



**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

**MEZİAL TEMPORAL LOB EPİLEPSİ (MTLE)
PATOLOJİSİNDE WNT YOLAĞI GENLERİNİN
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

Ayşe YÜZBAŞIOĞLU

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

**ANKARA
2012**

Mezial Temporal Lob Epilepsi (MTLE) Patolojisinin Wnt Yolağı Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin İncelenmesi

ÖZET

Mezial temporal lob epilepsi (MTLE) insanda sık rastlanan ve iyi tanımlanmış semptomatik, lokalizasyon-bağımlı parsiyel bir epilepsi türüdür. En belirgin patofizyolojik özelliği yoğun hücre kaybı ve gliosis ile tanımlanan hipokampal skleroz olarak bilinmektedir. Bu konuda literatürde yer alan çalışmalar genellikle hayvan modellerine dayanmaktadır. Hasta dokuları ile yapılan çalışmalar ender olup, insandaki epileptogenezin ve nöropatolojik değişikliklerin anlaşılabilmesi açısından kıymetlidir. Bu tez çalışmasının amacı, Mezial Temporal Lob Epilepsi (MTLE)'li hastaların beyin biyopsi örneklerinde gözlenen hipokampal nöron ölümü (nörodejenerasyon) ile ilişkili olabilecek, sinyal ileti yollarından biri olan Wnt yolağında etkili genlerden Dickkopf-1 (DKK1), Beta-katenin (β -katenin), Glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3- β)'nın ekspresyon düzeylerini belirlemek ve MTLE'li hastalarda sklerozu olan ve olmayan gruplar arasında Wnt yolağında etkili bu genlerin ekspresyon farklılıklarını belirleyerek nörodejenerasyon süreci ve hastalık patolojisinin aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır. MTLE hastalarında, Dickkopf-1 (DKK1), Beta-katenin (β -katenin), Glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3- β) genlerinin ekspresyonları incelenmiştir.

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi DNA/Hücre Bankası, Beyin Bankası tarafından desteklenmiştir.

2012, 66 sayfa

Anahtar Kelimeler: MTLE, Hipokampal skleroz, Wnt Yolağı, Ekspresyon analizi

Expression Analysis of Wnt Pathway Genes in Mesial Temporal Lobe Epilepsy (MTLE) Pathology

ABSTRACT

Mesial Temporal Lobe Epilepsy (MTLE) is common, and well-defined form of symptomatic localization-related epilepsies. The typical pathological finding is hippocampal sclerosis which is characterized by selective neuronal loss and reactive gliosis. Studies in the literature mostly depend on animal models, the ones based on human tissues are rare but very valuable in understanding epileptogenesis and neuropathological changes in human. The aim of this thesis is to analyze the pathways that may be related to hippocampal neuronal death in Mesial Temporal Lobe Epilepsy (MTLE) biopsy samples. The main pathway that was analyzed in Wnt and the expression of Dickkopf-1 (DKK1), Beta-catenin (β -catenin), Glycogen synthase kinase 3- β (GSK3- β) genes that are a part of this pathway. We aimed at determining if there is a difference in the expression levels of these genes in sclerotic and nonsclerotic groups so that they may play a role as a marker for the neurodegenerative process and the pathology of the disease. The expression of Dickkopf-1 (DKK1), Beta-catenin (β -catenin), Glycogen synthase kinase 3- β (GSK3- β) have been investigated in MTLE patients.

This study was supported by Hacettepe University DNA/Cell Bank, Brain Bank.

2012, 66 pages

Key Words: MTLE, Hippocampal sclerosis, Wnt Pathway, Expression analysis

TEŞEKKÜR

Bana bu tez çalışmasını gerçekleştirme fırsatını veren danışmanım Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na, tüm çalışmalarında, her yönüyle desteğini esirgemeyen yol gösterici değerli hocam Prof. Dr. Meral ÖZGÜÇ'e, Tez İzleme Komitesi Üyesi Prof. Dr. Esra ERDEMLİ'ye, hasta seçimi, doku temini ve patolojik değerlendirmedeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Serap SAYGI, Prof. Dr. Nejat AKALAN, Prof. Dr. Figen SÖYLEMEZOĞLU'na, çalışmanın her aşamasında destek aldığım Hacettepe Üniversitesi DNA/Hücre Bankası'na, laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma, bu süreç boyunca gösterdikleri anlayış ve fedakarlıklardan dolayı aileme, sevgili eşim ve canım oğluma sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi DNA/Hücre Bankası, Beyin Bankası tarafından desteklenmiştir.

Ayşe YÜZBAŞIOĞLU

Ankara, Haziran 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Mezial Temporal Lob Epilepsisi (MTLE)	3
2.2. Klinik Karakterizasyon	3
2.3. Patolojik Karakterizasyon	4
2.3.1. Hipokampal skleroz	4
2.3.2. Lezyon-bağımlı MTLE	6
2.4. MTLE Çalışmalarında Hayvan Modelleri ve Hasta Dokuları	6
2.5. Hipokampal Skleroz-Epilepsi İlişkisi	7
2.6. Wnt Yolağı	8
2.6.1. Canonical (β -katenin) Yolak	9
2.6.2. GSK3- β	10
2.6.3. β -katenin	11
2.6.4. Dickkopf	11
2.7. DKK1-Nörodejenerasyon İlişkisi	12
2.8. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (<i>Real Time PCR</i>)	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1. Materyal	17
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	17
3.2.1. RNA izolasyonu	17
3.2.2. Agaroz-formaldehid jel elektroforezi (RNA elektroforezi)	17
3.2.3. cDNA sentezi	18
3.2.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (<i>Real Time PCR</i>)	18
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi	18
3.2.6. İmmünohistokimya	19

3.3. Yöntemler.....	19
3.3.1. Doku örnekleme	19
3.3.2. RNA izolasyonu	20
3.3.3. RNA'ların kalite kontrolü	20
3.3.4. cDNA sentezi	21
3.3.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (<i>Real Time PCR</i>).....	22
3.3.6. Verilerin analizi	23
3.3.7. İmmünohistokimyasal çalışmalar	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	24
4.1. Kantitatif RT-PCR Yöntemi ile mRNA Ekspresyon Analizleri	24
4.1.1. DKK1 geni mRNA ekspresyon analizi.....	25
4.1.2. β -katenin geni mRNA ekspresyon analizi	28
4.1.3. GSK3- β geni mRNA ekspresyon analizi	31
4.1.4. TBP geni mRNA ekspresyon analizi	34
4.2. İmmünohistokimya Bulguları	35
4.2.1. DKK1 antikorı immünohistokimya bulguları	36
4.2.2. β -katenin antikorı immünohistokimya bulguları	40
4.2.3. GSK3- β antikorı immünohistokimya bulguları.....	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
KAYNAKLAR	50
EKLER	55
EK 1. DKK1 immünohistokimya görüntüleri.....	55
EK 2. β -katenin immünohistokimya görüntüleri	58
EK 3. GSK3- β immünohistokimya görüntüleri	61
ÖZGEÇMİŞ	63

SİMGELER DİZİNİ

APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
bç	Baz çifti
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
Ct	<i>Treshold cycle</i>
CTNNb1	<i>Beta catenin gene</i>
DG	<i>Dentate gyrus</i>
dk	Dakika
DKK1	<i>Dickkopf 1</i>
Fzd	<i>Frizzled</i>
gr	Gram
GSK3-β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
H&E	<i>Hematoxylin and eosin</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HRM	<i>High resolution melting curve</i>
HS	<i>Hippocampal sclerosis</i>
kg	Kilogram
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
MTLE	<i>Mesial temporal lobe epilepsy</i>
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction</i>
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TLE	<i>Temporal lobe epilepsy</i>
Tm	<i>Melting temperature</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal hipokampal yapı	5
Şekil 2.2. (A) Normal hipokampal yapı, (B) Ağır hipokampal skleroz	5
Şekil 2.3. Canonical Wnt sinyal iletimi	10
Şekil 2.4. <i>Real Time</i> PCR ile amplifikasyonun kantitatif analizi	13
Şekil 2.5. SYBR Green tekniği	14
Şekil 2.6. Erime eğrisi analizi ile amplifikasyonun Tm derecesi ve özgüllüğünün belirlenmesi	15
Şekil 2.7. Eşik döngü değeri (treshold cycle = Ct).....	15
Şekil 4.1. DKK1 geni kantitatif RT-PCR sonuçları	25
Şekil 4.2. DKK1 geni kantitatif RT-PCR analiz grafiği.....	26
Şekil 4.3. β -katenin geni kantitatif RT-PCR sonuçları.....	28
Şekil 4.4. DKK1 geni kantitatif RT-PCR analiz grafiği.....	29
Şekil 4.5. GSK3- β geni kantitatif RT-PCR sonuçları.....	31
Şekil 4.6. GSK3- β geni kantitatif RT-PCR analiz grafiği	32
Şekil 4.7. TBP geni kantitatif RT-PCR sonuçları.....	34
Şekil 4.8. DKK1 immünohistokimya görüntüleri	36
Şekil 4.9. β -katenin immünohistokimya görüntüleri.....	40
Şekil 4.10. GSK3- β immünohistokimya görüntüleri.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Wyler'in HS sınıflaması	6
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve uzunlukları	23
Çizelge 4.1. DKK1 geni kantitatif RT-PCR analizleri	26
Çizelge 4.2. β -katenin geni kantitatif RT-PCR analizleri	29
Çizelge 4.3. GSK3- β geni kantitatif RT-PCR analizleri.....	32

1. GİRİŞ

Mezial temporal lob epilepsisi (MTLE) limbik yapılarda epileptojenik abnormalitelerle kendini gösteren bir sendrom olarak tanımlanmaktadır (Engel *et al.* 1997). Epileptik nöbetler beyinde ciddi ve uzun süreli hasarlara neden olabilmektedir. Nöbet sonrası, özellikle hipokampus bölgesinde nöronal hücre ölümü, nörogenezisde artış, aksonal filizlenme ve reaktif gliosis gelişebilmektedir. Antiepileptik ilaçlara rağmen nöbetleri hayatlarını aksatacak şiddet ve sıklıkta devam eden parsiyel epilepsili hastalar, rezektif epilepsi cerrahisine aday hasta olarak kabul edilip yatırılarak incelenirler. Prevalansı %1 olan bu hastalığın ilaçlarla nöbetleri kontrol edilemeyen hasta oranı %20 dir. MTLE için standart cerrahi, hipokampus ve amigdalayı da içeren amigdalahipokampektomi yapılmasıdır.

MTLE hastalarından amigdalahipokampektomi sırasında elde edilen dokular “Hacettepe Üniversitesi DNA/Hücre Bankası, Beyin Bankası’nda taze dondurulmuş olarak saklanmaktadır. 2001 yılında Hacettepe Üniversitesi DNA/Hücre Bankası bünyesinde oluşturulan “Beyin Bankası” için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu’ndan onay alınmıştır (Sayı: B.30.2.HAC.0.01.00.05/267). Fonksiyonel genomik çalışmalar açısından uygun şartlarda bankalanmış, taze dondurulmuş kaliteli doku örnekleri çok kıymetlidir.

Bu tez çalışmasının amacı, Mesial Temporal Lob Epilepsi (MTLE)’li hastaların beyin biyopsi örneklerinde gözlenen hipokampal nöron ölümü (nörodejenerasyon) ile ilişkili olabilecek, sinyal ileti yollarından biri olan Wnt yolağında etkili genlerden Dickkopf-1 (DKK1), Beta-katenin (β -katenin), Glikojen sentaz kinaz 3β (GSK3- β)’nın ekspresyon düzeylerini belirlemek ve MTLE’li hastalarda sklerozu olan ve olmayan gruplar arasında Wnt yolağında etkili bu genlerin ekspresyon farklılıklarını belirleyerek nörodejenerasyon süreci ve hastalık patolojisinin aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır.

MTLE’li hasta örneklerinde yapılan çalışmalar sayıca kısıtlı olmakla birlikte insandaki epileptogenezin ve nöropatolojik değişikliklerin anlaşılabilmesi açısından oldukça kıymetlidir (Özbaş-Gerçeker *et al.* 2006, Yüzbaşıoğlu *et al.* 2009). Hastalarda nörodejenerasyon sürecinin aydınlatılması açısından, literatürde özellikle nörodejeneratif hastalıklarda ekspresyon düzeyinin arttığı belirlenmiş DKK1 geninin MTLE’li hasta örneklerindeki mRNA ekspresyonu oldukça önemlidir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar,

patolojik klasifikasyonu kolaylaştıracak belirleyicilerin ve tedavi edici ajanların tasarlanmasına yönelik hedef genlerin tanımlanmasına katkı sağlamaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Mezial Temporal Lob Epilepsisi (MTLE)

Epilepsi santral sinir sisteminde, kortikal ve subkortikal alanlarda bulunan nöron gruplarının hızlı, anormal ve hipersenkron deşarjları ile meydana gelen ve çoğunlukla tekrarlayıcı özellikte olan bir klinik tablodur.

İdiyopatik epilepsiler genetik yatkınlık dışında bir sebebi belirlenememiş, başka bir nörolojik hastalıkla ilişkisi olmayan epilepsilerdir. Çocukluk dönemi ya da erken erişkin dönemde başlarlar. Semptomatik epilepsiler serebral bozukluklara bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülen epilepsilerdir. Semptomatik epilepsilerin etyolojisinde konjenital bozukluklar, kafa travmaları, enfeksiyonlar, kitle lezyonları, metabolik bozukluklar, vasküler lezyonlar, dejeneratif hastalıklar gibi nedenler bulunmaktadır.

MTLE insanda sık rastlanan ve iyi tanımlanmış semptomatik, lokalizasyon-bağımlı parsiyel bir epilepsi türüdür (Engel *et al.* 1997). En belirgin patofizyolojik özelliği hipokampal skleroz olarak tanımlanmaktadır. Hipokampal skleroz “Cornu Ammonis” bölgesinde seçici nöron kaybı ve reaktif gliosis ile karakterize edilebilir (Lothman *et al.* 1991, Blümcke *et al.* 2002)). Bu süreçte astrosit hücrelerinde morfoloji değişiklikleri ve gen ekspresyon farklılıkları bulunmaktadır. Bunun yanı sıra entorhinal korteks ve amigdala gibi diğer mezial temporal yapılarda da nöron kaybı gözlenebilmektedir (Miller *et al.* 1994).

2.2. Klinik Karakterizasyon

MTLE, limbik yapılarda epileptojenik abnormalitelerle kendini gösteren bir sendromdur (Engel *et al.* 1997). Hastaların çoğunda, çocukluk çağı febril nöbetleri ya da kafa travması/intraserebral enfeksiyonlar görülmektedir (Mathern *et al.* 1995). Hastalardaki en belirgin nöbet tipi bilinç bulanıklığı, yutkunma, çiğneme gibi otomatizmalar, gözleri tek noktaya dikme ile kendini gösteren ve 1-2 dakika devam eden kompleks parsiyel nöbetlerdir. Temporal lob kökenli bu nöbetlerin büyük bir kısmı hipokampus gibi mezial yapılardan kaynaklanmaktadır (Liu *et al.* 1995).

Tedavi aşamasında başlangıçta hastalar anti-epileptik ilaçlara yanıt vermekte ve nöbetsiz birkaç yıl geçirmektedirler. Dirençli (intractable) tür epilepsilerde adolesan veya erken erişkin dönemde tekrarlayan nöbetlerin anti-epileptik ilaçlarla tedavisi mümkün olamamaktadır. Hastalardaki ilaca direncin nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Ancak ilaca dirençli MTLE hastalarının, hipokampus ve amigdalayı da içeren temporal lobektomi

uygulanmasıyla 2-5 yıllık takiplerde %60-80 oranında nöbetsiz oldukları bilinmektedir. Bu nedenle de MTLE, “cerrahi ile tedavi edilebilir” epilepsilere bir prototip oluşturmaktadır (Engel 1996). Cerrahi müdahale sonrasında hastalarda epileptik nöbetler azalmakta ya da kaybolmaktadır (Olivier 1992).

2.3. Patolojik Karakterizasyon

Amigdalahipokampektomi sırasında amigdala ve hipokampusun cerrahi girişimle çıkarılması sonucunda hastaların büyük çoğunluğunda nöbetlerin azalması ya da kaybolması (Zentner *et al.* 1995) MTLE’de mezial temporal yapıların etkili olduğunu göstermektedir.

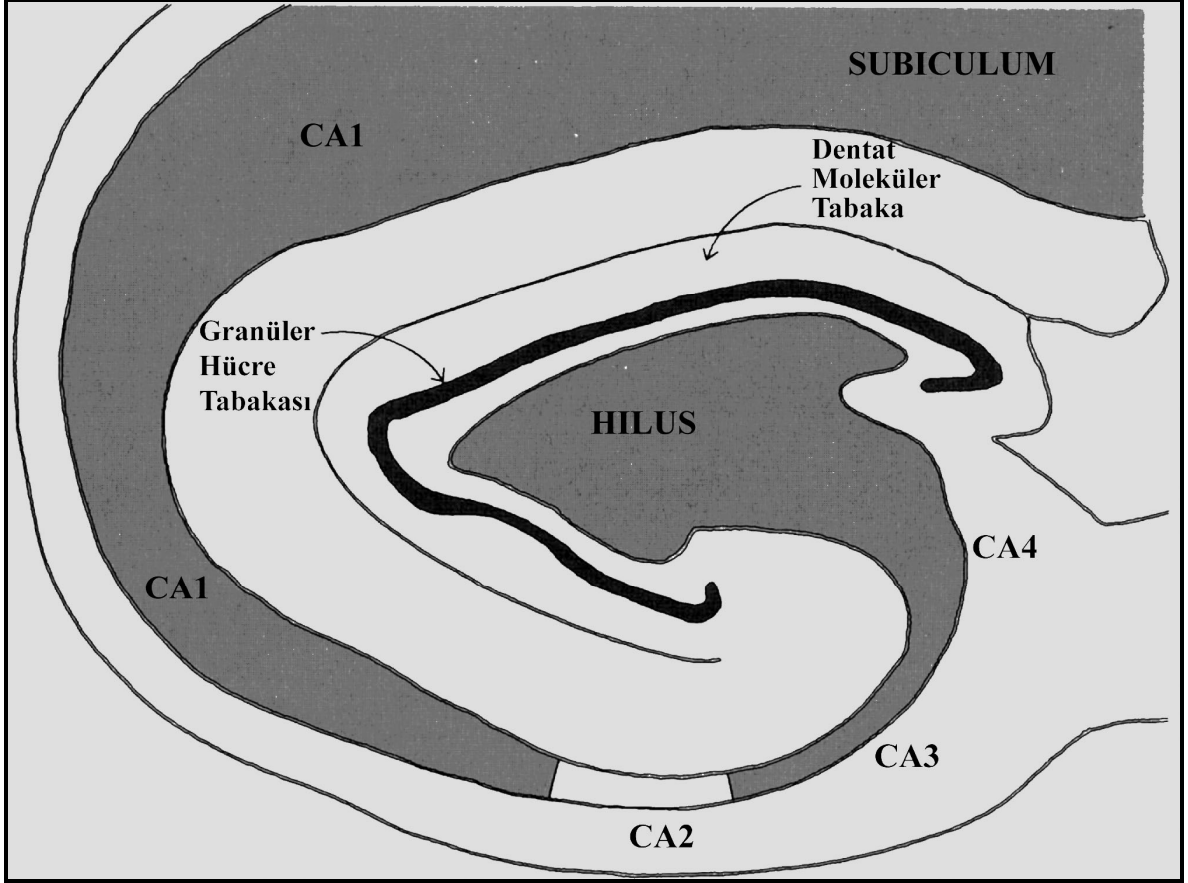
Hipokampal bölge, Dentat girus (DG), *Cornu Ammonis* (CA) ve subikular kompleks olmak üzere 3 ana kısımdan oluşmaktadır (Sloviter 1994, Duvernoy 2005). *Cornu Ammonis* bölgesi, CA1, CA2, CA3, CA4 (Şekil 2.1.) olarak adlandırılan alt bölgelerden oluşmaktadır. Bu bölgeler piramidal nöron hücrelerinin büyüklükleri açısından farklılık gösterirler.

2.3.1. Hipokampal skleroz

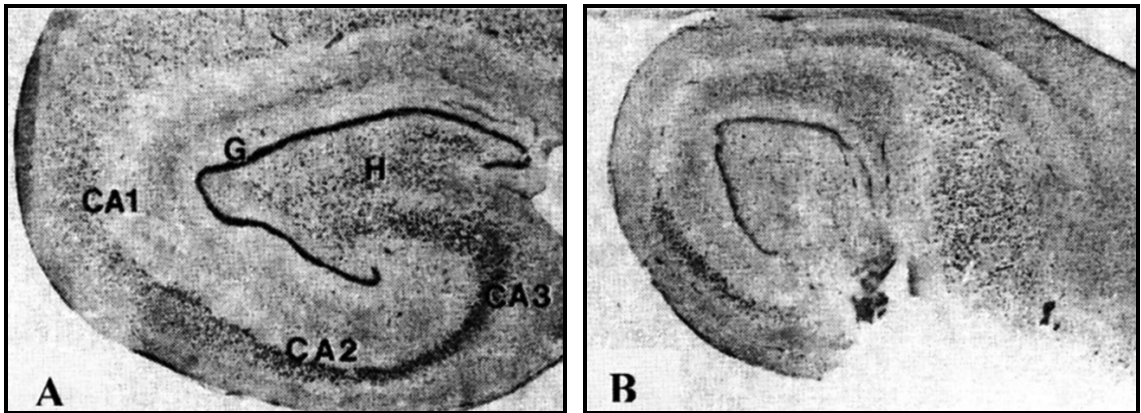
MTLE’de en belirgin patolojik bulgu hipokampal skleroz (HS) dur. HS, hipokampal yapıda atrofi, seçici nöron kaybı, reaktif gliosis ve sinaptik reorganizasyon ile karakterize edilir (Şekil 2.2.). Çizelge 2.1’de HS’nin evreleri ve bu evrelerin karakteristik patolojik özellikleri verilmiştir (Wyler *et al.* 1992). CA1 ve CA4 bölgeleri nöron kaybının en ağır olduğu bölgelerdir. CA2 ve DG bölgeleri ise hücre ölümüne karşı dirençli, korunmuş bölgelerdir (Kim *et al.* 1990). Kalsiyum bağlayıcı bir protein olan kromogranin A’nın hipokampusta dağılımı incelendiğinde, CA2 ve DG bölgelerindeki nöronal hücrelerde çok miktarda bulunduğu gözlenmiştir (Munoz 1990). Kromogranin A’nın nöronal kalsiyum tamponu oluşturması ve nöropeptitler için haberci rolü oynaması ile bu hücreleri eksitotoksik hücre ölümüne karşı koruyabildiği düşünülmektedir (Blümcke *et al.* 1999).

HS’de nöronal hücre kaybının olduğu bölgelerde astrosit ve mikroglia hücrelerinin aktivasyonu ve proliferasyonu ile tanımlanan reaktif gliosis görülmektedir. Astrosit hücrelerinde bu süreçte morfoloji değişiklikleri olmaktadır (Thom *et al.* 2002). Yoğun olarak görülen fibriler astrogliosis sonucunda, dokuda büzüşme ve sertleşme meydana gelmektedir. Aynı zamanda entorhinal korteks ve amigdala gibi diğer mezial yapılarda da nöron kaybı gözlenebilmektedir (Miller *et al.* 1994).

HS'de Mossy lifi filizlenmesi (MSF) deneysel epilepsi modellerinde de gözlenebilen diğer bir bulgudur (Sloviter 1987). Epileptik hipokampusta görülen MSF, CA3 bölgesindeki piramidal hücrelerin kaybı ile bağlantılıdır (Sutula *et al.* 1989).



Şekil 2.1. Normal hipokampal yapı (Sloviter 1994)



Şekil 2.2. (A) Normal hipokampal yapı, (B) Ağır hipokampal skleroz CA1, CA3 ve hilar (H) bölgede ağır nöron kaybı görülmektedir, CA2 ve granüler bölge (G) korunmuştur (Sloviter 1994)

Çizelge 2.1. Wyler'in HS Sınıflaması (Wyler 1992)

Evre	Patolojik Bulgu
I	Hipokampal piramidal hücre katmanının CA1, CA3 ve/veya CA4 sektörlerinde düşük oranda gliosis vardır, nöron kaybı yoktur.
II	CA1, CA3 ve/veya CA4 sektörlerinde belirgin gliosis ve %50'den daha az nöron kaybı vardır.
III	CA1, CA3 ve CA4 sektörlerinde ağır hasar ve gliosis mevcuttur. %50'den fazla nöron kaybı vardır. Dirençli sektör olan CA2 korunmuştur.
IV	Hipokampal piramidal hücre katmanının bütün sektörlerinde belirgin gliosis ve %50'den fazla nöron kaybı vardır.

2.3.2. Lezyon-bağımlı MTLE

MTLE hastalarının bir grubunda mezial temporal lob içerisinde hipokampus dışı fokal lezyonlar bulunmaktadır. Bunlar arasında ganglioma ve disembriyoblastik nöroepitelyal tümörler, astrositomalar, oligodendrogliomalar gibi glio-nöronal lezyon ve malformasyonlar yer almaktadır. Bu lezyonların ortak özellikleri temporal lobda lokalize olmaları, kronik kontrolsüz nöbetlerle seyretmeleri ve iyi huylu olmalarıdır (Wolf *et al.* 1993). Lezyon-bağımlı MTLE hastalarının bir kısmında hipokampal sklerozda gözlenen karakteristik nöropatolojik bulgulara rastlanmayabilir, ancak bazı hastalarda çift patoloji (*dual pathology*) olarak ifade edilen HS ve lezyonlar birlikte gözlenebilir (Blümcke *et al.* 1999, Salanova *et al.* 2004).

2.4. MTLE Çalışmalarında Hayvan Modelleri ve Hasta Dokuları

Hayvan modelleri MTLE araştırmalarında sık tercih edilen bir yaklaşım olarak kullanılmaktadır. Deneysel epilepsi modellerinde kontrol ve epileptik grupların mevcut olması, elektrofizyolojik, nöropatolojik ve moleküler biyolojik çalışmalar için avantaj sağlamaktadır. Hayvan modellerinin diğer bir katkısı ise epileptojenik mekanizmaların ve gelişme sürecinin incelenmesine olanak sağlamalarıdır. Deneysel epilepsi modelleri olan kainik asit, pilokarpin ve tutuşturma yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

MTLE hasta örneklerinde yapılan çalışmalar, sayıca kısıtlı olmakla birlikte insandaki epileptogenezin ve nöropatolojik değişikliklerin anlaşılabilmesi açısından oldukça kıymetlidir.

Epilepsi hastalarından elde edilen beyin dokularında yapılacak çalışmalarda en önemli sorun ise sağlıklı ve yaş-uyumlu kontrol dokularının bulunmasının zorluğudur. Bu nedenle

Çalışmalarda, daha çok HS ve lezyon-bağımlı MTLE hasta örneklerinin karşılaştırılması üzerinde yoğunlaşmış ve yapısal değişiklikler ile nöbet şiddeti / süresi arasında ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Her iki grupta da örneklerin eldesi sonrası işlenme sürecinin aynı olması ve moleküler biyolojik / elektrofizyolojik çalışma yapmaya uygun olmaları avantaj olarak değerlendirilebilir.

2.5. Hipokampal Skleroz-Epilepsi İlişkisi

İnsanda HS ve kronik epilepsi gelişimine neden olan olaylar sürecinin anlaşılmasına yönelik sistematik bir çalışma yapılamamaktadır çünkü hipokampal doku ancak kronik MTLE'nin ileri aşamalarında elde edilmektedir. Bu nedenle, nöropatolojik bulguların epileptogenezde etken mi yoksa tekrarlayan epileptik nöbetlerin sonucu mu olduğu net bilinmemektedir. Temporal lob epilepsi (TLE) hastalarının hipokampal hücre yoğunluğunun kontrol örneklerle ve ekstra-hipokampal odaklı epilepsi hastalarına göre daha az olması, HS ve TLE arasında bir ilişki olduğu düşüncesini desteklemektedir. İlaça dirençli TLE hastalarında hasarlı hipokampal yapının cerrahi girişimle eksizyonu sonucunda hastalarda nöbetlerin azaldığı ya da ortadan kalktığının görülmesi, özellikle HS varlığında cerrahi sonrası başarı oranının artması da bu ilişkiyi destekler yöndedir (Olivier 1992).

Retrospektif alışmalar MTLE hastalarındaki HS ile çocukluk ağı uzun febril ataklarının ilişkili olduğunu göstermektedir (Sagar *et al.* 1987, French *et al.* 1993, Davies *et al.* 1996) Ancak ocukluk çağında uzun febril atakları olmayan hastalarda da HS patolojisinin gözlenmesi çelişki oluşturmuştur. Retrospektif alışma sonuçlarında kafa travması, ensefalit, menejit ve hipoksi gibi hasarların da HS gelişimine etken olabileceği görülmüştür (Mathern *et al.* 1995). Bu nedenle febril nöbetlerin HS ve dolayısıyla TLE'ye neden olduğunu net olarak söyleyemeyiz.

HS ve epilepsi ilişkisinin aydınlatılmasında en büyük katkı deneysel hayvan modellerindendir. Yapılan çalışmalarda hipokampustaki ağır nöron kaybının sinaptik reorganizasyon ve sinyal iletiminde değişmelere neden olduğu ve beraberinde epileptik nöbetleri getirdiği ne sürülmektedir (Sloviter *et al.* 1991)

Deneysel havyan modelleri ve retrospektif çalışmaların artırılması HS ve epilepsi ilişkisinin aydınlatılması için büyük önem taşımaktadır.

2.6. Wnt Yolağı

Hücre sinyal ileti yolları, hücre ile ilgili bütün biyolojik aşamalarda etkilidirler. Embriyonik süreçte bu yollar, hücre gruplarının işlevlerini düzenleme ve hücreler arasındaki iletişimi sağlamada; erişkin dönemde ise homeostazisin sürdürülmesi ve rejenerasyon gibi süreçlerde önemli görevleri gerçekleştirirler. Bu yollarda oluşabilecek işlevsel bozukluklar ve hatalar, hücrelerde patolojik değişimlere neden olmaktadır. Wnt yolağı, santral sinir sistemi patolojilerinde ve nörodejenerasyonda son yıllarda araştırmaların yoğunlaştığı önemli sinyal ileti yollarından biridir. Günümüzde Wnt sinyal iletinin, canonical (klasik) ve non-canonical (klasik olmayan) olarak ikiye ayrıldığı kabul edilmektedir. Canonical yolağın temelinde, β -katenin'in sitoplazmik artışı ve sonrasında hücre çekirdeğine geçişi yer alır. β -katenin, çekirdekte transkripsiyon faktörleri TCF/LEF ile kompleks oluşturarak, c-myc ve siklin D gibi çoklu hedef genlerle etkinleşerek transkripsiyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır (Taketo 2004, Nojima *et al.* 2007).

Wnt adı, Wingless (Wg) ve Int genlerinin birleşimi ile oluşmuştur. Wingless geni, “*Drosophila melanogaster* segment polarite geni” olarak tanımlanmıştır. Metamorfозda erişkin eklem oluşumu ve embriyogenez boyunca işlev göstermektedir. Int genleri ise, omurgalı genleri olarak tanımlanmıştır. Int-1 ve Wingless geninin kodladığı ürünler evrimsel olarak korunmuş benzer aminoasit dizilerine sahiptirler ve Wingless, Int1'in *Drosophila* homologudur.

Wnt'ler ilk olarak memeli onkogenleri olarak tanımlanmış, daha sonra da embriyogenez boyunca hücre-hücre etkileşimlerini düzenleyen genler olarak tanımlanmışlardır (Ugolini *et al.* 2001). Wnt proteinleri; evrimsel açıdan yüksek düzeyde korunmuşlardır ve hayvanlarda gelişimsel süreçte ve homeostaziste çok önemli görevleri olan moleküllerdir (Logan *et al.* 2004, Coudreuse *et al.* 2007). Hücre yapışması (adhezyon), hücre göçü (migrasyon), apoptoz, hücre kutuplaşması (polaritesi), çoğalma (proliferasyon), gelişim (development), organogenez gibi birçok biyolojik süreçte rol üstlenirler (Logan *et al.* 2004, Wideltz *et al.* 2005).

Memelilerde Wnt proteinleri; salgılanan, lipid modifiye, sistein aminoasidi açısından zengin glikoproteinlerdir (Polakis 2000, Logan *et al.* 2004). Wnt'ler, aminoasit dizi benzerliklerine göre gruplandırılmışlardır. Omurgasız canlılar ve memeli genomunun

tamamen anlaşılması ile insan ve farede 19, *Drosophila*'da 7, ve *C. elegans*'ta 5 adet Wnt geni tanımlanmıştır (Nusse 2005).

Hücreden salgılanan Wnt proteinleri, membranı yedi kez geçen Frizzled (Fzd) reseptör ailesi için ligand işlevi görürler ve Fzd proteinleri üzerinden, hücrede parakrin/otokrin sinyal iletisini tetiklerler (Polakis 2000, Logan *et al.* 2004). Memelilerde tanımlanmış olan 19 Wnt ve 10 Fzd proteini arasındaki ligand-reseptör özgüllüğü ile değişik ligand-reseptör birleşimlerinin, farklı hücre içi sinyal yollarını ne şekilde etkinleştirdiği tam olarak bilinmemektedir (Widelitz *et al.* 2005).

Günümüzde Wnt sinyal iletisinin “canonical” ve “non-canonical” olarak ikiye ayrıldığı kabul edilmektedir (Widelitz *et al.* 2005).

2.6.1. Canonical (β -katenin) Yolak

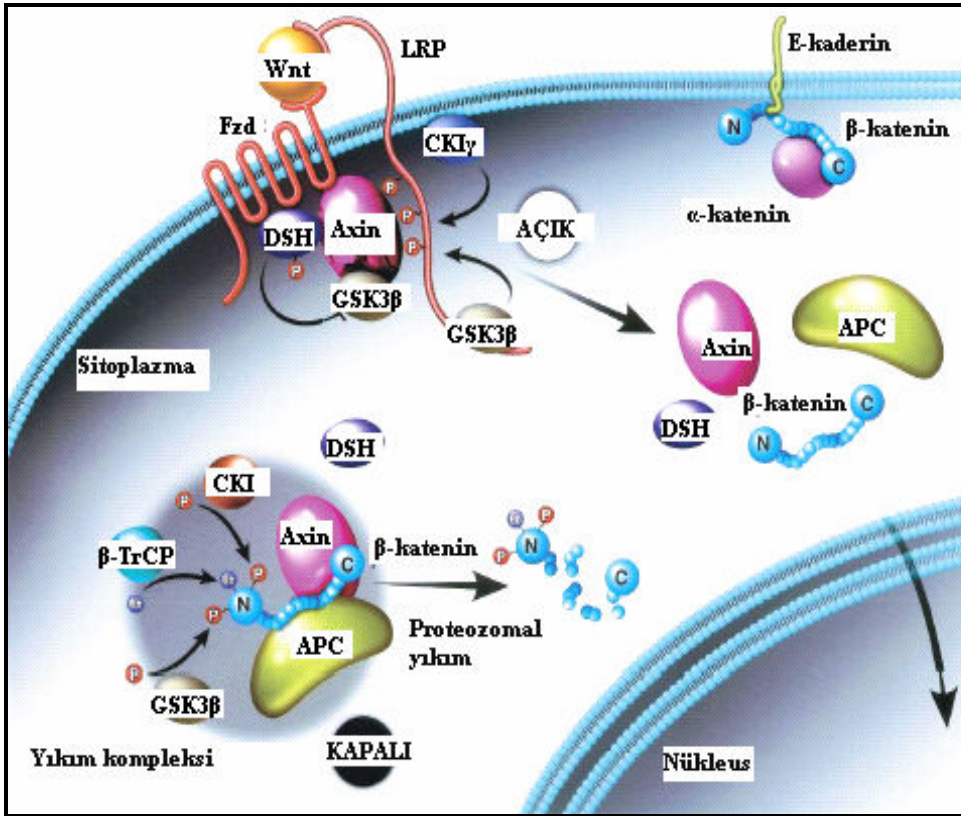
Canonical yolak, Wnt/ β -katenin yolağı olarak da tanımlanmaktadır (Şekil 2.3.). Genel olarak bu yolda, Wnt proteini ile Frizzled reseptörünün eşleşmesi sonucu, β -katenin'in yıkılması engellenir. Bu şekilde bulunduğu hücre sitoplazmasında miktarı artan β -katenin, sitoplazmadan çekirdek içine geçer (nükleer translokasyon) (Logan *et al.* 2004, Widelitz *et al.* 2005). β -katenin, çekirdekte transkripsiyon faktörleri TCF/LEF (T hücre spesifik transkripsiyon faktör / lenfoid enhancer bağlayıcı faktör) ile kompleks oluşturarak, aralarında c-myc ve siklin D'inde bulunduğu birçok hedef genin transkripsiyonunu etkiler.

Yolağı ayrıntılı olarak incelediğimizde; Wnt sinyal iletimi olmadığında, β -katenin yıkım kompleksi etkindir (Logan *et al.* 2004, Widelitz *et al.* 2005). β -katenin; Axin/APC (Adenomatöz polipozis coli)/ Casein kinaz 1'i içeren protein kompleksinde, GSK3- β tarafından NH₂ terminalinden fosforillenir. Fosforilenen β -katenin, ubiquitin proteozom yolağı ile kısa sürede yıkılır (Nojima *et al.* 2007).

Drosophila'da Wnt sinyalinin yokluğunda TCF Groucho ile kompleks oluşturarak, Wnt/Wg hedef genleri için baskılayıcı olarak hareket eder. Bu etki Groucho'nun Histon Deasetilaz (HDAC) ile ilişkisi aracılığıyla olmaktadır. β -katenin nükleusa girince, TCF baskılayıcı kompleksini, transkripsiyonel aktive edici komplekse dönüştürür. Aktivasyonun, TCF/LEF kompleksinden Groucho'nun ayrılması ve TCF/LEF'e histon asetilaz CBP/p300'ün bağlanması ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Nusse 2005).

Wnt ligandının, koreseptör LRP 5 veya 6'nın (Low-density lipoprotein receptor-related protein) varlığında Fzd reseptörüne bağlanmasıyla Wnt sinyal iletisi tetiklenir ve sinyal

hücre içine aktarılır (Willert *et al.* 1998, Logan *et al.* 2004). Böylece, normalde β -katenin'i yıkım için hedefleyen Axin-APC (Adenomatöz polipozis coli)-GSK3- β kompleksi baskılanır (Logan *et al.* 2004, Widelitz *et al.* 2005). Bu süreçte en önemli etki, Dishevelled (Dvl) proteininin aktive olmasıdır. Kazein kinaz 1(Casein KinaseI-CKI) ve PKC α tarafından Dishevelled proteinlerinin fosforilasyonu tetiklenir (Schlange *et al.* 2007) Fosforillenmiş olan Dvl, Axin-APC-GSK3- β kompleksini bozarak β -katenin'in fosforillenmesini engeller (Nojima *et al.* 2007). Bu şekilde β -katenin, sitoplazmada birikir ve hücre çekirdeğine geçer. Burada TCF /LEF transkripsiyon faktörleri ile kompleks oluşturarak hedef genlerin ekspresyonunu tetikler (Taketo 2004, Nojima *et al.* 2007).



Şekil 2.3. Canonical Wnt sinyal iletimi (Willert *et al.* 2006)

Wnt sinyal iletimi üzerine yapılan çalışmalar çoğunlukla β -katenin yolağı (canonical yolak) üzerinde yoğunlaşmış olmakla birlikte, son zamanlarda Wnt proteinleri ve ilişkili oldukları diğer proteinlerin, β -katenin yolağından bağımsız etkileri de araştırılmaktadır.

2.6.2. GSK3- β

GSK3- β birçok işlevi bulunan bir serin treonin kinazdır. Wnt sinyal iletim yolağında anahtar rolü oynayan proteindir. Kinaz özelliğinden dolayı çeşitli proteinlere bağlanarak

fosforile etme özelliğine sahiptir. Wnt/ β -katenin sinyal iletimindeki işlevi, farklı görevlerinden sadece birisidir. Bunun yanında pek çok onkogenik transkripsiyon faktörü ve proto-onkoprotein, GSK3- β kinaz substratı olduğu varsayılmakta ve inaktivasyonlarının buna bağımlı olduğu düşünülmektedir. Bu düşünceye göre, GSK3- β neoplastik transformasyon ve tümör gelişiminde rol oynamaktadır (Shakoori *et al.* 2005).

2.6.3. β -katenin

β -katenin, hücrelerarası bağlantılardaki E-kadherin komplekslerinin yapısal bir bileşenidir ve kadherin hücre adhezyon molekülünün sitoplazmik alanına bağlanarak hücre- hücre adhezyonunda görev alan bir polipeptiddir (Gumbiner 1997, Nelson *et al.* 2004, Willert *et al.* 2006).

Bir başka işlevi de nükleusta transkripsiyonu aktive etmek için, kromatin yeniden modelleme kompleksine katılmasıdır (Willert *et al.* 2006). Bununla birlikte β -katenin, Wnt proteinleri tarafından başlatılan sinyal iletim yolağının en önemli anahtar molekülüdür. β -katenin aktivitesi, onun yerleşimini ve stabilitesini etkileyen çok sayıda protein tarafından düzenlenerek kontrol edilmektedir (Willert *et al.* 1998).

β -katenin düzeyi Wnt uyarımı olmadığında, proteozomal yolk tarafından yıkıldığından düşüktür, ancak Wnt sinyali varlığında proteozomal yıkımdan kurtulur ve düzeyi artmaktadır (Nelson *et al.* 2004, Habas *et al.* 2005). β -katenin geninde (CTNNb1) meydana gelen mutasyon, β -katenin yıkımı için gerekli olan serin ve threonin birimlerini etkiler. Bu mutasyon, β -katenin'in amino terminalindeki dizi ile direkt ilişkisini sağlayan β -TRCP (E3 ubiquitin ligazın bir bileşeni) ile β -katenin'in etkileşimine bağlı fosforilasyonu engeller. β -katenin'deki bu düzenleyici dizi, çoğu insan kanser türlerinde mutanttır (Polakis 2000). Pek çok tümör hücre hattında, onkogenik β -katenin mutasyonları sitozolde β -katenin'in birikimine sebep olmaktadır (Gumbiner 1997).

2.6.4. Dickkopf

Dickkopf proteinleri, salgılanan proteinlerdir ve omurgalılarda DKK 1, 2, 3, 4 olmak üzere 4 ana üyesi bulunan bir ailedir (Niehrs 2006). Wnt sinyali iletiminin hücre dışı antagonistleri olarak tanımlanmaktadır. Dickkopf proteinleri Wnt ile doğrudan ilişki kurmazlar, ancak canonical sinyal iletim yolağında LRP5/6 koreseptörünün etkisini engellemektedirler (Caldwell *et al.* 2004). Dkk 1, 2 ve 4 farklı affinitelerle LRP5 ve 6'ya bağlanır; oluşan DKK/LRP kompleksi, kremen proteini ile etkileşime girerek yıkım için hücre zarından hücre içine alınır. Böylece sinyal iletiminde rol oynayacak Wnt koreseptör

sayısı azalır (Krishnan 2006). Bunun dışında DKK2'nin, LRP-6'yı aktive ederek β -katenin'in birikimine neden olabileceği de ileri sürülmektedir (Niehrs 2006).

2.7. DKK1-Nörodejenerasyon İlişkisi

Wnt yolağı antagonisti olan DKK1 geninin ekspresyonu, nörodejenerasyon ile karakterize edilen santral sinir sistemi patolojilerinde artış göstermektedir (Rosi *et al.* 2010, Purro *et al.* 2012). Alzheimer, İskemi ve TLE gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöron ölümünün nedenlerinin aydınlatılabilmesi açısından DKK1 geni ekspresyonu önemlidir (Caraci *et al.* 2008). Wnt yolağı aktif olduğunda β -katenin sitoplazmada birikerek çekirdeğe geçer ve nöronların yaşamını sürdürmesi için gerekli olan nörotrofik genlerin transkripsiyonu tetiklenmiş olur. Wnt antagonisti DKK1 ile yolak inaktif olduğunda ise β -katenin sitoplazmada yıkıma uğrar ve nörotrofik genlerin transkripsiyonu gerçekleşemez, nörodejenerasyon gözlenir (Caraci *et al.* 2008). Bu aşamada DKK1 geninin kontrolünde p53 geni rol oynamaktadır (Wang *et al.* 2000).

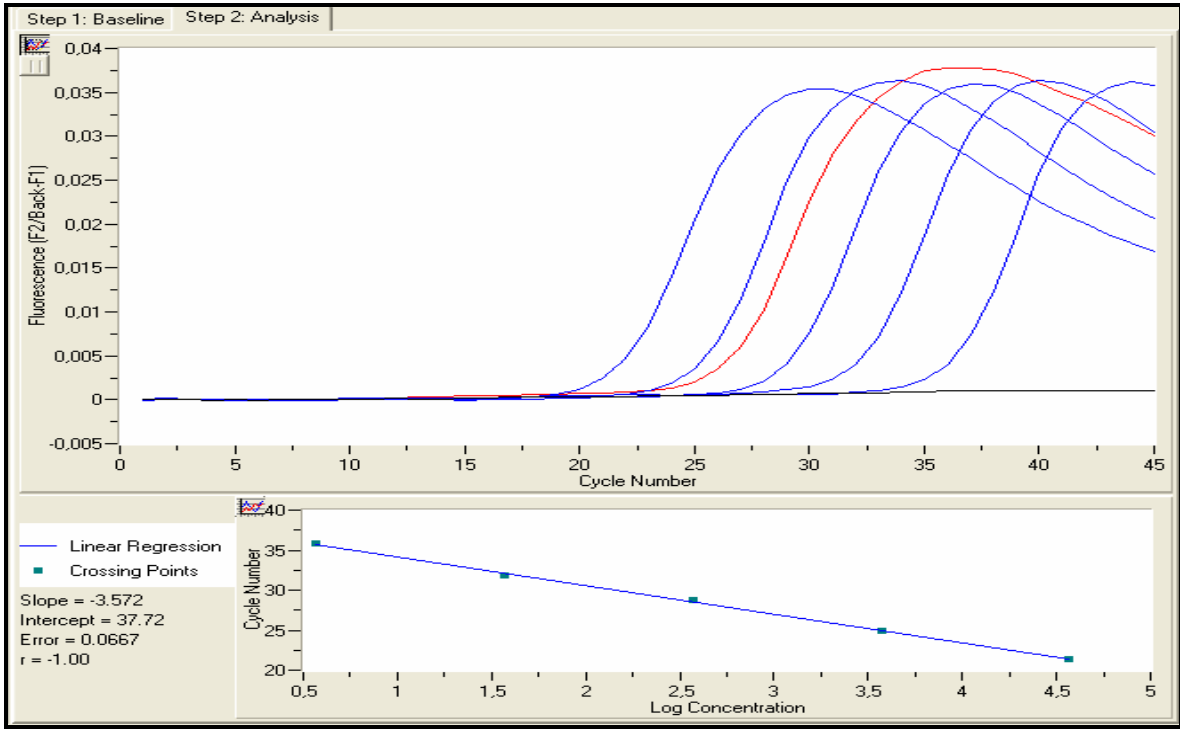
İskemili hayvanlarda DKK1 geninin susturulması ile (antisense oligonükleotidler kullanılarak) veya lityum iyonları kullanılarak hipokampal nöron ölümüne karşı koruma sağlanabildiği gösterilmiştir (Cappuccio *et al.* 2005).

Alzheimer'da hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki β -amiloid birikimi ve Tau proteininin hiperfosforilasyonu ile paralel olarak DKK1 ekspresyonu da artmıştır (Takashima *et al.* 1998, Scali *et al.* 2006). β -amiloid birikimi ve DKK1 ekspresyon artışı ile nörodejenerasyon da artmıştır (Caricasole *et al.* 2004).

Ağır nöron kaybı ile karakterize edilen TLE patolojisinde hayvan modelleri ve hastalarda DKK1 geni ekspresyon artışı gözlenmiştir (Busceti *et al.* 2007).

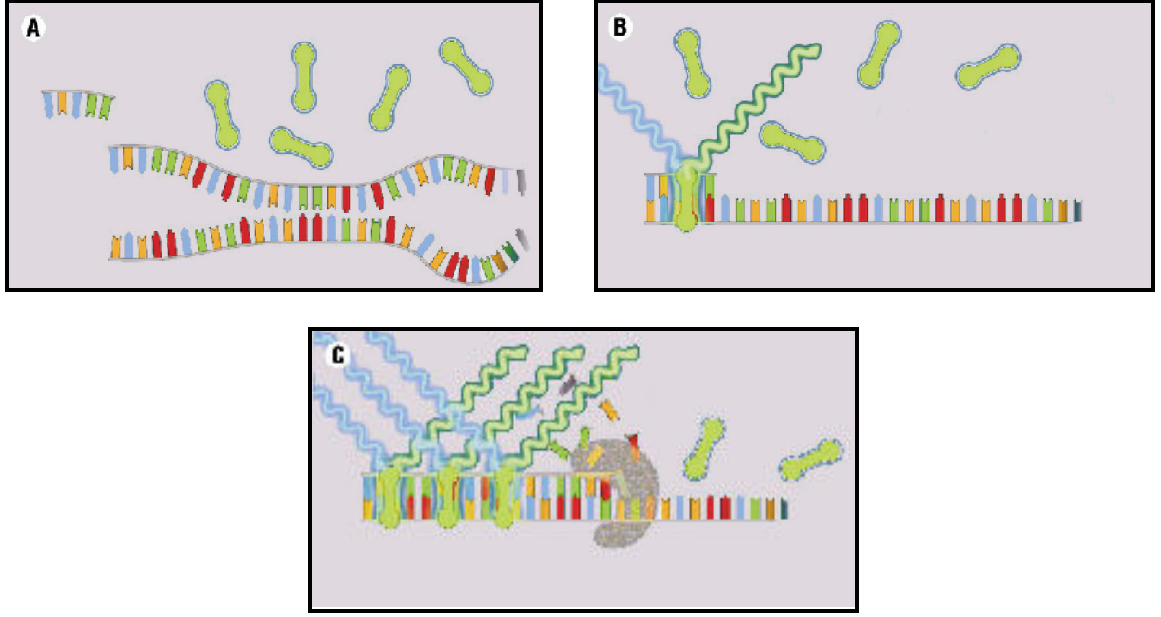
2.8. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR)

Real Time PCR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif sonuç verebilen PCR yöntemidir. Florojenik problemler veya SYBR Green I gibi interkalasyon yapabilen boyaların kullanımıyla amplifikasyon miktarının tespit edilmesini, klasik son nokta analizlerinin yapılmasına gerek olmadan sağlamaktadır (Nolan *et al.* 2006).



Şekil 2.4. *Real Time* PCR ile amplifikasyonun kantitatif analizi

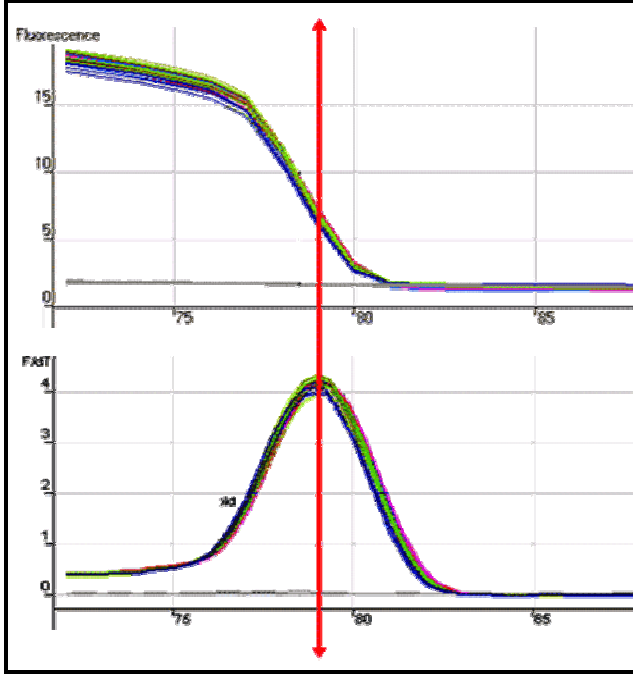
İnterkale olabilen boyalardan SYBR Green I, gen ekspresyonu kantitasyonunda sıklıkla kullanılan, çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan bir boyadır. Bu boyanın çift zincirli PCR ürününe interkale olmasıyla ürün miktarı ile orantılı olarak floresans açığa çıkmaktadır. SYBR Green tekniği ile gen ekspresyonu kantitasyonu için uygun primer seçimi en önemli aşamadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü vermemesi gereklidir. RNA izolasyonu sırasında sıklıkla gözlenen genomik DNA kontaminasyonu da SYBR Green tekniğinin başarısını tehdit eden bir diğer unsurdur. Özgül amplifikasyon ürünü elde etmek için, cDNA amplifikasyon primerlerinin farklı ekzonlardan seçilmesi, ampikon uzunluklarının kısa tutulması (120-250 baz) ve primerlerin bağlandığı ekzonların uzak seçilmesi dikkat edilmesi gereken noktalar.



Şekil 2.5. SYBR Green tekniği

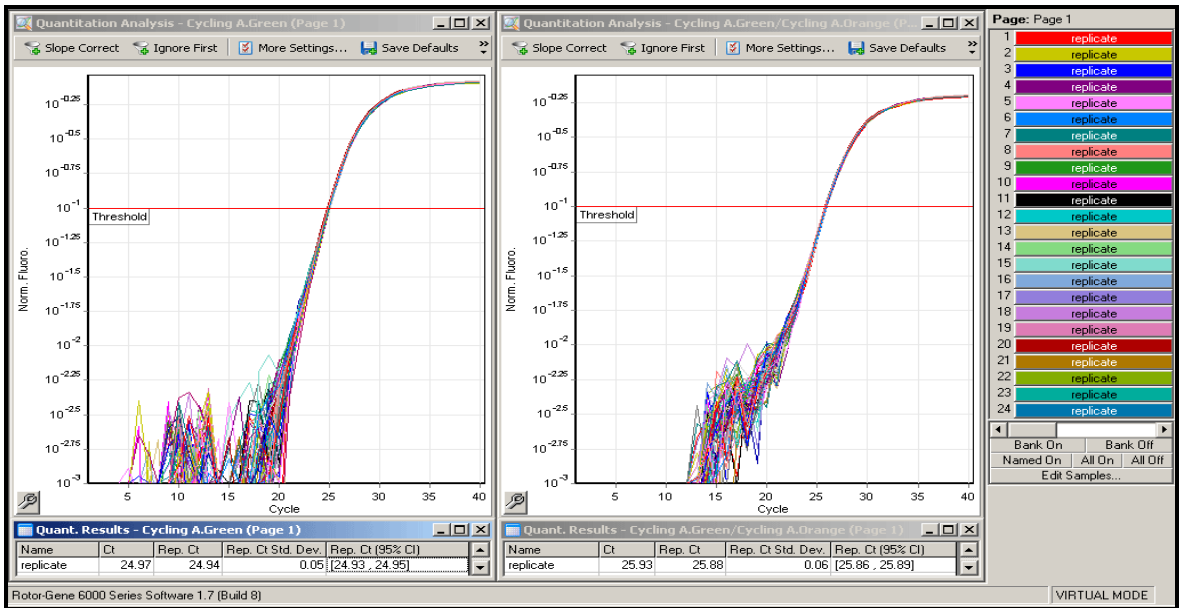
A) Başlangıç aşaması: Reaksiyonun başlangıcında ortamda SYBR Green, primerler ve tek zincirli DNA bulunduğu için floresans sinyal yoktur. **B)** Primerin hedef moleküle bağlanması: Primerin bağlanması ile amplifikasyon sonucu SYBR Green oluşan çift zincirli DNA'ya bağlanır ve az miktarda floresans sinyal açığa çıkar. **C)** Primer uzaması: Amplifikasyon oranına bağlı olarak çift zincirli DNA'nın yapısına daha fazla boya katılarak floresans sinyal artar.

SYBR Green I, primer dimerleri ve özgül olmayan PCR ürünleri gibi çift zincirli DNA moleküllerine de bağlanabilir (Bustin and Mueller 2005). Bu nedenle floresans artışı her zaman özgül amplifikasyonu göstermez. Primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift zincirli DNA kendine özgül “melting temperature, T_m ”(Çift zincirli DNA'nın %50'sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklık) değerine sahiptir. Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile floresans miktarı tespit edilir. Çift zincirli DNA denatüre olmaya başlayınca boya serbest kaldığı için ölçülen floresans miktarı düşmeye başlar. Bu şekilde elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun T_m derecesi saptanabilir ve reaksiyonun özgüllüğü belirlenir.



Şekil 2.6. Erime eğrisi analizi ile amplifikasyonun Tm derecesi ve özgülüğünün belirlenmesi

Eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) gen ekspresyonu kantitasyonunda önemli bir parametredir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile ürünün ilk anlamlı artışı olduğu noktayı belirtir (Corbett Life Science).



Şekil 2.7. Eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct)

Kantitatif RT-PCR verilerinin analizinde; mutlak ve relatif kantitasyon kullanılır. Relatif kantitasyon için, iki standart eğri ve karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılabilir (Wong and Medrano 2005).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında ilaca direnç gösteren MTLE'li hastalarda amigdalahipokampektomi ile çıkartılan (tedavi amaçlı) ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda bir kısmı parafine gömülerek incelenen hipokampus dokuları immün histokimyasal analizler için, DNA/Hücre Bankası - Beyin Bankası için taze dondurulmuş olarak saklanan hipokampus dokuları ise mRNA ekspresyon analizleri için kullanıldı. Kontrol dokusu olarak otopsi hipokampus dokusu kullanıldı. Çalışma kapsamında 2 adet otopsi, 5 adet epileptik-sklerotik olmayan, 8 adet epileptik-sklerotik hipokampus dokusu kullanılmıştır (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır , Sayı: B.30.2.HAC.0.01.00.05/267).

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

3.2.1. RNA izolasyonu

TRIzol (Invitrogen)

Kloroform (Applichem)

İzopropanol (Applichem)

Dietil pirokarbonat (DEPC, Applichem)

Etanol (Riedel)

3.2.2. Agaroza-formaldehid jel elektroforezi (RNA elektroforezi)

Agaroz (Cambrex)	: Moleküler biyoloji kullanımı saflığında	
MOPS tamponu	: MOPS	0,221 M
	Na-Asetat-Trihidrat (Sigma)	0,05 M
	Na ₂ EDTA (Sigma)	0,01 M
Yükleme tamponu	: Gliserol (Merck)	%50
	Na ₂ EDTA (Merck)	1 mM
	BPB boya (Merck)	%0,25
Etidyum bromür (Sigma)	: 10 mg/ ml distile su	
Formaldehid (Sigma)		

Formamid (Sigma)

3.2.3. cDNA sentezi

ImProm-II™ tampon	: Tris-HCL	250 mM
(5X) (Promega)	KCL	250 mM
	DTT	50 mM
ImProm-II™ RT (Promega)	: 1 µl/ reaksiyon	
MgCl ₂ (Promega)	: 25 mM	
Oligo(dT)15 primeri (Promega)	: 0,5 µg/ µl	
dNTP karışımı (Promega)	: 10 mM	

3.2.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*Real Time PCR*)

<i>SYBR Green</i> karışımı (Floresan boya)	: 20 mM Tris-HCL, pH: 8,3,
(2X) (Sigma)	100 mM KCl, 0,4 mM dATP,
	0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP,
	0,4 mM dTTP, Stabilizatör,
	0,05 u/µl Taq DNA polimeraz,
	Jump Start Taq antibody,
	<i>SYBR Green I</i> boyası
MgCl ₂ (Sigma)	: 25 mM

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz (Cambrex)	: Moleküler biyoloji kullanımı saflığında	
Tris-asetat tamponu (TAE) (pH: 8,0)	: Tris baz (Merck)	2 M
	Glasiyel asetik asit (Merck)	1,14 ml
	Na ₂ EDTA (Merck)	0,5 M
Yükleme tamponu	: Gliserol (Merck)	5,5 ml
	1X TAE tamponu (Merck)	4,5 ml
	Orange G boya (Merck)	0,01 gr

Etidyum bromür (Sigma)	: 10 mg/ ml distile su
Moleküler ağırlık belirleyicisi	: 100 bp DNA Ladder (Promega)
	(1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 baz çifti)

3.2.6. İmmünohistokimya

DKK1 antikor (SC-25516 – Santa Cruz – tavşan poliklonal)

β -katenin antikor (SC-7963 – Santa Cruz – fare monoklonal)

GSK3- β antikor (G-22320 – BD Transduction – fare monoklonal)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Doku örnekleme

MTLE hastalarından amigdalahipokampektomi sırasında elde edilen dokular “Beyin Bankası”nda taze dondurulmuş olarak saklanmaktadır. Fonksiyonel genomik çalışmalar açısından uygun şartlarda bankalanmış, taze dondurulmuş kaliteli doku örnekleri çok kıymetlidir. Bu amaçla doku örnekleme sürecinde aşağıdaki protokol izlenmektedir:

Doku, rezeksiyon sonrasında en fazla 5 dakika içinde kriyoprezervasyon için özel dizayn edilmiş çok düşük sıcaklıklara dayanıklı ve doku bütünlüğünün korunmasını sağlayan steril alüminyum kutu içerisine yerleştirilir.

Örnekler kuru buz veya sıvı nitrojen içerisinde en kısa sürede laboratuvara transfer edilir.

Örnek, kuru buz içerisinde taşınmış ise sıvı nitrojende şok dondurma yapılarak -80 °C derin dondurucuda saklanır. Örnek sıvı nitrojende taşınmış ise direk -80 °C’ye alınır.

Hasta ismi, dosya numarası, ön tanı, operasyon tarihi ve örneğin cinsi (ör: hippocampus, korteks, vs.) etikete yazılır ve dokuyu içeren alüminyum kutu, hazırlanan etiketle birlikte dondurma poşeti içerisine konarak derin dondurucu kutuları içerisinde saklanır.

Her dokuya -80 °C’deki lokalizasyonunu belirleyen bir kod verilir.

Beyin Bankası örnekleme formu her hasta için doldurulur ve bu bilgiler ayrıca bilgisayarda arşivlenir.

Patolojik incelemeler sonucunda hazırlanan raporun bir kopyası Beyin Bankası kapsamında dosyalanır.

Her örnekleme için operasyon öncesinde klinisyen tarafından hasta/hasta yakınına gerekli açıklama yapıldıktan sonra bilgilendirilmiş onam formu imzalatılır.

3.3.2. RNA izolasyonu

TRIzol içerisinde dondurularak -80 °C’de saklanan dokulardan oda sıcaklığına getirildikten sonra standart TRIzol izolasyon protokolü uygulanarak RNA izolasyonu yapıldı.

1. 100 mg doku üzerine 1 ml TRIzol eklenerek Fast Prep doku parçalayıcısı ile dokular homojenize edildi.
2. Homojenize edilen dokular 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
3. 200 µl kloroform eklendikten sonra vorteks yapıldı ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.
4. 12000 rpm de 15 dk 4 °C’de santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası oluşan en üst fazda bulunan RNA toplandı ve 500 µl izopropanol içeren yeni tüpe alındı.
6. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
7. 12000 rpm de 10 dk 4°C’de santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü. Pelet üzerine 1 ml DEPC içeren %70 etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
9. RNA’nın degrade olmasını ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk 4°C’ de santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası %70 etanol döküldü ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA peleti kurutuldu.
11. Pelet miktarına bağlı olarak 20-25 µl RNaz içermeyen su eklendi.
12. 60 °C’de 10 dk bekletildi ve analize kadar -20 °C’de, analiz sonrası -80 °C’de saklandı.

3.3.3. RNA’ların kalite kontrolü

İzole edilen RNA’lar kalite ve kantite açısından değerlendirilmek üzere denatüre jel elektroforezi (RNA elektroforezi; %1,5 Agaroz – formaldehid jel) ile incelendi,

konsantrasyonları Nanodrop ND-1000 cihazında ölçüldü. Elektroforez görüntüleri ve konsantrasyon ölçümleri izole edilen RNA'ların RT-PCR çalışmaları için uygun kalite ve kantitede olduklarını gösterdi.

3.3.4. cDNA sentezi

cDNA sentezi için, ImProm-II™ reverse transkriptaz enzimi (Promega) ve oligo(dT)15 primeri kullanıldı. Kalıp olarak 1 µg RNA kullanıldı ve 0,5 µg/µl oligo(dT)15 primeri ve RNaz içermeyen su ile 5 µl'ye tamamlanarak 70 °C'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 5 dk bekletildi. Ayrı bir tüpte 15 µl reverse transkripsiyon karışımı hazırlandı.

Reverse transkripsiyon karışımı:

	Final konsantrasyon	Hacim
RNaz içermeyen su		6,6 µl
Improm-II™ tampon (5X) (Promega)	1X	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	2,4 µl
dNTP karışımı (10 mM)	0,5 mM	1 µl
Improm-II™ Reverse Transkriptaz		1 µl
		Toplam: 15 µl

Toplam 20 µl olacak şekilde 5 µl RNA + primer karışımı, 15 µl reverse transkripsiyon karışımı ile birleştirilerek reverse transkripsiyon aşağıdaki koşullarda Applied Biosystems-9700 PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi:

25 °C'de 5 dk

42 °C'de 60 dk

70 °C'de 15 dk

Yukarıdaki reaksiyon sonucunda 20 µl cDNA sentezlendi. cDNA örnekleri daha verimli kullanılmak amacıyla 80 µl'ye sulandırıldı (20 µl cDNA + 60 µl distile su = 80 µl).

3.3.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*Real Time PCR*)

Hastalara ait hipokampus dokuları ve kontrol hipokampus dokularından RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA sentezi gerçekleştirildi β -katenin, GSK3- β ve DKK1 genlerinin cDNA dizilerine özgül primerler dizayn edildi ve RT-PCR çalışmaları için PCR optimizasyonları yapıldı. β -katenin, GSK3- β ve DKK1 genlerinin hastalara ait hipokampus dokuları ve kontrol hipokampus dokusundaki mRNA ekspresyon seviyeleri kantitatif RT-PCR yöntemi ile Rotorgene 6000 cihazında belirlendi. Bu çalışmada referans gen (normalizatör) olarak “Tata binding protein (TBP) kullanıldı. İlgilenilen genin ekspresyon düzeyinin referans gen ekspresyonuna oranı hasta ve kontrol örneklerinde karşılaştırıldı.

cDNA’lar RT-PCR tekniği ile ve SYBR Green floresan boyası kullanılarak çoğaltıldı. Bu amplifikasyon sırasında çift zincirli DNA’ya bağlanan SYBR Green miktarı florimetrik deteksiyon filtresiyle ölçülmektedir. Bu ölçümlerde floresans, DNA ürünü ile orantılı olarak değişmektedir. Rotor-gene 6000 cihazı, yüksek çözünürlükte erime eğrisi analizi (HRM) yapabilme özelliği ile primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gibi hataları gözlemlemeye olanak sağlamaktadır. RT-PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla kontrol hipokampus dokusundan elde edilen cDNA örneğinden 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlandı ve ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında analiz programı ile standart eğriler çizildi. Deneylerde her cDNA örneği ve standartlar birbirinin aynı 3 adet reaksiyon (triplicate) olarak çalışıldı.

RT-PCR Koşulları:

2X SYBR Green karışımı	5 μ l
25mM MgCl ₂	1,2 μ l
Forward primer (10 pmol/ μ l)	0,4 μ l
Reverse primer (10 pmol/ μ l)	0,4 μ l
cDNA	2 μ l
Distile su	1 μ l
Toplam: 10 μ l	

10 µl RT-PCR reaksiyonu Rotor-gene 6000 cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

94 °C’de 2 dk

94 °C’de 2 s
X °C’de 20 s } 40 döngü

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve uzunlukları

Gen	No		Oligonükleotid dizisi	Tm	bç
TBP	NM_003194	F	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	59,1	132
		R	5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'	59	
DKK1	NM_012242.2	F	5'-GTATTCCAGAAGAACCACCTT -3'	57.77	226
		R	5'-GACCTTCTCCACAGTAACAAC -3'	58.72	
CTNNB1 B-katenin	NM_001098209.1	F	5'- CCATTACAACCTCTCCACAACC-3'	59.05	193
		R	5'- ACCACTAGCCAGTATGATGAG -3'	59.17	
GSK3- β	NM_001146156.1	F	5'- GCTACCATCCTTATTCCTCCT -3'	58.88	228
		R	5'- ATTCTTTCCAAACGTGACCA -3'	58.12	

3.3.6. Verilerin analizi

RT-PCR sonuçları Rotor-gene 6000 series software version 1.7 (Build 61) yazılımı ile değerlendirilmiştir.

3.3.7. İmmünohistokimyasal çalışmalar

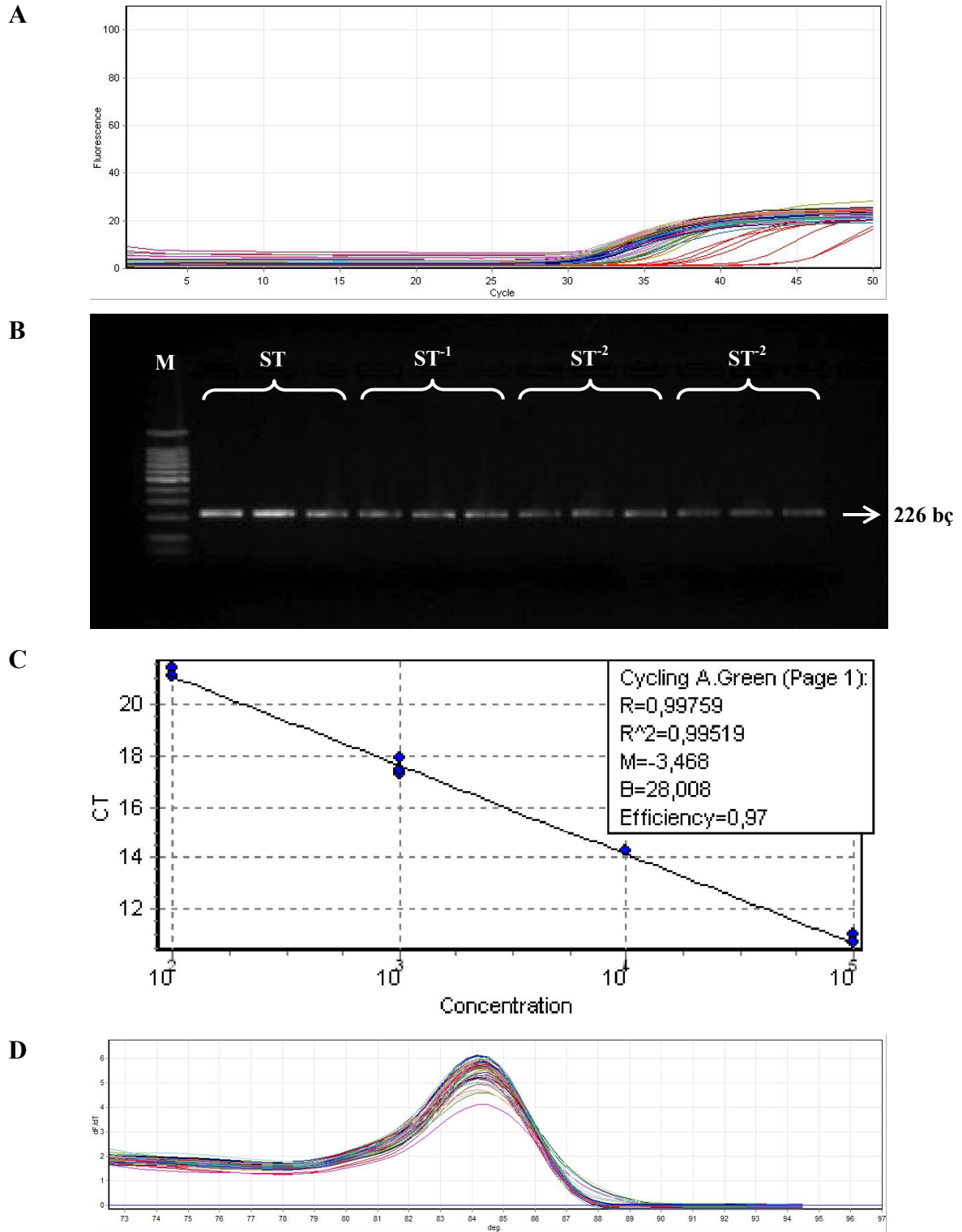
Parafin bloklardan 10 mikron kalınlığında kesitler alındı. 70 °C’de etüvde 1 saat deparafinize edilen dokular, xylol ve alkollerden geçirilerek hidrate edildi. Daha sonra blokaj yapılarak, primer antikorlar ile +4 °C’de bir gece bekletildi. Sekonder antikor ile inkube edilen kesitler diaminobenzidin (DAB) ve hematoksilen ile boyandı. Nikon Eclipse E600 ışık mikroskobu ile incelendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif RT-PCR Yöntemi ile mRNA Ekspresyon Analizleri

K1 ve K2 otopsi hipokampus dokuları, 1-5. örnekler epileptik-sklerotik olmayan hastaların hipokampus dokuları, 6-13. örnekler epileptik-sklerotik hastaların hipokampus dokularıdır.

4.1.1. DKK1 geni mRNA ekspresyon analizi

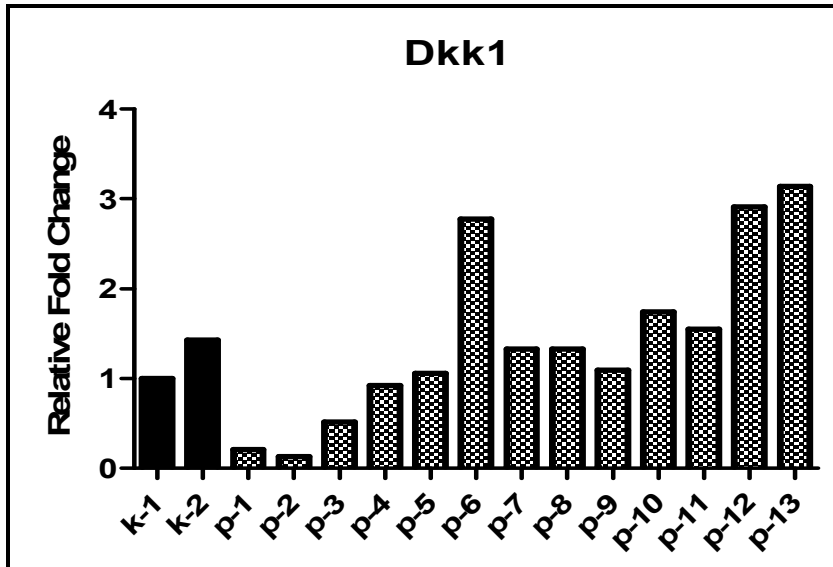


Şekil 4.1. DKK1 geni kantitatif RT-PCR sonuçları.

A) Standartların ve örneklerin gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B)** Standartların agaroz jel elektroforezi sonuçları. **C)** Standart grafik. **D)** Standartların ve örneklerin erime eğrisi

Çizelge 4.1. DKK1 geni kantitatif RT-PCR analizleri

Örnek	Kat artışı
k-1	1,97
k-2	1,43
p-1	0,21
p-2	0,13
p-3	0,52
p-4	0,92
p-5	1,06
p-6	2,78
p-7	1,33
p-8	1,33
p-9	1,09
p-10	1,74
p-11	1,55
p-12	2,91
p-13	3,14



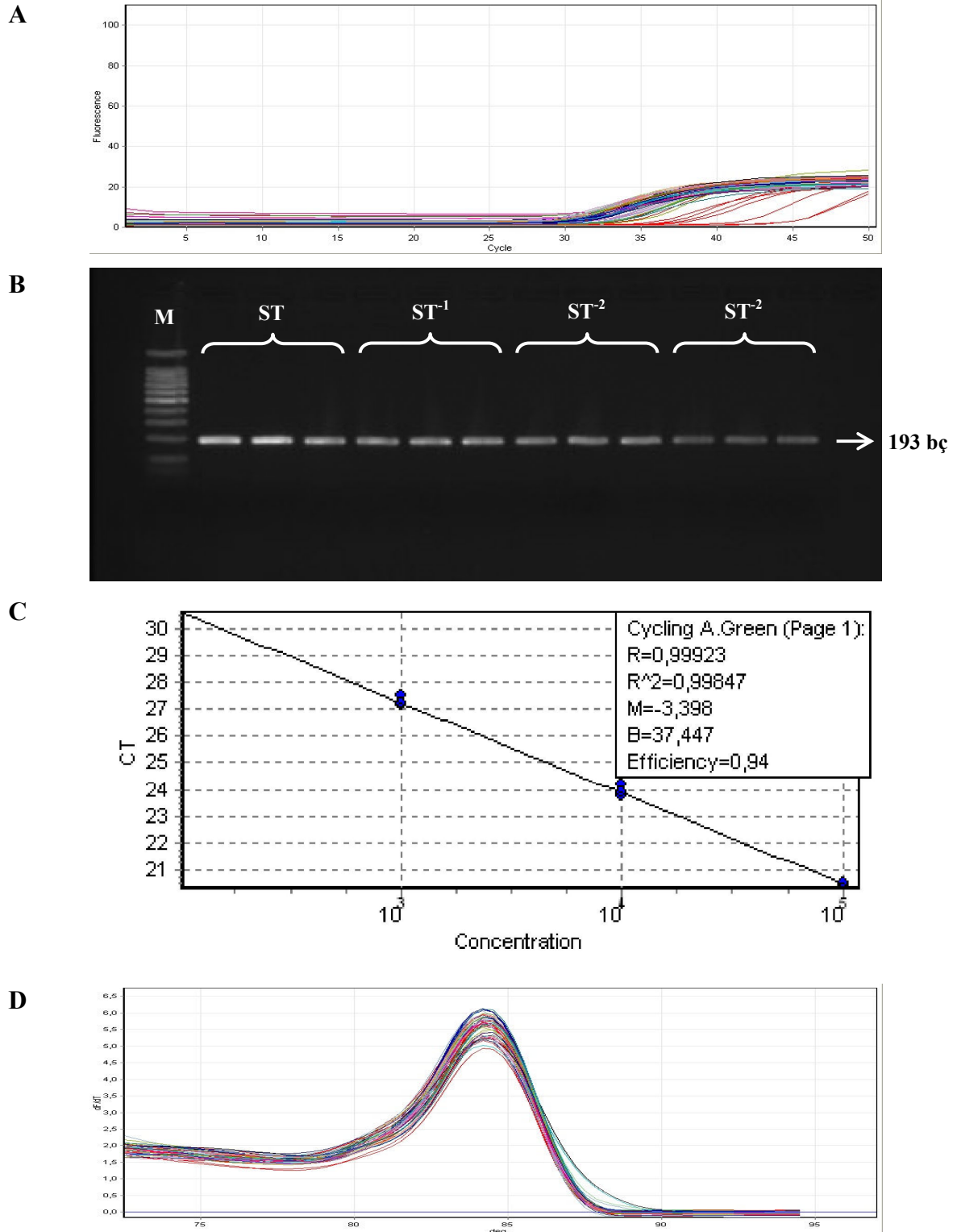
Şekil 4.2. DKK1 geni kantitatif RT-PCR analiz grafiği

k1-k2: otopsi hipokampus dokusu, p-1 – p-5: epileptik – sklerotik olmayan hasta hipokampus dokuları, p-6 – p-13: epileptik - sklerotik hasta hipokampus dokuları

DKK1 mRNA ekspresyon seviyesi kontrol hipokampus dokusu ve hastalara ait hipokampus dokularında analiz edilmiş ve ekspresyon düzeyinin kontrole göre değişimi belirlenmiştir.

k-1 ve k-2 otopsi (kontrol) hipokampus dokularıdır. k-1 36 yaşında ve herhangi bir santral sinir sistemi rahatsızlığı bulunmayan sağlıklı bir bireydir. k-2 37 yaşında ve herhangi bir santral sinir sistemi rahatsızlığı bulunmamaktadır ancak hipokampusun genel incelemesi yapıldığında strese bağlı (ölüm sırasında, travmaya bağlı) hipoksi görülmektedir. Bu nedenle k-1'e göre güvenilirliği daha az bir kontrol dokusudur. Kontrol doku seçiminin önemi ve analiz sonuçlarına etkisini de deneysel olarak göstermek için k-1 dışında k-2 de çalışma kapsamına alınmıştır. p-1 – p-5 epileptik – sklerotik olmayan hasta dokularıdır. Bu dokularda DKK1 mRNA ekspresyon seviyesi kontrol hipokampus dokusuna göre azalmış ya da değişmemiştir. p-6 – p-13 epileptik - sklerotik hasta hipokampus dokularıdır. Bu dokularda DKK1 mRNA ekspresyon seviyesi kontrol hipokampus dokusuna göre artmıştır.

4.1.2. β -katenin geni mRNA ekspresyon analizi

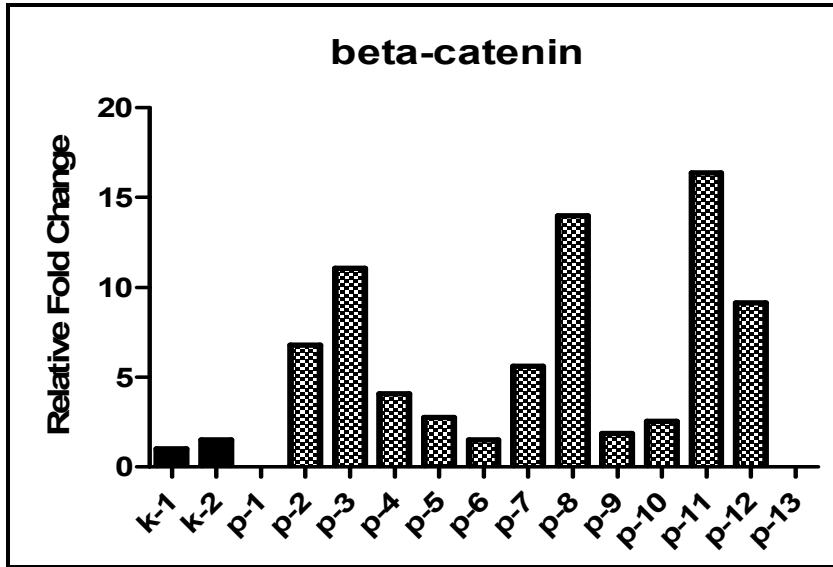


Şekil 4.3. β -katenin geni kantitatif RT-PCR sonuçları

A) Standartların ve örneklerin gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B)** Standartların agaroz jel elektroforezi sonuçları. **C)** Standart grafik. **D)** Standartların ve örneklerin erime eğrisi

Çizelge 4.2. β -katenin geni kantitatif RT-PCR analizleri

Örnek	Kat artışı
k-1	1,95
k-2	1,52
p-1	-
p-2	6,77
p-3	11,06
p-4	4,09
p-5	2,75
p-6	1,51
p-7	5,59
p-8	13,99
p-9	1,85
p-10	2,54
p-11	16,38
p-12	9,13
p-13	-



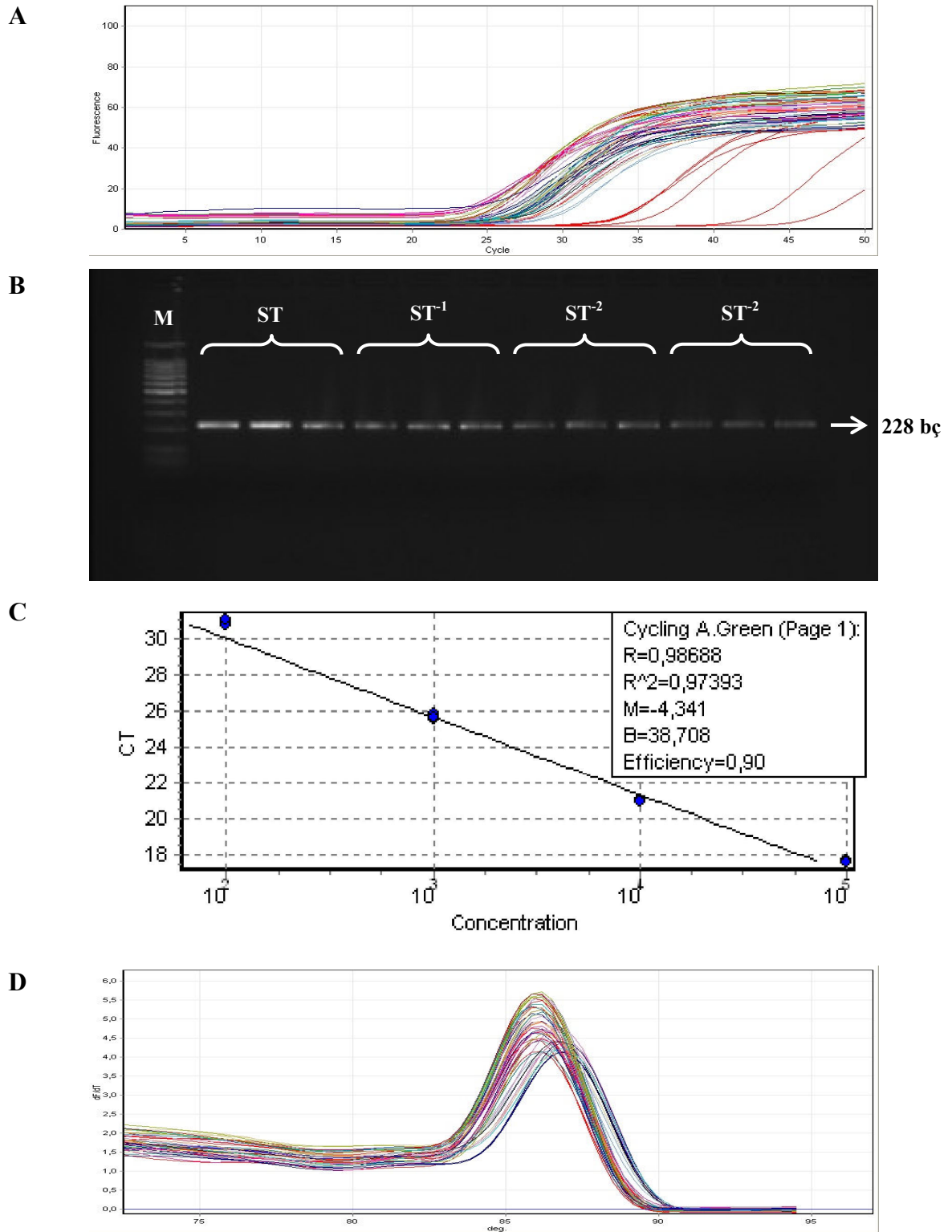
Şekil 4.4. DKK1 geni kantitatif RT-PCR analiz grafiği

k1-k2: otopsi hipokampus dokusu, p-1 – p-5: epileptik – sklerotik olmayan hasta hipokampus dokuları, p-6 – p-13: epileptik - sklerotik hasta hipokampus dokuları

β -katenin mRNA ekspresyon seviyesi kontrol hipokampus dokusu ve hastalara ait hipokampus dokularında analiz edilmiş ve ekspresyon düzeyinin kontrole göre değişimi belirlenmiştir.

Epileptik – sklerotik olmayan hasta hipokampus dokuları ile epileptik – sklerotik hasta hipokampus dokularının β -katenin mRNA ekspresyon seviyesi kontrol hipokampus dokusuna göre gruplar arası farklılık göstermemektedir. İki grup kendi içinde değerlendirildiğinde de ortak bir ekspresyon profili gözlenmemektedir.

4.1.3. GSK3- β geni mRNA ekspresyon analizi

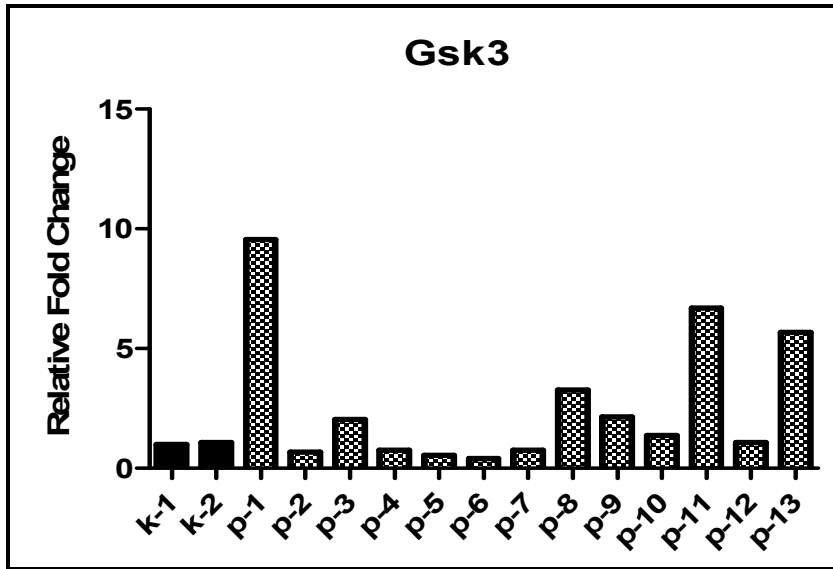


Şekil 4.5. GSK3- β geni kantitatif RT-PCR sonuçları

A) Standartların ve örneklerin gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B)** Standartların agaroz jel elektroforezi sonuçları. **C)** Standart grafik. **D)** Standartların ve örneklerin erime eğrisi

Çizelge 4.3. GSK3- β geni kantitatif RT-PCR analizleri

Örnek	Kat artışı
k-1	1,07
k-2	0,26
p-1	9,56
p-2	0,67
p-3	2,03
p-4	0,75
p-5	0,55
p-6	0,4
p-7	0,75
p-8	3,27
p-9	2,15
p-10	1,37
p-11	6,7
p-12	1,07
p-13	5,68



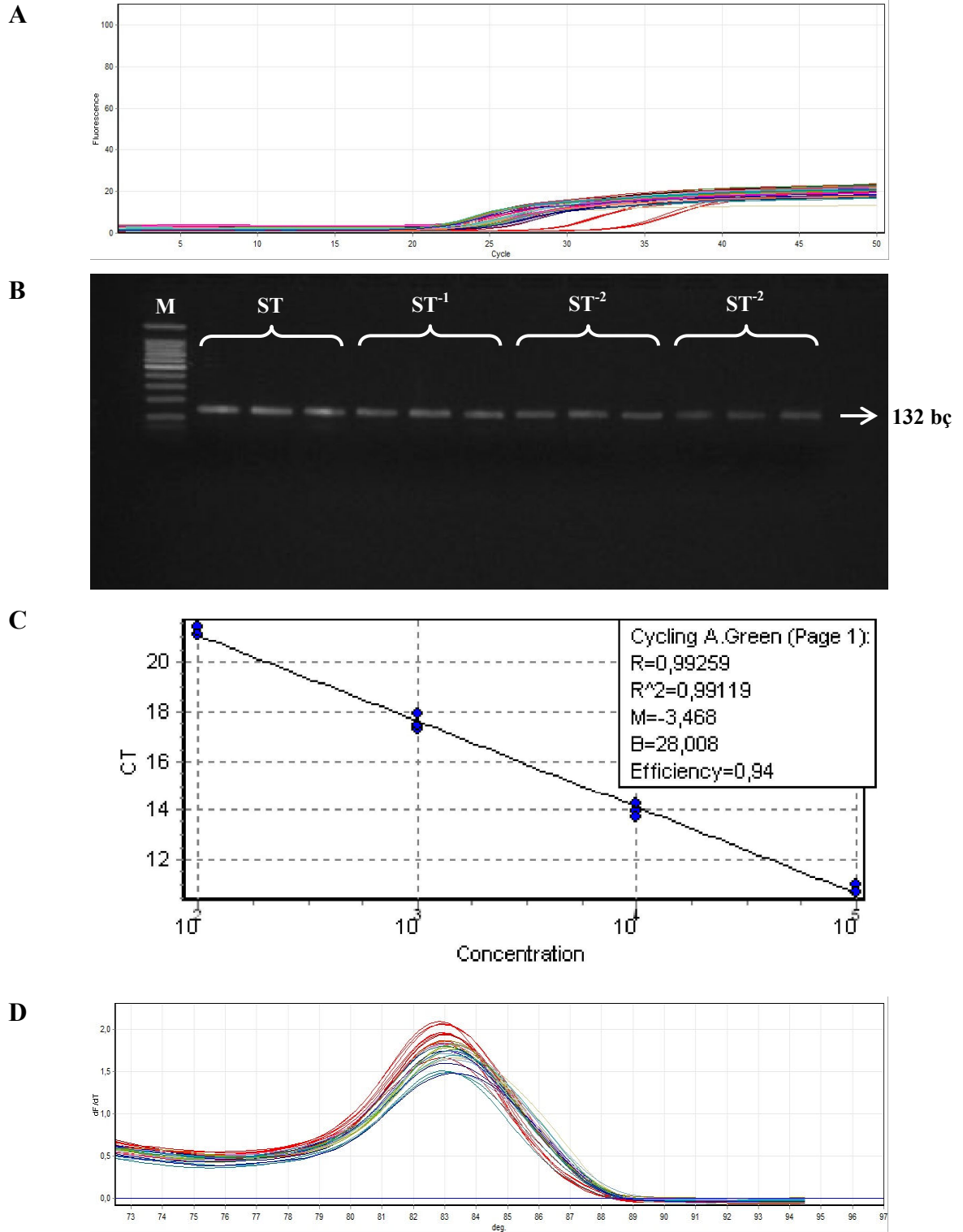
Şekil 4.6. GSK3- β geni kantitatif RT-PCR analiz grafiği

k1-k2: otopsi hipokampus dokusu, p-1 – p-5: epileptik – sklerotik olmayan hasta hipokampus dokuları, p-6 – p-13: epileptik - sklerotik hasta hipkampus dokuları

GSK3- β mRNA ekspresyon seviyesi kontrol hipokampus dokusu ve hastalara ait hipokampus dokularında analiz edilmiş ve ekspresyon düzeyinin kontrole göre değişimi belirlenmiştir.

Epileptik – sklerotik olmayan hasta hipokampus dokuları ile epileptik – sklerotik hasta hipokampus dokularının β -katenin mRNA ekspresyon seviyesi kontrol hipokampus dokusuna göre gruplar arası farklılık göstermemektedir. İki grup kendi içinde değerlendirildiğinde de ortak bir ekspresyon profili gözlenmemektedir.

4.1.4. TBP geni mRNA ekspresyon analizi



Şekil 4.7. TBP geni kantitatif RT-PCR sonuçları (normalizatör gen)

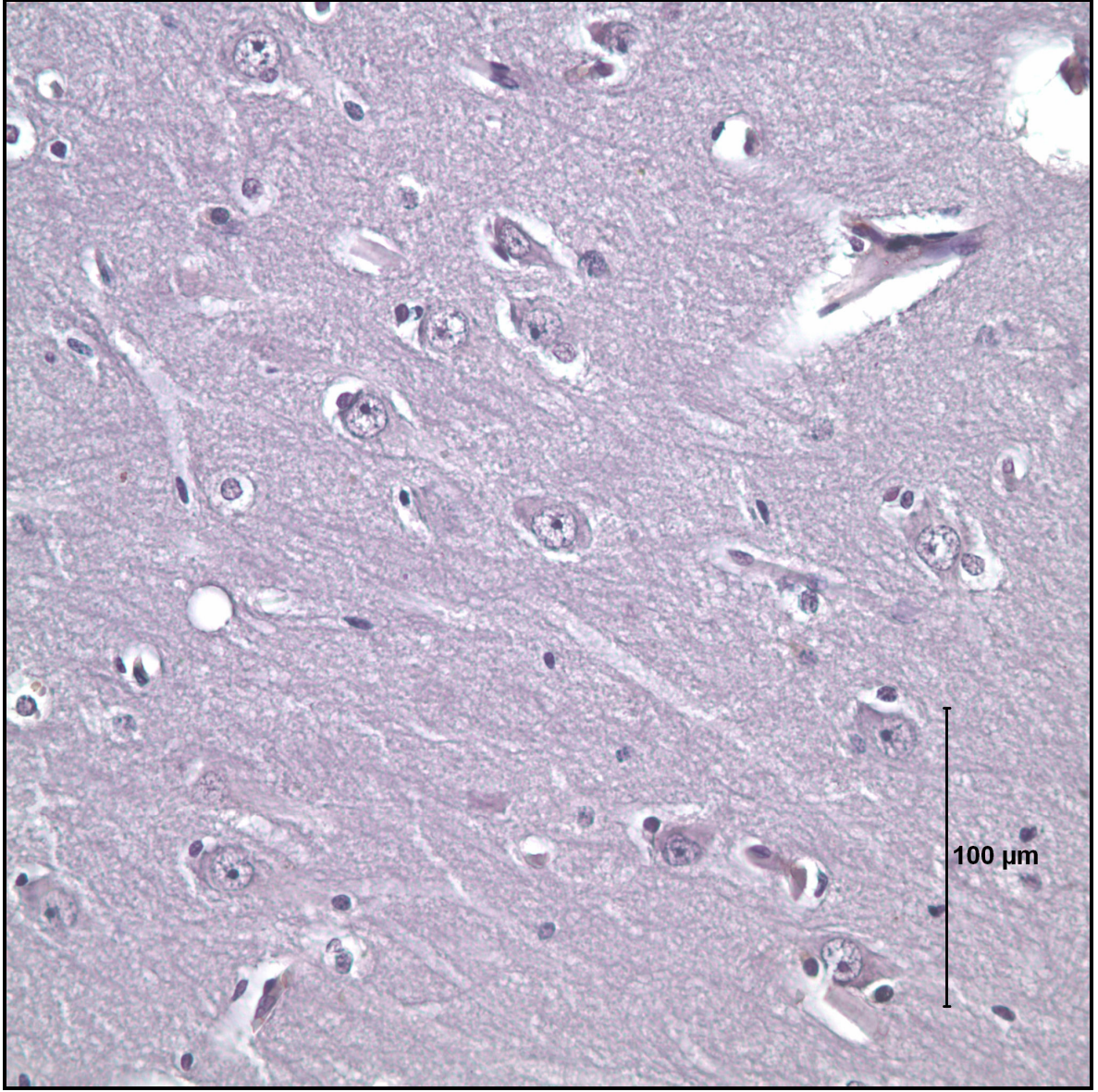
A) Standartların ve örneklerin gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B)** Standartların agaroz jel elektroforezi sonuçları. **C)** Standart grafik. **D)** Standartların ve örneklerin erime eğrisi

4.2. İmmünohistokimya Bulguları

Kantitatif RT-PCR sonuçlarına paralel olarak protein düzeyindeki ekspresyon kalıpları immünohistokimya boyamaları ile belirlenmiştir.

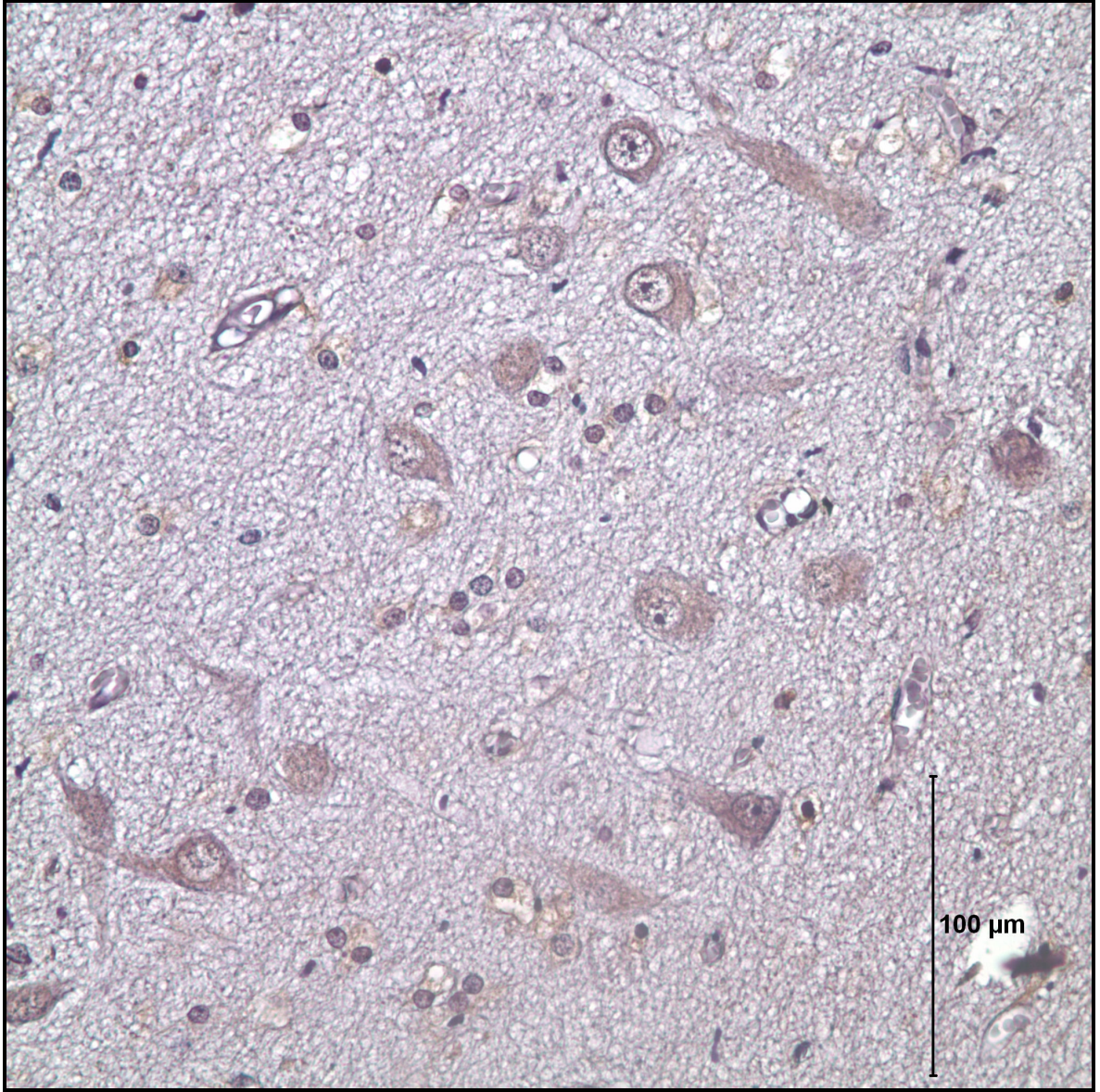
DKK1, β -katenin, GSK3- β protein ekspresyonlarının kalitatif olarak topografik ve hücresel dağılımları incelenmiştir. DKK1, β -katenin, GSK3- β antikorları ile yapılan boyamalarda her üç antikorda da hipokampusta bütünlüğü bozulmamış, nekrotik özellikler göstermeyen nöronlarda ekspresyon gösterilmiştir. Nekrotik özellikleri olan hücrelerin sadece hematoxilen ile boyandığı görülmüştür. Sonuç olarak her üç proteinin de nöronlarda sitoplazmadaki lokalizasyonu gösterilmiştir.

4.2.1. DKK1 antikoru immünohistokimya bulguları



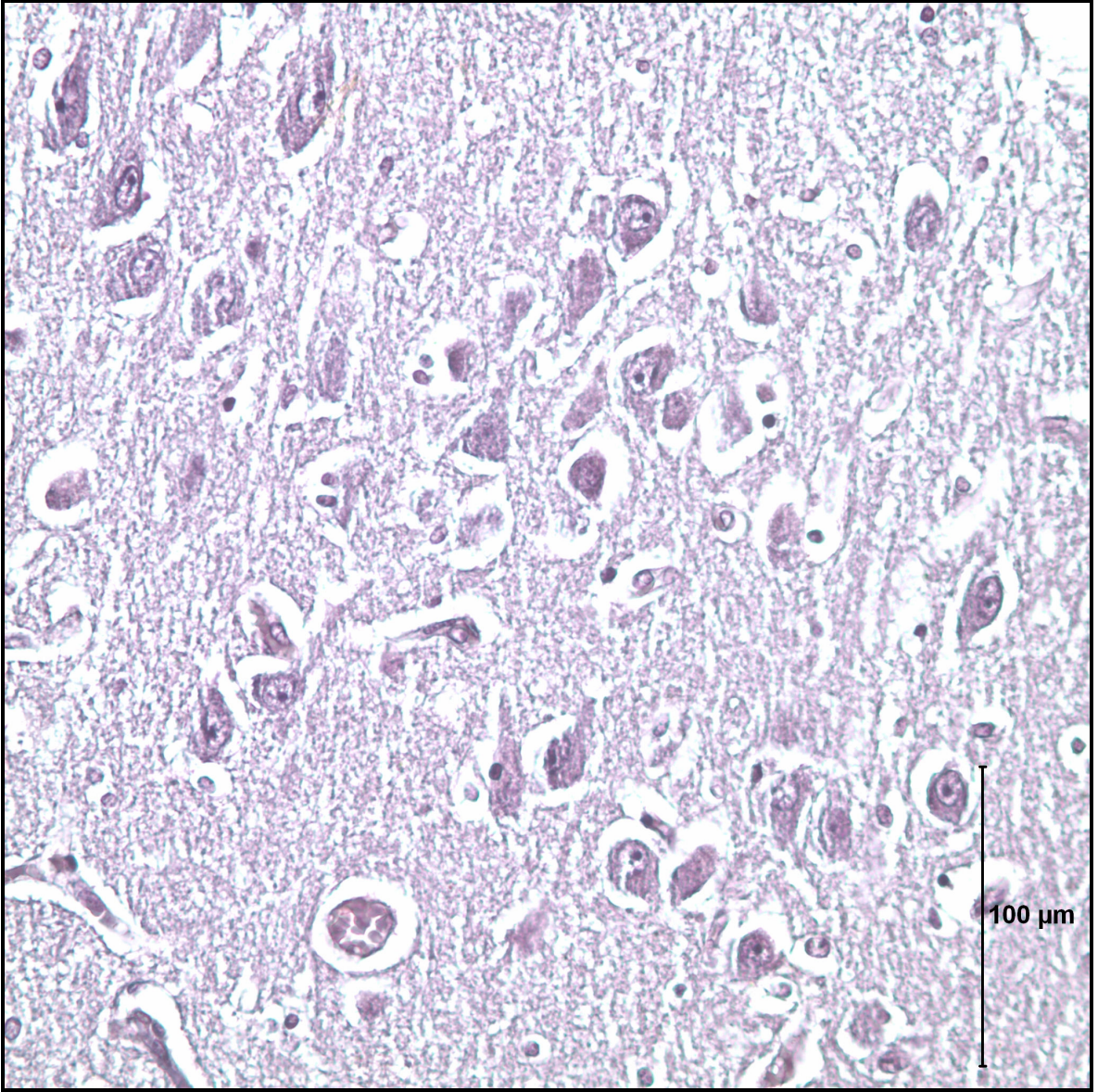
A

Şekil 4.8. DKK1 immünohistokimya görüntüleri
A) Epileptik-sklerotik olmayan hasta



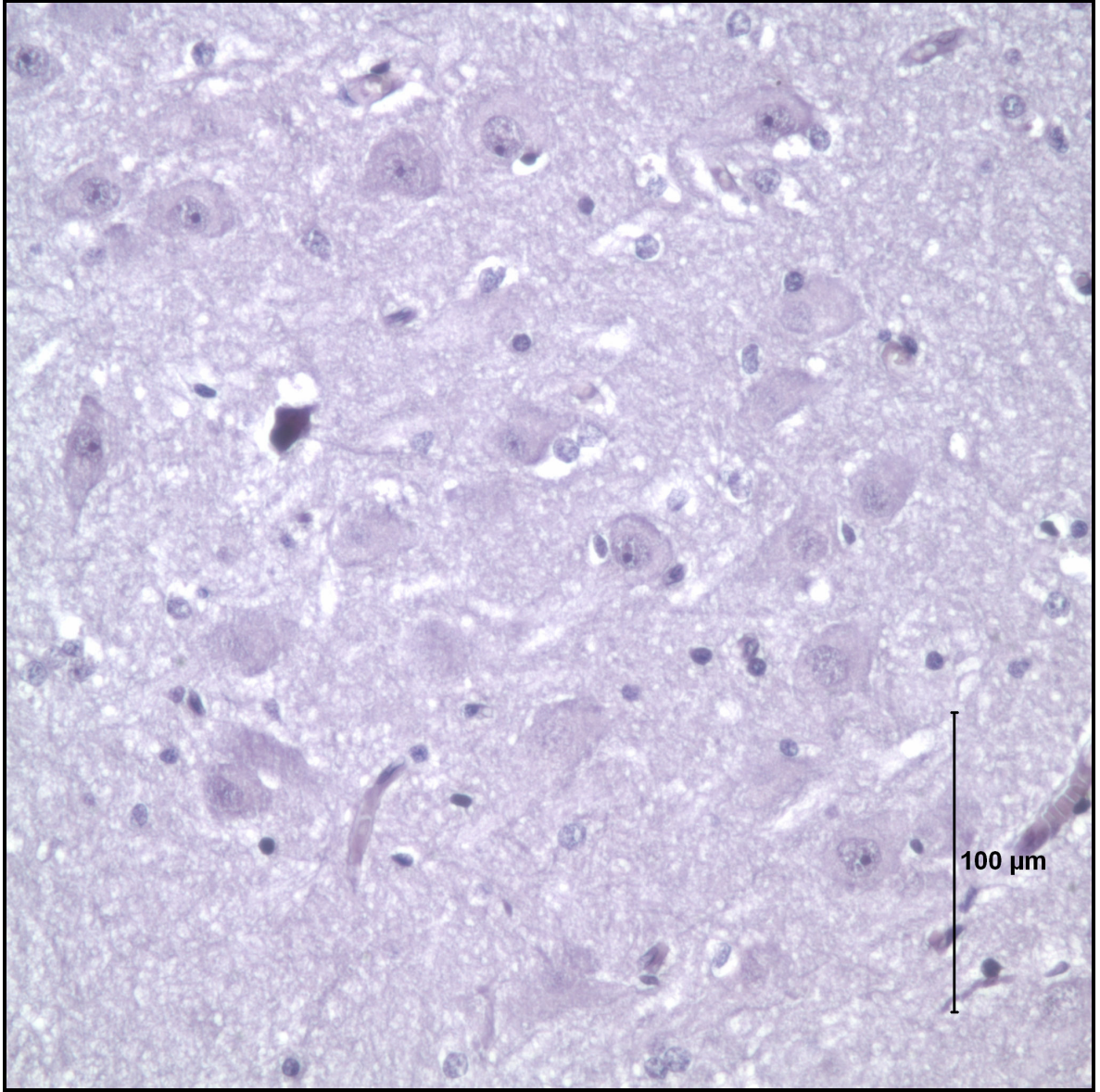
B

Şekil 4.8. DKK1 immünohistokimya görüntüleri
B) Epileptik-sklerotik hasta



C

Şekil 4.8. DKK1 immünohistokimya görüntüleri
C) Otopsi



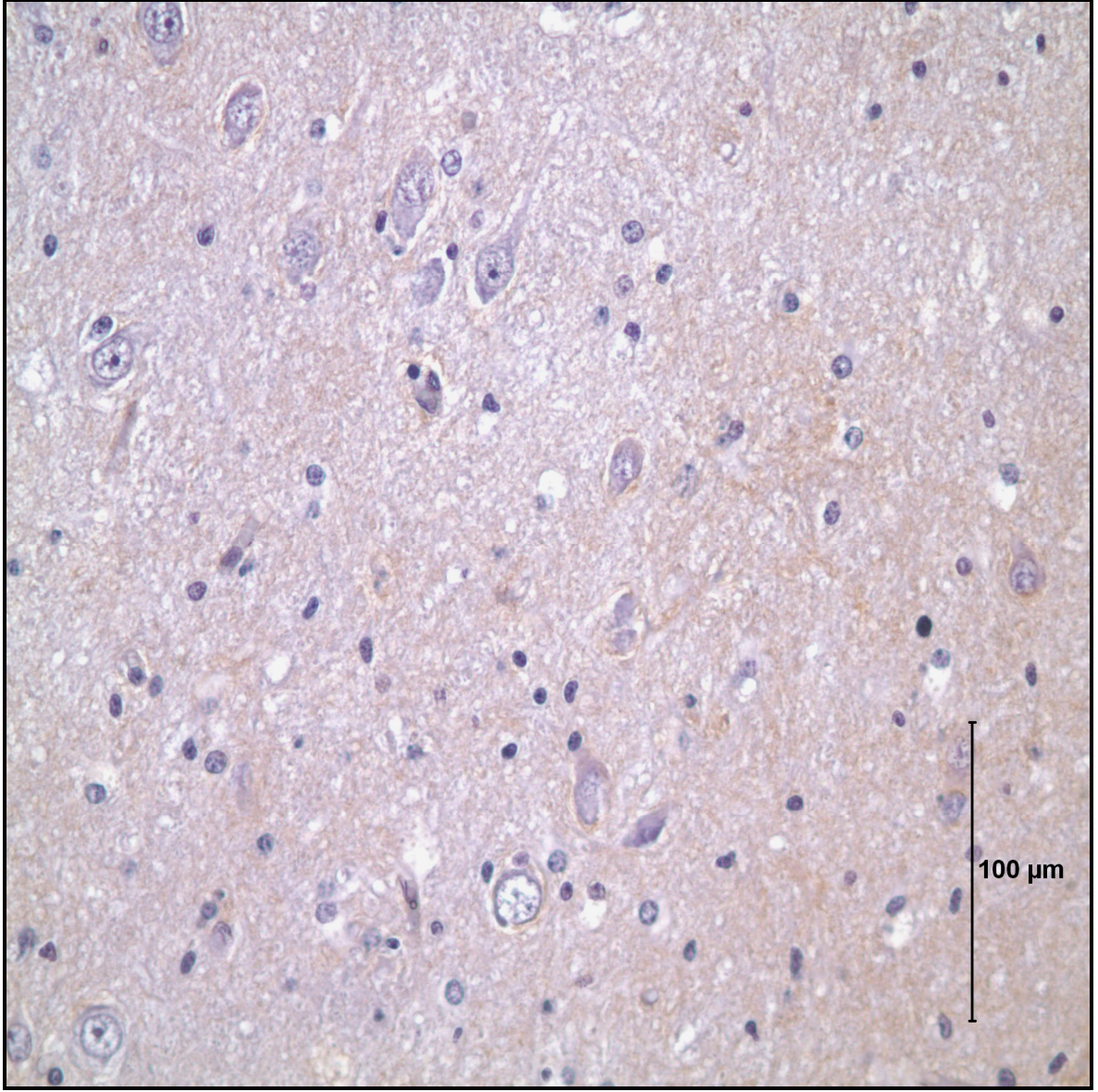
D

Şekil 4.8. DKK1 immünohistokimya görüntüleri

D) Negatif kontrol

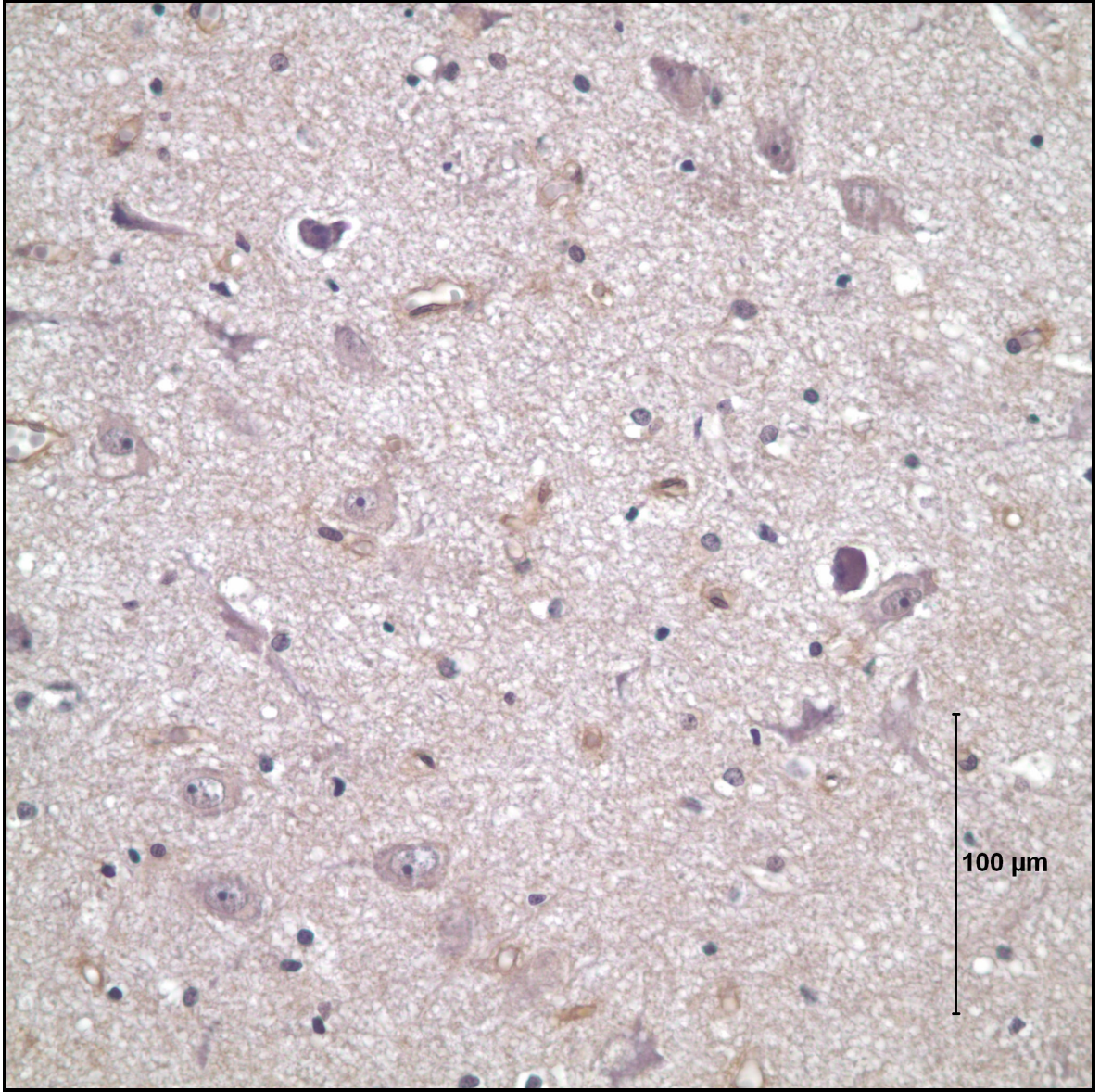
İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, epileptik - sklerotik olmayan hasta dokularında DKK1 protein ekspresyonu kontrol hipokampus dokusuna göre değişmemiştir. Epileptik - sklerotik hasta hipokampus dokularında DKK1 protein ekspresyonu kontrol hipokampus dokusuna göre artmıştır.

4.2.2. β -katenin antikoru immünohistokimya bulguları



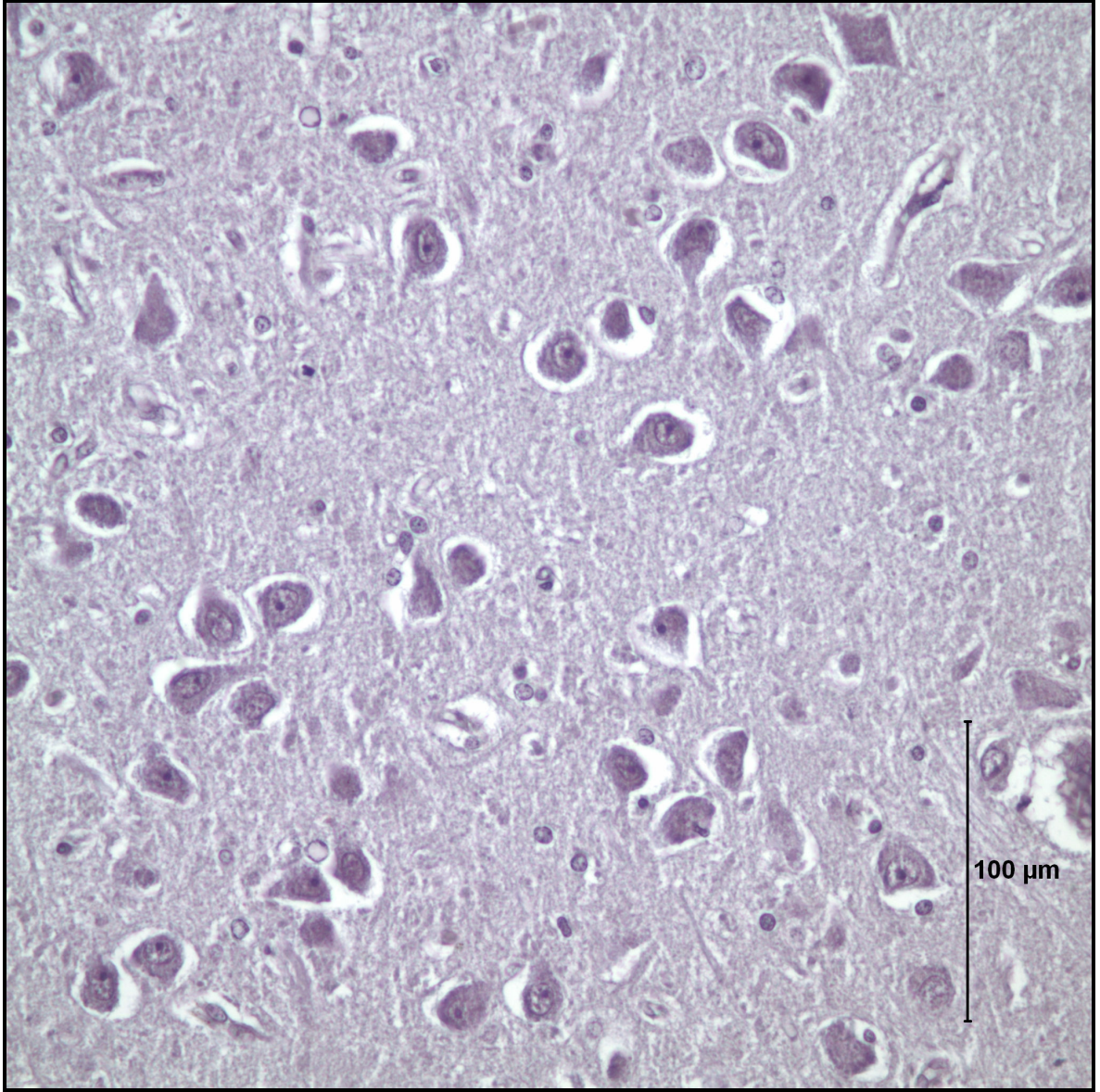
A

Şekil 4.9. β -katenin immünohistokimya görüntüleri
A) Epileptik-sklerotik olmayan hasta



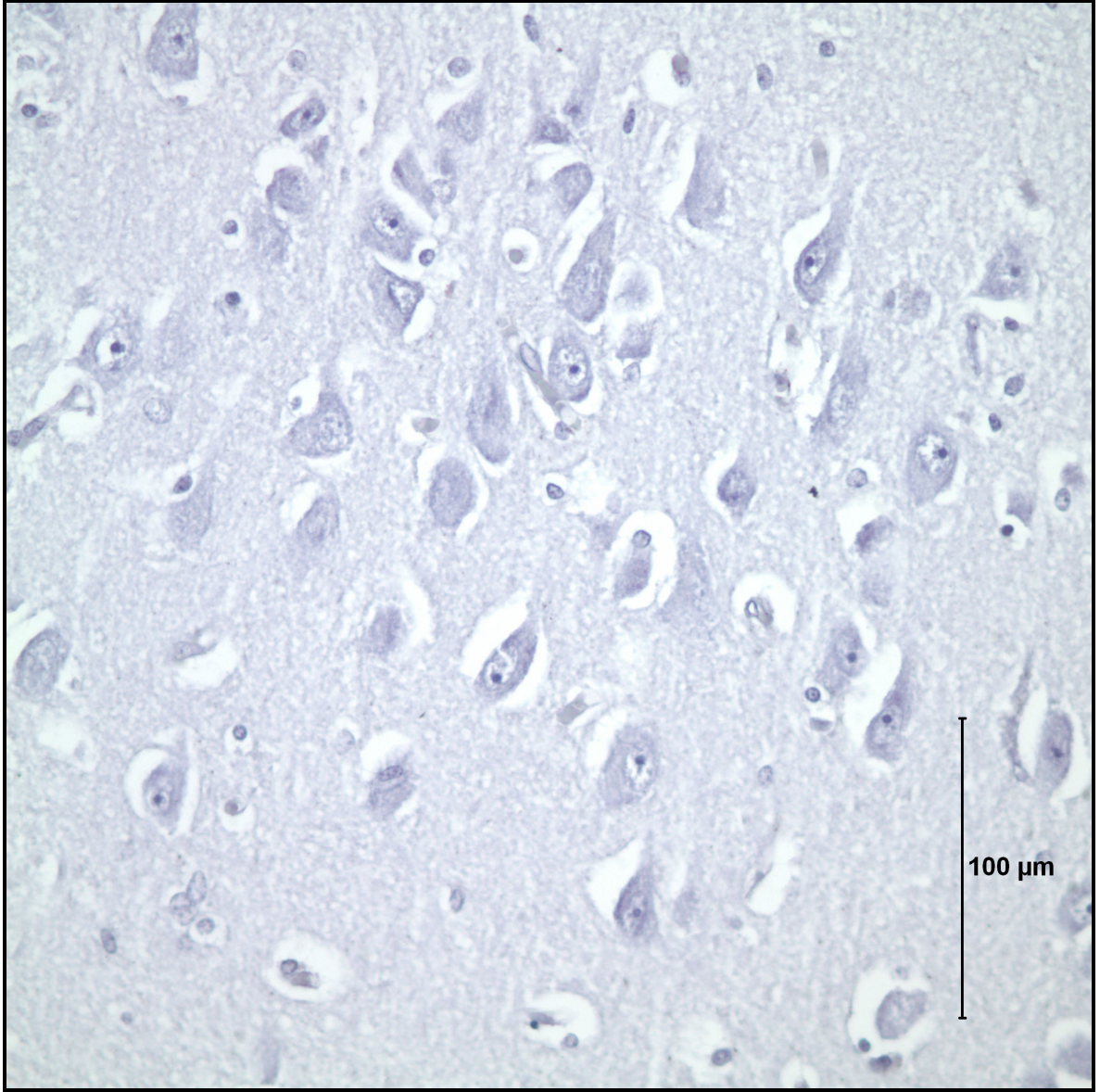
B

Şekil 4.9. β -katenin immünohistokimya görüntüleri
B) Epileptik-sklerotik hasta



C

Şekil 4.9. β -katenin immünohistokimya görüntüleri
C) Otopsi



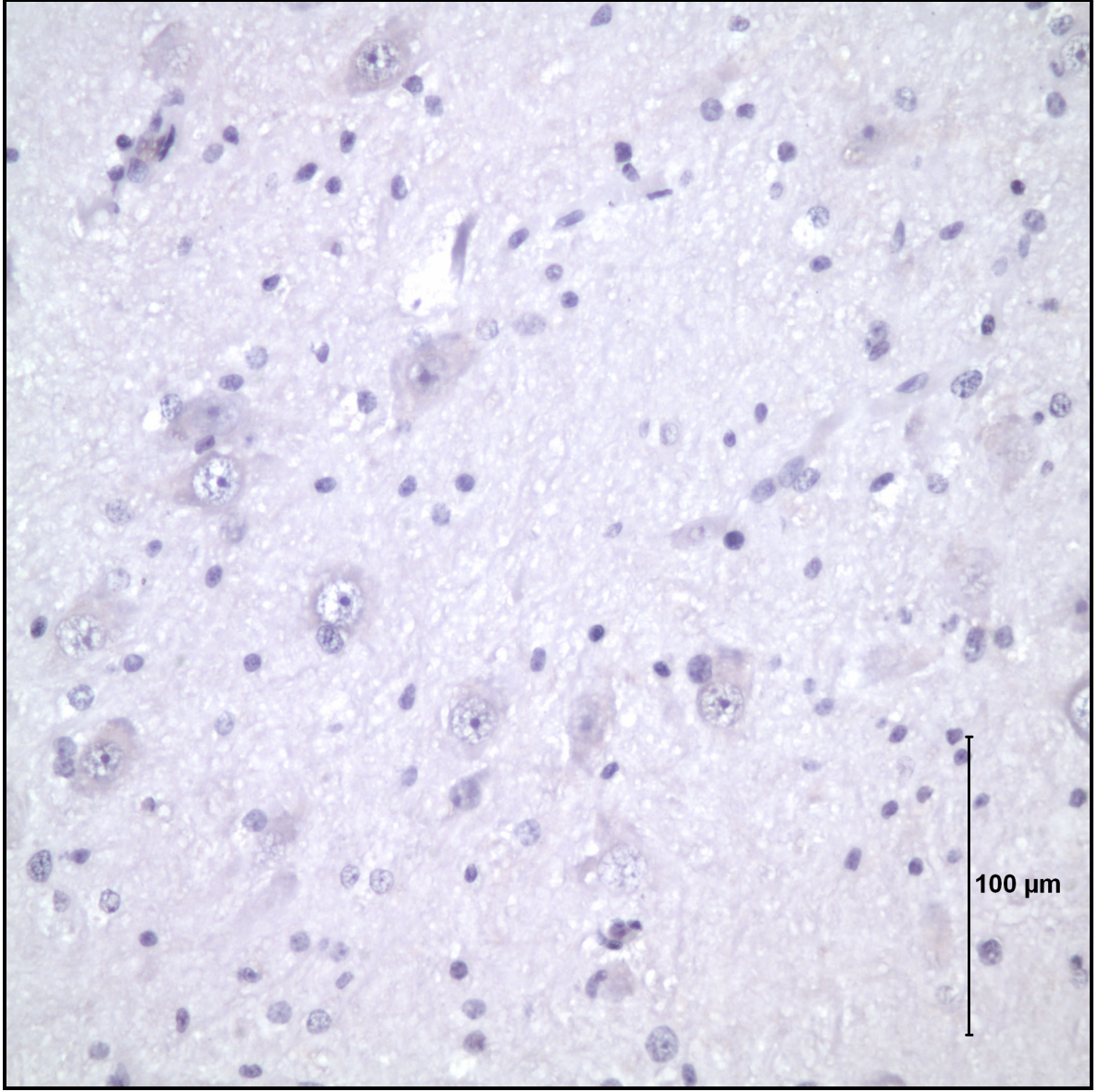
D

Şekil 4.9. β-katenin immünohistokimya görüntüleri

D) Negatif kontrol

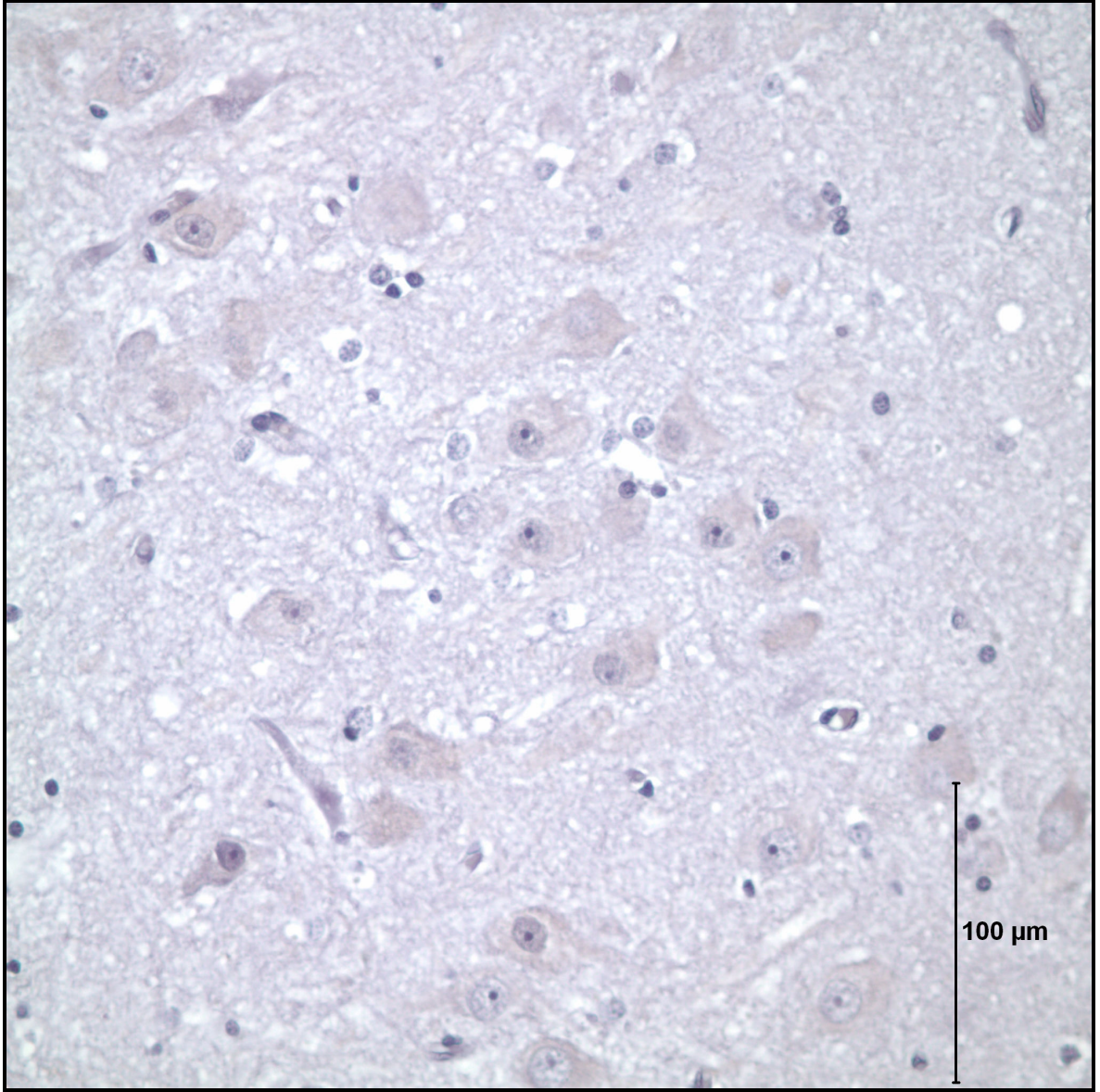
İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, β-katenin protein ekspresyonu DKK1 protein ekspresyonunda olduğu gibi epileptik - sklerotik olmayan hasta dokuları ile epileptik - sklerotik hasta dokularını ekspresyon paterni olarak birbirinden ayıracak sonuçlar vermemiştir. Ayrıca bu 2 grubun kendi içlerinde de ekspresyon düzeyi farklılıkları vardır.

4.2.3. GSK3- β antikoru immünohistokimya bulguları



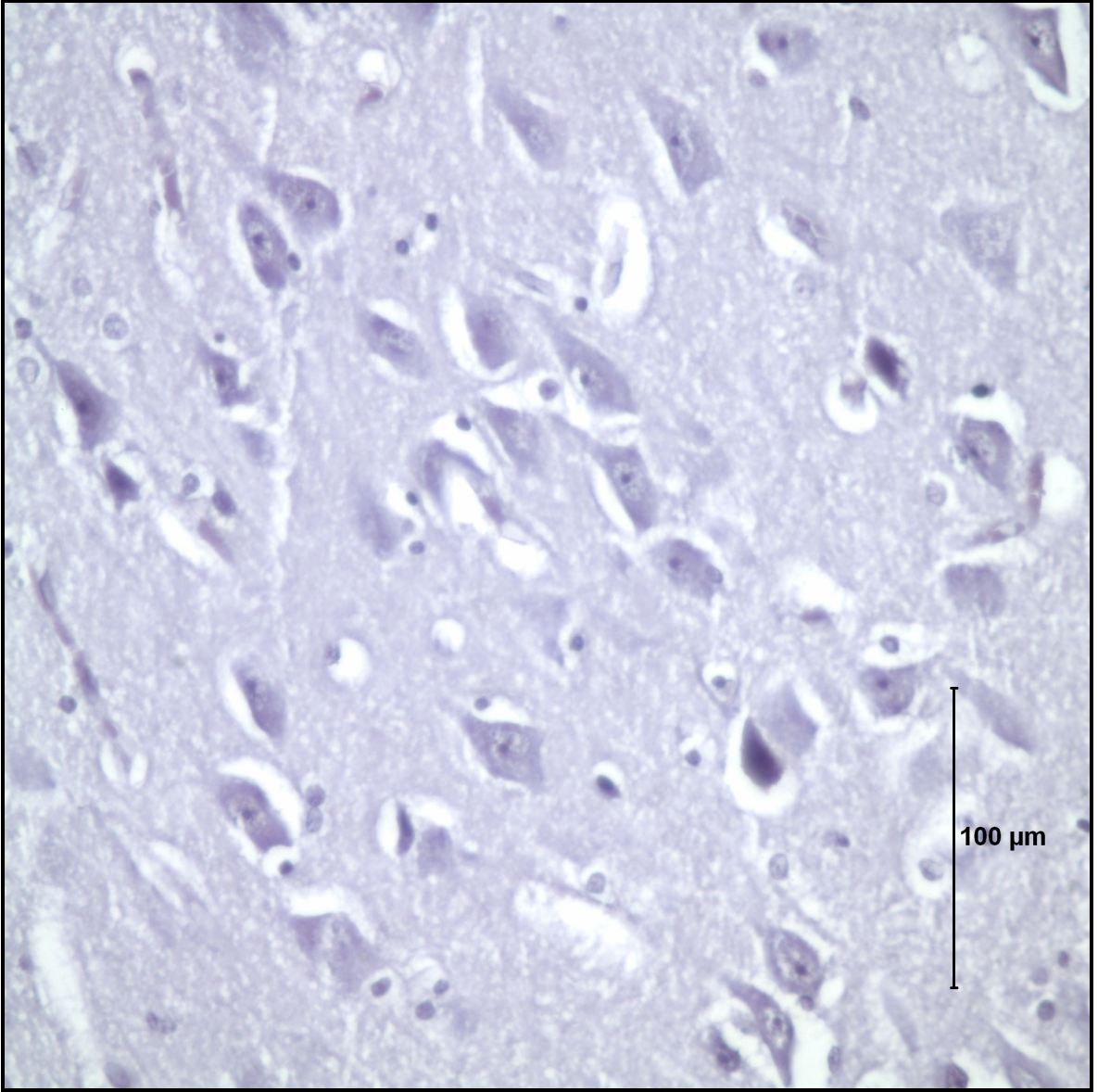
A

Şekil 4.10. GSK3- β immünohistokimya görüntüleri
A) Epileptik-sklerotik olmayan hasta



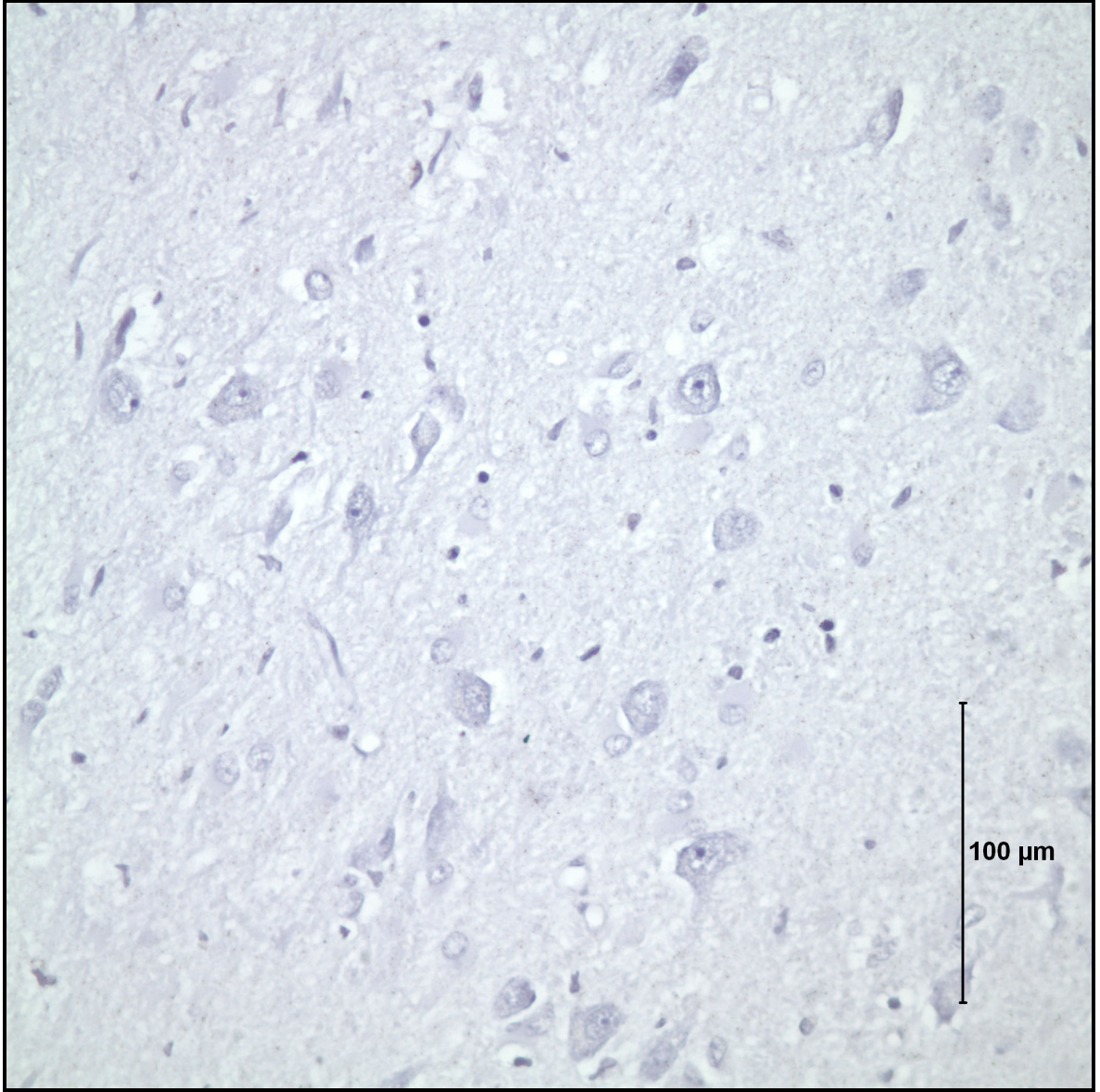
B

Şekil 4.10. GSK3- β immünohistokimya görüntüleri
B) Epileptik-sklerotik hasta



C

Şekil 4.10. GSK3- β immünohistokimya görüntüleri
C) Otopsi



D

Şekil 4.10. GSK3- β immünohistokimya görüntüleri

D) Negatif kontrol

İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, GSK3- β protein ekspresyonu da DKK1 protein ekspresyonunda olduğu gibi epileptik - sklerotik olmayan hasta dokuları ile epileptik - sklerotik hasta dokularını ekspresyon paterni olarak birbirinden ayıracak sonuçlar vermemiştir. Ayrıca bu 2 grubun kendi içlerinde de ekspresyon düzeyi farklılıkları vardır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

MTLE hasta örneklerinde yapılan bu çalışma insandaki epileptogenezin ve nöropatolojik değişikliklerin anlaşılabilmesi açısından önem taşımaktadır.

MTLE hastalarından amigdalahipokampektomi sırasında elde edilen dokular “Beyin Bankası” nda taze dondurulmuş olarak saklanmaktadır. Fonksiyonel genomik çalışmalar açısından uygun şartlarda bankalanmış, taze dondurulmuş kaliteli doku örnekleri çok kıymetlidir. Bu çalışma sırasında doku örnekleme sürecinde bankalama protokolü daha iyi koşullara getirilmiştir.

MTLE patolojisinde hipokampusta yoğun nöron ölümü gözlenmesi ve rezekte edilen dokunun büyük kısmının tanı amaçlı olarak patolojik incelemelere ayrılması nedeniyle kantitatif RT-PCR yöntemi için kullanılacak olan doku miktarı kısıtlanmaktadır. Bu nedenle sınırlı miktarda doku örneğinde yöntemin standardizasyonu ve seçilen genlerin mRNA ekspresyon analizlerinin yapılabilmesi çalışma çıktısı olarak kabul edilmektedir.

Wnt yolağı antagonisti olan DKK1 gen ekspresyonu, nörodejenerasyon ile karakterize edilen santral sinir sistemi patolojilerinde artış göstermektedir (Rosi *et al.* 2010, Purro *et al.* 2012). Bu nedenle DKK1 geninin MTLT’li hasta örneklerindeki ekspresyonu oldukça önemlidir.

Epileptik – sklerotik olmayan hasta hipokampus dokularında nörodejenerasyon epileptik – sklerotik hasta hipokampus dokularına göre daha azdır. DKK1 geni mRNA ekspresyonu da sklerotik olmayan grupta daha az gözlenmiştir. Sklerotik grupta DKK1 geni mRNA ekspresyonu anlamlı düzeyde artış göstermektedir.

Epileptik – sklerotik olmayan hasta hipokampus dokuları ile epileptik – sklerotik hasta hipokampus dokularının β -katenin ve GSK3- β mRNA ve protein ekspresyon seviyesi kontrol hipokampus dokusuna göre gruplar arası belirgin ve ayırıcı bir farklılık göstermemektedir. İki grup kendi içinde değerlendirildiğinde de ortak bir ekspresyon profili gözlenmemektedir.

MTLE hastalarında sklerotik - epileptik grup ile sklerotik olmayan – epileptik grubun patofizyolojik olarak ayrılmasında çalışma sonuçlarında iki grup arasında belirgin mRNA ekspresyon farklılığı gösteren DKK1, sklerotik yapı ve patolojik klasifikasyonun açıklanabilmesi açısından önemli bir belirteç olabilir.

Lezyon-bağımlı MTLE hasta örneklerinin bankalanması ve bu çalışmanın devamı olarak HS-lezyon birlikte gözlenen MTLE grubu ile HS olmayan-lezyon bulunan MTLE grubunda, DKK1 geni ekspresyonunun karşılaştırılması planlanmaktadır. Böylece nörodejeneratif klasifikasyon için DKK1 geni ekspresyonu bulguları farklı MTLE patolojileri ile genişletilmiş olacaktır.

İnsanda HS ve kronik epilepsi gelişimine neden olan olaylar sürecinin anlaşılmasına yönelik sistematik bir çalışma yapılamamaktadır çünkü hipokampal doku ancak kronik MTLE'nin ileri aşamalarında elde edilmektedir. Bu nedenle nöropatolojik bulguların epileptogenezde etken mi yoksa tekrarlayan epileptik nöbetlerin sonucu mu olduğu net olarak bilinmemektedir. Temporal lob epilepsi (TLE) hastalarının hipokampal hücre yoğunluğunun kontrol örneklerle ve ekstra-hipokampal odaklı epilepsi hastalarına göre daha az olması HS ve TLE arasında bir ilişki olduğu düşüncesini desteklemektedir. Ekstra hipokampal odaklı epilepsi hastalarında DKK1 ekspresyonunun belirlenebilmesi için de doku temini sağlanabilirse, farklı patolojik gruplarda nörodejeneratif sürecin aydınlatılması açısından önemli çıktılar elde edilebilecektir.

Nörodejeneratif klasifikasyon için DKK1 gen ekspresyonu sonuçları elde edilmiş ancak DKK1 ekspresyonunu nörodejenerasyonun daha yoğun gözlemlendiği HS'li grupta artıran mekanizma tam olarak açıklanamamıştır.

DKK1 genindeki mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyon artışında etkili olabilecek mekanizmaların, yolakların araştırılması planlanan çalışmalardır. HS patolojisinde etkili olan yolaklar ve mekanizmaların DKK1 geni ile ilişkilerinin araştırılması da gereklidir.

HS evrelerine göre değişmekle birlikte nörodejenerasyon açısından korunmuş sektör olan CA2 ile CA1, CA3 ve CA4 sektörlerindeki DKK1 gen ekspresyonunu ayrı ayrı belirleyebilmek de hastalığın evreleri ve sektörel durum açısından önemli bir bulgu olduğundan planlanan bir diğer çalışmadır.

Hipokampal sklerozun en belirgin özelliği olan gliosis, GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) geni ekspresyonu ile belirlenebilir (Martinian *et al.* 2009) Burada glial hücre artışı açısından klasifikasyon yapılmaktadır. Hastalardaki DKK1 geni mRNA ekspresyonu sonuçları ise nörodejenerasyonun derecesinin belirlenmesi ve sklerotik olmayan grup ile sklerotik grubun ayrılması açısından önemli bir bilgi olmuştur.

KAYNAKLAR

- Blümcke, I., Beck, H., Lie, A.A., Wiestler, O.D. 1999. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 36: 205-223.
- Blümcke, I., Thom, M., Wiestler, O.D. 2002. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol.*, 12: 199-211.
- Busceti, C.L., Biagioni, F., Aronica, E., Rizzo, B., Storto, M., Battaglia, G., Giorgi, F.S., Gradini, R., Fornai, F., Caricasole, A., Nicoletti, F., Bruno, V. 2007. Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 48(4): 694-705.
- Bustin, S.A. and Mueller, R. 2005. Review: Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109: 365-379.
- Caldwell, G.M., Jones, C., Gensberg, K., Jan, S., Hardy, R.G., Byrd, P., Chughtai, S., Wallis, Y., Matthews, G.M., Morton, D.G. 2004. The Wnt Antagonist sFRP1 in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Research*, 64(3): 883-888.
- Cappuccio, I., Calderone, A., Busceti, C.L., Biagioni, F., Pontarelli, F., Bruno, V., Storto, M., Terstappen, G.T., Gaviraghi, G., Fornai, F., Battaglia, G., Melchiorri, D., Zukin, R.S., Nicoletti, F., Caricasole, A. 2005. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *J. Neurosci.*, 25(10): 2647-2657.
- Caraci, F., Busceti, C., Biagioni, F., Aronica, E., Mastroiacovo, F., Cappuccio, I., Battaglia, G., Bruno, V., Caricasole, A., Copani, A., Nicoletti, F. 2008. The Wnt antagonist, Dickkopf-1, as a target for the treatment of neurodegenerative disorders. *Neurochem. Res.*, 33(12): 2401-2406.
- Caricasole, A., Copani, A., Caraci, F., Aronica, E., Rozemuller, A.J., Caruso, A., Storto, M., Gaviraghi, G., Terstappen, G.C., Nicoletti, F. 2004. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J. Neurosci.*, 24(26): 6021-6027.
- Corbett Life Science. REAL-TIME AMPLIFICATION ON THE ROTOR-GENE Overview of the chemistries and optimizations.
- Coudreuse, D., Korswagen, H.C. 2007. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development*, 134: 3-12.
- Davies, K.G., Hermann, B.P., Dohan, F.C., Foley, K.T., Bush, A.J., Wyler, A.R. 1996. Relationship of hippocampal sclerosis to duration and age of onset of epilepsy, and childhood febrile seizures in temporal lobectomy patients. *Epilepsy Res.*, 24: 119-126.
- Duvernoy, H.M. 2005. The human hippocampus. Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI. 3rd edition, Heidelberg, Springer, 3-4.

- Engel, J. Jr. 1996. Current concepts: surgery for seizures. *N. Engl. J. Med.*, 334: 647-652.
- Engel, J. Jr., Dichter, M., Schwarzkroin, P. 1997. Basic mechanisms of human epilepsy. "Epilepsy: a comprehensive text book". Philadelphia, Lippincott-Raven, s.499-512.
- French, J.A., Williamson, P.D., Thadani, V.M., Darcey, T.M., Mattson, R.H., Spencer, S.S., Spencer, D.D. 1993. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann. Neurol.*, 34: 774-780.
- Gumbiner, B.M. 1997. Carcinogenesis: A balance between β -catenin and APC. *Current Biology*, 7: 443-446.
- Habas, R., Dawid, I.B. 2005. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *Journal of Biology*, 4: 2.1-2.4.
- Kim, J.H., Guimaraes, P.O., Shen, M.Y., Masukawa, L.M., Spencer, D.D. 1990. Hippocampal neuronal density in temporal lobe epilepsy with and without gliomas. *Acta Neuropathol.*, 80(1): 41-45.
- Krishnan, V., Bryant, H.U., MacDougald, O.A. 2006. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 116: 1202-1209.
- Liu, Z., Mikati, M., Holmes, G.L. 1995. Mesial temporal sclerosis: pathogenesis and significance. *Pediatr. Neurol.*, 12(1): 5-16.
- Logan, C.Y., Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 20: 781- 810.
- Lothman, E.W., Bertram, E.H., Stringer, J.L. 1991. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog. Neurobiol.*, 37: 1-82.
- Martinian, L., Boer, K., Middeldorp, J., Hol, E.M., Sisodiya, S.M., Squier, W., Aronica, E., Thom, M. 2009. Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associated lesional pathologies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 35(4): 394-405.
- Mathern, G.W., Babb, T.L., Vickrey, B.G., Melendez, M., Pretorius, J.K. 1995. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain: A Journal of Neurology.*, 118(Pt 1): 105-118.
- Miller, L.A., McLachlan, R.S., Bouwer, M.S., Hudson, L.P., Munoz, D.G. 1994. Amygdalar sclerosis: preoperative indicators and outcome after temporal lobectomy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 57: 1099-1105.
- Munoz, D.G. 1990. The distribution of chromogranin A - like immunoreactivity in the human hippocampus coincides with the pattern of resistance to epilepsy-induced neuronal damage. *Annals of Neurology*, 27: 266-275.
- Nelson, W.J., Nusse, R. 2004. Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science*, 303: 1483-1487.

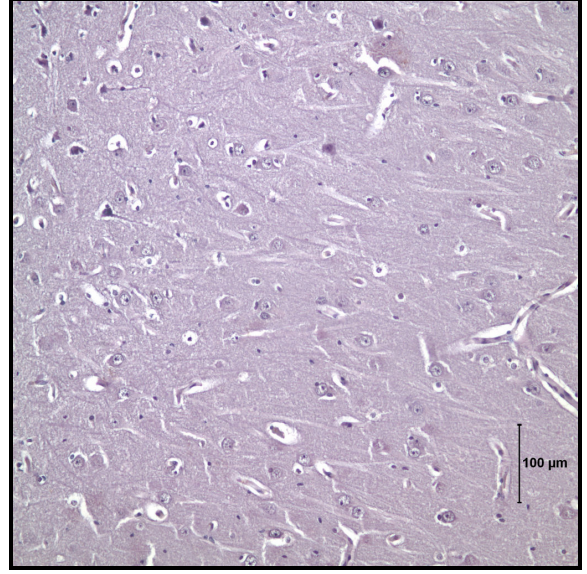
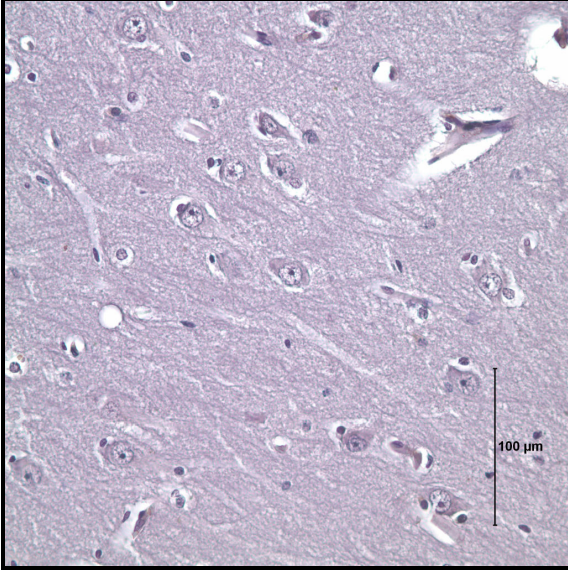
- Niehrs, C. 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 25: 7469-7481.
- Nojima, M., Suzuki, H., Toyota, M., Watanabe, Y., Maruyama, R., Sasaki, S., Sasaki, Y., Mita, H., Nishikawa, N., Yamaguchi, K., Hirata, K., Itoh, F., Tokino, T., Mori, M., Imai, K., Shinomura, Y. 2007. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, 26: 4699-4713.
- Nolan, T., Hands, R. E., Bustin, S.E. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3): 1559-1582.
- Nusse, R. 2005. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Research*, 15:28-32.
- Olivier, A. 1992. Temporal resections in the surgical treatment of epilepsy. *Epilepsy Res, Suppl.5*: 175-88.
- Özbaş-Gerçeker, F., Redeker, S., Boer, K., Özgüç, M., Saygi, S., Dalkara, T., Soylemezoglu, F., Akalan, N., Baayen, J.C., Gorter, J.A., Aronica, E. 2006. Serial analysis of gene expression in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 138(2): 457-474.
- Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes & Dev.*, 14: 1837-1851.
- Purro, S.A., Dickins, E.M., Salinas, P.C. 2012. The secreted Wnt antagonist Dickkopf-1 is required for amyloid β -mediated synaptic loss. *J. Neurosci.*, 32(10): 3492-3498.
- Rosi, M.C., Luccarini, I., Grossi, C., Fiorentini, A., Spillantini, M.G., Prisco, A., Scali, C., Gianfriddo, M., Caricasole, A., Terstappen, G.C., Casamenti, F. 2010. Increased Dickkopf-1 expression in transgenic mouse models of neurodegenerative disease. *J. Neurochem.*, 112(6): 1539-1551.
- Sagar, H.J., Oxbury, J.M. 1987. Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsions. *Ann. Neurol.*, 22: 334-340.
- Salanova, V., Markand, O., Worth, R. 2004. Temporal lobe epilepsy: analysis of patients with dual pathology. *Acta Neurol. Scand.*, 109(2): 126-131.
- Scali, C., Caraci, F., Gianfriddo, M., DiYotato, E., Roncarati, R., Pollio, G., Gaviraghi, G., Copani, A., Nicoletti, F., Terstappen, G.C., Caricasole, A. 2006. Inhibition of Wnt signaling, modulation of Tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiol. Dis.*, 24(2): 254-265.
- Schlange, T., Matsuda, Y., Lienhard, S., Huber, A., Hynes, N.E. 2007. Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. *Breast Cancer Research*, 9: R63.
- Shakoori, A., Ougolkov, A., Yu, Z.W., Zhang, B., Modarressi, M.H., Billadeau, D.D., Mai, M., Takahashi, Y., Minamoto, T. 2005. Deregulated GSK3- β activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334: 1365-1373.

- Sloviter, R.S. 1987. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*, 235(4784): 73-76.
- Sloviter, R.S. 1994. The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.*, 35(6): 640-654.
- Sloviter, R.S., Sollas, A.L., Barbaro, N.M., Laxer, K.D. 1991. Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 308(3): 381-396.
- Sutula, T., Cascino, G., Cavazos, J., Parada, I., Ramirez, L. 1989. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol.* 26(3): 321-330.
- Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K., Yamaguchi, H. 1998. Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β by amyloid β peptide (25–35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, 51: 317-323.
- Taketo, M.M. 2004. Shutting down Wnt signal—activated cancer. *Nature Genetics*, 36: 320-322.
- Thom, M., Sisodiya, S.M., Beckett, A., Martinian, L., Lin, W.R., Harkness, W., Mitchell, T.N., Craig, J., Duncan, J., Scaravilli, F. 2002. Cytoarchitectural abnormalities in hippocampal sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 61: 510-519.
- Ugolini, F., Charafe-Jauffret, E., Bardou, V.J., Geneix, J., Adélaïde, J., Labat-Moleur, F., Penault-Llorca, F., Longy, M., Jacquemier, J., Birnbaum, D., Pébusque, M.J. 2001. WNT pathway and mammary carcinogenesis: Loss of expression of candidate tumor suppressor gene SFRP1 in most invasive carcinomas except of the medullary type. *Oncogene*, 20(41): 5810-5817.
- Wang, J., Shou, J., Chen, X. 2000. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene*, 19(14): 1843-1848.
- Widelitz, R. 2005. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: Recent progress. *Growth Factors*, 23: 111-116.
- Willert, K., Jones, K.A. 2006. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & Dev.* 20: 1394-1404.
- Willert, K., Nusse, R. 1998. β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8: 95-102.
- Wolf, H.K., Wiestler, O.D. 1993. Surgical pathology of chronic epileptic seizure disorders. *Brain Pathol.*, 3: 371-380.
- Wong, M.L. and Medrano J.F. 2005. Review: Real Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1): 75-85.

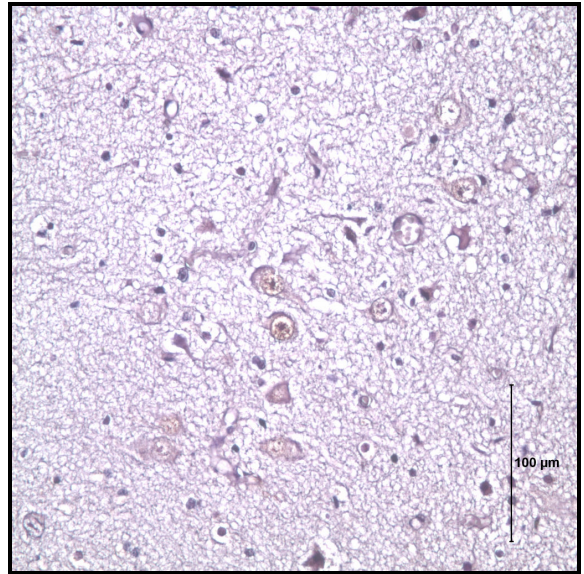
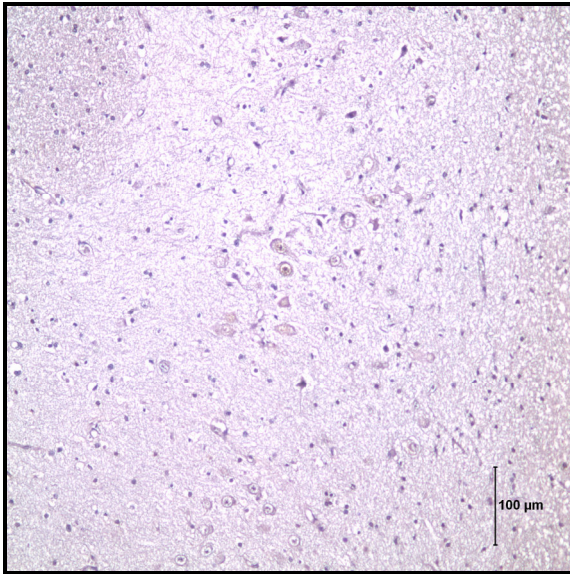
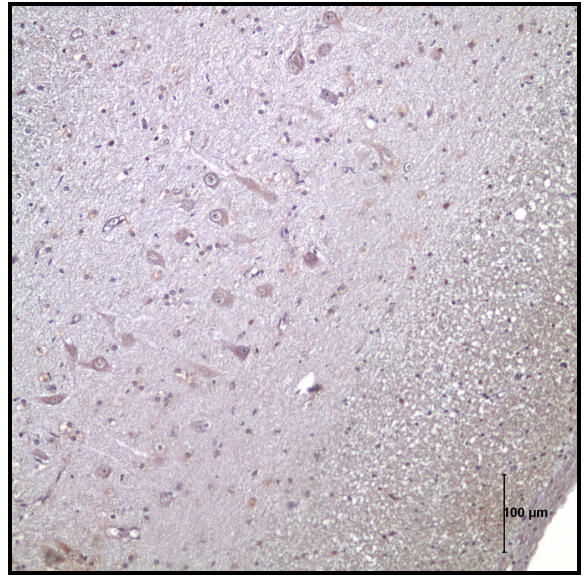
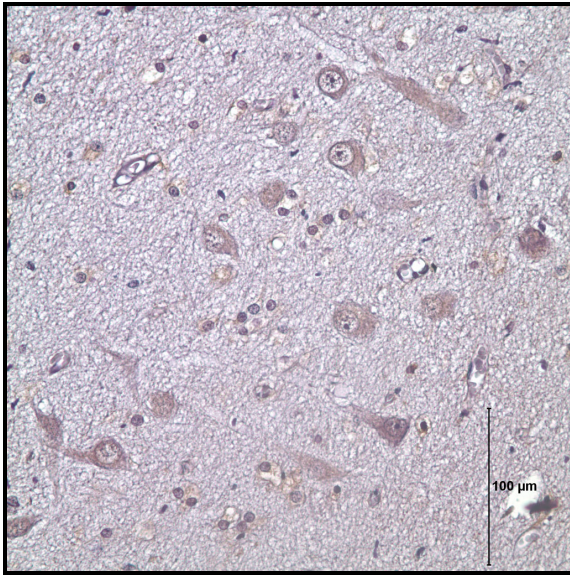
- Wyler, A.R., Dohan, F.C., Schweitzer, J.B., Berry, A.D. 1992. A grading system for mesial temporal pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy. *J. Epilepsy*, 5: 220-225.
- Yüzbaşıoğlu, A., Karataş, H., Gürsoy-Özdemir, Y., Saygi, S., Akalan, N., Söylemezoğlu, F., Dalkara, T., Kocaefe, Y.C., Özgüç, M. 2009. Changes in the expression of selenoproteins in mesial temporal lobe epilepsy patients. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 29(8): 1223-1231.
- Zentner, J., Hufnagel, A., Wolf, H.K., Ostertun, B., Behrens, E., Campos, M.G., Solymosi, L., Elger, C.E., Wiestler, O.D., Schramm, J. 1995. Surgical treatment of temporal lobe epilepsy: clinical, radiological, and histopathological findings in 178 patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 58(6): 666-673.

EKLER

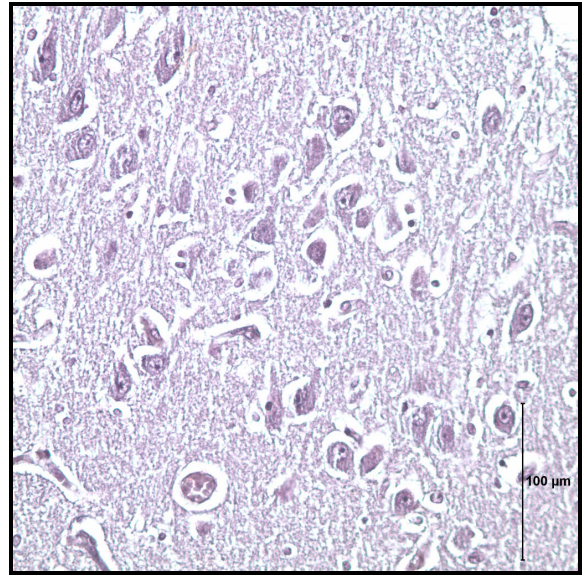
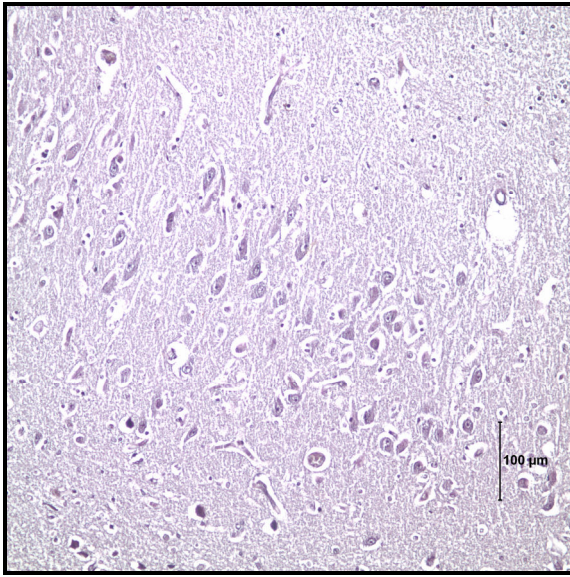
EK 1. DKK1 immünohistokimya görüntüleri



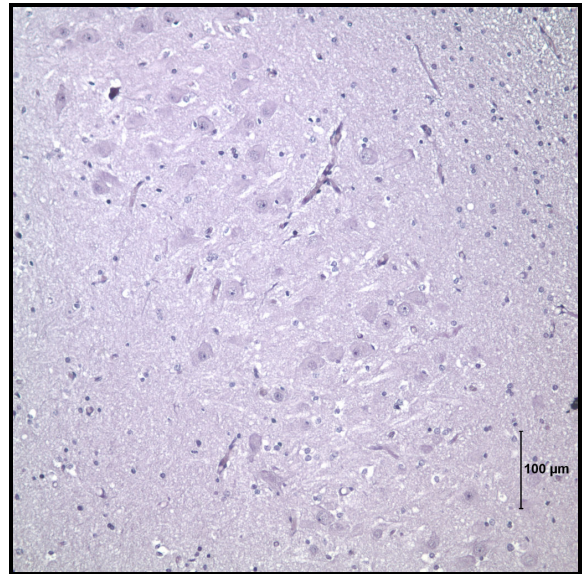
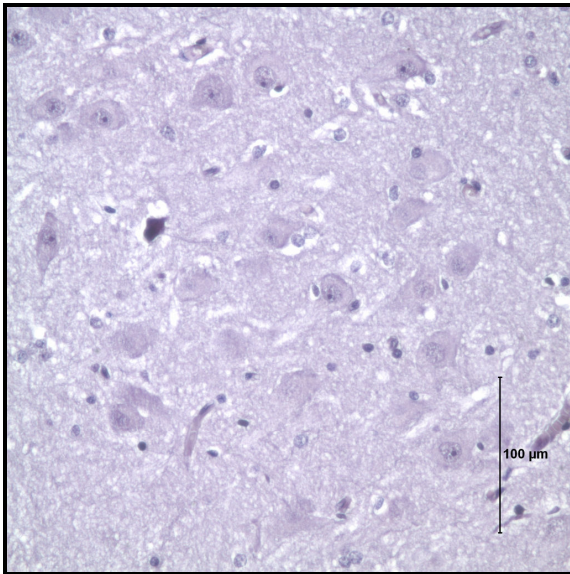
Epileptik-sklerotik olmayan hasta



Epileptik-sklerotik hasta

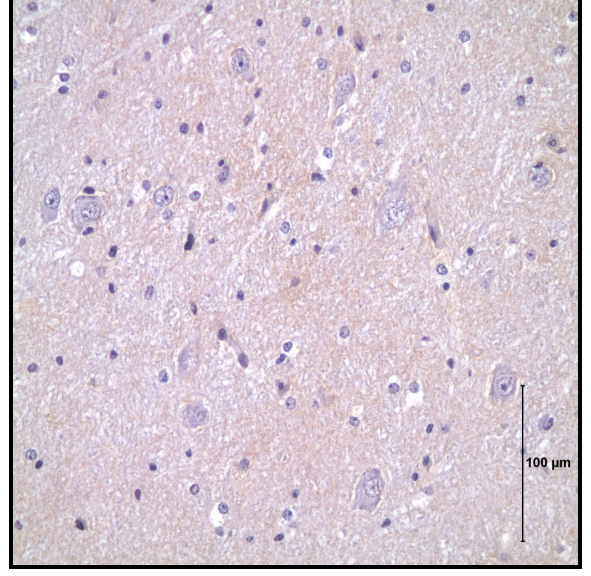
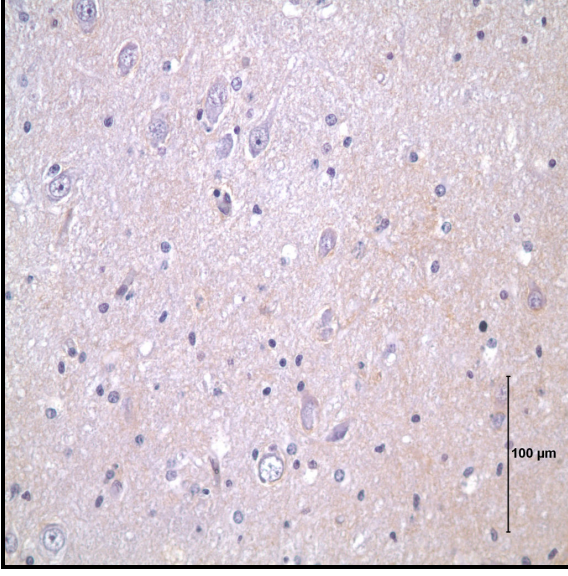


Otopsi

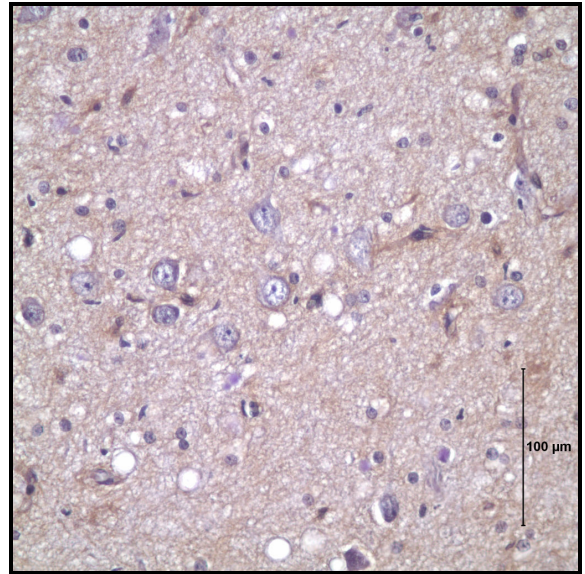
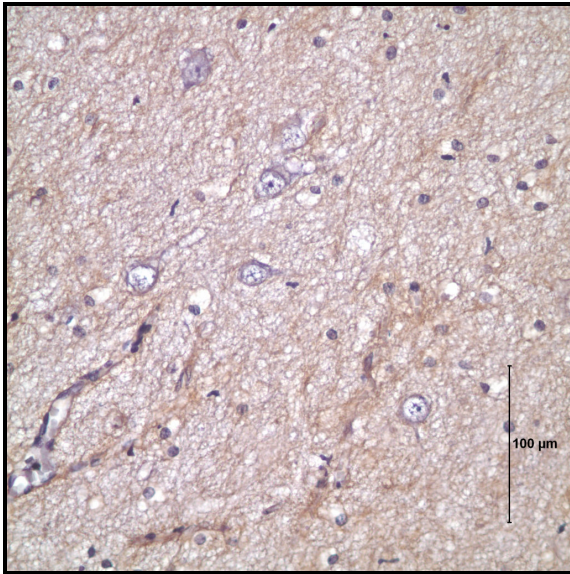
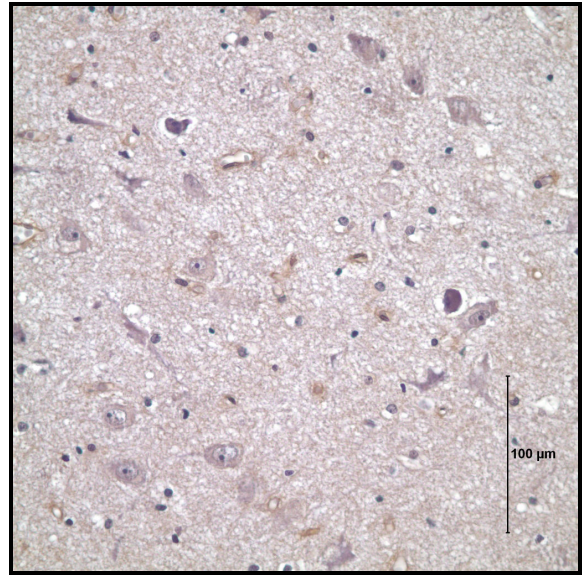
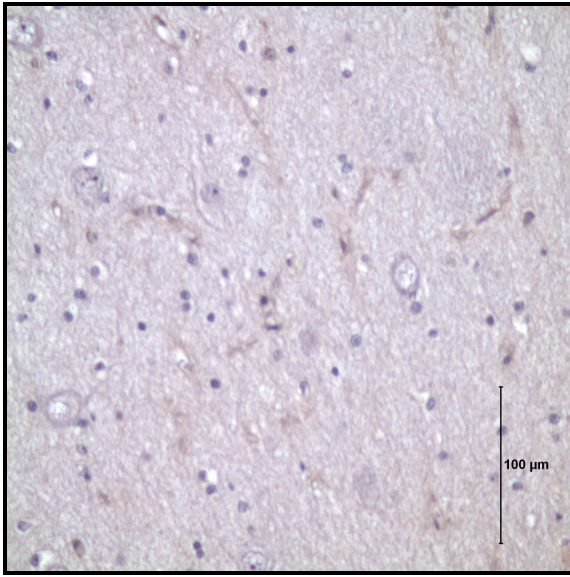


Negatif kontrol

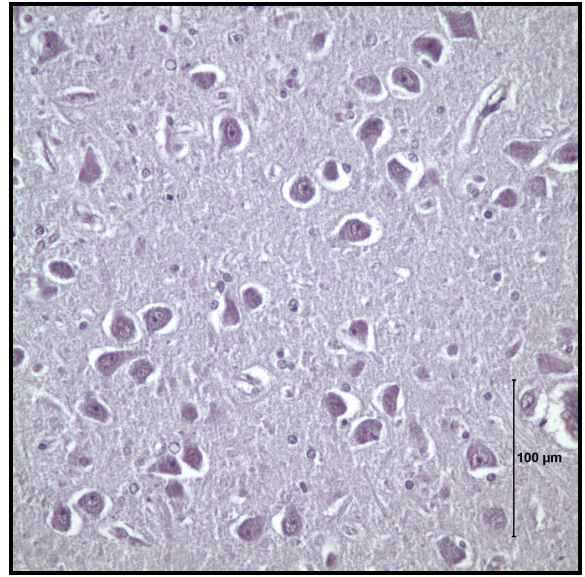
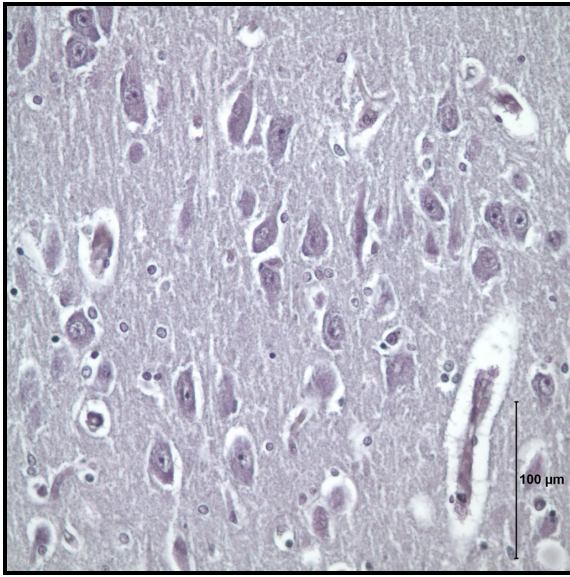
EK 2. β -katenin immünohistokimya görüntüleri



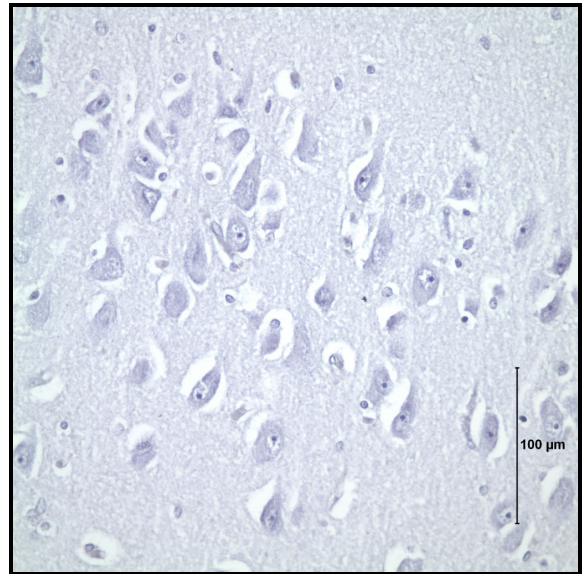
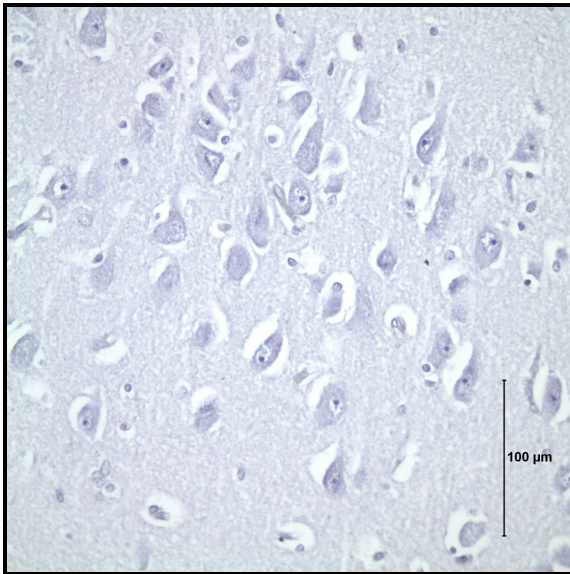
Epileptik-sklerotik olmayan hasta



Epileptik-sklerotik hasta

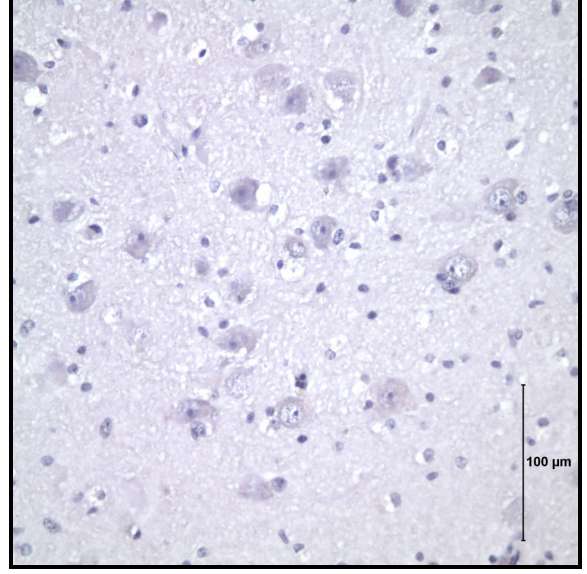
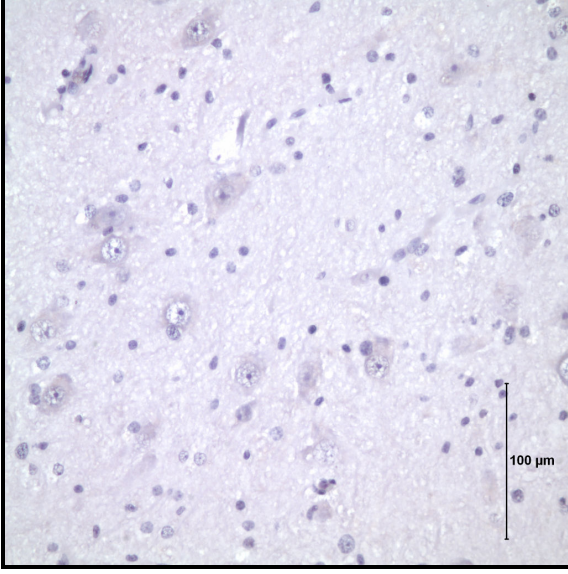


Otopsi

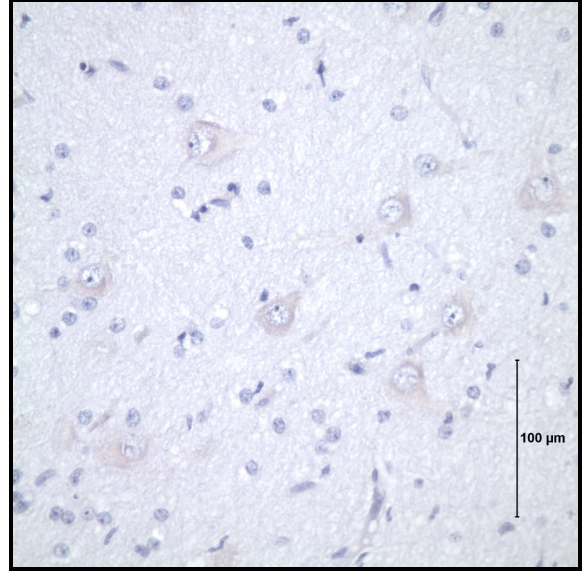
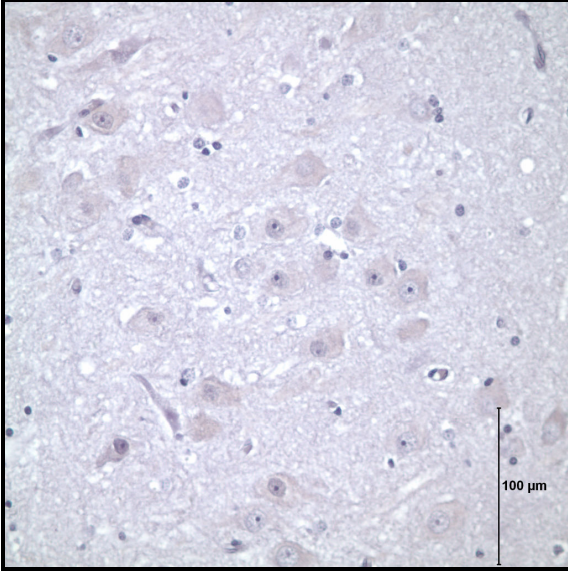


Negatif kontrol

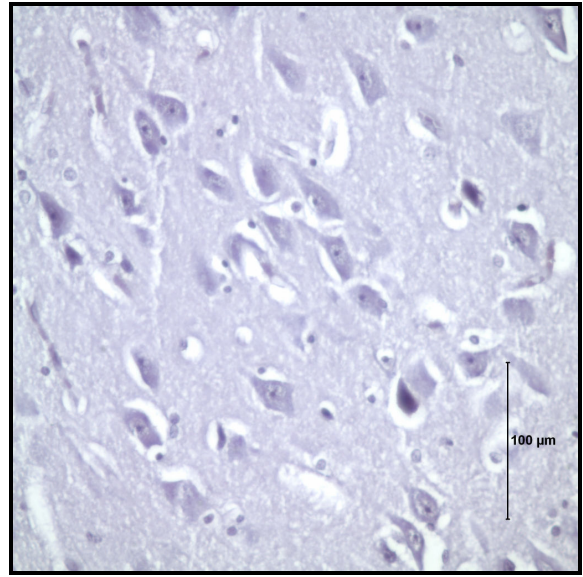
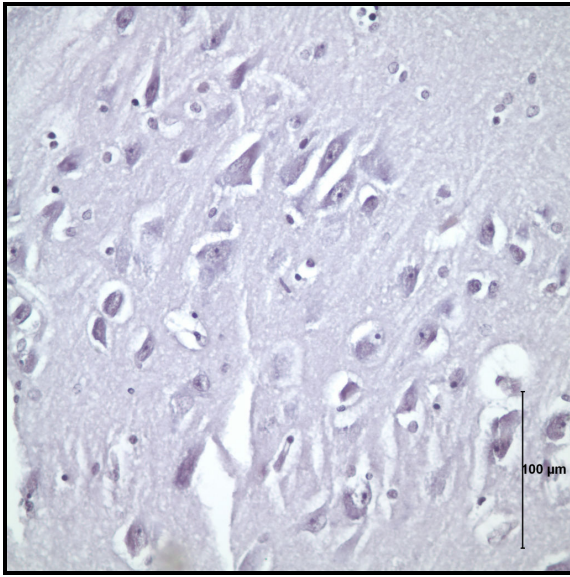
EK 3. GSK3- β immünohistokimya görüntüleri



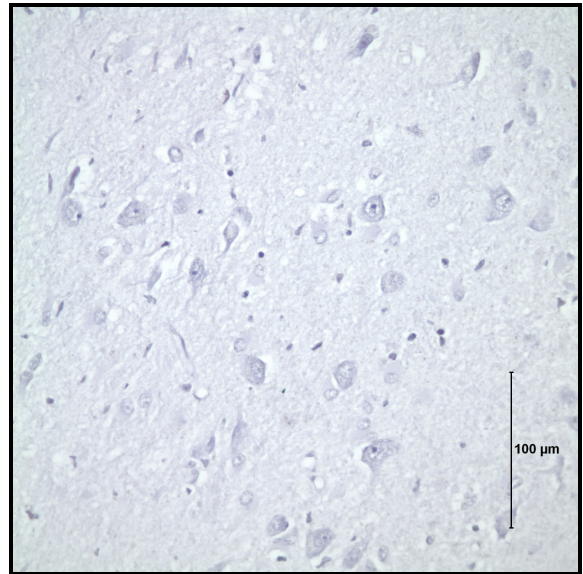
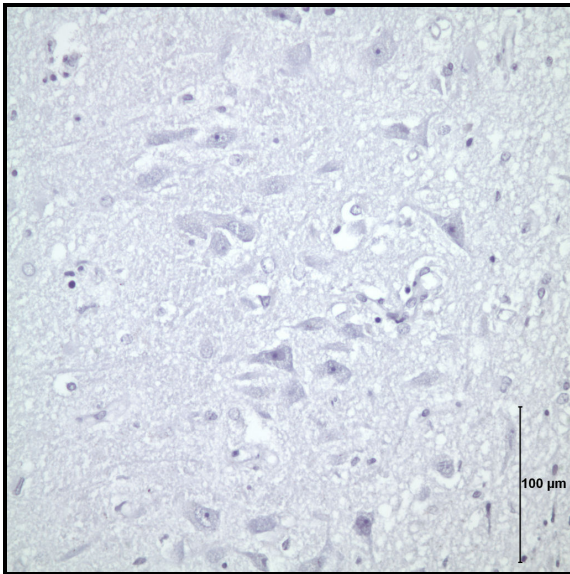
Epileptik-sklerotik olmayan hasta



Epileptik-sklerotik hasta



Otopsi



Negatif kontrol

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe Yüzbaşıoğlu
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 17.01.1977
Medeni Hali : Evli, 1 çocuk sahibi
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü - 1998
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı - 2008

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

1999-2006 : TÜBİTAK DNA/Doku Bankası ve Gen Araştırmaları Laboratuvarı (Uzman Yardımcısı)
2007 (Ocak-Mayıs): TÜBİTAK Teknoloji ve Yenilik Destek Programları Başkanlığı Biyoteknoloji, Tarım, Çevre ve Gıda Teknolojileri Grubu (Bilimsel Programlar Uzman Yardımcısı)
2007 (Haziran-) : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Uzman)

Yayınları (SCI ve diğer)

Tanyel, F.C., **Yüzbaşıoğlu, A.**, Kocafe, C., Orhan, D., Ozguc, M. 2006. Androgen receptor immunostaining and androgen receptor messenger ribonucleic acid expression are increased in cremaster muscles associated with undescended testis. Urology, 67(4): 855-858.

Yüzbaşıoğlu, A., Karataş, H., Gürsoy-Ozdemir, Y., Saygi, S., Akalan, N., Söylemezoğlu, F., Dalkara, T., Kocafe, Y.C., Özgüç, M. 2009. Changes in the expression of selenoproteins in mesial temporal lobe epilepsy patients. Cell. Mol. Neurobiol., 29(8): 1223-1231.

Özgüç, M., **Yüzbaşıoğlu, A.** 2009. Biyobankalar ve Etik. IKU, Sayı:22

- Yüzbaşıoğlu, A.**, Onbaşilar, I., Kocaefe, C., Özgüç, M. 2010. Assessment of housekeeping genes for use in normalization of real time PCR in skeletal muscle with chronic degenerative changes. *Exp. Mol. Pathol.*, 88(2): 326-329. Epub 2010 Jan 4
- Emre, S., Unver, N., Evans, S.E., **Yüzbaşıoğlu, A.**, Gürakan, F., Gümrük, F., Karaduman, A. 2010. Molecular analysis of Chanarin-Dorfman syndrome (CDS) patients: Identification of novel mutations in the ABHD5 gene. *Eur. J. Med. Genet.*, 53(3): 141-144.
- Yüzbaşıoğlu, A.**, Topçu, M., Cetin Kocaefe, Y., Özgüç, M. 2011. Novel mutations of the MLC1 gene in Turkish patients. *Eur. J. Med. Genet.*, 54(3): 281-283.

Kongre Tebliğleri

- Dursun, A., Özgül, K., Kalkanoğlu, S., **Yüzbaşıoğlu, A.**, Coşkun, T., Tokatlı, A., Özalp, I., Özgüç, M. Search for a founder effect in Turkish MSUD patients with a novel C213Y mutation at E1 α locus. SSIEM 39th Annual Symposium, Prague, Czech Republic, 4-7 September 2001. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol20(4) suppl 1, 072-P.
- Dursun, A., Özgül, K., Coşkun, T., Tokatlı, A., Kalkanoğlu, S., Özbaş-Gerçeker, F., **Yüzbaşıoğlu, A.**, Özalp, İ., Özgüç, M. A 11 bp deletion due to IVS3G→A mutation in E2 mRNA from a classical type Turkish MSUD patient. SSIEM 39th Annual Symposium, Prague, Czech Republic, 4-7 September 2001. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol 20(4) suppl 1, 073-P
- Ozbas-Gerceker, F., **Yuzbasioglu, A.**, Demirtas, M., Ozgul, K., Ozguc, M. TUBITAK DNA/Cell Bank and Gene Research Laboratory. Workshop on Biobanks-practical, ethical and legal aspects, September 12-13, 2002, Uppsala, Sweden. Short presentation 7.
- Özgüç, M., Ozbas-Gerceker, F., **Yuzbasioglu, A.** TUBITAK DNA/Cell Bank. ISBER 5th Annual Meeting, October 17-20, Perugia, Italy. *Cell Preservation Technology* Dec 2004, Vol. 2, No. 4: 318. Abstract # 33.
- Özgüç, M., Özbaş-Gerçeker, F., **Yüzbaşıoğlu, A.**, Özgül, R.K. TUBİTAK DNA/Cell Bank for rare genetic disorders, From biobanks to biomarkers: Translating the potential of human population genetics research to improve the quality of health of the EU

citizen, Wellcome Trust Conference, 20-22 September 2005, Hinxton, England, p18

Yüzbaşıoğlu, A., Onbaşlar, İ., Üren, D., Soylu, R., Kocaefe, Ç., Özgüç, M. Dejenerasyonu Sürecindeki Kas Dokusunda rt-PCR Uygulamaları İçin Güvenilir Normalizatör “House Keeping” Gen Seçimi, X.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 6-9 Eylül 2007, Antalya, p39

Yüzbaşıoğlu, A., Karataş, H., Gürsoy-Özdemir, Y., Saygı, S., Akalan, N., Söylemezoğlu, F., Dalkara, T., Kocaefe, Y.Ç., Özgüç, M. Selenoproteins in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. 3rd ESF Functional Genomics Conference, 1-4 October 2008, Innsbruck, Austria, p147

Yüzbaşıoğlu, A., Karataş, H., Gürsoy-Özdemir, Y., Saygı, S., Akalan, N., Söylemezoğlu, F., Dalkara, T., Kocaefe, Y.Ç., Özgüç, M. Mezial Temporal Lob Epilepsili Hastalarda Selenoproteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin İncelenmesi, XI.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 28-31 Ekim 2009, Bodrum, Aydın, S25

Projeler

- | | |
|------------------|--|
| 2000-2002 | Türk “Mapple syrup urine” hastalarında mutasyon ve polimorfizmlerin saptanması; C213Y mutasyonunun Türk toplumunda “founder” etkisinin araştırılması. H.Ü. Araştırma Fonu (0001101007), Yardımcı Araştırmacı |
| 2002-2004 | Çocuklarda inguinal herni, hidrosel ve inmemiş testisin nedenleri. H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi (01 02 101 004), Yardımcı Araştırmacı |
| 2002-2005 | Mesial Temporal Skleroz patolojisinde apoptotik ve sağkalım hücresel cevaplarının mRNA ekspresyonu seviyesinde analizi. H.Ü. Araştırma Fonu, (Proje No: 01 02 101 007), Yardımcı Araştırmacı |
| 2005-2007 | Mesial Temporal Lob Epilepsisi ve Selenoproteinler: Hipokampal Hücre Hasarına Karşı Sağkalım Cevabındaki Roller. TÜBİTAK-SBAG-2943, Yardımcı Araştırmacı |
| 2005-2007 | Genombilim Teknolojileri Altyapısının Güçlendirilmesi (GENTEPE), SBAG-FP6-2 (105S364), Yardımcı Araştırmacı |

- 2006-2007** Molecular defects involved in Pelizaeus Merzbacher Like Disease (PMLD), Yardımcı Araştırmacı
- 2006-2007** MLC disease: Elucidating the role of MLC1 protein in brain physiology and its involvement in MLC pathogenesis, Yardımcı Araştırmacı
- 2006-2009** Biyobankalama Etkinliklerinde Ulusal Ağ Kurulması (BIYONET), DPT Proje no: 2006K120040, Yardımcı Araştırmacı