öğrenme becerilerinin ortaya çıktığı, henüz cinsel olarak olgunlaşmadığı, gençlik dönemine denk gelmektedir (Brainard ve Knudsen, 1998). Bu dönemde büyüme faktörlerinin ve nörotransmitterlerin moleküler düzeydeki görevlerinin önemli rolleri vardır. Bütün bu mekanizmaların birlikteliği, mevcut sinapsların etkinliklerini ve anatomik bağlantıların düzenlerini değiştirmektedir (Feldman ve Knudsen, 1998).

Otizm nöroanatomik açıdan ele alındığında; otizmi olan bireylerde, bazı beyin bölgelerinde nöron sayısında ve dendritik dallanmada azalma görülmektedir. Toplam beyin büyüklüğü %5-20 oranında artmakta, beyin yapısındaki hacimsel genişleme detaysal yapıda bozulmaya neden olmaktadır. Nöral etkileşimde azalma olduğu da bir diğer bulgudur.

Otizimli bireylerde yapılan araştırmalarda, pozitron emisyon tomografisi sonuçları, glukoz kullanımının arttığını, limbik yapıda hücresel yoğunluğu ve Purkinje hücrelerindeki azalmayı göstermiştir. Bu durum, dikkat eksikliği ve duyuşsal kusurlara neden olmaktadır.

Otizmin etiyolojisine dair yapılan araştırmalarda otizmde serebellar yollar, beyin sapı, talamus, hipokampus, ve amigdala bölgelerinde çift taraflı defektler saptanmıştır. İşitme ve konuşmayı kontrol eden beyin bölgesi parietal lobun işleyişindeki bozukluk otizimli bireylerde çoğunlukla görülmektedir.

2.2.1. Nörotransmitterler

Nörotransmitterler, presinaptik nöronun sinapsa bırakılan, postsinaptik membrandaki ilgili reseptöre bağlanıp uyarıyı iletmek için gerekli sinyalleşmeyi başlatan proteinlerdir. Nörotransmitterlerin bazı önemli ortak özellikleri vardır:

1) Sinir uçlarında üretilirler. Nörotransmitterlerin sentezleri peptid hormonların sentezine

benzer. Hücre gövdesindeki endoplazmik retikulumda peptitler sentezlenir ve daha sonra depolandığı veziküllerde akson boyunca taşınırlar.

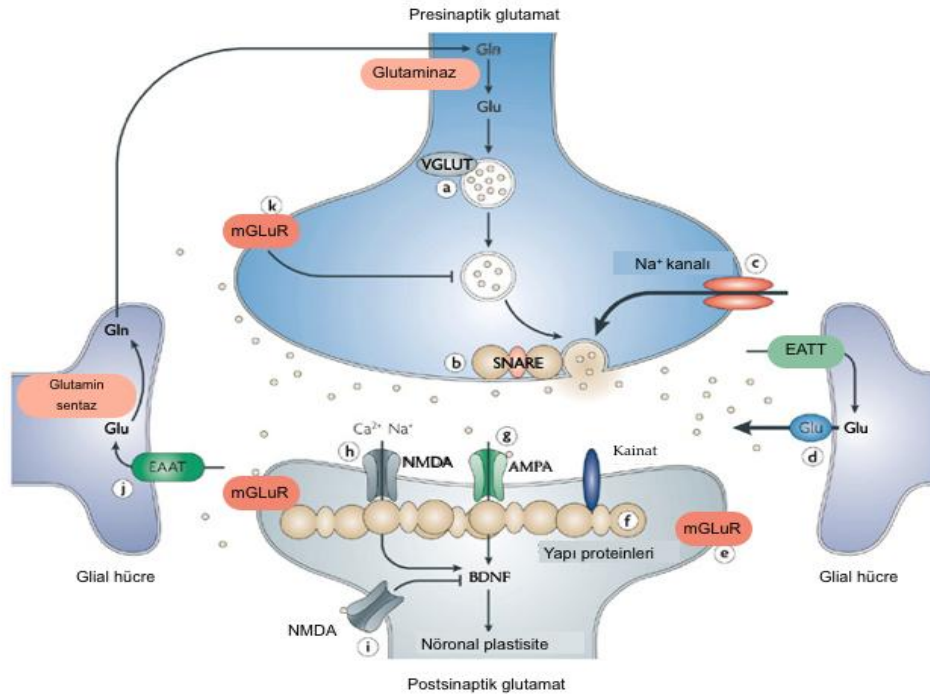
2) Salınimleri presinaptik uyarı ile gerçekleşir. Sinaptik I proteininin fosforile olması, nörotransmitterlerin salınımında görev almaktadır.

3) Postsinaptik olarak uygulandıklarında presinaptik uyarı ile alınan yanıtı benzer yanıt oluştururlar.

4) Nörotransmitterlerin kendilerine özgü antagonistleri vardır. Antagonistler çoğunlukla farmakolojik bileşenlerdir ve nörotransmitter ile spesifik reseptörleri arasındaki yanıtı engellemektedirler.

5) Nörotransmitterlerin etkilerini sonlandıran bir mekanizma bulunmaktadır (Narr ve ark., 2004).

Şekil 1: Glutamaterjik nörotransmisyonun sinapslardaki işleyişi.



(Sanacora ve ark., 2008).

2.2.2. Glutamat

Glutamat, beyninde en bol bulunan eksitator amino asit nörotransmitterdir ve iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerini uyararak etkisini ortaya çıkarır.

Memeli beyindeki nöronların yaklaşık %50'si nörotransmitter olarak glutamati kullanmaktadır. Beyinde prefrontal korteksten beyin sapına kadar giden glutamaterjik yolaklar mevcuttur ve bu glutamaterjik yolaklar diğer nörotransmitterlerin salınımında da düzenleyici görevini üstlenmektedirler (Oral ve Göktalay, 2012). Glutamaterjik sistemin diğer nörotransmitterle ve beyin işlevleriyle olan ilişki, bu derece etkin rol oynaması, glutamaterjik sistemin otizmle ve diğer nörogelişimsel hastalıklarla bağlantısı olduğunu ortaya koymaktadır.

Beyindeki ana uyarıcı nörotransmitter olan ve prefrontal korteksteki sinapsların çoğunu oluşturan glutamat'ın 2 reseptör tipi vardır (Herleniz ve Lagercrantz, 2004). Glutamaterjik nörotransmisyonadaki eksitasyon bazı olumsuz sonuçlar meydana getirmiş olabilir. Meydana gelen beyin hasarından sonra glutamatın aşırı salınımı saptanmış, ve bu aşırı salınımın, nörodejenerasyona neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, bu eksitasyonun bir sonucu olarak, intraselüler kalsiyum konsantrasyonu nöronal depolarizasyona ve bu da hücre hasarı ve apoptoza yol açar (Armijo ve ark., 2002).

2.2.2.1. Glutamat Reseptör Ailesi

İyon kanalları ile eşleşmeli iyonotropik glutamat reseptörleri N-metil-D-aspartik asit reseptörleri (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionik asit (AMPA) ve kainat reseptörleri olarak sınıflandırılırlar. İyonotropik glutamat reseptörleri birkaç alt üniteden oluşurlar ve aslında iyon kanallarındırlar (Bethea ve Sikich, 2007). AMPA ve NMDA reseptörleri genellikle aynı sinapsta bulunurlar; bu sayede glutamat aynı anda her iki reseptörü kullanarak iletiyi sağlamış olur (Nicoll ve ark., 2010). Bir sinapstaki AMPA/NMDA'ya bağlı iletimin miktarı sinapsın cinsine ve gelişimsel düzeyine bağlı olarak değişir (Liao ve ark., 1995). Yaşamın ilk haftalarında NMDA aktivitesi baskındır, ancak beyin gelişimi ile birlikte NMDA aktivitesi azalır ve erişkin dönemde AMPA aktivitesi belirgin hale gelir. Glutamaterjik sinir uçları yaşamın erken dönemlerinde çok fazla bulunmaktadırlar. Bu durumun daha sonra budanmanın olacağı sinapsları gösterdiği ileri sürülmektedir. Glutamat, uzun süreli güçlendirme (long-term potentiation) etkisini NMDA ile, uzun süreli söndürme (long-term depression) etkisini AMPA ile göstermektedir.

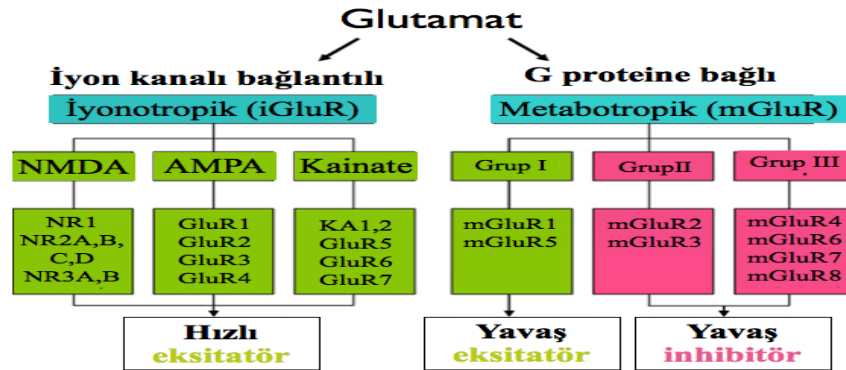
Glutamat iyonotropik reseptörler son zamanlarda otizmle bağlantısı araştırılmaya başlanmış reseptörlerdendir. Otizm tanısı konan hastalarla yapılan araştırmalarda, sağlıklı bireylere göre daha yüksek glutamat düzeyleri saptanmıştır. Otizm olgularının postmortem beyin incelemelerinde glutamat ile ilişkili bazı α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionik asit (AMPA) reseptör alt üniteleri genlerinin mRNA seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Purcell ve arkadaşları 2013 yılında yayınladıkları çalışmada, AMPA-tipi glutamat reseptörleri altbirimlerinin yoğunluğunun otizimli bireylerde artmış olduğunu ve glutamat düzeyindeki artışın henüz net olmayan nedeninin glutamat reseptörleri ile aydınlatılabileceğini belirtilmiştir. Purcell ve arkadaşları bu bulguları ile AMPA reseptör alt ünitelerinin yeterli işlev görmemesi sonucunda glutamatın ortamdan daha çabuk uzaklaştırılacağını ve bunun sonucunda glutamat reseptörlerinin daha düşük oranda uyarılacağını öngörmüşlerdir. Bir diğer olasılık olarak da alt ünitelerin artmış seviyelerde bulunmasının ortamdaki artmış glutamata ikincil gelişmiş bir upregulasyon olarak yorumlamışlardır.

Metabotropik glutamat reseptörleri G proteinleri ile eşleşmeli olan ve göreceli olarak daha yeni glutamat reseptörleridir (mGlu) ve 8 farklı alt tipi tanımlanmıştır. Sekiz adet olan bu metabotropik glutamat reseptörü amino asit dizilişleri, reseptöre bağlanmaları, etkileri ve farmakolojik özellikleri göz önüne alınarak üç grupta incelenmektedir. Glutamatın merkezi sinir sisteminin hem fizyolojisinde hem de patofizyolojisinde önemli roller üstlendiği düşünölmektedir. Merkezi sinir sisteminin değişik bölgeleri arasındaki iletişimde ve döngülerde glutamaterjik yollar önemli yer tutmaktadır. Eldeki bilgiler iyonotropik glutamat reseptör sisteminin bir grup nöropsikiyatrik hastalıklarda yer aldığını göstermektedir. Ayrıca glutamaterjik sistemin anksiyolitik ve antidepresan ilaçların etki düzeneklerinde yer aldığını düşünölmektedir. Glutamaterjik sistemin şizofrenide obsesif kompulsif bozuklukta, alkol bağımlılığında ve nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığı gösterilmiştir (Tural ve Önder, 2002). Glutamat (Glu), merkezi sinir sisteminin oldukça iyi bilinen eksitatör nörotransmitterdir. Spesifik glutamat reseptörlerine bağlı olarak çok çeşitli görevler üstlenmektedir. Glu aynı zamanda kanda bulunan besinsel bir aminoasittir. İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluRs) ve metabotropik glutamat reseptörleri (mGluRs) olmak üzere iki çeşit reseptörü vardır. iGluRs, agonist seşitciliklerine göre N-metil-D-aspartat-reseptörü (NMDAR), α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-

izoksazolepropionik asit reseptörü (AMPA), ve kainate reseptörü (KAR) olarak 3 alt birime ayrılmıştır. GluRs en çok miyokardiyum da dahil periferel dokuda bulunmaktadır. Fakat Glu reseptörlerinin immün hücrelerdeki rolü tam olarak anlaşılabilmiş değildir (Cheng ve ark., 2015).

Sinaptik iletim ve plastisite merkezi olan iyonotropik glutamat reseptörü altbirimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar çoğunlukla otistik spektrum bozukluğu ile ilişkilidir. Glutamat, beyindeki bir ana uyarıcı nörotransmitterdir. Ligand kapılı iyon kanalları (iyonotropik) ve G proteine bağlı reseptörler (metabotropik) ile etki gösterirler. Bu reseptörlerin aktivasyonu öğrenme ve bellek mekanizmalarını düzenleyen bazal uyarıcı sinaptik iletim ve sinaptik plastisitenin birçok formundan sorumludur. Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada, glutamat düzeyinin OSB’de belirleyici bir faktör olduğu gösterilmiştir. Glutamaterjik nörotransmisyonunda meydana gelen değişiklikler, glutamat reseptör genlerindeki mutasyonlar nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirilmektedir (Shinohe ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda bazı beyin bölgelerinde (amigdala-hipokampus) glutamat düzeyinin, otistik bireylerde, sağlıklı bireylere oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda yetişkin otistik bireylerde de artmış glutamat düzeyi gözlenmiştir (Shimmura ve ark., 2011). Bu gelişmeler, özellikle normal IQ seviyesindeki çocuklarda plazma glutamat düzeyi ölçümünün otizm için biyomarkır olabileceğini göstermektedir(Sarachana ve ark., 2013).

Şekil 2: Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılmasını anlatan şema.



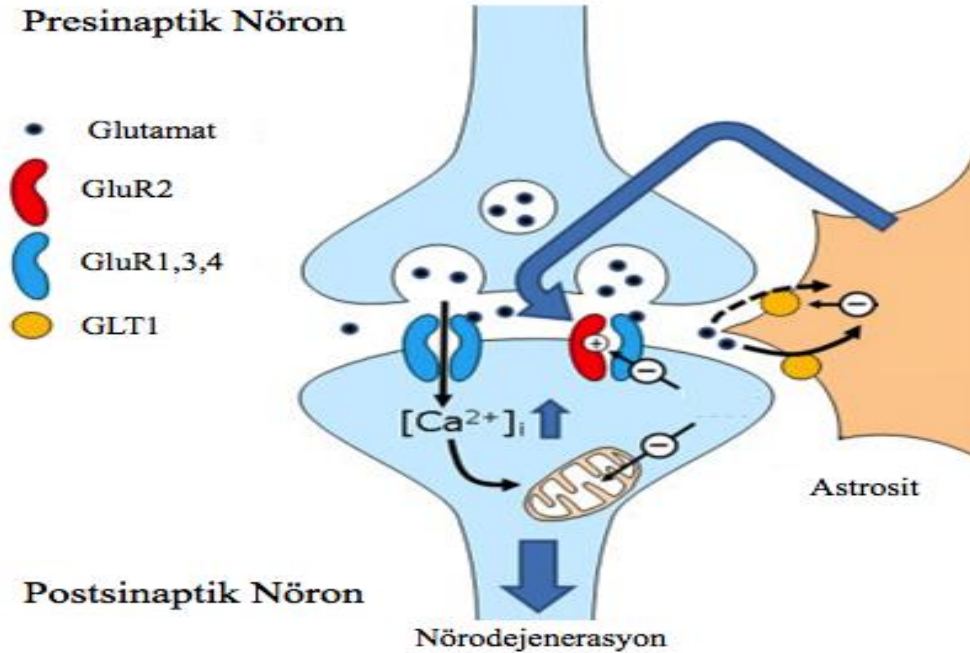
(Blackshaw ve ark, 2011)

2.2.2.2. Glutamat Eksitotoksitesi ve Nörodejenerasyon

Hücre ölümü nekrotik ve apoptotik hücre ölümü olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Nekroz, hücredeki toksik hasarlar sonucu gerçekleşir ve çevre dokuya da zarar verebilir, apoptoz programlanmış hücre ölümüdür (Stahl, 2000). Otizmin de içinde bulunduğu nörodejeneratif hastalıklarda apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiğini destekleyen çalışmalar yapılmaktadır.

Glutamat eksitotoksitesi apoptozu fizyolojik olarak hızlandırmaktadır. Hücre kültürü koşullarında yapılan sitotoksikite deneylerinde, glutamat gibi eksitotoksik bir nörotransmitterin yüksek dozlarda nörodejenerasyona neden olduğu saptanmıştır (Dy ve ark., 1999).

Şekil 3: Glutamat eksitotoksitesinin sinaptaki gösterimi.

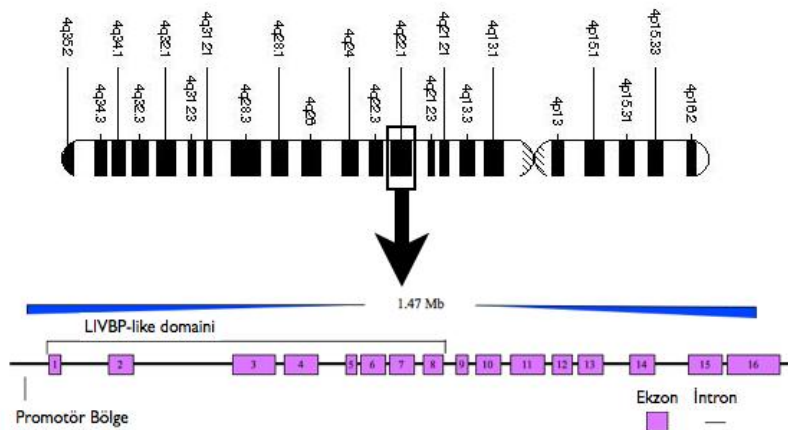


2.2.3. GRID2

İyonotropik glutamat reseptörleri ailesinin bir üyesi olan GRID2 (Glutamat reseptör iyonotropik delta 2) memeli beynindeki baskın uyarıcı nörotransmitter reseptörüdür. GRID2 nin kodladığı protein seçici olarak serebellar Purkinje hücrelerinde ifade edilen çok geçişli bir membran proteinidir. Bu protein paralel fiberler ve Purkinje hücreleri arasında sinaps organizasyonunda rol oynar. İnsanda GRID2 genindeki mutasyon serebellar ataksiye neden olur. GRID2 reseptörleri seçici olarak serebellumda Purkinje hücrelerinde baskın olarak ifade edilir ve sinaptojeniz, sinaptik plastisite ve motor koordinasyonun yanısıra apoptozda rol oynar ve GRID2'nin nöronal apoptozda büyük bir rolü olduğu düşünülmektedir (Araki ve ark., 1993).

Farelerde GRID2 genindeki nokta mutasyonunun postnatal gelişim döneminde serebellar Purkinje hücrelerinin seçici, otonom apoptozundan kaynaklanan ataksiye ve motor koordinasyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (Lalonde ve ark., 1992). İnsanda GRID2 nin heterozigot delesyonu ataksi ile kompleks spastik paraplejiye, frontotemporal demansa ve daha düşük motor nöron gelişimine neden olur (Maier ve ark., 2014). GRID2 nin homozigot biallelik delesyonu ise belirgin gelişimsel gecikme ile serebellar ataksi sendromuna, piramidal yol gelişimine neden olur (Utine ve ark., 2013). GRID2 ile ilişkili bu hastalıkların semptomları, nörogelişimsel hastalıklardaki semptomlarla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir.

Şekil 4: GRID2 geninin kromozomal lokasyonu ve ekzon, intron ve promotör bölgelerinin gösterimi.



2.3. Otizm ve Nöroinflamasyon

İmmün sistem ve sinir sistemi birbirleriyle kapsamlı bir şekilde etkileşim içerisinde. Bu sebeple nörolojik bozuklukların immün yetersizlikle seyretmesi olağan bir durumdur. Sitokinler olarak bilinen immün düzenleyiciler sistemler arası iletişimdeki anahtar yardımcılarıdır. Dendritik hücreler makrofajlar, nötrofiller T hücreleri B hücreleri gibi immün sistem hücreleri birincil sitokin kaynaklarıdır. Ayrıca nöronlar da dahil birçok farklı tipteki hücreler de sitokin üretir ve onlara cevap oluştur. Sitokinler nörotrofinler ve nörolojik bağlantılı büyüme faktörleri ile yapısal olarak gösterir ve sinyal yolları bakımından benzerlik gösterirler. Birçok açıdan sitokinler, immün sistem ve sinir sistemi arasındaki ortak bir protein ailesidir (Goines ve Ashwood, 2013).

Son zamanlardaki çalışmalar, immün-bağımlı proteinleri kodlayan genler ve OSB arasındaki ilişkiyi vurgulamakta, ayrıca beyin gelişimindeki ve sinaptik fonksiyonlardaki uzun süreli nöroimmün sistem anomalilerini göstermektedir. Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) sinaptik budamada son derece önemli rol oynamaktadır. Son bulgular, sitokin düzeylerinin biliş ve bellek de dahil nörolojik fonksiyonlarda arttığını göstermektedir. Bu anormal inflamatuvar aktivite, davranışsal ve nörolojik bozukluklara katkı sağlamaktadır (Tonhajzerova ve ark., 2015).

Aralarında pro-inflamatuvar sitokinler interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve TNF- α 'nın da bulunduğu kronik inflamasyon belirteçleri nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Anormal TNF- α regülasyonu olan dejeneratif merkezi sinir sistemi hastalıklarında, klinikte ve hastalıkların deneysel modellerinde birçok çalışma yapılmıştır (Tweedie ve ark, 2007). Otizmlili çocuklarda immün sistem yetersizliklerinin yapıldığı araştırmalarda TNF- α düzeyinin kontrol grubuna oranla yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Jyonouchi ve ark., 2001).

Glutamat sinyalizasyonu ve inflamasyon arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

NMDA tip olmayan iGluRs'a dahil olan AMPAR, merkezi sinir sistemindeki hızlı eksitator sinaptik iletimin çoğunu düzenler. Bunların dışında AMPAR, periferel dokularda uyarılabilir hücreler için de önemlidir. Örneğin; AMPAR pankreastaki β hücrelerinden insülin salınımını uyarır; AMPAR aktivasyonu oksidatif stresi ve apoptozu indükler (Cheng

ve ark., 2015).

Beyin gelişiminin düzenlenmesi, yönlendirilmesi ve kontrol edilmesinde genetik belirleyiciler önemli roller üstlenmektedir. Ancak postnatal beyin gelişiminde bireyin çevre ile etkileşimi de oldukça önemlidir. Nörotransmitter (NT) sistemlerindeki bu gelişimsel değişim sürecinin iki sonucu olduğu düşünülmektedir. Birincisi, çocukların çevresel, biyokimyasal ve ruhsal stres faktörlerine erişkinlerden daha duyarlı hale gelme ihtimalidir. İkinci olarak, bir çeşit plastisite becerisi olarak da yorumlanabilen, beyin değişime açık olma özelliği kişiyi bazı bozukluklara karşı dayanıklı kılıyor olmasıdır. Plastisite kavramı, nöronların yapısal organizasyonunun aslında dinamik süreçler olduğunu göstermiş ve beyin gelişiminin anlaşılmasına ayrıca beyindeki moleküler değişimlerin şizofreni, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, otizm gibi kimi psikiyatrik bozuklukların ortaya çıkışının nöral temellerinin anlaşılmasına önemli katkıda bulunmuştur.

Glutamaterjik iyonotropik reseptörler (NMDA, AMPA ve kainat) otizmde en çok araştırılmış reseptörlerdendir. Otizm tanısı konmuş erişkinler üzerinde yapılan, nörotransmitter sistemlerinin gelişimi ve semptomatik yansımaları alanındaki çalışmalarda, bu bireylerde sağlıklı kontrollere oranla glutamat düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca otizmlili erişkin olgularının postmortem beyin incelemelerinde AMPA reseptör alt üniteleri genlerinden bazılarının ve uyarıcı aminoasit taşıyıcı 1 (EAAT1) geni gibi glutamat ile ilişkili kimi genlerin mRNA seviyelerinde artış saptanmıştır. Ek olarak, Purcell ve arkadaşları 2013 yılında yayınladıkları çalışmalarında, AMPA-tipi glutamat reseptörleri yoğunluğunun otizmlili bireylerde azalmış olduğunu ve glutamat düzeyindeki artışın aydınlatılamayan nedeninin çözülmesinde bu bulguların önemli olabileceğini belirtmiştir. Bu bulgular doğrultusunda iki olasılıktan bahsedilmiştir: ya AMPA reseptör alt üniteleri yeterli işlev görmemektedir ve glutamatın ortamdaki daha çabuk uzaklaştırılmasına ve glutamat reseptörlerinin daha düşük oranda uyarılmasına neden olmaktadır. Ya da artmış seviyelerdeki alt üniteler ortamdaki glutamate seviyesinin artışına ikincil gelişmiş bir upregulasyon olarak da yorumlanabilir.

TNF (Tümör Nekroz Faktör) ailesi, üzerinde en fazla çalışılan protein ailesidir. Bir çok sistemde fonksiyon gösteren 19 üyesi mevcuttur. TNF- α (Tümör Nekroz Faktör Alfa) ve TNF beta bu ailenin tanımlanan ilk üyeleridir.

TNF- α ; çoğunlukla aktif makrofajlar ve monositler tarafından salgılanmaktadır. TNF- α

başlıca makrofaj ve diğer çekirdekli fagositler tarafından üretilir, inflamasyon gelişimi ve diğer sitokinlerin uyarımı gibi mekanizmalarda fonksiyonel göreve sahiptir. Özellikle kemokinlerin ifadenmesini ve mikrop öldürücü sistemlerin uyarımını sağlar. Doğal bağışıklık, hücrel düzenleme, hücre farklılaşması ve apoptoz süreçlerinde de önemli rollere sahiptir.

2.3.1 Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

Tümör nekroz faktör alfa, inflamasyon sürecinde önemli roller üstlenmektedir. Lökosit adezyonunu ve göçünü stimüle eder. Makrofajların uyarılmasında ve dokularda meydana gelen immün yanıtlarda önemli rol oynar.

TNF reseptörlerinde molekül ağırlıklarına göre isimlendirilmiş iki adet reseptör ve buna bağlı olarak çalışan iki apoptotik yolak vardır. Yolaklardan birisi kaspaz-8 uyarımı ile apoptoz oluşumuna ve böylece nörodejenerasyona yol açar. Diğer yolak transkripsiyon faktörlerini ve NF-kB'nin uyarımına yol açmaktadır. Diyabet gibi proinflamatuvar olaylar TNF- α miktarını arttırmaktadır. TNF- α insülin reseptörü ve insülin reseptör substratında tirozin fosforilasyonunu inhibe ederek ve GluR mRNA sentezini azaltarak otizme öncü koşulları hazırlamış olur (Korvatska ve ark., 2002).

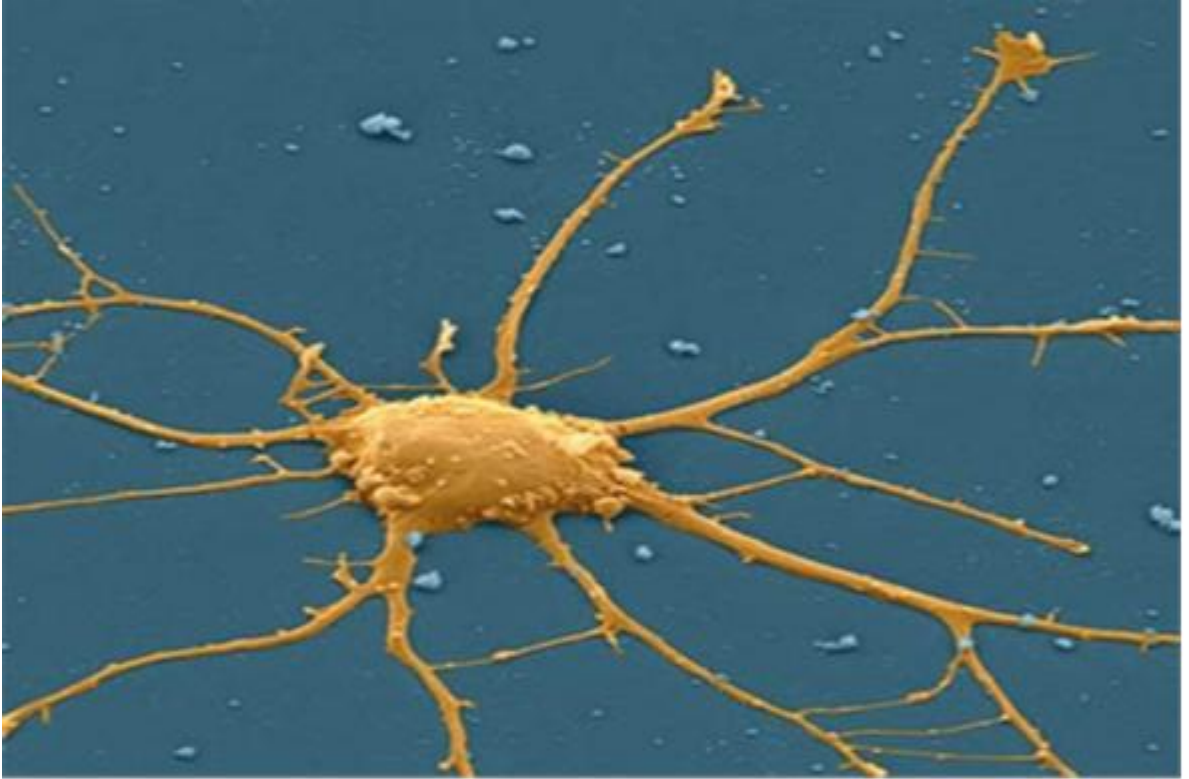
2.4. Santral Sinir Sistemi (SSS)

SSS, beyin, beyincik ve omurilikten oluşur. SSS dışında kalan bölümleri, periferik sinir sistemi (PSS) kapsamaktadır. PSS'de, başlıca gangliyonlar (sinir hücrelerinden meydana gelen topluluklar) ve sinirler bulunur. SSS'nin oluşumunda genetik ve çevresel faktörler birlikte rol almaktadırlar (Greenough ve ark, 1987). Prenatal dönemden doğuma kadar çok fazla değişmeyen nöronal içerik, doğumdan sonraki dönemde budanma ve sinaptik bağlantıların olgunlaşması gibi önemli olaylar meydana gelmektedir. SSS nöronları arasında bilgi akışı elektriksel ve kimyasal iletim aracılığıyla gerçekleşmektedir. Nörotransmitterler bahsedilen bu kimyasal iletimden sorumludurlar. Otizm, santral sinir sistemi (SSS)'ni etkileyen bir bozukluktur

2.4.1. Nöron

Sinir dokusunun ana hücreleridir. Nöron gövdesi, dendrit ve aksonlardan oluşurlar. Nöronların çapı, 3 – 150 mikron arasında değişmektedir. Beyincikteki granüler hücreler en küçükleri iken, serebellumda bulunan Purkinje hücreleri en büyük nöronlardır. Nöronlar, morfolojik açıdan yuvarlak, üçgen veya yıldız biçiminde gövdelere sahip olabilmektedirler. Nöronlar, glia hücreleri hariç, postnatal dönemde mitozla çoğalmazlar. Glia hücreleri, bir travma durumunda, çoğalar hasar giderici olarak görev yaparlar. Nöronlar kimi zaman, iki çekirdek bulundurabilirler (Bergland, 2014). Birbirleriyle aksonları yardımıyla iletişim kurarlar. Bu bağlantı yerlerinde bulunan ve sinaps adı verilen aralığa haberleşmelerini sağlamakta olan kimyasallarla nöral iletimi gerçekleştirirler. Bu sinyalleşmede görevli kimyasallara nörotransmitterler denir.

Şekil 5: Nöron hücresinin elektron mikroskop görüntüsü.



Postmortem çalışmalarda otizmli hastaların bazı beyin bölgelerindeki nöronlarda hacimce artış ve yaşın ilerlemesiyle nöronlarda hacimce ve sayıca azalış olduğu bulunmuştur. Bu fiziksel belirtilerin, beyindeki hacim değişikliğinin altında yatan patofizyolojik süreçte önemli olduğu düşünülmektedir (Courchesne ve ark., 2004). Beyin hacmindeki artışın bulunmasıyla, yeni sinaps oluşumu, dendritik dallanma ve aksonal miyelinizasyondaki artış, ardından dendritik ve sinaptik budanmada azalma sonucunda karmaşık ve hedefe yönelik olmayan ağların gelişmesi gibi farklı hipotezler ortaya atılmıştır (Ulay ve Ertuğrul, 2009).

2.4.2. Serebral korteks

Toplam beyin hacmindeki artış bulgularının ardından yapılan yapısal görüntüleme çalışmalarında hacim artışının hangi beyin bölgelerinden kaynaklandığı anlaşılmaya çalışılmıştır (Sparks ve ark. 2002). Çalışmaların sonucu göstermektedir ki, hacim artışı, başta serebral korteks olmak üzere, serebellum ve limbik sistem yapılarındaki beyaz ve gri cevher artışına bağlıdır. Hacim artışı bakımından farklı beyin bölgeleri karşılaştırıldığında sırasıyla en çok frontal, temporal ve parietal loblardaki artış dikkat çekmiştir. Hacim artışının en yüksek olduğu bölge olan frontal lob incelendiğinde ise dorsolateral prefrontal korteks ve ön singulat korteksi barındıran medyal frontal kortekste hacim artışı gözlenmiştir. (Carper ve ark., 2002; Carper ve Courchesne 2005)

2.4.3. Limbik yapılar

Otizm benzeri semptomların gelişimi ile ilgili olduğu düşünülen patolojik olayların amigdala ve hipokampus gibi beyin bölgeleriyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Postmortem incelemelerde bu beyin bölgelerinde hacim bakımından küçük fakat sayıca fazla miktarda nöronların bulunması yaygın görülen bir durumdur (Bauman ve Kemper, 2005). Amigdalanın hacmindeki artış, otizm tanısı konmuş bireylerde yapılan Yapısal MRG (Manyetik Rezonans Görüntüleme) çalışmalarında gösterilmiştir (Howard ve ark., 2000). Bunun yanında amigdala hacmi azalan veya normal bireylerle örtüşen vakalar da bulunmaktadır (Eigsti ve Shapiro, 2003). Otizm ve başka türlü adlandırılmayan yaygın

gelişimsel bozukluk tanılı bireyler karşılaştırıldığında otizmli gruptaki amigdala hacminin daha fazla olduğu bulunmuştur ve bunun da sonuç olarak hastalık şiddeti ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Erişkin otistik hastalarda hipokampal hacimler ise azalmış ya da normal olarak bildirilmektedir. Reseptif (Alıcı) konuşma alanı olması nedeniyle temporal lobun üstünde bulunan planum temporalin de konuşma merkezinin olduğu lobda büyük olması beklenir, fakat otizmli bireylerde bu asimetri saptanamamaktadır. Bu bulgu otizmde erken gelişimsel bozukluğun bir işareti olarak kabul edilmekte ve otizmdeki dil bozukluklarının altında yatan patolojiden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Ulay ve Ertuğrul, 2009).

2.4.4. Serebellum

Postmortem çalışmalarda en çok elde edilen bulgulardan birisi serebellumdaki Purkinje hücrelerinde azalmadır. Yapısal görüntüleme çalışmalarıyla, serebellum hemisferleri hacimce azalış saptanmış (Hashimoto ve ark., 1995; Courchesne ve ark., 2001), değişiklik saptanamamış veya hacim artışı saptanmıştır (Sparks ve ark., 2002). Bu farklı sonuçların doğurabileceği etkiler ile ilgili çeşitli düşünceler vardır fakat hepsinin ortak yönü serebellumu n patolojiden en çok etkilenen beyin kısımlarından biri olduğu yönündedir. Örneğin Courchesne ve arkadaşları, frontal lob hacminin artmasıyla serebellum hacminin azalması arasındaki ilişkinin, serebellumdaki nöron sayısının azalması sebebiyle inhibitor sinyal iletimindeki yetersizlik sonucu eksitator sinyal iletiminin arttığı ve sonucunda frontal büyüme neden olabileceğini söylemişlerdir (Courchesne ve ark., 2004).

2.4.5. Bazal Gangliyonlar ve Talamus

Literatürde, daha önceki yıllarda bazal gangliyonlardaki azalmadan bahseden daha fazla çalışma bulunmaktadır (Sears ve ark., 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazal gangliyonların çekirdek hacmindeki artış dikkat çekmektedir. Otizmde talamus hacminde daha önce herhangi bir farklılık saptanamamış olmasına karşın (Herbert ve ark., 2003), yakın dönemde yapılan bir çalışmada yüksek işlevli erkek hastalarda toplam beyin hacmine göre düzeltildiğinde talamus hacminde azalma gösterilmiştir (Tsatsanis ve ark., 2003)

2.5. Otizmde İşlevsel Beyin Görüntülemesi

Otizmin pek çok farklı çevresel, biyolojik ve genetik faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan heterojen nöropsikiyatrik bir bozukluk olduğu bilinmektedir. Otizmin olası etiyolojik etmenlerini, nöroanatomisini ve patofizyolojisini araştırmaya yönelik çok sayıda yapısal ve işlevsel beyin görüntüleme çalışması yapılmıştır.

Yapısal beyin görüntüleme çalışmaları ile pek çok farklı anatomik değişiklikler ortaya konmuştur ki, bu da gelişimin erken dönemlerinde nöron ağlarında olan yaygın bir bozukluğa işaret etmektedir (Bauman ve Kemper, 2005).

İşlevsel beyin görüntüleme çalışmalarında dil ve sosyal biliş alanında işlev gösteren temporal lob ve amigdalada etkinlik farklılıkları saptanmıştır (Shultz ve ark., 2000). Otistik bireyler dil ve sosyal biliş alanında, beyinlerinin etkin olarak fonksiyon göstermesi gereken beyin kısımlarını etkinleştirememekte ve de farklı alanları etkinleştirerek aynı fonksiyonları farklı kısımlara üstlenmeye çalışmaktadır (Baron-Cohen ve ark., 1999). Beyindeki normal gelişim süresi boyunca meydana gelen değişikliklerin netleştirilememiş olması otizmin etiyolojisini anlamak için gerekli adımların atılmasını güçleştirmektedir. İşlevsel beyin görüntüleme çalışmaları nörogelişimsel bir bozukluk olan otizmin nörobiyolojisinin anlaşılmasında önemli bir yere sahiptir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları

3.1.1. Hücre Kültürü İçin Gerekli Cihazlar ve Kimyasal Malzemeler

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli donanımdaki araç-gereçler: laminar akımlı kabin, karbon dioksit (CO₂) etüvü, faz kontrast mikroskop, hücreleri saklama için sıvı azot tankı ve hücrelerin üremeleri için gerekli tutunma ve hareketlerine olanak sağlayacak toksik olmayan, biyolojik olarak inert ve optik olarak saydam, tek kullanımlık steril plastik petrilere dir.

3.1.1.1. Laminar Akımlı Kabin (Laminar flow hood)

Laminar akım kabininde havadaki partikülleri uzaklaştıran HEPA (high efficiency particible) filtre kullanılır. Ortamda kısa dalga boylu UV ışığında her zaman için steriliteye katkıda bulunur. Deneyden önce ve sonra UV ışık açık bırakılır. Her kullanımdan sonra ortam %70'lik etanol ile temizlenir. Kullanılan horizontal kabinler Class C olarak da bilinen doku kültürü laboratuvarlarında daha çok ürün korumaya yönelik olarak kullanılan, kabinlerdir.

3.1.1.2. CO₂ İnkübatörü

Hücreler %5–10 CO₂'li ortamda çoğalırlar. Çünkü ortamın CO₂ içeriği medium NaHCO₃/ karbonik asit (H₂CO₃) dengesinde önemli rol oynar. Bu nedenle kültüre alınan kültür flask ve petrilere nin kapakları gaz giriş çıkışına uygun olmalıdır. İnkübatörlerin kapısı uzun süreli açık tutulmamalı, sıcaklık kaybı ve kontaminasyon riski göz önünde bulundurulmalıdır. Ortamdaki nem dengesi açısından inkübatördeki su kabının daima temiz ve dolu olması önemlidir. Kültür ortamının optimal sıcaklığı kullanılan organizmanın vücut sıcaklığına uygun olmalıdır. Genellikle 36,5–37°C hücre kültürleri için uygun sıcaklıktır.

3.1.1.3. Mikroskop

İnvert faz kontrast mikroskobu hücre kültürü çalışmalarında çok önemlidir. Kültür devam ederken hücrelerin büyümesi, morfolojik özellikleri ve kontaminasyon olup olmadığı invert mikroskopta takip edilir. Normal araştırma ışık mikroskobu (floresan atasmanlı) kültür sonrası testler (canlılık, sitogenetik, hücre sayımı vb.) için gereklidir. Hücreleri gözlemek için de faz kontrast mikroskoplar kullanılır.

3.2. Hücre Kültürü

SH-SY5Y (ATCC) nöroblastoma hücreleri önerilen besiyerinde % 5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik etüvde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerine % 10 fetal sığır serumu ve 100U/ml Penisilin/Streptomisin ve L-Glutamin eklenmesi ile elde edilen tam besiyerinde büyütülmüşlerdir. Her 4-5 günde bir, hücre yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak pasajları gerçekleştirilmiştir.

3.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı %10 FBS, 2mM glutamine, 100U/ml 100U/ml Penisilin/Streptomisin ve L-Glutamin, %0.1 non esansiyel aminoasit içeren DMEM medyumda, 37°C %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücre medyumunu her 3 günde bir değiştirilerek %90 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanmıştır. Bütün uygulamalar hücreler %75 yoğunluğa ulaştıklarında yapılmıştır. Hücreler ekildikten 24 saat sonra kültür medyumundaki FBS oranı %1 e düşürülerek ve 4. 7. ve 10. günlerde 10 µM retinoik asit eklenerek farklılaştırma başlatılmıştır. Hücrelerdeki morfolojik farklılaşmayı değerlendirmek için 4. 7. ve 10. günlerde invert mikroskop altında analiz edilmiştir.

3.4. SH-SY5Y Hücre Hattına TNF-α Uygulaması

Nöral kök hücreler ve farklılaşmış nöron hücreleri, kültür ortamında 8. günlerindeyken hücre medyumuna 10µM TNF-α eklenmiştir.

3.5. RNA izolasyonu

10 milyon hücre için 1 ml tri-reagent eklenerek pipetaj yaptıktan sonra 5 dak oda ısısında bekletildi. 200 ul kloroform eklendi. 15 sn vorteks edildikten sonra 2-3 dak oda ısısında bekletildi. Sonrasında 15 dak +4 derecede santrifüj yaonılarak üst faz yeni bir tüpe konuldu. 500 ul izopropanol eklenir. Vortekslenip 5-10 dak oda ısısında bekletildi. 10 dak +4 derecede santrifüj Supernatant atıldı. 750 ul 75% EtOH eklendi. 5 dak +4 derecede santrifüj Supernatant atıldı. 10 dak buzda bekletilerek alkol uçuruldu. 50 ul RNAase free su eklenip RNA pelleti çözüldü. 5 ependorfa bölünerek -80 derecede saklandı. Her tüp tek kullanımlık olacak şekilde hazırlandı böylece RNA'nın bozunması engellendi.

3.5. RNA'dan cDNA Hazırlanması

cDNA (complementer Deoksiribo Nükleik Asit) sentezlemek için SensiFAST cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Kitin protokolüne göre; master karışımı hazırlamak için 1ug RNA, 4 µl 5x TransAmp tamponu, 1µl Reverse transkriptaz enzimi ve 20 µl'ye tamamlayacak kadar DNase/RNase free su eklendi. Isı döngü cihazında 25°C 10 dakika, 42°C 15 dakika, 48°C 15 dakika, 85°C 5 dakika ve son olarak 4°C inkübasyon olacak şekilde program ayarlandı.

3.6. RT (Real-Time) PCR

RT PCR Roche LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I ile yapıldı. Kitin ön hazırlıkları için; Reaksiyon karışımı eritilerek, enzimden 10 µl içerisine eklendi, pipetajla karıştırıldı ve kullanana kadar ışıktan uzakta, ve buzda bekletildi. Toplam 10 µl hacimde PCR karışımı hazırlamak için dH₂O, Primer karışımı, MgCl₂ ve Master karışımı kitin protokolünde belirtilen miktarlarda eklendi. Roche LightCycler Nano cihazında sırasıyla, 95°C'de 600 sn bekleme, çoğaltma evresinde 95°C - 60°C - 72°C 45 döngü, 95°C'de 30 sn bekleme, erime evresinde 40°C den 60°C'ye son olarak da 40°C'de 30 sn bekleme şeklinde protokol düzenlendi ve çalıştırıldı.

3.7. P53 ve Kaspaz-3 Protein düzeylerinin ELISA Kit ile Spektrofotometrik Analizi

TNF- α 'nın kaspaz-3 ve p53 proteinlerinin düzeyinde meydana getirdiği değişiklikleri tespit etmek için CST PathScan® Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA kiti kullanıldı. Bu TNF- α 'nın kaspaz-3 ve p53 proteinlerinin düzeylerine etki gösterip göstermediklerini belirlemek için yapılmıştır. Kit için aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

Hücre Lizatının Hazırlanması:

SH-SY5Y kontrol ve RA ile farklılaştırılıp TNF- α uygulanan hücrelerin medyumu uzaklaştırıldı. Hücreler 1 kez soğuk PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldı ve 0.5 ml soğuk 1X hücre lizis tamponu eklendi hücreler 5 dk buzda inkübe edildi. Hücreler toplandı ve ependorfa aktarıldı. Lizat buzda bekletildi.10 dk. 4 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant hücre lizatıdır.

Test Prosedürü:

Mikrokuyucuklar oda sıcaklığına geldikten sonra, her mikrosantrifüj tüpüne 100 μ l örnek eklendi ve birkaç saniye vortekslendi. Hücre lizatları, uygun kuyucuklara eklendi. Üstü bantla kaplandı ve geceboyu 4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bant çıkarıldı ve kuyucuklar yıkandı. Her kuyucuk, 4 kez 200 μ l 1X yıkama tamponuyla yıkandı. Her yıkamada, plate, içindeki solüsyonu boşaltmak için kağıt havlunun üzerine ters çevrildi. Mikropleytin altı temizlendi. Her kuyucuğa 100 μ l uygun belirleyici antikor (detection antibody) eklendi. Üzeri bantla kapatıldı ve 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Yıkama prosedürü tekrarlandı. Her kuyucuğa, 100 μ l uygun HRP-bağlı ikincil antikor(HRP-linked secondary antibody) eklendi. Üzeri bantla kapatıldı ve 30 dk. 37 °C'de inkübe edildi. Yıkama prosedürü tekrarlandı. Her kuyucuğa 100 μ l TMB substratı eklendi. Üzeri bantla kapatıldı ve 10 dk. 37 °C'de inkübe edildi. 100 μ l STOP solüsyonu eklendi. Birkaç saniye hafifçe karıştırıldı. 30 dk. içinde 450nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

3.8. BIOGRID ile Biyoinformatik Olarak TNF- α ve GRID2, Kaspaz-3, p53 Genleri Arasındaki Yolakların Saptanması

BIOGRID ile herhangi iki gen arasındaki en kısa yolağı bulmak için algoritma yazıldı. Bu algoritma kullanılarak TNF- α ile GRID2, TNF- α ile Kaspaz-3 ve TNF- α ile p53

arasındaki etkileşimi saptamak için bu iki genin arasındaki en kısa yolak; matriks çarpımı yöntemiyle protein-protein etkileşiminin ağ olarak gösterilmesi ve matrikse dönüştürülmesiyle bulundu. Son olarak da bu yolaklardaki genler listelendi.

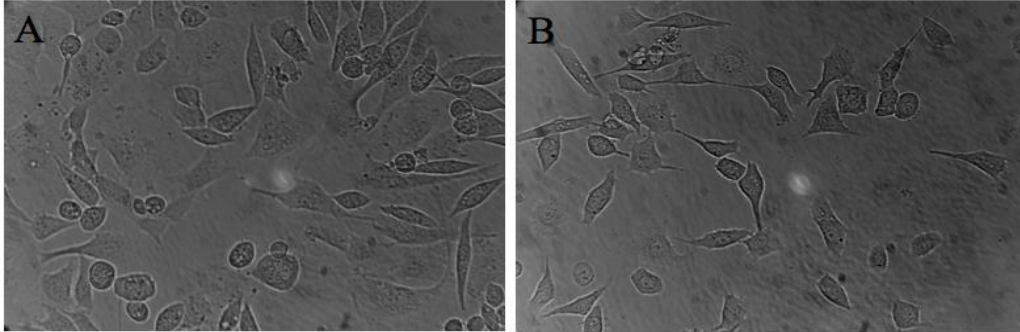
4. BULGULAR

4.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması Deneyi

Farklılaştırma protokolüne göre 10 uM RA ile muamele edilen SH-SY5Y hücreleri, 7 gün boyunca inkübatörde gerekli şartlar altında bekletildi. 1. ve 7. günlerde invert mikroskop kullanılarak kontrol grubu ve farklılaştırılan hücrelerin fotoğrafları çekildi. Şekil 7, Şekil 8 ve Şekil 9'da 1. Günden başlanarak SH-SY5Y hücrelerinin nöron hücrelerine farklılaştığı, akson oluşumu ve hücre morfolojisinin değişimi ile gösterilmiştir.

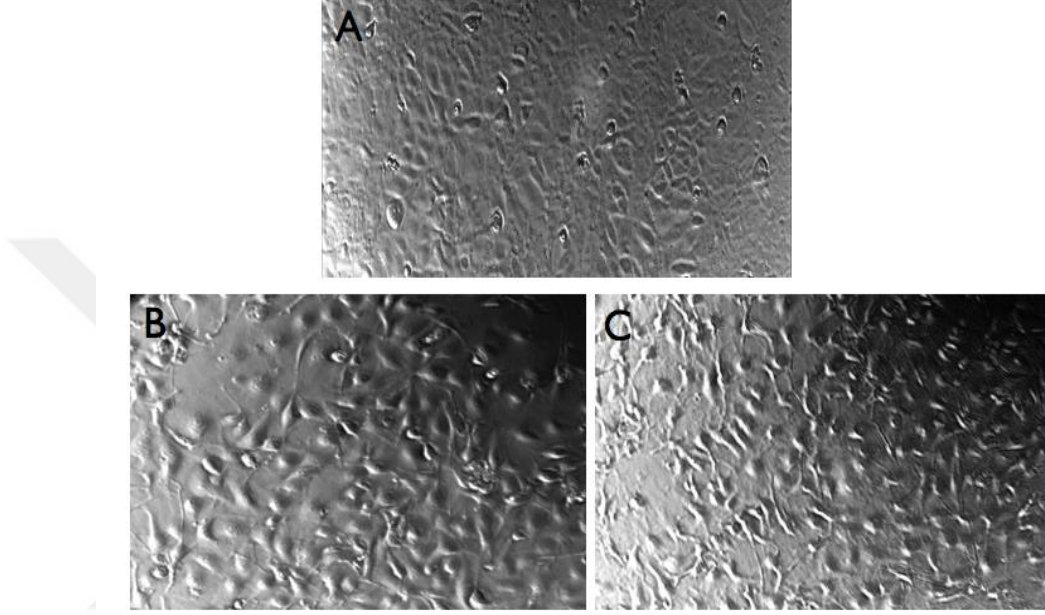
Şekil 6: %10 FBS içeren DMEM/F12 medyum içerisinde büyütülen kontrol grubu SH-SY5Y hücrelerinin (A) ve 10µM RA ile muamele edilerek farklılaştırılmaya başlanan SH-SY5Y hücrelerinin (B) 1. gündeki ışık mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları.

1. GÜN

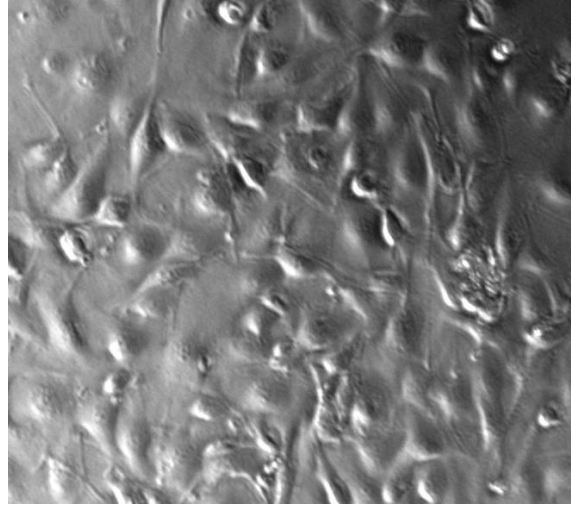


Şekil 7: %10 FBS içeren DMEM/F12 medyum içerisinde büyütülen kontrol grubu SH-SY5Y hücrelerinin (A) ve 10µM RA ile muamele edilerek farklılaştırılmaya başlanan SH-SY5Y hücrelerinin (B-C) 7. gündeki ışık mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafları

7. GÜN



Şekil 8: SH-SY5Y hücrelerinde RA uygulaması sonrasındaki 7. günde gözlemlenen morfolojik değişiklikler olan, akson oluşumu ve gövdenin üçgenleşmesinin ışık mikroskobu ile gösterilmesi.



4.2. İzole edilen RNA'ların Agaroz Jel Elektroforez Yöntemiyle Gösterilmesi.

İzole edilen ve EtBr işaretlemesi yapılan RNA'lar %2'lik Agaroz jelde 30 dakika yürütülerek UV görüntüleyici altında görüntülenmiştir.

Şekil 9: İzole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez sonucunun görüntülenmesi.



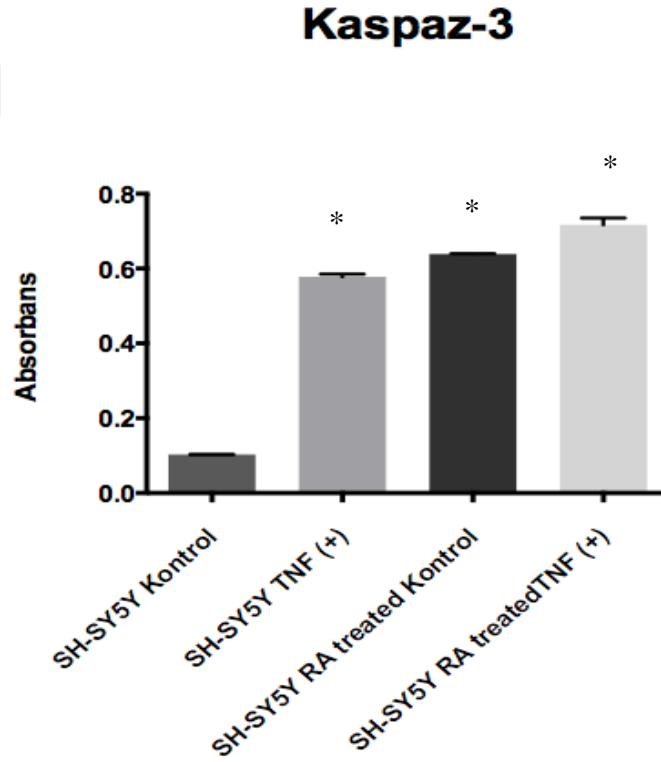
4.3. P53 ve Kaspaz-3 Protein Düzeylerinin Ölçümü

Spektrofotometrik ölçüm sonucunda elde edilen değerler SPSS ile analiz edildi. SH-SY5Y nöral kök hücrelerine göre p53 protein düzeyinin SH-SY5Y TNF (+), farklılaşmış kontrol, farklılaşmış TNF (+) hücrelerinde azaldığı bulunmuştur. Kaspaz-3 protein düzeyi ise TNF (+), farklılaşmış kontrol grubu, farklılaşmış TNF (+) hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine oranla artmış olarak bulunmuştur.

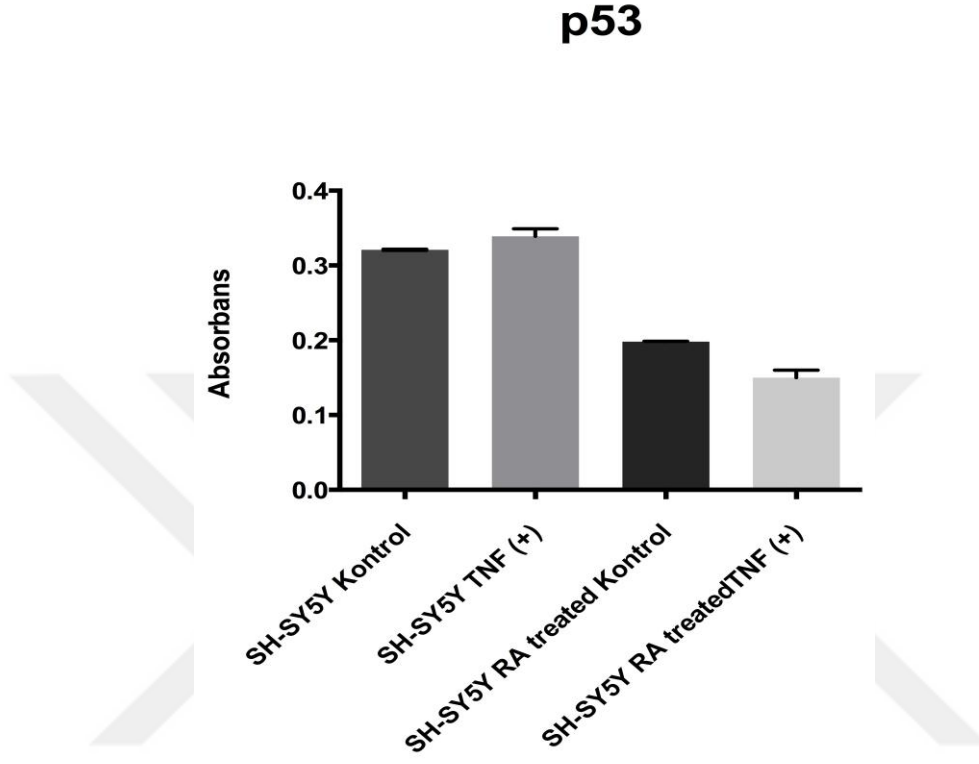
Tablo 1. Spektrofotometrik ölçüm sonucunda elde edilen değerlerin ortalamalarının ve standart sapmalarının tablo halinde gösterimi.

	p53	Kaspaz-3	
SH-SY5Y	Nöral kök hücre	0.326±0.0007	0.103±0.0003
	Nöral kök hücre TNF (+)	0.339±0.122	0.578±0.0071*
	Farklılaşmış	0.198±0.6	0.639±0.0006*
	Farklılaşmış TNF (+)	0.150±0.134	0.717±0.0183*

Şekil 10: Kaspaz-3 protein düzeyinin RA ve TNF uygulaması sonrasındaki değişimi. (*p<0.05 kontrole göre anlamlı olarak farklı).



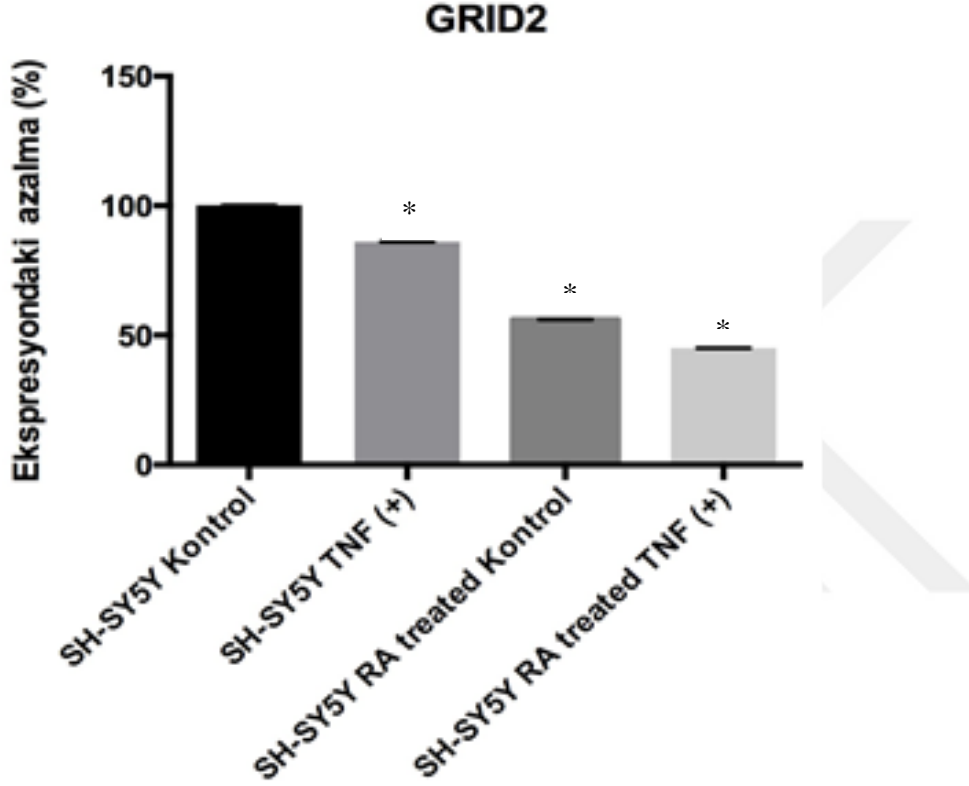
Şekil 11: p53 protein düzeyinin RA ve TNF uygulaması sonrasındaki değişimi.



4.4. Real-Time PCR ile GRID2 Gen Ekspresyon Düzeyindeki Değişikliklerin Ölçümü

Real-Time PCR deneyi sonucunda, kontrol grubu hücreleri ile SH-SY5Y TNF (+) hücreler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. SH-SY5Y nöral kök hücreler ve SH-SY5Y farklılaşmış hücreler arasında önemli ölçüde bir ekspresyon farkı bulunmuştur. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde GRID2 ekspresyonunun %44 azaldığı gözlenmiştir. Farklılaşmış hücrelere TNF uygulandığı zaman GRID2 ifadesinin kontrole göre %55 oranında azaldığı bulunmuştur.

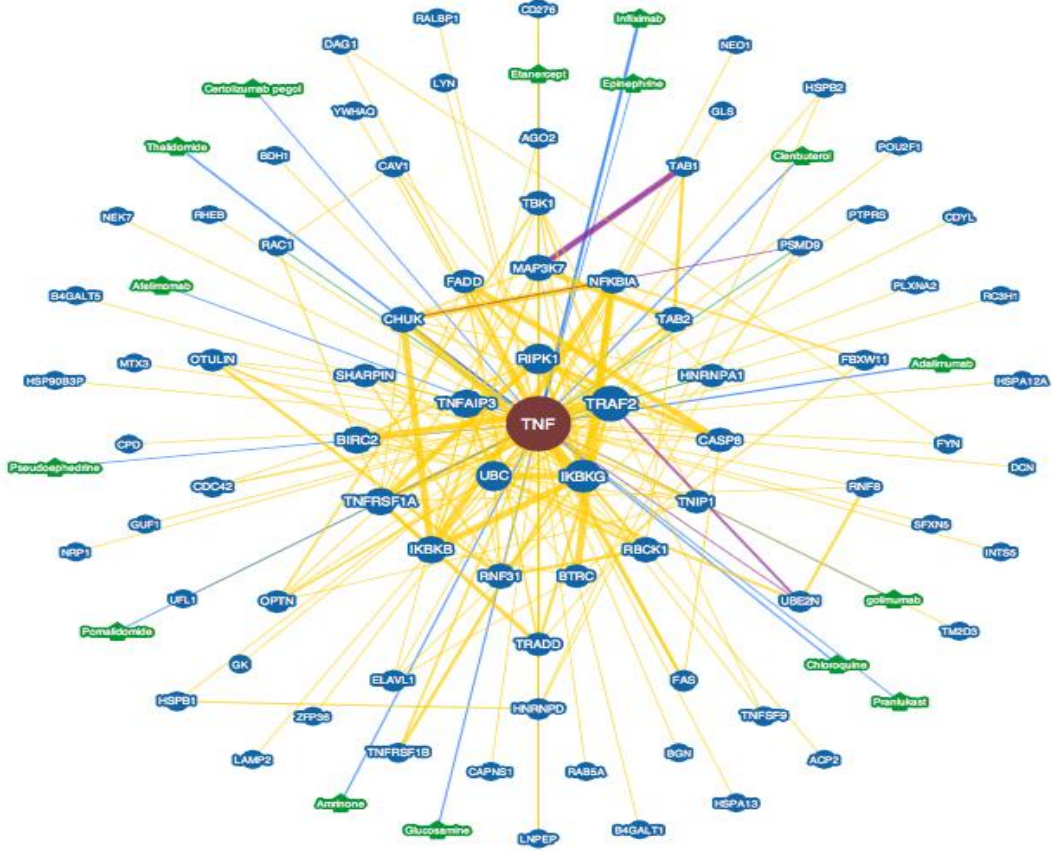
Şekil 12: RA ve TNF uygulamasından sonra, GRID2 geninin ekspresyonundaki azalma grafiği (*p<0.05 kontrole göre anlamlı olarak farklı).



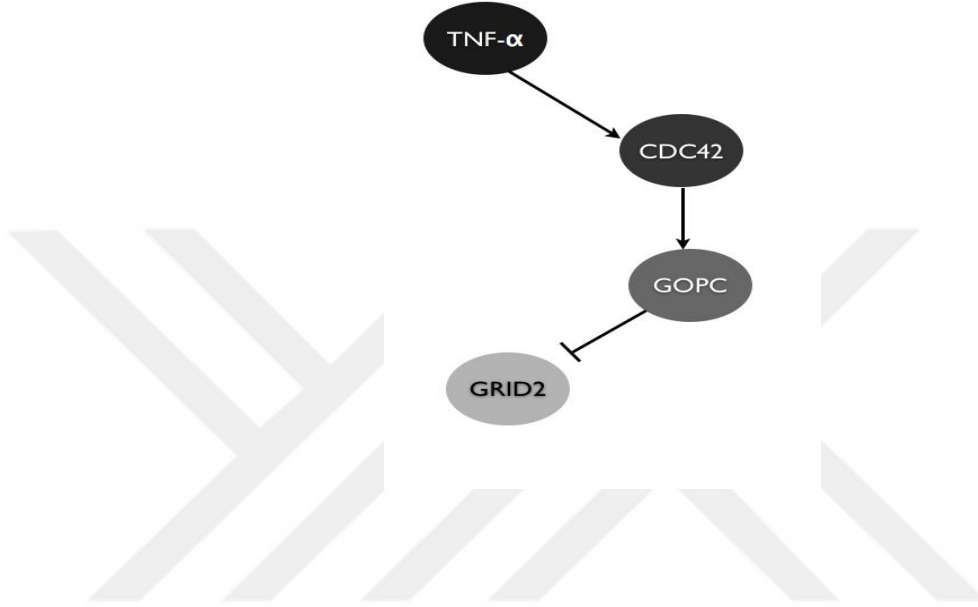
4.5. BIOGRID ile Yapılan Biyoinformatik Analiz ile TNF- α 'nın GRID2 Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etki Mekanizmasının Gösterilmesi.

BioGRID^{3,4} interaksiyon havuzundan elde edilen TNF- α 'nın etkileşim ağı bulunmuştur. Ayrıca BioGRID^{3,4} biyoinformatik yazılımı kullanılarak, TNF- α 'nın GRID2 ekspresyonunu CDC42 ve GOPC üzerinden etkilediği bulunmuştur.

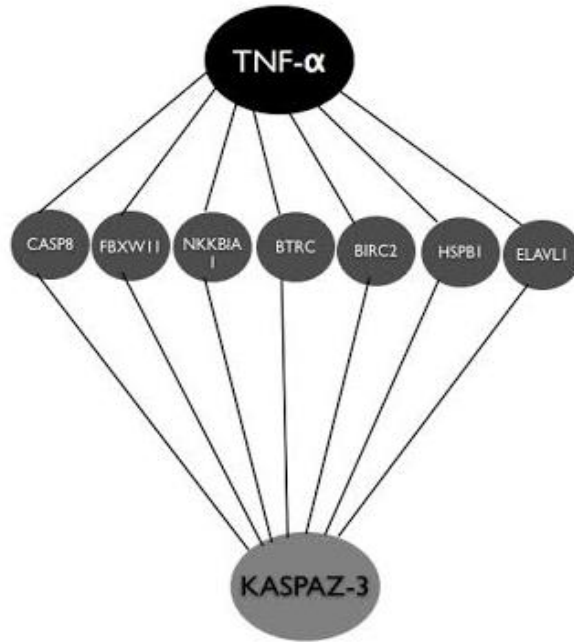
Şekil 13: BioGRID^{3,4} interaksiyon havuzundan alınan TNF- α etkileşim ağı.



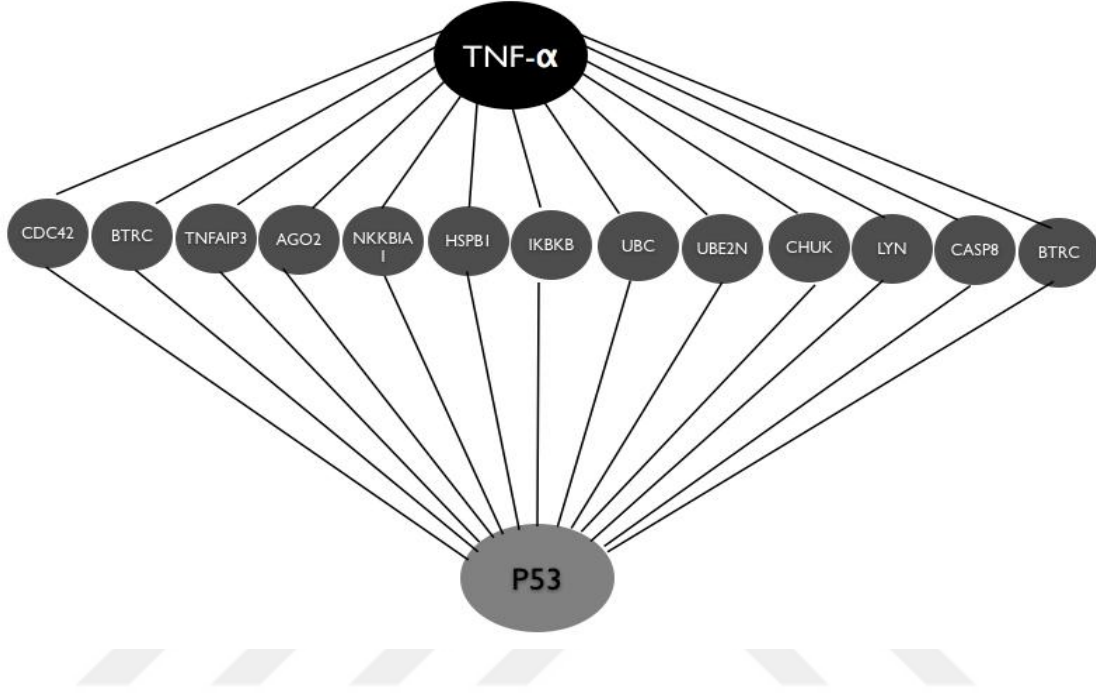
Şekil 14: TNF- α 'nın GRID2 ekspresyonunu baskıladığını gösteren yolağın şeması.



Şekil 15: TNF- α 'nın kaspaz 3 düzeyindeki değişimi etkilemesinin olası yolları



Şekil 16: Tnf - α 'nın p53 düzeyindeki değişimi etkilemesinin olası yolları



5. TARTIŞMA

Otizm, hafif ve atipik formları ile oldukça sık rastlanan nörogelişimsel hastalıklardan biridir (Korkmaz, 2010). Kardeşlerde, normale oranla 10-100 kez daha fazla risk bulunmaktadır. Monozigotik ikizlerde uyum geniş otizm fenotipi düşünüldüğünde yaklaşık %90, dizigotik ikizlerde ise %0-24 arasındadır (Szatmari ve ark, 2002). Çeşitli çalışmalarda otizmle yakından ilişkili bazı genler saptanmıştır. Bu genler değişik gruplara ayrılabilir. Reelin, BCL-2, Engrailed-2, WNT gibi nörogenez ile ilgili olanlar, serotonin ve glutamat reseptör gen varyantları gibi biyokimyasal süreçleri denetleyenler, BDNF, MECP2, nöroligin gibi dendrit ve sinaps gelişimi ile ilgili olanlar (Polleux, 2002) bulunmaktadır. Bununla birlikte otizmin sadece genetik nedenlere bağlı bir hastalık olmadığını, çevresel nedenlerin de etken olduğunu düşündüren bulgular vardır. Öncelikli olarak otistik bir çocuğun tek yumurta ikizinin her zaman otistik olmaması, sonradan oluşan beyin hasarına bağlı olabileceği bu yargıyı açık bir şekilde ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca otistik çocukların gebelik ve doğum öykülerinde komplikasyonlar olması, ilk 1 ay içinde daha sık enfeksiyon (genitoüriner, gastrointestinal enfeksiyon), artmış anne/baba yaşı, bazen tamamen normal bir doğum ve gelişimi takiben 8 ay-2 yaş arası tüm otistiklerin 1/3'ünde görülen gerileme, bağışıklık sistemi bozuklukları görülmesi, immünolojik bozukluklar ve minör fiziksel anomalilerin varlığı da çevresel etkenleri düşündürür (Smalley ve Collins, 1998). Yapılan bir çalışmada otizmin yüksek eğitimli kişilerin yaşadığı bölgelerde ve üniversite mezunu olan ebeveynlerde 4 kez daha fazla görüldüğü saptanmıştır; bunun nedeni bu tip ailelerin semptomların farkına varıp bir uzmana daha fazla başvurmaları olabilir (Meter ve ark, 2010). Çevresel etkiler içinde anneden kaynaklanan etkiler, nörotoksin ve potansiyel çevre kirleticilerine maruz kalma araştırmacıların dikkatini yoğunlaştırdığı alanlar olmuştur (Torrente ve ark, 2002). Değişik çalışmalar otizmde %60 hastada değişik tipte anormal hücrenel ya da humoral yanıtlara ilişkin immünolojik bozukluklar göstermiştir (Licinio ve ark, 2002). Otizmin görüldüğü ailelerde otoimmün bozuklukların, örneğin tip I diabet, erişkin romatoid artrit, hipotiroidizmin sık olduğu gösterilmiştir. Otizimli hastalarda prenatal dönemde beyin gelişiminde olumsuz etkiye neden olan ve anneye ait otoantikolar saptanmıştır (Comi ve ark, 1999). Ayrıca, hücrenel düzeyde yapılan deneyler sonucu elde edilen veriler, glutamat stimülasyonu ile ilişkili nöronların oksijen radikalleri oluşumu ile

etkileştiklerini göstermiştir. Bu radikaller, tekrar hem glutamat salınımına hemde geri alım inhibisyonuna neden olurlar; böylece sürekli bir döngü gerçekleşir (Brecht ve ark., 2001). Glutamat eksitotoksitesisi, apoptotik bir nörodejenerasyonu tetikleyebilmektedir. Otizmlili bireylerde glutamaterjik transmisyonadaki bozukluk, glutamat reseptör genlerinin işlevlerindeki disfonksiyonlarla ilişkilidir (Carlson, 2011).

Çalışmamızda, otizm ile ilişkili GRID2 glutamat reseptörünün, nörodejenerasyonun tetiklenmesindeki etki mekanizmasını anlamaya yönelik hücresel modellemesini oluşturduk. GRID2'nin yeni tanımlanmış bir glutamat reseptörü olması ve fizyolojik etki mekanizmasının nasıl olduğu ile ilgili sınırlı çalışma bulunması nedeniyle, GRID2 reseptör geninin kontrol mekanizmalarının anlaşılması oldukça önemlidir.

Öncelikle RA ile farklılaştırdığımız ve 24 saat TNF- α ile muamele ettiğimiz SH-SY5Y insan nöral kök hücrelerinde nörodejenerasyonu tetikledik. SH-SY5Y hücrelerinde TNF- α stimülasyonu kaspaz-3 protein düzeyinin artışına ve GRID2 gen ifadesinin azalmasına neden olmuştur. Kaspaz-3 protein aktivasyonu bir çok nörodejeneratif hastalıkta belirleyici bir biyogöstergeçtir (D'Amelio ve ark., 2012). Bu aktivasyonun GRID2 reseptör düzeyinin azalışına neden olması, GRID2 reseptör gen ifadesinin nörodejenerasyonda düzenleyici rol oynadığını ve onun bu etkisinde TNF- α 'nın uyarıcı etkisi olduğunu göstermektedir. TNF- α 'nın uyarısıyla apoptotik yolda anahtar protein rolü üstlenen kaspaz-3'ün artışı nöroinflamasyonla nörodejenerasyonun aralarındaki ilişkinin önemini göstermektedir. P53 düzeyinde anlamlı bir değişim görülmemesi, GRID2 gen ifadesinin düzenlenmesindeki sinyal yolağının spesifik olarak kaspaz-3 üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.

Yaptığımız biyoinformatik analizler, TNF- α 'nın GRID2 gen ifadesindeki azaltıcı etkiyi, Cdc42 ve GOPC genlerini aktive ederek gerçekleştirdiğini göstermektedir. TNF- α bu etkisini farklılaşmamış nöral kök hücrelerde de göstermekle birlikte, farklılaşmış nöronlarda bu etkisini 2 kat arttırmıştır. Nöron farklılaşmasının da GRID2 gen ifadesini azaltması TNF- α etkisinin 2 kat artmasına neden olmuştur. Otizmde meydana gelen glutamat artışının, glutamat reseptör gen ifadesinin azalmasından kaynaklandığını ve bu azalmada TNF- α 'nın etken olduğunu düşünmekteyiz.

Çeşitli çalışmalarda otizmlili hastaların plazma ve beyin omurilik sıvılarında TNF- α düzeyinin arttığı gösterilmiş ve TNF- α 'nın otizm biyogöstergeçi olup olamayacağı tartışılmıştır (Xiaohong ve ark., 2009). Ancak TNF- α 'nın glutamat reseptör gen ifadesini

kontrol eden sinyal yolağının moleküler mekanizması bilinmemektedir. Bu anlamda yaptığımız çalışma, TNF- α 'nın GRID2 gen ifade düzenlenmesindeki rolünü ve etki ettiği sinyal yolağını gösteren ilk çalışma olmuştur.

Yapılan bu çalışmada, otizmin moleküler mekanizmasında rol oynayan glutamat reseptör düzeyinin düzenlenmesinde nörodejeneratif ve nöroinflamasyonel faktörlerinin etkileşimi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Yaptığımız analizler, TNF- α 'nın Cdc42 ve GOPC genlerinin aktivasyonu üzerinden GRID2 geninin ifadesinin baskılandığını göstermiştir. Glutamaterjik yolda oldukça önemli bir role sahip olan GRID2 geninin anlatımının, dolayısıyla glutamat reseptör sayısının azalmasının glutamaterjik yolağın regülasyonunun bozulmasına ve glutamatın sinapslardaki düzeyinin artmasına neden olduğunu düşünmekteyiz. Glutamat düzeyinin artışı, otizm bulgularının en önemlilerinden bir tanesidir. Aynı zamanda immün sistem bozukluğu da, otizm tanısı konmuş hastalarda oldukça sık görülmektedir. Bulduğumuz sonuçlara göre, TNF- α 'nın GRID2 reseptör geninin ifadesini kontrol ettiği görülmektedir. İkinci olarak TNF- α ; kaspaz-3 apoptotik kaskadının aktivasyonunu sağlayarak, nörodejenerasyona sebep olmaktadır. Otizimli hastalardaki en önemli bulgulardan birisi olan nöron sayısındaki azalmadır. Kurduğumuz deney düzeneğinde, SH-SY5Y hücre hattına TNF- α uygulamasıyla otizmin nörodejeneratif temellerinin hücre kültürü koşullarında bir modelini oluşturduk. GRID2 reseptör geninin ifadesinin azalmasıyla kaspaz-3 artışı arasında ters ilişki olduğunu gözlemledik.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre TNF- α ve GRID2 arasındaki ilişkinin tek yönlü olmayabileceği de düşünülmektedir. GRID2 gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle, TNF- α düzeyinin değişmesi de gözlenebilir fakat bu ilişkiyi göstermek için bu çalışmanın ilerletilmesi gerekir.

Uberty ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada NMDA tip glutamat reseptörleriyle p53 ün artışının ters orantılı olduğunu bulmuştur. GRID2 reseptörü ile p53 arasında anlamlı bir ilişki bulunmaması her iki reseptörün farklı sinyal yolları üzerinden düzenlendiğini göstermektedir.

Selimi ve arkadaşlarının 2001 yılındaki çalışmasında Purkinje hücrelerinin apoptozlarını göstermek için GRID2 delesyonlu fareler kullanılmış ve aktif kaspaz-3 düzeyinin artmış olduğu bulunmuştur. Biz TNF- α stimülasyonu ile oluşturduğumuz nörodejenerasyon modelinde TNF- α sinyal yolağı üzerinden kaspaz-3'ün GRID2 reseptör

gen ifadesini azaltığını gösterdik. Bu sonuçlar GRID2 reseptöre gen ifadesi artışının kaspaz-3'ü dolayısıyla nörodejenerasyonu baskılayacağı etkisi olabileceğini göstermektedir. Nöronlarda retrovirüsle GRID2 geninin miRNA enfeksiyon tekniği kullanılarak GRID2 gen ifadesinin arttırılmasının nörodejenerasyonu engelleyici etkisi olabileceğini düşünmekteyiz ve *in vitro* olarak TNF- α sinyal yolağı ile ilgili bulduğumuz sonuçlar otizmde TNF- α düzey artışının biyogöstergeç olabileceği görüşünü güçlendirici niteliktedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bir pro-inflamatuar sitokin olan TNF- α 'nın nöral kök hücrelere muamelesi ile GRID2 gen anlatımını değiştirerek, otizmin etiyojisinde rol oynadığı ve artmış glutamat düzeyi ile de ilişkili olduğu söylenebilir.

Kaspaz-3 protein düzeyindeki artışın, TNF- α stimülasyonu ile gerçekleşmesi de nöral dejenerasyonda immün sistemin kritik bir rol üstlendiğini göstermiştir. Kaspaz-3 apoptotik kaskadı aktive ederek nörodejenerasyona neden olmaktadır.

GRID2 reseptörü ile p53 arasında anlamlı bir ilişki bulunmaması bu iki proteinin fonksiyonlarının farklı sinyal yolları üzerinden düzenlendiğini göstermektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, TNF- α 'nın otizmin moleküler mekanizmalarında önemli bir rolü olabileceği ve hastalığın biyogöstergeci olarak kullanılabilmesi görüşünü desteklemektedir.

Otizmin moleküler düzeyde anlaşılabilmesi için yapılan bu çalışmanın ilerletilmesi, otizm tanısında biyobelirteç olarak kullanılacak bir keşif ve tedavi için yeni yaklaşımlar sunacaktır. Bunun için, TNF- α 'nın GRID2'yi baskılamak için kullandığı yolaktaki diğer proteinler Cdc42 ve GIPC'nin protein düzeyindeki değişimleri ve gen anlatım profilleri de incelenmelidir.

6. KAYNAKLAR

Ardhanareeswaran, K., Volkmar, F. (2015) Focus: Autism Spectrum Disorders. *Yale J of Biology and Medicine*. 88:3-4.

Aroniadou-Anderjaska, V., et al., Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res*, 2008. 78(2-3): p. 102-108

Armijo, J.A., et al., [Advances in the physiopathology of epileptogenesis: molecular aspects]. *Rev Neurol*, 2002.

Baron-Cohen S, Leslie AM, Frith U. (1985) Does the autistic child have a 'theory of mind'?. *Cognition*. 21:37-46.34(5): p. 409-29.

Bauman, M.L., Kemper, T.L. (2005) Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int. J. Devl Neuroscience*. 23:183-187.

Belmonte, M.K., Cook, E.H.J., Anderson, G.M., Rubenstein, J.L., Greenough, W.T., Beckel, M.A., Courchesne, E., Boulanger, L.M., Powell, S.B., Levitt, P.R., Perry, E.K., Jiang, Y.H., DeLorey, T.M., Tierney, E. (2004) Autism as a disorder of neural information processing: Directions for research and targets for therapy. *Mol Psychiatry*. 9:646-663.

Bravo, HC. (2013) Gene Expression Analysis with R and Bioconductor: from measurements to annotated lists of interesting genes : *Computational Systems Biology and Functional Genomics*.

Brainard, M.S., Knudsen, E.I. (1998) Sensitive periods for visual calibration of the auditory space map in the barn owl optic tectum. *J Neurosci*. 18:3929-3942.

Brecht, S., Gelderblom, M., Srinivasan, A., Mielke, K., Dityateva, G., & Herdegen, T. (2001). Caspase-3 activation and DNA fragmentation in primary hippocampal neurons following glutamate excitotoxicity. *Molecular brain research*, 94(1), 25-34

Burger, RA., and Warren, RP. (1998) Possible immunogenetic basis for autism: Mental retardation and developmental disabilities research reviews 4: 137-141 .

Carper, R.A., Courchesne, E. (2000) Inverse correlation between frontal lobe and cerebellum sizes in children with autism. *Brain*. 123:836-844.

Carper, R.A., Moses, P., Tigue, Z.D. (2002) Cerebral lobes in autism: early hyperplasia and abnormal age effects. *Neuroimage*. 16:1038-1051.

Carper, R.A., Courchesne, E., (2005) Localized enlargement of the frontal lobe in autism. *Biol Psychiatry*,.57:126-133.

Cheng, X.L., Ding, F., Li, H., Tan, X.Q., Liu, X., Cao, J.M., Gao, X. (2015) Activation of AMPA receptor promotes TNF- α release via the ROS-cSrc-NF κ B signaling cascade in RAW264.7 macrophages. *Biochem and Biophys Res Communications*. 461:275-280.

Cheng, J., Dong, J., Cui, Y., Wang, L., Wu, B., Zang, C. (2012) Interacting Partners of AMPA-Type Glutamate Receptors. 48:441-447.

Comi, AM., Zimmerman, AW., Frye, WH., Law PA., and Peeden, JN. (1999) Familial Clustering of Autoimmune Disorders and Evaluation of Medical Risk Factors in Autism: Journal of Child Neurology DOI: 10.1177/088307389901400608.

Courchesne, E., Redcay, E., Kennedy, D.P. (2004) The autistic brain: birth through adulthood. Current Opinion in Neurology, 17:489– 496.

Courchesne, E., Mouton, P.R., Calhoun, M.E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M.J. (2011) Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. JAMA. 306(18):2001–10.

D'Amelio, M., Sheng, M., Cecconi, F. (2012) Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. Trends in Neurosciences. 35(11):700-709.

DeVito, T.J., Drost, D.J., Neufeld, R.W. (2007) Evidence for cortical dysfunction in autism: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. Biol Psychiatry, 61:465-73.

Dy, M., Vazquez, A., Bertoglio, J. et al. (1999) General aspects of cytokine properties and functions. In: Theze J. (Ed). The cytokine network and immune functions. Oxford University Pres, New York, 1-13

Eigsti, I.M., Shapiro, T. (2003) A systems neuroscience approach to autism: biological, cognitive and clinical perspectives. MR and Dev Dis Res Rev. 9:206–216.

Elena Korvatska, E., Water, JV., Anders, TF., and Gershwin, ME. (2002): Genetic and Immunologic Considerations in Autism Neurobiology of Disease 9, 107–125.

Feldman, D.E., Knudsen, E.I. (1998) Experience-dependent plasticity and the maturation of glutamatergic synapses. Neuron. 20:1067-1071

Goines, PE., Ashwood, P. (2013) Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment: Neurotoxicol Teratol. 36:67-81.

Greenough, W.T., Black, J.E., Wallace, C.S. (1987) Experience and brain development. Child Development. 58:539-559.

Howard, M.A., Cowell, P.E., Boucher, J. (2000) Convergent neuroanatomical and behavioural evidence of an amygdala hypothesis of autism. Neuroreport. 11:2931–2935.

Herbert, M.R., Ziegler, D.A., Deutsch, C.K. (2003) Dissociations of cerebral cortex, subcortical and cerebral white matter volumes in autistic boys. Brain. 126:1182–1192.

Herlenius, E., and Lagercrantz, H. (2004) Development of neurotransmitter systems during critical periods: Experimental Neurology 190 S8 – S21.

Herman, S.T. Clinical trials for prevention of epileptogenesis. Epilepsy Res, 2006. 68(1): p. 35-8.

- Kaplan, İ. (2010) Otizm ve otistik çocuklar bitirme çalışması. Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm
- Korkmaz, B. (2010) Otizm: Klinik ve nörobiyolojik özellikleri, erken tanı, tedavi ve bazı güncel gelişmeler: Turk Pediatri Arşivi . Vol. 45, p37-44. 8p.
- Landrigan, P. J. (2010). What causes autism? Exploring the environmental contribution. Curr. Opin. Pediatr. 22, 219–225.
- Levitt, P. (2003) Structural and functional maturation of the developing primate brain. J Pediatr. 143: 35-45.
- Liao, D., Hessler, N.A., Malinow, R. (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. Nature. 375:400-404.
- Monnerie, H., Le Roux, P.D.(2006) Glutamate receptor agonist kainate enhances primary dendrite number and length from immature Mouse cortical neurons *in vitro*. J Neurosci Res. 83:944-956.
- Moosmann, B., Behl, C. (2002) Antioxidants as treatments for neurodegenerative disorders. Expert Opin Investig. Drugs.11(10), 1407-1435.
- Olenow C.W., Tatton W.G., Jener P.: Mechanisms of cell death in Parkinson's disease. In: Jankovic J.J., Tolosa E., Parkinson's disease and movement disorders. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 4th. Edition., 38-59 (2002).
- Oral, S., Göktalay, G. (2012) Şizofreni Hastalığının Biyolojik Belirteçlerinden Olan Ön Uyarıcı Aracılı İnhibisyon Testine (ÖUAİ) Göre Gruplandırılmış Sıçanların Dizosilpin (MK-801)'e Verdikleri Yanıt Farklılıkları: Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi;2(1): 5-10.
- Pickering, M., Cumiskey, D., and O'Connor, J. Actions of TNF- α on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system: Exp Physiol 90.5 pp 663–670. DOI: 10.1113/expphysiol.2005.030734.
- Polleux, F., and Lauder, JM. (2004) Toward a developmental neurobiology of autism: Mental retardation and developmental disabilities research reviews. 10: 303–317.
- Rer, R. (2005) İdiopatik Parkinson hastalığı etyopatogenezinde seruloplazmin yeri ve proton MR spektroskopisi ile verifikasyonu. Uzmanlık tezi.
- Rice, D., and Barone, S. (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. Environ. Health Perspect. 108:511–533.
- Rogers, TD., McKimm, E., Dickson, PE., Goldowitz, D., Blaha, CD., and Mittleman, G. (2013) Is autism a disease of the cerebellum? An integration of clinical and pre-clinical research: Front. Syst. Neurosci. 7(15):1-16.
- Sarachana, T., Hu, V.W. (2013) Genome-wide identification of transcriptional targets of RORA reveals direct regulation of multiple genes associated with autism spectrum disorder. Molecular Autism. 4:14.
- Selimi, F., Campana, A., Bakouche, J., Lohof, A., Vogel, M.W., Mariani, J. (2001) Mechanisms of Neuronal Death: An *in vivo* Study in the Lurcher Mutant Mice. Neuronal Death by Accident or by Design. C.E. Henderson, 109-135. Springer.
- Schultz, R.T., Gauthier, I., Klin, A. (2000) Abnormal ventral temporal cortical activity during face discrimination among individuals with autism and Asperger syndrome. Arch Gen Psychiatry. 57:331-40.
- Sears, L.L., Vest, C., Mohamed, S. (1999) An MRI study of the basal ganglia in autism. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 23:613–624.

- Shimmura, C., Suzuki, K., Iwata, Y., Tsuchiya, K. J., Ohno, K., Matsuzaki, H., Mori, N. (2013). Enzymes in the glutamate-glutamine cycle in the anterior cingulate cortex in postmortem brain of subjects with autism: *Molecular Autism*, 4, 6. doi:10.1186/2040-2392-4-6.
- Shimmura, C., Suda, S., Tsuchiya, K.J., Hashimoto, K., Ohno, K., Matsuzaki, H., Iwata, K., Matsumoto, K., Tomoyasu, W., Kameno, Y., Suzuki, K., Tsujii, M., Nakamura, K., Takei, N., Mori, N. (2011) Alteration of plasma glutamate and glutamine levels in children with high-functioning autism. *PLoS One*. 6(10):e25340.
- Shinohe, A., Hashimoto, K., Nakamura, K., Tsujii, M., Iwata, Y., Tsuchiya, K.J., Sekine, Y., Suda, S., Suzuki, K., Sugihara, G., Matsuzaki, H., Minabe, Y., Sugiyama, T., Kawai, M., Iyo, M., Take, N., Mori, Norio. (2006) Increased serum levels of glutamate in adult patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:30(8):1472–1477.
- Sparks, B.F., Friedman, S.D., Shaw, D.W., Aylward, E.H., Echelard, D., Artru A.A., Maravilla K.R., Giedd, J.N., Munson, J., Dawson, G., Dager, S.D., Stahl, S.M. (2000) Brain structural abnormalities in young children with autism. *Neurology*. 59;184-192.
- Szatmari, E., Jones, MB., Zwaigenbaum, L., and MacLean, JE. (1998) Genetics of Autism: Overview and New Directions: *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 28(5):351-368.
- Şener, E.F., Özkul, Y. (2013). The Genetic Basis of Autism. *Journal of Health Sciences*.
- Tieu, K., Zuo, D.M. and Yu, P.H. (1999), Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of Bcl-2 and p53 proteins. *J. Neurosci. Res.*, 58: 426–435.
- Tonhajzerova, I., Ondrejka, I., Mestanik, M., Mikolka, P., Hrtanek, I., Mestanikova, A., Bujnakova, I., and Mokra, D.(2015) Inflammatory Activity in Autism Spectrum Disorder. 861:93-98.
- Trottier, G., Srivastava, L., Walker, CD. (1999) Etiology of infantile autism: a review of recent advances in genetic and neurobiological research: *J Psychiatry Neurosci*. 24(2):103-15.
- Tsatsanis, K.D., Rourke, B.P., Klin, A. (2003) Reduced thalamic volume in high-functioning individuals with autism. *Biol. Psychiatry*. 53:121–129.
- Tural, Ö., Önder, E.(2002) Glutamateryjik Sistem, N-Metil-D-Aspartik Asit Reseptörleri ve Depresyon. *Klinik Psikiyatri*. 4:30-34.
- Ulay, T.H., Ertuğrul, A. (2009) Otizmde Beyin Görüntüleme Bulguları: Bir Gözden Geçirme. *Türk Psikiyatri Dergisi*. 20(2):164:174.
- Uzunova, G., Hollander,E., and Shepherd, J. (2014) The Role of Iontropic Glutamate Receptors in Childhood Neurodevelopmental Disorders: Autism Spectrum Disorders and Fragile X Syndrome: *Current Neuropharmacology*. 12, 71-98.
- Li, X., Chauhn, A., Shiekh, A. M., Patil, S., Chauhn, V., Li, X.-M., Malik, M. (2009). Elevated Immune Response in the Brain of Autistic Patients. *Journal of Neuroimmunology*. 207(1-2), 111–116.
- Yıldırım, D. (2010) Psikiyatrik Hastalıklarda Radyolojik Görüntüleme: Yeni Gelişmeler. *Psikiyatride güncel yaklaşımlar*. 2(3):333-361.
- Yorbık, Ö., Akın, R., Söhmen, T. (2000) Childhood Disintegrative Disorder and a Case Report. *Turkish Journal of Child and Adolescent Mental Health*, 7 (1), 43-52.
- Yusuf, M., Leung, K., Morris, KJ., Volpi, EV. (2013) Comprehensive cytogenomic profile of the *in vitro* neuronal model SH-SY5Y: *Neurogenetics* 14:63–70 DOI 10.1007/s10048-012-0350-9.

EK 3. ÖZGEÇMİŞ

Zeynep KALKAN

KİŞİSEL BİLGİLER

Adres :Bulgurlu Mh. İzzettinbey Sokak. Elvankent Sitesi M Blok No:20 D:12
ÜSKÜDAR/İSTANBUL
GSM : 05074929287
e-mail : zeynep.ekc@gmail.com
Doğum Tarihi : 09.02.1990

EĞİTİM

2013 - Üsküdar Üniversitesi, Nörobilim Yüksek Lisans
2008 - 2012 İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
2004 - 2007 Konya-Ereğli Atatürk Lisesi

İŞ DENEYİMİ/STAJ

07/2011-09/2011 University of Arkansas at Little Rock – Microbiology Department
Yaz Stajı

10/2013 – 03/2014 Üsküdar Üniversitesi – Moleküler Biyoloji ve Genetik
Laboratuvarı, genetik tanı, gönüllü araştırmacı.

04/2014 – Üsküdar Üniversitesi – Hücre Kültürü Laboratuvarı
Chlorophyceae, Cyanophyceae, Prymnesiophyceae,

Eustigmatophyceae ve Bacillariophyceae Ailesine Ait Mikroalglerin
Antilösemik İlaç Potansiyellerinin Moleküler ve Mekanistik
Temellerinin Araştırılması – TUBITAK Proje Asistanı

YABANCI DİL

İngilizce	Okuma / Konuşma / Yazma
	8 7 8

YAYINLAR

1. **Kalkan, Z.**, Gur, H., ARSLAN, B.A., Recent studies on genetic and environmental basis of autism. The Journal of Neurobehavioral Sciences. 1(3): 92-94
doi: 10.5455/JNBS.1408369302
2. **Ekici, Z.**, Pavan, C., Tarasenko, O. Analysis Mus musculus genes networks associated with alveolar macrophages. 6th BioNanoTox Congress. Poster presentation
3. **Kalkan, Z.**, Yilancioglu, K., Gür, H., Kaman, T., Isık, F.B., Cetiner, S., Atasever Arslan, B. Cytotoxicity and Iron Chelating Activity of Spirulina platensis Extract on Endometrial Cancer Cells. (Under review)
4. Atasever Arslan, B., Yilancioglu, K., **Kalkan, Z.**, Gür, H., Deniz, E., Erman, B., Cetiner, S. Screening of new antileukemic agents for essential oils of 15 algae species and their interactions with intracellular signal nodes. (Under review)

KATILDIĞI KONGRELER ve TOPLANTILAR

1. Boğaziçi Üniversitesi, Molecular Biology And Genetic Weekend 6 – 04/2011
2. 6th BioNanoTox Congress. 2013 UALR.
3. İstanbul Üniversitesi Öğrenci Kış Okulu 2012
4. İstanbul Üniversitesi Öğrenci Kış Okulu 2013
5. İstanbul Üniversitesi Öğrenci Kış Okulu 2014

İLGİ ALANLARI

Fotoğrafçılık, keman çalmak.