



**T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNTRAHİPOKAMPAL ROSCOVİTİNE İNFUZYONUN
SİNAPTİK PLASTİSİTE FORMLARININ
OLUŞUMUNDAKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. SALİME AKÇAKAYA TEK

**Danışman
Prof.Dr.CEM SUER**

KAYSERİ-2022



**T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNTRAHİPOKAMPAL ROSCOVİTİNE İNFUZYONUN
SİNAPTİK PLASTİSİTE FORMLARININ
OLUŞUMUNDAKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. SALİME AKÇAKAYA TEK

**Danışman
Prof.Dr.CEM SUER**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TTU-2021-11016 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

KAYSERİ-2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde bilgisini, deneyimlerini ve desteğini esirgemeyen, bilimsel katkıları ve manevi yardımlarıyla eğitimimin son günlerine kadar emek veren, birlikte çalışmaktan her zaman onur duyduğum çok değerli hocam, danışmanım Sayın Prof. Dr. Cem SÜER'e,

Tezimin proje aşamasından yazımına kadar birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, destek ve emeğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nurcan DURSUN'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle verimli bir çalışma ortamı sunan değerli hocalarım Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ' ye, Dr. Öğr. Üyesi Erdem BAŞARAN' a, Dr. Öğr. Üyesi Akif BAKTIR' a , Dr. Öğr. Üyesi Burak TAN'a, Öğretim Gör. Bilal KOŞAR'a

Yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Asistan Buse GÜNAYDIN'a, Asisitan Dr.Nihal TOY'a, Ayşenur ÇİMEN'e, Fatma Boz'a, Aslınur YAŞAR'a, Özlem BARUTÇU' ya, Ezgi Aslan GÜLPINAR' a, Esra TUFAN' a ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Projenin gerçekleştirilmesinde büyük katkıları bulunan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje (BAP) Birimi' ne, DEKAM / Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne

Tez çalışmalarım süresince göstermiş olduğu sabırla ve sevgiyle her zaman yanımda olan değerli eşim Muhammed Mustafa TEK'e

Hayatım boyunca bana sonsuz destek olan annem Zekiye AKÇAKAYA'ya, rahmetli babam Edip Mehmet AKÇAKAYA'ya ve değerli kardeşlerime teşekkür ederim.

Salime AKÇAKAYA TEK

İÇİNDEKİLER

İNTRAHİPOKAMPAL ROSCOVİTİNE İNFUZYONUN SİNAPTİK PLASTİSİTE FORMLARININ OLUŞUMUNDAKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ

TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR ve SİMGELER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HİPOKAMPUS.....	3
2.1.1. Hipokampus fizyolojisi	3
2.2. HİPOKAMPUS VE BELLEK	7
2.2.1. Hipokampus ve elektrofizyoloji	7
2.3. NÖRONAL PLASTİSİTE	8
2.3.1. Sinaptik Plastisite	9
2.3.1.1. Sinaptik Plastisitenin Moleküler Temeli	10
2.4. CDK5 (Siklin Bağımlı Kinaz).....	16
2.5.TAU PROTEİNİ VE SİNAPTİK PLASTİSİTE	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. DENEY HAYVANLARI ve GRUPLANDIRMA.....	22
3.2. ELEKTROFİZYOLOJİ KAYITLARININ ALINMASI	23
3.2.1. Tipik elektriksel cevabın elde edilmesi	24
3.2.2. Girdi-Çıktı Eğrileri “Input – Output (I/O) Curve	24
3.2.3. UDG Kayıtlarının Alınması	24

3.2.4. UDB Kayıtlarının Alınması.....	25
3.2.5. Metaplastisite Kayıtlarının Alınması.....	26
3.2.6. Veri Kazanımı ve Uyarım	27
3.2.7. Veri Analizi ve İstatistik.....	27
3.3. WESTERN-BLOT YÖNTEMİ İLE PROTEİN DÜZEY TAYİNİ	28
3.3.1. Veri Analizi ve İstatistik.....	28
3.4. PCR	29
3.4.1. Hipokampus Dokusundan RNA İzolasyonu	29
3.4.2. DNA Sentezi.....	29
3.4.3. RNA Ekspresyon Çalışması	30
3.4.4. Veri Analizi ve İstatistik.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Genç-erişkin Erkek Sıçanlarda Farklı Plastisite Formlarının Kontrol Değerleri.....	31
4.2. Roscovitine'nin YFU ile İndüklenen Plastisitenin Sinaptik Bileşenine Etkisi.....	32
4.3. Roscovitine'in YFU ile İndüklenen Plastisitenin Somatik Bileşenine Etkisi.....	34
4.4. Roscovitine'in DFU ile İndüklenen Plastisitenin Sinaptik Bileşenine Etkisi.....	37
4.5. Roscovitine'in DFU ile İndüklenen Plastisitenin Somatik Bileşenine Etkisi.....	39
4.6. Roscovitine'in DFU sonrası YFU verilerek İndüklenen Plastisitenin Sinaptik Bileşenine Etkisi	42
4.7. Roscovitine'in DFU sonrası YFU verilerek İndüklenen Plastisitenin Somatik Bileşenine Etkisi	46
4.8. Elektrofizyolojik Bulguların Özeti.....	50
4.9. Moleküler Bulgular	50

4.9.1. Roscovitine infüzyonunun plastisiteye eşlik eden CDK5 gen anlatımına etkisi.....	50
4.9.2. Roscovitine infüzyonunun plastisiteye eşlik eden Cdk5 fosforilasyonuna etkisi.....	52
4.9.3. Roscovitine infüzyonunun plastisiteye eşlik eden MAPT anlatımına etkisi.....	53
4.9.4. Roscovitine infüzyonunun plastisiteye eşlik eden Tau fosforilasyonuna etkisi.....	55
5.TARTIŞMA	56
5.1. Elektrofizyolojik Bulgular	56
5.2. Moleküler Bulgular	58
6. SONUÇ	61
7.KAYNAKLAR	62

KISALTMALAR ve SİMGELER

AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4- isoksazol propiyonik asit
A-P	Anterior-posterior
BAP	Bilimsel araştırma projeleri
BCA	Biçinkonik asit
BSA	Bovin serum albümin
CA	Cornu ammonis
Ca⁺²	Kalsiyum
CAMK	Kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz
CAMKII	Kalsiyum-kalmodulin bağımlı kinaz II
CaMKIV	Kalsiyum-kalmodulin bağımlı kinaz -IV
cAMP	Siklik adenosin monofosfat
CREB	Siklik adenosin monofosfat yanıt elementi bağlayıcı protein
DFU	Düşük frekanslı uyarı
DG	Dentat girus
EC	Entorinal korteks
ECL	Enhanced chemiluminescence
EphA4	Ephrin type-A receptor 4
EPSP	Eksitator post sinaptik potansiyel
ERK	Ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinaz
fEPSP	Alan eksitator postsinaptik potansiyel
gr	Gram
GSK3	Glikojen sentaz kinaz 3
HRP	Horse radish peroksidaz
I/O	Input / Output
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase

K⁺	Potasyum
mA	Miliamper
MAGUK	Membran ilişkili guanilat kinaz
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MAPT	Mikrotübül ilişkili protein Tau
MEK	mitojen aktive olan kinaz kinaz
mGlu	Metabotropik glutamat
mGlu-R	Metabotropik glutamat reseptörü
M-L	Mediyal-Lateral
ml	Mililitre
mmol	Milimol
MP	Metaplastisite
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
ms	Milisaniye
mV	Milivolt
Na⁺	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NMDA	N-metil D-aspartat
NMDA-R	N-metil D-aspartat reseptörü
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PKMy	
PP1	Protein fosfataz 1
PS	Populasyon spike
PSD	Postsinaptik dansite
PTG	Post-tetanik güçlenme

PVDF	Poliviniliden diflorür
PY	Perforan yolak
RNA	Ribonükleik asit
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel
Ser	Serin
SF	Serum fizyolojik
STP	Short-term potentiation
TBS-T	Tris-buffered saline-tween
Thr	Treonin
Tyr	Tirozin
µm	Mikromol
UDB	Uzun dönemli baskılanma
UDG	Uzun dönemli güçlenme
V	Voltaj
YFU	Yüksek frekanslı uyarı

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4. 1.	Genç Erişkin Erkek Sıçanlar Gözlenen Plastisite Formları	32
Tablo 4.2.	İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri (input/output,mV/msn)	32
Tablo 4. 3.	Yüksek frekanslı uyarı protokolü ile EPSP eğiminde meydana gelen artış oranları (%)	33
Tablo 4.4.	İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen PS genlik değerleri (mV/msn).....	35
Tablo 4. 5.	Yüksek frekanslı uyarı protokolü ile PS genliğinde meydana gelen artış oranları (%)	36
Tablo 4.6.	İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri (input/output,mV/msn).	37
Tablo 4.7.	Düşük frekanslı uyarı protokolü ile EPSP eğiminde meydana gelen azalma oranları (%).....	38
Tablo 4.8.	İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri (input/output ,mV/msn).	40
Tablo 4. 9.	Düşük frekanslı uyarı protokolü ile PS genliğinde meydana gelen azalma oranları (%).....	41
Tablo 4.10.	İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri (input/output ,mV/msn).	42
Tablo 4.11.	Düşük frekanslı uyarı sonrası ve Yüksek frekanslı Uyarım Sonrası EPSP eğiminde meydana gelen değime oranları (%)	44
Tablo 4.12.	İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen PS genlik değerleri (mVxmsn).	47
Tablo 4.13.	Düşük frekanslı uyarı sonrası ve Yüksek frekanslı Uyarım Sonrası EPSP eğiminde meydana gelen değime oranları (%)	48
Tablo 4.14.	Roscovitine infüzyonu altında, indüksiyondan 60 dakika sonra oluşan plastisite formları.	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Hipokampusun ventrikül yüzeyine doğru en dış tabakası Alveus'dur. Daha sonra CA1, CA2 ve CA3 tabakaları gelir. En içte CA4 vardır. CA1 Subikulum'a, CA4 ise dentat girus'a yakındır. Entorinal korteks ile arasında hipokampal sulkus vardır. TH: Temporal horn CA: Cornu Ammonis. http://www.norosirurji.dergisi.org/	5
Şekil 2.2	Hipokampal devrenin temelini oluşturan entorinal korteks, dentat girus, CA3 , ve CA1 arasındaki bağlantıları içeren trisinaptik devre (kesikli çizgilerle gösterilmiştir). Entorinal korteksten perforan yol ile dentat girusa giren sinyal, sırasıyla CA3 ve CA1 alanlarında entegre edildikten sonra subikulum vasıtasıyla entorinal kortekse geri döner.....	6
Şekil 2.3	Sinaptik plastisitenin altında yatan sinyal yolları.....	12
Şekil 2. 4.	Cdk5 (sağda) ve Cdk5 dışındaki Cdk ailesi üyelerinin düzenleyicileri. Çoğalan hücrelerde, bu sikline bağımlı kinazlar, klasik siklinler tarafından aktive edilir. (Sağda) CDK 5in aktivatörleri (yeşil) ve inhibitörleri (kırmızı) gösterilmiştir.	17
Şekil 2. 5.	Cdk5'in sinaptik plastisite üzerindeki etkileri	18
Şekil 3.1.	Stereotaksik çatıya yerleştirilmiş sıçanın deney sırasındaki görünümü (solda) ve perforan yolağın uyarılması ile oluşan yanıtların dentat girustan kaydedilmesi (sağda).....	24
Şekil 3.2	UDG Kayıtlarının Alınması	25
Şekil 3.3.	UDB Kayıtlarının Alınması	26
Şekil 3.4.	Metaplastisite kaydı deney protokolü şeması.....	26
Şekil 4.1.	Roscovitine YFU ile indüklenen plastisitenin sinaptik bileşenini etkilemez.	34
Şekil 4.2.	Roscovitine YFU ile indüklenen plastisitenin somatik bileşenini etkilemez..	36
Şekil 4.3	Roscovitine DFU ile indüklenen plastisitenin sinaptik bileşenini baskılar.	39
Şekil 4.4.	Roscovitine DFU ile indüklenen somatik UDG'yi baskılar.	41
Şekil 4.5.	Roscovitine'nin metaplastik sinaptik UDB'yi inhibe eder.	45
Şekil 4.6.	Roscovitine somatik UDG'nin DFU ile regülasyonunu etkilemez.	49

Şekil 4.7.	Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda Cdk5-mRNA düzeyi.	51
Şekil 4.8 .	Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda Cdk5 protein seviyesi düzeyi.	52
Şekil 4.9.	Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda Ser159 epitopundan Cdk5 fosforilasyon düzeyi.	53
Şekil 4.10.	Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda MAPT-mRNA düzeyi.	54
Şekil 4.11.	Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda tau protein seviyesi.	54
Şekil 4.12.	Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda tau proteinin Thr181 ve Ser416 kalıtlarından fosforilasyon düzeyi.	55

İNTRAHİPOKAMPAL ROSCOVİTİNE İNFUZYONUN SİNAPTİK PLASTİSİTE FORMLARININ OLUŞUMUNDAKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Siklin bağımlı kinaz 5 (Cdk5), aynı adlı gen tarafından kodlanan bir proteindir. Aktivitesi p35 ve p39 gibi aktivatörlerle etkileşime bağlı olan Cdk5 sinir sisteminde nöronal tabakaların oluşumu, transmisyon, presinaptik salım gibi işlevler yanı sıra hipokampal sinaptik plastisite ilişkili bir kinazdır. Ancak, aynı zamanda bir tau-kinaz olan Cdk5'in plastisiteye eşlik eden tau proteinin fosforilasyonunu nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bu çalışmada Cdk5 inhibitörü (Roscovitine) infüzyonu altında UDG (Uzun Dönemli Güçlenme), UDB (Uzun Dönemli Baskılanma) ve metaplastisite (MP) gibi sinaptik plastisite formlarına eşlik eden Cdk5, tau gen ekspresyon ve protein düzeylerindeki değişiklikler değerlendirilmiştir.

Yöntem ve Gereçler: Çalışmada 108 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Her bir grupta 36 sıçan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Gruplarda uygulanan UDG, UDB ve metaplastisite protokollerinin her biri için 12 sıçan kullanıldı. Anestezi altında stereotaksik çatıya yerleştirilen sıçanların dentat girusundan (DG) eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP) ve populasyon spike (PS) alan potansiyelleri kaydedildi. Farklı plastisite formlarını indükleyebilmek için yüksek frekanslı uyarım (YFU), düşük frekanslı uyarım (DFU), tek başına veya birlikte, perforan yola verildi. İndüksiyon protokollerinin başlaması ile birlikte 1 saat süre ile DG'ye serum fizyolojik (SF) veya Roscovitine (20 µM veya Roscovitine 100 µM) infüzyonları yapıldı. Alan potansiyellerinin kaydından hemen sonra çıkartılan hipokampus dokusunda Cdk5- ve MAPT-mRNA seviyeleri gerçek zamanlı PCR yöntemi ile, proteinlerin toplam ve fosforillenmiş formları (p-ser⁴¹⁶tau, p-thr¹⁸¹tau, p-ser¹⁵⁹Cdk5 ve p-tyr¹⁵Cdk5 düzeyleri Western-blot yöntemi ile ölçüldü.

Bulgular: YFU ile indüklenen sinaptik ve somatik UDG, Roscovitine infüzyonundan etkilenmedi ancak UDG'ye eşlik eden Cdk5 gen anlatımı azalmış bulundu. DFU, ancak 100 µM Roscovitine infüzyonu yapıldığında UDB indükleyebildi; DFU ile

indüklenen somatik UDG ise Roscovitine varlığında baskılandı. Roscovitine'in Cdk5 gen anlatımını baskılayıcı etkisi DFU ile uyarılmış hipokampal dokularda da görüldü. Kontrol grubunda DFU, sonrasında uygulanan YFU'la oluşacak olan sinaptik UDG'yi inhibe ederken; bu metaplastik inhibisyon Roscovitine'in infüze edildiği deneylerde görülmedi. Roscovitine'in metaplastik UDG inhibisyonunu engelleyici etkisi MAPT gen anlatımında azalma ile birlikteydi. Plastisite ilişkili Cdk5 ve tau protein seviyeleri ve bu proteinlerin ölçülen epitoplarındaki fosforilasyon düzeyleri Cdk5 infüzyonundan anlamlı düzeyde etkilenmedi.

Sonuç: Çalışma bulguları, fizyolojik plastisite formları ve plastisite ilişkili gen anlatımının fizyolojik sınırlar içinde kalması için Cdk5 aktivitesinin önemli olduğunu; Cdk5 aktivitesi değiştiğinde DG granül hücrelerinin sinaptik ve somatik çıktıları bağlamında farklı plastisite formlarının oluşabileceğini ve plastisiteye eşlik eden Cdk5 ve MAPT gen anlatımının değişebileceğini göstermektedir. Bu etkilerin, kanser, nörodejenerasyon, inflamasyon, viral enfeksiyonlar, polikistik böbrek ve glomerülonefrit gibi hastalıkların tedavisinde bir potansiyel ajan olarak düşünülen Roscovitine'in tedavi amaçlı kullanımında dikkate alınması gereklidir.

Anahtar kelimeler: Sinaptik plastisite formları (UDG, UDB, MP) Cdk5, Tau, Hipokampus, Roscovitine

INVESTIGATION OF THE ROLE OF INTRAHIPPOCAMPAL ROSCOVITINE INFUSION IN THE FORMATION OF SYNAPTIC PLASTICITY FORMS

ABSTRACT

Aim: Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is a protein encoded by the gene of the same name. Cdk5, whose activity depends on the interaction with activators such as p35 and p39, is a kinase associated with hippocampal synaptic plasticity, as well as functions such as the formation of neuronal layers, transmission, presynaptic release in the nervous system. However, it is unknown how Cdk5, also a tau-kinase, affects the phosphorylation of the tau protein that accompanies plasticity. In this study, changes in Cdk5, tau gene expression and protein levels accompanying synaptic plasticity forms such as LTP (Long Term Potentiation), LTD (Long Term Depression) and metaplasticity under Cdk5 inhibitor (Roscovitine) infusion were evaluated.

Materials and Methods: 108 Wistar albino male rats were used in the study. They were divided into 3 groups with 36 rats in each group. 12 rats were used for each of the LTP, LTD and metaplasticity protocols applied in the groups. The excitatory postsynaptic potential (EPSP) and population spike (PS) field potentials were recorded from the dentate gyrus (DG) of the rats placed on the stereotaxic roof under anesthesia. In order to induce different forms of plasticity, high-frequency stimulation (HFS), low-frequency stimulation (LFS), alone or in combination, were given to the perforating pathway. With the start of the induction protocols, serum physiological (SF) or Roscovitine (20 μ M or Roscovitine 100 μ M) infusions were administered to the DG for 1 hour. Cdk5- and MAPT-mRNA levels in the hippocampus tissue removed immediately after the recording of the field potentials were measured by real-time PCR method, and total and phosphorylated forms of proteins (p-ser416tau, p-thr181tau, p-ser159Cdk5 and p-tyr15Cdk5 levels were measured by Western-blot method.

Results: Synaptic and somatic LTP induced by HFS were not affected by Roscovitine infusion, but Cdk5 gene expression accompanying LFS was found to be decreased. LFS was able to induce LTD only when 100 μ M Roscovitine was infused; Somatic LTP induced by LFS was suppressed in the presence of Roscovitine. The

suppressive effect of Roscovitine on Cdk5 gene expression was also observed in LFS-stimulated Hippocampal tissues. In the control group, while LFS inhibited the synaptic LTP that would be formed with the subsequent HFS; this metaplastic inhibition was not seen in experiments in which Roscovitine was infused. The inhibitory effect of Roscovitine on metaplastic LTP inhibition was associated with a decrease in MAPT gene expression. Plasticity-related Cdk5 and tau protein levels and phosphorylation levels in the measured epitopes of these proteins were not significantly affected by Cdk5 infusion.

Conclusion: The study findings suggest that Cdk5 activity is important for physiological forms of plasticity and plasticity-related gene expression to remain within physiological limits; It shows that when Ckd5 activity changes, different forms of plasticity may occur in the context of synaptic and somatic output of DG granule cells, and Cdk5 and MAPT gene expression accompanying plasticity may change. These effects should be considered in the therapeutic use of Roscovitine, which is considered as a potential agent in the treatment of diseases such as cancer, neurodegeneration, inflammation, viral infections, polycystic kidney and glomerulonephritis.

Keywords: Forms of synaptic plasticity (LTP, LTD and MP), Cdk5, Tau, Hippocampus, Roscovitine

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöronal plastisite, sinir sisteminin, çevresel deneyimdeki değişikliklere yanıt olarak bağlantılarını işlevsel ve yapısal olarak yeniden düzenleme yeteneğini ifade eder. Erken postnatal dönem; başlıca davranışsal işlevlere hizmet eden çeşitli beyin bölgelerinin dış uyaranlara yanıt olarak yüksek bir plastisite sergilediği zamandır [1]. Bu kritik dönem bittikten sonra yaşamın ilerleyen dönemlerinde nöronal plastisite gittikçe azalır.

Beynin nörogenezinde ve nöronal plastisitede, bunların oluşumunda asıl merkez olan hipokampusun gelişiminde, Cdk5 enzimi ve tau proteini önemli rol oynamaktadırlar.

Sikline bağımlı kinazların bir aile üyesi olan siklin bağımlı kinaz-5 (Cdk5), merkezi sinir sisteminde çok önemli rol oynar. Embriyogenez sırasında, Cdk5 beyin gelişimi için vazgeçilmezdir ve yetişkin beyinde, öğrenme ve hafıza oluşumu gibi daha yüksek bilişsel işlevler dahil olmak üzere çok sayıda nöronal süreç için gereklidir [2]. Cdk5'in aktivitesi p35, p25 ve p39 proteinleri tarafından arttırılmaktadır. P 25'in hiperfonksiyonu nörotoksiteden sorumlu tutulmaktadır [3, 4].

Cdk 5'in sinaptik plastisite oluşurken hem presinaptik hem de post sinaptik bölgede rolünün olduğu gösterilmiştir. Presinaptik bölgede Cdk5 inhibisyonun nörotransmitter salınımını arttırdığı ,başka bir çalışmada ise Cdk5'in N-tipi kalsiyum kanalının por oluşturucu alt birimi olan CaV2.2'yi fosforile ederek nörotransmitter salınımını arttırdığı belirtilmiştir [5, 6]. Presinaptik bölgede endositoz ve ekzositozu da etkilediği bilinmektedir Postsinaptik bölgede ise NMDA reseptörlerini etkileyerek sinaptik plastisiteyi etkilediğini gösterir çalışmalar mevcuttur [5, 6].

Cdk5 aktivitesinin inhibisyonu, bir çalışmada NR2A'nın Cdk5 tarafından fosforilasyonunu azaltarak akut beyin dilimlerinde N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aracılı akımları azalttığı ve başka bir çalışmada da benzer şekilde CA1 hipokampal nöronlarda uzun süreli güçlenmeyi (UDG) azlattığı belirtilmiştir. Cdk5in aktivatorü olan p35'ten yoksun farelerde UDB'nin uyarılması ve uzamsal öğrenmenin bozulduğu bildirilmiştir [7]. Öte yandan ilişkisel öğrenme ve korku koşullandırması sırasında Cdk5 aktivitesi birliktelik gösterir [8].

Tau proteinleri çözünürlüğü yüksek proteinlerdir, 16 ekzon içeren ve 17q21 kromozomuna yerleşmiş mikrotübül-ilişkili protein tau (MAPT) geni tarafından sentezlenir. Bizim plastisiteye eşlik eden tau fosforilasyonunu gösteririr çeşitli çalışmalarımız bulunmaktadır. Tau'nun; p-tau (Ser416), p-tau (Thr181), p-tau (Ser396) ve p-tau (Ser396) epitoplarından fosforilasyonu tarafımızca bakılan en sık fosforilasyon düzeyleridir. Bu fosforilasyonları etkileyen birçok kinazdan biri de Cdk5'dir.

Cdk5in sinaptik plastisite üzerindeki etkileri yeterince açık değildir. Bu çalışmada Cdk5 inhibitörü (Roscovitine) infüzyonu altında sinaptik plastisite formlarından olan UDG, UDB ve Metaplastisitedeki değişiklikler değerlendirilmiş ve buna eşlik eden Tau proteinin farklı epitoplarda fosforilasyon düzeyleri ile ilişkisi ortaya konulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HİPOKAMPUS

Hipokampus temporal lobun medial kısmında bulunur ve lateral ventrikülün temporal boynuzu ile yakın komşuluk içinde olan bir gri cevher yapısıdır. Hipokampus, üzerinde en fazla klinik ve laboratuvar çalışma yapılan beyin yapısıdır. Filogenetik olarak Arşikorteks olarak da adlandırılır ve gelişimsel olarak en eski beyin kısımlarından birisidir. Hipokampus, singulat girus, hipotalamus ve amigdala ile birlikte “Limbik sistem”i oluşturur. Erişkin bir insan beyinde hipokampusun hacmi yaklaşık 3-3,5 cm³ olup, hipokampusun tüm insan neokorteksine oranı yaklaşık 0,009’dur. Kemirgenlerde ise hipokampus, insan hipokampusüne oranla 100; maymun hipokampusünden ise 10 kat daha küçüktür.

2.1.1. Hipokampus fizyoanatomisi

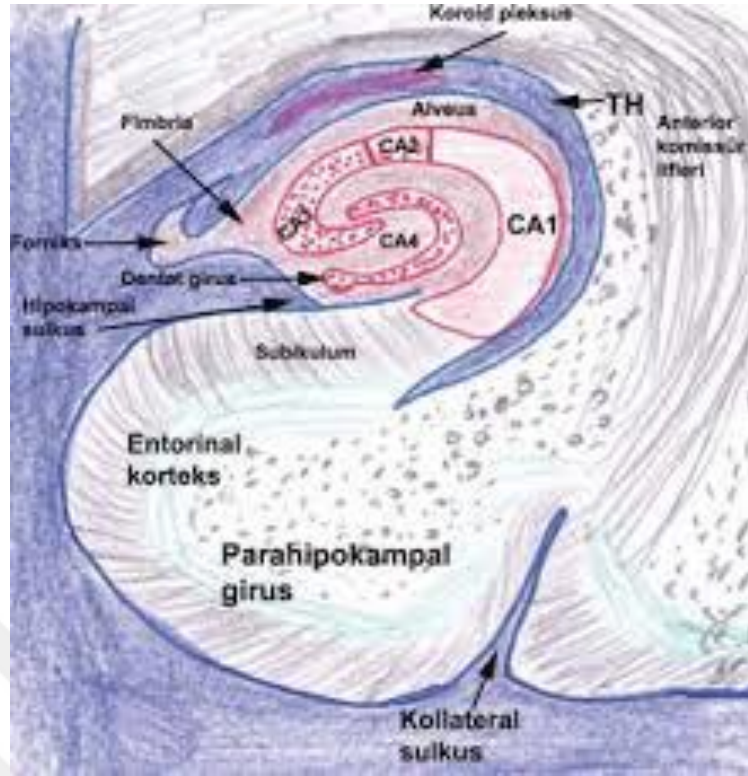
Hipokampus, temel olarak hafıza, duygulanım, konumlama ve yön bulmada önemli rol oynar. Hipokampusta nöral plastisite hayat boyunca devam etmektedir. Yapılan hayvan deneyleri hipokampusta birçok sinir hücresinin konum ve yer bulma hafızasını taşıdığını ve hayvanların bilindik yerlerden geçerken bu nöronlarda aksiyon potansiyeli meydana geldiğini göstermiştir. Ayrıca beyin görüntüleme teknikleriyle yapılan çalışmalarda yön bulmaya çalışan kişilerin hipokampuslerinin aktif olarak çalıştığı görülmüştür.

Hipokampusun anatomik olarak ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır. Ön tarafı geniş ve düz olup “pes hippocampi” adı verilir. Ön bölümde pençeye benzeyen iki veya üç adet yüzeysel çıkıntı bulunur. Bu çıkıntılara “digitationes hippocampi” adı verilir [9]. Hipokampusun bütün ventriküler yüzeyi kendi hücrelerinden gelen aksonların oluşturduğu “alveus” tabakası ile örtülüdür. Alveus lifleri medialde yassı bir bant şeklinde birbirine yaklaşarak

“fimbria hippocampi”yi meydana getirir. Fimbria hippocampinin ön ucu uncus, gyri hippocampinin beyaz cevherinde sonlanır. Arka ucu ise alveus ile birlikte Crus fornici's'i oluşturur. Alveustan gelip fimbriaya dahil olan lifler fornixin başlangıcını meydana getirirler. Forniks myelinli liflerden oluşur. Duyu lifleri hipokampusu fornixten terkeder. Cornu Ammonis'in (CA) İngilizce baş harflerini temsilen “CA” olarak da ifade edilebilen hipokampus, hücre yapısındaki değişikliklerden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 gibi farklı alanlara bölünmüştür [10].

Bunlardan CA1 subikulumu, CA4 ise dentat girusa en yakın olan alandır (Şekil 2.1.). Hipokampus CA1 bölgesi nöronları spasyal (uzaysal) öğrenme ve bellek için gereklidir. CA1 bölge nöronları entorinal korteksten veya CA3 bölgesinden bilgileri alır ve işler. Sağlam bir CA3 ve CA1- CA3 bağlantısı referans hafıza için mutlaka gereklidir. CA3 bölgesi Schaffer kollateral lifleri aracılığı ile CA1 bölgesiyle bağlantılıdır. CA1 çıktıları (output) subikulum, entorinal korteks ve prefrontal kortekse uzanır. CA1 ise iki yerden girdi (input) alır; birincisi (büyük kısmı) CA3'den gelir, çok az kısmı ise entorinal korteksten gelir. CA1 bölgesi bir hata dedektörü gibi çalışır ve kortikal bilgiler ile CA3 ve entorinal korteksten gelen bilgiler arasında uyumsuzluk olup olmadığına bakar. CA1 ve CA3'deki hücre sayıları adölesan dönemden önce daha az iken bu dönemden sonra giderek artmaktadır [11]. Bu da adölesan dönemde uzaysal öğrenme ve belleğin geliştiğini gösterir [11, 12].

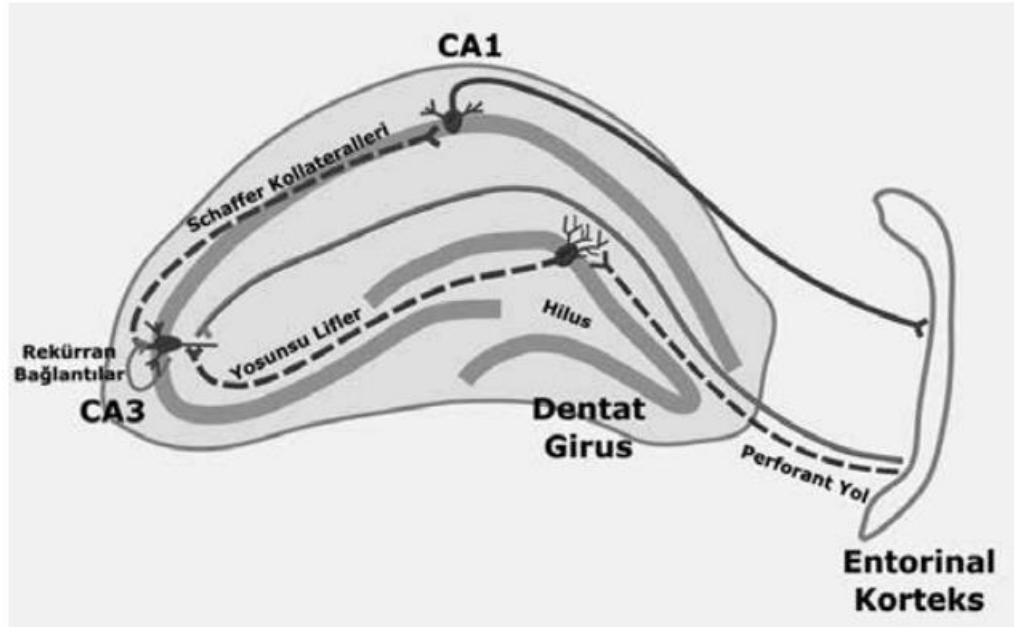
Hipokampus histolojik olarak ince ve birbiriyle bağlantılı pek çok tabakadan oluşur. Bu tabakalar literatürde yazardan yazara değişmekle birlikte genel olarak üzerinde anlaşılan 7 tabaka vardır. Bu tabakalar; alveus, stratum oriens, stratum pyramidalis, stratum lucidum, stratum radiatum, stratum lacunozum ve stratum molekulare'dir [9].



Şekil 2.1. Hipokampusun ventrikül yüzeyine doğru en dış tabakası Alveus'dur. Daha sonra CA1, CA2 ve CA3 tabakaları gelir. En içte CA4 vardır. CA1 Subikulum'a, CA4 ise dentat girus'a yakındır. Entorinal korteks ile arasında hipokampal sulkus vardır. TH: Temporal horn CA: Cornu Ammonis. <http://www.norosirurji.dergisi.org/>

Nöral bilginin işlenmesinde hipokampusun her bir bölgesinin ve bölgeler arası bağlantıların rol oynadığı bilinmektedir. Hipokampal ağın omurgasını EK, DG, CA3 ve CA1 arasındaki bağlantıları içeren trisinaptik devre oluşturur.(Şekil 2.2) DG, hipokampusta anahtar konumdadır. Kortikal girdiler hipokampusa DG'den girer. EK'den gelen uyarılar glutamaterjik eksitator sinaptik bağlantılarla DG granüler hücreleri dendritlerine yayılır (perforan yol). Trisinaptik halkanın ikinci yolu DG'nin CA3 ile yaptığı sinaptik bağlantıdır. DG granüler hücrelerinin aksonları CA3'teki piramidal hücrelerle yosunsu lifler aracılığıyla seyrek, fakat güçlü bağlantılar yapar. CA3 piramidal nöronlarından Schaffer kollateralleri ile CA1 piramidal nöronlarının dendritlerine yayılım ile trisinaptik yol tamamlanır [13]. Hipokampustaki diğer bağlantılar şöyledir: DG granüler hücreleri lokal internöronlar ile bağlantı kurar. Bu internöronlar granüler hücrelere feedback inhibisyon sağlar. EK'dan gelen perforan yol CA3 piramidal hücreleri ile de bağlantı kurar. CA3, DG'ye göre EK'dan daha yoğun ama muhtemelen daha zayıf bağlantılar alır. CA3'ten DG'ye geri dönen

bağlantılar dışında CA3 piramidal nöronların akson kollaterallerinin kendi kendini kuvvetlendiren rekürren bağlantıları bulunur. Ayrıca EK'den aksonlar CA1'e de yayılır. CA1'den ya direkt olarak çeşitli kortikal alanlara (prefrontal, anterior singulat, orbitofrontal gibi) ya da EK üzerinden bu alanlara projeksiyon vardır; yani CA1 hipokampustan çıkış bölgesidir. Böylece beynin çeşitli kısımlarından bilgi EK üzerinden hipokampusa gelir, işlenir, konsolide edilir ve bütün beynin aktivitesini etkilemek için EK'ye geri döner. Trisinaptik devre kodlama sırasında aktif rol oynar. Perforan yol ile DG'ye uğramadan CA3 ve CA1'e giden bağlantılar ise geri çağırma sırasında baskındır. DG'den yosunsu liflerle CA3'e giden projeksiyonların yeni ve ayırıcı kodların yaratılmasını yürüttüğüne ama yeniden aktivasyon için gerekli olmadığına dair kanıtlar vardır. CA3'teki rekürren bağlantılar ise oto-assosiyasyon ağı olarak çalışır. Bu bağlantılar sayesinde CA3 kendisine sunulan bilgilerin kuvvetlenip depolanmasını sağlar ve EK'den gelen aktivasyona dayanarak kayıtlı paternleri geri çağırma görevi görür [14]. Yani epizodik bellekte rol oynar. Epizodik bellek, bilgiyi geri alma işlemi (retrieval) sırasında erişilebilen içeriklerin incelenmesine olanak sağlamasının yanında, bellek içeriğinin değişmesine de olanak tanır.



Şekil 2.2 Hipokampal devrenin temelini oluşturan entorinal korteks, dentat girus, CA3 , ve CA1 arasındaki bağlantıları içeren trisinaptik devre (kesikli çizgilerle gösterilmiştir). Entorinal korteksten perforan yol ile dentat girusa giren sinyal, sırasıyla CA3 ve CA1 alanlarında entegre edildikten sonra subikulum vasıtasıyla entorinal kortekse geri döner ([TJN 22 4 149 155.pdf \(journalagent.com\)](http://TJN.22.4.149.155.pdf))

2.2. HİPOKAMPUS VE BELLEK

Santral sinir sistemi periferik reseptörlerden alınan sinyalleri ilgili kortikal alanlara iletir, algılanan bilgiyi depolayarak tüm bilişsel süreçlerin temeli olan belleği oluşturur. Bellek bütünüyle sinir sisteminin bir fonksiyonudur ve nöron ağlarında gerçekleşen plastik değişimler onun temel mekanizmasını oluşturur. Beyin, bellek işlevini uzamsal-zamansal alanda birbiriyle etkileşen çok sayıda paralel nöron ağları sayesinde gerçekleştirir [15]. Belleğin işlenmesi süresinde görev alan hipokampus; öğrenme, hafıza ve spasyal kodlama gibi yüksek beyin fonksiyonlarına aracılık etmektedir

Duyusal kısa ve uzun süreli bellek tiplerinden kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüşmesinde hipokampus rol oynamaktadır. Bu nedenle hipokampus etkilendiği Alzheimer gibi hastalıklarda uzun dönemli bellek bozulmaktadır.

Hipokampus deklaratif bellekten sorumluyken bir de non deklaratif bellek vardır. Deklaratif belleğe açık bellek, non deklaratif belleğe ise örtük bellek denilmektedir.

2.2.1. Hipokampus ve elektrofizyoloji

Hayvanlarda deneysel olarak perforan yolun elektriksel uyarımı granül hücrelerinde EPSP oluşumunu ve hücrelerin ateşlemelerini sağlar. Bu elektriksel aktivite ekstrasellüler yerleşimli bir elektrot ile kolayca kayıtlanabilir. Uygun bir elektrot, uyarımı takiben birkaç saniye sonra başlayan EPSP'lerin ve bu aktivitenin üstüne binen, ters yönde olan spike sırasındaki potansiyel değişiminin toplamını kaydeder. Alan potansiyeli denen bu aktivitenin ilk bileşeni alan EPSP (fEPSP) ve ikinci bileşeni popülasyon spike (PS) olarak bilinir ve sırasıyla sinaptik ve somatik etkinliği yansıtır. Alan potansiyelinde fEPSP bileşeninin eğimi ne kadar dikse sinaptik etkinlik o kadar güçlüdür ve PS genliği ne kadar büyükse eş zamanlı aksiyon potansiyeli üreten hücre sayısı o kadar fazladır. Büyük EPSP oluşumu ile daha fazla membran depolarizasyonu oluşur ve postsinaptik hücrenin aksiyon potansiyeli ateşleme eşiğine ulaşması kolaylaşır.

Hücrelerdeki EPSP'ler kimyasal olarak oluşur. Aktif bir presinaptik hücre, nörotransmitterleri sinapsa saldıığında, bazıları postsinaptik hücredeki reseptörlere bağlanır. Bu reseptörlerin çoğu, pozitif yüklü iyonları hücrenin içine veya dışına geçirebilen bir iyon kanalı içerir (bu tür reseptörlere iyonotropik reseptörler denir).

Sinapslarda, iyon kanalı tipik olarak sodyumun hücreye girmesine izin vererek uyarıcı bir postsinaptik akım oluşturur. Bu akım membran potansiyelinde depolarizasyon oluşturarak, EPSP'de artışa neden olur [16].

Sinaptik etkinliğin göstergesi; EPSP ve somatik etkinliği gösteren PS'lerin düzenlenmesiyle uzun dönem güçlenme, uzun dönem baskılanma ve metaplastisite oluşturulabilir. Bunlarda sinaptik plastisite formlarıdır.

Nörobilimde, uzun vadeli güçlendirme (UDG), sinapsların kalıcı bir şekilde güçlenmesidir. Uzun süreli depresyon (UDB), uzun paternli bir uyarının ardından nöronal sinapsların etkinliğinde aktiviteye bağlı bir azalma ya da nöronal budanmadır. Metaplastisite sinaptik plastisitenin modülasyonunda rol oynamaktadır.

2.3. NÖRONAL PLASTİSİTE

Sinir sistemi sinir hücresi(nöron) ve glia hücreleri olmak üzere iki farklı hücre tipinden oluşur. Nöron hücreleri glia hücrelerine göre sinir sisteminde daha az miktarda bulunmaktadır. Nöronların işlevsel görevi sinyallerin işlenmesi ve iletilmesidir; bunu da sinapslar yoluyla gerçekleştirmektedir. Glial hücreler doğrudan sinyalizasyona etki etmemekle birlikte sinir hücrelerinin ortamını kontrol etmede kritik roller oynarlar; sinir hücresi yapısını desteklerler ve miyelin şeklinde yalıtım görevi görürler. Hücre gövdesinden çıkan uzantılar , aksonlar ve dendritler olarak sınıflandırılabilir. Ortalama olarak somadan bir ila dokuz dendrit ortaya çıkar ve daha sonra her nöron popülasyonu için belirli özelliklere sahip yüksek derecede dallanmış bir dendritik ağaca bölünür. Dendritler düzensiz dış hatları, dalları boyunca azalan çapları, dallar arasındaki keskin açılar ve ultrastrüktürel özellikleri ile aksonlardan morfolojik olarak ayrılırlar [17].

Aksonlar pürüzsüz görünüşleri ve tüm boyutları boyunca tekdüze çapları ile dendritlerden ayrılır. Genellikle somadan genişleyen ilk segmentte ancak bazen birincil dendrit seviyesinde ortaya çıkarlar. Akson ve dalları miyelin kılıfı olan bir kılıfla çevrelenebilir.. Miyelin kılıfları glial hücreler tarafından oluşturulur ve izolatör görevi görür.

Bir nöronun oluşturduğu bağlantılar olağanüstü derecede büyük sayıda olabilir. Tek kortikal nöronlar 10.000'den fazla giriş sinapsından sinyal alırken serebellumdaki

Purkinje hücreleri dendritlerin yüzeyine 100.000'e kadar girdi alır [18]. Dendritik dikenler bir dendritten çıkıntı yapan ve bir sinapsın yarısını oluşturan diğer yarısı presinaptik terminal olan küçük membranöz çıkıntılardır. Dikenler ince bir omurga boynu aracılığıyla ana dendrite bağlanan soğanlı bir kafaya sahiptir. Bu kısım nöronların ana alıcı alanını oluşturur. Afferent bilgi dikenlerine ve dendritlere yanıt vermek için ya önceki nöronla (elektrik sinapsı veya boşluk kavşağı) doğrudan bağlantılara sahiptir ya da gelen kimyasal sinyali bir elektrik sinyaline dönüştürmek için gerekli olan reseptörleri ve diğer proteinleri (kimyasal sinaps) ifade eder. Kimyasal sinapslarda ifade edilen postsinaptik dansite (yoğunluk) (PSD), sinaptik yarıktaki nörotransmittere hızla yanıt vermek için nörotransmitter reseptörlerini yoğunlaştırır ve düzenler.

Nöroplastisite nöral aktivitelerdeki ve sinapslardaki değişiklikler anlamına gelir dolayısıyla hem sinaptik plastisiteden hem de sinaptik olmayan plastisiteden oluşur. Aslında bir aksiyon potansiyelinin oluşturulması nöronal aktivitenin temel çıktısıdır. Aksiyon potansiyellerini ateşleme kapasitesi uyarıcı sinaptik dinamiklere, inhibe edici kontrole ve iç zar özelliklerine bağlıdır. Hipokampusun CA1 alanında ve DG'nin olgun granül hücrelerinde, postsinaptik potansiyellerin herhangi birinin (eksitator postsinaptik potansiyel - inhibitör postsinaptik potansiyel) yokluğunda bile PS potansiyeli gözlenir. Bu durum DG'de nöronların çıktısının sinaptik güçteki değişikliklerden bağımsız bir süreçle güçlendirilebildiği belirli bir nöroplastisite formunun kurulduğuna işaret etmektedir [19, 20].

2.3.1. Sinaptik Plastisite

Bilgi, merkezi sinir sisteminde, nöronlar arası sinyalleşme için son derece özelleşmiş yapışkan bağlantı noktaları olan sinapslarla işlevsel olarak bağlanan nöron ağları aracılığıyla kodlanır.

Sinaptik plastisite , iletim etkinliğini sinapsların değiştirebilme yeteneğidir. Konsolide edilirken diğer sinapslar zayıflatılır ve budanır. Sinaptik plastisite öğrenmenin altında yatan nörofizyolojik mekanizmadır ve bu nedenle beynin değişen çevresel taleplere yanıt olarak yeniden düzenleme ve adaptasyon yeteneğini belirler.

Beynin onlarca yıl sürececek deneyimleri sonsuz sayıda anıya dönüştürme kapasitesi sinaptik etkinin uzun süreli aktiviteye bağlı değişikliklerine bağlanmıştır. Bu fikirler teorik olarak ilk kez 1940'ların sonlarında Hebb [21] ve Konorski [22] tarafından geliştirildi. İki bağlı sinir hücresi aynı anda aktif olduğunda sinapsın güçlendiği anlamına gelen bir hipotez ortaya koydular.

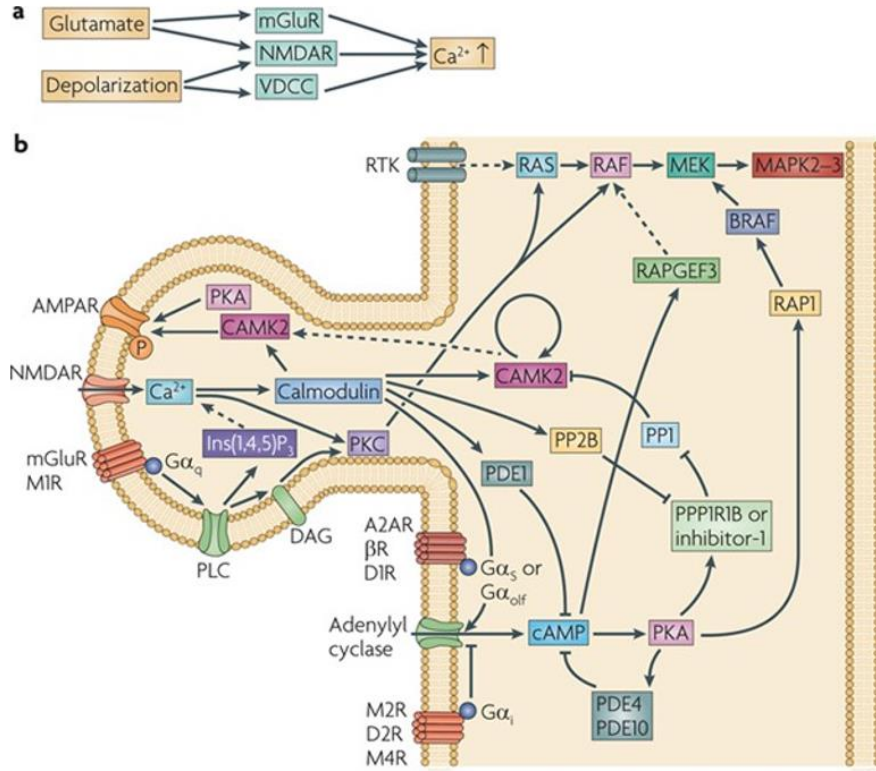
2.3.1.1. Sinaptik Plastisitenin Moleküler Temeli

Çoğunlukla uyarıcı, glutamaterjik sinapslardaki çoğu indüksiyon protokolünün iki ana özelliği, glutamatın presinaptik salınımı ve postsinaptik depolarizasyonudur, bunlar birlikte postsinaptik hücrede birkaç mekanizma yoluyla hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda bir artışa yol açar. Kalsiyum transportunu , voltaj kapılı Ca kanalları, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazolepropionate (AMPA) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) gibi ligand kapılı kanallar hücre dışından; protein kinaz membran enzim reseptörleri ve metabotropik glutamat reseptörü (mGlu-R) gibi metabolik etkili reseptörler hücre içinden ,sağlar . Nöronlar kalsiyum-kalmodulin bağımlı kinaz II (CAMKII) , protein kinaz C (PKC) ve kalsinörin gibi hücre içi kalsiyum düzeyine duyarlı enzimlere sahiplerdir. Nöron içi kalsiyum deposu endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organellerde bulunur ve hücre içi ve hücre dışı kaynaktan Ca^{+2} mobilizasyonu Ca^{+2} duyarlı enzim aktivitesini değiştirir. Hedef proteini defosforilleyen fosfataz enzimleri, fosforilleyen kinaz enzimlere göre Ca^{+2} 'a daha duyarlıdır; böyle hücre içi Ca^{+2} seviyesindeki küçük artışlar ancak fosfatazları uyarabilir. Dolayısıyla sinaptik gücün hangi yönde değişeceğini belirleyen temel faktör kalsiyum konsantrasyonundaki artışın büyüklüğü ve böylece kinaz/fosfataz enzim aktiviteleri arasındaki dengedir [23]. Bununla birlikte, Ca^{+2} konsantrasyonu tek başına plastisitenin yönünü tahmin etmek için her zaman yeterli olmayabilir. Bazı hücre türlerinde Ca^{+2} akışının kaynağı, UDB veya UDG'nin gelişip gelişmediğini etkiler; Örneğin UDB, metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR'ler) veya L-tipi Ca^{+2} kanallarının aktivasyonunu gerektirirken, UDG genellikle NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörüne bağımlıdır [23]. Ayrıca transmembran reseptörleri yoluyla aktive edilen çeşitli protein kinazlar ve fosfatazlar, sinaptik plastisitenin indüksiyonunda veya korunmasında rol oynarlar.

CAMK2 - Ca^{+2} bağımlı kalmodulin ile aktive edilir. Hipokampal ve neokortikal UDG için gereklidir. Protein kinaz A (PKA), striatuma UDG indüksiyonu için ve

hipokampusta NMDA-bağımlı UDG'nin uzun süreli formunun indüksiyonu için gereklidir (geç faz UDG olarak bilinir). PKC, serebellumda UDB'nin ve hipokampüste mGluR'ye bağımlı UDG'nin indüksiyonu için gereklidir. Ek olarak, protein kinaz M ζ (PKMy) gibi atipik PKC formları, indüksiyon için gerekli olmamasına rağmen, UDG'in kalıcılığında rol oynar. Transkripsiyon ve translasyon gerektiren sinaptik plastisite formlarında yer alan başka bir kinaz, mitojenle aktive olan protein kinaz 2'dir (MAPK2; aynı zamanda ERK2 olarak da bilinir). MAPK2'nin inhibisyonu bazı UDG formlarını bozar; tersine, bazı UDG tiplerini takiben MAPK2 seviyeleri artırılır [24].

Kinazların artmasıyla aktive olan aşağı akış moleküllerin aktivitesi birbirini etkileyerek bir veya birden çok transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu ve böylece bu faktörlerin kontrol ettiği gen anlatımını değiştirir. Değişen gen anlatımları sinaptik gücü uzun süreli olarak değiştirecek olan kalıcı ayarlamaların oluşmasını sağlar. Bu sayede sinaptik güç değiştirilmiş olur. Bu sürecin birinci bölümü olan protein anlatımı, protein sentez inhibitörlerinden etkilenmez ve sinaptik güçte geçici bir değişmeye karşılık gelir. Kalıcı bir değişme için protein sentezinin olduğu ve protein sentez inhibitörleri ile İnhibe edilebilen plastisitenin geç dönemidir.(Şekil 2.3)



Şekil 2.3 Sinaptik plastisitenin altında yatan sinyal yolları <https://www.semanticscholar.org/paper/Modelling-the-molecular-mechanisms-of-synaptic-Kotaleski-Blackwell>

a: Postsinaptik nöronun presinaptik glutamat salınımı ve depolarizasyonu, postsinaptik hücrede Ca^{2+} yükselmesine yol açar. NMDAR'ların (N-metil-D-aspartat reseptörleri) ve metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR'ler) aktivasyonu için glutamat gereklidir ve NMDAR'lar ve voltaja bağlı Ca^{2+} kanallarının (VDCC'ler) aktivasyonu için depolarizasyon gereklidir. Kullanılan belirli mekanizma hücre tipine bağlıdır. **b:** Kinaz aktivasyonuna ve AMPAR (α-amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazol-propiyonat reseptörü) fosforilasyonuna yol açan sinyal yolları. Burada bilinen yolların yalnızca bir alt kümesi gösterilmektedir ve bu şekilde gösterilen yolların tümü tüm nöronlarda yer almamaktadır. Ca^{2+} , AMPAR GluR1 alt birimini fosforile eden Ca^{2+} -kalmodüline bağımlı protein kinaz 2'yi (CAMK2) aktive ederek, artan sayıda fonksiyonel AMPAR'a yol açar. CAMK2, iki bitişik alt birim Ca^{2+} -kalmodüline bağlandığında meydana gelen otofosforilasyon ile kalıcı olarak aktive edilebilir. Bu kalıcı olarak aktif CAMK2 formu, en güçlü şekilde hipokampal uzun vadeli potansiyasyonda (UDG) rol oynar. Dopamin D1 reseptörleri (D1R'ler), β-adrenerjik reseptörler (βR'ler) 110,111 ve uyarıcı G proteinine (GS) veya koku alma G proteinine (Golf) bağlı adenosin tip 2A reseptörü (A2AR), adenilil siklazı aktive ederek UDG'ye katkıda bulunur, diğer dopamin D2 reseptörleri (D2R'ler) ve muskarinik asetilkolin reseptörleri (M2R ve M4R) adenilil siklazı inhibe eder. Adenilil siklaz tarafından üretilen siklik AMP, daha sonra AMPAR GluR1 alt birimlerini ve protein fosfataz 1 düzenleyici alt birim 1B'yi (PPP1R1B; DARPP32 olarak da bilinir) veya inhibitör-1'i fosforile eden protein kinaz A'yı (PKA) aktive eder. Bunlar, fosfataz aktivitesini azaltır ve hem AMPAR fosforilasyonunun hem de AMPAR'ın membrana sokulmasının kalıcılığına veya güçlendirilmesine izin verir. Bazı muskarinik asetilkolin reseptörleri (M1R'ler) ve mGluR'ler, diasilgliserol (DAG) ve inositol-1,4,5-trisfosfat (Ins (1,4,5) P₃) üreten fosfolipaz C'ye (PLC) bağlanır. Tipik PKC formları, hem Ca^{2+} hem de DAG'ye bağlanarak aktive edilir. MAPK2-3 (mitojenle aktive olan protein kinaz 2-3; ERK1 – ERK2 olarak da bilinir), RAS – RAF – MEK (MAPK – ERK kinaz) yolu aracılığıyla reseptör tirozin kinazları (RTK'ler) içeren bir yolla aktive edilir ve kalıcı sinaptik plastisite formlarının altında yatan gen transkripsiyonu ve protein anlatımı için gereklidir. Gα_i, inhibe edici G proteininin α-alt birimi; PDE, fosfodiesteraz; PP, protein fosfataz.

Sinaptik Plastisite Formları

Nöron havuzuna gelen presinaptik uyarımın frekansına göre alan potansilleri büyüyebilir ya da küçülebilir. Bu büyüme / küçülme plastisite için bir gösterge olarak değerlendirilir. Çoğunlukla iki bileşenin aynı yönde değişmesi beklense de dentat girusun olgun granül hücreleri sinaptik bileşende bir değişme olmasa da somatik bir güçlenme gösterebilir. Sinaptik güçteki değişikliklerden bağımsız bir şekilde nöron çıktısının kuvvetlendirilebileceği özel bir nöroplastisite biçimi olduğu belirtilmiştir. [19, 20]

Bellek oluşumunun deneysel modelleri geliştirildikçe, deneyime bağlı sinaptik değişimin temel bir öğrenme ve hafıza mekanizması olduğu görüşü, sinirbilimde hakim olmaya başlamıştır. Bu görüş sinaptik plastisite ve hafıza hipotezi olarak tanımlanmaktadır [25]. Öğrenme ve hafızanın altında yatan süreçler hakkında, sinapsların beyinde ana bilgi depolama alanı olduğu görüşü hakimdir.

Sinaptik değişim ve bellek depolanması arasındaki bağlantının deneysel temeli, in vitro ve in vivo elektrofizyolojik kayıtlar ile sinaptik etkinlikteki aktiviteye bağlı uzun süreli değişiklikler ortaya koyulduğu için güçlenmiştir. Bunlar arasında tipik olarak memeli ve omurgasız sinapslarında çalışılan uzun dönemli güçlenme (UDG) ve uzun dönemli baskılanma (UDB) bulunur [26].

1.Uzun dönemli güçlenme (UDG)

İlk bulunan ve en çok çalışılan plastisite formu UDG'dir. Hebbian öğrenme teorisi, yani "birlikte ateşleyen hücreler birbirine bağlanır" kuralı ile uyumlu olan plastisite formudur [27]. Terje Lomo tarafından, ilk olarak tavşan hipokampusunda gösterilmiştir [28]. Daha sonra serebral korteks, serebellum, amigdala gibi beyin yapıları başta olmak üzere, eksitator sinapsların UDG anlatımı yapabileceği gösterilmiştir. UDG, presinaptik ve postsinaptik eş zamanlı depolarizasyonu gerektiren Hebbian ve gerektirmeyen non-Hebbian UDG olarak da sınıflandırılabilirdiği gibi; geliştiği sinapstaki reseptörün katkısına göre NMDA-bağımlı ve NMDA-bağımsız olmak üzere de sınıflanabilir [29].

Bir afferent yolağın yüksek frekanslı elektriksel uyarımıyla postsinaptik hücrede UDG oluşması, zaman bağımlı fazlar gösterebilir. Yüksek frekanslı uyarımın verildiği dönemde hücre içine Ca^{+2} iyon girişi ve Ca^{+2} duyarlı kinazların aktivasyonu gerçekleşir. EPSP eğimi ve PS genliği tetanizasyon sırasında bariz bir

şekilde artar ve tetanizasyon bittikten hemen sonraki 1-5 dk'lık dönem post-tetanik güçlenme (PTG) dönemidir. Bu kısa ömürlü sinaptik plastisite “short-term potentiation, STP” olarak bilinir). Presinaptik aracı madde salımındaki artışla beraber Ca ve kalmodulin bağımlıdır. Eğer Ca yükselmesini PKC ve CAMKII gibi kinazların fosforilasyonu takip ederse UDG1 veya erken UDG deneni form oluşur. UDG1, eğer ek bir mekanizma ile desteklenmezse azalarak yaklaşık 4 saat içinde söner. Eğer kinaz aktivasyonu, AMPA reseptör proteinlerin hücre membranında tutulmasına neden olursa UDG1, daha kalıcı formu olan UDG2' ye ve nihayet gen ekspresyonunda artışa neden olursa saatlerce/günlerce devam edebilen UDG3 formuna dönüşür. Bu UDG fazlarının oluşma ve devam etme süreleri daha kısa da olabilir.

UDG, dört önemli özgülüğe sahiptir. Bunlar; (1) girdiye özgüdür (input-spesifik), yani oluştuğu sinapstan başka bir sinapsa yayılmaz, (2) assosiyatiftir, yani bir afferent lifin UDG oluşturmamayan girdisi, bir başka afferentin güçlü girdisiyle eş zamanlı olduğunda UDG oluşturur, (3) iş birliği gösterir (cooperative), yani birden çok afferentin UDG oluşturmamayan girdileri, eş zamanlı uygulandığında UDG oluşturabilir ve (4) kalıcıdır. Bu özellikleri ile UDG, öğrenmenin pek çok özelliği ile de örtüşür [30].

Fonksiyonel ve yapısal plastisitenin korunması için gereken proteinler UDG'nin tetiklenmesiyle sentezlenir. UDG oluşumunda en önemli kinazlardan biri olan Kalsiyum / kalmodulin bağımlı kinaz II (CaMKII) dendritik spinlerde çok yüksek konsantrasyonlarda bulunur. CaMKII, hücre içi diğer kinazların fosforilasyonuna yol açtığı gibi AMPA reseptörlerinin de fosforilasyonuna neden olur. PKA, CaMKIV, extracellular signal-regulated kinase (ERK) ve diğer sinyal molekülleri mRNA'dan veya nükleer transkripsiyonla lokal dendritlerde protein sentezini başlatır [31, 32]. Sonrasında, cAMP response element-binding protein (CREB) dahil olmak üzere transkripsiyon faktörleriyle etkileşimler olur. Kinazlar ayrıca iGlu reseptörleri gibi, tüm mGlu reseptörlerini de fosforilleyerek modüle edebilir [33].

2. Uzun dönemli baskılanma (UDB; long-term depression)

NMDA reseptöründen nispeten yavaş ve az kalsiyum iyon girişi, sinaptik güçte UDG yerine uzun-dönemli baskılanmayı (UDB) indükler. Genç hayvanların sinapsları,

yaşlılara göre daha kolay UDB anlatımı gösterirler. UDB, UDG'nin özelliklerinin birçoğunu sergiler [38, [34]. Presinaptik aksonların düşük frekanslı stimülasyonu UDB'yi indüklemek için yaygın olarak kullanılır. Tipik olarak bu protokoller, 5-15 dakika boyunca 1 ila 3 Hz'de stimülasyonu içerir. Bu stimülasyon, zayıf bir postsinaptik depolarizasyona ve NMDA-R'lerin zayıf ve tekrarlayan aktivasyonuna bağlı olarak postsinaptik kalsiyumda zayıf fakat uzun süreli bir artışa neden olur. NMDAR'a bağımlı UDB'nin oluşmasında kalsinörin ve protein fosfataz 1 (PP1) aktivitesi önemli rol oynar [35]. Kalsinörin, CaMKII'den kalsiyum / kalmodulin kompleksi için çok daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu nedenle kalsinörin, UDB için tetikleyici olan kalsiyumdaki zayıf bir artışla aktive olur. Bu iki fosfataz, AMPA reseptörlerinin fosforilasyon durumlarını etkileyerek de UDB'de rol oynar [36, 37].

3. Metaplastisite

UDG'nin indüklenmesinden önceki sinaptik aktivite düzeyi, sinapsların UDG anlatım yeteneğini belirleyen en önemli faktördür. Bu plastisite düzenleme şekli, metaplastisite olarak bilinir ve sinaptik plastisitenin plastisitesi şeklinde ifade edilir [38, 39].

UDG oluşturmadan önce, sinapsları oluşturulacak UDG'ye hazırlama işlemi “priming” veya astarlama olarak bilinir. Kimyasal astarlayıcılar arasında katekolaminler, GABA, asetilkolin, sitokinler ve bazı hormonlar sayılabilir. Elektriksel astarlama ise, UDG oluşturulmadan önce verilen düşük frekanslı uyarımlar ile sağlanabilir. Tek başına sinaptik etkinliği değiştirme yeteneği bulunmayan frekanslardaki elektriksel uyarımlar, sonrasında verilen yüksek frekanslı uyarımın UDG indükleyici etkisini değiştirirler. Astarlama uyarımının, aynı sinapstaki UDG'yi değiştirme yeteneği homosinaptik metaplastisite; komşu sinapsların UDG'sini değiştirme yeteneği ise heterosinaptik metaplastisite olarak tanımlanır.[40] Homosinaptik metaplastisite glutamaterjik sinapslarda NMDA reseptör-aracılı ya da mGluR-aracılı olarak iki farklı şekilde meydana gelmektedir.

NMDA-bağımlı metaplastisitenin oluşmasında adenosin A2 reseptörleri, p38-MAPK ve protein fosfatazların aktivasyonu görev alır. NMDA aktivasyonunun, hem UDG'de olduğu gibi sinaptik gücün kalıcı bir şekilde yükselmesi, hem de metaplastisitede olduğu gibi sonrasında oluşacak olan UDG'nin inhibe edilmesi için

gerekli olması, astarlama uyarılarının UDG inhibisyonuna neden olmak yerine UDG oluşma eşiğini yükselttiği belirtilmektedir [41] .

Astarlama bazal sinaptik güçte saptanabilen bir değişikliğe neden olmadığında bile UDG inhibe edilebildiğinden, astarlamanın etkisi basitçe UDG'nin doyunluğu üzerinden açıklanamaz [42].

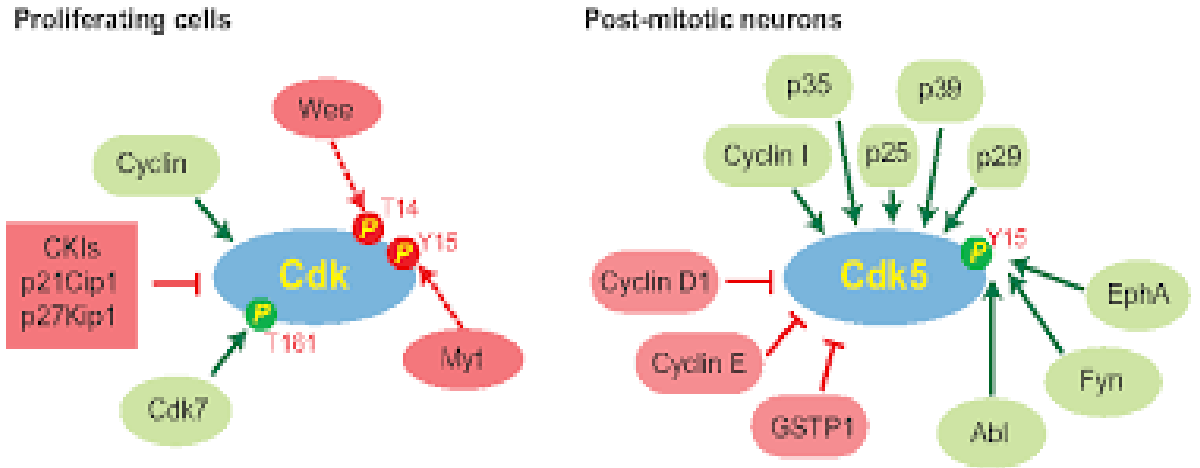
mGluR aracılı metaplastisitede ise UDG oluşumu ve kalıcılığı artmaktadır. Bu tür metaplastisite özellikle CA1 alanındaki eksitator nöronlarda belirgindir. Input-spesifik değildir ve Ca^{+2} ile aktive olan K^{+} akımının uzun süreli down-regülasyonu, bu tür metaplastisiteden sorumlu tutulmaktadır. Bu azalmayla birlikte fosfolipaz C, PKC veya hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımı içermeyen non-klasik bir mGluR sinyal yolağı eşlik eder [43].

2.4. CDK5 (Siklin Bağımlı Kinaz)

Sikline bağımlı kinazlar (Cdks), aktive edilmek üzere spesifik siklin alt birimleri ile birleşen Ser/Thr protein kinazlarıdır. Bu aile şu anda 11 klasik Cdk (Cdk1 – Cdk11) ve iki yeni aile üyesi (Cdk12, Cdk13) içermektedir [44].

Sikline bağımlı kinazların bir aile üyesi olan sikline bağımlı kinaz-5 (Cdk5), merkezi sinir sisteminde çok önemli bir rol oynar. Embriyogenez sırasında, Cdk5 beyin gelişimi için vazgeçilmezdir ve yetişkin beyinde, öğrenme ve hafıza oluşumu gibi daha yüksek bilişsel işlevler dahil olmak üzere çok sayıda nöronal süreç için gereklidir. Cdk5, akrabalarıyla oldukça homolog olmasına rağmen, benzersiz bir Cdk ailesi üyesidir [2, 45]. Cdk5 mRNA ve protein ; böbrek, testis ve yumurtalıkta eksprese edilir, ancak açık ara en yüksek ekspresyon seviyesi ,gelişmekte olan ve yetişkin sinir sistemlerinde postmitotik nöronlardadır [46].

Diğer Cdk'lerin aksine, Cdk5 çoğalan hücrelerde hücre döngüsü ilerlemesine katılmaz, ancak mitoz sonrası nöronlarda düzensizleştğinde hücre döngüsünün çeşitli bileşenlerini anormal şekilde aktive ederek hücre ölümüne yol açar [45, 47].

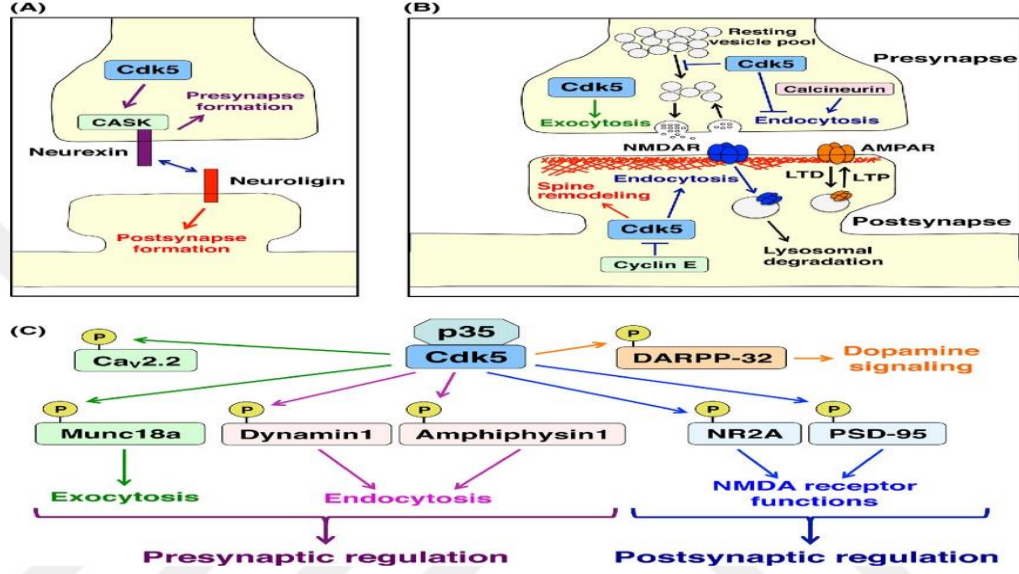


Şekil 2. 4. Cdk5 (sağda) ve Cdk5 dışındaki Cdk ailesi üyelerinin düzenleyicileri. Çoğalan hücrelerde, bu sikline bağımlı kinazlar, klasik siklinler tarafından aktive edilir. (Sagda) CDK 5in aktivatörleri (yeşil) ve inhibitörleri (kırmızı) gösterilmiştir. <http://europepmc.org/article/PMC/403893>

Cdk5, mitotik hücrelerde bulunur, ancak aktivitesi, nörona özgü aktivatörler p35 ve p39'un ekspresyonu nedeniyle çoğunlukla nöronal hücrelerle sınırlıdır [2]. Cdk5, tüm hücrelerde her yerde eksprese edilmesine ve sikline bağımlı kinaz ailesinin (CDK'ler) diğer üyeleriyle yüksek derecede homolojiye sahip olmasına rağmen, aktivitesi spesifik olarak post-mitotik nöronlarda bulunur, çünkü aktivatörleri p35 ve p39, birincil olarak nöronlarda eksprese edilir. Cdk5, nörit büyümesi ve nöronal göçten sinaptik aktiviteye ve hücre sağkalımına kadar çok çeşitli nöronal fonksiyonlarda yer alan çok fonksiyonlu bir S/T protein kinazdır [48].

Cdk5 eksikliği olan fareler ve p35 eksikliği olan farelerin fenotiplerinde çarpıcı farklılıklar vardır. Cdk5-null mutantları, serebral korteks, hipokampus ve serebellumda daha şiddetli bir laminasyon bozulması gösterir. Ek olarak, Cdk5-null fareler perinatal dönemde ölürken, p35-null fareler yaşayabilir. Bu tutarsızlıklar, p39 gibi diğer Cdk5 aktivatörlerinin işlevine bağlanmıştır. p39 ve p35'in rollerini anlamak için p39-null fareler ve p35/p39 bileşik mutant fareler ürettiğinde p39 null fareler belirgin bir saptanabilir anormallik göstermezken, p35-/-p39-/- çift mutantlar perinatal ölümcüldür. Bu veriler, sinir sisteminin gelişimi sırasında Cdk5 aktivitesi için p35 ve p39'un gerekli olduğunu kuvvetle göstermektedir. Bu nedenle, p35 ve p39, muhtemelen Cdk5'in tek aktivatörleri olmasa da başlıcalarıdır [50].

25 kDa'lık bir protein olan p25, kalsiyum ile aktive olan bir proteaz olan kalpain tarafından üretilen p35'in bir proteolitik fragmanıdır. Kısa ömürlü (yarı ömrü 20 dakikadan az olan) p35'in aksine, p25 kolayca bozulmaz ve p35'ten yaklaşık iki ila üç kat daha fazla yarı ömre sahiptir. Ayrıca, p25'in Cdk5'e bağlanması onu aktive eder, hücresel konumunu değiştirir ve substrat spesifikliğini değiştirir. Bu nedenle, bu bölünmüş fragman, p25, Cdk5'i, genellikle nörotoksisite ile ilişkilendirilen hiperaktif durumda tutar [3, 49].



Şekil 2. 5. Cdk5'in sinaptik plastisite üzerindeki etkileri

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/dgd.12138>

Sikline bağımlı kinaz-5'in hem presinaptik hem de postsinaptik bölgelerde işlev gördüğü bilinmektedir.(Şekil 2.5)Presinapsta, Cdk5, sinaptik veziküllerin geri dönüşüm havuzu boyutunun belirlenmesinde rol oynar [50, 51] ve inhibisyonun, presinaptik aktivasyon yoluyla, nörotransmitter salınımını arttırdığı belirtilmiştir. [50] Öte yandan, Cdk5, bir N-tipi kalsiyum kanalının por oluşturucu alt birimi olan Cav2.2'yi fosforile eder ve presinaptik terminallerdeki kenetlenmiş veziküllerin sayısını artırarak, nörotransmitter salınımının kolaylaşmasına neden olur [52] .Bu, Cdk5'in nörotransmitter salınımının çoklu adımlarını farklı şekilde düzenlediğini gösterir. Sikline bağımlı kinaz-5'in, sinaptik veziküllerin hem ekzositozunu hem de endositozunu kontrol ettiği, bilinmektedir. Cdk5, SNARE kompleksi için bir düzenleyici olan Munc18a'yı fosforile eder ve SNARE kompleksinin bir bileşeni olan Munc18a/Syntaxin1a kompleksinin ayrışmasını destekler. Endositoz sırasında, Cdk5, Dynamin1 ve Amphiphysin1'i fosforile eder ve bu proteinler, Kalsiyuma

duyarlı bir fosfataz olan Kalsinörin tarafından de-fosforile edilir [53, 54]; Bu proteinlerin Cdk5 aracılı fosforilasyonunun endositozdaki fonksiyonlarını negatif olarak düzenlediği rapor edilmiştir. Cdk5 ve Kalsinörin'in aracılık ettiği fosforilasyon döngüsünün hücrelerde endositozun uygun şekilde düzenlenmesinde önemli roller oynadığını düşündürür. NR2A'nın Ser1232'de Cdk5 tarafından fosforilasyonu, hipokampal CA1 piramidal nöronların iskemi aracılı hücre ölümü ile ilişkilidir. Cdk5 ayrıca, klatrin aracılı endositozda yer alan bir adaptör protein olan NR2B ve AP-2 arasındaki bağlanmanın düzenlenmesi yoluyla NR2B'nin hücre yüzeyi seviyelerini kontrol eder [6]. Cdk5, NR2B'nin endositozu ve bozulmasını artırır ve böylece hipokampusta NMDA reseptör aracılı akımı baskılar [5]. İlginç bir şekilde, Cyclin-E sadece çoğalan hücrelerde değil aynı zamanda yetişkin beyinlerinde de yüksek oranda eksprese edilir ve Cdk5'in sinaptik fonksiyonlarını negatif olarak düzenler. Yetişkin beyinlerinde Cyclin-E'nin koşullu nakavt edilmesi, NMDA reseptörlerinin hücre yüzeyi ekspresyonunun azalmasına ve hipokampal CA1 piramidal nöronlarda UDG'nin bozulmasına neden olur. Olgun sinapslardaki işlevine ek olarak, Cdk5'in sinaptogenezde rolleri olduğu ileri sürülmektedir. Sinaps oluşumu, birkaç sinaptik hücre yapışma molekülü ve presinaptik Neurexins ve postsinaptik Neuroligins gibi salgılanan moleküller tarafından kontrol edilir [55, 56]. Bir MAGUK ailesi üyesi olan CASK, Neurexins ile etkileşime girer ve bir Cdk5 substratıdır. [57] CASK'ın presinaptik terminallere alınması ve sinaps oluşumu için CASK'ın Cdk5 aracılı fosforilasyonu gereklidir [58]. EphA4 aracılı dendritik omurganın yeniden şekillenmesinde Cdk5'in katılımıyla birlikte ele alındığında [59] Cdk5'in sinaps oluşumu ve plastisite için merkezi bir düzenleyici olduğu görülmektedir.

İn vitro nörofizyolojik yaklaşımlar kullanılarak Cdk5'in sinaptik plastisitedeki rolü araştırılmıştır. Cdk5 aktivitesinin inhibisyonu, bir çalışmada NR2A'nın Cdk5 tarafından fosforilasyonunu azaltarak akut beyin dilimlerinde N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aracılı akımları azalttığı ve başka bir çalışmada da benzer şekilde CA1 hipokampal nöronlarda NMDA reseptörü aracılı uzun süreli güçlenmeyi (UDG) azlattığı belirtilmiştir. Cdk5'in aktivatorü olan p35'ten yoksun farelerde UDB'nin uyarılması ve uzamsal öğrenmenin bozulduğu bildirilmiştir [7]. Öte yandan ilişkisel öğrenme ve korku koşullandırması sırasında Cdk5 aktivitesi birliktelik gösterir [8]. Bu gözlemler Cdk5 aktivitesinin in vivo sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza için çok önemli olduğunu göstermektedir [60].

Roscovitine, çeşitli kanser tedavilerinde ve glomerülonefrit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan; Cdk5 inhibitörü ,pürin analogudur[61]. ATP-bağlanma bölgesinde doğrudan rekabet yoluyla sikline bağımlı kinazları (CDK'ler) inhibe eder. [62]

2.5.TAU PROTEİNİ VE SİNAPTİK PLASTİSİTE

Tau proteinleri çözünürlüğü yüksek proteinlerdir, 16 ekzon içeren ve 17q21 kromozomuna yerleşmiş mikrotübül-ilişkili protein tau (MAPT) geni tarafından sentezlenir. Alternatif birleşme yolu ile bu genden bazıları sadece embriyonik ve erken post-natal dönemde olmak üzere, farklı tau izoformlarını üretir. Ekzon 10 mikrotübül bağlanma alanını oluşturan 4-tekrar dizilerinden birini kodlayarak tau4R izoformunu oluştururken ekson 10'a sahip olmama 3-tekrar dizili tau-3R izoformunun oluşması ile sonuçlanır. Tau-3R izoformu başlıca erken gelişme döneminde; tau-4R izoformu ise olgun nöronlarda bulunur [63]. Tau proteininin başlıca fonksiyonu, hücre iskeletinin bileşenlerinden olan mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlamaktır [64]. Tau'nun 244-368 arası aminoasit bölgesinin mikrotübüllere direkt olarak bağlandığı ve 151-243 ve 369-400 dizi bölgelerinin ise mikrotübüllere bağlanma afinitesini artırdığı ileri sürülmektedir [65]. Tau-4R'nin mikrotübüllere afinitesi tau-3R izoformuna göre daha yüksektir önceden bağlanmış tau-3R izoformunu mikrotübülden ayırır [66] Son çalışmalar, tau proteininin fizyolojik sinaptik plastisitenin oluşmasında katkısı olduğunu göstermektedir [67] Tüm proteinlerde olduğu gibi tau proteinlerinin de yapısal ve işlevsel özelliklerini kazanması için translasyon aşamasında ya da translasyon bittikten sonra bazı modifikasyonlara uğraması gerekir. Tau proteini için en yaygın post-translasyon mekanizması fosforilasyondur ve fosforilasyondaki artış bu proteinin mikrotübül afinitesini azaltarak hücre iskeletinin istikrarsızlaşması ile sonuçlanır [68]. Tau proteininin 2-3 rezidüsünden fosforlanması, onun mikrotübül stabilize edici işlevi için gereklidir ve bu sinaptik plastisitenin kalıcılığı açısından önemlidir [69] ama aşırı fosforlanma tau'nun fizyolojik etkisini bozar [70] En uzun tau proteini 80'den fazla kalıttan fosforillenebilir ve bu kalıtlar ya GSK3, CDK5, p38-MAPK ve JNK gibi piroline yönelen kinazlar ya da PKA, PKC, CaMKII gibi proline yönelmeyen kinazlar tarafından fosforillenir [63]. Bu kinazlar içinde Cdk5'in hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında tau fosforilasyonunun düzenlenmesindeki rolünün

önemi vurgulanmaktadır. Tau-knock-out farelerin normal hipokampal UDG [71, 72] ve anormal UDB [73] göstermesi taunun fizyolojik sinaptik fonksiyon için önemine işaret eder. Bir çalışmada ise tau-knockout farelerde UDB normal ama UDG defektli bulunmuştur [74]. Ancak bu çalışmalar, tau proteininin anlatımında bir bozukluk olduğunda sinaptik fonksiyonun nasıl değiştiğini açıklasa da sinaptik plastisitenin (ve metaplastisitenin) gelişmesine nasıl bir tau fosforilasyon kalıbının eşlik ettiği hakkında bilgi vermez. Tau'nun fizyolojik fosforilasyonu dentrit ve spinlere taşınması , orada NMDAR-NR2B alt biriminin fosforilasyonu [75] ve sinaptik proteinlerle etkileşerek sinaptik plastisiteye katkı sağlaması için gerekli olabilir [76]. Nitekim UDG'nin depotansiye edilme sürecine tau'nun ser416 epitopunda artmış ama thr231 epitopunda azalmış fosforilasyonun eşlik ettiği tarafımızdan gösterilmiştir [77]. Sonuç olarak tau, nöronal aktivitede hücre iskeletinin organizasyonu, sinyalleme süreçleri ve sinaptik plastisite üzerinde önemli bir rol oynar ve bu etki muhtemelen, plastisitenin gelişmesi sırasında aktifleşen bazı hücre içi kinaz ve fosfatazların, taunun fizyolojik fosforilasyonunu/defosforilasyonunu sağlayacak şekilde etki etmesinden kaynaklanabilir

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI ve GRUPLANDIRMA

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri (BAP) Birimi Tarafından desteklenen TTU-2021-11016 nolu proje kapsamında ve Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 07.10.2020 tarih ve 20/130 sayılı onayı ile gerçekleştirildi. Çalışma için Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya İyi Klinik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretilen *Wistar albino* cinsi 108 adet 180-200 gr ağırlığında 60 günlük genç-erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar musluk suyu ve standart sıçan yemi ile kısıtlama yapılmaksızın beslendi. Çalışmada gereksiz deney hayvanı kullanmamak ve deney hayvanlarına acı vermemek için etik ilkelere özen gösterildi. Sıçanlar; kontrol (n=36), Roscovitine (20µM) (n=36) ve Roscovitine(100µM) (n=36) grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Uygulanan UDG, UDB ve metaplastisite protokollerinin herbiri için 12'şer sıçan kullanıldı. Elektrofizyolojik kayıtların bitiminden hemen sonra sıçanlar dekapite edilerek beyinleri çıkarıldı ve hipokampusleri izole edildi. Ve çıkarılan hipokampal dokuların 6'sı Western blot 6'sı rtPCR için ayrıldı. İzole edilen hipokampusler ise Western blot ve PCR analizleri yapılmaya kadar -80 °C'de saklandı, hipokampuslerde ise Cdk5 ve MAPK proteinlerinin ekspresyon ve fosforilasyon düzeyleri ölçüldü.

Deney gruplarının oluşturulması

1.Kontrol grubu: Sıçanlara 3 farklı protokol uygulandığı için 36 sıçan 12şerlik gruplara ayrılarak çalışıldı. Herbir gruba serum fizyolojik (SF) infüzyonu 1 saat süreyle hipokampusun dentat girus bölgesine indüksiyon protokolünün uygulanması sırasında uygulandı.

2. Roscovitine (20 µM) grubu: Sıçanlara 3 farklı protokol uygulandığı için 36 sıçan 12şerlik gruplara ayrılarak çalışıldı. Herbir Roscovitine (20µM) grubuna 12 sıçan

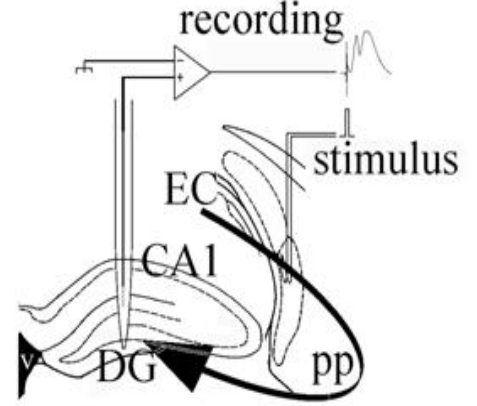
olmak üzere toplamda 36 sıçan kullanıldı. Roscovitine infüzyonu (20 μ M) 1 saat süreyle hipokampusun dentat girus bölgesine indüksiyon protokolünün uygulanması sırasında yapıldı.

3. Roscovitine (100 μ M) grubu: Sıçanlara 3 farklı protokol uygulandığı için 36 sıçan 12şerlik gruplara ayrılarak çalışıldı. Herbir Roscovitine (100 μ M) grubuna 12 sıçan olmak üzere toplamda 36 sıçan kullanıldı. Roscovitine infüzyonu (100 μ M) 1 saat süreyle hipokampusun dentat girus bölgesine indüksiyon protokolünün uygulanması sırasında yapıldı.

3.2. ELEKTROFİZYOLOJİ KAYITLARININ ALINMASI

Sıçanlar 1,2 g/kg dozda intraperitoneal ürethan enjeksiyonu ile anestezi edildikten sonra kulak ve ağız çubukları vasıtasıyla sabitlenerek stereotaksik sisteme (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) yerleştirildi (Şekil 3.1). Daha sonra kafa derisi üzerinde yapılan orta hat kesisi ile kafatasına ulaşıldı. Kafatasına ulaştıktan sonra bregma referans noktası olarak işaretlendi. Sağ hemisferin kraniyumunda hipokampus üzerine denk gelecek şekilde bir pencere açılarak kafatası parçası çıkarıldı. Bregma referans alınarak bipolar uyarıcı elektrot (Teflon kaplı, paslanmaz çelik, 127 μ m çaplı, ucunun yüzeyi izole edilmiş) medyal perforan yol uyarımı için; koordinatları bregmaya göre Anterior - Posterior (AP) : 6.5 mm; Mediyal - Lateral (ML) : 3.8 mm olacak şekilde yerleştirildi. Uyarıcı elektrodun iki kutbu düşük dirençli kablolar ile bir uyarım izolatörüne (A385, World Precision Instruments, USA,) bağlandı. Dış çapı 1,5 mm ve uzunluğu 10 mm olan borosilikat kapiller tüplerden (World Precision Instruments) dikey bir mikropipet çekici (P30, Sutter Instrument Co, USA) ile hazırlandı. Cam mikropipetin bir kanalı 3M NaCl ile dolduruldu, diğer kanalı ise kontrol grubunda serum fizyolojik ile, Roscovitine (20 μ M) grubunda Roscovitine ile, Roscovitine (100 μ M) grubunda ise Roscovitine ile dolduruldu. Kanaldan yapılacak infüzyonlar Hamilton pompa sistemi ile kontrol edildi. İki kanallı cam mikropipet (uç direnci 2–10 M Ω) kayıt için ipsilateral dentat girusun granül hücre tabakasına (bregmaya göre mm: AP: -3.5, ML: 2.15) yerleştirildi. Bir Ag-AgCl disk elektrot boyun derisi altına kondu ve referans elektrot olarak kullanıldı. NaCl ile doldurulan mikropipet içine kayıt elektrodu olarak yerleştirilen klorlanmış gümüş tel ve referans elektrodu bir head-stage kullanılarak

tek kanal epitelyal voltaj/akım kısaç yükselteci (VCC600, Physiological Instruments) bağlandı. Bütün sistem bir Faraday kafesi kullanılarak topraklandı.



Şekil 3.1. Stereotaksik çatıya yerleştirilmiş sıçanın deney sırasındaki görünümü (solda) ve perforan yolağın uyarılması ile oluşan yanıtların dentat girustan kaydedilmesi (sağda)

3.2.1. Tipik elektriksel cevabın elde edilmesi

Hem uyarıcı hem de kayıt elektrodu, EPSP olarak tanımlanan pozitif yönlü bir sapmayı takip eden ve populasyon spike (PS) olarak tanımlanan maksimum negatif yönlü sapma elde edilene kadar derin yapılara indirildi . Granül hücre tabakasının tipik yanıtı elde edilmeye başlandığında elektrotların derinlikleri 0,1 mm artırılarak en büyük cevap elde edildi. Bütün deneylerde ortalama elektrot derinlikleri uyarıcı elektrot için 2,5 mm, kayıt elektrodu için 3 mm’dir.

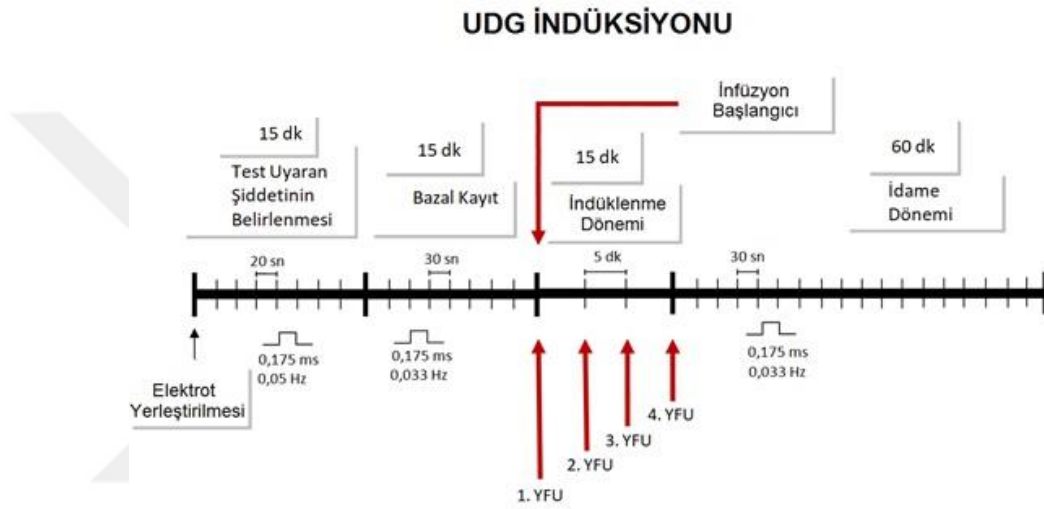
3.2.2. Girdi-Çıktı Eğrileri “Input – Output (I/O) Curve

Elektrotların yerleştirilmesinden sonra 15 dakika süresince akım şiddeti 0,1 mA’dan 1,5 mA’e kadar 0,2 mA’lık adımlarla artırılan 175 μ s süreli tek-fazlı sabit akım pulsları her 20 saniyede bir verilerek Input – Output (I/O) eğrileri elde edildi. Her akım şiddeti için kaydedilen 3 ardıl yanıtın ortalaması akım şiddetine karşı grafiklendi. Maksimum PS genliğinin yarısını oluşturan akım şiddeti test uyaran şiddeti olarak belirlendi ve deneyin sonraki aşamalarında bu akım şiddeti kullanıldı.

3.2.3. UDG Kayıtlarının Alınması

Test uyaran şiddetinde bir uyarı 30 sn’ de bir verilerek 15 dakika süreyle bazal kayıt alındı. Bazal kaydın ardından indüksiyon dönemi olarak tanımlanan süre için 5’er dakika ara ile 100 Hz frekansında 1 sn süren dört yüksek frekanslı uyaran (YFU) ile

UDG indüklendi. Birinci verilen YFU sırasında infüze edilecek maddenin (SF, Roscovitine) infüzyonuna başlandı ve 1 saat boyunca devam edildi . Son YFU'yu takiben toplam idame dönemi olarak tanımlanan 60 dakikalık sürede 30 sn' de bir test uyarın şiddetinde uyarı ile uyarıma devam edildi. YFU dönemindeki UDG yanıtlarının ortalaması indüksiyon dönemi, son YFU verilmesini takiben deneyin sonuna kadar elde edilen UDG yanıtlarının ortalaması ise idame dönemi yanıtı olarak belirlendi. (Şekil 3.2)

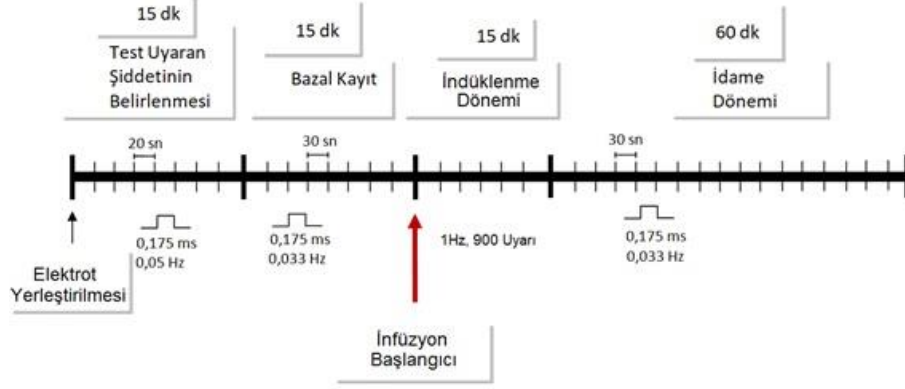


Şekil 3.2 UDG Kayıtlarının Alınması

3.2.4. UDB Kayıtlarının Alınması

Test uyarın şiddetinde bir uyarı 30 sn' de bir verilerek 15 dakika süreyle bazal kayıt alındı. Bazal kaydın ardından 900 kez 1 Hz frekansında düşük frekanslı uyarım ile UDB indüklendi. DFU sırasında infüze edilecek maddenin (SF, Roscovitine) infüzyonuna başlandı ve 1 saat boyunca devam edildi Son DFU uyarıdan sonra her 30 sn de bir test uyarımı verilip toplamda 60 dk sonra deney sonlandırıldı .(Şekil 3.3)

UDB İNDÜKSİYONU



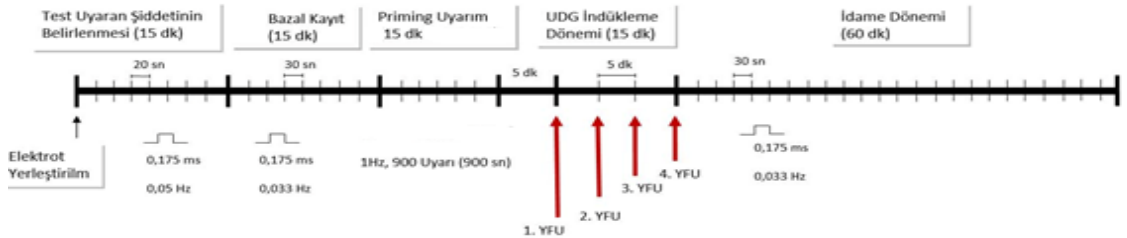
Şekil 3.3 UDB Kayıtlarının Alınması

3.2.5. Metaplastisite Kayıtlarının Alınması

Metaplastisite protokolü uygulanan gruplarda öncelikle bazal kaydın ardından astarlama – “priming” uyarı olarak DFU (1 Hz, 900 uyarı, 900 saniye) 15 dk boyunca uygulandı. DFU sırasında infüze edilecek maddenin (SF,Roscovitine 20 μ M,Roscovitine 100 μ M) infüzyonuna başlandı ve 1 saat boyunca devam edildi. “Priming” uyarımı takiben 5 dakika boyunca her 30 saniyede bir uyarı verilerek (0.033Hz), yanıtlarda meydana gelen değişiklikler kaydedildi. Sonrasında 5 dakika aralıklarla 4 kez YFU uygulanarak tetanizasyon indüklendi.

Bütün gruplarda indüksiyon protokolü uygulandıktan sonra idame dönemi olarak tanımlanan 60 dakikalık sürede 30 sn’de bir test uyarı şiddetinde uyarıya devam edildi. 60 dk sonunda kayıt sonlandırılarak analizler gerçekleştirildi

METAPLASTİSİTE İNDÜKSİYONU



Şekil 3.4. Metaplastisite kaydı deney protokolü şeması

3.2.6. Veri Kazanımı ve Uyarım

Veri kazanımı ve uyarım işleminin kontrolü “Scope” yazılımı (ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) ile yapıldı. A/D çevirici (Powerlab/8SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) vasıtasıyla tek fazlı 10 V 0,175-ms süreli pulslar oluşturuldu ve uyarı izolatörünün tetiklenmesinde kullanıldı. Kaydedilen biyolojik sinyaller 0,1-10 kHz band-genişliğinde bir yükselticide 1000x kez yükseltildi. Aktivite 20 ms için 40 kHz hızında çevirim içi olarak rakamsallaştırıldı.

3.2.7. Veri Analizi ve İstatistik

Eksitator Post Sinaptik Potansiyel dalgasının eğimi; dalganın başlangıcı ve PS dalgasının başlangıcı arasındaki voltaj farkının %20–80'i olacak şekilde hesaplandı. PS genliği ilk pozitif yükselti ve sonraki negatif yükselti arasındaki fark olarak hesaplandı. Başlangıçtaki 15 dakikalık bazal kayıt süresinde tetiklenen 30 alan potansiyelinin EPSP ve PS'lerinin ortalama eğim ve genlik değerleri 100 kabul edildi; indüksiyon sonrasındaki her EPSP eğim ve PS genlik değerleri 100 kabul edilen değerlerin yüzdesi cinsinden hesaplandı.

Deney gruplarında uygulanan indüksiyon protokolüne göre; YFU sonrası ilk 5 dakikalık dönemde, DFU sonrası ilk 5 dakikalık dönemde ve deney sonundaki son 5 dakikalık dönemde kaydedilen 10'ar alan potansiyelinden EPSP eğim ve PS genlik değerlerinin ortalamaları hesaplandı. Ayrıca indüksiyon protokolü için, son 5 dk'lık dönemin ilk 5 dk'lık döneme yüzde oranı, UDG protokolü uygulanan deneylerde bozulma (decay) oranı; UDB uygulanan deneylerde korunma oranı, tersinme deneylerinde tersinme oranı ve metaplastisite deneylerinde astarlanma oranı olarak hesaplandı.

İstatistiksel karşılaştırmalar için, gruplar arasında anlamlılık olup olmadığını saptamak için tek yönlü ANOVA testi, grupların ikili karşılaştırmasında ise post-hoc Tukey testi kullanıldı. Bir grup içinde elde edilen değerlerin bazal değerlerle karşılaştırılması için tek örneklem t testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak seçildi. Değerler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde ifade edildi.

3.3. WESTERN-BLOT YÖNTEMİ İLE PROTEİN DÜZEY TAYİNİ

Western blot çalışmaları için, elektrofizyoloji kayıtlarının bitimini takiben sıçanlar dekapite edilerek beyinleri çıkartıldı. Daha sonra hipokampus doku örnekleri bir camın üzerinde bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalandı. Dokular, eppendorf tüplere alınıp -80 °C' de saklandı. Örnekler çalışılacağı zaman hipokampal dokulardan RIPA lizis tamponu ile protein izolasyonu yapıldıktan sonra biçinkonik asit (BCA) belirteci ile konsantrasyonları belirlenip her kuyucukta 20 µg protein olacak şekilde Sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel (SDS-PAGE)'e yüklendi. Maksimum voltaj (V) ve jel başına 25 sa21 (mA) olacak şekilde proteinler yürütüldü ve poliviniliden diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Tris-Buffered Saline-Tween (TBS-T) içinde hazırlanmış % 5'lik süt tozu ile 1 saat bloklama yapıldıktan sonra, blotlar TBS-T ile 5 defa 5'er dakika aralıklarla yıkandı ve hemen ardından TBS-T içinde hazırlanmış % 5'lik bovin serum albümin (BSA) ile hazırlanmış primer antikorlarla (tau Mouse mAb, 1:1000, p-tau (Ser416) Rabbit mAb, 1:1000, p-tau (Thr181) Monoclonal Antibody, 1:500, β-Actin Antibody, 1:1000, total Cdk5:1000, p-Cdk5(ser¹⁵⁹), p -Cdk5(tyr¹⁵) Mouse mAb, 1:1000,) 12-16 saat, +4 °C' de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra TBS-T ile yıkama işlemi gerçekleştirilip, horse radish peroksidaz (HRP) ile konjuge edilmiş sekonder antikor (%5 BSA içinde hazırlanan, anti-mouse ve anti-rabbit, 1-5000) ile 1 saat muamele edildi. Gelişmiş kemilüminesans (Enhanced chemiluminescence: ECL; Pierce™ Western Blotting Substrate, catalog number: 32106) western blot substrat solüsyonu ile sinyal almak için SynGene G:BOX Chemi (Beacon House, Cambridge, UK) cihazında görüntüleme işlemi yapıldı. Elde edilen membran görüntüleri imageJ (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak hesaplandı.

3.3.1. Veri Analizi ve İstatistik

Western-blot deneylerinde elde edilen bantların optik yoğunluğu standardize edildikten sonra Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak seçildi. Değerler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde ifade edildi.

3.4. PCR

3.4.1. Hipokampus Dokusundan RNA İzolasyonu

Her biri içinde 1000 µl PureZOL™ (BioRad, ABD) RNA izolasyon solüsyonu bulunan tüp içine alınan hipokampus dokuları homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Daha sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Üzerine 400 µl kloroform eklenmiş ve 15 sn vorteks yapıldı. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. 14000 g'de 20 dk +4 °C santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan aköz faz yeni bir ependorf tüpe alındı. Üzerine (aköz faz miktarına bağlı olarak) 300 µl izopropanol eklendi ve birkaç kez alt üst edildi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi ve 14000 g'de 30 dk +4°C santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant kısmı atıldı. Dipte kalan pellet kısmı üzerine 1 ml %75' lik etanol eklenerek ve vorteks yapıldı. Sonrasında 7500 g'de 5 dk +4°C santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant kısım atılmış ve pellet etrafındaki etanol pipetle alınıp temizlendi. Pellet 10-15 dk etanol uçana kadar oda ısısında kurutuldu. Kurutma işleminden sonra üzerine 20 µl NFW (Nuclease Free Water) eklenmiş ve pellet resüspanse edildi. Daha sonra buz içerisine alınmış ve +4°C buzdolabında 10-15 dk bekletildi. Bu süre sonunda nanodropta RNA konsantrasyonu (ng/µl) ölçümü yapıldı.

3.4.2. DNA Sentezi

Çalışmaya başlamadan önce sıçanlara ait bütün RNA örnekleri numaralandırılmış ve PCR tüpleri üzerine bu numaralar yazıldı. cDNA sentezi için iScrip™ cDNA sentez Kit (1708890, BioRad, ABD) kullanıldı. cDNA sentezi iScrip™ cDNA Kit protokolüne göre yapıldı.

Her numuneden eşit miktarda RNA ile reaksiyon oluşturulabilmesi için RNA miktar tayini sonucuna göre eklenecek olan RNA ve su miktarları hesaplandı. PCR tüplerine istenilen miktarda NFW ve RNA örnekleri toplam hacim 15µl olacak şekilde eklendi. Sonrasında 5X reaction buffer (4 µl) ve Revers Transkriptaz (1 µl) karışımı her bir PCR tüpüne 5 µl dağıtılıp ve tüpler PCR cihazına (CFX Connect Real-Time PCR detection System BioRad) konuldu. PCR sonunda elimizde 20µl cDNA ürünü oluştu. PCR cihazında (CFX Connect Real-Time PCR detectionSystem, BioRad) inkübasyon, denatürasyon ve çoğalma ve birleşme basamakları için sırasıyla 25 °C'de 5dk, 42°C'de 30 dk ve 85°C'de 5 dakika tutuldu.

3.4.3. RNA Ekspresyon Çalışması

MAPT ve Cdk5 genlerinin mRNA ekspresyonları SsOAdvanced Universal IT SYBR Green Supermix kit (10000076382, BIORAD, ABD) kullanılarak BIORAD CFX Connect Real Time PCR cihazında (BIORAD, ABD) çalışıldı.

Kit içerisinde çıkan SYBR Green Supermix (10 µl), Nuclease Free Water (8 µl) ve Primer (1µl)'den oluşan bir reaksiyon karışımı hazırlanıp, 96'lık well plate üzerindeki kuyucuklara dağıtılıp ve her bir kuyucuğa cDNA (1 µl) eklendi. Daha sonra CFX Connect Real-Time PCR detection System PCR cihazına yerleştirildi. PCR pre-inkübasyon, çoğaltma ve soğutma koşulları için sırasıyla 95 °C'da 3 dk, 95 °C 5 sn ve 60°C'de 15 sn (44 döngü) ve 40°C'de 30 sn tutuldu. Bütün örnekler manipülasyondan dolayı doğabilecek hataları önleyebilmek için çift çalışıldı. House-keeping gen olarak β -Actin kullanıldı. İşlem sonunda kaydedilmiş elde edilen Ct (threshold cycle) değerleri $2^{-\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplandı ve normalize edildi.

3.4.4. Veri Analizi ve İstatistik

PCR deneylerinde elde edilen mRNA seviyeleri standardize edildikten sonra Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak seçildi. Değerler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Genç-erişkin Erkek Sıçanlarda Farklı Plastisite Formlarının Kontrol Değerleri.

Bu çalışmanın elektrofizyolojik verileri plastisitenin sinaptik ve somatik (nöronal) bileşenlerinin ayrı ayrı değerlendirilmesine olanak vermektedir. Plastisitenin sinaptik bileşeni EPSP eğimindeki değişme ile; somatik bileşeni ise PS genliğindeki değişme ile değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu sıçanlarda perforan yol sadece yüksek frekanslı uyarım ile uyarıldığında dentat girus nöronlarının etkinliğinin 1 saat sonra uyarımdan önceki değer $\%190,4 \pm 9,9$ 'una kadar arttığı; buna karşılık sinaptik etkinlikteki artışın $\%117,5 \pm 2,4$ oranında olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, kontrol grubu genç-erkek sıçanlarda YFU ile indüklenen UDG formunun somatik bileşen ağırlıklı olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Buna karşılık düşük frekanslı uyarım ile perforan yolun uyarılmasından bir saat sonra sinaptik etkinlikte anlamlı bir değişme gözlenmezken (uyarımdan önceki değer $\%104,3 \pm 5,6$ 'sı kadar artış olmuştur) somatik etkinlik uyarımdan önceki değer $\%136,3 \pm 12,6$ 'sına ulaşmıştır. Bu bulgu da perforan yolun DFU ile uyarılmasının dentat girusta sadece somatik bileşenden oluşan bir UDG indüklediğini göstermektedir. DFU ve YFU'nun ardıl bir şekilde uygulandığı deneylerde ise sinaptik bileşenin bazal değer $\%77,4 \pm 8,6$ 'ine kadar azalmasına rağmen somatik bileşenin $\%146,1 \pm 20,4$ oranında artış göstermiştir.

Tablo4. 1. Genç Erişkin Erkek Sıçanlar Gözlenen Plastisite Formları

İndüksiyon Protokolü	Sinaptik bileşen (EPSP eğim değişimi)	Somatik bileşen (PS genlik değişimi)	n
YFU (4 kez, 100Hz, 400 puls)	Güçlenme	Güçlenme	10
DFU (900 puls, 1 Hz)	Değişme Yok	Güçlenme	10
DFU sonrasında YFU	Baskılanma	Güçlenme	10

4.2. Roscovitine'nin YFU ile İndüklenen Plastisitenin Sinaptik Bileşenine Etkisi

İnfüzyonlar yapılmadan önce elde edilen girdi-çıktı eğrilerinde (Şekil 4.1), farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri Tablo 4.2'de sunulmuştur. EPSP eğimi bütün gruplarda uyarı şiddeti arttıkça artmış ve bu artış gruplar arasında farklılık göstermemiştir (tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi, Uyarı şiddeti etkisi $F_{7,175} = 138,56$, $p < 0,001$; Uyarı şiddeti x grup $F_{14,175} = 1,314$ $p > 0,05$; Grup etkisi $F_{2,25} = 1,172$, $p > 0,05$). Bu nedenle, infüzyondan önce grupların bazal sinaptik etkinlik bakımından aralarında fark yoktur.

Tablo 4.2. İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri (input/output,mV/msn)

Uyarı Şiddeti (mA)	SF grubu (n=30)	R-20 grubu (n=27)	R-100 grubu (n=27)
0,1	5,26±0,33	4,72±0,37	4,71±0,39
0,3	6,09±0,35	5,75±0,31	5,59±0,43
0,5	6,71±0,40	6,21±0,32	6,09±0,44
0,7	7,16±0,41	6,53±0,30	6,26±0,39
0,9	7,32±0,42	6,76±0,37	6,33±0,40
1,1	7,39±0,44	6,73±0,37	6,48±0,43
1,3	7,53±0,48	6,69±0,40	6,62±0,42
1,5	7,69±0,46	6,79±0,45	6,78±0,44

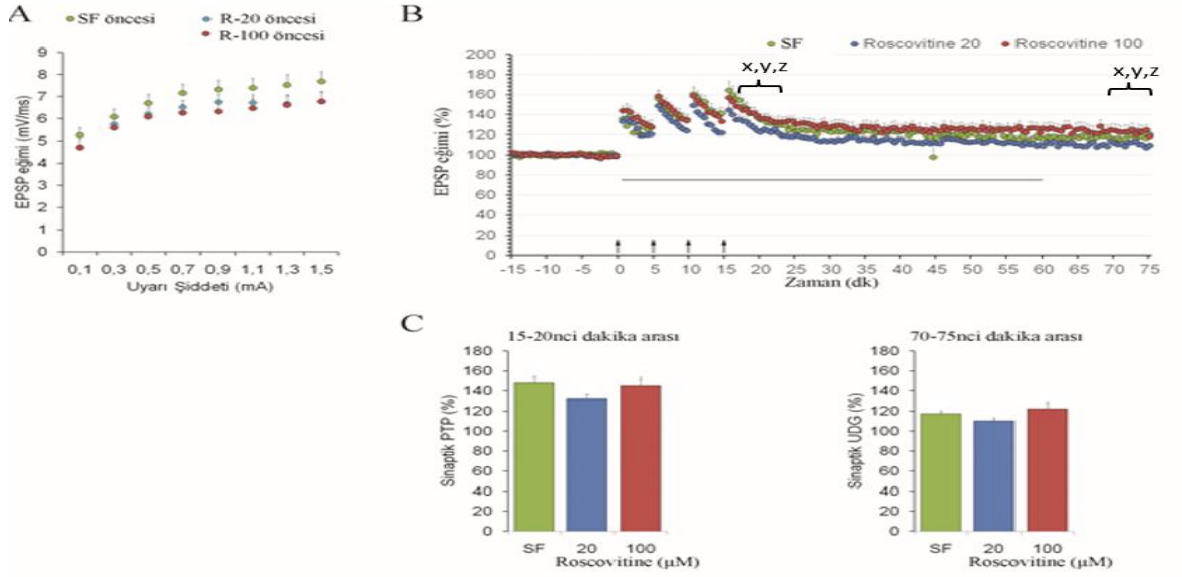
SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 µM Roscovitine infüze edilen grup; **R-100:** 100 µM Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

YFU protokolünden sonraki EPSP eğim değişimi şekil 4.2 B’de sunulmuştur. EPSP eğiminin bazal değere göre % değişimi, son YFU’dan sonraki 5 dakikalık dönemde (post-tetanik güçlenme) ve 55-60 dakikalar arasındaki dönemde ölçülmüştür (Şekil 4.3). Değerler ve istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4. 3’de verilmiştir. Post-tetanik güçlenme döneminde 3 grupta da bazal değere (%100) göre gerçekleşen artışlar anlamlıdır (tek-örnek t testi, p’ler< 0.001) ancak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.3). EPSP eğimlerindeki artış oranı, kaydın son beş dakikasına kadar azalsa da her üç grupta da anlamlı bir sinaptik UDG indüklenmiştir (tek-örnek t testi, SF grubu p’ler < 0.001) ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. **Bu bulgular YFU ile indüklenen plastisitenin sinaptik bileşenin intrahipokampal Roscovitine infüzyonundan etkilenmediğini göstermektedir.**

Tablo 4. 3. Yüksek frekanslı uyarı protokolü ile EPSP eğiminde meydana gelen artış oranları (%)

Grup (infüzyon)	n	15-20nci dakikalar	70-75nci dakikalar
SF	10	148,0±6,7*	117,5±2,4*
R-20	9	132,2±4,4*	110,5±2,5*
R-100	9	145,2±6,5*	122,5±6,6*
Tek-yönlü ANOVA (Gruplar arası karşılaştırma)	F _{2,25}	1,936	1,973
	p	,165	,160

SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 µM Roscovitine infüze edilen grup; **R-100:** 100 µM Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * kendi bazal değerine (%100) göre anlamlı farkı gösterir.



Şekil 4.1. Roscovitine YFU ile indüklenen plastisitenin sinaptik bileşenini etkilemez. A. İnfüzyonlardan önce uyarı şiddeti ve EPSP eğim ilişkisi gruplar arasında farklılık göstermemektedir. B. Bir saat süren fizyolojik serum (SF, n =10), Roscovitine (20 μM, n = 9) ve Roscovitine (100 μM, n = 9) infüzyonları sırasında, EPSP eğiminin YFU ile indüklenen zamansal değişimi. Her bir EPSP eğimi kendi bazal değer yüzdesi cinsinden hesaplanmıştır. Değerler ortalama ± standart hata olarak grafikleştirilmiştir. C. 15-20 ve 70-75nci dakikalar arasında ölçülen ortalama EPSP eğim değerleri. Sütun grafikler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. x=SF grubu,y=Roscovitine 20 μM z=Roscovitine100 μM kendi bazal değerine (%100) göre anlamlı farkı gösterir.

4.3. Roscovitine'in YFU ile İndüklenen Plastisitenin Somatik Bileşenine Etkisi

İnfüzyonlar yapılmadan önce elde edilen girdi-çıkı eğrilerinde (Şekil 4.1), farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen PS genlik değerleri Tablo 4.4'de; sunulmuştur. PS genlikleri bütün gruplarda uyarı şiddeti arttıkça artmış ve bu artış gruplar arasında farklılık göstermemiştir (tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi, Uyarı şiddeti etkisi $F_{7,175} = 167,89$, $p < 0,001$; Uyarı şiddeti x grup $F_{14,175} = 0,598$ $p > 0,05$; Grup etkisi $F_{2,25} = 1,177$, $p > 0,05$). Bu nedenle, infüzyondan önce grupların bazal nöronal etkinliği bakımından aralarında fark yoktur.

Tablo 4.4. İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen PS genlik değerleri (mV/msn).

Uyarı (mA)	Şiddeti	SF grubu (n=30)	R-20 grubu (n=27)	R-100 grubu (n=27)
0,1		2,27±0,21	2,83±0,29	2,37±0,32
0,3		4,89±0,42	6,22±0,46	5,60±0,51
0,5		8,13±0,69	8,97±0,61	8,23±0,79
0,7		9,61±0,78	10,80±0,71	9,65±0,92
0,9		10,55±0,91	12,16±0,92	10,81±0,97
1,1		11,42±1,16	13,17±0,96	11,22±0,99
1,3		12,37±1,13	13,95±1,03	11,78±0,99
1,5		12,49±1,16	14,36±1,08	12,02±1,04

SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 µM Roscovitine infüze edilen grup; **R-100:** 100 µM Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

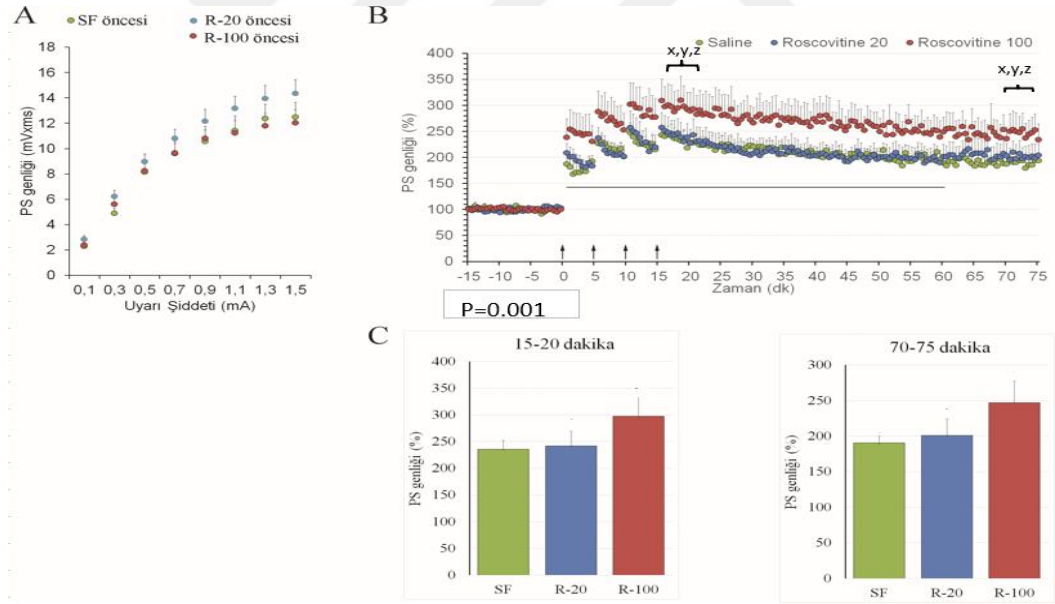
YFU protokolünden sonraki PS genlik değişimi Şekil 4.2’de sunulmuştur. PS genliğinin bazal döneme göre % değişimi, son YFU’dan sonraki 5 dakikalık dönemde (post-tetanik güçlenme) ve 55-60 dakikalar arasındaki dönemde ölçülmüştür. Değerler ve istatistiksel analiz sonuçları Tablo 5’de verilmiştir. Post-tetanik güçlenme döneminde 3 grupta da bazal değere (%100) göre gerçekleşen artışlar anlamlıdır (tek-örnek t testi, p’ler < 0.001) ancak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.3). PS genliğindeki artış oranı, kaydın son beş dakikasına kadar azalsa da her üç grupta da UDG’nin somatik bileşeni indüklenmiştir (tek-örnek t testi, SF grubu p’ler < 0.001) ve gruplar arasında anlamlı bir fark

bulunmamıştır. Bu bulgular UDG'nin somatik bileşeninin oluşmasında intrahipokampal *Roscovitone* infüzyonunun etkisinin olmadığını göstermektedir.

Tablo4. 5. Yüksek frekanslı uyarı protokolü ile PS genliğinde meydana gelen artış oranları (%)

Grup (infüzyon)	n	15-20nci dakikalar	70-75nci dakikalar
SF	10	235,8±16, 5*	190,4±9,9*
R-20	9	242,2±27,4*	201,1±23,2*
R-100	9	297,6±38,6*	247,0±30,7*
Tek-yönlü ANOVA	$F_{2,25}$	1,436	1,821
	p	,257	,183

SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 μ M *Roscovitone* infüze edilen grup; **R-100:** 100 μ M *Roscovitone* infüze edilen grup. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. * kendi bazal değerine (%100) göre anlamlı farkı gösterir.



Şekil 4.2. *Roscovitone* YFU ile indüklenen plastisitenin somatik bileşenini etkilemez. A. İnfüzyonlardan önce uyarı şiddeti ve PS genlik ilişkisi gruplar arasında farklılık göstermemektedir. B. Bir saat süren fizyolojik serum (SF, n =10), *Roscovitone* (20 μ M, n = 9) ve *Roscovitone* (100 μ M, n = 9) infüzyonları sırasında, PS genliğinin YFU ile indüklenen zamansal değişimi. Her bir PS genliği kendi bazal değerinin yüzdesi cinsinden hesaplanmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmektedir. C. 15-20 ve 70-75nci dakikalar arasında ölçülen ortalama PS genlik değerleri. Sütun grafikler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir **x**=SF grubu, **y**=*Roscovitone* 20 μ M **z**=*Roscovitone* 100 μ M kendi bazal değerine (%100) göre anlamlı farkı gösterir.

4.4. Roscovitine'in DFU ile İndüklenen Plastisitenin Sinaptik Bileşenine Etkisi

İnfüzyonlar yapılmadan önce elde edilen girdi-çıkı eğrilerinde (Şekil 4.3), farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri Tablo 4. 6'da sunulmuştur. EPSP eğimleri bütün gruplarda uyarı şiddeti arttıkça artmış ve bu artış gruplar arasında farklılık göstermemiştir (tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi, Uyarı şiddeti etkisi $F_{7,175} = 94,11$, $p < 0,001$; Uyarı şiddeti x grup $F_{14,175} = 1,002$ $p > 0,05$; Grup etkisi $F_{2,25} = 0,259$, $p > 0,05$). Bu nedenle, infüzyondan önce grupların bazal sinaptik etkinliği bakımından aralarında fark yoktur.

Tablo4.6. İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri (input/output,mV/msn).

Uyarı Şiddeti (mA)	SF grubu (n=30)	R-20 grubu (n=27)	R-100 grubu (n=27)
0,1	4,28±0,42	4,03±0,61	4,22±0,45
0,3	5,20±0,51	4,76±0,64	4,94±0,63
0,5	5,68±0,55	5,25±0,69	5,30±0,69
0,7	6,07±0,53	5,50±0,73	5,57±0,70
0,9	6,34±0,52	5,74±0,70	5,76±0,71
1,1	6,55±0,46	5,93±0,73	5,91±0,74
1,3	6,69±0,45	5,93±0,71	5,98±0,73
1,5	6,82±0,44	6,00±0,72	6,06±0,75

SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 µMRoscovitineinfüze edilen grup; **R-100:** 100 µM Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

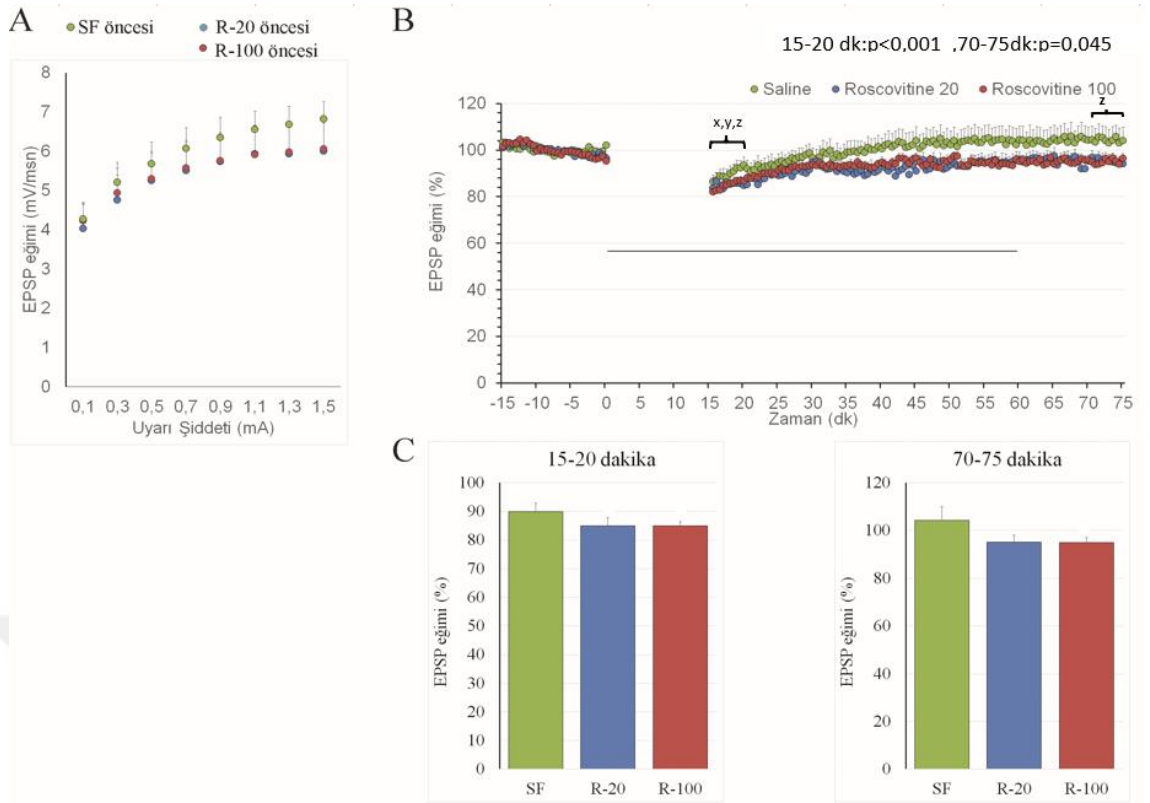
DFU protokolünden sonraki ESPS eğim değişimi Şekil 4.3'de sunulmuştur. EPSP eğiminin bazal döneme göre % değişimi, DFU'nun bitiminden sonraki 5 dakikalık

dönemde (erken dönem) ve 55-60 dakikalar arasındaki dönemde (geç dönem) ölçülmüştür. Değerler ve istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.7’de verilmiştir. Erken dönemde 3 grupta da bazal değere (%100) göre gerçekleşen azalmalar anlamlıdır (tek-örnek t testi, p’ler < 0.001) ancak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.2). SF infüzyonu yapılan kontrol grubunda ise deney sonu EPSP eğimi, bazal değerden anlamlı farklılık göstermemiştir. Bu nedenle perforan yolun DFU ile uyarımı sinaptik etkinlikte uzun süreli bir değişmeye neden olmamıştır. Bununla beraber, 100 µM Roscovitine infüzyonu altında son 5 dakikada ölçülen EPSP eğim ortalaması bazal değerden anlamlı derecede düşük bulunmuştur (tek-örnek t testi, $t_9=2,374$, $p = 0,045$). Bu bulgular, Cdk5 aktivasyonunun düşük frekanslı uyarım protokolü ile sinaptik UDB indüklenmesini engelleyen faktörlerden biri olabileceğini göstermektedir.

Tablo 4.7. Düşük frekanslı uyarı protokolü ile EPSP eğiminde meydana gelen azalma oranları (%)

Grup (infüzyon)	n	15-20nci dakikalar	70-75nci dakikalar
SF	10	89,9±1,5*	104,3±5,6
R-20	9	85,0±2,9*	95,2±2,8
R-100	9	85,0±3,1*	95,0±2,1*
Tek-yönlü ANOVA	$F_{2,25}$	1,185	1,799
	p	,322	,186

SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 µM Roscovitine infüze edilen grup ; **R-100:** 100 µM Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.* bazal değere (%100) göre farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.3 Roscovitine DFU ile indüklenen plastisitenin sinaptik bileşenini baskılar.

A. İnfüzyonlardan önce uyarı şiddeti ve eğim ilişkisi ilişkisi gruplar arasında farklılık göstermemektedir. **B.** Bir saat süren fizyolojik serum (SF, $n = 10$), Roscovitine (20 μM , $n = 9$) ve Roscovitine (100 μM , $n = 9$) infüzyonları sırasında, PS genliğinin DFU (0-15 dakikalar arası boşluk) ile indüklenen zamansal değişimi. Her bir EPSP eğimi kendi bazal değer yüzdesi cinsinden hesaplanmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak grafiklenmiştir. **C.** 15-20 ve 70-75nci dakikalar arasında ölçülen ortalama EPSP eğim değerleri. Sütun grafikler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. x =SF grubu, y =Roscovitine 20 μM z =Roscovitine 100 μM kendi bazal değerine (%100) göre anlamlı farkı gösterir.

4.5. Roscovitine'in DFU ile İndüklenen Plastisitenin Somatik Bileşenine Etkisi

İnfüzyonlar yapılmadan önce elde edilen girdi-çıktı eğrilerinde (Şekil 4.4), farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen PS genlik değerleri Tablo 4.8'de; sunulmuştur. PS genlikleri bütün gruplarda uyarı şiddeti arttıkça artmış ve bu artış gruplar arasında farklılık göstermemiştir (tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi, Uyarı şiddeti etkisi $F_{7,175} = 164,31$, $p < 0,001$; Uyarı şiddeti x grup $F_{14,175} = 1,080$ $p > 0,05$; Grup etkisi $F_{2,25} = 0,277$, $p > 0,05$). Bu nedenle, infüzyondan önce grupların bazal somatik etkinliği bakımından aralarında fark yoktur.

Tablo 4.8. İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri (input/output ,mV/msn).

Uyarı (mA)	Şiddeti	SF öncesi (n=30)	R-20 öncesi (n=27)	R-20 öncesi (n=27)
0,1		1,79±0,42	2,33±0,51	2,53±0,44
0,3		4,54±0,50	6,57±1,01	5,23±0,68
0,5		6,95±0,68	9,28±1,17	8,11±1,28
0,7		8,88±0,81	10,42±1,35	9,73±1,54
0,9		10,72±1,01	11,48±1,35	10,88±1,68
1,1		11,83±1,07	12,48±1,27	11,35±1,70
1,3		12,88±1,21	13,06±1,28	11,73±1,66
1,5		13,26±1,26	13,56±1,29	12,41±1,64

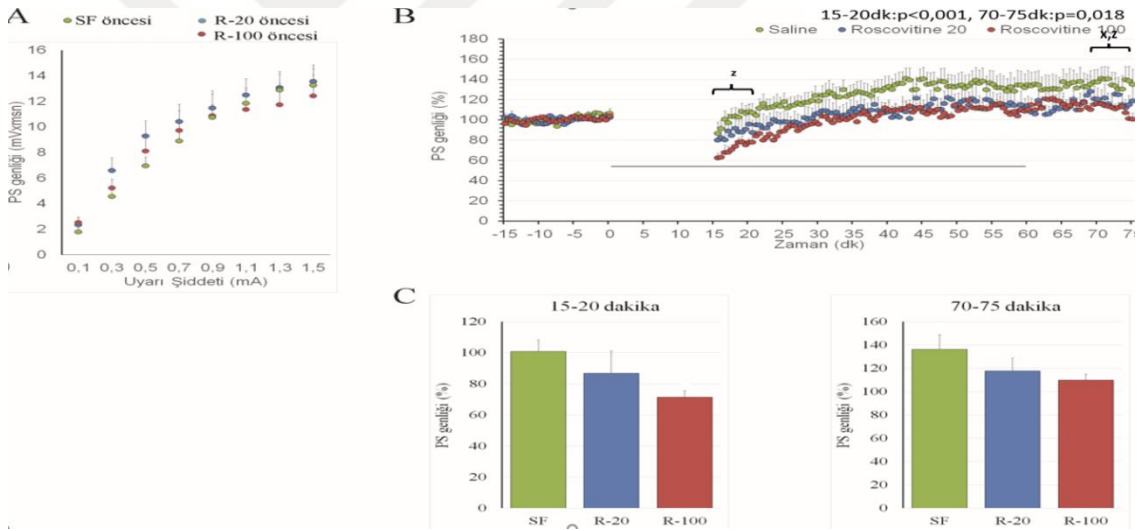
SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 µM Roscovitine infüze edilen grup; **R-100:** 100 µM Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

DFU protokolünden sonraki PS genlik değişimi Şekil 4.4’de sunulmuştur. EPSP eğiminin bazal döneme göre % değişimi, son DFU’dan sonraki 5 dakikalık dönemde (erken) ve 55-60 dakikalar arasındaki dönemde (geç) ölçülmüştür (Şekil 4.4). Değerler ve istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4. 9’da verilmiştir. PS genliği erken dönemde SF ve 20 µM Roscovitine infüze edilen gruplarda anlamlı bir değişme göstermezken ($p > 0.05$) 100 µM Roscovitine infüze edilen grupta anlamlı bir azalma göstermiştir ($t_9 = 6.670$, $p < 0.001$). Erken dönemdeki PS genlikleri bütün gruplarda deney sonuna kadar tedrici bir artış göstermiş ve deneyin sonunda sadece SF infüze edilen grupta bazal değerine göre anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($t_9 = 2.882$, $p = 0.018$). Bu bulgular, DFU ile somatik UDG oluşumuna Cdk5 aktivasyonunun katkısına işaret etmektedir.

Tablo 4. 9. Düşük frekanslı uyarı protokolü ile PS genliğinde meydana gelen azalma oranları (%)

Grup (infüzyon)	n	15-20nci dakikalar	70-75nci dakikalar
SF	10	100,8±7,4	136,3±12,6*
R-20	9	86,9±14,4	117,7±11,3
R-100	9	71,4±4,3*	110,0±5,0
Tek-yönlü ANOVA	F _{2,25}	2,424	1,744
	p	,109	,195

SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 µM Roscovitine infüze edilen grup; **R-100:** 100 µM Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.* bazal değere (%100) göre farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.4. Roscovitine DFU ile indüklenen somatik UDG'yi baskılar.

A. İnfüzyonlardan önce uyarı şiddeti ve eğim ilişkisi ilişkisi gruplar arasında farklılık göstermemektedir. **B.** Bir saat süren fizyolojik serum (SF, n =10), Roscovitine (20 µM, n = 9) ve Roscovitine (100 µM, n = 9) infüzyonları sırasında, PS genliğinin DFU (0-15 dakikalar arası boşluk) ile indüklenen zamansal değişimi. Her bir PS genliği kendi bazal değer yüzdesi cinsinden hesaplanmıştır. Değerler ortalama ± standart hata olarak grafiklenmiştir. **C.** 15-20 ve 70-75nci dakikalar arasında ölçülen ortalama PS genlik değerleri. Sütun grafikler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. x=SF grubu,y=Roscovitine 20 µM z=Roscovitine100 µM kendi bazal değerine (%100) göre anlamlı farkı gösterir

4.6. Roscovitine'in DFU sonrası YFU verilerek İndüklenen Plastisitenin Sinaptik Bileşenine Etkisi

Bölüm 4.2'de Roscovitine'nin sinaptik UDG'ye etkisi ile ilgili sonuçlar verilmiştir. Sinaptik UDG, sinapsın indüksiyondan önceki geçmiş aktivitesine bağlıdır. Bu bağımlılığı göstermek üzere, bazı deneylerde UDG indüksiyonundan 5 dakika önce sinapslar 15 dakika süren düşük frekanslı uyarıya maruz bırakılmıştır. Bu deneylerin başlangıcında (infüzyonlar yapılmadan önce) farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri Tablo 4.10 ve Şekil 4.5 A'da sunulmuştur. EPSP eğiminin bazal döneme göre % değişimi, DFU'dan sonraki 5 dakikalık dönemde (UDG öncesi), 35-40nci dakikalar arasındaki dönemde (UDG sonrası erken dönem) ve 90-95nci dakikalarda (UDG sonrası geç dönem) ölçülmüş; değerler ve istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.10'da verilmiştir.

EPSP eğimleri bütün gruplarda uyarı şiddeti arttıkça artmış ve bu artış gruplar arasında farklılık göstermemiştir (tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi, Uyarı şiddeti etkisi $F_{7,175} = 151,73$, $p < 0,001$; Uyarı şiddeti x grup $F_{14,175} = 0,573$ $p > 0,05$; Grup etkisi $F_{2,25} = 0,780$, $p > 0,05$). Bu nedenle, infüzyondan önce grupların bazal sinaptik etkinlik bakımından aralarında fark yoktur (Tablo 10 ve Şeki 14 A).

Tablo 4.10. İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen EPSP eğim değerleri (input/output, mV/msn).

Uyarı (mA)	Şiddeti	SF grubu	R-20 grubu	R-100 grubu
0,1		5,71±0,52	4,92±0,31	5,73±0,43
0,3		6,41±0,54	5,53±0,33	6,37±0,48
0,5		7,03±0,57	5,94±0,41	6,74±0,55
0,7		7,24±0,54	6,21±0,46	7,07±0,57
0,9		7,30±0,48	6,40±0,46	7,19±0,51
1,1		7,38±0,49	6,86±0,45	7,25±0,54
1,3		7,35±0,48	7,00±0,50	7,26±0,56
1,5		7,42±0,49	7,27±0,49	7,19±0,57

SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 μ M Roscovitine infüze edilen grup; **R-100:** 100 μ M Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

On beş dakika süren bazal kaydın ardından uygulanan DFU ile bütün gruplarda EPSP eğimi bazal değer anlamlı seviyede altına düşmüştür (15-20nci dakikalar arası ortalama değer %100'den farkı, tek-örnek t testi, SF grubu: $t_9 = 4.771$, $p = 0.001$; R-20 grubu: $t_8 = 7.121$, $p = 0.029$; R-100 grubu: $t_8 < 0,001$). DFU ile indüklenen bu sinaptik baskılanma gruplar arasında farklı bulunmamıştır (Tablo 4.10).

Sinaplarda oluşan bu baskılanmadan sonra YFU protokolü uygulandığında erken dönemde ne SF grubunda ne de R-20 grubunda UDG'nin sinaptik bileşeni indüklenebilmiştir (Tablo 4.10, 35-40nci dakikalar). R-100 grubunda ise bazal değer %128'ine kadar artan EPSP eğimi ($t_8 = 3.992$, $p = 0.004$) elde edilmiştir. Bu bulgular baskılanan sinapslarda YFU ile UDG indüksiyonunun yüksek konsantrasyonda Roscovitine ile kolaylaşabileceğini göstermektedir. Deneyin son 5 dakikalık bölümünde elde edilen EPSP eğim değerleri incelendiğinde ise kontrol grubunda anlamlı bir sinaptik UDB indüklendiği ($t_9 = 2,622$, $p = 0,028$), R-100 grubunda indüklenen sinaptik UDG'nin kalıcı olmadığı ve her iki deney grubunda da EPSP değerlerinin bazal değerlerine göre anlamlı bir değişme göstermediği bulunmuştur.

Şekil 4.5 her grupta YFU'nun öncesinde DFU verilmeden (Bölüm 4.2'de verilen değerler) ve verildikten sonra elde edilen EPSP eğimlerinin karşılaştırmasını göstermektedir. Kontrol (SF) grubunda YFU'dan 55-60 dakika sonra elde edilen EPSP eğimleri, sadece YFU verildiğinde, DFU'yu takiben YFU verildiği duruma göre anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur (Bağımsız örnekler t testi, $t_{18} = 4,474$, $p = 0.012$). Bir başka ifade ile YFU öncesinde DFU verilmezse UDG'nin sinaptik bileşenini indüklerlerken; DFU'dan sonra verildiğinde UDB'nin sinaptik formunun oluşumuna neden olmaktadır. R-20 ve R-100 gruplarında ise sinaptik UDG büyüklüğü öncesinde DFU uygulanan ve uygulanmayan durumlar arasında farklı bulunmamıştır.

Şekil 4.5 E, YFU'dan 55-60 dakika sonra ölçülen EPSP eğimlerinin, DFU'dan sonra ölçülen değerlere göre değişim oranlarını göstermektedir. SF grubunda EPSP eğimi, DFU sonrası değere göre bir değişme göstermezken, Roscovitine gruplarında

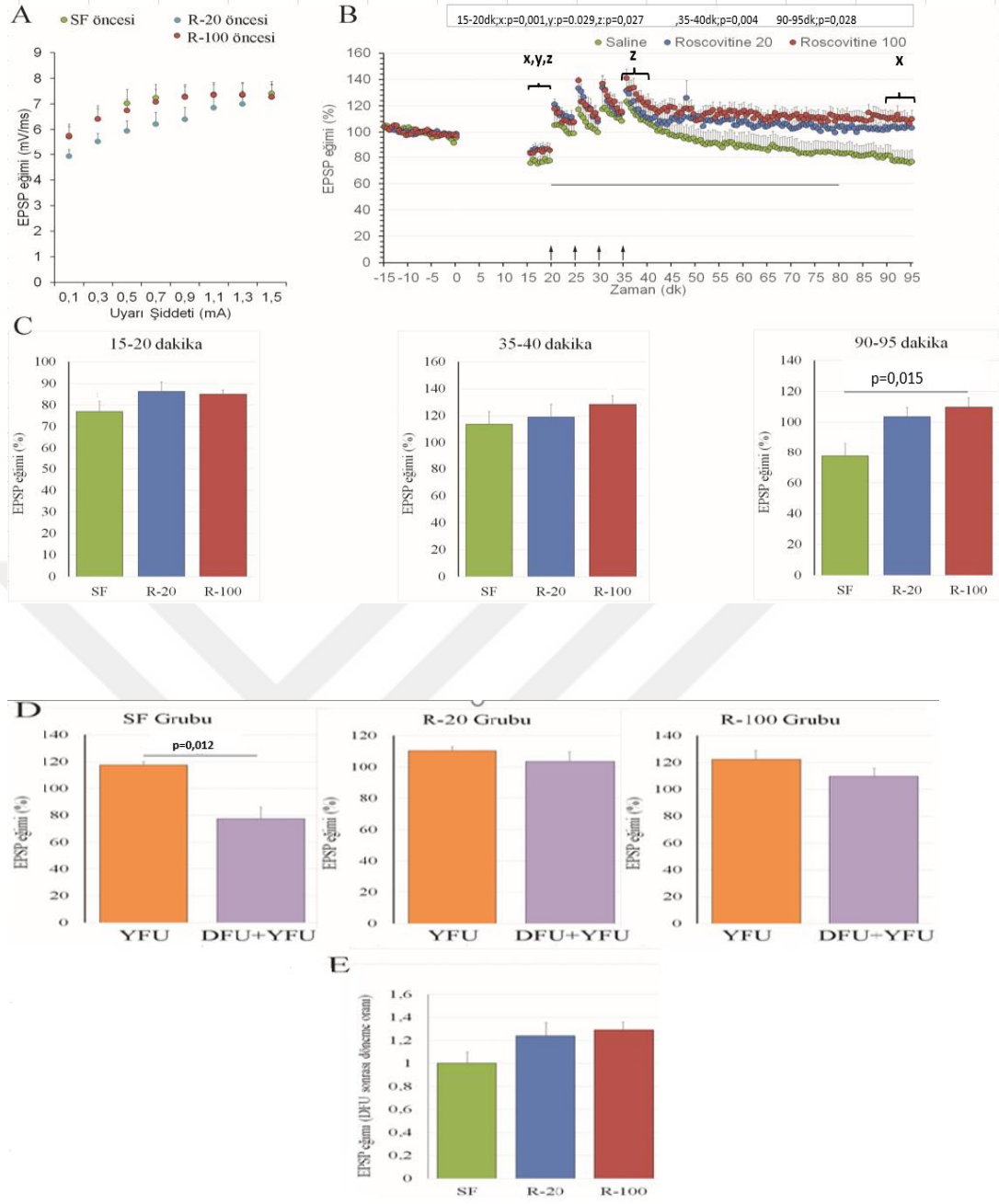
yaklaşık %20'lik bir artış bulunmuştur. Bununla beraber artış oranları gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

Bu bulgular, birlikte değerlendirildiğinde, DFU'nun YFU ile indüklenen sinaptik UDG anlatımını inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun Cdk5 enzimine bağımlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.11. Düşük frekanslı uyarı sonrası ve Yüksek frekanslı Uyarım Sonrası EPSP eğiminde meydana gelen değime oranları (%)

Grup (infüzyon)	n	15-20nci dakikalar	35-40ncı dakikalar	90-95nci dakikalar
SF	10	76,9±4,8*	113,8±7,2	77,4±8,6*
R-20	9	86,4±5,1*	119,1±9,3	103,6±6,8
R-100	9	85,1±2,1*	128,6±10,8*	109,8±6,9 ^a
Tek-yönlü ANOVA	F _{2,25}	1,464	,664	5,302
	p	,251	,523	,012

SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 µM Roscovitine infüze edilen grup; **R-100:** 100 µM Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * bazal değere (%100) göre farklılığı göstermektedir.^a SF grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (post-hocTukeytest, p = 0,015).



Şekil 4.5. Roscovitine'nin metaplastik sinaptik UDB'yi inhibe eder.

A. Uyarı protokolünden önce uyarı şiddeti ve EPSP eğim ilişkisi gruplar arasında farklılık göstermemektedir. **B.** Bir saat süren fizyolojik serum (SF, n = 10), 20 μ M (n = 9) ve 100 μ M (n = 9) Roscovitine infüzyonları sırasında (yatay çizgi) EPSP eğiminin DFU (0-15nci dakikalar arası boşluk) sonrası uygulanan YFU (oklar) ile zamansal değişimi. Her bir EPSP genliği kendi bazal değer yüzdesi cinsinden hesaplanmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak grafiklenmiştir. Sinaptik UDG anlatımına neden olması beklenen YFU'nın SF grubunda UDB oluşturduğu; Roscovitine infüze edilen gruplarda ise sinaptik baskılanmanın gözlenmediği izlenmektedir. **C.** EPSP eğiminin 15-20nci dakikalar, 35-40nci dakikalar ve 90-95nci dakikalar arasında ölçülen değerlerin sütun grafiği. **D.** YFU'nun öncesinde DFU

verilmeden (Bölüm 4.2'deki bulgular) ve verildikten sonra elde edilen EPSP eğimlerinin karşılaştırması. E. YFU'dan 55-60 dakika sonra ölçülen EPSP eğimlerinin, DFU'dan sonra ölçülen değerlere göre değişim oranları. x =SF grubu, y =Roscovitine 20 μ M z =Roscovitine 100 μ M kendi bazal değerine (%100) göre anlamlı farkı gösterir. ^a iki grup göre anlamlı farklılığı göstermektedir (post-hoc Tukey test, $p < 0,05$). Sütun grafikler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

4.7. Roscovitine'in DFU sonrası YFU verilerek İndüklenen Plastisitenin Somatik Bileşenine Etkisi

Somatik UDG'nin indüksiyondan önceki geçmiş aktiviteye bağımlılığını göstermek üzere, bazı deneylerde UDG indüksiyonundan 5 dakika önce sinapslar 15 dakika süren düşük frekanslı uyarıya maruz bırakılmıştır. Bu deneylerin başlangıcında (infüzyonlar yapılmadan önce) farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen PS genlik değerleri Tablo 4.11 ve Şekil 4.6 A'da sunulmuştur. PS genliklerinin bazal döneme göre % değişimi, DFU'dan sonraki 5 dakikalık dönemde (UDG öncesi), 35-40ncı dakikalar arasındaki dönemde (UDG sonrası erken dönem) ve 90-95nci dakikalarda (UDG sonrası geç dönem) ölçülmüş; değerler ve istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.11'de verilmiştir.

EPSP eğimleri bütün gruplarda uyarı şiddeti arttıkça artmış ve bu artış gruplar arasında farklılık göstermemiştir (tekrarlayan ölçümlü ANOVA testi, Uyarı şiddeti etkisi $F_{7,175} = 151,73$, $p < 0,001$; Uyarı şiddeti x grup $F_{14,175} = 0,573$ $p > 0,05$; Grup etkisi $F_{2,25} = 0,780$, $p > 0,05$). Bu nedenle, infüzyondan önce grupların bazal sinaptik etkinlik bakımından aralarında fark yoktur (Tablo 4.12 ve Şekil 4.6A).

Tablo 4.12. İnfüzyondan önce farklı uyarı şiddetlerinde elde edilen PS genlik değerleri (mVxmsn).

Uyarı Şiddeti (mA)	SF öncesi n=30	R-20 öncesi n=27	R-100 öncesi n=27
0,1	2,60±0,36	2,29±0,48	2,27±0,30
0,3	6,48±0,96	4,41±0,74	4,96±0,59
0,5	8,93±1,09	6,91±0,89	6,96±0,71
0,7	10,75±1,05	8,75±1,06	8,92±0,88
0,9	11,62±1,02	10,08±1,41	9,95±0,95
1,1	12,39±1,02	10,86±1,59	10,90±1,18
1,3	13,07±1,00	11,82±1,56	11,74±1,29
1,5	13,17±1,02	12,58±1,73	12,26±1,25

SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 µM Roscovitine infüze edilen grup; **R-100:** 100 µM Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

On beş dakika süren bazal kaydın ardından uygulanan DFU ile sadece SF grubunda PS genliği kendi bazal değerinin anlamlı seviyede altına düşmüştür (Tablo 4.13, 15-20nci dakikalar arası ortalama değer %100'den farkı, tek-örnek t testi, SF grubu: $t_9 = 2.336$, $p = 0.044$; R-20 grubu: $t_8 = 0.127$, $p > 0,05$; R-100 grubu: $t_8 = 1,555$ $p > 0,05$). DFU'dan sonraki 5 dakikalık bölüm için PS genlikleri gruplar arasında farklı bulunmamıştır. DFU'dan sonra YFU protokolü uygulandığında erken ve geç dönemde bütün gruplarda UDG'nin somatik bileşeni indüklenebilmiştir ancak PS genlikleri gruplar arasında farklılık göstermemiştir (Tablo 4.13).

Şekil 4.6 D her grupta YFU'nin öncesinde DFU verilmeden ve verildikten sonra elde edilen PS genliklerinin karşılaştırmasını göstermektedir. Bağımsız örnekler t testi ile yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, YFU'dan 55-60 dakika sonra elde edilen PS genlikleri SF grubunda öncesinde DFU verilen grupta verilmediği gruba göre bir azalma eğilimi göstermektedir ($t_{18} = 1,954$, $p = 0.066$). R-20 ve R-100 gruplarında ise PS genliğinin değişimi öncesinde DFU uygulanan ve uygulanmayan durumlar arasında farklı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

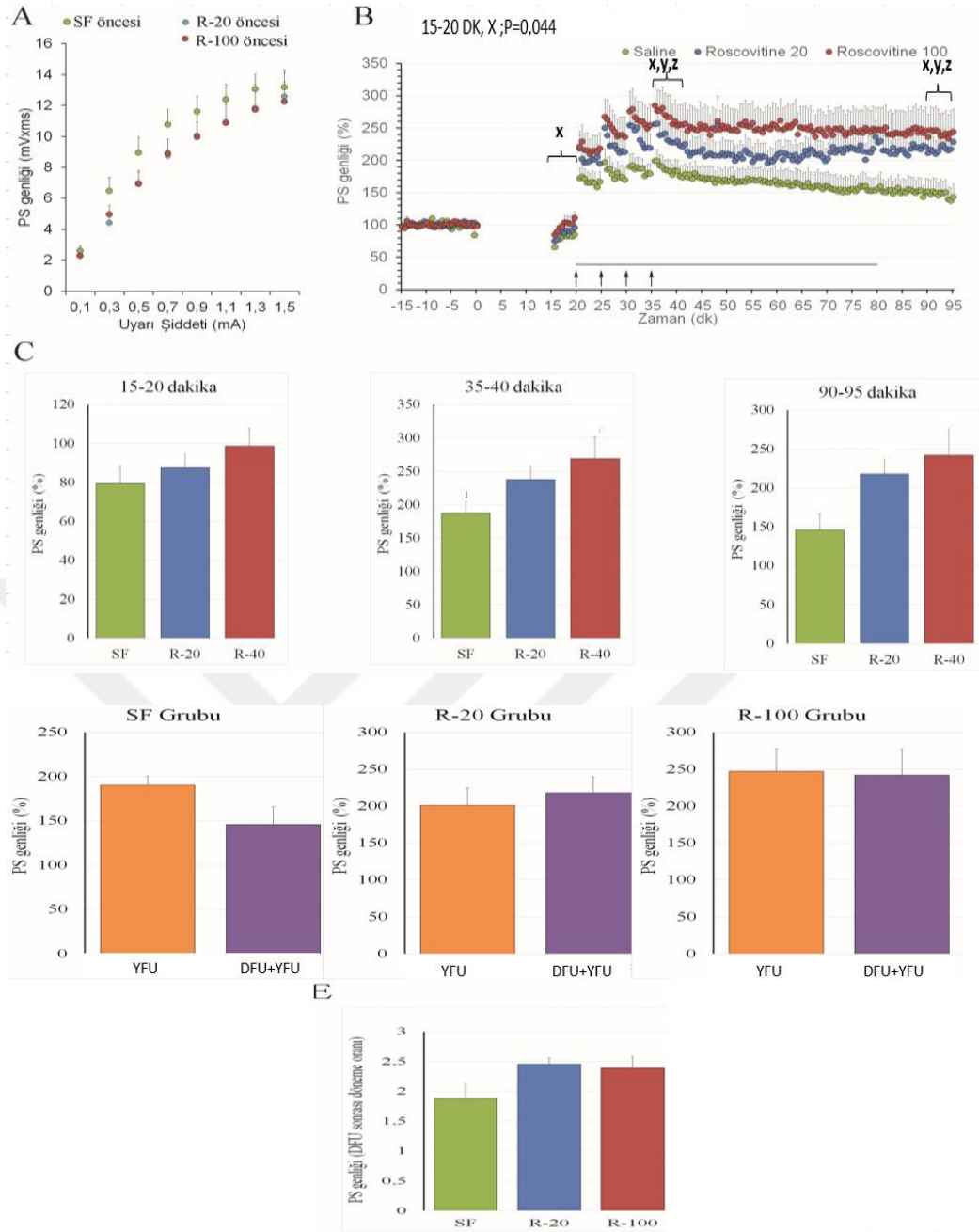
Şekil 4.6 E, YFU'dan 55-60 dakika sonra ölçülen PS genliklerinin, DFU'dan sonra ölçülen değerlere göre değişim oranlarını göstermektedir. SF grubunda EPSP eğimi, DFU sonrası değere göre yaklaşık 1,8 kat artarken, Roscovitine gruplarında yaklaşık 2,4 katlık bir artış bulunmuştur. Bununla beraber artış oranları gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($F_{2,25} = 2,462$, $p = 0.109$).

Birlikte değerlendirildiğinde, bu bulgular somatik UDG'nin DFU ile regülasyonunun Cdk5 bağımlı olmadığını göstermektedir.

Tablo 4.13. Düşük frekanslı uyarı sonrası ve Yüksek frekanslı Uyarım Sonrası EPSP eğiminde meydana gelen değişim oranları (%)

Grup (infüzyon)	n	15-20nci dakikalar	35-40nci dakikalar	90-95nci dakikalar
SF	10	79,5±8,8*	187,5±16,5*	146,1±20,4*
R-20	9	87,6±8,0	237,6±28,8*	217,7±25,0*
R-100	9	98,7±10,3	268,9±37,8*	241,9±41,0*
Tek-yönlü ANOVA	$F_{2,25}$	1,136	2,152	2,932
	p	,337	,137	,072

SF: Serum fizyolojik infüze edilen grup; **R-20:** 20 µM Roscovitine infüze edilen grup; **R-100:** 100 µM Roscovitine infüze edilen grup. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * bazal değere (%100) göre farklılığı göstermektedir.^a SF grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (post-hocTukey test, $p = 0,015$).



Şekil 4.6. Roscovitine somatik UDG'nin DFU ile regülasyonunu etkilemez.

A. Uyarı protokolünden önce uyarı şiddeti ve PS genliği ilişkisi gruplar arasında farklılık göstermemektedir. **B.** Bir saat süren fizyolojik serum (SF, n = 10), 20 μ M (n = 9) ve 100 μ M (n = 9) Roscovitine infüzyonları sırasında (yatay çizgi) EPSP eğiminin DFU (0-15nci dakikalar arası boşluk) sonrası uygulanan YFU (oklar) ile zamansal değişimi. Her bir EPSP genliği kendi bazal değer yüzdesi cinsinden hesaplanmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak grafiklenmiştir. Sinaptik UDG anlatımına neden olması beklenen YFU'nın SF grubunda UDB oluşturduğu; Roscovitine infüze edilen gruplarda ise sinaptik baskılanmanın gözlenmediği izlenmektedir. **C.** EPSP eğiminin 15-20nci dakikalar, 35-40nci dakikalar ve 90-95nci dakikalar arasında ölçülen değerlerin sütun grafiği. **D.** YFU'nun öncesinde DFU

verilmeden (Bölüm 4.2'deki bulgular) ve verildikten sonra elde edilen EPSP eğimlerinin karşılaştırması. E. YFU'dan 55-60 dakika sonra ölçülen EPSP eğimlerinin, DFU'dan sonra ölçülen değerlere göre değişim oranları. $x=SF$ grubu, $y=$ Roscovitine 20 μM $z=$ Roscovitine 100 μM kendi bazal değerine (%100) göre anlamlı farkı gösterir. ^a iki grup göre anlamlı farklılığı göstermektedir (post-hocTukey test, $p < 0,05$). Sütun grafikler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

4.8. Elektrofizyolojik Bulguların Özeti

Roscovitine infüzyonu altında, indüksiyondan 60 dakika sonra oluşan plastisite formları Tablo 4.14'de özetlenmiştir. Roscovitine 20 ve 100 μM konsantrasyonlarda 1 saat boyunca infüze edildiğinde YFU plastisitenin hem sinaptik hem de somatik bileşeninde, kontrol grubuna benzer bir güçlenme oluşturabilmiştir. DFU'nun tek başına veya ardından YFU verildiği deneylerde oluşan plastisite formunun Roscovitine infüzyonundan etkilendiği görülmektedir. Roscovitine 100 μM konsantrasyonda infüze edildiğinde DFU, kontrol grubundan farklı olarak sinaptik UDB indüklemekte; DFU'dan sonra YFU verildiğinde ise, kontrol grubunda oluşan sinaptik UDB yerine sinaptik UDG indüklemektedir. Buna karşın Roscovitine 20 μM konsantrasyonda infüze edildiğinde DFU'nun kullanıldığı indüksiyon protokolleri herhangi bir plastik değişikliğe neden olmamaktadır. DFU ile indüklenen somatik UDG ise Roscovitine'in her iki konsantrasyonunda da gözlenmemektedir.

Tablo 4.14. Roscovitine infüzyonu altında, indüksiyondan 60 dakika sonra oluşan plastisite formları.

İndüksiyon	Plastisite (Sinaptik bileşen)	Roscovitine 20 μM	Roscovitine 100 μM
YFU	UDG	UDG	UDG
DFU	ED	ED	UDB
DFU sonrası YFU	UDB	ED	UDG
İndüksiyon	Plastisite (Somatik bileşen)	Roscovitine 20 μM	Roscovitine 100 μM
YFU	UDG	UDG	UDG
DFU	UDG	ED	ED
DFU sonrası YFU	UDG	UDG	UDG

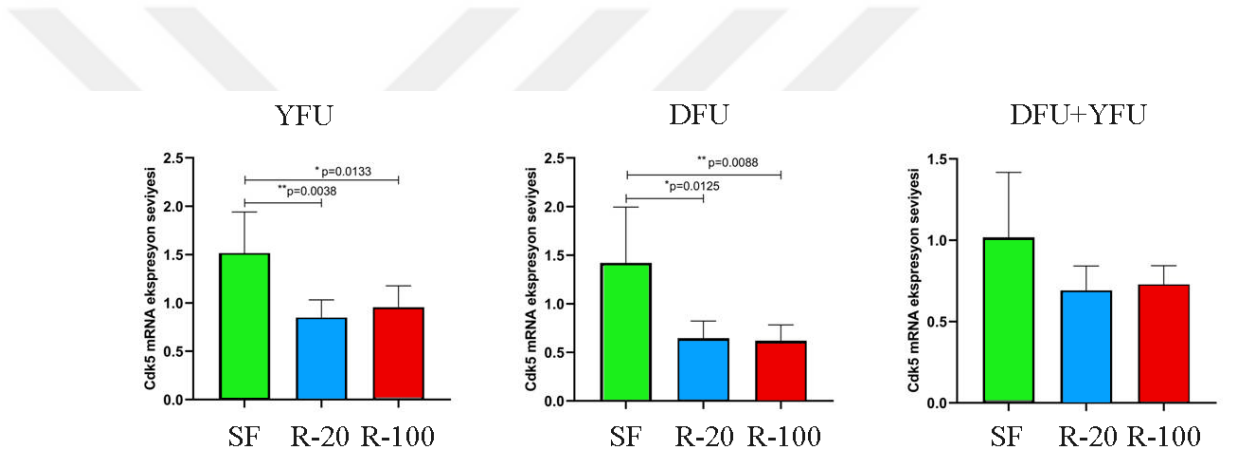
ED:Etkili Değildir

4.9. Moleküler Bulgular

4.9.1. Roscovitine infüzyonunun plastisiteye eşlik eden CDK5 gen anlatımına etkisi.

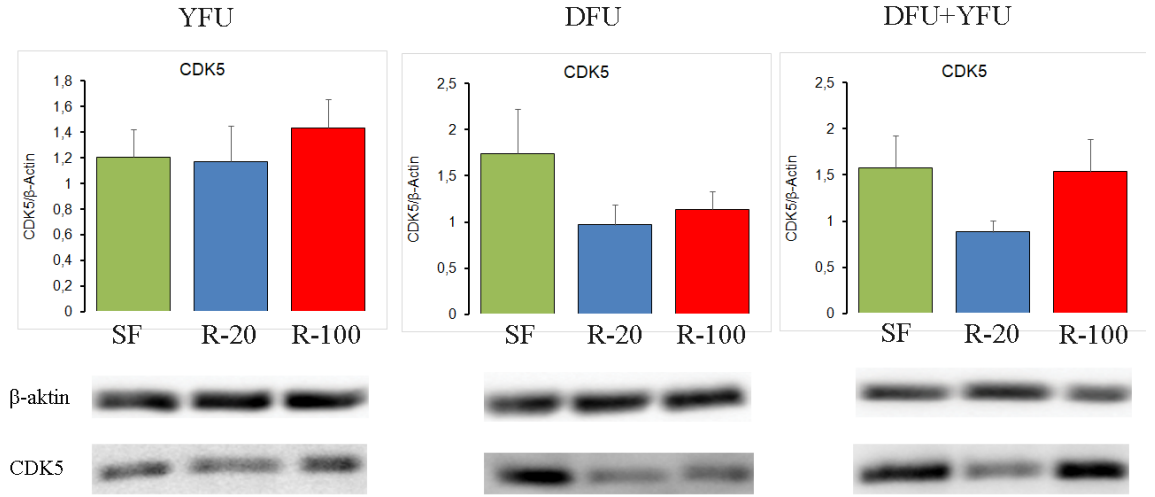
Çalışmamızda farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan Hipokampal dokuların rastlantısal olarak seçilen 6'sında rt-PCR yöntemi kullanılarak Cdk5-mRNA düzeyi değerlendirildi ve sonuçlar Şekil 16'da sunuldu. $2^{-\Delta\Delta Ct}$

değerlerinin istatistiksel analizi Cdk5-mRNA düzeyleri arasında YFU (Tek-yönlü ANOVA, $F_{2,14}=8,761$, $p = 0.003$) ve DFU (Kruskal-Wallis, $\chi^2=11,380$, $p = 0.0006$) uygulamasından 60 dakika sonraki Cdk5-mRNA anlatımının gruplar arasında farklı olduğunu gösterdi. Post-Hoc karşılaştırmada Cdk5-mRNA düzeyinde Roscovitine verilen gruplarda, kontrol grubuna göre, hem YFU'dan (R-20 grubu için $p = 0.0038$; R-100 grubu için $p = 0.0133$) hem de DFU'dan (R-20 grubu için $p = 0.0125$; R-100 grubu için $p = 0.0088$) sonra anlamlı bir azalma saptandı. Roscovitine grupları arasında fark bulunmadı. Ayrıca DFU-YFU verilmesinden sonra gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Bu bulgular Roscovitine infüzyonu altında indüklenen sinaptik UDG ve UDB'nin azalan Cdk5 anlatımı ile birlikte gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.7. Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda Cdk5-mRNA düzeyi.

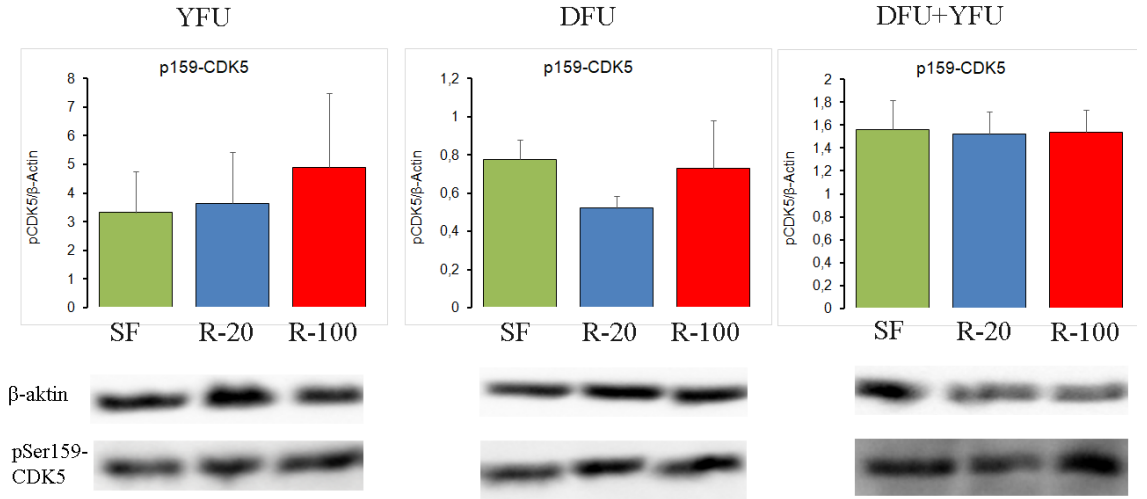
Şekil 4.7, farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokulardan rastlantısal olarak seçilen örneklerde Western-blot ile ölçülen bağıl Cdk5 protein düzeyini göstermektedir. Kruskal-Wallis testi, YFU ($\chi^2 = 1.089$; $p = 0,580$), DFU ($\chi^2 = 1.452$; $p = 0,484$) veya DFU+YFU ($\chi^2 = 2,892$; $p = 0,236$) protokollerinden sonra plastisiteye eşlik eden Cdk5 seviyesinin gruplar arasında farklı olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, DFU protokolünden sonra Cdk5 bandının optik yoğunluğunun, Roscovitine verilen gruplarda gözlenen mRNA seviyesindeki azalmayı destekleyecek şekilde azaldığı dikkati çekmektedir.



Şekil 4.8 . Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda Cdk5 protein seviyesi düzeyi.

4.9.2. Roscovitine infüzyonunun plastisiteye eşlik eden Cdk5 fosforilasyonuna etkisi

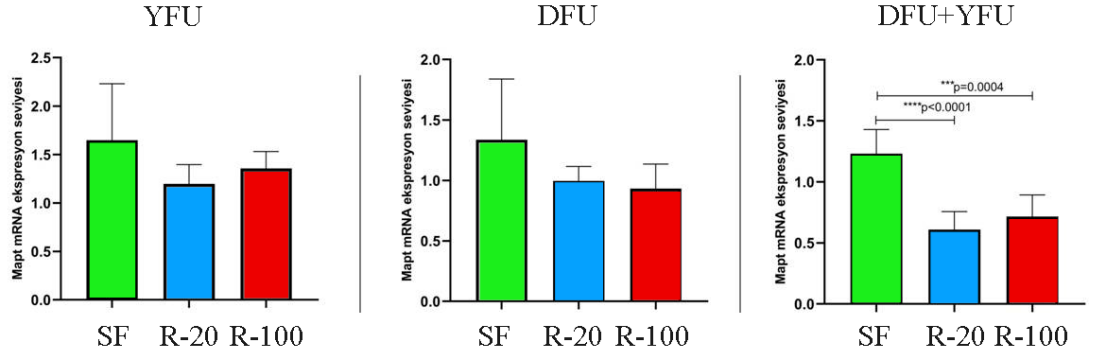
Şekil 4.9’de indüksiyon protokollerinin uygulanmasından en az 60 dakika sonra çıkarılan hipokampustaki ser¹⁵⁹ kalıtlarından fosforillenmiş tau formlarının western blot yöntemi ile belirlenen seviyeleri ve örnek membran bantları verilmiştir. Kruskal-Wallis testi, YFU ($\chi^2 = 0,140$; $p = 0,932$), DFU ($\chi^2 = 3,173$; $p = 0,205$) ve DFU+YFU protokollerinden sonra ($\chi^2 = 0,012$; $p = 0,994$), plastisiteye eşlik eden Cdk5 fosforilasyonlarında gruplar arasında bir farkın olmadığını göstermiştir. Ayrıca Tyr15 epitopundan fosforilasyona da bakılmış ancak hiç bir koşulda değerlendirilebilir bir band gözlenmemiştir.



Şekil 4.9. Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda Ser159 epitopundan Cdk5 fosforilasyon düzeyi.

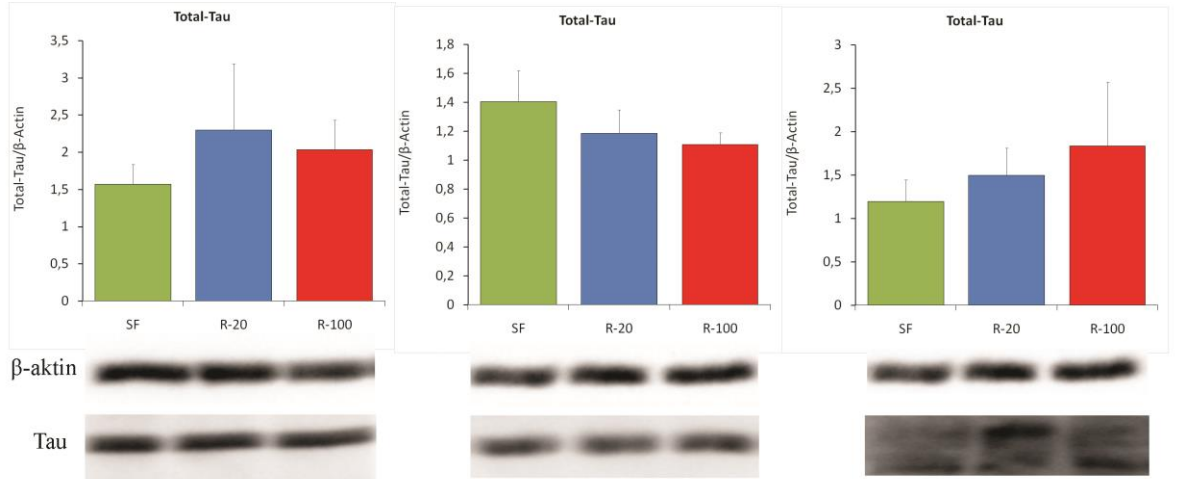
4.9.3. Roscovitine infüzyonunun plastisiteye eşlik eden MAPT anlatımına etkisi

Çalışmamızda farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokuların rastlantısal olarak seçilen 6'sında (Cdk5-mRNA ölçülenlerle aynı örnekler) rt-PCR yöntemi kullanılarak MAPT-mRNA düzeyi değerlendirildi ve sonuçlar Şekil 4.10'da sunuldu. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin istatistiksel analizi MAPT-mRNA düzeyleri arasında DFU+YFU (Tek-yönlü ANOVA, $F_{2,14}=21,71$; $p < 0,0001$) uygulamasından 60 dakika sonraki MAPT-mRNA anlatımının gruplar arasında farklı olduğunu gösterdi. Post-Hoc karşılaştırmada MAPT-mRNA düzeyinde Roscovitine verilen gruplarda, kontrol grubuna göre, DFU+YFU'dan (R-20 grubu için $p = 0.0001$; R-100 grubu için $p = 0.0004$) sonra anlamlı bir azalma saptandı. Roscovitine grupları arasında fark bulunmadı. Ayrıca DFU veya YFU'nun tek başına uygulandığı deneylerde MAPT-mRNA anlatımı bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Bu bulgular Roscovitine infüzyonu altında indüklenen sinaptik UDG ve UDB ye eşlik eden MAPT anlatımının değişmediğini ancak UDG'nin metaplastik kontrolünün MAPT anlatımında azalma ile birlikte gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.10. Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda MAPT-mRNA düzeyi.

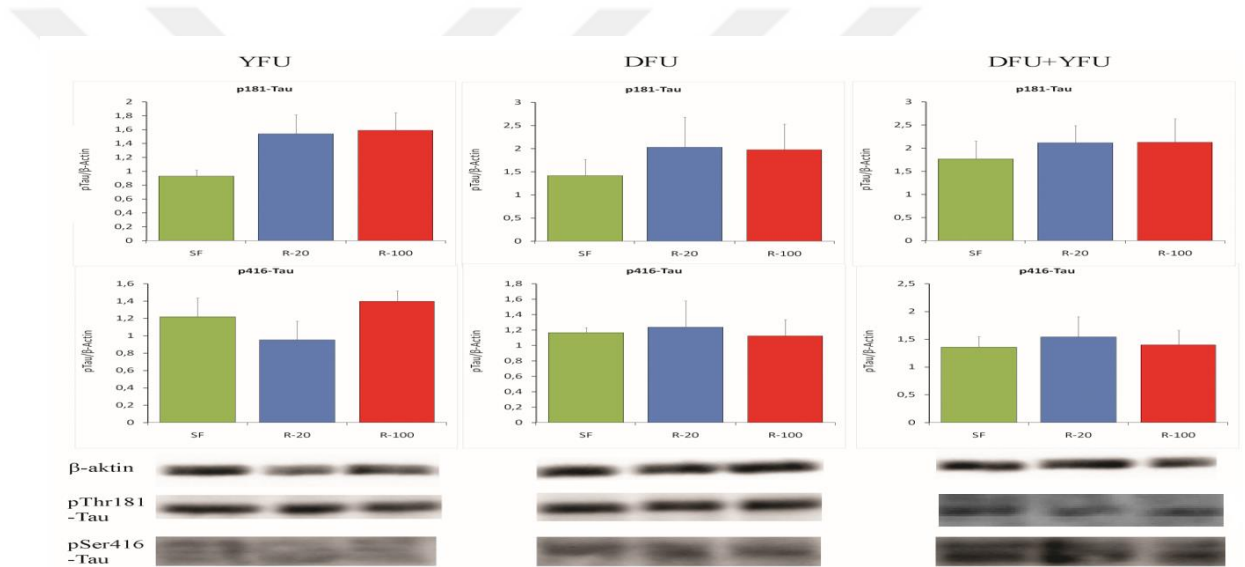
Şekil 4.11, farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokulardan rastlantısal olarak seçilen örneklerde Western-blot ile ölçülen bağıl tau protein düzeyini göstermektedir. Kruskal-Wallis testi, YFU ($\chi^2 = 0,503$; $p = 0,767$), DFU ($\chi^2 = 0,609$; $p:0,738$) veya DFU+YFU ($\chi^2 = 0,457$; $p = 0,796$) protokollerinden sonra plastisiteye eşlik eden toplam tau seviyesinin gruplar arasında farklı olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, DFU+YFU protokolünden sonra bütün gruplarda tau bandının optik yoğunluğunun, Roscovitine verilen gruplarda gözlenen mRNA seviyesindeki azalmayı destekleyecek şekilde azaldığı dikkati çekmektedir.



Şekil 4.11. Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda tau protein seviyesi.

4.9.4. Roscovitine infüzyonunun plastisiteye eşlik eden Tau fosforilasyonuna etkisi

Şekil 4.12’de YFU’dan en az 60 dakika sonra çıkarılan hipokampustaki thr¹⁸¹ ve ser⁴¹⁶ kalıtlarından fosforillenmiş tau formlarının western blot yöntemi ile belirlenen seviyeleri ve örnek membran bantları verilmiştir. Kruskal-Wallis testi, YFU (p^{thr181} tau: $X^2=5,245$; p=0,073 ve p^{ser416} tau: $X^2=3,196$; p=0,202), DFU (p^{thr181} tau: $X^2=0,983$; p=0,612 ve p^{ser416} tau: $X^2=0,0$; p=1,000) ve DFU+YFU protokollerinden sonra (p^{thr181} tau: $X^2=0,457$; p = 0,796 ve p^{ser416} tau: $X^2=0,047$; p=0,977), plastisiteye eşlik eden tau fosforilasyonlarında gruplar arasında bir farkın olmadığını göstermiştir.



Şekil 4.12. Farklı indüksiyon protokollerinin bitiminden 60 dk sonra çıkartılan hipokampal dokularda tau proteinin Thr181 ve Ser416 kalıtlarından fosforilasyon düzeyi.

5.TARTIŞMA

5.1. Elektrofizyolojik Bulgular

Hipokampal tri-sinaptik eksitatör devrenin girdi yapısı (DG) ve çıktı yapısı (CA1) plastisitenin yaygın olarak çalışıldığı iki yapıdır ve plastisitede farklı özellikler gösterirler. Örneğin DG'de UDG'yi indüklemek için gereken stimülasyon parametreleri, CA1 alanında UDG'yi indüklemek için gerekenlerden daha kuvvetli olmalıdır. Bu nedenle CA1'de UDG indükleyebilen en düşük frekanslı uyarılar, DG'de belirgin bir UDB oluşturmazlar [78, 79]. Bu, olasılıkla piramidal nöronlar ve granül nöronlarının Ca kinetiklerinin farklı olmasına dayanmaktadır [80]. DG ve CA1'in esas nöronları (sırasıyla granül hücreler ve piramidal hücreler), GABAerjik ara-nöronları ileri- veya geri-beslemeli inhibitör etkisine maruz kalırlar ve perforan yol doğrudan inhibitör ara-nöronlarda sonlanarak granül hücre aktivitesini (içsel uyarılabilirliğini) artırır [81]. Bu çalışmalar DG'deki plastisitenin sinaptik ve somatik bileşenlerinin ayrı ayrı değerlendirilmesinin gerekliliğini göstermektedir. Nitekim çalışmamızda kontrol grubu sıçanlarda perforan yolun her üç uyarı protokolü ile uyarılması, YFU ile daha belirgin olmak üzere, plastisitenin somatik bileşeninde güçlenmeye neden olurken, sinaptik bileşende indüklenen plastisite formu değişiklik göstermiştir. Sinaptik gücü anlamlı bir şekilde değiştirmeyen DFU, sinaptik bileşende UDG indükleyen YFU'dan önce verildiğinde anlamlı bir sinaptik UDB oluşmasına neden olmuştur. Kontrol grubundan elde edilen bu bulgular, DG nöronlarının sinaptik baskılanma gerçekleşmese bile UDG sergileyebileceklerini göstermektedir. CA1 piramidal nöronlarının böyle bir özelliğe sahip olup olmadıkları ise bilinmemektedir.

Kontrol grubu sıçanlardan elde edilen bulgulara göre perforan yolun 15 dakika süre ile 1Hz frekansta kare pulseler ile uyarılması sinaptik güçte kalıcı bir değişmeye neden olmamaktadır. Çalışmamızda kullanılan bu protokolün genç-yetişkin sıçanların

CA1 bölgesinde de kalıcı bir sinaptik UDB indükleyemediği bildirilmiştir [82, 83]. CA1 bölgesinden yapılan bu çalışmalarda PS genlik ölçümleri yapılmamıştır. Bizim çalışmamız düşük frekanslı uyarım kalıbının sinaptik güçte bir değişikliğe neden olmaksızın nöronal çıktıda en az 1 saat süren bir güçlenme oluşturabileceğini desteklemektedir [20, 84-86]. Ayrıca Roscovitine infuse ettiğimiz deney bulguları bu atipik UDG'nin oluşumunda Cdk5 aktivitesinin önemli olduğunu da desteklemektedir. Çünkü DFU Roscovitine varlığında hem sinaptik UDB oluşumuna neden olmuş hem de PS genliğindeki güçlenmeyi baskılamıştır.

Çalışmamızda kullanılan Roscovitine'in güçlü bir şekilde inhibe ettiği Cdk5, aktivitesi nörona özgü p35 ve p39 aktivatör proteinler tarafından regüle edilen bir serin/threonin protein kinazdır. Hem pre- hem postsinaptik nöronlarda yüksek oranda bulunması nedeni ile sinaptik plastisitenin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Çeşitli çalışmalar Cdk5'in nörotransmisyon rolü yanı sıra postsinaptik sinyal yollarının regülasyonundaki rolüne de vurgu yapmaktadır [87-89]. Çalışma bulgularımız plastisite Roscovitine verilerek YFU indüklendiğinde DG nöronlarında plastisitenin sinaptik ve somatik bileşenlerinin etkilenmediğini göstermektedir. Bu bulgu, Roscovitine ile Cdk5 inhibisyonunun, sinaptik plastisite oluşumundan sorumlu önemli kinazlardan biri olan Erk1/2'nin artmış aktivasyonu ile açıklanabilir [89-92]. In vivo çalışma bulgumuzun aksine in-vitro gerçekleştirilen önceki bir çalışmada Cdk5 inhibisyonunun CA1 hipokampal nöronlarda UDG'yi inhibe ettiği [8] kortikostriatal yolakta ise YFU ile indüklenen UDB'yi UDG'ye çevirdiği [90] rapor edilmiştir. Bu çalışmalarla beraber elde edilen bulgular Cdk5 aktivitesinin hipokampal UDG'ye olan etkisinin Cdk5'in UDG anlatıma olan etkisinin çalışılan bölgeye göre değişebileceğine işaret etmektedir.

Diğer yandan DG nöronlarının Roscovitine etkisi altında DFU ile uyarılması sinaptik UDB'ye yol açmış ve somatik UDG'yi inhibe etmiştir. Önceki bir çalışmada Cdk5'in NMDAR reseptör alt tipi NR2A'yı ser1212 kalıtından fosforilleyerek bu reseptörden Ca akımını artırdığı gösterilmiştir [91]. Dolayısıyla çalışmamızda Roscovitine etkisi altında DFU ile indüklenen plastisitenin kontrol grubuna göre azalmış Ca akımı ile birlikte gelişmesi beklenebilir. Bu nedenle, çalışmamızda azalmış Ca akımının sinaptik plastisitede UDB oluşmasına ve somatik plastisitenin inhibe edilmesine neden olabileceği düşünülebilir. Literatürde UDB-Roscovitine ilişkisini araştıran bir

çalışmaya rastlanılmamışsa da Cdk5 aktivatörü olan P35 yoksunu farelerde UDB oluşumunun bozulduğu bildirilmiştir [7]. Bu bulgular Cdk5 inhibisyonuyla Cdk5 aktivatörünün yokluğunun UDB oluşumunda farklı mekanizmaları kullanabileceğini düşündürmektedir.

Nöronların plastisite indüksiyonundan önceki aktivite geçmişi, sergileyecekleri plastisite formunun en önemli belirleyicilerinden biridir. Metaplastisite ya da plastisitenin plastisitesi olarak tanımlanan bu kavram sayesinde sinaptik plastisitenin iki formunun da doyumluğa ulaşması önlenir. Bir başka ifade ile metaplastisite, plastisitenin büyüklüğünü ve yönünü regüle eden bir süreçtir. Bu çalışmada kontrol grubunda sinaptik UDG indükleyen YFU'dan önce DFU verilmesi halinde beklenen UDG yerine UDB indüklenmiş olması tanımlanan metaplastisite özelliğine uyumludur. Ancak aynı metaplastisite özelliği, DG nöronlarında plastisitenin somatik bileşeni açısından gözlemlenmemiştir. Bu çalışmada Roscovitine etkisi altında sinaptik plastisitenin metaplastik regülasyonu ortadan kalkmış; DFU'nun sonrasında YFU verilerek indüklenen sinaptik plastisiteye bir etkisi olmamıştır. Bu bulgu, Cdk5'in plastisitenin metaplastik regülasyonuna katkısı olduğunu kuvvetle desteklemektedir. Bu bulgumuz ile doğrudan ilişkili bir çalışmaya rastlanılmamışsa da sinaptik plastisite gücünün ayarlanmasına aktivite ile indüklenen bir kinaz olan Polo-benzeri kinaz 2'nin aktivasyonu için Cdk'in gerekliliği hipokampal nöronlarda gösterilmiştir [92].

5.2. Moleküler Bulgular

Plastisitenin indüksiyonu, hücre içi sinyal yollarının Ca-duyarlı aktivasyonuna ve kalıcılığı uygun nöronal proteinlerin sentezlenmesine bağlıdır. Bu çalışmadan elde edilen moleküler bulgular, Roscovitine varlığında ve yokluğunda indüklenen nöral plastisite formlarına eşlik eden Cdk5 ve MAPT gen anlatımının farklılığına işaret etmektedir. HT29 insan kolon kanser hücrelerinde Roscovitine'in Aurora-A/B, Polo-like kinase, cyclin B2, WEE1 ve CDC25C gibi mitotik kontrol genlerinin anlatımını azalttığı gösterilmiştir [93]. Ayrıca Roscovitine kurbağa yavrusunda T3 hormon-duyarlı kuyruk gerilemesine neden olan genlerin anlatımını da azaltmaktadır [94]. Bizim çalışmamızda, ilk kez Roscovitine'in nörodejenerasyon-ilişkili iki genin anlatımında da azalma meydana getirebileceği ve bunun indüksiyon protokolüne bağımlı olduğu gösterilmiştir. Roscovitine'in RNA sentezini inhibe etmesinin olası

bir mekanizması RNA polimeraz II'nin karboksil terminal bölgesinin fosforilasyonunu inhibe etmesi olabilir [95].

Bulgularımız Roscovitine varlığında indüklenen sinaptik ve somatik UDG'nin büyüklüğünün kontrole göre değişmediğini ama buna eşlik eden Cdk5 gen anlatımının azaldığını göstermektedir. Bu bulguya dayanarak Cdk5 gen anlatımındaki azalmanın, UDG oluşumunu etkileyemeyeceğini ifade edilebiliriz. Cdk5-shRNA enjeksiyonu ile Cdk5 anlatımı azaltılan farelerde yapılan bir çalışmada ise CA1 bölgesinden kaydedilen UDG'nin güçlendiği rapor edilmiştir [96]. Bu çalışmada Cdk5 anlatımının hipokampüse yapılan Cdk5 shRNA-miR enjeksiyonları ile Cdk5 geninin doğrudan susturulması, bizim çalışmamızda ise Roscovitine ile Cdk5 genin anlatımının yaklaşık yarı-yarıya azaltılması söz konusudur. Dolayısıyla bizim çalışmamızda UDG'nin Roscovitine'den etkilenmemesi bu farklılıktan kaynaklanabilir.

Çalışma bulgularımız, Roscovitine ile azaltılan Hipokampal Cdk5 gen anlatımının, DFU ile indüklenen plastisiteye de eşlik ettiğini göstermektedir. Bu deneylerde Roscovitine ile azalmış Cdk5 anlatımı sinaptik UDB'nin oluşması ve somatik UDG'nin inhibisyonu ile beraberdir. Bu bulgular Cdk5 varlığında DFU ile transkripsiyon-bağımlı bir UDB'nin oluşmasının kolaylaşacağına işaret etmektedir. Cdk5 anlatımı ile UDB arasında doğrudan ilişkiyi gösteren yayınlanmış bir çalışma olmamakla birlikte Cdk5 tarafından NMDA reseptör NR2B alt-biriminin fosforillendiği gösterilmiştir [97]. NMDA reseptör alt biriminin NR2A veya NR2B olması halinde hangi sinaptik plastisite formunun oluşacağı konusunda bir uyuşma yoktur [98]. Roscovitinin sinaptik plastisiteye olan UDB oluşumunu teşvik eden etkileri dikkate alındığında, Cdk5'in NMDA alt birimlerinin anlatımını/fonksiyonunu farklı etkileyebileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda DFU ve YFU ile uyarılan hipokampal dokularda Cdk5 anlatımında Roscovitine varlığında bulunan azalma, bu protokollerin ardıl bir şekilde uygulanması halinde ortadan kalmıştır. Cdk5 anlatımının Roscovitine ile değişmediği bu deneylerde sinaptik UDG oluşumunun, MAPT gen anlatımında azalmayla birlikte, kolaylaştığı görülmüştür.

Çalışmamızda western blot tekniği ile ölçülen protein seviyeleri, bu proteinlerin mRNA düzeyindeki değişiklikler ile örtüşmemektedir. Bunun bir nedeni western ve

PCR deneylerinde farklı sıçanlarının hipokampüsünün kullanılmış olması olabilir. Diğer bir nedeni ise mRNA'daki azalmanın protein düzeyindeki azalmaya neden olabilmesi için deney süresinden daha uzun bir zamanın geçmesinin gerekliliği olabilir. Bu nedenle plastisite indüksiyonundan bir saat sonra çıkartılan hipokampal dokularda Cdk5 ve tau protein seviyesi azalmamış olabilir. Çalışmamızda Cdk5 ve tau protein fosforilasyonlarında belirgin bir farklılık görülmemesi ise fosforilasyonların hipokampal dokular çıkartılmadan önce gerçekleşmesine bağlı olabilir. Dolayısıyla bulgularımızın daha doğru yorumlanabilmesi için ölçümlerin indüksiyondan sonra farklı zamanlarda çıkartılan hipokampal dokularda yapıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada plastisite ilişkili anlatımları değerlendirilen Cdk5 geni ve MAPT geni nörodejeneratif hastalıklarla ilişki görülen genlerdendir [99]. Nöron gibi bütün postmitotik hücrelerde Cdk ailesinin bütün üyeleri, Cdk5 hariç olmak üzere, sessizdir ve Cdk5'in anormal fosforilasyonu tau ve amiloid prekürsör proteinin patolojik belirteçleri oluşturacak şekilde fosforilasyonuna neden olur [100, 101]. Rt-PCR tekniği kullanılarak entorinal korteks, işitme korteksi ve hipokampüsün incelendiği bir post-mortem çalışmada hipokampal Cdk5 anlatımı Alzheimer hastalarından kontrolden anlamlı düzeyde düşük bulunurken MAPT anlatımında bir farklılık bulunmamıştır [99].

6. SONUÇ

Çalışmadan elde edilen başlıca bulgulara dayanılarak aşağıda sıralanan sonuçlara ulaşılmıştır:

- 1) Roscovitine varlığında YFU ile plastisite indüksiyonu değişmez ama UDG'ye eşlik eden Cdk5 anlatımı azalır.
- 2) DFU'nun indüklediği somatik UDG, Roscovitine varlığında baskılanmakta ve sinaptik UDB indüklenmektedir.
- 3) DFU'nun Roscovitine varlığında indüklediği sinaptik UDB, Cdk5 anlatımındaki baskılanma ile birlikte olmaktadır.
- 4) Roscovitine varlığında DFU ile plastisite indüksiyonu değişmez ama UDG'ye eşlik eden Cdk5 anlatımı azalır.
- 5) Roscovitine varlığında metaplastik UDG inhibisyonu görülmemekte ve MAPT gen anlatımı baskılanmaktadır.

Çalışma bulguları birlikte değerlendirildiğinde, fizyolojik plastisite formları ve plastisite ilişkili gen anlatımının fizyolojik sınırlar içinde kalması için Cdk5 aktivitesinin önemli olduğu; Cdk5 aktivitesi değiştiğinde DG granül hücrelerinin sinaptik ve somatik çıktıları bağlamında farklı plastisite formuna dönüşebileceği ve plastisiteye eşlik eden Cdk5 ve MAPT gen anlatımının değişeceği görülmektedir. Bu etkilerin, kanser, nörodejenerasyon, inflamasyon, viral enfeksiyonlar, polikistik böbrek ve glomerülonefrit gibi hastalıkların tedavisinde bir potansiyel ajan olarak düşünülen Roscovitine tedavi amaçlı kullanımında dikkate alınması gereklidir.

7.KAYNAKLAR

1. Baroncelli, L., et al., *Brain plasticity and disease: a matter of inhibition*. Neural plasticity, 2011. 2011.
2. Dhavan, R. and L.-H. Tsai, *A decade of CDK5*. Nature reviews Molecular cell biology, 2001. 2(10): p. 749-759.
3. Patrick, G.N., et al., *Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration*. Nature, 1999. 402(6762): p. 615-622.
4. Li, B.-S., et al., *Integrin $\alpha1\beta1$ -mediated activation of cyclin-dependent kinase 5 activity is involved in neurite outgrowth and human neurofilament protein H Lys-Ser-Pro tail domain phosphorylation*. Journal of Neuroscience, 2000. 20(16): p. 6055-6062.
5. Hawasli, A.H. and J.A. Bibb, *Alternative roles for Cdk5 in learning and synaptic plasticity*. Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology, 2007. 2(8): p. 941-948.
6. Zhang, S., et al., *Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors*. Journal of Neuroscience, 2008. 28(2): p. 415-424.
7. Ohshima, T., et al., *Impairment of hippocampal long-term depression and defective spatial learning and memory in p35^{-/-} mice*. Journal of neurochemistry, 2005. 94(4): p. 917-925.
8. Fischer, A., et al., *Cdk5: a novel role in learning and memory*. Neurosignals, 2003. 12(4-5): p. 200-208.
9. İzci, Y. and Y.C. Erbaş, *Hipokampus: yapısı ve fonksiyonları*. Türk Nöroşir Derg, 2015. 25(3): p. 287-95.
10. Amaral, D., R. Insausti, and G. Paxinos, *The human nervous system*. San Diego: Academic, 1990: p. 711-755.
11. Suzuki, M., et al., *Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence*. Cerebral Cortex, 2005. 15(2): p. 187-193.

12. Tien, R.D., G.J. Felsberg, and B. Crain, *Normal anatomy of the hippocampus and adjacent temporal lobe: high-resolution fast spin-echo MR images in volunteers correlated with cadaveric histologic sections*. AJR. American journal of roentgenology, 1992. 159(6): p. 1309-1313.
13. Wojtowicz, J.M., *Adult neurogenesis. From circuits to models*. Behavioural brain research, 2012. 227(2): p. 490-496.
14. Bakker, A., et al., *Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus*. science, 2008. 319(5870): p. 1640-1642.
15. Dharani, K., *The biology of thought: A neuronal mechanism in the generation of thought-A new molecular model*2014: Academic Press.
16. Takagi, H., *Roles of ion channels in EPSP integration at neuronal dendrites*. Neuroscience research, 2000. 37(3): p. 167-171.
17. Hammond, C., *The voltage-gated channels of action potentials*. Cellular and Molecular Neurobiology, 1996: p. 117-187.
18. Graupner, M., *Induction and maintenance of synaptic plasticity*, 2008, Dresden, Techn. Univ., Diss., 2008.
19. Grasselli, G., et al., *Activity-dependent plasticity of spike pauses in cerebellar Purkinje cells*. Cell reports, 2016. 14(11): p. 2546-2553.
20. Lopez-Rojas, J., M. Heine, and M.R. Kreutz, *Plasticity of intrinsic excitability in mature granule cells of the dentate gyrus*. Scientific reports, 2016. 6(1): p. 1-12.
21. Hebb, D.O., *The organization of behavior: A neuropsychological theory*2005: Psychology Press.
22. Konorski, J., *Conditioned reflexes and neuron organization*. 1948.
23. Cummings, J.A., et al., *Ca²⁺ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus*. Neuron, 1996. 16(4): p. 825-833.
24. Kotaleski, J.H. and K.T. Blackwell, *Modelling the molecular mechanisms of synaptic plasticity using systems biology approaches*. Nature Reviews Neuroscience, 2010. 11(4): p. 239-251.
25. Martin, S.J., P.D. Grimwood, and R.G. Morris, *Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis*. Annual review of neuroscience, 2000. 23(1): p. 649-711.

26. Glanzman, D.L., *Common mechanisms of synaptic plasticity in vertebrates and invertebrates*. Current Biology, 2010. 20(1): p. R31-R36.
27. Löwel, S. and W. Singer, *Selection of intrinsic horizontal connections in the visual cortex by correlated neuronal activity*. Science, 1992. 255(5041): p. 209-212.
28. Lomo, T. *Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in dentate area of hippocampal formation*. in *Acta Physiologica Scandinavica*. 1966. Blackwell Science Ltd PO BOX 88, OSNEY MEAD, OXFORD OX2 0NE, OXON, ENGLAND.
29. Nicoll, R.A. and R.C. Malenka, *Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus*. Nature, 1995. 377(6545): p. 115-118.
30. Abraham, W.C., et al., *Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus*. Journal of Neuroscience, 2002. 22(21): p. 9626-9634.
31. Lisman, J., H. Schulman, and H. Cline, *The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory*. Nature Reviews Neuroscience, 2002. 3(3): p. 175-190.
32. Sacktor, T.C., *PKM ζ , LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage*. Progress in brain research, 2008. 169: p. 27-40.
33. Niswender, C.M. and P.J. Conn, *Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2010. 50: p. 295-322.
34. Malenka, R.C., *Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD*. Cell, 1994. 78(4): p. 535-538.
35. Lisman, J., *A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. 86(23): p. 9574-9578.
36. Mulkey, R.M., C.E. Herron, and R.C. Malenka, *An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression*. Science, 1993. 261(5124): p. 1051-1055.
37. Carroll, R.C., et al., *Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity*. Nature Reviews Neuroscience, 2001. 2(5): p. 315-324.

38. Abraham, W.C. and M.F. Bear, *Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity*. Trends in neurosciences, 1996. 19(4): p. 126-130.
39. Abraham, W.C. and W.P. Tate, *Metaplasticity: a new vista across the field of synaptic plasticity*. Progress in neurobiology, 1997. 52(4): p. 303-323.
40. Roth-Alpermann, C., et al., *Homeostatic shutdown of long-term potentiation in the adult hippocampus*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. 103(29): p. 11039-11044.
41. Wang, H. and J.J. Wagner, *Priming-induced shift in synaptic plasticity in the rat hippocampus*. Journal of neurophysiology, 1999. 82(4): p. 2024-2028.
42. Wang, Z., et al., *Bidirectional changes in spatial dendritic integration accompanying long-term synaptic modifications*. Neuron, 2003. 37(3): p. 463-472.
43. Ireland, D.R. and W.C. Abraham, *Group I mGluRs increase excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons by a PLC-independent mechanism*. Journal of neurophysiology, 2002. 88(1): p. 107-116.
44. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nature reviews cancer, 2009. 9(3): p. 153-166.
45. Shah, K. and D.K. Lahiri, *Cdk5 activity in the brain—multiple paths of regulation*. Journal of cell science, 2014. 127(11): p. 2391-2400.
46. Smith, D.S., P.L. Greer, and L.-H. Tsai, *Cdk5 on the brain*. Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research, 2001. 12(6): p. 277-284.
47. Chang, K.-H., F. Vincent, and K. Shah, *Deregulated Cdk5 triggers aberrant activation of cell cycle kinases and phosphatases inducing neuronal death*. Journal of Cell Science, 2012. 125(21): p. 5124-5137.
48. Cruz, J.C. and L.-H. Tsai, *Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Trends in molecular medicine, 2004. 10(9): p. 452-458.
49. Dhariwala, F.A. and M.S. Rajadhyaksha, *An unusual member of the Cdk family: Cdk5*. Cellular and molecular neurobiology, 2008. 28(3): p. 351-369.
50. Kim, S.H. and T.A. Ryan, *CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release*. Neuron, 2010. 67(5): p. 797-809.

51. Marra, V., et al., *A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses*. Neuron, 2012. 76(3): p. 579-589.
52. Su, S.C., et al., *Regulation of N-type voltage-gated calcium channels and presynaptic function by cyclin-dependent kinase 5*. Neuron, 2012. 75(4): p. 675-687.
53. Floyd, S.R., et al., *Amphiphysin 1 binds the cyclin-dependent kinase (cdk) 5 regulatory subunit p35 and is phosphorylated by cdk5 and cdc2*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(11): p. 8104-8110.
54. Tomizawa, K., et al., *Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles*. The Journal of cell biology, 2003. 163(4): p. 813-824.
55. Craig, A.M. and Y. Kang, *Neurexin-neuroligin signaling in synapse development*. Current opinion in neurobiology, 2007. 17(1): p. 43-52.
56. Yuzaki, M., *Cbln1 and its family proteins in synapse formation and maintenance*. Current opinion in neurobiology, 2011. 21(2): p. 215-220.
57. Kawauchi, T., *Cdk5 regulates multiple cellular events in neural development, function and disease*. Development, growth & differentiation, 2014. 56(5): p. 335-348.
58. Samuels, B.A., et al., *Cdk5 promotes synaptogenesis by regulating the subcellular distribution of the MAGUK family member CASK*. Neuron, 2007. 56(5): p. 823-837.
59. Fu, W.-Y., et al., *Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism*. Nature neuroscience, 2007. 10(1): p. 67-76.
60. Cheung, Z.H., A.K. Fu, and N.Y. Ip, *Synaptic roles of Cdk5: implications in higher cognitive functions and neurodegenerative diseases*. Neuron, 2006. 50(1): p. 13-18.
61. McClue, S.J., et al., *In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine)*. International journal of cancer, 2002. 102(5): p. 463-468.
62. Cicens, J., et al., *Roscovitine in cancer and other diseases*. Annals of translational medicine, 2015. 3(10).

63. Avila, J., et al., *Role of tau protein in both physiological and pathological conditions*. Physiological reviews, 2004.
64. Drechsel, D.N., et al., *Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau*. Molecular biology of the cell, 1992. 3(10): p. 1141-1154.
65. Jadhav, S., et al., *Tau-mediated synaptic damage in Alzheimer's disease*. Translational neuroscience, 2015. 6(1): p. 214-226.
66. Lu, M. and K.S. Kosik, *Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms*. Molecular biology of the cell, 2001. 12(1): p. 171-184.
67. Biundo, F., et al., *A role for tau in learning, memory and synaptic plasticity*. Scientific reports, 2018. 8(1): p. 1-13.
68. Fuster-Matanzo, A., et al., *Tau protein and adult hippocampal neurogenesis*. Frontiers in neuroscience, 2012. 6: p. 104.
69. Köpke, E., et al., *Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease*. Journal of Biological Chemistry, 1993. 268(32): p. 24374-24384.
70. Dolan, P.J. and G.V. Johnson, *The role of tau kinases in Alzheimer's disease*. Current opinion in drug discovery & development, 2010. 13(5): p. 595.
71. Roberson, E.D., et al., *Amyloid- β /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease*. Journal of Neuroscience, 2011. 31(2): p. 700-711.
72. Shipton, O.A., et al., *Tau protein is required for amyloid β -induced impairment of hippocampal long-term potentiation*. Journal of Neuroscience, 2011. 31(5): p. 1688-1692.
73. Kimura, T., et al., *Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2014. 369(1633): p. 20130144.
74. Ahmed, T., et al., *Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion*. Neurobiology of aging, 2014. 35(11): p. 2474-2478.
75. Mondragón-Rodríguez, S., et al., *Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent*

- tau phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 2012. 287(38): p. 32040-32053.
76. Siano, G., et al., *Tau modulates VGluT1 expression*. Journal of molecular biology, 2019. 431(4): p. 873-884.
 77. Dursun, N., et al., *The Effect of Metaplasticity and Neurogenesis Relationship on Developed Memory Disorders in Hypothyroidism*. 2018.
 78. Trieu, B.H., et al., *Pronounced differences in signal processing and synaptic plasticity between piriform-hippocampal network stages: a prominent role for adenosine*. Journal of Physiology-London, 2015. 593(13): p. 2889-2907.
 79. Abraham, W.C., S.E. MasonParker, and B. Logan, *Low-frequency stimulation does not readily cause long-term depression or depotentiation in the dentate gyrus of awake rats*. Brain research, 1996. 722(1-2): p. 217-221.
 80. Baba, A., et al., *Different Ca²⁺ dynamics between isolated hippocampal pyramidal cells and dentate granule cells*. Journal of Neurocytology, 2002. 31(1): p. 41-48.
 81. Smith, P.F., et al., *Vestibular Modulation of Long-Term Potentiation and NMDA Receptor Expression in the Hippocampus*. Frontiers in molecular neuroscience, 2020. 13.
 82. Benuskova, L. *Why is it hard to induce long-term depression?* in *The 2012 International Joint Conference on Neural Networks (IJCNN)*. 2012. IEEE.
 83. Gonzalez, J., et al., *Low-frequency stimulation induces long-term depression and slow onset long-term potentiation at perforant path-dentate gyrus synapses in vivo*. Journal of neurophysiology, 2014. 111(6): p. 1259-1273.
 84. Tomasulo, R.A., W.B. Levy, and O. Steward, *LTP-associated EPSP/spike dissociation in the dentate gyrus: GABAergic and non-GABAergic components*. Brain Res, 1991. 561(1): p. 27-34.
 85. Lopez-Rojas, J., M. Heine, and M.R. Kreutz, *Plasticity of intrinsic excitability in mature granule cells of the dentate gyrus*. Sci Rep, 2016. 6: p. 21615.
 86. Grasselli, G., et al., *Activity-Dependent Plasticity of Spike Pauses in Cerebellar Purkinje Cells*. Cell Rep, 2016. 14(11): p. 2546-53.
 87. Bibb, J.A., *Role of Cdk5 in neuronal signaling, plasticity, and drug abuse*. Neurosignals, 2003. 12(4-5): p. 191-199.

88. Lee, S.Y., et al., *Regulation of synaptojanin 1 by cyclin-dependent kinase 5 at synapses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(2): p. 546-551.
89. Tan, T.C., et al., *Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis*. Nature Cell Biology, 2003. 5(8): p. 701-710.
90. Miranda-Barrientos, J., E. Nieto-Mendoza, and E. Hernández-Echeagaray, *The Cdk5 inhibitor Roscovitine increases LTP induction in corticostriatal synapses*. ASN neuro, 2014. 6(2): p. AN20140006.
91. Li, B.S., et al., *Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(22): p. 12742-12747.
92. Seeburg, D.P., et al., *Critical role of CDK5 and Polo-like kinase 2 in homeostatic synaptic plasticity during elevated activity*. Neuron, 2008. 58(4): p. 571-583.
93. Whittaker, S.R., et al., *The cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (R-roscovitine; CYC202) decreases the expression of mitotic control genes and prevents entry into mitosis*. Cell Cycle, 2007. 6(24): p. 3114-31.
94. Skirrow, R.C., et al., *Roscovitine Inhibits Thyroid Hormone-Induced Tail Regression of the Frog Tadpole and Reveals a Role for Cyclin C/Cdk8 in the Establishment of the Metamorphic Gene Expression Program*. Developmental Dynamics, 2008. 237(12): p. 3787-3797.
95. Ljungman, M. and M.T. Paulsen, *The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382*. Molecular Pharmacology, 2001. 60(4): p. 785-789.
96. Posada-Duque, R.A., et al., *CDK5 downregulation enhances synaptic plasticity*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017. 74(1): p. 153-172.
97. Plattner, F., et al., *Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of NR2B*. Neuron, 2014. 81(5): p. 1070-1083.
98. Bartlett, T.E., et al., *Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus*. Neuropharmacology, 2007. 52(1): p. 60-70.
99. Fukasawa, J.T., et al., *CDK5 and MAPT Gene Expression in Alzheimer's Disease Brain Samples*. Current Alzheimer Research, 2018. 15(2): p. 182-186.

100. Bonda, D.J., et al., *Pathological implications of cell cycle re-entry in Alzheimer disease*. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2010. 12.
101. Cruz, J.C. and L.H. Tsai, *Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Trends in Molecular Medicine, 2004. 10(9): p. 452-458.



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

..... ait
..... adlı çalışma, jürimiz
tarafından.....
Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :

İmza

Başkan..... İmza

Üye..... İmza

Üye..... İmza

Üye..... İmza

Üye..... İmza