

T.C

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Eksitotoksik Koşullarda Spesifik Beyin Bölgelerinde Apoptozis ile İlişkili Bazı
MikroRNA'ların Ekspresyon Paternindeki Değişimler ve Gama-Glutamil
Sisteinil Etil Ester'in Düzenleyici Etkisinin Araştırılması**

Sinirbilim Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Burcu AZAK

Danışman

Prof. Dr. Ayfer YALÇIN

İZMİR

2014

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel birikiminden faydalandığım, akademik ve sosyal hayata hazırlanmamdaki yol gösterici çabası, sabrı ve çalışmalarımındaki ilgi ve desteğinden dolayı başta tez danışmanım Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayfer YALÇIN'a,

Bu tezde kullanmak üzere oluşturulan deney modeli için destek sağlayan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Lütfiye KANIT'a,

Çalışmalarım kapsamında ilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen E.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Dr. S. Ezgi TURUNÇ BAYRAKTAR ve Yrd. Doç. Dr. Güliz ARMAĞAN'a,

Lisansüstü eğitimimde emeği geçen tüm Sinirbilim Anabilim Dalı Öğretim Üyelerimize,

Tez çalışmalarım sırasında maddi destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fon Saymanlığı'na,

Desteğini her zaman hissettiğim aileme ve çalışma arkadaşım Gizem ÇİZMECİ'ye en içten dileklerimle teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

İzmir/ 2014

Burcu AZAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLOLAR DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. Eksitotoksisite ve Nörodejenerasyon	3
1.1.2. Kainik Asit ve Nörodejenerasyon	6
1.2. γ -Glutamilsistein Etil Esteri (GCEE) ve Potansiyel Nöroprotektif Etkileri	11
1.3. miRNA'lar ve Fizyolojik Önemi	12
1.3.1. miRNA'ların Keşfi	13
1.3.2. miRNA'ların Biyogenez ve Etki Mekanizmaları	14
1.3.3. miRNA'ların Hedef Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkileri	15
1.3.4. miRNA'ların Nörodejeneratif Olgulardaki Tedavi Potansiyelleri	16
1.3.5. Epilepsi ve Status Epileptikus Sonrası miRNA Düzenlenmesi	18
1.3.6. Deneysel Epilepsi Modelinde miRNA Düzenlenmesi	20

1.4.Apoptozisle ilişkili miRNA’lar ve Nörodejeneratif Olgulara	
Katkısı	20
1.4.1. Epileptik Nöbetler İle İndüklenen Nöronal Hücre	
Ölümünü Kontrol Eden miRNA’lar	20
1.4.1.1. miR34a ve Nöronal Hücre Ölümü	21
1.4.1.2. miR132 ve Nöronal Hücre Ölümü	22
1.4.1.3. miR184 ve Nöronal Hücre Ölümü	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	24
2.1.Kullanılan Aletler	24
2.2.Kullanılan Çözeltiler	25
2.3.Deney Grupları	26
2.4.Kullanılan Yöntemler	27
2.4.1. miRNA İzolasyonu	27
2.4.2. miRNA İntegrasyon Analizi	28
2.4.3. Revers Transkripsiyon ile cDNA sentezi	29
2.4.4. Real-Time PCR ile Hedef miRNA ekspresyon	
düzeylerinin saptanması (cDNA Amplifikasyonu)	30
2.4.5. Erime Eğrisi Analizi	32
2.4.6. RT- PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi ile Gösterilmesi	32
3. BULGULAR	34
3.1. İzole Edilen miRNA’ların A260/A280 oranları	34
3.2. İzole Edilen miRNA’ların İntegrasyon Analizi	35
3.3. Hedef miRNA’ların Ekspresyon Düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi	
İle Hesaplanmasına Yönelik Bulgular	36
3.4. Hedef miRNA’lar için Erime Eğrisi Sonuçları	40

3.5 Real Time PCR miRNA Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	42
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	43
4.1. Deney Gruplarına Yönelik Tartışma	43
4.2. Hedef miRNA'ların Ekspresyonunun Saptanmasında	
Seçilen Yönteme Yönelik Tartışma	44
4.3. Kainik Asitin Hedef miRNA'ların Ekspresyonu Üzerindeki	
Etkisine Yönelik Tartışma	45
4.4. GCEE'nin Hedef miRNA'ların Ekspresyonu Üzerindeki	
Etkisine Yönelik Tartışma	48
ÖZET	51
ABSTRACT	53
YARARLANILAN KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO

Sayfa no:

Tablo 1. Kontrol, Kainik Asit (KA), Kainik Asit +GCEE uygulanan striatum ve serebellum dokularından izole edilen miRNA'ların konsantrasyon ve A260/A280 absorbans oranları (Ortalama $\pm$ S.H'ları)

34

Tablo 2. Hedef miRNA'ların Kontrol, KA VE KA+GCEE gruplarına ait beyin serebellum ve striatum dokusundaki ekspresyon düzeyleri (ortalama $\pm$ SH'ları)

36

Şekil 1. Glutamat reseptörleri	5
Şekil 2. Glutamat ve kainik asitin yapısal benzerliği	7
Şekil 3. Kainik asitin nörodeneratif etki mekanizması	10
Şekil 4. GCEE'nin yapısı	12
Şekil 5. MikroRNA biyogenezi ve hedef mRNA üzerine etki mekanizması	15
Şekil 6. izole miRNA'ların garoz jel elektroforezi	35
Şekil 7. Sıçan beyni serebellum bölgesine ait miR34a, miR132 ve miR184 ekspresyon düzeylerinin gösterilmesi	37
Şekil 8. Sıçan beyni striatum bölgesine ait miR34a, miR132 ve miR184 ekspresyon düzeylerinin gösterilmesi	38
Şekil 9. RNU'ya ait erime eğrisi örneği	40
Şekil 10. miR34a'ya ait erime eğrisi örneği	40
Şekil 11. miR132'ye ait erime eğrisi örneği	41
Şekil 12. miR184'e ait erime eğrisi örneği	41
Şekil 13. Sıçan beyni striatum ve serebellum doku örneklerinden hedef miRNA'ların RT-PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde representatif olarak gösterilmesi	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eksitotoksisite merkezi sinir sisteminde epileptogenezis, Parkinson, amiotrofik lateral skleroz, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların ve travmatik beyin hasarı, stroke gibi patolojik olguların temelinde yer alan mekanizmalardan biridir. Eksitotoksisite sinir hücrelerinin glutamat gibi eksitator nörotransmitterler tarafından yoğun olarak uyarılmaları sonucu hasara ve apoptoza uğradığı patolojik bir süreçtir. Bu patolojik durum N-Metil-D-Aspartat (NMDA), 2-amino-3-(3-hidroksi-5-metil-izoksazol-4-) propanoik asit (AMPA) ve Kainat reseptörlerinin aşırı derecede aktive olması ve buna bağlı beyinde nöronların anormal ve kontrolsüz bir şekilde uyarılmasıyla karakterizedir. Bu reseptörlere bağlanan glutamat ve kainik asit (KA) gibi eksitotoksik bileşikler hücre içerisine Ca^{+2} girişini artırır ve nöronda depolarizasyonun uzamasına sebep olurlar. Aşırı Ca^{+2} girişi bazı enzimleri aktive ederek apoptozise sebep olabileceği gibi iyon dengesini bozarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine sebep olur (9, 17, 24, 25, 37, 76).

KA iyonotropik glutamat reseptörlerinin agonistidir. KA ile indüklenen nörotoksisitenin temelinde yer alan moleküler ve hücrel mekanizma; hücre dışındaki düzensiz artış nedeniyle hücre içerisinde iyon dengesinin bozulması ve oksijen kaynaklı serbest radikallerin aşırı üretimine bağlı olarak nöronlarda proapoptotik genlerin ekspresyonunu düzenleyen miRNA'ların seviyelerinin değişmesidir (3, 5, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 28, 33, 40, 52, 53).

MikroRNA (miRNA)'lar küçük, kodlama yapmayan, mRNA transkriptlerinin 3' ucundaki translasyonun gerçekleşmediği bölgelerine (UTR) sekans spesifik olarak bağlanarak post-transkripsiyonel gen ekspresyonunu düzenleyen ve böylece protein

üretimini ince ayarını yapan RNA sınıfı olarak kabul edilirler. İnsanlarda sadece ~ 1600 miRNA bulunmasına rağmen biyoinformatik ve ileri kantitatif proteomik çalışmalar protein kodlayan tüm genlerin yarısından fazlasının miRNA regülasyonu olduğunu ve her bir miRNA'nın birden çok proteini regüle ettiğini göstermektedir (1, 4, 5).

Beyin kendine özgü çeşitli miRNA'lar eksprese eder. Bu miRNA'lar dendritik morfoloji, iyon kanallarının düzeyi, nöronal migrasyon ve gliyal fonksiyonların kontrolünde yer almaktadırlar. Epileptogenezis sürecinin altında yatan epileptik durumun devamı ve ilerlemesi gibi patolojik mekanizmalar miRNA'lar ile ilişkilidir. Ekspresyon profillemeye çalışmalarına göre hayvan modellerinde uzun süren epileptik ataklar (status epileptikus) sonrasında beyin miRNA seviyelerinde seçici değişiklikler meydana gelmektedir (58,59,60). Epileptik bireylerde miRNA ekspresyon analizleri yapılmış ve nöroinflamatuvar süreçlerin baskın olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalara göre miRNA'lar belirli kilit süreçleri regüle edebilirler ancak epilepsideki tüm patolojik mekanizmaları kontrol edebilecek etkinliği göstermezler (1, 5, 6, 7, 11, 16, 33, 38, 58,59, 60).

GCEE'nin çeşitli organ ve doku sistemlerinde oksidatif strese karşı etkinliğini gösteren bir dizi çalışma bulunmaktadır. Karaciğer (66, 101) ve kalp (94, 50) iskemi-reperfüzyon modeli, karbon tetraklorürle indüklenen karaciğer hasarı (92) ve kalpte selenyum eksikliğine bağlı (98) patofizyolojik olgularda GCEE'nin oksidatif strese karşı koruyucu etkileri gözlenmiştir.

Spesifik miRNA düzeylerinde meydana gelen değişim apoptozis ile ilgili transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek nöronal hücre ölümüne ve nörodejenerasyona sebep olur. Bu çalışma kapsamında bazı özgün miRNA

ekspresyonlarının KA ve GCEE uygulamasına verdiği yanıt çerçevesinde GCEE'nin nöroprotektif özelliklerine bir yaklaşımda bulunulması amaçlanmıştır.

1.1 Genel Bilgiler

1.1.1. Eksitotoksisite ve Nörodejenerasyon

Akut veya kronik nörodejeneratif hastalıklar tüm dünyada giderek artan bir popülasyonu etkileyen gelişim süreci göstermektedir. Bu durumla ilişkili olarak nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik uygulamaların gelecek yıllarda tüm dünyada sağlık hizmeti veren kurum ve kuruluşlar açısından ekonomik bir sorun olması beklenmektedir. Bu nedenle, son yıllarda nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojik ve moleküler mekanizmalarına yönelik araştırmaların yoğunluk ve hız kazandığı gözlenmektedir.

Aspartat ve glutamat gibi eksitatör aminoasitler memeli santral sinir sisteminin (S.S.S.) temel nörotransmitterleridir. Bu aminoasitlerin beyindeki konsantrasyonları oldukça yüksektir, sinir terminalindeki sinaptik geçişi yönlendirir ve iyonların nöron içine girişini kontrol ederler (9, 40).

Aspartat ve glutamat nöronlar üzerindeki etkilerini belirli reseptörler ile etkileşerek oluştururlar (91, 103). Bu reseptörler iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki grupta sınıflandırılır (Şekil 1). İyon kanallarına bağlı olan iyonotropik reseptörler uyarıldıkları zaman hücre içine veya dışına iyon geçişini etkilerler. Diğer yandan, metabotropik reseptörler görevlerini ikinci haberciler(Inositol-trifosfat (IP₃), intraselüler Ca⁺² salınması) üzerinden yaparlar.

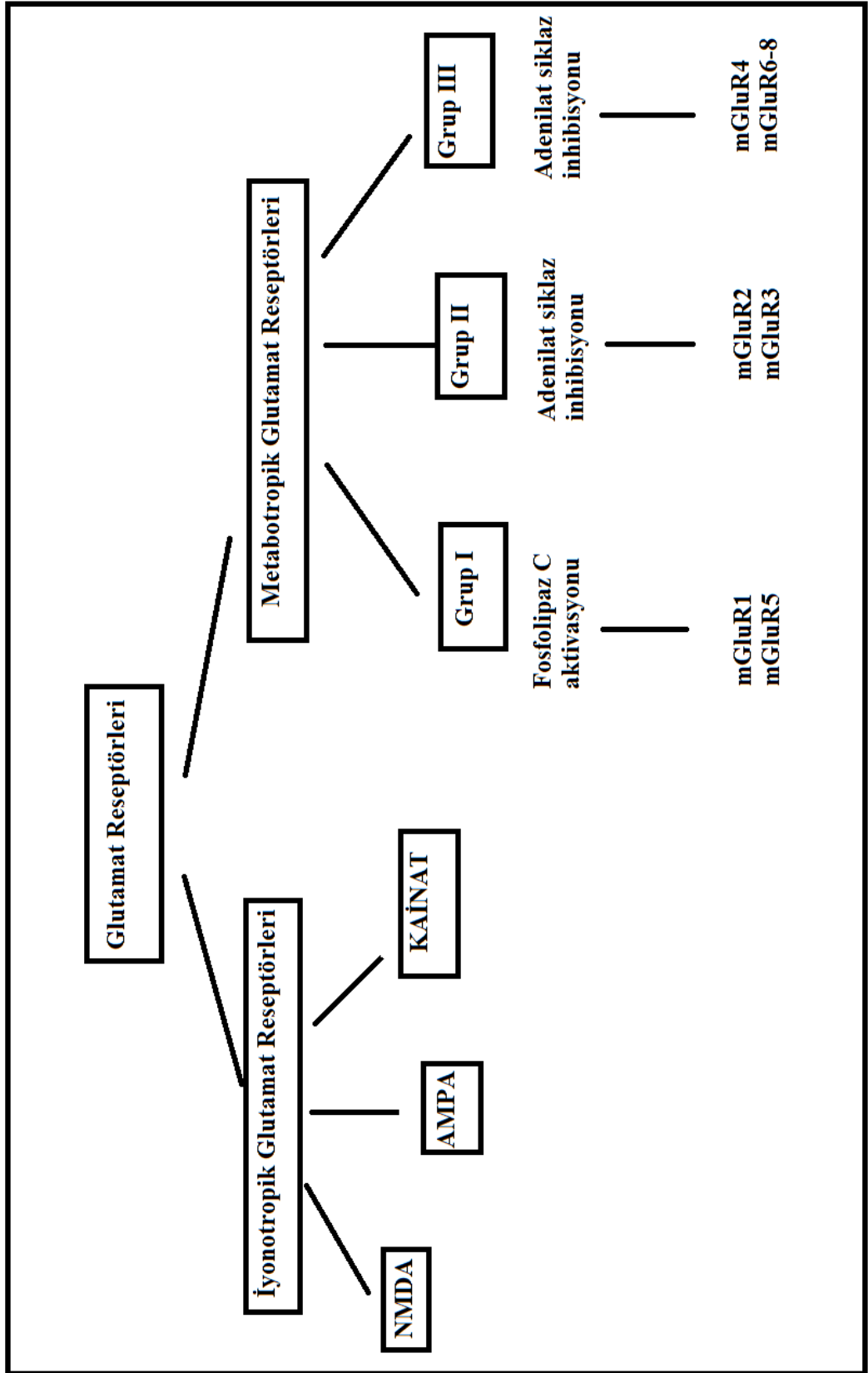
İyonotropik glutamat reseptörleri Na⁺, K⁺, Ca⁺² iyonlarına karşı farklı geçirgenliklere sahiptirler. Bu nedenle üçe ayrılırlar.

NMDA (N-Metil-D-Aspartat) reseptörleri: Na-K-Ca iyon kanalına bağlıdır. Sinir hücrelerine Ca^{+2} iyonlarının geçişini etkilemektedir ve yavaş eksitator yanıtı sorumludur.

AMPA (Alfa amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit) reseptörleri: Na-K iyon kanalına bağlıdır ve hızlı eksitator aşırımdan sorumludur.

Kainat Reseptörleri: AMPA reseptörleri gibi Na-K iyon kanalına bağlıdır ve hızlı eksitator yanıtı sorumludur(64, 71, 91, 103).





Şekil 1. Glutamat Reseptörleri

Eksitator aminoasitler sinir iletimindeki vazgeçilmez rollerine rağmen nörotoksisiteye de sebep verebilecek potansiyele sahiptirler. Eksitotoksisite, eksitator aminoasit reseptörlerin aşırı uyarılmasına bağlı ortaya çıkan ve hücre ölümüne bağlı olarak nörodejenerasyona neden olduğu durumdur. Eksitotoksisitenin rol oynadığı düşünülen hastalıklar arasında akut (strok, epilepsi vd.) ve kronik (Alzheimer, Parkinson vd.) nörodejeneratif hastalıklar vardır (28,32).

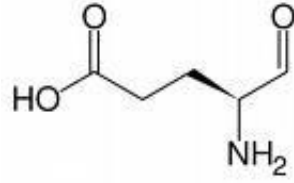
Glutamat reseptörleri üzerinden meydana gelen eksitotoksisitede hücrenin aşırı depolarizasyonu sonucu iyon dengesinin bozulmasına bağlı olarak hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonu artmaktadır. İntraselüler Ca^{+2} artışı bazı lipolitik (lipaz ve fosfolipaz) ve proteolitik enzimleri (Ca^{+2} bağımlı proteazlar) aktifleştirerek hücreyi hem apoptotik hem de nekrotik ölüme sürükleyen mekanizmaları tetikler (25, 64, 127).

1.1.2. Kainik Asit ve Nörodejenerasyon

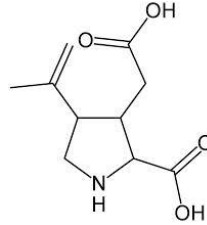
Glutamat reseptör kapılı iyon kanallarının aşırı ve kalıcı aktivasyonu (eksitotoksisite) nöronal hasara neden olur (138, 139, 4). KA, iyonotropik glutamat reseptör bölgelerinin spesifik agonistleri arasındadır ve KA ile indüklenen eksitotoksik koşullar hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve oksidatif strese yol açar (9, 17, 72). KA beyinde spesifik olarak presinaptik ve post sinaptik KA tipi reseptörlere bağlanmak suretiyle etkili olur. KA tipi reseptörler beyinde yaygın olarak hipokampus, amigdala ve piriform korteks bölgelerinde yer alır.

KA, bir tür kırmızı alg olan “Digenea Simplex” ten elde edilir (127). Glutamik asit ile yapısal bir benzerlik taşır. Bu yapısal benzerlik KA’ya iyonotropik glutamat reseptörlerinin agonisti olma özelliği verir (Şekil 2).

Glutamat



Kainik Asit



Şekil 2. Glutamat ve Kainik Asitin Yapısal Benzerliği

KA, akut ve subakut epileptik aktiviteye neden olan potansiyel santral sinir sistemi eksitotoksindir. KA sıçanlara 9-15 mg/kg doz aralığında uygulanması eksitotoksik etkiler yaratır ve hipokampus, talamus ve amigdala bölgeleri başta olmak üzere beyinde *in vivo* ve *in vitro* hasara yol açar. KA uygulanması aynı zamanda glia hücrelerinde, miyelin kılıflarda ve kan damarlarında önemli nöropatolojik değişimlere neden olmaktadır (12, 125).

Sıçanlara KA uygulaması şiddetli bir “status epileptikus” (SE) krizine yol açar. Epileptik şartların kalıcılığı beyinde yaygın bir nörodejenerasyonla sonuçlanır. Sıçanlara sistemik KA uygulamasının deneysel olarak geliştirilen insan SE ve temporal lop epilepsi ve selektif nörodejenerasyon modeli olduğu bilinmektedir (76).

KA, etkilerini iyonotropik glutamat reseptörleri üzerinden gösterir. KA’nın neden olduğu eksitotoksik hasarın temelini oluşturan biyokimyasal mekanizmalar aşağıdaki gibi özetlenebilir(8, 10, 45, 84, 123).

- Ca^{+2} iyon dengesinin bozulması, proteaz ve lipazların aktifleşmesi,

- Kalpainler ve kaspazların aktivasyonu sonucu hücrenin apoptoza yönelmesi
- Nitrik Oksit (NO) sentezi ve serbest radikallerin oluşumu sonucu oksidatif stresin ortaya çıkması
- Akut faz genleri ve diğer transkripsiyon faktörlerinin aşırı indüksiyonu

Kainik asitin yol açtığı nörodejeneratif mekanizmalar Şekil 3'te detaylarıyla gösterilmiştir (84). Buna göre;

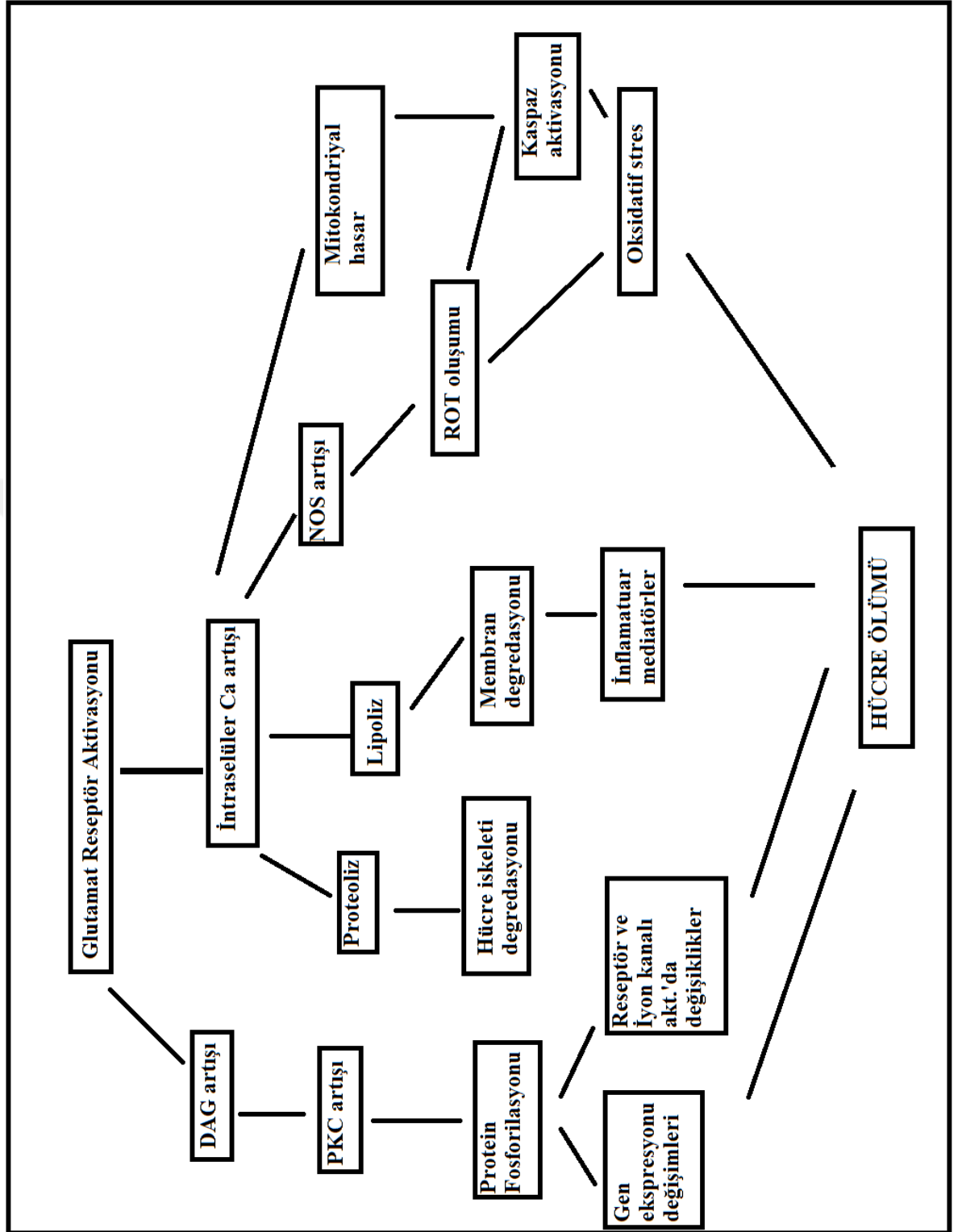
İyonotropik glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması sonucu iyon dengesi bozulur ve intraselüler Ca^{+2} iyon konsantrasyonu artar. Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun yükselmesi Ca^{+2} 'a bağlı lipolitik (lipaz ve fosfolipaz) ve proteolitik enzimlerin (kalpain I ve diğer proteazlar) aktiflenmesine yol açar. Proteazların aktiflenmesi sonucu c-fos, c-jun gibi akut faz genlerinin anormal transkripsiyonu uyarılır. Proteolitik enzimler hücre zarını ve hücre iskeletini oluşturan madde ve zincirleri yıkar. Lipolitik enzimler ise nöronun membranındaki fosfolipidlerden araşidonik asitin salınmasını ve böylece araşidonik asit döngüsünün başlamasını tetikler. Araşidonik asit döngüsünde prostaglandinler, lökotrienler ve tromboksanlar sentezlenir (8, 24, 40).

Serbest radikaller ve lipit peroksitlerin yapımı sonucu KA kaynaklı ve $OH^{\bullet}$ (hidroksil) radikali farelerde karaciğerde lipit peroksidasyonunu artırır ve beyinde de mitokondriyal DNA hasarına neden olur (18).

Hücrede en çok serbest radikal üreten organel ve nöronal hasarın gelişiminde etkili oksidatif stresin ve serbest radikallerin önemli üretim kaynağı mitokondridir. Nitrik oksit (NO) yapımından sonra meydana gelen $ONOO^{\bullet}$ (peroksinitrit) radikali mitokondriyal enerji sentezini inhibe ederek ATP kaybına öncülük etmekte ve

nöronlarda enerji yokluğuna yol açmaktadır. Mitokondride aşırı serbest radikal üretimi sonucu kaspaz aktivasyonuna neden olan pro-apoptotik faktörlerin mitokondriden salınması apoptotik yolakları tetikler ve hücre ölümü gerçekleşir (10, 131).





Şekil 3. Kainik Asitin Nörodejeneratif Etki Mekanizması (DAG, diaçilgliserol; PKC, protein kinaz C; NOS, nitrik oksit sentetaz; ROT, reaktif oksijen türevleri)

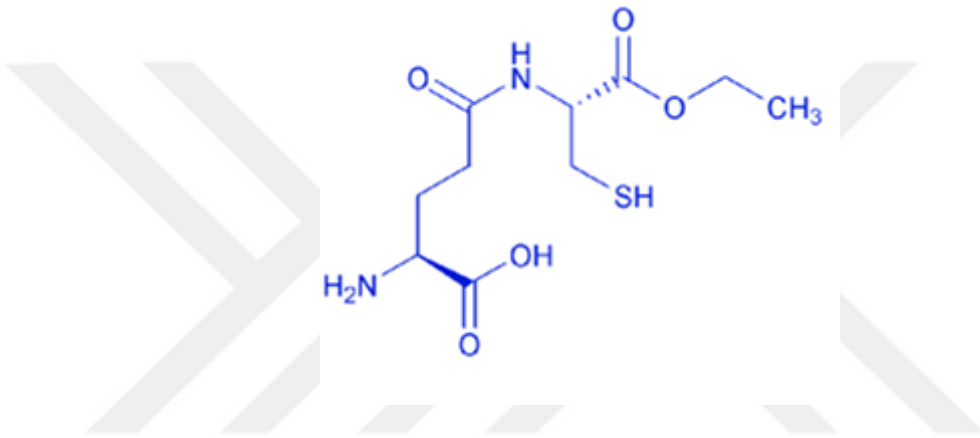
1.2. γ -Glutamilsistein Etil Esteri (GCEE) ve Potansiyel Nöroprotektif Etkileri

GCEE (Des-Gly)-Glutasyon-monoetil ester; γ -GCE) Şekil 4’de gösterildiği gibi yapısal özellikleri bakımından glutatyonla büyük benzerlik göstermektedir. Yapısında taşıdığı tiyol (–SH) grubu nedeniyle GSH’un hücre içine girişi oldukça zordur ve hücre içinde hızla amino asitlerine ayrılmaktadır. Ancak, GCEE’nin hücrelere kolayca girebileceği ve GSH biyosentezine katılabileceği gösterilmiştir (2). GCEE’nin bazı hücre tipleri ve sistemlerine etkin bir şekilde taşındığı ve GSH düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir. Hepatositlerde GCEE’nin hücre içine girişinin GSH’na oranla daha hızlı olduğu ve kolayca GSH’na dönüşebildiği gösterilmiştir (93).

GCEE’nin çeşitli organ ve doku sistemlerinde oksidatif strese karşı etkinliğini gösteren bir dizi çalışma bulunmaktadır. Karaciğer (66,101) ve kalp (94, 50) iskemi-reperfüzyon modeli, karbon tetraklorürle indüklenen karaciğer hasarı (92) ve kalpte selenyum eksikliğine bağlı (98) patofizyolojik olgularda GCEE’nin oksidatif strese karşı koruyucu etkileri gözlenmiştir. Yanısıra, GCEE’nin katarakt deney modelinde antikataraktojenik etkinliği de gösterilmiştir (97).

GCEE’nin beyine yönelik uygulamaları konusunda yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalarda intraserebroventriküler (i.c.v) (106; 108) ve intraperitoneal (30, 31) olarak ratlara uygulanan GCEE’nin beyinde GSH düzeylerini arttırabileceği bildirilmiştir. GCEE’nin bu konudaki etki mekanizması temel olarak hücrelere GSH biyosentezi için prekürsör olarak γ –glutamilsistein’in ulaştırılması ilkesine dayanmaktadır. Bu şekilde, GSH biyosentezinde γ -GCS enzimi ve GSH’un kendisi arasındaki feed-back inhibisyon engelini aşılması ve GSH biyosentezi için gereken substratların süregelen bir biçimde sağlanması mümkün olabilecektir.

İn vivo ve in vitro çalışmalar GCEE' nin GSH biyosentezi için bir prekürsör gibi davranmasının yanı sıra GSH benzeri antioksidan etkileri açısından da beyin dokusunda önemli bir fonksiyon gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar kapsamında; peroksinitrit (31), β -(1-42) amiloid protein (30, 15), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro-piridin; MPTP) (23), adriamisin (61) ve travmatik hasar (74) ile indüklenen bazı oksidatif stres modellerinde GCEE'nin antioksidan etkileri gösterilmiştir.



Şekil 4: GCEE'nin Yapısı

1.3. miRNA'lar ve Fizyolojik Roller

Protein kodlayan genler insan genomunun %1,5'ini oluşturmaktadırlar. Geri kalanının ise %80'i kodlama yapmayan RNA'lar olarak transkripsiyona katılır. Bunlar genom tarafından kodlanan ancak translasyonu gerçekleştirilmeyen genlerdir. Organizma fonksiyonlarının kompleksleşmesi ile birlikte kodlama yapmayan genlerin miktarı da artmaktadır ancak kodlama yapmayan RNA'ların fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Kodlama yapmayan RNA'ların hücre fenotipinden yaşlanmasına kadar tüm hücresel fonksiyonların kontrolünde yer aldığı belirtilmektedir (1, 5, 6, 16, 34, 54, 65).

miRNA'lar hücrelerde protein üretiminin represyonu, aktivasyonu ve ince ayarında önemli olan küçük kodlama yapmayan RNA'lardır. miRNA'ların ataklara bağlı hasarların ve epilepsinin gelişmesinde önemli rolleri bulunabileceği bildirilmektedir (34, 59, 60,64, 88).

1.3.1. miRNA'ların Keşfi

miRNA'lar özellikle *Caenorhabditis elegans* üzerinde yapılan çalışmalarda keşfedilmiştir. lin-4 olarak adlandırılan küçük bir endojen RNA'nın organizmanın gelişiminde yer alan bir proteinin (lin-14) translasyonunu regüle ettiği ortaya konulmuştur. Bu miRNA'nın bu işlemi lin-14'ün mRNA'sının 3' transle olmayan bölgesi (UTR) ile etkileşerek gerçekleştirdiği saptanmıştır (75). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile insanlarda yaklaşık 1500 ve farelerde 700'den fazla miRNA tanımlanmıştır. Sanger Enstitüsü'nün (İngiltere) miRBase veri tabanının son sürümüne (19. Versiyon) göre 190'dan fazla türde 25.000'den fazla miRNA listelenmektedir. Memelilerde protein kodlayan genlerin %60'ından fazlasını miRNA'ların regüle ettiği düşünülmektedir (34). miRNA'ların her birinin kesin hedef sayıları belirli olmamakla ve çeşitlilik göstermekle birlikte yaklaşık 200 mRNA hedeflemektedir. Böylesi bir sistemin biyolojik avantajları ile ilgili yeni düşüncelerin temelinde miRNA'ların biyolojik sistemlere sağlamlık ve dayanıklılık sağladığı yönündedir. miRNA'lar transkripsiyona geri bildirim sağlarlar, anormal ve aşırı transkript kopya sayısını azaltırlar. Bu da biyolojik sistemin internal ve eksternal bozulmalara karşı koymasını sağlar (34). miRNA'lar ile regüle edilen çeşitli süreçler arasında farklılaşma çok önemlidir. miRNA'lar fenotip oluşumunda ve korunmasında önemli rol oynarlar ve bu olay özellikle beyinde nöronal farklılaşma ve nöronal morfolijinin oluşumunda öne çıkmaktadır (88). miRNA ile güçlü bir şekilde regüle edilen diğer süreçlere protein translasyonu, immun yanıt ve

miRNA mekanizmasının kendisi örnek verilebilir. Buna karşılık temel biyolojik fonksiyonlarda rol oynayan proteinler 3' UTR'lerinde sınırlı miRNA bağlanma bölgesi içerirler.

1.3.2. Biyogenezisleri ve Etki Mekanizmaları

Bazı miRNA'lar tek başlarına kendi regülatör ve kontrol sekanslarını içeren özerk genler iken diğerleri kümeler halinde bir araya gelmişlerdir. Kendi başlarına bir gen olarak transkripsiyon geçirirler ya da protein kodlayan bir genin intronlarından RNA polimerazın etkisi ile primer transkript (pri-miRNA) üretebilirler. Primer transkript çekirdekte Drosha mikroişlemci kompleksi ile işlenir ve pre-miRNA oluşturulur. Pre-miRNA RNaz 3 enzim kesimi ile 20-25 nükleotidlik hatalı dupleksin uzaklaştırıldığı son işlem için sitoplazmaya girer. Daha sonra olgun miRNA'nın bir zinciri RNA ile indüklenen susturucu kompleks (RISC)'in bir parçası olan Argonaute (Ago) proteinine bağlanır. Ago proteini tek başına hedef sekansın susturulmasını tetikleyemez, GW182 proteinine ihtiyaç duyar (39).

miRNA'lar hedefledikleri mRNA'ların 3' UTR'lerindeki sekanslar ile Watson-Crick baz çiftleri oluşturarak fonksiyon görürler (7). Tipik olarak miRNA'lar spesifikliğı belirleyen bütünleyici ve birbirini tamamlayan bölge eşleşmesinden sonra 7-8 nükleotidlik tam bir 'çekirdek' eşleşmesi ile hedef mRNA'larına bağlanırlar. miRNA hedeflerinin bütünleyiciliğı tamamen olmadığından RNA interferansında olduğu gibi hedefin endonükleotik kesimi miRNA'lar için nadirdir. miRNA'lar mRNA hedeflerini doğrudan degrade etmemelerine rağmen mRNA hedeflerinin seviyelerini azaltabilirler. miRNA'lar ve mRNA hedeflerinin ekspresyonlarının birbirlerine zıt korele olduğu belirtilmiştir. Ribozom profillemelerine (47) ve kantitatif proteomik çalışmalarına (5, 119)

dayanarak miRNA'lar hücrede hedef mRNA'nın destabilizasyonu ile degradasyonunu teşvik ederek protein üretimini represe etmektedir (54). Ancak yine de farklı şekilde davranan, etkileri translasyonu aktive etmek yönünde olan miRNA'lar da vardır (133).

Şekil 5. miRNA biyogenezi ve hedef mRNA üzerindeki etki mekanizması

miRNA bağlanma etkisi protein üretimi üzerine iki kattan daha fazla değildir. Çok bölgeli hedefler için miRNA'ların çok daha fazla bölgeden hedeflenmeleri bağımsız ek etkiler meydana getirebilir ve orta dereceli eksprese olan bir miRNA on kattan daha fazla supresyona sebep olabilir (34). miRNA'nın etkisini artırdığı diğer bir mekanizma aynı yolaktaki genlerin bir setini hedeflemesidir. Bu gibi bir koordine edilmiş represyon yaygın olabilir (34).

Nöronlarda miRNA'ların geniş bir protein yelpazesinin translasyonunu regüle ettiği saptanmıştır (68). Bu proteinler diğerlerine ilave olarak özellikle nöronal morfoloji (Örneğin miR132 p250GAP ekspresyonunu inhibe eder) (136), iyon kanalları (NMDA reseptör alt ünitesi miR-125b ile düzenlenir) (35), nöronal migrasyonda (miR-134 doublecortin (DCX)'i regüle eder) (44) yer alan proteinleri de içermektedirler. Fonksiyonel miRNA sistemi astrositlerde de gereklidir, miRNA biyogenezisinin kaybı nörodejenerasyona ve epileptik nöbetlere sebep olmaktadır (128). miRNA'lar aynı zamanda mikroglia fonksiyonları için önemli olan proteinlerin translasyonunu da regüle etmektedir (109).

1.3.4. miRNA'ların Nörodejeneratif Olgulardaki Tedavi Potansiyelleri

Biyolojik bir süreçteki miRNA düzeyinin değişimi çeşitli faktörlerden etkilenir (34). Bu faktörlerden bazıları aşağıda sıralanmakla birlikte sadece bunlarla sınırlı olmadığı belirtilmektedir:

- miRNA ve hedef mRNA'nın ekspresyon seviyeleri; mRNA ekspresyonunun belirli bir eşik değerin altında olması miRNA etkisini değiştirebilir
- Fonksiyonel fazlılık; yani çakışan fonksiyonları olan diğer miRNA'ların sıklığı. Örneğin miR-132 ve miR-134 nöronal morfolojiyi regüle ederler.
- miRNA'nın zamana bağlı modeli mRNA'nın veya onun protein ürününün stabilitesine bağlı olarak değişir. miRNA seviyesindeki hızlı değişiklikler sistem tarafından kompanse edilebilen yavaş değişikliklere göre proteinler üzerinde daha güçlü etkilere sahiptir.
- İleri besleme ve geri besleme döngülerinin varlığı ve diğer kontrol mekanizmaları miRNA seviyesini etkiler.

- miRNA ömrü; miRNA'lar hücrede önemli derecede stabildir bu nedenle modülasyonları protein sentezinde uzun süreli etkilere yol açar.

Önemli miRNA biyogenez enzimlerinin “knock-out” deney modellerinde embriyonik ölüm gözlenmiştir. Ancak her bir miRNA için genetik bozulmalar sadece birkaç fenotipik değişiklik oluşturmaktadır (102). Bu fenotipler spesifik stresörler bağlamında üretilebilirler. Hücrelerde bireysel miRNA'ların modülasyonunda ekzojen miRNA uygulanması ya da spesifik inhibitörlerin verilmesi gibi bazı yaklaşımlar da bulunmaktadır (16). Bunlar viral- vektör tabanlı yaklaşımları, sahte miRNA'ları, miRNA parazitlerini (otlakçı) içerirler. Oligonükleotid tabanlı yaklaşımlar arasında “antagomir”ler yani miRNA'ları aynı optimal spesifiklik, tesir ve stabilitede hedefleyebilen tek zincirli sentetik RNA analogları yer almaktadır (100). Kilitli nükleik asit (Locked Nucleic Acid) ve kolesterol modifikasyonları miRNA'ların etkilerini ve hücre permeabilitelerini artırmaktadır. Antagomirler hedef miRNA'larına bağlandıklarında heterodupleksler oluştururlar ve olgun miRNA seviyesinde belirgin azalmayla sonuçlanır ve uzun süren biyolojik etkiler meydana getirir (36). Son zamanlarda aynı 8 birimlik çekirdek bölgesine sahip miRNA ailesini hedefleyebilen çekirdek (seed) hedefleyici “küçük LNA” oligonükleotidler geliştirilmiştir (96). Bu gibi miRNA inhibitör yaklaşımları son zamanlarda klinik denemelerde miRNA tabanlı tedavi edici potansiyelleri açısından ilgi çekmektedirler. Normalde antagomirler sağlam kan beyin bariyeri yapısının dışındadır (70).

Merkezi sinir sistemi çalışmalarında antagomirler intraserebroventriküler (i.c.v.) olarak verilebilmektedirler. Ancak stroke, travma, “status epileptikus” gibi akut merkezi sinir sistemi hasarı sonrasında kan beyin bariyerinin bütünlüğü bozulur. Kan beyin bariyeri aynı zamanda epilepsiyi de içeren kronik durumlarda açılabilir (81). Merkezi sinir sisteminde antagomirler gibi miRNA tabanlı ilaçlar için intranasal

uygulama bir yöntem olarak önerilmekte olup, bu uygulamanın etkileri henüz tam olarak ortaya konulmamıştır.

1.3.5. Epilepsi ve Status Epileptikus Sonrası miRNA Düzenlenmesi

Beyin gelişiminde miRNA'ların önemli rolleri olduğu fark bilinmektedir. Bazı nörodejeneratif (Alzheimer hastalığı, strok) ve psikiyatrik hastalıklar gibi diğer sinir sistemi hastalıklarında miRNA ekspresyonlarında ve fonksiyonlarında anormallikler olduğu saptanmıştır (33, 116). Epilepsi; tekrarlayan sebepsiz nöbetler ile karakterize kronik ciddi nörolojik bir hastalıktır. Bu durum beyinde anormal ve senkronize nöronal deşarjlar sonucu meydana gelir (20). Epilepsi dünya çapında 50 milyon insanı etkilemektedir ve temel sosyo-ekonomik problemlerden biridir. Epilepsinin tedavisinde antikonvülzan ve antiepileptik ilaçlar kullanılır. Bu ilaçlar nöbetleri önler ya da meydana gelme sıklığını azaltır ancak epilepsinin patofizyolojisinin tedavi etmezler.

Nadir durumlarda epilepsi tek gen mutasyonları sonucu oluşur, bu genler sıklıkla iyon kanallarını kodlayan genlerdir ancak epilepsinin temel mekanizması bilinmemektedir. Temporal lop epilepsisi (TLE) yetişkinler arasındaki en yaygın ve ilaç tedavisine direnç gösteren epilepsi tipidir. TLE; beyin travması, enfeksiyon, status epileptikus ve bazı beyin hasarlanmaları sonucu meydana gelir ve sıklıkla hipokampal patoloji (hipokampal skleroz) ile ilişkilidir. Epileptogenik süreçlerle ilgili tüm mekanizmalar henüz ortaya konulmamıştır. Ancak nöronal ölüm veya disfonksiyon, gliosis, iyon kanallarında fonksiyonel değişiklikler, nöroenezis ve nöroinflamasyon gibi süreçler ön plandadır (87, 107).

Epilepsinin ve epileptogenezin epigenetik faktörler ve sistem düzeyinde çoklu genleri ve proteinleri kontrol eden gen ürünleri ile kontrol edildiğini ortaya koyan

sonuçlara ulaşılmıştır (67, 79). Deneysel epilepsi ve TLE, protein kodlayan transkript seviyelerindeki değişiklikler ve proteinlerin anormal üretimleri ile ilişkilidir. Bu süreç önemli ölçüde transkripsiyonel bir baskılanma içerir (46). Buna uygun olarak epilepsi çalışmaları epileptogenezis sırasında ve kronik epilepsi durumunda miRNA'ların değişip değişmediği sorusuna yoğunlaşmıştır. miRNA tabanlı ilaçlar aynı zaman da bir tek bileşen yerine çok bileşenli biyolojik şebekeler üzerinde işlem yapmaya olanak sağlar (82). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda epilepside gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, nöbetlerin kontrolünü, nöbetler sonucu meydana gelen hasarın kontrolünü sağlamak için miRNA'ların kritik bir seviyeyi temsil ettiğini ve epileptogenezisin ve ilaç direncinin potansiyel biyomarkerları olabileceklerini göstermektedir.

Epileptik nöbetler sonrası miRNA ekspresyon yanıtlarının değiştiğine dair ilk çalışmalar Nudelman ve ark. tarafından yapılmıştır (95). Bu ekip dendritik büyüme ve morfolojinin oluşmasında yer alan ve CREB ile regüle edilen bir miRNA olan miR132'nin hipokampal ekspresyonu üzerine çalışmışlardır (135, 136 Sıçanlarda pilokarpin enjeksiyonu ile indüklenen “status epileptikus” pre-miR132'nin ve olgun miR132'nin seviyelerini artırmaktadır (95). Kısa süre sonra Liu ve ekibi sıçanlarda kainik asit ile indüklenen nöbet sonrasında miRNA ekspresyon profillerini ölçmek için TaqMan miRNA yöntemi kullanmışlardır (78). Buna göre epilepsi sonrasında beyinde 21 miRNA'nın 1.5 kattan daha fazla arttığını ve 39 miRNA'nın azaldığını bulmuşlardır ancak sadece 4'ü down-regüle olmuştur. Öte yandan bu çalışmada diğer merkezi sinir sistemi bozukluklarına verilen yanıtlar da karşılaştırılmış ve beyin hasarlanma tipine göre farklı miRNA ekspresyon profilleri ortaya çıkmıştır. Kainik asit ile indüklenen nöbetlerin kandaki total miRNA imzasının travma, stroke ve hemoraji gibi diğer hasarlardan farklı olduğu gösterilmiştir. Bu durum periferel

miRNA örneklemesinin beyin hasarlarının biyogöstergesi olması açısından uygun olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar aynı modelde özellikle hücre ölümü, immunolojik yanıtlar ve gen ekspresyonu süreçleri açısından önemli olan miRNA ve mRNA ekspresyon profilleri arasında önemli derecede örtüşmeler bulmuşlardır (78).

1.3.6. Deneysel Epilepsi Modelinde miRNA Düzenlenmesi

Deneysel SE modellerinde miRNA ekspresyon profillemesi yapılan pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sıçanlara sistemik KA uygulanması (78,105), farelere sistemik KA uygulanması (86), farelere amigdala içerisine KA uygulanması (56) ve sıçanlara pilokarpin uygulanması (51,52) şeklindeki deneysel modellerdir. Bununla birlikte bu çalışmalara göre nöbet sonrasında önemli ölçüde spesifik, zamana ve koşullara bağlı şekilde miRNA ekspresyon modellerinde değişiklikler meydana gelmektedir. Epileptik nöbet sonrasında beynin sinaptom fraksiyonlarında önemli değişiklikler meydana gelmektedir (105).

1.4. Apoptozisle İlişkili miRNA'lar ve Nörodejeneratif Olgulara Katkısı

1.4.1. Epileptik Nöbetler ile İndüklenen Nöronal Hücre Ölümünü Kontrol Eden miRNA'lar

Temporal lob epilepsisi vakalarının büyük çoğunluğunun altında yatan patolojik durum hipokampal skleroz, hiluslarda nöron kaybı, CA1 ve CA3 bölgelerinde gliozisdir. Spontan nöbetler sklerotik hipokampustan ortaya çıkmaktadır ve sklerotik hipokampusun cerrahi olarak çıkarılması birçok hastada nöbetlere bağlı hasarlardan kurtulmayı sağlar. SE hem deneysel modellerde hem de insanlarda hipokampal ve hipokampus dışı hasarlar meydana getirmekte ve daha sonra epilepsinin gelişmesini sağlamaktadır (42). Nöbetlerin tekrarlaması ile ilişkili olarak ortaya çıkan bilişsel bozukluklar ise nöron kaybı ile korelasyon gösterir (69).

Nöbetler ile indüklenen nöronal ölümün mekanizması glutamat aracılı eksitotoksik hücre ölümünü içermektedir ancak aynı zamanda apoptozisin kontrolüne aracılık eden sinyalizasyon yollarının aktivasyonu da söz konusudur (37). Bu nedenle nöroproteksiyon sonradan edinilmiş epilepsinin önlenmesinde önemli bir bileşen olabilirken bilişsel bozuklukları da azaltıyor olabilir (122). Status epileptikus sırasında pro-apoptotik genlerin delesyonu şeklinde uygulanan nöroproteksiyon yöntemi spontan nöbetleri azalttıysa da daha sonra ortaya çıkan nöbetleri engelleyememiştir (37).

Hem hücre ölümünü teşvik eden hem de önleyen bireysel miRNA'ların ve birbiri ile fonksiyonel olarak ilişkili miRNA kümelerinin tanımlanması beynin nöbet kaynaklı hasarlardan ve epileptogenezisten korunması için güçlü bir terapötik yaklaşım olabilir. Epilepside hücre ölümünü regüle eden potansiyel miRNA'ların tanımlanması süreci iki strateji içermektedir. Birincisi kanser gibi diğer hastalıklarda hücre ölümünün kontrolünde yer alan bireysel miRNA'ların analizidir. İkincisi ise nöroproteksiyonun endojen programını ortaya koyabilmek için miRNA değişikliklerinin analizidir.

1.4.1.1. miR34a ve Nöronal Hücre Ölümü

Hücrelerde doğrudan pro-apoptotik etkilere aracılık ettiği öğrenilen ilk miRNA p53 ile regüle edilen miR34a'dır (49). Bu miRNA'nın up-regülasyonu ya da over-ekspresyonu nöronal olmayan çeşitli hücrelerde apoptozisi teşvik etmektedir (21, 112, 137). miR34a'nın Bcl-2 gibi hücre sağ kalımını teşvik eden mekanizmalarda yer alan proteinleri içeren çeşitli hedefleri tanımlanmıştır. Ancak miR34a'nın 100 üzerinde proteine etki ettiği gösterilmiştir ve esas hedefleri genellikle doku ve modele özgü olarak değişmektedir (62).

miR34 α 'nın epileptik nöbetler ile indüklenen up-regülasyonu ilk kez pilokarpin uygulaması sonrası oluşan SE'yi takiben sıçan beyinde ekspresyon paterninin ölçülmesi ile bulunmuştur (53).

miR34 α 'nın in vivo hedefleri tam olarak tanımlanmamıştır ancak hücre sağ kalımını teşvik eden protein kinazlardan Map3k9'nın miR34 α 'nın indüklenmesi ile ilişkili olduğu görülmüştür (114). Epileptik nöbet sonucu oluşan nöronal ölümde Map3k9'un fonksiyonel önemi bilinmemektedir ancak miR34 α seviyesinin artmasını takiben Map3k9 protein seviyesinin azalması arasında ters bir korelasyon gözlenmiştir. miR34 α seviyesinin normal düzeye gelmesi sonrası Map3k9 seviyesinde de düzelme gözlenmiştir (114).

P53 transkripsiyon faktörünün de miR34 α 'nın aktivasyonunun tetiklenmesinde rolü olduğu bilinmektedir. Ayrıca miR34 α 'nın inhibisyonu kaspaz 3 sinyalizasyonunu bloke eder ve nöronal hücre ölümünü engeller (52)

1.4.1.2. miR132 ve Nöronal Hücre Ölümü

miR132 ekspresyonunun artışının fonksiyonel sonuçlarının keşfedilmesi için yapılan çalışmalarda miR132 antagomirleri kullanılarak miR132 seviyesinin azalması sağlanmıştır. Bunun sonucunda miR132 seviyesinin azalmasının epileptik nöbet şiddeti üzerinde bir etkisi olmadığı ancak hipokampusteki hasarı azalttığı görülmüştür. Buna dayanarak miR132'nin ekspresyonunun artması nöronal hasarı ve hücre ölümü teşvik edebilir (56).

miR132 nöronal hücre ölümünün kontrolünde yer alırken aynı zamanda nöronal yapının regülasyonunda da rol alır. SE sonrası miR132'nin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (56).

1.4.1.3. miR184 ve Nöronal Hücre Ölümü

miR132'nin baskılanmasından farklı olarak miR184 antagomirler ile hedeflendiğinde hücre ölümünde artış gözlenir (86). Bu durum miR184'ün hücre sağkalımını teşvik ettiğini hücre ölümünü baskıladığını gösterir. miR'184'ün in vivo hedefleri ise henüz tanımlanmamıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Aletler

-20°C derin dondurucu- Uğur

-80°C derin dondurucu-Sanyo Ultra Low

Çalkalayıcı- Labnet,Orbit LS

Güç kaynağı-Thermo, EC250-90

Hassas terazi-Sartorius, Analytic A-200

Manyetik karıştırıcı- Nüve, MK318

Mikrosantrifüj- Labnet, Spectrafuge 24D

Mikrodalga fırın- Vestel

Soğutmalı santrifüj- Kubota, 5922

Otomatik pipetler- Brand Transperfette

pH metre- inolab

Real -Time PCR cihazı-Stratagene, Mx 3000 P QPCR

Nanovetli spektrofotometre- Beckman Coulter, Du 730

Çalkalayıcı inkübatör- Grant Bio

Termal döngü cihazı (Thermal Cyclers)- Techne, TC 512

UV Transilüminatör ve Biocapt bilgisayar yazılımı- Vilber Lournat

Vortex- Nuvemix

Yatay elektroforez tankı- Thermo EC, EC330 Midicell Primo

2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Kitler

10X MiScript Primer Assay (Qiagen) Kiti

10X MiScript Universal Primer: (MiScript SYBR Green PCR Kit, Qiagen)

10X Nukleik Asit Karışımı: (miScript II RT Kit, Qiagen)

1X Tris EDTA Tamponu

2X Jel Yükleme Çözeltisi: Fermentas (A.B.D.)

2X QuantiTect SYBER Green PCR Master Karışım : (MiScript SYBR Green PCR Kit, Qiagen)

5X MiScript HiSpec Tampon Çözelti: (miScript II RT Kit, Qiagen)

6X Jel Yükleme Çözeltisi: Fermentas (A.B.D.)

Agaroz: Prona (İspanya)

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

Etanol: C_2H_5OH (%96-100)

Etidyum Bromid: AppliChem Bio. Syn. Services (Almanya)

Etilasetat: J.T. Baker (Hollanda)

Etilendiamintetraasetik Asit Disodyum Tuzu-2-hidrat: $EDTA.2H_2O$, Riedel-de Haen (Almanya)

Formaldehit: Biochemika-Fluka (Japonya)

γ -Glutamil-Sisteinil Etil Ester: GCEE (Bachem, İsviçre)

Glasiyel Asetik Asit: CH_3COOH , Merck (Almanya)

Glikojen: Fermentas (A.B.D.)

Kainik Asit: Sigma- Aldrich

Kloroform: CHCl_3 , Merck (Almanya)

MiScript Reverse Transkriptaz Karışımı: (miScript II RT Kit, Qiagen)

QIAzol Lizis Ayırıcı: (MiRNeasy mini kit, Qiagen)

RPE Tampon Çözeltisi: (MiRNeasy mini kit, Qiagen)

RWT Tampon Çözeltisi: (MiRNeasy mini kit, Qiagen)

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

Hidroklorik Asit: HCl , Merck (Almanya)

Nükleaz İçermeyen Su: Thermo Fisher Scientific (A.B.D.)

2.3. Deney Grupları

Proje çalışması için kullanılacak deney materyali daha önceki bir araştırma projesinden temin edilmiştir. Söz konusu proje için Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Deney Hayvanları Etik Kurul'unun 22.07.2004 tarih ve B.30.2.EGE.0.01.00.01/04-848 sayılı kararı çerçevesinde Etik Kurul Onay'ı alınmıştır. Deneylerde 200-250 g ağırlığında ve erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Tüm hayvanlar 12 saat gece ve 12 saat gündüz döngüsü olacak şekilde deney gününe kadar bekletilmiştir. Tüm uygulamalar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Kainik Asit, GCEE ve PBS uygulamaları intraperitoneal (i.p) olarak gerçekleştirilmiştir.

Buna göre deney grupları:

1. Grup I: Kontrol grubu (n=4): 10ml/kg PBS (i. p.)
2. Grup II: Kainik Asit (n=4): 10 mg/kg Kainik Asit (i. p.)
3. Grup III: Kainik Asit +GCEE (n=4): 10 mg/kg Kainik Asit+ 10 mg/kg GCEE (i. p.)

Uygulamalar sonrasında tüm deney hayvanları dekapite edilerek beyin dokuları buz üzerinde disekte edilmiştir. Dokular kullanılmak üzere - 86°C’de saklanmıştır. Çalışmada serebellum ve striatum beyin bölgeleri kullanılmıştır.

2.4. Kullanılan Yöntemler

2.4.1. miRNA İzolasyonu

Kullanılan Çözeltiler: MiRNeasy mini kit (Qiagen), Glikojen, Kloroform, %96’lık Alkol

Deneyin Yapılışı: miRNA’dan zengin RNA izolasyonu için beyin striatum ve serebellum dokularından 30-50 mg tartılıp 1.5 ml’lik ependorflara alınır. Üzerlerine 700µL kit içerisinde bulunan Qiazol ve 5µl glikojen eklenir. Buz üzerinde önce kalın uçlu daha sonra da ince uçlu enjektörle homojenize edilir. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra her bir ependorfa 140µl buzdolabında bekletilmiş kloroform eklenir ve vortekslenir. 15 dakika 12000xg’de 4°C’de santrifüjlenir. Üstteki berrak faz 350-400 µl olacak şekilde yeni ependorfa aktarılıp üzerine 1.5 katı kadar %100’lük etanol eklenir ve pipetleme ile karıştırılır. Karışımın 700 µl’si 2 ml’lik koleksiyon tüpü içeren kolona aktarılır. 9000xg’de 15 sn santrifüjlenir. Filtreden

geçerek tüpte toplanan sıvı dökülür ve kolon tüpe yeniden yerleştirilir. Aynı tüp 9000xg'de 15 sn daha santrifüjlenir. Koleksiyon tüpü boşaltılır. Kolona 700 µl kit içerisinde bulunan RWT Buffer eklenir. 9000xg'de 15 sn santrifüjlenir. Tüp boşaltılır, kolona tekrar yerleştirilir. Kolona kit içerisinde bulunan 500 µl RPE Buffer eklenir ve 9000xg'de 15 sn santrifüjlenir. Koleksiyon tüpü boşaltılıp kolon tekrar yerleştirilir. 500 µL RPE Buffer eklenip 2 dakika santrifüjlenir. Koleksiyon tüpü boşaltıldıktan sonra 1 dakika full speed santrifüjlenir. Kolon 1.5 ml'lik yeni koleksiyon tüpüne aktarılır, üzerine 30-50 µl RNaz içermeyen su eklenir ve 9000xg'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra miRNA'lar elde edilir.

İzole edilen miRNA'ların konsantrasyon ve saflıklarının belirlenmesi için nanovetli spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbanları ölçülür. A260/A280 oranı deneysel olarak uygun olan miRNA'lar seçilerek konsantrasyonları 1,5 µg/µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltilir. -20°C'de komplementer DNA sentezi yapılana kadar saklanır.

2.4.2. miRNA İntegrasyon Analizi

Kullanılan Çözeltiler:

Yürütme tamponu (5X): 10,3 g MOPS (0,1 M) ve 1,64 g sodyum asetat (40 mM); 400 ml DEPC- su'da çözülür. NaOH ile pH 7'ye getirilir. 5 ml 0,5 M EDTA eklenir. DEPC-Su ile 500 ml'ye tamamlanır.

Elektroforez tamponu (1X): 100 ml 5X yürütme tamponunun ultra saf su ile 500 ml'ye tamamlanması ile hazırlanır.

EDTA Çözeltisi (0.5 M): 186,1 g EDTA tartılıp 800 ml ultra saf suda çözündürülür. pH'sı 8'e ayarlanıp ultra saf su ile 1 lt'ye tamamlanır.

Dietilpirokarbonat-su (DEPC-Su): 999 ml ultra saf suya 1 ml DEPC eklenir. Manyetik karıştırıcıda 24 saat oda sıcaklığında karıştırılarak inkübe edilir. Otoklavda sterilize edilip buzdolabında +4°C’de saklanır.

Denevin Yapılışı: Total miRNA bütünlüğünün gösterilmesinde formaldehit içeren agaroz jel kullanılır. %1,2’lik agaroz jel hazırlamak için 250 ml’lik erlenin içine 1,2 g agaroz tartılıp üzerine 75 ml DEPC-Su eklenerek mikrodalga fırında çözülür. Hazırlanan jel soğuması için bir süre oda sıcaklığında bekletilir üzerine 20 ml 5X yürütme tamponu ve 5,3 ml Formaldehit eklenerek karıştırılır ve jel tepsisine dökülür. Jelin katılaşması beklenir. Jel tamamen katılaştıktan sonra tarak ve bantlar dikkatlice çıkarılır. Elektroforez tankı 1X yürütme tamponu ile doldurulur ve jel tanka yerleştirilir. 2 µl RNA, 3,5 µl DEPC-Su ve 4,5 µl 2X yükleme çözeltisi karıştırılarak 10 µl olacak şekilde kuyucuğa yüklenir. Elektroforez işlemi 50 V’luk potansiyel altında 1 saat 45 dakika süre içerisinde oda sıcaklığında gerçekleştirilir.

Elektroforez işlemi gerçekleştirildikten sonra jel 200 ml ultra saf su içeren bir kap içerisine alınır ve çalkalayıcıda oda sıcaklığında üzerine 20 µl Etidyum Bromür (10 mg/µl) eklenerek 30 dakika boyanır ve UV ışık altında BioCapt uygulaması ile görüntülenir ve fotoğrafı çekilir.

2.4.3. Revers Transkripsiyon ile cDNA sentezi

Kullanılan Çözeltiler: miScript II RT Kit (Qiagen)

miScript Reverse Transkriptaz Karışımı

10X miScript Nukleik Asit Karışımı

5X miScript HiSpec Tamponu

5X miScript HiFlex Tamponu

RNaz İçermeyen Su

Deneyin Yapılışı: cDNA sentezi için 1,5 µg/µl konsantrasyonundaki miRNA örnekleri kullanılır. 5µl miRNA örneği, 4 µl HiSpec Tamponu, 2 µl Nükleik Asit Karışımı, 2 µl RT karışımı, 7 µl RNaz içermeyen su 200 µl'lik bir reaksiyon tüpünde karıştırılır. Kısaca santrifüjlenir. 60 dakika 37°C'de inkübe edilir. 5 dakika 95°C'de inkübe edilir. Elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklanır.

2.4.4. Real-Time PCR ile Hedef miRNA ekspresyon düzeylerinin saptanması (cDNA Amplifikasyonu)

Kullanılan Çözeltiler: MiScript SYBR Green PCR Kit, 10X MiScript Primer Assay (Qiagen)

2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Karışım içerisinde:

- HotStar Taq DNA Polimeraz
- QuantiTect SYBR Green PCR Tamponu
- dNTP Karışımı (dUTP içerir)
- SYBR Green I
- ROX Pasif Referans Boya
- 5 mM MgCl₂ bulunmaktadır.

Ayrıca;

10x miScript Universal Primer

10X miScript RNU6B Pozitif Kontrol Primer

10X miScript miR34a, miR132, miR184 Spesifik Primerler

RNaz İçermeyen Su

1X Tris EDTA tamponu kullanılmıştır.

Deneyin Yapılışı: PCR reaksiyonu için elde edilen cDNA örnekleri 1:5 oranında seyreltilir. Spesifik primerler ise liyofilize halde olduklarından üzerlerine 550 µl TE Tamponu eklenerek kısaca santifüjlenir. 12,5 µl 2X QuantiTect SYBR Green PCR master karışım, 2,5 µl 10X miScript Universal Primer, 2,5 µl 10X miScript spesifik Primer, 2,5 µl kalıp cDNA, 5 µl RNaz içermeyen su reaksiyon tüpünde karıştırılıp kısaca santrifüjlenerek Stratagene, Mx 3000 P QPCR cihazına konulur. Başlangıç denatürasyonu 15 dakika 95°C’de ve bunu takiben 40 döngü; 15 saniye 94°C, 30 saniye 55°C ve 30 saniye 70°C olacak şekilde PCR programı oluşturulur. Erime eğrisi analizi için 40. döngünün sonuna 1 dakika 95°C, 30 saniye 55°C, 30 saniye 95°C olacak şekilde bir segment daha eklenir. PCR ürünlerinin varlığı ve saflık kontrolleri erime eğrisi analizi ile yapılır.

Ekspresyon Düzeyinin Hesaplanması:

Real-Time PCR ile elde edilen gen ürünlerinin kantifikasyonu için “Komperatif $\Delta\Delta^{CT}$ ” yöntemi kullanılmıştır. Kalibratör olarak referans genden ve karşılaştırma yapabilmek için de kontrol grubundan faydalanılır. Bir hedef genin referans genin referans gene göre rölatif ekspresyonu dikkate alınır. Referans gen olarak RNU6B ve kıyaslama içinde kontrol grubu kullanılmıştır. CT değeri; PCR ürünlerinin miktarındaki önemli artışın olduğu ilk döngüyü ifade etmektedir. Komperatif $\Delta\Delta^{CT}$ şu şekilde hesaplanır:

$$\text{Kontrol } \Delta\text{CT} = \text{Kontrol CT}_{(\text{GEN})} - \text{Kontrol CT}_{(\text{RNU6B})}$$

$$\text{Örnek } \Delta\text{CT} = \text{Örnek CT}_{(\text{GEN})} - \text{Örnek CT}_{(\text{RNU6B})}$$

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

$$\text{Hedef genin mRNA miktarı} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

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

2.4.6. Erime Eğrisi Analizi:

Erime noktası (T_m) bir DNA zincirinin %50'sinin açılması için gerekli sıcaklıktır. Bir DNA fragmentinin erime noktası; fragmentin uzunluğuna ve guanin-sitozin (GC) içeriğine bağlı olarak değişir. Farklı DNA fragmentlerine özgü erime noktaları saptanarak amplifikasyon ürünleri tayin edilebilir. Erime eğrisi analizleri; floresan boya ve DNA arasındaki spesifik bağlanmaları spesifik olmayan bağlanmalardan ayırt eder ve PCR ürünü hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar.

2.4.7. Real Time PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi ile Gösterilmesi

Kullanılan Çözeltiler:

5X TBE Tamponu: 54 g Tris Baz ve 27,5 g Borik Asit tartılarak 800ml suda manyetik karıştırıcıda çözdürülür. Üzerine 20ml 0,5 M EDTA pH:8.0 eklenir ve saf su ile 1lt'ye tamamlanır. 20 dakika otoklavlanır.

0,5X TBE Tamponu: 100 ml 5X'lik TBE tamponu üzerine 400 ml saf su eklenerek elde edilir.

Denevin Yapılışı: 2,6 g agaroz tartılır ve 100 ml 0,5X TBE Tamponunda çözdürölür.

Mikrodalga fırında agarozun erimesi sağlanır. Kaynayana kadar ara araerlen çıkarılıp çalkalanır. Jel soğuyunca jel tepsisine dökölür ve donması beklenir. Elektroforez tankı 0,5X TBE Tamponu ile doldurulur. 5 µl 6X yükleme çözeltisi ve 5 µl RT- PCR ürünü kuyucuklara yüklenir. Elektroforez işleml 60 V'luk potansiyel altında 1 saat 30 dakika süre içerisinde oda sıcaklığında gerçekleştirilir.

Elektroforez işleml gerçekleştirildikten sonra jel 200 ml ultra saf su içeren bir kap içerisinde alınır ve çalkalayıcıda oda sıcaklığında üzerine 20 µl Etidyum Bromür(10 mg/µl) eklenerek 30 dakika boyanır ve UV ışık altında BioCapt uygulaması ile görüntölünir ve fotoğrafı çekilir.

3. BULGULAR

3.1. İzole Edilen miRNA'ların A260/A280 oranları

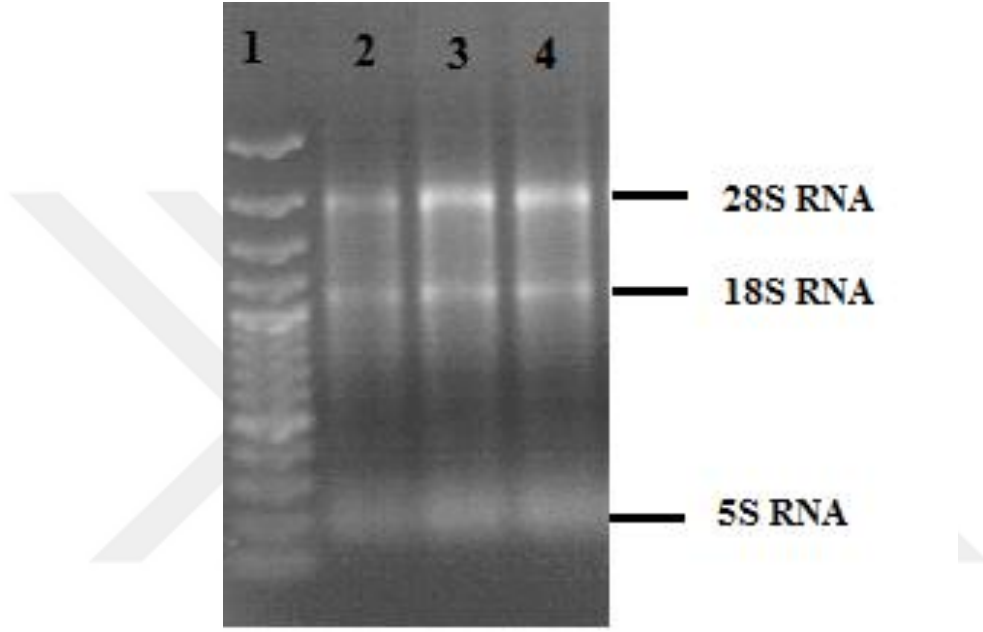
miRNA izolasyonu yapılan beyin striatum ve serebellum dokusu miRNA konsantrasyonları ve A260/A280 absorbans oranları Tablo 1'de gösterilmiştir.

miRNA A260/A280 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		
Grup (n=4)	Serebellum	Striatum
Kontrol	$2,1 \pm 0,06$	$2,51 \pm 0,19$
KA	$1,96 \pm 0,10$	$1,99 \pm 0,08$
KA + GCEE	$2,11 \pm 0$	$1,78 \pm 0,05$

Tablo 1: Kontrol, Kainik Asit (KA), Kainik Asit +GCEE uygulanan striatum ve serebellum dokularından izole edilen miRNA'ların konsantrasyon ve A260/A280 absorbans oranları (Ortalama $\pm$ S.H'ları)

3.2 İzole Edilen miRNA'ların İntegrasyon Analizi

Striatum dokularından izole edilen miRNA'lar kullanılarak, her bir deney grubu için representatif olarak miRNA integrasyon analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre miRNA'lara ait 5S bandı gözlenmiş olup, izole edilen örnekler bütünlük taşımaktadır.



Şekil 6. Beyin striatum dokularından izole edilen miRNA ürünlerinin agaroz jel üzerinde gösterilmesi

1: 100 bp Marker (Fermentas); 2: Kontrol; 3: KA; 4: KA+ GCEE

3.3. Hedef miRNA'ların Ekspresyon Düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi İle Hesaplanmasına Yönelik Bulgular

Hedef miRNA ekspresyonunun kantifikasyonu RNU6B geni referans olarak gruplar arasındaki farklılıklar Tablo 2 ve Şekil 7 ve 8'de gösterilmiştir

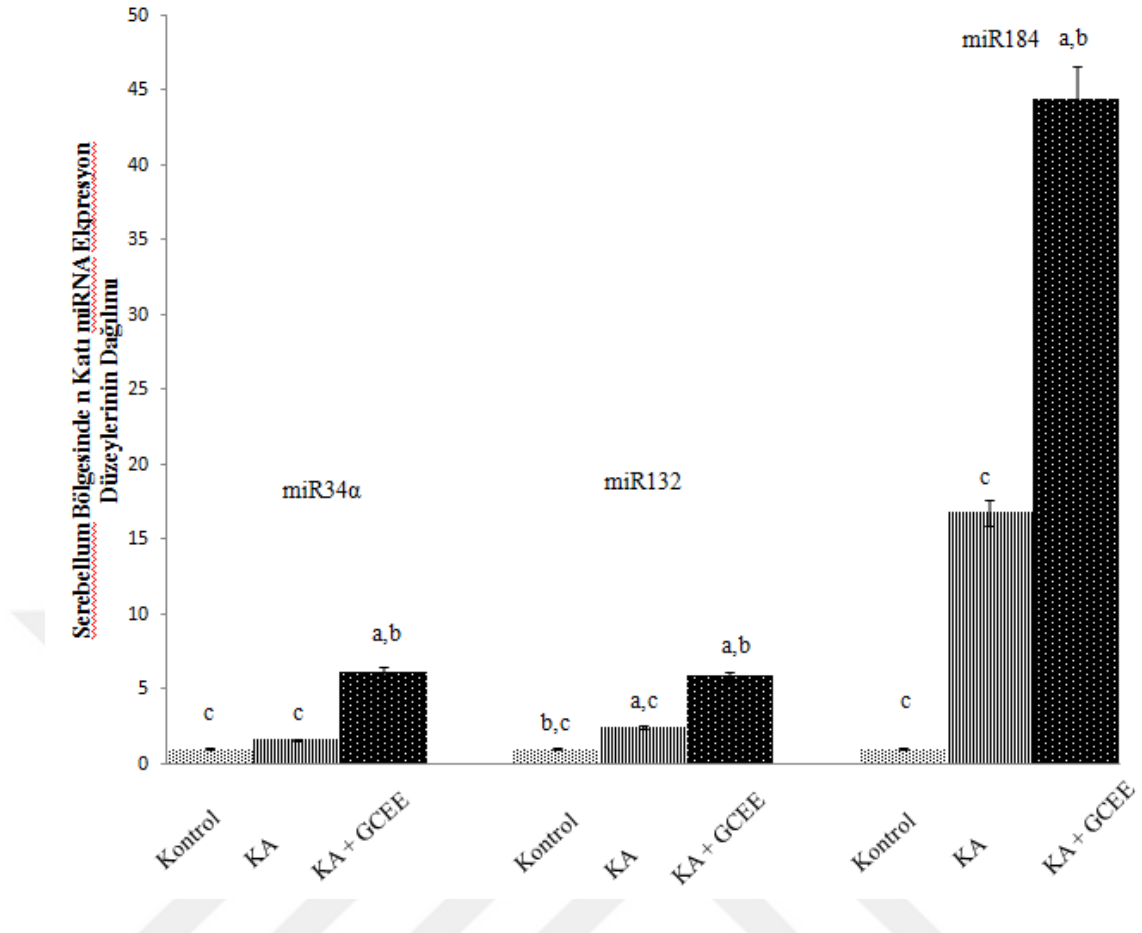
	Serebellum		
	Gruplar		
Hedef miRNA	Kontrol	KA	KA+GCEE
miR34a	1 ± 0^c	$1,5 \pm 0,2^c$	$6,18 \pm 0,5^{a,b}$
miR132	$1 \pm 0^{b,c}$	$2,41 \pm 0,6^{a,c}$	$5,88 \pm 0,4^{a,b}$
miR184	1 ± 0^c	$16,77 \pm 5,3^c$	$44,39 \pm 1^{a,b}$
	Striatum		
	Gruplar		
Hedef miRNA	Kontrol	KA	KA+GCEE
miR34a	1 ± 0^c	$1,23 \pm 0,15^c$	$3,95 \pm 0,4^{a,b}$
miR132	1 ± 0^c	$60,19 \pm 7,4^c$	$161,43 \pm 38,18^{a,b}$
miR184	$1 \pm 0^{b,c}$	$0,01 \pm 0,07^a$	$0,03 \pm 0,01^a$

Tablo 2. Hedef miRNA'ların Kontrol, KA VE KA+GCEE gruplarına ait beyin striatum ve serebellum dokusundaki ekspresyon düzeyleri (ortalama)

a) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı

b) KA uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı

c) KA + GCEE uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı

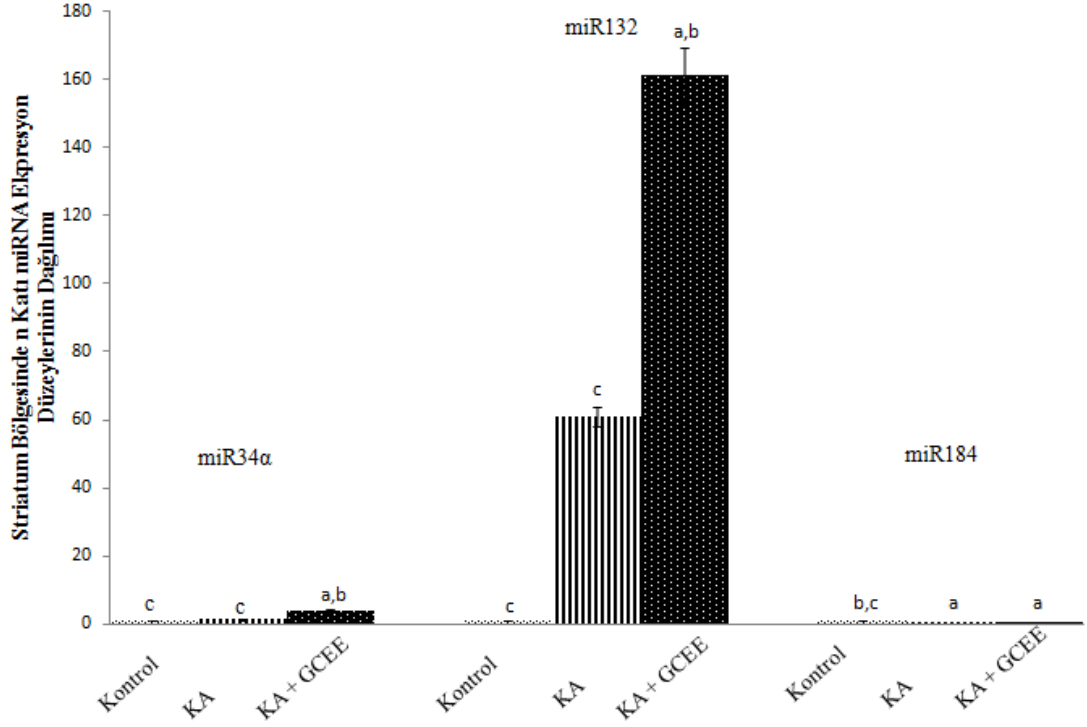


Şekil 7. Sıçan beyni serebellum bölgesine ait miR34a, miR132 ve miR184 ekspresyon düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

Tablo 2 ve Şekil 7’de görüldüğü üzere sıçan beyni serebellum bölgesinde miR34a ekspresyonu açısından KA+GCEE grubu Kontrol ve KA gruplarına göre anlamlı bir farklılık göstermektedir, KA grubu ise KA+GCEE grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p<0,05$).

Sıçan beyni serebellum bölgesinde miR132 ekspresyonu açısından KA+GCEE grubu hem Kontrol hem de KA gruplarına göre anlamlı bir farklılık göstermektedir, aynı şekilde KA grubu da Kontrol ve KA+GCEE grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p<0,05$).

Sıçan beyni serebellum bölgesinde miR184 ekspresyonu açısından KA+GCEE grubu Kontrol ve KA gruplarına göre anlamlı bir farklılık göstermektedir, KA grubu ise KA+GCEE grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 8. Sıçan beyni striatum bölgesine ait miR34a, miR132 ve miR184 ekspresyon düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

Tablo 2 ve Şekil 8’de görüldüğü üzere sıçan beyni striatum bölgesinde miR34a ekspresyonu açısından KA+GCEE grubu Kontrol ve KA gruplarına göre anlamlı bir farklılık göstermektedir, KA grubu ise KA+GCEE grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p<0,05$).

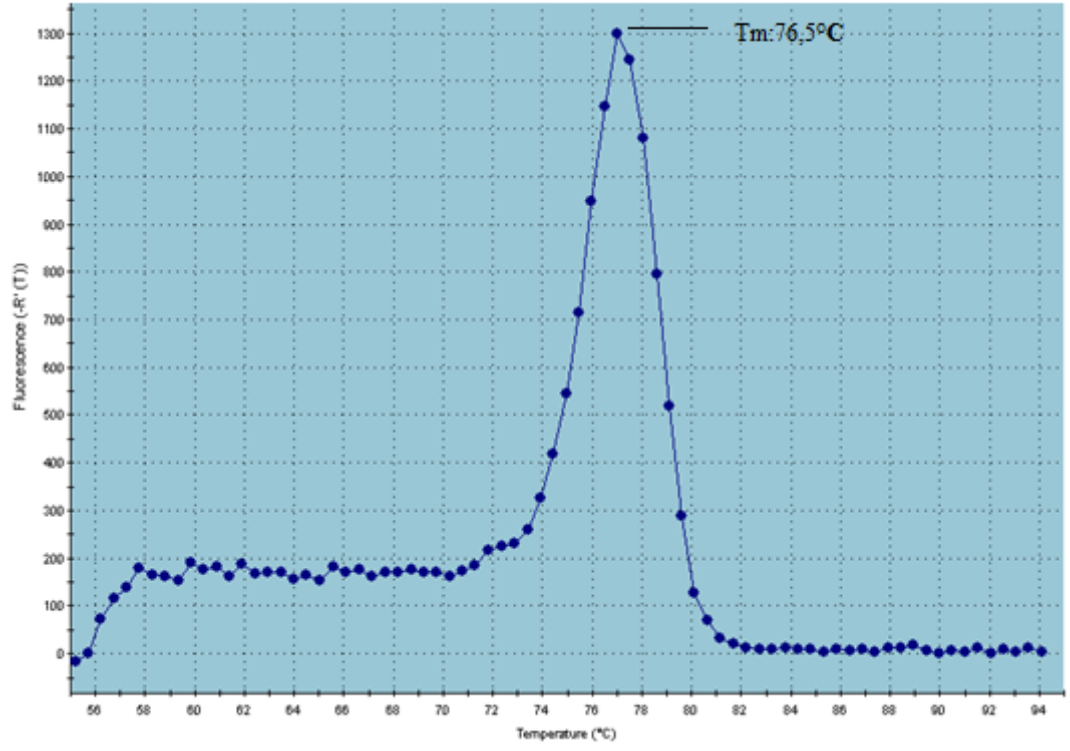
Sıçan beyni striatum bölgesinde miR132 ekspresyonu açısından KA+GCEE grubu Kontrol ve KA gruplarına göre anlamlı bir farklılık göstermektedir, KA grubu

ise KA+GCEE grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p<0,05$)

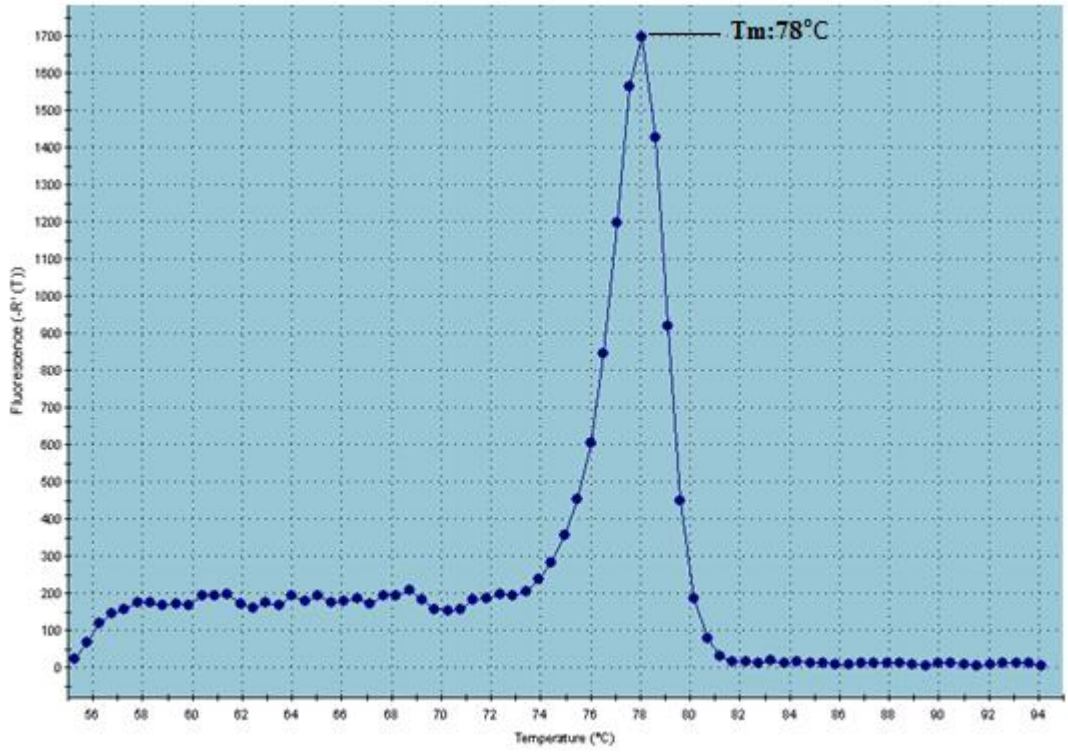
Sıçan beyni striatum bölgesinde miR184ekspresyonu açısından KA+GCEE grubu Kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermektedir, KA grubu ise yine Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p<0,05$).



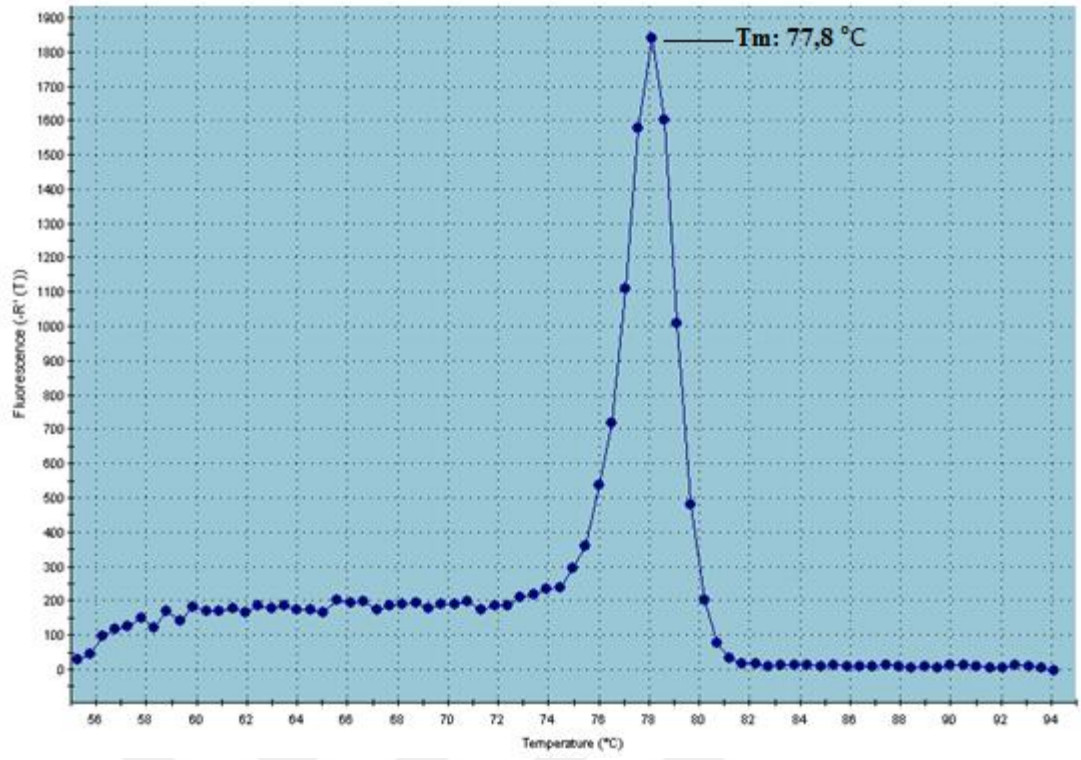
3.4. Hedef miRNA'lar için Erime Eğrisi Sonuçları



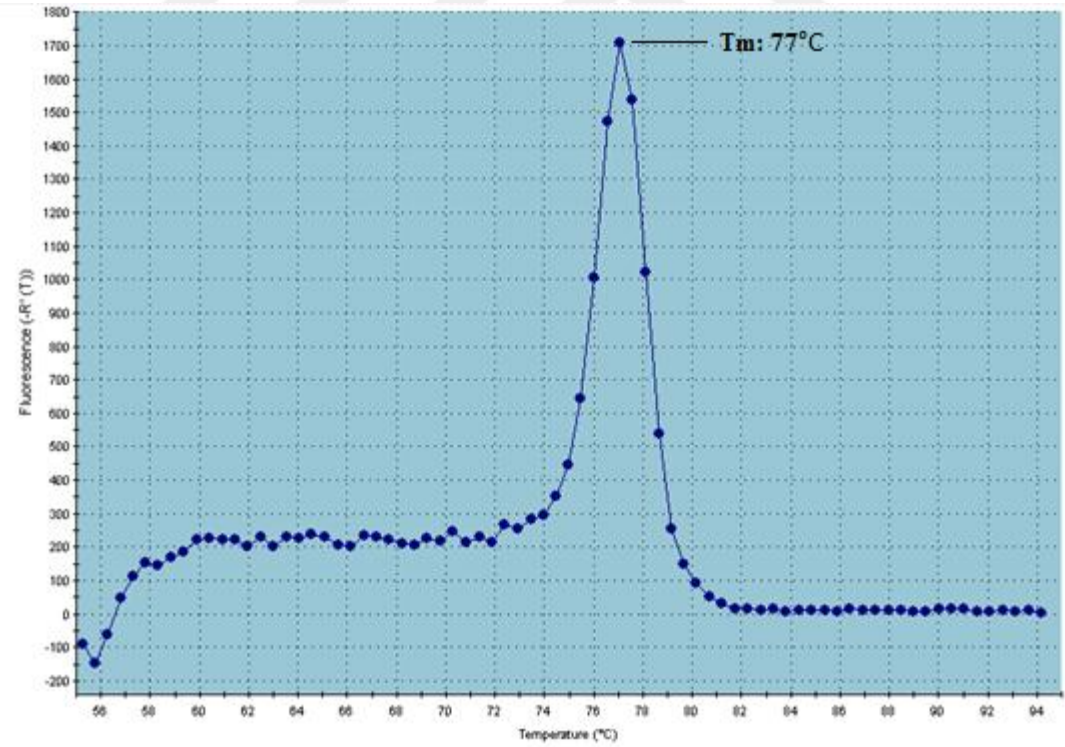
Şekil 9. RNU'ya ait erime eğrisi örneği



Şekil 10. miR34a'ya ait erime eğrisi örneği



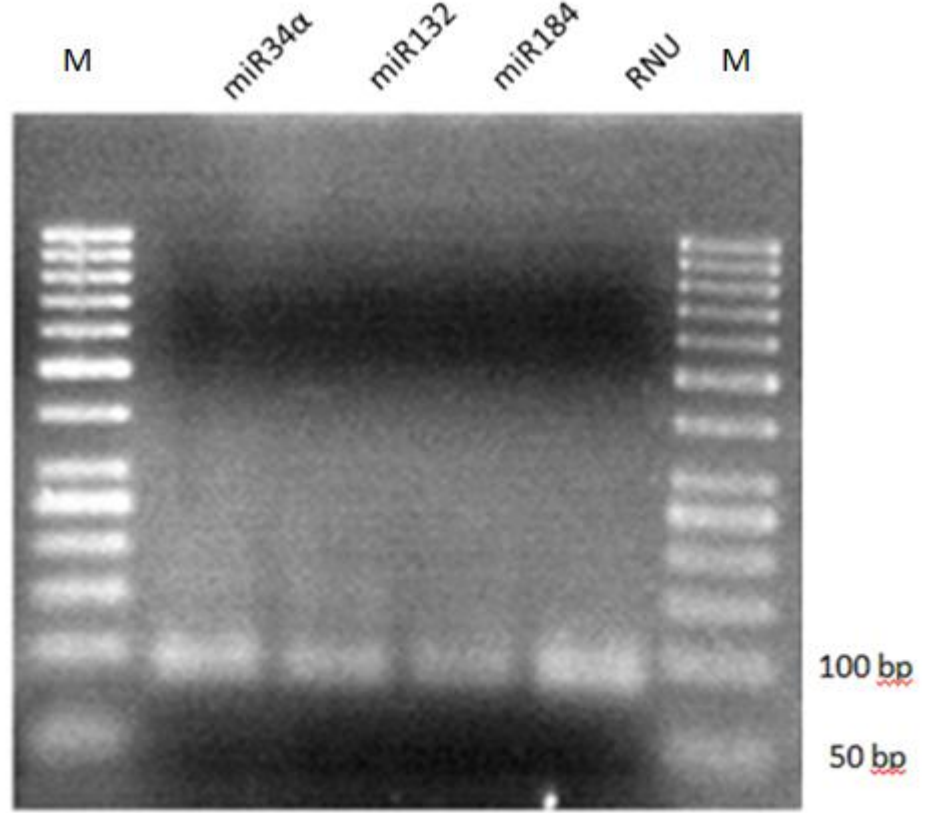
Şekil 11. miR132'ye ait erime eğrisi örneği



Şekil 12. miR184'e ait erime eğrisi örneği

3.5. Real Time PCR miRNA Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroforezi

Striatum ve Serebellum dokularından hedef miRNA'ların Real-Time PCR sonucunda oluşan PCR ürünlerine yönelik yapılan agaroZ jel elektroforezi Şekil 13'de gösterilmiştir.



M: 100bp marker

Şekil 13. Beyin Striatum ve Serebellum doku örneklerinden elde edilen hedef miRNA'ların RT-PCR ürünlerinin agaroZ jel üzerinde representatif olarak gösterilmesi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

4.1 Deney Gruplarına Yönelik Tartışma

Kainik asit, beyin hücrelerinde hasar oluşturan ve limbik nöbetlere sebep olan bir eksitotoksindir. Kainik asit ile sıçanlarda oluşturulan nörodejenerasyon temporal lob epilepsisi ile benzerlik göstermekte ve eksitotoksisite ile ilişkili çeşitli patolojik durumlar için iyi bir deney modeli oluşturmaktadır. Kainik asit kaynaklı eksitotoksisitenin nedenleri arasında serbest radikallerin aşırı üretimi, bazı apoptotik yolların aktivasyonu ve akut faz genlerin anormal indüksiyonu yer alır (59, 60, 69, 78, 105, 107, 125, 127).

MiRNA'ların bu apoptotik süreçlerde ne derece aktif rol oynadığı tam olarak bilinmemektedir. miR34 α , miR132 ve miR184'ün apoptotik yollarındaki rolleri ve ekspresyon düzeyleri ile ilişkili çeşitli çalışmalar farklı sonuçlardan söz etmektedir (35, 56, 105, 109, 112, 114, 120, 137) .

Bu çalışmada kainik asit uygulanmış erkek sıçanlarda eksitotoksik bir nörodejenerasyon modeline yaklaşımda bulunmaktadır. miR34 α , miR132 ve miR184'ün ekspresyon düzeyleri iki ayrı beyin bölgesinde incelenmiştir. Hedef miRNA ekspresyonlarının daha önceki çalışmalardan farklı olarak serebellum ve striatum bölgelerinde anlamlı bir farklılık gösterdikleri ve küçük de olsa bu farklılıkların apoptotik yollar üzerindeki etkileri üzerine bir yaklaşımda bulunulmuştur. Nörodejenerasyon, nöronal hücre ölümü ve nöroproteksiyon gibi yollarla rolleri olduğu düşünülen bu miRNA'ların düzeylerinin saptanmasında Real-Time PCR kullanılmıştır. GCEE uygulamasının ise antioksidan ve nöroprotektif bir rol üstlenerek nörodejenerasyonu ve nöronal hücre ölümünü azaltan bir etkisi

olduğu bilinmektedir. Bu nedenle kainik asit uygulaması ile ekspresyon düzeyleri değişen bu miRNA'lar üzerine GCEE'nin nöroprotektif etkisi de incelenmiştir.

4.2. Hedef miRNA'ların Ekspresyonunun Saptanmasında Seçilen Yönteme Yönelik Tartışma

Hücre yaşamının devamı, büyüme ve farklılaşma gibi hücresel süreçler spesifik genlerin ekspresyonlarındaki değişimler vasıtasıyla sağlanmaktadır. Eksprese olan genlerin ve onları düzenleyen miRNA düzeyleri; hücre siklusunun hangi safhasında olduğuna bağlı olmakla birlikte sitokinler, hormonlar, ilaç veya herhangi bir dış uyarana maruziyet sonucu da değişebilir. Bu nedenle gen ekspresyonu analizleri spesifik mRNA ve miRNA dizilerinin hassas, kesin ve tekrar edilebilir ölçümlerine olanak sağlamalıdır (33, 115).

RT-PCR, dizisi belli RNA örneklerinden enzimatik olarak amplifikasyonun yapıldığı ve değişik miktarlarda örneklerle çalışma imkanı veren in vitro enzimatik bir yöntemdir. RT-PCR yöntemi, gen ekspresyonunun saptanması açısından en hassas yöntemlerden biridir ve farklı örnek populasyonlarındaki çok az düzeyde eksprese olan miRNA düzeylerini karşılaştırma olanağı sunmaktadır. Deney zamanı açısından çok avantajlı olmakla birlikte sonuçların spesifikliği nedeniyle en çok tercih edilen yöntem olarak bilinmektedir (1, 19, 33, 115, 119) .

Çalışmamızda beyin striatum ve serebellum dokularında RNU, miR34α, miR132 ve miR184'ün ekspresyonunu saptamak üzere RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. RT-PCR bize az miktardaki dokulardan elde edilen veya nadir ve az eksprese edilen miRNA örnekleri ile çalışma imkanı sunmuştur.

RT-PCR'ın doğru bir şekilde gerçekleşmesi bazı parametrelere bağlıdır. Revers transkripsiyonu yapılan miRNA'lar yüksek kalitede olmalıdır. DNA ve

nükleaz içermemeli ayrıca revers transkripsiyonu inhibe edecek herhangi bir madde ile kontamine olmamalıdır. Çalışmamızda kullandığımız miRNA'ların A260/A280 oranlarının 1,6-2,5 arasında değişmesi dokulardan yapılan miRNA bakımından zengin izolasyonların doğru olduğunu göstermektedir.

Konvansiyonel PCR'da elde edilen ürün agaroz veya poliakrilamid jele uygulanıp floresan ya da radyoaktif olarak boyandıktan sonra dansitometrik olarak analiz edilir. Real-Time PCR, konvansiyonel PCR sonrası işlemlere gerek kalmadan ürün kantifikasyonuna olanak sağlar.

Çalışmamıza konu olan RNU, miR34a, miR132 ve miR184'ün amplifikasyon ürünleri için yapılmış erime eğrisi analizi ve jel elektroforezi sonuçları bu genlerin ekspresyonlarının başarılı bir şekilde saptanabildiğinin göstergesidir.

4.3. Kainik Asitin Hedef miRNA'ların Ekspresyonu Üzerindeki Etkisine Yönelik Tartışma

Deneysel SE modellerinde miRNA ekspresyon profillemesi yapılan pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sıçanlara sistemik KA uygulanması (78,105), farelere sistemik KA uygulanması (86), farelere amigdala içerisine KA uygulanması (56) ve sıçanlara pilokarpin uygulanması (52, 53) şeklindeki deneysel modellerdir. Bununla birlikte bu çalışmalara göre nöbet sonrasında zamana ve mekana bağlı şekilde spesifik miRNA ekspresyon modellerinde önemli ölçüde değişiklikler meydana gelmektedir (105).

Birçok model kullanılmasına rağmen alt alan örneklemesine karşı tüm hipokampus örnekleme ve analizin farklı zaman dilimlerinde yapılması potansiyel olarak korunan miRNA değişikliklerine ait moleküler imzaları daha karmaşık hale getirmektedir. Ancak yine de bazı miRNA değişiklikleri çalışmalar arasında sabit

kalmaktadır. Bu miRNA değişiklikleri miR34a'nın up-regölasyonu (52, 53, 114) ve miR132'nin up-regölasyonunu (95, 52, 56) içermektedir. Bazı modellerde artış gösteren bir çok miRNA ise bu karmaşıklıktan dolayı diğer modellerde hiçbir değişiklik göstermemiş ya da tam tersi yönde regölasyon göstermiştir (53, 56).

Çalışmamızda elde edilen verilere göre sıçan beyni serebellum bölgesinde miR34a, miR132 ve miR184'ün ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında akut KA uygulanan gruplarda artış göstermiştir. Bu sonuca göre KA ile indüklenen eksitotoksisite serebellumda bazı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırarak apoptotik olarak önerdiğimiz bu miRNA'ların ekspresyonunu up regüle ediyor olabilir. Daha önceki çalışmalardan elde edilen verilere göre eksitotoksik koşullarda hipokampuste seviyesi artan p53'ün miR34a ekspresyonunu artırdığı ve apoptoza sebep olduğu bilinmektedir (49, 52). Bununla uyumlu olarak çalışmamızın sonuçlarına göre KA uygulanan gruplarda miR34a ekspresyonunun artması serebellumda eksitotoksisite ile ilişkili nöronal ölüme yol açacak şekilde bazı transkripsiyon faktörlerini tetikliyor olabilir. Aynı şekilde araştırmalara göre nöronlarda miR132 ve miR184 ekspresyonu elektriksel aktivite ve nörotrofinlerin etkisi ile indüklenebilir ve çeşitli genlerin ekspresyon düzeylerini değiştirebilir (135, 136). Apoptotik gen ekspresyon paternindeki bu değişiklikler ise serebellumda apoptotik yolağı güçlendiriyor olabilir.

Striatumdan elde edilen verilere göre akut KA uygulaması miR34a ve miR132'nin ekspresyonunu up-regüle ederken miR184'ün ekspresyonunda kontrol ile karşılaştırıldığında önemli derecede düşüş meydana geldiği gözlenmiştir. Serebellumdaki artışın aksine striatumda miR184 ekspresyonunda meydana gelen düşüş miR184'ün hücre sağ kalımını tetikleyen başka yollara ait transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinden etkilenebileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple

miR184'ün ekspresyonunun zamana, bulunduğu bölgenin hücre tipine, KA uygulamasının intraperitoneal, intraserebrovasküler ya da intra-amigdala şeklinde olmasına ve o hücre tipinin metabolik olarak diğer bölgeye oranla ne derece aktif olduğuna bağlı olarak değişebileceği düşünülebilir. Böylelikle miR184 gibi tek bir miRNA'nın dinamik bir şekilde hem apoptotik hem anti apoptotik olmak üzere çift taraflı rol oynayabileceği öne sürülebilir. Sadece bir miRNA'nın hedefinde birden fazla mRNA olduğu kabul edilmektedir buna göre bir miRNA'nın çeşitli hücresel koşullardan farklı şekilde etkilenecek ve farklı mRNA'ları hedef alarak kompleks bir görev üstlendiği düşünülmelidir(78, 86, 114, 122). Hücrenin belirli bir andaki metabolik durumunda baskın olan yolların ve o yollara ait protein ve transkripsiyon faktörlerinin varlığına bağlı olarak miR184 çift yönlü görevinden birini seçtiği düşünülebilir.

miRNA ekspresyonu üzerine yapılan araştırmalar geniş çaplı olarak gözden geçirildiğinde farklı miRNA'ların farklı beyin bölgelerinde farklı ekspresyon paternleri olduğu gösterilmiştir (51, 52, 53, 56, 57, 58). Ekspresyon dağılımındaki bu farklılıklar sinaptik olarak lokalize olan hedef mRNA'ların ayrıcalık gösteren konsantrasyonları ile ilişkilidir (105, 115). Hatta konsantrasyonlara ait bu farklılıklar epileptojenik aktivite ile modüle ediliyor olabilir (105). Başka bir yönden bakıldığında miRNA'lar regüle eden genler ve hedeflerindeki mRNA'lar hakkında az bilgiye sahip olmamız çalışmalarda bu farklılıklar üzerine yapılan yorumları kısıtlamaktadır(52, 53, 56, 57, 60, 78, 95).

miRNA'lara ait radikal değişiklikler ve net hücresel hedefler elde edilmese bile küçük değişikliklerin dahi önemli yolları tetikleyebileceği düşünülerek çalışma kapsamındaki beyin bölgesi ve örneklem sayısı artırılarak herhangi bir miRNA'y ait küçük bir değişimin yıkıcı nöbetlerin izini gösterdiği ortaya konulabilir.

Ve bu değişim o hasarın imzası olacak şekilde diğer merkezi sinir sistemi hastalıkları sonucunda meydana gelen miRNA değişikliklerinden farklı olabilir (78). Deneysel epilepsi modelinde miRNA ekspresyonuna eş değer çalışmalar geniş çaplı bir analiz ve yorum yapabilmek için henüz yeterli sayıda değildir. Çalışmaların standardize edilmesi ve anlamlandırılması için uygulanan eksitotoksik bileşiğin miktarı, uygulama metodu, doku örneklerinin uygulamadan ne kadar süre sonra elde edildiği, beyin bölgeleri arasındaki farklılıklar açısından araştırmalar zenginleştirilmelidir.

4.4. Gamma Glutamil Sisteinil Etil Ester'in Hedef miRNA'ların Ekspresyonu Üzerindeki Etkisine Yönelik Tartışma

GCEE yapısal özellikleri bakımından glutatyona büyük benzerlik göstermektedir. Yapısında taşıdığı tiyol (–SH) grubu nedeniyle GSH'un hücre içine girişı oldukça zordur ve hücre içinde hızla amino asitlerine ayrışmaktadır. Ancak, GCEE'nin hücrelere kolayca girebileceği ve GSH biyosentezine katılabileceği gösterilmiştir (2). GCEE'nin bazı hücre tipleri ve sistemlerine etkin bir şekilde taşındığı ve GSH düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (15, 23, 30, 50, 61, 66,).

GCEE'nin beyine yönelik uygulamaları konusunda yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalarda intraserebroventriküler (i.c.v) (106, 108) ve intraperitoneal (30, 31) olarak ratlara uygulanan GCEE'nin beyinde GSH düzeylerini arttırabileceği bildirilmiştir. GCEE'nin bu konudaki etki mekanizması temel olarak hücrelere GSH biyosentezi için prekürsör olarak γ –glutamilsistein'in ulaştırılması ilkesine dayanmaktadır. Bu şekilde, GSH biyosentezinde γ –GCS enzimi ve GSH'un kendisi arasındaki geri bildirim inhibisyon engelini aşılması ve GSH biyosentezi için gereken substratların süregen bir biçimde sağlanması mümkün olabilecektir (74,93, 94, 106).

İn vivo ve in vitro çalışmalar GCEE' nin GSH biyosentezi için bir prekürsör gibi davranmasının yanı sıra GSH benzeri antioksidan etkileri açısından da beyin dokusunda önemli bir fonksiyon gösterebileceğini ortaya koymaktadır (15, 23, 30, 66, 93). Bu çalışmalar kapsamında GCEE'nin; peroksinitrit (31), β -(1-42) amiloid protein (30, 15), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro-piridin; MPTP) (23), adriamisin (61), travmatik hasar (74) ve kainik asit ile indüklenen eksitotoksisteki etkileri incelenmiştir (138).

Çalışmamızda GCEE'nin KA ile indüklenen eksitotoksik koşullarda miRNA ekspresyonları üzerindeki düzenleyici etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre KA+GCEE uygulaması yapılan sıçanlarda serebellum bölgesine ait miR34a, miR132 ve miR184 ekspresyonları hem KA hem de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede artış göstermişlerdir.

Striatum bölgesinden elde edilen sonuçlara göre ise miR184 ekspresyonu KA+GCEE uygulaması ile azalırken miR34a ve miR132 ekspresyonu belirgin artış gözlenmiştir.

GCEE'nin proapoptik miRNA'lar üzerindeki beklenmedik pozitif moleküler etkisinin ise GCEE'nin etkilediği başka sinyal yolları sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. KA ve GCEE'nin kesin etkilerinin belirlenebilmesi için bu miRNA'lar üzerine etki eden potansiyel diğer moleküler sinyal yollarının incelenmesi ve araştırılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

Diğer yandan başta DICER olmak üzere olgun miRNA sentezi için gerekli tüm enzimlerin ekspresyon düzeyleri de miRNA sentezi için belirleyici faktörler olduklarından bu enzimlerin ekspresyonlarının GCEE ve KA gibi uygulanan bileşiklerden nasıl etkilendikleri de çalışmaya dahil edilmelidir (86). KA+GCEE

uygulanan bölgelerde miRNA ekspresyonlarının beklendiğinin aksine artması GCEE'nin DICER ekspresyonu üzerine etkisinden dolayı meydana gelmiş olabilir.

Geniş çaplı miRNA ekspresyon profillemelerine ait çalışmalar sonucunda tahmin edildiği üzere hücrenin tipine bağlı olarak her hücrenini o ana ait biyokimyasal, fizyolojik veya patolojik durumuna göre bir miRNA parmak izi bulunmaktadır. Bu parmak izi o hücrede spesifik bir anda spesifik miRNA'lara ait ekspresyon paternini temsil etmektedir. Öyle ki ekspresyondaki bu değişiklikler o fizyolojik ya da patolojik duruma ait bir imza gibidir. KA ile indüklenen eksitotoksisite modeli üzerinde GCEE'nin etkisinin araştırılması için miRNA ekspresyon paternlerini incelemek ve bu modele ait bir parmak izi ortaya çıkarmak eksitotoksisite için önemli bir adım olacaktır. Çalışmamızda bu modelde apoptotik yollara ait olabileceği ön görülen miRNA'lara ait ekspresyon paternleri ön planda tutularak bir belirteç ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar bu miRNA'ların hedef mRNA ekspresyonlarını da kapsayacak şekilde yapılacak daha detaylı araştırmalar ile desteklendikçe anlamlı bir parmak izi kazanacaktır.

ÖZET

Eksitotoksik Koşullarda Spesifik Beyin Bölgelerinde Apoptozis ile İlişkili Bazı MikroRNA'ların Ekspresyon Paternindeki Değişimler ve Gama-Glutamil Sisteinil Etil Ester'in Düzenleyici Etkisinin Araştırılması

Kainik asit bir glutamat analogudur ve güçlü bir eksitotoksik bileşiktir. KA spesifik olarak presinaptik ve postsinaptik KA tipi reseptörlere bağlanmak suretiyle etkili olur. Sıçanlara sistemik KA uygulanması deneysel olarak temporal lob epilepsisi ve nörodejenerasyon modeli olarak kullanılmaktadır. Bu nörodejeneratif olguda beynin spesifik bölgelerinde nöronal hücre ölümünün baskın olduğu gözlenmiştir. Eksitotoksik koşullarda nöronal hücre ölümünde rol oynayan apoptotik yolların ve bu yollara ait proteinlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde bazı miRNA'ların aktif rol oynadıkları düşünülmektedir. Pro-apoptotik ya da anti-apoptotik olarak görev yaptığı varsayılan miR34a, miR132 ve miR184'ün ekspresyonlarındaki değişikliklerin kainik asitle oluşturulan nörodejenerasyon koşullarından da etkilenmesi olasıdır.

Çalışmamızda Sprague- Dawley sıçanlar kullanılmış ve deneyler striatum ve serebellum olmak üzere iki ayrı beyin bölgesinde Kontrol (n=4), KA (n=4), KA+GCEE (n=4) olmak üzere 6 ayrı grupta gerçekleştirilmiştir. Hedef miRNA'ların ekspresyon düzeyleri Real-Time PCR ile saptanmıştır.

Sonuçlara göre kontrol grubu ile kıyaslandığında KA uygulaması yapılan gruplarda serebellumda miR34a, miR132, miR184'ün ekspresyonlarında artış gözlenmiş, striatumda ise KA uygulaması sonrasında miR34a, miR132 artarken miR184'ün azaldığı saptanmıştır. Striatum ve serebellumda miR34a, miR132'nin ekspresyonlarındaki kararlı artışın nöronal hücre ölümüne ve nörodejenerasyona yol

açabileceği ve bu miRNA'ların pro-apoptotik yolları tetikleyebileceği söylenebilir. KA uygulaması yapılmış striatumda miR184 ekspresyonundaki azalma ise bu miRNA'nın hücre sağ kalımını teşvik eden yollarla ilişkili olabileceğini gösterebilir. Ayrıca KA ile GCEE uygulanan gruplarda sadece KA uygulanan gruplara göre serebellumda miR34a, miR132 ve miR184 artarken; striatumda miR184 azalmıştır. GCEE'nin proapoptoik miRNA'lar üzerindeki beklenmedik pozitif moleküler etkisinin ise GCEE'nin etkilediği başka sinyal yolları sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. KA ve GCEE'nin kesin etkilerinin belirlenebilmesi için bu miRNA'lar üzerine etki eden potansiyel diğer moleküler sinyal yollarının incelenmesi ve araştırılması gerekmektedir.

ABSTRACT

Changes in Expression Pattern of microRNAs Related With Apoptosis and Investigation of Regulatory Effect of Gamma-Glutamyl Cysteine Ethyl Ester

Kainic acid is a glutamate analogue and a potent excitotoxic compound. KA shows its effects by binding specifically to presynaptic and postsynaptic KA type receptors. It is known that experimental temporal lobe epilepsy and neurodegeneration model can be obtained by systematically KA treatment to rats. It is observed that neuronal cell death is dominant in the specific regions of brain in this neurodegenerative state. It is suggested that in excitotoxic states some miRNAs play active roles in the regulation of pro-apoptotic proteins expression levels that are belong to apoptotic pathways. It is suggested that changes in expression profiles of miR34 α , miR132, miR184 that are thought to may have proapoptotic and antiapoptotic roles in cells, are related to kainic acid induced neurodegenerative state.

In our study, Sprague-Dawley rats were used. Experiments are carried out in two different brain region as cerebellum and striatum and divided into three groups as control (n=4), KA (n=4) and KA+GCEE(n=4). Target miRNAs expression profiles were determined by Real-Time PCR.

Our results indicate that KA treatment in cerebellum significantly up regulates miR34 α , miR132, miR184 expression when compared to control groups. Besides that while KA treatment in striatum significantly upregulates miR34 α , miR132 expression, it downregulates the miR184 expression. We conclude that the stable increase of miR34 α and miR132 expression in striatum and cerebellum can promote neuronal cell death by triggering some proapoptotic pathways and cause neurodegeneration. We can suggest that downregulation of miR184 expression in

KA treated striatum may represents relationships between pathways that is related to cell survival and miR184. Additionally while KA+ GCEE treatment in cerebellum significantly upregulates miR34 α , miR132 and miR184 expression when compared to KA treatment; KA+ GCEE treatment in striatum significantly down regulates miR184 expression. It is thought that unforeseen effects of GCEE on pro-apoptotic miRNAs can be emerged related to other signaling pathways which can be effected by GCEE. In order to determine the certain effects of KA and GCEE, other potential signalling pathways which are influenced by GCEE are needed to be analyzed and explored.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Aldridge S., Hadfield J. Introduction to miRNA profiling technologies and cross-platform comparison. *Methods Mol Biol* 822:19–31 (2012).
2. Anderson M.E., Meister A., Glutathione monoesters, *Anal Biochem*, 183, 16-20, (1989).
3. Aronica E., Fluiter K., Iyer A., Zurolo E., Vreijling J., van Vliet EA, Baayen JC., Gorter JA. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 31:1100–1107 (2010).
4. Arroyo JD., Chevillet JR., Kroh EM., Ruf IK., Pritchard CC., Gibson DF., Mitchell PS., Bennett CF., Pogosova-Agadjanyan EL., Stirewalt DL., Tait JF., Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5003–5008 (2011).
5. Baek D., Villen J., Shin C., Camargo FD., Gygi SP., Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455:64–71 (2008).
6. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297 (2004).
7. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215–233(2009).
8. Bartus R.T., Hayward N.J., Elliott P.J., Sawyer S.D., Baker K.L., Dean R.L., Akimaya A., Straub J.A., Harbeson S.L., Li Z. Calpain Inhibitor AK295 Protects Neurons From Focal Brain Ischemia, Effects of

Postocclusion Intra-arterial Administration. *Stroke*. 25 (11): 2265-2270. (1994).

9. Beal M.F., Does Impairment of Energy Metabolism Result in Excitotoxic Neuronal Death in Neurodegenerative illness? *Ann. Neurol.*, 31,119-30 (1992)

10. Beckman J.S., Koppenol W.H. Nitric Oxide, Superoxide and Peroxynitrite: The Good, The Bad and Ugly. *Am. J. Physiol.* 271 (5): 1424-1437 (1996)

11. Bellingham S.A., Coleman B.M., Hill A.F. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 40:10937–10949 (2012).

12. Bliss T.V., Collingridge G.L., A Synaptic Model of Memory: Long Term Potentiation in The Hippocampus. *Nature*. (1993). 361 (6407): 31-39

13. Bobrie A., Colombo M., Raposo G., Thery C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 12:1659–1668 (2011).

14. Boldin M.P., Baltimore D. MicroRNAs, new effectors and regulators of NF-kappaB. *Immunol Rev* 46:205–220 (2012).

15. Boyd-Kimball D., Sultana R., Abdul H.M., Butterfield D.A., Gamma-glutamylcysteine ethyl ester-induced up-regulation of glutathione protects neurons against Abeta(1-42)-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease, *J Neurosci Res*, 79(5), 700-6, (2005).

16. Brown B.D., Naldini L. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet* 10:578–585 (2009).

17. Bruce A.J, Baudry M. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate induced seizures. *Free Radic Biol Med*. 18 993-1002 (1995).
18. Cassarino D.S., Bennett J.P. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: Mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev*. 29(1): 1-25 (1999).
19. Ceman S., Saugstad J. MicroRNAs: meta-controllers of gene expression in synaptic activity emerge as genetic and diagnostic markers of human disease. *Pharmacol Ther* 130:26–37 (2011).
20. Chang BS., Lowenstein DH. Epilepsy. *N Engl J Med* 349:1257–1266 (2003).
21. Chang TC., Wentzel EA., Kent OA., Ramachandran K., Mullendore M., Lee KH., Feldmann G., Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein CJ., Arking DE., Beer MA., Maitra A., Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 26:745–752 (2007).
22. Chen XM., Splinter PL., O'Hara SP., LaRusso NF. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem* 282:28929–28938 (2007).
23. Chinta S.J., Rajagopalan S., Butterfield D.A., Andersen J.K. In vitro and in vivo neuroprotection by gamma-glutamylcysteine ethyl ester against MPTP: relevance to the role of glutathione in Parkinson's disease, *Neurosci Lett*, 10, 137-41, (2006).

24. Choi D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of nervous system. *Neuron*. 1: 623-634 (1988).
25. Choi D.W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neuroscience*, 7(2):357- 368. (1987).
26. Christensen M., Larsen LA., Kauppinen S., Schratt G. Recombinant adeno-associated virus-mediated microRNA delivery into the postnatal mouse brain reveals a role for miR-134 in dendritogenesis in vivo. *Front Neural Circuits* 3:16 (2010).
27. Christoffersen NR., Shalgi R., Frankel LB., Leucci E., Lees M., Klausen M., Pilpel Y., Nielsen FC., Oren M., Lund AH. P53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ* 17:236–245 (2010).
28. Coyle J.T., Puttfarcken P.S. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. 262(5134): 689-695 (1993).
29. Diehl P., Fricke A., Sander L., Stamm J., Bassler N., Htun N., Ziemann M., Helbing T., El-Osta A., Jowett JB., Peter K. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* 93:633–644 (2012).
30. Drake J., Sultana R., Aksenova M., Calabrese V., Butterfield D.A., Elevation of mitochondrial glutathione by gamma-glutamylcysteine ethyl ester protects mitochondria against peroxynitrite-induced oxidative stress, *J Neurosci Res*, 74(6), 917-27, (2003).
31. Drake J., Kanski J., Varadarajan S., Tsoras M., Butterfield D.A., Elevation of brain glutathione by GCEE protects against peroxynitrite-induced oxidative stress, *J Neurosci*, 68, 776-84, (2002).

32. Dunnett S.B., Bjorklund A. Prospects for new restorative neuroprotective treatments in Parkinson's Disease. *Nature*, 399(6738): 32-39 (1999).
33. Eacker SM., Dawson TM., Dawson VL. Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 10: 837–841 (2009).
34. Ebert MS., Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* 149:515–524 (2012).
35. Edbauer D., Neilson JR., Foster KA., Wang CF., Seeburg DP., Batterton MN., Tada T., Dolan BM., Sharp PA., Sheng M. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* 65:373–384 (2010).
36. Elmen J., Lindow M., Schutz S., Lawrence M., Petri A., Obad S., Lindholm M., Hedtjarn M., Hansen HF., Berger U., Gullans S., Kearney P., Sarnow P., Straarup EM., Kauppinen S. LNA mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452:896–899 (2008).
37. Engel T., Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 1:97–115 (2009).
38. Engel T., Murphy BM., Hatazaki S., Jimenez-Mateos EM., Concannon CG., Woods I., Prehn JH., Henshall DC. Reduced hippocampal damage and epileptic seizures after status epilepticus in mice lacking proapoptotic Puma. *FASEB J* 24:853–861 (2010).
39. Eulalio A., Huntzinger E., Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* 15: 346–353 (2008).

40. Farooqui A.A., Horrocks L.A. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res. Rev.* 16: 171-191 (1991).
41. Fiore R., Khudayberdiev S., Christensen M., Siegel G., Flavell SW., Kim TK., Greenberg ME., Schratt G. Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J* 28:697–710 (2009).
42. Fujikawa DG. Neuroprotective strategies in status epilepticus In: Wasterlain CG, Treiman DM, editors. *Status Epilepticus: Mechanisms and Management*, vol. 36. Cambridge: MIT Press. p. 463–480 (2006).
43. Gao J., Wang WY., Mao YW., Graff J., Guan JS., Pan L., Mak G., Kim D., Su SC., Tsai LH. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466:1105–1109 (2010).
44. Gaughwin P., Ciesla M., Yang H., Lim B., Brundin P. Stagespecific modulation of cortical neuronal development by MmumiR-134. *Cereb Cortex* 21:1857–1869 (2011).
45. Gluck M. R., Jayatilleke E., Shaw S., Rowan A. J., Haroutunian V. CNS Oxidative stress associated with kainic acid rodent model of experimental epilepsy, *Epilepsy Res*, 39: 63-71
46. Gorter JA., van Vliet EA., Aronica E., Breit T., Rauwerda H., Lopes da Silva FH., Wadman WJ. Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 26:11083–11110 (2006).

47. Guo H., Ingolia NT., Weissman JS., Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466:835–840 (2010).
48. Hebert SS., Nelson PT. Studying microRNAs in the brain: technical lessons learned from the first ten years. *Exp Neurol* 235:397–401 (2012).
49. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 17:193–199 (2010).
50. Hoshida S., Kuzuya T., Yamashita N., Nishida M., Kitahara S., Hori M., Kamada T., Tada M., Gamma-glutamylcysteine ethyl ester for myocardial protection in dogs during ischemia and reperfusion, *J Am Coll Cardiol*, 24, 1391–1397, (1994).
51. Hu G., Yao H., Chaudhuri AD., Duan M., Yelamanchili SV., Wen H., Cheney PD., Fox HS., Buch S. Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphinemediated neuronal dysfunction. *Cell Death Dis* 3:e381 (2012a).
52. Hu K., Xie YY., Zhang C., Ouyang DS., Long HY., Sun DN., Long LL., Feng L., Li Y., Xiao B. MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cellapoptosis post-status epilepticus. *BMC Neurosci* 13:115 (2012b).
53. Hu K., Zhang C., Long L., Long X., Feng L., Li Y., Xiao B. Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurosci Lett* 488:252–257 (2011).

54. Huntzinger E., Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *NatRev Genet* 12:99–110 (2011).
55. Iyer A., Zurolo E., Prabowo A., Fluiter K., Spliet WG., van Rijen PC., Gorter JA., Aronica E. MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. *PLoS One* 7:e44789 (2012).
56. Jimenez-Mateos EM., Bray I., Sanz-Rodriguez A., Engel T., McKiernan R., Mouri G., Tanaka K., Sano T., Saugstad JA., Simon RP., Stallings RL., Henshall DC. MicroRNA expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. *Am J Pathol* 179:2519–2532 (2011).
57. Jimenez-Mateos EM., Engel T., Merino-Serrais P., McKiernan RC., Tanaka K., Mouri G., Sano T., O'Tuathaigh C., Waddington JL., Prenter S., Delanty N., Farrell MA., O'Brien DF., Conroy RM., Stallings RL., Defelipe J., Henshall DC. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nat Med* 18:1087–1094 (2012).
58. Jimenez-Mateos EM., Hatazaki S., Johnson MB., Bellver-Estelles C., Mouri G., Bonner C., Prehn JH., Meller R., Simon RP., Henshall DC. Hippocampal transcriptome after status epilepticus in mice rendered seizure damage-tolerant by epileptic preconditioning features suppressed calcium and neuronal excitability pathways. *Neurobiol Dis* 32:442–453 (2008).
59. Jimenez-Mateos EM., Henshall DC. Epilepsy and microrna. *Neuroscience* 238 218-219 (2013).

60. Jimenez-Mateos EM., Henshall DC. Seizure preconditioning and epileptic tolerance: models and mechanisms. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 1:180–191 (2009).
61. Joshi G., Hardas S., Sultana R., St Clair D.K., Vore M., Butterfield D.A., Glutathione elevation by gamma-glutamyl cysteine ethyl ester as a potential therapeutic strategy for preventing oxidative stress in brain mediated by in vivo administration of adriamycin: Implication for chemobrain, *The Journal of Neuroscience Research*, 85(3), 497-503, (2007).
62. Kaller M., Liffers ST., Oeljeklaus S., Kuhlmann K., Roh S., Hoffmann R., Warscheid B., Hermeking H. Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol Cell Proteomics* 10:M111. 010462 (2011).
63. Kan AA., van Erp S., Derijck AA., de Wit M., Hessel EV., O'Duibhir E., de Jager W., Van Rijen PC., Gosselaar PH., de Graan PN., Pasterkamp RJ. Genome-wide microRNA profiling of human temporal lobe epilepsy identifies modulators of the immune response. *Cell Mol Life Sci* 69:3127–3145 (2012).
64. Kato K., Puttfarcken P.S., Lyons W.E., Coyle J.T. Developmental time course and ionic dependence of kainate-mediated toxicity in rat cerebellar granule cell cultures. *J Pharmacol Exp Ther.* 256(1): 402-411 (1991).
65. Kim VN., Han J., Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:126–139 (2009).

66. Kobayashi H., Kurokawa T., Kitahara S., Nonami T., Harada A., Nakaso A., Sugiyama S., Ozawa T., Takagi H., The effects of gamma-glutamylcysteine ethyl ester, a prodrug of glutathione, on ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *Transplantation*, 54, 414–418, (1992).
67. Kobow K., Blumcke I. The methylation hypothesis: do epigenetic chromatin modifications play a role in epileptogenesis? *Epilepsia* 52(Suppl. 4):15–19 (2011).
68. Kosik KS. The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* 7:911–920 (2006).
69. Kotloski R., Lynch M., Lauersdorf S., Sutula T. Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits. *Prog Brain Res* 135:95–110 (2002).
70. Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev KG., Tuschl T., Manoharan M., Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature* 438:685–689 (2005).
71. Lachenal G., Pernet-Gallay K., Chivet M., Hemming FJ., Belly A., Bodon G., Blot B., Haase G., Goldberg Y., Sadoul R. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* 46:409–418 (2005).
72. Lafon-Caza M., Pietri S., Culcasi M., Bockaert J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, 364,535-537(1993).
73. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., Tuschl WT. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12:735–739 (2002).

74. Lai Y., Hickey R.W., Chen Y., Bayir H., Sullivan M., Cu C.T., Kocharek P.M., Dixon C.E., Jenkins L.W., Graham S.H., Watkins S.C., Clark R.S., Autophagy is increased after traumatic brain injury in mice and is partially inhibited by the antioxidant gamma-glutamylcysteine ethyl ester, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(3), 540-50, (2008).
75. Lee RC., Feinbaum RL., Ambros V. The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75:843–854 (1993).
76. Lees G.J. Effects of anesthetics, anticonvulsants and glutamate antagonist on kainic acid- induced local and distal neuronal loss. *Journal of the Neurological Sciences*. 108,221-8 (1992).
77. Lehmann SM., Kruger C., Park B., Derkow K., Rosenberger K., Baumgart J., Trimbuch T., Eom G., Hinz M., Kaul D., Habbel P., Kalin R., Franzoni E., Rybak A., Nguyen D., Veh R., Ninnemann O., Peters O., Nitsch R., Heppner FL., Golenbock D., Schott E., Ploegh HL., Wulczyn FG., Lehnardt S. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 15:827–835 (2012).
78. Liu DZ., Tian Y., Ander BP., Xu H., Stamova BS., Zhan X., Turner RJ., Jickling G., Sharp FR. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:92–101 (2010).
79. Lubin FD. Epileptogenesis: can the science of epigenetics give us answers? *Epilepsy Curr* 2:105–110 (2012).

80. Marchi N., Granata T., Ghosh C., Janigro D. Blood–brain barrier dysfunction and epilepsy: pathophysiologic role and therapeutic approaches. *Epilepsia* 53:1877–1886 (2012).
81. Marchi N., Tierney W., Alexopoulos AV., Puvenna V., Granata T., Janigro D. The etiological role of blood–brain barrier dysfunction in seizure disorders. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2011:482415 (2011).
82. Margineanu DG. Systems biology impact on antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res* 98:104–115 (2012).
83. Maroso M., Balosso S., Ravizza T., Liu J., Aronica E., Iyer AM., Rossetti C., Molteni M., Casalgrandi M., Manfredi AA., Bianchi ME., Vezzani A. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med* 16:413–419 (2010).
84. Mattson M.P., Mark R.J. Excitotoxicity and excitoprotection in vitro. *Adv Neurol*. 71: 1-37 (1996).
85. McKiernan RC., Jimenez-Mateos EM., Bray I., Engel T., Brennan GP., Sano T., Michalak Z., Moran C., Delanty N., Farrell M., O'Brien D., Meller R., Simon RP., Stallings RL., Henshall D. Reduced mature microRNA levels in association with dicer loss in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *PLoS One* 7:e35921 (2012a).
86. McKiernan RC., Jimenez-Mateos EM., Sano T., Bray I., Stallings RL., Simon RP., Henshall D. Expression profiling the microRNA response to epileptic preconditioning identifies miR-184 as a modulator of seizure-induced neuronal death. *Exp Neurol* 237:346–354 (2012b).

87. McNamara JO., Huang YZ., Leonard AS. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE* 2006:re12 (2006).
88. McNeill E., Van Vactor D. MicroRNAs shape the neuronal landscape. *Neuron* 75:363–379 (2012).
89. Meller R., Thompson SJ., Lusardi TA., Ordonez AN., Ashley MD., Jessick V., Wang W., Torrey DJ., Henshall DC., Gafken PR., Saugstad JA., Xiong ZG., Simon RP. Ubiquitin proteasomemediated synaptic reorganization: a novel mechanism underlying rapid ischemic tolerance. *J Neurosci* 28:50–59 (2008).
90. Meng Y., Zhang Y., Tregoubov V., Janus C., Cruz L., Jackson M., Lu WY., MacDonald JF., Wang JY., Falls DL., Jia . Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35:121–133 (2002).
91. Monaghan D.T., Bridges R.,J., Cotman C.W. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 365-402 (1989).
92. Nishida K., Ohta Y., Ishiguro L., Preventive effect of γ -glutamylcysteinylethyl ester on carbon tetrachloride-induced hepatic triglyceride accumulation in mice, *Toxicology Letters*, 95, 141-6, (1998).
93. Nishida K., Ohta Y., Ito M., Nagamura Y., Kitahara S., Fujii K., Ishiguto I., Conversion of γ -glutamylcysteinylethyl ester to glutathione in rat hepatocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1313, 47-53, (1996).
94. Nishinaka Y., Kitahara S., Sugiyama S., Yokota M., Saito H., Ozawa T., The cardioprotective effect of gamma-glutamylcysteine ethyl ester during

coronary reperfusion in canine hearts, *Br J Pharmacol*, 104, 805–810, (1991).

95. Nudelman AS., DiRocco DP., Lambert TJ., Garelick MG. Le J., Nathanson NM., Storm DR. Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. *Hippocampus* 20:492–498 (2010).

96. Obad S., dos Santos CO., Petri A., Heidenblad M., Broom O., Ruse C., Fu C., Lindow M., Stenvang J., Straarup EM., Hansen HF., Koch T., Pappin D., Hannon GJ., Kauppinen S.. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet* 43:371–378 (2011).

97. Ohtsu A., Kitahara S., Fujii K., Anticataractogenic property of gamma-glutamylcysteine ethyl ester in an animal model of cataract, *Ophthalmic Research*, 23(1), 51-8, (1991).

98. Okamoto T., Ogiwara H., Hayashi T., Mitsui A., Kawabe T., Yodoi J., Human thioredoxin/adult T cell leukemia-derived factor activates the enhancer binding protein of human immunodeficiency virus type 1 by thiol redox control mechanism, *International Immunology*, 4, 811-9, (1992).

99. Omran A., Peng J., Zhang C., Xiang QL., Xue J., Gan N., Kong H., Yin F. Interleukin-1beta and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 53:1215–1224 (2012).

100. Orom UA., Kauppinen S., Lund AH. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene* 372:137–141 (2006).

101. Ozaki M., Ozasa H., Fuchinoue S., Teraoka S., Ota K., Protective effects of glycine and esterified gamma-glutamylcysteine on

ischemia/reoxygenation injury of rat liver, *Transplantation*, 58, 753–755, (1994).

102. Park CY., Choi YS., McManus MT. Analysis of microRNA knockouts in mice. *Hum Mol Genet* 19:R169–R175 (2010).

103. Park D.S., Obeidat A., Giovanni A., Greene L.A. Cell cycle regulators in neuronal death evoked by excitotoxic stress: Implications for neurodegeneration and its treatment. *Neurobiol. Aging*. 21: 771-781 (2000).

104. Pennisi E. Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. *Science* 337:1159. 1161 (2012).

105. Pichardo-Casas I., Goff LA., Swerdel MR., Athie A., Davila J., RamosBrossier M., Lapid-Volosin M., Friedman WJ., Hart RP., Vaca L. Expression profiling of synaptic microRNAs from the adult rat brain identifies regional differences and seizure-induced dynamic modulation. *Brain Res* 1436:20–33 (2012).

106. Pileblad E., Magnusson T., Increase in rat brain glutathione following intracerebroventricular administration of γ -glutamylcysteine, *Biochemical Pharmacology*, 44, 895-903, (1992).

107. Pitkanen A., Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol* 10:173–186 (2011).

108. Pocernich C.B., Cardin A.L., Racine C.L., Lauderback C.M., Butterfield D.A., Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membrane: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease, *Neurochemistry International*, 39, 141-9, (2001).

109. Ponomarev ED., Veremeyko T., Barteneva N., Krichevsky AM., Weiner HL. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBPalpha-PU.1 pathway. *Nat Med* 17:64–70 (2011).
110. Qureshi IA., Mehler MF. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 13:528–541 (2012).
111. Rajendran L., Honsho M., Zahn TR., Keller P., Geiger KD., Verkade P., Simons K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11172–11177 (2006).
112. Raver-Shapira N., Marciano E., Meiri E., Spector Y., Rosenfeld N., Moskovits N., Bentwich Z., Oren M. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 26:731–743 (2007).
113. Saman S., Kim W., Raya M., Visnick Y., Miro S., Jackson B., McKee AC., Alvarez VE., Lee NC., Hall GF. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287:3842–3849 (2012).
114. Sano T., Reynolds JP., Jimenez-Mateos EM., Matsushima S., Taki W., Henshall DC. MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death. *Cell Death Dis* 3:e287 (2012).
115. Sato F., Tsuchiya S., Terasawa K., Tsujimoto G. Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PLoS One* 4:e5540 (2009).

116. Saugstad JA. MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1564–1576 (2010).
117. Schratt G. Fine-tuning neural gene expression with microRNAs. *Curr Opin Neurobiol* 19:213–219 (2009).
118. Schratt GM., Tuebing F., Nigh EA., Kane CG., Sabatini ME., Kiebler M., Greenberg ME.. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439:283–289 (2006).
119. Selbach M., Schwanhauser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455:58–63 (2008).
120. Shaked I., Meerson A., Wolf Y., Avni R., Greenberg D., Gilboa-Geffen A., Soreq H. MicroRNA-132 potentiates cholinergic antiinflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity* 31:965–973 (2009).
121. Sharples RA., Vella LJ., Nisbet RM., Naylor R., Perez K., Barnham KJ., Masters CL., Hill AF. Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J* 22:1469–1478 (2008).
122. Sloviter RS. Progress on the issue of excitotoxic injury modification vs. real neuroprotection; implications for posttraumatic epilepsy. *Neuropharmacology* 61:1048–1050 (2011).
123. Smeyne R.J., Vendrell M., Hayward M., Baker S.J., Miao G.G., Schilling K., Robertson L.M., Curran T., Morgan J.I. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature*. 363(6425): 166-169 (1993).

124. Song YJ., Tian XB., Zhang S., Zhang YX., Li X., Li D., Cheng Y., Zhang JN., Kang CS., Zhao W. Temporal lobe epilepsy induces differential expression of hippocampal miRNAs including let-7e and miR-23a/b. *Brain Res* 1387:134–140 (2011).
125. Sperk G. Kainic acid seizures in rat. *Prog Neurobiol.* 42(1):1-32(1994).
126. Stenzel-Poore MP., Stevens SL., King JS., Simon RP. Preconditioning reprograms the response to ischemic injury and primes the emergence of unique endogenous neuroprotective phenotypes: a speculative synthesis. *Stroke* 38: 680–685 (2007).
127. Tanaka T., Tanaka S., Fujita T.T., Tkano K., Fukuda H., Sako K., Yonemasu Y. Experimental complex partial seizures induced by a microinjection of kainic acid into limbic structures. *Prog Neurobiol.* 38: 317-334 (1992).
128. Tao J., Wu H., Lin Q., Wei W., Lu XH., Cantle JP., Ao Y., Olsen RW., Yang XW., Mody I., Sofroniew MV., Sun YE. Deletion of astroglial dicer causes non-cell-autonomous neuronal dysfunction and degeneration. *J Neurosci* 31:8306–8319 (2011).
129. Tarasov V., Jung P., Verdoodt B., Lodygin D., Epanchintsev A., Menssen A., Meister G., Hermeking H. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 6:1586–1593 (2007).
130. Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 39:7223–7233 (2011).

131. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552: 335-344 (2003).
132. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee JJ., Lotvall JO.. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654–659 (2007).
133. Vasudevan S., Tong Y., Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up- egulate translation. *Science* 318:1931–1934 (2007).
134. Vezzani A., French J., Bartfai T., Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 7:31–40 (2011).
135. Vo N., Klein ME., Varlamova O., Keller DM., Yamamoto T., Goodman RH., Impey S. A cAMP-response element binding proteininduced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16426–16431 (2005).
136. Wayman GA., Davare M., Ando H., Fortin D., Varlamova O., Cheng HY., Marks D., Obrietan K., Soderling TR., Goodman RH., Impey S. An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9093–9098 (2008).
137. Welch C., Chen Y., Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 26:5017–502 (2007).
138. Yalcin A, Armagan G, Turunc E, Konyalioglu S and Kanit L. Potential neuroprotective effect of -glutamylcysteine ethyl ester on rat

brain against kainic acid-induced excitotoxicity. *Free Radic Res* 2010;44:513-521.

139. Yoon S., Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*. 24,21-44 (2006).

140. Zachariou V. et al. Distinct roles of adenylyl cyclases 1 and 8 in opiate dependence: Behavioral, electrophysiological and molecular studies. *Biol Psychiatry* 63:1013-1021 (2008).



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı Soyadı: Burcu AZAK

Uyruğu : T.C

Doğum Yeri: KONAK/İZMİR

Doğum Tarihi: 13/6/1990

Medeni Durum: Bekar

Adres: Ufuk Mah. 1005 sok. No:30/b İşçievleri/Buca/İZMİR

Tel: 0553 542 69 70

E-mail: burcuazak@hotmail.com

EĞİTİM DURUMU:

2004-2008 Fatma Saygın Yabancı Dil Ağırlıklı Lise

2008-2012 Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Opsiyonu

2010- 2012 Ege Üniversitesi Eğitim Bilimleri Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifika Programı

2012- 2014 Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı

2013- Devam ediyor İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fiziyojji Anabilim Dalı Yüksek Lisans

STAJ:

2009-Gönüllü Staj-Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı(27 Temmuz-26 Ağustos)

2010-Gönüllü Staj-Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı (23 Ağustos- 24 Eylül)

2011- Zorunlu staj –Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı (15 Ağustos- 15

Eylül)

2012- Gönüllü staj – Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı (Şubat)

2012- Mustafa Kemal Anadolu Lisesi/ İzmir Pedagojik Formasyon Zorunlu Stajı

KONGRE

27-30 Ağustos 2009 -Ege Üniversitesi Uluslararası Katılımlı 3.Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma İle Uygulama Platformu/ Katılımcı

23 Mart 2010- Ege Üniversitesi EBİLTET 2. Kök Hücre Sempozyumu/Katılımcı

27-30 Ağustos 2010 - Ege Üniversitesi Uluslararası Katılımlı 4.Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma İle Uygulama Platformu/Katılımcı

06 Ocak 2010- Ege Üniversitesi BEST(Board of European Students of Technology) Öğrenci Topluluğu/GDO (Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar) Sempozyumu/Katılımcı

30 Nisan 2011- Ege Üniversitesi EBİLTET Geleneksel 3.Kök Hücre Sempozyumu/Katılımcı

04-06 Mart 2011-İstanbul Üniversitesi İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış okulu/Katılımcı

24-25 Haziran 2011- TÜBA 2.Kök Hücre Kursu ve 7. Kök Hücre Sempozyumu/Katılımcı

17-18 Aralık 2011- Boğaziçi Üniversitesi 3.Evrin, Bilim ve Eğitim Sempozyumu/Katılımcı

26-27 Kasım 2011- Ege Üniversitesi/EBİLTEM-Discussion Meeting on Sialoglycobiology/ Katılımcı

21-23 Şubat 2012-İstanbul Üniversitesi İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu/Katılımcı

27 Kasım 2012- Türk Biyokimya Derneği Aylık Toplantısı- Discrimination Between Self and Nonself by The Complement system / Prof. Dr. Seppo K. MERI

26 Aralık 2012- Türk Biyokimya Derneği Aylık Toplantısı- Barsak Bakterileri, Enerji metabolizması Üzerine Etkileri ve Obesite / Prof. Dr. Nur ARSLAN

22 Ocak 2013- Türk Biyokimya Derneği Aylık Toplantısı- Hastalıkta ve Sağlıkta Hücre İçi Protein Kalite Kontrolü ve Yıkım Yolakları / Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK

16-17 Şubat 2013- 1. ODTÜ Sinirbilim Günleri

2 Nisan 2013- Türk Biyokimya Derneği Aylık Toplantısı-Hemoglobinopatiler ve Hemoglobin İzmir / Yrd. Doç. Dr Aydan ÇELEBİLER

16 Nisan 2013- Türk Biyokimya Derneği Aylık Toplantısı- Hepatoselüler Karsinoma Modelinde Oksidatif Stres İle Uyarılan Sinyal İleti Yolaklarının İncelenmesi / Prof. Dr. Neşe ATABEY

28 Nisan- 1 Mayıs 2013- 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi

28 Nisan- 1 Mayıs 2013- 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi Çalıştay- Kadavradan Moleküle Temel Nöroanatomi: Multimediyatik Nöromorfoloji Turu

BİLİMSEL PROJE-POSTER :

17-18 Aralık 2011-Boğaziçi Üniversitesi 3.Evrin, Bilim ve Eğitim Sempozyumu/ Poster sunumu “Prion Gen Ailesinin Evrimi”

21-23 Şubat 2012-İstanbul Üniversitesi İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu/ Poster sunumu “ Gen Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar : Örümcek İpeğinin Gen Aktarımında Vektör Olarak Kullanılması ”

16-17 Şubat 2013- 1. ODTÜ Sinirbilim Günleri Poster Katılımı / Alzheimer Hastalığında Genetik Alt Yapının Etkisi

16-17 Şubat 2013- 1. ODTÜ Sinirbilim Günleri Poster Katılımı / Opioid/Nosiseptin Sistemin Epileptik Olgularla İlişkisi

DERNEK VE TOPLULUK ÜYELİKLERİ:

2009-2011 Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) Üyesi

2009-2011 Ege Üniversitesi Biyoloji Topluluğu (EGEMBİYOT) Üyesi

2012- Halen Türk Biyokimya Derneği Üyesi

2013- Halen Ege Sinirbilim Topluluğu Üyesi