TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENÇ VE YAŞLI SIÇANLARDA BELLEK OLUŞUMU VE DEPOLANMASININ, ZAMAN BAĞIMLI OLARAK BEYNİN FARKLI BÖLGELERİNDE DNA METİLASYONU YÖNÜNDEN İNCELENMESİ.

Çiğdem YAZICI MUTLU

DİSİPLİNLERARASI SİNİR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Eyüp Sabri AKARSU

ANKARA
2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENÇ VE YAŞLI SIÇANLARDA BELLEK OLUŞUMU VE DEPOLANMASININ, ZAMAN BAĞIMLI OLARAK BEYNİN FARKLI BÖLGELERİNDE DNA METİLASYONU YÖNÜNDEN İNCELENMESİ.

Çiğdem YAZICI MUTLU

DİSİPLİNLERARASI SİNİR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Eyüp S. AKARSU

Bu çalışma 115S810 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

ANKARA
2018

ETİK BEYAN

Ankara üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum ''Genç ve Yaşlı Sıçanlarda Bellek Oluşumu ve Depolanmasının, Zaman Bağımlı Olarak Beynin Farklı Bölgelerinde DNA Metilasyonu Yönünden İncelenmesi'' başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.
Yukarıda belirttiğim hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Çiğdem Yazıcı Mutlu
Tarih: 26. 06. 2018
İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Sinir Bilimleri

Anabilim Dalında ÇİĞDEM YAZICI MUTLU tarafından hazırlanan

''GENÇ VE YAŞLI SIÇANLARDA BELLEK OLUŞUMU VE DEPOLANMASININ, ZAMAN BAĞIMLI OLARAK BEYNİN FARKLI BÖLGELERİNDE DNA METİLASYONU YÖNÜNDEN İNCELENMESİ.''

adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak

OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

26.06.2018

Prof Dr Eyüp Sabri Akarsu
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Dr. Öğretim Üyesi Timur TUNCALI
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. Gonca K. AKBULUT
Gazi Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Erkan YURTÇU
Başkent Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Ş. Remzi ERDEM
Başkent Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii

Kabul ve Onay iii

İçindekiler iv

Önsöz viii

Simgeler ve Kısaltmalar x

Şekiller xiii

Çizelgeler xvi

1.GİRİŞ 1

1.1 Kısa Süreli Bellek 1

1.2 Uzun Süreli Bellek 3

1.2.1 Uzun Süreli Örtük Bellek 4

1.2.1.1 Uzun Süreli Örtük Belleğin Moleküler Mekanizmaları 7

1.2.1.2 Uzun Süreli Örtük Bellek Oluşumunda Yer Alan Nöroanatomik Alanlardan Biri: Amigdala 11

1.2.2 Uzun Süreli Açık Bellek 15

1.2.2.1 Uzun Süreli Açık Bellek ve Hipokampus 16

1.2.2.2 Hipokampusta Uzun Süreli Açık Belleğin Oluşumunun Moleküler Mekanizmaları 18

1.2.3 Uzun Süreli Potansiyasyonun (LTP) Erken ve Geç Fazları 22

1.2.4 Uzun Süreli Belleğin Konsolidasyonu ve Rekonsolidasyonu 25

1.2.4.1 Amigdalaya Bağlantılı Uzun Süreli Örtük Belleğin Konsolidasyonu 26

1.2.4.2 Hipokampus Bağlantılı Olarak Uzun Süreli Açık Belleğin Konsolidasyonu ve Rekonsolidasyonu 27

1.2.5 Uzun Süreli Bellek ve Sistem Konsolidasyonu 27

1.2.6 Uzun Süreli Belleğin Transkripsiyonel Düzenlenmesi 29

1.3 *Early Growth Response 1* (*Egr1*) geni 32

1.3.1 *Egr1* ve LTP 32

1.3.2 *Egr1* ve Uzun Süreli Bellek 33

1.4 Kalsinörin Geni (*CaN*) ve Uzun Süreli Bellek 34

1.4.1 Kalsinörin ve Uzun Süreli Bellek 36

1.5 Reelin Geni (*Reln*) ve Sinaptik Plastisite, LTP, Uzun Süreli Bellek 40

1.5.1 Reelin ve Sinaptik plastisite, LTP, Uzun Süreli Bellek 42

1.6 Epigenetik Düzenlemeler ve Bellek 45
1.6.1 Kromatin Yapı Değişiklikleri ve Bellek 46
1.6.1.1 Histon Asetilasyonu ve Bellek 47
1.6.1.2 Histon metilasyonu ve Bellek 48
1.6.2 DNA Metilasyonu 50
1.6.2.1 DNA Metilasyonu ve Bellek 52
1.6.2.2 DNA Metilasyonu ve Yaşlanma 56
1.6.2.3 Yaşlanma ve Bellek 56
1.6.2.4 Rodentlerde Yaşlanma ve Bellek 58
1.7 Sıçanlarda Öğrenme Modelleri 59
1.7.1 Bağlamsal Korku Şartlanması (*Contextual Fear Conditioning*) 60
1.7.2 Bağlamsal Korku Şartlanmasının Nöral Devreleri 61
1.7.3 Bağlamsal Korku Şartlanması ve Yaşlanma 62
1.8 Çalışmanın Amacı 63

2. GEREÇ VE YÖNTEM 66

2.1 Denekler 66
2.2 Gereç ve Materyal 68
2.3 Kullanılan Tamponlar 69
2.4 Yöntem 69
2.4.1 Bağlamsal Korku Şartlanması 69
2.4.2 Beyin Dokularının Çıkarılması 73
2.4.3 DNA Metilasyonu Analizi 74
2.4.3.1 DNA İzolasyonu ve Fragmantasyonu 74
2.4.3.2 Metillenmiş DNA'nın İmmunopresipitasyonu (MeDIP) 78
2.4.4 RT-PCR analizi 80
2.4.4.1 Primerlerin Optimizasyonu 80
2.4.4.2 RT-PCR Protokolü 86
2.4.5 MeDIP RT-PCR Analizinin Hesaplanması 87
2.4.6 İstatistiksel Yöntemler 88

3. BULGULAR 89

3.1 Bağlamsal Korku Şartlanmasına İlişkin Bulgular 89
3.2 DNA Metilasyon Analizine İlişkin Bulgular 95

3.2.1 Hipokampus Dokusunda *CaN* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları 95

3.2.2 Prefrontal Kortekste *CaN* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları 98

3.2.3 Amigdala Dokusunda *CaN* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları 101

3.2.4 Hipokampus Dokusunda *Reln* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları 104

3.2.5 Prefrontal Kortekste *Reln* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları 107

3.2.6 Amigdala Dokusunda *Reln* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları 110

3.2.7 *Egr1/Zif268* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları 113

4.TARTIŞMA 114

4.1 Korku Belleği Oluşumuna İlişkin Bulguların Tartışılması 115

4.2 Genç Sıçanların *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonlarına İlişkin Bulguların Tartışılması 118

4.2.1 Genç Sıçanların Hipokampus Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması 118

4.2.2 Genç Sıçanların Prefrontal Korteks Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması 119

4.2.3 Genç Sıçanların Amigdala Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması 122

4.2.4 Genç sıçanların *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Genel Olarak Tartışılması 123

4.3 Yaşlı sıçanların *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması 123

4.3.1 Yaşlı Sıçanların Hipokampus Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması 124

4.3.2 Yaşlı Sıçanların Prefontal Korteks Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması 125

4.3.3 Yaşlı sıçanların Amigdala Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması 125

4.3.4 Yaşlı sıçanların *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Genel Olarak Tartışılması 126

4.4 *Egr1* Geninin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması 127

5. SONUÇ VE ÖNERİLER **129**

ÖZET **132**

SUMMARY **133**

KAYNAKLAR **134**

EKLER **155**

ÖZGEÇMİŞ **156**

ÖNSÖZ

Korku belleğinin oluşması ve sürdürülmesinde, genç ve yaşlı sıçan beyninin farklı nöroanatomik bölgelerinde *CaN, Reln* ve *Egr1* genlerinin promotor bölge DNA metilasyon değişiklikleri farklı zaman noktalarında incelenmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulguların belleğin nasıl depolandığını anlamamızda bir basamak olacağı düşünülmektedir.

Bu zorlu yolculukta benim önümü açan, beni anlayan, yönlendiren, sabrına ve bilgisine her zaman güvendiğim danışmanım Prof. Dr. Eyüp Akarsu'ya çok teşekkür ederim.

Yeditepe Üniversitesinin kapılarını bana açan ve yönlendiren Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bayram Yılmaz'a, beni yüreklendiren, destek olan Yrd. Doç. Dr Burcu Şeker'e ve yardımlarından dolayı doktora öğrencisi Sinem Ethemoğlu'na ve Emre Yorgancıgil'e teşekkür ederim.

Deney hayvanlarımın üretimini ve 20 ay boyunca bakımını sağlayan Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (YÜDETAM) sorumlu yöneticisi Vet. Hek. Engin Sümer'e ve çalışma arkadaşlarına teşekkür ederim

Çalışmamın DNA metilasyon analizlerin yapılması için Yeditepe Üniversitesi Genetik Hastalıkları Tanı Merkezinin tüm imkanlarını kullanmama izin veren, yabancısı olduğum konuda bana sabır ve samimiyetle açıklamalar yapan, bilgisine ve kıvrak zekasına güvendiğim, kapısına koştuğumda asla geri çevirmeyen iyi yürekli insan ve bilim adamı Tıbbi Genetik Anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ömer Faruk Bayrak'a ve yakın ve sıcak dostluğu için öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr Ayşegül Kuşkucu'ya teşekkür ederim. Ayrıca bana desteklerini esirgemeyen Dilhan Öncel, Öznur Suakar, Mesut Şahin, Özlem Şilan Coşkun ve diğer çalışma arkadaşlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca epigenetik çalışmalardaki eksiklerimi bana gösteren, uzak diyarlardan video bağlantıları ile TİK toplantılarıma katılan, tüm

yoğunluğunun arasında daima bana zaman ayıran Doç. Dr. Güvem Gümüş Akay'a teşekkür ederim.

Fizyoloji yüksek lisansı ile başladığım bu yolculukta eğitim sürecimdeki katkılarına ek olarak beni destekleyen ve tez izleme jürimde de yer alarak yanımda olan sevgili hocam Prof. Dr. Gonca Akbulut'a teşekkür ederim.

Sinir bilimleri doktora programımda eğitim sürecimdeki önemli katkılarından ötürü Prof. Dr. Metehan Çiçek, Prof. Dr. Aysun Uz, Prof Dr. Canan Kalaycıoğlu ve diğer tüm hocalarıma ve bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamın her alanında bana destek olan, bana güvenen, desteğini hep arkamda hissettiğim sevgili eşime ve sabırla annesinin öğrenciliğinin bitmesini bekleyen canım kızım *Selin Mutlu'ya* sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACC	Anterior Singulat Korteks
AMPA	α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-4-propiyonik Asit
APV	2-amino-5-fosfonovalerik Asit
ARC	*Activity Regulated Cytoskeleton* Geni
5-AZA	5-aza-deoksisitidin
B	Amigdala Bazal Nükleus
BÇ	Baz Çifti
BLA	Amigdala Bazolateral Nükleus
BM	Amigdala Bazomedial Nükleus
Ca^{2+}	Kalsiyum İyonu
CaN	Kalsinörin Geni
CaMK	Kalsiyum Kalmodulin Kinaz
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CBP	CREB Bağlayıcı Protein
5cC	5-karboksisitozin
C/EBP	*CAAT Box Enhancer Binding* Protein
C-FOS	FBJ Osteosarkoma Onkogen
CH3	Metil Grubu
CpG	Sitozin-Fosfat-Guanin
CREB	*cAMP Response Element Binding* Protein
Ct	Döngü Eşiği
DAB1	Reelin Adaptör Protein 1
DNMT	DNA Metiltransferaz Enzimi
Egr1	*Early Growth Response* 1 Geni

EKŞ	Elektrokonvülsif Şok
EPSP	Eksitatör Postsinaptik Potansiyal
5fC	5-formilsitozin
F-MRI	Fonksiyonel-Manyetik Rezonans Görüntüleme
GLUA	Glutamat Reseptörü
HAT	Histon asetiltransferaz
HDAC	Histon Deasetilaz
HDM	Histon Demetilaz
HDM-LSD1	H3K4me3 Demetilazı
5hmC	5-Hidroksimetilsitozin
HMT	Histon Metiltransferaz
HMT-MILL	H3K4me3 Metiltransferazı
IEG	*İmmediate Early* Gen
IP DNA	İmmünopresipite Edilmiş DNA
LA	Lateral Amigdala Nükleusu
LTD	Uzun Süreli Depresyon
LTF	Uzun Süreli Fasilitasyon
LTP	Uzun Süreli Potansiyasyon
MAPK	Mitojen-Activated Protein Kinaz
MeCP	Metil-CpG Bağlanma Proteini
MeDIP-PCR	Metillenmiş DNA İmmünopresipitasyonu-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
5mC	5-metilsitozin
Mg^{2+}	Magnezyum İyonu
mA	Miliamper
µL	Mikrolitre

MPF	Medial Prefrontal Korteks
Na^{2+}	Sodyum İyonu
ng	Nanogram
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
PKMζ	Protein Kinaz M Zeta
PP1	*Protein Fosfataz 1* Geni
PP2B	*Protein Fosfataz 2B* Geni
Reln	Reelin Geni
RPM	*Revolutions per minute*, Dakikadaki Devir Sayısı Ölçü Birimi
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAM	S-adenozil Metionin
SFK	Src Tirozin Kinaz
TET	*Tet-Eleven* Translokasyon Protein Ailesi
Tubb	Tubulin Geni

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Uzun süreli bellek şekilleri ve sorumlu anatomik bölgeler	6
Şekil 1.2.	Amigdaladaki korku şartlanması uyaranlarının BLA'daki yerleşimi, santral nükleusla bağlantıları ve korku ifadelerinin şematik gösterimi	13
Şekil 1.3.	Açık bellek için hipokampal sinaptik devreler	17
Şekil 1.4.	Postsinaptik nöronda LTP ve LTD'nin AMPA ve NMDA reseptörleri üzerinden ifadesi	22
Şekil 1.5.	Erken ve geç LTP'nin erken ve geç fazlarının moleküler modeli	24
Şekil 1.6.	Uzun süreli belleğin oluşumunda yer alan CREB yolağının şematik gösterimi	31
Şekil 1.7.	Erişkin beyinde sinaptik plastisite ve reelin sinyal yolağı	44
Şekil 1.8.	Histon modifikasyonlarının şematik gösterimi	46
Şekil 1.9.	Açık kromatin yapısı ve kapalı kromatik yapısının şematik gösterimi	47
Şekil 1.10.	DNA metilasyonunun şematik gösterimi	51
Şekil 1.11.	Bağlamsal korku şartlanmasında koşullu ve koşulsuz uyaranlara bağlı olarak görülen aktivitenin hipokampus ve amigdala bölgelerine projeksiyonları LA, lateral amigdala; B, bazal nükleus; AB, aksesuar bazal nükleus; CE, santral nükleus	62
Şekil 2.1.	Çalışmada yer alan genç ve yaşlı sıçan grupları	67
Şekil 2.2.	Korku şartlanması kabini, izleme ve kayıt sistemi	70
Şekil 2.3.	Bağlamsal korku şartlanması deney protokolü	72

Şekil 2.4.	Bağlamsal korku şartlanması kontrol protokolü	72
Şekil 2.5.	Kontrol ve deney gruplarına uygulanan donma davranışı test protokolü	72
Şekil 2.6.	Beyin dokularının çıkarılması a) Prefrontal korteks b) Hipokampus c) Amigdala	74
Şekil 2.7.	Su banyosu sönikatörü ile fragmente olmuş DNA'nın agaroz jel görüntüsü	77
Şekil 2.8.	Kontrol ve deney gruplarına ait DNA örneklerinin 5 dk'lık sonikasyon sonrası agaroz jel görüntüsü	77
Şekil 2.9.	*CaN* geninin promotor bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin A) amplifikasyon B) erime eğrileri ve C) agaroz jel görüntüsü	81
Şekil 2.10.	*Reln* geninin promotor bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin A) amplifikasyon B) erime eğrileri ve C) agaroz jel görüntüsü	82
Şekil 2.11.	*Egr1* geninin promotor bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin A) amplifikasyon B) erime eğrileri ve C) agaroz jel görüntüsü	83
Şekil 2. 12.	*Tubb* geninin promotor bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin A) amplifikasyon B) erime eğrileri ve C) agaroz jel görüntüsü	84
Şekil 2.13.	*H19* geninin promotor bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin A) amplifikasyon B) erime eğrileri ve C) agaroz jel görüntüsü	85
Şekil 3.1.	Bağlamsal korku şartlanması sonrasında genç ve yaşlı sıçanların % donma değerlerinin dağılım grafikleri	90
Şekil 3.2.	Genç ve yaşlı sıçanların kontrol ve deney gruplarının % donma verilerinin karşılaştırmalı grafiği	93
Şekil 3.3.	Genç ve yaşlı sıçanların hipokampus dokusunda *CaN* gen metilasyonunun katlı değişim grafiği	96

Şekil 3.4. Genç ve yaşlı sıçanların prefrontal korteksinde *CaN* gen metilasyonunun katlı değişim grafiği 99

Şekil 3.5. Genç ve yaşlı sıçanların amigdala dokusunda *CaN* gen metilasyonunun katlı değişim grafiği 102

Şekil 3.6. Genç ve yaşlı sıçanların hipokampus dokusunda *Reln* gen metilasyonunun katlı değişim grafiği 105

Şekil 3.7. Genç ve yaşlı sıçanların prefrontal korteksinde *Reln* gen metilasyonunun katlı değişim grafiği 108

Şekil 3.8. Genç ve yaşlı sıçanların amigdala dokusunda *Reln* geninin metilasyonunun katlı değişim grafiği 111

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Egr1 geni ve gen ürünü hakkında özet bilgi tablosu	32
Çizelge 1.2.	CaN geni ve gen ürünü hakkında özet bilgi tablosu	35
Çizelge 1.3.	Nöronda kalsinörinin yer aldığı düzenlemeler	39
Çizelge 1.4.	Reln geni ve gen ürünleri hakkında özet bilgi tablosu	41
Çizelge 2.1.	Uygulanan sonikasyon protokolü	76
Çizelge 2.2.	Primer dizileri, amplikon uzunlukları ve çalışma sıcaklıkları	80
Çizelge 3.1.	Çalışmada yer alan sıçanların bağlamsal korku şartlanması sonrasında % donma verilerinin istatistiksel karşılaştırma sonuçları	91
Çizelge 3.2.	Genç ve yaşlı sıçanların % donma verilerinin kontrol gruplarının kendi aralarında ve deney grupları kendi aralarında istatistiksel karşılaştırma sonuçları	92
Çizelge 3.3.	Genç ve yaşlı sıçanların kontrol ve deney gruplarının % donma verilerinin istatistiksel karşılaştırma sonuçları	94
Çizelge 3.4.	Genç ve yaşlı sıçanların hipokampus dokusunda *CaN* geninin promotor bölge katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları	97
Çizelge 3.5.	Genç ve yaşlı sıçanların prefrontal kortekste *CaN* geninin promotor bölge katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları	100
Çizelge 3.6.	Genç ve yaşlı sıçanların amigdala dokusunda *CaN* geninin promotor bölge katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları	103

Çizelge 3.7. Genç ve yaşlı sıçanların hipokampus dokusunda *Reln* geninin promotor bölgesinin katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları 106

Çizelge 3.8. Genç ve yaşlı sıçanların prefrontal korteksinde *Reln* geninin promotor bölge katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları 109

Çizelge 3.9. Genç ve yaşlı sıçanların amigdala dokusunda Reln geninin promotor bölge katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları 112

Çizelge 4.1. Genç sıçanlarda *CaN* ve *Reln* genlerinin DNA metilasyon değişimleri 118

Çizelge 4.2. Yaşlı sıçanlarda *CaN* ve *Reln* genlerinin DNA metilasyon değişimleri 124

1.GİRİŞ

Öğrenme, canlıların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gerekli bilgiyi sağlama, çevreden gelen uyarılara göre adaptif davranışlarda bulunma ve bu yolla geleceği yeniden yapılandırabilme gücü olan bir işlem olarak tanımlanır. Bellek ise, öğrenilen bilgi ya da davranışın kodlanma, saklanma ve ihtiyaç anında geri çağırılma sürecini ifade eder. Öğrenme ve bellek zihnimizin en gizemli özelliklerindendir. Bu özellik canlıların hayatta kalmaları ve canlılık fonksiyonlarını optimal olarak yerine getirebilmeleri için gereklidir. Kandel belleği, beynimizin tüm zihinsel işlemlerini bir arada tutan bir yapışkana benzetmiş ve ‘‘bilinçli veya bilinçsiz, yaşamımızda belleğin bütünleştirici etkisi olmazsa yaşamımızdaki günler saniyelere bölünerek boş ve anlamsız hale gelebilirdi’’ diye ifade etmiştir (Kandel ve ark., 2013).

Yaklaşık bir asırdır beynin biyolojisi üzerine hücrenin moleküler biyolojisinden sistem biyolojisine ve psikolojiye kadar uzanan birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, belleğin nerede depolandığı, beyinde nasıl organize olduğu, kaç tür bellek olabileceği sorularının cevapları aranmış, sonuçta bazı cevaplar bulunmuş olmakla birlikte yeni sorular sorulmuş ve yine de bellek nasıl depolanır sorusuna tatmin edici bir cevap verilememiştir.

Bellek iki ayrı boyutta incelenmektedir; birincisi zamansal düzeyde, diğeri ise depolanan bilginin niteliği düzeyindedir. Zamansal düzeyde bellek kısa süreli veya uzun süreli bellek olarak ikiye ayrılır (Kandel ve ark., 2013).

1.1 Kısa Süreli Bellek

Bellek dediğimizde ilk aklımıza gelen uzun süreli ve bilinçli olarak farkında olduğumuz bilgidir ki bu belleğin depolanması ile oluşturulur. Oysaki bilgiyi depolama yeteneği kısa süreli bellek olarak da adlandırılan çalışma belleğine (*working memory*) bağlıdır. Çalışma belleği, güncel, geçici bir amaç

için bilginin oluşmasını sağlar. Bilişsel görevleri yerine getirirken bilgiyi geçici olarak tutan ve düzenleyen bir bellek sistemidir. İnsanda çalışma belleği iki alt sistemden meydana gelir ve bunlardan biri sözlü bilgi diğeri ise görsel-uzamsal bilgidir. Bu iki alt sistemin fonksiyonu diğer bir sistem olan yürütücü kontrol süreçler (*executive control processes*) ile denetlenir. Yürütücü kontrol süreçlerin, sözel-dilsel ve görsel-uzamsal girdilere göre depolanan bilgiyi düzenlediği, izlediği ve değiştirdiği düşünülmektedir (Baddeley ve Hictch, 1974).

Sözlü bilgi sistemi, bilinçli bir şekilde konuşma-temelli (fonolojik) bilgiyi akılda tutabilmek için kullanılır. Sözlü bilgi sistemi iki interaktif bölümden meydana gelir; fonolojik bilgiyi ifade eden bir depo ve işitilen bilginin aktif olarak tekrar edilmesini sağlayan bir mekanizma. Fonolojik depo, konuşma içeriğinin kısa bir süre (örneğin, 2 s) akılda tutulmasını sağlar. Pasif bir depolama sistemidir. Tekrar mekanizması ise bilginin sürdürülmesini sağlamaktadır. Bilginin hızlı bir şekilde silinmesini önlemek için fonolojik depodan bilginin işitilmesinden hemen sonra sessiz bir şekilde tekrar edilmesini sağlayan bir mekanizmadır. Bu mekanizma, sesletimsel tekrarlama (*articulary rehearsal*) veya sözel tekrarlama (*verbal rehearsal*) veya iç tekrarlama (*subvocal rehearsal*) olarak adlandırılır. Nörofizyoloji ve nörogörüntüleme çalışmaları, fonolojik deponun posterior pariyetal kortekste, tekrar mekanizmasının ise Broca alanındaki artikülasyon süreçlerine bağlı olduğunu göstermiştir (Smith ve ark., 1998; Kandel ve ark., 2013).

Görsel ve uzamsal sistem, bir nesnenin uzaydaki yerini ve görsel nesnenin zihinsel görüntüsünü oluşturur. Pariyetal, inferior temporal ve ekstrastriatal oksipital kortekste oluşan uzay ve nesne ifadesi, frontal, premotor korteks ve diğer sistemlerden gelen bilgiler ile birlikte toplanır, bütünleştirilir, denetlenir ve değişiklikler yapılarak düzenlenir. Primatlarda yapılan hücresel kayıt çalışmalarında obje bilgisi, yer bilgisine ek olarak obje ve yer bilgisinin işlendiği nöron grupları gösterilmiştir. Her iki bilginin işlendiği bölgenin prefrontal korteks olduğu bildirilmiştir (Goldman-Rakic, 1995; Kandel ve ark., 2013).

1.2 Uzun Süreli Bellek

Kısa süreli bellekteki bilgiler kalıcı biçime dönüştürülmek üzere etkinleştirildiklerinde uzun süreli bellek oluşmaktadır. Bilgiler kademeli olarak kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe aktarılır. Bilginin tekrar edilmesi veya kullanılması ne kadar fazla ise uzun süreli belleğe aktarılması o kadar fazla olmaktadır. Sınırlı ve çabuk bozulan kısa süreli belleğin aksine uzun süreli bellek sınırsız miktardaki bilgiyi süresiz olarak depolayabilir. Uzun süreli bellek oluşumu nöronlarda kimyasal ve fiziksel değişiklikleri içerir (Kandel ve ark., 2013).

1950 yılının ortalarında H.M. olarak bilinen bir hastanın bilateral olarak hipokampus ve amigdalası çıkarıldıktan sonra, saniye ve dakikalar içinde işlev gören çalışma belleğinin etkilenmediği dolayısıyla çalışma belleği için medial temporal lobun gerekli olmadığı anlaşılmıştır (Penfield ve Milner, 1958). Hastanın operasyon öncesi meydana gelen olayları hatırladığı ve uzun süreli belleğinin korunduğu görülmüştür. Ancak kısa süreli belleğin, uzun süreli belleğe dönüştürülemediği rapor edilmiştir. Daha sonra medial temporal lob hasarı olan birçok hastanın da uzun süreli bellek oluşturamadığı gösterilmiştir.

Graf ve Schacter (1985) sağlıklı kişilerde yaptıkları çalışmalarda uzun süreli belleğin geri çağırılmasının bilinçli veya refleksif olduğunu göstermişlerdir (Graf ve Schacter, 1985). Amnezi hastalarında yapılan çalışmalar sonucunda, bu hastaların uzun süreli belleklerinde, motor becerileri ve alışma, duyarlılaşma, klasik şartlanma ve operant şartlanmayı içeren basit refleksif bilgilerin bozulmadığı ve ayrıca belli algısal ve kavramsal eğitimlerle bu özelliklerin geliştirilebildiği gösterilmiştir. Uzun süreli bellek incelenirken bilinçli olarak geri çağrılan açık bellek ve refleksif olduğu ifade edilen örtük bellek olarak iki kısma ayrılmıştır.

1.2.1 Uzun Süreli Örtük Bellek

Uzun süreli bellekte, bilinçsiz bir şekilde hatırlanan bellek örtük bellek (nondekleratif, prosedürel veya implisit bellek) olarak ifade edilmektedir. Örtük bellek, otomatik bir tutum içindedir. Kendi içinde *priming* (ön hazırlık, tohumlanma), beceri öğrenme, alışkanlık ve şartlanma olarak ayrılır. Açık (dekleratif) olarak ifade edilen diğer bellek; yer, kişi ve nesneler hakkında gerçek bilgiyi bilinçli bir şekilde çağırma ile önceki deneyimlerimizin düşünülerek hatırlanmasıdır. Açık bellek büyük oranda esnektir. Bilginin değişik yönlü parçaları farklı şartlar altında ilişkilendirilirken, örtük bellek öğrenme sırasında oluşan şartlara katı bir şekilde bağlıdır (Schacter, 1987).

Örtük bellek, bilinçsiz davranışa rehberlik eden ve bilinçli bir çaba gerektirmeden bilginin depolanma şeklidir. Örtük belleğin bir tipi olan *priming*'in iki tipi vardır; bunlardan biri kavramsal *priming* (*conceptual priming*) diğeri ise algısal *primingdir* (*perceptual priming*). Kavramsal *priming* semantik bilgiye ulaşılmasını kolaylaştırır. Algısal *priming* ise özel duyu modaliteleri içinde meydana gelmektedir (Tulving ve Schacter, 1990).

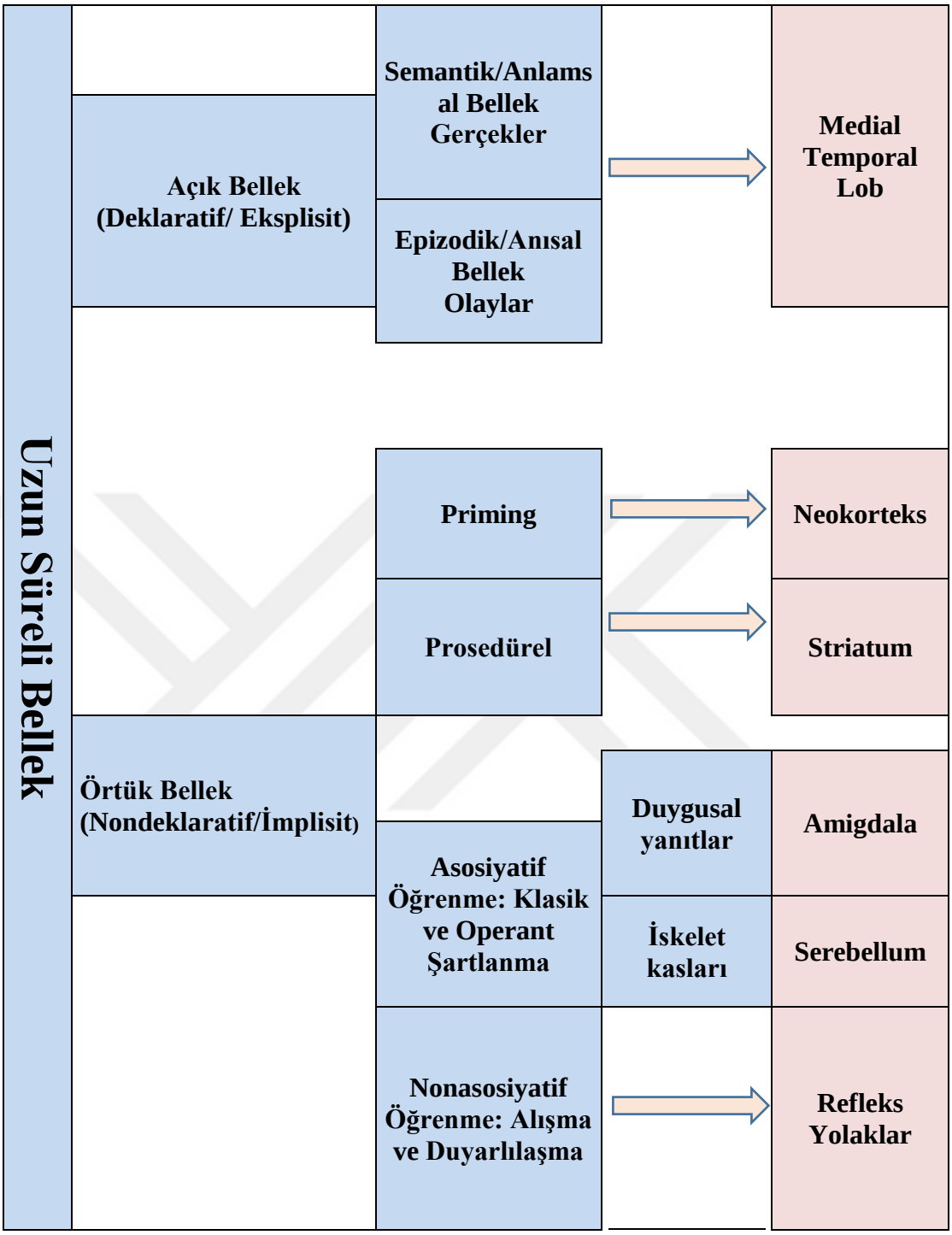
Yeni algısal, motor ya da bilişsel yetenekler tekrarla öğrenilmektedir. Tekrarla performans daha hızlı daha doğru hale gelmekte ve yeni bilginin öğrenilmesi kolaylaşmaktadır. Beceri öğrenmede bilgi, bilinç alanında başlar ve öğrenen kişi dikkatini konu üzerinde yoğunlaştırmak zorundadır. Öğrendikten sonra beceri artık bilinçli dikkate ihtiyaç duymaz, otonom aşamaya geçilmiştir. Sensorimotor becerileri öğrenmede beynin bazal ganglion, serebellum ve neokorteks bölgeleri yer almaktadır.

Klasik şartlanma çalışmalarının temelinde iki uyaranın birbirleri ile eşleştirilmesi yatmaktadır. Işık, ses ya da dokunma gibi koşullu uyaranlar seçilir. Koşulsuz uyaran için ise yiyecek ya da elektrik şoku uyaranları seçilir. Koşulsuz uyarana yanıtlar doğuştan vardır ve öğrenme olmadan meydana gelir. Klasik şartlanmada koşullu uyaran ve koşulsuz uyaran bu sıra ile birbirlerini takip ederek uygulanır ve bu iki uyaran arasındaki süre önemlidir. Bu uyaranların peş

peşe verilmeleri ve uygulama tekrar sayısının artması uyaranların içsel bağlantılarını kuvvetlendirir. Böylece bu iki uyaran birbirleri ile eşleştirilerek hatırlanır (Kandel ve ark., 2013).

Operant davranışlar, organizmanın hiçbir dış uyarana maruz kalmadan ortaya koyduğu davranışlardır. Operant şartlanma, ödüle götüren veya cezadan kurtaran bir davranış ve bu davranışın ortaya çıkardığı sonuç arasındaki tahmini ilişkinin oluşması olarak ifade edilir (Kandel ve ark., 2013).

Uzun süreli bellekte örtük bellek *priming* için neokortekste, görevler ve alışkanlıklar için striatumda, öğrenilmiş korku için amigdalada, öğrenilmiş motor görevler için serebellumda, alışma ve duyarlılaşma gibi nonasosiyatif öğrenme için belirli refleks yolaklarında oluşurken, açık bellek neokortekste medial temporal lob ve hipokampuste meydana gelmektedir (Şekil 1.1). Başlangıçta açık bellekte depolanan bilişsel, motor ve algısal beceriler, uzun süreli pratik sonucunda örtük bellek olarak depolanır.



Şekil 1.1 Uzun süreli bellek şekilleri ve sorumlu anatomik bölgeler (Kandel ve ark., 2013'den uyarlanmıştır).

1.2.1.1 Uzun Süreli Örtük Belleğin Moleküler Mekanizmaları

Örtük belleğin depolanmasında sinaptik iletimin etkinliğindeki değişiklikler rol oynamaktadır. Bu değişiklikler ile örtük belleğin moleküler mekanizmasını göstermek için Kandel ve ekibi, *Aplasia californicayı* (deniz salyangozu) model olarak kullanmışlardır. Örtük öğrenmenin en basit şekilleri, alışma, duyarlılaşma ve klasik şartlanmadır. Alışmanın fizyolojik temelleri ilk olarak Sherington tarafından araştırılmış ve uyarılan yolakta yer alan sinapsların etkinliğinde azalma olduğu gösterilmiştir (Sherrington, 1906). Daha sonra Spencer ve Thompson, alışma sırasında, lokal eksitator internöronlardan motor nöronlara gelen inputun kuvvetinin azaldığını göstermişlerdir (Spencer ve ark, 1966). Kandel deniz salyangozunda solungaç geri çekme refleksini kullanarak alışmanın, duyarlılaşmanın ve klasik şartlanmanın moleküler mekanizmasını duyu, motor nöron ve internöronlar tarafından oluşturulan nöral devre bağlantılarını kullanarak açıklamıştır. Örtük belleğin moleküler mekanizması açıklanırken duyarlılaşma modeli kullanılmıştır.

Duyarlılaşma solungaç geri çekme refleksinin nöral devre bağlantılarında, sinaptik iletimin artmasının bir sonucu olarak oluşmaktadır. Bir hayvana tekrarlı şekilde zararsız bir uyaran verildiğinde o uyarana alışma gerçekleşir; dolayısıyla refleks cevap alınamaz. Tersine, zararlı bir uyaran ile hayvan tipik bir şekilde korkuyu öğrenir ve hatta zararsız uyarana bile kuvvetli bir cevap oluşturur. Sonuç olarak sifona dokunulduğunda solungaçta geri çekme refleks yanıtı abartılı bir şekilde meydana gelmektedir. Refleks yanıtındaki artış duyarlılaşma olarak isimlendirilmektedir.

Duyarlılaşmada deniz salyangozunun kuyruğuna elektrik uyarısı uygulanmıştır. Bu uyarıyı duyu nöronlarının presinaptik terminallerine akso-aksonik sinaps yapan 3 grup internörondan biri olan serotoninerjik internöronlar algılamaktadır.

Kuyruğa verilen elektrik uyarısı sonrasında serotoninerjik internöronlardan serotonin salgılanmakta ve duyu nöronlarındaki serotonin reseptörlerini uyararak G proteini aracılığıyla adenilat siklaz aktivitesi artmaktadır.

- Adenilat siklaz aracılığıyla, ikincil haberci siklik adenozin monofosfat (cAMP) sentezlenmekte ve sonrasında cAMP-bağımlı protein kinaz A (PKA) aktivitesi artmaktadır.
- Serotonin ayrıca G proteini ile kenetli diğer bir reseptörünü uyararak, protein kinaz C'yi (PKC) uyarmakta ve fosfolipidlerin hidrolizine neden olmaktadır.
- PKA ve PKC aracılığıyla fosforile olan proteinler duyu nöronlarından transmitter salıverilmesını artırmaktadır. PKA, potasyum kanallarını fosforile edip kapatarak kalsiyum (Ca^{2+}) girişini artırırken, PKC, direkt olarak Ca^{2+} girişini artırarak transmitter salıverilmesını artırmaktadır.
- Transmitter salıverilmesindaki artış birkaç dakikalık presinaptik fasilitasyon meydana getirmektedir.

Deniz salyangozunda uzun süreli duyarlılaşma modeli ile uzun süreli belleğin oluşum mekanizması açıklanmıştır. Bu modelde tekrarlı elektrik uyarısı uygulamasının, presinaptik fasilitasyonu gün boyunca devam ettirdiği ve böylece presinaptik ve postsinaptik nöron ile arasındaki sinaptik bağlantının kuvvetlendiği ifade edilmiştir.

Solungaç geri çekme refleksinin uzun süreli duyarlılaşmasında da duyu ve motor sinaps bağlantısının kuvvetinde değişiklikler meydana geldiği ve ayrıca yeni sinaptik bağlantıların da oluştuğu gösterilmiştir.

Duyu nöronuna aralıklı olarak 5 kez serotonin uygulaması, 1 gün ya da daha uzun devam eden presinaptik fasilitasyon ve yaklaşık bir saatin üzerinde uzun süreli duyarlılaşma meydana getirirken, birkaç gün boyunca duyu nörona aralıklı olarak serotonin uygulaması, duyarlılaşmayı bir ya da birkaç hafta devam ettirmektedir.

Tekrarlı uyarılar kısa süreli belleği, uzun süreli belleğe dönüştürürler. Bu durum konsolidasyon olarak isimlendirilir ve süreç yeni protein sentezine ihtiyaç duyar. Kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe geçebilmek için uzun süreli cAMP artışı gerekir.

- Tekrarlı uygulamalar serotoninin reseptörleri aracılığıyla adenilat siklazı uyarmasıyla cAMP de uzun süreli artışa neden olur (Kandel, 2001; Ma ve ark., 2009).
- cAMP de oluşan uzun süreli artış, PKA aktivasyonunun uzamasına neden olur ve kinazın katalitik kısmının ayrılarak duyu nöronunun nükleusuna gitmesine olanak sağlar ve ayrıca ikinci bir kinazın [Mitojen-activated protein kinaz (MAPK)] aktivitesini sağlar.
- Nükleusa geçen PKA'nın katalitik kısmı fosforillenir ve *cAMP Response Element Binding Protein1* (CREB-1) adı verilen bir transkripsiyon faktörünü aktive eder.
- Aktive olan CREB-1 promotor bölgeye CREB bağlayıcı protein (CBP) aracığı ile bağlanır ve gen transkripsiyonunu başlatır.
- CREB'in CBP'ye bağlanması histon asetilasyonuna neden olarak nükleozom seviyesinde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere de neden olur (Silva ve ark., 1998).
- PKA ile transkripsiyonun başlaması aynı zamanda MAPK yolağının aktifleşmesine de bağlıdır. MAPK, CREB-2 transkripsiyon faktörünü fosforilleyerek CREB-2'nin transkripsiyon üzerine olan inhibitör etkisinin ortadan kalkmasına neden olur.
- Uzun süreli fasilitasyonun ilk adımında, transkripsiyon üzerine CREB-1'in aktivatör ve CREB-2'nin inhibitör etkisinin ortadan kalkmasının birlikteliği uzun süreli bellek oluşumunda bir eşik meydana getirir.
- Uzun süreli fasilitasyonun ilk aşamasında, kromatin yapısı değişir ve CREB-1'in aktivasyonu ile iki gen ifade edilir. Bu genler; ubikuitin karboksi terminal hidrolaz ve *CAAT box enhancer binding protein* (C/EBP) dir.

- Ubikuitin aracılı protein yıkımını artıran hidrolazlar, PKA'nın aktivasyonunun artmasına yardım eder. Tekrarlı uyarılma ve hidrolazın PKA'yı uyarması duyu nöronunda PKA nın düzenleyici kısımlarının %25'ni yıkar ve katalitik kısımlar serbest kalarak sinaptik bağlantının kuvvetlenmesi, CREB-1'in aktivasyonu ve transmitter salıverilmesinda yer alan önemli proteinlerin fosforillenmesinin devam etmesini sağlar.
- CREB-1'in uzun süreli aktivasyonu C/EBP transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu transkripsiyon faktörü kendisiyle homodimer, diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte heterodimer oluşturarak aktivasyon faktörü denilen bir yapı meydana getirmektedir. Bu faktörler birlikte, uzun süreli belleği destekleyen yeni sinaptik bağlantıların büyümesini tetikleyen genlerin transkripsiyonu üzerine etkindir.
- Geri çekme refleksinde yer alan duyu nöronundaki presinaptik terminallerin sayısı uzun süreli sensitizasyon ile iki katına çıkmaktadır. Motor nöronun dendritleri, ek sinaptik inputları alabilmek için büyümektedir. Bu uzun süreli yapısal değişikliklere bağlı olarak sinaps sayısı artmaktadır (Kandel, 2001; Kandel ve ark., 2013).

CREB-bağımlı yolağın memeli beyninde korunduğu ve uzun süreli sinaptik plastisite ve bellek oluşumunda yer aldığı gösterilmiştir (Benito ve Barco, 2010; Barco ve Marie, 2011; Alberini ve Kandel, 2015).

Deniz salyangozu çalışmalarında ayrıca nükleusta meydana gelen ürünlerin yalnızca belirli sinapsları etkilediği ve uzun süreli fasilitasyonun (LTF) sinapsa özel olduğu gösterilmiştir (Martin ve ark., 1997). Serotonin uyarısı ile nükleusta yeni sentezlenen gen ürünlerinin (mRNA ve protein) hızlı aksonal transport mekanizmasıyla nöronun tüm sinapslarına gittiği fakat sadece daha önceden sinaptik aktivite ile işaretlenmiş ya da etiketlenmiş sinapslarda fonksiyonel olarak etki gösterdikleri bulunmuştur. Yeni protein sentezi ile LTF'nin oluşması için daha önce serotonin tarafından sinapsın işaretlenmesi gerekmektedir. Bu

durum deniz salyangozunda (Martin ve ark., 1997) ve rodent hipokampusünde (Frey ve Morris, 1998) gösterilmiş ve sinaptik yakalama ya da sinaptik işaretleme olarak isimlendirilmiştir.

Uzun süreli potansiyasyonun (LTP) gen ürünlerinin yakalanmasını sağlayan sinaptik işaretlenmenin doğasını araştırmak için serotonin ile işaretlendiği bilinen sinapslara protein sentez inhibitörü uygulanmış ve bu sinapslarda 24 saat sonra fasilitasyonunun ve sinaptik büyümenin kaybolduğu bulunmuştur. Öğrenme ile uyarılan sinaptik büyüme için sinapsta lokal protein sentezinin gerekliliği gösterilmiştir (Frey ve Morris, 1998).

Deniz salyangozu üzerinde yapılan çalışmalar sonrasında sinaptik işaretlemede iki farklı aşamadan bahsedilmektedir. Sinaptik işaretlemede, yaklaşık 24 saat devam eden ilk aşama uzun süreli sinaptik plastisiteyi ve sinaptik büyümeyi başlatır, nükleusta translasyon ve transkripsiyon gerçekleşir. Lokal olarak ise PKA aktivitesi artmaya başlar fakat lokal protein sentezi olmaz. İkinci bölüm ise uzun süreli sinaptik değişiklikler için sinapsta lokal protein sentezinin gerekli olduğu aşamadır (Kandel, 2001; Kandel ve ark., 2013). Elde edilen tüm bilgilere göre deniz salyangozunda öğrenme ve belleğin en temel şekilleri, presinaptik ve postsinaptik nöronlarda oluşan yapısal değişikliklere bağlıdır.

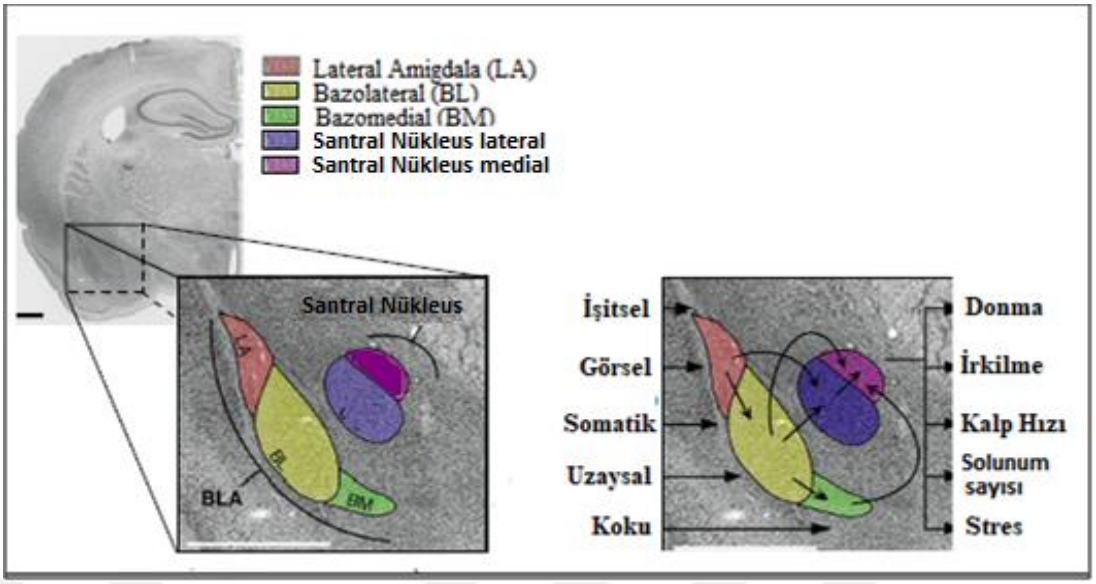
1.2.1.2 Uzun Süreli Örtük Bellek Oluşumunda Yer Alan Nöroanatomik Alanlardan Biri: Amigdala

Amigdala emosyonel davranışlar ve özellikle korku ile ilişkilendirilmiştir. Amigdala'nın, içgüdüsel ve öğrenilmiş korkunun nöronal devrelerinin merkezinde yer aldığı (LeDoux, 1988; Davis, 1992) ve duyusal bellek süreçlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Squire ve Zola, 1996; McGaugh, 2004). Amigdala ortamdaki potansiyel tehlike uyarısının belirlenmesi ve değerlendirilmesinde yer almaktadır.

Korku, beyinde nöral bağlantıları yönünden en iyi anlaşılan duygulardan biridir. Bir tehdit durumunda meydana gelen korku öznel bir his durumunu ifade etmekte, davranışsal ve fizyolojik yanıtlar oluşturmaktadır (Johansen ve ark., 2011). Amigdala bilinçsiz korku yanıtları (emosyonel durum) hakkındaki bilgiyi, direkt olarak ve anterior singulat korteksten (ACC) indirekt olarak almaktadır. Amigdala temelli savunma sistemi sayesinde, yeni tehlike çok hızlı bir şekilde belirlenmekte ve nötral uyaran ile bilinmeyen tehdit uyarısı birbirleri ile ilişkilendirilerek çok çabuk öğrenilmektedir.

Otoradyografik ve immünohistokimyasal çalışmalar amigdalanın homojen bir yapıda olmadığını ve birçok nükleus içerdiğini ortaya koymuştur (Sah ve ark., 2003). Amigdalada işitsel, somatosensoriyel ve nosiseptif bilgilerin entegrasyonu için primer bölge bazolateral amigdala (BLA) kompleksidir. BLA, lateral (LA), bazal (B); bazolateral (BL) ve bazomedial (BM) nükleuslardan oluşmaktadır (Maren, 1999). BLA yoğun olarak eksitatör nöron içerirken az miktarda GABAerjik internöron da bulunmaktadır (McDonald, 1982).

Amigdalaya gelen işitsel, görsel, somatik, uzaysal ve koku duyuları BLA nükleus kompleksinde farklı yerlerde işlenerek santral nükleusa iletilir. Duyusal girdilerin çıktıları santral nükleustan olmaktadır. Santral nükleus bilgileri, donma, irkilme, kalp hızı, solunum sayısı değişiklikleri ve stres davranışı gibi yanıtların ortaya çıkmasına aracılık eden beyin sapına göndermektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Amigdaladaki korku şartlanması uyaranlarının BLA'daki yerleşimi, santral nükleusla bağlantıları ve korku ifadelerinin şematik gösterimi (Maren, 1999'dan uyarlanmıştır).

Amigdala dilimlerinin deneysel koşullarda elektriksel yolla uyarılması ile sinaptik değişiklikler olabildiği gösterilmiştir. Yüksek frekanslı elektriksel uyarı, amigdalada LTP meydana getirmektedir (Racine ve ark., 1983). Ayrıca *in vivo* olarak talamo-amigdala ve hipokampo-amigdala bağlantılarında yüksek frekanslı uyarı sonrasında LTP kaydedilmiştir (Maren ve Fanselow, 1995; Rogan ve LeDoux, 1995). Talamus ve hipokampusten gelen bilginin BLA'ya iletildiği ve talamo-amigdala sinapslarında oluşan LTP'nin BLA içindeki işitsel uyarı ile ortaya çıkan potansiyellerin ampitüdlerini arttırdığı bulunmuştur (Rogan ve LeDoux, 1995). BLA'da oluşan LTP'nin, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aktivasyonuna ihtiyaç duyduğu gösterilirken (Gean, 1993; Huang ve Kandel, 1998), α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-4-propiyonik asit (AMPA) reseptörünün aktivasyonu ile de meydana gelebildiği gösterilmiştir (Mahanty ve Sah, 1998). Bu durum amigdalada meydana gelen LTP'nin hem NMDA reseptörüne bağımlı hem de NMDA reseptöründen bağımsız olarak oluşabileceğini düşündürmektedir.

Yüksek frekanslı elektrik uyarısı ile oluşturulan LTP gibi, davranışsal öğrenme ile de BLA'da benzer değişiklikler gözlenmiştir. Bir davranış deneyi olan korku şartlanması paradigması sonrasında amigdalada korkunun algılanması

ve korkuya bağlı oluşan yanıtlarda, glutamat (NMDA ve AMPA) reseptörlerinin önemli rolü gösterilmiştir (Maren, 1999). BLA nükleus kompleksi içine NMDA reseptör antagonistlerinden 2-amino-5-fosfonovalerik asit (APV) infüzyonu sonrasında donma (Fanselow ve Kim, 1994; Maren ve ark, 1996), irkilme (Miserendino ve ark., 1990; Campeau ve ark., 1992) gibi korku yanıtlarının oluşmasının engellendiği bulunmuştur. Bununla birlikte, AMPA reseptör antagonistlerinin infüzyonu sonrasında, korku ifadesinin oluşmadığı (Kim ve ark., 1993) ve agonistlerinin infüzyonu ile korku ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Rogan ve ark., 1997). Sıçanlarda korku şartlanması sonrasında BLA nöronlarında sinaptik iletimin AMPA reseptörleri aracılığı ile presinaptik fasilitasyona uğradığı bulunmuştur (Mckenan ve Shinnick-Galacher, 1997).

Amigdalada korku şartlanması sonrasında moleküler değişiklikler birçok çalışma ile belirlenmiştir. Korku şartlanmasında görülen moleküler değişiklikler;

- Koşullu uyaran (ses) ile presinaptik terminallerden salıverilen glutamat, LA hücrelerindeki AMPA ve NMDA reseptörlerine bağlanır.
- Glutamat reseptörü bulunan bu nöronlar, koşulsuz uyaran (elektrik uyarısı) aracılığıyla da depolarize edilir (Romanski ve ark., 1993).
- İki uyaran ile oluşan güçlü depolarizasyon NMDA reseptöründen magnezyum iyonu (Mg^{2+}) engelini kaldırarak hücre içine Ca^{2+} girişine izin verir (Mayer ve ark., 1984).
- Ca^{2+}, Ca^{2+}/kalmodulin-bağımlı protein kinaz II (CaMKII) enzimini aktive ederek fosforilasyon mekanizması aracılığı ile glutamat reseptor 1 (GluA1) içeren AMPA reseptörlerinin iletimini (Barria ve ark., 1997) ve sinapstaki yerleşimlerini (Krapivinsky ve ark., 2004) artırır.
- GluA1, LA'da bulunan nöronların dendritik spinlerinin sinapslarına yönlendirilir (Nedelescu ve ark., 2010). Bu süreç korkunun öğrenilmesi için gereklidir (Rumpel ve ark., 2005).
- Belleğin uzun süreli olabilmesi için gerekli basamaklardan olan PKA'nın aktive olması ile, GluA1 ve GluA2 içeren AMPA

reseptörlerinin sentezinin arttığı gösterilmiştir (Nayak ve ark., 1998).

- Konsolidasyon sırasında belleğin stabilizasyonu için GluA2 alt birimleri yeni eklenen GluA1 alt birimlerinin yerine geçer (Joels ve Lamprecht, 2010; Hong ve ark., 2013).
- Korku belleğinin kalıcılığı, protein kinaz M zeta (PKMζ) tarafından GluA2'nin trafiği düzenlenerek sağlanır (Migues ve ark., 2010).
- Ayrıca amigdaladaki nöronlarda uzun süreli belleğin oluşması CREB aktivitesine de bağlıdır (Silva ve ark., 1998).

1.2.2 Uzun Süreli Açık Bellek

Kanadalı psikolog Endel Tulving açık belleğin, anısal (epizodik) bellek ve anlamsal (semantik) bellek olarak sınıflandırılması gerektiği fikrini ortaya atmıştır. Anısal bellek bir süre önce yaşadığımız olayları geri çağırırken faydalandığımız bellek şekli iken, anlamsal bellek yeni öğrendiğimiz kelime ve kavramları hatırlamak için kullandığımız bellek şekli olarak ifade edilir. Hem anısal hem de anlamsal bellekte medial temporal lob önemli rol oynamaktadır. Bugün biliyoruz ki, açık bellek beyinde tek bir yerde depolanmamakta, aksine bilginin herhangi bir parçası beynin farklı birçok bölgesi arasında dağılmakta ve bu bilgilere bağımsız şekilde ulaşılmaktadır (Tulving ve Schacter, 1990).

Açık bellek süreçleri dört farklı bölümle ifade edilmektedir.

Kodlama, yeni bilgi oluşma sürecinde yeni bilginin bellekte var olan bilgiye bağlanması ve eklenmesidir. Bu sürecin uzunluğu öğrendiğimiz şeyi nasıl hatırlayacağımızı belirlemek için önemlidir. Bir belleğin kalıcı ve hatırlanabilir olması için bilginin kodlanması gerekmektedir. Bu durum ancak, yeni bilginin kodlanmış bilgi ile ilişkilendirilip ona eklenmesi ile gerçekleşmektedir. Ayrıca bilgi hatırlandıkça bellek daha da güçlenmektedir.

Depolama; zaman içinde akılda tutulan hatıraların yeri ve nöral mekanizmasını ifade etmektedir. Uzun süreli belleğin depolanmasında en dikkati çeken özellik, kapasitesinin sınırsız olabileceğidir. Çalışma belleğinin depolanması ise çok kısıtlıdır.

Konsolidasyon; bilginin geçici olarak depolanmasını sağlayan süreçtir. Konsolidasyonda, sinapslarda oluşan yapısal değişiklikleri oluşturan gen ifadesi ve protein sentezi yer almaktadır.

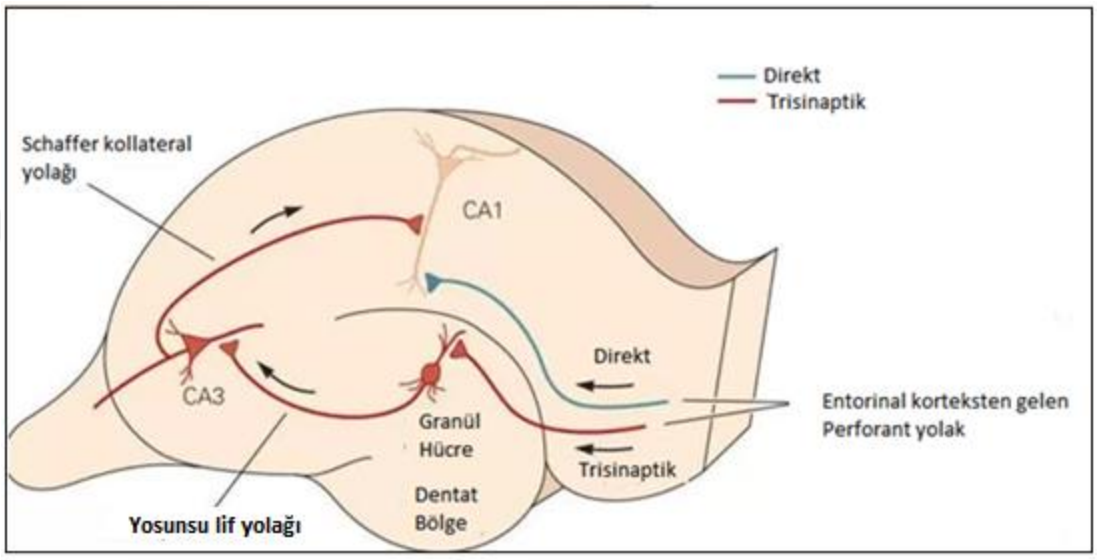
Geri çağırma; depolanmış bilginin yeniden hatırlanma sürecini ifade etmektedir. Farklı yerlerde depolanan farklı türdeki bilgilerin zihne geri getirilmesini ifade etmektedir. Belleğin geri çağırılması ile bellek yeniden yapılanma sürecine girdiğinden dolayı bozulmaya açıktır. Açık belleğin geri çağrılması çalışma belleğine bağlıdır (Kandel ve ark., 2013).

1.2.2.1 Uzun Süreli Açık Bellek ve Hipokampus

Açık bellek, yer, kişi ve nesneler hakkında gerçek bilginin bilinçli bir şekilde çağırılması ve önceki deneyimlerimizin düşünülmesi ve hatırlanmasını ifade etmektedir. Memeli beyninde hipokampus, açık belleğin kodlanması ve depolanması için önemli bir bölgedir. Hipokampus tarafından bilginin uzun süreli depolanması, sinaptik bağlantıların kuvvetinde uzun süreli değişiklikler meydana gelmesiyle olanaklıdır.

Hipokampusa gelen çok yönlü duyusal ve uzaysal bilginin girişi entorinal korteksten olurken, bilginin çıkışı CA1 bölgesindeki piramidal nöronlar aracılığı ile sağlanmaktadır. Entorinal korteksten gelen bilgi perforant yolaklar olarak isimlendirilen direkt ve indirekt eksitatör yolaklar ile CA1 bölgesine ulaşmaktadır. Direkt yolakta, entorinal korteks'in III. tabakasında yer alan nöronların aksonları, CA1 bölgesindeki nöronların apikal dendritlerinin distaline sinaps yapmaktadır. İndirekt yolakta ise, entorinal korteks'in II. tabakasına gelen bilgi üç sinapslı bir yolak aracılığıyla CA1 bölgesine iletilmektedir. Bu üç

aşamalı yolağın ilk durağı olan entorinal korteksin II. tabakasında yer alan nöronların aksonları, perforant yolağın içinde dentat girusun granül hücrelerine, ikinci durak olan granül hücrelerinin aksonları hipokampusün CA3 bölgesine, Yosunsu lif yolağı içinde uzanmaktadır. Son olarak CA3 den çıkan aksonlar Schaffer kollateral yolağı içinde seyrederek CA1 bölgesindeki piramidal nöronların proksimal bölgelerine eksitatör sinapslar yapmaktadır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Açık bellek için hipokampal sinaptik devreler (Kandel ve ark., 2013'den uyarlanmıştır).

CA1 bölgesindeki piramidal nöronlarda, direkt yolaktan ve indirekt yolaktan gelen bilgiler birbirleri ile karşılaştırılmaktadır (Ishizuka ve ark., 1990; Kandel ve ark., 2013). Bu yolaklarda yapılan lezyon çalışmaları sonrasında her iki yolağın da öğrenme ve bellek oluşumunda yer aldığı gösterilmiştir.

İndirekt Schaffer kollateral yolak lezyonu olan fare modelinde, farelerin karmaşık uzaysal bellek görevlerinin bozulduğu görülürken bazı uzaysal öğrenme görevlerinin normal olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca CA1 bölgesindeki lezyonların, belleğin ilk oluşumunu değiştirmediği, fakat konsolidasyon sürecini bozarak uzun süreli belleğin oluşmasını engellediği gözlenmiştir (Grant ve ark., 1992). Direkt yolağın genetik olarak inaktivasyonunda, anısal belleğin oluşmasının engellediği gösterilmiştir (Egorov ve ark., 2002).

Hipokampus lezyonlu fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda, hipokampusün uzaysal bilgiyi kodladığı bulunmuştur (Clark ve ark., 2005). Sağlıklı insanlarda yapılan fonksiyonel görüntüleme (*f-MRI*) çalışmaları sonrasında uzaysal bilgi geri çağırılırken sağ hipokampusün aktivitesinin arttığı, kelime, nesne ya da insan bilgisi geri çağırıldığında ise, sol hipokampusün aktive olduğu gösterilmiştir (Wixted ve Squire, 2011).

1.2.2.2 Hipokampusta Uzun Süreli Açık Belleğin Oluşumunun Moleküler Mekanizmaları

Bliss ve Lomø (1973) üçlü sinaptik yolun ilk kısmını bulmuşlar ve bu kısmın nöronal aktivitelere hassasiyetini göstermişlerdir. Bu yolağa kısa süreli yüksek frekanslı elektriksel bir uyarı verildiğinde LTP meydana geldiği ve dentat granül hücrelerinde eksitatör postsinaptik potansiyel (EPSP) oluştuğu bulunmuştur (Bliss ve Lomø, 1973). Sonraki çalışmalar, üçlü sinaptik yolakta yer alan tüm sinapslarda kısa süreli yüksek frekanslı elektriksel uyarıların LTP'ye neden olduğunu göstermiştir (Malinow ve Tsien, 1990). LTP, farklı hücresel ve moleküler mekanizmalar aracılığı ile farklı hipokampal sinapslarda sinaptik iletimi kuvvetlendiren süreçlerde yer almaktadır. LTP'nin farklı şekilleri, değişik sinaptik aktiviteler, sürece katılan reseptörler ve iyon kanalları açısından farklılık göstermektedir. Ayrıca LTP oluşurken, farklı ikincil haberci sinyal yolakları aracılığıyla, hem presinaptik hücrede transmitter salıverilmesi hem de postsinaptik hücrede glutamata hassasiyet değişebilir.

Schaffer kollateralleri, yosunsu lifler ve entorinal korteksten CA1 bölgesine gelen üç yolakta da LTP'nin oluşmasında yer alan glutamat reseptörü olarak postsinaptik yerleşimli NMDA'nın rolü değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, üç yolakta da sinaptik iletimin, kısa süreli yüksek frekanslı uyarım sonrasında uzun süreli olarak arttığı ve NMDA reseptörünün LTP oluşumuna katılımının üç yolakta da farklı olduğu bulunmuştur.

CA1 piramidal nöronları ile Schaffer kollateral sinapslarında, kısa süreli 100 Hz'lik elektriksel uyarıya yanıtla oluşan LTP'nin, NMDA reseptör antagonisti (APV ya da AP5) uygulaması ile engellendiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, APV'nin CA1'e entorinal korteksten gelen sinapslarda LTP oluşumunu kısmen engellendiği ve CA3 ile yosunsu lifler arasındaki sinapslarda oluşan LTP'ye ise bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Gustafsson ve ark., 1987; Gustafsson ve Wigström 1988; Kandel ve ark., 2013).

Yosunsu liflerde meydana gelen LTP, kısa süreli yüksek frekanslı elektriksel uyarım sırasında presinaptik terminallerden büyük miktardaki Ca^{2+} girişi ile tetiklenmektedir. Presinaptik nörona Ca^{2+} girişi, cAMP ve PKA aktivasyonu ile *mossy* liflerin terminallerinden glutamat salıverilmesini artırarak LTP'yi oluşturmaktadır. Postsinaptik nöronda benzer bir mekanizma ile LTP oluşmamaktadır. Dolayısıyla yosunsu liflerdeki meydana gelen LTP, postsinaptik nöronla ilişkili değildir (nonasosiyatiftir).

Schaffer kollateral yolağında oluşan LTP ise asosiyatiftir. Schaffer kollaterallerinden salıverilen glutamat ile CA1 piramidal nöronların postsinaptik membranlarında yer alan AMPA ve NMDA reseptörleri aktive olmakta ve postsinaptik sinyalleme basamaklarını ve LTP'yi başlatmaktadır.

NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile reseptörün yapısında bulunan Ca^{2+} kanalının açılması iki aşamada olmaktadır. İlk olarak kanalın açılması için herhangi bir iyonotropik reseptör gibi glutamatın NMDA reseptörüne bağlanması gereklidir. Zayıf bir uyaran ile oluşan membran depolarizasyonu veya dinlenme potansiyeli NMDA reseptöründen iyon geçişi için yeterli değildir. Çünkü NMDA reseptör kanalı ekstrasellüler Mg^{2+} ile engellenmiştir. Postsinaptik membranın elektrostatik bir itme ile Mg^{2+} iyonunun uzaklaştırabilmesi için güçlü bir depolarizasyon gerekmektedir. LTP uyarımı sırasındaki güçlü bir sinaptik aktivite, çok sayıda AMPA reseptörünün açılmasını sağlayarak postsinaptik aksiyon potansiyelini tetikleyecektir. Aksiyon potansiyelinin oluşturduğu büyük depolarizasyon NMDA reseptöründe yer alan Mg^{2+} engelini kaldırarak postsinaptik nörona iyon geçişine olanak sağlayacaktır. Hem AMPA hem de NMDA reseptörleri postsinaptik hücrede intrasellüler Ca^{2+} artışına neden

olmaktadır (Şekil 1.3). Hücre içindeki Ca^{2+} artışı, CaMKII, PKC ve tirozin kinaz sinyal yolaklarını aktive etmektedir. Bu sinyal yolakları hem postsinaptik hücrenin glutamata verdiği cevabı hem de presinaptik Schaffer kollateral terminalinden salıverilen glutamat miktarını artırmaktadır.

Schaffer kollateral yolağında oluşan LTP, NMDA reseptörü aracılığı ile hem presinaptik hem de postsinaptik nöronda sinyal yolaklarını etkilemektedir (Jahr ve Stevens 1993; Malenka, 1994; Lüscher ve Malenka, 2012).

NMDA reseptörleri, öğrenme ve bellek ile ilgili olarak Schaffer kollateral yolağında oluşan LTP'ye bazı özellikler kazandırmaktadır. Bu özellikler;

Cooperativity (Birliktelik), afferent aksonların büyük bir kısmının eş zamanlı olarak uyarılmasını ifade etmektedir. Bu şekilde oluşan uyarı, NMDA reseptöründeki Mg^{2+} engelini kaldırarak büyük bir depolarizasyonun meydana gelmesine neden olmaktadır.

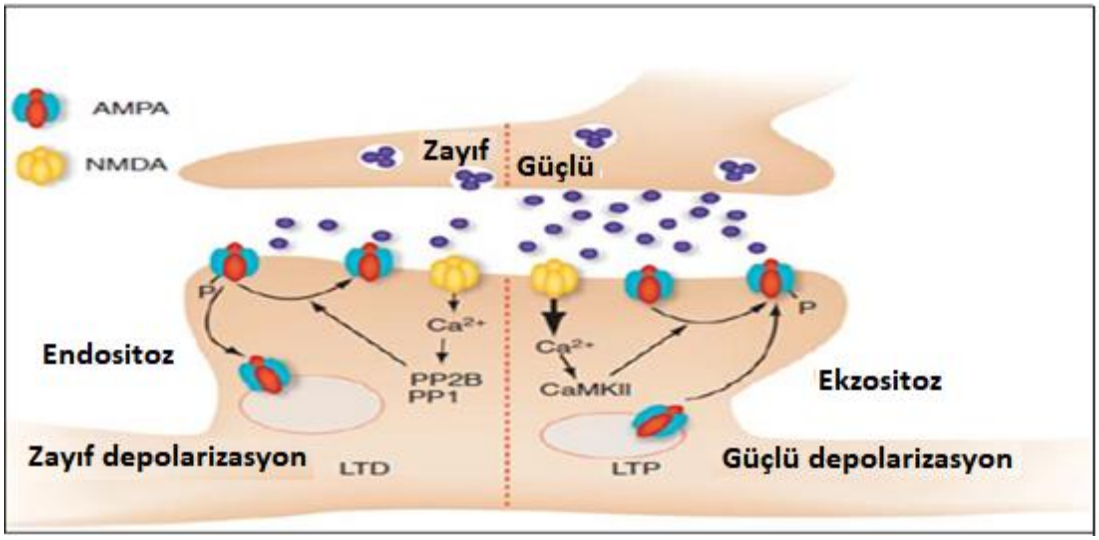
Associativity (Birleşme özelliği), normalde LTP oluşturmak için gerekli postsinaptik depolarizasyonu oluşturamayan zayıf uyaranın güçlü bir sinaptik uyaran ile birleşerek eşik üstü depolarizasyon uyaranı oluşturması şeklinde ifade edilmektedir.

LTP'nin üçüncü özelliği ise sinapsa özel olmasıdır. Bu üç özellik uzun süreli bellek depolanmasının anahtar bileşenleridir. Birliktelik özelliği, yalnızca yüksek derecede öneme sahip olayların ancak yeterli bir uyarı oluşturabileceğini ve bellek depolanmasında yer alacağını ifade etmektedir. Birleşme özelliği, Pavlovian şartlanma gibi, küçük bir öneme sahip uyaranın başka önemli bir uyaran ile birleştirilmesini sağlamaktadır. Sinapsa özgüllük ise, belirli bir olay ile ilgili olmayan bilgileri taşıyan uyaranların belleğe katılarak güçlenmesini engellemektedir (Kandel ve ark., 2013).

Bellek oluşumu, LTP'ye benzer şekilde sinaptik iletimin uzun süreli depresyonuna da (LTD) bağlıdır (Bienenstock ve ark., 1982). LTD, presinaptik nöronda tekrarlı düşük frekansta (1-3 Hz) sinaptik uyarı ile orta dereceli postsinaptik depolarizasyon gelişimi ile oluşmaktadır. NMDA

reseptörünün düşük frekans ile tekrarlı uyarılmasına bağlı olarak postsinaptik Ca^{2+} akımında uzun süreli bir artış meydana gelmektedir. LTD'nin birçok şekli, LTP ile benzer olarak aynı reseptörleri kullanmaktadır. Ayrıca LTD'nin, postsinaptik nörona NMDA reseptörü aracılığı ile Ca^{2+} girişi ile oluştuğu düşünülmektedir. LTP, yüksek frekans uyarı ile oluşurken LTD düşük frekans uyarı ile oluşmaktadır. LTD, göreli olarak orta dereceli postsinaptik depolarizasyona bağlı olarak oluşturulmaktadır ve bu depolarizasyon NMDA reseptöründeki Mg^{2+} engelini kaldırmak için yeterli değildir. Postsinaptik Ca^{2+} konsantrasyonu LTP'de gözlenenden çok düşük olduğundan CaMKII'yi aktive etmek için yetersiz kalmaktadır. LTD kalsiyum-bağımlı fosfataz (kalsinörin) enzim kompleksini kullanmaktadır. Aktive olan kalsinörin, AMPA reseptörünün alt bölümlerinden olan GluA1 gibi proteinleri defosforile eden diğer fosfatazları aktifleştirerek sinyal basamaklarını tetiklemektedir (Lisman, 1989; Jahr ve Stevens 1993; Malenka, 1994; Lüscher ve Malenka, 2012) (Şekil 1.4).

Fosfataz aktivitesine ek olarak, PKC ile AMPA reseptörünün alt bölümlerinden olan GluA2'nin fosforilasyonu da artmaktadır. GluA1 reseptörünün defosforilasyonu ve GluA2 reseptörünün fosforilasyonunun birlikteliği, AMPA reseptörlerinin endositozunu tetiklemekte ve postsinaptik membrandaki reseptör sayısını azaltmaktadır. LTD'nin farklı şekilleri, metabotropik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu aracılığı ile de uyarılmaktadır. Bu LTD şekilleri, fosfataz aktivasyonuna ihtiyaç duymazken MAPK sinyal yolağına bağımlılık göstermektedir (Lüscher ve Malenka, 2012). Bu tip LTD'de, postsinaptik hücrede yer alan AMPA reseptör trafiğindeki değişiklik ve Schaffer kollateral terminallerinden düşük miktarda glutamat salıverilmesi sinaptik iletimde bir azalmaya yol açmaktadır (Kandel ve ark., 2013).



Şekil 1.4 Postsinaptik nöronda LTP ve LTD'nin AMPA ve NMDA reseptörleri üzerinden ifadesi (Lüscher ve Malenka, 2012'den uyarlanmıştır).

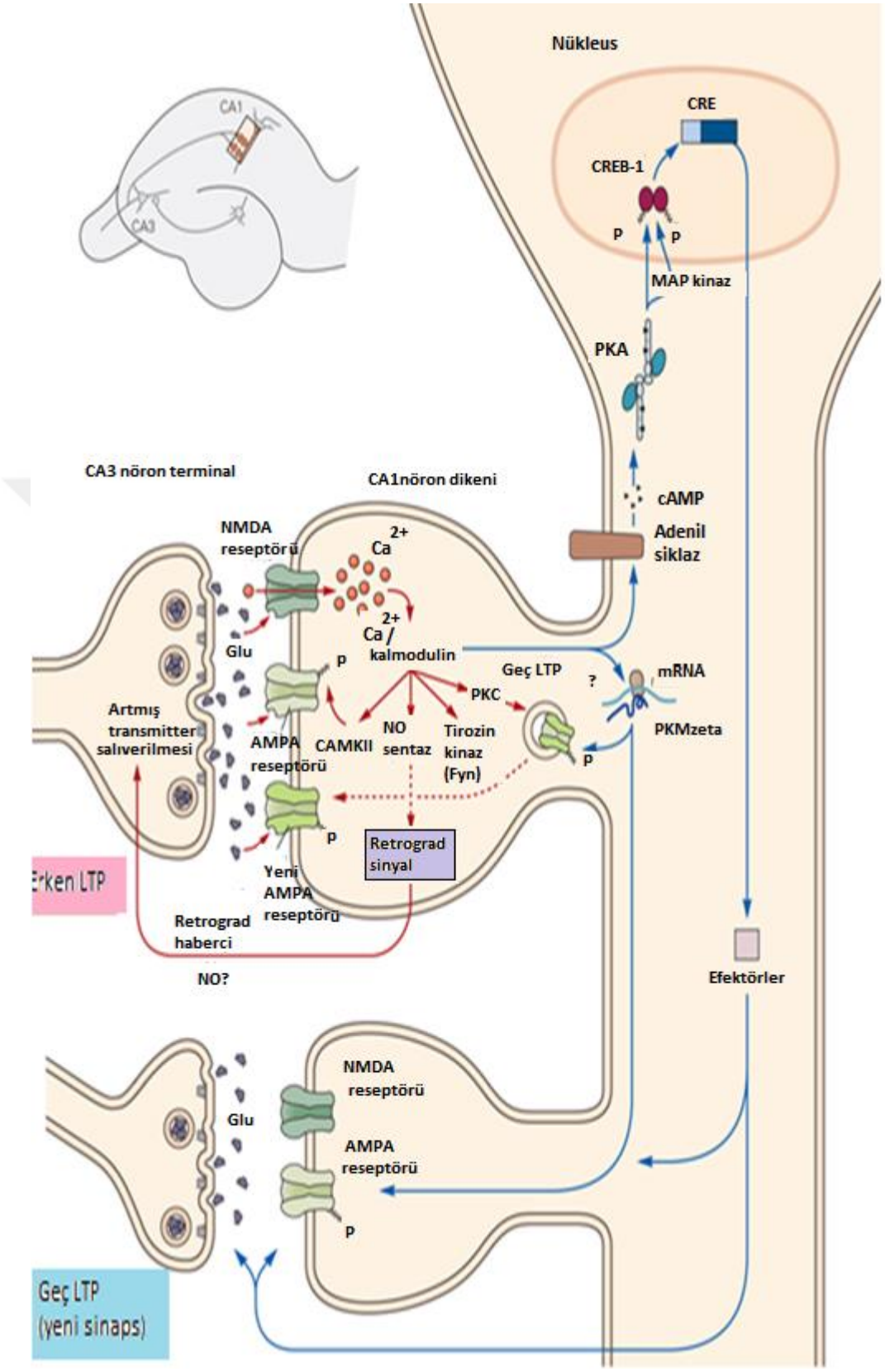
Psikolog Donald Hebb (1949) nöral devrelerin deneyimle nasıl değiştiğini açıklayan teorik bir model ortaya atmıştır. Onun ifadesi ile "A nöronunun bir aksonu B hücresini uyarmaya yaklaşmışsa ve sürekli/kalıcı olarak ateşlenmesinde rol alıyorsa, hücrelerden birinde veya her iki hücrede öyle bir gelişme veya metabolik bir değişim meydana gelir ki, B'nin ateşlenmesinde rol alan A'nın verimliliğinde bir artış olur.'' (Hebb, 1949). Hipokampuste yapılan LTP çalışmaları aynı zamanda, Hebb'in oluşturduğu teorik mekanizmaya da uymaktadır. Ayrıca entorinal korteksten dentat girusa gelen perforant yolak ve CA3'ten CA1'e gelen Schaffer kollaterallerindeki sinapsların Hebb tarafından ortaya atılan öğrenme modeline uyduğu, Yosunsu liflerdeki sinapsların ise uymadığı görülmektedir (Hebb, 1949; Kandel ve ark., 2013).

1.2.3 Uzun Süreli Potansiyasyonun (LTP) Erken ve Geç Fazları

LTP iki faza sahiptir. Bir dizi aksiyon potansiyeli erken LTP denilen bir saatten 3 saate kadar devam eden bir LTP fazı oluşturmaktadır. Bu faz protein sentezine, PKA'ya ya da cAMP'ye ihtiyaç duymamaktadır. Bununla birlikte aralıklı olarak dört ya da daha fazla sinaptik uyarı 24 saat devam eden geç LTP'yi uyarmaktadır. Geç faz LTP, cAMP, PKA, yeni protein sentezi ve gen

transkripsiyonunda değişikliklere ihtiyaç duymaktadır. Geç fazın devamlılığının PKC'nin bir izoformu olan PKMζ bağlı olduğu gösterilmiştir (Sacktor, 2011).

Erken ve geç LTP'nin moleküler modelinde tek bir uyarı ile NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile erken LTP uyarılmakta ve postsinaptik hücre içine Ca^{2+} girişi ile birlikte bir grup ikincil haberci aktive olmaktadır. Presinaptik uyarılar tekrarlı olarak devam ettiğinde Ca^{2+} akışı adenilat siklazı devreye katarak cAMP'nin oluşumuyla PKA'nın aktifleşmesi sağlanmaktadır. Bu durum aynı zamanda MAPK'nin aktifleşmesine neden olmaktadır. PKA ve MAPK nükleusa giderek CREB'nin fosforillenmesinde yer almaktadır. CREB1 yeni sinaptik bağlantıların büyümesinde yer aldığı bilinen hedeflerin transkripsiyonlarını aktifleşmektedir. Tekrarlı uyarılar aynı zamanda dendritlerde PKC'nin devamlı aktif izoformu PKMζ'yi kodlayan mRNA'nın translasyonunu aktifleşmektedir. Bu durum postsinaptik membrandaki AMPA reseptör sayısında uzun süreli artışa neden olmaktadır (Kandel ve ark., 2013) (Şekil 1.5).



Şekil 1. 5 Erken ve geç LTP'nin erken ve geç fazlarının moleküler modeli (Kandel ve ark., 2013'den uyarlanmıştır).

1.2.4 Uzun Süreli Belleğin Konsolidasyonu ve Rekonsolidasyonu

Uzun süreli belleğin oluşumu zamanla gerçekleşmektedir. Bellek başlangıçta kırılgandır ve konsolidasyon olarak isimlendirilen stabilizasyon süreci aracılığı ile bozulmaya dirençli hale gelmektedir (Bailey ve ark., 1996; McGaugh, 2000; Dudai, 2012). Uzun süreli belleğin oluşum mekanizmasında mRNA sentezinin ve bunun proteine dönüşmesinin bellek konsolidasyonu için gerekli olduğu ve bu transkripsiyonel olayların temelde evrimsel olarak korunduğu bilinmektedir (Brink ve ark., 1966; Pedreira ve ark., 1996).

Konsolidasyon hakkında ilk klinik veriler serebral travmalı kişilerde görülen bellek kaybı ile elde edilmiştir (Burnham ve ark., 1903). Daha sonra konsolidasyon, rodentlerde elektrokonvülsif şok (EKŞ) ile oluşturulan retrograd amnezi çalışmaları ile açıklanmaya çalışılmıştır (McGaugh, 2000). Birçok konsolidasyon çalışmasında, bellek oluştuktan sonra EKŞ ya da intraserebral protein sentez inhibitörü uygulamaları ile uzun süreli belleğin bozulduğu gösterilmiştir. Eğer uygulamalar bellek oluşumundan hemen sonra değil de belli bir süre sonra yapılacak olursa uzun süreli belleğin etkilenmediği bulunmuştur (Rodriguez-Ortiz ve Bermudez-Rattoni, 2007).

Konsolidasyonda, uzun süreli sinaptik plastisiteye katılan moleküler mekanizmalar da yer almaktadır (Alberini ve Kandel, 2015). Konsolidasyonun biyolojik mekanizması, moleküler konsolidasyon olarak bilinen *de novo* gen ifadesinin hızlı fazı ile başlamaktadır. Yakın döneme kadar moleküler konsolidasyonun hızla birkaç saat içinde tamamlandığına inanılmaktaydı; fakat son zamanlarda yapılan *in vivo* çalışmalarda, sirkadyen ritim ve uykunun da katıldığı zamansal bir pencerede en az 24 saat sürebileceği ortaya konulmuştur (Eckel-Mahan ve Storm, 2009; Wang ve ark., 2011; Tononi ve Cirelli, 2014).

Konsolidasyon sırasında olduğu gibi belleğin geri çağrılması sonrasında da ilk birkaç saatte *de novo* transkripsiyon ve translasyon gereklidir. Bu durum bellek rekonsolidasyonu olarak, bellek stabilizasyonunun reaktivasyon sürecini ifade etmektedir (Sara, 2000; Nader ve Einarsson, 2010; Alberini, 2011; Alberini

ve Kandel, 2015). Bellek iki durumda aktif hale gelmektedir: biri yeni oluştuğunda, ikincisi geri çağırma vasıtasıyla yeniden etkinleştirildiğinde. Belleğin aktif olduğu konsolidasyon ve rekonsolidasyon durumlarında, bozulmaya açıkken, diğer tüm durumlarda inaktiftir ve bozulmaya dirençlidir.

Konsolidasyon ve rekonsolidasyonun aynı fizyolojik mekanizmaları kullandıklarını söyleyen çalışmalar olmakla birlikte (Nader ve ark., 2000; Debiec ve ark., 2002; Duvarci ve ark., 2006) farklı süreçler olduklarını söyleyen çalışmalar da (Taubenfeld ve ark., 2001; Rodriguez-Ortiz ve Bermudez-Rattoni, 2007) bulunmaktadır.

1.2.4.1 Amigdalaya Bağlantılı Uzun Süreli Örtük Belleğin Konsolidasyonu

Amigdaladanın uzun süreli korku belleğinin oluşmasında yer aldığı, uzun süreli belleğin oluşmasında LTP oluşumu (Rogan ve ark., 1997), CREB aktivasyonu (Silva ve ark., 1998) ve *early growth response 1 (Egr1)* gen ifadesinin (Rosen ve ark., 1998) gerekli olduğu gösterilmiştir.

Amigdalanın uzun süreli belleğin konsolidasyonunda yer alabileceğini gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte (Nader ve ark., 2000) tam olarak yer alıp almadığı kesin değildir. Amigdalanın uzun süreli belleğin ve korku belleğinin konsolidasyonunun düzenlenmesinde diğer beyin bölgeleri ile birlikte yer aldığı ifade edilmiştir (McGaugh, 2000; McGaugh, 2004).

BLA ile entorinal korteks (Ressler ve ark. 2002; McGaugh, 2004), ACC (Malin ve McGaugh, 2006) arasındaki bağlantıların bellek konsolidasyonunda yer aldığı gösterilmiştir. Amigdala ve medial prefrontal korteks (mPF) arasında yoğun ve karşılıklı bağlantıların (Little ve Carter, 2013) BLA içindeki nöral entegrasyonu ile korku ifadesini düzenlediği belirtilmiştir (Arruda-Cavolho ve Clem, 2015).

1.2.4.2 Hipokampus Bağlantılı Olarak Uzun Süreli Açık Belleğin Konsolidasyonu ve Rekonsolidasyonu

Konsolidasyon hipotezi hakkındaki ilk bilgiler medial temporal lob hasarı görülen, geriye dönük unutkanlığı olan hastalardan elde edilmiştir (Burnham ve ark., 1903). Amnezik hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda belleğin kodlanması sonrasında uzun süreli olabilmesi için sınırlı bir süre için hipokampusün gerekli olduğu bildirilmiştir (Squire ve ark., 2001). Sağlıklı insanda yapılan *f-MRI* çalışmalarında hatırlama ile ilişkili olarak medial temporal lob yapılarının etkinliğinin azaldığı fakat neokortikal yapıların aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (Smith ve ark., 2010).

Uzun süreli bağlamsal, uzaysal ve anısal bellek oluşumunda yer aldığı bilinen hipokampuste, kaçınma belleğinin konsolidasyonu için gerekli olan gen ifadesine bağımlı fazın sıçanlarda eğitimden sonra 24 saatten daha uzun sürdüğü, yaklaşık 48 saatte tamamlandığı görülmüştür (Taubenfeld ve ark., 2001; Alberini 2009; Bekinschtein ve ark., 2014).

Öğrenme sonrasında saatler içinde meydana gelen değişikliklerin hipokampus-bağımlı olduğu, daha sonraki zaman noktalarında nöronal sistem seviyesindeki değişikliklerin hipokampusten bağımsız olarak meydana geldiği düşünülmektedir (Anagnostaras ve ark., 2001).

1.2.5 Uzun Süreli Bellek ve Sistem Konsolidasyonu

Hipokampal formasyon ve etrafındaki yapılar yeni bellek oluşumunda gereklidir. Hipokampus ve prefrontal korteks arasında direkt monosinaptik ve indirekt polisinaptik birçok bağlantı bulunmaktadır. Bu kortikal ve subkortikal alanlardan gelen kompleks multisinaptik yolaklar yüksek bilişsel fonksiyonlarda yer almaktadır (Jin ve Maren, 2015). Hipokampus ve prefrontal korteks arasındaki bağlantıların, anısal belleğin kodlanması ve geri çağırılması için gerekli olduğu ortaya konmuştur.

Neokortikal bölgelerin uzun süreli belleğin depolanmasından sorumlu olabileceği fikrini ilk olarak Frankland ve ark. (2004) ortaya atmışlardır (Frankland ve ark., 2004). Neokorteksin bilginin uzun süreli depolanmasında gerekli olduğu ve mPF korteksin ise bellek depolanmasında yer aldığı gösterilmiştir (Milad ve Quirk, 2002; Frankland ve ark., 2004; Runyan ve ark., 2004; Gilmartin ve Helmstetter, 2010).

Bellek konsolidasyonu, öğrenme sonrası saatlerde sinaptik plastisiteyi stabil hale getiren hücresel seviyedeki olayları açıklamak için kullanılmaktadır. Sistem konsolidasyonu ise belleği destekleyen beyin sistemlerinin dereceli reorganizasyonunu ifade etmektedir. Ayrıca sistem konsolidasyonu, başlangıçta hipokampuse bağımlı belleğin zamanla yeniden düzenlenmesi olarak açıklanabilmektedir. Bu süreçte, hipokampus belleğin depolanma ve geri çağırılmasında daha az önemli hale gelmekte, neokorteksin farklılaşmış bölgelerinde belleğin daha kalıcı hale geldiği düşünülmektedir.

Squire ve ark. (2015) sistem konsolidasyonu mekanizması ile son hatıraların başlangıçta hipokampus ve neokortekste kodlandığını fakat zamanla hipokampusten bağımsız hale geldiğini ve ayrıca hipokampusün kortikal bağlantıları aracılığı ile neokorteksteki bilginin stabililizasyonu için gerekli olduğunu ifade etmişlerdir (Squire ve ark., 2015). Neokortekste olan değişiklikler, birçok kortikal bölge arasındaki dağılmış, karmaşık bağlantıları artırarak uzun süreli belleğin stabil hale gelmesini sağlamaktadır (Squire ve ark., 2015).

Sistem konsolidasyonu ile hipokampusün başlangıçtaki rolünün farelerde iki haftanın üzerinde, insanda ise yıllarca devam ettiği ve zamanla ortadan kalkabileceği gösterilmiştir (Squire ve ark., 2004; Wiltgen ve Tanaka, 2013). Sistem konsolidasyonu fazının sonunda belleğin, moleküler uygulamalara veya hipokampal bozulma/inaktivasyon ile meydana gelen bozulmalara duyarsız olduğu açıklanmıştır (Squire ve ark., 2015).

Hipokampus-bağımlı açık belleğin sistem konsolidasyonuna girdiği bilinmekle birlikte, amigdalanın gerekli olduğu Pavlovian şartlanma gibi

durumlarda oluşan örtük belleğin sistem konsolidasyonuna girip girmediği bilinmemektedir. Hipokampus temelli açık ve amigdala temelli örtük bellek farklılıklarına rağmen uzun süreli belleğin oluşum süreçlerinde birbirleri ile etkileşim halinde olabilecekleri görülmüştür (Phelps, 2004).

1.2.6 Uzun Süreli Belleğin Transkripsiyonel Düzenlenmesi

Spesifik gen ürünlerinin (RNA ve protein) konsantrasyonlarındaki azalma ya da artışı hücre içinde belirleyen ana mekanizmalardan birisi transkripsiyonel düzenlemedir (Lewin, 2004). Dışarıdan gelen uyarılara yanıt oluşturmak için, belirli genlerin ifadeleri transkripsiyon seviyesinde kontrol edilmektedir.

Uzun süreli belleğin oluşumu ve sürdürülmesinde rol oynayan transkripsiyonel düzenlenme, çok sayıda kofaktörün, kromatin düzenleyici proteinlerin ve transkripsiyonu aktive/inhibe eden birçok transkripsiyon faktörünün etkileşimini gerektiren karmaşık bir süreçtir.

Memeli beyninde CREB bağımlı bir yolağın, sinaptik plastisite ve bellek oluşumu için gerekli olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda CREB, uzun süreli belleğin konsolidasyonu ve rekonsolidasyonu için gerekli olduğu gösterilmiş ilk transkripsiyon faktörlerinden biridir (Benito ve Barco, 2010) (Şekil 1.6).

Plastisite ya da öğrenme bağlamında CREB aktivasyonu ile C/EBP transkripsiyon faktörününün ifadesini artırmaktadır. C/EBP'nin aşırı ifadesinin ya da fonksiyonunun engellenmesi, sinaptik plastisiteyi ve bellek konsolidasyonunu artırdığı ya da engellediği gösterilmiştir (Alberini ve ark., 1994). Bu tip transkripsiyon faktörleri kendileri ile homodimer diğer transkripsiyon faktörü ile heterodimer bir yapı oluşturmaktadır. C/EBP, CREB ile birlikte uzun süreli belleği destekleyen yeni sinaptik bağlantıları tetikleyen genler üzerinde etki göstermektedir. Bu transkripsiyonu düzenleyici iki faktör arasındaki durum fonksiyonel bir bağlantıyı işaret etmektedir. CREB'in

transkripsiyon basamaklarını *C/EBP* aracılığıyla kontrol ettiği de bildirilmiştir (Alberini ve ark., 1994).

C/EBP geni bir *immediate early* gendir (IEG). Merkezi sinir sisteminde IEG'ler gen ve çevre etkileşimde önemli aracılar olarak bilinmekte; nöronal aktivite ve plastisite için çevresel uyarılar ile hedef genler arasındaki hızlı etkileşimi tetikledikleri düşünülmektedir (Bahrami ve Drabløs, 2016).

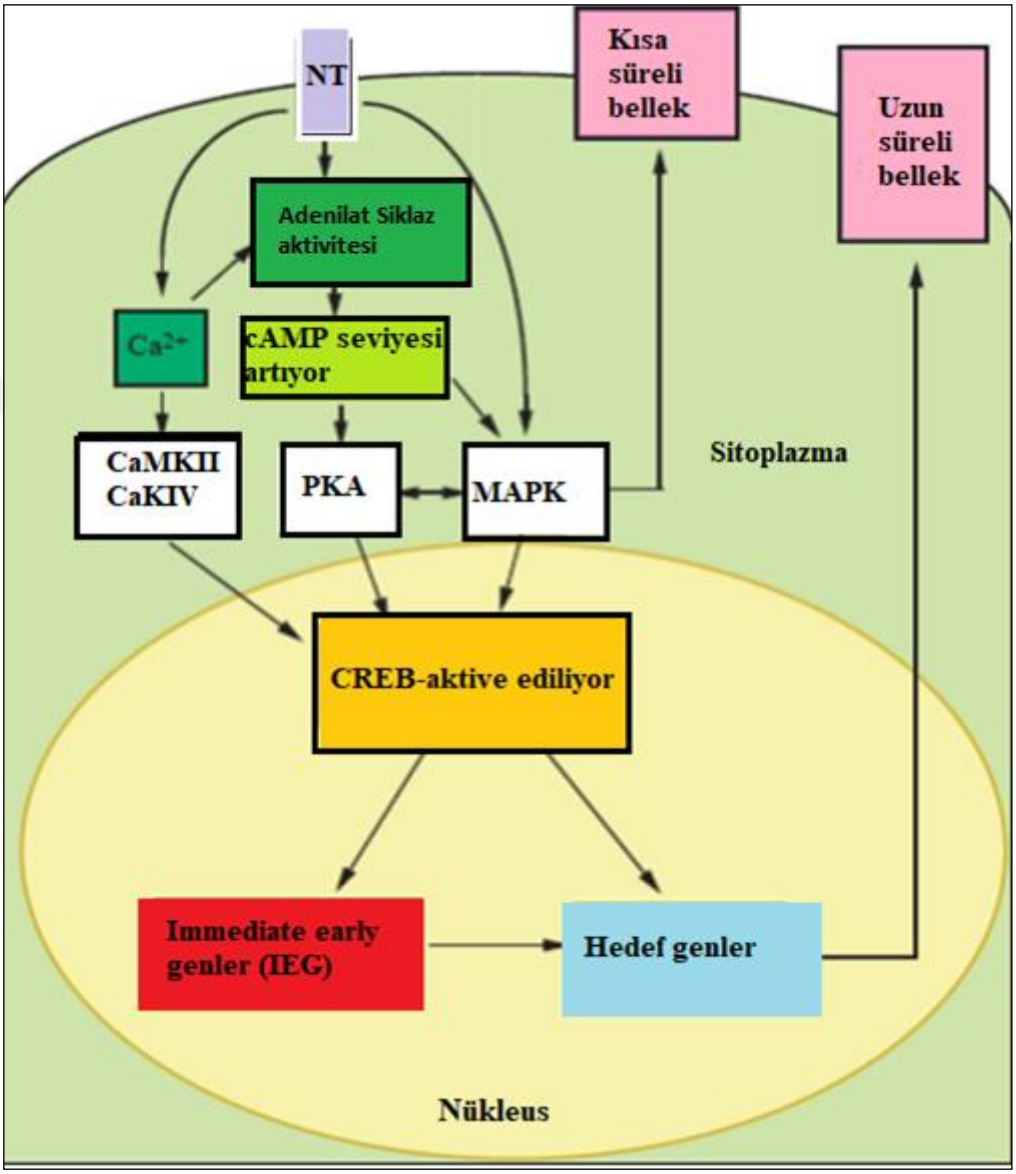
Birçok IEG transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir. Bu durum sinaptik ve nöronal seviyelerde kalıcı adaptasyonları kodlamak için nöronal faaliyete hızlı ve dinamik bir karakter sağlamaktadır. Öğrenme ve bellek oluşumu sürecinde IEG'lerin aktivasyonu önemlidir. IEG'ler öğrenme ile ilgili geç yanıt genlerinin ifadelerini düzenlemek için bunların promotor bölgeleri ile iletişime geçen transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadırlar (Penke ve ark., 2014).

IEG'lerden olan *FBJ osteosarcoma oncogene* (*c-fos*) ve *Egr1* gibi genlerin aktivasyonu sonucunda görülen bazı transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonu, öğrenmeyi takip eden nöronal aktivite ile uyarılmaktadır ve uzun süreli belleğin oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Guzowski ve ark., 2001).

Uzun süreli bellek için, *c-fos, Egr1(zif268)* ve *activity regulated cytoskeleton associated protein (arc)* genlerinin yüksek frekanslı nöronal aktivite ile hızlı bir şekilde uyarılmaları gerekmektedir (Mayford ve ark., 2012). Bu genler, nöral aktivite deseninin bir genetik çıktı oluşturabilmesi için, nöron gruplarının üzerine direkt bir moleküler kontrol oluşturma potansiyeline sahiptirler (Myford ve ark., 2012). Ayrıca bu transkripsiyon faktörleri, efektör genlerin yanıtlarından ve ifadelerinin düzenlemesinden de sorumludurlar (Woldemichael ve ark. 2014; Oliveira ve ark., 2017).

Nöronal aktivite ile uyarılan genler olarak *c-fos* ve *Egr1*'in ifadeleri, öğrenme, geri çağırma ya da herhangi bir davranışsal yanıt tarafından ortaya konan nöronal aktivite desenlerini araştırmak için kullanılmaktadır.

Nöronal aktivite ile uyarılan hedef genlerin bir grubunun ise, öğrenme ve bellek ile ilişkilendirilen sinaptik plastisitenin mekanizmasında yer alan genlerden oluştuğu düşünülmektedir (Benito ve Barco, 2015).



Şekil 1.6 Uzun süreli belleğin oluşumunda yer alan CREB yolağının şematik gösterimi (Alberini, 1999'dan uyarlanmıştır).

1.3 *Early Growth Response 1* (*Egr1*) geni

IEG'lerden biri olan Egr1 proteini çinko parmak (*zinc finger*) motifi içeren transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir. İlk olarak yaklaşık 30 yıl önce, nöronal büyüme faktörleriyle ifadesi artan genlerin araştırılması sırasında bulunmuştur (Milbrandt, 1987). *Egr1* geni (*Zif268*, *NGF1 ve Krox-24* olarak da bilinmektedir) sıçanda 18. kromozomda (NC_005117.4) yer almaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 *Egr1* geni ve gen ürünü hakkında özet bilgi tablosu.

Organizma	Sıçan
Gen sembolü	*Egr1*
Genin açık ismi	Early growth response 1
Alternatif isimler	Ngfr, Zif268, Ngf1, NGF1-A, Krox-24
Gen kimlik numarası	ID- 24330
Kromozom	18q12
Yeri	NC_005117.4
Yerleşimi	27,657,903- 27,660,101
Uzunluğu	2199 bç 2.9 kbp
Ekzon sayısı	2
Kodladığı protein	Egr1
Egr1 proteinin uzunluğu	3130 bç, 536 aa
Sıçanlarda mRNA izolasyonu yapılan dokular	Beyin, timus, adrenal bezler, kalp, böbrek, karaciğer, kas, dalak, testis/uterus
Hücre içi yerleşimi	Nükleus
Kaynak	NCBI (National Center of Biotechnology Information)

1.3.1 *Egr1* ve LTP

Egr1 geni, LTP ile ilişkili olarak veya belirli öğrenme deneyimlerinden sonra bazı beyin bölgelerinde hızla uyarılmaktadır. *Egr1* geninin deneyime bağımlı uzun süreli sinaptik plastisite ve bellek oluşumunda yapısal ve

fonksiyonel değişiklikleri sağlayan geç yanıt genlerinin transkripsiyonunu düzenlemede önemli olduğu bilinmektedir (Davis ve ark., 2003; Knapska ve Kaczmarek, 2004).

Egr1'in inaktive edildiği mutant farelerde hipokampuste kısa süreli LTP'nin bozulduğu fakat uzun süreli LTP'nin devam ettiği gösterilmiştir (Jones ve ark., 2001). *Egr1*'nin sıçanlarda obje tanıma, uzaysal öğrenme modellerinde uzun süreli bellek oluşumunda yer aldığı gösterilmiştir (Jones ve ark., 2001).

1.3.2 *Egr1* ve Uzun Süreli Bellek

Egr1'in farklı beyin bölgelerinde ifadesinin, açık belleğin farklı şekillerinin konsolidasyonu ve rekonsolidasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir (Veyrac ve ark., 2014).

Literatürde korku belleğinin amigdala bölgesinde konsolidasyonu ve rekonsolidasyonunda *Egr1* geninin rolü ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Egr1 transkripsiyon faktörünün, hipokampuste (Lee ve ark., 2004) ve amigdalada (Lee ve ark., 2006) bağlamsal korku şartlanması ile ilişkili olarak belleğin rekonsolidasyon sürecinde yer aldığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise, LA'da bağlamsal korku koşullaması sonrasında *Egr1* geninin konsolidasyonda yer aldığı fakat rekonsolidasyonda yer almadığı rapor edilmiştir (Malkani ve Rosen, 2000). Diğer bir çalışmada ise, *Egr1* ifadesinin işitsel korku koşullaması sonrasında LA'da konsolidasyonda yer almadığı fakat rekonsolidasyonda önemli olduğu gösterilmiştir (Hall ve ark., 2001). Maddox ve Schafe (2011) *Egr1* antisens yaklaşımıyla *knockdown* edilmiş sıçanlarda LA'da işitsel korku şartlanması belleğinin konsolidasyon ve rekonsolidasyonun bozulduğunu bildirmişlerdir (Maddox ve Schafe, 2011). Ayrıca amigdalada *Egr1*'in obje tanıma belleğinin rekonsolidasyonunda yer alabileceği gösterilmiştir (Bozon ve ark., 2003)

Bellek oluşumunun farklı zaman noktalarındaki rolü incelendiğinde, *Egr1* geni *knock-out* farelerde hipokampus-bağımlı obje tanıma belleğinin uzun süreli komponentinin (24 saatlik) bozulduğu, fakat kısa süreli komponentinin (10 dakikalık) sağlam kaldığı bulunmuştur (Jones ve ark., 2001). *Egr1* LA'da antisens olarak *knockdown* edildiğinde korku şartlanması sonrasında 24 saatte uzun süreli belleğin bozulduğu kısa süreli belleğin ise (3 saat) sağlam kaldığı gösterilmiştir (Maddox ve Schafe, 2011). Tüm bu bulgular işitsel korku şartlanmasında LA'da *Egr1* geninin bellek konsolidasyonunda önemli olduğu, ayrıca amigdalada bağlamsal korku şartlanmasında uzun süreli belleğin oluşumu için gerekli olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Malkani ve ark., 2004; Maddox ve Schafe, 2011).

1.4 Kalsinörin Geni (*CaN*) ve Uzun Süreli Bellek

Sıçanlarda uzun süreli bellek çalışmalarında yer alan kalsinörin, Ca^{2+} bağımlı Serin/Treonin (Ser/Thr) alfa katalitik alt birimi *Ppp3ca* geni tarafından kodlanmaktadır. Aynı zamanda bu gen protein fosfataz 2B (*PP2B*) ya da kalsinörin (*CaN*) olarak da isimlendirilmektedir. *Ppp3ca* geninin beyinde daha fazla ifade olduğu gösterilmiştir (Rusnak ve Mertz, 2000). *CaN* geni sıçanda 2. kromozomda (NC_005101.4) yerleşmiş olarak bulunmaktadır (Çizelge 1.2)

Çizelge 1.2 *CaN* geni ve gen ürünü hakkında özet bilgi tablosu.

Organizma	Sıçan
Gen sembolü	*Ppp3ca*
Genin açık ismi	Protein fosfataz 3 katalitik alt birim alfa
Alternatif isimler	*Pp2BAα, Calna1, CaN*
Gen kimlik numarası	ID- 24674
Kromozom	2q43
Yeri	NC_005101.4
Yerleşimi	241,909,332-242,186,861
Uzunluğu	277,530 bç
Ekzon sayısı	15
Kodladığı protein	PPp3ca
Kalsinörin proteininin uzunluğu	2326 bç, 521 aa
Sıçanlarda mRNA izolasyonu yapılan dokular	Beyin, kemik, mide, kalp, böbrek, karaciğer, hematopoetik sistem, plasenta, iskelet kası, hipofiz bezi
Hücre içinde yerleşimi	Sitoplazma, nükleus
Kaynak	NCBI (National Center of Biotechnology Information)

Sıçanlarda *CaN* geninin alt birimlerini (CaNAα ve CaNAβ) hedef alan antisens oligonükleotid aracılı genetik inhibisyon çalışmalarında, CA1 bölgesinde *CaN'*nin LTP'nin uyarılmasında antagonistik etkisi olduğu gösterilmiştir (İkegami ve ark., 1996). Erişkin sıçan beynine *CaN* antisens oligonükleotid infüzyonunun belleği geliştirdiği gösterilmiştir. Korku şartlanması sonrasında 24. saatte antisens oligonükleotid uygulamasıyla asosiyatif belleğin arttığı bulunmuştur (İkegami ve İnokuchi, 2000). Fakat aynı uygulama uzaysal öğrenmeye etki etmemiştir ve bu durum uzaysal öğrenme (su labirenti) ile ilgili yapılardaki yetersiz *CaN* inhibisyonuna ya da sıçanların aşırı çalışmasına bağlı olabileceği şeklinde açıklanmıştır (Mansuy, 2003). Prefrontal kortekste *CaN*'in aktif formu oluşturulan transgenik farelerde uzaysal öğrenme ve belleğin bozulduğu gösterilmiştir (Mansuy ve ark., 1998a). Fosfataz aktivitesinin arttığı CN98 mutant farelerde kısa süreli bellek normal bulunurken, uzun süreli belleğin bozulduğu gösterilmiştir (Mansuy ve ark., 1998b). Uzaysal bellekteki bozulmanın aşırı *CaN* ifadesine bağlı olduğu şeklinde açıklanmıştır

(Mansuy ve ark., 1998b). *CaN*'nin regülatör bölgesini kodlayan genin *knock-out* edildiği hayvanlarda uzaysal çalışma belleğinin bozulduğu, fakat uzaysal öğrenme ve belleğin normal olduğu bulunmuştur (Malleret ve ark., 2001).

Rodentlerde protein fosfataz 1 (*pp1*) ve *CaN*, deniz salyangozunda *CREB2* gibi belleği baskılayan genlerin, bellek üzerinde güçlü bir kısıtlama oluşturdukları ve bu genlerden herhangi birinin sessizleşmesi durumunda belleğin saklanmasının arttığı ve belleğin oluşum eşiğinin düştüğü gösterilmiştir (Malleret ve ark., 2001; Genoux ve ark., 2003; Koshibu ve ark., 2009).

1.4.1 Kalsinörin ve Uzun Süreli Bellek

Kalsinörin memeli dokusunda en yüksek düzeyde beyinde olmak üzere yaygın olarak ifade edilmektedir. Kalsinörin, biri katalitik diğeri ise Ca^{2+} bağlayan düzenleyici alt birim olmak üzere 2 alt birimden oluşan bir heterodimerdir. Katalitik alt birim için her biri ayrı genler tarafından kodlanan 3 izozim (α, β, γ); düzenleyici alt birim için ise yine her birisi ayrı genler tarafından kodlanan 2 izoform (α1, α2) söz konusudur (Kuno ve ark., 1989; Kincaid ve ark.,1990; Ueki ve ark., 1992; Chang ve ark., 1994). Dokuya göre her bir alt birimin izoformları farklılık göstermektedir.

Kalsinörin proteini; Ca^{2+} hassasiyeti yüksek, sadece Ca^{2+} ile aktive olan ve sinir sisteminde en çok bulunan bir protein fosfatazdır. Nöronlarda nükleus ve sitoplazmada yerleşim göstererek birçok substrat ile etkileşime geçebilmektedir (Baumgärtel ve Mansuy, 2012).

Presinaptik nöron terminallerinde bol miktarda bulunan kalsinörinin nörotranmitter salıverilmesinin birçok aşamasında rol oynadığı bilinmektedir. Endositoz ve ekzositoz adımları kalsinörin bağımlıdır ve bu süreçlerde kalsinörin, sinapsin, sinaptotagmin, rabfilin3A, sinaptobrevin ve defosfinleri de içeren birçok fosfoprotein ile etkileşime geçmektedir (Greengard ve ark., 1993). Sinaptik aktivite sırasında CaMKI ve II, PKA, MAPK/siklin-bağımlı kinazlar 1

ve 5 gibi birçok protein kinazlar tarafından kalsinörin fosforillenmektedir. Kalsinörinin fosforilasyonu sinapsinin vezikülden ayrılmasını ve ekzositoz için hareketlenmesine olanak sağlamaktadır (Hosaka ve ark., 1999). Kalsinörin tarafından MAPK/siklin bağımlı kinazların defosforilasyonu ya da bir diğer fosfataz olan protein fosfataz 2A tarafından CaMK/PKA defosforilasyonu ile ekzositoz süreci geri çevrilmektedir (Jovanovic ve ark., 2001). Fosforilasyon ve defosforilasyon arasındaki denge, uyarının frekansı ile düzenlenmektedir. Bu dengedeki bir düzensizlik nörotransmitter salıverilmesini önemli şekilde bozmaktadır.

Kalsinörin proteini postsinaptik nöronda da bol miktarda, dendritlerin terminallerinin iskelet proteinlerine tutunmuş olarak bulunmaktadır. Bu konumlanmada kalsinörine PKA ve PKC eşlik etmektedir (Coghlan ve ark., 1995; Oliveria ve ark., 2003). Bu yakın ilişkinin kinaz ve fosfataz dengesini sağlamak açısından önemli olduğu ifade edilmektedir (Mansuy, 2003).

Kalsinörin sitoplazmada Ca^{2+} homeostazisinin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Postsinaptik nöronda meydana gelen Ca^{2+} girişi ile ilk aktive olan kalsinörindir (Klee ve ark., 1979). Kalsinörin bir kez uyarılsa bile intrasellüler depodan Ca^{2+} salıverilmesi ve hücre içine Ca^{2+} akışının azalmasına katkı sağlamaktadır. Bunu voltaja bağımlı Ca^{2+} kanalların inaktivasyonu ve defosforilasyonuna yol açan geri-besleme mekanizmalarını tetikleyerek yapmaktadır. Bu mekanizmalar ya doğrudan voltaja bağımlı Ca^{2+} kanalları, ya da dolaylı olarak voltaja bağımlı sodyum (Na) kanalları üzerinden kontrol edilmektedir (Chen ve ark., 1995). NMDA reseptörünün uyarılması sırasında içeri giren Ca^{2+}'un düzenlenmesi, kalsinörin tarafından reseptörün *downregülasyonu* ile sağlanmaktadır (Mansuy, 2003). Sinaptik NMDA yanıtları kalsinörin tarafından baskılanmakta (Lieberman ve Mody, 1994) ve glisin-bağımsız reseptör desensitizasyonu ise artırılmaktadır (Tong ve Jahr, 1994; Raman ve ark., 1996). Kalsinörin, AMPA reseptörlerinin fosforilasyonunu düzenleyerek sinaptik iletimi düzenlemektedir (Baumgärtel ve Mansuy, 2012).

Kalsinörin, nükleustaki süreçlerde transkripsiyon faktörlerine doğrudan veya dolaylı olarak etki ederek Ca^{2+} ve nörotrofin ile uyarılan gen ekspresyonuna

katılmaktadır (Crabtree, 2001). Kalsinörin tarafından aktivitesinin düzenlendiği bilinen en önemli transkripsiyon faktörü CREB'dir (Bito ve ark., 1996; Siemann ve ark., 1999). CREB'in fosforilasyonu, kalsinörin tarafından ya doğrudan defosforillenerek ya da pp1'in aşağı akış yönünde aktivasyonu ile sonlandırılmaktadır (Genoux ve ark., 2003; Chang ve Berg, 2001). Kalsinörinin nöronal hücrelerde düzenleyici mekanizmalarda yer alması, aktivite alanları, substratlarının çeşitliliği ve Ca^{2+} hassasiyeti gibi özellikleri sebebiyle, öğrenme ve bellek mekanizmaları için önemli bir oyuncu olmaya aday olarak görülmektedir (Çizelge 1.3).

Öğrenme ve belleğin oluşma mekanizmasında nöronlarda protein kinazlar ile protein fosfatazlar arasında bir denge olduğu fikri Lisman (1994) tarafından ortaya atılmıştır (Lisman, 1994). Protein kinazlar ve fosfatazlar negatif veya pozitif geri-bildirimler ile beyindeki sinyal yolaklarını düzenlenmektedir. Bu düzenlemede yer alan en önemli kinaz CaMKII olarak gösterilmiştir. CaMKII, Ca^{2+} ile uyarılmasından sonra otofosforilasyon ile kendi kendini aktifleştirmeye devam edebilmektedir. Fosfatazlar ve kinazlar arasındaki dengeleme durumunda kalsinörin ve pp1, CaMKII'nin otofosforilasyon aktivitesini tersine döndürebilmekte ve substratlarını da defosforile etmektedir. Ayrıca Ca^{2+} ile aynı zamanda uyarılan protein fosfatazlar ve PKA'nın birbirlerine karşı zıt aktivite gösterdikleri belirtilmektedir.

Nöronal aktiviteye bağımlı uyarı ile postsinaptik nörondaki Ca^{2+} artışı ile sinaptik etkinlikte görülen değişikliklerin, nörondaki bazı proteinlerin fosforilasyon seviyeleri ile belirlendiği ve kalsinörinin bu fosforilasyonu düzenleyen önemli bir fosfataz olduğu bilinmektedir.

Kalsinörinin famakolojik veya genetik yöntemlerle inhibisyonu çalışmaları ile, kalsinörinin uzun süreli bellek oluşum mekanizmalarındaki rolü açıklanmaya çalışılmıştır.

Çizelge 1.3 Nöronda kalsinörinin yer aldığı düzenlemeler

	Presinaptik	**Post sinaptik**	**Nükleus**
Nöronda kalsinörinin yer aldığı düzenlemeler	Kalsinörinin kinazlar (CaMKI-II, PKA, MAPK, Siklin bağımlı kinazlar 1-5) tarafından fosforile edilmesi	Postsinaptik nörona giren Ca^{2+} ve hücre içi depolardan Ca^{2+}'un salıverilmesi ile ilk olarak kalsinörin aktive olur.	Transkripsiyon faktörlerine direkt ya da dolaylı olarak etki ederek gen ifadesine katılır.
	Sinapsinin vezikülden ayrılmasını sağlayarak ekzositozu başlatır.	Voltaja bağımlı Ca^{2+} kanallarını ve hücre içi Ca^{2+} salıverilmesini inaktive eder. Dolaylı olarak voltaj-bağımlı Na kanallarının inhibisyonunda rol alır. NMDA reseptörün aşağı regülasyonunu sağlıyor. AMPA reseptörün fosforilasyonunu düzenler.	
	Kalsinörin MAPK'ı defosforile ederken PP2A da CaMk/PKA'yı defosforile eder. Ve böylece ekzositoz geri çevrilir.		Kalsinörin tarafından aktivitesinin düzenlendiği bilinen en önemli transkripsiyon faktörü olan CREB'in defosforilasyonuna neden olur.
Sonuç olarak	Transmitter salıverilmesini etkiler.	Hücre içi Ca^{2+} hemostazisini düzenlemede önemlidir.	Transkripsiyonu negatif yönde etkiler.

CA1 bölgesinde kalsinörinin farmakolojik inhibisyonu ile LTP eşiğinin uygulanan inhibitörün dozuna bağımlı olarak azaldığı bulunmuştur (İkegami ve ark., 1996). Korku şartlanması yapılan sıçanlarda intravenöz yolla kalsinörin inhibitörü uygulamasının korku belleğindeki bozulmayı engellediği; fosfataz aktivitesinin artırıldığı CN98 mutant farelerde kalsinörin seviyesindeki artış ile paralel olarak korku belleğinde bozulma olduğu gösterilmiştir (Mansuy ve ark., 1998b; Mansuy, 2003; Lin ve ark., 2003a). Bu sonuçlar kalsinörin inhibisyonunun korku belleğinin oluşumu için gerekli olduğu şeklinde açıklanmıştır. Sıçanlarda yapılan uzaysal bellek çalışmalarında kalsinörin aktivitesindeki azalma ile uzaysal öğrenme ve belleğin arttığı gösterilmiştir (Malleret ve ark., 2001).

Kalsinörin inhibisyonunun bellek üzerine olan etkisinde, inhibe edildiği beyin bölgelerine göre de farklılıklar gözlenmektedir. Ön beyinde davranış deneyi öncesi ve sonrasında yapılan kalsinörin inhibitörü uygulamaları sonrasında belleğin arttığı ifade edilirken (Malleret ve ark., 2001; Baumgärtel ve ark., 2008) amigdalada kalsinörinin farmakolojik inhibisyonu ile korku belleğinin oluşmasının engellendiği gösterilmiştir (Lin ve ark., 2003b).

1.5 Reelin Geni (*Reln*) ve Sinaptik Plastisite, LTP, Uzun Süreli Bellek

Reelin geni (*Reln*), 1997 yılında DeSilva tarafından bulunmuş ve 7q22 kromozom bölgesinde haritalandırılmıştır (DeSilva ve ark., 1997). Sıçanlarda *Reln* 4. kromozom bölgesine (NC_005103.4) yerleşmiş olarak bulunmaktadır (Çizelge 1.4)

Çizelge 1.4 *Reln* geni ve gen ürünleri hakkında özet bilgi tablosu.

Organizma	Sıçan
Gen sembolü	*Reln*
Genin açık ismi	Reelin
Alternatif isimler	Reelen, Rl, Reeler
Gen kimlik numarası	ID- 24718
Kromozom	4q11
Yeri	NC_005103.4
Yerleşimi	9,347,533-9,774,257
Uzunluğu	426,726 bç
Ekzon sayısı	66
Kodladığı proteinler	2 protein kodluyor (Reln-201, Reln-202)
Kodlanan proteinlerin uzunluğu	Reln-201: 11090 bç, 3461 aa Reln-202: 10384 bç, 3462 aa
Sıçanlarda mRNA izolasyonu yapılan dokular	Adrenal bezler, beyin, kalp, böbrek, karaciğer akciğer, kas, dalak, timus, testis/uterus
Hücre içinde yerleşimi	Ekstrasellüler
Kaynak	NCBI (National Center of Biotechnology Information)

İnsanda yapılan genetik çalışmalarda *RELN* lokusunun şizofreni, bipolar bozukluk, otizm ve Alzheimer Hastalığı gibi nöropsikiyatrik hastalıklar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (İshii ve ark., 2016). Reelin için haplo-yetersiz [heterozigot *Reln* (rl/-)] farelerde bilişsel ve davranışsal bozukluklar gösterilmiştir (Tueting ve ark., 1999). Heterozigot *Reln* ve çok-düşük yoğunluktaki lipoprotein reseptörü (VLDL-R) ve Apolipoprotein reseptör 2 (ApoER2) mutant farelerde yapılan çalışmalar, reelinin sinaptik disfonksiyona neden olarak bilişsel disfonksiyona ve psikiyatrik semptomlara benzer değişikliklere yol açtığını düşündürmektedir (Weeber ve ark., 2002; Qiu ve ark., 2006; Pujadas ve ark., 2010).

Reelinin sinaptik plastisitedeki önemli rolü, NMDA reseptörü üzerinden oluşan etkiler ile açıklanmıştır (Weeber ve ark., 2002; Qui ve ark., 2006; Pujadas ve ark., 2010). Weeber ve ark. (2002) reelin ApoER2 ve VLDL reseptörü *knock-out* fare hipokampus dilimlerinde reelin aracılı sinyal iletiminin sinaptik plastisite ve bellek oluşumu için önemli olduğunu bildirmişlerdir. Pujadas ve ark. (2010) reelini aşırı ifade eden transgenik farelerde hipokampuste sinaptik fonksiyonun ve LTP'nin arttığını ve dendritik dikenlerin hipertrofik olduğunu göstermişlerdir (Pujadas ve ark., 2010). Trotter ve ark. (2013) tarafından ön beyinde eksitatör nöronlarda *reelin adaptor protein 1* (*Dab1*) *knock-out* farelerde, dendritik diken büyüklüklerinde azalma olduğu, Akt ve ERK sinyal yolaklarının baskılandığı, hipokampal LTP'nin kaybolduğu ve hipokampus bağlantılı öğrenmenin bozulduğu bulunmuştur (Trotter ve ark., 2013). Bir diğer çalışmada dorsal ön beyine özel *Dab1 knock-out* farelerde motor fonksiyonların normal olduğu fakat hayvanların hiperaktif oldukları, anksiyete benzeri davranışların azaldığı, çalışma ve uzaysal belleğin bozulduğu görülmüştür (Imai ve ark., 2017).

İki aylık iken tamoksifen verilerek *Reln* inaktivasyonu yapılan ($Reln^{flox/flox}$) *knock-out* farelerde, kortikal yapıda bir bozulma olmadığı, korku şartlanması sonrasında korku belleğinin normal olduğu ve CA1 bölgesindeki LTP'de belirgin bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Lane-Donovan ve ark., 2015). mPF kortekste *Reln knockdown* farelerde uzaysal çalışma belleği ve obje tanıma davranışlarında bozulma, ayrıca yürüyüşte aksamalar bulunmuştur (Brosda ve ark., 2011).

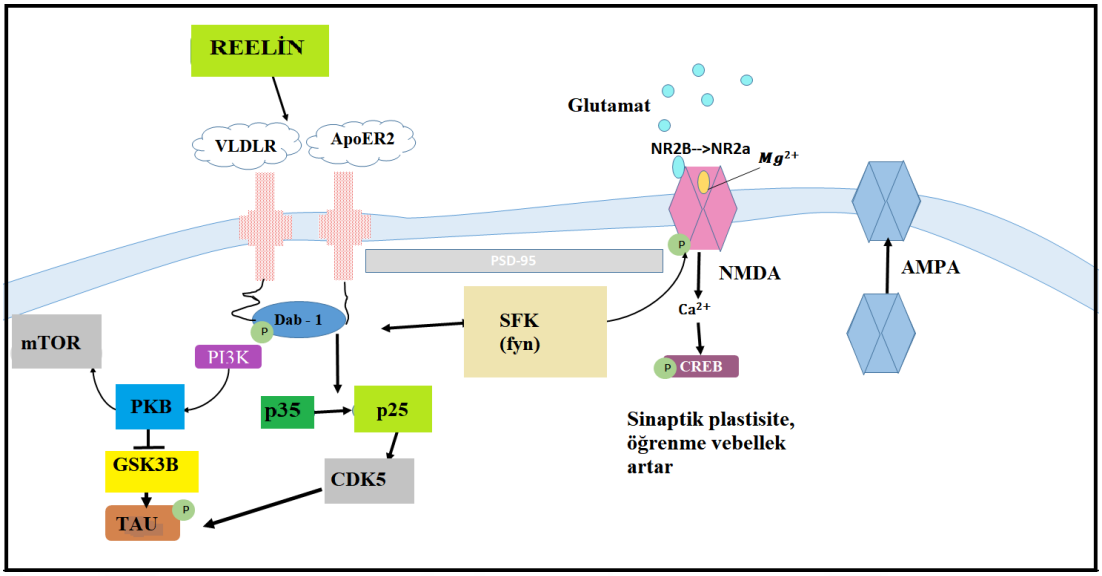
1.5.1 Reelin ve Sinaptik plastisite, LTP, Uzun Süreli Bellek

Reelin, *Reln* geni tarafından kodlanan, embriogenez sırasında beyin gelişiminde önemli olan bir ekstrasellüler matriks proteinidir. Hipokampüs ve serebral korteks gelişiminde Cajal-Retzius nöronları tarafından üretilen bir glikoprotein olan reelin, dendrit formasyonu, hücre agregasyonu, nöron migrasyonu ve korteksin laminar formasyonunda düzenleyici olarak görev

yapmaktadır (Nakajima ve ark., 1997; Franco ve ark., 2011; Kohno ve ark., 2015). Yetişkin hipokampuste LTP oluşumuna katıldığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2005).

Reelin fonksiyonunu ya bir serin proteaz olarak proteolitik aktivite yoluyla ya da bir reseptöre bağlanması sonrasında hücresel sinyal basamaklarını aktive ederek yerine getirmektedir. Proteolitik aktivite, nöromusküler kavşağın, motor son plağın gelişimini ve sinir-kas bağlantısının doğru bir şekilde oluşturulmasını sağlamaktadır (Quattrocchi ve ark., 2003). Öte yandan reelin, hücrede bazı sinyal basamaklarını başlatmak için membran üzerinde bulunan lipoprotein reseptörlerine (ApoER2 ve VLDL-R) ve alfa3beta1 integrine bağlanarak fonksiyon görmektedir (D'Arcangelo ve ark., 1999).

Cajal-Retzius nöronlarında üretilen reelin, beyin gelişiminin fetal fazından sonra, neokorteks ve hipokampusta dağılmış olan GABA-erjik internöronlarda üretilmeye başlanır. GABA-erjik internöronlardan ektrasellüler aralığa reelin salınır salınmaz hücre membranı üzerinde yer alan VLDL-R ve ApoER2 (D'Arcangelo ve ark., 1999; Weeber ve ark., 2002; Herz ve Chen, 2006; Lussier ve ark., 2016) ile etkileşerek reseptörlerde dimerizasyona neden olmakta ve intrasellüler adaptör protein olan Dab-1'in aşağı-akış yönünde tirozin fosforilasyonu oluşmaktadır. Dap-1 in fosforilasyonu, Src tirozin kinaz ailesinin (SFK) aktivasyonunu sağlamaktadır. SFK ailesinden olan Fyn, hücre içine Ca^{2+} girişini sağlayan NMDA reseptörünü fosforilleyerek hücre içine giren Ca^{2+} miktarının artmasını sağlar, membrandaki AMPA reseptörü sayısı da artar ve sonuç olarak uzun süreli potansiyasyon oluşur (Weeber ve ark., 2002; Chen ve ark., 2005; Qiu ve ark., 2006; Herz ve Chen 2006; Qiu ve Weeber, 2007) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 Erişkin beyinde sinaptik plastisite ve reelin sinyal yolağı (Lussier ve ark., 2016'dan uyarlanmıştır).

Gelişmekte olan beyinde nöronal göç ve korteksin katmanlarının oluşmasında reelinin önemli bir düzenleyici olduğu, postnatal dönemde de dendrit ve dendritik dikenlerde yapısal değişiklikler oluşturarak sinaptik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynadığı ifade edilmektedir (Ishii ve ark., 2016). Erişkin beyninde ise, reelin sinyal iletiminin sinaptik fonksiyonu modüle ettiği ifade edilmektedir (Chen ve ark., 2005).

Reelinin bellek oluşumundaki rolünün, NMDA reseptör fonksiyonunun düzenlenmesi ve bellek oluşumunu etkileyen sinyal yolakları aracılığıyla olduğu ifade edilmiştir (Chen ve ark., 2005). Sıçan ve farelerin kortikal nöronlarında NMDA reseptör aracılığı ile hücre içine giren Ca^{2+} akışına reelinin etkisi araştırılmış ve reelin olduğunda glutamatın neden olduğu Ca^{2+} girişinin belirgin bir şekilde arttığı bulunmuştur. Hem reelinin hem de glutamatın tek başına böyle bir artış meydana getiremedikleri gösterilmiştir. Ayrıca reelinin ApoER2 ve VLDL reseptörlerine bağlanmasının engellenmesiyle, nöronlarda Dap1 eksikliği ve SFK'nın farmakolojik inhibisyonu ile de reelinin nöronda Ca^{2+} girişinde oluşturduğu artışın bozulduğu da bulunmuştur (Chen ve ark., 2005).

Reelin lipoprotein reseptörlerine bağlanarak, bilişsel süreçlerin önemli düzenleyicisi olarak işlev görmektedir. ApoER2 ve VLDL-R reseptörlerinin

reelin tarafından aktive edilmesinin sinaptik aktivitenin düzenlenmesi ile birlikte öğrenme ve bellek oluşumda da yer aldığı bildirilmiştir (Weeber ve ark., 2002; Herz ve Chen 2006).

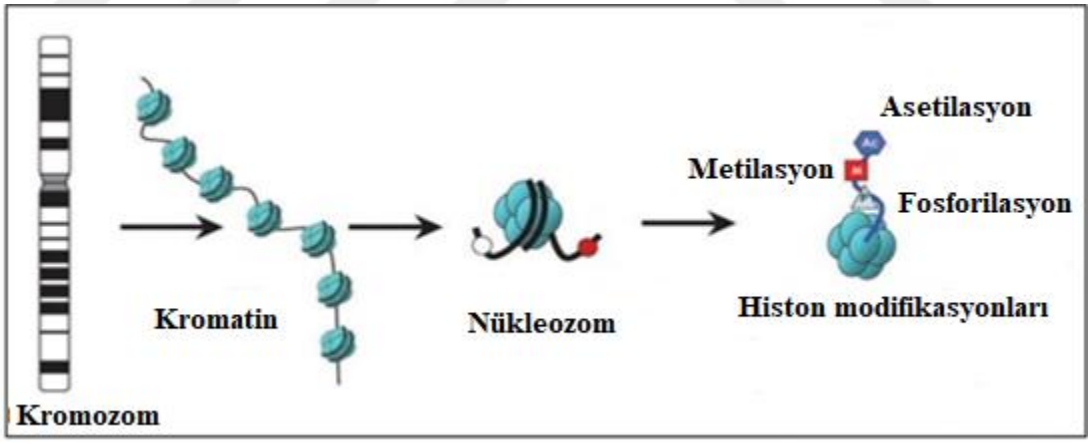
1.6 Epigenetik Düzenlemeler ve Bellek

‘‘Epigenetik’’ terimi ilk olarak, 1942’de Conrad Waddington tarafından kullanılmış ve ‘‘varlığın fenotipini meydana getiren genlerle çevrenin etkileşimi’’ şeklinde tanımlanmıştır. Epigenetik terimi, DNA dizisi değişmeden hücre bölünmesi ile kararlı hale gelen ve kalıtılabilen tüm değişiklikleri ifade etmektedir (Bird, 2007). Sinir sisteminde erişkin nöronlar tarafından uzun süreli hücresel davranışı devam ettirmek için kullanılmasından dolayı bazı araştırmacılar ‘‘nöroepigenetik’’ tanımını kullanmayı tercih etmektedirler (Day ve Sweatt, 2010). Epigenetik mekanizmalar, canlıların özellikle embriyodan yetişkin bireye doğru ilerleyen gelişim sürecinde gözlemlenmekte, hücre farklılaşmaları sırasında veya erişkin nöronlarda uzun süreli hücresel davranışın devam ettirilmesi için gerekli gen ifadesi değişikliklerinde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesi değişiklikleri, DNA’nın seçici olarak, farklı epigenetik durumlarda bulunan farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır. Epigenetik mekanizmalardan üzerinde en çok çalışma yapılmış olan iki tipi, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları olmuştur. Bu iki olayın birbiriyle bağlı ve geri-dönüşlü olduğu bilinmektedir.

Çalışmalar bellek ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde epigenetik mekanizmaların önemli rolü olduğunu ortaya koymuştur (Kaas ve ark., 2013; Lubin ve ark., 2008; Rudenko ve ark., 2013; Sui ve ark., 2012; Yu ve ark., 2012; Guan ve ark., 2009). Epigenetik mekanizmalar ve onların metabolik dinamikleri belli beyin bölgelerinde özel bir şekilde düzenlenmektedir (Gupta-Agarval ve ark., 2012; Levenson ve ark., 2006; Miller ve ark., 2007; Chwang ve ark., 2006).

1.6.1 Kromatin Yapı Değişiklikleri ve Bellek

Uzun süreli belleğin konsolidasyonu için gerekli olan trankripsiyonel olayların düzenlenmesinde transkripsiyon faktörleri önemli rol oynamaktadır. Fakat bu transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonlarını yapabilmeleri için DNA'nın düzenleyici dizisindeki bağlanma bölgelerine erişmeleri gerekmektedir. Bu düzenleyici DNA dizileri, genomdaki diğer diziler gibi histon proteinleri ile paketlenmiş olarak bulunmakta ve paketlenmenin derecesine bağlı olarak (kapalı/açık) kontrol edilmektedir. Ökaryotik hücre nükleusunda histon proteinleri ve etrafına sarılmış olan DNA kromatin olarak bilinmektedir. Kromatinin temel fonksiyonel birimi olan nükleozom, histon oktomeri (her histondan ikişer adet H2A, H2B, H3, H4) ve bunların etrafını yaklaşık 1,7 kez saran 147 baz çifti (bç) DNA'nın bir araya gelmesinden oluşmaktadır. Histon proteinlerin nükleozomlardan dışarı çıkan küçük N-terminal kuyrukları vardır ve kuyruklardaki amino asitlerin üzerine özel işaretlerin eklenmesi ile modifiye edilmeleri olanaklıdır (Şekil 1.8).

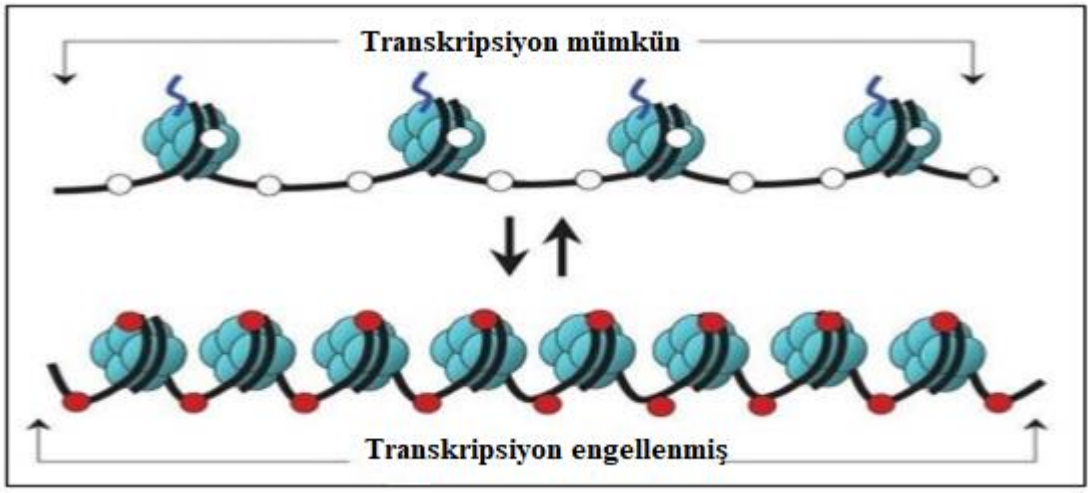


Şekil 1.8 Histon modifikasyonlarının şematik gösterimi (Rodenhiser ve Mann 2006'dan uyarlanmıştır).

Histonlar birçok posttranslasyonel modifikasyona uğramaktadırlar. Bu modifikasyonlar lizin ve arjinin asetilasyonu ve metilasyonu, serin fosforilasyonu, lizin übikitinasyonu ve sümolasyonu ile oluşmaktadır. Histonların bu şekilde modifikasyonları kromatinin yeniden şekillenmesine neden olmaktadır. Kromatinde meydana gelen değişiklikler, DNA'nın

paketlenme derecesine etki ederek transkripsiyona uygun hale gelmesini module etmektedir. Böylece kromatin yapısındaki değişikler gen ifadesini kontrol eder: kromatin yapı sıkılaşıp yoğunlaştığında genler inaktive olur (sessiz), kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında (aktif) ise genler aktive olarak ifade edilir (Şekil 1.9).

Kromatin yapısındaki bu dinamik durum, geri-dönüşlü nitelikte olan ve DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik mekanizmalar yardımı ile gerçekleştirilir.



Şekil 1.9 Açık kromatin yapısı ve kapalı kromatik yapısının şematik gösterimi (Rodenhiser ve Mann 2006'dan uyarlanmıştır).

Uzun süreli belleğin oluşmasında, bu sürece aracılık eden proteinleri kodlayan mRNA'ların seviyelerinin düzenlenmesinde histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların önemli olduğu ortaya konmuştur. Bu mekanizmaların nöronlarda, bellek oluşumu sırasında gen ifadesini çift yönlü olarak (artırma veya baskılama yönünde) etkileyebildiği gösterilmiştir (Jarome ve ark., 2014).

1.6.1.1 Histon Asetilasyonu ve Bellek

İlk olarak histon modifikasyonlarının, uzun süreli bellek oluşumu ile ilişkilendirilen genlerin ifadelerini düzenlemede yer alabileceği öne sürülmüştür

(Swank ve Sweatt, 2001). Guan ve ark., (2002) tarafından histon asetilasyonunun, uzun süreli plastisite için önemli olan gen ifadesinin düzenlenmesinde gerekli bir adım olduğu gösterilmiştir (Guan ve ark., 2002). Sonrasında birçok çalışmada öğrenme ile farklı histonların asetilasyonlarının arttığı rapor edilmiştir. Histon asetilasyonu, kromatin yapısını gevşetmekte ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına izin vererek gen ifadesinde artışa neden olmaktadır (Marmorstein, 2001). Histonların asetillenmesi, histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri aracılığıyla düzenlenmektedir. Belleğin konsolidasyonunda histon asetilasyonunun uygun şekilde artabilmesi için HAT ve HDAC'ler arasında bir denge gerekmektedir (Lubin ve ark., 2011).

Uzun süreli bellek oluşumunun genel HDAC inhibitörü olan tricostatin A veya sodyum bütirat verilmesi ile arttığı, HAT eziminin genetik olarak silinmesi ile ise bozulduğu gösterilmiştir (Vecsey ve ark., 2007; Barrett ve ark., 2011). HDAC'lerin öğrenme sonrasında nöronlarda histon asetilasyon miktarını kontrol ederek belleği güçlendirmede görev aldıkları da gösterilmiştir (McQuown ve Wood, 2011). Histon asetilasyonunun bellek oluşumunda yer alan tek epigenetik mekanizma olmadığı düşünülmektedir.

1.6.1.2 Histon metilasyonu ve Bellek

Histon metilasyonu, metilasyonu gerçekleştiren histon metiltransferaz (HMT) ve metilasyonu ortadan kaldıran histon demetilaz (HDM) enzimleri ile düzenlenmektedir. Histon metiltransferazlar çok seçicidirler. Spesifik bir amino asit rezidüsünü ve metil modifikasyon sayısı ile metilasyonun yerini hedefleyerek gen ifadesini uyarmakta veya baskılayabilmektedirler.

Histon asetilasyonu yanında histonların metilasyonu da bellek konsolidasyon sürecinde yer almaktadır. Histon metilasyonu, çoğunlukla H3 histonunun farklı lizin rezidülerinde farklı sayılarda (monometilasyon, dimetilasyon, trimetilasyon) meydana gelmektedir. Lizin rezidüsü dışında arjinin

rezidüsünde de mono-, di-, trimetilasyon sözkonusudur. Metilasyondaki bu sayısal farklılıklara bağlı olarak, gen ifadesi ve bellek konsolidasyonu farklı şekillerde etkilenmektedir (Jarome ve Lubin, 2013). Bağlamsal korku şartlanması sonrasında, sıçanların hipokampus ve entorinal korteks dokularında transkripsiyon-baskılayıcı bir işaret olarak histon-3 lizin 9 dimetilasyon (H3K9me2) ve transkripsiyon-artırıcı bir işaret olarak histon-3 lizin 4 trimetilasyonunun (H3K4me3) birlikte arttıkları gösterilmiştir (Gupta ve ark., 2010; Gupta-Agarwal ve ark., 2012). Ayrıca bu işaretlerin davranış çalışması sonrasında 24 saat sürmesi, H3 lizin metilasyonunun gen transkripsiyonunu düzenlemeye devam edebileceğini düşündürmektedir (Jarome ve ark., 2014). Fakat bu uzun süreli histon metilasyonu değişikliklerinin işlevsel önemleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

H3K4me3'e özel metiltransferazın (HMT-MLL) hipokampuste genetik olarak silinmesi sonucunda korku koşullanmasına bağlı gelişen belleğin konsolidasyonunun bozulduğu, özel demetilazın (HDM-LSD1) farmakolojik manipulasyonları sonrasında ise korku belleğinin arttığı gösterilmiştir (Gupta-Agarwal ve ark., 2012; Kerimoğlu ve ark., 2013). Bu durum hipokampuste uzun süreli belleğin oluşmasında H3 lizin metilasyonu ile düzenlenen gen traskripsiyonundaki artış ve azalmaların önemli olduğunu ifade etmektedir.

Ayrıca bağlamsal korku şartlanması sonrasında, hipokampuste H3K4me3'nu (Levenson ve ark., 2004; Gupta ve ark., 2010) ve H3K9me2'nunun azaldığı gösterilmiştir (Gupta ve ark., 2010).

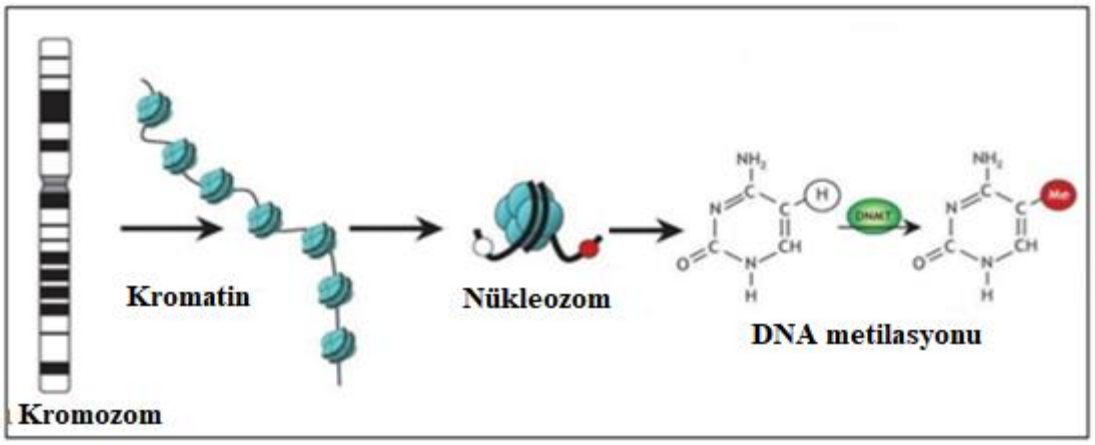
Yakın bir zamanda Halder ve ark. (2016)'nın gerçekleştirdiği çalışmada bağlamsal korku şartlanması sonrasında 1. saatte CA1'de 7 farklı kromatin modifikasyonu (H3K9ac, H3K4me3, H3K4me1, H3K79me3, H3K27ac, H3K27me3) genom boyu araştırmıştır. Nöronal aktivite ile genel olarak H3K4me3 ve H3K9ac'nin arttığı H3K27me3'ün azaldığı gösterilmiştir. İlave olarak hücresel konsolidasyon sırasında H3K79me3'nin arttığı gözlenmiştir. Gen ontolojisi analizi sonucunda H3K79me3 değişikliğinin sinapsların yeniden şekillenmesinde yer alan genleri hedef aldığı bulunmuştur. Araştırmacılar histon modifikasyonlarının kısa süreli değişiklikler olduğunu, belleğin uzun süreli

kalmasını sağlayan bir substrat olmadığını, nöronları gelecekte oluşacak aktiviteler için duyarlılaştırdıklarını düşünmektedirler (Halder ve ark., 2016).

1.6.2 DNA Metilasyonu

DNA, sitozin, guanin, timin ve adenin adı verilen dört nükleotidin kombinasyonundan meydana gelmektedir. DNA metilasyonu, DNA'nın 5` pozisyonundaki sitozin pirimidin halkasına, DNA metiltransferaz enzimi (DNMT) aracılığı ile S-adenozil metionin (SAM)'dan metil (CH_3) grubunun eklenmesidir (Şekil 1.10). Omurgalı DNA'sındaki C-G baz çiftlerinin %70'ten fazlası metillenmiş durumdadır. Genin birçok yerindeki sitozine metil grubu eklenebilirken, sitozin-fosfat-guanin (CpG) metilasyonu ise genelde guanin nükleotidini takip eden sitozin nükleotidi ile kısıtlanmıştır. Bu bölümlere CpG adaları denir ve bu CpG adaları çoğunlukla genin transkripsiyonunu sağlayan promotor bölgesinde yer almaktadır. CpG adacıklarında görülen DNA metilasyonu, gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır.

Promotor bölgedeki CpG adacıklarının metilasyonu genellikle o genin susturulmasını sağlamaktadır. Bu durumun gerçekleşmesi için iki mekanizma öne sürülmüştür; direkt ve indirekt mekanizmalar. Direkt mekanizmada, genin promotor bölgesine transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasının fiziksel olarak engellenmesi söz konusudur. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesindeki metillenmiş CpG'ler, transkripsiyon faktörlerinin buraya bağlanmasını yapısal olarak engeller ve bu şekilde gen ifadesi baskılanır. Bu mekanizmaya alternatif olan indirekt mekanizmadır. Burada, genin promotor bölgesindeki metillenmiş CpG'ler, metil-CpG bağlanma proteinleri (MeCPs) olarak adlandırılan birtakım faktörlerin bu bölgeye bağlanmasını tetiklemektedir. Bu proteinlerin bağlanması, HDAC ve HMT gibi birçok korepresör proteinin de bölgeye gelmesini sağlamaktadır. Bu yolla histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu birbirlerini etkilemektedir. Sonuçta, genin promotor bölgesinde oluşan bu kompleks etkileşim genin transkripsiyonunu engeller ve gen ifadesi baskılanmış olur.



Şekil 1.10 DNA metilasyonunun şematik gösterimi (Rodenhiser ve Mann, 2006'dan uyarlanmıştır).

Metillasyonun canlıdan canlıya ve dokudan dokuya değiştiği bilinmektedir. Metilasyon deseninin fonksiyonel birtakım sonuçları olabileceği önceden beri düşünülmektedir. Bu konuda ilk yapılan araştırmalarda metilasyon ile gen ifadesi arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. Genlerin promotor bölgelerindeki metilasyon seviyesinin düşük olması çoğunlukla aktif gen ifadesi ile pozitif korelasyon göstermektedir. DNA'nın *de novo* metilasyonu ve bu metilasyonun devamlılığının sağlanmasında DNMT'ler görevlidir (Şekil 1.8). Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olmak üzere 5 adet DNMT izoenzimi tanımlanmıştır. Bunlardan, amino terminal düzenleyici bölgesi bulunmayan DNMT2 ve katalitik bölgesi bulunmayan DNMT3L dışındaki izoenzimlerin hepsinde enzimatik aktivite görülmektedir. DNMT1, "*maintenance methyltransferase*" olarak da bilinir ve replikasyon sonrasında yarı-metile DNA bölgelerine bağlanmaktadır. DNMT3a ve DNMT3b, *de novo* metiltransferazlar olarak adlandırılır ve yarı-metile ya da hiç metillenmemiş bölgelerde metilasyonu gerçekleştirirler.

DNA metilasyonu klasik olarak, erken gelişim sırasında transpozonların sessizleşmesi, X-kromozom inaktivasyonu, ''imprinting'' ve hücre farklılaşmasında statik bir mekanizma olarak tanımlanmıştır (Suzuki ve Bird, 2008). Başlangıçta sitozin metilasyon deseninin hücre tipine özel ve stabil olduğu, metilasyon değişimin sadece hücre bölünmesi sırasında olabileceği

postmitotik hücrelerde olamayacağı düşünülmekteydi. Fakat bu görüş, erişkin postmitotik nöronlarda bol miktarda DNMT enziminin bulunması (Goto ve ark., 1994), erişkin ve erişkin olmayan nöronlarda DNMT aktivitesinde artış görülmesi (Brooks ve ark., 1996) ile değişmiştir. Bu bulgular DNA metilasyonunun bilinmeyen bazı rollerde yer almak üzere beyinde dinamik bir şekilde değişebileceğini düşündürmüştür. Çalışmalardan elde edilen kanıtlar, sitozin metilasyonunun, dış uyaranlara yanıt olarak davranış değişiklikleri ile ya da nöronal aktiviteyle değişebileceğini göstermektedir (Miller ve ark., 2007; Lubin ve ark., 2008; Yu ve ark., 2012).

Hızlı DNA metilasyon/demetilasyon için bellek ve plastistede yer alan spesifik genlerden 5mC'nin uzaklaştırılması için aktif bir mekanizmanın varlığı gerekmektedir. Başka bir değişle sitozinden 5mC'yi uzaklaştıracak bir mekanizma olmalıdır. Demetilasyon için en güçlü moleküler aday tet-eleven translokasyon (Tet) protein ailesidir. Demetilasyonun, Tet enzimi varlığında ilk olarak 5mC'nin 5-hidroksimetilsitozine (5hmC) daha sonra ard arda 5-formilsitozin (5fC) ve 5-karboksisitozine (5cC) oksidasyonu ile olduğu düşünülmektedir. Tet proteinleri inhibe edildiğinde beyinde 5hmC'nin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Guo ve ark., 2011; Morris ve Monteggia, 2014).

1.6.2.1 DNA Metilasyonu ve Bellek

Nöronal hücre kültüründe DNA metilasyonunun nöral plastisite için önemli olan aktivite bağımlı genlerin (*brain-derived neurotrophic factor*; *bdnf* gibi) düzenlenmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir (Martinowich ve ark., 2003). İlave olarak, DNA metilasyonu seviyesini değiştirmeyi hedefleyen farmakolojik veya genetik yaklaşımlar ile LTP ve bilişsel becerilerin değişebildiği gösterilmiştir.

Farmakolojik çalışmalarda DNMT enzim inhibitörleri kullanılarak plastisite ve bellek oluşumunun bozulduğu belirlenmiştir. DNMT inhibitörleri olan zebularin veya 5-aza-deoksisitidin (*5-AZA*) kullanılması sonucunda

hipokampusta (Levenson ve ark., 2006) ve 5-AZA kullanımı sonrasında amigdalada (Monsey ve ark., 2011) LTP'nin oluşması ve devamlılığının bozulduğu gösterilmiştir. Ayrıca amigdalaya 5-AZA infüzyonu sonrasında sıçanlarda bellek ile ilgili nörofizyolojik yanıtların değiştiği de ifade edilmiştir (Maddox ve ark., 2014). Bağlamsal korku şartlanması sonrasında sıçanların CA1 bölgesinde *DNMT* gen ifadesinin arttığı zebularin ya da 5-AZA infüzyonu (DNMT inhibisyonu) sonrasında bellek oluşturma yeteneklerinin azaldığı bulunmuştur (Miller ve ark., 2007). Aynı çalışmada DNMT inhibiyonunun bellek ile ilişkili H3 asetilasyonunu engellediği de ifade edilmiştir. Çalışmacılar, DNMT inhibisyonundan önce histon asetilasyonunu farmakolojik olarak artırarak DNMT inhibisyonunun oluşturduğu bellek bozukluğunun ortadan kalktığını göstermişlerdir. DNMT aktivitesinin sıçan hipokampusünde plastisite ve bellek oluşumunu düzenlemek için histon modifikasyonu ile birlikte çalışabileceğini ifade etmişlerdir (Miller ve ark., 2008).

Aynı grubun bir diğer çalışmasında ise bağlamsal korku şartlanması öncesinde CA1 bölgesine yapılan zebularin infüzyonu sonrasında *bdnf* metilasyonunun belleğin konsolidasyonunda yer aldığı gösterilmiştir (Lubin ve ark., 2008).

Amigdala bölgesi LA'da DNMT inhibisyonu ile işitsel korku şartlanması sonrasında, kısa süreli işitsel olarak uyarılmış potansiyellerin arttığı ve kısa süreli belleğin etkilenmediği fakat uzun süreli belleğin bozulduğu *in vivo* olarak gösterilmiştir (Monsey ve ark., 2011; Maddox ve ark., 2014).

Hipokampus bölgesinde plastisite ile ilişkili genlerde yapılan çalışmalarda, bağlamsal korku şartlanmasından 1 saat sonra bellek baskılayıcı *pp1* metilasyonunun arttığı, *Reln* geninin demetile olduğu bulunmuştur. Çalışmanın devamında nonspesifik DNMT inhibisyonu yapılmasıyla, *pp1* geninin metilasyonunun engellendiği ve plastisite ile ilgili olan *Reln* promotor bölgesinin demetilasyonunun arttığı ayrıca *Reln* ve *pp1* genlerinin metilasyonununda ortaya çıkan değişimlerin 24 saat sonra normale geri döndüğü gösterilmiştir. Araştırmacılar, DNA metilasyonundaki zamansal hızlı değişimi DNA metilasyonunun bellek oluşumu için önemli olduğu ve değişikliklerinin kısa

süreli olmasından dolayı hipokampus bölgesinin belleğin depolanmasına katılmadığı şeklinde ifade etmişlerdir (Miller ve ark., 2007; Morris ve Monteggia, 2014). Korku şartlanması sonrasında, hipokampuste bellek konsolidasyonu sürecinde *bdnf* gen transkripsiyonunun ekzon bölgelerine göre değişiklik gösterdiği de bulunmuştur (Lubin ve ark., 2008). Bellek konsolidasyonu sırasında (2 saat) CA1 bölgesinde *bdnf* geninde ekzon IV'ün amigdala bölgesinde ise, ekzon I ve IV'ün mRNA ifadesinin arttığı bulunmuştur. DNMT inhibisyonu ile *bdnf* ekzon I, IV ve VI'da metilasyonunun azaldığı mRNA seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Lubin ve ark., 2008).

Miller ve ark. (2010) belleğin devamlılığında DNA metilasyonunun yer alıp almadığını araştırabilmek için, uzak hatıraların tutulduğu bir yer olduğu düşünülen ACC bölgesine odaklamışlar ve çalışmalarında sıçanlarda bağlamsal korku şartlanması sonrasında bellek baskılayıcı olarak ifade edilen *CaN* geninin metilasyonunun artışının 24. saatte başlayarak 7. güne kadar devam ettiğini göstermişlerdir (Miller ve ark., 2010). Araştırmacılar başka bir çalışmada bağlamsal korku şartlanması ile oluşturulan belleğin 29. gününde dorsomedial prefrontal (dmPF) kortekse DNMT inhibitörü infüzyonu yapmışlar ve *CaN* DNA metilasyonunun azaldığını ve 30. günde belleğin bozulduğunu göstermişlerdir (Miller ve ark., 2010).

Prefrontal korteks bölgesinde yapılan çalışmalarda, bağlamsal korku şartlaması sonrasında 1. saatte *Reln* promotor bölgesinin hipermetile olduğu ve bu artışın sonraki zaman noktalarına doğru azaldığı fakat 7. günde DNA metilasyonundaki artışın devam ettiği bulunmuştur (Miller ve ark., 2010; Sweatt, 2016). Aynı çalışmada NMDA reseptör antagonisti (MK-801) uygulanarak 7. gündeki *Reln* DNA metilasyonunun önlendiği de gösterilmiştir (Sweatt, 2016). dmPF kortekste bağlamsal korku şartlanması sonrasında 30. günde *Reln* geninin DNA metilasyonunun değişmediği bulunmuştur (Miller ve ark., 2010; Sweatt, 2016).

Bağlamsal korku şartlanması sonrasında davranış deneyi uygulanan tüm sıçanlarda *Egr1*'in promotor bölge DNA metilasyonunun, (kontrol ve deney

grubu) naif gruba göre 1. saatten 7. güne kadar devam edecek şekilde belirgin bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Miller ve ark., 2010; Sweatt, 2016).

Birçok çalışma öğrenme ya da nöronal aktivite sonrasında seçilmiş genlerin promotor bölgelerinin DNA metilasyon değişikliklerine ve genlerin ifadelerine odaklanmıştır. Genom boyu yapılan DNA metilasyonu (metilom) çalışmaları, nöronal aktiviteyle düzenlenen değişiklikleri, tüm genomda farklı şekilde metillenen bölgeleri ve genlerin detaylı analizlerini ortaya koymayı olanaklı kılmaktadır. Halder ve ark. (2016) tarafından yapılan, CA1 ve ACC bölgelerinde korku şartlanması sonrasında 1. saat ve 4. haftada 1000'in üzerinde gendeki metilasyon değişikliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, kontrol ve deney grupları arasında farklı şekilde metile olan genler ve farklı şekilde metile olan alanlar ortaya konmaya çalışılmıştır. Söz konusu çalışmada, hipokampus CA1 bölgesinin bellek oluşumunda önemli olduğu, ACC bölgesinin ise, uzun süreli belleğin depolanmasında yer aldığı gösterilmiştir (Halder ve ark., 2016). Bu çalışmada ayrıca gen ontoloji analizi yapılmış ve bu analiz sonucunda, CA1 nöronlarında 1. saatte ifade edilen ve kontrol grubuna göre farklı şekilde metile olan genlerin, sinyal iletim sürecinin ve protein kinaz aktivitesinin düzenlemesinde yer aldıkları gösterilmiştir. Ayrıca ACC nöronlarında 4. haftada akson ve dendritteki yapısal değişiklikleri düzenleyen genlerin farklı şekilde metile oldukları bulunmuştur. Araştırmacılar, DNA metilasyonu mekanizmasının, bellek oluşumu sırasında, gen ifadesinin modülasyonu üzerinden, sinaptik iletimi düzenlediği; belleğin sürdürülmesinde ise, kortikal yapısal düzenlenme için gerekli olduğunu ifade etmektedirler (Halder ve ark., 2016).

DNA metilasyonunun bellek oluşumu ve devamlılığında yer alan moleküler düzenlemelere katıldığı düşülmekle birlikte bu düzenlenmenin nasıl olduğu hala tam olarak bilinmemektedir.

1.6.2.2 DNA Metilasyonu ve Yaşlanma

Yaşlanma ile ilişkili olarak DNA metilasyonunda genel bir azalmaya (Wilson ve ark., 1987) işaret edilmektedir. Fakat insan beynindeki bir çok bölgede CpG adalarındaki metilasyonun arttığı (Siegmund ve ark., 2007; Hernandez ve ark., 2011) ancak ince bağırsak, akciğer, karaciğer ve böbrek dokularındaki 11 genomik bölgede DNA metilasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Maegawa ve ark., 2010; Jung ve Pfeifer, 2015). Beyinde yaşlanma ile görülen DNA metilasyonundaki artışın transkripsiyonel bozukluklara katılabileceği düşünülmüştür. Bu düşünce ile yaşlı sıçanların hipokampusünün dentat girus ve CA1 bölgelerinde *arc* geninin DNA metilasyonunun değiştiği, bu değişimin uzaysal bellek bozukluğu ve *arc* transkripsiyonu ile bağlantılı olduğu ifade edilmiştir (Penner ve ark., 2011). Ek olarak yaşlı Long-Evans sıçanlarında yaşlanmayla meydana gelen bilişsel azalmada yer aldığı gösterilen genlerin (*Gabra5, Hspa5 ve Syn*) promotor bölge metilasyon değişimleri değerlendirilmiş (Haberman ve ark., 2011) ve bu genlerin metilasyonundaki artışın bilişsel fonksiyon ile ilgi olmadığı kronolojik yaş ile ilişkili olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Haberman ve ark., 2012).

Yaşlı sıçanların CA1 bölgesinde *Egr1* geninin promotor bölgesindeki 20 CpG adasında yaşlanma ile DNA metilasyonunda değişme gözlenmezken dentat girusta 4 CpG bölgesinde bir azalma olduğu bulunmuş ve metilasyon değişiminin, gen transkripsiyonunu bölgelere göre farklı şekilde düzenlediği ifade edilmiştir (Penner ve ark., 2016). Yaşlı rodent beynindeki metilasyon değişiklikleri hakkında sınırlı sayıda veri bulunmaktadır.

1.6.2.3 Yaşlanma ve Bellek

Yaşlanma sırasında beynin yapısı ve işlevi değişmektedir. İnsanda yaşın ilerlemesi ile birlikte bilişsel süreçlerin zayıfladığı bilinmektedir. Normal yaşlanma ile ilişkili olarak bilişsel ve bellek kapasite kaybının nöronal temeli

belli değildir. Genel olarak insanlarda ve primatlarda normal yaşlanma ile kortikal nöronlarda anlamlı ölçüde bir kayıp olmadığı ifade edilmekle birlikte, (Gazzaley ve ark., 1997; Smith ve ark., 2004; Freeman ve ark., 2008; Peters ve ark., 2010) beynin belli bölgelerinde (örneğin prefrontal kortekste (8A)) bazı nöron kayıplarının olabileceği de ifade edilmektedir (Smith ve ark., 2004). Yaşlanma ile birlikte hipokampal hacmin azaldığı, insanlarda (Mungas ve ark., 2005; Sexton ve ark., 2010) insan olmayan primatlarda (Picq ve ark., 2012) ve rodentlerde (Driscoll ve ark., 2006) gösterilmiştir. Normal yaşlanmada glial hücre değişikliklerinin de rol oynadığı, miyelinli sinir liflerinin uzunluğunun azaldığı, miyelin kılıfın bozulduğu da ifade edilmektedir.

İnsan çalışmalarında Lintl ve Braak (1983), görme korteks kesitlerinde miyelinli sinir liflerinin 30'lu yaşlardan sonra azalmaya başladığını gösterirken, Kemper (1994) de benzer şekilde insan korteksinde özellikle de asosiyasyon alanlarında sinir liflerinin boyanma yoğunluğunda azalma olduğunu bulmuştur (Lintl ve Braak, 1983; Kemper, 1994). İnsan MRI çalışmalarında yaşlanma ile ilişkili olarak myelin kılıfının hacminde azalma olduğu gösterilmiştir. (Raz ve ark., 2012). Primatlarda, primer görme korteksinde ve optik sinirde astrosit hücre sayısının değişmediği fakat oligodendrosit ve mikroglia hücrelerinde artış olduğu ortaya konmuştur (Sandell ve Peters, 2002; Peters ve Sethares, 2004). Yaşlanma ile myelin ve oligodendrosit proteinlerindeki değişikliklerin bilişsel bozulma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sloane ve ark., 2003). Peters ve ark., (2010) forniksin içindeki nöroglial hücreler ve sinir lifleri üzerinde yaşın etkisi araştırmışlardır. Bu çalışmada, primat forniksinde yaşlanma ile birlikte miyelinli sinir liflerinde anlamlı düzeyde kayıp olduğu, yeniden miyelinasyonun arttığı, oligodendrosit hücrelerinin de genç primatlara göre %20 daha fazla olduğu gösterilmiştir (Peters ve ark., 2010). Rodent çalışmalarında yaşlanma ile sıçan neokorteksinde subventriküler zonda daha fazla oligodendrositlerin oluştuğu gözlenmiştir (Levison ve ark., 1999). Yaşlanma ile sıçanlarda amigdalanın BLA nükleusunda hacmin % 15 ve glial hücre sayısının % 18 oranında arttığı fakat nöron sayısının değişmediği gösterilmiştir (Rubinow ve Juraska, 2009).

Bilişsel yaşlanmanın en dikkat çekici ve erken belirteci bellekteki bozulmadır. Literatürde yaşlanma ve bellek hakkında yapılan ilk çalışmalarda sözel bellek paradigmaları kullanılmış ve yaşlanma ile ilişkili olarak sözel bellekte azalma yönünde farklılıklar gösterilmiştir (Willoughby, 1929). Daha sonra Ruch (1934) 60-82 yaşındakilerin, 34-59 yaşındakilere göre daha kötü bellek performansı gösterdiklerini, 12-17 yaşındaki katılımcıların ise en iyi bellek performansına sahip olduklarını göstermişlerdir (Ruch, 1934). Yaşlı yetişkinlerin resimleri kelimelere göre daha iyi hatırlamaları, resim belleğinin yaş etkilerinden korunmuş olduğu şeklinde ifade edilmiştir (Park ve ark., 1983).

Yaşlanma ile birlikte insanlarda belleğin tüm tipleri eşit şekilde etkilenmemektedir. Anlamsal belleğin yaşla birlikte dereceli olarak arttığı görülürken (Nyberg ve ark., 2003) diğer bellek tiplerinde (örneğin; prosedürel bellek ve *priming*) erken yetişkinlikten geç yetişkin döneme kadar çok az bir değişiklik olduğu ifade edilmektedir (Backman ve ark., 1999). Yaşlanma ile en fazla azalma anısal bellekte görülmektedir (Nyberg ve ark., 2003; Schaie, 2005). Ayrıca çalışma belleğinin performansı da yaşlanma ile birlikte azalmaktadır (Cabeza ve ark., 2005). İnsanlarda uzunlamasına yapılan çalışmalarda yaşlanma ile görülen anısal bellek ve çalışma belleğinde görülen azalmanın hangi yaşlarda başladığı belirlenememiştir.

İnsanlarda yaşlanma ile anısal bellek fonksiyonlarındaki azalma ve uzun süreli belleğin konsolidasyonunda önemli olduğu bilinen anatomik yapılar hipokampus ve bitişiğindeki medial temporal lobtur. Bu anatomik yapılar anısal ve uzaysal bellek için insan ve hayvanda benzerdir.

1.6.2.4 Rodentlerde Yaşlanma ve Bellek

Rodentlerde yaşlanma insanlardakine benzer şekilde bilişsel fonksiyonlarda aşamalı bir gerileme ve bellek bozulmasının oluşmasında da geniş kapsamlı heterojenite sergiler (Meeter ve ark., 2005). Rodentler nörodejeneratif hastalıklara yakalanmadıklarından dolayı, hücre ölümünden dolayı değil de

normal yaşlanma ile ilgili bilişsel azalmanın mekanizmasının araştırılmasında önemli model organizmalardır. Ayrıca rodent çalışmaları, bellek bozukluklarında görülen biyolojik belirteçlerin çalışılmasını olanaklı hale getirmektedir (Foster ve ark., 2012).

Primatlarda yaşlanma ile motor ve prosedürel bellekte bozulma gözlenmezken uzaysal belleğin bozulduğu gösterilmiştir (Walton ve ark., 2008). Anısal ve uzaysal belleğin anatomik yerleşimi insan ve hayvan modellerinde hipokampus bölgesidir. İnsan ve rodent çalışmalarında yaşlanma ile hipokampus hacminin azaldığı bulunmuştur (Mungas ve ark., 2005; Driscoll ve ark., 2006). Ayrıca yaşlı rodent çalışmalarında, hipokampuste uzaysal belleğin biyolojik belirteçleri olan hipokampal nöronların uyarılabilirliği, sinaptik ileti hızı gibi parametrelerin azaldığı, NMDA reseptör bağımlı sinaptik plastisitenin bozulduğu gösterilmiştir (Foster, 2007; Burke ve Barnes, 2011; Bergado ve ark., 2011).

Yaşlanmanın bir sonucu olarak bellek fonksiyonlarında görülen bu farklılıkların belirlenebilmesi için davranışsal testler uygulanmaktadır.

1.7 Sıçanlarda Öğrenme Modelleri

Bir hayvanın yeniliklere maruz kaldığında nasıl bir öğrenme stratejisi geliştirdiğini anlamak, altta yatan mekanizmaları bulabilmek için araştırmacılara olanak sağlamaktadır. Öğrenme modellerinde hayvanların hangi bilgiyi edindiğini anlamak zor olabilir. Öğrenmeyi belirleyebilmek için, hayvanın davranışsal yanıtları ölçülebilir olmalıdır. Davranış sinirbilimcileri arasında davranışın moleküler etkilerini değerlendirebilmek için en çok kullanılan sıçan ve fare modelleridir. Laboratuvar rodentleri için uygun birçok davranış testleri vardır. Bunların rodent davranışlarının ana araştırma konuları (Teegarden, 2012);

- Temel motor ve duyusal fonksiyonlar
- Sosyal davranışlar
- Anksiyete veya depresyon benzeri davranışlar

- Ödüllendirmeye yanıt
- Öğrenme ve bellek

Öğrenme ve bellek çalışmalarında en çok kullanılan davranış testleri;

- Uzaysal bellek testleri
    - Morris su labirenti
    - Radyal kol labirenti
- Bağlamsal bellek testleri
    - Korku şartlanması
    - Pasif sakınma testi
- Çalışma belleği testleri
    - Y labirent
    - T labirent
    - Obje tanıma
- Açık alan aktivite testi (spontan lokomotor aktivite ölçümü)

Belleği ölçmek için, öğrenmeden bir süre sonra hayvanın davranış değişikliklerine bakılarak karar verilen modeller kullanılmaktadır. Hayvanlarda uzun süreli belleği çalışmak için Pavlovian korku şartlanması önemli bir modeldir. Bağlamsal bellek testlerinden olan korku şartlanması, bağlamsal korku şartlanması ve ipuçlu korku şartlanması şeklinde uygulanabilmektedir. Birçok türde kullanılan ipuçlu ya da bağlamsal korku şartlanması deneyleri asosiyatif öğrenmeyi temsil etmektedir (Teegarden, 2012; Bryan ve ark., 2009).

1.7.1 Bağlamsal Korku Şartlanması (*Contextual Fear Conditioning*)

Öğrenme modellerinden biri olan bağlamsal korku şartlanması, emosyonel belleği değerlendirmek için en sık kullanılan, en iyi bilinen hayvan modellerinden biridir. Hayvanlar çevresel olayları değerlendirirken kendilerine zararlı olabilecek uyaranları öğrenirler ve bu zararlı uyaranlardan kaçınırlar.

Eğer kaçamayacakları bir ortamda bulunuyorlarsa savunma davranışı gösterirler ki, bu davranış genelde hareketsiz kalma (donma davranışı; donup kalma) şeklindedir. Bağlamsal korku şartlanması deneyinde, sıçanların zararlı bir uyaran (elektrik uyarısı - koşulsuz uyaran) ile bulundukları ortamı ilişkilendirmeleri ve bu ilişkiyi hatırlandıklarını ortaya koyan bir savunma davranışı olan donma davranışı gösterip göstermedikleri değerlendirilmektedir. Donma davranışının süresine bakarak, ortamla ilişkilendiren zararlı uyaranın hatırlanıp hatırlamadığı tahmin edilmektedir (Curzon ve ark., 2009).

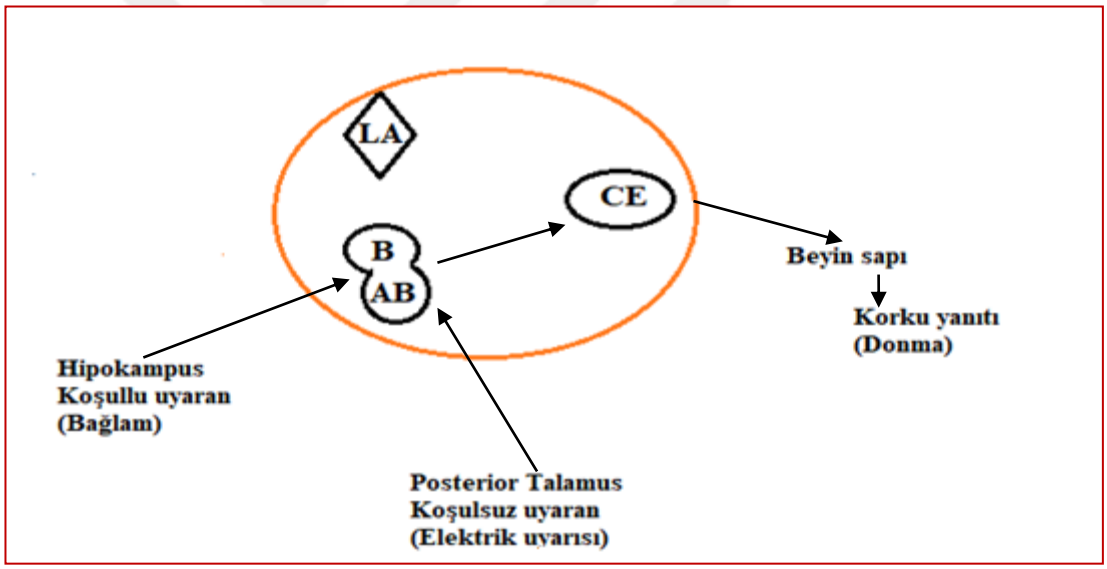
Asosiyatif öğrenme modeli olarak kullanılan korku şartlanması, bellek ile ilgili beyin bölgelerinde hücresel ve moleküler değişiklikler oluşturmaktadır (LeDoux, 2000). Öğrenme ve bellek çalışmalarında, epigenetik işaretleri gösterebilmek ve DNA metilasyonunun rolünü araştırmak için birçok farklı, korku temelli bellek modeli kullanılmaktadır.

Kullanılacak korku temelli modele karar verebilmek için, korku oluşturan uyaran uygulandığında beynin bununla ilgili olarak hangi bölgelerinin uyarıldığının gösterilmiş olması gerekmektedir. Bağlamsal korku şartlanmasının, hem hipokampus hem de amigdala bağlantılı uzun süreli bellek oluşumuna neden olabileceği gösterilmiştir (LeDoux, 2000; Abel ve Lattal, 2001). Koşullu uyaranın etkisinin uzun sürmesi bellek çalışmaları için gereklidir. Korku şartlanmasında elektrik şoku ve ortam arasındaki ilişkinin, uzun süreli ve kalıcı olduğu da gösterilmiştir (Morgan ve LeDoux, 1999).

1.7.2 Bağlamsal Korku Şartlanmasının Nöral Devreleri

İçgüdüsel veya öğrenilmiş korkuya yol açan bir çevresel uyaranın saptanması ve değerlendirilmesini sağlayan beyin bölgesinin amigdala olduğu bilinmektedir (LeDoux, 2000). Buradan yola çıkarak korku şartlanmasında koşullu ve koşulsuz uyaranın izi amigdalada takip edilmiştir. Bağlamsal korku şartlanması için ise, hipokampus ve amigdala bölgelerinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Koşullu uyaran (bağlam) ile uyarılan ventral hipokampus

bölgelerinden (*CA1* ve *Subiculum*) bağlam bilgisi amigdala'nın B ve AB nükleuslarına gelerek oradan santral nükleusa iletilmektedir. Spinotalamik yol aracılığı ile posterior talamusa gelen koşulsuz uyaran (elektrik uyarısı) aktivasyonunun, amigdalanın AB nükleusuna iletildiği ve burada koşullu uyarana bağlı aktivasyonla birleştiği, daha sonra amigdalanın santral nükleusuna gönderildiği gösterilmiştir. Santral nükleustan beyin sapına olan bağlantıların korku şartlanması yanıtını oluşturduğu rapor edilmiştir (LeDoux ve ark., 1988; Davis, 1992; Kapp ve ark., 1992) (Şekil 1.11). Hipokampuste olan bağlam bilgisinin geri çağrılmasında hipokampus ve prefrontal korteksin gerekli olduğu insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Bağlamsal geri çağırma duygusal bellek ile ilgili savunma davranışlarının organizasyonu için de önemlidir (Jin ve Manren, 2015)



Şekil 1.11 Bağlamsal korku şartlanmasında koşullu ve koşulsuz uyaranlara bağlı olarak görülen aktivitenin hipokampus ve amigdala bölgelerine projeksiyonları LA, lateral amigdala; B, bazal nükleus; AB, aksesuar bazal nükleus; CE, santral nükleus (LeDoux, 2000'den uyarlanmıştır).

1.7.3 Bağlamsal korku şartlanması ve yaşlanma

İnsanlarda yapılan meta analiz çalışma sonuçlarına göre bağlamsal bilgi belleğinde (zamansal sıralama, uzaysal yer ya da kaynak) anlamsal belleğe göre

daha az bozulma olduğu bulunmuştur (Spencer and Raz, 1995; Old and Naveh-Benjamin, 2008). Uzaysal bellek ya da bağlamsal belleği özel olarak değerlendiren testlerin (örneğin; bağlamsal korku şartlanması) yaşlanmaya hassas olduğu düşünülmektedir (Foster ve ark., 2012).

Rodentlerde yaşlılıkla bağlamsal korku şartlaması sonrasında korku belleğinin oluşmasına dair literatürde çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Bağlamsal korku şartlanması sonrasında bellek oluşumu hemen (Kudo ve ark., 2005), 24. saatte (Houston ve ark., 1999; Bergado ve ark., 2011), 72. saatte (Barrientos ve ark., 2006), 10. günde (Oler ve Marcus, 1998) ve 20. günde (Houston ve ark., 1999) değerlendirilmiş ve yaşlanmaya bağlı bir bozulma olmadığı rapor edilmiştir. Buna karşın farelere 2 s süresince farklı şiddette elektrik akımı uygulanarak belleğin 2. saatte (0,75 mA) (Kudo ve ark., 2005), 24. saatte (0,2 mA) (Fukushima ve ark., 2008), 24 saatte (1 mA) (Peleg ve ark., 2010) ve 48. saatte (0,5 mA) değerlendirildiği çalışmalarda yaşlanmaya bağlı donma davranışında fark gözlenmezken, 1,5 mA şiddetinde elektrik akımı uygulanmasının 72. saatinde fark bulunmuştur (Barrientos ve ark., 2006). Ardışık iki çalışmada (2 s, 0,5 mA) kullanarak 48. saatte yaşlanmaya bağlı donma davranışında farklılık gösterilirken (Gemma ve ark., 2004; Gemma ve ark., 2005), aynı yoğunlukta 4 tekrarlı eğitimde 10 gün sonra yaşlanmaya bağlı bir fark bulunmamıştır (Oler ve Marcus, 1998). Sonuçlar arasında görülen farkların deney düzeneğinde yer alan uyaranın şiddeti, süresi, tekrarı ve test edilen zaman noktalarından kaynaklanabileceği belirtilmektedir (McGaugh, 2006). Moyer ve Brown (2006) yaptıkları çalışmada farklı yaş gruplarında donma davranışını incelenmiş ve bağlamsal korku şartlanması sonrasında yaşlanmaya bağlı daha düşük donma davranışı olduğunu bildirmişlerdir (Moyer ve Brown, 2006).

1.8 Çalışmanın Amacı

Belleğin nasıl depolandığını anlayabilmek için uzun yıllardır ortaya atılan fikirler bu kapsamdaki çalışmaları epigenetik alana yoğunlaştırmıştır. Oluşan

bilginin depolanmasına aracılık eden nöronal devrelerdeki sinaptik etkinliğinin nükleusta gen transkripsiyonunu ile düzenlendiği bilinmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar, nükleusta gen transkripsiyonunu düzenleyen mekanizmalardan biri olan DNA metilasyonuna yönelmiştir. DNA metilasyonunun belleğin depolanmasında yer alan mekanizmalardan biri olup olmadığının araştırılması uzun süreli belleğin nasıl depolandığını anlamamız açısından büyük önem taşımaktadır.

Çalışmada, sıçan beyninin farklı nöroanatomik alanlarında korku belleğinin oluşumu ve sürdürülmesi sırasında bazı genlerin promotor bölgesindeki DNA metilasyon değişimlerinin belirlenmesi ve yaşlanma ile nasıl değişebileceğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak uzun süreli bellek oluşumunu sağlayan korku şartlanması davranış modeli kullanılarak genç ve yaşlı sıçanlarda korku belleğinin oluşturulması ve korku belleği ağı içinde yer alan ve uzun süreli belleğin konsolidasyonundan sorumlu hipokampus, uzun süreli belleğin depolandığı yer olarak düşünülen prefrontal korteks ve korku ile ilişkilendirilen amigdala bölgelerinde, 1. saat (kısa süreli bellek), 24. saat, 7. ve 21. günlerde (uzun süreli bellek) belleğin oluşması ve sürdürülmesinde rol alabileceği düşünülen *CaN, Reln* ve *Egr1* genlerinin promotor bölgesindeki DNA metilasyonu değişimleri incelenmiştir.

Hipokampus, prefrontal korteks ve amigdala bölgeleri arasında, zaman-bağımlı olarak genlerin promotor bölge DNA metilasyon değişikliklerinin belirlenmesi, korku belleğinin oluşması ve sürdürülmesi mekanizmaları hakkında bilgi verecek ve ayrıca yaşa bağlı olarak bellek oluşumunda gözlenen değişiklikler hakkındaki bilgilerimize katkı sağlayacaktır.

Araştırmanın aşamaları:

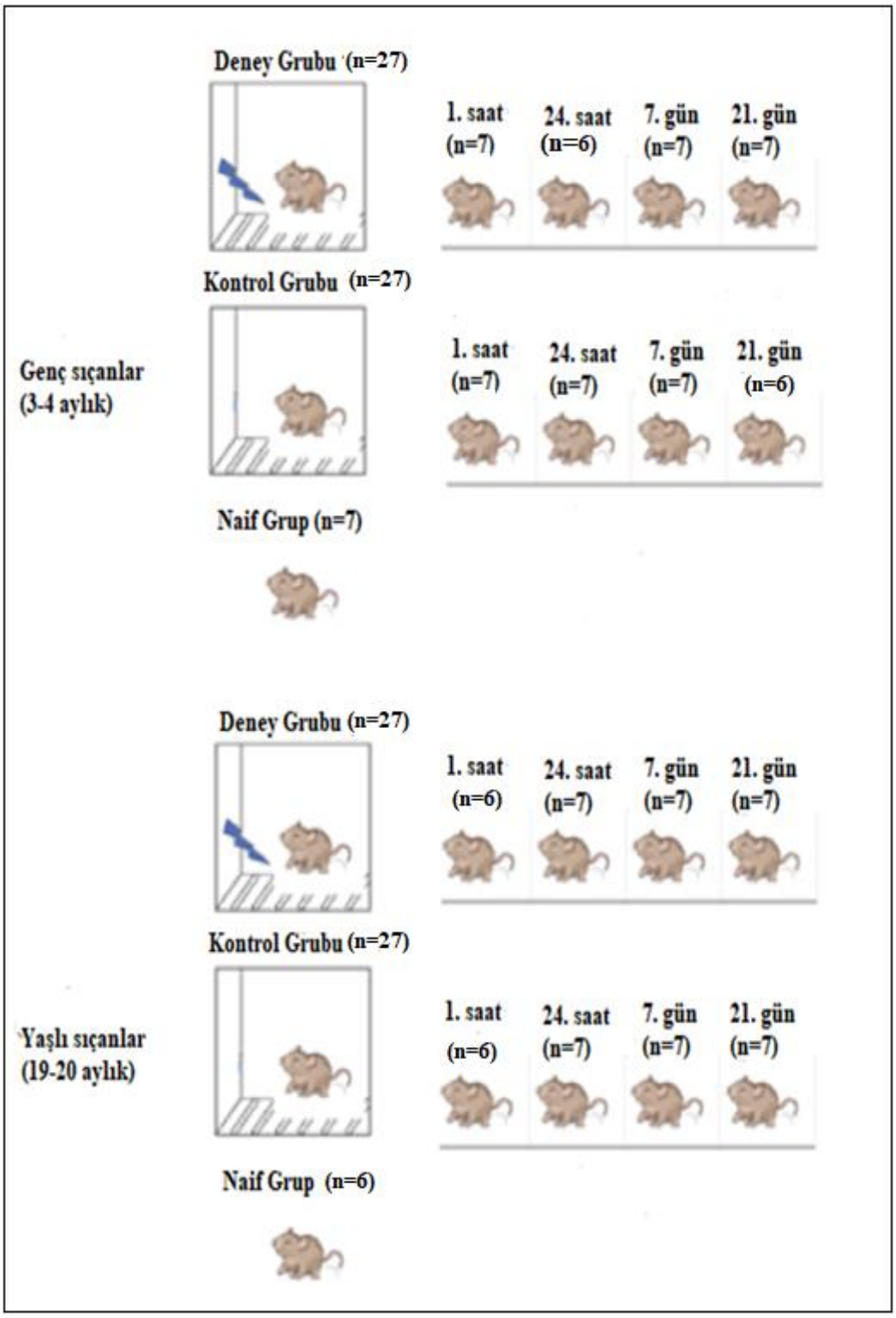
- Genç ve yaşlı sıçanlarda korku belleği oluşturmak için bağlamsal korku şartlanması davranış deneyinin uygulanması ve donma yanıtlarının incelenmesi

- Hipokampus, prefrontal korteks ve amigdala dokularında ilgili genlerin DNA metilasyon düzeylerinin MeDIP analizi yöntemi ile belirlenmesi
- MeDIP analizi ile elde edilmiş metilenmiş DNA'nın RT-PCR ile *CaN, Reln* ve *Egr1* genlerinin promotor bölge DNA metilasyonunun belirlenmesi olarak sıralanabilir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Denekler

Tez çalışmasında kullanılan 123 adet *Sprague-Dawley* erişkin erkek sıçanın 27 Mart 2015 ve 20 Ağustos 2015 tarihlerinde üretimleri Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde (YÜDETAM) gerçekleştirilmiş ve bakımları yine aynı merkez tarafından sağlanmıştır. Davranış deneyinde 250-350 g ağırlığında genç, 400-500 g ağırlığında olan yaşlı sıçanlar kullanılmıştır. Çalışmada yer alan sıçanlar laboratuvar ortamında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde, normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslenmişlerdir. Bu düzen otomatik olarak sağlanmıştır. 20 Ağustos 2015'de üretimi yapılan 63 adet sıçan 3 aylarını doldurdukları 20 Kasım 2015 tarihinden itibaren, 27 Mart 2015'de üretimi yapılan 63 adet sıçan ise 19 aylarını doldurdukları 20 Ekim 2016 tarihinden itibaren davranış deneyi çalışmalarına alınmaya başlanmıştır. 3 aylık olarak davranış deneyine katılan 63 sıçan genç grup olarak belirlenirken, 19 aylık olarak davranış deneyine katılan 60 sıçan ise yaşlı grup olarak belirlenmiştir. Yaşlı sıçan grubunda bulunan 3 adet sıçan yaşlanmaya bağlı gelişen hastalıklar ve düşük ağırlık nedeni ile çalışmadan çıkarılmıştır. Genç ve yaşlı gruplarının her birinde en az 6 sıçan yer almıştır. Genç ve yaşlı çalışma grupları ayrı ayrı dört kontrol ve dört deney olmak üzere toplam sekiz gruptan oluşmaktadır. Ayrıca çalışmada genç ve yaşlı gruplar için hiçbir deneyin uygulanmadığı birer naif grup da yer almaktadır. Genç naif grupta 7 sıçan yer alırken, yaşlı naif grupta 6 sıçan yer almıştır (Şekil 2.1). Ek kontrol grubu olan naif grup, bellek ile bağlantılı olarak herhangi bir nöronal aktivasyonun olmadığı bazal bir DNA metilasyon düzeyini ifade etmektedir. Kontrol ve deney grubunun DNA metilasyon verileri bu bazal DNA metilasyon düzeyine göre düzeltilerek ortaya konulacaktır.



Şekil 2.1. Çalışmada yer alan genç ve yaşlı sıçan grupları.

2.2 Gereç ve Materyal:

- Korku şartlanması kabini (Commat Ltd. Şti. Ankara, Türkiye)
- Gerçek zamanlı PCR (Lightcycler 480 System, Roche Molecular System Inc, ABD)
- Su banyolu sonikatör (Bransonic Ultrasonic Cleaner 2510MT, Sigma-Aldrich, ABD)
- Elektroforez Tankı, Güç kaynağı (Power Pac Basic Electrophoresis, BIO-RAD, ABD)
- DNA Spektrofotometresi (NanoPhometer, IMPLEN, Almanya)
- UV jel görüntüleme (Fussion pulse, Vilber Lourmat, Fransa)
- DNA izolasyon kiti (Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit Kat no: 69506, Qiagen, Almanya)
- Monoklonal anti-5-metilsitidin (5-mC) antikoru (Monoclonal anti-5-methylcytidine (5-mC), Clone 33D3, Kat no: A-1014-100, Epigentek Group Inc. ABD)
- İzotip IgG antikoru (IgG1 Izotype Control Monoclonal Antibody, Kat no: A-24002-1, Epigentek Group Inc. ABD)
- Protein A- manyetik boncuk (Dynabeads Protein A Kat no: 1002D, Invitrogen Corporation, ABD)
- Manyetik tutucu (Magnetic Separation Rack, Kat no: S1509S, New England BioLabs Inc. ABD)
- Proteinaz K 20 mg/mL (Proteinase K Solution Kat no: AM2546, Invitrogen Corporation, ABD)
- DNA saflaştırma kiti (Wizard Magnesil Plasmid Prufication System, Kat no: A1630, Promega Corporation, ABD)
- Sybergreen Enzimi (Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix kat no:172-5274, BIO-RAD. ABD)
- RT-PCR plate (Lightcycler 480 Multiwell Plate 96, White Kat no: 04729692001, Roche Molecular System Inc. ABD)

2.3 Kullanılan Tamponlar

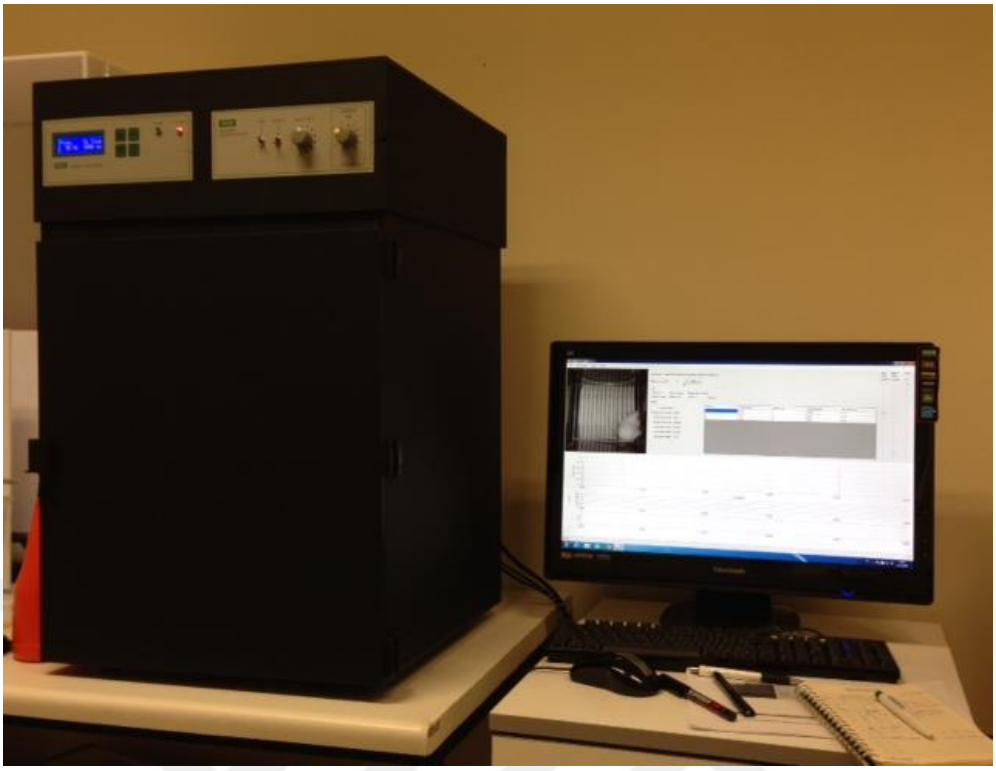
- TE tampon (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
- 10 X IP tampon [1M Na_3PO_4 (pH 7.0), 5M NaCl, % 0,05 TritonX-100, H_2O]
- PBS-BSA % 0,1 [9 mL PBS, 1 mL BSA (10 mg/mL stok)]
- Digestion tampon (50 mM Tris–HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, % 0,5 SDS)

2.4 Yöntem

2.4.1 Bağlamsal Korku Şartlanması

Çalışma, sıçanlar için tasarlanan korku şartlanması kabininde gerçekleştirilmiştir (Commat Ltd. Şti., Ankara). Cihazın üzerinde elektriksel uyarının süresini, frekansını ve ışık miktarını ayarlayabileceğimiz kısımlar yer almaktadır. Kabin içinde 30 cm x 30 cm x 30 cm ebatlarında, kamera ile izlenen, önden kapılı bir girişi olan, zemini siyaha boyalı pleksiglas bir kutu bulunmaktadır. Kutunun zeminine elektrik akımını ileten metal çubuklar monte edilmiştir. Kabinin üst kısmında sıçanın hareketlerini kaydeden kamera ile görüntüler bilgisayara aktarılmaktadır (Şekil 2.2)

Deneyler, Yeditepe Üniversitesi deney hayvanları ünitesinde ayrı bir odada yapılmıştır. Bu bölümde arka plan sesleri en aza indirilmiş, yeterince aydınlık bir ortam sağlanmış, parfüm gibi duyusal uyaranların olmamasına ve deney sırasında odada deneyi yapanın dışında kimsenin bulunmamasına dikkat edilmiştir. Deneye alınan her bir sıçan için deney tamamlandıktan sonra, kabin % 60'lık etil alkol ile temizlenmiştir



Şekil 2.2 Korku şartlanması kabini, izleme ve kayıt sistemi.

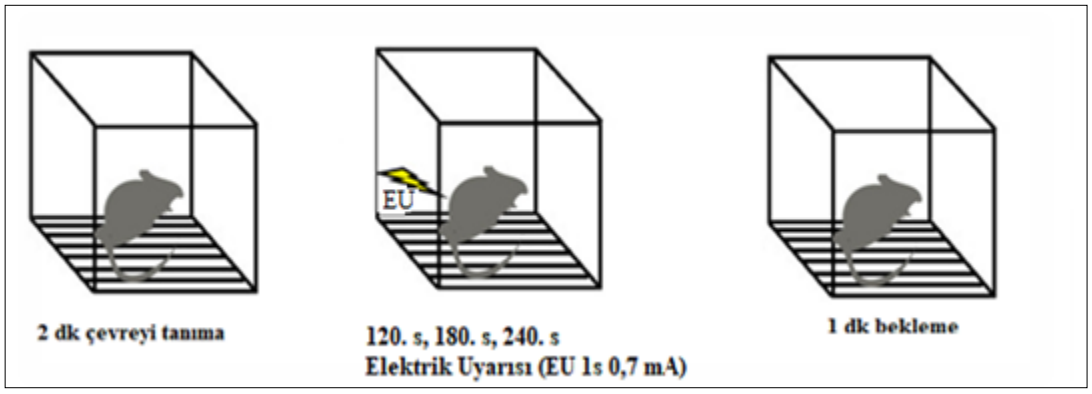
Çalışmaya dahil edilen tüm sıçanlar, 3 gün önce ortama adaptasyonlarını sağlamak için deney yapılacak alana getirilip deneyi yapacak kişiye alıştırılmışlardır.

Korku şartlanması deneyi ve donma davranışının değerlendirilmesi ile ilgili davranış deneyleri aydınlık periyodun 1 saat sonrası ve karanlık periyodun öncesinde olacak şekilde planlanmış ve saat 9:30'da ilk sıçan deneye alınmıştır. Sabah saat 9:00 da o gün çalışılacak grup ayrılıp ayrı bir bölmeye taşınmış ve sıçanlar testin yapılacağı odaya, teker teker transfer kafesi ile getirilmiştir. Bir günde aynı zaman dilimi için deney (n= 6 veya 7) ve kontrol (n= 6 veya 7) grupları deneye alınmıştır. Deneye alınan sıçanlar deney sırasında birbirlerinden ayrılmış ve deney bitiminde yaşadıkları ortama dönerlerken yine aynı kafeste olacak şekilde yerleştirilmiştir.

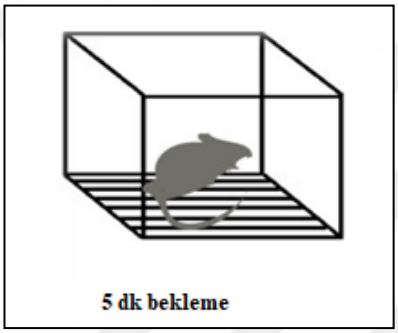
Çalışmamızda uygulanan bağlamsal korku şartlanması davranışı protokolü, sıçanların zararlı uyaran (elektrik uyarısı) ile bulundukları ortamı ilişkilendirmelerini (asosiyatif öğrenme) ve sonrasında aynı ortama maruz

kaldıklarında hatırlanan korkuyu ifade eden donma davranışının değerlendirilmesini içermektedir. Bağlamsal korku şartlanması protokolü iki ana aşamadan oluşmaktadır.

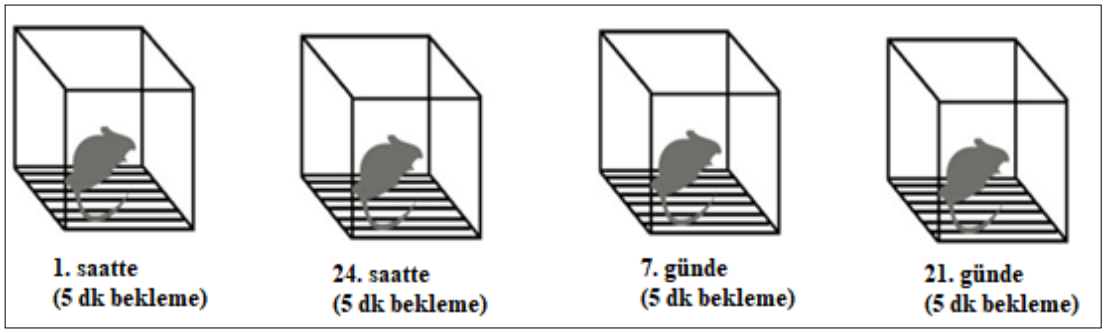
- İlk aşama korku şartlanmasının oluşturulması için gerekli deney dizaynı; 2 dk, 2 dk ve 1 dk'lık dilimlere ayrılmak üzere toplamda 5 dk olacak şekilde 3 bölümden oluşturulmuştur. Elektrik uyarısı 120., 180., ve 240. s'lerde 1s süresince 0,7 mA şiddetinde uygulanmıştır. Bu protokolde kullanılan sıçanlar deney grubumuzu oluşturmuştur (Şekil 2.3)
- Kontrol grubumuz aynı düzenekte 2 dk, 2 dk ve 1 dk olmak üzere toplamda 5 dk olacak şekilde kabine alınmış fakat bu sıçanlara elektrik uyarısı verilmemiştir (Şekil 2.4).
- Deneyin ikinci aşaması ise sıçanların elektrik verilen ortamı, hatırlayıp hatırlamadığını test etmek üzere tasarlanmıştır. Bu aşamada deney ve kontrol gruplarına aynı olacak şekilde, korku şartlanma kabinine farklı zaman aralıklarında (deney yapıldıktan sonra 1. saatte, 24. saatte, 7. günde ve 21. günde) alınarak donma davranışı gözlenmiştir (Şekil 2.5). Donma davranışı, en az 3 s süreyle solunum ve kalp atış hareketleri dışında hareketliliğin olmaması durumu olarak belirlenmiştir. Her bir zaman noktası için farklı bir grup sıçan kullanılmıştır.
- Donma davranışı testinde elde edilen verilerden 5 dk'lık süre içerisindeki donma hareketinin yüzdesel değerleri hesaplanıp, kontrol ve deney hayvanları arasında karşılaştırılarak oluşan korku ile ortam ilişkisi bilgisinin deneklerin belleklerinde olup olmadığı değerlendirilmiştir.



Şekil 2.3. Bağlamsal korku şartlanması deney protokolü.



Şekil 2.4. Bağlamsal korku şartlanması kontrol protokolü.



Şekil 2.5. Kontrol ve deney gruplarına uygulanan donma davranışı test protokolü.

2.4.2 Beyin Dokularının Çıkarılması

Her bir grubun deneyi tamamlamasından sonra genç ve yaşlı sıçanlara, ketamin/ksilazin (100/10 mg/kg, intraperitoneal) karışımı enjekte edilmiş ve oluşan anesteziyi takiben giyotin ile baş gövdeden ayrılmıştır.

Genel anestezi altında dekapitasyon işlemini takiben, kafatası açılmış ve beyin tümüyle çıkarılarak buzla soğutulmuş bir petri kutusunun üzerine konulmuş, tüm nöroanatomik bölgeler süratle makro diseksiyon yoluyla elde edilmiş ve dokular kuru buzda soğutulan tüplere konularak – 80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Total olarak çıkarılan beyin dokusundan ilk olarak serebellum uzaklaştırılmıştır. Sonra anterodorsal bir yönelimle olfaktor bulbus uzaklaştırılarak anterior komissura ulaşılmıştır. Buradan 1 mm kalınlığında alınan koronal bir kesit prefrontal motor alan olarak kabul edilmiştir. Bu kesitin hemen ardından 2 mm'lik koronal bir kesit daha alınarak hemisferlerin birleşim bölgesinden (Şekil 2.6) sağ ve sol prefrontal bölgeler diseke edilmiş ve saklanmıştır.

Prefrontal korteks çıkarıldıktan sonra geriye kalan beyin dokusu korpus kallosumdan sağ ve sol hemisfer olarak ikiye ayrılmıştır. Her bir hemisferden serebral kortikal doku altında yer alan sağ ve sol hipokampus bütün olarak (Şekil 2.6) çıkarılmıştır. Sağ ve sol bölümler birleştirerek saklanmıştır.

Hipokampus çıkarıldıktan sonra geriye kalan beyin dokusunda temporal lobun iç kısmından lateral hipotalamus ve lateral ventrikülün önünde yer alan bölüm amigdala dokusu (Şekil 2.6) olarak çıkarılmıştır. Bu bölge, deneye alınmayan bir sıçanda bregmadan, - 2,8 mm anteroposterior, 4,8 mm lateral, - 6,6 mm dorsoventral stereotaksik koordinatlara karşılık gelen bölgeye (Paxinos ve Watson, 2013) stereotaksik olarak (Stoelting Co, Stereotaksik Frame, ABD) metilen mavisi **(**0,5 µl) enjekte edilmek süretiyle görselleştirilmiş ve bu görsel şemaya göre diğer sıçanlardan alınan beyin dokuları diseke edilmiştir.



Şekil 2.6. Beyin dokularının çıkarılması a) Prefrontal korteks b) Hipokampus c) Amigdala (Spijker, 2011'den uyarlanmıştır).

Deney hayvanları üzerinde uygulanan bu protokol Yeditepe Üniversitesi, Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 12.03.2015 tarih ve 455 nolu kararıyla uygun bulunmuştur.

2.4.3 DNA Metilasyonu Analizi

Çalışmada, *CaN*, *Reln* ve *Egr1* genlerinin promotor bölgelerindeki metilasyon profilinin belirlenmesinde *Methylated DNA Immunoprecipitaion-Polymerase Chain Reaction* (MeDIP-PCR) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde temel olarak metile DNA'nın monoklonal 5mC antikoru ile immünopresipitasyonunu takiben her bir gen için promotor bölgeden elde edilen spesifik primer çiftleri ile gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) gerçekleştirilmektedir (Weber ve ark., 2005). Test edilen her örnek için metillenmemiş olduğu bilinen intronik bölgeden elde edilen *Tubb* geni internal kontrol olarak kullanılmıştır. Kullanılan MeDIP yönteminin doğruluğunu test etmek amacı ile pozitif kontrol olarak maternal olarak metile olduğu bilinen *H19* geninin promotor bölgesi analiz edilmiştir.

2.4.3.1 DNA İzolasyonu ve Fragmantasyonu

Farklı beyin bölgelerinden (prefrontal korteks, hipokampus ve amigdala) DNA izolasyonu Qiagen DNaesy Blood & Tissue Kit (Qiagen, kat no: 69506) kullanılarak ve üreticinin önerdiği, aşağıda tanımlanan protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

- Başlangıç materyali olarak 25 mg beyin dokusu küçük parçalara ayrılarak 1,5 mL tüplere konulmuş, üzerine 180 µL ATL tamponu ve 20 µL Proteinaz K eklenmiştir. Bu karışım doku lizis olana kadar 56°C de (1,5 saat) ara ara vortekslenerek bekletilmiştir.
- Doku lizisi tamamlandıktan sonra örnekler 15 s vortekslenmiş ve örneklere ilk olarak 200 µL AL tamponu daha sonra 200 µL etanol (% 96-100) eklenmiş her birinden sonra tekrar vortekslenmiştir.
- Elde edilen karışım, 2 mL biriktirme tüplerine yerleştirilen DNeasy Mini Spin kolonlarına pipetlenmiş, 9000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında 2 mL biriktirme tüplerinin içinde biriken materyal atılmış, tüpler değiştirilmiş spin kolonlara 500 µL AW1 tamponu eklenip 9000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- Tekrar 2 mL biriktirme tüplerinin içinde biriken materyal atılmış tüpler değiştirilmiştir. Bu sefer spin kolonlara 500 µL AW2 tamponu eklenerek 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj yapılmıştır.
- Ek olarak spin kolonlar kurumaları için tekrar 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
- Spin kolonlar 1,5 mL tüplere yerleştirilerek içlerine 200 µL AE tamponu eklenmiş, oda sıcaklığında 1 dk bekletildikten sonra 1 dk 9000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 1,5 mL tüplerde yaklaşık 200 µL DNA elde edilmiştir.

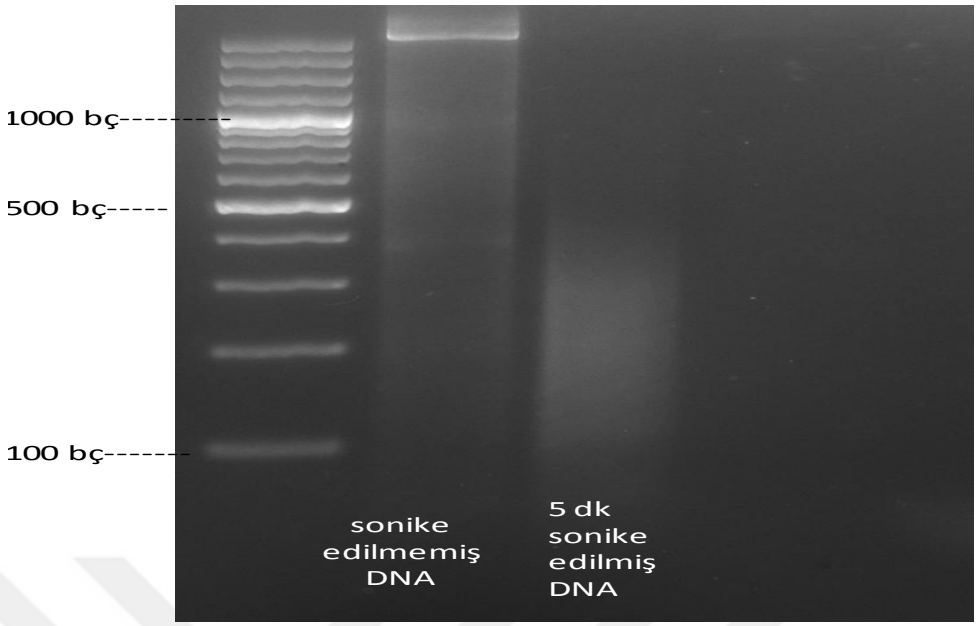
Elde edilen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonları spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (IMPLEN, Nanophotometer). DNA'lar kısa süreli olarak +4°C'de, uzun süreli olarak -20°C'de saklanmıştır.

Elde edilen DNA'nın fragmentasyonu için sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Sonikasyon ile 300 - 1000 bç büyüklüğünde DNA parçaları elde edilebilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sonikasyon aşamasında tüpün büyüklüğü ve içindeki DNA'nın hacmi, sonikatörün içindeki suyun sıcaklığı, tüpün yeri ve sonikasyon süresi gibi parametreler DNA fragmentasyonu üzerine etkili olabileceği için, bu parametrelerin ayrı ayrı

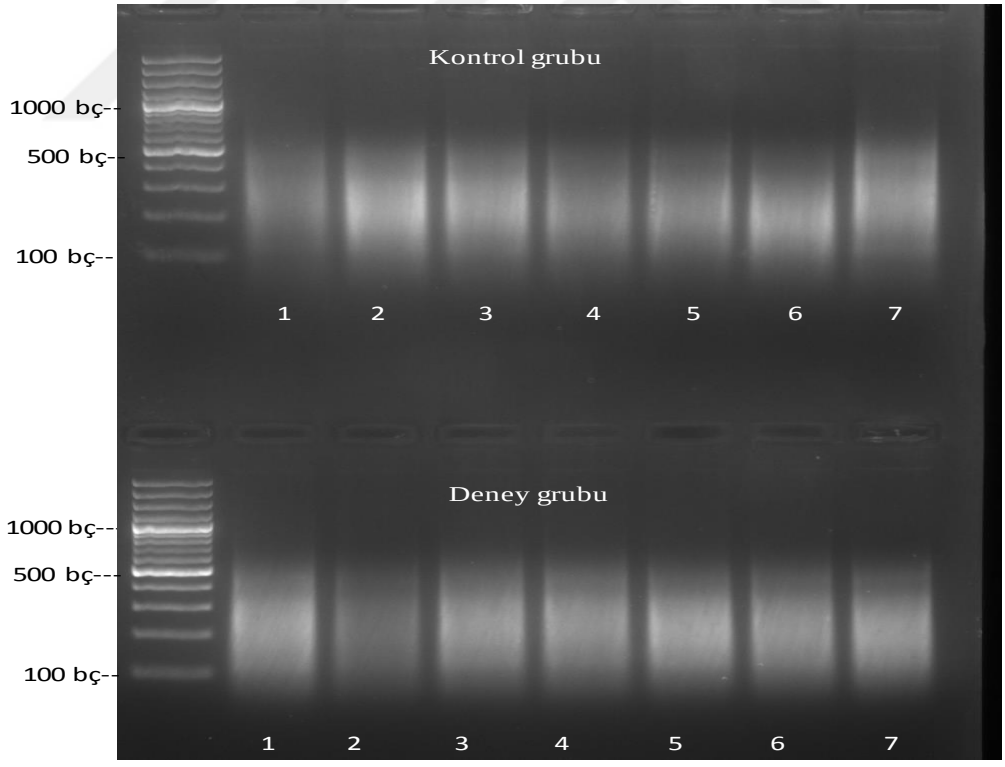
optimize edilmeleri yoluna gidilmiştir. Sonikasyon optimizasyonu için laboratuvarda bulunan su banyosu sonikatörü kullanılmıştır (Bransonic 2510 MT). 100 µL hacimdeki DNA miktarı için denemeler sonrasında 200 µL'lik tüpün uygun olduğu belirlenmiştir. Bu tüpler su banyosu içinde belirli yerlere yerleştirilmiş ve sonikatörün kapalı dönemlerinde tüplerin yerleri değiştirilerek tüm örneklerin aynı şiddette sonikasyona maruz kalmaları sağlanmıştır. Sonikasyon süresi 60 s/30 s açık/kapalı olacak şekilde toplamda 5 dk olarak uygulanmıştır (Çizelge 2.1). Optimizasyon çalışmalarında parçaların büyüklüğünün kontrolü % 2 lik agaroz jel elektoforezi ile belirlenmiştir (Şekil 2.7). Grup içinde yer alan tüm DNA'lar benzer şekilde fragmente olmuşlardır (Şekil 2.8).

Çizelge 2.1. Uygulanan sonikasyon protokolü.

Sonikasyon Protokolü	
DNA fragmantasyonu için kullanılan malzeme	Su banyosu sonikatör
DNA fragmantlarında istenen büyüklük	300 - 1000 bç
Fragmante edilen DNA hacmi	100 µL DNA
Sonikasyon uygulama şekli	60 s / 30 s açık/kapalı
Sonikasyon döngü sayısı	5 tekrar
Toplam sonikasyon süresi	5 dk



Şekil 2.7. Su banyosu sönikatörü ile fragmente olmuş DNA'nın agaroz jel görüntüsü.



Şekil 2.8. Kontrol ve deney gruplarına ait DNA örneklerinin 5 dk'lık sonikasyon sonrası agaroz jel görüntüsü.

2.4.3.2 Metillenmiş DNA'nın İmmunopresipitasyonu (MeDIP)

MeDIP için gerekli olan tamponlar literatürde belirtildiği şekilde hazırlanmıştır (Weber ve ark., 2005; Thu ve ark., 2009; Guerrero-Bosagna ve Jensen, 2015). Metile DNA'nın immünopresipitasyonu için aşağıda belirtilen, iki gün süren basamaklar takip edilmiştir.

1. gün;

- Fragmente DNA'nın 4 µg'ı 5 mC antikoru ile muamele edilirken, 1 µg fragmente DNA ise 'input' olarak ayrılmıştır.
- 4 µg fragmente-DNA örnekleri 1,5 mL santrifüj tüplerine alınarak, üzerlerine 450 µL TE tamponu (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ilave edilmiştir.
- Fragmente DNA'nın denaturasyonu için örnekler ilk önce 95°C de 10 dk inkübe edildikten sonra hemen buz üzerine alınmış ve buzda 10 dk daha bekletilmiştir.
- Metillenmiş DNA'nın immünopresipitasyonu için, denature edilmiş DNA örneklerine 52 µL 10 X IP tamponu [1 M Na_3PO_4 (pH 7,0), 5M NaCl, % 0,05 TritonX-100, H_2O] ve 1 µL monoklonal 5mC antikoru, (Epigentek kat no: A-1014-100) eklenmiş ve örnekler 4°C de bir gece çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
- Negatif kontrol olarak, aynı miktarda denature DNA 1 µL izotip IgG antikoru (Epigentek kat no: A24002-1) ile yukarıda belirtilen adımlar takip edilerek muamele edilmiştir.

2. gün;

- Protein A'lı manyetik boncuklara 700 µL PBS-BSA % 0,1 ile ön yıkama yapıldıktan sonra 40 µL protein A'lı manyetik boncuklar (Invitrogen kat no: 1002D) antikorlanmış DNA'lara eklenmiştir.
- Manyetik boncukların 5mC antikorlarına tutunabilmesi için örnekler 4°C da 2 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

- Tüpler manyetik ayırıcıya (Biolabs kat no: S1509S) yerleştirilerek 5mC antikoru ile birleşen manyetik boncuklar tüpün duvarına çekilmiş geriye kalan süpernatan tüpten uzaklaştırılmıştır. Böylece manyetik boncuklarla birlikte 5mC antikoru ile immünopresipite olmuş DNA kalmıştır.
- Antikorla bağlanmamış DNA kalıntıların temizlenmesi için 700 µL 1 X IP ile yıkama işlemiyle 10 dakika yıkanmış ve bu işlem iki defa tekrarlanmıştır.
- İşlem sonunda manyetik boncuklara protein A ile bağlı olarak elde edilen metillenmiş DNA'dan, protein A bağlantısınını uzaklaştırmak için, örnek üzerine 3,5 µL proteinaz K (20mg/mL Invitrogen kat no: AM2546) ve 250 µL digestion tampon (50 mM Tris–HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, % 0.5 SDS) eklenmiştir.
- Örnekler ısıtıcılı çalkalayıcıda (800 rpm) 50°C da 3 saat inkübe edilmiştir.
- En son aşamada DNA'nın saflaştırılması için manyetik boncuk içerikli DNA saflaştırma kiti (Promega kat no:A1630) kullanılmıştır.
- Bu işlemlerin sonucunda 60 µL metillenmiş DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar PCR analizleri gerçekleştirilinceye kadar - 20°C'de muhafaza edilmiştir.

Metillenmiş DNA'nın RT-PCR için kontrolü *H19* gen çifti ile yapılmıştır. Elde edilen RT-PCR verilerinin normalizasyonunda bellek oluşumundan etkilenmeyen *Tubb* geninin intronik bölgesinden elde edilmiş primerler kullanılmıştır.

2.4.4 RT-PCR analizi

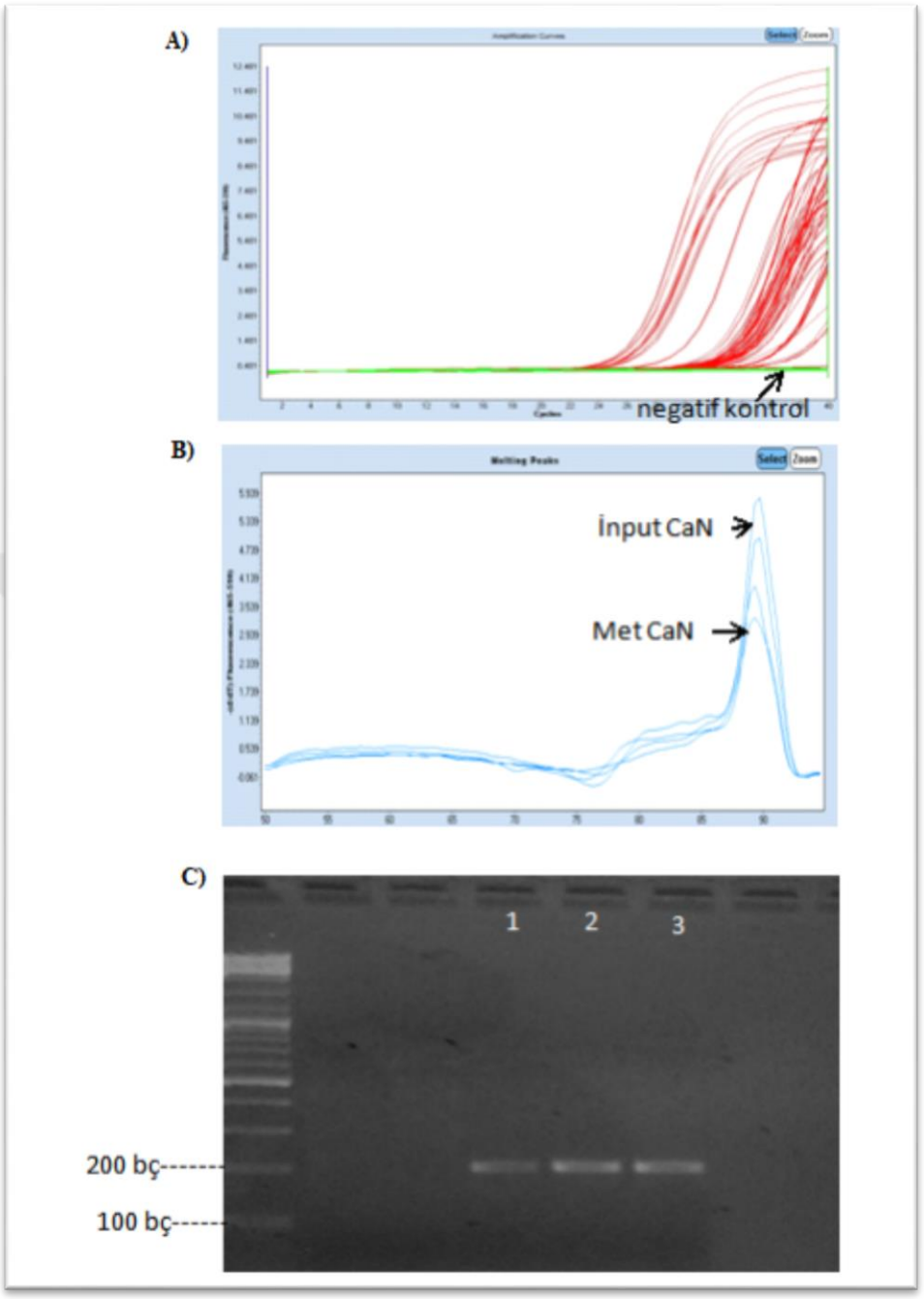
2.4.4.1 Primerlerin Optimizasyonu

Çalışmada yer alan *CaN, Reln, Egr1, Tubb ve H19* genlerinin çoğaltılması için kullanılan primer çiftleri, elde edilen amplikon uzunlukları ve çalışma '*annealing*' sıcaklıkları Çizelge 2.2'de verilmiştir. Primer çiftlerinin çalışma sıcaklıkları optimize edilirken spesifik olarak hedef bölgenin amplifikasyonunun gerçekleştiğini doğrulamak için, erime eğrileri analizleri ve agaroz jel elektroforezi yapılmıştır.

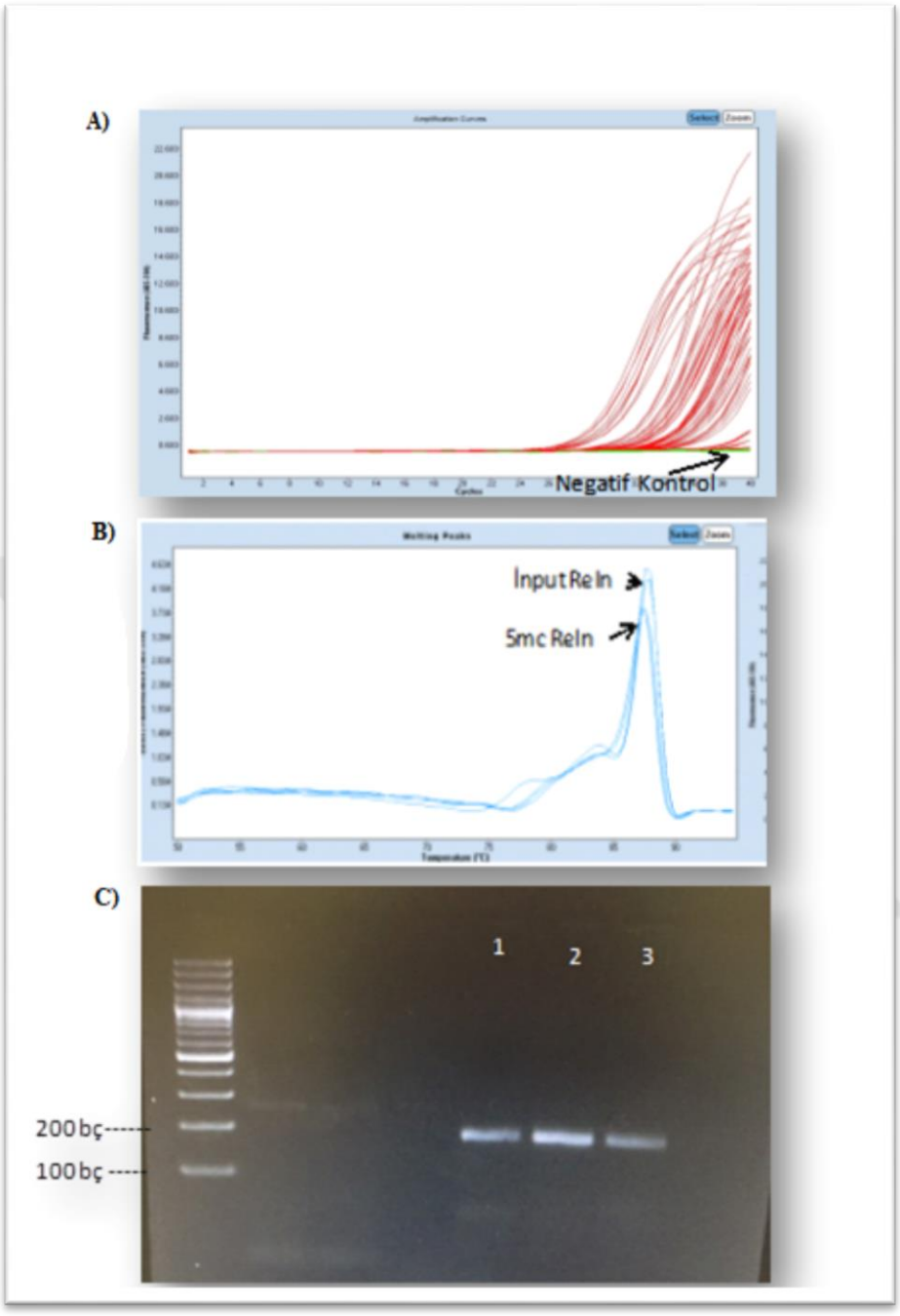
Temsili olarak seçilen örneklerde her bir gen için elde edilen amplifikasyon ve erime eğrileri ile PCR ürünlerinin % 2 lik agaroz jel görüntüleri Şekil 2.9-2.13'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Primer dizileri, amplikon uzunlukları ve çalışma sıcaklıkları.

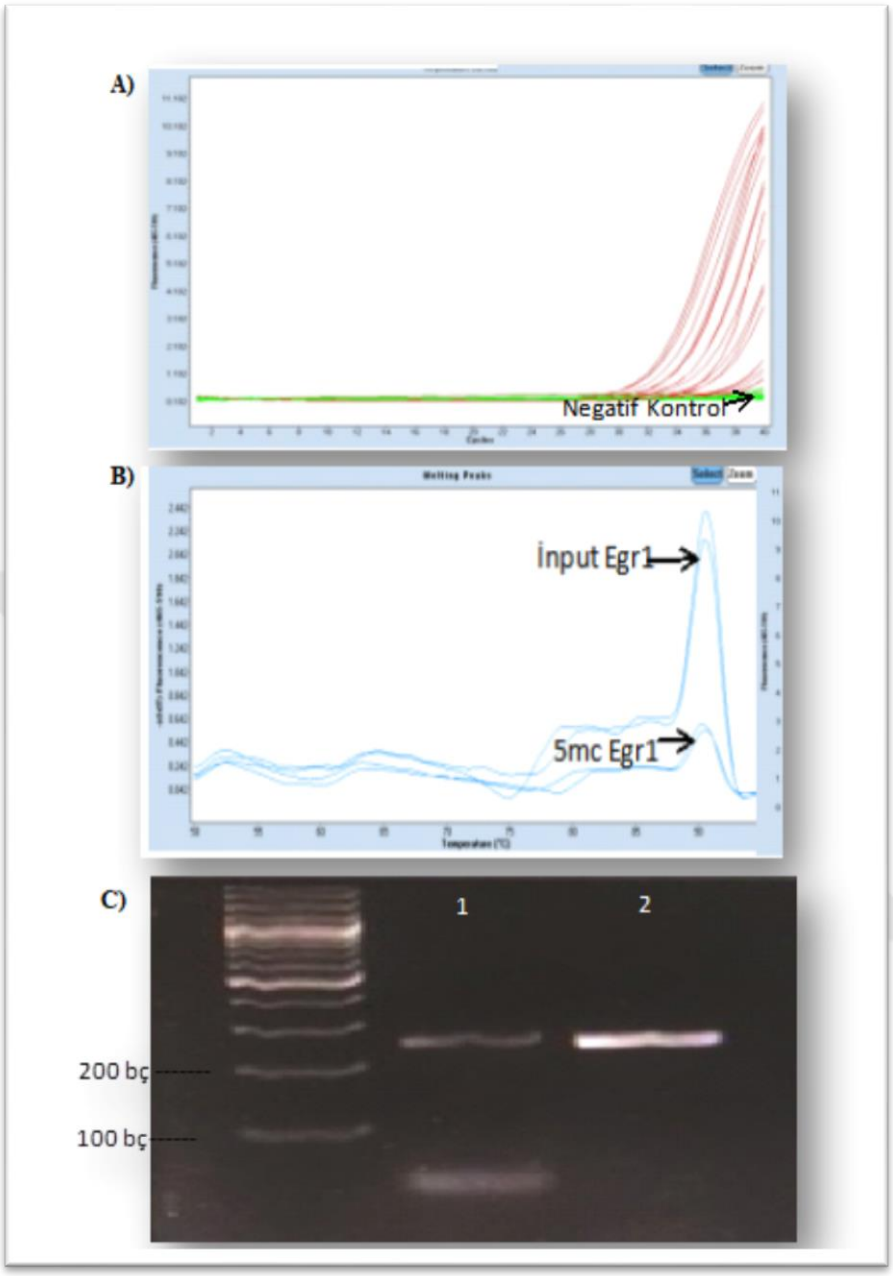
Primer		Dizilimleri	Amplikon Uzunlukları	Çalışma Sıcaklıkları
Egr1	F5'	CGGGTTGGGAACCAAGGAG	253 bç	65°C
	R5'	AGGCTCCTGGAAAGCCTAGT		
Reln	F5'	TTTCAGACATTCCCGTTTCC	181 bç	55°C
	R5'	GCGCACAAGTGAAACCATCT		
CaN	F5'	TGAACATAGCCAGGGTCACA	206 bç	60°C
	R5'	GAAGGCGACGAGTAAACAGC		
Tubb	F5'	AGAGGCTTGGGAGATGACTG	168 bç	60°C
	R5'	TGGTCTCTCACTCAACACTTGG		
H19	F5'	GAGCCCCGTATTGGAATCCAC	103 bç	72°C
	R5'	GAATGCATGTGTCCTGCCCTC		



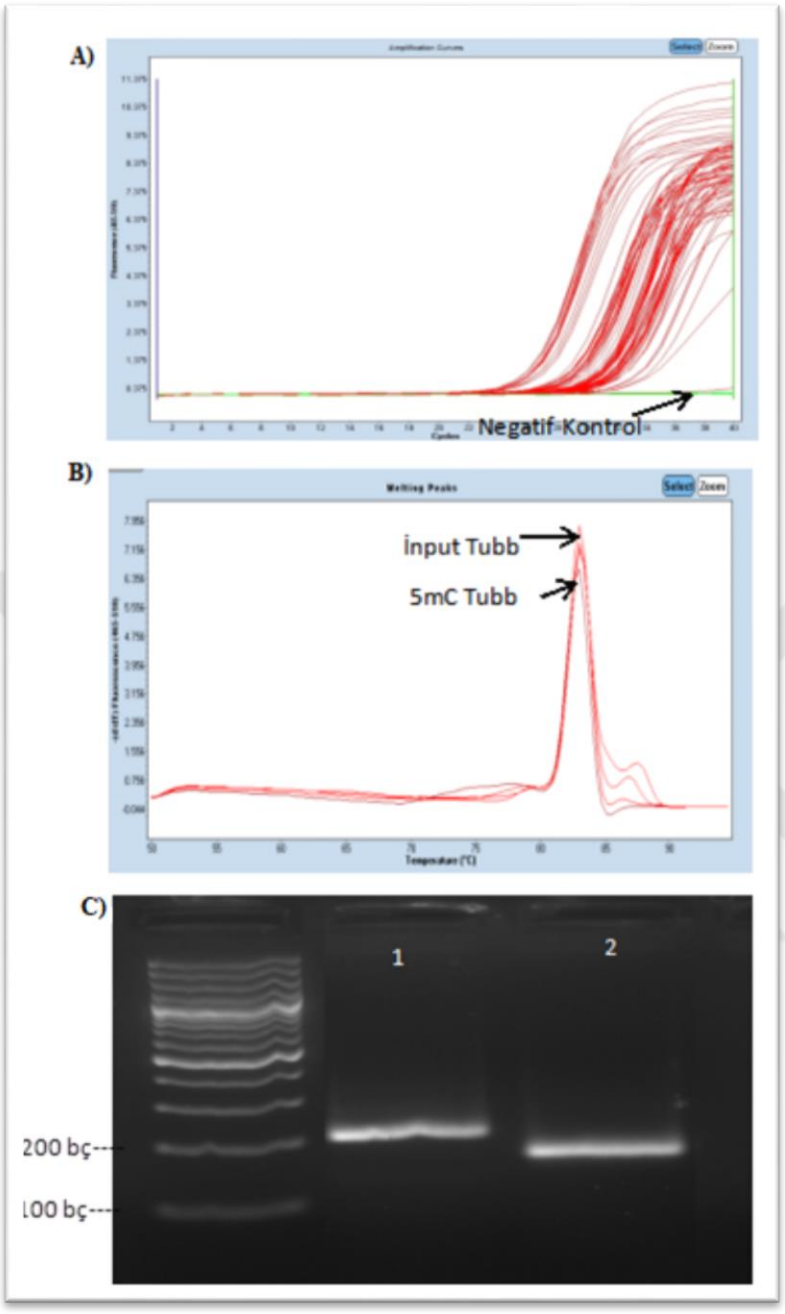
Şekil 2.9. *CaN* geninin promotor bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin A) amplifikasyon B) erime eğrileri ve C) agaroz jel görüntüsü



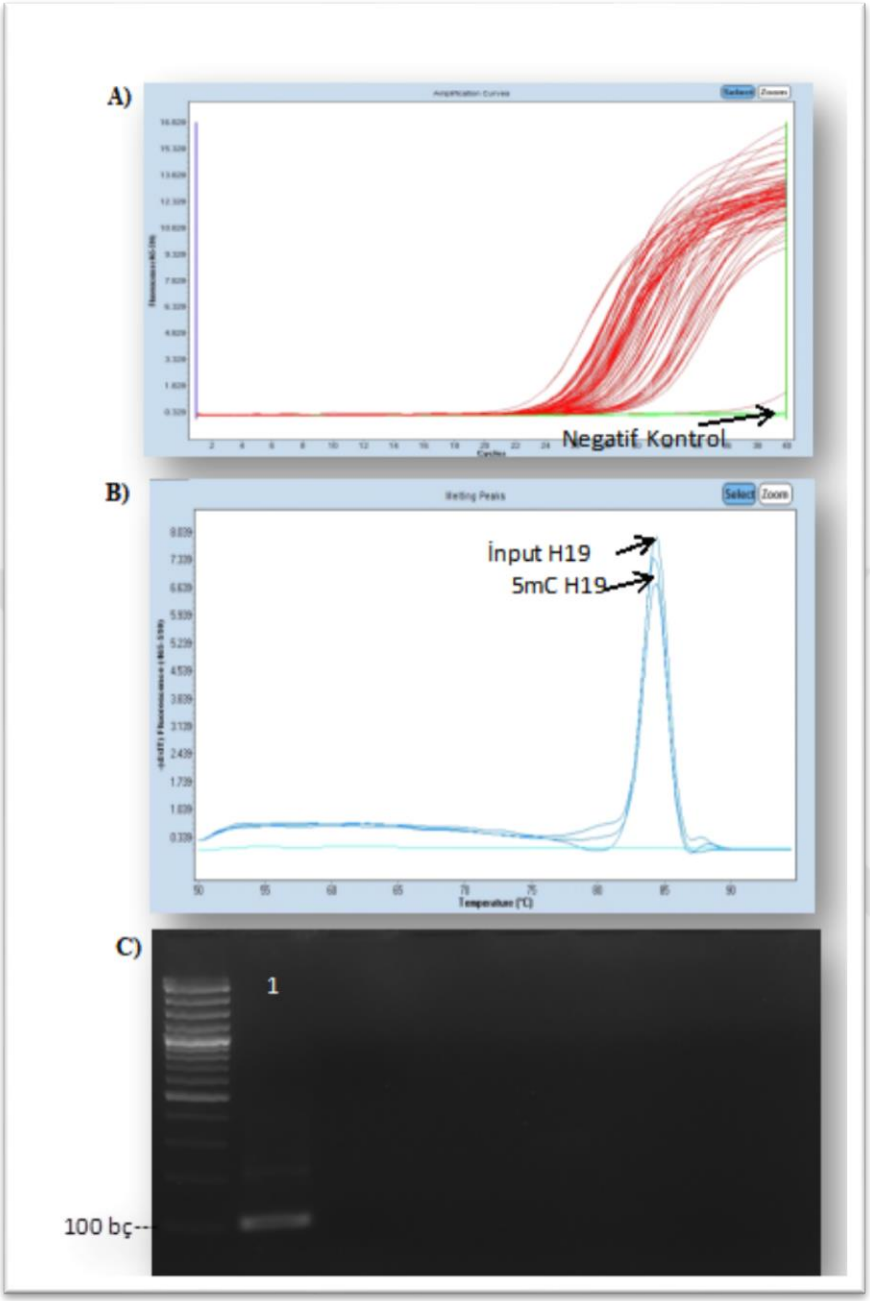
Şekil 2.10. *Reln* geninin promotor bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin A) amplifikasyon B) erime eğrileri ve C) agaroz jel görüntüsü (3 farklı çalışma sıcaklığı denemesi).



Şekil 2.11. *Egr1* geninin promotor bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin A) amplifikasyon B) erime eğrileri ve C) agaroz jel görüntüsü (2 farklı çalışma sıcaklığı denemesi).



Şekil 2.12. *Tubb* geninin promotor bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin A) amplifikasyon B) erime eğrileri ve C) agaroz jel görüntüsü (2 farklı çalışma sıcaklığı denemesi).



Şekil 2.13. *H19* geni promotor bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin A) amplifikasyon B) erime eğrileri ve C) agaroz jel görüntüsü.

2.4.4.2 RT-PCR Protokolü

RT-PCR analizi için reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Sybergreen süpermix (2x)	5 µL
10 µM primer düz	1 µL
10 µM primer ters	1 µL
DNA	2 µL
Nükleazsız H2O	1 µL
Toplam	10 µL

Her bir analizde her DNA örneği için genomik DNA (input DNA) (20 ng konsantrasyonda; 2 µL), 5mC (metillenmiş DNA 2 µL) ve IgG (negatif kontrol DNA 2 µL) örnekleri gerçek zamanlı PCR ile çoğaltılmıştır. Tüm örnekler en az iki tekrar olacak şekilde çalışılmıştır. İki tekrarlardan elde edilen sonuçların ortalaması alınarak kullanılmıştır. Uygulanan gerçek zamanlı PCR koşulları aşağıdaki şekilde kurulmuştur.

98°C'de 1 dk Başlangıç Denaturasyonu takiben

95°C 25 s Denaturasyon

55-72°C 30 s Primer Bağlanma } 40 döngü

72°C 30 s Uzama

72°C 5 dk ---------- Son uzama

95°C 1 dk

50°C 15 s (2,2°C/s) } Erime Eğrisi Analizi

95°C devam

40°C 30 s ---------- Soğuma

2.4.5 MeDIP RT-PCR Analizinin Hesaplanması

MeDIP RT-PCR sonucunda elde edilen ürünlerdeki metilasyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre hesaplanmıştır. Bu hesaplamada internal kontrol geni olarak *Tubb* geni kullanılmıştır. Hesaplamada, analiz edilen her bir gen için 5mC antikorunda bekletilmiş DNA (*Immunoprecipitated* DNA; IP DNA) ve genomik DNA (input DNA) için elde edilen RT-PCR'da floresan sinyal miktarının gözlemlenmesi için gereken eşik değerini geçen dongü sayısı (*Cycle threshold*; Ct) değerleri kullanılarak relatif metillenmiş DNA miktarı hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre çalışmada yer alan *CaN, Reln* ve *Egr1* için elde edilen metilenmiş Ct değerleri naif kontrole göre katlı değişim şekilde hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). Bazı örneklerden Ct değeri elde edilememiş ve bu durum da bazı gruplarda örnek sayımızın azalmasına neden olmuştur.

Bu hesaplamalar yapılırken ilk olarak;

CaN, Reln, Egr1 ve *Tubb* genleri input Ct değerine göre normalize edilmiş.

(Gen IP Ct / Gen Input Ct= Gen met Ct)

Buradan elde edilen sonucun internal kontrol genimiz olan *Tubb*'e göre normalizasyonu yapılmış.

(Gen met Ct - Tub met Ct= ΔCt)

Son olarak bu değer naif kontrolümüzden elde ettiğimiz ortalama ΔCt değeri ile normalize edilmiştir.

(Gen met ΔCt - Naif ort.met ΔCt= ΔΔCt)

Elde edilen nihai metilasyon sonucu iki sayısının üstel bir değeri olarak ifade edilmiştir.

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Grupların karşılaştırılmasında naif kontrole göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile elde edilen katlı değişim değerleri kullanılmıştır.

2.4.6 İstatistiksel Yöntemler

Çalışmadaki verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS istatistik 20.0 ve GraphPad Prism 5.03 programları (IBM Corp; GraphPad Software) kullanılmıştır. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği *Shapiro-Wilk* testi ile incelenmiştir. Davranış verilerinin gruplar arası karşılaştırılmasında Mann-Witney U testi, tüm kontrol ve deney gruplarının kendi aralarında çoklu karşılaştırılmasında *Kruskal Wallis* testi kullanılmıştır. Metilasyon derecelerinin karşılaştırılmasında verilerin dağılımlarına göre parametrik *Student's t* testi veya non-parametrik *Mann-Witney U* testi kullanılmıştır. Metilasyon verileri karşılaştırılırken p değeri $\leq 0,01$ olarak alınmıştır. Davranış verileri için $p<0,05$ değeri yeterli bulunmuştur.

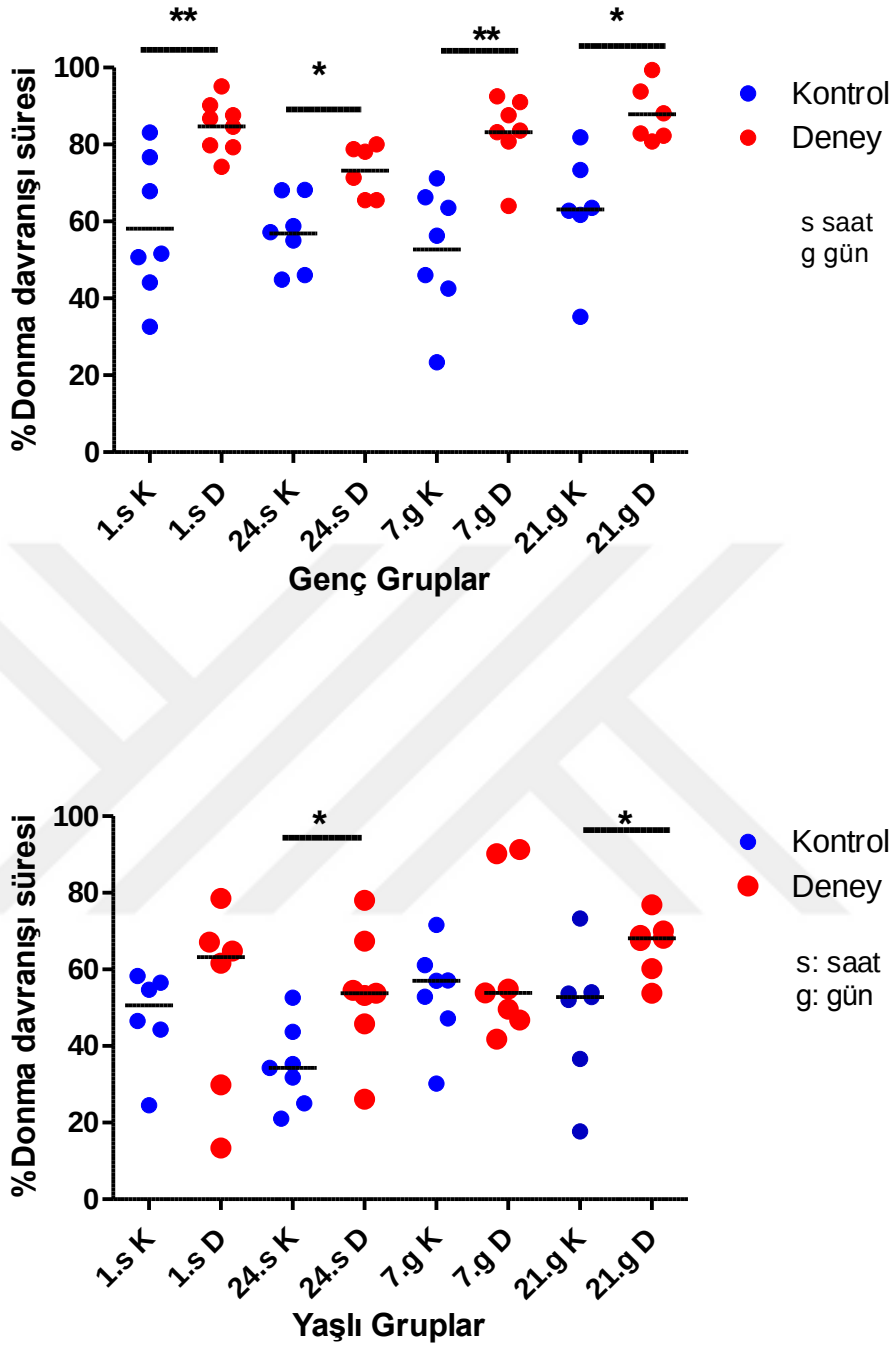
3. BULGULAR

3.1 Bağlamsal Korku Şartlanmasına İlişkin Bulgular

Genç ve yaşlı sıçanlarda bağlamsal korku şartlanması deneyi 4 farklı bellek oluşum zamanları sonrasında (1. saat, 24. saat, 7. gün ve 21. gün) % donma değerlerinin aritmetik ortalaması, medyan değerleri ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları Çizelge 3.1 de, % donma değerlerinin dağılım grafikleri Şekil 3.1 de sunulmuştur.

Verilerin analizine göre, genç sıçanların tüm bellek oluşum zamanlarında deney gruplarının % donma değerleri kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla; p=0,004; p=0,01; P=0,002; p=0,03). Bu durum genç sıçanların tüm bellek oluşum zamanlarında korku belleği oluşturduklarını göstermektedir. Tüm genç kontrol ve deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; p=0,73, p=0,056) (Çizelge 3.2).

Yaşlı sıçanların 24. saat ve 21. gün gruplarında deney grubu % donma değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla, p=0,01; p=0,02), 1. saat ve 7. günde bellek oluşum zamanlarında anlamlı fark gözlenmemiştir (sırasıyla; p=0,31; p=1,00). Bu verilere göre yaşlı sıçanlarda sadece 24. saat ve 21. gün bellek oluşum zamanlarında korku belleğinin oluşturulabildiği, 1. saat ve 7. gün gruplarında ise oluşturulamadığı anlaşılmaktadır. Tüm yaşlı kontrol ve deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; p=0,058, p=0,37) (Çizelge 3.2).



Şekil 3.1. Bağlamsal korku şartlanması sonrasında genç ve yaşlı sıçanların % donma değerlerinin dağılım grafikleri (* p<0,05; ** p<0,005).

Çizelge 3.1. Çalışmada yer alan sıçanların bağlamsal korku şartlanması sonrasında % donma verilerinin istatistiksel karşılaştırma sonuçları.

Yaş	Bellek Depolanma Zamanları	Gruplar	% Donma Ortalama	Standart Sapma ±	Medyan	Minimum Maksimum	p değeri U
3-4 aylık Genç	1. saat	Kontrol (n=7)	58,10	18,30	51,6	32,60 83,10	**0,004*** U= 52,00
		Deney (n=7)	84,70	6,70	85,7	74,20 95,10	
	24. saat	Kontrol (n=7)	56,89	9,33	57,2	44,90 68,10	**0,01*** U=38,00
		Deney (n=6)	73,22	6,68	78,1	65,50 80,00	
	7. gün	Kontrol (n=7)	52,74	16,65	51,15	23,40 71,20	**0,002*** U= 47,00
		Deney (n=7)	83,24	9,49	85,6	64,00 92,50	
	21. gün	Kontrol (n=6)	63,08	15,75	63,5	35,20 90,00	**0,03*** U=36,00
		Deney (n=7)	81,61	17,91	82,9	80,80 99,40	
19-20 aylık Yaşlı	1. saat	Kontrol (n=6)	47,47	12,57	50,6	24,50 58,30	0,31 U=25,00
		Deney (n=6)	52,55	25,15	63,2	13,40 78,50	
	24. saat	Kontrol (n=7)	34,81	10,74	34,8	21,00 52,60	**0,01*** U= 43,00
		Deney (n=7)	54,11	16,34	54,15	45,80 78,00	
	7. gün	Kontrol (n=7)	53,87	12,86	54,95	30,20 61,10	1,00 U=24,00
		Deney (n=7)	61,21	20,65	51,75	41,80 91,30	
	21. gün	Kontrol (n=7)	48,56	17,29	52,4	17,70 73,30	**0,02*** U= 42,00
		Deney (n=7)	66,49	7,42	68,5	53,80 76,90	

Mann Whitney U
* $p<0,05$

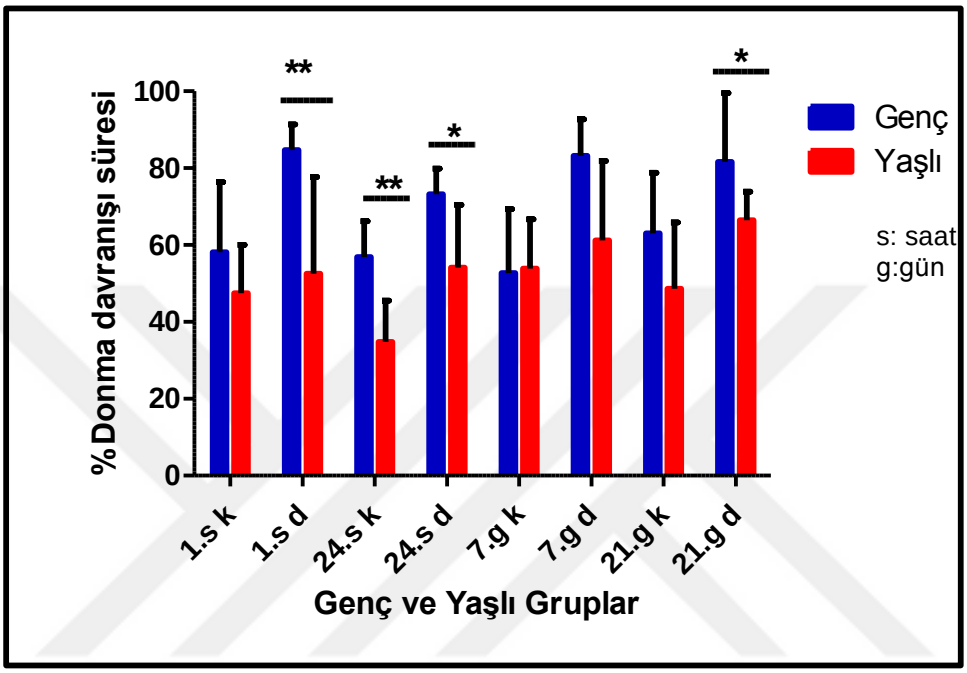
Çizelge 3.2. Genç ve yaşlı sıçanların % donma verilerinin kontrol gruplarının kendi aralarında ve deney gruplarının kendi aralarında istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Yaş	Gruplar	p değeri H	Yaş	Gruplar	p değeri H
Genç Kontrol	**1. saat (n=7)**	0,73 1.28	**Genç Deney**	**1. saat (n=7)**	0,056 7,54
	24. saat (n=7)			**24. saat (n=6)**	
	7. gün (n=7)			**7. gün (n=7)**	
	21. gün (n=6)			**21. gün (n=7)**	
Yaşlı Kontrol	**1. saat (n=6)**	0,058 7,47	**Yaşlı Deney**	**1. saat (n=6)**	0,37 3,13
	24. saat (n=7)			**24. saat (n=7)**	
	7. gün (n=7)			**7. gün (n=7)**	
	21. gün (n=7)			**21. gün (n=7)**	

Kruskal Wallis Testi
$p<0,05$

Genç ve yaşlı sıçanların % donma davranış verileri kontrol ve deney grupları kendi aralarında karşılaştırılmalı olarak Grafik 3.2 de sunulmuştur. Genç ve yaşlı sıçanların kontrol grupları arasında donma davranışları arasında sadece 24. saatte fark gözlenirken ($p=0,002$) diğer zamanlarda (1. saat, 7. gün ve 21. günde) fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p= 0,53$; $p= 0,90$; $p= 0,10$).

Genç ve yaşlı sıçanların deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise 1, 24. saat ve 21. gün bellek oluşum sürelerinde yaşlı sıçanların % donma değerlerinin anlamlı olarak düşük olduğu gözlenirken 7. gün grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla; p= 0,001; p= 0,02; p= 0,09; p= 0,02) (Çizelge3.3).



Şekil 3.2. Genç ve yaşlı sıçanların kontrol ve deney gruplarının % donma verilerinin karşılaştırmalı grafiği (* p<0,05; **p<0,005).

Çizelge 3.3. Genç ve yaşlı sıçanların kontrol ve deney gruplarının % donma verilerinin istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Bellek Depolanma Zamanları	Gruplar	% Donma Ortalama	Standart Sapma ±	Medyan	Minimum Maksimum	p değeri U
1. saat	Genç Kontrol (n=7)	58,1	18,3	51,6	32,60 83,10	0,53 U= 1,19
	Yaşlı Kontrol (n=6)	47,46	12,56	50,6	24,50 58,30	
	Genç Deney (n=7)	84,7	6,7	85,7	74,20 95,10	**0,001*** U= 1,00
	Yaşlı Deney (n=6)	52,55	25,15	63,2	13,40 78,50	
24. saat	Genç Kontrol (n=7)	56,88	9,33	57,2	44,90 68,10	**0,002*** U= 2,00
	Yaşlı Kontrol (n=7)	35,31	11,67	34,8	21,00 52,60	
	Genç Deney (n=6)	74,76	6,16	78,1	65,50 80,00	**0,02*** U= 5,00
	Yaşlı Deney (n=7)	58,78	11,71	54,15	45,80 78,00	
7. gün	Genç Kontrol (n=7)	50,95	17,48	51,15	23,40 71,20	0,90 U= 26,00
	Yaşlı Kontrol (n=7)	50,91	11,18	54,95	30,20 61,10	
	Genç Deney (n=7)	83,65	10,33	85,6	64,00 92,50	0,09 U= 11,00
	Yaşlı Deney (n=7)	62,26	22,41	51,75	41,80 91,30	
21. gün	Genç Kontrol (n=6)	66,92	17,61	63,5	35,20 90,00	0,10 U= 9,00
	Yaşlı Kontrol (N=7)	44,68	18,75	52,4	17,70 73,30	
	Genç Deney (N=7)	86,7	7,61	82,9	80,80 99,40	**0,02*** U= 7,00
	Yaşlı Deney (N=7)	66,31	8,11	68,5	53,80 76,90	

Mann Whitey U

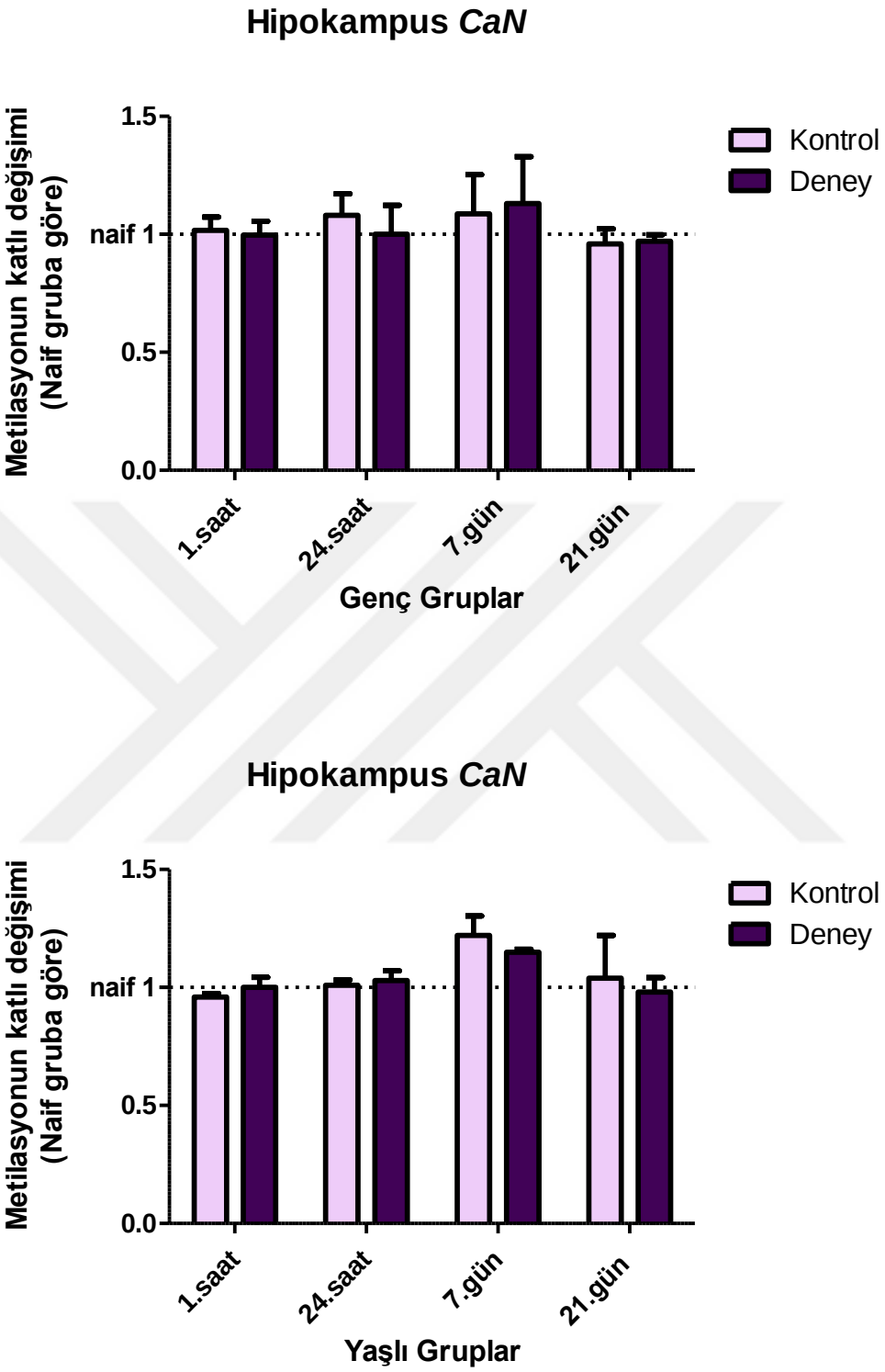
* $p<0,05$

3.2 DNA Metilasyon Analizine İlişkin Bulgular

3.2.1 Hipokampus Dokusunda *CaN* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları

Genç ve yaşlı sıçanlarımızın hipokampus dokusundaki *CaN* geninin promotor bölgesinin naif kontrole göre katlı değişim metilasyon verilerinin aritmetik ortalaması, medyan değerleri ve istatistiksel karşılaştırmaları Çizelge 3.4 de ve metilasyonun katlı değişim grafikleri Şekil 3.3 de sunulmuştur.

Elde edilen bulgulara göre, hem genç hem de yaşlı sıçanların hipokampus dokularında *CaN* geninin metilasyonunun katlı değişimi tüm bellek oluşum zamanlarında kontrol ve deney grupları arasında anlamlı olarak farklılaşmamıştır.



Şekil 3.3. Genç ve yaşlı sıçanların hipokampus dokusunda *CaN* gen metilasyonunun katlı değişim grafiği.

Çizelge 3.4. Genç ve yaşlı sıçanların hipokampus dokusunda *CaN* geninin promotor bölge katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Gen	Beyin Bölgesi	Yaş	Bellek Oluşum Zaman	Gruplar	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ Ortalama	Standart Sapma ±	Medyan	Minimum Maksimum	p değeri U/t
Kalsinörin (CaN)	Hipokampus	Genç	1. saat	Kontrol (n=6)	1,01	0,05	0,99	0,98 1,13	0,85[a] t= 0,19
				Deney (n=6)	1,01	0,06	1,01	0,94 1,08	
			24. saat	Kontrol (n=6)	1,08	0,08	1,08	0,97 1,18	0,19[a] t=1,38
				Deney (n=6)	1,00	0,09	1,02	0,90 1,13	
			7. gün	Kontrol (n=7)	1,08	0,16	1,07	0,91 1,28	0,94[b] U= 22,00
				Deney (n=6)	1,13	0,19	1,16	0,90 1,34	
			21. gün	Kontrol (n=6)	0,95	0,06	0,96	0,9 1,02	0,56[b] U= 17,50
				Deney (n=5)	0,97	0,02	0,96	0,95 1,02	
		Yaşlı	1. saat	Kontrol (n=6)	0,96	0,01	0,96	0,94 0,98	0,06[a] t=-2,20
				Deney (n=6)	1,00	0,03	1,00	0,95 1,04	
			24. saat	Kontrol (n=6)	1,01	0,02	1,03	0,99 1,03	0,32[b] U=24,00
				Deney (n=6)	1,03	0,04	1,05	0,98 1,07	
			7. gün	Kontrol (n=6)	1,21	0,07	1,23	1,13 1,23	0,33[b] U=12,00
				Deney (n=6)	1,15	0,01	1,15	1,14 1,18	
			21. gün	Kontrol (n=5)	1,03	0,18	0,94	0,91 1,34	0,61[a] t=0,52
				Deney (n=6)	0,98	0,06	0,99	0,91 1,05	

T-testi [a]

Mann Whitney U [b]

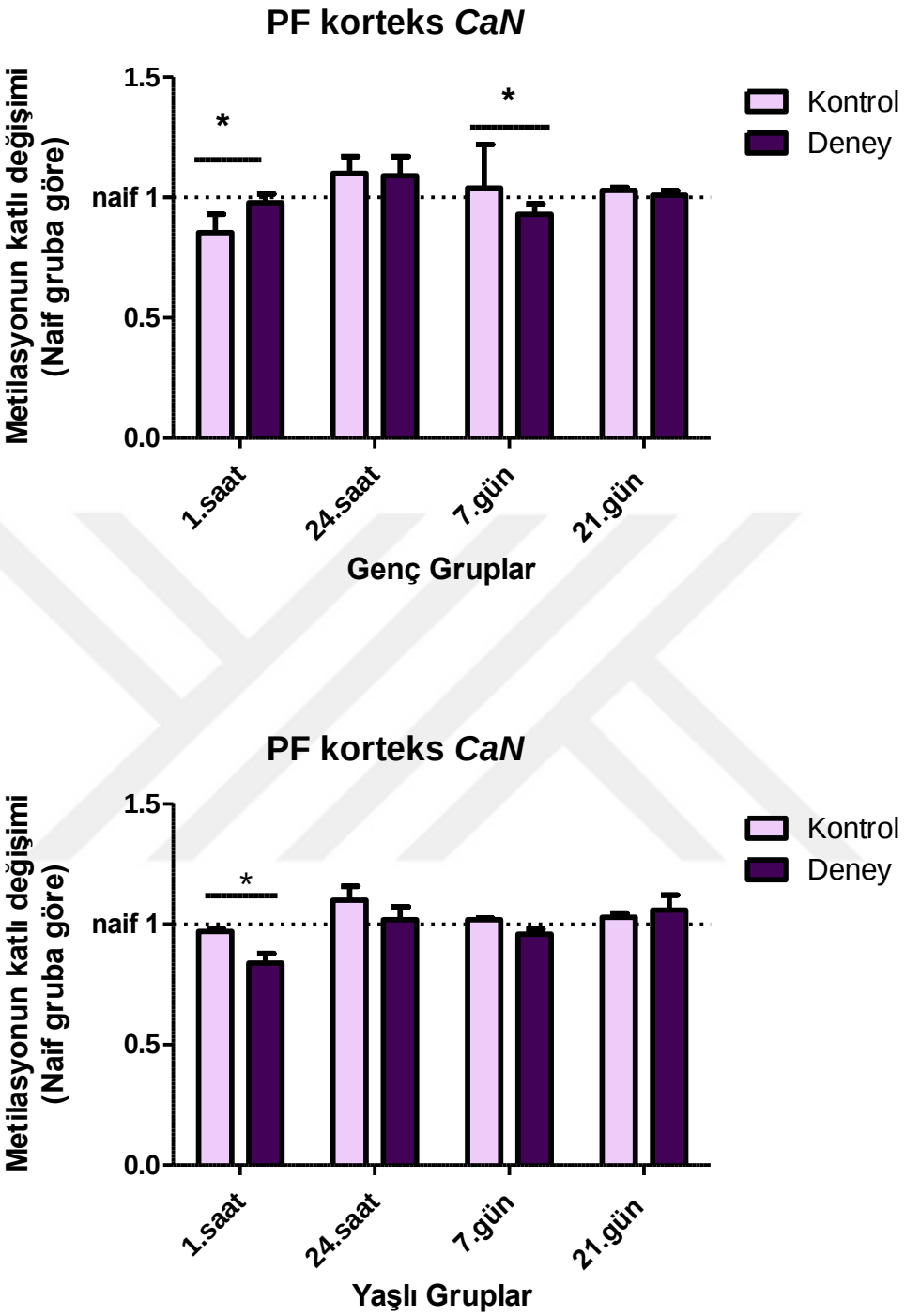
$p \leq 0,01$

3.2.2 Prefrontal Kortekste *CaN* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları

Genç ve yaşlı sıçanların prefrontal korteksinde *CaN* geninin promotor bölgesinin naif kontrole göre katlı değişim metilasyon verilerinin aritmetik ortalaması, medyan değerleri ve istatistiksel karşılaştırmaları Çizelge 3.5 de ve metilasyonun katlı değişim grafikleri Şekil 3.4 de sunulmuştur.

Elde edilen bulgulara göre, genç sıçanların prefrontal korteksinde *CaN* geninin promotor bölge metilasyonunun naif kontrole göre katlı değişiminde 1. saatte artış 7. günde azalış yönünde fark bulunurken diğer bellek oluşum zamanlarında kontrol ve deney grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Yaşlı sıçanların prefrontal korteks *CaN* geninin promotor bölge metilasyonunun naif kontrole göre katlı değişiminin 1. saat bellek oluşum zamanında deney grubunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulunurken 24. saat, 7. ve 21. gün bellek oluşum zaman gruplarında kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 3.4. Genç ve yaşlı sıçanların prefrontal korteksinde *CaN* gen metilasyonunun katlı değişim grafiği (* p≤0,01).

Çizelge 3.5. Genç ve yaşlı sıçanların prefrontal korteksinde *CaN* geninin promotor bölge katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Gen	Beyin Bölgesi	Yaş	Bellek Oluşum Zamanı	Gruplar	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ortalama	Standart Sapma ±	Medyan	Minimum Maksimum	p değeri U/t
Kalsinörin (*CaN*)	Prefrontal Korteks	Genç	1. saat	Kontrol (n=5)	0,85	0,07	0,84	0,74 0,96	**0,01**[b] U=23,00
				Deney (n=5)	0,97	0,03	0,98	0,94 1,01	
			24. saat	Kontrol (n=7)	1,10	0,07	1,15	1,0 1,16	0,76[a] t=0,30
				Deney (n=6)	1,09	0,08	1,14	0,97 1,19	
			7. gün	Kontrol (n=4)	1,21	0,21	1,04	1,02 1,20	**0,01**[a] t=3,08
				Deney (n=6)	0,93	0,04	1,03	0,88 0,98	
			21. gün	Kontrol (n=6)	1,03	0,01	1,03	1,02 1,05	0,02[a] t= 2,79
				Deney (n=7)	1,01	0,02	1,00	0,99 1,04	
		Yaşlı	1. saat	Kontrol (n=5)	0,97	0,01	0,98	0,95 1,00	**0,001**[a] t=5,71
				Deney (n=5)	0,84	0,04	0,83	0,81 0,93	
			24. saat	Kontrol (n=6)	1,09	0,05	1,07	1,05 1,17	0,04[a] U=8,00
				Deney (n=6)	1,02	0,05	1,00	0,97 1,09	
			7. gün	Kontrol (n=5)	1,01	0,005	1,01	1,01 1,02	0,03[b] U=6,00
				Deney (n=7)	0,96	0,02	0,95	0,94 1,02	
			21. gün	Kontrol (n=5)	1,03	0,01	1,03	1,02 1,05	0,41[a] t= -0,84
				Deney (n=7)	1,05	0,06	1,04	1,02 1,2	

T-testi [a]

Mann Whitney U [b]

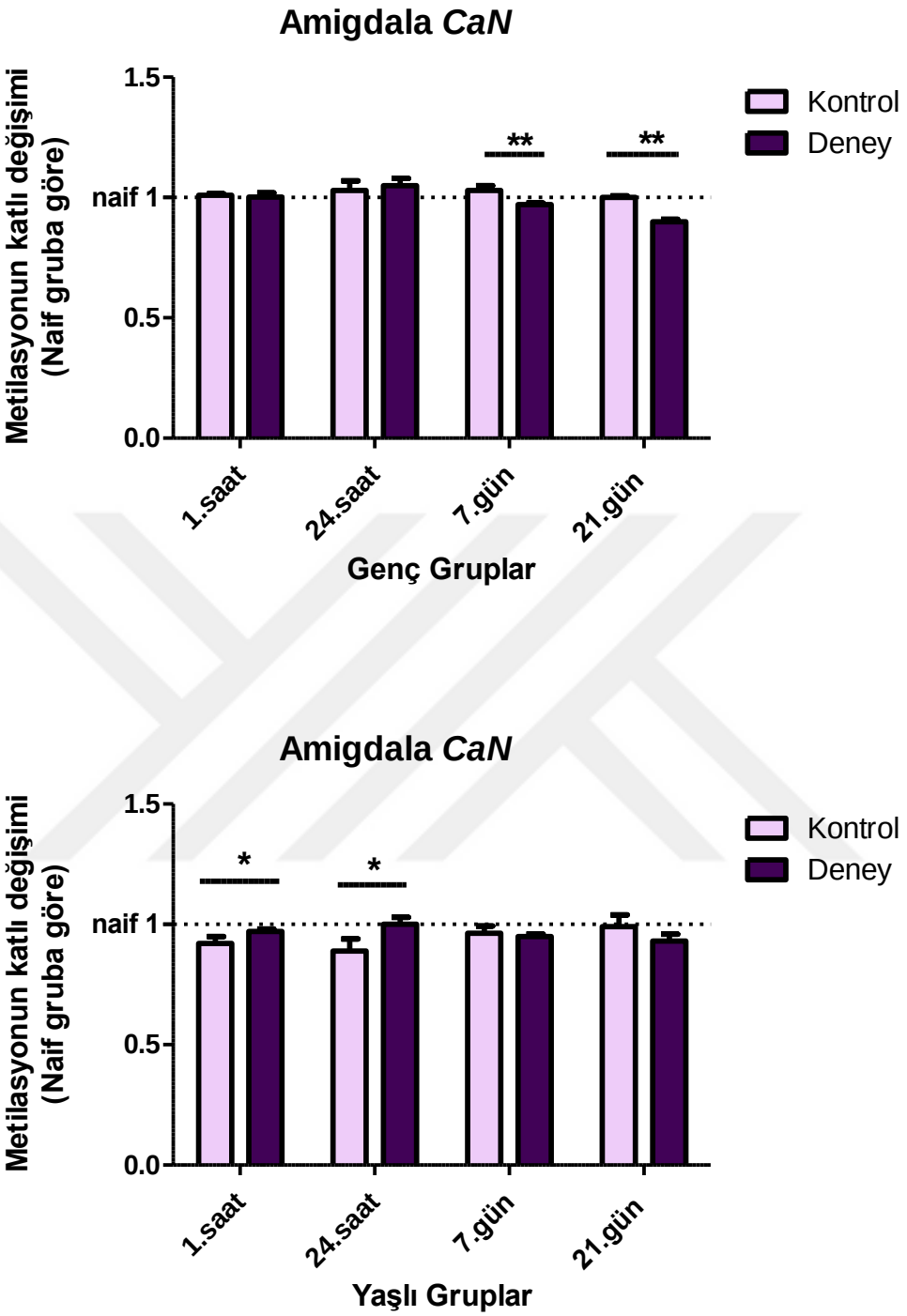
$p \leq 0,01$

3.2.3 Amigdala Dokusunda *CaN* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları

Genç ve yaşlı sıçanların amigdala dokusunda *CaN* geninin promotor bölgesinin naif kontrole göre katlı değişim metilasyon verilerinin aritmetik ortalaması, medyan değerleri ve istatistiksel karşılaştırmaları Çizelge 3.6 da ve metilasyonun katlı değişim grafikleri Şekil 3.5 de sunulmuştur.

Elde edilen bulgulara göre genç sıçanlarda amigdala dokusunda *CaN* geninin promotor bölge metilasyonunun 7. gün ve 21. gün bellek oluşum zamanlarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. 1. ve 24. saat bellek oluşum zaman noktalarında kontrol ve deney grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Yaşlı sıçanlarda ise, amigdala dokusunda *CaN* geninin promotor bölge metilasyonunun 1. ve 24. saat bellek oluşum zamanlarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı bulunurken 7. ve 21. gün bellek oluşum zaman noktalarında kontrol ve deney grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 3.5. Genç ve yaşlı sıçanların amigdala dokusunda *CaN* gen metilasyonunun katlı değişim grafiği (* p≤0,01;** p<0,001).

Çizelge 3.6. Genç ve yaşlı sıçanların amigdala dokusunda *CaN* geninin promotor bölge katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Gen	Beyin Bölgesi	Yaş	Bellek Oluşum Zamanı	Gruplar	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ortalama	Standart Sapma ±	Medyan	Minimum Maksimum	p değeri* t
Kalsinörin (*CaN*)	Amigdala	Genç	1. saat	Kontrol (n=6)	1,01	0,006	1,01	1,01 1,02	0,80 t= -0,25
				Deney (n=6)	1,01	0,01	1,01	0,99 1,02	
			24. saat	Kontrol (n=6)	1,03	0,04	1,03	0,99 1,08	0,65 t= -0,45
				Deney (n=6)	1,05	0,05	1,05	1,02 1,09	
			7. gün	Kontrol (n=6)	1,03	0,02	1,04	1,01 1,05	**0,0004** t= 5,14
				Deney (n=6)	0,97	0,007	0,97	0,97 0,99	
			21. gün	Kontrol (n=6)	1,00	0,007	1,00	1,00 1,02	**0,0001** t= 6,56
				Deney (n=5)	0,9	0,01	0,9	0,89 0,93	
		Yaşlı	1. saat	Kontrol (n=5)	0,92	0,02	0,91	0,90 0,96	**0,01** t= -3,17
				Deney (n=5)	0,97	0,01	0,97	0,96 1,00	
			24. saat	Kontrol (n=5)	0,89	0,05	0,88	0,84 0,95	**0,005** t= -3,86
				Deney (n=5)	1,00	0,03	1,00	0,96 1,04	
			7. gün	Kontrol (n=4)	0,96	0,03	0,97	0,93 0,98	0,45 t= 0,79
				Deney (n=4)	0,96	0,03	0,95	0,94 0,97	
			21. gün	Kontrol (n=5)	0,99	0,05	0,97	0,96 1,06	0,08 t= 1,93
				Deney (n=5)	0,93	0,03	0,92	0,90 0,97	

T-testi *

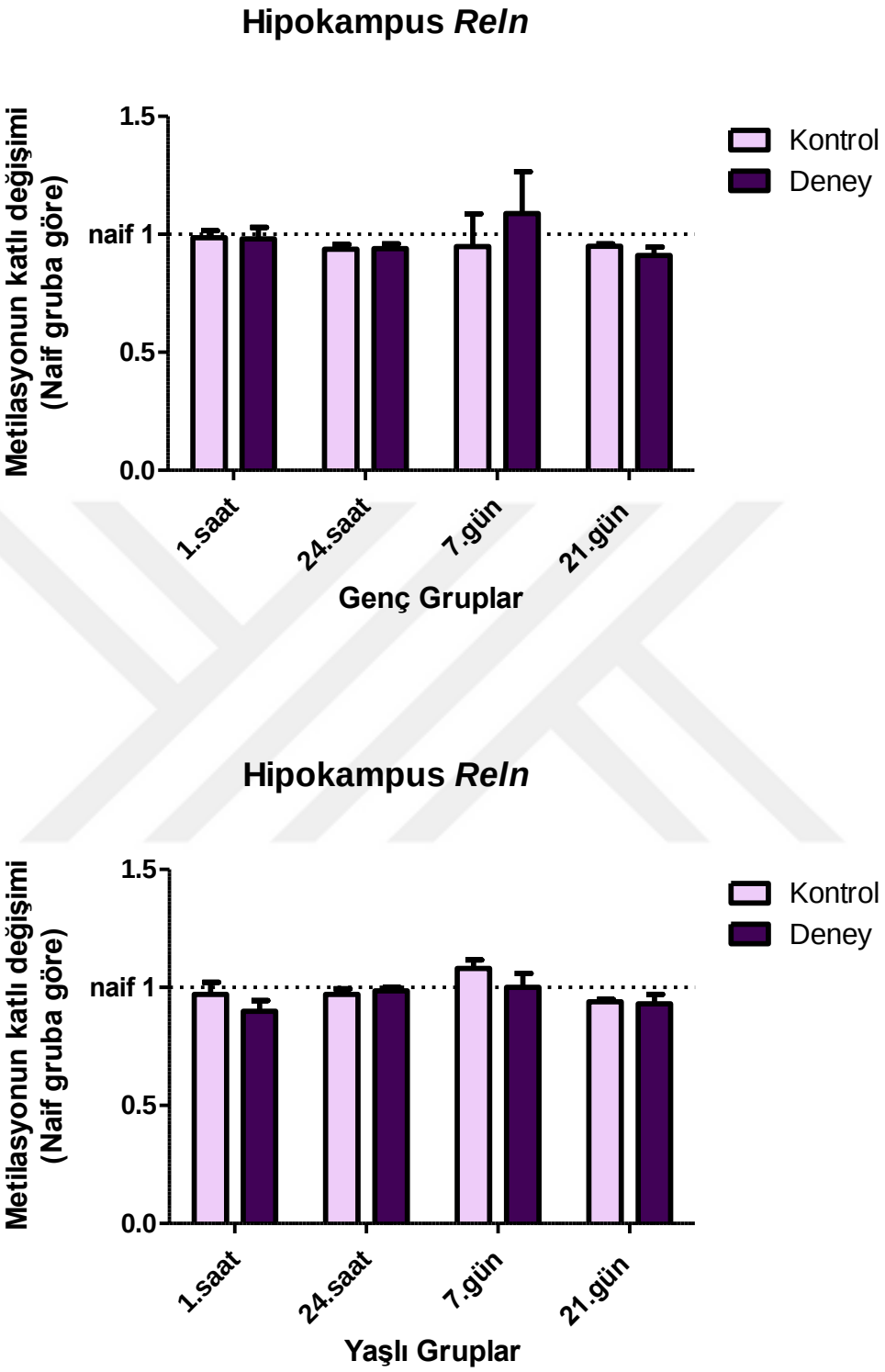
$p \leq 0,01$

3.2.4 Hipokampus Dokusunda *Reln* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları

Genç ve yaşlı sıçanların hipokampus dokusunda *Reln* geninin promotor bölgesinin naif kontrole göre katlı değişim metilasyon verilerinin aritmetik ortalaması, medyan değerleri ve istatistiksel karşılaştırmaları Çizelge 3.7 de ve metilasyonun katlı değişim grafikleri Şekil 3.6 da sunulmuştur.

Elde edilen bulgulara göre, genç sıçanların hipokampusünde *Reln* geninin promotor bölge metilasyonunda, tüm zaman noktalarında kontrol ve deney grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Yaşlı sıçanların hipokampusünde *Reln* geninin promotor bölge metilasyonu bellek oluşum zamanlarının hepsinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklılaşmamıştır.



Şekil 3.6. Genç ve yaşlı sıçanların hipokampus dokusunda *Reln* gen metilasyonunun katlı değişim grafiği.

Çizelge 3.7. Genç ve yaşlı sıçanların hipokampus dokusunda *Reln* geninin promotor bölgesinin katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Gen	Beyin Bölgesi	Yaş	Bellek Oluşum Zamanı	Gruplar	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ortalama	Standart Sapma ±	Medyan	Minimum Maksimum	p değeri U/t
Reelin (*Reln*)	Hipokampus	Genç	1. saat	Kontrol (n=6)	0,98	0,03	0,98	0,95 1,03	0,85[a] t= 0,18
				Deney (n=6)	0,98	0,05	0,96	0,92 1,06	
			24. saat	Kontrol (n=5)	0,93	0,02	0,94	0,90 0,95	0,92[b] U=14,00
				Deney (n=6)	0,94	0,02	0,94	0,92 0,98	
			7. gün	Kontrol (n=6)	0,99	0,11	1,04	0,95 1,09	0,16[a] t= 0,54
				Deney (n=6)	1,11	0,15	1,12	0,86 1,28	
			21. gün	Kontrol (n=6)	0,95	0,01	0,96	0,93 0,97	0,03[a] t=2,42
				Deney (n=5)	0,91	0,03	0,92	0,85 0,96	
		Yaşlı	1. saat	Kontrol (n=6)	0,96	0,05	0,96	0,91 1,04	0,04[a] t=-2,26
				Deney (n=6)	0,90	0,04	0,91	0,85 0,96	
			24. saat	Kontrol (n=6)	0,97	0,02	0,98	0,94 0,99	0,40[a] t=-0,86
				Deney (n=6)	0,98	0,01	0,99	0,96 0,99	
			7. gün	Kontrol (n=4)	1,08	0,03	1,08	1,05 1,11	0,08[a] t=1,97
				Deney (n=6)	1,00	0,06	1,00	0,92 1,08	
			21. gün	Kontrol (n=7)	0,94	0,01	0,95	0,93 0,97	0,49[a] t=0,72
				Deney (n=7)	0,93	0,04	0,92	0,92 1,02	

T-testi [a]

Mann Whitney U [b]

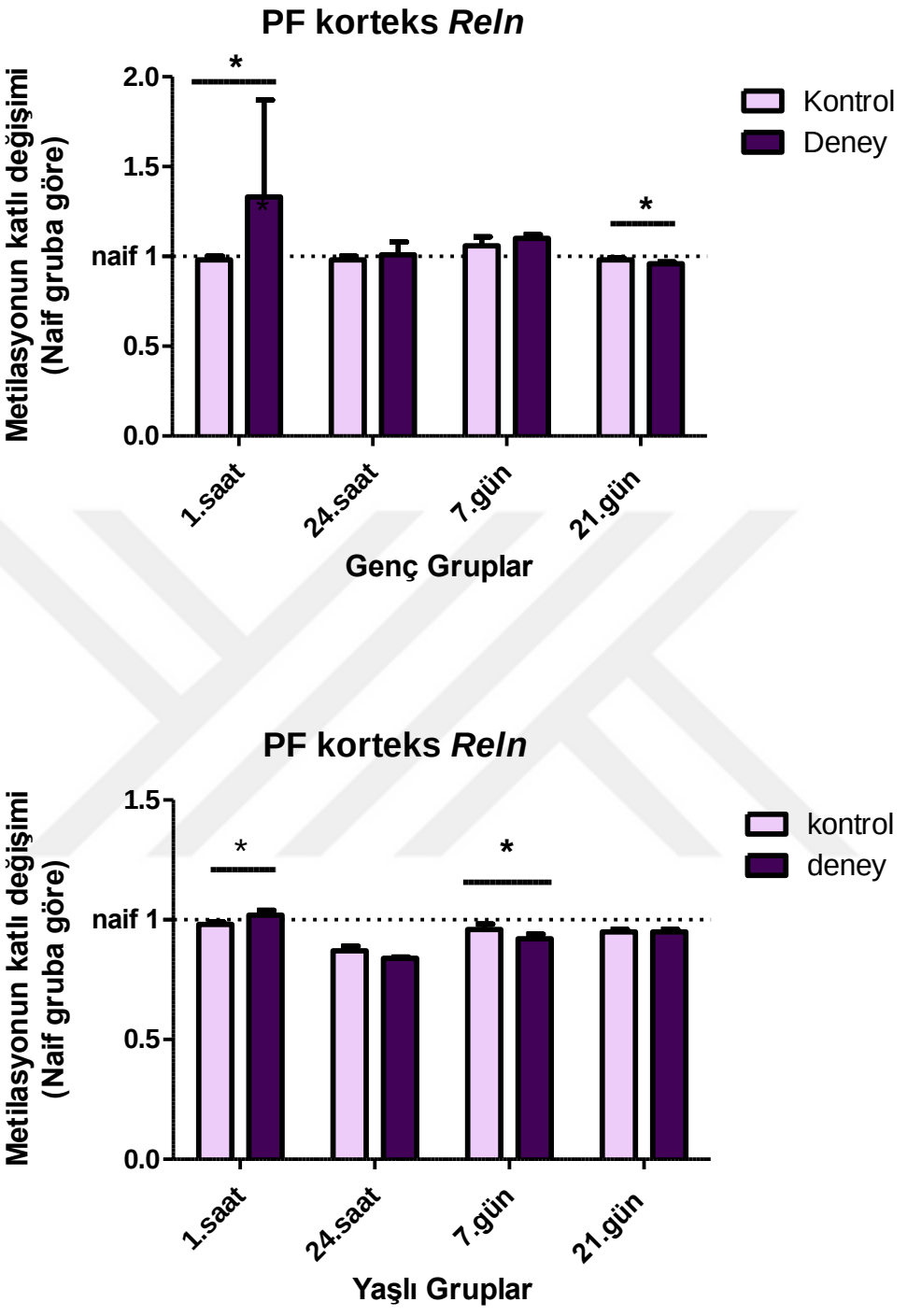
$p \leq 0,01$

3.2.5 Prefrontal Kortekste *Reln* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları

Genç ve yaşlı sıçanların prefrontal korteksinde *Reln* geninin promotor bölgesinin naif kontrole göre katlı değişim metilasyon verilerinin aritmetik ortalaması, medyan değerleri ve istatistiksel karşılaştırmaları Çizelge 3.8 de ve metilasyonun katlı değişim grafikleri Şekil 3.7 da sunulmuştur.

Elde edilen bulgulara göre, genç sıçanların prefrontal korteksinde *Reln* geninin promotor bölge metilasyonu 1. saat bellek oluşum zamanında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış, 21. günde ise azalmıştır. Diğer zaman dilimlerinde kontrol ve deney grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Yaşlı sıçanların prefrontal korteksinde ise, *Reln* geninin promotor bölgesinin metilasyonu 1. saat bellek oluşum anında artarken, 7. günde anlamlı olarak azalmıştır. 24. saat ve 21. gün bellek oluşum zamanlarında ise anlamlı fark gözlenmemiştir. Yaşlı sıçanların metilasyon oranları bakımından anlamlı fark oluşan gruplarında korku belleğinin oluşturulamadığı vurgulanmalıdır.



Şekil 3.7. Genç ve yaşlı sıçanların prefrontal korteksinde *Reln* gen metilasyonunun katlı değişim grafiği (* p≤0,01).

Çizelge 3.8. Genç ve yaşlı sıçanların prefrontal korteksinde *Reln* geninin promotor bölge katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Gen	Beyin Bölgesi	Yaş	Bellek Oluşum Zamanı	Gruplar	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ Ortalama	Standart Sapma ±	Medyan	Minimum Maksimum	p değeri U/t
Reelin (*Reln*)	Prefrontal Korteks	Genç	1. saat	Kontrol (n=5)	0,99	0,03	0,98	0,96 1,01	**0,004** [b] U=29,50
				Deney (n=6)	1,30	0,49	1,09	1,04 2,30	
			24. saat	Kontrol (n=7)	0,98	0,04	0,98	0,95 1,00	0,54[a] t= -0,62
				Deney (n=6)	1,00	0,06	0,98	0,94 1,14	
			7. gün	Kontrol (n=6)	1,04	0,02	1,08	1,00 1,11	0,20[a] t=-1,46
				Deney (n=6)	1,09	0,08	1,08	1,08 1,13	
			21. gün	Kontrol (n=6)	0,98	0,01	0,98	0,97 0,99	**0,01**[a] t= 2,93
				Deney (n=7)	0,96	0,01	0,96	0,94 0,98	
		Yaşlı	1. saat	Kontrol (n=5)	0,98	0,01	0,98	0,97 1,01	**0,009** [a] t=-3,33
				Deney (n=6)	1,02	0,01	1,02	1,00 1,05	
			24. saat	Kontrol (n=6)	0,87	0,03	0,88	0,84 0,91	0,24[b] U=10,00
				Deney (n=6)	0,84	0,005	0,85	0,84 0,85	
			7. gün	Kontrol (n=5)	0,96	0,02	0,96	0,93 0,98	**0,006** [a] t= 3,56
				Deney (n=6)	0,92	0,01	0,92	0,90 0,94	
			21. gün	Kontrol (n=6)	0,96	0,02	0,95	0,94 0,96	1[b] U= 20,50
				Deney (n=7)	0,95	0,03	0,96	0,94 0,97	

T-testi [a]

Mann Whitney U [b]

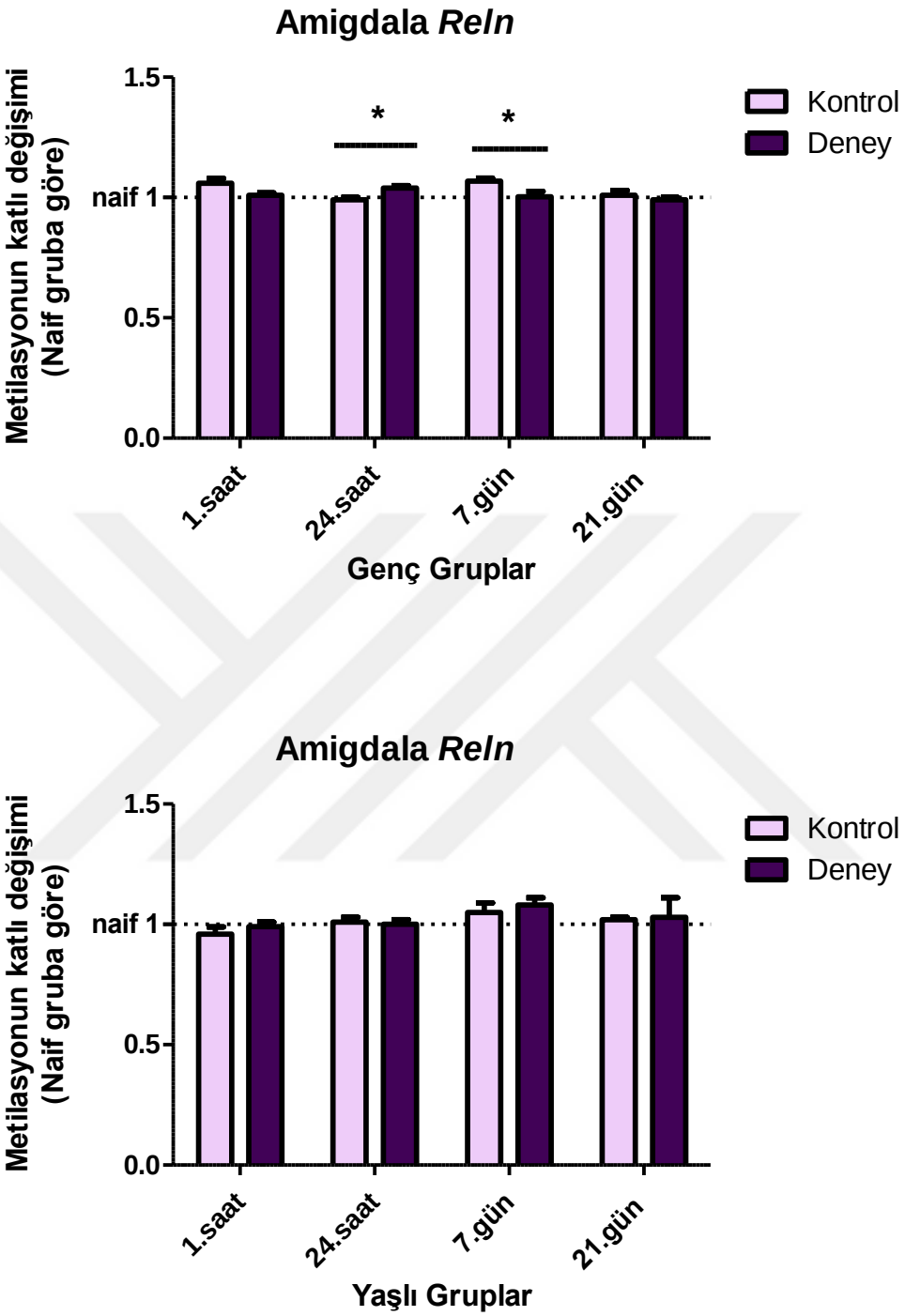
$p \leq 0,01$

3.2.6 Amigdala Dokusunda *Reln* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları

Genç ve yaşlı sıçanların amigdala dokularında *Reln* geninin promotor bölgesinin katlı değişim metilasyon verilerinin aritmetik ortalaması, medyan değerleri ve istatistiksel karşılaştırmaları Çizelge 3.9 da ve naif kontrole göre metilasyonun katlı değişim grafikleri Şekil 3.8 de sunulmuştur.

Elde edilen bulgulara göre, genç sıçanların amigdala dokularında *Reln* geninin promotor bölge metilasyonu 24. saat bellek oluşum anında anlamlı olarak artarken 7. gün bellek oluşum zamanında anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Genç sıçanların 1. saat ve 21. gün bellek oluşum zamanlarında kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı fark gözlenmemiştir.

Yaşlı sıçanların amigdala dokularında *Reln* geninin promotor bölge metilasyonu bellek oluşum zamanlarının tümünde kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklılaşmamıştır.



Şekil 3.8. Genç ve yaşlı sıçanların amigdala dokusunda *Reln* geninin metilasyonunun katlı değişim grafiği (* p≤0,01).

Çizelge 3.9. Genç ve yaşlı sıçanların amigdala dokusunda *Reln* geninin promotor bölge katlı değişim metilasyonunun istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Gen	Beyin Bölgesi	Yaş	Bellek Oluşum Zamanı	Gruplar	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ortalama	Standart Sapma ±	Medyan	Minimum Maksimum	p değeri t
Reelin (*Reln*)	Amigdala	Genç	1. saat	Kontrol (n=6)	1,06	0,02	1,06	1,03 1,08	0,02 t= 2,55
				Deney (n=6)	1,01	0,01	1,00	1,00 1,03	
			24. saat	Kontrol (n=6)	0,99	0,01	0,99	0,99 1,01	**0,002** t= -4,29
				Deney (n=6)	1,04	0,01	1,05	1,02 1,05	
			7. gün	Kontrol (n=6)	1,06	0,01	1,05	1,06 1,08	**0,0001** t= 6,31
				Deney (n=6)	1,00	0,03	0,98	0,98 1,05	
			21. gün	Kontrol (n=6)	1,01	0,03	1,00	1,00 1,04	0,14 t= 1,62
				Deney (n=5)	0,99	0,03	1,00	0,98 1,02	
		Yaşlı	1. saat	Kontrol (n=4)	0,96	0,03	0,96	0,94 1,00	0,76 t= -0,26
				Deney (n=5)	0,99	0,01	0,99	0,96 1,01	
			24. saat	Kontrol (n=4)	1,01	0,02	1,02	0,98 1,03	0,31 t= 1,08
				Deney (n=5)	1,00	0,02	1,01	0,98 1,02	
			7. gün	Kontrol (n=4)	1,05	0,04	1,03	1,02 1,10	0,32 t= -1,06
				Deney (n=4)	1,08	0,03	1,06	1,06 1,12	
			21. gün	Kontrol (n=5)	1,02	0,01	1,02	1,02 1,05	0,73 t= -0,35
				Deney (n=4)	1,03	0,08	1,01	0,96 1,14	

T-testi
$p \leq 0,01$

3.2.7 *Egr1/Zif268* Geninin Promotor Bölgesinin Metilasyon Bulguları

Egr1 primer çiftleri için optimizasyon sağlanmış ve MeDIP analizinden elde ettiğimiz DNA'lar kullanılarak pozitif kontrol genimiz *H19* ile kontrolleri yapılmış olmasına rağmen, bu genin metilasyonunun değerlendirilmesinde tüm beyin bölgelerinden ve tüm bellek oluşum zamanları için alınan kontrol ve deney grupları örneklerinde RT-PCR analizi sonrasında sinyal elde edilememiştir. Bununla birlikte genç ve yaşlı naif sıçanların tüm beyin bölgelerinden *Egr1* geni için RT-PCR sinyalleri alınmıştır. Bu durum *Egr1* genindeki metilasyonunun hem kontrol hem de deney gruplarında naif gruba göre çok düşük olduğuna işaret edebilir. Durumun ilgili genin ekspresyonuna bakılarak doğrulanması gerekmektedir. Diğer bazı çalışmalarda da *Egr1* geninin promotor bölge metilasyonunun naif gruba göre azaldığı gösterilmiştir (Miller ve ark., 2010; Penner ve ark., 2016).

4.TARTIŞMA

Çalışmamızın amacı, genç ve yaşlı sıçanların korku belleği ağı içinde yer alan ve uzun süreli belleğin konsolidasyonundan sorumlu hipokampus, uzun süreli belleğin depolandığı yer olarak düşünülen prefrontal korteks ve korku belleği süreçlerinin düzenlenmesinde yer alan amigdala bölgelerinde, 1. saatte (kısa süreli bellek) 24. saatte, 7. ve 21. günlerde (uzun süreli bellek), belleğin oluşması ve depolanmasında yer aldığı öne sürülen *CaN, Reln* ve *Egr1* genlerinin promotor bölgesindeki DNA metilasyonu değişimlerinin incelenmesi olarak belirlenmiştir.

Çalışmada; aynı zamanda üretimi yapılan genç (3-4 ay; n=63) ve yaşlı (19-20 ay; n=60) olmak üzere toplam 123 adet erkek *Sprague Dawley* sıçan kullanılmıştır.

Korku belleğini değerlendirmek için, bağlamsal korku şartlanması protokolü uygulanmıştır. Bellek oluşumu, bağlamsal korku şartlanmasını takiben farklı zaman noktalarında (1. saat, 24. saat, 7. gün, 21. gün) değerlendirilmiştir. Dört farklı zaman noktası, 1. saat korku öğrenildiği ve kısa süreli bellek oluştuğu için, 24. saat kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe konsolidasyonunu ifade ettiğinden, 7. ve 21. günler ise uzun süreli belleğin sürdürülmesi durumundaki zamansal değişimi gösterdiğinden dolayı seçilmiştir.

Korku belleğinin oluşması, sıçanların daha önce maruz kaldıkları zararlı uyaran (elektrik uyarısı-koşulsuz uyaran) ile bu uyarana maruz kalmış oldukları ortamı (bağlam-koşullu uyaran) ilişkilendirmeleri ve bu ilişki durumunu hatırladıklarını ortaya koyan donma davranışının gösterilmesi oranı üzerinden değerlendirilmiştir. Korku şartlanması için elektrik uyarısı verilen deney grubu ile elektrik uyarısı verilmeyen kontrol grubunun kabin içinde kaldıkları 5 dk'lık sürede gösterdikleri donma davranışı yüzdelerine bakılarak korku belleğinin oluşup oluşmadığına karar verilmiştir.

Belleğin depolanmasını açıklama yaklaşımı olarak korku belleğinin nöronal ağlarında yer alan beyin bölgelerinde (hip**o**kampus, prefrontal korteks ve amigdala) meydana gelen moleküler değişikliklerden biri olarak ifade edilen DNA metilasyonu değerlendirilmiştir.

DNA metilasyonu ölçümü için, metilasyona bağımlı immünoprespitasyon tekniği olan MeDIP analizi kullanılmıştır. Bu analizle belleğin oluşmasında rol oynadığı düşünülen *CaN, Reln* ve *Egr1* genlerinin promotor bölgelerindeki DNA metilasyonu analiz edilmiştir. Metilasyon artışı, ilgili genin ifadesinin baskılandığı, metilasyon azalması ise ilgili genin ifadesinin arttığı şeklinde yorumlanmıştır.

4.1 Korku Belleği Oluşumuna İlişkin Bulguların Tartışılması

Öğrenme ve bellek çalışmalarında yer alan mekanizmaları aydınlatmanın bir yolu asosiyatif öğrenme süreçlerini incelemektir. Bağlamsal korku şartlanması korku belleğini oluşturmak için kullanılan asosiyatif öğrenme paradigmalarından biridir. Tehlike karşısında model organizmalar yanıt olarak ‘‘donma davranışı’’ sergilemektedir. Tehlike devam ettikçe donma davranışının süresi arttığından dolayı, bu davranış öğrenme ve bellek oluşumunun bir endeksi olarak kullanılmaktadır.

Literatürdeki çalışmalarda, deney hayvanının türü, deney düzeneği, uyaranın şiddeti, süresi ve tekrarının donma davranışının süresini etkilediği belirtilmektedir (McGaugh, 2006; Curzon ve ark., 2009).

Bu çalışmada sıçanlara bağlamsal korku şartlanması protokolü uygulanmıştır. Genç sıçanların yer aldığı deneylerde tüm zaman noktalarında donma davranışı yüzdesi kontrol gruplarından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Deney grubunda yer alan genç sıçanların korku belleği oluşturdukları kabul edilmiştir. Kontrol ve deney gruplarının dört farklı zaman noktasında göstermiş oldukları donma davranışı kendi içlerinde

karşılaştırıldıklarında bir fark gözlenmemiştir. Bu durum kontrol ve deney gruplarında yer alan sıçanların motor hareketlilik bakımından birbirlerine benzer olduklarını ifade etmektedir.

Yaşlı sıçanlarda da kontrol ve deney grupları 4 farklı zaman noktasında kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında donma davranışı yönünden bir fark gözlenmemiştir (Sırasıyla; kontrol grubu 47,47±12,57; 34,81±10,74; 53,87±12,86; 48,56±17,29. deney grubu; 52,55±25,15; 54,11±16,34; 61,21±20,65; 66,49±7,42). Ancak yaşlı sıçanların 24. saat ve 21. gün deney grupları kontrollerinden anlamlı olarak % donma davranışı süresi arttığı 1. saat ve 7. gün deney gruplarında yer alan yaşlı sıçanların kontrollere göre % donma davranışı süresinde fark göstermediği görülmüştür. 1. saat ve 7. günde yaşlı kontrol ve deney grupları arasında donma davranışı yüzdesinde fark meydana gelmediğinden bu deney gruplarında korku belleğinin oluşmadığı kabul edilmiştir.

Yaşlanma ile bellekte görülen değişikliklerin geniş bireysel farklılıklar sergilediği, bununla birlikte en çok çalışma belleği ve anısal bellekte bozulma meydana geldiği bilinmektedir. Bu nedenle 1. saat grubunda görülen kısa süreli korku belleğinin oluşmamasının nedeninin yaşlanmaya bağlı etkilerden olabileceğini düşünmekteyiz. Yaşlı 7. gün deney grubunda yer alan sıçanların üçünde katarakt geliştiği belirlenmiştir. Bu durum, görsel duyu girdilerindeki bozulmaya bağlı olarak 7. gün grubunda korku belleğinin oluşmamasının nedeni olarak düşünülmektedir.

Houston ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, korku şartlanması sonrasında duyusal (duyu ve ağrı eşiği testi) ve motor aktivite yönünden genç ve yaşlı sıçanlar arasında fark olmadığı gösterilmiştir (Houston ve ark., 1999). Yaş gruplarında donma davranışının incelendiği çalışmalarda ve bağlamsal korku şartlanması sonrasında yaşlanmaya bağlı olarak donma davranışının daha az olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni hakkında bir açıklama bulunmamaktadır (Moyer ve Brown, 2006).

Bağlamsal korku şartlanması sonrasında donma davranışındaki beklenen artışın olmamasının hipokampus bağlantılı bir bozulmayı ifade ettiği (Phillips ve LeDoux, 1992) ve hipokampus lezyonu sonrasında görülen hiperaktivitenin donma davranışını etkilediği fikri ortaya atılmıştır (Good ve Haney, 1997; McNish ve ark., 1997). Fakat Anagnostaras 1999 yılındaki çalışmasında hipokampal lezyonların korku koşullanması üzerindeki amnezik etkilerini, gözlemlenen korku seviyelerine göre basitçe tahmin edilemeyeceğini ifade etmiştir (Anagnostaras ve ark., 1999). Vazdarjanova ve McGaugh (1998) çalışmalarında amigdala BLA lezyonunun lokomotor aktiviteyi arttırdığını buna bağlı olarak sıçanlarda korku şartlanması sonrasında donma davranışının azaldığını fakat öğrenmenin etkilenmediğini göstermişlerdir (Vazdarjanova ve McGaugh, 1998). Yaşlanma ile birlikte görülen donma ifadesindeki azalmanın nedeni kesin olarak açıklanamamaktadır.

Bu çalışmada yaşlı kontrol grupları arasında donma davranışı bakımından zamana bağlı fark bulunmazken, genç ve yaşlı sıçanların donma davranışı ifadeleri karşılaştırıldığında, kontrol gruplarında yaşlı sıçanların donma yüzdelerinde genel bir azalma dikkat çekmekle birlikte, bu azalmanın sadece 24. saatte genç kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. Ancak, bu yaşlı deney grubunda bellek oluşturulabilmiştir.

Korku şartlanması uygulanan yaşlı deney grupları arasında donma davranışı yönünden bir fark bulunmazken, yaşlı sıçanların donma davranışı yüzdelerinin 1. saatte, 24. saatte ve 21. günde genç gruba göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Mevcut çalışma yaşlı deney gruplarının donma yüzdelerinde görülen anlamlı azalmanın nedenini açıklayamamaktadır. Yaşlanma ile gelişebilecek olası motor aktivite değişiklikleri büyük olasılıkla, kullandığımız paradigmadaki performansı etkileyebilecek parametrelerden biri değildir.

Çalışmada uygulanan bağlamsal korku şartlanması modelinin, yaşlanma ile ilgili değişikliklere hassas olduğu, şartlanma grubunun donma davranışının yaşlılıkla azalma eğilimi yönünde değişebileceği öne sürülebilir.

4.2 Genç Sıçanların *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonlarına İlişkin Bulguların Tartışılması

Çizelge 4.1: Genç sıçanlarda *CaN* ve *Reln* genlerinin DNA metilasyon değişimleri ➪ ⇧ ⇩ (sırasıyla; değişmedi, arttı veya azaldı).

Genç Gruplar				
Kalsinörin				
	1.saat	**24.saat**	**7.gün**	**21.gün**
Hipokampus	➪	➪	➪	➪
Prefrontal Korteks	⇧	➪	⇩	➪
Amigdala	➪	➪	⇩	⇩
Reelin				
	1.saat	**24.saat**	**7.gün**	**21.gün**
Hipokampus	➪	➪	➪	➪
Prefrontal Korteks	⇧	➪	➪	⇩
Amigdala	➪	⇧	⇩	➪

4.2.1 Genç Sıçanların Hipokampus Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması

Mevcut çalışmada, uzun süreli belleğin konsolidasyonunun olduğu bilinen hipokampus bölgesinde *CaN* ve *Reln* genlerinin DNA metilasyonu incelenmiş ve *CaN* ve *Reln* metilasyonunda tüm zaman noktalarında bir değişim gözlenmememiştir.

Literatürde bellek ve DNA metilasyonu ile bağlantılı olarak hipokampuste *CaN* metilasyon değişikliklerini gösteren bir çalışmaya rastlanmazken, *Reln* geninin metilasyonuna ilişkin çalışmalara bakıldığında, bağlamsal korku şartlanması sonrasında *pp1* metilasyonunun arttığı, *Reln* geninin demetile olduğu görülmektedir. Çalışmanın devamında DNMT inhibitörü uygulanmasıyla hipokampus bölgesinde *Reln* demetilasyonu artarken, *pp1* metilasyonunu engellendiği ve bu değişiklerin kısa süreli (ilk 24 saatte) olduğu gösterilmiştir

(Miller ve ark., 2007; Morris ve Monteggia, 2014). Çalışmacılar, DNMT inhibitörü infüzyonu sonrasında elde edilen bulgulara dayanarak hipokampusun CA1 bölgesindeki DNA metilasyon değişikliklerinin belleğin konsolidasyonunda yer alabileceğini ifade etmişlerdir (Miller ve ark., 2007).

Hipokampus bölgesinde bellek ve DNA metilasyonunu spesifik genlerde değil de genom boyu bir yaklaşımla inceleyen Halder ve ark., (2016) yaptıkları çalışmada CA1 bölgesinde 1. saatte metilasyon değişiklikleri olduğunu göstermişler ve bu değişikliklerin kısa süreli olduğu ifade etmişlerdir (Halder ve ark., 2016).

Bu bilgiler ışığında mevcut çalışmada elde edilen bulgular, hipokampus bölgesinde korku belleğinin oluşmasında *CaN* ve *Reln* metilasyonuna ilişkin bir düzenleme olmayabileceğini düşündürmektedir.

Hipokampus bölgesinde bağlamsal korku şartlanması sonrasında bağlam bilgisinin oluştuğu düşünülmektedir. *CaN* metilasyonunda kontrol ve deney grupları arasında fark gösterilememesinin nedenlerinden biri kontrol ve deney grupları arasında bağlam bilgisi yönünden fark olmaması olabilir. Bir diğer neden ise çalışmanın hipokampusün tümünde yapılmış bir analizi içermesinden dolayı CA1 bölgesine özgü bir değişikliğin sonuçlara yansımamış olması olasılığıdır. Hipokampus alt bölgelerinde (CA1 ve dentat girus) genlerin metilasyon desenlerinin farklı olabileceği gösterilmiştir (Penner ve ark., 2011; Penner ve ark., 2016).

4.2.2 Genç Sıçanların Prefrontal Korteks Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması

Mevcut çalışmanın bulguları, bağlamsal korku şartlanması sonrasında prefrontal kortekste (mPF bölgesini de içeren genişlikte olmak üzere) literatürde

benzer çalışmaların bulguları ile zamansal değişimler dikkate alınarak aşağıda karşılaştırılmıştır:

1. saat incelendiğinde mevcut çalışmada *Reln* ve *CaN* genlerinin metilasyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Miller ve ark. (2010) tarafından ACC'de *Reln* metilasyonunun 1. saatte arttığı gösterilirken *CaN* metilasyonunda böyle bir artış bulunmamıştır.

24. saatte mevcut çalışmada *CaN* ve *Reln* metilasyon değişikliği bulunmazken, Miller ve ark. (2010) tarafından ACC'de *CaN* ve *Reln* genlerinin DNA metilasyonunun artış yönünde değiştiğini göstermişlerdir.

7. günde mevcut çalışmada *CaN* geninin DNA metilasyonu azalırken, *Reln* geninin DNA metilasyonunun değişmediği gözlenmiş, Miller ve ark. (2010) tarafından ise *CaN* ve *Reln* metilasyonunun yüksek olduğunu bulunmuştur.

Mevcut çalışma 21. günde *CaN* metilasyonunda değişiklik göstermezken *Reln* geninin DNA metilasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Literatürde 21. günde yapılmış bir çalışma bulunmazken, Miller ve ark. (2010) dmPF (ACC ve prelimbik alanlar) kortekste korku şartlanması sonrasında 30. günde *CaN* gen metilasyonunda artışın devam ettiğini *Reln* metilasyonunda korku şartlanması sonrasında 30. günde değişmediğini bulmuşlar ve bu bulgularını *CaN* için mRNA ve protein seviyesinde azalmayla, *Reln* için de mRNA seviyesinde fark gözlenmemesi ile desteklemişlerdir (Miller ve ark., 2010; Sweatt, 2016).

Miller ve ark. (2010) *CaN* metilasyonundaki artışın ACC'de 24. saatten başlayarak 7. güne kadar devam ettiğini ve ayrıca dmPF kortekste 30. günde *CaN* metilasyonunun yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bu duruma bağlı olarak araştırmacılar, *CaN* geninin metilasyonundaki artış ile uzun süreli belleğin depolanmasının mümkün olabileceğini ifade etmişlerdir.

DNA metilasyon çalışmalarına ek olarak bellek ve *CaN* arasındaki ilişkiyi gösteren literatüre bakıldığında, rodentlerde *CaN* geninin bellek üzerinde güçlü bir kısıtlama oluşturduğu ve sessizleşmesi durumunda belleğin saklanmasının arttığı ve bellek oluşma eşiğinin düştüğü (Malleret ve ark., 2001; Genoux ve

ark., 2003; Koshibu ve ark., 2009) görülmektedir. Transgenik farelerde prefrontal kortekste *CaN* gen ifadesindeki artışla uzaysal belleğin bozulduğu da gösterilmiştir (Mansuy ve ark., 1998a). Sinaptik plastisitede ve bellekte kalsinörinin rolü hala tam olarak belli olmamakla birlikte, uzun süreli belleğin oluşmasında *CaN* gen ifadesindeki azalmanın önemli olduğu ifade edilmektedir.

Reelin hakkında genel düşünce, gen ifadesindeki azalmanın bilişsel bozulmalar ile bağlantılı olduğu şeklindedir. mPF kortekste *Reln knockdown* farelerde uzaysal çalışma belleğinin bozulduğu gösterilmiştir (Brosda ve ark., 2011). *Reln* ve DNA metilasyonu ile ilişkili olarak sadece Miller ve ark. (2010) nın çalışmaları bulunmaktadır. Araştırmacılar iki farklı bölgede çalışmışlar ve ACC'de 1. saatte *Reln* metilasyonunun arttığını bu artışın zamanla 7. güne kadar azalma göstermekle birlikte devam ettiğini ve dmPF kortekste ise 30. günde ortadan kalktığını göstermişlerdir.

Prefrontal kortekste *CaN* metilasyonu hakkındaki genel beklenti 24. saatten sonra, uzun süreli bellek süresince, *CaN* metilasyonundaki artışın devam etmesi yönündedir. Mevcut çalışmada *CaN* metilasyonundaki artışın sadece kısa süreli bellekte görülmesi, uzun süreli bellekte ise *CaN* metilasyonunun azalması ilginçtir. Kısa süreli korku belleğinin 1. saatinde bulunan *CaN* metilasyonundaki artış ve uzun süreli korku belleğinin 7. gününde *CaN* metilasyonunun azalması genel beklentilerle ve literatürle uyumlu değildir. Bununla birlikte 7. gündeki *CaN* metilasyonunda görülen azalma sıçanların korku belleği oluşmasını etkilememiştir. Bu durum *CaN* metilasyonundaki artışın uzun süreli korku belleğinin prefrontal kortekste depolanması için gerekli olmayabileceğini düşündürmektedir.

Mevcut çalışmadan elde edilen 1. saatteki *Reln* metilasyonundaki artış Miller ve ark. (2010)'nın bulguları ile uyumlu olmakla birlikte, genel beklentinin tersi yönde olmuştur. Miller ve ark. (2010) 30. günde *Reln* metilasyonunda fark bulmazken, mevcut çalışmada 21. günde *Reln* metilasyonunun azalma yönünde değiştiği görülmüştür.

Mevcut çalışmada prefrontal kortekste elde edilen 1. saatteki *CaN* ve *Reln* metilasyonundaki artış bu genlerin kısa süreli korku belleğinin oluşmasında yer alabileceğini düşündürmektedir. Prefrontal korteks bölgesinde *CaN* ve *Reln* metilasyonunun azalma yönündeki zamansal değişikliklerin uzun süreli korku belleğinin depolanmasını etkilemediği görülmüştür. Korku belleğinin oluşması ve depolanmasında bu genlerin metilasyonundaki değişikliğin artma ya da azalma yönünde zamansal olarak değişebileceği ve bu durumun korku belleğinin depolanması için mutlak bir gereklilikten çok, hücre içinde bir düzenlemeye (homeostazis) yönelik olabileceği ileri sürülebilir.

4.2.3 Genç Sıçanların Amigdala Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması

Korku duygusu ile ilişkili olan amigdala bölgesinde mevcut çalışmada, *CaN* metilasyonunun 7. ve 21. günlerde azaldığı, *Reln* metilasyonunun ise 24. saatte belirgin olarak arttığı, 7. günde ise azaldığı görülmektedir.

Amigdalaya DNMT inhibitörü infüzyonu ile işitsel korku şartlanması sonrasında kısa süreli bellek etkilenmezken uzun süreli belleğin etkilendiği gösterilmiştir (Monsey ve ark., 2011; Maddox ve ark., 2014). Ayrıca Maddox ve ark. (2014) DNMT inhibisyonu sonrasında oluşan DNA metilasyon değişikliklerinin korku belleğinin konsolidasyon ve rekonsolidasyonunda önemli rol oynadığını bulmuşlardır (Maddox ve ark., 2014). Amigdala bölgesinde kalsinörinin korku belleğinin oluşmasına ve silinmesine katkısı olduğu da gösterilmiştir (Lin ve ark., 2003b). Literatürde amigdala bölgesinde *CaN ve Reln* genlerini DNA metilasyonu ve bellek açısından değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanmadı.

Mevcut çalışma bağlamsal korku şartlanması sonrasında amigdala bölgesinde *CaN* ve *Reln* genlerinin metilasyonunu inceleyen ilk çalışmadır.

Literatürdeki verilerin yetersizliğine rağmen bu çalışmada elde edilen amigdala bölgesinde 7. ve 21. günlerdeki *CaN* metilasyonundaki azalma bulgusu, beklentinin tersi yönde olmuş ve *CaN* ifadesindeki olası artışın uzun süreli belleğin oluşmasını bozmayabileceği şeklinde yorumlanmıştır. *Reln* metilasyonundaki artma uzun süreli korku belleğinin oluşması (24. saat) ve azalma uzun süreli belleğin (7. gün) sürdürülmesinde zamansal boyutta zıt yönlü değişiklikler gösterebileceğini de göstermektedir. Bu durum *Reln* metilasyonundaki değişimlerin bellek oluşumuyla sistematik olarak etkileşmeyebileceğini düşündürmektedir.

4.2.4 Genç sıçanların *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Genel Olarak Tartışılması

CaN metilasyonu, prefrontal korteks ve amigdala bölgelerinde uzun süreli bellek zamanlarında azalma, prefrontal kortekste ise kısa süreli bellek zamanlarında artış yönünde değişim göstermektedir.

Reln metilasyonunun, korku belleğinin konsolidasyonunda amigdala bölgesinde birbirlerine zıt yönde (sırasıyla; azalma, artma) değiştiği ayrıca prefrontal kortekste kısa süreli bellek oluşmasında arttığı, prefrontal korteks ve amigdalada ise uzun süreli bellek döneminde azalma yönünde değiştiği görülmüştür.

Korku belleğinin oluşması ve depolanmasında *CaN* ve *Reln* metilasyonunun zamansal ve uzaysal olarak değiştiği görülmektedir.

4.3 Yaşlı sıçanların *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması

Yaşlı sıçanların 1. saat ve 7. gün deney gruplarındaki donma davranışının kontrollere göre anlamlı farklılaşma göstermemesinden dolayı, bu gruplarda

bellek oluşmadığı kabul edilmiştir. Yaşlı sıçanlar arasında 24. saat ve 21. gün bellek oluşumu olan ve 1. saat ve 7. gün bellek oluşumu olmayanlar olarak ikiye ayrılmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2: Yaşlı sıçanlarda *CaN* ve *Reln* genlerinin DNA metilasyon değişimleri ➡ ⬆ ⬇ (sırasıyla; değişmedi, arttı ve azaldı) (Bellek oluşumu olan alan; Bellek oluşumu olmayan alan).

Yaşlı Gruplar				
Kalsinörin				
	1.saat	**24.saat**	**7.gün**	**21.gün**
Hipokampus	➡	➡	➡	➡
Prefrontal Korteks	⬇	➡	➡	➡
Amigdala	⬆	⬆	➡	➡
Reelin				
	1.saat	**24.saat**	**7.gün**	**21.gün**
Hipokampus	➡	➡	➡	➡
Prefrontal Korteks	⬆	➡	⬇	➡
Amigdala	➡	➡	➡	➡

4.3.1 Yaşlı Sıçanların Hipokampus Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması

Literatürde, yaşlı sıçanlarda korku belleğinin oluşmasına bağlı olarak *CaN* ve *Reln* DNA metilasyonunu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.Yaşlanma ile birlikte beyinde genel olarak DNA metilasyonunun arttığı ayrıca CA1 bölgesinde spesifik genlerin (*Gabra5, Hspa5 ve Syn)* yaşlanma ile DNA metilasyonlarının arttığı gösterilmiştir (Haberman ve ark., 2011).

Yaşlı sıçanların hipokampus bölgesinde korku belleği oluşan ve oluşmayan zaman noktalarında *CaN* ve *Reln* metilasyonunda herhangi bir değişiklik gösterilmemiştir.

4.3.2 Yaşlı Sıçanların Prefontal Korteks Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması

Bellek oluşan olan 24. saat ve 21. gün gruplarında;

CaN ve *Reln* genlerinin metilasyonunda herhangi bir değişiklik görülmemiştir.

Bellek oluşmayan 1. saat ve 7. gün gruplarında ise;

1. saatte *CaN* geninin metilasyonu azalırken, *Reln* metilasyonunun arttığı görülmüştür. *CaN* metilasyonundaki artışın bellek oluşması için gerekli olduğu düşünüldüğünde, *CaN* metilasyonunda saptanan bu azalma korku belleğinin oluşmaması için bir gerekçe olabilir.

7. günde *CaN* metilasyonunda değişiklik görülmezken *Reln* metilasyonunda azalma bulunmuştur.

Reln metilasyonundaki azalmanın belleğin depolanması için tek başına yeterli olmayabileceği ileri sürülebilir.

4.3.3 Yaşlı sıçanların Amigdala Bölgesindeki *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması

Bellek oluşan 24. saat ve 21. gün gruplarında;

CaN metilasyonu 24. saatte artarken, *Reln* metilasyonunda herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

Bellek oluşmayan 1. saat ve 7. gün gruplarında;

Sadece 1. saatte *CaN* metilasyonunda artış görülürken, her iki zaman noktasında *Reln* geninin DNA metilasyonunda herhangi bir farklılık görülmemiştir.

1. saatte *CaN* metilasyonundaki artışının korku belleğinin oluşmasını sağlamadığı görülmektedir. Bu durum *CaN* metilasyonunun bellek oluşumu üzerine olan etkilerinin nöroanatomik bölgelere göre değişiklik gösterebileceğini düşündürmektedir.

4.3.4 Yaşlı sıçanların *CaN* ve *Reln* Genlerinin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Genel Olarak Tartışılması

Yaşlı sıçanların korku belleğinin oluştuğu ve oluşmadığı grupları, bulguları farklı bir şekilde yorumlamamıza olanak tanımaktadır.

Bellek oluşumu olan grupları (24. saat ve 21. gün) incelendiğinde genç sıçanlarda görülen değişikliklerin hiçbirisinin yaşlı sıçanlarda saptanmaması dikkat çekicidir. Yaşlanan beynin mekanizmalarının değişmesi ile bağlantılı olarak bellek oluşumunda da *CaN* ve *Reln* metilasyon düzenlemelerinin fark gösterdiği düşünülmektedir.

Bellek oluşmayan gruplar (1. saat ve 7. gün) incelendiğinde ise, *CaN* metilasyonundaki 1. saatte prefrontal korteksteki azalma korku belleğinin oluşmamasının nedeni olduğu düşünülebilir. Bu durum *CaN* sessizleşmesinin bellek oluşumunu etkilediği düşüncesi ile uyumludur.

Yaşlı sıçanların prefrontal korteks ve amigdala bölgelerinde 1. saatte elde edilen *CaN* metilasyon bulgusu birbirine zıttır. Amigdala bölgesinde 1. saatte görülen *CaN* metilasyonundaki artışının belleğin oluşmasını sağlamadığı görülmektedir. Bu durum 1. saatteki *CaN* metilasyonundaki artışın oluşturduğu etkinin bölgelere göre de değiştiğini göstermektedir. Korku belleğinin oluşması için prefrontal kortekste meydana gelen *CaN* metilasyon değişikliklerinin daha

belirleyici olduğu, amigdala bölgesinde oluşan *CaN* metilasyonundaki artışın ise yeterli olmadığı görülmektedir.

Stranahan ve ark. (2011) bellek oluşumu olmayan yaşlı sıçanlarda lateral entorinal kortekste *Reln* ifadesinin azaldığını fakat medial entorinal kortekste değişmediğini göstermişlerdir (Stranahan ve ark., 2011). Mevcut çalışmada, prefrontal kortekste bellek oluşmayan gruplarda *Reln* metilasyonunun zamansal olarak fark gösterdiği (1. saatte artma, 7. günde azalma) görülmektedir.

Reln metilasyonunda da zamansal ve uzaysal olarak değişim görülmekle birlikte korku belleğinin oluşması ya da depolanması için gerekli olduğu bağlamında bir sonuç elde edilememiştir.

Literatürde reelinle ilgili araştırmalar, daha çok gelişim döneminde veya yaşlanmaya bağlı bilişsel bozulmalar ile ilişkili hastalıklara odaklanmıştır. Genel yargı, bölgesel farklılıklar göstermekle birlikte, sorunlu olan bölgede DNA metilasyonunun arttığı ve *Reln* ifadesinin azaldığı yönündedir.

4.4 *Egr1* Geninin Promotor Bölge DNA Metilasyonuna İlişkin Bulguların Tartışılması

Mevcut çalışmada, genç ve yaşlı sıçanların naif gruplarının IP DNA örneklerinden RT-PCR sonucunda Ct değerleri elde edilirken, kontrol ve deney gruplarının IP DNA örneklerinin RT-PCR analizinde floresan sinyalleri ölçülememiştir. Bu durum hipokampus, prefrontal korteks ve amigdala bölgelerinde davranış deneyi sonrasında uyarılan nöronal aktivite ile *Egr1* ifadesinin arttığını ve bununla paralel olarak gen metilasyonunun aşırı derece azaldığını düşündürmektedir.

Egr1 promotor bölgesinin primer optimizasyonu çalışmalarında sorunlar yaşanmış ve 3 kez *Egr1* promotor bölgesi için primer dizayn edilmiştir. Üçüncü *Egr1* promotor bölge primerinde optimizasyon sağlanmıştır. Naif grubun *Egr1* RT-PCR analizinde diğer genlerin primerlerine nispeten zayıf floresan sinyali

elde edilmiştir. Kontrol ve deney gruplarında nöronal aktivasyon ile *Egr1* metilasyonundaki azalma floresan sinyalinin iyice zayıflamasına ve ölçüm için gerekli eşik değere ulaşamamasına neden olmuş olabilir.

Egr1 DNA metilasyonunun, korku şartlanması sonrası naif kontrole göre hem kontrol hem de deney gruplarında dmPF kortekste 1. ve 24. saatte, 7. günde azaldığı gösterilmiştir (Miller ve ark., 2010).

Penner ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada, hipokampusun CA1 ve dentat girus kısımlarında *Egr1* DNA metilasyonunu incelemiş ve dentat girusta *Egr1* gen metilasyonunun yaşlanma ile azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca davranış deneyi uygulananlar ile uygulanmayanlar arasında *Egr1* gen metilasyonu karşılaştırılmış ve davranış deneyi uygulanan grupta metilasyonun anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Penner ve ark., 2016).

Başka bir çalışmada, ise ödülle öğrenmede ventral tegmental alanda, *Egr1* geninin metilasyonunun azaldığı gen ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Day ve ark., 2013).

Egr1, LTP ile ilişkili olarak ve belirli öğrenme deneyimlerinden sonra davranış ile ilgili beyin bölgelerinde hızla uyarılmaktadır. *Egr1*'in nöronal aktiviteye bağımlı uzun süreli sinaptik plastisite ve bellek oluşumunda yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri artıran geç yanıt genlerinin transkripsiyonunu düzenlemede önemli olduğu düşünülmektedir (Davis ve ark., 2003; Knapska ve Kaczmarek, 2004).

Eğer beynin genel olarak uyarılması ile *Egr1* geninin ifadesinin arttığı yorumumuz doğru ise, bu artışın spesifik olarak bellek oluşum sürecinden daha çok non-spesifik nöronal aktivasyonla ilgili olabileceği öne sürülebilir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçların doğrulanması için gen ifadesi analizi ile desteklenmesi gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde bellek oluşumu ve depolanmasında yer alan genlere özel DNA metilasyon bilgisi yetersizdir. Mevcut çalışma, bağlamsal korku şartlanması sonrasında prefrontal kortekste *CaN* ve *Reln* promotor bölge metilasyon değişikliğini gösteren ikinci çalışmadır. Ayrıca korku belleği ağında (hipokampus, prefrontal korteks ve amigdala) ve yaşlanmaya bağlı olarak *CaN* ve *Reln* promotor bölge değişimini gösteren ilk çalışmadır. Kısa ve uzun süreli belleğin oluşumunda hücre içinde birçok fonksiyonel değişiklikler olmaktadır. Bellek oluşumunun tüm aşamalarında DNA metilasyonunun hücre içinde nasıl bir düzenleme yaptığı bilinmemektedir.

Bu çalışma kısa ve uzun süreli korku belleğinin oluşması ve sürdürülmesinde spesifik olarak (*CaN* ve *Reln*) promotor bölge DNA metilasyon değişikliklerini, korku belleği ağı içinde genel olarak ortaya koymuştur.

Bulgularımız, hipokampus bölgesinde korku belleğinin oluşmasında *CaN* ve *Reln* metilasyonuna ilişkin bir düzenleme olmayabileceğine işaret edebilir.

Prefrontal kortekste elde edilen 1. saatteki *CaN* ve *Reln* metilasyonundaki artış bu genlerin kısa süreli korku belleğinin oluşmasında yer alabileceğini düşündürmektedir. Yaşlı sıçanlarda prefrontal kortekste *CaN* metilasyonundaki azalmanın kısa süreli korku belleğin oluşmasını engelleyebileceği öne sürülebilir.

Prefrontal korteks bölgesinde *CaN* ve *Reln* metilasyonunun azalma yönündeki zamansal farklılaşmaların uzun süreli korku belleğinin depolanmasını etkilemediği görülmüştür.

Amigdala bölgesinde *CaN* metilasyonundaki azalma bulgusu bu değişimin belleği bozmayabileceği şeklinde yorumlanmıştır. *Reln* metilasyonundaki değişimlerin bellek oluşumuyla sistematik olarak etkileşmeyebileceğini düşündürmektedir.

Korku belleğinin oluşması için prefrontal kortekste meydana gelen *CaN* metilasyon değişikliklerinin daha belirleyici olduğu, amigdala bölgesinde oluşan *CaN* metilasyonundaki artışın ise yeterli olmadığı görülmektedir.

Sweatt (2016) yazdığı incelemesinde DNA metilasyonunun, hücre içindeki fonksiyonel durumu kontrol eden ve nöronal homeostatik stabiliteyi sağlayan bir mekanizma olabileceğini öne sürmektedir (Sweatt, 2016).

Korku belleğinin oluşması ve depolanmasında bu genlerin metilasyonundaki değişimin artma ya da azalma yönünde zamansal olarak değişebileceği ve bu durumun korku belleğinin depolanması için mutlak bir gereklilikten çok, hücre içinde bir düzenlemeye (homeostazis) yönelik olabileceği ileri sürülebilir.

MeDIP analizi optimizasyon aşamaları sağlandıktan sonra, çok sayıda dokudaki spesifik genlerin promotor bölge DNA metilasyon bilgisine uygun imkanlarla ulaşılabilmesi açısından önemli bir analiz yöntemidir. Mevcut çalışmada spesifik genlerin promotor bölge DNA metilasyonunun belirlenmesinde kullanılan MeDIP analizi çok sayıda dokunun incelenmesine olanak sağlamıştır.

DNA metilasyon analiz yöntemini seçerken çalışmanın amacına yönelik olmasına ve laboratuvar imkanlarına dikkat edilmelidir. Bu analiz yöntemini seçmemizin en önemli nedeni çok sayıdaki örnekte *CaN* ve *Reln* promotor bölge DNA metilasyon değişimini görebilmekti ve bu sonuca ulaşıldı. Fakat bu çalışmada görüldü ki bellek oluşumunda zamansal olarak DNA metilasyonu çok hızlı değişiklikler göstermekte ve naif kontrole göre DNA metilasyonunu belirlemek ve deney grubunu kontrole göre ‘‘arttı ya da azaldı’’ şeklinde ifade etmek yetersiz kalmaktadır. Üstelik çok küçük değişiklikler ile artma ya da azalma meydana gelmektedir.

Çalışma gruplarında yer alan sıçan sayısı en az 6 olarak tutulmakla birlikte MeDIP RT-PCR analizi sonucunda bazı verilerin kullanılamamasından dolayı örnek sayısı bazı gruplarda 4’e düşmüştür ki bu da istatistiksel analiz yöntemlerinin sınırlarını zorlamaktadır.

Mevcut çalışma korku bellek ağında (hipokampus, prefrontal korteks ve amigdala) DNA metilasyon değişikliklerinin ortaya konulması açısından önemlidir. Bölgesel olarak değişimin görülmesi DNA metilasyon düzenlemelerinin nöron gruplarına göre değişebileceğini düşündürmektedir. Korku bellek ağını belirlerken hipokampus yerine daha spesifik olarak CA1, prefontal korteks yerine ACC ya da amigdala yerine BLA nükleusunun alınmasının sonuçları etkileyeceğini düşünmekteyiz.

Çalışmada kullanılan 4 farklı zaman noktasında çalışılması yerine, 1. saat ve 21. gün noktalarının seçilmesi ve grup içi örnek sayısının artırılması önerilebilir.

Ayrıca gelecekte belleğin oluşması ve depolanmasında transkripsiyonel düzenlemeyi daha net anlayabilmek için DNA metilasyonu ile histon asetilasyonunu birlikte gösteren alan çalışmalarının yapılması konunun daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacaktır. Mevcut çalışmada elde edilen *CaN* ve *Reln* metilasyon değişikliklerinin gen ifadelerine bakılarak doğrulanması gerekmektedir.

Mevcut çalışmada beyinde uzun süreli korku belleğinin nasıl depolandığını anlayabilmek için spesifik genlerde (*CaN* ve *Reln*) promotor bölge DNA metilasyonu düzenlemesi genel hatları ile incelenmiştir. Uzun süreli belleğin depolanmasında DNA metilasyonu değişimlerinin net olarak anlaşılması için tek bir çalışma yeterli değildir. Bir dizi çalışmaya ihtiyaç vardır.

ÖZET

Genç ve Yaşlı Sıçanlarda Bellek Oluşumu ve Depolanmasının, Zaman Bağımlı Olarak Beynin Farklı Bölgelerinde DNA Metilasyonu Yönünden İncelenmesi.

Bilginin depolamasına aracılık eden nöronal devrelerdeki sinaptik etkinliğin nükleusta gen transkripsiyonunu ile düzenlendiği bilinmektedir. Belleğin nasıl depolandığını anlayabilmek için son çalışmalar, nükleusta gen transkripsiyonunu düzenleyen mekanizmalardan biri olan DNA metilasyonuna yönelmiştir.

Çalışmada, korku belleğinin oluşumu ve sürdürülmesi sırasında, genç ve yaşlı sıçan beyninin hipokampus, prefrontal korteks, amigdala bölgelerinde, *CaN, Reln* ve *Egr1* genlerin promotor bölgesinde farklı zaman noktalarındaki (1. saatte, 24. saatte, 7. ve 21. günde) DNA metilasyon değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 3-4 aylık 63 adet ve 19-20 aylık 63 adet olmak üzere 126 adet *Sprague-Dawley* erkek sıçanda bağlamsal korku şartlanması modeli kullanılmıştır. Beynin hipokampus, prefrontal korteks ve amigdala bölgeleri izole edilmiştir. Bu nöroanatomik bölgelerde *CaN, Reln* ve *Egr1* genlerinin promotor bölgesindeki DNA metilasyonu değişimleri MeDIP RT-PCR analiz yöntemi ile incelenmiştir. Donma davranışı verilerine göre, genç sıçanlarda tüm zaman noktalarında korku belleği oluştuğu görülmüştür. DNA metilasyon verileri, hipokampus bölgesinde korku belleğinin oluşmasında *CaN* ve *Reln* metilasyonuna ilişkin bir düzenleme olmayabileceğini göstermiştir. Prefrontal kortekste elde edilen 1. saatteki *CaN* ve *Reln* metilasyonu artışı bu genlerin kısa süreli korku belleğinin oluşmasında yer alabileceğini düşündürmektedir. Prefrontal korteks bölgesinde *CaN* ve *Reln* metilasyonunun azalma yönündeki zamansal farklılaşmaların uzun süreli korku belleğinin depolanmasını etkilemediği görülmüştür. Amigdala bölgesinde *CaN* metilasyonundaki azalma bulgusu bu değişimin belleği bozmayabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Donma davranışı verilerine göre, yaşlı sıçanlarda 1. ve 7. günde bellek oluşmadığı, 24. saatte ve 21. günde bellek oluştuğu görülmüştür. DNA metilasyon verilerinde, yaşlı sıçanlarda hipokampus bölgesinde *CaN*

ve Reln metilasyonuna ilişkin bir düzenleme görülmemiştir. Prefrontal kortekste *CaN* metilasyonundaki azalmanın kısa süreli korku belleğinin oluşmasını engelleyebileceği öne sürülebilir. Korku belleğinin oluşması için prefrontal kortekste meydana gelen *CaN* metilasyon değişikliklerinin daha belirleyici olduğu, amigdala bölgesinde oluşan *CaN* metilasyonundaki artışın ise bellek oluşumu için yeterli olmayabileceği görülmektedir. Amigdala bölgesinde *Reln* metilasyonuna ilişkin bir düzenleme gözlenmemiştir. Bu durum *Reln* metilasyon değişimlerin bellek oluşumuyla sistematik olarak etkileşmeyebileceğini düşündürmektedir.Egr1 geninin metilasyonunu değerlendirebilmek üzere, hem genç hemde yaşlı sıçan beyin örneklerinden yeterince büyük bir sinyal elde edilememiştir.

Sonuç olarak korku belleğinin oluşması ve depolanmasında bu genlerin metilasyonundaki farklılaşmanın artma ya da azalma yönünde zamansal olarak değişebileceği ve bu durumun korku belleğinin depolanması için mutlak bir gereklilikten çok, hücre içinde bir düzenlemeye (homeostazis) yönelik olabileceği ileri sürülebilir.

Anahtar Sözcükler: Bellek, DNA metilasyonu, CaN, Reln, Egr1, Yaşlanma

SUMMARY

Investigation of Time-Dependent DNA Methylation in Different Regions of The Brain in related with Memory Formation and Storage in Young and Aged Rats.

It is known that the synaptic activity in the neuronal circuits mediating information storage is regulated by gene transcription in the nucleus. Recent studies to understand how the memory is stored have indicated the possible role of DNA methylation, one of the mechanisms that regulate gene transcription in the nucleus.

This study is aimed to determine DNA methylation at different time points (1st hour, 24th hours, 7th and 21st days) in the promotor region of *CaN*, *Reln* and *Egr1* genes in the hippocampus, prefrontal cortex, amygdala regions of young and aged rat brains during the formation and maintenance of fear memory. For this purpose, 126 Sprague-Dawley male rats, 63 for 3-4 months and 63 for 19-20 months, were used. The contextual fear conditioning model was also been used to provide the formation of a long-term memory. The hippocampus, prefrontal cortex and amygdala regions of brain were isolated. DNA methylation changes in the promoter region of *CaN*, *Reln* and *Egr1* genes in these neuroanatomical regions were examined by MeDIP RT-PCR analysis method. The behavioral data show that fear memory formation is significantly observable at all time-points in young rats. DNA methylation data indicate that there may be no regulation of *CaN* and *Reln* methylation in the formation of the fear memory in the hippocampus region. An increased methylation of *CaN* and *Reln* at 1st hour in the prefrontal cortex suggests that these genes may be involved in the formation of short-term fear memory. Temporal changes such as the reduction of *CaN* and *Reln* methylation in the prefrontal cortex area does not seem to affect the long-term storage of the fear memory. The finding of a decrease in *CaN* methylation in the amygdala

region suggests that this change may not distort memory storage. According to the behavioral data, fear memory was not successfully formed on the 1st hour and 7th day in the aged rats, meanwhile, fear memory was intact on the 24th hour and 21th day. Based on the DNA methylation data, tit appears that there is no regulation of *CaN* and *Reln* methylation in the hippocampus region in aged rats. It can be argued that a reduction in *CaN* methylation in the prefrontal cortex may have an interfering effect on the formation of short-term fear memory. It seems that *CaN* methylation changes in the prefrontal cortex may have more decisive role the formation of fear memory. On the other hand, an increase in *CaN* methylation in the amygdala region may not be sufficient for memory formation. No regulation of *Reln* methylation has been observed in the amygdala region. This suggests that *Reln* methylation changes may not systematically interact with memory formation.

Data show that methylation levels of these genes change temporarily in the evaluated neuroanatomical sites during formation and storage of fear memory. These changes may be related with more general cellular homeostasis rather than a specific involvement with fear memory.

Key words: Memory, DNA methylation, *CaN, Reln, Egr1*, Aging

KAYNAKLAR

ABEL TK, LATTAL, KM (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, **11:** 180-187.

ALBERINI CM (1999). Genes to remember. *The Journal of Experimental Biology*, **202:** 2887-2891.

ALBERINI CM (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev*, **89:** 121–145.

ALBERINI CM (2011). The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front Behav Neurosci* **5:** 12.

ALBERINI CM, GHIRARDI M, METZ R, KANDEL ER (1994). C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell*, **76:** 1099–1114.

ALBERINI CM, KANDEL ER (2015). The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7:** a021741.

ANAGNOSTARAS SG, MAREN S, FANSELOW MS (1999). Temporally graded retrograd amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci*, **19:** 1106-1114.

ANAGNOSTARAS SG, GALE GD, FANSELOW MS (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. *Hippocampus* **11:** 8–17.

ARRUDA-CAVALHO M, CLERN RL (2015). Prefrontal-amygdala fear Networks come into focus. *Frontiers in Systems Neuroscience* **9:** 1-5.

BACKMAN L, SMALL BJ, WAHLIN A, LARSSON M (1999). In Handbook of Cognitive Aging (2nd ed.) In.: cognitive functioning in very old age. Ed.: Craick F.I.M., Salthouse T.A., Lawrence Erlbaum, Mahwah, NJ. 499–558.

BADDELEY AD, HITCH G (1974). Working Memory The Psychology of Learning and Motivation. Ed.: Bower GH, New York: Academic Press. 47-89.

BAHRAMI S, DRABLØS F (2016) Gene regulation in the immediate-early response process. *Advanced in Biological Regulation* **62:** 37-49.

BAILEY CH, BARTSCH D, KANDEL ER (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci*, **93:** 13445–13452.

BARCO A, MARIE H (2011). Genetic approaches to investigate the role of CREB in neuronal plasticity and memory. *Mol Neurobiol* **44:** 330 –349.

BARRETT RM, MALVAEZ M, KRAMAR E, MATHEOS DP, ARRIZON A, CABRERA SM, LYNCH G, GREENE RW, WOOD MA (2011). Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory. *Neuropsychopharmacology*, **36:** 1545-1556.

BARRIA A, MULLER D, DERKACH V, GRIFFITH LC, SODERLING TR (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science*, **276:** 2042–2045.

BARRIENTOS RM, HIGGINS EA, BIEDENKAPP JC, SPRUNGER DB, WRIGHT-HARDESTY KJ, WATKINS LR, RUDY JW, MAIER SF (2006). Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. *Neurobiol Aging*, **27:** 723–732.

BAUMGÄRTEL K, MANSUY IM (2012). Neural functions of calcineurin in synaptic plasticity and memory. *Learning and Memory* **19:** 375-384.

BAUMGÄRTEL K, GENOUX D, WELZL H, TWEEDIE-CULLEN RY, KOSHIBU K, LIVINGSTONE-ZATCHEJ M, MAMIE C, MANSUY IM (2008). Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and Zif268. *Nat Neurosci* **11:** 572–578.

BEKINSCHTEIN P, CAMMAROTA M, MEDINA JH (2014). BDNF and memory processing.. *Neuropharmacology* **76:** 677– 683.

BENITO E, BARCO A (2010). CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: Implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci* **33:** 230 –240.

BENITO E, BARCO A (2015). The neuronal activity-driven transcriptome. *Mol Neurobiol*, **51:** 1071–1088.

BERGADO JA, ALMEQUER W, ROJAS Y, CAPDEVILA V, FREY JU (2011). Spatial and emotional memory in aged rats: a behavioral-statical analysis. *Neuroscience* **172:** 256-269.

BIENENSTOCK EL, COOPER LN, MUNRO PW (1982). Theory for the development of neuron selectivity: Orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J Neurosci*, **2:** 32–48.

BIRD A (2007). Perspective of epigenetics. *Nature,* **44:** 396-398.

BITO H, DEISSEROTH K, TSIEN RW (1996). Creb phosphorylation and dephosphorylation: a Ca2+ and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* **87:** 1203–1214.

BLISS TVP, LOMO T (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, **232:** 331-356.

BOZON B, DAVIS S, LAROCHE S (2003). A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* **40:** 695–701.

BRINK JJ, DAVIS RE, AGRANOFF BW (1966). Effects of puromycin, acetoxycycloheximide and actinomycin D on protein synthesis in goldfish brain. *J Neurochem* **13:** 889–896.

BROOKS PJ, MARIETTA C, GOLDMAN D (1996) DNA mismatch repair and DNA methylation in adult brain neurons. *J Neurosci* **16:** 939–945.

BROSDA J, DIETZ F, KOCH M. (2011). Impairment of cognitive performance after reelin knockdown in the medial prefrontal cortex of pubertal or adult rats. *Neurobiol Dis,* **44:** 239–247.

BRYAN KJ, LEE H, PERRY G, SMITH MA, CASADESUS G (2009). Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. In: Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: Behavioral testing and considerations, Ed.: Buccafusco JJ, 2nd Ed., CRC Press/Taylor &Francis.

BURKE SN, BARNES CA (2011). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends Neurosci* **33:** 153–161.

BURNHAM WM (1903). Retroactive amnesia: Illustrative cases and a tentative explanation. *Am J Psychol*, **14:** 382–396.

CABEZA R, NYBERG L, PARK D (2005). Cognitive Neuroscience of Aging. Ed.: Cabeza R, Nyberg L, Park D. University Press, New york, Oxford. 190-198.

CAMPEAU S, MISERENDINO MJ, DAVIS M (1992). Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5 blocks acquisition but not expression of fear-potentiated startle to an auditory conditioned stimulus. *Behav Neurosci* **106:** 596-574.

CHANG CD, MUKAI H, KUNO T, TANAKA C (1994). cDNA cloning of an alternatively spliced isoform of the regulatory subunit of Ca2+/calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin B a2). *Biochim Biophys Acta* **1217:** 174–180.

CHANG KT, BERG DK (2001). Voltage-gated channels block nicotinic regulation of creb phosphorylation and gene expression in neurons. *Neuron*, **32:** 855–865.

CHEN TC, LAW B, KONDRATYUK T, ROSSIE S (1995). Identification of soluble protein phosphatases that dephosphorylate voltage sensitive sodium channels in rat brain. *J Biol Chem*, **270:** 7750–7756.

CHEN Y, BEFFERT U, ERTUNC M, TANG TS, KAVALALI ET, BEZPROZVANNY I, HERZ C (2005). Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J Neurosci*, **25:** 8209–8216.

CHWANG WB, O'RIORDAN KJ, LEVENSON JM, SWEATT JD (2006). ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learning and Memory*, **13:** 322–328.

CLARK RE, BROADBENT NJ, SQUIRE LR. (2005).Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus*, **15:** 260-272.

COGHLAN VM, PERRINO BA, HOWARD M, LANGEBERG LK, HICKS JB, GALLATİN WM, SCOTT JD (1995). Association of protein kinase a and protein phosphatase 2b with a common anchoring protein. *Science*, **267:** 108–112.

CRABTREE GR (2001). Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem*, **276:** 2313–2316.

CURZON, P. RUSTAY, NR. BROWMAN KE (2009). Methods of Behaviors Analysis in Neuroscience. In. cued and contextual fear conditioning for rodents methods of behavior analysis in neuroscience, Chapter 2, Ed.:Buccafusco JJ, 2nd Ed., CRC Press/Taylor &Francis.

D'ARCANGELO G, HOMAYOUNI R, KESHVARA L, RICE DS, SHELDON M, CURRAN T (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* **24:** 471–479.

DAVIS M, (1992). The role of the amygdala in conditioned fear. *See Aggleton* 255-306.

DAVIS S, BOZON B, LAROCHE S (2003) How necessary is the activation of the immediate early gene *zif268* in synaptic plasticity and learning. *Behav Brain Res* **142:** 17–30.

DAY JJ, SWEATT JD (2010). DNA methylation and memory formation. *Nat Neurosci* **13:** 1319-1323.

DAY JJ, CHILDS D, GUZMAN-KARLSSON MC, KIBE M, MOULDEN J, SONG E, TAHIR A, SWEATT JD (2013). DNA methylation regulates associative reward learning. *Nature Neuroscience* **16:** 1445-1452.

DEBIEC J, LEDOUX JE, NADER K (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron,* **36:** 527–538.

DESILVA U, D'ARCANGELO G, BRANDEN VV, CHEN J, MIAO GG, CURRAN T, GREEN ED (1997). The human reelin gene: isolation, sequencing and mapping on chromosome 7. *Genome Res.,* **7:** 157-164.

DRISCOLL I, HOWARD SR, STONE JC, MONFILS MH, TOMANEK B, BROOKS WM, SUTHERLAND RJ (2006). The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience,* **139:** 1173–1185.

DUDAI Y (2012). The restless engram: Consolidations never end. *Annu Rev Neurosci* **35:** 227–247.

DUVARCI S, MAMOU CB, NADER K (2006). Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci,* **24:** 249–260.

ECKEL-MAHAN KL, STORM DR (2009). Circadian rhythms and memory: Not so simple as cogs and gears. *EMBO Rep* **10:** 584 –591.

EGOROV AV, HAMAM BN, FRANSEN E, HASSELMO ME, ALONSO AA (2002). Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature,* **420:** 173-178.

FANSELOW MS, KIM JJ (1994). Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav Neurosci,* **108:** 210-212.

FOSTER TC (2007). Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell,* **6:** 319–325.

FOSTER TC, DEFAZIO RD, BIZON JL (2012). Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. *Frontiers in Aging Neurosci,* **4:** 1-18.

FRANCO SJ, MARTINEZ-GARAY I, GIL-SANZ C, HARKINS-PERRY SR, MULLER U (2011). Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron,* **69:** 482–497.

FRANKLAND PW, BONTEMPI B, TALTON LE, KACZMAREK L, SILVA AJ (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* **304:** 881-883.

FREEMAN SH, KANDEL R, CRUZ L, ROZKALNE A, NEWELL K, FROSCH MP, HEDLEY-WHYTE ET, LOCASCIO JJ, LIPSITZ LA, HYMAN BT (2008).Preservation of neuronal number despite age-related cortical brain atrophy in elderly subjects without Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **67:** 1205-12.

FREY U, MORRIS RGM, (1998). Synaptic tagging: implications for maintenance of hippocampal long-term potantiation. *Trends Neuroscience* **21:** 181-188.

FUKUSHIMA H, MAEDA R, SUZUKI R, SUZUKI A, NOMOTO M, TOYODA H, WU LJ, XU H, ZHAO MG, UEDA K, KITAMOTO A, MAMIYA N, YOSHIDA T, HOMMA S, MASUSHIGE S, ZHUO M, KIDA S (2008). Upregulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV improves memory formation and rescues memory loss with aging. *J Neurosci* **28:** 9910–9919.

GAZZALEY AH, THAKKER MM, HOF PR, MORRISON JH (1997). Preserved number of entorhinal cortex layer II neurons in aged macaque monkeys. *Neurobiol Aging* **18:** 549-543.

GEAN PW (1993). Long-term enhancement of EPSP and NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the amygdala. *Brain Res Bull,* **31:** 7-11.

GEMMA C, STELLWAGEN H, FISTER M, COULTRAP SJ, MESCHES MH, BROWNING MD, BICKFORD PC (2004). Rosiglitazone improves contextual fear conditioning in aged rats. *Neuroreport*, **15:** 2255–2259.

GEMMA C, FISTER M, HUDSON C, BICKFORD PC (2005). Improvement of memory for context by inhibition of caspase-1 in aged rats. *Eur. J. Neurosci* **22:** 1751–1756.

GENOUX D, HADITSCH U, KNOBLOCH M, MICHALON A, STORM D, MANSUY IM (2003). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, **418:** 970–975.

GILMARTIN MR, HELMSTETTER FJ (2010). Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. *Learning and Memory* **17:** 289–296.

GOLDMAN-RAKIC PS (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron* **14:** 477-485.

GOOD M, HONEY RC (1997). Dissociable effects of selective lesions to hippocampal subsystems on exploratory behavior, contextual learning, and spatial learning. *Behav Neurosci* **111:** 487- 493.

GOTO K, NUMATA M, KOMURA JI, ONO T, BESTOR TH, KONDO H (1994). Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation*, **56:** 39–44.

GRAF P, SCHACTER DL (1985). Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *Journal of Experimental Psychology: Learning Memory and Cognition* **11:** 501-518.

GRANT SG, O'DELL TJ, KARL KA, STEIN PL, SORIANO P, KANDEL ER (1992). Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science* **258:** 1903-1910.

GRAPHPAD SOFTWARE COMPANY (Released, 2011) GraphPad Prism version: 5.03., Sandiago, California.

GREENGARD P, VALTORTA F, CZERNIK AJ, BENFENATI F (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **259:** 780–785.

GUAN Z, GIUSTETTO M, LOMVARDAS S, KIM JH, MINIACI MC, SCHWARTZ JH, THANOS D, KANDEL ER (2002). Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell* **111:** 483–493.

GUAN JS, HAGGARTY SJ, GIACOMETTİ E, DANNENBERG JH, JOSEPH N, GAO J, NIELAND TJ, ZHOU Y, WANG X, MAZITSCHEK R, BRADNER JE, DEPINHO

RA, JAENISCH R, TSAI LH (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature,* **459:** 55–60.

GUERRERO-BOSAGNA C, JENSEN P (2015). Optimized method for methylated DNA. *MethodsX* **2:** 432–439.

GUO JU, SU Y, ZHONG C, MİNG GL, SONG H (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **145:** 423-434.

GUPTA S, KIM SY, ARTIS S MOLFESE DL, SCHUMACHER A, SWEATT JD, PAYLOR RE, LUBIN FD (2010). Histon methylation regulates memory formation. *J Neurosci,* **30:** 3589-3599.

GUPTA-AGARWAL S, FRANKLIN AV, DERAMUS T, WHEELOCK M, DAVIS RL, MCMAHON LL, VUBIN FD (2012). G9a/GLP histone lysine dimethyltransferase complex activity in the hippocampus and entorhinal cortex is required for gene activation and silencing during memory consolidation. *J Neurosci,* **32:** 5440-5453.

GUSTAFSSON B, WIGSTRÖM H, ABRAHAM WC, HUANG YY (1987). Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials. *J Neurosci,* **7:** 774-780.

GUSTAFSSON B, WIGSTRÖM H (1988). Physiological mechanisms underlying long-term potentiation. *Trends Neurosci,* **11:** 156-162.

GUZOWSKI JF, SETLOW B, WAGNER EK, MCGAUGH JL (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos and zif268. *J Neurosci,* **21:** 5089–5098.

HABERMAN RP, COLANTUONI C, STOCKER AM, SCHMİDT AC, PEDERSEN JT, GALLAGHER M (2011). Prominent hippocampal CA3 gene expression profile in neurocognitive aging. *Neurobiol Aging,* **32:** 1678–1692.

HABERMAN RP, QUIGLEY CK, GALLAGHER M (2012). Characterization of CpG island DNA methylation of impairment-related genes in a rat model of cognitive aging. *Epigenetics,* **7:** 1008–1019.

HALDER R, HENNION M, VIDAL RO, SHOMRONI O, RAHMAN R, RAJPUT A, BONN S (2016). DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory. *Nature Neuroscience* **19:** 102-110.

HALL J, THOMAS KL, EVERITT BJ (2001) Cellular imaging of *zif268* expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: Selective activation of hippocampal CA1 neurons during recall of contextual memories. *J Neurosci,* **21:** 2186–2193.

HEBB DO (1949). The organization of behavior: A neuropsychological theory. John Wiley & Sons, New York. 62.

HERNANDEZ DG, NALLS MA, GİBBS JR, AREPALLI S, VAN DER BRUG M, CHONG S, MOORE M, LONGO DL, COOKSON MR, TRAYNOR BJ,

SINGLETON AB (2011). Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Hum Mol Genet*, **20:** 1164–1172.

HERZ J, CHEN Y (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* **7:** 850–859.

HUANG YY, KANDEL ER (1998). Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. *Neuron*, **21:** 169-178.

HONG I, KIM J, LEE S, KO HG, NADER K, KAANG BK, TSEIN RW, CHOI S (2013). AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **110:** 8218–8223.

HOSAKA M, HAMMER RE, S€UDHOF TC (1999) A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron,* **24:** 377–387.

HOUSTON FP, STEVENSON GD, MCNAUGHTON BL, BARNES CA (1999). Effects of age on the generalization and incubation of memory in the F344rat. *Learning and Memory,* **6:** 111–119.

IBM CORP. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0 Amork, NY: IBM Corp.

IKEGAMI S, KATO A, KUDO Y, KUNO T, OZAWA F, INOKUCHI K (1996). A facilitatory effect on the induction of long-term potentiation in vivo by chronic administration of antisense oligodeoxynucleotides against catalytic subunits of calcineurin. *Brain Res Mol Brain Res* **41:** 183–191.

IKEGAMI S, INOKUCHI K (2000). Antisense DNA against calcineurin facilitates memory in contextual fear conditioning by lowering the threshold for hippocampal long-term potentiation induction. *Neuroscience*, **98:** 637–646.

IMAI H, SHOJI H, OGATA M, KAGAWA Y, OWADA Y, MIYAKAWA T, SAKIMURA K, TERASHIMA T, KATSUYAMA Y (2017). Dorsal forebrain-specific deficiency of reelin-Dab1 signal causes behavioral abnormalities related to psychiatric disorders. *Cereb Cortex*, **27:** 3485-3501.

ISHII K, KUBO K, NAKAJIMA K (2016). Reelin and neuropsychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*, **10:** 229.

ISHIZUKA N, WEBER J, AMARAL DG (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol*, **295:** 580–623.

JAHR CE, STEVENS CF (1993). Calcium permeability of the *N*-methyl-D-aspartate receptor channel in hippocampal neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci*, **90:** 11573–11577.

JAROME TJ, LUBIN FD (2013). Histone lysine methylation: critical regulator of memory and behavior. *Rev Neurosci* **24:** 375–387.

JAROME TJ, THOMAS JS, LUBIN FD (2014). The epigenetic basis of memory formation and storage. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **128:** 1-27.

JIN J, MAREN S (2015). Prefrontal-Hippocampal interaction in memory and emotion. *Front. Syst. Neuroscience,* **9:** 170.

JOELS G, LAMPRECHT R (2010). Interaction between *N*-ethylmaleimide-sensitive factor and glur2 is essential for fear memory formation in lateral amygdala. *J Neurosci*, **30:** 15981–15986.

JOHANSEN JP, CAIN CK, OSTROFF LE, LE DOUX JE (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, **147:** 509-524.

JONES MW, ERRINGTON ML, FRENCH PJ, FINE A, BLISS TVP, GAREL S, CHARNAY P, BOZON B, LAROCHE S, DAVIS S (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci*. **4:** 289–296.

JOVANOVIC JN, SIHRA TS, NAIRN AC, HEMMİNGS JR. HC, GREENGARD P, CZERNIK AJ (2001). Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin in during Ca2+-dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J Neurosci* **21:** 7944–7953.

JUNG M, PFEIFER GP (2015). Aging and DNA methylation. *BMC Biology*, **13:** 1–8.

KAAS GA, ZHONG C, EASON DE, ROSS DL, VACHHANI RV, MING G-L, KİNG JR, SONG H, SWEATT JD (2013). TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. *Neuron*, **79:** 1086–1093.

KANDEL ER (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialog Between Genes and Synapses. *Bioscience Reports,* **21:** 565-611.

KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSEL TM, SIEGELBAUM SA, HUDSPETH AJ (2013). Learning and Memory Principles of Neural Science. Ed.: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA,Hudspeth AJ, 5th Ed,The McGraw-Hill Companies, 1442-1503.

KAPP BS, WHALEN PJ, SUPPLE WF, PASCOE JP (1992). Amygdaloid contributions to conditioned arousal and sensory information processing. *See Aggleton*, 229-254.

KEMPER TL (1994) Clinical Neurology of Aging. In: Neuroanatomical and neuropathological changes during aging and dementia. Ed.: Albert ML, Knoefel JE. Oxford University Press; New York. 3-67.

KERIMOGLU C, AGIS-BALBOA RC, KRANZ A, STILLING R, BAHARI-JAVAN S, BENITO-GARAGORRI E, HALDER R, BURKHARDT S, STEWART AF, FISCHER A (2013). Histone methyltransferase MLL2 (KMT2B) is required for memory formation in mice. *J Neurosci*, **33:** 3452–3464.

KIM M, CAMPEAU S, FALLS WA, DAVIS M (1993). Infusion of the non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression of fear-potentiated startle. *Behav Neural Biol*, **59:** 5-8.

KINCAID RL, GIRI PR, HIGUCHI S, TAMURA J, DIXON SC, MARIETTA CA, AMORESE DA, MARTIN BM (1990). Cloning and characterization of molecular

isoforms of the catalytic subunit of calcineurin using nonisotopic methods. *J Biol Chem*, **265:** 11312–11319.

KLEE CB, CROUCH TH, KRINKS MH (1979). Calcineurin: a calcium and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76:** 6270–6273.

KNAPSKA E, KACZMAREK L (2004). A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK. *Prog Neurobiol*, **74:** 183–211.

KOHNO T, HONDA T, KUBO K, NAKANO Y, TSUCHIYA A, MURAKAMI T, BANNO H, NAKAJIMA K, HATTORI M (2015). Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis. *J Neurosci*, **35:** 4776–4787.

KOSHIBU K, GRAFF J, BEULLENS M, HEITZ FD, BERCHTOLD D, RUSSIG H, FARINELLI M, BOLLEN M, MANSUY IM (2009). Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *J Neurosci*, **29:** 13079-13089.

KRAPIVINSKY G, MEDINA I, KRAPIVINSKY L, GAPON S, CLAPHAM DE (2004). SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron*, **43:** 563–574.

KUDO K, WATI H, QIAO C, ARITA J, KANBA S (2005). Age-related disturbance of memory and CREB phosphorylation in CA1 area of hippocampus of rats. *Brain Res*, **1054:** 30–37.

KUNO T, TAKEDA T, HIRAI M, ITO A, MUKAI H, TANAKA C (1989). Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochem Biophys Res Commun*, **165:** 1352–1358.

LANE-DONOVAN C, PHILIPS GT, WASSER CR, DURAKOGLUGİL MS, MASIULIS I, UPADHAYA A, POHLKAMP T, COSKUN C, KOTTI T, STELLER L, HAMMER RE, FROTSCHER M, BOCK HH, HERZ J (2015). Reelin protects against amyloid β toxicity *in vivo*. *Sci Signal*, **8:** ra67.

LEDOUX JE, IWATA J, CİCCHETTİ P, REIS DJ (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediata autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci*, **8:** 2517-2529.

LEDOUX JE (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, **23:** 155-187.

LEE JLC, EVERITT BJ, THOMAS KL (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, **304:** 839–843.

LEE JL, MILTON AL, EVERITT BJ (2006). Cue-induced cocaine seeking and relapse are reduced by disruption of drug memory reconsolidation. *J Neurosci*, **26:** 5881–5887.

LEVENSON JM, O'RİORDAN KJ, BROWN KD, TRINH MA, MOLFESE DL, SWEATT JD (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem*, **279:** 40545–40559.

LEVENSON JM, ROTH TL, LUBIN FD, MILLER CA, HUANG IC, DESAI P, MALONE LM, SWEATT JD (2006). Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* **281:** 15763–15773.

LEVISON SW, YOUNG GM, GOLDMAN JE (1999). Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia. *J Neurosci Res,* **57:** 435-446.

LEWIN B (2004). Genes VIII. Pearson Prentice Hall, New Jersey

LIEBERMAN DN, MODY I (1994). Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca2+-dependent phosphatase. *Nature,* **369:** 235–239.

LIN CH, LEE CC, GEAN PW (2003a) Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Mol Pharmacol,* **63:** 44–52.

LIN CH, YEH SH, LEU TH, CHANG WC, WANG ST, GEAN PW (2003b). Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *J Neurosci,* **23:** 1574–1579.

LINTL P, BRAAK H (1983) Loss of intracortical myelinated fibers: a distinctive age-related alteration in the human striate area. *Acta Neuropathol,* **61:** 178-181.

LISMAN J (1989). A mechanism for the Hebb and the antiHebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci* **86:** 9574–9578.

LISMAN J (1994). The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci,* **17:** 406 – 412.

LITTLE JP, CARTER AG (2013). Synaptic mechanisms underlying strong reciprocal connectivity between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. *J Neurosci,* **33:** 15333–15342.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2ΔΔCt Method. *Methods* **25:** 402–408.

LUBIN FD, ROTH TL, SWEATT JD (2008). Epigenetic Regulation of bdnf Gene Transcription in the Consolidation of Fear Memory. *Journal of Neuroscience,* **28:** 10576–10586.

LUBIN FD, GUPTA S, PARRISH RR, GRISSOM NM, DAVIS RL (2011). Epigenetic Mechanisms: Critical Contributors to Long-Term Memory Formation. *Neuroscientist,* **17:** 616-632.

LUSCHER C, MALENKA RC (2012). NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4:** a005710.

LUSSIER AL, WEEBER EJ, REBECK GW (2016). Reelin proteolysis affects signaling related to normal synapse function and neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* **10:** 1-7.

MA N, ABEL T, HERNANDEZ J (2009). Exchange protein activated by cAMP enhances long-term memory formation independ of protein kinaz A. *Learning and Memory,* **16:** 367-370.

MADDOX S, SCHAFE G (2011). Epigenetic alteration in the lateral amigdala are required reconstriction of a Pavlovian fear memory. *Journal of Neuroscience,* **18:** 7073–7082.

MADDOX SA, WATTS CS, SCHAFE GE (2014). DNA methyltransferase activity is required for memory-related neural plasticity in the lateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem,* **107:** 93–100.

MAEGAWA S, HINKAL G, KIM HS, SHEN L, ZHANG L, ZHANG J, ISSA JJ (2010). Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Research,* **20:** 332–340.

MAHANTY NK, SAH P (1998). Calcium-permeable AMPA receptors mediate long-term potentiation in interneurons in the amygdala. *Nature,* **394:** 683-687.

MALENKA RC (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* **78:** 535–538.

MALIN EL, MCGAUGH JL (2006) Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **103:** 1959–1963.

MALINOV R, TSIEN RW (1990). Presynaptic enhancement shown by whole cell recording of LTP in hippocampal slices. *Nature,* **357:** 134-139.

MALKANI S, ROSEN JB (2000). Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. *Neuroscience,* **97:** 693–702.

MALKANI S, WALLACE KJ, DONLEY MP, ROSEN JB (2004). An egr-1 (zif268) antisense oligodeoxynucleotide infused into the amygdala disrupts fear conditioning. *Learn Mem,* **11:** 617–624.

MALLERET G, HADITSCH U, GENOUX D, JONES MW, BLISS TV, VANHOOSE AM, WEITLAUF C, KANDEL ER, WINDER DG, MANSUY IM (2001). Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell,* **104:** 675–686.

MANSUY IM (2003). Calcineurin in memory and bidirectional plasticity. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* **311:** 1195–1208.

MANSUY IM, WINDER DG, MOALLEM TM, OSMAN M, MAYFORD M, HAWKINS RD, KANDEL ER (1998a). Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron,* **21:** 257–265.

MANSUY IM, MAYFORD M, JACOB B, KANDEL ER, BACH M (1998b). Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component of the transition from short-term to long-term memory. *Cell,* **92:** 39–49.

MAREN S (1999). Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci,* **22:** 561–567.

MAREN S, FANSELOW MS (1995). Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *Neurosci,* **15:** 7548-7564.

MAREN S, AHARONOV G, FANSELOW (1996). Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. *Behav Neurosci,* **110:** 718-726.

MARMORSTEIN R (2001). Protein modules that manipulate histone tails for cromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol,* **2:** 422-432.

MARTIN KC, CASADIO A, ZHU H, YAPING E, ROSE JC, CHEN M, BAILEY CH, KANDEL ER (1997). Synapse-specific, long term facilitation of Aplaysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell,* **91:** 927-938.

MARTINOWICH K, HATTORI D, WU H, FOUSE S, HE F, HU Y, FAN G, SUN YE (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science,* **302:** 890–893.

MAYER ML, WESTBROOK GL, GUTHRIE PB (1984). Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature,* **309:** 261–263.

MAYFORD M, SIEGELBAUM SA, KANDEL ER (2012) Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol,* **4:** a005751.

MCDONALD AJ (1982). Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. *J Comp Neurol,* **212:** 293–312.

MCGAUGH JL (2000). Memory—A century of consolidation. *Science,* **287:** 248–251.

MCGAUGH JL (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci,* **27:** 1–28.

MCGAUGH JL (2006). Make mild moments memorable: add a little arousal. *Trends Cogn Sci,* **10:** 345–347.

MCKENAN MG, SHINNICK-GALLAGHER P (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature,* **390:** 607-611.

MCNISH KA, GEWIRTZ JC, DAVIS M (1997). Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: A disruption of freezing but not fear-potentiated startle. *J Neurosci,* **17:** 9353-9360.

MCQUOWN SC, WOOD MA (2011). HDAC3 and the molecular brake pad hypothesis. *Neurobiol Learn and Mem,* **96:** 27-34.

MEETER M, MYERS CE, GLUCK MA (2005). Integrating incremental learning and episodic memory models of the hippocampal region. *Psychol Rev*, **112:** 560–585.

MIGUES PV, HARDT O, WU DC, GAMACHE K, SACKTOR TC, WANG YT, NADER K (2010). PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci,* **13:** 630-634.

MILAD MR, QUIRK GJ (2002). Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*, **420:** 70-74.

MILBRANDT J. (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science*, **238:** 797–799.

MILLER CA, CAMPBELL SL, SWEATT JD (2007). Covalent modification of DNA regulates memory function. *Neuron,* **32:** 857-869.

MILLER CA, CAMPBELL SL, SWEATT JD (2008). DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem*, **89:** 599–603.

MILLER CA, GAVIN CF, WHITE JA, PARRISH CR, RIVERA IM, RUBIO MD, RUMBAUGH G, SWEATT JD (2010). Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nature Neuroscience* **13**: 664-666.

MISERENDINO MJ, SANANES CB, MELIA KR, DAVIS M (1990). Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature,* **345:** 716-718.

MONSEY MS, OTA KT, AKINGBADE IF, HONG ES, SCHAFE GE (2011). Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PLoS One*, **6:** e19958.

MORGAN MA, LEDOUX JE (1999) Contribution of ventrolateral prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Neurobiology of Learning Memory*, **72:** 244-251.

MORRIS MJ, MONTEGGIA LM (2014). Role of DNA methylation and the DNA methyltransferases in learning and memory. *Dialogues Clin Neurosci,* **16:** 359-371.

MOYER JR, BROWN TH (2006). Impaired trace and contextual fear conditioning in aged rats. *Behav Neurosci*, **120:** 612–624.

MUNGAS D, HARVEY D, REED BR, JAGUST WJ, DECARLI, C, BECKETT L, MACK WJ, KRAMER JH, WEINER MW, SCHUFF N, CHUI HC (2005). Longitudinal volumetric MRI change and rate of cognitive decline. *Neurology*, **65:** 565–571.

NADER K, SCHAFE GE, LEDOUX JE (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature,* **406:** 722–726.

NADER K, EINARSSON EO (2010). Memory reconsolidation: An update. *Ann NY Acad Sci*, **1191:** 27–41.

NAKAJIMA K, MIKOSHIBA K, MIYATA,T, KUDO C, OGAWA M (1997). Disruption of hippocampal development in vivo by CR-50 mAb against reelin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94:** 8196–8201.

NAYAK A, ZASTROW DJ, LICKTEIG R, ZAHNISER NR, BROWNING MD (1998). Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. *Nature,* **394:** 680–683.

NEDELESCU H, KELSO CM, LÁZARO-MUÑOZ G, PURPURA M, CAIN CK, LEDOUX JE, AOKI C (2010). Endogenous GluR1-containing AMPA receptors translocate to asymmetric synapses in the lateral amygdala during the early phase of fear memory formation: an electron microscopic immunocytochemical study. *J Comp Neurol* **518:** 4723–4739.

NYBERG L, MAITLAND SB, RONNLUND M, BACKMAN L, DIXON RA, WAHLIN A, NILSSON LG (2003). Selective adult age differences in an age invariant multifactor model of declarative memory. *Psychol Aging,* **18:** 149–160

OLD SR, NAVEH-BENJAMIN M (2008). Differential effects of age on item and associative measures of memory: a meta-analysis. *Psychol Aging,* **23:** 104–118.

OLER JA, MARKUS EJ (1998). Age-related deficits on the radial maze and in fear conditioning: hippocampal processing and consolidation. *Hippocampus,* **8:** 402–415.

OLIVERIA SF, GOMEZ LL, DELL'ACQUA ML (2003). Imaging kinase-akap79-phosphatase scaffold complexes at the plasma membrane in living cells using fret microscopy. *J Cell Biol,* **160:** 101–112.

OLIVEIRA AMM (2017). DNA methylation: a permissive mark in memory formation and maintenance. *Learning and Memory,* **23:** 587-593.

PARK DC, PUGLISI JT, SOVACOOL M (1983) Memory for pictures, words, and spatial location in older adults: evidence for pictorial superiority. *J Gerontol*, **38:** 582-588.

PAXINOS G, WATSON C (2013). Paxinos & Watson's The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.7th ed. Academic Press.

PEDREIRA ME, DIMANT B, MALDONADO H (1996). Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab Chasmagnathus. *Pharmacol Biochem Behav,* **54:** 611–617.

PELEG S, SANANBENESI F, ZOVOILIS A, BURKHARDT S, BAHARİ-JAVAN S, AGIS-BALBOA RC, COTA P, WITTNAM JL, GOGOL-DOERING A, OPITZ L, SALINAS-REISTER G, DETTERNHOFER M, KANG H, FARINELLI L, CHEN W, FISHER A (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science,* **328:** 753–756.

PENFIELD W, MILNER B (1958). Memory deficit produced by bileteral lessions in the hippocampal zone. *AMA Archives of Neurology and Psychiatry,* **79:** 475-497.

PENKE Z, MORICE E, VEYRAC A, GROS A, CHAGNEAU C, LEBLANC P, SAMSON N, BAUMGARTEL K, MANSUY IM, DAVIS S, LAROCHE S. (2014). Zif268/Egr1

gain of function facilitates hippocampal synaptic plasticity and long-term spatial recognition memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.,* **369:** 20130159.

PENNER MR, ROTH TL, CHAWLA MK, HOANG LT, ROTH ED, LUBIN FD, BARNES CA (2011). Age-related changes in Arc transcription and DNA methylation within the hippocampus. *Neurobiology of Aging,* **32:** 198-210.

PENNER MR, PARRISH RR, HOANG TL, LUBIN FD, BARNES CA (2016). Age-related changes in Egr1 transcription and DNA methylation within the hippocampus. *Hippocampus,* **26:** 1008-1020.

PETERS A, SETHARES C (2004). Oligodendrocytes, their progenitors and other neuroglial cells in the aging primate cerebral cortex. *Cereb Cortex,* **14:** 995-1007.

PETERS A, SETHARES C, MOSS BM (2010). How the primate fornix is affected by age. *J Comp Neurol,* **518:** 3962-3980.

PHELPS EA (2004). Human emotion and memory: Interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol,* **14:** 198–202.

PHILLIPS RG, LEDOUX JE (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci,* **106:** 274–285.

PICQ JL, AUJARD F, VOLK A, DHENAİN M (2012). Age-related cerebral atrophy in nonhuman primates predicts cognitive impairments. *Neurobiol Aging,* **33:** 1096–1109.

PUJADAS L, GRUART A, BOSH C, DELGADO L, TEIXEIRA CM, ROSSI D, DE LECCA L, MARTINE A, DELGADO-GARCIA JM, SORIANO E (2010). Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potantiation. *J Neurosci,* **30:** 4636-4649.

QIU S, ZHAO LF, KORWEK KM, WEEBER EJ (2006). Differential reelin- induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *J Neurosci,* **26:** 12943–12955.

QIU, S, WEEBER EJ (2007). Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *J Neurophysiol,* **97:** 2312–2321.

QUATTROCCHI CC, HUANG C, NIU S, SHELDON M, BENHAYOND, CARTWRIGHT J JR, MOSSIER DR, KELLER F, D'ARCANGELO G (2003). Reelin promotes peripheral synapse elimination and maturation. *Science,* **301:** 649-659.

RACINE RJ, MILGRAM NW, HAFNER S (1983). Long-term potantiation phenomena in the rat limbic forebrain. *Brain Res,* **260:** 217-231.

RAMAN IM, TONG G, JAHR CE (1996). Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron,* **16:** 415–421.

RAZ N, YANG YQ, RODRIGUE KM, KENNEDY KM, LINDENBERGER U, GHISLETTA P (2012). White matter deterioration in 15 months: latent growth curve models in healthy adults. Neurobiol. *Aging,* **33:** 429.e1-429.e5

RESSLER KJ, PASCHALL G, ZHOU XL, DAVIS M. (2002). Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *J Neurosci*, **22:** 7892–902.

RODRIGUEZ-OTIZ CJ, BERMUDEZ RATTONI F (2007) Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging Memory. In. Reconsolidation or updating consolidation? Chapter 11, Ed.: Bermudez Rattoni F. Boca Raton. CRC Press.

ROGAN MT, LEDOUX JE (1995). LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit. *Neuron*, **15:** 127-136.

ROGAN MT, STÄUBLI UV, LEDOUX JE (1997). AMPA receptor facilitation accelerates fear learning without altering the level of conditioned fear acquired. *J Neurosci*, **17:** 5928-5935.

ROMANSKI LM, CLUGNET MC, BORDI F, LEDOUX JE. (1993). Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav Neurosci*, **107:** 444–450.

ROSEN JB, FANSELOW MS, JOUNG SL, SITCOSKE M, MAREN S (1998). Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain Res*, **796:** 132-142.

RUCH FL (1934). The differentiative effects of age upon human learning. *The Journal of General Psychology* **11:** 261–286.

RUBINOW MJ, JURASKA JM (2009). Neuron and glia numbers in the basolateral nucleus of the amygdala from preweaning trough old age in male and female rats: a stereological study. *J Comp Neurol*, **512:** 717-725.

RUDENKO A, DAWLATY MM, SEO J, CHENG AW, MENG J, LE T, FAULL KF, JAENISCH R, TSAI LH (2013). Tet1 is critical for neuronal activity-regulated gene expression and memory extinction. *Neuron*, **79:** 1109–1122.

RUMPEL S, LEDOUX J, ZADOR A, MALINOW R (2005). Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science*, **308:** 83-88.

RUNYAN JD, MOORE AN, DASH PK (2004) A role for prefrontal cortex in memory storage for trace fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, **24:** 1288-1295.

RUSNAK F, MERTZ P (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*, **80:** 1483-1521.

SACKTOR TC (2011). How does PKMζ maintain long term memory? *Nat Rev Neurosci*, **12:** 9-15.

SAH P, FABER SL, LOPEZ M, POWER J (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiology Review*, **83:** 803–34.

SANDELL JH, PETERS A (2002). Effects of age on the glial cells in the rhesus monkey optic nerve. *J Comp Neurol*, **445:** 13-28.

SARA SJ (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem*, **7:** 73–84.

SCHACTER DL (1987). Implicit memory: history and current status. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory and Cognition*, **13:** 501-518.

SCHAIE, KW (2005) Developmental Influences on Adult Intelligence: The Seattle Longitudinal Study, Oxford University Press.

SEXTON CE, MACKAY CE, LONIE JA, BASTIN ME, TERRİERE E, O'CARROLL RE, EBMEIER KP (2010). MRI correlates of episodic memory in Alzheimer'sdisease, mildcognitive impairment, and healthy aging. *Psychiatry Res*, **184:** 57–62.

SHERRINGTON CS (1906). The integrative action of the nervous system. Yale University Press; New Haven. 305-309.

SIEGMUND KD, CONNOR CM, CAMPAN M, LONG TL, WEISENBERGER DJ, BINISZKIEWICZ D, AKBARIAN S (2007). DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons, *PLoS ONE*, **2:** e895.

SIEMANN G, BLUME R, GRAPENTIN D, OETJEN E, SCHWANINGER M, KNEPEL W (1999). Inhibition of cyclic AMP response element-binding protein/cyclic AMP response element-mediated transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin a and fk506 depends on the promoter context. *Mol Pharmacol*, **55:** 1094–1100

SILVA AJ, KOGAN JH, FRANKLAND PW, KIDA S (1998). CREB and Memory. *Annual Review of Neuroscience*, **21:** 127-148.

SLOANE JA, HINMAN JD, LUBONIA M, HOLLANDER W, ABRAHAM CR (2003). Age-dependent myelin degeneration and proteolysis of oligodendrocyte proteins is associated with the activation of calpain-1 in the rhesus monkey. *J Neurochem*, **84:** 157-168.

SMITH EE, JONIDES J, MARSHUETZ C, KOEPPE RA (1998). Components of verbal working memory: evidence from neuroimaging. *Proc Nat Acad Sci USA*, **95:** 876-882.

SMITH DE, RAPP PR, MCKAY HM, ROBERTS JA, TUAZYNSKI HM (2004). Memory impairment in aged primates is associated with focal death of cortical neurons and atrophy of subcortical neurons. *Journal of Neuroscience*, **24:** 4373-4381.

SMITH JF, ALEXANDER GE, CHEN K, HUSAIN FT, KIM J, PAJOR N, HORWITZ B (2010). Imaging systems level consolidation of novel associate memories: A longitudinal neuroimaging study. *Neuroimage*, **50:** 826–836.

SPENCER AW, THOMPSON RF, NIELSON DR JR (1966). Response decrement of the flexion reflex in the acute spinal cat and transient restoration by strong stimuli. *J Neurophysiol*, **29:** 240-252.

SPENCER WD, RAZ N (1995). Differential effects of aging on memory for content and context: a meta-analysis. *Psychol Aging*, **10:** 527–539.

SQUIRE LR, ZOLA SM (1996). Structure and function of declarative and non declarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93:** 13515–13522.

SQUIRE LR, STARK CE, CLARK RE, KNOWLTON BJ (2001). Retrograd amnesia. *Hippocampus,* **11:** 50-55.

SQUIRE LR, STARK CE, CLARK RE (2004). The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* **27:** 279–306.

SQUIRE LR, GENZEL L, WINXLED JT, MORRIS RG (2015) Memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, **7:** a021766.

STRANAHAN AB, HABERNAN RP, GALAGHER M (2011). Cognitive decline is associated with reduced reelin expression in the entorhinal cortex of aged rats. *Cerebral Cortex*, **21:** 392-400.

SUI L, WANG Y, JU LH, CHEN M (2012). Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem*, **97:** 425–440.

SUZUKI MM, BIRD A (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, **9:** 465–476.

SWANK MW, SWEATT JD (2001). Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. *J Neurosci* **21:** 3383–3391.

SWEATT JD (2016). Dynamic DNA methylation controls glutamate receptor trafficking and synaptic scaling. *Journal of Neurochemistry*, **137:** 312-330.

TAUBENFELD SM, MILEKIC MH, MONTI B, ALBERINI CM (2001). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPb. *Nat Neurosci*, **4:** 813– 818.

TEEGARDEN S (2012). Behavioral phenotyping in rats and mice. *Materials and Methods*, **2:** 122.

THU KL, VUCIC EA, KENNETT Y, BROWN CJ, LAM WL, WILSON IM (2009). Methylated DNA Immunoprecipitation. *Journal of Visualized Experiments*, **23:** e935.

TONG G, JAHR CE (1994). Regulation of glycine-insensitive desensitisation of the NMDA receptor in outside-out patches. *J Neurophysiol*, **71:** 754–761.

TONONI G, CIRELLI C (2014). Sleep and the price of plasticity: From synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron*, **81:** 12–34.

TROTTER J, LEE GH, KAZDOBA TM, CROWELL B, DOMOGAUER J, MAHONEY HM, FRANCO SJ, MULLER U, WEEBER EJ, D'ARCANGELO G (2013). Dab1 is required for synaptic plasticity and associative learning. *J Neurosci*, **33:** 15652–15668.

TUETING P, COSTA E, DWIVEDI Y, GUİDOTTI A, IMPAGNATIELLO F, MANEV R, PESOLD C (1999). The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse. *Neuroreport*, **10:** 1329–1334.

TULVING E, SCHACTER DL (1990). Priming and human memory systems. *Science,* **247:** 301-306.

UEKI K, MURAMATSU T, KINCAID RL (1992). Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochem Biophys Res Commun,* **187:** 537–543.

VAZDARJANOVA A, MCGAUGH JL (1998). Bazolateral amygdala is not critical for cognitive memory of contextual fear conditioning. *Proc Natl Acad Sci USA,* **95:** 15003-15007.

VECSEY CG, HAWK JD, LATTAL KM, STEIN JM, FABIAN SA, ATTNER MA, CABRERA SM, MCDONOUGH CB, BRİNDLE PK, ABEL T, WOOD MA (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *Journal of Neuroscience,* **27:** 6128–6140.

VEYRAC A, BESNARD A, CABOCHE J, DAVIS S, LAROCHE S. (2014). The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity and memory. *Prog Mol Biol Transl Sci,* **122:** 89–129.

WALTON A, SCHEIB JL, MCLEAN S, ZHANG Z, GRONDIN R (2008). Motor memory preservation in aged monkeys mirrors that of aged humans on a similar task. *Neurobiol Aging,* **29:** 1556–1562.

WANG G, GRONE B, COLAS D, APPELBAUM L, MOURRAIN P (2011). Synaptic plasticity in sleep: Learning, homeostasis and disease. *Trends Neurosci,* **34:** 452 –463.

WEBER M, DAVIES JJ, WITTIG D, OAKELEY EJ, HAASE M, LAM WL, SCHU D (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics,* **37:** 853–862.

WEEBER EJ, BEFFERT U, JONES C, CHRISTIAN JM, FORSTER E, SWEATT JD, HERZ C (2002). Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem,* **277:** 39944–39952.

WILLOUGHBY RR (1929). Incidental learning. *Journal of Educational Psychology,* **20:** 671–682.

WILSON VL, SMITH RA, MA S, CUTLER RG (1987). Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem*, **262:** 9948–9951.

WILTGEN BJ, TANAKA KZ (2013). Systems consolidation and the content of memory. *Neurobiol Learn Mem,* **106:** 365– 371.

WIXTED JT, SQUIRE LR (2011). The medial temporal lobe and the attributes of memory. *Trends in Cognitive Science,* **15:** 210-217.

WOLDEMICHAEL BT, BOHACEK J, GAPP K (2014). Epigenetics of memory and plasticity. *Progress in Molecular Biology and Translational Science,* **12:** 305-330.

YU M, HON GC, SZULWACH KE, SONG CX, ZHANG L, KIM A, LI X, DAI Q, SHEN Y, PARK B, MIN JH, JIN P, REN B, HE C (2012). Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell*, **149:** 1368–1380.

EKLER

EK-1: Etik Kurul Kararı

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU (YÜDHEK)

ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
12.03.2015	455	05.03.2015 Tarihli Yazı	Prof.Dr.Güler ÖZTÜRK

'Genç ve yaşlı sıçanlarda bellek oluşumu ve depolanmasının, zaman bağımlı olarak beynin farklı bölgelerinde DNA metilasyonu yönünden incelenmesi' adlı bilimsel çalışma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi:2 Yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Raportör	Prof. Dr. Işıl Aksan KURNAZ	
Üye	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	KATILMADI
Üye	Prof. Dr. Başar ATALAY	
Üye	Yard.Doç.Dr.Soner DOĞAN	
Üye	Yard. Doç. Dr. Ediz DENİZ	KATILMADI
Üye	Doç. Dr. C. Narter YEŞİLDAĞLAR	KATILMADI
Üye	Sumru KİRAZCI	

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı	:Çiğdem
Soyadı	:Yazıcı Mutlu
Doğum yeri ve tarihi	: Bafra.07.Ocak.1972
Uyruğu	:TC
Medeni durumu	: Evli
İletişim adresi	: Mevlana Mah. TEM2 Avrupa Konutları C Blok GOP-İstanbul
İletişim telefonu	: 0535 8752619 email: cigdemyazmutlu@gmail.com.

II-Eğitimi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AbD yüksek lisans (2012)

Hacettepe Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu yüksek lisans (1999).

Hacettepe Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu lisans (1994).

Bafra Lisesi (1987)

Yabancı dili : İngilizce (ÜDS, 70/100 2008; YÖKDİL, 78/100 2017)

III-Ünvanları

Fizyoterapist

Uzm. Fizyoterapist

IV-Mesleki Deneyimi

Başkent Üniversitesi hastanelerinde nörolojik rehabilitasyon ve solunum terapisi alanlarında Fizyoterapist olarak çalışmıştır 1995-1999.

Dirimsel Tıp Merkezi, Fizik Tedavi ve Ortopedik Rehabilitasyon 2005-2007.

Yeni Ufuk Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezinde part-time Pediatrik Rehabilitasyon 2002-2003.

Ankara Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nörolojik Rehabilitasyon 2007- 2010.

V-Üye Olduğu Bilimsel Dernekler

Türkiye Fizyoterapistler Derneği (TFD)

Türkiye Osteopatlar Derneği (TFAO)

Türkiye Fizyolojik Bilimler Derneği (TFBD)

VI-Bilimsel İlgi Alanları

A-Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

A1- Keskin-Aktan A, Akbulut KG, Yazıcı-Mutlu C, Sonugur G, Ocal G, Akbulut H (2018). The effect of melatonin and curcumin on expression of SIRT2, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of adult rats. *Brain Research Bulletin,* (accepted 5 january) doi.org/10.1016/j.brainresbull. 2018.01.006. (SCI-E)

B-Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler.

B1- Yazıcı Mutlu C, Ozturk G, Akarsu ES, Bayrak OF, Yılmaz B, Şeker B, Suakar Ö Calcineurin and reelin gene promoter region methylation changes due to fear conditioned long-term memory formation in hippocampal and dorsomedial prefrontal korteks tissues of young or aged rats. *Acta Physiologica*, 2017, Volume 221, Issue Supplement S714.

B2- Keskin Aktan A, Yazıcı Mutlu Ç, Akbulut KG. The effects of curcumine on the oxidative stress in the aged rat brain. *Acta Physiologica*, 2015, Volume 215, Issue Supplement S704.

B3- Akbulut KG, Keskin Aktan A, Yazıcı Mutlu Ç. The effect of melatonin, curcumin and salermide on sirt2 expression level of hippocampus in middle aged rats. Acta Physiologica, 2015, Volume 215, Issue Supplement S704.

B4- Yaşlı sıçanlarda melatonin ve curcumin uygulamasının testis dokularına etkisi; 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül 2014, Erciyes Üniversitesi, (P-081).

B5- Yazıcı Mutlu Ç, Akbulut KG, Keskin Aktan A, Akbulut H. The Relationship Between Oxidative Stres and Sirt2 in Serebral Cortex of Middle-aged Rats. Journal of Neurological Sciences (Turkish), 2013, Volume 30,Supplementary issue.

B6- Keskin Aktan A, Akbulut KG, Yazıcı Mutlu Ç, Güney Ş, Akbulut H. The Relationship Between Oxidative Stress and Bcl-2 in Hippocampus of Middle-

aged Rats. Journal of Neurological Sciences (Turkish), 2013, Volume 30, Supplementary issue.

B7- Melatonin ve curcumin uygulamasının karaciğer dokusunda oksidatif stres üzerine etkisi; 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 10-14 Eylül 2013, Hacettepe Üniversitesi, (P-019).

B8- Yaşlanmada serebral korteks oksidatif stres ve melatonin ilişkisi; 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 25-29 Eylül 2012, KATÜ, (P-035).

C- Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan sözlü bildiriler.

C1- Yazıcı Mutlu C, Ozturk G, Akarsu ES, Bayrak OF, Yılmaz B, Şeker B, Suakar Ö. Calcineurin and reelin gene promoter region methylation changes due to fear conditioned long-term memory formation in hippocampal and dorsomedial prefrontal korteks tissues of young or aged rats. Acta Physiologica, 2017, Volume 221, Issue Supplement S714.

VII- Bilimsel Etkinlikler

A-Projeler:

A1-‘‘Sirtuin’in Beyinde Apopitoz Üzerine Etkisi’’, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir - 01/2011- 49 (Araştırmacı)

A2-‘‘Yaşlanma Sürecinde Beyinde Sirtuin Aktivitesi’’, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir - 01/2011- 48 (Araştırmacı)

A3-‘‘Genç ve Yaşlı Sıçanlarda Bellek Oluşumu ve Depolanmasının, Zaman Bağımlı Olarak Beynin Farklı Bölgelerinde DNA metilasyonu Yönünden İncelenmesi’’ TÜBİTAK 3001 Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir.-01/09/2015-01/09/2017 (Bursiyer)

VII Diğer Bilgiler

A-Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve seminerler

A1- 1996 TFD, 3 Boyutlu Skolyoz tedavisi, Ankara

A2- 1997 TFD, H. Ü. Göğüs hastalıkları, Fizik Tedavide Özel Yaklaşımlar: Solunum Fizoterapisi sempozyumu

A3- 2004 Ankara Üniversitesi (ATAUM) Avrupa Birliği Temel Eğitim kursu 35. Dönem, Ankara

A4- 2005 Aktif Sağlıklı Yaşam Merkezi, Lumbal Bölge Problemlerinde Mobilizasyon ve Terapatik Egzersizler kursu, İstanbul

A5- 2005 Patricia Sullivan, Nörolojik Etkilenimli Hastalarda Yürüyüş Değerlendirilmesi, Ankara

A6- 2006 TİFAO Manuel Terapi (Kalthenborn – Evient) ,Ankara

A7- 2007-2012 IFAO (Instıtut Für Angewandie Osteopathie) Osteopati eğitimi, İstanbul

A8- 2009 Földi College, Manuel Lenf Drenajı ve Kompleks Boşaltıcı Fizyoterapi sertifikası

A10- 2010 Gazi Üniversitesi Laboratuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, VIII. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, Ankara