

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÖĞRENME SONRASI UYKU YOKSUNLUĞUNUN
FARELERDE HİPOKAMPAL SİNAPTİK
PLASTİSİTEYLE İLGİLİ GENLERE VE
MİKRORNALARA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Sebahattin KARABULUT**

**Danışman
Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ**

Doktora Tezi

**MAYIS 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÖĞRENME SONRASI UYKU YOKSUNLUĞUNUN FARELERDE
HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTEYLE İLGİLİ GENLERE
VE MİKRORNALARA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Sebahattin KARABULUT**

**Danışman
Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ**

Doktora Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri
Birimi tarafından TDK-2015-6077 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**MAYIS 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Sebahattin Karabulut

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Öğrenme Sonrası Uyku Yoksunluğunun Farelerde Hipokampal Sinaptik Plastisiteyle İlgili Genlere ve MikroRNAlara Etkisinin Araştırılması” adlı Doktora tezi Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Sebahattin Karabulut

Danışman
Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ

Fizyoloji Anabilim Bilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Sami AYDOĞAN

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ danışmanlığında **Sebahattin KARABULUT** tarafından hazırlanan “**Öğrenme Sonrası Uyku Yoksunluğunun Farelerde Hipokampal Sinaptik Plastisiteyle İlgili Genlere ve MikroRNAlara Etkisinin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Fizyoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

12 /05 / 2017

JÜRİ:

Danışman	:Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ (ERÜ Fizyoloji Anabilim Dalı)
Üye	: Prof. Dr. Sami AYDOĞAN (ERÜ Fizyoloji Anabilim Dalı)
Üye	: Prof. Dr. Nurhan CÜCER (ERÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
Üye	:Doç. Dr. Hande YAPIŞLAR (Acıbadem Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı)
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Derya Deniz ELALMIŞ (Ömer Halis Demir Üniversitesi Fizyoloji ABD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../
Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi için gerekli işbirliklerini sağlayıp, çalışmalarım boyunca rehberliğini ve desteğini esirgemeyen, doktora öğrenciliğim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana çok şey katan danışman hocam sayın Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ'ye,

Doktora eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Erciyes Üniversitesi Fizyoloji Ana Bilim Dalındaki tüm hocalarıma,

Çalışma sırasında ve sonrasında hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak, bitirilmesine emek veren Kezban Korkmaz BAYRAMOV ve değerli eşi Ruslan BAYRAMOV'a,

Çalışmanın yapılmasında desteklerini esirgemeyen Fadime ÖZDEMİR, Ergül ERGEN, Tuğba TOPALOĞLU, Esra TUFAN, Halime DANA, Kamile YAZGAN ve Burak TAN'a,

Doktora öğrenciliğim boyunca büyük fedakârlık gösteren ve her zaman yanımda olan sevgili eşime ve aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez çalışmasını TDK-2015-6077 kodlu proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi'ne ve bu çalışma için kapılarını bizlere açan GENKÖK'e teşekkür ederim.

Sebahattin Karabulut

Kayseri, Mayıs 2017

**ÖĞRENME SONRASI UYKU YOKSUNLUĞUNUN FARELERDE
HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTEYLE İLGİLİ GENLERE VE
MİKRORNALARA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sebahattin KARABULUT

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Mayıs 2017

Danışman: Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ

KISA ÖZET

Bu çalışmada öğrenme sonrası uyku sırasında bellek konsolidasyonu için kritik zaman periyodunun belirlenmesi ve bu periyotta yapılan REM uyku yoksunluğunun plastisiteyle ilişkili genlerin ve ilgili mikroRNA (miRNA)'ların ekspresyonuna etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 2-3 aylık 60 adet Balb/c türü erkek fareler her grupta 10'ar adet olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. AK ve BK; kontrol grupları, A1 ve B1; son denemeden hemen sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grupları, A2 ve B2; son denemeden 3 saat sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grupları olarak belirlendi. Uzamsal öğrenme ve bellek performansları Morris su labirent testiyle ölçüldü. REM uykusu modifiye çoklu platform metodu kullanılarak elimine edildi. BK, B1 ve B2 grupları öğrenme denemeleri ve uyku yoksunluğu paradigmaları uygulandıktan sonra 4. günün sonunda dekapite edilerek hipokampusları çıkarıldı. Hipokampal BDNF, CAMK II, CREB, Zif268, Tomozin, REST mRNA'ları ve miR-132, miR-124, miR-9, miR-182, miR-219 ve miR-325 ekspresyonları Kantitatif Real Time PCR ile ölçüldü. AK ve A1 gruplarında toplam alınan yol uzunluğu ve platforma çıkma süresinde azalma görülürken, bu değerler A2 grubunda arttı ($p<0.05$). A2 grubunda hedef kadranda geçirilen sürenin yüzde oranı, AK grubuna göre düşüktü ($p<0.05$). B2 grubunda hipokampal CAMK II, CREB, Tomozin mRNA düzeyleri yüksekti, bu artış BDNF'de anlamlıydı ($p<0.05$). BK grubunda zif268 ve REST düzeyleri daha yüksekti ($p>0.05$). B1 grubunda hipokampal miR-182 ve miR-132, miR-219, miR-124, miR-9 ve miR-325 düzeylerindeki azalmalar anlamlıydı ($p<0.05$). Sonuç olarak son denemeden sonraki 3-6. saatler arasındaki 3 saatlik REM uyku yoksunluğu Morris su labirent testinde uzamsal bellek fonksiyonunu bozmuştur. Uyku yoksunluğu hipokampal plastisiteyle

ilgili genlerin ekspresyonlarında görece sınırlı ve bunlarla ilişkili miRNA'larda ise daha dramatik değişikliklere yol açmıştır.

Anahtar Kelimeler: Öğrenme ve bellek, REM uyku yoksunluğu, Hipokampal gen ekspresyonu, miRNA



**EFFECTS OF POST-LEARNING SLEEP DEPRIVATION ON HIPPOCAMPAL
SYNAPTIC PLASTICITY RELATED GENES AND MIRNAS EXPRESSION IN
MICE**

Sebahattin KARABULUT

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Physiology

Doctoral Thesis, May 2017

Advisor: Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ

ABSTRACT

The current study aims to determine the the critical time period for memory consolidation during sleep after learning, and to evaluate the effect of REM sleep deprivation in this period on the expression of plasticity-related genes and miRNAs. 60 male Balb/c mice, aged 2-3 month, were grouped in to six different gorups where each group consists of 10 mice. AK and BK; control groups, A1 and B1; after the last training session the mice were deprived of sleep for 3 hours immediately, A2 and B2; after the last training session the mice were deprived of sleep for 3 hours after 3 hours waiting period. Spatial learning and memory were tested in the Morris Water Maze (MWM). REM sleep was eliminated by using the modified multiple platform method. After the learning trials and sleep deprivation paradigms, BK, B1 and B2 groups were decapitated at the end of the 4th day and their hippocampus was removed. Quantitative RT-PCR was used to measure the changes in the expression of hippocampal mRNAs (BDNF, CAMK II, CREB, Zif268, Tomosyn, REST) and miRNAs (miR-132, miR-124, miR-9, miR-182, miR-219, miR-325). There were observed that the total path length and time to find the platform reduced across training trials between AK and A1, but these parameters was higher in A2 ($p < 0.05$). In A2, the time spent in the target quadrant to the ratio of the total time spent expressed as a percentage value in was found to be lower than AK ($p < 0.05$). In group B2, hippocampal CAMK II, CREB, and Tomozin mRNA levels were higher, which was significant in BDNF ($p < 0.05$). In group B1, the hippocampal miR-182 and miR-132, miR-219, miR-124, miR-9 and miR-325 levels were significant ($p < 0.05$). Consequently specific 3-h critical sleep period, extending from 3 to 6 h after last training, during which REM sleep deprivation impairs

hippocampal spatial memory function in MWM. Sleep deprivation has been relatively limited in the expression of genes involved in hippocampal plasticity and has led to more dramatic changes in miRNAs.

Key Words: Learning and memory, REM sleep deprivation, Hippocampal gene expression, miRNA



İÇİNDEKİLER

ÖĞRENME SONRASI UYKU YOKSUNLUĞUNUN FARELERDE HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTEYLE İLGİLİ GENLERE VE MİKRORNALARA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
KISA ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
TABLOLAR LİSTESİ.....	xv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Öğrenme ve Bellek	3
2.1.1. Belleğin Sınıflandırılması	3
2.1.2. Belleğin Aşamaları.....	5
2.1.3. Uzamsal Bellek ve Hayvanlardaki Davranışsal Çalışmalar.....	7
2.1.3.1. Hipokampus	8
2.1.3.2. Hipokampal Sinaptik Plastisite	10
2.1.3.2.1. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (Brain-Derived Neurotrophic Factor-BDNF)	11
2.1.3.2.2. Kalsiyum-Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz 2 (Calcium- Calmodulin-Dependent Protein Kinase II- CAMK II).....	11
2.1.3.2.3. cAMP-Yanıt Elementi Bağlanma Proteini (cAMP-Response Element Binding Protein-CREB)	12

2.1.3.2.4. Zif268	13
2.1.3.2.5. Nöron Kısıtlayıcı Susturma Faktörü (Repressor Element 1-Silencing Transcription Factor-REST)	13
2.1.3.2.6. Tomozin.....	14
2.1.3.3. Uzamsal Bellek Çalışmalarında Morris Su Labirent Testi	14
2.2. Uyku ve Bellek.....	16
2.2.1. Uykunun Aşamaları	16
2.2.2. Uyku ve Bellek.....	18
2.2.2.1. REM Uykusu ve Bellek	19
2.2.2.2. NREM Uykusu ve Bellek.....	20
2.2.2.3. Uyku ve Bellek İlişkisi İle İlgili Hipotezler	21
2.2.2.3.1. Sinaptik Homeostazis Hipotezi	21
2.2.2.3.2. Aktif Sistem Hipotezi.....	22
2.2.3. Deneysel Hayvanlarda Uyku Yoksunluğu Modelleri	23
2.2.4. Uyku Yoksunluğu ve Gen Ekspresyonu	23
2.3. mikroRNA'lar ve Bellek.....	25
2.3.1. miRNA Biyogenezi.....	26
2.3.2. Sinaptik Plastisite ve Bellek Oluşumunda miRNA'ların Rollerini	27
2.3.2.1. Beyinde miRNA Ekspresyonu	27
2.3.2.2. Sinaptik Konsolidasyonda miRNA'ların Rolü.....	28
2.3.2.3. Nörodejeneratif Hastalıklarda miRNA'ların Rolü	30
2.3.3. Uyku ve miRNA'lar	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	33
3.1. Deney Hayvanları ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması	33
3.2. Morris Su Labirent Testi.....	34
3.3. Çok Platformlu Modifiye Su Tankı.....	35
3.4. RNA İzolasyonu	36
3.5. Gen Ekspresyon Çalışması	36
3.5.1. cDNA Sentezi.....	36
3.5.2. Gen Ekspresyonu	37

3.6. miRNA Ekspresyon Çalışması	38
3.6.1. cDNA Sentezi.....	38
3.6.2. miRNA Ekspresyonu	38
3.7. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Davranış Testi Bulguları.....	40
4.1.1. Toplam Alınan Yol	40
4.1.2. Platforma Ulaşma Süresi.....	41
4.1.3. Yüzme Hızları	42
4.1.4. Hedef Kadranda Geçirilen Süre	43
4.2. Hipokampal Gen Ekspresyonu Bulguları	44
4.3. Hipokampal miRNA Ekspresyonu Bulguları	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
5.1. Davranış Sonuçları	48
5.2. Hipokampal Gen Ekspresyon Sonuçları.....	52
5.3. Hipokampal miRNA Ekspresyon Sonuçları	60
KAYNAKÇA	68
EKLER.....	91

ORJİNALLİK RAPORU

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

miRNA:	MikroRNA
mRNA:	Haberci RNA
NT:	Nörotransmitter
BDNF:	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
CAMK II:	Kalsiyum-Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz 2
CREB:	cAMP-Yanıt Elementi Bağlanma Proteini
p-CREB:	Fosforile CREB
REST:	Nöron Kısıtlayıcı Susturma Faktörü
PKA:	Protein Kinaz A
PKC:	Protein Kinaz C
MAPK:	Mitojen Aktive Protein Kinaz
TrkB:	Tropomiyozin Reseptör Kinaz B
IEG:	Immediate-Early Gen
LTP:	Uzun Erimli Güçlendirme
E-LTP:	Erken Faz LTP
L-LTP:	Geç Faz LTP
DG:	Dentat Gyrus
AMPA:	Alfa amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionat asit
NMDA:	N-metil D-aspartat
cAMP:	3'-5'-siklik Adenozin Monofosfat
CA1:	Cornu Ammonis 1
CA3:	Cornu Ammonis 2
EC:	Entorhinal korteks
STXBP5:	Syntaxin-bağlanma proteini 5
REM:	Rapid Eye Movement

NREM:	Non REM
EEG:	Elektroenseleografi
EMG:	Elektromiyogram
EOG:	Elektrookülogram
SWR:	Keskin Dalga Ripple
NGFI-A:	Sinir Büyüme Faktörü-İndüklenebilir Protein-A
Arc:	Aktivite-Düzenleyici Hücre İskeleti-İlişkili Protein
ATP:	Adenozin Trifosfat
GTP:	Guanozin Trifosfat
pri-miRNA:	Primer mikroRNA
pre-miRNA:	Prekürsör mikroRNA
DGCR8:	DiGeorge Sendromu Kritik Bölge Protein 8
RISC:	RNA İndüklenebilir Susturucu Kompleksi
PSD:	Postsinaptik Density
MeCP2:	Metil-CpG Bağlanma Proteini 2
cDNA:	Tamamlayıcı DNA
MIMAT:	MikroRNA miRBase Accession
HDAC:	Histon Deasetilaz
VAMP2:	Vesikül-İlişkili Membran Protein 2
GRIA4:	Glutamat Reseptör İyonotrofik AMPA 4

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Sinaptik Plastisite ve Bellekte Rolü Olan miRNA'lar ve Bilinen Hedef Genleri	29
Tablo 3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	34
Tablo 4.1. Grupların Morris Su Labirent Testinin Öğrenme Periyodunda Toplam Aldıkları Yol	40
Tablo 4.2. Grupların Morris Su Labirent Testi Öğrenme Periyodunda Platforma Ulaşma Süresi.....	41
Tablo 4.3. Grupların Morris Su Labirent Testi Öğrenme Periyodunda Yüzme Hızları	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Belleğin Sınıflandırılması	4
Şekil 2.2. Hipokampus Bağımlı Bellek Konsolidasyon Süreci	7
Şekil 2.3. Hipokampal Trisinaptik Organizasyon.....	9
Şekil 2.4. Morris Su Labirent Test Düzeneği	15
Şekil 2.5. Normal, Hipokampus ve Subikulum Lezyonlu Farelerin 5.GünTestleri	16
Şekil 2.6. Uykunun Aşamaları ve Karakteristik EEG kayıtları	18
Şekil 2.7. Sinaptik Homeostazis Hipotezi	22
Şekil 2.8. Aktif sistem hipotezi.....	23
Şekil 2.9. miRNA Biyogenez Yolağı.....	27
Şekil 3.1. Morris Su Labirent Test Düzeneği	35
Şekil 3.2. Çok Platformlu Modifiye Su Tankı	36
Şekil 1.1. Morris su tankında 4 gün boyunca, Toplam Alınan Yol Uzunluğunun AK, A1 ve A2 Grupları Arasında Karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.2. Morris su tankında 4 gün boyunca, Platforma Çıkma Süresinin AK, A1 ve A2 Grupları Arasında Karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.3. Morris su tankında 4 gün boyunca, Ortalama Hızların AK, A1 ve A2 Grupları Arasında Karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.4. Morris su tankında 5. gün uygulanan Hedef Kadrande Geçirilen Sürenin AK, A1 ve A2 Gruplarının Karşılaştırılması	44
Şekil 4.5. Hipokampal mRNA ekspresyonları.....	45
Şekil 4.6. Hipokampal miRNA Ekspresyon Sonuçları.....	46

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Anıların beyinde kalıcı hale getirilmesi işlemi olan bellek konsolidasyonunun uyku sırasında gerçekleştiği düşünülmektedir (1-3). Bellek konsolidasyonu çok sayıda biyomolekülün yer aldığı sinyal yollarını gerektirir ve sonuçta yeni gen ekspresyonuyla birlikte protein sentezi gerçekleşir (4, 5). Hipokampal BDNF, CAMK II, CREB, Zif268 gibi protein yapılar konsolidasyon sürecindeki rolleri iyi bilinen moleküllerdendir (6). Uyku yoksunluğunun bellek konsolidasyonunda yer alan hipokampal sinyal yollarını bozduğu ve gen ekspresyon sürecini etkilediği bilinmektedir (6, 7). Yapılan çalışmalar öğrenme sonrası spesifik bir zaman diliminde yapılan REM uyku yoksunluğunun hipokampus bağımlı uzamsal bellek fonksiyonunda bozulmaya yol açtığını göstermiştir (8-10). Uzamsal bellek performansındaki bu bozulmanın, konsolidasyon için önemli olan sinyal yollarının aktive olduğu zaman periyodunun uyku kaybıyla çakışmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (11). miRNA'lar kodlanmayan, kısa endojen RNA'lar olup protein sentezinin posttranskripsiyonel düzenleyicileri olarak tanımlanırlar. miRNA'lar mesajcı RNA (mRNA)'lara bağlanarak protein sentezini engellerler (12). Çok sayıda miRNA yetişkin beyinde yüksek oranda eksprese edilir ve bunların ekspresyonu nöronal aktiviteyle düzenlenebilir (13). Bu endojen RNA'ların öğrenme ve bellek gibi beyin fonksiyonlarının yanı sıra, Alzheimer, Rett sendromu gibi bilişsel işlevlerin etkilendiği nörodejeneratif hastalıklarda da işe karıştığı gösterilmiştir (14, 15). miRNA'lar sinapslarda, dendritik dikenlerde ve somalarda protein sentezini aktivite bağımlı bir tarzda düzenleyebilirler (16). Protein ekspresyonunun miRNA'lar tarafından regüle edilmesi, nöronlara protein sentezini lokal olarak kontrol etme yeteneği kazandırabilmektedir.

Bu çalışmada, öğrenme sonrası farklı zaman periyotlarında yapılan REM uyku yoksunluğunun Morris su labirent testinde uzamsal bellek performanslarına etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bunun yanında REM uyku yoksunluğunun bellek konsolidasyonunda yer aldığı düşünülen BDNF, CAMK II, CREB, Zif268, Tomozin ve

REST gibi moleküllerin hipokampustaki ekspresyonlarına etkisi araştırılmıştır. Ayrıca öğrenme ve bellek araştırmalarında ön plana çıkan ve çalışmada kullanılan genlerle ilişkili olan miR-132, miR-124, miR-9, miR-182, miR-219 ve miR-325'in hipokampal ekspresyonlarının REM uyku yoksunluğundan nasıl etkilendiğı sorusuna cevap aranmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

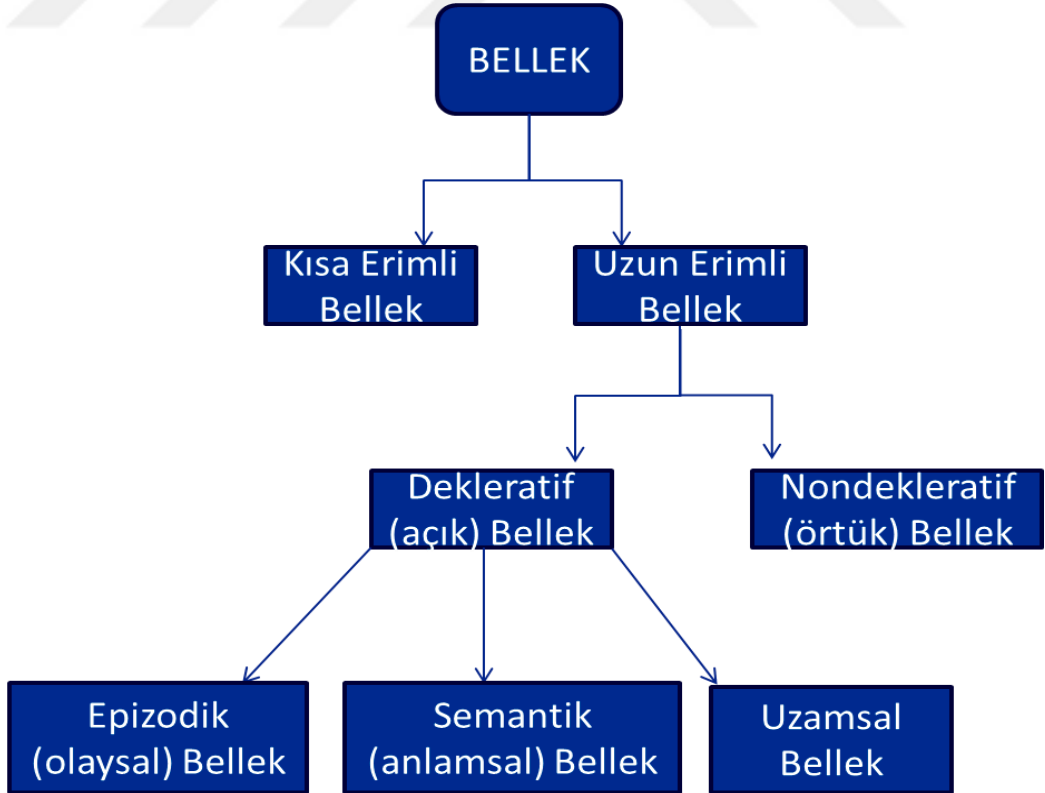
2.1. Öğrenme ve Bellek

Öğrenme ve bellek insan yaşamında hayati öneme sahiptir. Bilgiyi elde etme ve depolama yetisi, deneyimlerimizin gerekli davranış değişikliğine dönüşebilmesini ve gelecekle ilgili plan yapabilmeyi sağlar. Diğer taraftan, öğrenme ve bellek oluşumundaki kusurlar (örneğin Alzheimer hastalığı) bilim adamı ve klinisyenlere meydan okuyan bir sağlık sorunu olarak ortaya çıkabilir. Herhangi bir hastalık için tedavi edici yaklaşımların geliştirilmesinin o hastalığın altta yatan patofizyolojik mekanizmalarının tam olarak aydınlatılmasına bağlı olduğu dikkate alındığında, “belleğin nörobiyolojisi”ndeki eksik parçaların tamamlanması bellek kusurlarının etkili tedavileri için faydalı olacaktır.

2.1.1. Belleğin Sınıflandırılması

Nöropsikolojide bellek bazı kriterler göz önüne alınarak (deney hayvanlarında yapılan lezyon çalışmaları, beyin görüntüleme çalışmalarından elde edilen aktivasyon modelleri vs) taksonomik kategorilere ayırt edilmiştir (17). Anıların kazanılması sürecinde görev alan beyin bölgeleri de her bellek kategorisi için farklılık göstermektedir (18). İlk olarak bellek, depo edilme süresine bağlı olarak “kısa erimli bellek (çalışan bellek)” ve “uzun erimli bellek” olarak iki kısma ayrılır (Şekil 2.1). Çalışan belleğin (örneğin zihinsel aritmetik işlem yaparken), uyaran tarafından tetiklenen bir nöral aktiviteye bağlı olduğu düşünülmektedir (17). Burada, sinaptik etkinliğin değiştirilmesinde nöron içerisinde önceden mevcut olan bazı moleküllerin translasyon sonrası modifikasyonu söz konusudur (19). Birkaç dakikadan birkaç saatlik süreye karşılık gelen kısa erimli bellek için, genel olarak frontal lob yapılarının aracılık ettiği bilinmektedir. Bilginin saatler, günler ve hatta ömür boyu saklanabildiği uzun erimli bellekte ise çalışan bellekten farklı olarak aktif bir kodlama fazının yanında bir takım sinaptik değişimler de yer almaktadır (19). Uzun erimli bellekte anıların kalıcı olarak saklanması *de novo* gen ekspresyonu ve protein sentezi gerektirir. Bu durum transkripsiyon ya da translasyon inhibitörlerinin

uzun erimli bellekte bozulmaya yol açmasının gösterilmesiyle desteklenmiştir (20). Kalıcı anıların oluşumu sırasında sentez edilen proteinlerin sinapslarda yeniden yapılanma sürecine katıldığı, böylece sinaptik etkinlikte bir artışın olduğu bilinmektedir. Depo edilmiş bilgiler uygun “ipuçları” varlığında uzun erimli bellekten alınabilmektedir. İkinci olarak, uzun erimli bellek içinde dekleratif (açık) bellek ve non-dekleratif (örtük) bellek kısımları yer alır. Dekleratif bellek bilimsel gerçeklerin ve yaşanmış olayların bilinçli olarak hatırlanmasını gerektirir. Epizodik (olaysal), uzamsal ve semantik (anlamsal) bellek bu grup içerisinde yer alır ve bu tarz anılar hipokampus, entorhinal korteks gibi yapıları içine alan medial temporal lob kısımlarında depolanır (17). Non-dekleratif ya da prosedürel bellek ise emosyonel öğrenme, algısal ve motor yeteneklerin dahil olduğu bir öğrenme ve bellek sistemi grubudur. Dekleratif bellekten farklı olarak, öğrenilmiş yetenekler motor korteks, serebellum ve putamen gibi beyin yapılarında depo edilir. Nondekleratif bellekte öğrenme yavaş olup birden fazla deneme gerektirirken, aynı zamanda anılar bilinç olmadan kazanılabilir ve hatırlanabilir (3).



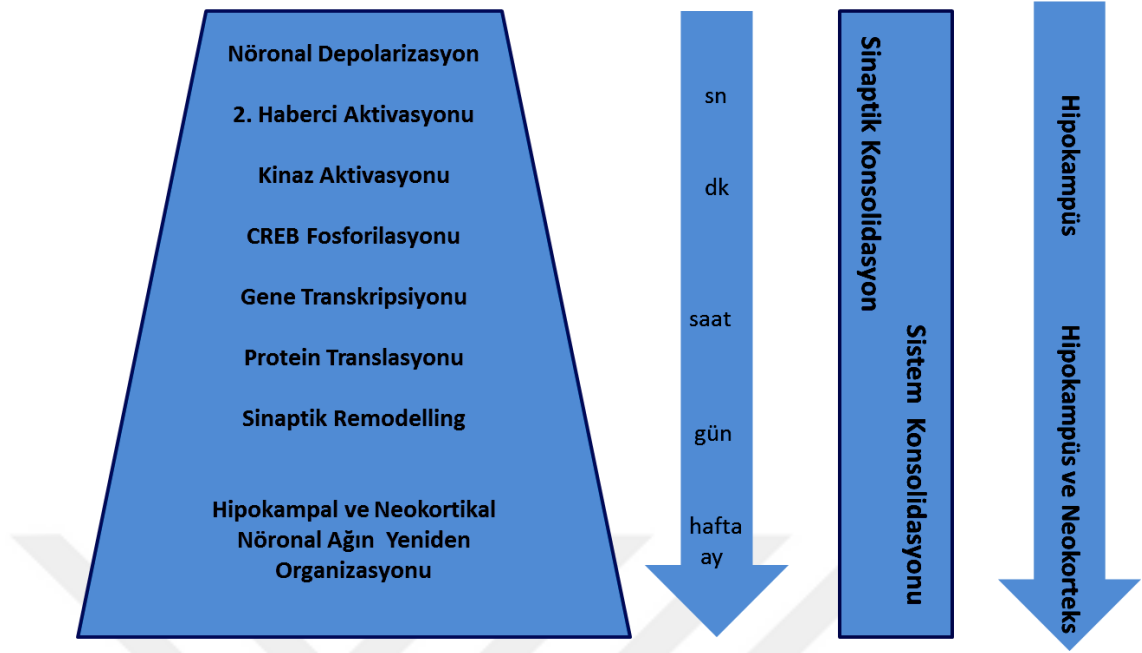
Şekil 2.1. Belleğin Sınıflandırılması

2.1.2. Belleğin Aşamaları

Bellek anlık ve üniter bir süreç değil, dereceli ve devamlı bir işlemdir. Bellek farmakolojik olarak da ayırt edilebilen zamansal olarak 3 farklı aşamadan oluşur: *Encoding* ya da kodlama, *Consolidation* veya pekiştirme ve *Retrieval* ya da geri çağırma. Bellek bilginin kodlanması, depolanması ve geri alınması olarak da tanımlanabilir. Primatlar ve diğer memeliler deklaratif anıların kodlanması ve konsolidasyonunda hipokampus, entorhinal korteks gibi aynı medial temporal lob yapılarını kullanırlar. Belleğin her bir aşamasının altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması, bu moleküler fonksiyonlara kesin bir zamansal çerçeve belirlenemediğinden dolayı zor gözükmetedir (4).

Kodlama aşaması sırasında bilgi nöronlar arasındaki elektriksel ve kimyasal sinyallerin yayılması vasıtasıyla sinaptik aktiviteye transfer edilir (21). Bu bilgi nöral aktivitenin bir modeli olarak beyinde temsil edilir. Çok sayıda nörotransmitter sisteminin kodlama aşaması sırasında yer aldığı bilinmektedir. Örneğin, kodlama asetilkolinin kısmen aracılık ettiği dikkat süreçleri tarafından modüle edilebilir (17). Ancak, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic asit (AMPA) ve N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörleri vasıtasıyla bir eksitator nörotransmitter Glutamat'ın aracılık ettiği sinirsel iletim ve bunun hücresel korelasyonu olan "Long Term Potentiation (LTP)" öğrenme ve bellek çalışmalarında ön plana çıkmıştır (4). LTP ilk kez Bliss ve Lomo tarafından, hipokampal sinapslarda yüksek frekanslı aksiyon potansiyeli uyarımının sinaptik iletide uzun süreli bir artışa yol açtığı gösterilmesiyle tanımlanmıştır (22) ve bundan sonra belleğin sinirsel korelasyonu olarak kabul edilmiştir. Presinaptik nöronun elektriksel uyarımı sonucu Glutamat salınır ve bu Glutamat postsinaptik zarında AMPA ve NMDA reseptörlerine bağlanır. NMDA reseptörü hem Na^+ hem de Ca^{+2} iyonlarına geçirgen bir kanal proteindir. Glutamatın NMDA reseptörlerine bağlanması tek başına kanalın açılmasına yeterli değildir, çünkü dinlenme zar potansiyelinde NMDA reseptörünün poru Mg^{+2} ile kapalı durumdadır. NMDA reseptöründeki Mg^{+2} tıkaçı, zarın postsinaptik AMPA reseptörünün tekrarlayıcı aktivasyonu sonucu depolarize olmasıyla ortadan kaldırılır. Postsinaptik hücreye NMDA reseptörler-aracılı Ca^{+2} akışı önceden mevcut proteinlerin kovalent modifikasyonlarına (örneğin fosforilasyon) ve sonuç olarak bazı protein kinazların aktivasyonuna yol açar. Bu durum sinaptik gücün kısa dönemli olarak güçlenmesiyle sonuçlanır (21).

Bilgi kalıcı belleğin bir parçası olacaksa, kodlama sürecinden kaynaklanan sinaptik aktivite değişikliklerinin stabilize olması gerekir. Yani kırılabilir nitelikteki kısa erimli bellek konsolide edilmelidir. Nörobiyologlar bellek konsolidasyonunu bir hızlı diğeri yavaş olmak üzere sinaptik konsolidasyon ve sistem konsolidasyonu şeklinde iki kısma ayırırlar. Sinaptik konsolidasyon, plastisitede yer alan genlerin transkripsiyonuyla sonuçlanan hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu ve sinapsların yapısal ve fonksiyonel elemanlarının değişimi için gerekli plastisite-ilişkili mesajcı RNA (mRNA)'ların translasyonunu içerir. Yeni sinaptik bağlantıların oluşumunun yanında mevcut sinapsların yeniden yapılandırılmasını da içine alan bu değişiklikler öğrenmeyi takip eden ilk birkaç saat içinde gerçekleşir (1). Hücre içi Ca^{+2} düzeyindeki artışlar Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II (CAMK II)'nin otofosforilasyonla aktive olmasına yol açar. Bu kinaz aktivasyonu AMPA reseptörlerinin endozomal trafiğini ve dendritik dikenlerde aktin sitoskeletal dinamiklerini modüle ederek, postsinaptik zarda AMPA reseptör ekspresyonunda artışa ve dendritik dikenlerde büyümeye yol açar (23). Yine, hücre içi Ca^{+2} düzeyindeki artış Adenilil siklazın tarafından bir ikinci haberci molekül olan 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 'nin üretimini uyarır (24). Sonuçta cAMP response element binding protein (CREB)'in de içinde yer aldığı hücre içi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile plastisite-ilişkili genlerin transkripsiyonu başlatılır. Belleğin hücre model olarak kabul edilen LTP'nin erken aşaması (Early-LTP (E-LTP)) postsinaptik proteinlerin posttranskripsiyonel modifikasyonuna bağlıdır, dolayısıyla kısa erimli bellekle analogtur. LTP'nin geç fazı da (Late-LTP (L-LTP)) gen transkripsiyonu ve translasyon aşamalarını kapsar, bu yönüyle uzun erimli bellekle koreledir. Sistem konsolidasyonu ise, bellek sürecinde yer alan beyin bölgelerinin dereceli bir yeniden organizasyonunu içerir. Böylece yeni anılar sinaptik konsolidasyondan sonra daha geniş bir düzeyde reorganizasyona uğrarlar (25). Bu süreçte anılar kalıcı depolama için hipokampustan neokortekse yavaş bir şekilde transfer edilir (Şekil 2.2). Hatırlama (retrieval) son aşama olup bellek izlerinin yeniden aktive olmasıdır. Hatırlama olayının altında yatan moleküler olaylar hakkında çok şey bilinmese de, en azından bazı beyin bölgelerinde Protein Kinaz A (PKA) aktivitesinin yer aldığı düşünülmektedir (21).



Şekil 2.2. Hipokampus Bağımlı Bellek Konsolidasyon Süreci

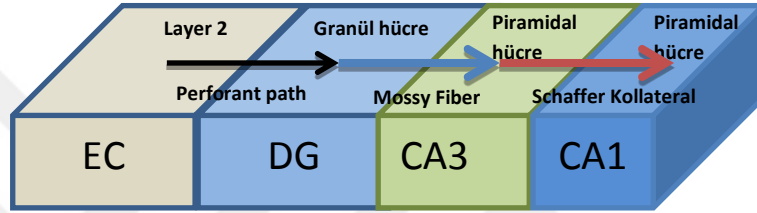
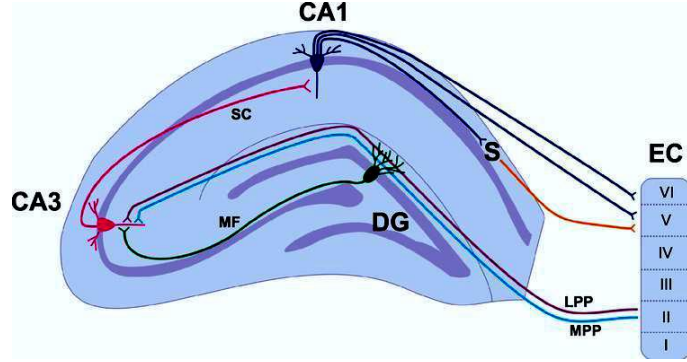
2.1.3. Uzamsal Bellek ve Hayvanlardaki Davranışsal Çalışmalar

Uzamsal bellek, çevremizdeki nesnelerin yerlerini ve bunların birbirlerine göre konumlarını öğrenmeyi sağlayan bir yetenektir. Bellekteki mekânsal temsiller uzamsal öğrenme için hayati öneme sahiptir. Yer ve yön bulmada ön plana çıkan beyin bölgesi limbik sistemin bir elemanı olan hipokampustür. 1971’de O’Keefe ve Dostrovsky’ın hipokampal CA1 bölgesinde “yer hücrelerini”, 2005’te Moser ve arkadaşlarının entorhinal kortekste “ızgara (grid) hücrelerini” keşfetmesi uzamsal yer bulmada “hipokampal devre”nin yerini pekiştirmiştir. Öğrenme-bellek sürecinde hücrel eksitabileden gen ekspresyonuna, sinaptik modifikasyonlardan nöronal ağ düzeyinde yeniden organizasyona kadarki değişimlerin tümü nihayetinde organizmada bir “davranış değişikliği” ile sonuçlanır. Öğrenme ve bellek çalışmaları için farklı hayvan türlerinde (goriller, fareler, arılar) çeşitli davranışsal testler geliştirilmiştir (4, 26). Hayvanlarda uzamsal yetenekleri ölçen testler (T-maze, Radial maze, Açık alan testi ve Morris su labirent testi), özellikle hipokampus bağımlı bellek fonksiyonu değerlendirmede oldukça kullanışlı olmaktadır (17). Morris su labirent testi hipokampus bağımlı uzamsal bellek çalışmalarında altın standart olarak kabul edilmektedir (27).

2.1.3.1. Hipokampus

Hipokampus temporal lobun medial kısmında bulunan bir gri cevher tabakasıdır. Denizatına olan benzerliğinden dolayı bu ismi alan hipokampus, daha önceleri kokuyla ilgili bir merkez olarak kabul edilmiştir. Ancak, hem kendi içinde hem de diğer beyin yapılarıyla yoğun nöronal bağlantılarının ortaya çıkarılmasıyla hipokampusun sadece kokuyla ilgili değil, kısa ve uzun erimli bellek, uzamsal öğrenme ve duygulanım gibi kompleks davranışlarda da önemli rol üstlendiği anlaşılmıştır (28).

Dış yapısı koçboynuzuna benzediğinden “Cornu Ammonis (CA)” olarak da adlandırılan hipokampus, hücrel morfolojideki farklılıklara dayanılarak farklı anatomik bölümlere ayırt edilmiştir: CA1, CA2, CA3, CA4 alanları ve Dentate Gyrus (DG). Bu bölgelerin her birisinin belleğin farklı süreçlerinde rol oynadığına inanılır. Hipokampal nöronal bağlantılar “trisinaptik loop” olarak adlandırılan ve birbirini tamamlayan 3 önemli devre şeklinde organize olmuştur: Perforant path, Mossy fiber ve Schaffer collateral (Şekil 2.3). Entorhinal korteks (EC) hipokampus ve neokorteks arasında yer alır ve yeni bilgilerin hipokampusa ana girdisini oluşturur. Çoğunlukla EC’in 2. ve 3. tabakasından köken alan eksitator iletiler DG’nin granül hücreleriyle sinaps oluşturur (Perforant path). DG granül hücrelerinin aksonları CA3 piramidal hücreleriyle sinaps yapar (Mossy fiber). CA3 ten ayrılan ana kollateraller CA1 de piramidal hücrelerle sinaps oluşturur (Schaffer collateral). Son olarak CA1 afferent nöronları EC’e projekte olarak devre tamamlanır (29). DG’daki tek bir granül hücrelerine gönderilen kortikal akson sayısı, tek bir CA3 piramidal hücreleriyle temas eden DG granül hücrelerinin sayısının yaklaşık olarak 10 katı kadardır. Trisinaptik loop’da nöronal bağlantıların bu şekilde azaltılmasının, kompleks duyuusal deneyimlerin ürettiği nöronal ateşleme paternlerinin sadeleştirilmesiyle sonuçlanan bir filtrelemeyi yansıttığı düşünülmektedir (30).



Şekil 2.3. Hipokampal Trisinaptik Organizasyon (EC; Entorhinal Korteks, LPP; Lateral Perforant Path, MPP; Medial Perforant Path, DG; Dentate Gyrus, MF; Mossy Fiber, CA3; Cornu Ammonis 3; SC; Schaffer Collateral, CA1; Cornu Ammonis 1, S; Subiculum) (31).

Hipokampusun uzamsal bellekte rol aldığı 1960'lerden bu yana bilinmektedir. Henry Molaison isimli hastada ilaca dirençli medial temporal lob epilepsisinin tedavisi amacıyla 1953'te hipokampusun de dahil olduğu bölgenin bilateral rezeksiyonu, hipokampusun bellek konsolidasyonundaki rolünün anlaşılmasında dönüm noktası olmuştur (32). Molaison ameliyattan sonra epileptik nöbetlerden kurtulmuş fakat hem geçmişteki bazı anılarını hatırlayamaz olmuştur (retrograde amnezi), hem de yeni öğrendiği bilgileri uzun süre hafızasında tutamamıştır (anterograde amnezi). Molaison üzerinde yapılan kapsamlı araştırmalardan, çocukluk anılarının kaybolmadığı ve ameliyat olduğu tarihe kadar olan 11 yıllık periyotun silindiği anlaşılmıştır (33). Bu durum anterograde ve retrograd amnezi için beyinde farklı anatomik substratlar bulunduğunu ve medial temporal lob yapılarının deklaratif anıların depolanmasında zamansal olarak sınırlı bir role sahip olduğunu göstermektedir. Daha sonraları Londra'daki taksi sürücüleriyle yapılan bir çalışmada normal kontrollere göre sürücülerin daha büyük bir hipokampusa sahip oldukları gösterilmiştir (34). Maymunlarda da medial temporal lobun bilateral lezyonları uzamsal bellek testi sırasında mekânsal referansların kullanımında bozulmayla sonuçlanmıştır (35). Yine

kemirgenlerdeki lezyon çalışmalarında da Morris su labirenti (36) ve bağlamsal korku koşullanması (37) gibi uzamsal bellek testlerinde hipokampusun mekânsal öğrenmedeki varlığı açıkça ortaya konulmuştur.

Hipokampus yetişkin dönemde nörogenezin sürdürüldüğü iki beyin bölgesinden biri (diğeri olfaktör bulb) olmakla da eşsizdir. Genç sıçanlarda günde yaklaşık olarak 9000 yeni sinir hücresi DG'un subgranüler bölgesinden filizlenir (38). Bu yeni nöronlar kortikal alanlardan yoğun olarak bilgi akışına maruz kalan DG için gerekli olabilir. Ömür boyu devam eden bu hipokampal sinir oluşum sürecinin öğrenme için potansiyel bir substrat olabileceği düşünülmektedir (39). Ayrıca nörogenezdeki bir azalmanın Alzheimer gibi nörolojik hastalıkların oluşumunda rol alabileceği ileri sürülmüştür (40). Hipokampal nörogenez için başka bir yaklaşım ise, sistem konsolidasyonu sırasında kortekse göçen modası geçmiş anıların hipokampustan silinmesi sürecine katkı sağladığıdır (41).

2.1.3.2. Hipokampal Sinaptik Plastisite

Sinaptik plastisite öğrenme ve belleğin fiziksel substratıdır (Benington and Frank, 2003). Sinaptik ağların aktivite-bağımlı yapısal ve fonksiyonel değişikliklerinin öğrenme ve belleğin hücresel temelini oluşturduğu düşünülmektedir. Yapısal plastisite dendritik diken modifikasyonları, aksonal filizlenme, sinaptogenez gibi morfolojik değişimleri içine alırken, fonksiyonel plastisite nöral aktiviteye yanıtındaki etkinliği (LTP gibi) ve sinaptik iletideki değişimleri kapsar (42). Aktivite-bağımlı sinaptik plastisite hipokampal sinapsların da belirgin bir özelliğidir (43). Dolayısıyla hipokampal sinaptik plastisitenin hipokampus bağımlı bellek sistemlerine aracılık ettiği düşünülmektedir.

Nöronal aktivitenin sinaptik plastisitede merkezi bir rol oynadığı kabul edilir. Sinirsel aktivitenin tetiklediği sinaptik plastisite çok yönlü bir süreçtir; mevcut sinaptik proteinlerin hücre içi trafiğinin yeniden düzenlenmesini (endositoz/ekzositoz) ya da posttranskripsiyonel modifikasyonlarını, dendritlerde bulunan mevcut mRNA'lardan protein sentezinin başlatılmasını ve nükleusta yeni gen transkripsiyonunu içerir (44). Bu hücresel süreçler 1-2 dakika içinde başlayan ama saatlerce, günlerce sürebilen sinaptik plastisitenin değişen zamansal bileşenlerine aracılık ederler. Bu yoğun ve karmaşık biyokimyasal süreçlere oldukça fazla sayıda moleküler oyuncunun aracılık etmesi de sürpriz değildir. Bunlar genel olarak protein kinazlar, nörotrofinler, transkripsiyon

faktörleri, hücre adezyon molekülleri ve immediate-early genler (IEG) adı verilen çeşitli hücrel uyaranlara hızlı ve geçici olarak aktive olan genlerdir.

2.1.3.2.1. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (Brain-Derived Neurotrophic Factor- BDNF)

Nörotrofin ailesinin bir üyesi olan BDNF, sinirsel gelişimde ve nöronal sağ kalımda rol oynayan bir proteindir. Etkilerini TrkB (tropomyosin receptor kinase B) reseptörüne bağlanarak gösterirler (45). Biriken kanıtlar sinirsel aktivitenin BDNF geninin transkripsiyonunu, BDNF mRNA'sının dendritlere taşınmasını ve BDNF protein salgılanmasını düzenlediğine işaret etmektedir (46). Yüksek derecede sinaptik plastisiteye sahip bir beyin bölgesi olarak hipokampus, BDNF ve reseptörü olan TrkB'yi de en fazla eksprese eden nöroanatomik alan olarak dikkat çekmektedir (47). BDNF hipokampusta öğrenmenin hücrel korelasyonu olan LTP'yi teşvik eder (48). BDNF'nin hipokampus bağımlı bilişsel fonksiyonlardaki rolü, zenginleştirilmiş ortama konulan sıçanlarda uzamsal bellekteki düzelmeye hipokampuslarında BDNF mRNA ekspresyon artışında bir korelasyon bulunmasıyla ortaya konulmuştur (49). Morris su labirent testi öğrenme denemelerine maruz kalan hayvanların hipokampal BDNF mRNA'sında ve TrkB miktarında artış gözlenmiştir (50, 51). BDNF antisense oligonükleotidler kullanarak hipokampal BDNF gen ifadesinin bozulması sıçanlarda uzamsal bellekte ciddi aksamalara yol açmıştır (52). BDNF reseptörü TrkB'nin ekspresyonunun deneysel olarak değiştirildiği farelerde de hipokampal bağımlı öğrenmede bozulmalar gözlenmiştir (53). BDNF-TrkB sinyal yolağının hipokampal nöronlarda dendritik dikenleri ve sinaptik yoğunluğu etkileyebileceği gösterilmiştir (54).

2.1.3.2.2. Kalsiyum-Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz 2 (Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II- CAMK II)

Merkezi sinir sisteminde geniş bir hücrel dağılım gösteren CAMK II, beyinde en fazla bulunan Ca^{+2} bağımlı bir kinaz üyesidir. Bu enzim postsinaptik dansitede (PSD; postsinaptik nöronun reseptörlerinin elektron mikroskop kesitlerinde görülen yoğun bölgesi) yüksek miktarda bulunur ve postsinaptik bölgede önemli bir Ca^{+2} dedektörü olarak kabul edilir (55). Çoğu nöron tipinde Ca^{+2} 'un ikincil haberci etkisinin birçoğuna aracılık etmesiyle "çok fonksiyonlu protein kinaz" olarak tanımlanır (56). Glutamat

reseptörlerinin uyarılmasına yanıt olarak CAMK II otofosforilasyona uğrar ve Ca^{2+} /calmodulinin bağımlı şekilde aktive olur. Bu özelliğinden ötürü diğer kinazlara kıyasla sinaptik plastisitede daha ön plandadır (57). CAMK II'nin nöronal fonksiyonlardaki rolü genetik manüplasyonların yapıldığı çalışmalarla hücrenel ve davranışsal düzeyde araştırılmıştır. CAMK II alt ünitelerinin genetik olarak nakavt edildiği (gene knock out; bir genin etkisizleştirilerek fonksiyonunun araştırılmasında kullanılan yöntem) hayvanlarda hem LTP'de (58) hem de uzamsal bellek davranış testlerinde bozulmalar gözlenmiştir (59).

2.1.3.2.3. cAMP-Yanıt Elementi Bağlanma Proteini (cAMP-Response Element Binding Protein-CREB)

Sinirsel uyarımın başlattığı ikincil haberciler ve kinazlardan oluşan moleküler kaskad, nihayetinde nükleusta bulunan transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu ile sonuçlanır. CREB protein sentezi gerektiren L-LTP'de ve uzun erimli bellek oluşumunda önemli rol oynayan hücrenel bir transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörü bazı genlerin promotor bölgesi olan cAMP-response element (CRE) bölgelerine bağlanarak uzun erimli bellekte yer alan çeşitli proteinlerin sentezini teşvik eder (60). Bazı hücre içi sinyal kaskadları CREB'in düzenlediği gen transkripsiyonunda yer alır: Adenilil siklaz, cAMP ve Ca^{+2} (61). CREB aktivasyonu sinirsel aktiviteye yanıt olarak başlatılan bu sinyal yolları tarafından düzenlenebilir. Lakhina ve arkadaşları *Caenorhabditis elegans* türü solucanda yaptığı genom-düzeyindeki fonksiyonel analiz çalışmasında, öğrenme denemelerini takiben CREB tarafından aktive edilen 757 gen olduğunu belirlemişlerdir (62). CREB fosforilasyonu nöronlarda CREB-bağımlı gen ekspresyonu için gereklidir. Bu fosforilasyonel aktivasyona çok sayıda kinaz aracılık edebilir: Protein kinaz A ve C (PKA ve PKC), CAMK I, CAMK II, Mitogen-activated protein kinaz (MAPK) (4). Bu kinazların her biri CREB'i S133 bölgesinde fosforile eder. Çeşitli kinaz inhibitörleri kullanılarak CREB fosforilasyonunun engellendiği çalışmalarda uzun erimli bellek oluşumunda kusurlar gözlenmiştir (63, 64). Uzamsal bellek oluşumunda hipokampal CREB fonksiyonunun gerekli olduğunu gösteren bir çalışmada, global CREB-yoksun farelerin dorsal hipokampuslarında viral vektörler aracılığıyla CREB düzeylerinin lokal olarak artırılması uzamsal bellek kusurlarının düzelmesiyle sonuçlanmıştır (65).

2.1.3.2.4. Zif268

Sinirsel aktivite tarafından indüklenen Zif268 (EGR-1; Early growth response protein 1), sinaptik plastisitede yer aldığı bilinen bir IEG üyesidir. IEG'ler çeşitli hücresel uyaranlara ilk yanıt olarak herhangi bir protein sentezinden önce transkripsiyon düzeyinde aktive olan genleri temsil ederler. Bu gen sınıfı nöronlarda aktivite-bağımlı yapısal değişiklikleri başlatan süreçte, NT bağlanmasıyla gen ekspresyonunun değişimi arasında köprü sağlayan bir "3. haberci" olarak kabul edilmiştir (66). IEG'lerin ekspresyonunun sinirsel aktivite tarafından başlatıldığı gösterilmiştir ve bunların uzun erimli bellekte görev aldığı düşünülmektedir (67). Hipokampal LTP artmış Zif268 mRNA'sıyla ilişkilidir ve Zif268 geninin nakavtı farelerde uzamsal bellek kusurlarına yol açmıştır (68). Zif268 ayrıca yetişkin nörogenezle de yakından ilişkilidir ve yeni oluşan nöronların sağ kalımında önemli rol oynar (69).

2.1.3.2.5. Nöron Kısıtlayıcı Susturma Faktörü (Repressor Element 1-Silencing Transcription Factor-REST)

Bir krüppel-tip çinko parmak transkripsiyon faktörü olarak REST, 21-23 baz çiftlik yüksek derecede korunmuş "nöron-restriktif silencer element (RE1)" sekanslarına ve diğer genomik alanlara bağlanır. Bu bölgelerde gen ekspresyonunun susturulması için diğer çoklu-alt ünite kompleksler ve DNA bağlanma proteinleri için bir yapı iskeleti olarak görev alır (70). Bu represör molekülün yaklaşık olarak 1300 kadar genin ekspresyonunu kontrol ettiği ve bunlar arasında eksitabilite, sinaptogenez, nörogenez gibi nöronal homeostazis için önemli süreçlerle ilgili genler olduğu bilinmektedir (71, 72). REST çok sayıda nöral-spesifik genleri (iyon kanalları, nörotransmitter reseptör genleri) ve non-nöronal hücre soylarında nöronal genleri baskılamak üzere yüksek derecede eksprese edilir. Ayrıca, çok sayıda nörodejeneratif hastalıkta yer alabilir: Epilepsi, Huntington's hastalığı, X'e bağlı Mental Retardasyon, Down Sendromu (73). REST'in olgun nöronların sinaptik fonksiyonlarındaki rolünü araştıran bir çalışmada, NMDA reseptörlerinin alt ünite kompozisyonlarında gelişimsel olarak ortaya çıkan değişime aracılık ettiği gösterilmiştir (74). Aynı çalışmada maternal deprivasyona erken dönemde maruziyetin REST'in aktivasyonunu ve sinaptik NMDA reseptör fonksiyonunu bozduğu gösterilmiştir. Lu ve arkadaşları insan kortikal ve hipokampal nöronlarda yaşlanmaya karşı adaptif bir yanıt olarak REST'in indüklendiğini,

ancak ılımlı kognitif bozukluk ve Alzheimer'de REST'in kaybolduğunu ve yaşlanma sırasında REST ekspresyonunun nöronlar için koruyucu olduğunu göstermişlerdir (75).

2.1.3.2.6. Tomozin

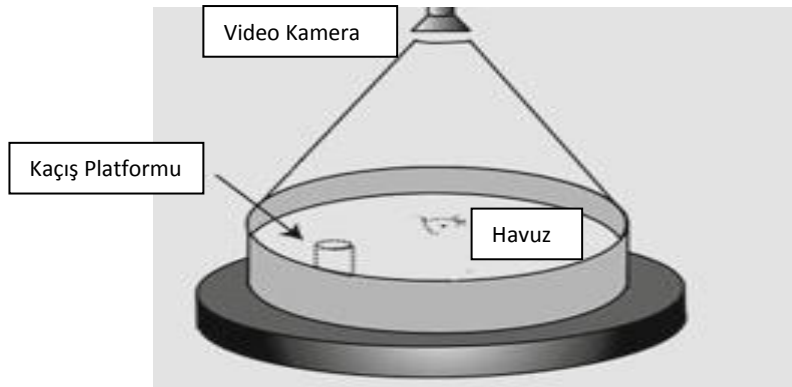
Tomozin (Syntaxin-binding protein 5; STXBP5), yaklaşık 1100 aminoasitten oluşan ve nörotransmitter salınımını inhibe eden bir syntaxin-bağlanma proteindir. Tomozin, sinaptik vezikül sekresyonu için gerekli SNARE (Soluble N-ethylamide-sensitive factor Attachment Protein Reseptör) kompleksi oluşumunu düzenleyen proteinlerden biri olarak sinaptik gücü büyük ölçüde etkileyebilir (76). Hipokampal Mossy fiber terminallerinde ve CA3 bölgelerinde zengin olarak eksprese edilen Tomozin'in, spesifik olarak DG'deki düzeyinin değiştirilmesinin hipokampal bilgi akışını etkilediği gösterilmiştir. Örneğin Chen ve arkadaşları Tomozin geninin nakavtının Drosophila'da sinaptik gücü artırarak koku öğrenimini etkilediğini ve sonuç olarak geç dönem aversif koku belleğini azalttığını göstermişlerdir (76). Tomozin proteininin farelerde uzamsal bellek fonksiyonuna etkisini araştıran bir çalışmada ise, Barak ve arkadaşları bir lentiviral vektör aracılığıyla hipokampal DG nöronlarında Tomozin'in aşırı ekspresyonunun Morris su labirent testinde bellekte bir bozulmaya yol açtığını göstermişlerdir (77).

2.1.3.3. Uzamsal Bellek Çalışmalarında Morris Su Labirent Testi

Morris su labirenti öğrenme ve uzamsal belleğin altında yatan nöral mekanizmaların ve fizyolojik süreçlerin aydınlatılması amacıyla kemirgenler için tasarlanmış bir davranışsal testtir. Bu test İskoçya'da St Andrews Üniversitesi'nde Richard Morris tarafından geliştirilmiş ve ilk kez 1980'lerin başında tanımlanmıştır. Test oldukça basit bir göreve dayanır. Opak suyla dolu dairesel bir havuzda bulunan sıçan ya da farenin uzamsal belleğini kullanarak gizli kaçış platformuna ulaşmasını gerektirir. Bu test için 1,5-2 metre çapında, içi opak madde eklenmiş yaklaşık olarak 25°C suyla dolu olan ve gizli bir kaçış platformu bulunan dairesel bir tank kullanılır. Havuzdaki su günlük olarak değiştirileceği için basit bir doldurma ve boşaltma sistemine sahip olmalıdır. Suyun sıcaklığının 13°C'nin altında olmasının stres artırıcı etkisi öğrenme davranışını etkileyebilir. Öğrenme denemelerinin 1.gününde kortikosteron düzeyinde bir miktar artışla karakterize ılımlı bir stres reaksiyonu gözlemlense de, ileriki günlerde alışma gerçekleşir (17). Havuz merkezinin üstüne yerleştirilmiş bir dijital bir kamera ile

hayvanın labirent içerisindeki davranışları kaydedilir. Bunun yanında sisteme davranış kayıtlarının aktarıldığı bir bilgisayar ve hayvanın çeşitli davranışsal parametrelerini izleyen bir yazılım dahildir. Kaçış platformu 10-15 cm çapında silindirik yapıda olup, suyun 1,5 cm altına yerleştirilir (Şekil 2.4).

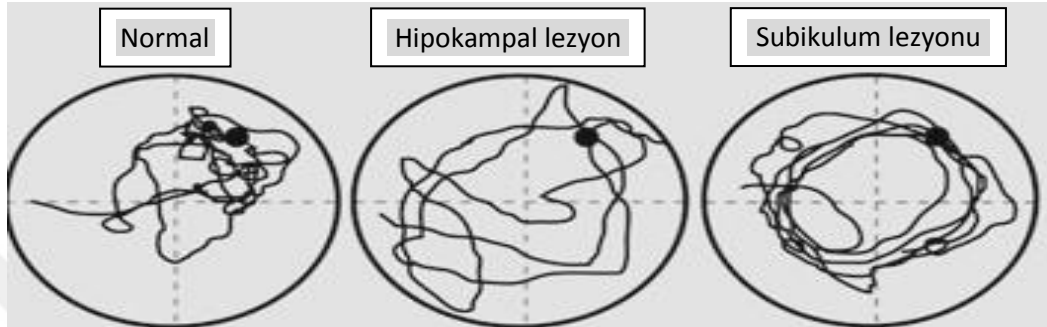
Öğrenme periyodunda, hayvanlar “trial” olarak adlandırılan yüzdürme denemelerine tabi tutulurlar. Bunun için havuz hayali 4 eşit kadrana bölünür ve her kadrana başlama noktaları belirlenir. Bu kadranslardan biri hedef kadrana olarak seçilerek kaçış platformu buraya yerleştirilir. Bir başlama noktasından yüzü havuzun duvarına dönük şekilde bırakılan hayvanın 60 saniye yüzmesine izin verilir ve bu süre zarfında platformu bulamayanlar nazikçe platforma konularak 30 saniye bekletilir. Böylece çevresel işaretler yardımıyla platformun yerini öğrenmesi sağlanır. Yapılan çalışmalardan gözlemlendiği kadarıyla, platforma çıkan hayvan “şaha kalkma” hareketi yapar ve etrafına bakarak muhtemelen bulunduğu yerin uzamsal konumu belirlemeye çalışır. Her öğrenme denemesi, arası 20 dakika olacak şekilde günde 4 kez 4 gün boyunca gerçekleştirilir. Başlama noktasının her denemede farklı noktadan olmasına, yani hayvanın üst üste aynı noktadan bırakılmamasına dikkat edilmelidir.



Şekil 2.4. Morris Su Labirent Test Düzenegi (17)

Morris su labirent testi izleme sistemi deneklerin denemeler boyunca toplam aldıkları yol uzunluğu, platforma ulaşma süresi, yüzme hızı gibi parametreleri hesaplar. Öğrenme gerçekleşen normal hayvanlarda kat edilen yol uzunluğu ve platforma ulaşma süresi gibi parametrelerin dereceli olarak azalması söz konusudur. Hedef kadranda geçirilen süre Morris su labirentinin bellek testi aşaması olup, 5. gün kaçış platformu kaldırıldıktan sonra 60 saniyelik tek bir yüzme denemesiyle gerçekleştirilir. Bu süre zarfında hayvanların hedef kadranda geçirdikleri sürenin havuzda aldıkları toplam süreye oranının yüzde değerleri hesaplanarak bellek performansları değerlendirilir. Denemeler

boyunca öğrenmenin gerçekleştiği hayvanlar bu test sırasında kaçış platformunun olduğu hedef kadranda görece daha uzun süre bulunma eğilimi gösterirler. Bu da uzamsal bellek açısından kanıt olarak kabul edilir. Aksine, hipokampus ve DG, subikulum gibi organlardan biri lezyonlu olan hayvanlarda 5. gün yapılan bu testte bellek performansındaki bozulmayı ortaya çıkarmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Normal, Hipokampus ve Subikulum Lezyonlu Farelerin 5. Gün Testleri (17)

2.2. Uyku ve Bellek

Uyku bilişsel aktivitenin azalarak uyarılma eşiğinin arttığı, karakteristik bir postürün eşlik ettiği tekrarlayıcı ve geri dönüşümlü bir davranış olarak tanımlanabilir. Uyku birçok canlı türünde (böcekler, kuşlar, balıklar, memeliler) korunmuş olup tüm hayatın önemli bir süresini işgal eder. İlk bakışta avcılara açık olma, besin kaynaklarının elde edilmesini engelleme ve sosyal etkileşime ara verme gibi dezavantajlara sahip gibi görünmesine rağmen uykunun birçok organizma grubunda var oluşu şaşırtıcıdır. Uykunun fonksiyonu için öne sürülen hipotezler enerji kaynaklarının restorasyonu, termoregülasyon, metabolik düzenleme, immün fonksiyon gibi bazı homeostatik süreçlere odaklanmıştır (78-81). Uykunun fonksiyonu için en fazla dikkat çeken hipotezlerden birisi de uykunun öğrenme-bellek süreçlerine ve beyin plastisitesine katkı sağladığı varsayımlarıdır (3, 21). “Bellek için uyku (sleep-for-memory)” hipotezinin geçerliliği uykunun belleğe yararlı etkisini gösteren çalışmaların giderek artmasıyla büyük bir ivme kazanmıştır.

2.2.1. Uykunun Aşamaları

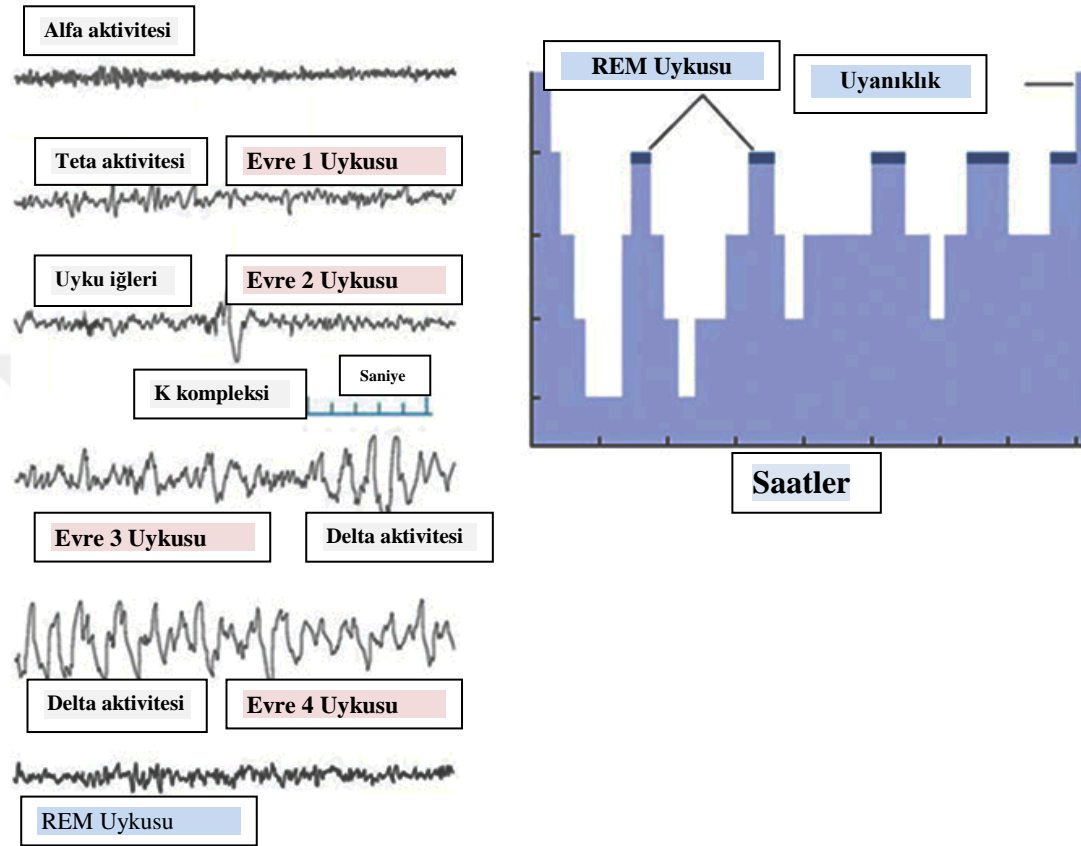
Uyku sırasında beynin elektrik dalgalarının elektroenseleografi (EEG) ile ölçülmesi uykunun üniter bir süreç olmayıp en az iki aşamadan oluşan bir durum olduğunu göstermiştir: Hızlı göz hareketleri (Rapid Eye Movement-REM) uykusu ve Non-REM (NREM) uykusu (Şekil 2.6). EEG'nin yanı sıra, uyku sırasında alınan

“elektrookülogram (EOG)” ve “elektromyografi (EMG)” kayıtları da uyku aşamalarının karakteristiklerini yansıtan desenler sunar. REM ve NREM uykusunun düzenli olarak birbirini izlediği bir uyku döngüsü insanlarda yaklaşık olarak 90 dakikadır ve böylece bir gece 4-6 uyku döngüsünden oluşur (3). REM uyku periyotları arasında geçen süre beyin büyüklüğü ile değişir; insanda 90 dakika olan bu süre farelerde 10 dakika kadardır (2). Uykunun başlangıç döneminde NREM uykusu baskınken, sonlara doğru REM uykusu baskın hale gelir. Her ne kadar isimlendirme uyku esnasında göz hareketlerinin olup olmayışına göre yapılmış olsa da, iki uyku aşaması arasında çok daha fazla farklar mevcuttur.

REM uykusu düşük voltajlı hızlı EEG aktivitesiyle uyanık EEG'ye oldukça benzerlik gösterir. Bu yüzden REM uykusuna paradoksal uyku da denir. Göz ve solunum kasları hariç iskelet kas tonusunda azalma (atoni), senkronize göz hareketleri, artmış solunum ve kalp hızı ve rüya görme REM uykusunun karakteristiklerindedir (82). Kaslardaki bu atonik durum spinal korddaki motor nöronların glisinerjik ara nöronlar tarafından inhibe edilmesiyle başlar. REM uykusu sırasında neokortikal piramidal nöronların tonik olarak depolarize olması EEG'de senkronize olmayan desenler oluştururken, hipokampal nöronların tonik depolarizasyonları senkronize teta ritimlerine (4-6 Hz) yol açar (2). Bu hipokampal ritmik aktivite kemirgenlerde keşfetmeye yönelik motor davranışlar ve uzamsal navigasyonun öğrenilmesi esnasında da gözlenmiştir (83).

NREM uykusu giderek uykunun daha derin aşamasına karşılık gelen 1-4 evrelerinden meydana gelir. Evre 1 uykuya geçiş aşaması olup kaslar gevşemeye ve solunum yavaşlamaya başlar. Bu evrede kişi belirli derecedeki çevresel uyaranlara yanıt olarak uyanabilecek derecede bir bilince sahiptir. Evre 2'de beyin dalgaları düzensizleşir, hızlı uyku iğleri (12-15 Hz) ve K kompleksleri görülür (11). Bu evrede de kişi çevresel uyaranlar tarafından uyandırılabilirse de, evre 1'dekinden daha yüksek şiddette bir uyaran gerekir. Evre 3 ve 4, “yavaş dalga uykusu” olarak da isimlendirilir, yüksek voltajlı yavaş EEG dalga osilasyonları (1-4 Hz) ve iğ aktivitesiyle (11-15 Hz) karakterizedir (84). Ayrıca hipokampal nöronların yüksek frekansta senkronize ateşlemeleri (sharp-wave ripples, SWR) bu evrede görülen diğer bir osilasyondur. En derin uyku Evre 3'teki NREM uyku sırasında gerçekleşir ve bu aşama artan parasempatik aktivite ile karakterizedir. Kan basıncı, kalp hızı ve sistemik damar direnci NREM'in sonraki aşamalarında düşmeye başlar. Kalp bu evrelerde daha az

çalıştığından metabolik enerji kaynaklarını yerine koyabilir ki, bu kardiyak besin yenilenmesi miyokardın sağlığı için önemlidir.



Şekil 2.6. Uykunun Aşamaları ve Karakteristik EEG kayıtları

2.2.2. Uyku ve Bellek

Uykunun canlılar için asıl fonksiyonun ne olduğu sorusu henüz cevaplanamamış olsa da, bazı hipotezler uykunun öğrenme ve bellek için faydalı olduğuna dikkat çekmektedir. Yaklaşık bir yüzyılı aşkın süredir araştırmacılar çeşitli davranışsal, elektrofizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yaklaşımlar aracılığıyla uykunun belleği nasıl teşvik ettiğini ve uyku yoksunluğunun bellek üzerine olumsuz etkisinin altında yatan mekanizmaların ne olduğunu bulmaya çalışmaktadırlar. Elde edilen veriler uyku yoksunluğunun yol açtığı bilişsel bozulmadan en fazla etkilenen beyin bölgesinin, öğrenme-bellekle ilişkili beyin bölgesi olan hipokampus olduğuna işaret etmektedir. Uykunun, özellikle anıların kalıcı hale getirilmesi işlemi olan konsolidasyon sürecine katkı sağladığı gözlenmektedir. Bununla birlikte bu katkının uykunun farklı aşamalarında (REM-NREM) farklı şekilde gerçekleştiği bilinmektedir (3).

2.2.2.1. REM Uykusu ve Bellek

REM uykusunun bellek konsolidasyonuna katkı sağladığı görüşü, REM uyku EEG'sinin uyanık beyin EEG'sine benzer olması ve öğrenmeden sonraki uykuda REM uykusu miktarında bir miktar artış gözlenmesiyle ortaya çıkmıştır (8, 85). Uykunun farklı aşamalarının bellek konsolidasyonuna etkisini araştıran farklı yaklaşımlar (öğrenme denemelerini takiben uyku yoksunluğunun belleğe etkisinin incelenmesi, öğrenme denemelerini takiben uyku aşamalarının analizi, öğrenme denemelerini takiben uyku aşamaları sırasında hücrel aktivitenin elektrofizyolojik analizi) genel olarak uykunun yararını ortaya koymakla birlikte özellikle REM uykusunun kritik rolünü ortaya çıkarmıştır (8, 9, 86). Smith ve Rose, REM uyku yoksunluğunun Morris su tankında uzamsal bellek performansını bozduğunu bulmuşlardır. Aynı grup öğrenme sonrası REM uyku miktarında bir artış olduğunu da göstermişlerdir (8). İlginç olarak REM uyku yoksunluğunun belleğe etkisinin yapılan testin kompleksliliğiyle ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Örneğin pasif sakınma testi, basit labirent testleri REM uyku yoksunluğundan daha az etkilenirken, kompleks labirent testleri, enstrümantal koşullanma gibi öğrenilmesi görece zor testler REM uyku yoksunluğuna daha duyarlıdır (21). REM uykusu-bellek ilişkisiyle ilgili diğer bir özel durum, öğrenme sonrası spesifik bir zaman dilimindeki REM uykusunun konsolidasyon için gerekli olduğudur. Öğrenme sonrası uyku yoksunluğunun bu spesifik zaman periyoduyla çakışması halinde bellek konsolidasyonun bozulduğu, bunun periyodun dışındaki döneme denk gelen uyku yoksunluğunun belleği etkilemediği gözlenmiştir (11; 86).

REM uyku yoksunluğunun bellek sürecine etkisini moleküler düzeyde araştıran çalışmalarda Hipolide ve arkadaşları, yoksunluğun α - ve β -adrenerjik reseptörlerin beyin boyunca daha düşük bağlanmaya yol açtığını göstermişlerdir (87). Başka bir çalışmada REM uyku yoksunluğunun daha düşük bir fosforile CREB düzeyiyle ilişkili olduğu ve farelerde bağlamsal korku bellek konsolidasyonunda bir bozulmanın eşlik ettiği ortaya konulmuştur (88). Ayrıca bir muskarinik reseptör antagonisti Scopolamin'in bağlamsal korku koşullanmasında öğrenme sonrası spesifik zaman dilimlerinde uygulanmasının bellekte bozulmayla sonuçlanması, bellek konsolidasyonunda kolinerjik sinyal mekanizmalarının da yer alabileceği fikrine yol açmıştır (89). Ribeiro ve Nicolelis öğrenme sonrası REM uykusunun sıçan neokorteks ve hipokampusunda artmış Zif268 ekspresyonuyla ilişkili olduğu göstermişlerdir (90).

REM uykusunun uzamsal bellek konsolidasyonu ile ilişkisini araştıran yeni bir çalışmada, Boyce ve arkadaşları optogenetik yöntemler kullanarak REM uykusu sırasında bellekle ilişkili teta ritimlerini seçici olarak bloke etmek için “medial septum γ -aminobutyric acid (MS^{GABA})” nöronlarını devre dışı bırakmışlardır. Sonuçta, REM uykusu dışında benzer sürelerde aynı işleme maruz fareler hariç, transgenik farelerde yeni obje tanıma bellek oluşumunda kusurlar gözlenmiştir (91). Böylece bellek konsolidasyonunda REM uykusu sırasındaki spesifik elektriksel aktivitenin önemli olduğu ortaya konulmuştur.

2.2.2.2. NREM Uykusu ve Bellek

1980’lerin sonuna kadar REM uykusu bellek iyileşmesinde kritik uyku aşaması olarak kabul edilmiştir, ancak daha sonraki çalışmalar REM uykusunun bellek konsolidasyonunda tek başına rol oynadığı fikri için bazı sorgulamalara neden olmuştur. İnsan ve kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalarda öğrenme sonrası NREM uyku miktarında ve yavaş dalga aktivitesi, iğ aktivitesi gibi NREM uyku-ilişkili süreçlerde bir artış olduğu gözlenmiştir (92, 93). Bazı çalışmalarda, NREM uykusunda ortaya çıkan SWR aktivitesinin uzamsal öğrenme sırasında daha önce aktive olan aynı hipokampal nöron setinden kaynaklandığının keşfedilmesiyle NREM-bellek ilişkisi daha net ortaya çıkmıştır (94, 95). Elde edilen kanıtlara göre öğrenme sırasında görülen nöronal aktivasyon desenleri uykuda yeniden ortaya çıkmakta ve öğrenme sırasında meydana gelen moleküler süreçler bu esnada tekrar devreye girmektedir (21). “Moleküler replay” NREM uykusu sırasında ilk 10-15 dakika içinde ortaya çıkmaktadır ve reaktif olan devrelerin bu esnada sinaptik konsolidasyona uğradığı düşünülmektedir (82).

NREM uyku sırasında görülen yavaş dalgaların hipokampal ve neokortikal nöronların “upstate” ve downstate” durumları arasındaki senkronize geçişi yansıttığı düşünülmektedir (96). Upstate; korteks ve hipokampal nöronların kolektif depolarizasyonunu ve birlikte ateşlenmelerini yansıtırken, downstate; bu nöronların hiperpolarize ve görece sessiz durumlarını yansıtmaktadır. Girardeau ve arkadaşları, SWR’lerin seçici olarak bloke edilmesinin hipokampus bağımlı uzamsal hafızayı bozduğunu göstermişlerdir (97). Buna paralel olarak, kanıtlar uyku iğlerinin ve SWR’in uyku-bellek etkileşiminde özel bir rol oynadıklarına ve yavaş dalga uykusu sırasında birlikte ortaya çıkma eğiliminde olduklarına işaret etmektedir (3). Ayrıca Hahn ve arkadaşları, uyku sırasındaki bu neokortikal-hipokampal diyaloga 3. oyuncu olarak

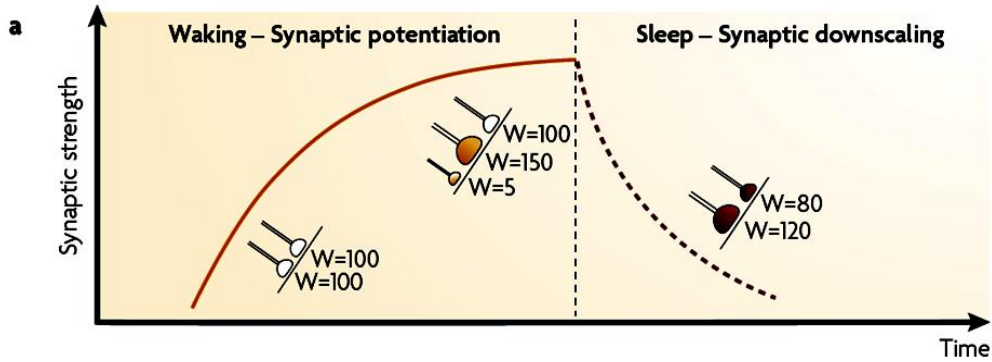
entorhinal korteksi eklemiş ve konsolidasyon sürecindeki iletişimin çok yönlü karmaşık doğasına işaret etmişlerdir (98). Bu zamansal bağdaşımın entorhinal korteks, hipokampus ve neokorteks arasında koordine bilgi transferine karşılık geldiği düşünülse de, söz konusu bu diyalogun moleküler ve hücresel doğası henüz bilinmemektedir (21).

2.2.2.3. Uyku ve Bellek İlişkisi İle İlgili Hipotezler

Uykunun fonksiyonu ile ilgili hipotezler genel olarak beyin odaklı olmuştur: sinaptik homeostazis hipotezi (99), beyin enerji restorasyon hipotezi (100), aktif sistem hipotezi (101) gibi. Çok sayıda çalışma uykunun, uyanıklık sırasındaki plastisitenin indüksiyonundan sonra sinaptik değişimlere ve bellek konsolidasyonuna katkı sağladığına işaret etmektedir (82). Uyku-bellek ilişkisi için ön plana çıkmış iki hipotez olan sinaptik homeostazis ve aktif sistem hipotezinin mutlak olarak birbirini dışlamadığı ve her iki hipotezin de bu ilişkide yer alabileceği ön görülmektedir.

2.2.2.3.1. Sinaptik Homeostazis Hipotezi

Sinaptik homeostazis hipotezi Tononi ve Cirelli tarafından ortaya atılan sinaptik düzeydeki uyku ve uyanıklık-bağımlı değişikliklere dayanan bir hipotezdir (99). Bu hipotezin temel argümanı, öğrenme ve uyanıklık sırasındaki deneyimlerin “sinaptik güçte” bir artışla ilişkili olduğu ve uykunun beyindeki nöronal devreleri bu “aşırı yüklenmeden” kurtardığıdır (Şekil 2.7). Uyanırken net sinaptik gücün arttığı ve uyku sırasında sinaptik gücün azaltıldığıyla ilgili elde edilen biyokimyasal, nörofizyolojik ve morfolojik kanıtlar bu hipotezin tetiklediği çok sayıda araştırmanın neticesidir (102, 103). Öyle ki, aktivite bağımlı sinaptik plastisite metabolik ihtiyacın ve enerji talebinin arttığı, bunun da ötesinde milyonlarca nöron ve gliadan oluşan kompleks bir organ olan beyinde “boşluk” gerektiren bir süreçtir. Bu hipoteze göre uyku, uyanıklığın yol açtığı artmış sinaptik aktivitenin normal düzeye indirildiği bir durumu yansıtmaktadır.



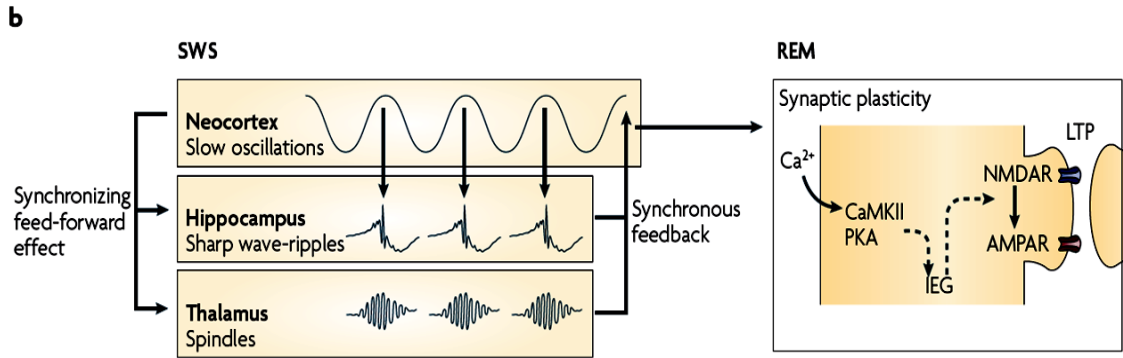
Şekil 2.7. Sinaptik Homeostazis Hipotezi (101)

Sinaptik homeostazis hipotezi çok sayıda deneysel gözlemi tutarlı bir çerçevede uzlaştırarak sinaps, nöronal ağ ve tüm beyin düzeyinden davranışsal çıktıya kadar elde edilen tüm veriler arasında bir köprü oluşturmuştur. Bu hipotez son 20-30 yılda elde edilmiş birbirinden farklı ve açıklanamayan çok sayıda bulgunun birikimiyle ortaya çıkmış ve daha sonra dünya çapında birçok laboratuvarında yoğun araştırmaların başlamasına yol açmıştır (103).

2.2.2.3.2. Aktif Sistem Hipotezi

Aktif sistem hipotezi öğrenme sırasında gözlenen hücrel aktivitenin öğrenme-sonrası uyku sırasında aynı formda “replay” olduğunu, yani “tekrar edildiğini” varsayar. Buna göre uyku sırasında ortaya çıkan moleküler tekrarlar kodlama sürecini taklit eder ya da daha önce konsolide edilmiş bellek ağına yeni anıları ekler (21). Uyanırken aktive edilen spesifik nöronların (örn; hipokampal yer hücrelerinin) ardışık uyanıklık döneminde ya da uykunun NREM (özellikle SWR dalgaları) ve REM dönemlerinde yeniden aktive oldukları gözlenmiştir (9, 94). REM uykusu döneminde plastisite-ilişkili IEG’ler up regüle edilerek konsolidasyona katkı sağlanır (104). Genetik olarak değiştirilmiş farelerde hipokampal çıktının bloke edilmesi yer hücrelerinin reaktivasyon frekansını azaltmış ve sistem konsolidasyonunda bozulmayla sonuçlanmıştır (105). Hipokampal “tekrarlama”nın uyku sırasında yüksek frekanslı SWR ile eş zamanlı olarak ortaya çıkmasıyla, hem anıların hipokampal sinapslarda pekiştirilmesine katkı sağladığı hem de kortikal bölgelerdeki bellek konsolidasyon sürecini koordine ettiği düşünülmektedir. Dahası hipokampal SWR, medial prefrontal kortekste kaydedilen yavaş dalga iğleriyle zamansal bir korelasyon göstermektedir (106). NREM uykusu sırasında ortaya çıkan bu şekildeki bir hipokampal-kortikal diyalog kortekste bulunan

anların dereceli olarak konsolide olmasına katkı sağlayabilir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Aktif sistem hipotezi (101)

2.2.3. Deneysel Hayvanlarda Uyku Yoksunluğu Modelleri

Uyku yoksunluğunun deneysel uygulamaları hem uykunun organizmalardaki fonksiyonlarını ortaya çıkarmak hem de uyku yoksunluğunun özellikle beyinin çeşitli işlevleri üzerinde etkisini moleküler, hücresel, sinaptik ve davranışsal düzeyde araştırmak için kullanılmaktadır (6). Uykunun bellek konsolidasyonuna etkisini araştıran çalışmalarda da uyku yoksunluğu paradigmatları yaygın şekilde uygulanmaktadır. Bunlar arasında dönen platform tekniği, flower-pot metodu, yeni obje metodu ve optogenetik teknikler ön plana çıkmaktadır (11). Flower-pot metodu başlangıçta kedilerde uyku yoksunluğu (özellikle REM uyku yoksunluğu) yapmak için geliştirilmiş, daha sonraları kemirgenler için adapte edilmiştir (107). Bu metotta hayvan su dolu bir tankın içerisinde üzerinde çömelebileceği büyüklükte küçük bir platformda bekletilir. Hayvan REM uykusunun başlangıcında kassal atoniye uğrayacağından boyun kaslarının gevşemesiyle burun kısmı suya temas ederek uyanır. Flower-pot tekniğinin psikososyal ve immobilizasyon strese yol açabilecek bir uygulama olduğu göz önüne alınarak, stres yanıtını azaltmak için daha geniş bir tank içinde hem hayvanların dolaşabilmesine olanak sağlayacak hem de sosyal izolasyonu önleyecek şekilde birden fazla platformun bulunduğu “çok platformlu modifiye su tankı” geliştirilmiştir (108).

2.2.4. Uyku Yoksunluğu ve Gen Ekspresyonu

Uyku yoksunluğu metabolizma, immünite ve kognisyonla ilişkili genlerin ekspresyonlarında kapsamlı değişimlere yol açmasıyla büyük bir fizyolojik meydan okumayı temsil etmektedir. Uyku yoksunluğunun önemli sonuçlarından birisi de nöronal fonksiyonda değişimlere yol açmada hücresel işlevleri aktive ya da inhibe

edebilen genlerin ekspresyonundaki modifikasyonlardır. Bu yüzden gen ekspresyonu analizi uyku yoksunluğunun beyin fonksiyonlarına etkisi hakkında önemli bilgiler verebilir.

Uyku yoksunluğunun gen ekspresyonuna etkisiyle ilgili yapılan çalışmaların bazıları, çok sayıda genin ekspresyonunun eş zamanlı olarak ölçümüne izin veren mikroarray metodu (DNA çip) ile gerçekleştirilmiştir (109, 110). Uyku yoksunluğu çalışmalarında genellikle stres yanıt genlerinin ekspresyonu hedeflenmiştir, öyle ki uyku yoksunluğu metodlarının stres yapıcı etkilerinin yanı sıra uyku yoksunluğunun kendisi de bir stresör faktördür. Uyanıklık sırasında merkezi sinir sisteminde eksprese olan bazı genlerin uyku yoksunluğu sırasında up regüle olduğu gözlenmiştir (6). İlk olarak çalışmaların çoğu uyku yoksunluğundan sonra kortikal bölgelerdeki gen ekspresyonu değişimlerine odaklanmıştır. Uyku yoksunluğunun akut periyotlarından sonra kortekste “activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc), c-fos, BDNF, nerve growth factor-inducible protein A (NGFI-A)” gibi IEG ve transkripsiyon faktörlerinin up regüle olduğu görülürken, uyku yoksunluğu uzadıkça diğer gen sınıfların ekspresyonlarında da (ısı şok proteinleri, moleküler şaperonlar, adezyon molekülleri, NMDA ve AMPA reseptör alt üniteleri) değişimler gözlenmiştir (7, 110-112).

Uyku yoksunluğunu takiben hipokampustaki sinaptik plastisiteyle ilgili gen ekspresyonu çalışmalarında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Taishi ve arkadaşları 8 saat uyku yoksunluğundan sonra bir IEG olan Arc’ın hipokampusta up regüle olduğunu, BDNF düzeyinin ise değişmediğini bulmuşlardır (113). BDNF mRNA’sının hipokampusta uyku yoksunluğunu takiben arttığını gösteren çalışmaların yanında, uyku yoksunluğundan sonra hipokampal BDNF ekspresyonunun down regüle edildiğini gösteren çalışmalar da vardır (114-116). Başka bir çalışmada, hipokampal AMPA reseptör alt ünitelerinin fosforilasyonunun 12 saatlik uyku yoksunluğunu takiben önemli ölçüde azalmış olduğu gösterilmiştir (117). Genom-düzeyinde mikroarray çalışmasında, 5 saat uyku yoksunluğunu takiben hipokampusta GTP sinyalizasyon, ATP bağlanma, nükleozom/kromatin assembly, transkripsiyonun pozitif düzenleyici genleri up regüle olurken, translasyon, RNA bağlanma/işlenme, transkripsiyonun negatif düzenleyici genleri ise down regüle edilmiştir. Aynı çalışmada, hipokampal gen ekspresyonundaki bu kapsamlı değişimlerin uyku yoksunluğunu takiben 2,5 saatlik bir uykuyla geri döndürüldüğü gösterilmiştir (118).

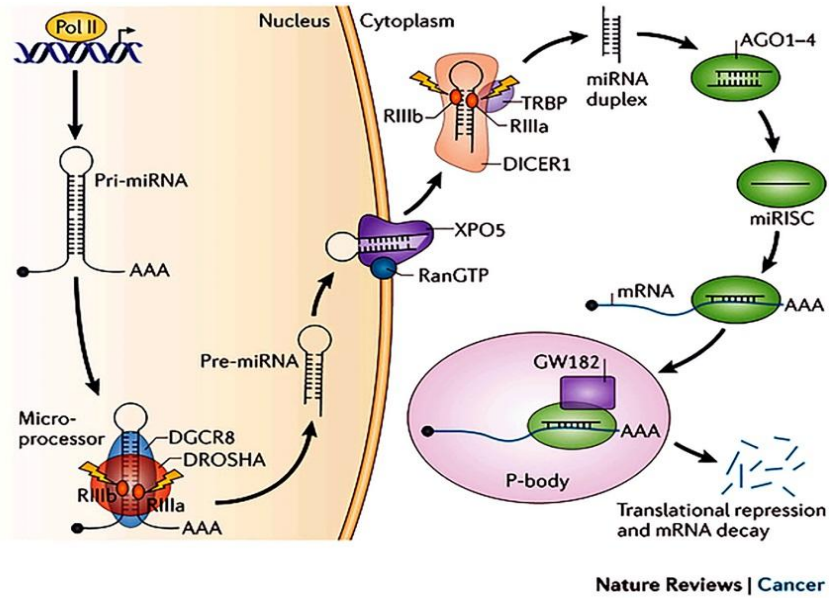
Uyku yoksunluğunun nöral plastisitede görev alan genlerin up regülasyonuna yol açmasıyla bilişsel fonksiyonlarda bozulmayla sonuçlanması arasındaki paradoks, öğrenmenin nöronların spesifik bir alt grubunda gen ekspresyonunu hedeflerken uyku yoksunluğunun genel olarak nöronal popülasyonları etkilemesiyle açıklanmaktadır (6). Öte yandan, öğrenme ve bellekte rolü olan bazı genlerin transgenik overekspresyonlarının kognitif kapasiteyi negatif olarak etkilediğini gösteren çalışmalar da vardır (119, 120). Dahası, mRNA' nın posttranskripsiyonel aşamadaki düzenlemeleri dikkate alındığında, gen ekspresyonundaki değişikliklerin her zaman protein ekspresyonundaki değişimi yansıtmadığı da bir gerçektir. Dolayısıyla uyku ve uyku yoksunluğunu takiben gen ekspresyonlarının yanı sıra protein ekspresyon analizlerinin yapılması daha doğru gözükmetedir (11).

2.3. mikroRNA'lar ve Bellek

Gen ekspresyonunun düzenlenmesi hücrel fonksiyonların belirlenmesine ve değişimine aracılık eden temel moleküler mekanizmalardan biridir. Bu düzenleme nöronlarda aktivite-bağımlı gen ekspresyonu ve protein sentez işlemlerini gerektiren öğrenme ve bellek süreçleri için de oldukça önemlidir. Belleğin nöral korelasyonu olan plastisite, çevresel uyaranların tetiklediği sinaptik yapı ve fonksiyonlardaki kalıcı değişimleri yöneten karmaşık gen ekspresyon programları tarafından yürütülür. miRNA'lar 21-23 nükleotidden oluşan, gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenleyicileri olarak tanımlanmış kodlanmayan RNA molekülleridir. Bu moleküller komplementeri olduğu mRNA'ya bağlandıktan sonra parçalanmasına yol açarlar. Bunun yanında miRNA'ların protein ekspresyonunu pozitif olarak düzenlediğiyle ilgili kanıtlar da vardır (121). Bu posttranskripsiyonel düzenlemenin gelişimden kansere, nörogenezden bellek oluşumuna kadar birçok biyolojik süreçte rol oynadığı gösterilmiştir (14). Çok sayıda miRNA yetişkin beyinde eksprese edilir ve Alzheimer, Rett sendromu gibi nörodejeneratif hastalıklarda anormal miRNA ekspresyonu söz konusudur. Bu bulgular gen ağının miRNA temelli düzenlenmesinin normal beyin fonksiyonları için önemli olduğuna ve bu düzenlemede oluşabilecek bozulmaların anormal beyin fonksiyonlarıyla sonuçlanabileceğine işaret etmektedir.

2.3.1. miRNA Biyogenezi

Çekirdekli hücrelerin genomunda kodlanmış olan miRNA genleri RNA polimeraz III tarafından transkribe edilen birkaç istisna dışında, çoğunlukla RNA polimeraz II tarafından transkripsiyona uğrar (122). Transkripsiyon sonucu oluşan uzun RNA transkripti “primer miRNA (pri-miRNA)” olarak adlandırılır. Transkripsiyonu takiben, bir RNA polimeraz III enzimi Drosha ve onun kofaktörü olan DiGeorge sendromu kritik bölge protein 8 (DGCR8) ile birlikte mikroişlemci kompleksi denilen büyük bir proteini yapıyı oluştururlar. Bu mikroişlemci kompleksi pri-miRNA'nın yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda “öncü miRNA (pre-miRNA)” oluşumunu sağlar. Daha sonra pre-miRNA çekirdek zarında bulunan Exportin 5 ile sitoplazmaya transfer edilir (123). Sitoplazmaya geçen pre-miRNA burada bulunan bir RNA polimeraz III enzimi Dicer tarafından işlenerek yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olgun miRNA dubleksisi oluşur (124). Bu çift-iplikli RNA molekülünün bir ipliği yıkılır, diğer iplik ise RISC (RNA-induced silencing complex) oluşturmak üzere Argonaut protein kompleksiyle birleşir. RISC tek-iplikli olgun miRNA'yı, mRNA'nın “3' kodlanmamış bölge (3' UTR)” sine bağlanmaya yönlendirerek eşleşme düzeyine göre mRNA'nın ya yıkılmasına ya da translasyonun engellenmesine neden olur (14). RISC/miRNA kompleksi tarafından mRNA'nın tanınması genelde miRNA'nın 5' ucunda 2-8 nükleotidin yer aldığı bir “seed sequence” bölgesine dayanır (12). miRNA-mRNA arasındaki bu eşleşme sekansının sınırlı olması durumu, tek-iplikli miRNA'nın birden fazla mRNA'yı düzenleyebilmesini açıklayabilir. mRNA ve miRNA kompleksi sitoplazmik işleme organlarına (P bodies) gönderilerek, burada mRNA'ların Dcp1/Dcp2 ve ekzonükleaz Xrn1 gibi enzimler tarafından yıkılması sağlanır. (125). (Şekil 2.8)



Şekil 2.9. miRNA Biyogenez Yoluğu (126)

2.3.2. Sinaptik Plastisite ve Bellek Oluşumunda miRNA'ların Rollerini

Yetişkin beyinde nöral devreler duyuşal deneyimler tarafından yeniden düzenlenebilir. Nöronların farklı tip ve şiddetteki duyuşal girdilere yanıt olarak yapışal bağlantılarını seçici olarak değiştirebilme yetenekleri hassas mekanizmalar tarafından kontrol edilir. Aktiviteye yanıt olarak dendritik ve sinaptik düzeyde ortaya çıkan bu düzenlemeler, yapışal ve fonksiyonel olarak son derece karmaşık bir organ olan beyinde gen ekspresyon profillerinin uzamsal ve zamansal regülasyonuna bağlıdır. Gen ekspresyonunun aktivite bağımlı düzenlenmesi sinaptik plastisite ve bellek oluşumu için temeldir. Ayrıca bellek oluşum sürecinde nöral dendritlerde lokal protein sentezinin nöronal aktiviteyle başlayan sinaptik değişimler için temel olduğu kabul edilmektedir (14). miRNA'lar sinapslarda, dendritik dikenlerde ve somalarda aktivite bağımlı bir tarzda lokal protein sentezini düzenleyebilirler (16). Bu yönleriyle nöral proteomik profilin dinamik olarak değişimine izin veren miRNA'lar, nöronal gen ekspresyonunu regüle ederek belleğe entegre olduğu düşünölen "sinaptik özgülüğe" aracılık edebilirler.

2.3.2.1. Beyinde miRNA Ekspresyonu

miRNA'ların çoğu dokuya özgü ekspresyon profili sergilerler, bununla birlikte şimdiiye kadar tanımlanmış miRNA'ların yarıdan fazlasının beyinde eksprese edildiği ya da zengin olarak bulunduğu bilinmektedir (127). Dahası, beyinde zengin olarak bulunan miRNA'lar beyin bir bölgesinde ve hatta bireysel nöronların alt bölgelerinde bile farklı

miktarlarda mevcut olabilirler (128). Yetişkin beyinde miRNA ekspresyon çalışmasında çok sayıda miRNA'nın spesifik olarak hipokampus ve korteks gibi yapılarda eksprese edildiğini göstermiştir (129). GABAerjik ve Glutamerjik nöronların, hatta GABAerjik nöronların alt ünitelerinin farklı miRNA ekspresyon profiline sahip oldukları bulunmuştur (130). Ayrıca nöronun farklı kısımlarında lokalize olan miRNA'ların tanımlanması çalışmalarında bazı miRNA'ların soma ve dendritlerde farklı miktarlarda olduğu gösterilmiştir. Örneğin miR-26a'nın dendritlerde somaya kıyasla daha zengin olduğu gözlenmiştir (131). Fare hipokampal PSD'de pri- ve pre-miRNA'ların yanı sıra bunların işleme partnerleri olan Drosha, DGRC8 ve Dicer'in lokalize olduğu gösterilmiştir (132). Normal koşullar altında Dicer'in PSD'de inaktive halde bulunduğu ve sinaptik aktiviteyi takiben Ca^{+2} salınımlarıyla birlikte aktif hale geldiği gözlenmiştir (133). Bunun yanında, mRNA-miRNA kompleksi içeren yapılar olan "P bodies" in dendritlerde yer aldığı (134) ve miRNA'ların sinaptik düzeyde poliribozomlarla eş lokalizasyon gösterdiği bulunmuştur (135).

2.3.2.2. Sinaptik Konsolidasyonda miRNA'ların Rolü

Bellek oluşumunda miRNA'ların olası rolleri için en dikkat çekici ayrıntı, nöronal protein sentezini lokal olarak kontrol edebilme yetenekleridir (30). Sinapslarda miRNA aktivitesinin uzamsal ve zamansal olarak "ince ayarlaması" protein translasyonunu seçici olarak kontrol etmeyi sağlar. Buna paralel olarak, sistem biyolojisi analizleri miRNA'ların proteinlerin istenmeyen dalgalanmalarını önleyen moleküler tamponlar olarak hareket ettiğine işaret etmektedir (136). İlginç olarak, sinaptik plastisitede ve bellek oluşumunda rol aldığı gösterilen miRNA'ların bu düzenlemedeki rollerinin her zaman negatif olmadığı da gösterilmiştir (16, 121). miRNA'lar transkripsiyon ve işlenmeden sonra fonksiyonel olabildiklerinden dışsal uyarılara transkripsiyon faktörlerinden daha hızlı yanıt verebilirler (137). Dolayısıyla gen ekspresyonunun aktivite bağımlı düzenlenmesi miRNA'lar için de geçerlidir (13).

Nöronal büyümede rolü olduğu gösterilen ilk miRNA miR-132 olmuştur. (138). Bu çalışmada miR-132'nin dışsal uyarıya yanıt olarak bir CREB-bağımlı düzenleme ile nöronal morfogenezini teşvik ettiği gösterilmiştir. CREB, pri-miRNA-132 geninin promotor bölgesindeki 2 CRE-sorumlu elemente bağlanarak miR-132 transkripsiyonunu başlatmaktadır. Wayman ve arkadaşları, Bicucullin- ve KCl-aracılı nöronal aktivasyonu takiben miR-132 ekspresyonunun hızlı bir şekilde arttığını göstermişlerdir (139). Fare

ön beyinde miR-132'nin transgenik overekspresyonu artmış dendritik diken yoğunluğuyla ve yeni obje tanıma testinde bozulmayla sonuçlanmıştır (140). Yetişkin beyinde miRNA ekspresyonunun inhibe edilmesinin bellek üzerine etkilerini görmek için, Konopka ve arkadaşları Dicer mutant fare suşu üzerinde yaptıkları Morris su labirent testinde artmış bellek fonksiyonu gözlemlemişlerdir (141). Ayrıca Dicer mutant farelerdeki nöronlarda filopod-benzeri dendritik diken yoğunluğunda artış ve BDNF gibi plastisiteyle ilişkili protein düzeyinde yükselme gözlenmiştir. Buradan, miRNA'ların sinaptik plastisitede önemli genlerin düzenlemedeki rolünün lokal protein sentezi etkinliğini azaltma yönünde olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Diğer bir yaklaşım ise, miRNA'ların aktivite bağımlı gen ekspresyon eşliğini yükseltmeleridir (14). Bu çalışmayla paralel olarak *Drosophila*'da bellek oluşumunun RISC/miRNA kompleksi tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Ashraf ve arkadaşları, RISC'in ana komponenti olan Armitage'nin bazal koşullarda sinapslarda lokalize olduğunu ve kalıcı bellek oluşumunun başlatılmasıyla birlikte parçalandığını göstermişlerdir (142). Sinaptik plastisitede ve öğrenme-bellek gibi beyin fonksiyonlarda rolü olduğu gösterilen miRNA'lar Tablo 2.1 'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Sinaptik Plastisite ve Bellekte Rolü Olan miRNA'lar ve Bilinen Hedef Genleri

miRNA	Hedef Genler	Bilişsel Fonksiyonlardaki Rolü	Referanslar
miR-9	REST	sinaptik plastisite	233
miR-124	CREB, Zif268, FMR1	sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek	222; 223; 217
miR-125b	NR2A	sinaptik plastisite	143
miR-128b	Rcs	koru-extinction (silinme) bellek	145
miR-132	p250GAP, MecP2, p300	sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek	218; 144; 139; 143; 165
miR-134	LimK1, CREB, Pumilio2, SIRT1	sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek	146; 147; 148
miR-137	MIB1	sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek	149; 150
miR-182	BDNF, HDAC9	sinaptik plastisite	226; 224
miR-219	CAMK II	sinaptik plastisite	227
miR-325	Tomozin	sinaptik plastisite	215

2.3.2.3. Nörodejeneratif Hastalıklarda miRNA'ların Rolü

Nörodejeneratif hastalıklar, merkezi sinir sistemindeki spesifik nöronal grupların yapısal ve fonksiyonel kayıplarıyla karakterize bir hastalık grubunu temsil etmektedir. Öğrenme, bellek, bilgi işleme ve muhakeme gibi beyin fonksiyonlarında belirgin bir bozulma bu hastalıklar için ortak özelliklerdir. Henüz kalıcı bir tedavi yöntemi bulunamayan bu nörolojik hastalıkların büyük sosyal ve ekonomik etkilerinin varlığı, sinir bilimcileri altta yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması yönünde zorlamaktadır. İnsanlarda yaşlanmakla birlikte miRNA fonksiyonundaki bozulmanın nörodejeneratif fenotipten sorumlu olabileceği düşünülmektedir (15). Ayrıca, Alzheimer ve Parkinson gibi nörolojik hastalıklara sahip hastaların beyinlerinde değişmiş miRNA ekspresyonunun belirlenmesi, nörolojik hastalıkların fizyopatolojisinde bu moleküllerin rolü olabileceğini akla getirmektedir (151). Nörodejeneratif hastalıkların bir RNA hastalığı olabileceği de ileri sürülmektedir (15). Nörodejenerasyonda miRNA'ların rolünün belirlenmesi nörolojik hastalıklar için genetik tedavilerin ve yeni teşhis yöntemlerinin gelişimine kapı açabilecektir.

Alzheimer hastalığı geç-başlangıçlı, yaygın ve kognitif bozuklukla ilişkili nörodejeneratif bir hastalıktır (152). Hastalıktan etkilenmiş beyin dokuların postmortem miRNA analizleri ve bunların hasta olmayan kontrollerle karşılaştırılması, bu tür nörodejeneratif hastalıklarda miRNA'ların rolünü belirlemede öne çıkan bir strateji olmuştur. Alzheimer'lı beyinlerin hipokampuslarında miR-9 ve miR-128 ekspresyonunun up regüle edildiği gösterilmiştir (153). Wang ve arkadaşları ise miR-107'nin ekspresyonunun Alzheimer hastalığının erken evresinde down regüle olduğunu göstermişlerdir (154). Başka bir çalışmada miR-124'ün Alzheimer'de downregüle edildiği gözlenmiştir (155). miRNA profil çalışmalarında farklı sonuçların gözlenmesi küçük örneklem boyutuna ve farklı deneysel yaklaşımlara atfedilmektedir (151).

Parkinson hastalığı bradikinezi, tremor, rijidite ve sonunda postural bozuklukla karakterize ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (156). Bu klinik bulgular substantia nigra'da dopaminerjik nöron kaybıyla ilişkilidir. Parkinson'lu hastaların ve hastalıklı olmayan kontrol deneklerin ön beyinde miRNA ekspresyon profili çalışmasında, miR-133b Parkinson'lu beyinde düşük bulunmuştur (157). Fonksiyonel çalışmalar miR-133b'nin dopaminerjik nöronların matürasyonunu ve fonksiyonunu düzenlediğine işaret etmektedir (14). Minones-Moyano ve arkadaşları ise Parkinson hastalığında etkilenmiş

beyin bölgelerinde (amigdala, frontal korteks, substantia nigra, serebellum) miR-34b ve miR-34c'nin ekspresyonunun down regüle olduğunu göstermişlerdir (158).

Huntington's hastalığı "huntingtin (htt)" geninde anormal trinükleotid-CAG tekrarlarının yer aldığı, kortikal nöronal kayıpla sonuçlanan ve bilişsel ve motor bozuklukla karakterize yaygın bir nörodejeneratif hastalıktır (159). Mutant htt proteinin Ago1 ve Ago 2 ile etkileşerek P body oluşumunu inhibe ettiğinin gösterilmesi, bu hastalığın miRNA bozukluğuyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (160). Normalde htt proteini nöronlarda "nöron kısıtlayıcı susturma faktörü" olarak bilinen ve non-nöronal hücrelerde represör olarak görev yapan REST transkripsiyon faktörüyle ilişkilidir. Sağlıklı nöronlarda, htt sitoplazmada REST ile kompleks oluşturur ve REST'in DNA'ya bağlanarak "represör" olarak hareket etmesini önler. Mutant htt proteini ise REST ile etkileşime girmez, bu yüzden REST nükleusa bağlanarak nöronal gen ekspresyonunu baskılar. REST'in hedef genlerinden biri de nöronal sağ kalım için temel bir protein olduğu bilinen BDNF'dir (161). Huntington's hastalığından etkilenmiş bireylerin serebral korteks miRNA ekspresyon çalışmasında miR-9/miR-9*'un büyük oranda azalmış olduğu gözlenmiştir (162). miR-9/miR-9* REST'in iki komponentini hedefler, bu yüzden Huntington's hastalığında bu miRNA'ların azalmış ekspresyonu REST'in nöronlarda anormal birikimine yol açmaktadır. Huntington's hastalığında rolü olduğu düşünülen diğer bir miRNA ise miR-132 olmuştur. miR-132'nin down regülasyonu hem hastalığa sahip bireylerin postmortem beyin analizlerinde hem de Huntington's hastalığının fare modelinde gösterilmiştir (163).

Rett sendromu, X kromozomunda lokalize "metil-CpG bağlanma proteini 2 (MeCP2)" geninin mutasyonuna bağlı olarak gelişen ve mental retardasyon, büyüme geriliği, dil ve motor becerilerde duraklamayla karakterize nörogelişimsel bir hastalıktır (164). Bu hastalıkta sinaps oluşumunda, dendritik diken matürasyonunda ve nöral devrelerin gelişiminde bir sınırlanma söz konusudur. Ön beyinde miR-132'nin transgenik overekspresyonu hipokampal MeCP2 düzeyinde azalmaya yol açmıştır (140). MeCP2'nin miR-132'nin bir hedefi olmasının yanında, MeCP2 'nin azalmış ekspresyonunun in vivo miR-132 ekspresyonunda azalmaya yol açtığına gösterilmesiyle, bu iki molekülün bir feedback döngüyle etkileştikleri anlaşılmıştır (165). MeCP2-bağımlı bu miRNA homeostatik düzenlenmesindeki bozulmanın Rett sendromunun patoetyolojisinde bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

2.3.3. Uyku ve miRNA'lar

Uyku bozuklukları nörodejeneratif hastalıklarda yaygın olarak görülmektedir. Bazı durumlarda uyku bozuklukları bu tür hastalıklarda semptomların görülmesinden önce ortaya çıksa da, bazen de hastalık durumuna sekonder olarak gelişir. Çağdaş görüş uykunun nörodejeneratif hastalıklarla etkileşim içerisinde olduğu ve bu ilişkide miRNA'ların aracı bir rol oynayabileceği yönündedir (166). Öyle ki, miRNA'lar hem nörodejeneratif hastalıkların etyolojisinde hem de uyku-uyanıklık durumlarında iyi tanımlanmıştır (151, 167).

İlk olarak, kanıtlar miRNA düzeyindeki değişimlerin sirkadiyen ritimler üzerindeki etkileri aracılığıyla uyku bozukluğuna yol açabileceğine işaret etmektedir. miR-132 ve miR-219 düzeyinde nörodejeneratif hastalıkların sonucu olarak ortaya çıkan değişimlerin sirkadiyen bozuklukla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (168, 169). Diğer taraftan miRNA'ların uyku aşamalarını değiştirebileceği gösterilmiştir. Davis ve arkadaşları miR-132 analogunun intraserebroventriküler uygulamasının REM uyku süresini artırırken, NREM uyku süresini kısalttığını göstermişlerdir (169). Ayrıca uyku yoksunluğunun beyinde bölge-spesifik tarzda bir miRNA ekspresyon değişimi gösterdiği bulunmuştur. Örneğin uyku yoksunluğunu takiben miR-132 düzeyinin hipokampusta arttığı, fakat korteks ve hipotalamusta azaldığı gözlenmiştir (167). Sonuç olarak bu miRNA değişimleri uyku bozukluğunun zararlı sonuçlarını yansıtabilir ya da uyku bozukluğunun beyine zararlı etkisini korumak için adaptif bir yanıt olabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 12.08.2015 tarih ve 15/116 no'lu kararıyla, Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi Davranış Laboratuvarı ve Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi Genom Araştırma ve Uygulama Birimi'nde yapılmıştır.

3.1. Deney Hayvanları ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda 2-3 aylık yaklaşık olarak 21-27 gram ağırlığındaki erkek Balb/c türü fareler kullanıldı. Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi Davranış Laboratuvarı'nda bakımı yapılan fareler çalışma süresince 191mm x 292mm x 127mm ölçülerindeki kafeslerde beslenme kısıtlaması olmaksızın normal yem ve su ortamında barındırıldılar. Her kafeste 4-5 hayvan olacak şekilde gruplandırılan hayvanlar ortalama 21-22 °C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsünde tutuldular. Bütün deneysel uygulamalar 12 saatlik aydınlık döngüsünde (09.00 ve 17.00 saatleri arasında) yapıldı. Hayvanlar üzerindeki tüm işlemler Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesinde yer alan etik kurallar çerçevesinde gerçekleştirildi.

İki aşama olarak planlanan çalışmada her bir aşama için 3'er grup ve her grupta 10 hayvan olacak şekilde toplam 6 grup (n=60) oluşturuldu.

A) *Öğrenme sonrası uyku yoksunluğu ve bellek testi*: Bu aşamada hayvanlar 4 gün boyunca günde 4 kez olmak üzere Morris su labirentinde öğrenme denemelerine maruz bırakıldılar. Bu 4 gün boyunca son denemeden (4. deneme) sonra kontrol grubu dışındaki tüm hayvanlar aşağıda belirtildiği şekilde 3 saatlik uyku yoksunluğuna tabi tutuldular. 5.gün tüm grupların Morris su labirentinde hedef kadranda geçirilen süreleri ölçüldü.

B) *Öğrenme sonrası uyku yoksunluğu ve moleküler analiz*: Bu aşamada da hayvanlar 4 gün boyunca günde 4 kez olmak üzere Morris su labirentinde öğrenme denemelerine

maruz bırakıldılar. Yine, bu 4 gün boyunca 4. denemeden sonra kontrol grubu dışındaki tüm hayvanlar aşağıda belirtildiği şekilde 3 saatlik uyku yoksunluğuna tabi tutuldular. Ancak bu gruptaki hayvanlar 4.gün 4. denemeden sonra dekapite edildikten sonra hipokampusları steril cerrahi koşullar altında alındı ve moleküler analiz için uygun kimyasal ortamda saklandı.

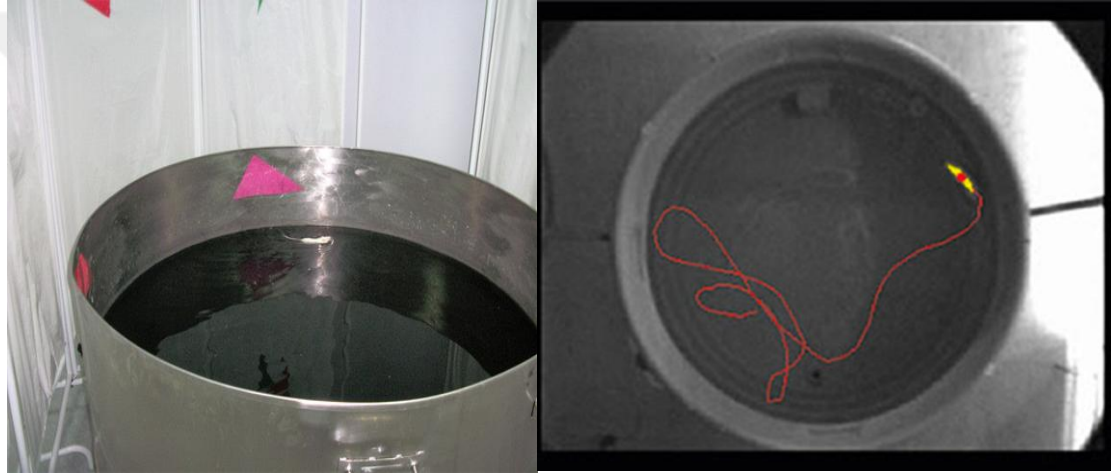
Tablo 3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

GRUP	UYKU YOKSUNLUĞU PROTOKOLÜ	YAPILAN İŞLEM
A1	Öğrenme Sonrası Hemen 3 saat Uyku Yoksunluğu	5.gün Hedef Kadrandaki Geçirilen Sürenin Ölçülmesi
A2	Öğrenme Sonrası 3 saat Sonra 3 saat Uyku Yoksunluğu	
AK	Öğrenme Denemeleri	
B1	Öğrenme Sonrası Hemen 3 saat Uyku Yoksunluğu	4. gün Son Deneme Sonrası Dekapitasyon
B2	Öğrenme Sonrası 3 saat Sonra 3 saat Uyku Yoksunluğu	
BK	Öğrenme Denemeleri	

3.2. Morris Su Labirent Testi

Hipokampus bağımlı uzamsal bellek testi için Morris su labirenti (Ethovision, Noldus) kullanılmıştır. Bu test hayvanların opak su dolu dairesel bir havuzda çevresel ipuçları yardımıyla suyun hemen altındaki bir kaçış platformunun yerini bulma davranışını izlemek için geliştirilmiştir (Resim 3.1). Sistem hayvanın havuz içerisindeki hareketlerini kaydeden bir video kamera, kayıtların aktarıldığı bir bilgisayar ve hayvanın çeşitli davranışsal parametrelerini hesaplayan bir yazılımdan oluşur. Test için 124 cm çapında ve 32 cm derinliğindeki havuz, 24±2 °C sıcaklığındaki toksik olmayan siyah boya ile muamele edilmiş suyla dolduruldu. Havuz hayali olarak 4 eşit kadrana bölündü ve 4 eşit başlama pozisyonu labirentin kenarına işaretlendi. Kadranlardan biri hedef kadran olarak belirlenerek, bunun merkezine hayvanların üzerinde kaymadan tırmanabileceği 7 cm çapında su seviyesinin 1 cm altında kalacak şekilde siyah renkte silindirik bir kaçış platformu yerleştirildi. Her denemede başlama pozisyonu

değiştirilerek 60 saniye boyunca hayvanların serbestçe yüzmelerine izin verildi. Bu süre zarfında hedef kadradaki kaçış platformunu bulamayan hayvanlar nazik bir şekilde tutularak platformda 30 saniye bekletildi. Her deneme arası 20 dakika olacak şekilde günde ardışık 4 deneme, 4 gün boyunca gerçekleştirildi. 5. gün ise hedef kadranda yer alan kaçış platformu kaldırılarak 60 saniye süren tek bir yüzdürme denemesi yaptırıldı. Davranışsal değerlendirmede öğrenme aşamasında hayvanın su tankında platformu bulana kadarki toplam aldığı yol uzunluğu, platformu bulma süresi ve ortalama hızı, 5. gün ise hedef kadranda geçirilen sürenin su tankında geçirilen süreye oranının % cinsinden değeri kullanıldı.



Şekil 3.1. Morris Su Labirent Test Düzenegi

3.3. Çok Platformlu Modifiye Su Tankı

Çalışmamızda farelerde öğrenme sonrası REM uyku yoksunluğu “Çok Platformlu Modifiye Su Tankı” kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Resim 3.2). Bu tank Chang ve arkadaşlarının modifiye ettiği “flower pot” tekniği dikkate alınarak yapılmıştır (170). 50 cm uzunluğunda ve 30 cm yüksekliğinde dikdörtgen şeklindeki plastik bir kabın tabanına 10 adet küçük silindirik plastik platformlar sabitlenmiştir. Bu platformlar farelerin üzerinde düşmeden durabilecekleri büyüklükte, 3 cm çap ve 10 cm yükseklikte hazırlanmıştır. Uyku yoksunluğu deneylerinde kabın tabanı 7-8 cm’ye kadar yaklaşık olarak 25°C sıcaklığındaki suyla doldurulmuştur. Farelerin 3 saatlik uyku yoksunluğu süresince yeme ve içmelerine izin verilmiştir.



Şekil 3.2. Çok Platformlu Modifiye Su Tankı

3.4. RNA İzolasyonu

mRNA ve miRNA ekspresyon analizi yapılacak fareler 4. gün son denemeden sonra sakrifiye edildi ve steril koşullarda alınan hipokampusları Trizol içerisine konularak -80°C saklandı. Buzdolabından alınan örnekler 5 dakika oda sıcaklığında çözünmesi beklendikten sonra enjektör yardımıyla homojenize edildi. Üzerlerine 200 μl Kloroform eklendikten sonra 15 saniye vorteksleme işlemi yapılarak oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Örnekler 1200 rcf'de 15 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ santrifüj edildikten sonra aköz faz yeni bir ependorf tüpe alındı. 500 μl İzopropanol eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 1200 rcf'de 10 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldı. Kalan kısma 1 ml % 75 Etanol eklenerek homojen karışım sağlandı. Daha sonra karışım 7500 rcf'de 5 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra pellet 60 μl Nükleaz free water ile resüspanse edilerek RNA miktarı Biospec Nano ile ölçüldü.

3.5. Gen Ekspresyon Çalışması

3.5.1. cDNA Sentezi

Tek zincirli komplementer DNA (cDNA) sentezi için total RNA'nın 50 ng'ı alınarak revers transkripsiyon işlemi uygulandı. cDNA sentezi RT2 HT First Strand Kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. 6 μl Buffer GE2 (gDNA elimination buffer) üzerine 8 μl RNA eklenip 37°C 'de 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra 6 μl BC4 (Reverse transcriptase primer) eklenerek, karışım Thermal Cycler (SensoQuest) cihazına konuldu

ve 42 °C 15 dakika, 95 °C’de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA -20 °C’de saklandı.

3.5.2. Gen Ekspresyonu

Gen ekspresyon çalışması LightCycler 480 II (Roche) Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi. cDNA örnekleri 1/5 oranında Nuclease Free Water ile seyreltikten sonra reaksiyon ortamına (LightCycler 480 Multiwell Plate, 96 well (Roche)) solüsyonlar aşağıda belirtilen miktarlarda eklendi:

2X Probe Master Mix	10 µl
Primer/Probe	1 µl
Nuclease Free Water	4 µl
cDNA	5 µl

Daha sonra LightCycler 480 II (Roche) Real-Time PCR cihazında aşağıdaki programa konuldu.

95° C	10 dakika	} 45 Döngü
95° C	10 saniye	
60° C	30 saniye	
72° C	1 dakika	
40° C	30 saniye	

Gen ekspresyon çalışmasında Housekeeping gen olarak beta-actin kullanıldı. Veriler delta delta ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metodu kullanılarak hesaplandı ve normalize edildi. İlgili genlere ait bilgiler aşağıdaki gibidir:

Gen Adı	NCBI link	Assay ID
ACTB	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11461	300236
BDNF	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12064	317775
CAMKII	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12323	300360
CREB	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12912	300049
EGR1	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13653	311971
REST1	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13653	314910
STXBP5	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/78808	317899

3.6. miRNA Ekspresyon Çalışması

3.6.1. cDNA Sentezi

miRNA ekspresyon çalışmasında cDNA sentezi için miScript II RT Kit'i (Qiagen) kullanılmıştır. Hazırlanan Mix çözeltisi aşağıdaki gibidir:

5X miScript RT Buffer (HiSpec)	2µl
RNase free water	1 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 µl
10X Nucleics Mix	1 µl
Template RNA	5 µl

Template RNA üretici firmanın direktifleri doğrultusunda 20ng/ µl olacak şekilde seyreltildi. Tüplere 5'er µl mix dağıtıldıktan sonra 5'er µl RNA eklendi. Daha sonra 37°C 'de 60 dakika, ardından 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA -20 °C'de saklandı.

3.6.2. miRNA Ekspresyonu

10 µl cDNA üzerine 40 µl Nuclease free water eklenerek, cDNA'lar 1/5 oranında sulandırıldı ve her bir reaksiyonda 1-3 ng cDNA olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan Mix çözeltisi aşağıdaki gibidir:

2X miScript SYBR Green Mix	12,5 µl
10X miScript Universal Primer	2,5 µl
10X miScript Primer Assay	2,5 µl
RNase free water	5 µl

22,5 µl mix üzerine 2,5 µl cDNA dağıtıldı ve her bir örnek çift olarak çalışıldı. miRNA ekspresyon çalışmasında Housekeeping gen olarak RNU6-2-11 kullanıldı. Veriler delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metodu kullanılarak hesaplandı ve normalize edildi. Çalışılan miRNA'lar, primer dizileri ve olgun "microRNA miRBase accession (MIMAT)" kodları aşağıdaki gibidir:

miRNA Adı	Dizisi	MIMAT
mmu-miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	0000134
mmu-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACCG	0000211
mmu-miR-325-3p	UUUAUUGAGCACCUCUAUCAA	0004640
mmu-miR-219a-5p	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU	0000664
mmu-miR-9-3p	AUAAAGCUAGAUAACCGAAAGU	0000143
mmu-miR-132-3p	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG	0000144

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler “IBM SPSS Statistics Version 22” paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplardan elde edilen davranışsal veriler ortalama ve standart sapma dağılımları ile gösterilmiştir. Morris su labirent testinde toplam alınan yol uzunluğu ve platforma ulaşma süresindeki ölçümlerin analizinde tekrarlı ölçümlerde varyans analizi (Repeated Measures ANOVA) testi, hedef kadranda geçirilen sürenin toplam süreye oranının yüzde değerlerinin gruplar arası karşılaştırılmasında ise tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) testi kullanıldı. Post-hoc analiz olarak Tukey LSD ve Tamhane testleri kullanıldı. Hipokampal RNA ekspresyonlarının analizlerinde gruplar arası farklılığın öneminin belirlenmesinde ANOVA ve Kruskal–Wallis H testi, post-hoc analiz olarak Tukey HSD ve Dunn’s testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

Bulguların ilk kısmında AK, A1 ve A2 gruplarındaki hayvanların Morris su labirent testindeki öğrenme ve bellek performansına ait veriler yer alırken, ikinci kısımda BK, B1 ve B2 grubu hayvanların hipokampal mRNA ve miRNA ekspresyon sonuçları bulunmaktadır.

4.1. Davranış Testi Bulguları

Morris su labirent testinde öğrenme davranışı ilk 4 günde farelerin platformu bulana kadar toplam aldıkları yol (cm) ve platforma çıkma süreleri (sn) üzerinden, motor aktiviteleri ise ortalama hızları (cm/sn) ile değerlendirilmiştir. Bunun yanında farelerin uzamsal bellek performansları 5. günde platformun kaldırılarak hedef kadranda geçirdikleri zaman yüzdeleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

4.1.1. Toplam Alınan Yol

Grupların Morris su tankının öğrenme periyodunda kaçış platformu bulana kadar aldıkları toplam yol uzunlukları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

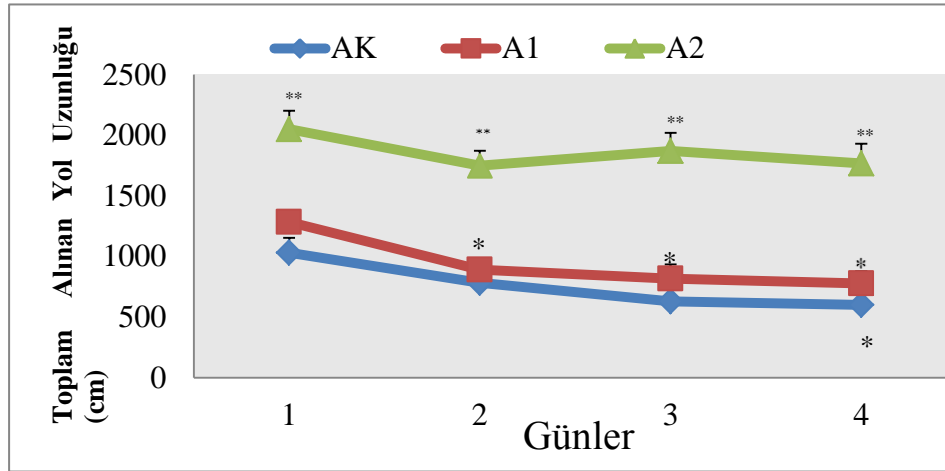
Tablo 4.1. Grupların Morris Su Labirent Testinin Öğrenme Periyodunda Toplam Aldıkları Yol (cm) (ortalama±SD)

GRUPLAR	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	p
AK (n=10)	1032±122,8	783,7±90,5	631,3±99,8	601,2±99,1*	<0.05
A1 (n=10)	1286,6±78	890,2±85,6*	818,2±117,3*	777,4±101,4*	<0.05
A2 (n=10)	2051,1±150,2**	1749±122,8**	1871±149,1**	1769,5±161,8**	>0.05
p	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	

* : Grup içi karşılaştırmalarda 1. günden farklı

** : Gruplar arası karşılaştırmalarda AK ve A1'den farklı

Günler arası farklılıklara bakıldığında; AK grubunda 4. gün alınan toplam yol uzunluğundaki azalma anlamlıyken, A1 grubunda 2,3 ve 4. günlerde alınan yol uzunluğundaki azalmalar anlamlı oldu ($p<0.05$). A2 grubunda ise günler arasında alınan yol uzunluğu bakımından fark yoktu ($p>0.05$). (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. Morris su tankında 4 gün boyunca, Toplam Alınan Yol Uzunluğunun AK, A1 ve A2 Grupları Arasında Karşılaştırılması (AK; kontrol grubu, A1; son denemeden hemen sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu, A2; son denemeden 3 saat sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu)

Buna göre, hem AK grubunda hem de A1 grubundaki farelerin kaçış platformunu bulana kadarki aldıkları yolun ilk güne kıyasla diğer günlerde anlamlı olarak azalmış olması, bu gruplarda öğrenmenin gerçekleştiğine işaret etmektedir. Aksine, A2 grubundaki veriler öğrenmenin gerçekleşmediğini göstermektedir. Bunun yanı sıra, gruplar arası karşılaştırmalarda A2 grubundaki toplam alınan yol uzunluğu verileri AK ve A1 gruplarına kıyasla 4 gün için de anlamlı derecede yüksek olmuştur ($p < 0.05$).

4.1.2. Platforma Ulaşma Süresi

Grupların Morris su tankının öğrenme periyodunda kaçış platformu bulana kadar aldıkları süre Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

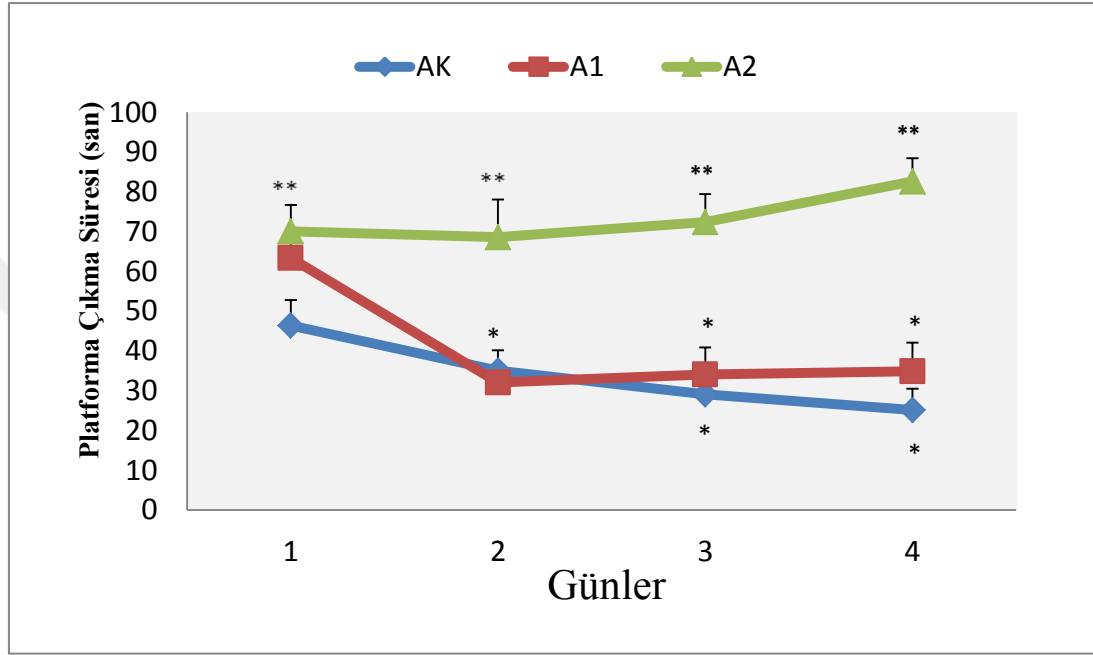
Tablo 4.2. Grupların Morris Su Labirent Testi Öğrenme Periyodunda Platforma Ulaşma Süresi (sn) (ortalama \pm SD)

GRUPLAR	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	p
AK (n=10)	46,4 \pm 6,4	35,1 \pm 5,1	29,1 \pm 5,4*	25,1 \pm 5,3*	<0.05
A1 (n=10)	63,4 \pm 5,5	32,1 \pm 3,8*	34,1 \pm 6,8*	34,9 \pm 7,2*	<0.05
A2 (n=10)	70,1 \pm 6,6**	68,6 \pm 9,4**	72,4 \pm 7**	82,6 \pm 5,7**	>0.05
p	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	

* : Grup içi karşılaştırmalarda 1. günden farklı

** : Gruplar arası karşılaştırmalarda AK ve A1’den farklı

Toplam alınan yol sonuçlarıyla paralel olarak, platforma ulaşma sürelerinde de AK ve A1 gruplarında 1. güne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlenmiştir ($p<0.05$). A2 grubunda ise günler arasında platforma ulaşma süresi bakımından fark bulunamamıştır ($p>0.05$). (Şekil 4.2)



Şekil 4.2. Morris su tankında 4 gün boyunca, Platforma Çıkma Süresinin AK, A1 ve A2 Grupları Arasında Karşılaştırılması (AK; kontrol grubu, A1; son denemeden hemen sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu, A2; son denemeden 3 saat sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu)

Buna göre, her iki AK ve A1 grubundaki farelerin platforma ulaşma sürelerinde ilk güne kıyasla 3. ve 4. günlerde gözlenen azalmalar öğrenmenin gerçekleştiğine işaret etmektedir. A1 grubunda 2. gündeki azalma da anlamlı olmuştur. Tersine olarak, A2 grubunda platformu bulma sürelerinde 2. gün hariç sürekli olarak artış meydana gelmiştir. Gruplar arası karşılaştırmada A2 grubu farelerde platformu bulma süreleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

4.1.3. Yüzme Hızları

Grupların Morris su tankının öğrenme periyodundaki ortalama hızları Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

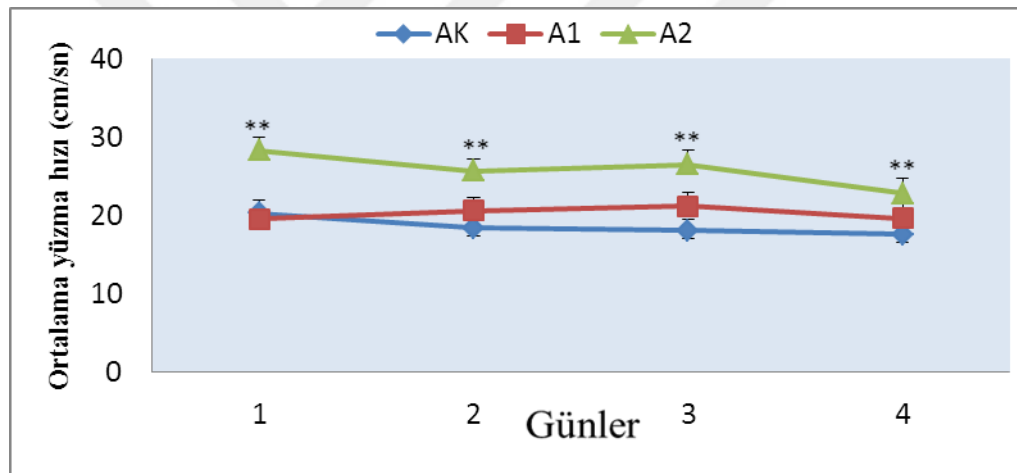
Tablo 4.3. Grupların Morris Su Labirent Testi Öğrenme Periyodunda Yüzme Hızları (cm/sn) (ortalama±SD)

GRUPLAR	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	p
AK (n=10)	20,3±1,7	18,4±1,1	18,2±1,4	17,1±1,6	>0.05
A1 (n=10)	19,5±0,8	20,7±1,6	21,2±1,8	19,7±1,9	>0.05
A2 (n=10)	28,3±1,6**	25,7±1,6**	26,7±1,8**	22,3±1,9*,**	<0.05
p	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	

* : Grup içi karşılaştırmalarda 1. günden farklı

** : Gruplar arası karşılaştırmalarda AK ve A1'den farklı

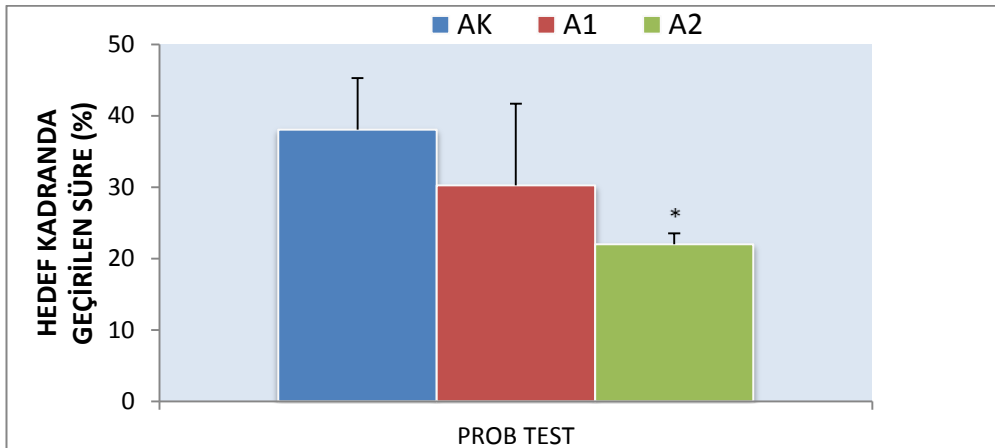
Grup içi karşılaştırmada A2 grubundaki ortalama hız ilk güne göre 4. günde farklı bulunmuştur. Gruplar arası karşılaştırmada ise A2 grubunda ortalama hız diğer iki gruba kıyasla yüksek bulunmuştur (p<0.05).



Şekil 4.3. Morris su tankında 4 gün boyunca, Ortalama Hızların AK, A1 ve A2 Grupları Arasında Karşılaştırılması (AK; kontrol grubu, A1; son denemeden hemen sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu, A2; son denemeden 3 saat sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu)

4.1.4. Hedef Kadranda Geçirilen Süre

Morris su labirent testinin bellek fonksiyonlarının değerlendirildiği aşaması olan bu kısımda, farelerin kaçış platformu kaldırıldıktan sonraki davranışları değerlendirilmiştir. 5. gün yapılan bu test ile farelerin hedef kadranda geçirdikleri sürenin havuzda aldıkları toplam süreye oranının yüzde değerleri hesaplanarak bellek performansları karşılaştırılmıştır.

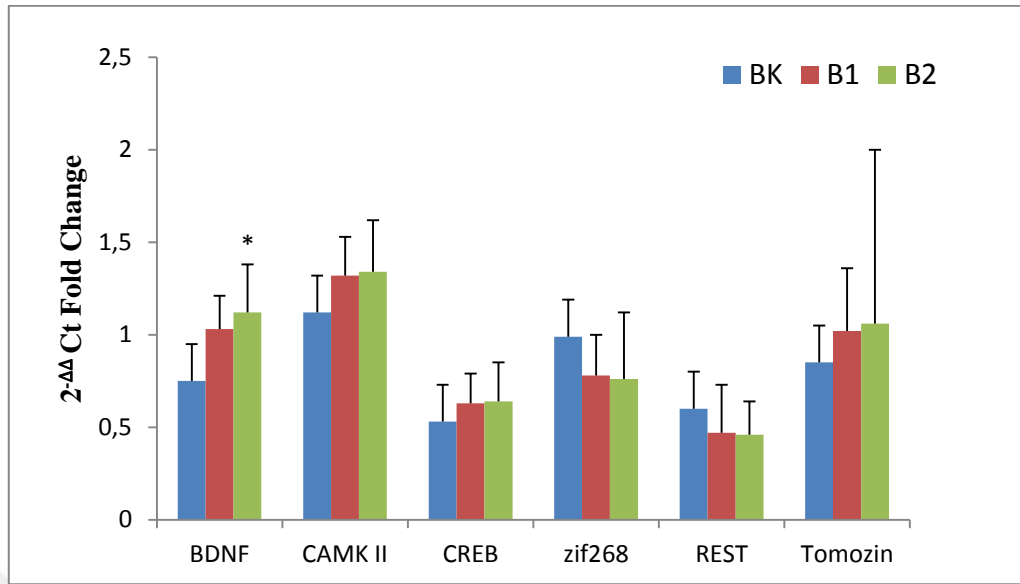


Şekil 4.4. Morris su tankında 5. gün uygulanan Hedef Kadranda Geçirilen Sürenin AK, A1 ve A2 Gruplarının Karşılaştırılması (*; $p < 0.05$, AK ile karşılaştırıldığında) (AK; kontrol grubu, A1; son denemeden hemen sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu, A2; son denemeden 3 saat sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu)

Gruplar hedef kadranda geçirdikleri zaman yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığında, A2 grubundaki azalmanın AK grubuna kıyasla anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). A1 grubunda AK grubuna kıyasla gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır ($p > 0.05$).

4.2. Hipokampal Gen Ekspresyonu Bulguları

Çalışmanın uyku yoksunluğu ve moleküler analiz aşamasında, öğrenme sonrası uyku yoksunluğu ve bellek testi kısmında olduğu gibi ilk olarak gruplardaki bütün hayvanlar Morris su labirentinde 4 gün boyunca öğrenme denemelerine tabi tutuldular. Daha sonra, BK grubu hariç B1 ve B2 grubundaki hayvanlara Tablo 3.1'deki uyku yoksunluğu protokolleri uygulandı. Tüm gruplardaki hayvanlar 4. günün sonunda dekapite edilerek hipokampusları çıkarıldı ve plastisteyle ilişkisi olduğu düşünülen genlerin ve miRNA'ların ekspresyonu çalışması için uygun kimyasal ortamlarda saklandı. BK, B1 ve B2 grubundaki farelerin hipokampal mRNA ekspresyonu sonuçları Şekil 4.5'teki gibi gerçekleşmiştir.

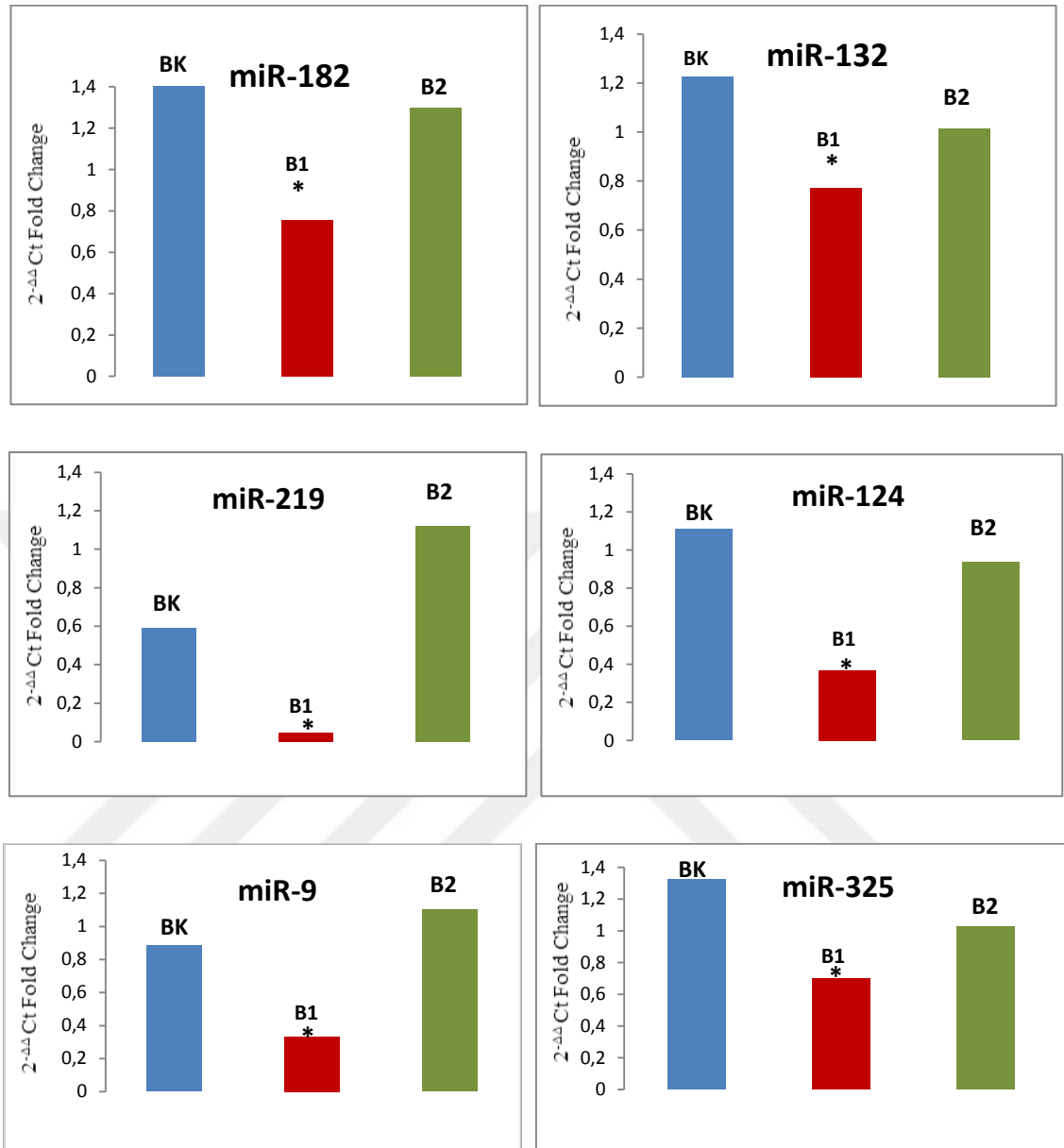


Şekil 4.5. Hipokampal mRNA ekspresyonları (BK; kontrol grubu, B1; son denemeden hemen sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu, B2; son denemeden 3 saat sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu)

B2 grubunda hipokampal BDNF mRNA ekspresyonundaki artış kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmuştur ($p < 0.05$). Uyku yoksunluğu uygulanan iki grupta da hipokampal BDNF, CAMK II ve CREB gen ekspresyonu kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Zif268 ve REST mRNA'ları kontrol grubunda uyku yoksunluğuna maruz kalan gruplara göre daha yüksek olmuştur. Tomozin mRNA'sı kontrol grubunda diğer gruplara kıyasla daha düşük bulunmuştur ($p > 0.05$).

4.3. Hipokampal miRNA Ekspresyonu Bulguları

BK, B1 ve B2 grubu hayvanların hipokampal miRNA ekspresyon analizi için total RNA havuzundan "3.6. miRNA Ekspresyon Çalışması" kısmında belirtilen işlemler uygulandı. Hipokampal miR-182, miR-219, miR-132, miR-124, miR-9 ve miR-325 ekspresyon sonuçları Şekil 4.6'daki gibi gerçekleşmiştir.



Şekil 4.6. Hipokampal miRNA Ekspresyon Sonuçları (BK; kontrol grubu, B1; son denemeden hemen sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu, B2; son denemeden 3 saat sonra 3 saat REM uyku yoksunluğu grubu)

Hipokampusta ekspresyonu çalışılan tüm miRNA'lar için B1 grubundaki azalma anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). B1 grubunda hipokampal miR-182 ve miR-132'deki düşüş BK grubuna göre anlamlıyken, miR-219, miR-124 ve miR-325 düzeyindeki azalma hem BK hem de B2 grubuna göre anlamlı olmuştur. B1 grubunda miR-9 düzeyindeki azalma ise B2 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p < 0.05$). Diğer taraftan hipokampal miR-182, miR-132, miR-124 ve miR-325 düzeyleri için kontrol grubunda yüksek uyku yoksunluğu gruplarında düşük olan bir ekspresyon

profili gözlenirken, miR-219 ve miR-9 düzeyleri için B2 grubunda daha yüksek bir profil ortaya çıkmıştır.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu bölümün ilk kısmında AK, A1 ve A2 gruplarındaki hayvanların Morris su labirent testindeki öğrenme ve bellek performansları değerlendirilmiştir. İkinci ve üçüncü kısımlarda ise BK, B1 ve B2 grubu hayvanların hipokampal mRNA ve miRNA sonuçları tartışılmıştır.

5.1. Davranış Sonuçları

Çalışmamızın bu aşamasında öğrenme sonrası spesifik zaman diliminde yapılan uyku yoksunluğunun uzamsal öğrenme ve bellek üzerine etkisi araştırıldı. Bunun için hipokampus bağımlı uzamsal bellek çalışmalarında altın standart olarak kabul edilen Morris su labirent testi seçildi (27). REM uyku yoksunluğu için, maliyeti ucuz olan ve sosyal izolasyon stresine engel olacak şekilde aynı anda çok sayıda hayvana uygulanabilmesi nedeniyle modifiye çoklu platform yöntemini kullanıldı (171).

Morris su labirent testinin ilk 4 günü boyunca yapılan öğrenme denemelerinin davranışsal analizi incelendiğinde, platformu bulana kadarki alınan yol uzunluğunun AK grubunda günler ilerledikçe azaldığı ve bu azalmanın 4. gün ilk güne kıyasla anlamlı olduğu gözlenmektedir. Her geçen gün platformu bulmak için daha az yol kat etmeleri bu gruptaki hayvanların gizli platformun yerini öğrendiklerine işaret etmektedir. Buna paralel olarak, platformu bulma süresi de denemelerin uygulandığı 4 gün boyunca giderek azalma göstermiş ve bu azalmalar ilk güne kıyasla 3. ve 4. günde anlamlı bulunmuştur. Platformu bulma süresi açısından değerlendirildiğinde, bu sonuçlar da AK grubunda öğrenmenin gerçekleştiğini işaret etmektedir. Denemelerin sonunda hemen 3 saat REM uyku yoksunluğuna maruz kalan A1 grubu hayvanlarda da hem toplam alınan süre hem de platforma ulaşma süresi açısından ilk güne kıyasla anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Bu azalmalar ilk güne nazaran 2, 3 ve 4. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak Şekil 4.2 incelendiğinde, AK ve A1 grupları için platformu bulma süresine karşılık gelen eğrilerin görece benzer olmakla birlikte A1 grubunun 3 ve 4. günlerdeki denemelerde sürenin 2. günden sonra bir miktar

artmış olduğu görülmektedir. Bu gösterge uyku yoksunluğunun bu protokolünün yol açtığı, öğrenme davranışındaki ılımlı bir bozulmayı temsil edebilir. Öğrenmeden sonraki 4-6. saatler arasında REM uyku yoksunluğuna maruz kalan A2 grubu hayvanlarda ise, hem toplam alınan yol uzunluğu hem de platforma ulaşma süresinde 2, 3 ve 4. günlerde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmektedir. Bu sonuçlar, aynı sürede ama farklı zaman dilimlerinde uygulanan REM uyku yoksunluğunun öğrenme davranışına olan negatif etkisinin farklı derecelerde ortaya çıktığına işaret etmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, REM uykusunun çeşitli labirent görevlerinin öğrenilmesine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Datta, sıçanların bir kaçınma (avoidance) görevinde eğitimi takiben REM uykusunda harcadıkları zamanın yaklaşık% 25 oranında arttığını göstermiştir (85). Dahası, etkin bir öğrenme için REM uykusunun belirli zamanlarda ortaya çıkması gerekmektedir. Smith, öğrenme için kritik olan bu REM uykusu zaman periyotlarını “paradoxical sleep windows” olarak isimlendirmiştir (172). Bu REM uyku pencerelerinin varlığı çeşitli labirent testlerinde gösterilmiştir. Örneğin, öğrenmeden hemen sonra uygulanan 4 saat REM uyku kısıtlamalarının sıçanlarda 8-kollu radyal maze ve Morris su labirent testinde uzamsal öğrenmede bozulmaya yol açtığı gösterilmiştir (86, 173). Uykunun, beynin farklı bölgeleri arasında hızlı bir ilişki kurulmasını gerektiren bazı karmaşık öğrenme türleri için önemli olduğu bilinmektedir. Uzamsal öğrenme yeteneği görme ve bağlamsal ipuçlarını ilişkilendirme gibi algılamının polimodal bilgisinin hipokampusta işlenmesini gerektiren kompleks bir süreçtir. Dolayısıyla, uyku yoksunluğuna (özellikle REM uyku yoksunluğuna) en duyarlı beyin bölgesinin öğrenme ve bellekle ilgili alan olan hipokampus olması sürpriz değildir. REM uyku yoksunluğu kemirgenlerde Morris su labirent testinin hipokampus bağımlı olmayan versiyonundaki (gizli platform yerine görülebilir platform) performansı etkilemezken, hipokampus bağımlı uzamsal görevlerin yerine getirilmesinde düşük performansla sonuçlanmıştır (86).

Morris su labirent testinde grupların 5. gündeki bellek performansları değerlendirildiğinde A2 grubunun hedef kadranda geçirilen sürenin yüzde oranının AK grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca A1 grubunun bellek performansı parametresi AK ile A2 grubu arasında bir noktaya işaret etmektedir. Bu sonuçlardan REM uyku yoksunluğunun bellekteki bozucu etkisi A2 grubunda bariz bir şekilde gözlenirken, A1 grubunda bu bozulma daha ılımlı olarak ortaya çıkmıştır.

Morris su labirent testinin öğrenme aşamasında gözlenen gruplar arasındaki performans farklılıkları, testin bellek performansı aşamasında da ortaya çıkmıştır. Uykunun birden fazla fizyolojik fonksiyona hizmet etmesi olası olsa da, güçlü deneysel kanıtlar uykunun beyin plastisitesi ve bellekle ilişkili olduğudur (82). Bununla paralel olarak, öğrenme sonrası spesifik bir zaman diliminde uyku yoksunluğuna maruz kalmanın uzun erimli bellek fonksiyonunu bozduğu çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (10, 86 174). Smith ve arkadaşları öğrenme sonrası REM uyku yoksunluğunun uzamsal bellek üzerine etkisini Morris su labirent testi aracılığıyla araştırdıkları çalışmalarında, son denemeden sonraki ilk 4 saat boyunca REM uyku yoksunluğunun bellek performansını bozduğunu göstermişlerdir (86). Diğer 4 saatlik periyotlarda yapılan REM uyku yoksunluğunda ise (5-8, 9-12, 13-16. saatler arasında) bellek performansı kontrol grubuna benzer şekilde olmuştur. Graves ve arkadaşları çoklu denemelerin yerine tek bir öğrenme denemesinin uygulandığı hipokampus bağımlı bir bellek testi olan bağlamsal korku koşullanmasında ilk 5 saatlik uyku yoksunluğunun bellekte bozulmaya yol açtığını, ikinci 5 saatlik uyku yoksunluğunun herhangi bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir (175). Palchikova ve arkadaşları bir hipokampus bağımlı uzamsal bellek testi olan yeni obje tanıma testinde öğrenme sonrası 6 saatlik uyku yoksunluğunun bellekte bozulmayla sonuçlandığını, 7-12. saatler arasındaki uyku yoksunluğunun ise bellek için olumsuz etki göstermediğini bulmuşlardır (174). Prince ve arkadaşları ise yine yeni obje tanıma testi kullanarak öğrenme sonrası ilk 3 saatlik uyku yoksunluğunun bellek konsolidasyonu açısından olumsuz bir etkisi olmadığını, fakat 1-4. saatler arasındaki 3 saatlik uyku yoksunluğunun bellek performansını olumsuz etkilediğini göstermişlerdir (10). Bu çalışmada, bellek performansı bozulmuş olan grupta hipokampal LTP'de de bir bozulma gözlenmiş ve bu sonuçla bellek konsolidasyonu ve sinaptik plastisitenin uyku yoksunluğuna benzer şekilde duyarlılık gösterdiği kabul edilmiştir. Bütün bu sonuçlar, öğrenme sonrası uykunun kritik bir zaman diliminin bellek konsolidasyonu için önemli olduğunu ve bu zaman diliminde uygulanan uyku yoksunluğunun bellekte bir bozulmaya yol açabileceğini göstermektedir. Dahası, öğrenmeden sonraki ilk 5-6 saatlik dönemin bellek konsolidasyonu açısından kritik olduğu gözlenmektedir (11, 176). Bizim çalışmamızda ise öğrenmeden hemen sonra uygulanan 3 saatlik REM uyku yoksunluğunun uzamsal bellek performansı üzerine etkisi görece az olurken, 4-6. saatler arasındaki REM uyku yoksunluğu belleği olumsuz yönde etkilemiştir. Bu sonucun ortaya çıkmasında konsolidasyon için önemli olduğu bilinen moleküler sinyal

yolaklarının uyku yoksunluğu nedeniyle bozulmuş olması etkili olmuş olabilir. Uzun erimli bellek yeni gen ekspresyonu ve protein sentezi gerektirir. Konsolidasyonda işe karışan sinyal yollarının da öğrenmeden sonraki belli dönemlerde aktive olduğu ve bunların uyku sırasında gerçekleşebileceği öngörülmektedir (21). Örneğin uzun erimli bellekte bozulmaya yol açtığı bilinen bir protein sentez inhibitörü Anizomisin'in konsolidasyon için kritik olan REM uyku penceresi sırasında uygulanması bellekte bozulmayla sonuçlanmıştır (177). Dahası, konsolidasyon periyodu boyunca ortaya çıkan protein sentez süreci ve bu süreçte kritik rol oynayan bir kinaz PKA iki dalgalanma aktivitesi gösterir: öğrenmeden hemen sonra ve 4 saat sonra (178). Buna paralel olarak, LTP'nin erken fazı olarak kabul edilen E-LTP'nin indüksiyondan sonra 1-2 saat sürdüğü ve bu aşamada gen ekspresyonu ve protein sentezinin olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca ilk protein sentez aktivitesinin LTP indüksiyonunu takiben 2 saat sonra ortaya çıktığı bilinmektedir (104). Yine, bellek için önemli olduğu bilinen ikincil haberci cAMP'nin konsolidasyon süreci boyunca 3 pik düzeyi bulunmuştur: 0,5, 3 ve 6. saatler (179). Dolayısıyla, REM uyku yoksunluğunun zamansal olarak iki farklı paradigmasının konsolidasyon aşamasındaki protein sentez süreci ve ilgili sinyal yollarıyla çakışma derecesinin farklı olması, bizim çalışmamızdaki A1 ve A2 gruplarında neden farklı bellek performanslarının ortaya çıktığını açıklayabilir. Görüldüğü kadarıyla bellek konsolidasyonunda yer alan moleküler ve biyokimyasal süreçlerin ana komponentleri 3. saatten itibaren devreye girmektedir, bu yüzden ilk birkaç saatte ortaya çıkan hücreyel olaylar bellek açısından görece daha az önemli olabilir. Öte yandan, bellek için kritik olduğu varsayılan REM uyku zaman penceresinin çalışmada kullanılan hayvanın ırkıyla veya uygulanan bellek testinin kompleksliğiyle değişebileceği ön görülmüştür (86). Gerçekten de, REM uyku yoksunluğunun bellekte oluşturduğu bozulmanın derecesi kullanılan testin komplekslik derecesiyle ilişkilidir; öyle ki, basit testler (örneğin pasif kaçınma) REM uyku yoksunluğundan daha az etkilenirken, enstrümantal koşullanma gibi daha karmaşık testler yoksunluğa daha çok duyarlıdır (21). Dolayısıyla bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, Balb/c türü farelerin Morris su labirent testindeki öğrenme ve bellek için kritik olduğu düşünülen spesifik REM uyku penceresini yansıtır olabilir.

Öte yandan beklenmedik bir sonuç olarak, A2 grubundaki hayvanların ortalama yüzme hızları diğer gruptakilere kıyasla yüksek bulunmuştur. Morris su labirent testi açısından

yüzme hızı, deneklerin motor aktivitesini yansıtan bir parametre olarak kabul edilmektedir ve bu ölçümün normal koşullarda tüm hayvanlarda birbirine yakın değerlerde olması beklenmektedir. Deney sırasında tüm gruplar için aynı koşullar sağlanmış olmasına rağmen, A2 grubunda gözlenen ortalama hızdaki artış bu gruba spesifik olarak artmış bir stres yanıtının sonucu olabilir. Aslında uyku yoksunluğunun kendisinin yanı sıra bu amaçla kullanılan modellerin yol açtığı stres koşullarının bellek performansındaki bozulmaya katkı sağlayabileceği fikri, bu alanda sürekli var olan bir tartışma konusudur. Özellikle kısa uyku yoksunluğu paradigmalarından sonra gözlenen bellek kusurlarında stres faktörünün ön planda olduğu ileri sürülmektedir (176). Bununla birlikte stres sinyal yolları aktivasyonlarının geçici ya da kalıcı olarak ortadan kaldırıldığı çalışmalarda, araştırmacılar stres yanıtından bağımsız olarak uyku yoksunluğunun kendisinin kognitif bozukluklardan sorumlu olduğunu göstermişlerdir (180, 181). Bunun yanında, kısa süreli uyku yoksunluğu sırasında gözlenen plazma kortikosteron artışlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadığı rapor edilmiştir (117). Dahası ılımlı stresör bir faktör olarak kısa süreli uyku yoksunluğunun, glukkokortikoid düzeyinde hafif artışla birlikte bellek ve plastisite oluşumunu bozmaktan ziyade teşvik ettiği ileri sürülmektedir (182). Sonuç olarak, A2 grubundaki muhtemel stres kaynaklı ortalama yüzme hızı artışının bu grupta gözlenen öğrenme ve bellek performansındaki bozulmadan sorumlu olmadığı düşünülmektedir.

Özetle, çalışmamızda öğrenme sonrasında 3 saatlik bir zaman aralığından sonra yapılan 3 saatlik REM uyku yoksunluğunun Morris su labirent testinde öğrenme ve bellek fonksiyonunu bozduğu görülmüştür. Öğrenme aşamasında son denemeden hemen sonra yapılan 3 saatlik REM uyku yoksunluğunda ise öğrenme ve bellek fonksiyonlarının kontrol grubunununkine görece benzer olduğu gözlemlenmiştir. Uykunun REM dönemi yeni anıların pekiştirilmesine olanak sağlayacak şekilde, belli bir zaman diliminde beynin dış çevreden gelen uyarılara kapatıldığı elektriksel olarak görece “yalıtkan” bir periyodu temsil edebilir. Sonuç olarak, öğrenme sonrası uyku bellek konsolidasyonu için önemlidir ve REM uykusu hipokampal fonksiyonun önemli bir modülatörü olarak gözükmektedir.

5.2. Hipokampal Gen Ekspresyon Sonuçları

Beyinde gen ekspresyonu uyku ve uyanıklık boyunca dinamik olarak regüle edilmektedir. Ayrıca, sinaptik plastisitede rolü olan bazı genlerin uyku ve uyanıklık

durumundan etkilendiği iyi bilinmektedir. (104). Öğrenme, uyku ve uyku yoksunluğu olgularının her biri gen ekspresyonunu farklı şekilde regüle edebilen aktivite bağımlı süreçlerdir. Çalışmamızda Morris su labirent testi kullanarak öğrenme sonrası farklı dönemlerdeki 3 saatlik REM uyku yoksunluğunun hipokampusta öğrenme ve bellekle ilişkisi olan bazı genlerin ekspresyonuna etkisini araştırdık. Bunun için, “Öğrenme sonrası uyku yoksunluğu ve moleküler analiz” aşamasında yer alan tüm gruplardaki hayvanların hipokampusları çıkarılarak altı farklı genin mRNA ekspresyonu analiz edildi. Bu genler bellek konsolidasyonunda rolleri iyi bilinen ve uyku yoksunluğu çalışmalarında yer alan BDNF, CAMK II, CREB ve Zif268 ile öğrenme ve bellek fonksiyonunda rolü olduğu düşünülen ve şimdiye kadar uyku yoksunluğu çalışmalarında yer almamış REST ve Tomozin’dir.

BDNF öğrenme-bağımlı yapısal plastisitede önemli rolleri olan bir nörotrofindir. BDNF aksonal ve dendritik dallanmanın düzenlenmesi, sinaptogenez ve sinaptik bağlantıların sağ kalımında yer alır (54, 183). Spesifik olarak, BDNF’nin Morris su labirent testinde uzamsal bellek fonksiyonunda da rolü olduğu ortaya konulmuştur. Kesslak ve arkadaşları hipokampusta BDNF mRNA’sının Morris su labirent testinin 1. günün sonunda değişmediğini, 3. ve 6. günün sonunda upregüle olduğunu göstermişlerdir (51). Çalışmamızda hipokampal BDNF mRNA’sının BK grubuna kıyasla B1 ve B2 gruplarında artmış olduğu ve bu artışın B2 grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Uyku yoksunluğunun farklı beyin bölgelerindeki BDNF düzeylerine olan etkisiyle ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Taishi ve arkadaşları 8 saatlik total uyku yoksunluğunun hipokampusta BDNF mRNA düzeyini değiştirmedeğini, ama serebral kortekste azalttığını bulmuşlardır (113). Sei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıçanların bellerine dokunularak yapılan 6 saatlik REM uyku yoksunluğu hipokampusta BDNF protein düzeyinde bir değişikliğe yol açmazken, serebellumda bir azalmayla sonuçlanmıştır (184). Guzman-Marin ve arkadaşları 8 saatlik ve 48 saatlik uyku yoksunluğunun sıçan hipokampusunda BDNF mRNA ve protein düzeylerini azalttığını göstermişlerdir (115). Fujihara ve arkadaşları ise sıçanların sırtlarına vurularak yapılan 1-2 saatlik uyku yoksunluğunun hipokampal BDNF mRNA ve protein seviyelerini artırdığını bulmuşlardır (114). Conti ve arkadaşları gen çip teknolojisi ve in-situ hibridizasyon metodu kullanarak uyku yoksunluğunun beyinde BDNF ekspresyonuna etkisini araştırdıkları çalışmalarında,

BDNF mRNA'sının hipokampus ve piriform kortekste artmış olduğunu göstermişlerdir (116). Bütün bu çalışmalardan elde edilen sonuçların farklı çıkması metodolojideki farklılığın sonucu olabilir. Öyle ki, BDNF ekspresyonu çalışılan beyin bölgelerinin ve hayvanların maruz bırakıldığı uyku yoksunluğu protokollerinin farklı olmasının sonuçları etkilemesi mümkündür. Uyku yoksunluğuna transkripsiyon ve sinyalizasyon düzeyindeki duyarlılığın beyin bölgeleri arasında aynı olmadığı düşünülmektedir (104). Çalışmalarda kullanılan hayvanların yaşlarının ve ekspresyon analizi yapılan metodun farklı olması da çelişkili sonuçların ortaya çıkmasına katkı sağlamış olabilir. Ayrıca farklı uyku yoksunluğu metotlarının ve sürelerinin farklı derecede stresör potansiyellere sahip olduğu ve öğrenme-bellek üzerine etkilerinin aynı derecede olmayacağı da açıktır. Bu durum sinaptik plastisiteyle ilgili önemli bir molekül olan BDNF'nin hipokampustaki ekspresyonunda elde edilen farklı sonuçları açıklayabilir. Öte yandan sinaptik homeostazis hipotezine göre, uyku yoksunluğunun uzamış sürelerinin artmış sinaptik güçle birlikte, sinaptik plastisiteyle ilgili gen ekspresyonunun artmış düzeyleriyle de ilişkili olduğu bilinmektedir (103). Çalışmamızda, uyku yoksunluğuna maruz kalan B1 ve B2 gruplarında BK grubuna kıyasla hipokampusta daha yüksek BDNF ekspresyonunun bulunması, sinaptik homeostazis hipoteziyle tutarlıdır ve uykunun aşırı plastik değişimleri sınırlayarak bellek için kararlı bir iç çevre sağlama rolüne işaret etmektedir. Ayrıca, B2 grubunda BDNF ekspresyonunun B1 grubundan daha fazla olması, uyku yoksunluğu süresinin yanında “zamanlamasının” da nöronal plastisiteyle ilişkili moleküler araçların düzeylerini belirleme açısından önemli bir faktör olduğu fikrini uyandırmaktadır. Diğer taraftan, plastisite ilişkili gen ekspresyonu up regülasyonunun bellek fonksiyonlarında bir düzelmeye pozitif korelasyon göstermek yerine, tersine, bozulmuş bellek performansı ile birlikte ortaya çıkması şaşırtıcı gibi görünmektedir. Ancak, bedendeki tüm biyolojik süreçlerin gerçekleştirilmesinde herhangi bir molekül için belirlenmiş normal fizyolojik sınırlar söz konusudur ve bu dar aralığın dışındaki suprafizyolojik değerler fonksiyonel olarak yıkıcı olabilir. Bu durum, öğrenme ve bellek gibi çok sayıda sinyal yollarının katılımını ve düzinelerce yeni molekülün sentezlenmesini gerektiren bir biyolojik fonksiyon için de geçerli olabilir. Örneğin aşırı BDNF ve uzamsal bellek ilişkisiyle ilgili olarak, Croll ve arkadaşları BDNF overekspresyonunun hipokampal CA1 LTP'sinde ve pasif kaçınma testi performansında önemli bir bozulmayla sonuçlandığını göstermişlerdir (119). Benzer şekilde, BDNF aşırı miktarlarının 8-kollu radyal maze ve

Morris su labirent testi gibi uzamsal öğrenme ve bellek görevlerinde de bozulmaya yol açtığı gösterilmiştir (185). Her ne kadar bizim çalışmamızdaki uyku yoksunluğunun yol açtığı yüksek hipokampal BDNF seviyeleri, bu overekspresyon çalışmalarındaki ekstrem düzeylerden uzak olsa da, en azından kısmen, öğrenmenin tetiklediği fizyolojik artış miktarlarının üzerindeki değerlerle uyku yoksunluğunun yol açtığı bozulmuş bellek davranışını açıklamada bir bakış açısı sunabilir.

CAMK II beyinde zengin miktarda bulunan ve PSD'de yüksek konsantrasyonda yer alan önemli bir hücre içi Ca^{+2} dedektörüdür. CaMK II mRNA'sı dendritlerin aktif bölgelerinde birikmiş haldedir ve bunların translasyonları sinaptik aktivite tarafından düzenlenir (186). Hipokampal CA1 bölgesindeki LTP'nin indüksiyonunun CAMK II sentezinde hızlı bir artışa yol açtığı ve LTP'nin geç fazının lokal CAMK II protein sentezi gerektirdiği gösterilmiştir (187, 188). Tan ve arkadaşları Morris su labirent testi denemelerinin hipokampusta CAMK II aktivasyonunu indüklediğini ve bellek performansının CAMK II aktivite düzeyleriyle pozitif olarak korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır (189). Uyku yoksunluğunun CAMK II ekspresyonuna etkisiyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Guzman-Marin ve arkadaşları 8 ve 48 saatlik uyku yoksunluğunun hipokampusta CAMK II mRNA düzeyinde azalmayla sonuçlandığını göstermişlerdir (115). Alhaider ve arkadaşları 24 saatlik uyku yoksunluğunun E-LTP sırasında P-CAMK II (fosforile CAMK II) ekspresyonunda azalmaya yol açtığını bulmuşlardır (190). Terao ve arkadaşları 6 saatlik uyku yoksunluğunun sıçan serebral korteks ve bazal ön beyinde CAMK II mRNA'sında up regülasyona yol açtığını göstermişlerdir (191). Bizim çalışmamızda ise 3 saatlik uyku yoksunluğu BK grubuna göre B2 grubunda daha yüksek olacak şekilde, her iki uyku yoksunluğu grubunda da bir miktar artışa yol açmıştır. Bu farklı sonuçların ortaya çıkmasındaki belirleyici faktör uyku yoksunluğu sürelerindeki farklılıklar olabilir. Daha uzun süreli uyku yoksunluğu paradigmaları plastisitede kritik bir sinyal proteini olan CAMK II'nin bellekle ilgili beyin bölgelerindeki ekspresyonunu azaltma yönünde etki gösterirken, görece daha kısa uyku yoksunlukları ise artırma yönünde eğilim gösteriyor olabilir. Öyle ki, uyku yoksunluğunun süre açısından beyin tarafından tolere edilebilir bir üst sınırı varsa, görece kısa uyku yoksunluğu paradigmalarının plastisiteyle ilişkili bazı molekülleri up regüle etmesi, bellek bozukluklarını azaltma yönünde kompensatuar bir mekanizmayı temsil ediyor olabilir.

CREB bellek oluşumun sürecinde yer alan önemli bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir. Bir deniz omurgasız olan *Aplysia* ve fareler üzerinde yapılan çalışmalar uzun erimli bellek oluşumunda CREB-bağımlı gen ekspresyonunun önemini ve bu yolağın türler boyunca korunmuş olduğunu ortaya koymuştur (192, 193). Davranışsal bir deneyimde olduğu gibi, CREB'in ekstraselüler bir uyarandan aktivasyonu sinapslardaki yapısal ve fonksiyonel değişimleri stabilize eden proteinlerin ekspresyonuna yol açmaktadır. Ulloor ve arkadaşları öğrenmeden sonra hipokampusta fosforile-CREB (p-CREB) düzeylerinin arttığını rapor etmişlerdir (194). Öğrenme hücre içinde Ca^{+2} düzeyinde geçici bir artışı ve Adenil siklaz aktivasyonunu indükleyerek, sırasıyla, CAMK II ve cAMP ikincil haberci molekülün aktive olmasına yol açar. cAMP'nin downstream hedefleri arasında PKA da bulunur ki, bu kinazın CAMK II ile birlikte aktivasyonu CREB'in fosforilasyonu ve sonuçta plastisiteyle ilişkili gen ürünlerinin ekspresyonuyla sonuçlanır (11). Uyku yoksunluğunun hipokampal cAMP-PKA sinyal yolağını bozarak CREB'in fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (195). Bunun yanında, Vecsey ve arkadaşları uyku yoksunluğunun hipokampal cAMP'yi yıkan bir enzim olan fosfodiesteraz 4'ün aktivitesini artırdığını ve bu enzimin inaktivasyonunun uyku yoksunluğunun yol açtığı hipokampal-bağımlı bellek konsolidasyonundaki bozulmayı geri çevirdiğini rapor etmişlerdir (88). Guzman-Marin ve arkadaşları 8 ve 48 saatlik uyku yoksunluğunun hipokampusta CREB mRNA'sını azalttığını bulmuşlardır (115). Alhaider ve arkadaşları da 24 saatlik uyku yoksunluğunun CA1 ve DG'de CREB protein düzeylerinde azalmaya yol açtığını göstermişlerdir (196). Bununla birlikte, Cirelli ve Tononi 3 saatlik uyku yoksunluğunun serebral kortekste p-CREB düzeyinde önemli bir artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir (111). Bizim çalışmamızda ise BDNF ve CAMK II'de olduğu gibi, uyku yoksunlukları B1 ve B2 gruplarında hipokampal CREB mRNA düzeylerinde BK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışlara yol açmıştır ve bu artış B2 grubunda daha fazla olmuştur. Dolayısıyla bu çalışmada diğer iki molekül için yukarıda ifade edilen hipotetik yaklaşımlar CREB için de geçerlidir. Örneğin Bourtchouladze ve arkadaşları transgenik olarak fare hipokampusunda cAMP-PKA yolağının aşırı aktivasyonlarının uzamsal bellek performansını bozduğunu ve bellek oluşumu için bu sinyal yolağının optimal aralıkta olması gerektiğini göstermişlerdir (197). Pineda ve arkadaşları da hipokampusta Adenil siklaz aktivitesinin $G_{i\alpha 1}$ - reseptör aracılı tonik inhibisyonunun bellek için kritik olduğunu ve bu reseptör fonksiyonunun bloke

edilmesinin hipokampus bağımlı bellek oluşumunu bozduğunu rapor etmişlerdir (198). Bununla paralel olarak, Viosca ve arkadaşları hipokampusta CREB aktivitesinin kronik artışının Morris su labirent testinde öğrenme ve bellek fonksiyonunu bozduğunu göstermişlerdir (199).

Zif268 hipokampus ve neokortekste yüksek derecede eksprese olan ve çeşitli hücrel fonksiyonlara sahip çok sayıda genin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Bellek konsolidasyonunun de novo protein sentezi gerektiren aşaması CREB aktivasyonu ile birlikte Zif268 ekspresyonunu da gerektirir (104). Zif268 up regülasyonu birçok öğrenme-bellek paradigmasında ve farklı beyin bölgelerinde rapor edilmiştir. Makak temporal korteksinde görsel eşleştirilmiş-ilişkili öğrenme görevinde (200), sıçan hipokampusunda aktif kaçınma öğrenme denemelerinden sonra (201), sıçanlarda bağlamsal korku koşullanmasından sonra hipokampus ve amigdalada Zif268 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (202). Jones ve arkadaşları Zif268 ekspresyonunun uzun erimli bellek konsolidasyonunda uzamsal navigasyona spesifik olduğunu göstermişlerdir (203). Hipokampal CA1'de LTP indüksiyonunu takiben Zif268'in up regüle olduğunu gösterilmesiyle bu molekülün hipokampal sinaptik plastisitedeki rolü pekiştirilmiştir (204). Riberio ve arkadaşları uyanıkken çevresel zenginleştirme paradigmasına maruz kalan sıçanların öğrenme sonrası REM uykusu sırasında Zif268'in up regüle olduğunu göstermişlerdir (205). Buna paralel olarak, DG'ta LTP indüksiyonundan sonra da REM uykusu sırasında bazı kortikal bölgelerde (entorhinal, somatosensöryel, frontal korteks) Zif268'in artmış ekspresyonu gözlenmiştir (206). Aynı çalışmada, REM uykusu başlamadan önce hipokampusun tetrakain ile indüklenen inaktivasyonunun bu kortikal bölgelerde Zif268'in up regülasyonunu bloke ettiği de gösterilmiştir. Bu sonuç bellek konsolidasyon sürecinde kortekste gen ifadesinin hipokampusun kontrolü altında olabileceği ihtimalini ortaya çıkarmıştır (25). Terao ve arkadaşları farelerde 6 saat uyku yoksunluğunun ardından 4 saatlik bir dinlenme periyodunun serebral korteks ve bazal ön beyinde Zif268 mRNA düzeylerinin up regülasyonuna yol açtığını göstermişlerdir (207). Ravassard ve arkadaşları ise 4 saatlik REM uyku yoksunluğunun sıçanlarda bağlamsal korku koşullanma konsolidasyonunu bozduğunu ve dorsal hipokampal CA1 bölgesinde Zif268 ekspresyonunu azalttığını rapor etmişlerdir (208). Bizim çalışmamızda da buna paralel olarak, hipokampal Zif268 ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre REM uykusu yoksunluğuna maruz grupta

benzer olarak daha düşük bulunmuştur. Çalışmamızdaki 3 saatlik uyku yoksunluğu diğer çalışmalarda uygulanan uyku yoksunluğu sürelerine kıyasla, oldukça ılımlı bir uyku bozukluğu modelini yansıtmaktadır. Marks ve Wayner platform metodu kullanarak 3, 6 ve 9 saatlik REM uyku yoksunluğunun hemen ardından aldıkları DG LTP kayıtlarından, yoksunluğun hipokampal sinaptik plastisiteyi “zaman-bağımlı” bir şekilde bozduğunu göstermişlerdir (209). Dolayısıyla uyku yoksunluğunun daha yüksek süreleri gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar çıkmasına katkı sağlıyor olabilir.

REST, nöron-spesifik genlerin yüzlercesini regüle ettiği düşünülen bir çinko parmak transkripsiyon faktörüdür. REST'in yetişkin hipokampal granüler ve piramidal nöronlarda yüksek derecede ekspresyon profili sergilediği bulunmuştur (210). Ayrıca yetişkin postmitotik nöronların iskemiye ve nöbete yanıt olarak hipokampusta REST'i up regüle ettiği gösterilmiştir (211, 212). Önceleri REST'in bu up regülasyonunun nöronlar için zararlı olduğu düşünülse de, yeni çalışmalar hipokampustaki olgun nöronlarda REST'in indüklenmesinin eksitabilitenin inhibitör homeostatik kontrolünde rol olan koruyucu bir mekanizma olduğunu ortaya koymuştur. Lu ve arkadaşları REST'in yaşlı insan beyinde stres direnci ile ilişkili bir gen ağını düzenlemek üzere indüklendiğini göstermişlerdir (75). Bilişsel yetenekleri bozulmamış bu yaşlı insanlarda, artmış REST düzeylerinin hipokampus, prefrontal korteks gibi Alzheimer hastalığına karşı savunmasız beyin bölgelerinde gözlenmiştir. Dolayısıyla REST nöronları oksidatif stresten ve ameloid β -protein toksisitesinden koruyan ve yetişkin beyinde normal fizyolojik koşullarda bulunması gereken bir molekül gibi gözükmektedir. Çalışmamızda hipokampal REST ekspresyonunun her iki uyku yoksunluğu gruplarında kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Uyku yoksunluğu beyinin bu koruma yanıtını bozacak şekilde hipokampusta REST'i down regüle eden bir sonuca zemin hazırlıyor olabilir. Ayrıca bu sonuç, uykusuzluğun beyinin fizyolojik meydan okumalara karşı adaptif yanıt verme esnekliğini azaltan bir durum olduğu görüşüne katkı sağlayabilir. Öyle ki, Alzheimer, otizm, inme gibi nörolojik rahatsızlıklarının ve beyin hasarlarının rehabilitasyon sürecinde uyku bozukluklarının düzeltilmesi önemli bir hedef olarak kabul edilmektedir (213).

Tomozin, SNARE kompleksi oluşumunu engelleyerek nörotransmitter içeren veziküllerin salınımını negatif olarak etkileyen bir presinaptik proteindir. Bu yolla

Tomozin, sinaptik yarığa dökülecek vezikül havuzunun boyutunu kontrol ederek sinaptik iletimi modüle edebilir. İlginç olarak Tomozin-SNARE kompleksi arasındaki etkileşim, sinaptik plastisitedeki pozitif rolü iyi bilinen PKA tarafından Tomozin'in fosforilasyonu ile düzenlenmektedir (214). Tomozinin davranışsal plastisitedeki rolünü araştıran bir çalışmada, hipokampal Tomozin'in overekspresyonu Morris su labirent testinde öğrenme ve bellek performansında bozulmayla sonuçlanmıştır (77). Yine bu çalışmada Mossy fiber-CA3 sinapslarındaki elektrofizyolojik kayıtlar, Tomozin overekspresyonunun hipokampal sinaptik plastisiteyi negatif olarak etkilediğini göstermiştir. Bu sonuçlar hipokampal Tomozin ekspresyon paternini değiştirebilecek durumların potansiyel olarak sinaptik etkinliği ve plastisiteyi etkileyebileceğine işaret etmektedir. Literatürde uyku yoksunluğunun Tomozin ekspresyonuna etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda uyku yoksunluğuna maruz kalan B1 ve B2 gruplarının hipokampal Tomozin ekspresyonunda BK grubuna kıyasla daha yüksek bir ekspresyon profili sergiledikleri gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da, bu artışlar B2 grubunda daha yüksek bulunmuştur. Sonuçta uyku yoksunluğunun 3 saatlik süresinin bile, hipokampusta Tomozin ekspresyonunu değiştirebildiği görülmüştür. Dolayısıyla öğrenme sonrası uyku yoksunluğunun bellek performansına negatif etkisinin ortaya çıkmasında, sinaptik iletiyi negatif olarak regüle eden bir presinaptik protein olan Tomozinin de katkısı olabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, öğrenme sonrası uyku yoksunluğunun hipokampusta bazı genlerin ekspresyonunu up regüle ettiğini göstermektedir. Sinaptik homeostazis hipotezine göre uyanık dönemde deneyimlerin yol açtığı sinaptik güçlenme ve ağırlık artışı uyku sırasında (özellikle NREM) “aşağı çekilerek” dengelenir. Buna göre uyku yoksunluğunun yol açtığı uzamış uyanıklık plastisite-ilişkili sinyal molekülerinin up regülasyonu ile sonuçlanır (103). Diğer taraftan aktif sistem hipotezine göre de, NREM sırasında sinaptik replay ve REM uykusu sırasında ise IEG'lerin transkripsiyonu bellek konsolidasyonuna katkı sağlar (104). Bizim çalışmamızda, her ne kadar modifiye çoklu platform metodu kullanılarak öğrenme sonrası REM uyku yoksunluğunun bellek konsolidasyonuna etkisini araştırmak amaçlanmış olsa da, bu metodun aynı zamanda NREM uykusunda da bir miktar kayba yol açmış olması söz konusudur. Öyle ki, modifiye çoklu platform metodu ile yapılan uyku yoksunluğunun kemirgenlerde REM uykusunun % 95'ini suprese

ettiği, NREM’de de % 40’a varan oranlarda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (216). Dolayısıyla çalışmamızda uygulanan 3 saatlik uyku yoksunluğu paradigması, REM uykusunun neredeyse tamamen elimine edildiği ve NREM uykunun da yaklaşık olarak yarısının ortadan kaldırıldığı görece total uyku yoksunluğuna benzer bir nitelik taşımaktadır. Çalışmamızdaki hipokampal gen ekspresyonu sonuçları bu açıdan değerlendirildiğinde, uyku yoksunluğunun BDNF, CAMK II ve CREB mRNA’larında bir miktar up regülasyona yol açması, yoksunluğun NREM uykuda yol açtığı kayıpla ilişkili olabilir. Bu noktadan bakıldığında çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, önceki çalışmalarda ortaya çıkan uyku yoksunluğu paradigmalarının hipokampusta ve bellekle ilişkili diğer beyin bölgelerinde gen ekspresyonlarında up regülasyonla sonuçlanmasıyla paralel gözükmektedir. Ancak bizim çalışmamızda, uyku yoksunluğunun 3 saat gibi görece kısa bir periyotta uygulanması ve bu süre zarfında NREM uykusunun daha az etkilenmiş olması hipokampal gen ekspresyonundaki up regülasyonu sınırlayarak, B2 grubunda BDNF geni hariç CAMK II ve CREB mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışlara yol açmıştır.

5.3. Hipokampal miRNA Ekspresyon Sonuçları

Hipokampusta yeni anıların kalıcı hale getirilmesi “de novo” protein sentezi gerektirir. Yapısal ve fonksiyonel plastisite için temel olan bu süreçte yer alan miRNA’lar, öğrenme ve bellek gibi hipokampus bağımlı fonksiyonları regüle edebilirler (217). Gen ekspresyonunda olduğu gibi, miRNA transkripsiyonu da nöronal aktivite ile düzenlenir ve böylece öğrenme, uyku, uyku yoksunluğu gibi farklı aktivite bağımlı süreçler tarafından etkilenebilir (14, 167). Çalışmamızda Morris su labirent testinde öğrenme denemelerine ve ardından uyku yoksunluğuna maruz kalmış hayvanların hipokampuslarında miR-132, miR-124, miR-9, miR-182, miR-219 ve miR-325’in ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Bu miRNA’lar beyinde yüksek derecede eksprese edilmeleri, öğrenme ve bellek çalışmalarında yoğun olarak yer almaları ve çalışmamızda kullanılan genlerle ilişkili olmaları nedeniyle tercih edilmiştir.

miR-132 sinaptik plastisiteyi ve nöronal morfolojiyi değiştirebilme özellikleriyle öğrenme ve bellek çalışmalarında en çok çalışılan miRNA olmuştur (42). Nöronal aktivite ve nörotrofinler tarafından ekspresyonu indüklenen miR-132, dendritik protein sentezini düzenleyerek öğrenme ve bellekte önemli rol oynamaktadır (16). Çalışmamızda hipokampal miR-132 gen ekspresyonunun B1 grubunda BK grubuna

kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu görüldü. miR-132 düzeyleri Morris su labirent testi öğrenme denemeleri uygulanan BK grubunda en yüksek düzeydeyken, öğrenme sonrası uyku yoksunluğuna maruz kalan iki grupta da daha düşük olarak gözlemlendi. miR-132'nin öğrenme tarafından indüklenmesiyle ilgili olarak, hipokampal miR-132 düzeylerinin bağlamsal- ve trace (iz) korku koşullanmasında arttığı gösterilmiştir (218, 219). Wang ve arkadaşları, in-vivo olarak hipokampal miR-132'nin virüs-aracılı inhibisyonunun bilginin depolanmasında geçici bir bozulmaya yol açtığını göstermişlerdir. Benzer şekilde miR-132'nin uzamsal bellek oluşumundaki rolüyle ilişkili olarak, yeni obje tanıma ve Barnes maze gibi hipokampus bağımlı davranışsal testlerde de hipokampal miR-132 düzeylerinde bir artış olduğu gözlemlenmiştir (140, 144). Hansen ve arkadaşları, bu çalışmalarında miR-132'nin normal fizyolojik değerlerinin üzerindeki yüksek düzeylerinin her iki testte de bellek performansında bozulmaya yol açtığını rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar, hipokampal miR-132'nin suprafizyolojik değerlerinin indüklediği aşırı dendritik diken oluşumunun nöron fonksiyonu açısından sınırlayıcı bir durum olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (144). Öğrenme-bellekte rol alan genlerin overekspresyonunun yol açtığı bozulmuş bellek performansına analog olarak, miR-132'nin fizyolojik olmayan aşırı miktarlarının da hafızayı negatif olarak etkilediği gözlemlenmiştir. Diğer taraftan Magill ve arkadaşları, miR-132 nakavtının fare hipokampal nöronlarında dendritik dallanmada ve diken yoğunluğunda azalmaya yol açtığını göstermişlerdir (220). Sonuç olarak, miR-132 düzeyinin normal fizyolojik aralığı dışındaki artışı ve azalışı, muhtemelen farklı mekanizmalar aracılığıyla öğrenme ve bellekte benzer şekilde bozulmalarla sonuçlanmaktadır. Öğrenme-bellek ve miRNA ilişkisiyle ilgili zengin bir literatürün aksine, uyku ve uyku yoksunluğunun beyin miRNA düzeylerine etkisi hakkında çok az çalışma mevcuttur. Davis ve arkadaşları, sıçanlarda 8 saat total uyku yoksunluğunu takiben hipokampus, hipotalamus, prefrontal ve somatoduysal kortekste yaklaşık 50 miRNA'nın uyku kaybından etkilendiğini ortaya koymuşlardır (167). Bu miRNA'ların up- ya da down regüle olmasındaki değişimin yönü incelenen beyin bölgesine göre değişmiştir. Örneğin 49 miRNA hipokampusta up regüle olurken, bunların prefrontal kortekste 19'u down- ve 2'si up regüle olmuştur. Bu çalışmada miR-132'nin uyku yoksunluğundan sonra bellek ile ilişkili iki beyin bölgesi olan hipokampusta up regüle ve prefrontal kortekste down regüle olması, yapıya özel bellek fonksiyonuna (kısa erimli ve uzun erimli bellek) atfedilmiştir. Bizim çalışmamızda, tersine, 3 saatlik REM uyku yoksunluğu sonunda hipokampal miR-132

düzeyleri BK grubunda daha yüksek, uyku yoksunluğu gruplarında ise B1’de anlamlı olmak üzere daha düşük bulunmuştur. Bu farklılık uyku yoksunluğu sürelerinin ve bozulan uyku aşaması içeriklerinin (REM ya da NREM) farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Bunun yanında çalışmamızdaki deneysel protokol, öğrenme sonrası uyku yoksunluğunun hipokampal miRNA düzeylerine etkisini belirlemek üzere kurgulanmış olduğundan, hipokampus bağımlı bir öğrenme testine maruz kaldıktan sonra uyku yoksunluğu uygulanan farelerde miRNA regülasyonunun farklı şekilde etkilenmiş olması da muhtemeldir. Kompleks bir görevi öğrenmeye maruz kalmış bir hipokampus açısından sonraki uyku dönemi, hem aktive olan moleküler ve biyokimyasal yollar açısından hem de NREM deki replay, yavaş dalga gibi spesifik elektriksel aktivitelerin varlığı nedeniyle nöronlar için oldukça farklı bir fizyolojik ortam oluşturur. Dolayısıyla öğrenme sonrası uyku yoksunluğuyla sıradan bir uyku yoksunluğu paradigmasının hipokampal miRNA ekspresyonuna etkisi benzer şekilde sonuçlanmayabilir. Saab ve Mansuy’un önerdiği gibi, yeni anılar öğrenmeyi izleyen dönemde bir nöron grubunda kodlanmış, biyokimyasal ve epigenetik olarak desteklenen spesifik elektriksel formlar olarak bulunabilirler (30). Bu elektriksel formların, “memory engram (bellek izleri)” olarak bir grup nöronda anıların fiziksel bir işareti olarak temsil edildiği düşünülmektedir. Buna göre, bir elektriksel “memory engram”ın bozulmadan varlığını sürdürmesi bir nöronun başka bir nöronu aktive edebileceği asenkronize ateşleme aktivitelerinin var olduğu koşulları gerektirir. Dolayısıyla NREM uykudaki senkronize yavaş dalgalar bellek engramları için yıkıcı olabilir ve kalıcı nöral kodlar epigenetik olayların ve biyokimyasal değişikliklerin varlığıyla uyku sırasında “silinmekten” kurtulabilirler. Bu yaklaşım uykunun sinaptik down scaling hipotezi ile epigenetik mekanizmalar arasında bir köprü kurarak, uyku-bellek ilişkisini belirleme açısından yeni bir bakış açısı sağlayabilir. Bu modele göre, hipokampal miR-132’nin uyku yoksunluğuna maruz kalmayan BK grubunda yüksek, uyku yoksunluğuna maruz kalmış gruplarda da düşük olması mümkündür. Bellek için pozitif bir modülatör olarak hipokampal miR-132, öğrenilmiş yeni anıları uyku sırasında “sinaptik budanma” dan koruyan bir mekanizmanın parçası olabilir. Hipokampal miR-132’nin B2 grubunda B1’e göre yüksek olmasının altında, B2 grubu hayvanların öğrenme traillerinden sonra 3 saat kafeslerinde bekletilmeleri ve bu sürenin bir kısmının uykuda geçmiş olması yatabilir. Ayrıca uyku aşamaları karakteristikleri bakımından, B1 grubunda hayvanların öğrenme sonrası dönemde daha az NREM uyku periyoduna maruz kalmış olması da

miR-132 düzeylerinin düşük kalmasına katkı sağlamış olabilir. Yine bu modele göre, NREM uykusuna kıyasla daha desenkronize elektriksel beyin aktivitesinin görüldüğü REM uykusu bellek izleri için koruyucu olan bir dönemi temsil edebilir.

miR-124 hipokampusta en fazla eksprese edilen ve yüzlerce geni regüle eden miRNA'lerden biridir (221). Ayrıca bellek fonksiyonunda rolü olduğu ilk kez gösterilen *Aplysia*'da da en fazla bulunan nöron-spesifik miRNA'dır (222). *Aplysia*'da miR-124'ün CREB'i suprese ederek serotoninin indüklediği sinaptik kolaylaştırmayı sınırladığı gösterilmiştir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş bir antagomir ile miR-124'ün inhibisyonu ise tersi etki göstererek sinaptik kolaylaştırmayı düzeltmiştir. Yang ve arkadaşları miR-124 overekspresyonlarının uzamsal bellek performansını ve hipokampal LTP'yi bozduğunu göstermişlerdir (223). Bizim çalışmamızda ise miR-132 ile benzer olarak, miR-124 BK grubunda yüksek ve B1 grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar bellek fonksiyonları açısından negatif role sahip miR-124'ün, uyku yoksunluğunda down regüle edildiği adaptif bir mekanizma olabileceğine işaret etmektedir. Yang ve arkadaşları aynı çalışmalarında, miR-124'ün bellek için kritik bir IEG olan *Zif268*'in ekspresyonunu azalttığını rapor etmişlerdir (223). Dolayısıyla REM uyku yoksunluğu nedeniyle hipokampal *Zif268* ekspresyonları azalan B1 ve B2 grubu hayvanlarda, bellekteki bozulmayı azaltacak adaptif bir yanıt olarak bu mRNA'yı hedefleyen miR-124 down regüle edilmiş olabilir. Ayrıca bu yanıt, hipokampal miR-124'ün en az eksprese olduğu B1 grubunda bellek performansı açısından daha az bozulma görülmesini de açıklayabilir.

miR-182, "miR-183 cluster" olarak bilinen ve miR-183, miR-96 ve miR-182'den oluşan bir gen sınıfının üyesidir. Bu üç miRNA oldukça benzer sekanslara sahip olsalar da, seed sekanslarındaki küçük farklar bunların farklı mRNA'ları hedeflemelerine yol açar (224). Dendritik dikenlerdeki aktin-bağımlı hücre sitoskeletal yeniden yapılanmanın nöral plastisitedeki varlığı bilinmekte olup, miR-182'nin bu süreçte yer aldığı düşünülmektedir (104, 225). Çalışmamızda hipokampal miR-182 ekspresyonunun BK grubuna kıyasla uyku yoksunluğu gruplarında B1 grubunda anlamlı olmak üzere daha düşük olduğunu bulunmuştur. Morris su labirent denemeleri kontrol grubumuzdaki hayvanların hipokampuslarında miR-182 düzeyini up regüle etmiş olabilir. Woldemichael ve arkadaşları, bu miRNA sınıfının hipokampus bağımlı bir görevi öğrenmeden sonra hipokampusta up regüle edildiğini, uzun erimli bellek oluşumu ve

sinaptik plastisitede rol oynadığını göstermişlerdir (224). Öte yandan, uyku yoksunluğu gibi kognitif fonksiyonlar için zorlayıcı koşullar miRNA regülasyonunda önemli değişimleri tetikleyebilir. Bir miRNA'nın yüzlerce genin regülasyonunda yer alması göz önüne alındığında, organizmanın maruz kaldığı koşullar bu düzenlemenin niteliğini değiştirebilir. Örneğin, öğrenme sonrası uyku yoksunluğu hipokampustaki miRNA regülasyonunu bellek fonksiyonundaki bozulmayı en aza indirecek şekilde etkileyebilir. Bu bakış açısından miR-182'nin hedeflerinden birinin BDNF olduğu göz önüne alındığında (226), B1 ve B2 gruplarındaki azalmış hipokampal miR-182 düzeyleri böyle bir düzenlemenin sonucunu yansıtıyor olabilir. Woldemichael ve arkadaşları öğrenme sonrası gözlenen hipokampal miR-182'deki up regülasyonda hedef genin, bellek fonksiyonunda negatif etkisi bilinen bir histon deasetilaz (HDAC) enzimini kodlayan HDAC9 olduğunu bildirmişlerdir (224). Sonuç olarak B1 grubunda bellek fonksiyonlarının görece bozulmamış olması, bu grupta hipokampal BDNF'yi hedefleyen miR-182'nin down regüle edilmesiyle açıklanabilir.

miR-219 beyinde yüksek derecede eksprese edilen ve Alzheimer, Parkinson ve Şizofreni gibi nörodejeneratif hastalıklarda rolü olduğu gösterilen bir miRNA'dır (227, 228). Kocerha ve arkadaşları, miR-219'un CAMK II'yi hedefleyerek NMDA sinyalizasyonunu düzenlediğini ve miR-219 regülasyonundaki bozulmanın Şizofreni gibi hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynayabileceğini göstermişlerdir (227). Ayrıca Zheng ve arkadaşları miR-219'un CAMK II/NMDA reseptör yolağını modüle ederek deneysel epilepsi modellerinde nöbet oluşumunu baskılamada rol oynayabileceğini ve miR-219 uygulamasının epilepsi tedavisinde potansiyel bir strateji olabileceğini rapor etmişlerdir (229). Bizim çalışmamızda hipokampal miR-219 B2 grubunda en yüksek ve B1 grubunda diğer iki gruba kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. B2 grubunda aşırı miktardaki miR-219 hipokampusta CAMK II mRNA'sını hedefleyerek bellek için kritik bir sinyal yolağını negatif olarak etkilemiş olabilir. Buna paralel olarak, B1 grubundaki hipokampal miR-219'un down regülasyonu da, bellek fonksiyonundaki bozulmayı indirgeyen bir yanıt olarak ortaya çıkmış olabilir.

miR-325 hipokampusta eksprese olan ve 70'in üzerinde genin regülasyonunda görev aldığı bilinen bir miRNA'dır (230). Benito ve arkadaşları Bicucullinle tedavi edilen fare hipokampal nöron kültüründe miR-325'in up regüle edildiğini göstermişlerdir (231). Barak ve arkadaşları, miR-325'in çevresel zenginleştirme paradigmasına maruz

farelerin hipokampuslarında up regüle olduğunu ve Alzheimer fare modelinde ise bu miRNA'nın down regüle edildiğini rapor etmişlerdir (215). Bu çalışmada elde edilen sonuçların miR-325'in Tomozin'i hedeflemesiyle ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise B1 grubundaki hipokampal miR-325 düzeyi diğer iki gruba kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Her ne kadar bu sonuç hipokampal Tomozin ekspresyonlarıyla birlikte düşünüldüğünde Barak ve arkadaşlarının çalışmalarından elde ettikleri sonuçlarla uygunluk göstermese de, miR-325'in diğer hedef genleri arasında sinaptik iletide rol oynayan "Vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2)" geni ve AMPA reseptör alt ünitesini kodlayan "Glutamate Receptor Ionotropic AMPA 4 (GRIA4)" geni de bulunmaktadır (230). Dolayısıyla hipokampal miR-325, Tomozinin dışında sinaptik plastisite açısından pozitif rolü olan genlerin düzenlenmesiyle de ilişkili olabilir ve B1 grubundaki düşük ekspresyon bellek fonksiyonu için avantaj sağlamış olabilir.

miR-9 yetişkin beyninin hipokampus gibi nörojenik bölgelerinde ve nöral prekürsör hücrelerinde yüksek derecede eksprese edilen bir miRNA'dır (232). miR-9'un nöronal farklılaşma ve aksonal dallanmada görev aldığı bilinmektedir (217). Bu miRNA'nın Huntington's, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu da ileri sürülmektedir (151). Çalışmamızda hipokampal miR-9 düzeylerinde B2 grubunda en yüksek B1 grubunda en düşük olan bir ekspresyon profili ortaya çıkmıştır. Giusti ve arkadaşları miRNA sponge tekniği kullanarak hipokampal nöronlarda miR-9'un inhibisyonunun dendritik büyümede ve sinaptik iletide bir bozulmayla sonuçlandığını rapor etmişlerdir (233). Bu inhibisyona REST'in güçlü bir up regülasyonunun eşlik ettiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlardan miR-9'un in vivo REST'i hedefleyerek sinaptik plastisitede rol oynadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca Sim ve arkadaşları miR-9'un hipokampal inhibisyonunun LTP'de ve öğrenme ve bellek fonksiyonunda bozulmaya yol açtığını göstermişlerdir (234). Sonuç olarak öğrenme ve bellek fonksiyonu için hipokampal miR-9'un varlığı gereklidir ve bizim çalışmamızdaki BK grubunda elde edilen miR-9 düzeyi normal fizyolojik aralıktaki miktarı yansıtabilir. Diğer taraftan hipokampal miR-9 değerlerinin uyku yoksunluğunun yol açtığı fizyolojik aralığın dışındaki düşük ve yüksek düzeyleri bellek performansında farklı derecelerde bozulmaya yol açabilir. Malmevik ve arkadaşları hipokampusta miR-9'un inhibisyonunun 31 gende up regülasyona ve 69 gende down regülasyona yol açtığını

rapor etmişlerdir (217). Bu genler arasında hücre adezyon genleriyle endositoz, fagositoz ve hücre ölümünden sorumlu genlerin bulunduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla herhangi bir nedenle ortaya çıkan hipokampal miR-9 ekspresyon düzeyindeki anormal değişiklikler, plastisitede işe karışan çok sayıda genin bozulmuş regülasyonuna eşlik edebilir.

Özetle, ilk bakışta sonuçlarımız B1 grubundaki uyku yoksunluğu paradigmasının hipokampal miRNA ekspresyonunda global bir down regülasyona yol açtığına işaret etmektedir. Çalışmamızda ekspresyonu araştırılan 6 genin dışında sinaptik plastisitede düzinelerce protein molekülü yer almaktadır ve bunlar arasındaki olası hedefler açısından düşük miRNA ekspresyonu avantaj sağlamış olabilir. Bu sonuçlarla B1 grubundaki hayvanların davranışsal performansları arasında bir korelasyon kurarak, azalmış miRNA ekspresyonunun görece bozulmamış bellek fonksiyonuna katkı sağladığı yorumu yapılabilir. Ancak, her ne kadar sonuçlarımız B1 grubunda öğrenme sonrası hemen uyku yoksunluğunun hipokampal miRNA ekspresyonunda bir down regülasyona yol açtığına işaret etmiş olsa da, uyku yoksunluğunun yol açtığı miRNA ekspresyonu değişiminin fonksiyonel sonuçları açısından genelleme yapmak yanıltıcı olabilir. Başka bir ifadeyle B1 grubundaki görece bozulmamış bellek performansını doğrudan bu grubun hipokampal miRNA ekspresyonundaki azalmış ekspresyonla ilişkilendirmek isabetli bir yaklaşım olmayabilir. Bunun çok sayıda nedenleri arasında sinapslarda miRNA regülasyonunun her zaman negatif etki göstermemesi, bir miRNA'nın farklı nitelikteki yüzlerce geni hedefleyebilir olması ya da bir genin çok sayıda miRNA tarafından hedeflenebilir olması gibi etkenler sayılabilir. Bu yüzden her bir miRNA'daki değişimin bellek performansı üzerindeki etkisini ayrı ayrı değerlendirmek daha isabetli olacaktır. Bunun yanında miRNA transkripsiyonunun ve çok sayıda komponentin yer aldığı kompleks bir süreç olan miRNA biyogenezinin bazı aşamalarının aktivite bağımlı düzenlenmesi de göz ardı edilmemelidir (13). Öğrenme, uyku ve uyku yoksunluğundaki nöronal aktivite değişiklikleri miRNA ekspresyonunda büyük çapta değişimleri tetikleyebilir. Öğrenme sonrası uyku sırasındaki neokortikal-entorhinal-hipokampal elektriksel iletişim, bellekle ilişkili bu beyin yapılarında konsolidasyonu güçlendirecek nitelikte farklı miRNA ekspresyon programlarını harekete geçirebilir. Uyku yoksunluğunda ise durum, bellekteki bozulmaya katkı sağlayan ya da koruyucu olarak harekete geçen adaptif bir yanıt şeklinde olabilir.

Dolayısıyla bir nörondaki miRNA regülasyonu nöronal aktivite tarafından dinamik olarak etkilenen ve hücredeki düzenlemenin yönünün her zaman değişebileceği karmaşık bir fenomen olarak gözükmektedir.

Bu çalışmada öğrenme sonrası REM uyku yoksunluğunun bellek bozucu etkisinin zamansal çerçevesini belirlemenin yanında, bu süreçte plastisiteyle ilişkili olabilecek çok sayıda genin ve miRNA'nın hipokampal ekspresyonlarını analiz ederek genel bir moleküler perspektif sunulması amaçlanmıştır. Öncelikle bir genin işlevsel son ürününün protein molekülleri olduğu dikkate alındığında, genlerin posttranskripsiyonel regülasyonun net sonucunun belirlenmesi açısından protein analizlerinin de yapılması daha isabetli olacaktır. Ancak bu durum çalışmanın maliyetini artıracığından, araştırmak istenen gen ve miRNA sayısı azaltılarak belirli bir hedefe odaklanmak daha net sonuçlar verebilecektir. Bunun yanında öğrenme sonrası uyku yoksunluğunun bellek konsolidasyonuna etkisinin ortaya konulmasında, elektrofizyolojik (LTP gibi) ve histolojik çalışmaların da eklenmesi yapısal ve fonksiyonel plastisitedeki değişimleri belirleme yönünden faydalı olacaktır.

KAYNAKÇA

1. Dudai, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 2004; 55: 51-86.
2. Benington JH, Frank MG. Cellular and molecular connections between sleep and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 2003; 69: 71-101.
3. Rasch B, Born J. About Sleep's Role in Memory. *Physiol Rev* 2013; 93: 681-766.
4. Tsien JZ. Learning and Memory. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Siegel JG (eds). Elsevier Academic Press, 2006: p 859-875.
5. Hernandez PJ, Abel T. The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. *Neurobiol Learn Mem* 2008; 89: 293-311.
6. Souza C, Riberio S. Sleep Deprivation and Gene Expression. In: *Sleep, Neuronal Plasticity and Brain Function*. Meerlo P, Benca MR, Abel T (eds). Springer Science+Business Media 2015: p 65-91.
7. Tononi G, Cirelli C. Modulation of brain gene expression during sleep and wakefulness: A review of recent findings. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25: 28-35.
8. Smith C, Rose GM. Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol Behav* 1996; 59: 93-97.
9. Kudrimoti HS, Barnes CA, McNaughton BL. Reactivation of hippocampal cell assemblies: effects of behavioral state, experience, and EEG dynamics. *J Neurosci* 1999; 19: 4090-4101.

10. Prince TM, Wimmer M, Choi J, Havekes R, Aton S, Abel T. Sleep deprivation during a specific 3-hour time window post-training impairs hippocampal synaptic plasticity and memory. *Neurobiol Learn Mem* 2014; 109: 122-30.
11. Prince TM, Abel T. The impact of sleep loss on hippocampal function. *Learn Mem* 2013; 20: 558-569.
12. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-33.
13. Aksoy-Aksel A, Zampa F, Schratt G. MicroRNAs and synaptic plasticity-a mutual relationship. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369(1652): 1-11.
14. Wang W, Kwon EJ, Tsai HL. MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learn Mem* 2012; 19: 359-368.
15. Johnson R, Noble W, Tartaglia GG, Buckley NJ. Neurodegeneration as an RNA disorder. *Prog Neurobiol* 2012; 99: 293-315.
16. Rajgor D, Hanley JG. The Ins and Outs of miRNA-Mediated Gene Silencing during Neuronal Synaptic Plasticity. *Non-coding RNA* 2016; 2(1): 1-13.
17. Morris R. Neurobiology of learning and memory. In: *Neuroscience in the 21st Century*, Pfaff DW (eds). Springer Science Business Media, 2013: p2174-2211.
18. Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13515–13522.
19. Cavallaro S, D'Agata V, Manickam P, Dufour P, Alkon D. Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16279-16284.
20. Stork O, Welzl H. Memory formation and the regulation of gene expression. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 575-592.
21. Hernandez JP, Abel T. A molecular basis for interactions between sleep and memory. *Sleep Med Clin* 2011; 6 (1): 71-84.

22. Bliss TV, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232: 331-356.
23. Bosch M, Hayashi Y. Structural plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 2012; 22: 383-388.
24. Roberson ED, Sweatt JD. A biochemical blueprint for long-term memory. *Learn Mem* 1999; 6: 381-388.
25. Frankland PW, Bontempi B. The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 2005; 6: 119-130.
26. Menzel, R. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem.* 2001; 8: 53-62.
27. Garthe A, Kempermann G. An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci.* 2013; 7: 63.
28. İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg* 2015; 25(3): 287-295.
29. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res.* 2007; 163: 3-22.
30. Saab BJ, Mansuy IM. Epigenetics of Memory: Evidence and Models. *Epigenetics of Lifestyle* 2012; Chapter 2: 36-69.
31. Patten A, Yau S, Fontaine C, et al. The Benefits of Exercise on Structural and Functional Plasticity in the Rodent Hippocampus of Different Disease Models. *Brain Plasticity* 2015; 1(1): 97-127.
32. Corkin S. What's new with the amnesic patient H.M.? *Nature Rev Neurosci* 2002; 3: 153-160.
33. Sagar HJ, Cohen NJ, Corkin S, Growdon JH. Dissociations among processes in remote memory. *Ann NY Acad Sci* 1985; 444: 533-535.

34. Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, et al. Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(8): 4398-403.
35. Lavenex PB, Amaral DG, Lavenex P. Hippocampal lesion prevents spatial relational learning in adult macaque monkeys. *J Neurosci* 2006; 26(17): 4546-4558.
36. Schenk F, Morris RG. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. *Exp Brain Res* 1985; 58: 11-28.
37. Chen C, Kim JJ, Thompson RF, Tonegawa S. Hippocampal lesions impair contextual fear conditioning in two strains of mice. *Behav Neurosci.* 1996; 110(5): 1177-1180.
38. Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2000; 435: 406-417.
39. Stone SS, Teixeira CM, Devito LM, et al. Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *J Neurosci* 2011; 31: 13469-13484.
40. Lazarov O, Marr RA Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol* 2010; 223: 267-281.
41. Feng R, Rampon C, Tang YP, et al. Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 2001; 32: 911-926.
42. Ye Y, Xu H, Su X, He X. Role of MicroRNA in Governing Synaptic Plasticity. *Neural Plasticity* 2016; Article ID 4959523: 1-13.
43. Neves G, Cooke SF, Bliss TVP. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 65-75.
44. Saneyoshi T, Fortin DA, Soderling TR. Regulation of spine and synapse formation by activity-dependent intracellular signaling pathways. *Curr Opin Neurobiol.* 2010; 20(1) :108-15.

45. Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist* 2008; 14: 147-156.
46. Lu B. BDNF and Activity-Dependent Synaptic Modulation. *Learn Mem* 2003; 10: 86-98.
47. Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 71-124.
48. Xu B, Gottschalk W, Chow A, et al. The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J Neurosci* 2000; 20(18): 6888-6897.
49. Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, et al. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* 1992; 138: 153-156.
50. Gomez-Pinilla F, So V, Kesslak JP. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Res.* 2001; 904: 13-19.
51. Kesslak JP, So V, Choi J, Cotman CW, Gomez-Pinilla F. Learning up-regulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav. Neurosci.* 1998; 112: 1012-1019.
52. Ma YL, Wang HL, Wu HC, Wei CL, Lee EH. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neuroscience* 1998; 82: 957-967.
53. Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From Acquisition to Consolidation: On the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Hippocampal-Dependent Learning. *Learn Mem.* 2002; 9: 224-237.
54. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol* 2010; 70(5): 304-322.

55. Lisman JE, McIntyre CC. Synaptic plasticity: a molecular memory switch. *Curr Biol*. 2001; 11(19): 788-791.
56. Schulman H. Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 375-381.
57. Fink CC, Meyer T. Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12: 293-299.
58. Silva A, Stevens C, Tonegawa S, Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 1992; 257 (5067): 201-206.
59. Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ. Autophosphorylation at Thr286 of the Calcium-Calmodulin Kinase II in LTP and Learning. *Science* 1998; 279 (5352): 870-873.
60. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 2002; 35: 605-623.
61. Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R, Kandel ER. cAMP response element-binding protein is activated by Ca⁺²-calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88: 5061-5065.
62. Lakhina V, Arey RN, Kaletsky R, et al. Genome-wide functional analysis of CREB/long-term memory-dependent transcription reveals distinct basal and memory gene expression programs. *Neuron* 2015; 85(2): 330-345.
63. Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, et al. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* 1998; 5: 365-374.
64. Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE. Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem* 1999; 6(2): 97-110.
65. Sekeres MJ, Neve RL, Frankland PW, Josselyn SA. Dorsal hippocampal CREB is both necessary and sufficient for spatial memory. *Learn Mem* 2010; 17: 280-283.

66. Curran T, Rauscher FJ, Cohen DR, Franza BR. Beyond the second messenger: oncogenes and transcription factors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1988; 53: 769-777.
67. Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and Zif268. *J Neurosci* 2001; 21: 5089 -5098.
68. Jones MW, Errington ML, French PJ, et al. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories, *Nat Neurosci* 2001; 4(3): 289-296.
69. Veyrac A, Gros A, Bruel-Jungerman E, et al. Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 7062-7067.
70. Qureshi A, Gokhan S, Mehler M. REST and CoREST are transcriptional and epigenetic regulators of seminal neural fate decisions. *Cell Cycle* 2010; 9: 4477-4486.
71. Ballas N, Mandel G. The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15: 500-506.
72. D'Alessandro R, Klajn A, Meldolesi J. Expression of dense-core vesicles and of their exocytosis are governed by the repressive transcription factor NRSF/REST. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1152: 194-200.
73. Qureshi IA, Mehler MF. Regulation of non-coding RNA networks in the nervous system—what's the REST of the story? *Neurosci Lett* 2009; 466: 73-80.
74. Rodenas RA, Chávez AE, Cossio MJ, Castillo PE, Zukin RS. REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci* 2012; 10: 1382-1390.
75. Lu T, Aron L, Zullo J, et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* 2014; 507: 447-454.

76. Chen K, Richlitzki A, Featherstone DE, Schwärzel M, Richmond JE. Tomosyn-dependent regulation of synaptic transmission is required for a late phase of associative odor memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(45) :18482-18487.
77. Barak B, Okun E, Ben-Simon Y, et al. Neuron-Specific Expression of Tomosyn1 in the Mouse Hippocampal Dentate Gyrus Impairs Spatial Learning and Memory. *Neuromolecular Med* 2013; 15(2): 351-363.
78. Oswald I. Sleep as restorative process: human clues. *Prog Brain Res* 1980; 53: 279-288.
79. McGinty D, Szymusiak R. Keeping cool: a hypothesis about the mechanisms and functions of slowwave sleep. *Trends Neurosci* 1990; 13: 480-487.
80. Hobson JA. Sleep is of the brain, by the brain and for the brain. *Nature* 2005; 437: 1254-1256.
81. Lange T, Dimitrov S, Born J. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1193: 48-59.
82. Wang G, Grone B, Colas D, Appelbaum L, Murrain P. Synaptic plasticity in sleep: learning, homeostasis, and disease. *Trends Neurosci* 2011; 34(9): 452-463.
83. Klimesch W, Doppelmayr M, Yonelinas A, et al. Theta synchronization during episodic retrieval: Neural correlates of conscious awareness. *Cogn Brain Res* 2001; 12: 33-38.
84. Mölle M, Bergmann TO, Marshall L, Born J. Fast and slow spindles during the sleep slow oscillation: Disparate coalescence and engagement in memory processing. *Sleep* 2011; 34: 1411-1421.
85. Datta S. Avoidance task training potentiates phasic pontine-wave density in the rat: a mechanism for sleep-dependent plasticity. *J Neurosci* 2000; 20: 8607-8613.
86. Smith C, Rose GM. Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 1997; 111: 1197-1204.

87. Hipolide DC, Tufik S, Raymond R, Nobrega J. Heterogeneous effects of rapid eye movement sleep deprivation on binding to alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes in rat brain. *Neuroscience* 1998; 86: 977-987.
88. Vecsey CG, Baillie GS, Jaganath D, et al. Sleep deprivation impairs cAMP signalling in the hippocampus. *Nature* 2009; 461: 1122-1125.
89. Rudy JW. Scopolamine administered before and after training impairs both contextual and auditory-cue fear conditioning. *Neurobiol Learn Memory* 1996; 65: 73-81.
90. Ribeiro S, Nicolelis MA. Reverberation, storage and postsynaptic propagation of memories during sleep. *Learn Mem* 2004; 11: 686-696.
91. Boyce R, Glasgow SD, Williams S, Adamantidis A. Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science* 2016; 352: 812-816.
92. Gais S, Mölle M, Helms K, Born J. Learning-dependent increases in sleep spindle density. *J Neurosci* 2002; 22: 6830-6834.
93. Hellman K, Abel T. Fear conditioning increases NREM sleep. *Behav Neurosci* 2007; 121: 310-323.
94. Wilson M, McNaughton B. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 1994; 265: 676-679.
95. Bendor D, Wilson MA. Biasing the content of hippocampal replay during sleep. *Nat Neurosci* 2012; 15: 1439-1444.
96. Isomura Y, Sirota A, Ozen S, et al. Integration and segregation of activity in entorhinal hippocampal subregions by neocortical slow oscillations. *Neuron* 2006; 52: 871-882.
97. Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci*. 2009; 12: 1222-1223.

98. Hahn TT, McFarland JM, Berberich S, Sakmann B, Mehta MR. Spontaneous persistent activity in entorhinal cortex modulates cortico-hippocampal interaction in vivo. *Nature Neuroscience* 2012; 15: 1531-1538.
99. Tononi G, Cirelli C. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Res Bull* 2003; 62: 143-150.
100. Benington JH, Heller HC. Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol* 1995; 45: 347-360.
101. Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 114-126.
102. Tononi G, Cirelli C. Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron* 2014; 81: 12-34.
103. Vyazovskiy VV, Faraguna U. Sleep and synaptic homeostasis. *Curr Top Behav Neurosci* 2015; 25: 91-121.
104. Grønli J, Soulé J, Bramham CR. Sleep and protein synthesis-dependent synaptic plasticity: impacts of sleep loss and stress. *Front Behav Neurosci.* 2014; 7 (224): 1-18.
105. Nakashiba T, Buhl DL, McHugh TJ, Tonegawa S. Hippocampal CA3 output is crucial for ripple-associated reactivation and consolidation of memory. *Neuron* 2009; 62: 781-787.
106. Siapas AG, Wilson MA. Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron* 1998; 21: 1123-1128.
107. Jouvet D, Vimont P, Delorme F. Study of selective deprivation of the paradoxal phase of sleep in the cat. *J. Physiol* 1964 (Paris); 56: 381.
108. Van Hulzen ZJ, Coenen AM. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. *Physiol Behav* 1981; 27: 741-744.
109. Cirelli C, Tononi G. Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle. *Brain Res* 2000; 885 (2): 303-321.

110. Cirelli C, Faraguna U, Tononi G. Changes in brain gene expression after long-term sleep deprivation. *J Neurochem* 2006; 98(5): 1632-1645.
111. Cirelli C, Tononi G. Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. *J Neurosci* 2000; 20(24): 9187-9194.
112. Wang H, Liu Y, Briesemann M, Yan J. Computational analysis of gene regulation in animal sleep deprivation. *Physiol Genomics* 2010; 42: 427-436.
113. Taishi P, Sanchez C, Wang Y, et al. Conditions that affect sleep alter the expression of molecules associated with synaptic plasticity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: 839-845.
114. Fujihara H, Sei H, Morita Y, Ueta Y, Morita K. Short-term sleep disturbance enhances brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat hippocampus by acting as internal stressor. *J Mol Neurosci* 2003; 21: 223-232.
115. Guzman-Marin R, Ying Z, Suntsova N, et al. Suppression of hippocampal plasticity-related gene expression by sleep deprivation in rats. *J Physiol* 2006; 575(3) :807-819.
116. Conti B, Maier R, Barr AM, et al. Region-specific transcriptional changes following the three antidepressant treatments electroconvulsive therapy, sleep deprivation and fluoxetine. *Mol Psychiatry* 2007; 12(2): 167-189.
117. Hagewoud R, Havekes R, Novati A, et al. Sleep deprivation impairs spatial working memory and reduces hippocampal AMPA receptor phosphorylation. *J Sleep Res* 2010; 19: 280-288.
118. Vecsey CG, Peixoto L, Choi JHK, et al. Genomic analysis of sleep deprivation reveals translational regulation in the hippocampus. *Physiol Genomics* 2012; 44: 981-991.
119. Croll SD, Suri C, Compton DL, et al. Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience*. 1999; 93(4):1491-1506.

120. Viosca J, Malleret G, Bourtchouladze R, et al. Chronic enhancement of CREB activity in the hippocampus interferes with the retrieval of spatial information. *Learn Mem.* 2009; 16(3):198-209.
121. Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *RNA* 2012; 3 (3): 311-330.
122. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 1097-1101.
123. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-3016.
124. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell.* 2004; 117(1): 69-81.
125. Sheth U, Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 2003; 300(5620): 805-808.
126. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2015; 15: 321-333.
127. Kosik KS, Krichevsky AM. The elegance of the MicroRNAs: A neuronal perspective. *Neuron* 2005; 47: 779-782.
128. Pichardo-Casas I, Goff LA, Swerdel MR, et al. Expression profiling of synaptic microRNAs from the adult rat brain identifies regional differences and seizure-induced dynamic modulation. *Brain Res* 2012; 1436(3): 20-33.
129. Bak M, Silaharoglu A, Moller M, Christensen M, Rath MF, Skryabin B et al. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* 2008; 14: 432-444.
130. He M, Liu Y, Wang X, et al. Cell-type-based analysis of MicroRNA profiles in the mouse brain. *Neuron* 2012; 73: 35-48.
131. Kye MJ, Liu T, Levy SF, et al. Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. *RNA* 2007; 13: 1224-1234.

132. Lugli G, Larson J, Demars MP, Smalheiser NR. Primary microRNA precursor transcripts are localized at post-synaptic densities in adult mouse forebrain. *J. Neurochem* 2012; 123: 459-466.
133. Lugli G, Larson J, Martone ME, Jones Y, Smalheiser NR. Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J Neurochem* 2005; 94: 896-905.
134. Barbee SA, Estes PS, Cziko AM, et al. FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* 2006; 52(6): 997-1009.
135. Kim J, Krichevsky A, Grad Y, et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(1): 360-36.
136. Peláez N, Chartew RW. Biological Robustness and the Role of MicroRNAs: A Network Perspective. *Curr Top Dev Biol* 2012; 99: 237-255.
137. Ryan B, Joilin G, Williams JM. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Front Mol Neurosci* 2015; 8(4): 1-17.
138. Vo N, Klein ME, Varlamova O, et al. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(45): 16426-16431.
139. Wayman GA, Davare M, Ando H, et al. An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 9093-9098
140. Hansen KF, Sakamoto K, Wayman GA, Impey S, Obrietan K. Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory. *PLoS One* 2010; 5(11): e15497.
141. Konopka W, Kiryk A, Novak M, et al. MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J Neurosci* 2010; 30 (44): 14835-14842.

142. Ashraf SI, McLoon AL, Sclarsic SM, Kunes S. Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* 2006; 124: 191-205.
143. Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, et al. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* 2010; 65: 373-384.
144. Hansen KF, Karelina K, Sakamoto K, Wayman GA, Impey S, Obrietan K. miRNA-132: a dynamic regulator of cognitive capacity. *Brain Struct Funct* 2013; 218: 817-831.
145. Lin Q, Wei W, Coelho CM, et al. The brain-specific microRNA miR-128b regulates the formation of fear-extinction memory. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1115-1117.
146. Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 2006; 439: 283-289.
147. Gao J, Wang WY, Mao YW, et al. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 2010; 466: 1105-1109.
148. Fiore R, Khudayberdiev S, Christensen M, et al. Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J* 2009; 28: 697-710.
149. Smrt RD, Szulwach KE, Pfeiffer RL, et al. MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase mind bomb-1. *Stem Cells* 2010; 28: 1060-1070.
150. Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, et al. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* 2011; 43: 969-976.
151. Junn E, Mouradian MM. MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Their Therapeutic Potential. *Pharmacol Ther* 2012; 133(2): 142-150.
152. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease. *Lancet* 2011; 377: 1019-1031.

153. Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport*. 2007; 18: 297-300.
154. Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, et al. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci* 2008; 28: 1213-1223.
155. Smith P, Hashimi A, Girard J, Delay C, Hebert SS. In vivo regulation of amyloid precursor protein neuronal splicing by microRNAs. *J Neurochem* 2011; 116: 240-247.
156. Shtilbans A, Henchcliffe C. Biomarkers in Parkinson's disease: an update. *Curr Opin Neurol* 2012; 25: 460-465.
157. Kim J, Inoue K, Ishii J, et al. MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 2007; 317: 1220-1224.
158. Minones-Moyano E, Porta S, Escaramis G, et al. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 3067-3078.
159. Maciotta S, Meregalli M, Torrente Y. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7(265): 1-17.
160. Savas JN, Makusky A, Ottosen S, et al. Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing through association with Argonaute and P bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(31): 10820-10825.
161. Zuccato C, Tartari M, Crotti A, et al. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 2003; 35: 76-83.
162. Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci*. 2008; 28(53):14341-14346.

163. Johnson R, Zuccato C, Belyaev ND, et al. A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2008; 29(3): 438-445.
164. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 23: 185-188.
165. Klein ME, Liroy DT, Ma L, Impey S, Mandel G, Goodman RH. Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1513-1514.
166. Kay DB, Davis CJ. Sleep and MicroRNAs (miRNAs) in Neurodegenerative Diseases. In: *microRNAs in Toxicology and Medicine*. Sahu CS (ed.), Wiley Online Library 2013: Chapter 13
167. Davis CJ, Bohnet SG, Meyerson JM, Krueger JM. Sleep loss changes microRNA levels in the brain: a possible mechanism for state-dependent translational regulation. *Neurosci Lett.* 2007; 422(1): 68-73.
168. Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, et al. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron.* 2007; 54(5): 813-829.
169. Davis CJ, Clinton JM, Taishi P, et al. MicroRNA 132 alters sleep and varies with time in brain. *J Appl Physiol* 2011; 111(3): 665-72
170. Chang HF, Su CL, Chang CH, Gean PW. The beneficial effects of leptin on REM sleep deprivation-induced cognitive deficits in mice. *Learn Mem* 2013; 20(6): 328-335.
171. Alkadhi K, Zagaar M, Alhaider I, Salim S, Aleisa A. Neurobiological consequences of sleep deprivation. *Curr Neuropharmacol.* 2013; 11(3): 231-249.
172. Smith C. Sleep states and learning: a review of the animal literature. *Neurosci Biobehav Rev* 1985; 9: 157-168.
173. Smith CT, Conway JM, Rose GM. Brief paradoxical sleep deprivation impairs reference, but not working, memory in the radial arm maze task. *Neurobiol Learn Mem* 1998; 69: 211-217.

174. Palchykova S, Winsky-Sommerer R, Meerlo P, Dürr R, Tobler I. Sleep deprivation impairs object recognition in mice. *Neurobiol Learn Mem* 2006; 85(3): 263-271.
175. Graves LA, Heller EA, Pack AI, Abel T. Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learn Mem* 2003; 10(3): 168-176.
176. Havekes R, Vecsey CG, Abel T. The impact of sleep deprivation on neuronal and glial signalling pathways important for memory and synaptic plasticity. *Cell Signal* 2012; 24(6): 1251-1260.
177. Smith C, Tenn C, Annett R. Some biochemical and behavioural aspects of the paradoxical sleep window. *Can J Psychol* 1991; 45: 115-124.
178. Bourchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER. Different training procedures for contextual memory in mice can recruit either one or two critical periods for memory consolidation that require protein synthesis and PKA. *Learn Mem* 1998; 5: 365-374.
179. Bernabeu R, Bevilacqua L, Ardenghi P, et al. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 7041-7046.
180. Tiba PA, Oliveira MG, Rossi VC, Tufik S, Suchecki D. Glucocorticoids are not responsible for paradoxical sleep deprivation-induced memory impairments. *Sleep* 2008; 31(4): 505-515.
181. Ruskin DN, Dunn KE, Billiot I, Bazan NG, LaHoste GJ. Eliminating the adrenal stress response does not affect sleep deprivation-induced acquisition deficits in the water maze. *Life Sci* 2006; 78: 2833-2838.
182. Roozendaal B. Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27(8): 1213-1223.

183. Alsina B, Vu T, Cohen-Cory S. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat Neurosci* 2001; 4: 1093-1101.
184. Sei H, Saitoh D, Yamamoto K, Morita K, Morita Y. Differential effect of short-term REM sleep deprivation on NGF and BDNF protein levels in the rat brain. *Brain Res* 2000; 877: 387-390.
185. Cunha C, Angelucci A, D'Antoni A, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments. *Neurobiol Dis* 2009; 33: 358-368.
186. Mayford M, Bach ME, Huang YY, et al. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 1996; 174: 1678-1683.
187. Fukunaga K, Muller D, Miyamoto E. Increased phosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and its endogenous substrates in the induction of long term potentiation. *J Biol Chem* 1995; 270: 6119-6124.
188. Miller S, Yasuda M, Coats JK, et al. Disruption of dendritic translation of CaMKII- α impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 2002; 36: 507-519.
189. Tan S, Liang K. Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain Res* 1996; 711: 234-240.
190. Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, Alkadhi KA. Caffeine prevents sleep loss-induced deficits in long-term potentiation and related signaling molecules in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 2010; 31: 1368-1376.
191. Terao A, Wisor JP, Peyron C, et al. Gene expression in the rat brain during sleep deprivation and recovery sleep: an Affymetrix GeneChip® study. *Neuroscience* 2006; 137(2): 593-605.
192. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 1998; 21: 127-148.

193. Kandel ER. The biology of memory: A forty-year perspective. *J Neurosci* 2009; 29: 12748-12756.
194. Ulloor J, Datta S. Spatio-temporal activation of cyclic AMP response element-binding protein, activity-regulated cytoskeletal-associated protein and brain-derived nerve growth factor: a mechanism for pontine-wave generator activation-dependent two-way active-avoidance memory processing in the rat. *J Neurochem* 2005; 95: 418-428.
195. Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, Alkadhi KA. Sleep deprivation prevents stimulation-induced increases of levels of P-CREB and BDNF: Protection by caffeine. *Mol Cell Neurosci* 2011; 46: 742-751.
196. Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, Alzoubi KH, Alkadhi KA. Chronic caffeine treatment prevents sleep deprivation-induced impairment of cognitive function and synaptic plasticity. *Sleep* 2011; 33: 437-444.
197. Bourtchouladze R, Patterson SL, Kelly MP, et al. Chronically increased G α signaling disrupts associative and spatial learning. *Learn Mem* 2006; 13(6): 745-752.
198. Pineda VV, Athos JJ, Wang H, et al. Removal of G α 1 constraints on adenylyl cyclase in the hippocampus enhances LTP and impairs memory formation. *Neuron* 2004; 41(1): 153-163.
199. Viosca J, Malleret G, Bourtchouladze R, et al. Chronic enhancement of CREB activity in the hippocampus interferes with the retrieval of spatial information. *Learn Mem.* 2009; 16(3): 198-209.
200. Okuno H, Miyashita Y. Expression of the transcription factor Zif268 in the temporal cortex of monkeys during visual paired associate learning. *Eur J Neurosci* 1996; 8(10): 2118-2128.
201. Nikolaev E, Kaminska B, Tischmeyer W, Matthies H, Kaczmarek L. Induction of expression of genes encoding transcription factors in the rat brain elicited by behavioral training. *Brain Res Bull* 1992; 28(3): 479-484.

202. Besnard A, Laroche S, Caboche J. Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Struct Funct* 2013; 219(1): 415-430.
203. Jones MW, Errington ML, French PJ, et al. A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 2001; 4(3): 289-296.
204. Roberts LA, Higgins MJ, O'Shaughnessy CT, Stone TW, Morris BJ. Changes in hippocampal gene expression associated with the induction of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 42(1): 123-127.
205. Ribeiro S, Goyal V, Mello CV, Pavlides C. Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learn Mem* 1999; 6: 500-508.
206. Ribeiro S, Mello CV, Velho T, et al. Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal *Zif-268* expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. *J Neurosci* 2002; 22(24): 10914-10923.
207. Terao A, Greco MA, Davis RW, Heller HC, Kilduff TS. Region-specific changes in immediate early gene expression in response to sleep deprivation and recovery sleep in the mouse brain. *Neuroscience* 2003; 120(4): 1115-1124.
208. Ravassard P, Hamieh AM, Joseph MA, et al. REM Sleep-Dependent Bidirectional Regulation of Hippocampal-Based Emotional Memory and LTP. *Cereb Cortex* 2016; 26(4): 1488-1500.
209. Marks CA, Wayner MJ. Effects of sleep disruption on rat dentate granule cell LTP in vivo. *Brain Res Bull* 2005; 66: 114-119.
210. Sun YM, Greenway DJ, Johnson R, et al. Distinct profiles of REST interactions with its target genes at different stages of neuronal development. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5630-5638.
211. Calderone A, Jover T, Noh KM, et al. Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *J Neurosci* 2003; 23: 2112-2121.

212. Palm K, Belluardo N, Metsis M, Timmusk T. Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J Neurosci* 1998; 18: 1280-1296.
213. Gorgoni M, D'Atri A, Lauri G, et al. Is sleep essential for neural plasticity in humans, and how does it affect motor and cognitive recovery? *Neural Plast.* 2013; 103949: 1-13.
214. Baba T, Sakisaka T, Mochida S, Takai Y. PKA-catalyzed phosphorylation of tomosyn and its implication in Ca⁺²-dependent exocytosis of neurotransmitter. *J Cell Biol* 2005; 170: 1113-1125.
215. Barak B, Shvarts-Serebro I, Modai S, Gilam A, Okun E, Michaelson DM, et al. Opposing actions of environmental enrichment and Alzheimer's disease on the expression of hippocampal microRNAs in mouse models. *Transl Psychiatry* 2013; 3(304): 1-13.
216. Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique, quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res* 2004; 1004: 45-51.
217. Malmevik J, Petri R, Knauff P, et al. Distinct cognitive effects and underlying transcriptome changes upon inhibition of individual miRNAs in hippocampal neurons. *Scientific Reports* 2016; 6(19879): 1-14.
218. Nudelman AS, DiRocco DP, Lambert TJ, et al. Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. *Hippocampus* 2010; 20: 492-498.
219. Wang RY, Phang RZ, Hsu PH, et al. In vivo knockdown of hippocampal miR-132 expression impairs memory acquisition of trace fear conditioning. *Hippocampus* 2013; 23: 625-633.
220. Magill ST, Cambronne XA, Luikart BW, et al. MicroRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 20382-20387.
221. Eacker SM, Keuss MJ, Berezikov E, Dawson VL, Dawson TM. Neuronal activity regulates hippocampal miRNA expression. *PloS One* 2011; 6: e25068.

222. Rajasethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, et al. Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron* 2009; 63: 803-817.
223. Yang Y, Shu X, Liu D, et al. EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation. *Neuron* 2012; 73: 774-788.
224. Woldemichael BT, Jawaid A, Kremer EA, et al. The microRNA cluster miR-183/96/182 contributes to long-term memory in a protein phosphatase 1-dependent manner. *Nat Commun* 2016; 25(7): 12594.
225. Saab BJ, Mansuy IM. Neuroepigenetics of memory formation and impairment: the role of microRNAs. *Neuropharmacology* 2014; 80: 61-69.
226. Li Y, Li S, Yan J, et al. miR-182 (microRNA-182) suppression in the hippocampus evokes antidepressant-like effects in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016; 4(65): 96-103.
227. Kocerha J, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, et al. MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 3507-3512.
228. Santa-Maria I, Alaniz ME, Renwick N, et al. Dysregulation of microRNA-219 promotes neurodegeneration through post-transcriptional regulation of tau. *J Clin Invest* 2015; 125(2): 681-686.
229. Zheng H, Tang R, Yao Y, et al. MiR-219 Protects Against Seizure in the Kainic Acid Model of Epilepsy. *Mol Neurobiol* 2016; 53(1): 1-7.
230. Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, et al. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. 2016: Database (Oxford).
231. Benito E, Valor LM, Jimenez-Minchan M, Huber W, Barco A. cAMP response element-binding protein is a primary hub of activity-driven neuronal gene expression. *J. Neurosci* 2011; 31(50): 18237-18250.

232. Motti D, Bixby JL, Lemmon VP. MicroRNAs and neuronal development. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012; 17: 347-352.
233. Giusti SA, Vogl AM, Brockmann MM, et al. MicroRNA-9 controls dendritic development by targeting REST. *eLife* 2014; 3: 1-22.
234. Sim SE, Lim CS, Kim JI, et al. The Brain-Enriched MicroRNA miR-9-3p Regulates Synaptic Plasticity and Memory. *J Neurosci* 2016; 36(33): 8641-8652.



EKLER



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



Tarih: 12.08.2015
No:15/116

Toplantı Sayısı: 07

Karar

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 12.08.2015 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Çağrı ŞAKALAR	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	KATILMADI
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	KATILMADI
Serpil SARIÖZKAN	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D.'dan Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ tarafından sunulan "Öğrenme Sonrası Uyku Bozukluğunun Farelerde Hipokampal Sinaptik Plastisiteyle İlgili MikroRNA ve Genlere Etkisinin Araştırılması." başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 12.08.2015
Etik kurul Başkan Vekili : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA
İmza :

ORJİNALLİK RAPORU



Sebahattin KARABULUT

ORIGINALITY REPORT

6%

SIMILARITY INDEX

6%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

2%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.eaorganization.net Internet Source	1%
2	Submitted to Erciyes Üniversitesi Student Paper	1%
3	aves.erciyes.edu.tr Internet Source	<1%
4	sagens.erciyes.edu.tr Internet Source	<1%
5	Submitted to Omer Halisdemir University Student Paper	<1%
6	archivia.unict.it Internet Source	<1%
7	www.istanbulbilim.edu.tr Internet Source	<1%
8	www.ulusalsinirbilimkongresi2013.org Internet Source	<1%
9	www.melkaproductions.com Internet Source	<1%
10	Karolina, D.S., and K. Jeyaseelan. "micro	<1%

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	Sebahattin KARABULUT
Uyuđu	Türkiye (TC)
Dođum Yeri ve Tarihi	Sivas, 06/ 10/ 1983
Medeni Hali	Evli
İletişim Adresi	Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kayseri
E-posta Adresi	sbkarabulut@yandex.com.tr

EĞİTİM VE AKADEMİK DURUMU

Lise	Sivas Atatürk Sağlık Meslek Lisesi, 1997-2001
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü, 2004-2008
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 2009-2013
Doktora	Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 2014-2017

YABANCI DİL

İngilizce

ULUSLARARASI VE ULUSAL POSTER VE BİLDİRİLER

1- **Karabulut S**, Bayramov KK, Ozdemir F, Ergen E, Topaloglu T, Tufan E, Dana H, Yazgan K, Gogeli A. Öğrenme sonrası REM uyku yoksunluğunun fare hipokampal REST ve miR-9 ekspresyonuna etkisi. 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 7-10 Mayıs 2017, Sakarya, Türkiye.

2- Gogeli A, **Karabulut S**, Korkmaz Bayramov K, Ozdemir F, Topaloglu T, Ergen E,

Yazgan K. Investigation of the effect of post-learning sleep deprivation on hippocampal synaptic plasticity-related genes and micro-RNA in mice. 29th ECNP Congress, 17-20 September 2016, Vienna, Austria.

3- **Karabulut S**, Gogeli A, Bayramov KK, Ozdemir F, Topaloglu T, Ergen E, Tufan E. Öğrenme Sonrası REM Uyku Yoksunluğunun Fare Hipokampusunde BDNF ve miR-182 Ekspresyonuna Etkisi. 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 5-8 Eylül 2016, Düzce, Türkiye.

4- **Karabulut S**, Gogeli A, Ozdemir F, Yazgan K. Öğrenme Sonrası Uyku Yoksunluğunun Farelerde Uzamsal Bellek Üzerine Etkisi. 14. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 26-29 Mayıs 2016, Ankara, Türkiye.

5- Pektaş F, Acer H, Kara AY, **Karabulut S**, Dolu N. Hipertiroidili Hastalarda Reaksiyon Zamanının İşitsel Oddball Paradigmasında Butona Basma Cevabında Değerlendirilmesi. 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül 2014, Kayseri, Türkiye.

6- Gulturk S, Benek S, Cakir Z, Kılinc E, **Karabulut S**, Gulturk A. Valproik Asit ve L-arginin'in WAG/Rij Sıçanlarda Pasif Sakınma Üzerine Etkileri. 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 10-14 Eylül 2013, Ankara, Türkiye.

7- **Karabulut S**, Benek S, Gulturk S. Finasterid Uygulanan WAG/Rij Sıçanlara Nöroaktif Steroidler Olan THDOC ve THPROG'un EEG'de Diken Dalga Deşarjlara Etkisi. 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 28 Nisan-1 Mayıs 2013, İzmir, Türkiye.

SERTİFİKA, KURS VE EĞİTİMLER

1- 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 28-31 Ağustos 2008, İstanbul.

2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 20 Şubat-2 Mart 2012, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas.

3- 29. Ulusal Klinik Nörofizyoloji EEG-EMG Kongresi, 3-7 Nisan 2013, Antalya.

4- Akademik Gelişim Kursu, 5 Mart-25 Nisan 2013, Sivas.

5. 2. Temel Moleküler Biyoloji Yöntemleri Uygulama Eğitimi Kursu, 5-6 Haziran 2013, Sivas.

6- 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 10-14 Eylül 2013, Ankara.

7- 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül 2014, Kayseri.

8- 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 30 Nisan-3 Mayıs 2015, Konya.

9- 14. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 26-29 Mayıs 2016, Ankara.

10 - 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 5-8 Eylül 2016, Düzce

11. 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 7-10 Mayıs 2017, Sakarya.

İŞ DENEYİMLERİ

Sivas Numune Hastanesi Anestezi teknisyeni, 2003-Halen

ÖDÜL VE BURSLAR

1-“Finasterid Uygulanan WAG/Rij Sıçanlara Nöroaktif Steroidler Olan THDOC ve THPROG’un EEG’de Diken Dalga Deşarjlara Etkisi” isimli yüksek lisans tez çalışması (T512), CÜBAP tarafından desteklenmiştir.

2- CDE GRANT, 29th ECNP Congress, 17-20 September 2016, Vienna, Austria.