

**DEMİR İYONUNUN (Fe³⁺) SIÇAN (*Rattus norvegicus*)
BEYİN KORTEKS VE HİPOKAMPUS DOKULARINDA
SİNAPSİN 3, SİNAPSİN 4, SİNAPTOGİRİN 1 VE
SİNAPTOGİRİN 4 GENLERİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Abdullah TUNÇ

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN
2013
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DEMİR İYONUNUN (Fe^{3+}) SIÇAN (*Rattus norvegicus*) BEYİN
KORTEKS VE HİPOKAMPUS DOKULARINDA SİNAPSİN 3,
SİNTAKSİN 4, SİNAPTOGİRİN 1 VE SİNAPTOGİRİN 4
GENLERİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Abdullah TUNÇ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ERZURUM

2013

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Demir iyonunun (Fe^{3+}) sıçan (*Rattus norvegicus*) beyin korteks ve hipokampus dokularında sinapsin 3, sintaksin 4, sinaptogirin 1 ve sinaptogirin 4 genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, Abdullah TUNÇ tarafından hazırlanan bu çalışma 24/01/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu (.../...)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DEMİR İYONUNUN (Fe^{3+}) SIÇAN (*Rattus norvegicus*) BEYİN KORTEKS VE HİPOKAMPUS DOKULARINDA SİNAPSİN 3, SİNTAKSİN 4, SİNAPTOGİRİN 1 VE SİNAPTOGİRİN 4 GENLERİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Abdullah TUNÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Metabolizmanın kullanabileceğinden fazla demirin canlılarda toksik özelliği vardır. Normal demir metabolizmasının bozulması beyin dokusunu oksidatif stres hasarına açık hale getirir. Çok sayıda kanıt demir, çinko ve bakır gibi geçiş metal iyonlarının nörodejeneratif rahatsızlıklarının gelişimi üzerine güçlü bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bugün alzaymır, parkinson ve şizofreni gibi birçok nörodejeneratif rahatsızlığın bu sinaptik iletimdeki aksaklıklardan kaynaklandığını düşündüren pekçok bulgu mevcuttur.

Bu tez çalışmasında, *Rattus norvegicus*'a ağız yoluyla verilen farklı konsantrasyonlarda demir iyonlarının, bu hayvanlardaki hipokampus ve korteks dokularında –sinaptik iletimde önemli roller üstlenen- sinapsin 3, sintaksin 4, sinaptogirin 1 ve sinaptogirin 4 genlerinin ekspresyon seviyeleri multipleks Real-Time PCR yöntemi ile GAPDH geninin ekspresyonuna kıyaslanarak incelenmiştir.

Korteks dokusunda Stx4 geni ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler önemsiz olarak bulunmuştur. Hipokampus dokusunda Stx4 geni ekspresyon seviyelerinde meydana gelen azalış önemli bulunmuştur. Korteks ve hipokampus dokularında Syn3 geni ve Korteks dokusunda Syngr1 geni ekspresyon seviyelerindeki artış önemli bulunmuştur. Korteks ve hipokampus dokularında Syngr4 geni ekspresyon seviyelerinde önemli değişiklikler gözlenmiştir.

2013, 66 sayfa

Anahtar Kelimeler: Demir iyonu (Fe^{3+}), *Rattus norvegicus*, gen ekspresyonu, sintaksin 4, sinapsin 3, sinaptogirin 1, sinaptogirin 4

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS of IRON IONS (Fe^{3+}) on EXPRESSION LEVELS of SYNAPSIN III, SYNTAXIN IV, SYNAPTOGYRIN I AND SYNAPTOGYRIN IV GENES in RAT (*Rattus norvegicus*) BRAIN HIPPOCAMPUS AND CORTEX

Abdullah TUNÇ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetic

Supervisor : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

More iron that can be used by metabolism has a toxic effect. Degeneracy of normal iron metabolism makes brain tissue vulnerable to oxidative stress damage. A lot of evidences show that transition metal ions like iron, zinc and copper do not have a strong effect on neurodegenerative sicknesses. At present, there are many findings available which give an impression that alzheimer, parkinson and schizophrenia result from defects in that synaptic transmission.

In this thesis study, iron ions, given orally to *Rattus norvegicus*, are examined by comparing expression levels of Synapsin III, Syntaxin IV, Synaptogyrin I and Synaptogyrin IV which undertake important roles in synaptic transmission in the hippocampus and cortex tissues of those animals with expression of GAPDH gene.

The changes at Stx4 gene expression level in cortex tissue were found significantly. The reduction occurring at Stx4 gene expression levels in hippocampus tissue was found significantly. The increase at Syngr1 expression levels in cortex tissue and Syn3 gene in cortex and hippocampus tissue was found significantly. It was observed that there was significant changes Syngr4 gene expression levels in cortex and hippocampus tissue.

2013, 66 pages

Keywords : Iron ion (Fe^{3+}), *Rattus norvegicus*, gene expression, syntaxin IV, synapsin III, sinaptogirin I, synaptogyrin IV

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın başlangıcından itibaren her aőamasında tecrübelerini benim ile paylaőan ve her alanda bana destek çıkan danıőmanım Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a

Katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK'a

Çalıőmam boyunca yanımda olan ve destekleriyle yardımını esirgemeyen Sayın Arő. Gör. Hamid CEYLAN'a

Çalıőmalarımın en yoğun dönemlerinde bana moral ve motivasyon veren değerli kardeőim Sayın Mesut IŐIK'a,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyip hep yanımda olan aileme teőekkürlerimi sunarım.

Abdullah TUNÇ

Ocak 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.1.1. Ağır metaller	1
1.1.2. Demir toksisitesi	3
1.2. Alzaymır Hastalığı	8
1.2.1. Nörofibriler yumaklar	9
1.2.2. Amiloid plaklar	10
1.3. Şizofreni Hastalığı.....	13
1.4. SNARE Proteinleri	14
1.4.1. Transmitter salınımı	14
1.4.2. Sintaksin 4 (Stx4).....	15
1.4.3. Sinapsin 3 (Syn3).....	16
1.4.4. Sinaptogirin 1 ve Sinaptogirin 4 (Syngr1 ve Syngr4).....	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Sıçanların temin edildiği yer	25
3.1.2. Çalışmanın yürütüldüğü yer	25
3.1.3. Sıçanların bakımı	25
3.1.4. Sıçanların beslenmesi	25
3.1.5. Primerler ve problemler	27
3.1.6. Kullanılan kimyasal maddeler	28
3.1.6.a. RNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler	28

3.1.6.b. Elektroforezde kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler	29
3.1.6.c. PCR’da kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler	29
3.1.6.d. cDNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler	29
3.1.6.e. Kullanılan cihazlar ve kimyasal maddeler.....	30
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Sıçanların doku örneklerinin alınması ve RNA izolasyonu	32
3.2.2. RNA’nın agaroz jel elektroforezinde kontrolü	33
3.2.2.a. Jelde yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı	33
3.2.2.b. Jelin hazırlanışı	33
3.2.2.c. Elektroforez işlemi	33
3.2.3. cDNA kütüphanesinin oluşturulması	33
3.2.4. Multipleks kantitatif gen ekspresyonu (Real-Time PCR)	35
3.2.4.a. PCR kontrolü	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	39
4.1. Araştırma Bulguları	39
4.1.1. RNA bulgusu	39
4.1.2. RNA ve cDNA konsantrasyonu kantitatif tayini bulgusu	40
4.2. İstatistiksel Sonuçlar	42
4.2.1. Gen ekspresyon sonuçları	42
5. SONUÇ	55
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AH	Alzaymır Hastalığı
AP	Amiloid plaklar
APP	β -Amiloid Prokürsör Proteini
DPEC	Dietil pirokarbonat
kDA	kiloDalton
LTP	Long-term potentiation
MPL	Maximum Permitted Limit (Maksimum Geçirgenlik Limiti)
NFY	Nörofibriler Yumaklar
n	Her bir grup için kullanılan sıçan sayısı
ns	not significant (önemsiz)
p	İstatistiksel önem seviyesi
ppm	Parts per million (Milyonda bir birim)
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
qPCR	Real-Time polymerase chain reaction
rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
RFLP	Restriction Fragment Length Polimorphism
RT	Revers Transkriptaz

SNARE	souble N-ethylmaleimide sensitive factor activeting protein receptor
SP	Senil plaklar
Stx	Sintaksin
Syn	Sinapsin
Syngp	Sinaptogirin
Syp	Sinaptofisin
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
VAMP	Vesicle-Associated Membrane Protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. 770 aa'lık APP'nin alternatif splayz formları.....	11
Şekil 1.2. β ve γ sekretazlar tarafından kesilen APP ve β -amiloid oluşumu.....	12
Şekil 2.1. Sinaptogirin 1 ve sinaptofisin 1 ikili nakavt fare (B) ve doğal tip (wild-type) (A) fareden hipokampusun immunohistokimyasal analizi	22
Şekil 3.1. Real Time PCR protokolü.....	37
Şekil 4.1. Korteks dokusundan izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüsü.....	39
Şekil 4.2. Hipokampus dokusundan izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüsü.....	39
Şekil 4.3. Korteks dokusunda Stx4'ün GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları	43
Şekil 4.4. Hipokampus dokusunda Stx4 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları	44
Şekil 4.5. Korteks dokusunda Syn3 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları	46
Şekil 4.6. Hipokampus dokusunda Syn3 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları	47
Şekil 4.7. Korteks dokusunda Syngr1 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları.....	49
Şekil 4.8. Hipokampus dokusunda Syngr1 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları	50
Şekil 4.9. Korteks dokusunda Syngr4 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları.....	52
Şekil 4.10. Hipokampus dokusunda Syngr4 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Sıçan gruplarına verilen ppm cinsinden demir iyonunun konsantrasyonları ve beslenme süreleri.....	26
Çizelge 3.2. Genlerin spesifik forward ve revers primerleri, taqman problemleri ve ürün uzunlukları	28
Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları	30
Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve markalar.....	31
Çizelge 3.5. Multipleks Real Time PCR karışımı (25 µl için)	36
Çizelge 4.1. Beynin sol korteks dokusunda kantitatif tayini yapılan RNA ve cDNA konsantrasyonları	40
Çizelge 4.2. Beynin sol korteks dokusunda kantitatif tayini yapılan RNA ve cDNA konsantrasyonları	41
Çizelge 4.3. Korteks dokusunda gruplara göre Stx4 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri.....	43
Çizelge 4.4. Hipokampus dokusunda gruplara göre Stx4 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri.....	45
Çizelge 4.5. Korteks dokusunda gruplara göre Syn3 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri.....	46
Çizelge 4.6. Hipokampus dokusunda gruplara göre Syn3 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri.....	48
Çizelge 4.7. Korteks dokusunda gruplara göre Syngr1 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri.....	49
Çizelge 4.8. Hipokampus dokusunda gruplara göre Syngr1 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri.....	51
Çizelge 4.9. Korteks dokusunda gruplara göre Syngr4 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri.....	52
Çizelge 4.10. Hipokampus dokusunda gruplara göre Syngr4 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri.....	54

1. GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler

1.1.1 Ağır metaller

Ağır metal terimi genel olarak kirletici ve yüksek oranda toksikolojik veya ekotoksikolojik potansiyele sahip metalleri ve yarı metalleri (metaloit) içine alan bir grup metal için kullanılmaktadır.

Gerçekte ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 'den daha büyük olan metaller için kullanılır. Bu grupta yer alan kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, cıva ve çinko başta olmak üzere altmıştan fazla metal doğaları gereği, yerkürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde kararlı bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar (Kahvecioğlu 2004).

Doğru (2007) tarafından belirtilen literatürdeki ağır metal tanımları incelendiği zaman yoğunluk, atom ağırlığı, atom numarası ve diğer kimyasal özelliklerine göre çeşitli ağır metal tanımları bulunmaktadır. Yoğunluğa göre yapılan tanımlarda; en düşük $3,5 \text{ g/cm}^3$ den başlamak üzere 7 g/cm^3 ve üzeri yoğunluğa sahip elementlerin ağır metal olduğunu belirten pek çok farklı tanım bulunmaktadır. Atom ağırlığına göre yapılan tanımlarda ise; “atom ağırlığı sodyumdan büyük olanlar” veya “atom ağırlığı 40'dan büyük olan metaller ağır metaldir” şeklinde tanımlar bulunmaktadır. Eğer atom ağırlığı sodyumdan fazla olan metaller ağır metal olarak kabul edilirse, ağır metaller magnezyum elementinden itibaren başlamakta, atom ağırlığı 40'dan fazla olan elementler ağır metal olarak kabul edilirse, ağır metaller skandiyum elementinden itibaren başlamaktadır. Atom numarasına göre yapılan tanımlarda ise; “atom numarası kalsiyumdan fazla olan metaller”, “atom numarası 20 den fazla olan metaller” ve “atom numarası 21 (skandiyum) ila 92 (uranyum) arasında olan metaller ağır metal olarak kabul edilmektedir” şeklinde tanımlar bulunmaktadır. Ağır metallerin skandiyumdan itibaren

başladığını belirten tanımlar kabul edildiğinde ise, bu durumda yoğunluğu 3 g/cm^3 'ün altında olan elementler de ağır metal kategorisine girmektedir. (Duffus 2002)

Normal koşullarda ağır metallerin doğadaki oranı düşüktür. Doğal ortamdaki konsantrasyon oranı arttığında, gümüş, civa bakır, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metaller özellikle organizmalar üzerinde toksik etki yapmakta ve enzimleri inhibe etmektedir. Canlılardaki bazı enzimatik aktiviteler için bazı metaller belli konsantrasyonlarda olmak şartı ile gereklidir (Balkıs ve Algan 2005). Canlıların yaşamsal aktiviteleri için katalizör görevi yaparlar. Bazı ağır metaller biyolojik sistemler için alınması gereken temel besin unsurları olmasına karşın gereğinden fazla alındıklarında ya da uzun süre ağır metalle kirlenmiş ortamda kalındığında zehirleyici hatta öldürücü etki yapmaktadır (Morton 1976; Tunçer 1980-82).

Metaller doğal sularda serbest iyonlar, inorganik veya organik bileşikler ve partikül maddelere absorbe edilmiş şekillerde bulunmaktadır. Sedimente çökmüş olsalar dahi, bazı fiziksel ve kimyasal olaylarla tekrar iyonik forma dönüşür ve toksik etkilerini gösterebilirler (Çetingül ve Aysel 1998).

Suda bulunan ağır metaller balıklarda beslenme ve absorpsiyon yolu ile birikebilmektedir. Bu birikim oranı ise balığın yaşına, bulunduğu yere ve beslenme durumuna göre değişir (Şeker vd. 1999). Canlı organizmaların vücutlarında biriken bu ağır metaller besin zinciri yoluyla organizmadan organizmaya giderek artan miktarlarda geçmektedir. Ortamdan hiçbir şekilde yok olmayan ağır metaller burada yaşayan su ürünlerinin tüketilmesiyle insana kadar ulaşmakta ve bazen insan sağlığını tehdit edebilmektedir (Şeker vd. 1999). Özellikle iç organlarda birikerek sindirim ve sinir hastalıkları başta olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Morton 1976; Tunçer 1980-82).

Metallerin birçoğunun karsinojenik potansiyeli de vardır. Metal karsinogenezisinin endojen reaktif oksijen çeşitlerinden oluştuğunu ve çeşitli karsinojenik metal bileşiklerinin hidrojen peroksit varlığında oksidatif DNA hasarına sebep olduğu

bulunmuştur. Metaller sadece karsinojen olarak değil, aynı zamanda ko-karsinojen olarak da etki etmektedir. 1970'lerde araştırmacılar biyolojik elementlerle toksik metallerin benzer kimyasal ve fiziksel özellikleri olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bundan sonra gittikçe artan şekilde bu maddelerin karşılıklı etkileri çalışılmaya başlanmıştır. Karşılıklı etkiler çinko, bakır, demir, selenyum, kalsiyum ile toksik elementler arasındadır (Güven 1999).

Kanserojen olarak etki gösteren birçok bileşiğin DNA'ya zarar verdiği bilinmektedir. Zarar gören DNA'ya sahip hücreler bölündüğü zaman mutant hücreler üretir. Bazı kimyasal maddeler DNA alt birimlerine bağlanarak özel bileşikler (adduct) oluşturabilirler. Bu oluşan bileşikler DNA onarım mekanizmaları sayesinde uzaklaştırılabilirler. Fakat bazen bu bileşikler kalıcı bir şekilde bağlanabilir ve hücre bölündüğü zaman yanlış translyona uğrayarak mutant hücrelerin oluşumuna yol açabilir. İnsanlarda metal bileşiklerinin karsinojenik riski Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından değerlendirilmiştir. Somatik hücrelerdeki mutasyonlar ile kansere sebep olan olaylar arasındaki ilişki uzun süreden beri bilinmektedir. Kanserojen maddelerin birçoğunun mutajen, mutajen maddelerin birçoğu da karsinojen olduğu saptanmıştır (Ames *et al.* 1975; Güven 1999).

1.1.2 Demir toksisitesi

Demir 26 atom numarası ve 55,85 atom ağırlığına sahip olan nikel ve kobaltla birlikte geçiş elementlerinin ilk yatay üçlü grubunun bir parçasını oluşturan periyodik tablodaki 26. elementtir. Biyolojik çevrede Fe^{2+} ve Fe^{3+} değerlikli iyon durumlarının yaygın olmasının yanında +6 değerlikli maksimum oksidasyon durumuna da sahiptir. Doğal demir atomu 3d orbitalinde 4 tek elektron ve 4s orbitalinde 2 çift elektrona sahiptir. 4s elektronlarını çıkarmak +2 değerlik, 3d orbitalindeki elektronları tamamlamak +3 değerlik kazandırır (Sienko and Salman 1976).

Demir vücut sıvılarında daima iki oksidasyon durumu olan ferrik (Fe^{3+}) veya ferröz (Fe^{2+}) şekilde bulunur. Demirin bu elektron değişimi, redoks aktivitesi, bir yandan

olumluyken öte yandan demir fazlalığı durumlarında oluşan serbest demir, prooksidan olarak serbest oksijen radikallerinin yapılmasına yol açar. Antioksidanlar tarafından yeteri kadar detoksifiye edilemeyen serbest oksijen radikalleri ileri derecede zararlı ve toksiktir. Bu nedenle demir serbest bırakılmamaya çalışılır. Transferrinle taşınır, ferritinde depolanır ve böylece organizmada demir konsantrasyonu çok sıkı bir denetim altında tutulmaya çalışılır. Fazlası toksik olan bu elementin vücuttaki miktarının devamlılığı intestinal emilimin ile düzenlenir. Et yemekle alınan (hemoglobin ve miyoglobinden kaynaklanan) hem demiri ve et dışı kaynaklardan alınan inorganik demirin emilim yolları birbirinden oldukça farklıdır. Hem, duodenal enterosite hem taşıyıcı protein 1 denilen özel bir taşıyıcı ile girer. Mukozal hücre içinde hemin proporfirin halkası hem oksijenaz enzimi aracılığıyla açılır, demir açığa çıktıktan sonra birleşerek inorganik demirle aynı şekilde devam eder. İnorganik demirin emilimi çok kompleks ve moleküler olarak çok sıkı kontrol gerektiren bir sistem içinde düzenlenmektedir. Hem dışı demirin çoğu ferrik (Fe^{3+}) demir şeklinde olup, solubilitesi ve lümeden duodenal villüsta enterosite alımı için lümen içi pH'yı düşüren mide asiditesine gereksinimi vardır. Emilimde ilk basamak bu ferrik demirin membrana bağlı bir redüktaz olan, ferriredüktaz olarak fonksiyon gören ve askorbat bağımlı duodenal sitokrom b (DCYTB) tarafından ferröz (Fe^{2+}) şekle redükte edilmesidir. Fe^{2+} olgun enterositin lümeneye bakan yüzeyinde bulunan divalent metal transporter 1 (DMT1) ile luminal yüzeyden enterosit içine alınır. DMT1 nonhem demir alımını sağlayan en önemli proteindir. Enterosite alınan demirin bir kısmı ferritin şeklinde depolanır ve duodenal eksfoliasyon ile atılır. Organizmada demir ihtiyacı varsa, emilimden sonra enterositin bazolateral tarafına taşınır ve oradan insanda bilinen tek demir atıcısı olan ferroportin ile plazmadaki transferrine yüklenir. Fakat önce seruloplazmin homologu ve bir transmembran proteinini olan hefaestin ile Fe^{2+} , Fe^{3+} haline okside edilmelidir. Ferroportin ile enterosit dışına alınan ve hefaestin ile okside edilerek Fe^{3+} forma dönüştürülen demir, transferrine yüklendikten sonra ağırlıklı olarak eritrosit öncülleri olmak üzere hücrelere taşınır. Her transferrin molekülü iki tane ferrik demiri güçlü bir şekilde bağlar (Tüzün ve Yakut 2009).

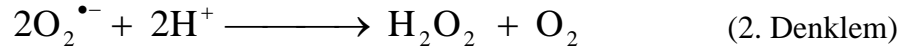
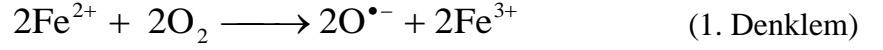
Demir insan vücudu için esansiyel bir elementtir ama oksijen radikal oluşumuna neden olabilme potansiyeli nedeniyle aynı zamanda toksik olma özelliği de taşır. Normal demir metabolizmasının bozulması beyin dokusunu oksidatif stres hasarına açık hale getirir.

Demansların (bunama) çok büyük bir kısmından sorumlu olan alzaymır hastalığı ve diğer tip demanslarla, parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde suçlanan mekanizmalardan birisi de bölgesel demir birikimi, bunun sonucunda oluşan nörotoksisite ve nöronal hasardır. Demirin bölgesel birikiminin hastalıkların saptanması, tanısı, evrelemesi ve şelasyon ajanları ile potansiyel terapötik girişim için bir biyomarkır olabileceği düşünülmektedir (Fischer 1997; Collingwood 2006, 2008).

Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzları arasında çözülebilirlik yönünden dikkate değer bir fark vardır. Fe^{2+} tuzları pH 7'de 10^{-1} M çözülebilirliğe ulaşırken Fe^{3+} tuzları 10^{-17} M maksimum çözülebilirliğe ulaşmaktadır (Spiro and Salman 1975). Fe^{2+} indirgeyici biyolojik sıvılarda yaygındır. O_2 tarafından oksitlenmesinden dolayı demir sürekli Fe^{2+} ve Fe^{3+} durumlar arasında dönüş yapar. Hem Fe^{2+} hem de Fe^{3+} bir hayli ligand çeşitliliğine sahip bileşiklerle bağlantı kurar. Demir bileşikleri yüksek pozitiflikten negatif değerlere kadar çeşitli indirgenme potansiyelleri gösterir (Nunez *et al.* 2012). Bu özellik demirin katalize olduğu elektron transfer sistemi ve demirin indirgenme potansiyeli arasında etkileşime izin verir. Hücrenin içindeki demirin indirgenme potansiyelinin 0 V civarında olduğu tahmin edilmektedir (Wood 1988).

Demir Fe^{2+} ve Fe^{3+} formları arasında değişebildiği için elektron değişim reaksiyonları için uygun bir elementtir. Doğada yaygın olarak kullanılır. Demire 6 veya daha fazla ligantın sıkı bağlanmaması halinde elektron değişim reaksiyonlarını meydana getirir (Graf *et al.* 1984). Demir toksisitesi oksijen varlığında ve indirgeyici hücre içi ortamı ile birleşen bu elektron değişim kapasitesinin ürünüdür. Fe^{2+} süperoksit dismütaz ile katalizlenerek süperoksit radikallerini meydana getirmek için oksijen ile reaksiyona girebilir (1. Denklem). Oluşan süperoksit radikali protonlanarak Hidrojen peroksit

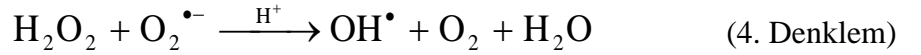
(H₂O₂) ve oksijen (O₂) oluşabilir (2. Denklem). Fe²⁺ hem de yüksek reaktiviteye sahip hidroksi radikali oluşturmak için hidrojen peroksit ile reaksiyona girer (3. Denklem). Bir hidroksi radikali üretmek için H₂O₂ ile Fe²⁺ reaksiyonu Fenton Reaksiyonu olarak adlandırılır (Nunez *et al.* 2012).



Fenton reaksiyonları:



Haber-Weiss reaksiyonu:



Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup hücre zarında lipit peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir (Tuba 2006).



Hücre içi ortam gibi O₂ içeren ve indirgeyici çevrede demir GSH ve O₂ nin tüketiminde hidroksil radikalini oluşturur. Denklem 5'e göre demirin konsantrasyonunu artırdıkça oluşan hidroksi radikali (OH⁻) daha da artacağı bekleniyor (Zecca *et al.* 2004).

Dopaminerjik hücrelerde, dopamin non-enzimatik oksidasyonundan türeyen serbest radikallerin diğerkaynakları redoks aktifleyici demir tarafından yürütülür (Zoccarato *et al.* 2005).

1.2 Alzaymır Hastalığı (AH)

Bir hücredeki bütün kalite kontrol mekanizmaları bozulduğu zaman hücrede büyük protein topakları birikmeye başlar. Bu topaklardan bazıları hücre için kritik olan makromolekülleri soğurarak hücreye zarar verebilir ve sonunda da hücrenin ölümüne neden olur. Ölmüş olan hücreden salıverilen protein topakları bu dokuda bulunan hücreleri çevreleyen hücre matrisinde birikme eğilimi gösterir ve aşırı durumlarda dokuya da zarar verebilir. Beyin, oldukça iyi organize olmuş sinir hücrelerinden meydana geldiği için özellikle kolayca zarar görebilir yapıdadır. Bundan dolayı protein topaklarının öncelikle nörodejenerasyona uğraması şaşırtıcı değildir. Günümüzde 20 milyondan fazla insanda görülen yaşa bağlı bunamaya neden olan AH bu bozukluklar arasındadır (Albert 2008).

AH ilk kez 20. yüzyılın başlarında Alman bilim adamı ve psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından ilerleyici zihinsel işlev bozukluğu ve davranış değişikliği olan Auguste D. isimli hastanın hastanede son 5 yılının izlenmesi ve ölümünün ardından da beyin dokusunun mikroskopik incelenmesi ile ortaya konmuş nörodejeneratif bir rahatsızlıktır (Bick 2001; Selkoe 2001).

65 yaş altında görülen erken bunamada meydana gelen nadir bir bunama olduğuna inanılan AH esasen alzaymır tipinin bunamasından ayırdedilememektedir. Alzheimer'in Auguste isimli hastası bugünlerde çoğu hastada hâlâ gözlemlenen rahatsızlığın birçok başlıca özelliklerini örneklemiştir. Bunlar: İlerleyici hafıza kaybı, bozulmuş bilinç fonksiyonları, paranoya, halüsinasyonlar ve asosyalliği içeren çeşitli davranışlar ve dil fonksiyonlarında aşırı bir gerilemedir.

Alzheimer'in başlıca tanımlamalarından sonra onlarca yıldır AH patogenezindeki bulgularda çok az ilerleme meydana geldiği vurgulanmaktadır. Bu durum Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Robert Terry ve İngiltere'deki Michael Kidd'in elektron mikroskopunu keşfiyle 1960'larda değişmeye başlamıştır. Böylece alzaymır'e bağlanan

iki klasik lezyonun altında yatan göze çarpan ileri derecede yapısal değişiklikler tarif edilmiştir: Senil (nörotik) plaklar (SP) ve Nörofibriler yumaklar (NFY) (Selkoe 2001).

AH'de histopatolojik olarak Senil AP ve NFY'nin yanında sinaps-nöron kaybı ve beyinde belirgin bir atrofi de saptanmıştır (Katzman 1991). Senil plakların oluşumu hastalığın en önemli histopatolojik belirtisi olarak öngörülmekte ve özellikle amigdala, hipokampus ve neokortekste görülmektedir (Khachaturian 1985). AH tanısı için SP ve NFY saptanması gereklidir ancak yeterli değildir. Çünkü bunların başka nörodejeneratif rahatsızlıklarda da görülme ihtimali vardır (Gürvit 2004). Normal bir insanda 60lı yaşlardan itibaren neokortekste SP ve limbik sistemde NFY lezyonları oluşmaya başlar (Braak 1991). Ancak daha önceki yaşlarda da bu lezyonların birikimi olduğu gözlenmiştir.

AH başladığı yaşa göre iki tip olarak tanımlanmıştır; 65 yaş öncesi başlayan AH'a erken başlangıçlı AH, 65 yaş sonrası gelişen AH'a geç başlangıçlı AH denilmektedir (Finckh 2003). Hastalığın 60'lı yaşlardan önce başlamasına yol açan sebep hastalığın genetik geçişli olmasıdır (Rocca 1991). Bunun yanında geç başlangıçlı hastalarda genetiğin rol oynayıp oynamadığı tartışmalıdır. AH'nin etiolojisinde genetik faktörlerin rol aldığını gösteren en çarpıcı bulgu otozomal dominant geçişin mevcut olduğunu gösteren bireylerin saptanmasıyla ortaya konmuştur (Nee 1983). Zamanımıza kadar AH'nin genetik etiolojisinde rol aldığı düşünülen 21. kromozom üzerindeki amiloid prokürsör proteini (APP), 14. kromozom üzerindeki presenilin 1 (PS1) geni, 1. kromozom üzerindeki presenilin 2 (PS2) geni ve 19. kromozom üzerindeki APO E olmak üzere dört lokusu tanımlanmıştır (Glennner and Wong 1984).

1.2.1. Nörofibriler yumaklar (NFY)

NFY proteinli materyallerin anormal birikiminin bir sonucudur. NFY gitgide intrasellüler boşlukları doldurarak nöronların içinde gelişir. Bu birikimlerin etkilenen nöronları öldürdüğüne inanılır (Yates and McLoughlin 2008).

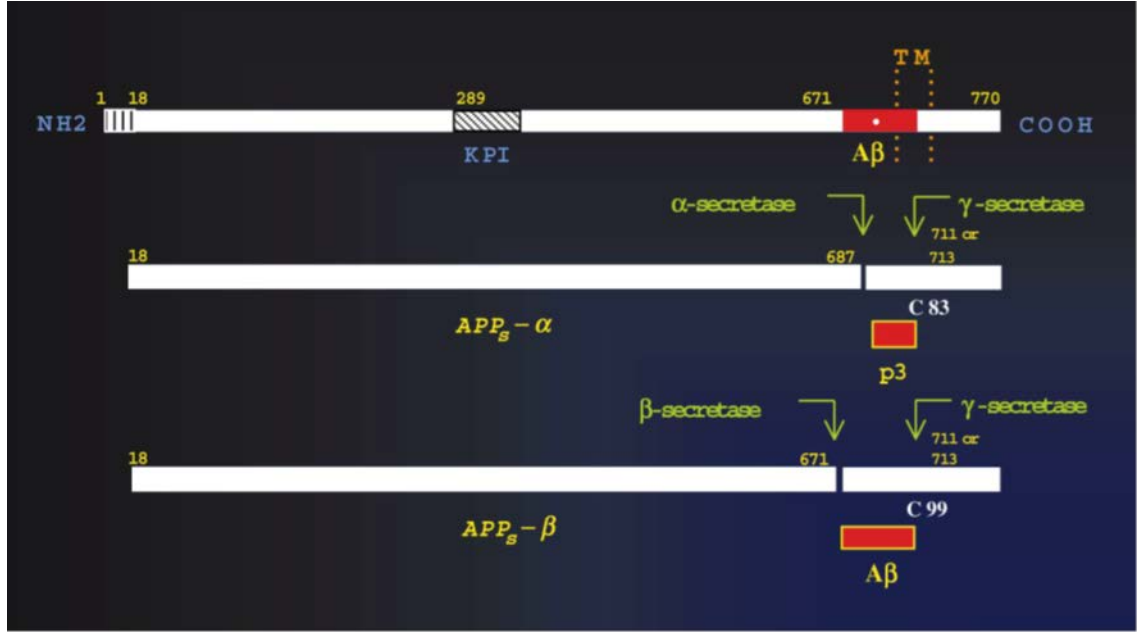
NFY'nin ana bileşeni mikrotübül ilişkili tau proteindir (Ballatore vd. 2007). Normal koşullar altında 17. kromozomdan kodlanan tau nöronal hücre iskeletinin kilit bileşeni olan mikrotübüllere bağlanır ve mikrotübüllerin stabilizasyonunda, hücre iskeletinin bütünlüğünün korunmasında ve aksonal transportta önemli rol oynar (Selkoe 1991; Mesulam 2000). Ancak AH'de tau mikrotübüllerden bağımsızlaşır. Özellikle bu patoloji NFY oluşumunu başlatmak için çok önemli olabilen her bir tau molekülünün normal olmayan fosforillenmesiyle ilişkilidir. Mikrotübüllerin destabilizasyonu ile birleştirilen NFY'lerin mevcudiyeti hücre ölümü meydana gelmeden önce nöronal fonksiyonu ciddi bir şekilde azalttığı muhtemeldir (Yates and McLoughlin 2008).

Ailesel AH'deki mutasyonlarda tau proteininin aksine amiloid β üretimi artmıştır hatta AH'ye benzemeyen bazı nörodejeneratif rahatsızlıklarda da tau birikimi bulunmuştur (Goedert and Spillantini 2006).

1.2.2. Amiloid plaklar (AP)

Amiloid özellikle düzenli bir β konfigürasyonunu benimseyen proteinler veya peptitlerin anormal kümelenmesi için kullanılan kapsamlı bir terimdir.

21. kromozom üzerindeki Amiloid β (A4) prokürsör protein (APP) geninde meydana gelen mutasyon anormal amiloid öncü protein (APP) oluşmasına neden olur. APP normal beyin fonksiyonları için önemli bir proteindir. APP β ve γ sekretaz enzimleri tarafından kesilerek β -amiloid peptid haline gelir. β -amiloid peptid, AH'ye neden olan anahtar madde olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.1) (Drouet 2000).

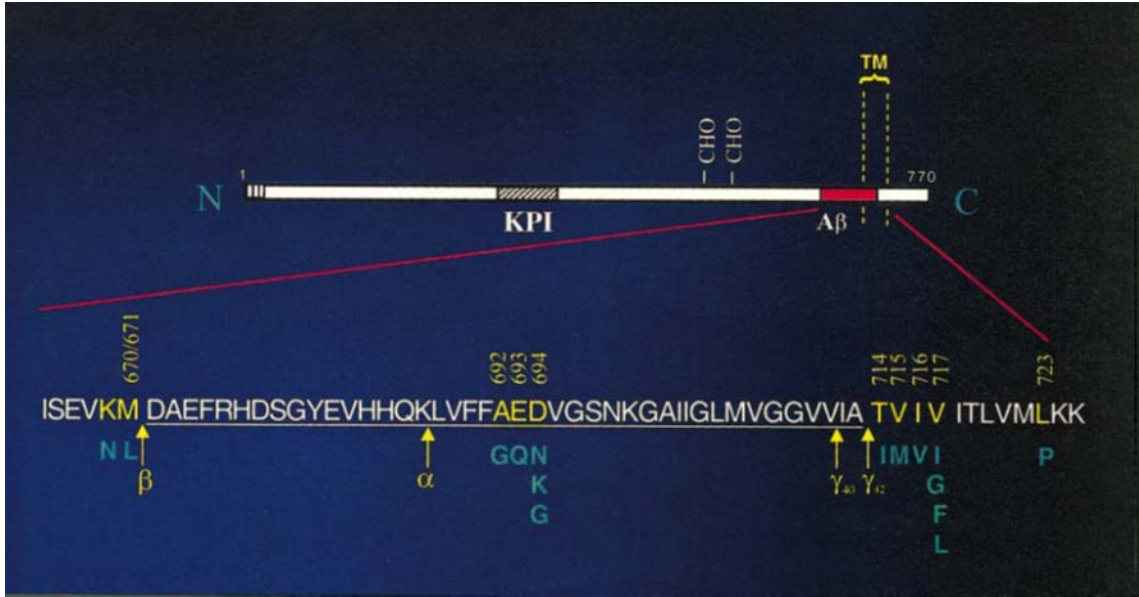


Şekil 1.1. 770 aa'lik APP'nin alternatif splayz formları (Selkoe 2001)

Amyloid β (A β) precursor protein (APP) geni amiloid öncü protein üretimi için bilgi sağlayan gendir. Bu protein vücutta birçok dokuda üretilir. Fonksiyonunun tam olarak bilinmemesine karşın hücre yüzeyindeki diğer proteinlere bağlanarak hücrelerin birbirlerine tutunmalarına yardımcı olurlar. Kirkitadze ve Kowalska, amiloid öncü proteinlerinin (APP) gama sekretaz enzimi ile kesilerek farklı fragment büyüklüklerine sahip β amiloid peptidlerine parçalandığını belirtmişlerdir. APP geninde meydana gelen mutasyonlar neticesinde oluşan aşırı β amiloid birikimi özellikle beyinde sitotoksisite ve nöral hücre ölümü olmakta, bu da alzaymır gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açmaktadır (Kirkitadze ve Kowalska 2005). Bu APP hücrelerde iki büyük yolla metabolize edilir. Çoğu hücrede en seçkin yol N ucundan kesilmiş A β peptidi üreten α -sekretazın A β sekansını kestiği esas yoldur (Esch 1990). Nöronlar amiloidojenik yol süresince APP'nin metabolize edilmesine yaradılıştan bir meyli vardır (Simons 1996). β ve γ sekretazlar tarafından sırayla kesilerek tam boy A β peptidleri salınır. β sekretaz yüksek spesifikte bir kesim sergilerken γ sekretaz düşük spesifikte bir kesim sergiler ve 40 aa.'lik ve 42 aa.'lik peptit izoformuna neden olur (Klaffki 1996). Bugüne kadar belirlenen 8 AH ilişkili APP mutasyonlarının tamamı sekretaz kesim bölgelerinin yakınında yerleştiği ve A β_{42} 'nin artmasına neden olan APP süreci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İn Vitroda bu A β_{42} peptidinin hızlı bir şekilde fibriller içerisine biriktiği

gösterilmiştir (Jarett 1993). A β ve özellikle A β_{42} 'nin AH patogenezinde esas rol oynadığı belirlenmiştir.

APP mutasyonları nadirdir ve alzaymır hastalarının %0.1'inden daha azında görülmektedir. Bu mutasyonların, yerleşim yerine göre, artmış β -sekretaz aktivitesi ile A β oluşumunu artırarak, protofibril oluşumuna daha yatkın A β oluşumuna neden olarak, ya da daha amiloidojenik A β formunun (A β_{42}) oranını artırarak AH'ye neden oldukları gösterilmiştir (Şekil 2) (Bettens vd. 2010).



Şekil 1.2. β ve γ sekretazlar tarafından kesilen APP ve β -amiloid oluşumu (altı çizili kısım) (Selkoe 2001)

APP çeşitli dokularda eksprese edilir (Tanzi 1988). APP ekspresyonu büyüme hormonları ve sitokinler tarafından ve stres koşulları gibi çeşitli ajanlar tarafından başlatılabilir (Yoshikai 1990).

1.3. Şizofreni Hastalığı

İnsan davranış bozuklukları içerisinde önemli hastalıklardan olan şizofreni ve manik depresif hastalık gibi hastalıklar geniş bir araştırma konusu olmuştur. İkizler, normal ve evlatlık olan kişilerle yapılan çalışmalar, manik depresyonun genetik bir bileşene sahip olduğu fikrini desteklemektedir. Haritalama çalışmaları orijinal olarak manik depresyonla ilgili lokusların 11. kromozom ve X kromozomu üzerinde bulunduğu işaret etmiştir. Fakat daha sonra bu çalışmalar çürütülmüştür. Amerika Birleşik Devletleri popülasyonunun yaklaşık %1'ini etkileyen bu hastalıktan sorumlu lokusların bulunması için yapılan çalışmalarda, pekçok laboratuvar manik depresyon gösteren ailelerin büyük soyağaçlarını taramak için RFLP belirleyicileri (marker) kullanmaktadır.

Şizofreni içe kapanıklık, toplumdən kaçma, acayip davranışlar ve bazen de hayal görme ile karakterize edilen zihinsel bir bozukluktur (Klug 2003). Patofizyolojisi ve etiyojisi çok az bilinen kompleks ve ciddi bir beyin rahatsızlığıdır. Son 20 yıldan daha fazla süredir şizofreni hastalığı ile ilgili açıklayıcı bir teori geliştiriliyor. O açıklamaların en basit şekli, şizofreninin klinik semptomların başlangıcından uzun bir süre önce başlayan nörogelişimsel süreçlerdeki bir anormalliğin davranışsal sonucu olduğu ve çevre ve genetik faktörler tarafından neden olduğudur (Cardno 1999; Singh 2004).

Bunun yanında genetik faktörlerin de büyük rol oynadığı düşünülmektedir. Tek ve çift yumurta ikizlerinde şizofreniye uyum ya da yatkınlık özelliği bazı çalışmaların konusu olmuştur. Çalışmaların çoğunda, tek yumurta ikizlerin çift yumurta ikizlere göre şizofreni olma olasılığı daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar genetik yapının varlığını desteklemekle birlikte, şizofreninin genetik temelini tam olarak ortaya koyamamıştır. Şizofreni için tek monohibrit kalıtımı, dihibrit kalıtımı ve çoklu gen kontrolü fikirleri ileri sürülmüştür. Şizofreniden bir veya iki lokusun sorumlu olamayacağı anlaşılma ile birlikte poligenik bir kalıtımda olduğu gibi kontrolünün kesin sayılarla da ifade edilmesi mümkün değildir. Manik depresyon araştırmalarında kullanılan yöntemlerdeki gibi, bu davranış bozukluğunu kontrol eden lokusları içerdiği düşünülen genom bölgelerinin tanımlanması için de DNA belirleyicileri (marker) kullanılmaktadır (Klug 2003).

1.4 SNARE Proteinleri

1.4.1 Transmitter salınımı

Hücre uyarımı yoluyla hızlı egzositik olayların meydana geldiği yer nöronal aksonun presinaptik membranıdır (Südhof and Rothman 2009). Beynin öğrenme ve bellek gibi en karmaşık ve üst düzey fonksiyonlarının temelinde aksiyon potansiyelleri ile presinaptik sonlanmalardan transmitter salınması ve kimyasal ileti yer alır. Ökaryotik hücrelerde organeller arası ve organeller ile plazma membranı arasındaki füzyonda temel görev alan proteinler SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor activating protein receptor) proteinlerdir (Martens 2008). Vezikülde bulunan SNARE proteinlerine v-SNARE, plazma membranında bulunan SNARE proteinlerine t-SNARE proteinleri denir. Her SNARE proteininin yer aldığı hücre ve hücredeki lokalizasyonu farklı ve özgüdür (Duman and Forte 2003).

SNARE'ler 18-32 kDA ağırlığında membran proteinleridir (Bennet and Scheller 1993; Solner *et al.* 1993; Hanson 1997; Sutton 1998; Lonart and Südhof 2000). SNARE'ler vezikül ve plazma membranlarından stoplazma içine sarkar ve reseptör görevleri vardır ve en çok sinir hücrelerinde çalışılmışlardır (Bennett 1993; Feiro 1994; Hay 1997; Li 2003). SNARE kompleksi oluşumunun inhibisyonu nörotransmitter salınımını inhibe eder (Littleton *et al.* 1998; Chen *et al.* 2001). Veriler SNARE kompleks oluşumunun sinaptik vezikül membranı plazma membranının yakın çevresine getirdiğini göstermiştir (Bennett *et al.* 1992). v-SNARE ve t-SNARE"ler arasında yüksek afinite ve özgüllük SNARE kompleksinin oluşumunda büyük etkindir (Bennett 1993). Bu etkene yardımcı olan bir protein grubunda Rab proteinleridir (Rothman and Wieland 1996). Bu proteinler, vezikülün hedef membrana yanaşmasını ve yapışmasını sağlarlar (Weber *et al.* 1998; Mcnew *et al.* 1999; Mcnew *et al.* 2000).

Sinaptik iletim küçük membran veziküllerinin presinaptik uçtan nörotransmitterin salınımına aracılık ettiği sinaptik vezikül döngüsüdür. 3 fazdan oluşur: Vezikül doldurma, salma ve geri dönüşüm.

Nörotransmitterler veziküler nörotransmitter taşıyıcıları aracılığıyla veziküller içerisine yüklenir (filling). Veziküller plazma membranına yaklaşır (docking) ve yapışma fazına girer (priming). Daha sonra voltaj kanallarından kalsiyumun girişi sonrasında plazma membranıyla vezikülün birleşimi olur. Bu bileşenler nörotransmitter salınımı sürdürmek için geri dönüştürülmelidir.

Sinaptik vezikül siklusu; SNAREs, UNC-18, Rab3 ve Vakuolar H⁺ATPaz (V-ATPaz) ve sinapsin eksositoz özelliğini düzenleyen sinaptotagmin gibi proteinleri içeren membran trafiği için gerekli olan protein ailesinin üyeleri tarafından kontrol edilir (Weimer and Jorgensen 2003). Sinaptik veziküllerde bulunan SNARE proteini VAMP veya Synaptobrevin adını alır. Plazma membranında ise Sintaksin ve SNAP-25 olmak üzere iki SNARE protein bulunmaktadır. SNAP-25 tam orta noktasında bulunan sistein aminoasidi ile membrana tutunur (Varousse 2001; Sorensen 2005; Montecucco *et al.* 2005).

1.4.2. Sintaksin 4 (Stx4)

Membrane yapısındaki hızlı değişimler, beyin gelişimi ve öğrenme ile ilişkili plastisite boyunca sinapsları değiştirir (Shepherd and Huganir 2007; Newpher and Ehlers 2008). Aydınlatıcı elektrofizyolojiksel ve görüntüleme çalışmaları membran içi birikiminin ekzositozunun dakikalar içerisinde sinaptik aktiviteye çevrildiği bulunmuştur ve sinaptik plastisite için gereklidir (Liedo *et al.* 1998; Maletic-Savatic and Malinow 1998).

Membran bileşimine aracılık eden moleküller arasında başlıcaları onların hedef membranlarına hücre içi vezikülleri tutturarak ve membran birleşimini kontrol eden SNARE proteinleridir. Sintaksin, SNAP-23/25 ve Synaptobrevin/VAMP protein ailelerini içeren SNARE proteinleri ökaryotik hücrelerde membran bileşim olaylarının çeşitli oluşumları için gereklidir (John and Scheller 2006; Martens and McMahon 2008) ve presinaptik uçlardan nörotransmitter salınımında bir rol oynadığı bilinir.

Memeli hücrelerindeki Sintaksin (STX) ailesinin 15 üyesinin 4'ü (STX1-4) hücre yüzeyi üzerinde ekzositozun spesifik alanları için düşünülen hemen hemen 70 moleküllük küçük homotipik kümelerden oluşan plazma membranına lokalize olmuştur (Lang *et al.* 2001; Ohano- Imaizumi *et al.* 2004; Low *et al.* 2006; Sieber *et al.* 2006,2007).

Beyinde eksprese edilen bir postmembran SNARE proteini olan STX4'ün postsinaptik kısımlardan membran trafiğinin çoğuna aracılık ettiği bulunmuştur. STX4 endozomların postmembranla kaynaştığı dentritik bölgelere lokalize olur (Blanpied *et al.* 2002, Racz *et al.* 2004; Lu *et al.* 2007).

SNARE proteini STX4, postsinaptik membran lateral kısımlarında zengin olduğu immunogold elektromikroskobu tarafından görüntülenmiştir. Buradaki görevi AMPA reseptörü içeren veziküllerin dentritik spinlerin postsinaptik membranına birleşimini başlatmaktır (Matthew *et al.* 2010).

Son çalışmalar sinapsin iç ve dışındaki AMPA glutamat reseptörlerinin düzenlenen hareketinin aktiviteye bağımlı sinaptik plastisite boyunca meydana gelen sinaptik güçteki değişikliklere katkı sağlayan en önemli faktör olduğu sonucuna varılmıştır (Tyler *et al.* 2005).

1.4.3. Sinapsin 3 (Syn3)

Sinapsin 3 (Syn3) insan genom projesi üzerine ilk çalışmanın bir sonucu olarak 1998'de keşfedilmiştir (Hosaka and Südhof 1998; Kao *et al.* 1998). İnsan Syn3 geni Syn1 (X kromozonu üzerinde lokalize olan) ve Syn2 (3. Kromozom üzerinde lokalize olan)'den farklı olan 22. kromozom üzerine homolojik sekansı aracılığı ile belirlenmiştir. İnsan Syn3 geni 494 000 baz çiftine sahip ve genom içerisinde geniş bir alanı içerir (Kao *et al.* 1998). Bunun yanında SYN3 birçok proteinkinaz için istekli bir substrattır (Porton *et al.* 2004).

Yaklaşık 30 yıl önce bulunan nörona özel fosfoproteinlerin bir ailesidir (Johnson *et al.* 1972). Sinapsin I ve II'yi ayrı genler kodlar ilk tarif edilen sinapsinler ve onların transkriptleri her bir gen için 2 izoformdan meydana gelen (1a, 1b, 2a ve 2b) 3' ucunda splayz edilir (Südhof *et al.* 1989). Her iki sinapsinler de merkezi sinirlerin presinaptik sinir uçlarında yoğun bir şekilde toplanır ve sinaptik veziküllerin stoplazmik yüzeyleri ile ilişkilidir (De Camilli *et al.* 1983; Hutterer *et al.* 1983).

Sinapsinlerin akson büyümesi (Han *et al.* 1991; Ferreira *et al.* 1994, Chin *et al.* 1995), sinir ucu gelişimi (Han *et al.* 1991; Zhong *et al.* 1999), sinaps oluşumu (Chin *et al.* 1995; Takei *et al.* 1995; Valtorta *et al.* 1995; Ferreira *et al.* 1998) ve sinaps devamlılığı (Ferreira *et al.* 1995) nı içeren çeşitli özelliklerdeki sinirsel gelişim de bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Sinapsin gen ailesinin 3. üyesi Syn3 son zamanlarda tanımlanmıştır (Hosaka and Südhof 1998; Kao *et al.* 1998). Bu gen mRNA'nın 3' ucunun alternatif splayzından türetilen en az 2 proteini (3a, 3b) üretmektedir (Porton *et al.* 1999). Diğer sinapsinler gibi hücre içi parçaların da bu proteinin nörotransmitter salınımında bir rol ortaya koyan sinaptik vezikül parçalarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Kao *et al.* 1998).

Ancak son çalışmalar Syn3'ün bu gen için yeni bir fonksiyon gösteren hücre içi dağılımı şekli ve önemli ölçüde farklı bir gelişimsel ekspresyona sahip olduğunu göstermiştir. Başta Syn3 ekspresyonu zirvedeyken, sinaps oluştuğu zaman seviyeler hızlı bir şekilde azalmıştır (Ferreira *et al.* 2000).

Sinapsinler sekans homolojileri ve domain yapıları benzer olmasına rağmen Syn3, alternatif splayz yönünden eşsiz bir transkripsiyonel profile sahiptir (Porton *et al.* 1999). Ayrıca yapısal çalışmalar SYN3 için ayrı bir role işaret etmektedir. Örneğin sinapsinlerin C domainleri yapısal olarak ATP kullanan enzim ailesine homogenezdır (Esser *et al.* 1998). Bu gözlemlere uyan sinapsinlerin ATP kullanıcı enzimle de olabileceğini destekleyen düşük afinite ile ADP'ye, yüksek afinite ile ATP'ye bağlandığı gösterilmiştir (Hosaka 1998; Esser 1998; Hosaja 1998). SYN3'e ATP'nin

bağlanmasını inhibe eden kalsiyum, SYN1'e ATP'nin bağlanmasını aktive etmiştir. Fakat SYN2'ye ATP'nin bağlanması etki etmemiştir (Hosaka 1998).

Yetişkin beyinde Syn3 ekspresyonu, sinapsin I ya da II'nin ekspresyonundan çok daha düşük olduğu bulunmuştur (Kao *et al.* 1998). Sinapsin I ve II özellikle sinaptik bölgelerde lokalize edilirken SYN3'ün hücre içi lokalizasyonu akson başı ve hücre gövdesi gibi ekstrasinaptik bölgelerde artığı gözlenmiştir (Ferriera *et al.* 2000).

Sinaptik veziküllerin rezervinde hiçbir değişiklik yokken, SYN3 yönünden kusurlu olan postsinaptik nöronda önemli bir azalma gözlenmiştir (Feng *et al.* 2002). Bu bağlamda SYN3 nörotransmisyonun negatif düzenleyicisi olarak görev yaparken sinapsin I ve II pozitif düzenleyici olarak görev yapar (Porton *et al.* 2011).

SYN3 proteini hipokampal kısımların genç nöronal öncül hücrelerinde zengindir (Pierribone *et al.* 2002). Syn3 nakavt (knockout) farelerde Syn3 ve nörogenesis arasında doğrudan bir bağlantıyı destekleyen değişimler gözlenmiştir (Kao *et al.* 2008). Syn3 nakavt farelerde nöral atasal hücrelerin hayatta kalmasında %55 artış, çoğalmada ise %30'luk bir azalış gözlemlenmiştir.

1950'ler ve 60'larda psikofarmakolojinin icadından bu yana bazı spesifik nörotransmitterlerin çeşitli nöropsikiyatrik hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığının farkına varılmıştır. SYN3, dopamin salınımını da içermektedir. Antipsikotik ilaçlar dopamin D2 reseptörün seçici antagonistleridirler ve onların etkileri klinikal etkinliği ile ilişkilidir (Seemen *et al.* 1976). Sinaptik dopamini artıran ajanlar (yani kokain ve amfetaminler gibi dopamin taşıyıcılarının antagonistleri) ruh sağlığını kötüleştirir (Lieberman 1990). Bu gözlemler şizofreninin dopamin hipotezinin formülüne öncülük eder (Canlsson 1988). SYN3'ün dopamin salınımında da rol oynaması onun yanlış fonksiyonunun ruh sağlığında potansiyel bir rol oynamasıyla örtüşmektedir (Porton 2011).

SYN3 seviyeleri manik bozukluğu bulunan kişilerin ölüm sonrası hipokampusunda %75'e kadar ve şizofrenili kişilerde %50 den daha fazlasına kadar azalmıştır (Wavter 2002). SYN3 protein seviyeleri şizofrenili fertlerin prefrontal korteksinde önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir (Porton and Wetsel 2007). SYN3 presinaptik alanların yanında growth cone ve hücre gövdesinde bulunur.

1.4.4. Sinaptogirin 1 ve Sinaptogirin 4 (Syngr1 ve Syngr4)

Sinaptogirin 1 (Syngr1) geni sinaptik plastisitede rol oynayan bir integral membran proteinini kodlar. Bu gen birçok çalışma tarafından şizofreniye dahil olan bir bölge olan kromozom 22q13 üzerine yerleşmiştir (Takahashi *et al.* 2003; Coon *et al.* 1994; Vallada *et al.* 1995). Bu genin ekspresyonunun şizofreni hastalarında normal kişilere oranla azaldığı görülmüştür (Mirnics *et al.* 2000). Bu gen Hintli populasyonunda şizofreni ile ilişkili olduğu gösterilen kromozom 22q13 üzerinde 1 milyon bazlık CAG tekrarlı markır içerisinde bulunur (Saleem *et al.* 2001).

Syngr1 geni nörotransmitter salınımı ve sinaptik plastisitede önemli bir rol oynar (Janz *et al.* 1999). Syngr1, 3 alternatif transkripti ve 6 ekzonuyla 36 kb uzunluğundadır (Kedra *et al.* 1998). Syngr1 ve synaptophysin 1 (Syp1) nakavt farelerin hipokampusunda sinaptik plastisite ve long-term potansiyelinde azalma görülmüştür (Janz *et al.* 1999). Syp1 ve Syngr1 geni nakavt fareler uzun devre ve kısa devre (long term - short term) sinaptik plastisitede şiddetli bir azalma göstermiştir (Janz *et al.* 1999). Bu bulgular Syngr1'in şizofreni ve bipolar rahatsızlığının potansiyel aday geni olduğunu düşüncesine desteklemektedir (Verma *et al.* 2005).

Bu hastalık dünya çapında genel nüfusun hemen hemen %1 ini etkilemektedir. Bugün hâlâ şizofreninin potoloji ve etiyojisi açık değildir (Cardno *et al.* 1999).

SYNGR1 ve SYP1 dört transmembran bölgesi ve bir fosforillenmiş tirozin sitoplazmik kuyruktan oluşur (Johnston *et al.* 1989; Stenus *et al.* 1995; Janz and Südhof 1998). SYNGR1 ve SYP1 in vitro da c-src tirozin kinazın substratlarıdır (Janz and Südhof

1998). In vivo'da bu genler src benzeri bir endojen tirozin kinaz tarafından fosforillenir (Barnekow *et al.* 1990; Linstedt *et al.* 1992).

Tirozin fosforilasyonunun rolü sinaptik veziküllerde açık değildir. Tirozin fosforilasyonunun Hipokampal CA1 bölgesinde long- term potansiyel (LTP)'de görev aldığına dair birçok baskın görüş bulunmaktadır. Protein kinaz inhibitörlerinin uygulanması CA1 bölgesi ve dentate kıvrımlarında LTP'yi bloke etmiştir (O'dell *et al.* 1991; Abe and Saito 1993).

Sinaptogirin 4 (Syng4), 19q13.3 lokusunda haritalanmıştır. Genomik sekans analizi ile 19q kromozom üzerinde 1,6 Mb'lık bir glioma tümör supressor bölgesi içerisinde bulunmuştur. Bu genin 4 ekzon bölgesi belirlenmiştir ve SYNGR4 proteinini kodlar. Sinaptik vezikül proteini olan SYNGR4 proteini 234 aa içerir (Smith *et al.* 2000). Bu gen bölgesi ve proteini ile ilgili çalışma hemen hemen hiç mevcut olmadığından fonksiyonu kesin olarak bilinmemektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bernard Katz ve Ricardo Miledi sinir hücrelerinin presinaptik bölgesini uyararak, postsinaptik hücre bölgesinden sinaptik potansiyeli kaydetmişlerdir (Katz and Miledi 1971)

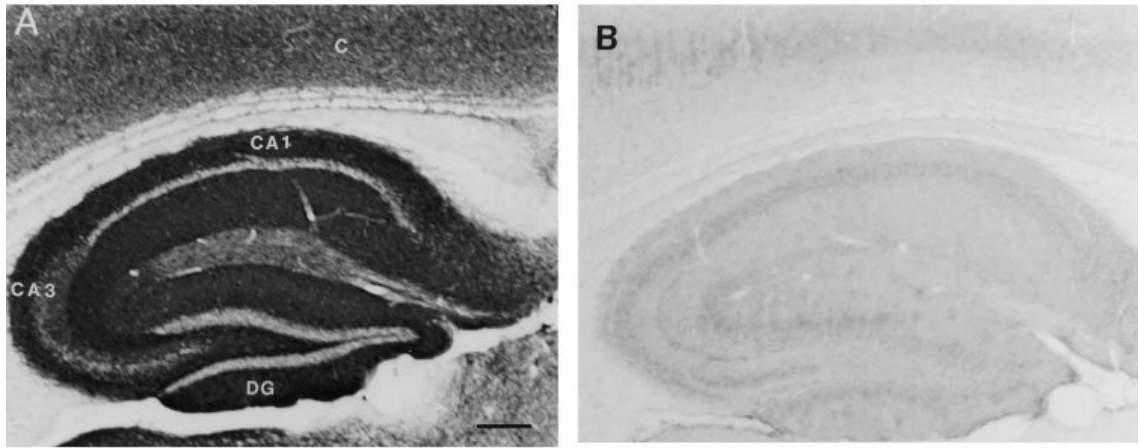
Matthew ve arkadaşları immunogold elektron mikroskobu ile dentritin lateral kısımlarında kümelenen STX4'ü çalışmış ve AMPA reseptör içeren veziküllerin dentritik spinlerin postsinaptik membranına birleşimini başlattığını göstermişlerdir. Spin ekzositozunun postsinaptik membran lateral kısımlarındaki SNARE proteini STX4'ün zengin olduğu kısımlarda meydana geldiğini ifade etmişlerdir (Matthew *et al.* 2010).

Vincent ve arkadaşları yetişkin fare beyinde SYN 3 proteininin anatomik dağılımını incelemişlerdir. SYN3 antikorlarıyla renklendirmiş yetişkin beyninin bir çok bölgesinde sinaptik uçları andıran tipik benekli uçlar görmüşlerdir. Sinapsin 3'ün yetişkin beyninin nörojenik bölgesinde yetişkin olmayan nöronların işlemleri ve hücre gövdesine lokalizasyonunu gözlemlemişlerdir. Bu bulgular sinapsin 3 için yeni bir fonksiyonu ortaya koymaktadır (Vincent *et al.* 2002).

Porton ve arkadaşları tarafından bütün Syn genlerinin her birinin homozigot delesyonuyla üretilen farenin oluşumunun sinapsinlerin fizyolojik faaliyetlerini kullandığı kesin mekanizmayı çözmede etkili bir araç olduğu kanıtlanmıştır (Porton *et al.* 2011).

Feng ve arkadaşları Syn3'ün, Syn1 ve Syn2'nin nörotransmitter salınımını düzenlemesinden daha açık olduğunu göstermişlerdir. Syn3'den yoksun bir farede sinaptik vezikül dönüşüm havuzunun büyüklüğünün arttığını ve sinaptik şiddetin azaldığını göstermişlerdir (Feng *et al.* 2002).

Janz *et al.* (1999) *Syng1* ve *Syp1* genleri nakavt yapılan farelerin morfolojik ve biyokimyasal analizleri geniş bir şekilde incelemiş, toplam sinaptik vezikül proteinlerinin %10'luk bir kaybına rağmen sinaps oluşumu ve yapısının değişmediğini destekleyen nakavt fareler ve doğal tip arasında önemli farklar bulamamışlardır. Aynı çalışmada çeşitli antikorlarla immunositokimya yöntemi ile doğal tip ve nakavtlı beyinler incelenmiş *Syng1* ve *Syp1* nakavtların beyin yapısının gelişimi ilgili değişimlere neden olduğunu gösteren hiçbir anormalliklere rastlanmamıştır. Örneğin hipokampal bölge doğal tip ile nakavt arasında ayırdedilememiştir (Şekil 2.1.) (Janz *et al.* 1999).



Şekil 2.1. Sinaptogirin 1 ve sinaptofisin 1 ikili nakavt fare (B) ve doğal tip (wild-type) (A) fareden hipokampusun immunohistokimyasal analizi (Janz *et al.* 1999).

Yine aynı çalışmada *Syng1* ve *Syp1* genlerinin herbiri ayrı ayrı nakavtlandığı farelerde hiçbir değişiklik gözlemlenmemiş ancak her ikisi birlikte nakavtlandığı farelerde Long-Term potansiyel (LTP) kontrol değerinden önemli derecede azalmıştır. Bu sonuçlar LTP'de *Syng1* ve *Syp1* genlerinin doğrudan ilişkisinin bir sonucudur (Janz *et al.* 1999).

Yao ve arkadaşları mutant APP transgenik farelerin mikroarray analizleri, bazı sinaptik vezikül trafiği ile ilgili genlerin transkript seviyeleri azalmasına rağmen yine bir

sinaptik vezikül proteini olan dinamin'deki değişmenin AH yapısını iletmediğini göstermişlerdir (Yao *et al.* 2003).

Yao ve arkadaşları sinaps kaybının alzaymır hastalığındaki bilinç kaybı ile ilişkili olduğundan, ancak sinaptik bozukluk ve kaybın altında yatan moleküler mekanizmanın iyi bilinemediğinden bahsetmiştir. Çalışmalarında beş alzaymır hastasından alınan beyin dokusunun mikroerrey analizinde sinaptik vezikül trafiğinde rol alan dinamin 1, dinamin 2, sintaksin 1A, sintaksin 5, sinapsin 1, sinapsin 2, AP180, AP3 μ 3A ve AP3 β 3B genlerinin ekspresyonlarında bir azalış olduğunu ortaya koymuşlar ve bunu da RT-PCR ile doğrulamışlardır. Bunun aksine vezikül trafiğinden başka fonksiyonlara sahip birçok sinaptik genlerinin ise değişmeden kaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca immunoblotlama ile dinamin protein seviyesinin azaldığını da göstermişlerdir (Yao *et al.* 2003).

Wu ve arkadaşları beyinde demir dengesinin daha iyi anlaşılması için intestinal demir taşıyıcı olarak farzedilen ferroportinin dağılımını karakterize etmişler ve merkezi sinir sisteminde demir dengesinin düzenlenmesinde potansiyel bir role sahip olduğunu göstermişlerdir. İn situ hibridizasyon ve immunohistokimya kullanarak, ferroportinin kan-beyin bariyerinin endotel hücrelerinde, nöronlardaki oligodendrositler, astrositler, gözün damar tabakası sinir ağında ve epidemiyal hücrelerde eksprese edildiğini keşfetmişlerdir. Ayrıca ferroportinin sinaptik vezikülle ilişkili olduğunu sinaptik vezikülün biyokimyasal saflaştırılması ve immunoelektron mikroskop teknolojisi kullanarak keşfetmişlerdir (Wu *et al.* 2004)

SYN3 nörotransmisyonun negatif düzenleyicisi olarak görev yapar (Porton *et al.* 2011). Sinaptik veziküllerin rezervinde hiçbir değişiklik yokken, SYN3 yönünden kusurlu olan postsinaptik nöronda sinaps iletiminde önemli bir azalma gözlenmiştir (Feng *et al.* 2002). Ferreira ve arkadaşları ise aksiyon potansiyelinin sinaptik bölgeye gelişile Syn3 ekspresyonunda hızlı bir azalma kaydetmiştir (Ferreira *et al.* 2000).

STX4'deki hem kronik hemde akut bozulma hipokampal sinapsta spin ekzositozunu inhibe ettiği ve LTP'yi bloke ettiği görülmüştür. İşte bu spinlerdeki ekzositik bölgelerde glutamat reseptörünü içeren geri dönüşümlü kargonun ekzositozunun sinaptik plastisite ve spinin membran birleşimini yöneten SNARE proteini STX4 tarafından gerçekleştirildiğini gösterir (Matthew *et al.* 2010).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Sıçanların temin edildiği yer

Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar Atatürk Üniversitesi (Erzurum, TÜRKİYE), Deneysel Tıbbi Uygulama ve Araştırma Merkezinde temin edilmiştir.

3.1.2. Çalışmanın yürütüldüğü yer

Çalışmalar, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1.3 Sıçanların bakımı

Sıçanlar kontrollü olarak $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, %40-60 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık bir odada barındırılmıştır. İstenildiği kadar besin ve su verilmiştir. Deneye başlamadan önce deiyonize su ile en az bir hafta alışma periyoduna bırakılmıştır. Sonraki haftalarda grupların konsantrasyonlarına göre sularına $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ karıştırılarak konsantrasyon ayarlanmıştır. Sıçanlar 100 gün boyunca günlük deiyonize edilmiş su ile metal karışımına maruz bırakılmıştır. İlk haftadan sonraki haftalarda her grup kendi beslenme konsantrasyonuna getirilene kadar suyun iyon konsantrasyonu düzenli olarak arttırılmıştır.

3.1.4 Sıçanların beslenmesi

Bu deneyde 5 sıçan grubu ve her bir grup için 3 adet sıçan kullanıldı. 1. grup kontrol grubudur ve bu gruba 12 hafta boyunca deiyonize su verilmiştir. 2. gruba ilk hafta deiyonize su, 2. hafta (WHO tarafından belirlenen maksimum olması gereken sınırlara

eşdeğer konsantrasyonlarda) 0,87 ppm demir iyonu konsantrasyonu uygulanmıştır. 3. grub ilk hafta deiyonize su, 2. hafta 0,87 ppm, 3. hafta ise 3 ppm konsantrasyonu muamele edilmiştir. 4. gruba 1. hafta deiyonize su, 2. hafta 0,87 ppm, 3. hafta 3 ppm, 4. hafta 30 ppm konsantrasyonla muamele edilmiştir. 5. gruba 1. hafta deiyonize su, 2. hafta 0,87 ppm, 3. hafta 3 ppm, 4. hafta 30 ppm, 5. hafta 300 ppm konsantrasyonla muamele edilmiştir (Çizelge 3.1). Hiçbir hayvan ölmemiş ve görülebilen toksik işaretlerin hiçbiri görülmemiştir.

Çizelge 3.1. Sıçan gruplarına verilen ppm cinsinden demir iyonunun konsantrasyonları ve beslenme süreleri

Hafta	ppm				
	Kontrol (3) 0	MPL (3) 0.87	1X (3) 3	10X (3) 30	100X (3) 300
0.	DIW	DIW	DIW	DIW	DIW
1.	DIW	MPL	MPL	MPL	MPL
2.	DIW	MPL	1X	1X	1X
3.	DIW	MPL	1X	10X	10X
4.	DIW	MPL	1X	10X	100X
5.	DIW	MPL	1X	10X	100X
6.	DIW	MPL	1X	10X	100X
7.	DIW	MPL	1X	10X	100X
8.	DIW	MPL	1X	10X	100X
9.	DIW	MPL	1X	10X	100X
10.	DIW	MPL	1X	10X	100X
11.	DIW	MPL	1X	10X	100X
12.	Kesim	MPL	1X	10X	100X
13.		Kesim	1X	10X	100X
14.			Kesim	10X	100X
15.				Kesim	100X
16.					Kesim

100 gün sonra sıçanlar anestezi yapılarak öldürüldü. Beynin kısımları hızlı bir şekilde çıkarıldı ve deney aşamaları niçin donduruldu.

3.1.5. Primerler ve problar

Gen materyali olarak RNA, primer olarak ise sinapsin 3, sintaksin 4, sinaptogirin 1 ve sinaptogirin 4 genlerine spesifik primerler kullanılmıştır. İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) *Rattus norvegicus*'a ait sinapsin 3, Sintaksin 4, sinaptogirin 1 ve sinaptogirin 4 genlerine ait sırasıyla NM_017109, NM_031125, NM_019166 ve NM_001025644 kod numaralı mRNA verileri ışığında baz dizilimleri değerlendirmeye alınmış ve yine internet ortamındaki başka bir primer dizayn programı (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/) kullanılarak genlere spesifik primerler ve problar oluşturulmuştur. Oluşturulan primerler ve probların ilgili bölgeye spesifiklikleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.2. Genlerin spesifik forward ve revers primerleri, taqman problemleri ve ürün uzunlukları

GEN ADI	SEKANS	ÜRÜN UZUNLUĞU
Sinapsin 3 forward	5'-AGACAGACAAGGCATCACTACATC-3'	115
Sinapsin 3 reverse	5'-AGCCCAAAGGCAAGCAAAAT-3'	
Sinapsin 3 taqman	5'- ^{FAM} - ACCATACGCTTGCTCCCTGCCG ^{-TAMRA} -3'	
Sintaksin 4 forward	5'-TGCCATCTGTGTTTCTGTAC-3'	114
Sintaksin 4 reverse	5'-AAATGCTGGGTCTCTGTTTCTC-3'	
Sintaksin 4 taqman	5'- ^{FAM} - TGGCTGTCATCATTGGCATCACC ^{-TAMRA} -3'	
Sinaptogirin 1 forward	5'-AGGACAACCCTCTGAACGAAG-3'	112
Sinaptogirin 1 reverse	5'-TGATACCGCTGGAAGGCTAG-3'	
Sinaptogirin 1 taqman	5'- ^{FAM} - TGCCATCGCCTTTTCGTTCTTCTC ^{-TAMRA} -3'	
Sinaptogirin 4 forward	5'-ACGGTCTTCACCCCATAG-3'	100
Sinaptogirin 4 reverse	5'-TTGATTCTCCCCTGAGTTGG-3'	
Sinaptogirin 4 taqman	5'- ^{FAM} - ACAGCAATGTAAGGGCTCAGTCAGGG ^{-TAMRA} -3'	
GAPDH forward	5'-TGGACCTCATGGCCTACATG-3'	144
GAPDH reverse	5'-AGGGAGATGCTCAGTGTTGG-3'	
GAPDH TaqMan	5'- ^{CY5} - ACCACCCAGCCCAGCAAGGA ^{-BHQ2} -3'	

3.1.6. Kullanılan kimyasal maddeler

3.1.6.a. RNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler

RNA izolasyonunda; trizol, kloroform, izopropil alkol, %70'lik etanol, DPEC (Diethyl pirokarbonat) kullanılmıştır. Küçük dokulardan RNA izolasyonunda ise GenElute Mammalian Total RNA MiniPrep Kit (Sigma) izolasyon kiti kullanılmıştır.

3.1.6.b. Elektroforezde kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

Elektroforezde; agaroz, etidyum bromür (10mg/ml), 1X TAE tamponu, 1X ve 20X MOPS (morpholinopropanesulphonic acid), formamid, DNA işaretleyici (50 bp-2.000 bp) ve 6X yükleme tamponu (BFB; Brom Fenol Blue) kullanılmıştır.

3.1.6.c. PCR'da kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

PCR uygulamalarında; Taq DNA polimeraz, 10 mM dNTP mix, 10X Buffer, 25 mM MgCl₂, forward ve reverse primerler, cDNA ve dH₂O (deiyonize su) kullanılmıştır.

3.1.6.d. cDNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler

0.1 M DTT (500 µL), 5x First Strand Buffer (1 mL), Oligo dT23 (0.1 mL), dNTP , 10x reaksiyon buffer, amplifikasyon grade DNase I (1 unit/µL), super script III RT (200 unit/µL), stop solüsyonu, dH₂O.

3.1.6.e. Kullanılan cihazlar ve kimyasal maddeler

Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları

Kullanılan Cihaz	Markası
U.V. Cihazı	Biogen Cientifica
Nanodrop Cihazı	Thermo
Mikrodalga Fırın	Beko
Santrifüj Cihazı	Hettich
-86°C Dondurucu	New Brunswick
Otoklav Cihazı	Hirayama
qPCR Cihazı	Rotor-Gene Q
PCR Cihazı	BioRad C1000 Termal Cyclers
Çeker Ocak	WCS Space
Ultratoraks Cihazı	Heidolph
Saf Su Cihazı	MPMınpure Dest Up
Elektroforez Cihazı	BioRad
Mikropipet	Ependorf
Elektronik Terazı	

Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve markaları

Kimyasal Madde	Markası
10X Reaksiyon Buffer	Sigma
Etanol	Riedel-de Haen
Trizol	Sigma
Kloroform	Sigma
İzopropil alkol	Sigma
DPEC	Sigma
Markır	Fermentas
Yükleme Tamponu	Fermentas
Taq Polimeraz	Sigma
RNase Zap	Sigma
Forward ve Reverse primerler ve Problar	Metabion
MgCl ₂	Sigma
10XBuffer	Sigma
dNTP	Fermantes
RNA Later	Sigma
Master Mix	Roche
Agaroz	Sigma
Etidyum Bromür	Sigma

3.2. Yöntem

3.2.1. Sıçanlardan doku örneklerinin alınması ve RNA izolasyonu

1. Her 4 ml trizol başına 500 mg doku örneği kullanılmış ve örnek trizol içinde homojenize edilmiştir.
2. Homojenizasyonun ardından 4°C'de 10 dk 11000 devirde santrifüj edilip supernatant alınmıştır. (3200 µl süpernatant alınmıştır.)
3. 800 µl kloroform eklenip tüplerin ağızları güvenli bir şekilde kapatılıp, 15 sn süreyle elle çok güçlü bir şekilde çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra örnekler 4°C'de 15 dk 11000 rpm de santrifüjlenerek supernatant alınmıştır.
5. Örnekler 2 ml izopropilalkol katılmış ve oda sıcaklığında 5-10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
6. Örnekler 11000 rpm'de 4°C de 15 dk santrifüj edilip üs faz tamamen uzaklaştırılmıştır.
7. Altta kalan kısma 4 ml %70 etanol ilave edilerek hafifçe vortekslenmiş ve 8000 rpm'de 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. (Bu aşama 2 defa tekrarlanmıştır.)
8. Etenol uzaklaştırılarak tüpler kurutma kağıdına ters çevrilip kurutulmuştur.
9. Örneğe 40 µl DEPC su ilave edilerek -80 °C'de stoklanmıştır.

3.2.2.RNA'nın agaroz jel elektroforezinde kontrolü

3.2.2.a Jelde yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı

1 µl izole ettiğimiz RNA'nın üzerine 3.5 µl ddH₂O, 0.5 µl 20xMOPS solüsyonu ve 5 µl formamid sırasıyla ilave edilerek 65°C'de 15 dk inkübe edilmiştir.

3.2.2.b Jelin hazırlanışı

1.88 ml 20xMOPS solüsyonuna 0.3 gr agaroz, 28.5 ml ddH₂O sırasıyla konulup kaynatılmıştır. 37 °C'ye kadar soğuyunca 6.68 µl formamid eklenmiştir. Hemen ardından 5.5 µl etidium bromür eklenip jel donmaya bırakılmıştır.

3.2.2.c Elektroforez işlemi

Yüklemeye hazır hale getirilen RNA örnekleri 6X yükleme boyasıyla karıştırılmıştır. Bu karışımdan alınan 7 µl jelde oluturulan kuyulara ayrı ayrı yüklenmiştir. Yükleme bittikten sonra 60 V'ta 30 dk elektrik akımı uygulanmış, daha sonra jel UV altında gözlemlenerek kalitatif analiz yapılmıştır.

3.2.3 cDNA kütüphanesinin oluşturulması

cDNA sentezi moleküler biyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan ters transkriptaz enzimi ile yapılmıştır. Saklanan ve miktar tayini yapılan mRNA örnekleri First Strand cDNA synthesis System for qPCR (Invitrogen) ile cDNA haline getirilmiştir.

Uygulama Őu Şekilde yapılmıştır;

1. Revers transkriptaz reaksiyon karışımı aşağıdaki iŐeriĐe gĐre toplamda 20 μ l olacak Şekilde hazırlanır;

4 μ l RNA ĐrneĐi (1 pg- 500 ng)

1 μ l oligodT primeri

1 μ l 10mM dNTP mix

7 μ l ddH₂O

2. Hazırlanan karışım vaktekslenip 65 $^{\circ}$ C'de 5 dakika inkĐbe edilmiştir.

3. 1. aŐamada hazırlanan karıŐıma,

4 μ l 5X RT tamponu

1 μ l 0.1 M DTT

1 μ l RNaseOUT (40 U/ μ l)

1 μ l SuperScript III RT (200 U/ μ l) eklenmiŐ ve 45 dakika 50 $^{\circ}$ C'de inkĐbe edilmiştir.

4. 70 $^{\circ}$ C'de 15 dakika bekletilerek reaksiyon durdurulmuŐtur.

5. Kısa bir santrifĐjle reaksiyon tĐpĐnĐn iÇi toplanmıŐ ve 1 μ l RNaseH eklenip 37 $^{\circ}$ C'de 20 dakika bekletilmiŐtir.

6. Nanodrop ile sentezlenen tek zincirli cDNA'nın kantifikasyonu yapıldıktan sonra klasik PCR kullanılarak sentezin doğruluğu kanıtlanmıştır.

7. Elde edilen cDNA daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.6. Multipleks kantitatif gen ekspresyonu (Real-Time PCR)

PCR, DNA veya cDNA üzerinde seçilen bir veya birden fazla bölgenin invitro şartlarda çoğaltılması yöntemidir. 1986 yılında Mullis ve arkadaşlarının (1993 yılında kimya alanında Nobel ödülü aldıkları) moleküler düzeydeki çalışmalara çığır açan bu buluşundan zaman sonra Gradientli PCR, Multipleks PCR, Nested PCR gibi farklı uygulamalara yönelik PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bunların en önemlilerinden biri, Higuchi ve arkadaşlarının 1993 yılında kinetik PCR analizi adını verdikleri çalışmalarında real time PCR'ı keşfetmeleridir (Ceyhun vd. 2011)

Real Time PCR adından da anlaşılacağı üzere PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan DNA veya cDNA'nın floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif tespitidir. PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan ürün miktarı floresan boyaların verdiği sinyal ile doğru orantılı olarak artmakta ve hangi döngüde hangi oranda artışın olduğu reaksiyon esnasında belirlenebilmektedir. Floresan boyaların verdiği bu sinyal normal klasik PCR'dan farklı olarak cihaz içerisinde bulunan filtrelerden belirli dalga boylarında gönderilen ışığın absorbe edilmesi ile tespit edilmektedir. Real time PCR'da klasik PCR'daki gibi ürünün çoğaltılıp çoğaltılmadığının jel elektroforezi gibi yöntemlerle belirlenmesine gerek olmadığından kontaminasyon riski de azdır. Reaksiyon esnasında ürün amplifikasyonu miktarsal olarak izlenebilir. Real time PCR'da çoğaltılan ürünün kantitatif miktarı hakkında bilgi edinilmesine rağmen ürün uzunluğu hakkında bir bilgi edinilemez (Ceyhun vd. 2011)

Demir iyonunun subletal dozlarına maruz bırakılmış sıçanlardan elde edilen dokularda kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla real time PCR analizi yapılmıştır. Bu maksatla farklı deneme gruplarından elde edilen doku örneklerinden izole edilmiş

olan cDNA'lar kullanılmıştır. Floresan işaretli TaqMan probu kullanılarak genlerin ekspresyon miktarları ölçülmüştür. Hem korteks hem de hipokampus dokuları üzerinde herbir kontrol ve uygulama grupları içindeki 3 sıçanın herbiri için 3 tekrarlı olacak şekilde mütipleks Real Time PCR yapılmıştır. Genlerin ekspresyon dereceleri Real time PCR'da ilgili gen bölgesinin çoğaltılması esnasındaki kantitatif olarak oluşan ürüne TaqMan probun bağlanması ve belirli dalga boyunda ışığa yaparak absorbans vermesi esasına dayanır. Böylece oluşan ürünün miktarı kantitatif olarak ölçülür.

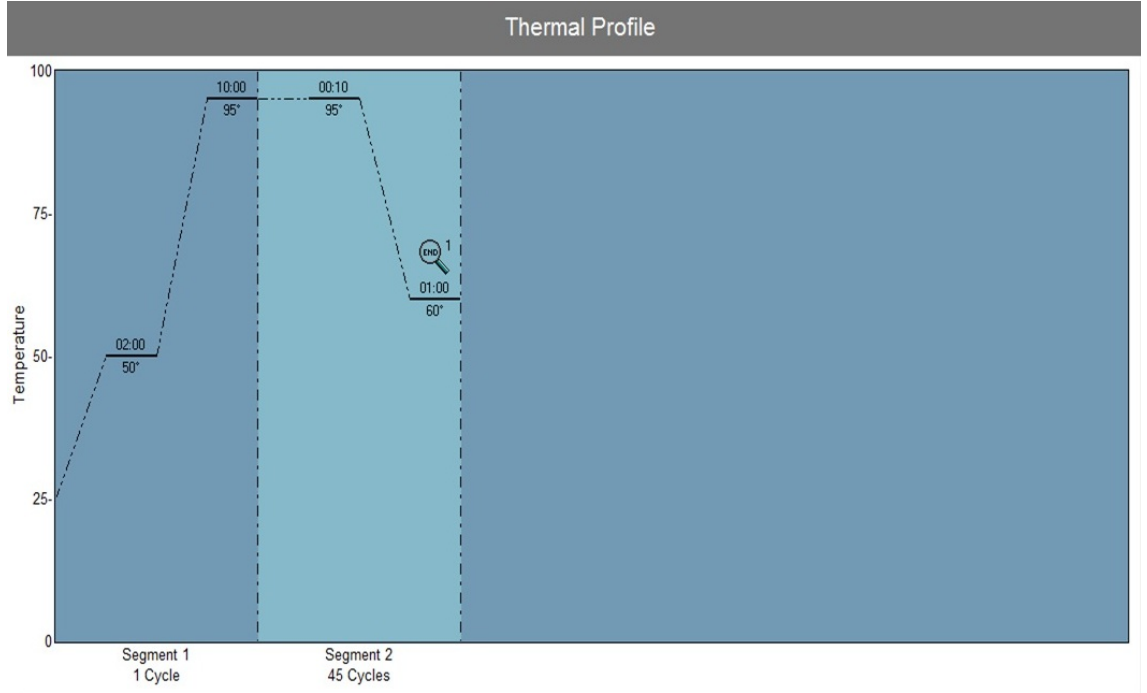
3.2.6.a. PCR protokolü

PCR yapmadan önce hedef bölgeye spesifik primerler ile probalar dizayn edilmiştir. Bu problemlerin uçlarına FAM ve TAMRA boya taktırılmıştır. Bu işlemlerin ardından aşağıdaki gibi bir PCR karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. Multipleks Real Time PCR karışımı (25 µl için)

Bileşenler	Final Konsantrasyonu	Miktar (µL)
TaqMan® Probe Master Mix	1X	12,5
Probe hedef gen	0,6 pmol	0,15
Probe GAPDH	0,6 pmol	0,15
Forward Primer hedef gen	0,2 pmol	0,25
Forward Primer GAPDH	0,2 pmol	0,25
Reverse Primer hedef gen	0,2 pmol	0,25
Reverse Primer GAPDH	0,2 pmol	0,25
cDNA (50 ng)	120 ng/ µl	2-3
ddH ₂ O (Steril)	-	8,7

Bu karışım daha sonra bir kez 50°C'de 2 dk, 95°C'de 10 dk, 45 kez 95°C'de 10 sn ve 60°C'de 1 dk olmak üzere Real-Time PCR işlemine maruz bırakıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Real Time PCR protokolü

Real time PCR’da karşılaştırmalı (göreceli) ölçüm için Livak matematiksel model kullanılmıştır (Livak and Schmittgen 2001).

$$\text{HEDEF GEN ORANI} = \frac{(E_{\text{hedef gen}})^{\Delta\text{CT hedef (kontrol-örnek)}}}{(E_{\text{referans gen}})^{\Delta\text{CT referans (kontrol-örnek)}}$$

Hedef gen oranı: Relatif ekspresyon seviyesi ($\Delta\Delta C_T$ değeri)

$E_{\text{hedef gen}}$: Hedef geni çoğaltan primer etkinlik oranı

$E_{\text{referans gen}}$: Referans (housekeeping) geni çoğaltan primer etkinlik oranı

E değerleri kendi genlerinin slope değerleri ile bağlantılı olup $E=10^{-1/\text{slope}}$ şeklindedir.

ΔCT : PCR reaksiyonu esnasında ürünün miktarsal olarak anlamlı artışının gerçekleştiği C_T değeri

$\Delta CT_{\text{hedef (kontrol-örnek)}}$: Hedef genin ortalama C_T değeri (kontrol grubu hedef genin C_T değeri – uygulamaya ait hedef genin C_T değeri)

$\Delta CT_{\text{referans (kontrol-örnek)}}$: Referans (housekeeping) genin ortalama C_T değeri (kontrol grubu referans genin C_T değeri – uygulamaya ait referans genin C_T değeri)

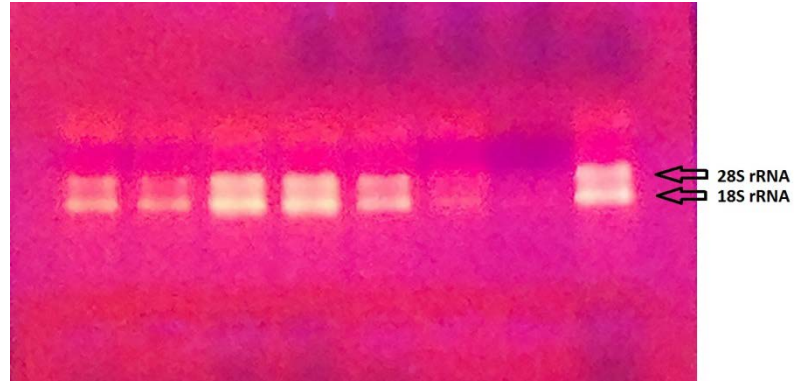
Referans (Housekeeping) gen genellikle temel hücresel fonksiyonların gerçekleştirilmesi için gerekli olan bir organizmanın her hücresinde bulunan temel bir gendir (Butte *et al.* 2001). Deney çalışmasında referans gen olarak GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) geni kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

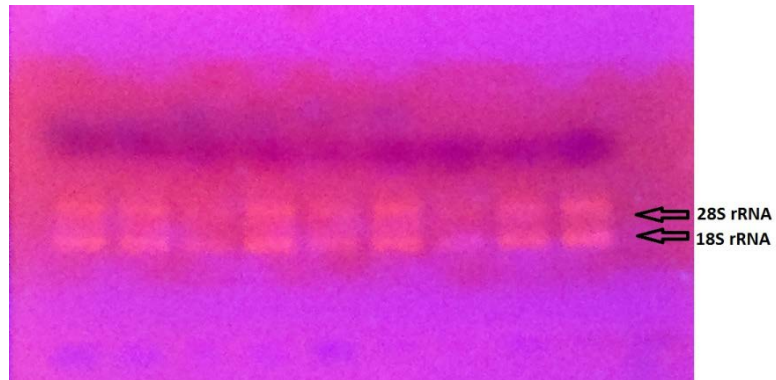
4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. RNA bulgusu

Kontrol ve uygulama gruplarının sol korteks ve hipokampus dokularından izole edilen total RNA'ların varlığı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Korteks dokusundan izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.2. Hipokampus dokusundan izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüsü

4.1.2. RNA ve cDNA konsantrasyonu kantitatif tayini bulgusu

İzole edilen RNA ve cDNA konsantrasyon ve saflıkları nanodrop cihazı ile 260/280 nm'de okuma yapılarak belirlenmiştir. Veriler Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Beynin sol korteks dokusunda kantitatif tayini yapılan RNA ve cDNA konsantrasyonları

Beyin Sol Korteks Dokusu					
No	Numune Kodu	RNA Konsantrasyonu		cDNA Konsantrasyonu	
		260/280	ng/ μ l	260/280	ng/ μ l
1	Kontrol 1	1,97	3963,7	1,87	1243
2	Kontrol 2	1,9	360,2	1,79	849
3	Kontrol 3	1,87	2372	1,85	1412
4	0.87ppm 1	1,91	3233	1,85	1208
5	0.87ppm 2	1,85	3443,4	1,87	1178
6	0.87ppm 3	1,85	3938,7	1,81	1339
7	3ppm 1	1,91	2132,5	1,81	1469
8	3ppm 2	1,94	2779,4	1,85	1128
9	3ppm 3	1,93	2112,6	1,82	1225
10	30ppm 1	1,88	3591,1	1,84	1211
11	30ppm 2	1,91	3116,6	1,82	1227
12	30ppm 3	1,87	3682,8	1,83	1325
13	300ppm 1	1,81	3619,8	1,81	1231
14	300ppm 2	1,88	3069,8	1,84	1184
15	300ppm 3	1,87	1158,3	1,88	1053

Çizelge 4.2. Beynin sol korteks dokusunda kantitatif tayini yapılan RNA ve cDNA konsantrasyonları

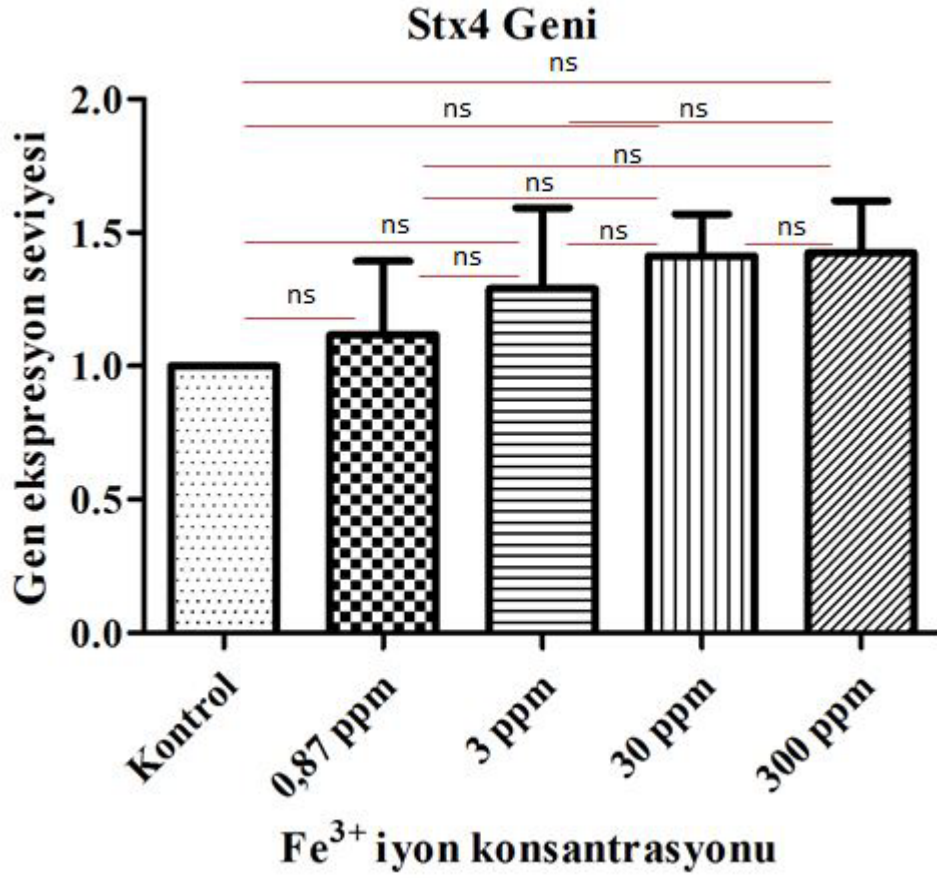
Beyin Sol Hipokampus Dokusu					
No	Numune Kodu	RNA Konsantrasyonu		cDNA Konsantrasyonu	
		260/280	ng/ μ l	260/280	ng/ μ l
1	Kontrol 1	2,07	198,7	1,84	1201
2	Kontrol 2	2,09	194,3	1,79	1045
3	Kontrol 3	2,09	147,8	1,83	1196
4	0.87ppm 1	2,06	269,5	1,82	1008
5	0.87ppm 2	2,09	156,2	1,75	921
6	0.87ppm 3	2,07	220,9	1,85	1160
7	3ppm 1	2,08	88,1	1,83	1159
8	3ppm 2	2,10	171,5	1,77	1110
9	3ppm 3	2,08	245	1,72	725
10	30ppm 1	2,12	110,3	1,71	751
11	30ppm 2	2,08	139,5	1,66	778
12	30ppm 3	2,06	383,8	1,70	814
13	300ppm 1	2,08	170,4	1,68	745
14	300ppm 2	2,09	159,3	1,69	700
15	300ppm 3	2,06	87,9	1,69	733

4.2. İstatistiksel Sonuçlar

4.2.1. Gen ekspresyonu sonuçları

İstatistiksel analiz GraphPad Prism 5 versiyonu istatistik programı kullanılarak yapılmış ve Tukey's comparation test yöntemi ile tüm gruplar birbirleriyle kıyaslanarak ekspresyon seviyelerindeki değişimin önemli olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Demir ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış sıçanların korteks dokusundaki kontrol, 0,87, 3, 30 ve 300 ppm uygulama gruplarında Stx4 gen ekspresyonu seviyelerindeki değişim birbirlerine göre istatistiksel olarak önemsiz görölmüştür ($p>0,05$) (şekil 4.3).

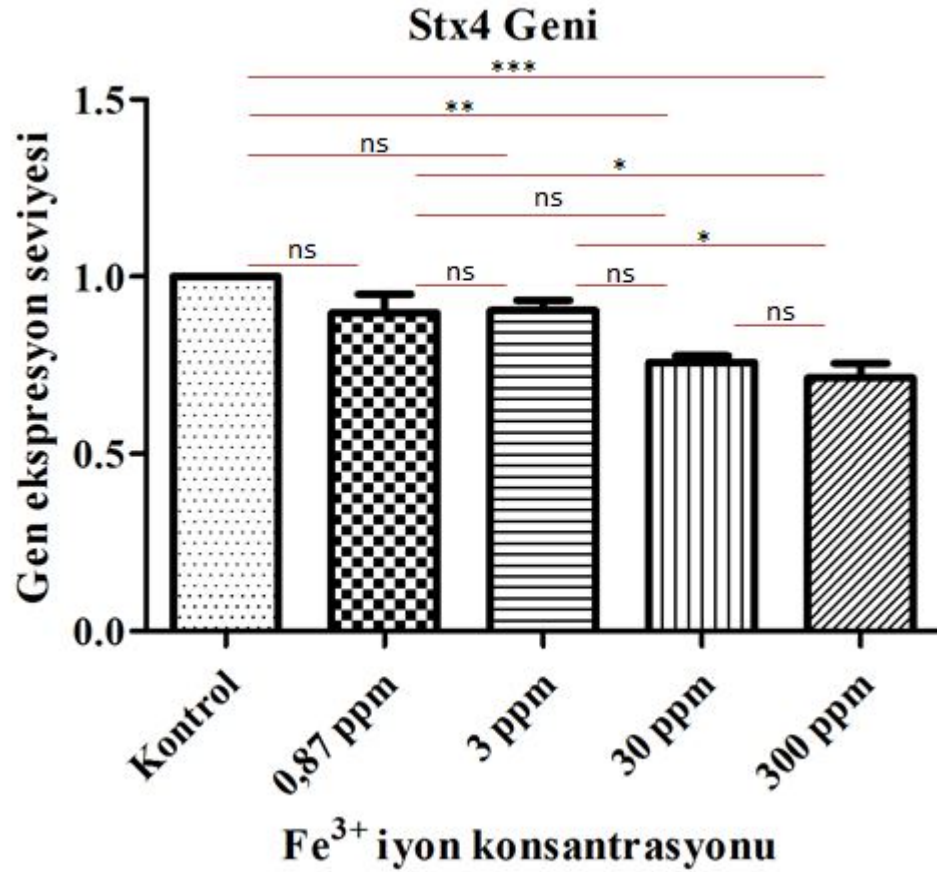


Şekil 4.3. Korteks dokusunda Stx4'ün GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları
 $p > 0,05 = ns$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$

Çizelge 4.3. Korteks dokusunda gruplara göre Stx4 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri

Stx4 Geni			
Gruplar	n	C_T	$\Delta\Delta C_T$
Kontrol	3	13,696±0,309	1±0
0,87 ppm	3	14,326±0,567	1,118±0,477
3 ppm	3	14,358±0,688	1,289±0,523
30 ppm	3	13,956±0,3681	1,412±0,273
300 ppm	3	15,401±1,484	1,425±0,338

Demir ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış sıçanların hipokampus dokusundaki Stx4 gen ekspresyonu seviyesine bakıldığı zaman, 300 ppm uygulama grubunda kontrol, 0,87 ppm uygulama ve 30 ppm uygulama gruplarına göre önemli bir düşüş kaydedilmiştir ($p < 0,05$, $p < 0,001$). Ayrıca 30 ppm uygulama grubundaki Stx4 geni ekspresyon seviyesinde kontrole nazaran önemli bir düşüş görülmektedir ($p < 0,01$) Gruplar arasında diğer kıyaslamalardaki ekspresyon seviyeleri değişimleri önemsiz olarak belirlenmiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.4).

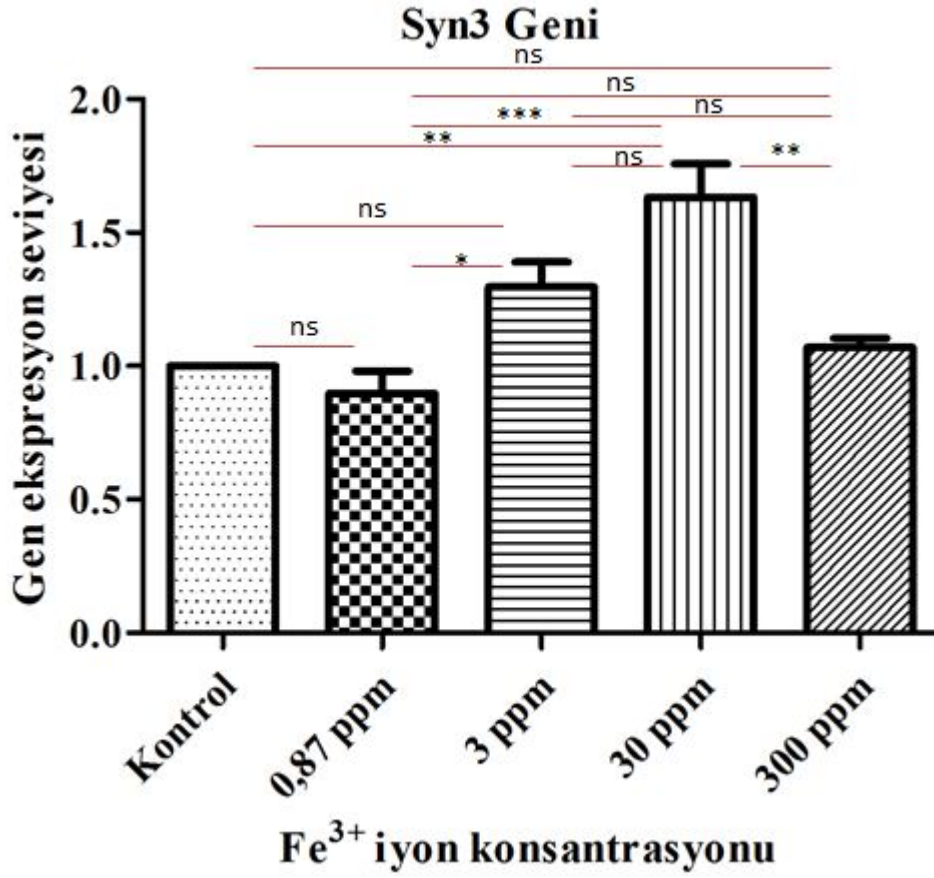


Şekil 4.4. Hipokampus dokusunda Stx4 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları
 $p > 0,05 = ns$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$

Çizelge 4.4. Hipokampus dokusunda gruplara göre Stx4 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri

Stx4 Geni			
Gruplar	n	C_T	$\Delta\Delta C_T$
Kontrol	3	23,721±0,549	1±0
0,87 ppm	3	24,267±0,229	0,898 ± 0,0915
3 ppm	3	24,242±0,723	0,905 ± 0,0489
30 ppm	3	23,916±0,528	0,758 ± 0,0336
300 ppm	3	24,146±0,326	0,714 ± 0,072

Demir ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış sıçanların korteks dokularındaki Syn3 geni ekspresyon seviyesi 30 ppm uygulama grubunda kontrol, 0,87 ppm ve 300 ppm uygulama gruplarına göre önemli artış gözlenmiştir ($p<0,01$, $p<0,001$). 3 ppm uygulama grubunda 0,87 ppm uygulama grubuna göre önemli bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Gruplar arasındaki diğer kıyaslamalarda ekspresyon seviyeleri arasındaki değişimler önemsiz olarak analiz edilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.5).

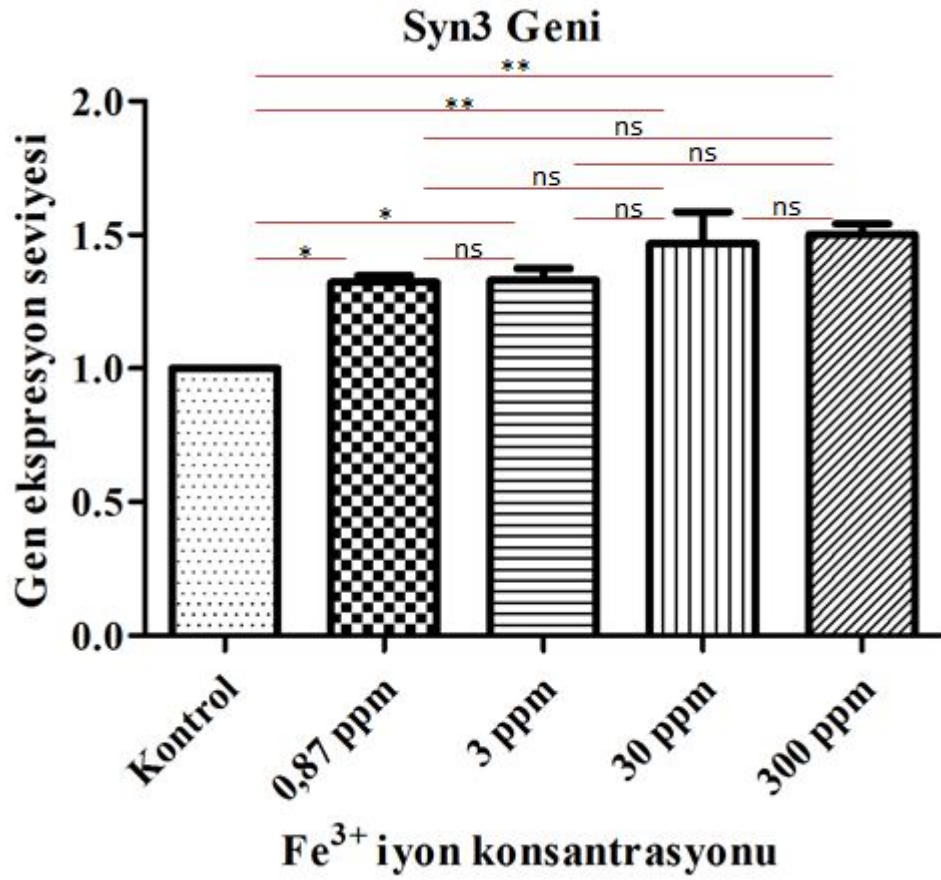


Şekil 4.5. Korteks dokusunda Syn3 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları
 $p > 0,05 = ns$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$

Çizelge 4.5. Korteks dokusunda gruplara göre Syn3 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri

Syn3 Geni			
Gruplar	n	C_T	$\Delta\Delta C_T$
Kontrol	3	30,336±1,659	1±0
0,87 ppm	3	30,756±0,708	0,897±0,145
3 ppm	3	30,417±1,353	1,295±0,162
30 ppm	3	30,366±1,082	1,633±0,218
300 ppm	3	31,844±2,509	1,07±0,059

Demir ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış sıçanların hipokampus dokularında Syn3 geni ekspresyon seviyeleri incelendiğinde 0,87 ppm, 3 ppm, 30 ppm ve 300 ppm uygulama gruplarının herbiri ayrı ayrı kontrole kıyaslandığında herbirinin ekspresyon seviyelerindeki artış önemli olarak karşımıza çıkmaktadır ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Gruplar arasındaki diğer karşılaştırmalar incelendiğinde ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin önemsiz olduğu görülmüştür ($p > 0,05$) (Şekil 4.6).

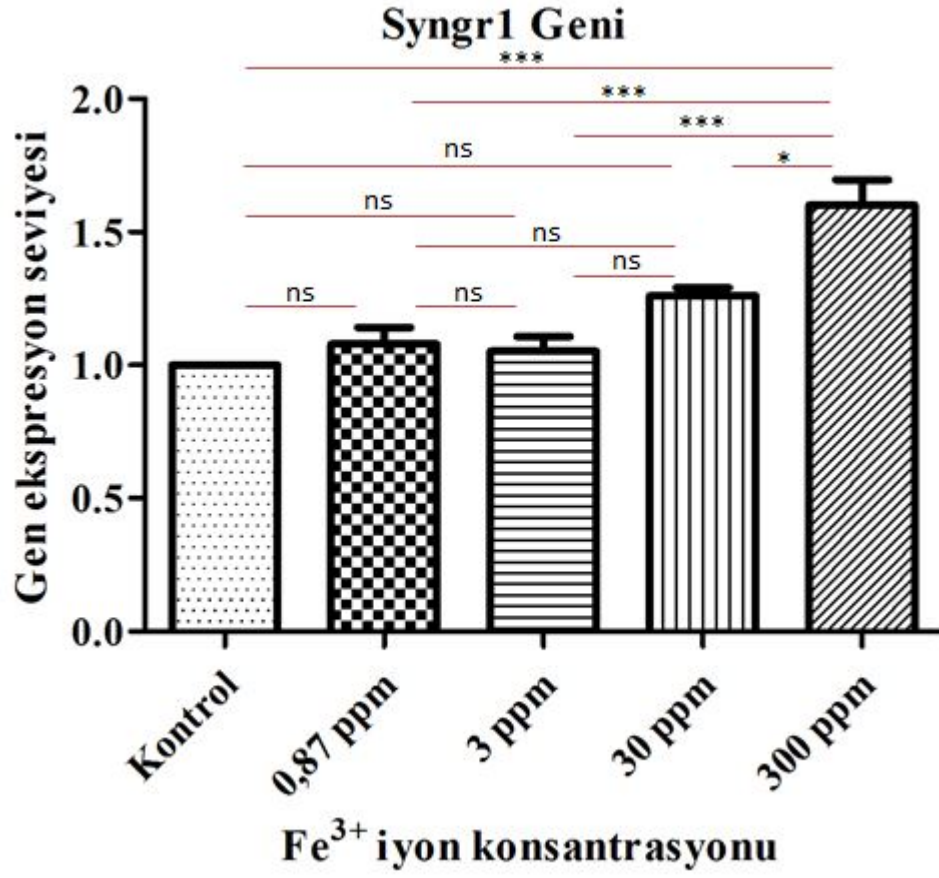


Şekil 4.6. Hipokampus dokusunda Syn3 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları
 $p > 0,05 = ns$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$

Çizelge 4.6. Hipokampus dokusunda gruplara göre Syn3 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri

Syn3 Geni			
Gruplar	n	C_T	$\Delta\Delta C_T$
Kontrol	3	30,051±1,36	1±0
0,87 ppm	3	30,422±0,739	1,323±0,045
3 ppm	3	30,582±0,76	1,330±0,077
30 ppm	3	30,031±0,173	1,467±0,205
300 ppm	3	30,233±0,78	1,5±0,07

Demir ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış sıçanların korteks dokularında Syngr1 geni ekspresyon seviyeleri incelendiğinde 300 ppm uygulama grubunda kontrol, 0,87 ppm, 3 ppm ve 30 ppm uygulama gruplarına göre önemli bir artış gözlenmiştir ($p<0,01$, $p<0,001$). Gruplar arasındaki diğer karşılaştırmalar incelendiğinde ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin önemsiz olduğu görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 4.7).

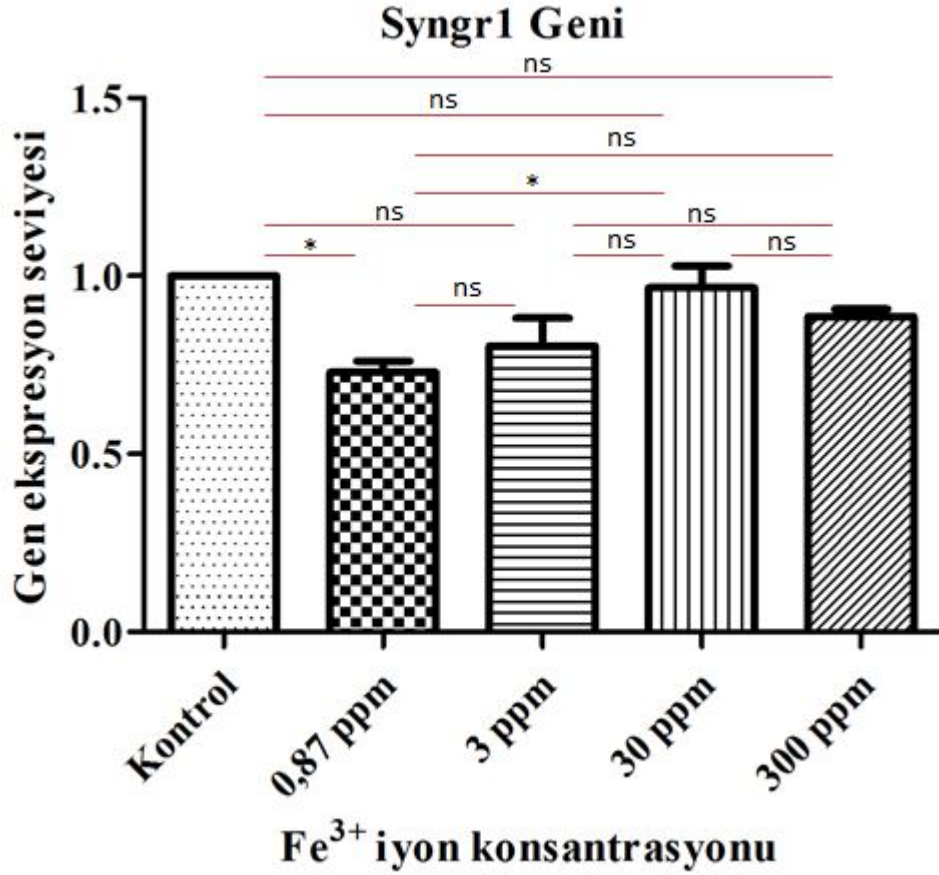


Şekil 4.7. Korteks dokusunda Syngn1 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları
 $p > 0,05 = ns$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$

Çizelge 4.7. Korteks dokusunda gruplara göre Syngn1 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri

Syngn1 Geni			
Gruplar	n	C_T	$\Delta\Delta C_T$
Kontrol	3	25,733±0,848	1±0
0,87 ppm	3	26,059±0,572	1,08±0,104
3 ppm	3	26,097±0,56	1,053±0,094
30 ppm	3	25,632±0,885	1,26±0,054
300 ppm	3	26,818±1,512	1,6±0,165

Demir ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış sıçanların hipokampus dokularında *Syng1* geni ekspresyon seviyeleri incelendiğinde 0,87 ppm uygulama grubunun ekspresyon seviyesinde kontrole göre önemli bir düşüş meydana gelmiştir ($p < 0,05$). 30 ppm uygulama grubu 0,87 ppm uygulama grubuna göre ekspresyon seviyesinde önemli bir artış meydana gelmiştir ($p < 0,05$). Gruplar arasındaki diğer karşılaştırmalar incelendiğinde ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin önemsiz olduğu görülmüştür ($p > 0,05$) (Şekil 4.8).

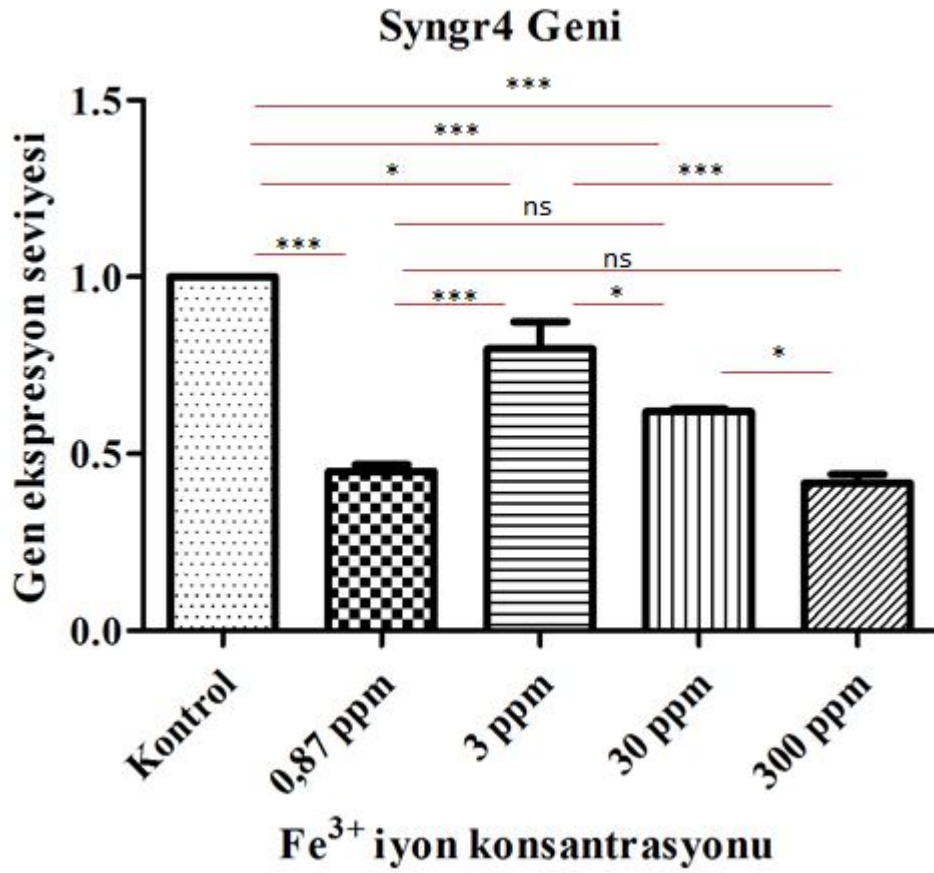


Şekil 4.8. Hipokampus dokusunda *Syng1* geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları $p > 0,05 = ns$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$

Çizelge 4.8. Hipokampus dokusunda gruplara göre Syngn1 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri

Syngn1 Geni			
Gruplar	n	C_T	$\Delta\Delta C_T$
Kontrol	3	27,134±0,346	1±0
0,87 ppm	3	27,322±0,716	0,73±0,053
3 ppm	3	27,434±0,796	0,8±0,136
30 ppm	3	26,488±0,356	0,967±0,105
300 ppm	3	26,636±0,803	0,885±0,038

Demir ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış sıçanların korteks dokularında Syngn4 geni ekspresyon seviyeleri incelendiğinde kontrole göre 0,87 ppm, 3 ppm, 30 ppm ve 300 ppm uygulama gruplarında bir azalış meydana gelmiş ve bu azalışın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,001$). 3 ppm uygulama grubunun ekspresyon seviyesinde 0,87 ppm uygulama grubuna göre önemli bir artış görülmüştür ($p<0,001$). 30 ppm uygulama grubunun ekspresyon seviyesinde 3 ppm uygulama grubuna göre önemli bir azalış görülmüştür ($p<0,05$). 300 ppm uygulama grubunun ekspresyon seviyesinde ise 30 ppm ve 300 ppm uygulama gruplarına göre önemli bir azalış görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,001$). 0,87 ppm ve 300 ppm uygulama grupları arasındaki ekspresyon seviyesi farkı önemsiz olarak görülmüştür ($p>0,05$) ve aynı şekilde 0,87 ppm ve 30 ppm uygulama grupları arasındaki ekspresyon seviyesi farkı da istatistiksel analiz sonucunda önemsiz olarak karşımıza çıkmaktadır ($p>0,05$) (Şekil 4.9).

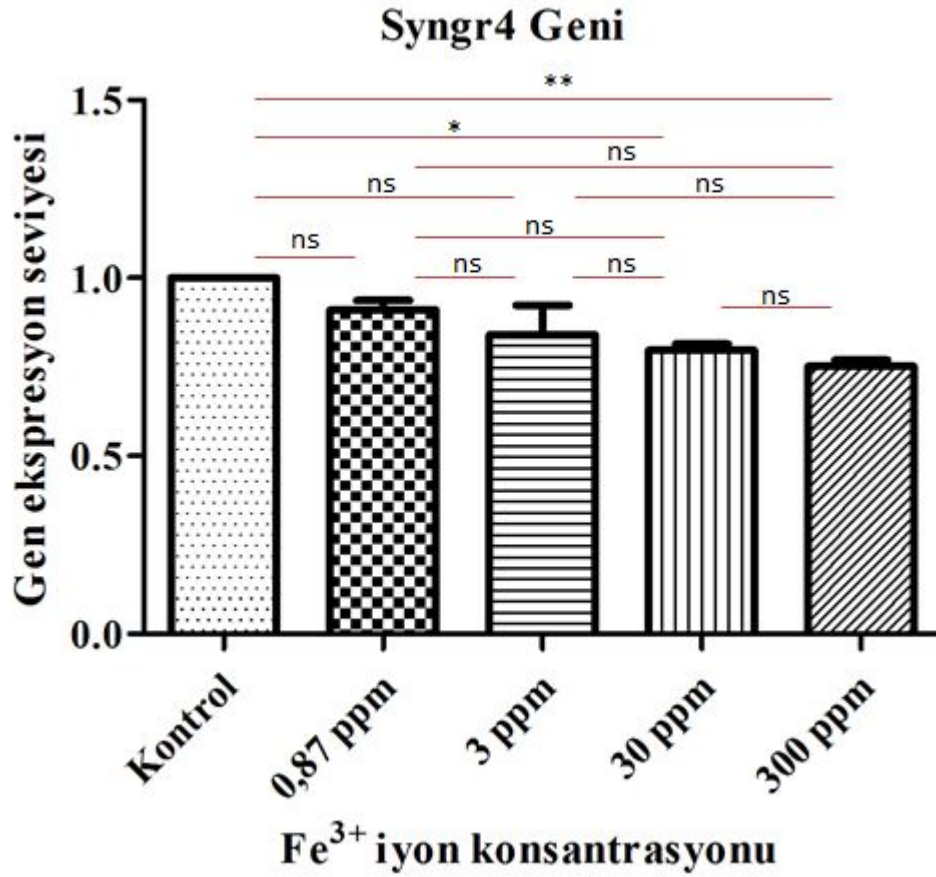


Şekil 4.9. Korteks dokusunda Syngn4 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları
 $p > 0,05 = ns$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$

Çizelge 4.9. Korteks dokusunda gruplara göre Syngn4 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri

Syngn4 Geni			
Gruplar	n	C_T	$\Delta\Delta C_T$
Kontrol	3	34,1±0,15	1±0
0,87 ppm	3	34,804±0,327	0,45±0,034
3 ppm	3	34,694±0,301	0,797±0,132
30 ppm	3	34,55±0,417	0,619±0,0133
300 ppm	3	35,779±0,911	0,418±0,041

Demir ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış sıçanların hipokampus dokularında Syngn4 geni ekspresyon seviyeleri incelendiğinde 30 ppm uygulama grubuna ait ekspresyon seviyesinde kontrole göre önemli bir azalış meydana gelmiştir ($p<0,05$). Aynı şekilde 300 ppm uygulama grubuna ait ekspresyon seviyesinde de kontrole göre bir azalış meydana gelmiştir ($p<0,01$). Gruplar arasındaki diğer karşılaştırmalar incelendiğinde ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin önemsiz olduğu görülmüştür ($p>0,05$). (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Hipokampus dokusunda Syngn4 geninin GAPDH'e bağlı ekspresyon seviyeleri Tukey's comparison test istatistik analiz sonuçları $p>0,05=ns$, $p<0,05=*$, $p<0,01=**$, $p<0,001=***$

Çizelge 4.10. Hipokampus dokusunda gruplara göre Syngn4 genine ait C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri

Syngn4 Geni			
Gruplar	n	C_T	$\Delta\Delta C_T$
Kontrol	3	33,301±0,588	1±0
0,87 ppm	3	33,674±0,385	0,91±0,0464
3 ppm	3	33,321±0,484	0,841±0,143
30 ppm	3	32,739±0,543	0,797±0,03
300 ppm	3	32,941±0,677	0,752±0,029

5. SONUÇ

Sonuç olarak ağır metallere maruz bırakılan sıçanlarda bazı dokulardaki genlerin gen ekspresyonları araştırılmış ise de korteks ve hipokampus dokularında özellikle de sinaptik vezikül proteinlerinin ağır metal uygulanması sonucu ekspresyon seviyelerinin araştırılmasına ilişkin yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada, Fe^{3+} ağır metal iyonlarının subletal dozlarına maruz kalmış sıçanlarda Stx4, Syn3, Syngr1 ve Syngr4 genlerinin ekspresyonlarındaki değişimler incelenmiştir. Bu amaçla mRNA gen ekspresyonunu belirlemek için multipleks Real-Time PCR uygulanmıştır. Genel olarak kontrol grubu ve metal uygulanmış gruplar kıyaslandığında istatistiksel açıdan farklı olduğu gözlemlenmiştir.

Gen ekspresyonu çalışmasında sıçanlarda korteks ve hipokampus dokularının herbiri için kontrol ve dört uygulama grubu çalışılmıştır. Bu herbir uygulama grupları için üçer sıçan kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz GraphPad Prism 5 versiyonu istatistik programı ve Tukey's comparison test yöntemi ile elde edilen analize göre aşağıdaki verilere ulaşılmıştır.

Korteks dokusunda Stx4 geni ekspresyon seviyelerinde bir artış meydana gelmiş olsa da bu artış istatistiksel analiz sonucunda önemsiz olarak değerlendirilmiştir.

Hipokampus dokusunda Fe^{3+} iyonu konsantrasyonu arttıkça Stx4 geni ekspresyon seviyesi üzerinde genel olarak bir azalış meydana gelmiştir. Özellikle 300 ppm uygulama grubu kontrole göre en fazla azalışın gerçekleştiği gruptur. Bu azalış istatistiksel analiz sonucunda önemli olarak değerlendirilmiştir. Yine 30 ppm uygulama grubunda kontrole nazaran önemli bir azalış gerçekleşmiştir. 300 ppm uygulama grubu

Stx4 gen ekspresyon seviyesinde, 0,87 ppm ve 3 ppm uygulama gruplarına göre de önemli bir azalma gözlenmiştir.

Korteks dokusunda Syn3 geni ekspresyon seviyesi için 30 ppm uygulama grubunda, kontrole ve 0,87 ppm uygulama grubuna göre önemli bir artış meydana gelirken, 300 ppm uygulama grubunda 30 ppm uygulama grubuna göre ekspresyon seviyesinde önemli bir azalış gözlenmiştir

Hipokampus dokusunda Syn3 geni ekspresyon seviyelerinde 0,87 ppm, 3 ppm, 30 ppm ve 300 ppm uygulama gruplarında kontrole göre önemli artış meydana gelmiştir.

Korteks dokusunda Syngr1 geni ekspresyon seviyelerinde 300 ppm uygulama grubu kontrol, 0,87 ppm, 3 ppm ve 30 ppm uygulama gruplarına göre önemli bir artış göstermiştir.

Hipokampus dokusunda Syngr1 geni ekspresyon seviyelerinde 0,87 ppm, kontrole göre önemli bir azalış göstermiştir. 30 ppm uygulama grubu ekspresyon seviyesi 0,87 ppm uygulama grubuna göre bir artış göstermiştir.

Korteks dokusunda Syngr4 geni ekspresyon seviyelerinde kontrole göre 0,87 ppm, 3 ppm, 30 ppm ve 300 ppm uygulama gruplarında bir azalış meydana gelmiş ve bu azalışın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. 3 ppm uygulama grubunun ekspresyon seviyesinde 0,87 ppm uygulama grubuna göre önemli bir artış görülmüştür. 30 ppm uygulama grubunun ekspresyon seviyesinde 3 ppm uygulama grubuna göre önemli bir azalış görülmüştür. 300 ppm uygulama grubunun ekspresyon seviyesinde ise 30 ppm ve 300 ppm uygulama gruplarına göre önemli bir azalış görülmüştür.

Hipokampus dokusunda Syngr4 geni ekspresyon seviyelerinde 300 ppm ve 30 ppm uygulama gruplarında kontrole göre önemli bir azalış meydana gelmiştir.

Bu ekspresyon seviyelerindeki değişimde Fe³⁺ iyonunun doğrudan ya da dolaylı etkisi olabilir.

Bu tez çalışmasının sinaptik vezikül proteinleri araştırmalarında yararlanılacak bir çalışma olduğu muhtemeldir.

KAYNAKLAR

- Abe, K., Saito, H., 1993. Tyrosine kinase inhibitors, herbimycin A and lavendustin A, block formation of long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Brain Research*, 621(1), 167–170.
- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008. Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Türkiye Bilimler Akademisi Yayınları, 1530 s, Ankara, Türkiye.
- Ames, B., Mc Cann, J., Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res*, 31, 347-364.
- Balkıs, N., Algan, O., 2005. Marmara Denizi yüzey sedimentlerinde metallerin birikimi ve denetleyen mekanizmalar. *Deniz Kirliliği*, 21, TÜDAV Yayınları, İstanbul.
- Ballatore, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 663–672.
- Barnekow, A., Jahn, R., Scharfl, M., 1990. Synaptophysin: a substrate for the protein tyrosine kinase pp60src in intact synaptic vesicles. *Oncogene*, 5, 1019–1024.
- Bennett, M.K., Calakos, N., Scheller, R.H., 1992. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257, 255-259.
- Bennett, M.K., Scheller, R.H., 1993. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 90 (7), 2559-2563.
- Bennett, D.A., Schneider, J.A., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Arnold, S.E., 2004. Neurofibrillary Tangles Mediate the Association of Amyloid Load With Clinical Alzheimer Disease and Level of Cognitive Function. *Arch Neurol*, 61(3), 378-384.
- Bettens, K., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C., 2010. Current status on Alzheimer's disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum. Mol. Genet.*, 19 (R1), R4 R11.
- Bick, K.L., 2001. Alzheimer hastalığının başlangıç öyküsü. Çeviri Editörü; Gürvit İH. *Alzheimer Hastalığı*. Yelkovan Yayıncılık, 1-10.
- Blanpied, T.A., Scott, D.B., Ehlers, M.D., 2002. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron*, 36, 435–449.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.*, 82, 239-59.
- Brown, T.C., Tran, I.C., Backos, D.S., Esteban, J.A., 2005. NMDA Receptor-Dependent Activation of the Small GTPase Rab5 Drives the Removal of Synaptic AMPA Receptors during Hippocampal LTD. *Neuron*, 45 (1), 81–94,
- Butte, A.J., Dzau, V.J., Glueck, S.B., 2001. Further defining housekeeping, or maintenance genes focus on a compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol. Genomics*, 7(2), 95-96.

- Dearth, R.K., Hiney, J.K., Srivastava, V., Dees, W.L., Bratton G.R., 2004. Low level lead (Pb) exposure during gestation and lactation: assessment of effects on pubertal development in Fisher 344 and Sprague-Dawley female rats. *Life Sciences*, 74 (9), 1139-1148.
- Cardno, A.G., Marshall, E.J., Coid, B., Macdonald A.M., Ribchester, T.R., Davies, N.J., Venturi, P., Jones, L.A., Lewis, S.W., Sham, P.C., Gottesman, I.I., Farmer, A.E., McGuffin, P., Reveley, A.M., Murray, R.M., 1999. Heritability estimates for psychotic disorders: The Maudsley twin psychosis series. *Archives of General Psychiatry*, 56 (2), 162–168.
- Carlsson, A., 1988. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 1, 179–186.
- Ceyhun, S.B., Aksakal, E., Kaneko, G., Erdoğan, O., Ceylan, H., İçoğlu, F., 2011. Real Time PCR'da TaqMan Prob Yöntemiyle Kantitatif Gen Analizi. *Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri*, Ed: Küfrevioğlu, İ., Watabe, S., Çiltaş, A., Erdoğan, O.. Atatürk Üniversitesi. Erzurum. 111-124.
- Chen, Y.A., Scales, S.J., Scheller, R.H., 2001. Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. *Neuron*, 30, 161-170.
- Chin, L.S., Li L., Ferreira, A., Kosik, K.S., Greengard, P., 1995. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 9230–9234.
- Collingwood, J.F., Dobson, J., 2008. Nanoscale iron compounds related to neurodegenerative disorders. *Biomedical Nanostructures*, Gonsalves, K.E., Halberstadt, C.R., Laurencin, C.T., Nair, L.S.. Hoboken, New Jersey, 461-490.
- Collingwood, J., Dobson, J., 2006. Magging and characterization of iron compounds in Alzheimer's tissue. *J Alzheimers Dis.*, 10, 215-222.
- Coon, H., Holik, J., Hoff, M., Reimherr, F., Wender, P., Myles-Worsley, M., Waldo, M., Freedman, R., Byerley, W., 1994. Analysis of chromosome 22 markers in nine schizophrenia pedigrees. *Am. J. Med. Genet.*, 54(1),72–79.
- Çetingül, V., Aysel, V., 1998. Ekonomik Degerdeki Bazı Kahverengi ve Kırmızı Alglerin Ağır Metal Birikim Düzeyleri. *Su Ürünleri Dergisi Cilt No: 15 Sayı: 1-2 s: 63-76 İzmir.*
- De Camilli, P., Cameron, R., Greengard, P., 1983. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J. Cell. Biol.*, 96 (5), 1337–1354.
- Doğru, M.İ., 2007. Ağır Metal ve Adrenomedullin Uygulamasının Bazı Sıçan Dokularında Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. *Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.*
- Drouet, B., Raymond, M.P., Chambaz, J., Pillot T., 2000. Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (5), 705–715.
- Duffus, J.H., 2002. Heavy metals-A meaningless term?. *Pure Appl. Chem.*, 74(5), 793-807.
- Duman, J.G., Forte, J.G., 2003. What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am J. Physiol. Cell Physiol.*, 285, 237-49.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blaccer, R.W., Culwell, A.L., Oltersdorf, T., McClure, D., Ward,P.J., 1990. Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, 248, 1122-1124.

- Esser, L., Wang, C.R., Hosaka, M., Smagula, C.S., Südhof, T.C., Deisenhofer, J., 1998. Synapsin I is structurally similar to ATP-utilizing enzymes. *EMBO J.*, 17, 977–84.
- Feng, J.P., Blanpied, T.A., Xu, Y., Magarinos, A.M., Ferreira, A., Takahashi, R.H., Kao, H.T., McEwen, B.S., Ryan, T.A., Augustine, G.J., Greengard, P., 2002. Regulation of neurotransmitter release by synapsin III. *J. Neurosci.* 22, 4372–80.
- Ferreira, A., Chin, L.S., Li, L., Lanier, L.M., Kosik, K.S., Greengard, P., 1998. Distinct roles of synapsin I and synapsin II during neuronal development. *Mol. Med.* 4, 22–28.
- Ferreira, A., Kao, H.T., Feng, J., Rapoport, M., Greengard, P., 2000. Synapsin III: developmental expression, subcellular localization, and role in axon formation. *J. Neurosci.*, 20, 3736–3744.
- Ferreira, A., Kosik, K.S., Greengard, P., Han, H-Q., 1994. Aberrant neurites and synaptic vesicle protein deficiency in synapsin II-depleted neurons. *Science*, 264, 977–979.
- Ferreira, A., Han, H-Q., Greengard, P., Kosik, K.S., 1995. Suppression of synapsin II inhibits the formation and maintenance of synapses in hippocampal culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 9225–9229.
- Finckh, U., 2003. The future of genetic association studies in Alzheimer disease. *J. Neural. Trans.*, 110 (3), 253-66.
- Fischer, P., Götz, M.E., Danielczyk, W., Gsell, W., Riederer, P., 1997. Blood transferrin and ferritin in Alzheimer's disease. *Life Sciences.*, 60, 2273-8.
- Glenner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120 (3), 885-890.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., 2006. A century of Alzheimer's Disease. *Science*, 314 (5800), 777-781.
- Graf, E., Mahoney, J.R., Bryant, R.G., Eaton, J.W., 1984. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.* 259 (6), 3620– 3624.
- Grober, E., Dickson, D., Sliwinski, M.J., Buschke, H., Katz, M., Crystal, H., Lipton, R.B., 1999. Memory and mental status correlates of modified Braak staging. *Neurobiol. Aging*, 20, 573-579.
- Güven, K., 1999. *Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji*. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Basımevi, 1. Baskı, 200 p, Diyarbakır.
- Gürvit, H., 2004. *Sinir Sisteminin Dejeneratif Hastalıkları. Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar*. Öge, A.E.. Nobel Matbaacılık, İstanbul, 367-415.
- Han, H-Q., Nichols, R.A., Rubin, M.R., Bahler, M., Greengard, P., 1991. Induction of formation of presynaptic terminals in neuroblastoma cells by synapsin IIb. *Nature*, 349, 697–700.
- Hanson, P.I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., Heuser, J.E., 1997. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quickfreeze/ deep-etch electron microscopy. *Cell*, 90, 523-535.
- Hosaka, M., Südhof, T.C., 1998. Synapsins I and II are ATP-binding proteins with differential Ca²⁺ regulation. *J. Biol. Chem.*, 273, 1425–1429.

- Huttner, W.B., Schiebler, W., Greengard, P., De Camilli, P., 1983. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J. Cell. Biol.*, 96, 1374–1388.
- Jarett, J.T., Lansbury Jr, P.T., 1993. Seeding ‘one-dimensional crystallization’ of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie?. *Cell*, 73, 1055-1058.
- Johnson, E.M., Ueda, T., Maeno, H., Greengard, P., 1972. Adenosine 3',5-monophosphate-dependent phosphorylation of a specific protein in synaptic membrane fractions from rat cerebrum. *J. Biol. Chem.*, 247, 5650–5652.
- Johnston, P.A., Jahn, R., and Südhof, T.C., 1989. Transmembrane topology and evolutionary conservation of synaptophysin. *J. Biol. Chem.*, 264, 1268–1273.
- Jarousse, N., Kelly, R., 2001. Endocytotic mechanisms in synapses. *Cur Opin in Cell Biol.*, 13, 461-469.
- Jahn, R., Scheller, R.H., 2006. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 631–643.
- Janz, R., Südhof, T.C., 1998. Cellugyrin, a novel ubiquitous form of synaptogyrin that is phosphorylated by pp60c-src. *J. Biol. Chem.*, 273, 2851–2857.
- Janz, R., Südhof, T.C., Hammer, R.E., Unni, V., Siegelbaum, S.A., Bolshakov, V.Y., 1999. Essential roles in synaptic plasticity for Synaptogyrin 1 and Synaptophysin 1. *Neuron*, 24, 687–700.
- Kahvecioğlu Ö., Kartal G., Güven A., Timur S., 2004. Metallerin Çevresel Etkileri-I. *Metalurji Dergisi*, 136, 47-53.
- Kao, H.T., Li, P., Chao, H.M., Janoschka, S., Pham, K., Feng, J., Mcewen, B.S., Greengard, P., Pieribone, V.A., Porton, B., 2008. Early involvement of synapsin III in neural progenitor cell development in the adult hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 507 (6), 1860–1870.
- Kao, H-T., Porton, B., Czernik, A.J., Feng, J., Yiu, G., Haring, M., Benfenati, F., Greengard, P., 1998. A third member of the synapsin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 4667–4672.
- Katz, B., Miledi, R., 1971. The effect of prolonged depolarization on synaptic transfer in the stellate ganglion of the squid. *J. Physiol*, 216, 503-512.
- Katzman, R., Saitoh, T., 1991. Advances in Alzheimer’s disease. *FASEB J.*, 5, 278-286.
- Kedra, D., Pan, H.Q., Seroussi, E., Fransson, I., Guilbaud, C., Collins, J.E., Dunham, I., Blennow, E., Roe, B.A., Piehl, F., Dumanski, J.P., 1998. Characterization of the human synaptogyrin gene family. *Hum. Genet.*, 103, 131–141.
- Khachaturian, Z.S., 1985. Diagnosis of Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 42 (11), 1097-1105.
- Kirchhausen, T., 2000. Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell.*, 1, 187-198
- Kirkitaдзе, M.D., Kowalska, A., 2005. Molecular mechanisms initiating amyloid β -fibril formation in Alzheimer’s disease. *ABP*, 52 (2), 417–423.
- Klafki, H., Abramowski, D., Swoboda, R., Paganetti, P.A., Staufenbiel, M., 1996. The carboxyl termini of β -amyloid peptides 1-40 and 1-42 are generated by distinct γ -secretase activities. *J. Biol. Chem.*, 271, 28655-28659.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., 2003. Genetik ve Davranış. *Genetik Kavramlar*. Öner, C., , Palme Yayıncılık, Ankara, 658-681.

- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C., Jahn, R., 2001. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 20, 2202–2213.
- Lledo, P.M., Zhang, X., Südhof, T.C., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., 1998. Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science*, 279, 399–403.
- Li, L., Chin, L.S., Shupliakov, O., Brodin, L., Sihra, T.S., Hvalby, O., Jensen, V., Zheng, D., McNamara, J.O., Greengard, P., 1995. Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9235–9239.
- Lieberman, J.A., Kinon, B.J., Loebel, A.D., 1990. Dopaminergic mechanisms in idiopathic and drug-induced psychoses. *Schizophr. Bull.*, 16, 97–110.
- Linstedt, A.D., Vetter, M.L., Bishop, J.M., Kelly, R.B., 1992. Specific association of the proto-oncogene product pp60-src with an intracellular organelle, the PC12 synaptic vesicle. *J. Cell Biol.*, 117, 1077–1084.
- Littleton, J.T., Chapman, E.R., Kreber, R., Garment, M.B., Carlson, S.D., Ganetzky, B., 1998. Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly. *Neuron*, 21, 401–413.
- Livak, K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, 25, 402–408.
- Lonart, G., Südhof, T.C., 2000. Assembly of SNARE core complexes prior to neurotransmitter release sets the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.*, 275, 27703–27707.
- Lu, J., Helton, T.D., Blanpied, T.A., Racz, B., Newpher, T.M., Weinberg, R.J., Ehlers, M.D., 2007. Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron*, 55, 874–889.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., 1998. Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part I: trans-Golgi network-derived organelles undergo regulated exocytosis. *J. Neurosci.*, 18, 6803–6813.
- Martens, S., McMahon, H.T., 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Rev.*, 9, 543–56.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., Beyreuther, K., 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 (12), 4245–9.
- Matthew, J.K., Lan, G.D., Camenzind, G.R., Michael, D.E., 2010. Syntaxin-4 Defines a Domain for Activity-Dependent Exocytosis in Dendritic Spines. *Cell*, 141, 524–535.
- McNew, J.A., Weber, T., Engelman, D.M., Sollner, T.H. and Rothman, J.E. 1999. The length of the flexible SNAREpin juxtamembrane region is a critical determinant of SNAREdependent fusion. *Mol. Cell*, 4, 415–421.
- McNew, J.A., Weber, T., Parlati, F., Johnston, R.J., Melia, T.J., Sollner, T.H. Rothman, J.E. 2000. Close is not enough: SNAREdependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. *J. Cell Biol.*, 150, 105–117.
- Mesulam, M.M., 2000. *Aging, Alzheimer's Disease and Dementia: Clinical and Neurobiological Perspectives*. New York, Oxford University Press, 439–522.

- Mirnic, K., Middleton, F.A., Marquez, A., Lewis, D.A., Levitt, P. 2000. Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron*, 28, 53–67.
- Montecucco, C., Schiavo, G., Pantano, S., 2005. SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close?. *Trends in Biochemical Sciences*, 30, 367-72.
- Morton, D.S., 1976. *Water Pollution Causes and Cures* Worzallo Publishing. Stevens Point Wisconsin, Co. Pp. 76-81.
- Nee, L.E., Polinski, R.J., Eldridge, R., Weingartner, H., Smallberg, S., Ebert, M., 1983. A family with histopathologically confirmed Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*, 40 (4), 203-208.
- Newpher, T.M., Ehlers, M.D., 2008. Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron*, 58, 472–497.
- O'Dell, T.J., Kandel, E.R., Grant, S.G., 1991. Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature*, 353, 558–560.
- Ohara-Imaizumi, M., Nishiwaki, C., Kikuta, T., Kumakura, K., Nakamichi, Y., Nagamatsu, S., 2004. Site of docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 beta cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Biol. Chem.*, 279, 8403–8408.
- Pieribone, V.A., Porton, B., Rendon, B., Feng, J., Greengard, P., Kao, H.T., 2002. Expression of synapsin III in nerve terminals and neurogenic regions of the adult brain. *J. Comp. Neurol.*, 454, 105–14.
- Porton, B., Kao, H.T., Greengard, P., 1999. Characterization of transcripts from the synapsin III gene locus. *J. Neurochem.*, 73, 2266–71.
- Porton, B., Wetzel, W. C., Kao, H.T., 2011. Synapsin III: Role in neuronal plasticity and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22 (4) 416– 424
- Probst, A., Langui, D., Ipsen, S., Robakis, N., Ulrich, J., 1991. Deposition of beta/A4 protein along neuronal plasma membranes in diffuse senile plaques. *Acta Neuropathologica*, 83 (1), 21-29.
- Racz, B., Blanpied, T.A., Ehlers, M.D., Weinberg, R.J., 2004. Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. *Nat. Neurosci.*, 7, 917–918.
- Rocca, W.A., Hofman, A., Brayne, C., Breteler, M.M., Clarke, M., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Engedal, K., Hagnell, O., Heeren, T.J., Jonker, C., Lindesay, J., Lobo, A., Mann, A.H., Mölsä, P.K., Morgan, K., Droux, A.d.S., Sulkava, R., Kay, D.W.K., Armaducci, L., 1991. The prevalence of vascular dementia in Europe: facts and fragments from 1980-1990 studies. *Annals Neurology*, 30 (6), 817-824.
- Rosahl, T.W., Spillane, D., Missler, M., Herz, J., Selig, D.K., Wolff, J.R., Hammer, R.E., Malenka, R.C., Thomas, C., Südhof, T.C., 1995. Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature*, 375, 488–493.
- Ryan, T.A., Li, L., Chin, L.S., Greengard, P., Smith, S.J., 1996. Synaptic vesicle recycling in synapsin I knock-out mice. *J. Cell Biol.*, 134, 1219–1227.
- Saleem, Q., Dash, D., Gandhi, C., Kishore, A., Benegal, V., Sherrin, T., Mukherjee, O., Jain, S., Brahmachari, S.K., 2001. Association of CAG repeat loci on chromosome 22 with schizophrenia and bipolar disorder. *Mol. Psychiatry*, 6 (6), 694 –700.

- Seeman, P., Lee, T., Chau-Wong, M., Wong, K., 1976. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/ dopamine receptors. *Nature*, 261, 717–719.
- Selkoe, D.J., 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6, 487-498.
- Selkoe, DJ., 2001. Alzheimer's Disease: Gene, Proteins and Therapy. *Physiological Reviews*, 81 (2), 741-766
- Shepherd, J.D., Huganir, R.L. 2007. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23, 613–643.
- Sieber, J.J., Willig, K.I., Heintzmann, R., Hell, S.W., Lang, T. 2006. The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophys. J.*, 90, 2843–2851.
- Sieber, J.J., Willig, K.I., Kutzner, C., Gerding-Reimers, C., Harke, B., Donnert, G., Rammner, B., Eggeling, C., Hell, S.W., Grubmuller, H., Lang, T., 2007. Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science*, 317, 1072–1076.
- Sienko, M.J., Plane, R.A., 1976. *Chemistry*. McGraw-Hill 620 s., 5th edn., New York.
- Simons, M., De Strooper, B., Multhaup, G., Tienari, P.J., Dotti, C.G., Beyreuther, K., 1996. Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 16, 899-908.
- Singh, S.M., McDonald, P., Murphy, B., O'Reilly, R., 2004. Incidental neurodevelopmental episodes in the etiology of schizophrenia: an expanded model involving epigenetics and development. *Clin. Genet.*, 65, 435–440.
- Smith, J.S., Tachibana, I., Pohl, U., Lee, H.K., Thanarajasingam, U., Portier, B.P., Ueki, K., Ramaswamy, S., Billings, S.J., Mohrenweiser, H.W., Louis, D.N., Jenkins, R.B., 2000. A Transcript Map of the Chromosome 19q-Arm Glioma Tumor Suppressor Region. *Genomics* 64, 44–50.
- Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J.E., 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362, 318-324.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H. Rothman, J.E. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92, 759-772.
- Sorensen, J., 2005. SNARE complexes prepare for membrane fusion. *Trends in Neurosciences*, 28, 453-455.
- Spiro, T.G., Salman, P., 1974. Iron in biochemistry and medicine. *Inorganic chemistry*, In: Jacobs, A., Worwood, M., (eds). Academic Press, New York, p 1–28
- Stenius, K., Janz, R., Südhof, T.C., Jahn, R., 1995. Structure of synaptogyrin (p29) defines a novel synaptic vesicle protein. *J. Cell Biol.*, 131, 1801–1809.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. Brunger, A.T., 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395, 347-353.
- Südhof, T.C., Czernik, A.J., Kao, H-T., Takei, K., Johnston, P.A., Horiuchi, A., Kanazir, S.D., Wagner, M.A., Perin, M.S., De Camilli, P., Greengard, P., 1989. Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science*, 245, 1474–1480.
- Südhof, T.C., Rothman, J.E., 2009. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, 323, 474-7.

- Şeker, E., Köprücü, K., Ural, M., Gür, F., Sarıeyyüpoğlu, M., 1999. Keban Baraj Gölün'deki Tatlı Su Midyesi *Unio elongatulus eucirrus* (Bourguignat, 1860)'da Ağır Metallerin araştırılması. *Su Ürünleri Dergisi*, 16 (3-4), 319-326.
- Takei, Y., Harada, A., Takeda, S., Kobayashi, K., Terada, S., Noda, T., Takahashi, T., Hirokawa, N., 1995. Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system. *J. Cell Biol.*, 131, 1789–1800.
- Tanzi, R.E., McClatchey, A.I., Lamperti, E.D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J.F., Neve, R.L., 1988. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's Disease. *Nature*, 331, 528-530.
- Tunçer, S., 1982. Accumulation Du Mercure Et Du Cadmium Chez *Mytilus edulis* (L.) Par Le Milieu Et par La Nourriture. *E. Ü. Faculty of Science Journal*, 1, 85-93
- Tüzün, Y., Yakut, M., 2009. Demir Metabolizması ve Herediter Hemokromatozis. *Güncel Gastroenteroloji*, 13(2), 94-101.
- Valtorta, F., Iezzi, N., Benfenati, F., Lu, B., Poo, M-m., Greengard. P., 1995. Accelerated structural maturation induced by synapsin I at developing neuromuscular synapses of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Neurosci.* 7, 261–270.
- Verma, R., Kubendran, S., Das, S.K., Jain, S., Brahmachari, S.K., 2005. Syngr1 is associated with schizophrenia and bipolar disorder in southern India. *J. Hum. Genet.*, 50, 635–640
- Pieribone, V.A., Porton, B., Rendon, B., Feng, J., Greengard, P., Kao, H.T., 2002. Expression of Synapsin III in Nerve Terminals and Neurogenic Regions of the Adult Brain. *The Journal Of Comparative Neurology* 454, 105–114
- Yao, P.J., Zhu, M., Pyun, E.I., Brooks, A.I., Therianos, S., Meyers, V.E., Coleman, P.D., 2003. Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 12, 97-109
- Yates, D., McLoughlin, D.M., 2008. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Psychiatry*, 7(1), 1-5.
- Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., Sasaki, Y., 1990. Genomic organization of the human amyloid β -protein precursor gene. *Gene*, 87, 257-263.
- Zhong, Z-G., Noda, M., Takahashi, H., Higashida, H., 1999. Overexpression of rat synapsins in NG108-15 neuronal cells enhances functional synapse formation with myotubes. *Neurosci. Lett.* 260, 93–96.
- Nunez, M.T., Urrutia, P. Mena, N., Aguirre, P., Tapia, V., Salazar, J., 2012. Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals*, 25, 761–776
- Takahashi, S., Cui, Y.H., Kojima, T., Han, Y.H., Zhou, R.L., Kamioka, M., Yu, S.Y., Matsuura, M., Matsushima, E., Wilcox, M., Arinami, T., Shen, Y.C., Faraone, S.V., Tsuang, M.T., 2003. Family based association study of markers on chromosome 22 in schizophrenia using African-American, European-American, and Chinese families. *Am J. Med. Genet.* 120, 11–17.
- Tuba, A., 2006. Curcuminin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.*
- Weimer, R.M. Jorgensen, E.M., 2003. Controversies in synaptic vesicle exocytosis. *Journal of Cell Science*, 116, 3661-3666.
- Wood, P.M., 1988. The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem. J.*, 253 (1), 287–289

- Wu, L.J., Leenders, A.G.M., Cooperman, S., Meyron-Holtz, E., Smith, S., Land, W., Tsai, Y.L.R., Berger, U.V., Sheng Z.H., Rouault, A.T., 2004. Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood–brain barrier. *Brain Research*, 1001, 108 – 117.
- Vallada, H.P., Gill, M., Sham, P., Lim, L.C., Nanko, S., Asherson, P., Murray, R.M., McGuffin, P., Owen, M., Collier, D., 1995. Linkage studies on chromosome 22 in familial schizophrenia. *Am J. Med. Genet.*, 60, 139 –146.
- Vawter, M.P., Thatcher, L., Usen, N., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Freed, W.J., 2002. Reduction of synapsin in the hippocampus of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 7, 571–8.
- Zecca, L., Youdim, M.B., Riederer, P., Connor, J.R., Crichton, R.R., 2004. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (11), 863–873
- Zoccarato, F., Toscano, P., Alexandre, A., 2005. Dopamine-derived dopaminochrome promotes H₂O₂ release at mitochondrial complex I: stimulation by rotenone, control by Ca²⁺, and relevance to Parkinson disease. *J. Biol. Chem.*, 280 (16), 15587–15594

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Malatya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Malatya'da tamamladı. Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu. 2011 yılında, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Moleküler Biyoloji ve Genetik anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.