



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**VENTROMEDYAL HİPOTALAMİK ÇEKİRDEKTE
STEROİDOJENİK FAKTÖR 1 (SF-1) İFADE EDEN
NÖRONLARIN BESLENME ÜZERİNE ETKİSİ**

FULYA KÖKSALAR

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. DENİZ ATASOY

İSTANBUL 2018

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Doç. Dr. Deniz Atasoy'a, Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e, sunduğu fırsatlar için REMER ve MEDİTAM'a, desteğini her zaman hissedeceğim Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı'ya,

Annem ve babam Buket ve Turgay Köksalar'a, eşim Hilmi Kaan Alkan'a, arkadaşlarım Bircan ve Cansu Kolbaşı, Nazlı Moripek'e ve de Tonbak ailesine,

Teşekkür ediyorum.



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. Obezite	4
4.2. Ventromedyal Hipotalamus ve Beslenme.....	6
4.3. Ventromedyal Hipotalamus, Steroidojenik Faktör 1 ve Beslenme.....	9
4.4. VMH ^{SF-1} nöronlarının kemogenetik ve optogenetik manipülasyonları	15
5. MATERYAL VE METOT.....	21
5.1. Materyal	21
5.2. Transgenik Deney Hayvanları	22
5.3. Genotipleme	23
5.3.1. DNA İzolasyonu	23
5.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	23
5.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi	24
5.4. Doku Fiksasyonu ve Kesit Alımı	24
5.5. İmmunohistokimyasal Antikor Boyaması.....	25
5.6. Mikroskopi.....	25
5.7. rAAV Üretimi	25
5.8. Beyin İçine Lateks boncuk Enjeksiyonu	27
5.9. Beslenme Davranışı Analizleri	27
5.9.1. Nöral Aktivasyon.....	27
5.9.2. Nöral İnaktivasyon.....	29
5.9.3. Nöral Ablasyon.....	30
5.10. Anksiyete Testi.....	31
5.11. Enjeksiyon Alanlarının Sayısal Analizleri	31
5.12. İstatistiksel Analiz	32
6. BULGULAR.....	33
6.1. Deney Grupları Ve Genotipleme.....	33
6.2. Lateks Boncuk Enjeksiyonu İle VMH'in Hedeflenmesi	33
6.3. Nöral Aktivasyon	34

6.4. Nöral İnaktivasyon	37
6.5. Nöral Ablasyon	40
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
8. KAYNAKLAR	46
10.ETİK KURUL ONAYI.....	50
11.ÖZGEÇMİŞ	53



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AAV	Adeno-asosiyе virüs
ACh	Asetilkolin
AgRP	Agouti-related Protein
ARC	Arkuat Nükleus
BAT	Brown Adipose tissue
BMI	Vücut kitle indeksi
CAG	cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin promoter
Casp3	Kaspaz 3
ChR2	Channelorhodopsin 2
CNO	Clozapine-N-Oxide
Cre	Carbapenem – resistant Enterobacteriaceae
CRR	Karşı Düzenleyici Yanıt
cVMH	central Ventromedyal Hipotalamus
DA	Dopamin
DMH	Dorsomedyal Hipotalamus
dmVMH	Dorsomedyal Ventromedyal Hipotalamus
DREADD	Designer receptors exclusively activated by designed receptors
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
EF1a	human elongation factor 1 alpha
EtOH	Etanol
EPM	Elevated Plus Maze
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
FLEX	Cre –dependent flip excision switch
GABA	Gamma-aminobutirik asit
GFP	Green Fluorescence Protein
HCl	Hydrochloric acid
LHA	Lateral Hipotalamik Alan
LoxP	Locus of X(cross)-over in P1
mACh	Muskarinik Asetil kolin
ME	Medyal Eminence
MSS	Merkezi sinir sistemi

NE	Norepinefrin
Npy	Nöropeptid Y
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyde
POMC	Pro-opiomelanocortin
PSS	Periferik sinir sistemi
rAAV	rekombinant adeno-asosiye virüs
SF-1	Steroidojenik faktör 1
TAE	Tris base, acetic acid and EDTA
TEVp	Tobacco etch virüs protease
vlVMH	ventrolateral Ventromedyal Hiptalamus
VMH	Ventromedyal Hipotalamus
VMN	Ventromedyal Nükleus
Vglut2	Vesicular glutamate transporter 2
i.p.	intraperitonel
3V	üçüncü ventrikül

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. TÜİK güncel obezite verileri	4
Şekil 4.1.2: Dünya Sağlık Örgütü 2014 obezite verileri	5
Şekil 4.2.1: Vücuttaki enerji dengesinin hem periferik hem de merkezi sistemlerin iletişimi ile düzenlenmesi	6
Şekil 4.2.2: VMH'e özgün elektrolitik lezyonlar ve çelik bıçak indirme yöntemlerine göre albino sıçanlarda kilo alımı	8
Şekil 4.3.1: VMH ^{SF-1} nöronlarının elektrofizyolojik kayıtları	13
Şekil 4.3.2: VMH'te yabancı tip ve nakavt SF-1 ifade eden farelerin besin içeriğine ve beslenme durumuna bağlı uzun süreli etkileri	14
Şekil 4.3.3: İnsülinin VMH ^{SF-1} nöronlarının elektriksel aktivitesine etkisi	15
Şekil 4.4.1: Nr5a1::hM4D-2A-tomatoF transgenik farede gen ifadenin şeması... ..	17
Şekil 4.4.2: Cre-bağımlı genetik yaklaşım ile nöral ablasyonu	18
Şekil 4.4.3: Whole-cell patch clamp metodu ile Chr2 ifade eden VMH ^{SF-1} nöronlarının ışık uyarımlı elektrofizyolojik kaydı	19
Şekil 4.4.4: SF-1 nöronlarının optogenetik inaktivasyonu	20
Şekil 5.9.1: Nöral aktivasyon deney şeması	28
Şekil 5.9.2: Nöral inaktivasyon deney şeması	30
Şekil 5.9.3: Nöral ablasyon deney şeması	31
Şekil 6.3.1: Anlık SF-1 nöral aktivasyonu	35
Şekil 6.3.2: Uzun süreli SF-1 nöral aktivasyonu	36
Şekil 6.3.3: Davranış değişimleri ve aktive edici virüs ile transdükte olan VMH alan korelasyonu	36
Şekil 6.4.1: Anlık SF-1 nöral inaktivasyonu	38
Şekil 6.4.2: Uzun süreli SF-1 nöral inaktivasyon	39
Şekil 6.4.3: Davranış değişimleri ve inaktive edici virüs ile transdükte olan VMH alan korelasyonu	39
Şekil 6.5.1: rAAV-FLEX-taCasp3-TEVp virüsünün SF1-Cre farede ifadenin şeması.	40
Şekil 6.5.2: SF-1 nöral ablasyonunun besin tüketimine ve vücut ağırlığına etkisi	41
Şekil 6.5.3: SF-1 nöral ablasyonu ve besin tüketimi değişimi	41
Şekil 6.5.4: Nöral ablasyon sonucu anksiyete analizleri	42

TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.3.1: PZR Karışımı.....	23
Tablo 5.3.2: PZR Programı.....	24
Tablo 6.1.1: Deney grupları ve hayvan sayıları.....	33



RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.2.1: Elektrolitik lezyon sonrası sekizinci haftada obez albino sıçanlar	7
Resim 4.3.1: Dişi ve Erkek Farelerde VMH'e özgün SF-1 ifadenmesi.....	11
Resim 4.3.2: MSS'ye özgün silinmesi sonucu SF-1'a bağılı eGFP transgeni ifade eden nöronların yerleşimi	12
Resim 4.4.1: CNO aracılı DREADD aktivitesi ve nöral yanıtlar	15
Resim 4.4.2: Cre-LoxP işleyiş şeması	16
Resim 4.4.3: Hücre tipine özgün transgenik gen ifadenmesi.....	16
Resim 6.1.1: Cre ifade eden SF-1 erkek farelerin PCR görüntüsü	33
Resim 6.2.1: Lateks boncuklar ile VMH'in beyin içi enjeksiyon ile hedeflenmesi ..	33
Resim 6.3.1: hM3Dq-mCherry virüsünün SF-1 Cre farede ifadenmesi	34
Resim 6.4.1: hM4Di-mCherry virüsünün SF-1 Cre farede ifadenmesi	37

1. ÖZET

VENTROMEDYAL HİPOTALAMİK ÇEKİRDEKTE STEROİDOJENİK FAKTÖR 1 (SF-1) İFADE EDEN NÖRONLARIN BESLENME ÜZERİNE ETKİSİ

Obezite enerji alımı ve enerji harcanması arasındaki dengenin alım yönüne kayması ile gelişen önemli bir sağlık problemidir. Hipotalamustaki sinir ağlarının açlık ve tokluk hissini düzenlediği uzun zamandır bilinmektedir. Bu bölgede yer alan Ventromedyal hipotalamus (VMH) besin tüketiminde rol alan ve ‘tokluk’ merkezi olarak da bilinen bir çekirdektir. Enerji metabolizmasında ve glikoz dengesinden de sorumlu VMH’ye yapılan lezyon çalışmaları ve bu çekirdekte bulunan nöral alt grupların genetik manipülasyonu hiperfajiyile karakterize obeziteye yol açtığı kanıtlanırsa da anlık iştah yönetiminde VMH nöronlarının işleyişi sinaptik düzeyde halen bilinmemektedir. Bu tezde hücre tipine özgün farmakogenetik teknikler kullanılarak VMH steroidojenik faktör 1 (SF-1) ifade eden nöronların anlık ve uzun süreli iştaha etkileri incelendi. Aç hayvanlarda SF-1 nöronlarının kemogenetik aktivasyonu anlık besin tüketimini baskıladı ($p<0.005$). Tok hayvanlarda SF-1 nöronlarının kemogenetik inaktivasyonu sonucu anlık iştahta herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Öte yandan, SF-1 nöronları apoptoz aracılı hücre ölümü ile ablasyonu sağlanarak, iştahta uzun süreli bir artış ve bununla birlikte ilerleyen kilo alımı görüldü ($p<0.05$). Bulgular, SF-1 ifade eden VMH nöronlarının iştahı ve vücut ağırlığını çok sıkı olmayan bir şekilde kontrol ettiğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: VMH, SF-1, beslenme davranışı, vücut ağırlığı, kemogenetik

2. ABSTRACT

STEROIDOGENIC FACTOR 1 (SF-1) NEURONS IN THE VENTROMEDIAL HYPOTHALAMUS EFFECT ON FOOD INTAKE

Obesity is an epidemic disease which is caused by the imbalance between energy intake and energy expenditure. It has been known that there are neuronal circuits in the hypothalamic region of the brain regulating appetite and body weight. Ventromedial hypothalamus (VMH) is one of the earliest identified ‘satiety’ centers and has long been implicated in feeding behavior. Despite the large body of literature suggesting that genetic or anatomical lesions to this region are sufficient to drive obese phenotype, precise role of electrical activity in VMH neurons for acute appetite regulation is not clear. In this thesis, cell type specific pharmacogenetic manipulation tools have been used to investigate role of VMH steroidogenic factor -1 (SF-1) neurons in short term regulation of appetite. Results indicate that while chemogenetic activation of SF-1 neurons inhibit food intake in food deprived mice ($p < 0.005$), their inhibition does not result in significant food inhibition in sated animals. In addition, specific ablation of VMH^{SF-1} neurons resulted in increased body weight and food intake over a period of several months ($p < 0.05$). Collectively, these results suggest a permissive role for VMH^{SF-1} neuronal activity in short term regulation of food intake.

Keywords: VMH; SF-1; feeding behavior, body weight; chemogenetics

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite, birlikte seyreden hastalıklarla ölüm riskini artıran ciddi bir sağlık problemi olup insan popülasyonunun büyük bir kısmı etkilemektedir. Görülme sıklığı giderek artan obezite, yetersiz egzersiz, büyük porsiyonlar, yüksek kalori içerikli besin tüketimi ve dengesiz beslenme düzeni sonucu, alınan ve verilen enerji miktarındaki dengenin alma yönünde kayması sonucu gelişmektedir [1].

Vücutta enerji dengesi, merkezi (MSS) ve periferik sinir sisteminin (PSS) entegre olduğu bir haberleşme ağıyla düzenlenir. Enerji azalması ile gelişen besin tüketme ihtiyacı, organlardan beyine iletilen hormonal faktörlerin algılanması ile başlatılıp, gereken enerji elde edildiğinde buradan bir geri bildirim ile durdurulur.

Ventromediyal Hipotalamus (VMH), ağırlıklıla eksitator nöral alt grupların bulunduğu ve aktivitesine bağlı olarak açlık ve tokluğu yönlendirebilen, üçüncü ventriküle (3V) bitişik hipotalamik bir çekirdektir [2]. Barındırdığı nöral alt grupların tokluk hormonu insülin ve leptine ve de açlık hormonu ghrelin'e duyarlıdır [3, 4].

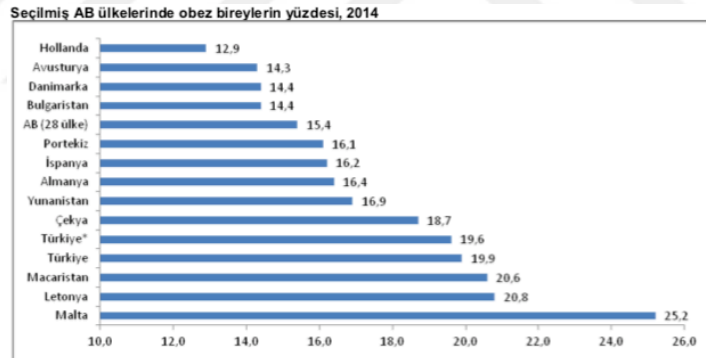
VMH'e özgün elektrolitik lezyonlar ve kimyasal infüzyon çalışmaları, kandaki glikoz ve insülin seviyesi dengesizlikleriyle seyreden hızlı kilo alımı ve yüksek iştah ile karakterize obeziteye neden olmuştur [5-8]. Neredeyse tüm hipotalamusu kapsayan ve üçüncü ventrikülün parçalanmasına neden olan bu lezyonlar, VMH'in bir çekirdek olarak enerji durumunu nasıl düzenlediğini açıklamamaktadır [9].

Halen, VMH'in açık ve tokluğa nasıl etkideği tüm vücutta ve sinaptik seviyede ayrıntılı olarak bilinmemektedir. Günümüz teknolojisi, tüm beyin bölgelerinde olduğu gibi, VMH'in ve burada yerleşik nöral alt grupların enerji dengesini ve beslenmeyi düzenleyici görevlerini moleküler düzeyde araştırabilmeye imkân tanımaktadır. Bu tezde, VMH'teki eksitator Steroidojenik Faktör 1 (SF-1) ifade eden nöronların anlık ve uzun süreli enerji ihtiyacı durumlarında beslenmenin merkezi kontrolündeki rolü incelenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Obezite

Dünya Sağlık Örgütü 2014 verilerine göre dünya popülasyonunun %39'u vücut kitle endeksi (BMI) standartını üzerindedir (obez fenotip için $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$; aşırı kilo için $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) ve çocukluk çağındaki bireylerin vücut ağırlığı %30 oranında artmıştır. 2016 yılı TÜİK verilerine göre ise Türkiye'de obez bireylerin oranı %19,6'dır (Şekil 4.1.1). Dünyada obez fenotipin erkek ve kadınlarda görülme sıklığı Şekil 4.1.2'deki gibidir. Beslenme düzeyinde büyük porsiyon, yüksek kalori içeriği ve yemek yeme süresindeki düzensizler ile birlikte obez fenotip daha sık ortaya çıkmaktadır. Bu olumsuzluklara ek olarak gelişen teknoloji, sözde hayat kolaylaştırıcı unsurların bolluğu ve az veya yetersiz egzersizden dolayı enerji tüketiminin azalması sonucu daha da ciddileştirmektedir. Yalnızca kilo alımıyla kalmayıp, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser, hipertansiyon, inme, osteoartrit, iskelet sistemi bozukluklarına da yol açmaktadır. Hem metabolik hem de davranışsal bozukluklara yol açan obezite, insan geleceğini temelden sarsan, ciddi bir sağlık sorunudur.



*2016 yılı verisidir.

Şekil 4.1.1. TÜİK güncel obezite verileri

Fig. 7.2 Age-standardized prevalence of obesity in women aged 18 years and over (BMI ≥ 30 kg/m²), 2014

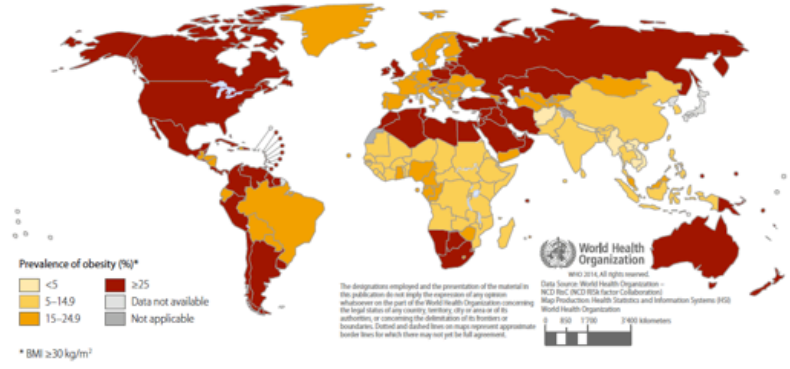
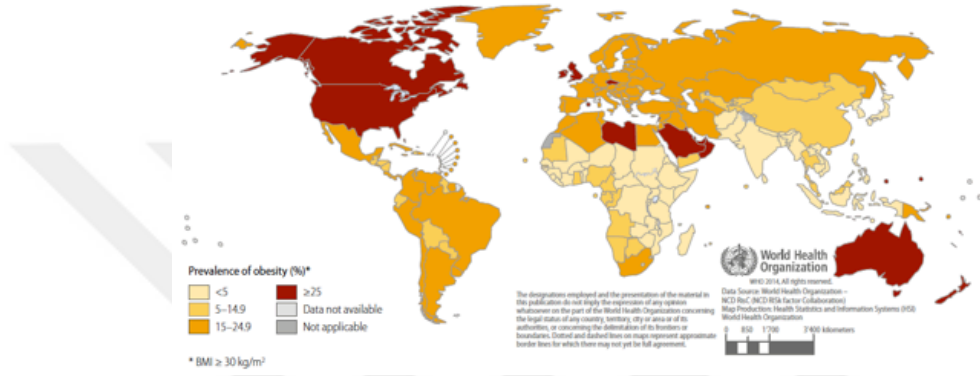


Fig. 7.1 Age-standardized prevalence of obesity in men aged 18 years and over (BMI ≥ 30 kg/m²), 2014



Şekil 4.1.2: Dünya Sağlık Örgütü 2014 obezite verileri

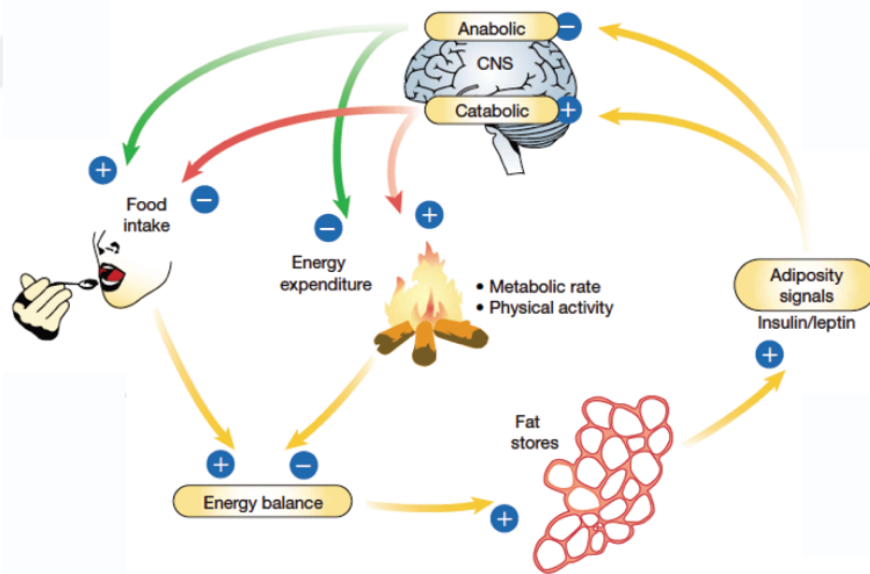
Merkezi ve periferik sinir sisteminin birlikteliği ile yönetilen enerji metabolizmasının, bozukluğu durumlarında hangi sistemlerin nasıl etkilendiği ve sistemlerdeki ne tip bozukluklar ve/veya hatalı işleyişler nedeniyle ortaya çıktığı net bir şekilde bilinmemektedir. İnsan metabolizmasının karmaşık işleyişi nedeniyle, sorunun odağı kolaylıkla tespit edilememektedir. Günümüzde genetik alanındaki gelişmeler sayesinde bu eksiklikler hızla tamamlanıp teorik olarak gün ışığına çıkarılmaya başlanmıştır. Model organizmalar kullanılarak, insan sağlığını olumsuz etkileyen hastalıkların kaynağına ulaşmak kolaylaşırken, tedavi yöntemleri de şekillenmektedir. Obezite gibi kalıtsal veya dış etkenlerin etkisiyle gelişebilen bir sağlık probleminin çözümünde bu tip araştırmalar hem odağa hem de uygun tedavi yöntemine ulaşabilmeyi sağlamaktadır.

Açlık ve tokluk durumları ve bunlara ilişkin fizyolojik ve metabolik değişimlerin vücut tarafından nasıl kontrol edildiği halen netleşmemiştir. Beyinde hipotalamus bölgesi, beslenme için özelleşmiş sinir ağlarını içerir. Buradaki çekirdeklerin besin tüketimi veya tokluk açısından önemli bir yere sahiptir. Ancak moleküler düzeyde nasıl

çalıştıkları, diğer beyin bölgeleri ile olan ilişkileri, kendi içerisindeki çalışma prensipleri ve genel davranışa etkileri bilinmemektedir. Yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için bu ağların sinaptik bağlantılarının farmakolojik özellikleri araştırılmalıdır. Ancak bu sayede nöron düzeyinde beslenme davranışının beyin tarafından nasıl düzenlendiği ve de bozulması durumunda ne nelere yol açtığı belirlenebilir.

4.2. Ventromedyal Hipotalamus ve Beslenme

Hipotalamus hormonal ve sinirsel uyarıların vücutta enerji dengesini korumak üzere birleştirildiği beyin bölgesidir (Şekil 4.2.1) [10]. Periferden salınıp dolaşım yoluyla hipotalamusa ulaşan hormonlar (leptin, insülin, ghrelin vb.), anlık enerji durumunu bildirir. Buradaki elektriksel bilgi enerji dengesinin artırılması veya azaltılması yönünde gelişecek bir davranışın başlatılmasını sağlar.

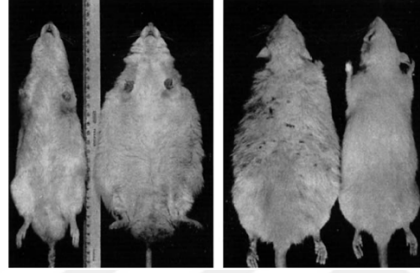


Şekil 4.2.1: Vücuttaki enerji dengesinin hem periferik hem de merkezi sistemlerin iletişimi ile düzenlenmesi[10]

1840'lı yıllarda obez kişilerin bazomedyal hipotalamik bölgelerinde yapısal anormallikler belirlenmiştir. Bu nedenle obezitenin başta hipofizyal kaynaklı bir endokrin sistem bozukluğu olduğu düşünülmüştür. Ancak bazomedyal hipotalamusu

etkilemiş tümörü olan kişilerde obezite gelişirken, hipofizi çıkarılan kişilerde herhangi ciddi değişimler gözlenmemiştir [2, 11]. Bu erken bulgular beslenme ve vücut ağırlığının kontrolünde hipotalamusun önemli bir yere sahip olduğunu göstermiştir.

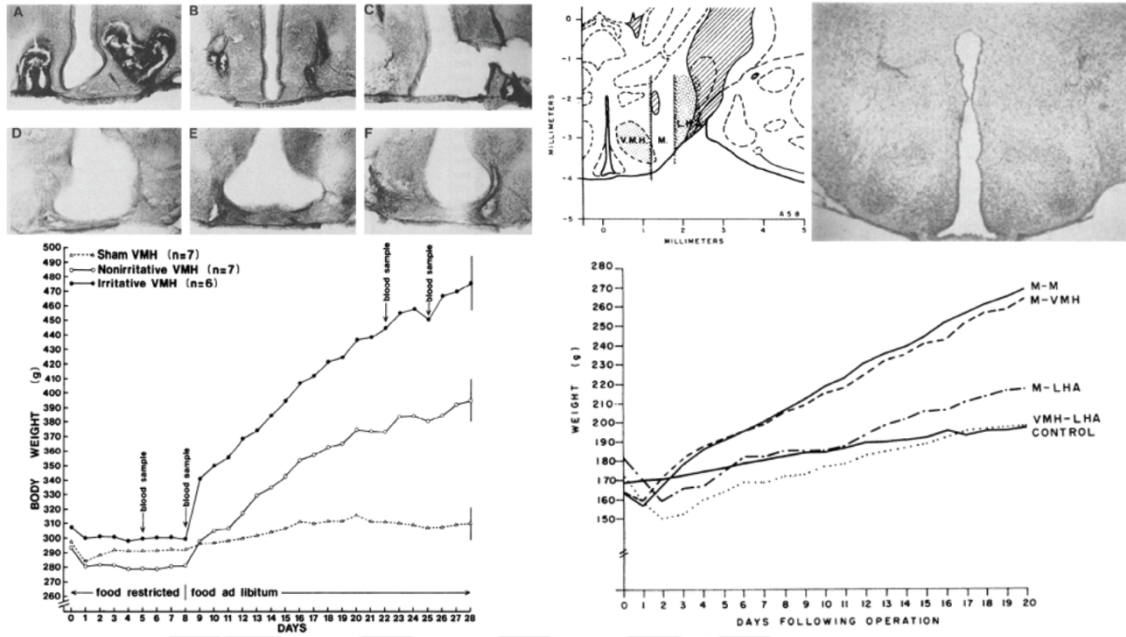
1940'lı yıllarında albino sıçanların VMH'ine yapılan elektrolitik lezyonlar sonrası aşırı besin tüketimi ve kilo alım gözlenmiştir (Resim 4.2.1) [12, 13]. Lezyon operasyonlarından hemen sonra görülebilen bu ciddi iştah artışı ve kilo alımıyla karakterize hiperfaji, VMH'i bir *'tokluk merkezi'* olabilme statüsüne taşımıştır.



Resim 4.2.1: Elektrolitik lezyon sonrası sekizinci haftada obez albino sıçanlar [12]

Lezyonlar, steryotaktik çerçevede, yetişkin albino sıçanların hipotalamuslarının farklı bölgelerine indirilen elektrotlar ile yapılmaktaydı. Bu oldukça invaziv ve iyileşme süreci zor olan bir tekniktir. Yapılan lezyonlardan sağ çıkabilen sıçan sayısı düşük olsa da hayatta kalanlarda operasyon sonrası hızlı bir iştah artışı ve kilo alımı gözlenmiştir [14, 15]. Tekniğin bir diğer dezavantajı ise lezyonlanan alanın doğru ve tutarlı olamamasıdır. Lezyonların bazıları lateral hipotalamik alana (LHA) yayılıp medyal hipotalamusu kapsarken bazıları üçüncü ventrikülü parçalayacak kadar geniş olmaktadır. Öyle ki, LHA lezyonları, VMH'in tersine, kilo kaybı ve iştah kesilmesi ile karakterize afajiye neden olmaktadır ve dolayısıyla bölge *'açlık merkezi'* olarak tanımlanmıştır [5]. Bir yandan *'merkez'* statüleri üzerine çalışmalar sürdürülürken, bir yandan lezyon tekniklerin invazivliği ve hayatta kalan sıçanlar ile elde edilen bilginin kısıtlı veya yanıltıcı olabileceği tartışılıyordu. İnvaziv olmayan yöntemler ile *'açlık-tokluk'* merkezleri araştırıldığında görülmüştür ki, VMH'in sadece medyal kısmı veya

sadece ventral kısmından geçen nöradrenerjik fiberlerin hasarlanmasına bağlı gelişen hiperfajik obezite söz konusuydu (Şekil 4.2.2) [5, 9, 16].



Şekil 4.2.2: VMH'e özgün elektrolitik lezyonlar (sol) ve çelik bıçak indirme (sağ) yöntemlerine göre albino sıçanlarda kilo alımı [5, 16]

Adipoz doku tarafından salgılanan ve hipotalamik bölgeleri elektriksel düzeyde etkileyen leptin ve insülin, vücuttaki anlık enerji bilgisini ileten hormondur. Artan leptin seviyeleri, yüksek beyaz adipoz doku miktarı ile doğru orantılı olup, hipotalamusa da beslenmenin durdurulup enerji tüketimine geçilmesi gerektiğini bildirir [17]. VMH ise bu hormonların reseptörünce zengin bir hipotalamik çekirdektir. [2, 4].

İnvaziv olmayan tekniklerle VMH lezyonları sonrası kanda serbest dolaşan anormal seviyelerdeki insülin ve glikoz tespit edilmiştir. Normal besin (*chow diet*) tüketen lezyonlu sıçanlarda kilo artışına paralel gelişen hiperinsülinemi ve hipoglisemi gelişmiştir [8, 18]. Glikoz baskılayıcısı olan goldthioglucose'un VMH'e verilmesini takiben hiperfajik bir fenotip ortaya çıkmaktadır [19]. Ayrıca periton içine (*i.p.*) glikoz enjeksiyonu, özellikle VMH'teki glikoz radyoaktivitesini de yükseltmiştir [20]. VMH'in elektriksel uyarımı sonucu, ısı artışı ve yağ metabolizmasının hızlanması ile karakterize artmış kahverengi yağ dokusu (BAT) aktivitesi de rapor edilmiştir [21, 22].

Nöroendokrin yanıtların oluşturulmasındaki bozukluklara da işaret eden bu durum, hipotalamik-hipofizyal bir eksenle beslenmenin düzenlendiğine dair ipuçlarını ortaya çıkarmıştır.

VMH’te elektriksel aktiviteyi başlatacak humoral faktörlerin yanı sıra, nörotransmitter bazlı iletişime dair çok az veri vardı. Çalışmalar genellikle bu bölgeye belirli uyarıların verilmesi şeklindeydi. Gerçekten de uyarıcı bir nörotransmitter olan glutamatin VMH’e verilmesi ile BAT’tan ısı üretiminin arttığı rapor edilmiştir [22]. Bu sinyalleşmenin bozulması durumunda ise yüksek iştah, düşük enerji tüketimi ve obezitenin gelişmektedir. Yani VMH’deki glutamaterjik sinyalleşmenin enerji metabolizmasının doğru işleyebilmesi için şart olduğunu göstermiştir. VMH’i çevreleyen fiber ağlar norepinefrin (NE) ve dopaminerjik (DA) terminallerce zengindir ve dendritlerine sinaps yaparlar. Hipoglisemide VMH’te NE konsantrasyonu artmıştır. Yükselen DA konsantrasyonu ile sık aralıklarla ve aşırı besin tüketimi arasında doğru bir orantı vardı [23]. Gamma-aminobütirik asit (GABA) VMH’te önemli bir role sahiptir. VMH’i çevreleyen duvarlardaki GABAerjik fiberler, VMH ve LH arasında baskılayıcı temelde bir iletişimi sağlarlar [24]. NE gibi, VMH’te artan GABA konsantrasyonları da hipoglisemi ile ilişkilidir [25].

4.3. Ventromedyal Hipotalamus, Steroidojenik Faktör 1 ve Beslenme

Lezyon ve infüzyon çalışmalarından edinilen yetersiz bilgi, geliştirilen teknikler sayesinde tüm beyin bölgelerinde olduğu gibi VMH ve içerisindeki nöral grupların moleküler düzeyde araştırılmasıyla giderilmektedir. Başlarda hem yetişkin hem de embriyonik dönem VMH’inde yapısal gelişim ve fonksiyon kazanmada belirteç görevi gören kilit genler ve gen ifadenme kalıpları incelenmiştir. Günümüzde ise, nöral alt grupların hem kendi başlarına hem de yer aldıkları yollardaki görevlerine göre, sinaptik düzeyde VMH’in nöral ağlarına dair ayrıntılı bilgilere ulaşılabilmektedir.

Steroid hormonlar kolesterolden sentezlenir ve fetüsten yetişkinliğe birçok gelişimsel ve fizyolojik işleyişi düzenler. 1930 yılında kimyasal yapısının tanımlanmasıyla steroidogenez yolları da incelenmeye başlanmıştır. 1980 yılında farklı hayvanlardan steroidojenik enzimler izole edilip cDNA klonlamaları yapılmış ve steroidojenik reaksiyonlardan daha az sayıda steroidojenik enzim olduğu görülmüştür [25]. Yani

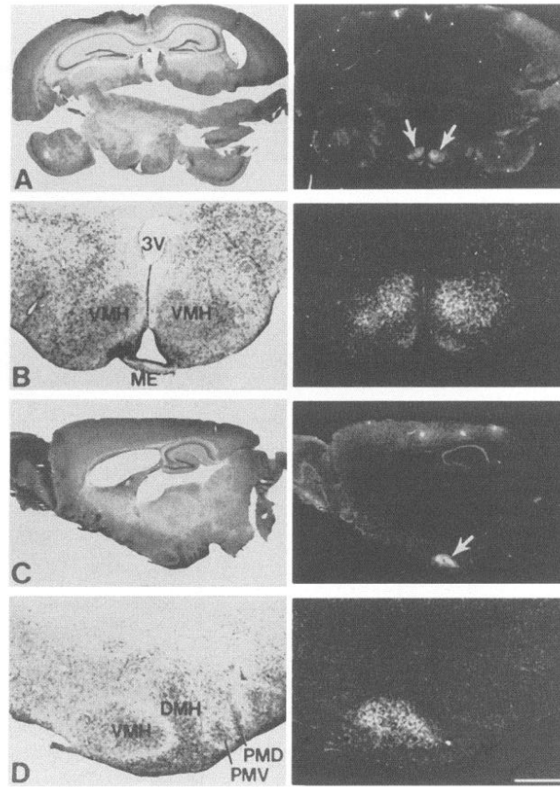
çoğu durumda, bir steroidojenik reaksiyon tüm dokularda aynı enzim tarafından katalizlenir. Steroidlerin farklı fizyolojik kategorilerinin (androjen, östrojen ve mineralokortikoidler ve glukokortikoidler) görevleri ancak steroid hormon reseptörlerin tanımlanması ile ortaya çıkmıştır.

Çoğu steroidojenik enzim, sitokrom oksidaz P450 ailesindedir. İnsanda 57 tane sitokrom P450 ifadeleyen gen bulunur ve 7 tanesi mitokondriye, 50 tanesi de endoplazmik retikuluma hedeflidir [26, 27]. Adrenal korteksten sentezlenen kortikosteroidler, P450 enzimleri ile aktivite gösterebilir. Kolesterol yan zincir yıkım enzimi (Cyp11a, P450_{scc}) tüm steroid kökenli dokulardan sentezlenerek, steroidlerin sınırlı sürede üretimini katalize eder. Steroid 21-hidroksilaz (21-Ohase, Cyp21) ise mineralokortikoidler ve glukokortikoidlerin sentezinden sorumludur. Farede steroid 21β-hidroksilaz, adrenal bezden ifadelenen iki izoenzime sahiptir. 11β-hidroksilaz (11β-Ohase, Cyp11b-1), korteksin iç kısmında ifadelenecek, deoksikortikosteronun 11β-hidroksilasyonu ile kortikosterona (glukokortikoid) dönüşümünü sağlar. Aldosteron sentaz (AS, Cyp11b-2) izozimi ise, glomerulozanın dışından sentezlenir ve üç ardışık reaksiyonu katalize ederek aldosteronu (mineralokortikoid) oluşturur. Kolesterol sentezindeki genetik anormallikler ve metabolizmasındaki bozukluklar öncelikli olarak hipertansiyon ve adrenal yetmezliğe yol açarken demansı da tetikleyebilir. Ayrıca mikrosefali, gelişim geriliği, atipik yüz, kardiyak anormallikleri ve az gelişmiş erkek genital bölge de yansımaları arasındadır.

Büyük baş hayvanların adrenal bezlerinden alınan çekirdek özütlerinde, *NR5a1* geni tarafından kodlanan ve steroidojenik faktör 1 (SF-1/Ad4BP) olarak isimlendirilen steroidojenik düzenleyici enzimlerle etkileşen bir protein elde edilmiştir. Yüksek miktarda ifadelenmesi sayesinde DNA kolonileri oluşturulmuş ve SF-1'in adrenal kortekste tüm steroidojenik enzimlerle koordineli biçimde ifade edildiği görülmüştür [28]. İnsanda *SF-1* mutasyonları, orta ila ciddi düzey arası fenotiplere yol açar. Adrenal ve gonadal hasarları ile dikkat çekerken, özellikle Gly-146 pozisyonundaki mutasyon, obeziteye eş insülin duyarlılığı ve tip 2 diyabet de görülmektedir. Ancak SF-1'in doğrudan vücut ağırlığının düzenlenmesinde hangi metabolik yollarda ve nasıl etkili olduğu ise bilinmemektedir. Farede Ad4 olarak temsil edilen SF-1 proteinini yine steroid kökenli enzimlerin gen dizisinin promotör bölgesi ile birlikte koordineli ifadelendirir. Ayrıca, SF-1'in fare homologu Ad4 RNA'sı hipotalamusun geliştiği ventral

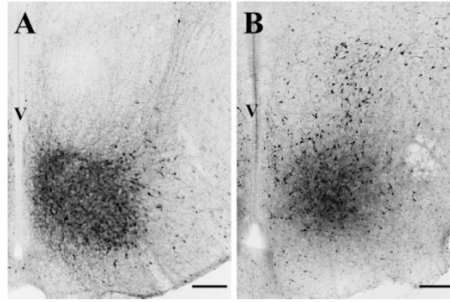
diyensefalonda da görülmüştür. Hipotalamusta SF-1 ifadenmesi embriyonik dönemin 14,5'cu gününde belirgin şekilde görülür [29]. Bu bulgular, hipotalamik-hipofizyel-steroidojenik bir ekseninin varlığına işaretir. Bu eksinin varlığını güçlendirecek düzeyde bir diğer bulgu ise farede *Ftz-F1* (SF-1 kodlayıcı gen) ifadesinin bozukluğuna bağlı gelişen gonadotropik markör Luteinleyici-hormon β (LH β), folikül-uyarıcı hormon β (FSH β) ve gonadotropin-salgılayıcı hormon reseptörü (GnRH) eksikliğidir [30]. SF-1 ifadesinin üreme fonksiyonu ve gelişim için olmazsa olmazdır.

Hipotalamusun yapısal gelişimi ve fonksiyonu açısından nasıl bir etkiye sahip olduğu araştırıldığında SF-1 ifadesinin VMH ile kısıtlı olduğu görülmüştür (Resim 4.3.1) [31]. Doğum sonrası birinci gün itibariyle SF-1 kodlayan *Ftz-F1* geninin yokluğu, VMH yapısal bütünlüğünü bozar ve SF-1 nöronlarının eksikliğine neden olmaktadır.



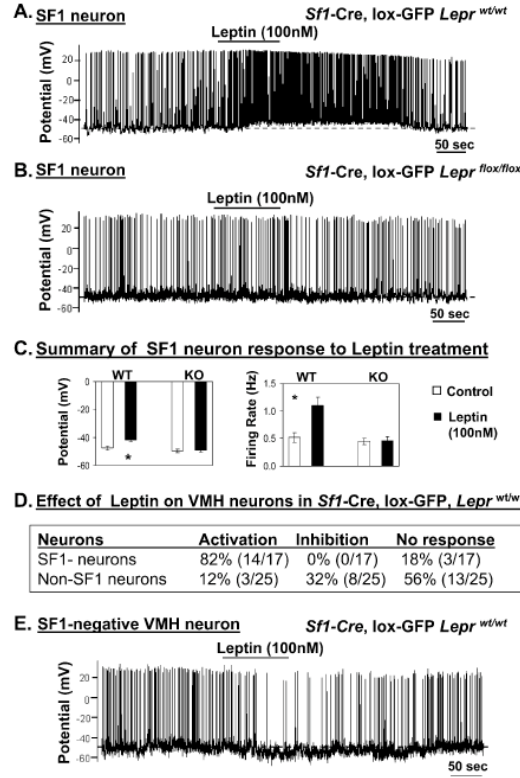
Resim 4.3.1: Dişi ve Erkek Farelerde VMH'e özgün SF-1 ifadenmesi. A-B. Dişi fare hipotalamusunun koronal kesitinde SF-1 ifadesinin kristal viyole boyama (sol) ve karşı-zincir hibridizasyonu ile gösterilmesi (sağ). C-D. Erkek fare hipotalamusunun sagittal kesitinde SF-1 ifadesinin kristal viyole boyama (sol) ve karşı-zincir hibridizasyon ile gösterilmesi (sağ) [31]

SF-1 nakavt doğan hayvanlarda gonad ve adrenal bezlerin yokluğuna bağlı ölümler gerçekleşmektedir [30-33]. Bu hayvanlara doğum sonrası adrenal bez transplantasyonu yapıldığında ise geç dönem başlangıçlı obezite gözlenmiştir. Beyaz yağ dokusu artışı ve enerji tüketiminin azalması nedeniyle gelişen obez fenotipin, transplantasyon sonrası aşırı glukokortikoid üretiminden olmadığı, kontrollere göre değişmeyen kortikoid seviyeleri ile ispatlanmıştır [33]. Nakavt farelerde yeşil floresan protein (GFP) ile ifade edilen SF-1 geni için hücresel pozisyonlanmanın bozulduğu gözlenmiştir (Resim 4.3.2) [34]. Hücre sayısı etkilenmese de yerleşimleri ve son farklılaşma sürecindeki nöral göçte bozukluklar gözlenmiştir. Bu etki, periferik steroid hormonların yönlendirmesinden bağımsızdır.



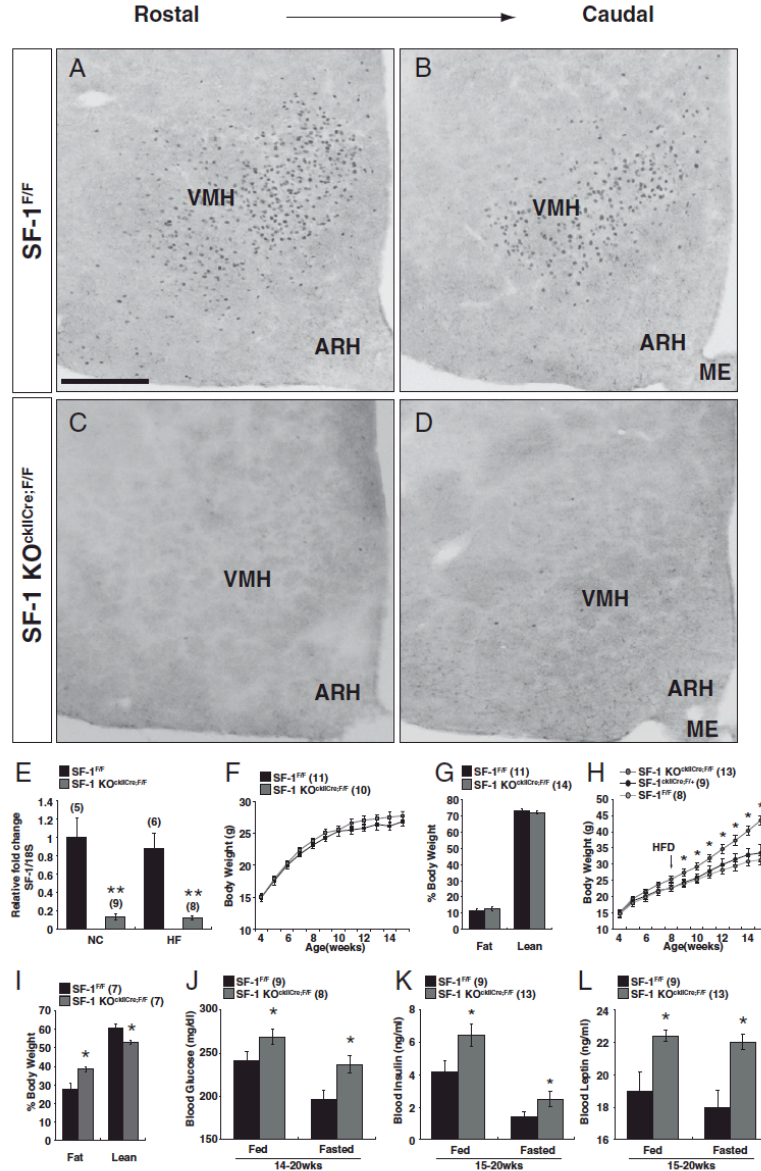
Resim 4.3.2: MSS'ye özgün silinmesi sonucu SF-1'a bağlı eGFP transgeni ifade eden nöronların yerleşimi. A. Yabanıl tip farede immünreaksiyon ile işaretlenen eGFP ifade eden SF-1 nöronları. B. Nakavt farede immünoreaktif işaretlenen eGFP ifade eden SF-1 nöronları. Skala 100um [34]

LepR geninin silinmesi sonucu görülen hiperfajinin yanı sıra, termoregülasyon, karaciğer ve yağ doku genişlemesi ve glikoz oksidasyonunda düşüş gözlenir. ARC, DMH ve LHA'a ek olarak, VMH'te de *LepR* ifadesi oldukça fazladır [4, 35, 36]. Cre/loxP şartlı gen nakavtı ile VMH^{SF-1} nöronlarına özgün *LepR* gen ifadenmesi silindiğinde, yüksek yağlı beslenen fareler daha kesin bir obez fenotip ortaya koymuştur. Ayrıca leptin reseptörden yoksun SF-1 nöronlarının depolarizasyon sonucu nöral ateşlenmesi baskılanmıştır (Şekil 4.3.1) [37].

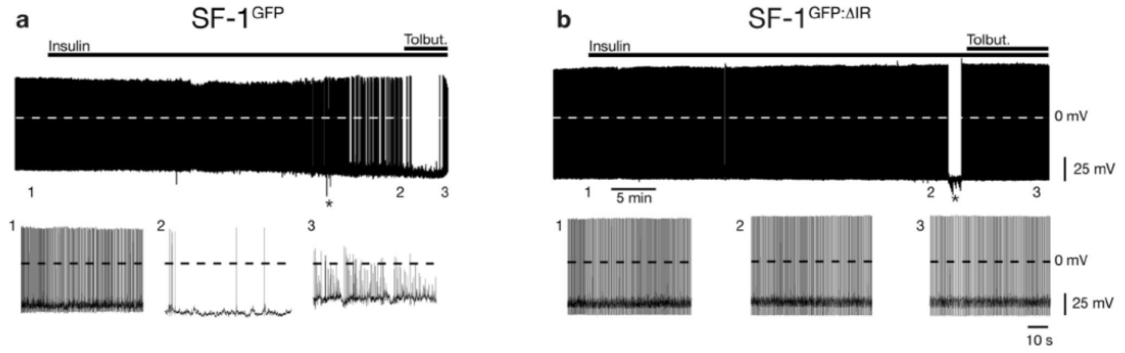


Şekil 4.3.1: VMH^{SF-1} nöronlarının elektrofizyolojik kayıtları A. yabancı tip Sf1-Cre, lox-GFP Lepr ifade eden farede leptin varlığında artan SF-1 nöronu aksiyon potansiyel frekansı kaydı. B. Nakavt Sf-1-Cre lox-GFP Lepr farede leptine duyarsızlaşan SF-1 nöronu aksiyon potansiyel kaydı. C. İstatistiksel olarak yabancı tip ve nakavt farelerin leptine yanıtı. D. SF-1 ifade eden ve etmeyen VMH nöronlarının leptine yanıtları. E. Yabancı tip farede SF-1 ifade etmeyen VMH nöronların leptine yanıtı. *p<0,05, student's t-test. [37].

Yağ oranınca düşük, normal besin ile beslenen nakavt ve yabancı tip farelerde ne kilo artışı ne de iştah artışı görülmezken, yüksek yağlı besine geçirilen hayvanlarda yağlanma hızlanmış ve kilo artışı gözlenmiştir. Bu hayvanlarda yabancı tipe göre yüksek leptin, insülin ve glikoz seviyeleri tespit edilmiştir (Şekil 4.3.2) [38]. SF-1 nöronlarında leptin reseptörü kontrollü beslenme ve enerji dengesinin sağlanması açısından şarttır. VMH'teki nöral aktiviteden sorumlu bir diğer metabolit ise insülin ve SF-1 nöronlarında reseptörü bolca bulunur. Yüksek yağlı beslenen farelerde, hiperinsülinemi gösteren hayvanların SF-1 nöronlarında hiperpolarizasyonu artmıştır ve bu da POMC nöronlarına giden sinaptik bilginin kesilmesiyle glikoz toleransına ve obeziteye yol açar (Şekil 4.3.3) [39].



Şekil 4.3.2: VMH’te yabancı tip ve nakavt SF-1 ifade eden farelerin besin içeriğine ve beslenme durumuna bağlı uzun süreli etkileri. A – D. SF-1’in VMH’te silinmesi (skala 200µm). E. Normal ve yüksek yağlı besin tüketiminde yabancı tip ve nakavt farelerin SF-1’in ifadeleme seviyeleri (her bir fenotip için n=8). F. Erkek farelerin normal besin tüketimine bağlı vücut ağırlığı değişimi. G. Normal besin tüketen yabancı tip ve nakavt farelerde yağlı ve yağsız vücut kitlesine ağırlık değişimleri. H. İki farklı genetik yapıya yabancı tip ve SF-1 nakavt erkek farelerde yağlı besin tüketimi öncesi ve sonrasında vücut ağırlıkları. I. Yağlı besin tüketen yabancı tip ve nakavt farelerde yağlı ve yağsız vücut kitlesine göre ağırlık değişimleri. J-L. 8. haftadan itibaren yağlı besin tüketen yabancı tip ve nakavt farelerin açlık ve tokluk durumlarında sırasıyla kandaki glikoz, insülin ve leptin seviyeleri. (*p<0.05 ve **p<0.01, Student’s t-test) [38].

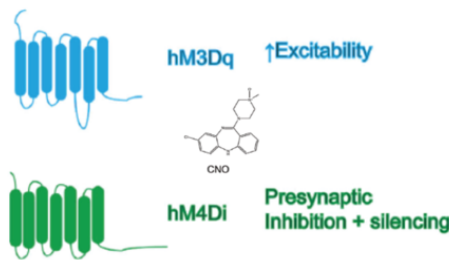


Şekil 4.3.3: İnsülinin VMH^{SF-1} nöronlarının elektriksel aktivitesine etkisi. A. İnsülin reseptörü içeren SF-1 nöronlarına insülinin etkisi. B. İnsülin reseptörü silinmiş SF-1 nöronlarına etkisi [39].

4.4. VMH^{SF-1} nöronlarının kemogenetik ve optogenetik manipülasyonları

Günümüzde kemogenetik ve optogenetik yöntemler ile, beyindeki herhangi bir bölgedeki nöral bir alt grubun hücreye özgü anlık veya uzun süreli manipülasyonları yapılabilmektedir.

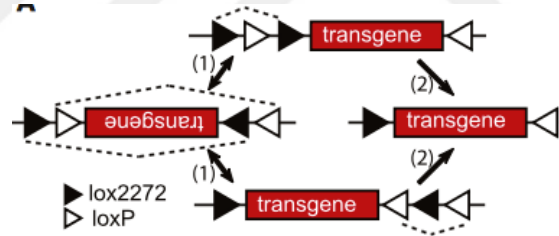
Hücrelerin yanıt oluşturma yolağındaki görevleri iyi bilinen G protein kaplı reseptörler (GPCRs) farmakolojik olarak kolayca hedeflenmektedir. Muskarinik reseptörler (M1-M5) üzerinden aktiflenen inhibitör ($G_{i/o}$) veya aktivatör (G_q) GPCR yolları uygun hücresel yanıt başlatılır. Asetil kolin (ACh), bir nöronda G proteinin uyarıcı doğal bir nörotransmitterdir. DREADD (İlaç yoluyla aktiflenen dizayn edilmiş reseptörler) olarak kısaltılan kemogenetik yaklaşımda, muskarinik ACh reseptörler (mAChR) farmakolojik olarak yan etkileri indirgenmiş Clozapine-N-oxide (CNO) tarafından uyarılır ve takip eden G protein yolağını başlatır (Resim 4.4.1) [40].



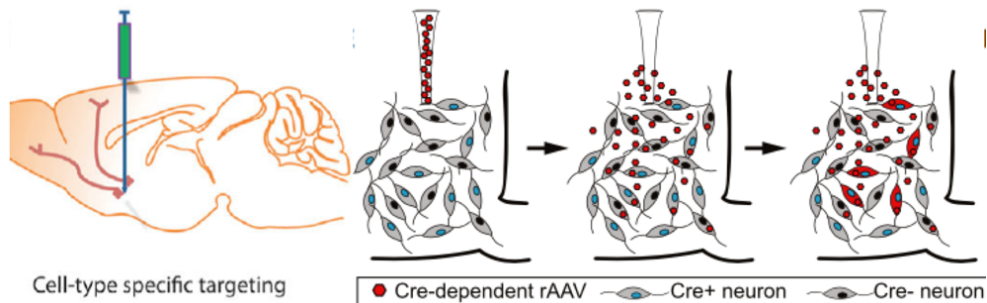
Resim 4.4.1: CNO aracılı DREADD aktivitesi ve nöral yanıtlar [40]

Muskarinik reseptör-1, -3 ve -5' göre tasarlanmış aktive edici hM3Dq DREADD'ler düşük doz CNO ile uyarılır ve hücre içi kalsiyumun artması sonucu depolarizasyon gerçekleşir. Muskarinik reseptör- 2 ve -4'e göre tasarlanmış inaktive edici hM4Di DREADD'ler CNO ile uyarıldıklarında ise ya K⁺ kanalları açılıp bir önceki sinapstan nörotransmitter salınımı baskılanarak hücrenin hiperpolarizasyonu gerçekleşir [41]. CNO'nun periton içinden uygulanmasıyla yaklaşık 45 dakika içinde, metabolize olmuş klozapin, kan beyin bariyerini aşıp DREADD ifade eden nöronları reseptör düzeyinde uyarır.

Cre bakteriyel bir rekombinaz enzimidir. 34 baz çiftlik LoxP dizisi Cre rekombinaz enziminin tanıdığı bölgedir. Gen dizisinde LoxP bölgelerinin konumlanış yönlerine göre rekombinaz işlemi sonucu ters yöne çevrilir (Resim 4.4.2) [42]. Cre-bağımlı olarak bu şekilde ifade edilen DREADD ürünlerini taşıyan rekombinant adeno-asosiyasyon virüsleri (rAAV), Cre rekombinaz ifade eden transgenik farelerin beynine stereotaktik çerçeve kullanılarak enjekte edilir (Resim 4.4.3).

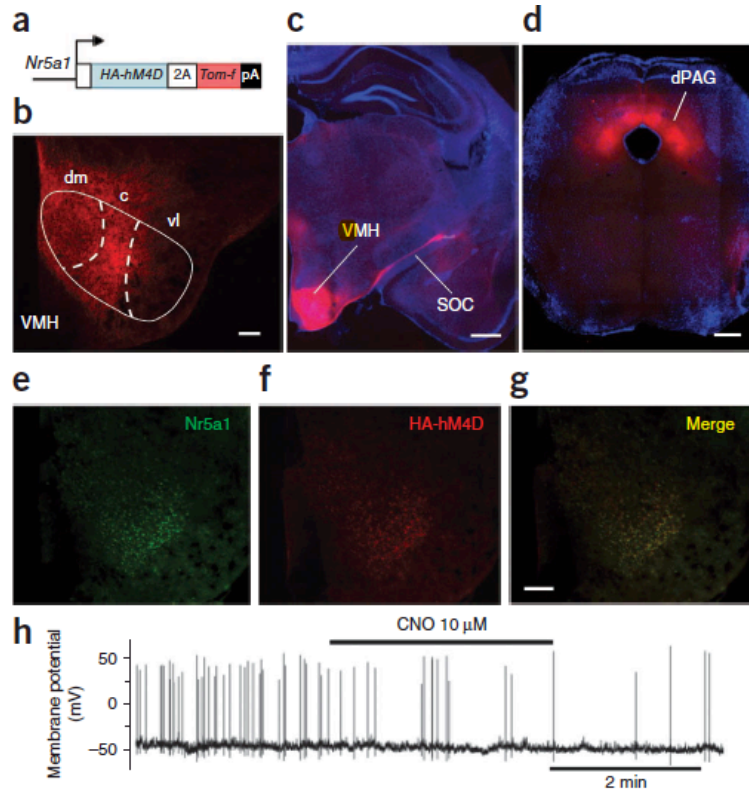


Resim 4.4.2: Cre-LoxP işleyiş şeması [42]



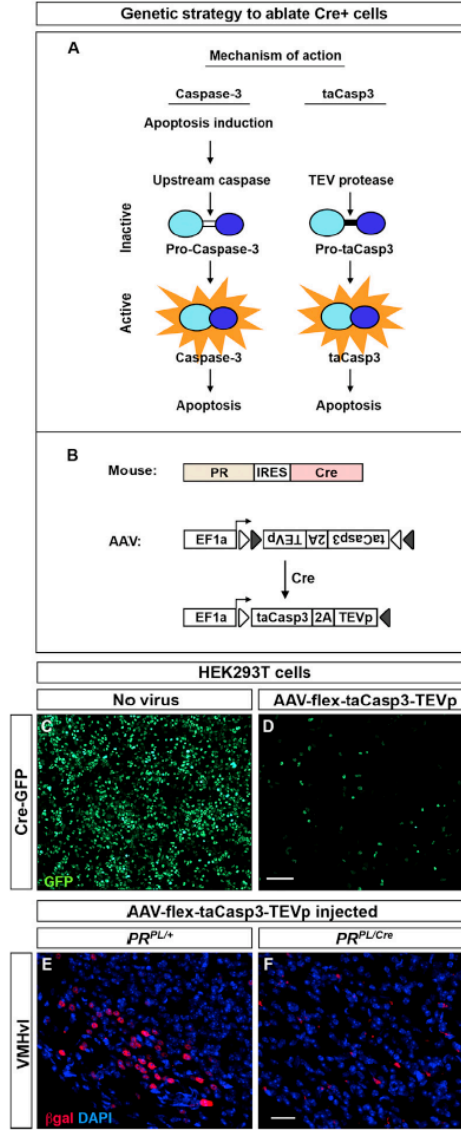
Resim 4.4.3: Hücre tipine özgün transgenik gen ifadenmesi [41, 42]

Silva ve arkadaşları, DREADD yöntemi ile kemogenetik olarak anlık nöral aktiviteyi değiştirerek yukarıda sözkonusu bilgi kısıtlamalarının indirgenebildiğini göstermişlerdir. dmVMH ve vlVMH'in kemogenetik inaktivasyonu, sırasıyla, bir yırtıcı veya avcıya karşı geliştirilecek kaçma yanıtını ve agresif bir sıçanla karşılaşıldığındaki donup kalma davranışını bozmuştur [43]. Ayrıca, *in vitro* olarak CNO aracılı SF-1 nöral inaktivasyon, dmVMH'deki spontan ateşleme ve membran potansiyelinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.4.1).



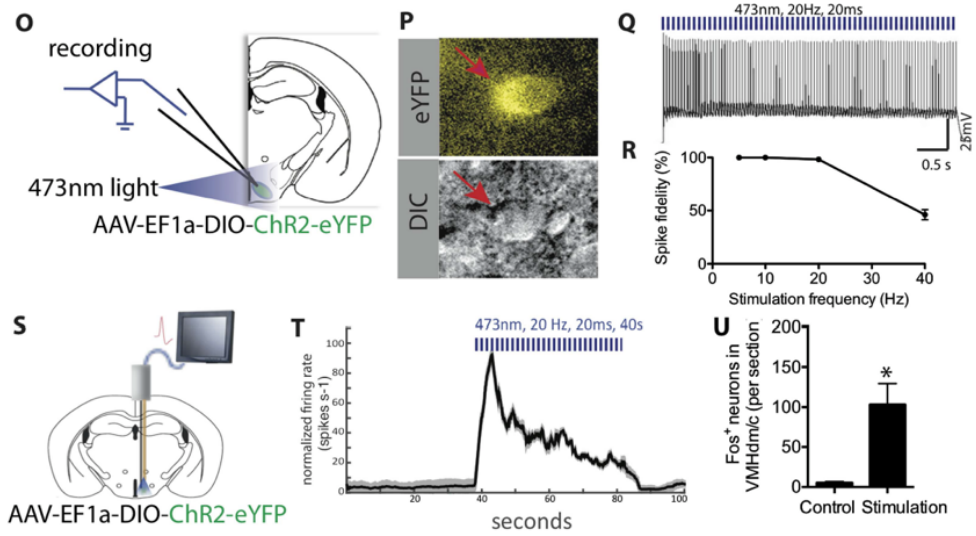
Şekil 4.4.1: *Nr5a1::hM4D-2A-tomatoF* transgenik farede gen ifadenme şeması. A. *Nr5a1* ile birlikte ifade edilen HA-hM4Di farmakogenetik nöral inhibisyon dizisine takiben Tomato floresan protein (Tom-f) ifade eden transgen. B-D. sırasıyla dm/cVMH, SOC ve dPAG'de Tom-f ifadesi. E-G. *Nr5a1* ve HA özgün çifte immünofloresan boyama. H. *Nr5a1::hM4D-2A-tomatoF* farenin *in vitro* beyin kesitlerine uygulanan CNO sonrası düşen aksiyon potansiyeli oluşum frekansı ve membran potansiyelinin patch-clamp elektrofizyolojik kaydı [43].

Progesteron reseptörü (PR⁺) ifade eden vlVMH nöronlarının taCasp3 aracılı apoptotik ablasyonu, erkek farelerde çiftleşme davranışı ve agresyonu azaltırken, dişilerde cinsel çekimi ortadan kaldırmıştır (Şekil 4.4.2) [44].



Şekil 4.4.2: Cre-bağımlı genetik yaklaşım ile nöral ablasyonu. A. Endojen prokaspaz 3 yıkımının üst düzey kaspazlarca parçalanması sonucu kaspaz-3 aracılı apoptoz tetiklenir. TEV bağlayıcı dizi içeren inaktif taCasp3 virüsünde ise Cre varlığına bağlı olarak apoptoz tetiklenir. B. PR⁺- Cre farede taCasp3 virüsünün cre bağımlı ifadenme şematığı. C-D. *in vitro* ortamda taCasp3 virüsünün kontrolü. E-F. PR⁺- Cre farelerde taCasp3 virüsünün kontrolü [44]

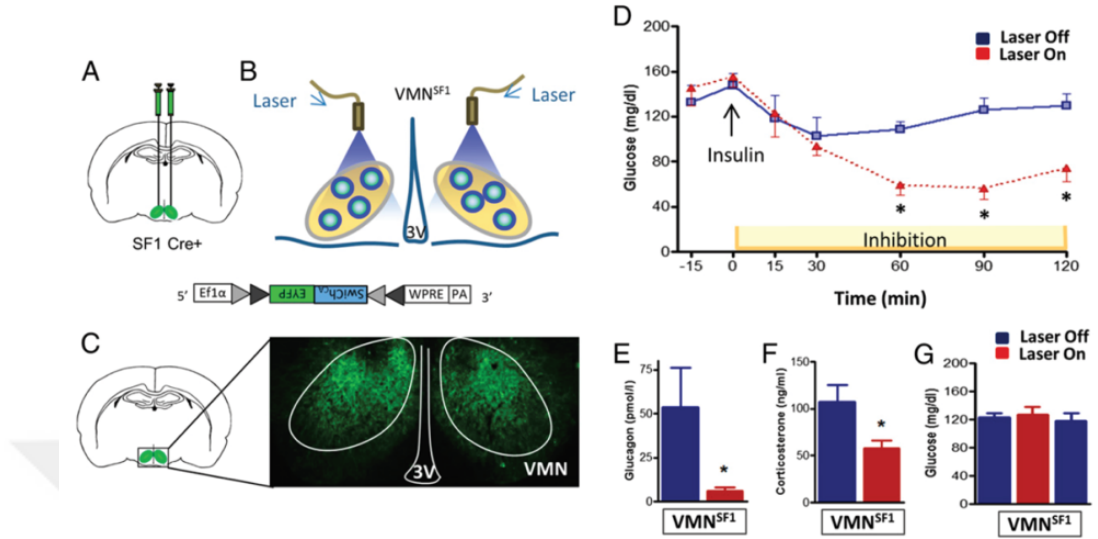
Optogenetik hücre grubuna özgün aktivite artırıcı ya da baskılayıcı manipülasyonlara izin veren bir diğer tekniktir. 473nm dalga boyunda ışığa duyarlı Channelorhodopsin-2 reseptörü (ChR2) ifadeleyen SF-1 nöronlarının uyarımı sonucu hücre içine Na⁺ akışı başlar ve hücre depolarize olarak eksitator frekansta sinyalleşmeyi tetikler. Tek hücre elektrofizyolojisinde, 20Hz'e kadar olan optogenetik uyarım sonucu SF-1 nöronlarının ateşleme sıklığını artmaktadır (Şekil 4.4.3) [45].



Şekil 4.4.3: Whole-cell patch clamp metodu ile ChR2 ifade eden VMH^{SF-1} nöronlarının ışık uyarımlı elektrofizyolojik kaydı. O. Elektrofizyolojik kayıt şeması. P. Kayıt alınan eYFP ile işaretli ChR2 ifade eden SF-1 nöronu. Q-R. 473nm, 20Hz uyarım ile artan ateşleme frekansı ve uyarım frekansına göre ateşleme yüzdesi değişimi. S. Canlı hayvanda elektrofizyolojik kayıt şeması. T. Uyarım ile aktiflenen ateşleme frekansının zamana göre değişimi. U. Canlı hayvanda nöral uyarıma bağlı cFos pozitifliği [45].

Hipoglisemi, diyabet tedavisinde aşılmaya çalışılan önemli bir aşamadır. Kandaki glikozu normal seviyeye getirebilmek üzere gerçekleşen artan glukagon, epinefrin ve glikokortikoidlerin salınımı ve insülin salınımının azaltılması gibi savunma mekanizmaları hipoglisemiye Karşı –Düzenleyici Yanıtları (CRR; *Counter Regulatory Response*) oluşturur. SF-1 nöronlarının Cre-bağımlı inhibitör ChR2 (SwiChR_{CA}) aracılı inaktivasyonu sonucu bu yanıtın oluşturulmadığı, düşük

glukagon ve kortikosteron seviyeleri ortaya koyulmuştur (Şekil 4.4.4) Geliştirilecek CRR için VMH^{SF-1} nöronlarının aktivitesi şarttır. [46].



Şekil 4.4.4: SF-1 nöronlarının optogenetik inaktivasyonu. A-C. Bilateral stereyotaktik inhibitör Chr2 (SwiChr_{CA}) enjeksiyonu ve fiber optik yerleştirilmesi. D-F. Hipoglisemik koşullarda periton içi insülin uygulaması sonrası nöral inaktivasyona bağlı glukagon ve kortikosteron seviyeleri değişimi. G. Bazal koşullarda nöral inaktivasyonu öncesi, sırası ve sonrası glikoz seviyeleri değişimi [46].

Kemogenetik ve optogenetik olarak SF-1 nöronlarının modülasyonu ile gelişen davranışlar ortaya koyulsa da uzun ve kısa vadede VMH^{SF-1} aktivitesinin iştah ve vücut ağırlığına etkisi bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, DREADD teknolojisi ile SF1-Cre farelerde, enerji durumuna bağlı olarak beslenmenin nasıl değiştiğini ve tüm bu değişimlerin vücut ağırlığına olan etkileri araştırılmıştır.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyal

293AAV Hücree hattı	(Cell BioLabs – AAV 100)
Agaroz	(BioRAD – 161305)
Amicon Ultra-15 100 membranlı santrifüj filtreler	(Millipore – GNUFC910024)
Anestezi cihazı	(Beyza Medikal)
Benzonase	(Sigma E8263-25K)
cFos Tavşan monoklonal antikor	(Cell Signaling - 2250)
Clozapine N-Oxide (CNO)	(Enzo Life Sciences – BML-NS105-0025)
ChemiDoc™ MP System	(BioRAD)
dNTP Mix	(Thermo Fisher Scientific - R0193)
Ear Tag	(Harvard Apparatus - 524716)
EndoFree Plazmit Maxi Kit	(Qiagen – 12362)
Eppendorf tüpler	(Eppendorf)
Fluoromount™ Mounting Medium	(Sigma – F4680)
Hidrojen Peroksit	(Sigma Adrich – H1009-5ML)
Keçi serumu	(Sigma Aldrich- G9023)
Keçi anti-tavşan IgG (H+L) 488 ikincil antikor	(Life Technologies - A11008)
Lateks Boncuk (kırmızı)	(Sigma Aldrich - L2778)
LB Agar	(Biomatik - A8523-500G)
Lb Broth	(Biomatik - A8523-500G)
Magnezyum Klorid (MgCl ₂)	(Sigma Aldrich – 208337-1KG)
Mikropipet	(Thermo Fisher Scientific)
Mikromanipulätör	(Narishige - SM-25C)
MicroPunch	(Harvard Apparatus - 340140)
Multi-therm Shaker	(Benchmark Scientific H5000-HC)
OneShot Stbl-2 Kompetan <i>E. Coli</i> hücre hattı	(Life Technologies – C737303)
OptiSeal Santrifüj şişeleri	(Thermo Fisher Scientific – 76003026)

Paraformaldehit	(Sigma Aldrich – 158127)
PBS (Fosfat-tampon çözeltisi – Salin)	(Multicell - 311-010-CL)
PCR tüpü	(IsoLab)
Primerler	(Sentegen, Ankara)
Rekombinant adeno-asosiye virüsler	(Addgene)
SafeView	(ABM G-108)
Santrifüj	(Orto Alsera – Biocen 22R)
Shutter P-1000 Mikropipet çekici	(Sutter Instruments)
Sonikatör	
SpektraMax	(Molecular Devices)
SteREO Discovery V8 mikroskop	(Carl Zeiss)
Sub-Cell ® GT Horizontal Electrophoresis Systems, 15× 10 cm Tray	(BioRAD – 1704401)
Sükroz	(Sigma Aldrich – 0389-5KG)
Steryotaktik Çerçeve	(David Kopf Instruments)
T100™ Thermal Cycler	(BioRAD- 1861096)
Taq Polimeraz	(Thermo Fisher Scientific - 10342046)
Tris-Hidrojen Klorür (Tris-HCl)	(Sigma Aldrich – 07066)
Triton X-100	(Sigma Aldrich – X100-500ML)
Vibratom VT1000S	(Leica)
Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskobu	(Carl Zeiss)

5.2. Transgenik Deney Hayvanları

012462 kodlu ve *Tg(Nr5a1-cre)7Lowl* alelik sembolü 2 erkek SF-1-Cre fare Jackson Laboratory tarafından sağlandı. SF-1 erkek fareler ikiye C57BL/6 dişi fare ile 15 gün çiftleşmeye bırakılmış ve sonra erkek fareler kafesten çekildi. Doğum sonrası 21.ci günde, yavruların kulaklarından 2 mm çaplı doku örnekleri alınarak genotipleme yapıldı. Deneyler genotiplemede SF-1 cre çıkan 42 transgenik erkek fare ile gerçekleştirilmiştir. Hayvan bakımı ve üretimleri İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi'nce (MEDİTAM) yapıldı. Tüm hayvan deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK) tarafınca onaylandı.

5.3. Genotipleme

5.3.1. DNA İzolasyonu

Kulaklarından 2mm'lik doku örnekleri alınan fareler, MicroPunch (Harvard Apparatus) kulak işaretçisi takılarak numaralandırıldı. Dokular 0.2ml'lik PCR tüplerindeki alkali lizis solüsyonuna (75 µL 25mM NaOH/0,2mM EDTA) atılıp, T100™ Thermal Cycler PZR cihazında 1 saatlik 98°C programda homojenize edildi. Çıkan dokular pipetaj ile mekanik olarak homojenize edildikten sonra üzerine 75µl 40 mM Tris/HCl (pH 5.5) eklenerek 5 dakika boyunca 4000 rpm hızda santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant DNA, 0.6ml'lik eppendorf tüplere aktarılıp kısa süre için +4°C'ye, uzun süre için -20°C'ye kaldırıldı.

5.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Tablo 5.3.1'deki sıra ile PZR karışımı hazırlanıp T100™ Thermal Cycler PZR cihazına optimize edilmiş programda (Tablo 5.3.2) DNA'lar çoğaltıldı. Heterozigot hattın SF1-Cre olduğunu belirten transgen dizi 650bp, Internal Positive Control (IPC) olarak belirtilen yabancı tip dizi 300bp ürün vermektedir. Hem Cre hem IPC bandını taşıyan heterozigot SF-1 erkek fareler deney için kullanıldı.

Tablo 5.3.1: PZR Karışımı

İÇERİK	Miktar
ddH ₂ O	14,375 µl
10X Tampon çözelti	2.4 µl
dNTP karışımı	0.5 µl
Primer A (SF1-Cre Forward transgene 5'-->3' CTGAGCTGCAGCGCAGGGACAT)	0.4 µl
Primer B (SF-1 Cre Reverse transgene 5'-->3' TGCGAACCTCATCACTCGTTGCAT)	0.4 µl
Primer C (IPC yabancı tip Forward 5'-->3' CAAATGTTGCTTGCTGGTG)	0.4 µl
Primer D (IPC yabancı tip Reverse 5'-->3' GTCAGTCGAGTGCACAGTTT)	0.4 µl
DNA	4 µl
MgCl ₂	2 µl
Taq Polimeraz	0.125 µl

Tablo 5.3.2: PZR Programı

ADIMLAR	Bilgiler
İlk ayırma	94°C 00:02:00
<i>Döngü 1</i>	94°C 00:00:20 65°C 00:00:15 (her döngüde 0,5°C düşüş) 68°C 00:00:10
TEKRAR < <i>Döngü 1</i> >	10 döngü
<i>Döngü 2</i>	94°C 00:00:15 60°C 00:00:15 72°C 00:00:10
TEKRAR < <i>Döngü 2</i> >	28 döngü
Son uzatma	72 °C 00:02:00
Soğuma	-4 °C (bekleme)

5.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

3 gr Agaroz, 100 µL 1X TAE (40mM Tris, 20mM Glasiyal Asetik Asit, 1mM pH: 7.6 EDTA) tampon çözelti içinde karıştırılıp 200°C’de kaynatılarak çözünmesi sağlandı. Sıcak karışımın üzerine 5µL SafeView nükleik asit boyası eklendi. Akan su altında ılıklaştırılan agaroz yükleme tarağı takılı elektroforez kasedine döküldü ve donduktan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerine tüm kasedi ve tankı kaplayacak şekilde 1X TAE tampon çözeltisi döküldü. İlk kuyucuk 5 µL DNA ladder yüklenirken, 2 µL DNA loading dye ve 8 µL PZR ürünü karıştırılarak diğer kuyucuklar dolduruldu. 100V’ta 45 dakika boyunca jelde yürütülen PCR ürünleri, ChemiDoc UV cihazında görüntülendi.

5.4. Doku Fiksasyonu ve Kesit Alımı

Deney bitiminde fareler anestezi altında kardiyak olarak perfüze edilmiştir. 10ml 1X PBS ile kalpteki kan boşaltıldıktan sonra fiksatif olarak %4’lük paraformaldehit (PFA) geçirildi. Farelerin beyini çıkarılıp önce +4°C’de 4 saat boyunca 4%PFA’da, sonra kesit alınca kadar %30’luk sükröz çözeltisinde +4°C’de bekletildi. VMH’i kapsayan hipotalamik kısım bistüri ile ayrılıp 70µM kalınlığında vibratom kesitleri alınarak görüntülenmek üzere ya doğrudan lam üzerinde kapatıldı ya da immünohistokimyasal boyama için 24-well petrilere aktarıldı.

5.5. İmmunohistokimyasal Antikor Boyaması

70µM'lik VMH kesitleri 15 dakikalık 3 tekrar şeklinde 1X PBS içerisinde yıkandı. Tüm sıvı çekildikten sonra, 1X PBS'te çözünmüş %0,1 Triton-X-100 ve %15 keçi serumu içeren bloklayıcı çözelti eklenerek oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Sıvı atıldıktan sonra, birincil antikor Tavşan anti-cFos 1X PBS'te çözünmüş %0,1 Triton-X-100 ve %5 keçi serumu içeren çözeltide 1/1000 oranında seyreltilerek beyin kesitlerine verilip gece boyu (16 saat) +4°C'de yatay olarak çalkalandı. Kontrol olarak beyin kesitlerinin birkaçı bu birincil antikoru içermeyen çözelti ile çalkalandı. 16 saatin sonunda kesitlerden sıvı atılıp, kesitleri 15 dakikalık 3 tekrar şeklinde 1X PBS yıkaması yapıldı. 1X PBS, %0,1 Triton-X-100 ve %5 keçi serumunda 1/1000 seyreltilmiş Keçi anti-Tavşan IgG (H+L) Alexa Fluor ® 488 antikor, kesitlere eklenerek, 1 saat boyunca oda sıcaklığında yatay olarak çalkalanarak inkübe edildi. Boyama bitiminde, 15 dakikalık 3 tekrar şeklinde 1X PBS yıkaması yapıldı ve kesitler pozitif yüklü lamlara aktarıldı. Kuruyan kesitler, üzerine Fluoromount kapatma sıvısı dökülerek lamellerle kapatıldı ve görüntüleninceye kadar +4°C'ye kaldırıldı

5.6. Mikroskopisi

İmmünohistokimyasal boyama yapılan ve yapılmayan tüm kesitlerin floresan görüntülemeleri Zeiss LSM 780 Konfokal mikroskobunda yapıldı.

5.7. rAAV Üretimi

Rekombinant adeno-asosiyasyon virüslerini yapmayı sağlayacak plazmitler Addgene (<http://www.addgene.com/>) üzerinden satın alındı. Plazmitler bakteriyel preparatlar, kompetan Stb13 *E.coli* 'ye transformasyonları yapılmış halde getirilmiştir.

Plazmid dizisini çoğaltmak üzere 35 g/L oranında dH₂O'da çözünmüş LB agar otoklavlanarak ılık halde üzerine 100 µg/ml ampisilin eklendi. 10 cm çapında petri kaplarının üçte ikisine kadar ampisilinli LB agar doldurulup donmaya bırakıldı. Bakteriyel plazmid preparatları soğuyan agar kaplarına yayılıp 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Oluşan bakteriyel koloniler öze ile toplanıp otoklavlanmış 20 g/L sıvı LB brota aktarıldı. 18 saat boyunca 37°C'de 250 rpm hızla çalkalanarak bakterilerin için uygun sayıya ulaşmaları sağlandı. Tüm brot 6000 rpm hızda 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi ve çökelti halindeki bakteriyel özüt elde edildi. Özüt bir

dahaki çoğaltımda kullanılıncaya kadar -80°C’de saklandı. Virüs yapımında gerekli yardımcı vektörler olan Helper ve vektör 2/1 için de aynı işlemler tekrarlandı. Dondurulan çözeltiler çözüldükten sonra Qiagen EndroFree Plasmid Maxi Kit ile DNA izolasyonu yapıldı ve elde edilen konsantrasyon SpektraMax cihazıyla kontrol edildi. Tüm bu işlemler izole edilen tüm plazmid DNA’ları için tekrarlandı.

293AAV hücre hattı 10^6 sayıda olacak şekilde 10x10 cm petri kaplarına ekilerek, 37°C’lik %5 CO₂ ve %20 O₂ koşullarındaki inkübatörlerde büyümeye bırakıldı. %80 doyumluk oranına ulaştığında pasajlanan hücreler transfeksiyona hazır hale geldi. Steril bir tüpte, yardımcı vektör Helper’dan 24 µg, vektör 2/1’den 20 µg ve istenilen transgeni ifade edecek diziyi içeren vektörden 12 µg olacak şekilde Opti-MEM transfeksiyon karışımı ve polietilenimin transfeksiyon ajanı karıştırıldı. Büyüyen hücreler üzerine eklenen karışım, 72 saat boyunca transfeksiyonu sağlamak üzere 37°C’lik %5 CO₂ ve %20 O₂ koşullarında inkübe edildi. Toplanan hücreler 4°C 1100 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen çökelti -80°C’de donduruldu.

Dondurulmuş çökelti 9 ml steril lizis içinde çözüldürülüp, önce %70 EtOH-kuru buz, sonra 37°C su banyosunda olmak üzere ikişer dakika bekletildi. İşlemler üç kez tekrarlanıp bir de üç dakika sonikatörde tutulup hücrelerin içindeki virüslerin serbest kalması sağlandı. Pürifikasyon için üzerine 1mM MgCl₂ ve 250U/ml Benzonase eklenip 4°C 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. 17%’lik çözelti (5ml 10x PBS, 0,05ml 1M MgCl₂, 0,125ml 1M KCl, 10ml 5M NaCl, 12,5ml Iodixanol ve 50 ml’ye kadar H₂O), 25%’lik çözelti (5 ml 10x PBS, 0,05ml 1M MgCl₂, 0,125ml 1M KCl, 20 ml Iodixanol, 0,1ml 0.5% fenol kırmızısı ve 50 ml’ye kadar H₂O), 40%’lik çözelti (5ml 10x PBS, 0,05ml 1M MgCl₂, 0,125ml 1M KCl, 10ml 5M NaCl, 33,3ml Iodixanol ve 50 ml’ye kadar H₂O) ve 60%’lik çözelti (0,05ml 1M MgCl₂, 0,125ml 1M KCl, 50ml Iodixanol, 0,025ml 0.5% fenol kırmızısı) hazırlandı. Sırayla 3 ml %60’lik çözelti, 5 mL %40’lik çözelti, 6 ml %25’lik çözelti, 6 ml %17’lik çözelti ve son olarak hücre lizatı, OptiSeal ultrasantrifüj tüpüne yavaşça şırınga edildi. 18°C 60000 rpm’de 90 dakika santrifüj edildikten sonra %40’lik çözeltinin bulunduğu katmanda birikecek virüsler yine bir şırınga yardımıyla toplandı. 1X saklama tamponu (1L: 100 mL 10x PBS, 50 g D-Sorbitol, 42,4 mL %5 NaCl) ile yıkanan Amicon 100K filtreli kolonlara şırınga ile çekilen virüs içeriği eklenip 15ml’ye tamamlanincaya kadar saklama tamponu eklendi. İki kez 4°C 3500 rpm’de 30 dakika santrifüj işlemi tamamlandıktan

sonra filtrenin üzerine kalan virüsler toplanıp, 3µL alikotlar halinde -80°C'ye kaldırıldı.

5.8. Beyin İçine Lateks boncuk Enjeksiyonu

Gentoipleme sonucu yabancı tip olarak belirlenmiş 35 günlük erkek farede steryotaktik çerçevede anestezi altında (Beyza Medikal) lateks boncuk enjeksiyonları yapıldı. rAAV enjeksiyonlarının VMH'yi hedefleyebilmesi adına bu lokasyon bulma enjeksiyonları yapılmıştır. Kafatası sabitlenerek bistüri ile derisi açılıp hidrojen peroksit ile kemikler belirginleştirildi. Hidrojen peroksit uzaklaştırıldıktan sonra SteREO Discovery V8 (Zeiss) mikroskop altında kafatası üzerinde koordinatlar belirlendi. Shutter P-100 Mikropipet çekicide tüm cam pipetlerin inceltip koparıldı. VMH için koordinatlar Anterior/Posterior: 1,2 mm, Medyal/Lateral: 0,30 mm ve Dorsal/Ventral: -5,40 mm olarak belirlendi. Tüm rAAV enjeksiyonları bu koordinatlara cam mikropipet takılı mikromanipülatör ile yapıldı. mikropipetlere çekilmiş yaklaşık 320 nl miktarında virüs yavaşça VMH'e verilip 10 dakika sonra mikropipet beyinden çekildi. Kafa derisi kapatılıp dikiş atılarak üzeri betadin ile temizlendi. Farelerin ensesinden %0,9 Sodyum klorür serum enjekte edilip, deney yapılarına kadar 14 günlük iyileşmeye bırakıldı.

5.9. Beslenme Davranışı Analizleri

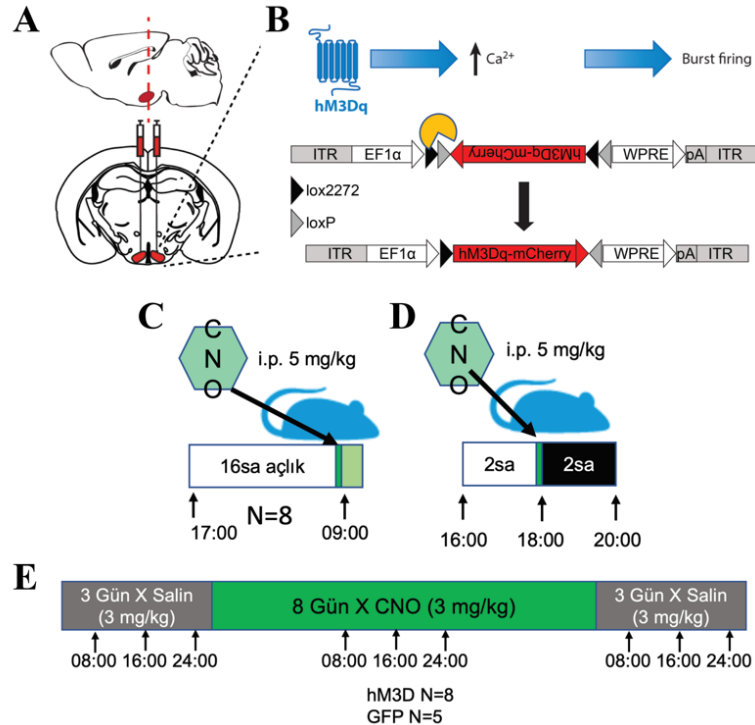
5.9.1. Nöral Aktivasyon

SF1-Cre ifade eden farelerin VMH bölgesine ateşlemeyi uyaran aktive edici DREADD, rAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry (EF1a: human elongation factor 1 alpha) virüsü enjekte edildi (Şekil 5.9.1). Virüs, reseptör dizisiyle birlikte ifadelenen mCherry floresan gen dizisini de içermektedir (Şekil 5.9.1 B). Uzun süreli aktivasyon deneyleri için rAAV-FLEX-EGFP (FLEX: Cre-dependent flip excision switch) virüsü enjekte edilmiş 6 transgenik erkek fareden 5 tanesi kullanıldı.

14 günlük dinlenme süresinin son 4 gününde hayvanlar tekli kafeslere alındı. Besin tüketimine SF-1 nöronlarının anlık aktivitesi, hem açlık sonrası (Şekil 5.9.1 C) hem de akşam saatinde (Şekil 5.9.1 D) incelenmiştir. Açlık deneyleri için, akşam ışıklar kapanmadan 1 saat önce yemleri alınan farelere 16 saat sonra periton içi 5mg/kg Salin (%0,9 fosfat tampon çözeltisi içinde çözünmüş %100 EtOH) veya 5 mg/kg %0,9 fosfat

tampon çözeltisinde çözünmüş CNO enjeksiyonları yapıldı. Farelerin birinci gün ilk açlık sabahındaki salin enjeksiyonunu takiben yarım saat sonra yeme ulaşmaları sağlandı. Yarım saat aralıklar ile 2 saat boyunca yem tartımı yapıldı. Açlık deneyi tamamlandıktan sonra bir gün ara verildi. Üçüncü gün ikinci açlık sabahında 5mg/kg CNO enjeksiyonu yapıp salin protokolünün aynısı takip edildi. Akşam deneyleri için, ışıklar kapanmadan 2 saat önce besin tüketimleri ölçülüp, ışıklar kapatılmadan yarım saat önce Salin veya CNO enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyonu takiben saate bir yemleri tartıldı. Salin ve CNO deney günleri arasında birer gün ara verildi. Tüm deneyler ikişer kez tekrarlandı.

Besin tüketiminde SF-1 nöronlarının uzun süreli aktivitesinin rolü ise gün boyu periton içi CNO enjeksiyonu ile ölçüldü (Şekil 5.9.1 E). 14 günlük sürecin ilk ve son 3 gününde, günde 3 defa 3mg/kg Salin, aradaki 8 gün boyunca günde 3 defa 3mg/kg CNO enjeksiyonu yapıldı. Besin tüketimi ve vücut ağırlıkları her sabah enjeksiyonu öncesi tartıldı. GFP ifade eden rAAV virüsü enjekte edilmiş fareler için de aynı protokol takip edildi.



Şekil 5.9.1: Nöral aktivasyon deney şeması. A. Beyin içi bilateral hM3Dq-mCherry DREADD enjeksiyonunun sagittal ve koronal temsili. B. Aktive edici hM3Dq-mCherry DREADD virüsünün çalışma mekanizması ve Cre rekombinaz (sarı) aracılı gen ifadesi. C. hM3Dq ifade

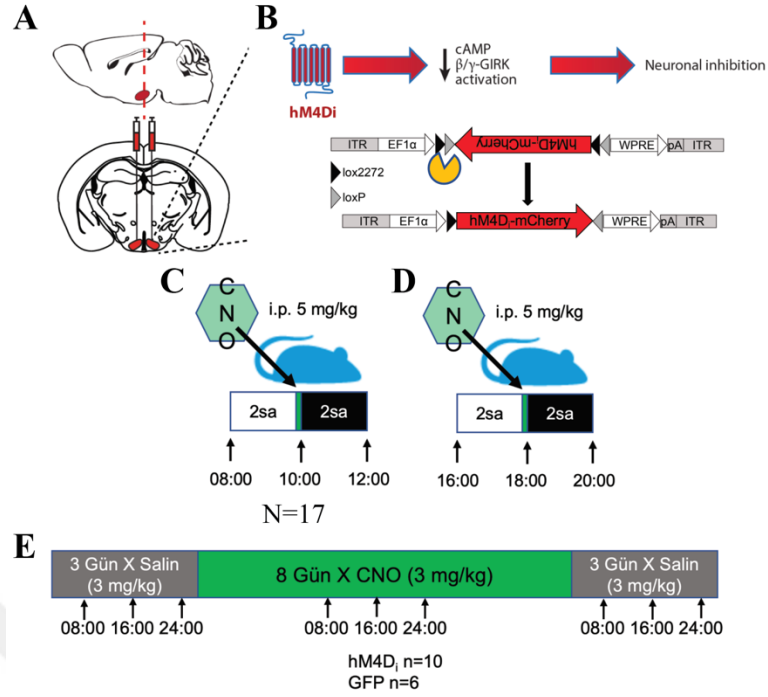
eden 8 farede 16 saat açlık sonrası CNO uygulaması. D.hM3Dq ifade eden 8 farede akşam döngüsünde CNO uygulaması. E. GFP ifade eden 5 kontrol ve hM3Dq ifade eden 8 farede CNO uygulamasına bağlı uzun süreli SF-1 nöron inaktivasyonu.

5.9.2. Nöral İnaktivasyon

SF-1-Cre ifade eden farelerin VMH bölgesine, ateşlemeyi baskılayacak hiperpolarizasyonu uyaran inaktive edici DREADD, hM4Di virüsü enjekte edildi (Şekil 5.9.2). Virüs, reseptör dizisiyle birlikte ifadelenen mCherry floresan gen dizisi içermektedir (Şekil 5.9.2 B). Uzun süreli aktivasyon deneyleri için rAAV-GFP enjekte edilmiş 6 erkek transgenik fare kullanıldı.

14 günlük dinlenme süresinin son 4 gününde hayvanlar tekli kafeslere alındı. Besin tüketimine SF-1 nöronlarının anlık inaktivasyonu, hem gündüz (Şekil 5.9.2 C) hem de akşam saatlerinde (Şekil 5.9.2 D) incelendi. Gündüz deneyleri için ışıklar açıldıktan sonra 2 saat boyunca besin tüketimleri ölçülen farelere periton içi 5mg/kg Salin (% 0.9 fosfat tampon çözeltisi içinde çözünmüş %100 EtOH) veya 5 mg/kg %0.9 fosfat tampon çözeltisinde çözünmüş CNO enjeksiyonları yapıldı. Enjeksiyonu takip eden 2 saat boyunca her yarım saatte bir yem tartımları yapıldı. Akşam deneyleri için, ışıklar kapanmadan 2 saat önce besin tüketimleri ölçülüp, ışıklar kapatılmadan yarım saat önce 5mg/kg Salin veya 5mg/kg CNO enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyonu takip eden 2 saat boyunca saate bir yemleri tartıldı. Salin ve CNO deney günleri arasında birer gün ara verildi. Tüm deneyler ikişer kez tekrarlandı.

Besin tüketiminde SF-1 nöronlarının uzun süreli inaktivasyonu ise gün boyu periton içi CNO enjeksiyonları ile ölçüldü (Şekil 5.9.2 E). 14 günlük sürecin ilk ve son 3 gününde, günde 3 defa 3mg/kg Salin, aradaki 8 gün boyunca günde 3 defa 3mg/kg CNO enjeksiyonu yapıldı. Besin tüketimi ve vücut ağırlıkları her sabah enjeksiyonu öncesi tartıldı. GFP ifade eden rAAV virüsü enjekte edilmiş fareler için de aynı protokol takip edildi.



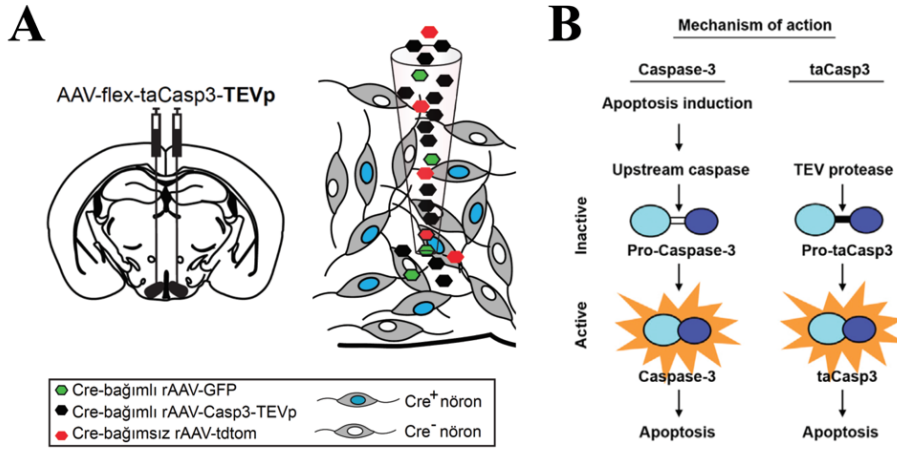
Şekil 5.9.2: Nöral inaktivasyon deney şeması. A. Beyin içi bilateral hM4Di-mCherry DREADD enjeksiyonunun sagittal ve koronal temsili. B. İnaktive edici hM4Di-mCherry DREADD virüsünün çalışma mekanizması ve Cre rekombinaz (sarı) aracılı gen ifadesi. C. hM4Di ifade eden 17 farede 16 saat açlık sonrası CNO uygulaması. D. hM4Di ifade eden 25 farede akşam döngüsünde CNO uygulaması. E. GFP ifade eden 6 kontrol ve hM4Di ifade eden 10 farede CNO uygulamasına bağlı uzun süreli SF-1 nöron inaktivasyonu.

5.9.3. Nöral Ablasyon

35 günlük erkek transgenik VMH bölgesine programlı hücre ölümü apoptozu uyaran rAAV-FLEX-taCasp3-TEVp virüsü enjekte edildi (Şekil 5.9.3A). Virüsle herhangi bir floresan protein ifade edilmediğinden, enjeksiyonlar hem Cre-bağımlı rAAV-FLEX-EGFP hem de Cre-bağımsız rAAV-CAG-tdTomato (tdtom) (CAG: cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin promoter) ifade eden iki virüsle birlikte yapıldı. Kontrol farelere ise sadece GFP ile birlikte tdtom enjeksiyonları yapıldı. 14 günlük dinlenme süresinin son 4 gününde hayvanlar tekli kafeslere alındı.

Normal hücresel apoptoz yolağından farklı olarak, rAAV-taCasp3 virüsü, TEV proteaz sayesinde hızla apoptoz uyarır (Şekil 5.9.3B). Virüs enjeksiyonundan önce kiloları tartılan tüm hayvanlar, virüs enjeksiyonundan sonraki 14.günden itibaren, 14

hafta boyunca haftada 3'er kez kilo ve yem tartımları yapıldı. Deneyde 4 kontrol, 7 taCasp3 ifade eden erkek fare vardır.



Şekil 5.9.3: Nöral ablasyon deney şeması. A. Cre-bağımlı rAAV-FLEXGFP, Cre-bağımsız rAAV-CAG-tdTomato ve Cre-bağımlı rAAV-FLEX-taCasp3-TEVp virüslerinin beyin içi enjeksiyonu. B. Normal yoldan ve TEV proteaz bağımlı olarak pro-taKaspaz-3 aracılı apoptozun tetiklenmesi[44].

5.10. Anksiyete Testi

Yerden 50 metre yukarıda artı biçimli Elevated Plus Maze (EPM) deney düzeneğinde, iki adet açık kol (5x35 cm) ve iki adet kapalı kol (5x35x20 cm) bulunmaktadır. Fareler deneyden bir saat önce deney odasına getirilip odaya alıştırdı. Açık kola bakacak şekilde karenin merkezinden düzeneğe bırakılan fareler, 10 dakika boyunca teste tabi tutuldu. Davranışlar CCD kamera tarafından kaydedildi ve ANY-maze Software (Stoelting Co., Wood Dale, IL) programında analiz edildi.

5.11. Enjeksiyon Alanlarının Sayısal Analizleri

Davranış sonrası beyin kesitleri alınan farelerin VMH görüntülemeleri yapıldı, virüs ile transdüksiyona uğramış SF-1 nöronlarının 200um skala üzerinden ne kadarlık bir alan kapladığı ImageJ programında hesaplandı. Kesitler fare beyin atlasındaki koordinatlarla uyumlu olacak şekilde çakıştırıldı. Görüntülerdeki beyaz alan artırılıp karanlık alan üzerinden transdükte olmuş alan hesaplandı. VMH'in olduğu tüm kesitler için görüntüleme yapıldı alan hesaplandı. Kaspaz ablasyon deneyleri için ise karanlık alan artırılıp beyaz alan üzerinden transdükte olmuş alan hesaplandı. Nöral aktivasyon, inaktivasyon ve ablasyon deneylerinden elde edilen besin tüketimi

değişimlerinin yüzde değerleri ile transdükte olan VMH alanının ne tip bir orantıda olduğu korelasyon analizleri ile hesaplandı.

5.12. İstatistiksel Analiz

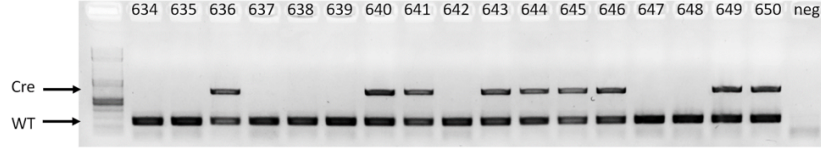
Tüm sonuçlar ortalama \pm standart hata payı ile gösterilmiştir. Tüm deneyler için aksi belirtilmedikçe eşli ve eşli olmayan Student's t-test kullanılmıştır (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$). Korelasyon analizleri için Pearson r ve p değerleri, Prism 7 (GraphPad Software) kullanılarak test edilmiştir.



6. BULGULAR

6.1. Deney Grupları Ve Genotipleme

Genotipleme sonucu (Resim 6.1.1) Cre ifade ettiği belirlenen 35 günlük 47 SF-1-Cre erkek fareler, enjeksiyonlar için tablo 6.1.1 'deki gibi deney gruplarına ayrıldı.



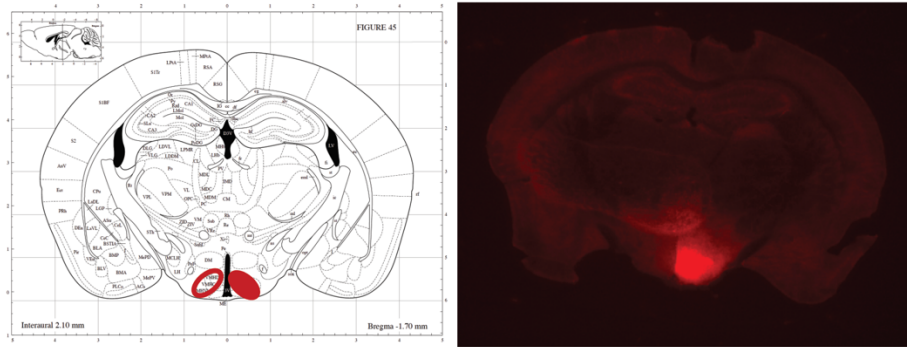
Resim 6.1.1: Cre ifade eden SF-1 erkek farelerin PCR görüntüsü

Tablo 6.1.1: Deney grupları ve hayvan sayıları

Deney grubu	Hayvan sayısı
Aktivasyon (hM3Dq)	8 hM3Dq
İnaktivasyon (hM4Di)	17 hM4Dq
Ablasyon (taCasp3-TEVp)	7 taCasp3-TEVp
Kontrol	6 GFP; 4 GFP&TdTom

6.2. Lateks Boncuk Enjeksiyonu İle VMH'in Hedeflenmesi

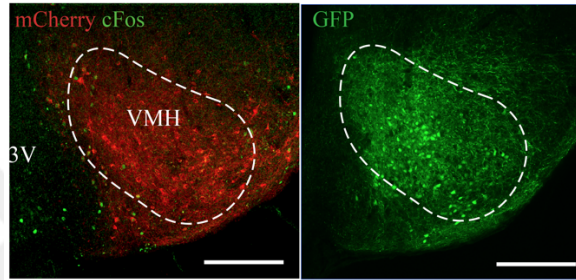
Metotlar 5.8'de tarif edildiği şekilde, Lateks boncuklar beyin için belirtilen koordinatlarda VMH'e verilerek uygun lokasyon bulundu (Resim 6.2.1).



Resim 6.2.1: Lateks boncuklar ile VMH'in beyin içi enjeksiyon ile hedeflenmesi

6.3. Nöral Aktivasyon

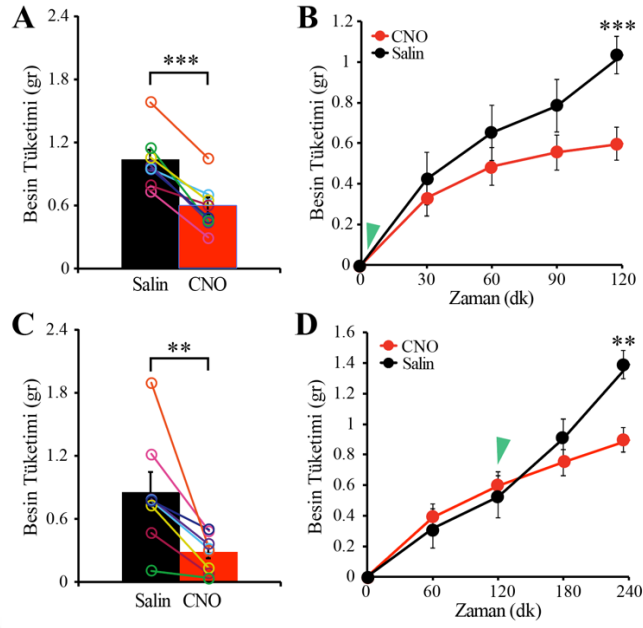
SF-1 nöronlarının anlık ve uzun süreli kemogenetik aktivasyonunun besin tüketimini ve kiloyu nasıl etkilediğini bulmak için, rAAV-hSyn-FLEX-hM3Dq-mCherry (n=8) ve rAAV-FLEX-GFP (n=5) enjekte edilmiş (Resim 6.3.1) SF-1-Cre erkek farelere, açlık ve akşam iştahı deneyleri yapıldı. Beyin içi enjeksiyonlar bilateral tutularak, en fazla sayıda nöron aktivasyonu ile karakterize edilecek davranış ortaya çıkarılmaya çalışıldı.



Resim 6.3.1: hM3Dq-mCherry virüsünün SF-1 Cre farede ifadenmesi. cFos pozitif hM3Dq ifade eden SF-1 nöronları (sol), GFP ifade eden SF-1 nöronları (sağ)

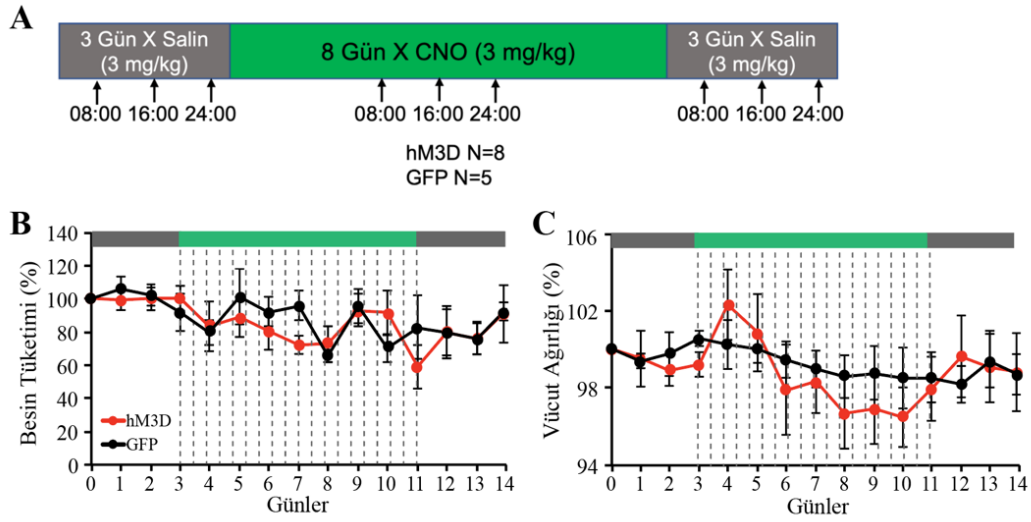
Uzun süre açlık sonrası yüksek iştah söz konusudur ve yemeğe ulaşımı sağlanan farelerin hızla yemeğe gitmeleri beklenir. Gerçekten, salin enjekte edilen güne kıyasla yem tüketiminde yarı yarıya bir düşüş görüldü (Şekil 6.3.1 A) (**p<0,005). Besin tüketimindeki düşüşün birikimli analizinde ise yeme ulaşım sağlandıktan sonraki ikinci saatteki düşüş anlamlı bulundu (Şekil 6.3.1B) (**p<0,005).

Farelerin en fazla besin tüketimi akşam, ışıklar kapandıktan sonradır. Bu dönemdeki iştah SF-1 nöronlarının kemogenetik aktivasyonu ile uyarıldığında, salin enjeksiyonlarına kıyasla yarı yarıya bir düşüş gözlemlendi (Şekil 6.3.1 C) (**p<0,01). Işıklar kapanmadan önceki iki saatte yedikleri yem miktarı göz önünde bulundurulduğunda, ikinci saatin sonunda birikimli besin tüketiminde bir azalma gözlemlendi (Şekil 6.3.1 D) (**p<0,01)



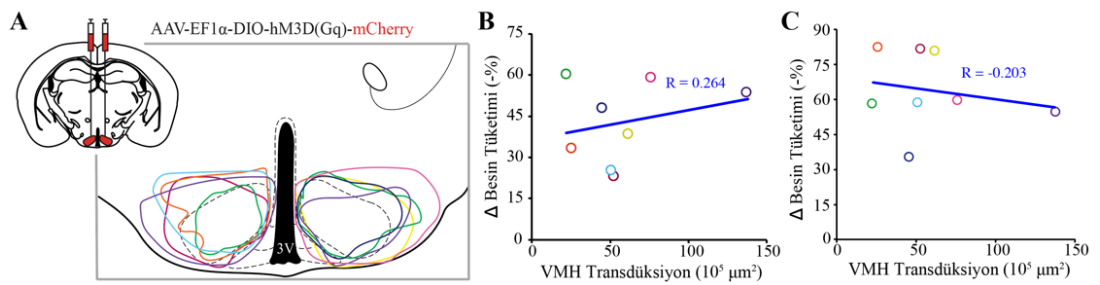
Şekil 6.3.1: Anlık SF-1 nöral aktivasyonu. A. 16 saatlik açlık sonrası CNO enjeksiyonunu takip eden 2 saatteki besin tüketiminin salin enjeksiyonuna kıyası. B. 16 saatlik açlık sonrası CNO enjeksiyonunu (yeşil) takip eden her yarım saatteki besin tüketiminin, salin enjeksiyonuna birikimli kıyası. C. Akşam iştahı öncesi CNO enjeksiyonunu takip eden 2 saatlik besin tüketiminin, salin enjeksiyonuna kıyası. D. Akşam iştahında CNO ve salin enjeksiyonuna bağlı besin tüketiminin birikimli kıyası. ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,005$

Anlık olarak besin tüketimindeki kısa süreli değişimlerin yanı sıra, SF-1 nöron aktivasyonunun sürekliliğinde nasıl bir fenotip ortaya çıkacağı da araştırıldı (Şekil 6.3.2A). hM3Dq ve GFP ifade eden SF-1-Cre farelerde uzun süreli aktivasyon sonucu besin tüketiminde ve veya vücut ağırlığında anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 6.3.2 B,C).



Şekil 6.3.2: Uzun süreli SF-1 nöral aktivasyonu. A. 14 günlük deney planı ve enjeksiyonlar. B. Uzun süreli SF-1 nöral aktivasyonuna bağlı besin tüketimi değişiminin kontrol (GFP) fareler ile karşılaştırılması. C. Uzun süreli SF-1 nöral aktivasyonuna bağlı vücut ağırlığı değişiminin kontrol fareler ile karşılaştırılması.

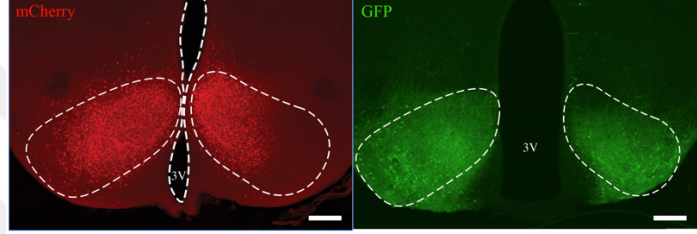
Aktive edici DREADD virüsü ile transdükte olmuş VMH kesitlerinden alan hesaplaması yapıldığında (Şekil 6.3.3 A) 16 saat açlık ve akşam tokluk nöral aktivasyonu sonucu besin tüketimindeki düşüş oranı ile transdükte olmuş VMH alanının arasında herhangi bir orantı bulunmadı. (Şekil 6.3.3 B, C).



Şekil 6.3.3: Davranış değişimleri ve aktive edici virüs ile transdükte olan VMH alan korelasyonu. A. rAAV-hM3Dq-mCherry ifade eden SF-1 nöronlarını temsil eden alan (her renk bir hayvanı temsil etmektedir) (200 μm skala). B. 16 saatlik açlık sonrası düşen besin tüketimi ve transdüksiyon alanının karşılaştırılması. C. Akşam iştahında düşen besin tüketimi ve transdüksiyon alanının karşılaştırılması.

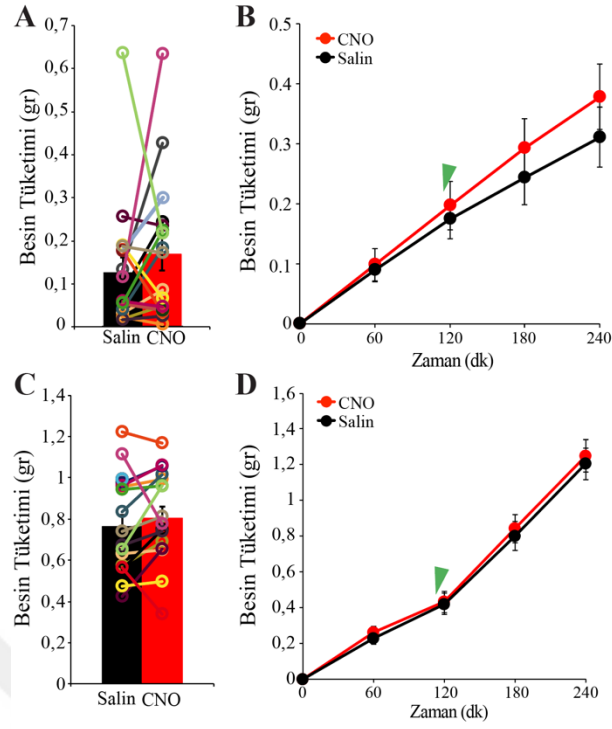
6.4. Nöral İnaktivasyon

SF-1 nöronlarının anlık ve uzun süreli kemogenetik inaktivasyonu ile besin tüketimini ve kiloyu nasıl etkilediğini bulmak için, rAAV-hSyn-FLEX-hM4Di-mCherry (n=17) ve rAAV-FLEX-GFP (n=6) enjekte edilmiş (Resim 6.4.1) SF-1-Cre erkek farelere, gündüz ve akşam tokluk deneyleri yapıldı. Beyin içi enjeksiyonlar bilateral tutularak, en fazla sayıda nöron inaktivasyonu ile karakterize edilecek davranış ortaya çıkarılmaya çalışıldı.



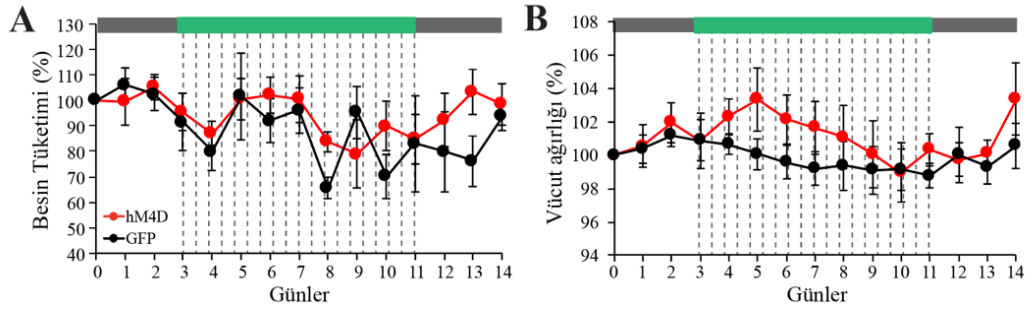
Resim 6.4.1: hM4Di-mCherry virüsünün SF-1 Cre farede ifadenmesi. Bilateral hM4Di ifade eden SF-1 nöronları (sol), bilateral GFP ifade eden SF-1 nöronları (sağ).

Farelerde gündüzleri düşük bir iştah söz konusudur. Lezyon ve nakavt çalışmalarına paralellikle SF-1 nöronlarının inaktivasyonuna bağlı olarak gündüz iştahında artış beklenir. Ancak CNO uygulamasına bağlı toplam yem tüketimleri salin enjekte edilen güne kıyasla değişmedi (Şekil 6.4.1 A). Benzer şekilde birikimli yem tüketiminde de herhangi bir farklılık bulunamadı (Şekil 6.4.1 B). Normal akşam iştahının üzerine taşıyacak bir iştah olup olmadığı araştırıldığında ise, SF-1 nöral inaktivasyonunun besin tüketimini daha da artırmadığı görüldü (Şekil 6.4.1 C). Benzer şekilde birikimli yem tüketiminde de herhangi bir farklılık bulunmadı (Şekil 6.4.1 D).



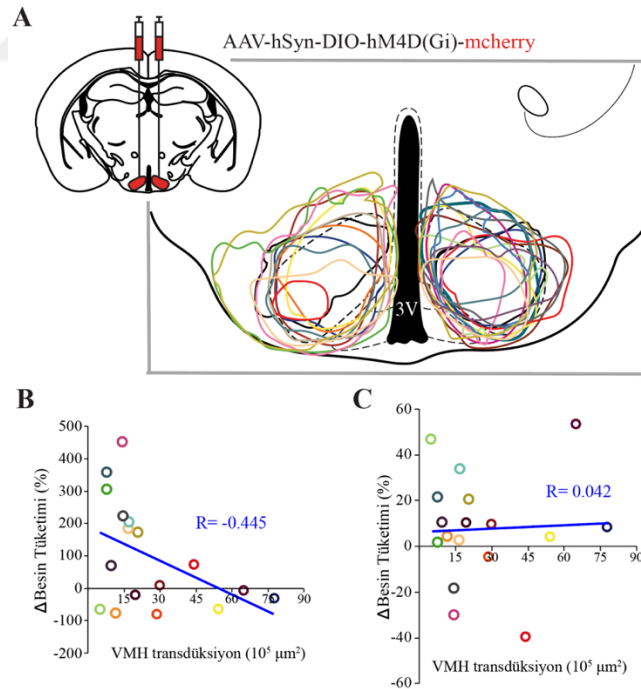
Şekil 6.4.1: Anlık SF-1 nöral inaktivasyonu. A. Gündüz CNO enjeksiyonunu takip eden 2 saatteki besin tüketiminin salin enjeksiyonuna kıyası. B. Gündüz CNO enjeksiyonunu (yeşil) takiben saatte bir besin tüketiminin, salin enjeksiyonuna kıyasla birikimli kıyası. C. Akşam iştahı öncesi CNO enjeksiyonunu takiben 2 saatlik besin tüketiminin, salin enjeksiyonuna kıyası. D. Akşam CNO ve salin enjeksiyonuna bağlı besin tüketiminin birikimli kıyası.

Anlık olarak besin tüketimindeki kısa süreli değişimlerin yanı sıra, sürekli SF-1 nöron inaktivasyonu sonucu obez fenotip çıkıp çıkmayacağı da araştırıldı. 14 günlük deneyde hM4Di ve GFP ifade eden SF-1-Cre farelerde uzun süreli inaktivasyonu sonucu besin tüketiminde (8. Gün hariç) ve vücut ağırlığında anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 6.4.2).



Şekil 6.4.2: Uzun süreli SF-1 nöral inaktivasyon. A. Uzun süreli SF-1 nöral inaktivasyonuna bağlı besin tüketimi değişiminin kontrol (GFP) fareler ile karşılaştırılması. B. Uzun süreli SF-1 nöral inaktivasyonuna bağlı vücut ağırlığı değişiminin kontrol fareler ile karşılaştırılması.

İnaktive edici DREADD virüsü ile transdükte olmuş VMH kesitlerinden alan hesaplaması yapıldığında (Şekil 6.4.3 A) ne gündüz ne de gece besin tüketimi değişimi ile transdükte olmuş VMH alan arasında herhangi bir ilişki bulunmadı (Şekil 6.4.3 B,C).



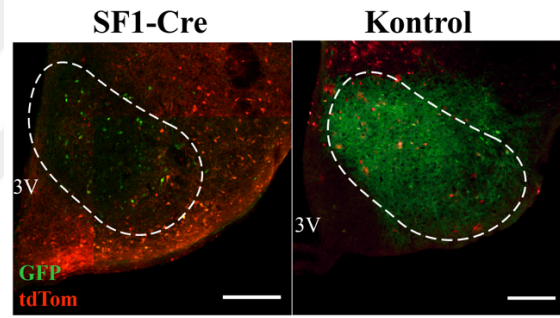
Şekil 6.4.3: Davranış değişimleri ve inaktive edici virüs ile transdükte olan VMH alan korelasyonu. A. rAAV-hM4Di-mCherry ifade eden SF-1 nöronlarını temsil eden alan (her renk bir hayvanı temsil etmektedir) (200um skala). B. Gündüz açlığı sonrası besin

tüketimindeki değişim ve transdüksiyon alanlarının karşılaştırılması. C. Akşam iştahı sonrası besin tüketimindeki değişim ve transdüksiyon alanlarının karşılaştırılması.

6.5. Nöral Ablasyon

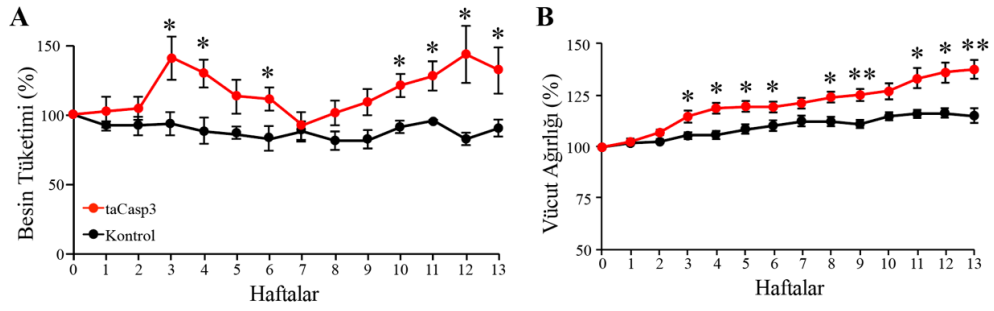
VMH ve etrafındaki nöradrenerjik fiber yapıları hasarlayan lezyon çalışmaları ve beyine özgü SF-1 nakavt hayvan modellerinden elde edilen bilgilere göre ciddi VMH ve SF-1 besin tüketimi ve vücut kitlesinin korunumunda önemli göreve sahiptir. Bu bilgiler ışığında, tezde viral teknikler kullanılarak, normal besin içeriğinde beslenen yetişkin farelerde SF-1 nöron kaybı ile obezite ilişkisi tekrar incelendi.

Bilateral olarak 7 fareye rAAV-FLEX-taCasp3-TEVp 4 fareye ise rAAV-FLEX-GFP ile rAAV-CAG-tdTomato birlikte enjekte edildi. Genel olarak tek tarafı vuran enjeksiyonlar Şekil 6.5.1'deki gibidir.



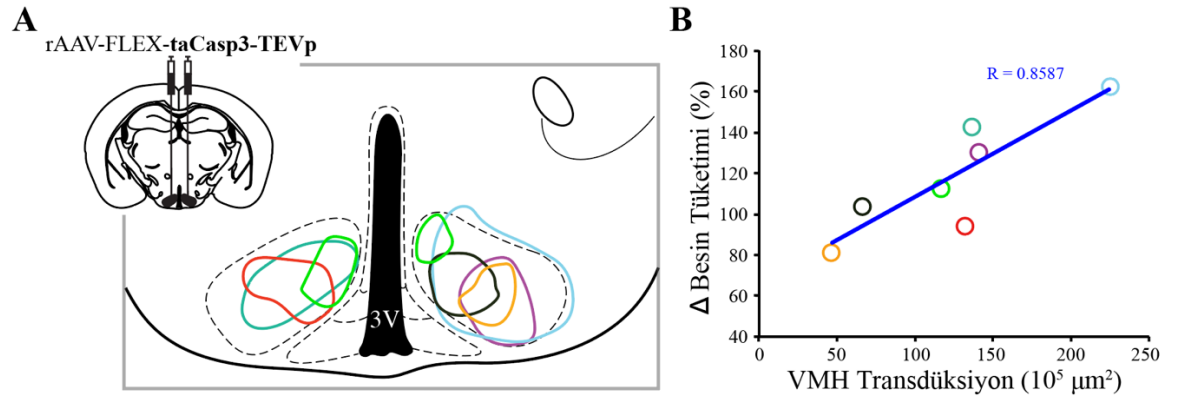
Şekil 6.5.1: rAAV-FLEX-taCasp3-TEVp virüsünün SF1-Cre farede ifadenmesi. Kaspaz 3 aracılı apoptotik yolak ile ölen SF-1 nöronlarını kapsayan VMH bölgesi (sol) kaspaz 3 ifade etmeyen SF-1 nöronlarını kapsayan VMH bölgesi (sağ). Skala 200µm.

İlk hafta yedikleri yem miktarı baz alınıp geri kalan besin tüketimindeki değişim yüzde cinsinden hesaplandı. Kontrol fareler ile karşılaştırıldığında, beklenildiği gibi, SF-1 nöron kaybı hem besin tüketiminin artmasına neden oldu (Şekil 6.5.2 A) (Yedinci haftadan itibaren birkaç hafta boyunca kontrol edilemeyen oda ısısı düşüşü olmuştur). Buna paralel olarak, enjeksiyon öncesi vücut ağırlıklarına oranlandığında, kontrol farelere kıyasla SF-1 nöronları ölen farelerde anlamlı seyreden kilo almına görüldü (Şekil 6.5.2 B).



Şekil 6.5.2: SF-1 nöral ablasyonunun (A) besin tüketimine ve (B) vücut ağırlığına etkisi. * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$.

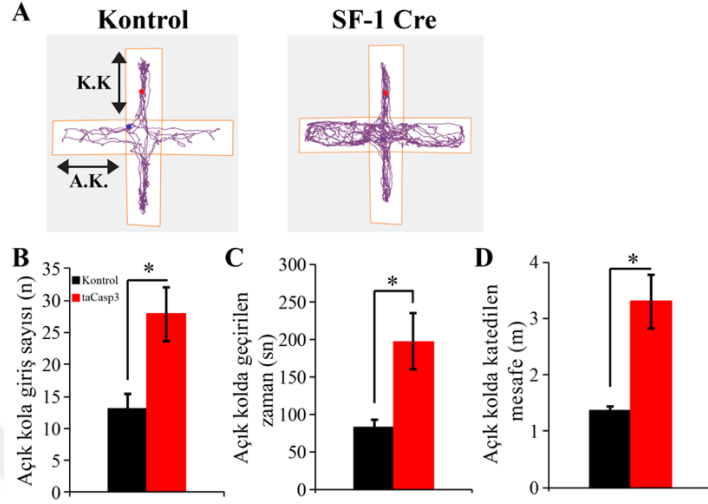
SF-1 nöronlarının VMH'ın ne kadarında apoptoza uğradığı hesaplandığında (Şekil 6.5.3 A), ablasyon genişliği artan besin tüketimi ile ilişkili olduğu görüldü ($p = 0.0002$, $R = 0.8587$, $P = 0.013$) (Şekil 6.5.3 B). Aynı ilişki vücut ağırlığında artış için hesaplandığında, negatif yönde bir korelasyon görüldü ($R = -0.234$ ve $P = 0.613$).



Şekil 6.5.3: SF-1 nöral ablasyonu ve besin tüketimi değişimi. A. her bir hayvandaki apoptoza uğramış SF-1 nöronlarının kapsadığı alanlar (skala 200µm). B. Başlangıçtaki değerlere oranla artan besin tüketimi ile ablasyona uğramış alan arası ilişki.

SF-1 nöronlarının nöral ablasyonu sonucu farelerde anksiyete ile birlikte seyreden artan lokomotor aktivite bildirilmiştir. Bunu ispatlamak amacıyla nöral ablasyon ($n = 7$) ve kontrol gruplarına ($n = 4$) Elevated Plus Maze (EPM) anksiyete testi yapıldı (Şekil 6.5.4 A). Ablasyon yapılan hayvanlar, kontrollere kıyasla, açık kola geçiş ($p = 0.0334$),

burada bulunma süresi ($p=0.0495$) ve katedilen mesafe bakımından ($p=0.0155$) anksiyolitik davranış göstermiştir (Şekil 6.5.4 B-D).



Şekil 6.5.4: Nöral ablasyon sonucu anksiyete analizleri. A. Kontrol ve ablasyon grubundan birer farenin temsili EPM izleri. Mavi başlangıç, kırmızı bitiş noktasını gösterir. (A.K., açık kol; K.K., kapalı kol). Açık kollara girme sayısı (B), açık kollarda geçirilen toplam zaman (C) ve açık kollarda koşulan mesafenin (D) kontrol farelere kıyası (* $p<0.05$).

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

VMH nöral alt gruplarının bazıları besin tüketimini ve ilintili diğer davranışları yönetmektedir. Son dönem çalışmaları genelde saldırganlık, anksiyete ve savunma davranışı üzerinedir. Ancak şimdiye kadar beslenme davranışı için, sistematik olarak davranışsal ve fizyolojik herhangi bir sonuç ortaya koyulmamıştır. Bu tezde, bu bağlantılı ilişkiyi çözebilmek adına, VMH'in çoğunluğunu oluşturan SF-1 nöronlarının besin tüketimi ve vücut ağırlığını anlık ve uzun süreli olarak nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında öncelikli olarak VMH^{SF-1} nöronlarının beslenme durumlarına bağlı anlık ve uzun süreli farmakogenetik aktivitesine bakılmıştır. Kemogenetik hM3Dq aracılı anlık aktivasyon beklendiği üzere besin tüketimini durdurmuştur. Bu elektriksel VMH^{SF-1} uyarımı sonucu azalan ateşleme frekansı ile tutarlı bir sonuçtur. Alan ile besin tüketimindeki azalma arasındaki ilişki zayıftır. Uzun süreli CNO enjeksiyonuna bağlı SF-1 nöron ateşlemesinin sürekliliği sonucu vücut ağırlığı bir süre düşse de anlamlılık yoktur. Bu da tek başına SF-1 nöral aktivitesinin anoreksik olmayıp, anlık olarak anoreksik bir nöral ağı fonksiyonunu etkilediğini düşündürür. Aktivasyon çalışmaları farklı VMH bölgelerinin farklı fonksiyonlara sahip olduğunu göstermiştir. vVMH 'teki SF-1 nöronlarının aktivitesi agresyon ve çiftleşme gibi iki farklı davranışı birden yönetirken [47, 48], dmVMH'in optogenetik aktivasyonu sadece saldırı davranışını tetiklemektedir [45]. Bu nedenle enjeksiyonun deneydeki tüm hayvanlarda tutarlı bir alanı kapsamaması belirgin bir fenotipin görülmesini engellemiş olabilir. Gerçekten de enjeksiyon alanı ile davranış eğilimi arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

VMH^{SF-1} nöronlarının nakavt modellerinde erken başlangıçlı obez fenotip ortaya çıktığı bilinmektedir. Ancak beslenme durumuna bağlı olarak anlık nöral inaktivasyonun davranışa nasıl yansıdığı halen bilinmemektedir. Bu tezde VMH^{SF-1} literatüre benzer şekilde bir besin tüketimi artışı bulmak amacıyla hM4Di aracılı inaktivasyon yapılmıştır. Besin tüketiminin ve fiziksel aktivitenin en az olduğu gündüz döngüsünde çok az bir artış görülmüştür ancak bu anlamlı değildir. İnaktivasyonun

akşam iştahını daha da artırma gibi bir etkisi de yoktur. Nakavt veya lezyon çalışmalarındaki gibi ciddi bir hiperfajinin görülememe nedenlerinden biri, hali hazırda vücuttaki yağlanmaya bağlı olarak SF-1 aktivitesinin alttan alta kronik olarak şekillenmiş olabileceğidir. Enerji depolarındaki değişimler, SF-1 nöronlarının haberleştiği diğer alt nöral yollarının da besin durumuna karşı geliştirilecek bir karşı yanıtın şekillenmesine neden olabilir. İnaktivasyonun hangi VMH bölgesinde meydana geldiği de davranışı etkileyebilmektedir. vVMH'deki SF-1 nöronlarının kemogenetik olarak baskılanması sosyal korku davranışını baskılamaktadır [43, 49]. Bölgeye özgün fenotipten yola çıkarak, inaktive edilmiş nöral alan ile besin tüketimi arasında bir bağlantı kurulmaya çalışılmıştır. Gündüz besin tüketiminde ortalama bir artış olsa da anlamlı değildir ve artış ile alan arasında korelasyon yoktur. Tüm hayvanlarda inaktive edici virüs enjeksiyonu iki taraflı tüm VMH'i kapsamadığından dolayı da beslenme davranışı net olarak ortaya koyulamamış olabilir. Uzun süreli CNO enjeksiyonuna bağlı SF-1 nöron ateşlemesinin engellenmesi, birkaç gün için vücut ağırlığında artışa neden olmuştur. Bu artış belli bir süre sonra vücut ağırlığının normale dönmesiyle takip etmiştir. Ayrıca kilo artışı besin tüketiminden bağımsızdır. Bu da SF-1 nöronlarına yüklenen bazı görevlerin VMH dışındaki bazı hücre grupların, kompanse edici şekilde çalışarak vücut ağırlığını düzenlediğini düşündürmektedir. Vücut ağırlığını düzenleyici görevde olduğu bilinen SF-1 nöronlarının, bunu beslenmeden bağımsız olarak kontrol ettiği daha önceleri rapor edilmiştir [37, 50-54].

Nöronların apoptotik olarak ölümü teknik olarak nakavt çalışmalarını taklit edebilmektedir. Bu tezde apoptotik olarak VMH^{SF-1} nöron ablasyonu sonucu, literatürdeki gibi erken başlangıçlı ve sürdürülebilir bir hiperfajinin ortaya çıkıp çıkmayacağı araştırılmıştır. VMH^{SF-1} nöronlarının Kaspaz 3 aracılı ablasyonu gerçekten erken başlangıçlı kilo ve besin tüketimi artışa neden olmuştur. Her ne kadar, VMH'in tamamında SF-1 nöronlarının kaybı sağlanamamış ve görece az hayvan ile çalışılmasına rağmen obez fenotip görülmüştür. Ablasyona uğramış alan ile besin tüketimindeki artış ilişkilidir ancak vücut ağırlığı için bu tip bir şey söylenemez. Yetişkin dönemde SF-1 nöral kaybının besin tüketimine ve vücut ağırlığına olan etkisi bu tez ile ilk olma niteliğindedir. Daha önce bu teknik ile saldırı karışığında gerçekleştirilen otonom savunma davranışlarının VMH bölgelerine özgün

düzenlendiği gösterilmiştir [43-45]. Ayrıca bu tezde, ablasyonun son haftasında yapılan EPM testi, SF-1 nöral aktivitesinin anksiyetik davranış ortaya koyabilmek için şart olduğu, önceki bulgularla benzer şekilde, bir kez daha kanıtlanmıştır. Kısaca VMH'teki bu nöral grup tek başına sadece beslenmeyi kontrol etmemektedir.

SF-1 nöral ağı, beyinde beslenme ve savunma davranışlarının merkezi entegrasyonunda yer alır. Bu tip bir düzenlemenin, birçok hipotalamik nöral popülasyon tarafından da gerçekleştirildiği göz önünde bulundurulursa, VMH^{SF-1} nöronlarının bu ağdaki görevi, birçok bölge ile birlikte çalışıp ve anlık çevresel etkilerle şekillenebilen davranışlara göre yanıt oluşturmaktır. Sonuç olarak, iştah düzenlenmesi ve enerji dengesi SF-1 nöronlarınca çok da sıkı olmayan bir biçimde kontrol edilmemektedir. Bu nedenle insan sağlığı için hipotalamik obeziteye yönelik tedavi çalışmaları hem duygu durum hem de beslenme davranışının ortak düzenlendiği nöral ağlar üzerine sürdürülmelidir.

8. KAYNAKLAR

1. Morton, G.J., et al., *Central nervous system control of food intake and body weight*. Nature, 2006. **443**(7109): p. 289-95.
2. King, B.M., *The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight*. Physiol Behav, 2006. **87**(2): p. 221-44.
3. Campfield, L.A. and F.J. Smith, *Functional coupling between transient declines in blood glucose and feeding behavior: temporal relationships*. Brain Res Bull, 1986. **17**(3): p. 427-33.
4. Elmquist, J.K., et al., *Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem*. Endocrinology, 1997. **138**(2): p. 839-42.
5. Albert, D.J. and L.H. Storlien, *Hyperphagia in rats with cuts between the ventromedial and lateral hypothalamus*. Science, 1969. **165**(3893): p. 599-600.
6. Grossman, S.P., *A neuropharmacological analysis of hypothalamic and extrahypothalamic mechanisms concerned with the regulation of food and water intake*. Ann N Y Acad Sci, 1969. **157**(2): p. 902-17.
7. Ball, G.G., *Self-stimulation in the ventromedial hypothalamus*. Science, 1972. **178**(4056): p. 72-3.
8. Hustvedt, B.E. and A. Lovo, *Correlation between hyperinsulinemia and hyperphagia in rats with ventromedial hypothalamic lesions*. Acta Physiol Scand, 1972. **84**(1): p. 29-33.
9. Gold, R.M., *Hypothalamic obesity: the myth of the ventromedial nucleus*. Science, 1973. **182**(4111): p. 488-90.
10. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 661-71.
11. Schmauss, A.K., [*Experimental studies of the blocking of the anterior pituitary gland with steroid hormones, and their significance for the hormone treatment of inoperable mamma carcinoma and the prophylactic hormone treatment in radical operation*]. Wien Klin Wochenschr, 1955. **67**(11): p. 190-1.
12. Hetherington, A.W.a.R., S.W., *Hypothalamic Lesions and Adiposity In The Rat*. 1940.
13. Hetherington, A.W.a.R., S.W., *The Relation of Various hypothalamic Lesions to Adiposity in The Rat*. 1942.

14. Teitelbaum, P. and A.N. Epstein, *The lateral hypothalamic syndrome: recovery of feeding and drinking after lateral hypothalamic lesions*. Psychol Rev, 1962. **69**: p. 74-90.
15. Arees, E.A. and J. Mayer, *Anatomical connections between medial and lateral regions of the hypothalamus concerned with food intake*. Science, 1967. **157**(3796): p. 1574-5.
16. King, B.M. and L.A. Frohman, *Nonirritative lesions of VMH: effects on plasma insulin, obesity, and hyperreactivity*. Am J Physiol, 1985. **248**(6 Pt 1): p. E669-75.
17. Bingham, N.C., et al., *Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome*. Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2138-48.
18. Cox, J.E. and T.L. Powley, *Intragastric pair feeding fails to prevent VMH obesity or hyperinsulinemia*. Am J Physiol, 1981. **240**(5): p. E566-72.
19. Marshall, N.B., R.J. Barnett, and J. Mayer, *Hypothalamic lesions in goldthioglucose injected mice*. Proc Soc Exp Biol Med, 1955. **90**(1): p. 240-4.
20. Panksepp, J., *The ventromedial hypothalamus and metabolic adjustments of feeding behavior*. Behav Biol, 1973. **9**(1): p. 65-75.
21. Minokoshi, Y., M. Saito, and T. Shimazu, *Sympathetic denervation impairs responses of brown adipose tissue to VMH stimulation*. Am J Physiol, 1986. **251**(5 Pt 2): p. R1005-8.
22. Amir, S., *Intra-ventromedial hypothalamic injection of glutamate stimulates brown adipose tissue thermogenesis in the rat*. Brain Res, 1990. **511**(2): p. 341-4.
23. Meguid, M.M., Z.J. Yang, and A. Laviano, *Meal size and number: relationship to dopamine levels in the ventromedial hypothalamic nucleus*. Am J Physiol, 1997. **272**(6 Pt 2): p. R1925-30.
24. Kelly, J., J. Rothstein, and S.P. Grossman, *GABA and hypothalamic feeding systems. I. Topographic analysis of the effects of microinjections of muscimol*. Physiol Behav, 1979. **23**(6): p. 1123-34.
25. Beverly, J.L., et al., *Noradrenergic and GABAergic systems in the medial hypothalamus are activated during hypoglycemia*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(2): p. R563-9.
26. Miller, W.L., *Molecular biology of steroid hormone synthesis*. Endocr Rev, 1988. **9**(3): p. 295-318.

27. Miller, W.L. and R.J. Auchus, *The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders*. Endocr Rev, 2011. **32**(1): p. 81-151.
28. Lala, D.S., D.A. Rice, and K.L. Parker, *Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor 1*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(8): p. 1249-58.
29. Ikeda, Y., et al., *Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(5): p. 654-62.
30. Ingraham, H.A., et al., *The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis*. Genes Dev, 1994. **8**(19): p. 2302-12.
31. Ikeda, Y., et al., *The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(4): p. 478-86.
32. Luo, X., Y. Ikeda, and K.L. Parker, *A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation*. Cell, 1994. **77**(4): p. 481-90.
33. Majdic, G., et al., *Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity*. Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 607-14.
34. Davis, A.M., et al., *Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus*. J Neurobiol, 2004. **60**(4): p. 424-36.
35. Elmquist, J.K., *Anatomic basis of leptin action in the hypothalamus*. Front Horm Res, 2000. **26**: p. 21-41.
36. Elmquist, J.K., et al., *Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 741-6.
37. Dhillon, H., et al., *Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis*. Neuron, 2006. **49**(2): p. 191-203.
38. Kim, K.W., et al., *Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(26): p. 10673-8.
39. Klockener, T., et al., *High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons*. Nat Neurosci, 2011. **14**(7): p. 911-8.

40. Armbruster, B.N., et al., *Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(12): p. 5163-8.
41. Roth, B.L., *DREADDs for Neuroscientists*. Neuron, 2016. **89**(4): p. 683-94.
42. Sternson, S.M., et al., *An Emerging Technology Framework for the Neurobiology of Appetite*. Cell Metab, 2016. **23**(2): p. 234-53.
43. Silva, B.A., et al., *Independent hypothalamic circuits for social and predator fear*. Nat Neurosci, 2013. **16**(12): p. 1731-3.
44. Yang, C.F., et al., *Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males*. Cell, 2013. **153**(4): p. 896-909.
45. Kunwar, P.S., et al., *Ventromedial hypothalamic neurons control a defensive emotion state*. Elife, 2015. **4**.
46. Meek, T.H., et al., *Functional identification of a neurocircuit regulating blood glucose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(14): p. E2073-82.
47. Lee, H., et al., *Scalable control of mounting and attack by Esr1+ neurons in the ventromedial hypothalamus*. Nature, 2014. **509**(7502): p. 627-32.
48. Lin, D., et al., *Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus*. Nature, 2011. **470**(7333): p. 221-6.
49. Silva, B.A., et al., *The ventromedial hypothalamus mediates predator fear memory*. Eur J Neurosci, 2016. **43**(11): p. 1431-9.
50. Ramadori, G., et al., *SIRT1 deacetylase in SF1 neurons protects against metabolic imbalance*. Cell Metab, 2011. **14**(3): p. 301-12.
51. Cheung, C.C., et al., *Genetic labeling of steroidogenic factor-1 (SF-1) neurons in mice reveals ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) circuitry beginning at neurogenesis and development of a separate non-SF-1 neuronal cluster in the ventrolateral VMH*. J Comp Neurol, 2013. **521**(6): p. 1268-88.
52. Cheung, C.C., et al., *Sex-dependent changes in metabolism and behavior, as well as reduced anxiety after eliminating ventromedial hypothalamus excitatory output*. Mol Metab, 2015. **4**(11): p. 857-66.
53. Xu, Y., et al., *PI3K signaling in the ventromedial hypothalamic nucleus is required for normal energy homeostasis*. Cell Metab, 2010. **12**(1): p. 88-95.
54. Xu, Y., et al., *Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction*. Cell Metab, 2011. **14**(4): p. 453-65.

10.ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.40092
Konu : Etik Kurulu Kararı

24/09/2018

Sayın Deniz ATASOY

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 24/02/2015 tarihli ve 21 karar no ile onay verilen “Ventromedial hipotalamik (VMH) sinir ağlarının enerji dengesini kontrolü” isimli çalışmanızın başlığını “Ventromedial hipotalamik çekirdekte steroidojenik faktör 1 (SF-1) ifade eden nöronların beslenme üzerine etkisi” olarak değiştirilmesi, bitmiş olan etik onay süresinin “02.07.2018” tarihine kadar uzatılması ve hayvan sayısının “42” olarak değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 24.09.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 86577C85X5 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)

Sayı : 38328770 –28
Konu: Etik Kurulu Kararı

24/02/2015

Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz ATASOY

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Ventromedial hipotalamik (VMH) sinir ağlarının enerji dengesini kontrolü” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.


Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

24/02/2015-İ.FİL


Tel: (0216)681 51 37
Faks: (0212)531 75 55
E-mail: ilknurfil@medipol.edu.tr

Adres: Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No: 19,34810
Kavacık/BEYKOZ



T.C.

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
24/02/2015	21		Yrd. Doç. Dr. Deniz ATASOY

“Ventromedial hipotalamik (VMH) sinir ağlarının enerji dengesini kontrolü” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fulya	Soyadı	Köksalar
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	22.12.1989
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kimlik No	16678752080
E-mail	fulyakoksalar@gmail.com	Tel	+905353244800

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Medipol Üniversitesi	-
Yüksek Lisans	Haliç Üniversitesi	2013
Lisans	Haliç Üniversitesi	2010
Lise	Fenerbahçe Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
1. -	-	-	-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	İyi

Yabancı Dil Sınavı Notu								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
		6.5	98					

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	Çok iyi
Adobe Photoshop , Illustrator	İyi
Arduino	İyi
MATLAB	Zayıf
ImageJ	İyi
GraphPad	zayıf

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

Uluslararası Bildiriler

1. Poster – Aklan I, **Köksalar F**, Cebecioglu U, Baser O, Mutlu o, Yavuz Y, Sayar Atasoy N, Atasoy D, “Arcuate cholinergic neurons regulate appetite”, 11th FENS Forum of Neuroscience, Germany, 2018

2. Poster- Baser O, **Koksalar F**, Mutlu O, Cebecioglu U, Aklan I, Atasoy D, “ Thre role of cholinergic neurons in the arcuate nucleus on anxiety behavior”, 3rd International Congress of Turksih Neuroendocrinology Society, Turkey, 2018.
3. Poster- Coban I, Aklan I, Ateş, T, Oncul, M, **Koksalar F**, Yavuz Y, Dilsiz P, Topcu, IC, Filiz G, Sayar-Atasoy N, Atasoy D, “Investigation of hindbrain – hypothalamus catecholaminergic circuit for feeding”, 3rd International Congress of Turksih Neuroendocrinology Society, Turkey, 2018
4. Poster- Coban I, Aklan I, Ateş, T, Oncul, M, **Koksalar F**, Yavuz Y, Dilsiz P, Topcu, IC, Filiz G, Sayar-Atasoy N, Atasoy D, “Investigation of hindbrain – hypothalamus catecholaminergic circuit for feeding”, Nature Reviews Endocrinology, Germany, 2017
5. Poster- Dilsiz P, **Koksalar F**, Oncul M, Sayar-Atasoy N, Atasoy D, “Melanin concentrating hormone neurons regulate homeostatic feeding and control hedonic drive”, 5th International congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Turkey, 2017
6. Poster- **Koksalar F**, Coban I, Dilsiz P, Atasoy D, “Acute and Long-term regulation of Appetite bu VMH^{SF-1} Neurons”, 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Tukey, 2017
7. Poster- Ersoy-Tunalı N, Tiryakioglu O, **Koksalar F**, “RAF1 c*266C-T polymorphism as a protective factor in baldder cancer”, 23rd Biennial congress of the European Association for Cancer Research, Germany, 2014

Sertifikalar

1. Deney hayvanları kullanım sertifikası
2. EMBO YIP PhD Course, Germany, 2017

Ödüller

1. Poster ödülü – FEBS Journal Poster Prize, 2017