



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ARKUAT ÇEKİRDEKTEKİ KOLİNERJİK NÖRONLARIN
BESLENME DAVRANIŞINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

UTKU CEBECİOĞLU

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. DENİZ ATASOY

İSTANBUL-2018

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi'nin bilimsel araştırmalara sağladığı olanak ve desteklerle yapılmıştır. Sağladığı modern, yüksek vizyona sahip ve gelişmiş altyapı imkanları için Mütevelli Heyeti Başkanı Dr. Fahrettin Koca ile Uluslararası Tıp Fakültesi kurucu dekanı Prof. Dr. Ahmet Zeki Şengil'e, desteğini üzerimizden hiçbir zaman esirgemeyen REMER Müdürü Prof. Dr. Gürkan Öztürk ile Müdür Yardımcısı Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a,

Yol göstericilikleri, öğreticilikleri, üstün sabırları, tükenmeyen destekleri ve en önemlisi bana tanıdığı oldukları bu şans için teşekkürden daha fazlasını borçlu olduğum danışmanlarım Doç. Dr. Deniz Atasoy ve Dr. Nilüfer Sayar Atasoy'a,

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyip motivasyonumu yüksek tutmamda yardımcı olan çalışma arkadaşlarım: Merve Öncül, Dr. Tayfun Ateş, Özlem Mutlu, Dr. Muhammed İkbâl Alp, Fulya Köksalar, İltan Aklan, Edanur Ateş Öz, Özge Başer, Gizem Filiz, İskelen Cansu Topcu, Cihan Civaş, Tuba Oğuz, Öykü Dinçkol, Pelin Dilsiz ve İlknur Çoban'a,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını daimî kıлып tüm altyapıyı sürdürülebilir bir şekilde ulaşılabilir kılan başta Dr. Taha Keleştemur, Hilmi Kaan Alkan ve Ekrem Musa Özdemir ile tüm REMER ve MEDİTAM ailesine,

En ufak sorunda çözümcü yaklaşımlarla yardımcı olan Göknil Erbatu Çelik'e, yardımını esirgemeyen Hasan Keçeci ve Hülya Sıbiç ve de özveriyle çalışan Mehtap Şimşek ve Büşra Batgi'e

Yüksek sabrı, sevgi ve saygısıyla sürekli yanımda destek olan Ayşe Aydın'a,

Her daim yanımda olup beni sonsuz destekleyen, tüm sıkıntı ve zorlukları aşmamda en büyük dayanağım Canım Annem, Hüsniye Işıl Soğukpınar'a canı gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
RESİMLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
1 ÖZET	1
2 ABSTRACT.....	3
3 GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4 GENEL BİLGİLER	7
4.1 Obezite.....	7
4.2 Hipotalamus.....	9
4.3 Arkuat Çekirdek	10
4.4 Kolinerjik nöronlar ve ilgili reseptörleri	11
4.5 Hücre Tipi Spesifik Transgen İfadesi ve Transgenik Fare Modeli	13
4.6 Kemogenetik Uygulama.....	15
5 MATERYAL VE METOT	17
5.1 Materyal.....	17
5.2 Metot	20
5.2.1 Deney hayvanları	20
5.2.2 Genotipleme	20
5.2.2.1 DNA eldesi	20
5.2.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	21
5.2.2.3 Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme.....	22
5.2.3 Rekombinant adeno-asosiye virüs üretimi.....	22
5.2.3.1 Plazmit DNA çoğaltma	23
5.2.3.2 DNA izolasyonu	23
5.2.3.3 293AAV Hücre transfeksiyonu	23
5.2.3.4 Pürifikasyon.....	24
5.2.4 İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiye virüs enjeksiyonu.....	25
5.2.5 Doku fiksasyonu ve kesit alma	26
5.2.6 Mikroskopik görüntüleme ve analiz	26
5.2.7 Kolinerjik nöronların morfolojik olarak belirlenmesi.....	26
5.2.8 Kolinerjik nöronların projeksiyonlarının belirlenmesi.....	27
5.2.9 Davranış Deneyleri.....	27
5.2.9.1 CNO varlığında besin tüketimi ölçümü hM3Dq	27
5.2.9.2 Kronik besin tüketimi ölçümü ChAT-Cre caspase.....	28

5.2.10	İstatistiksel analiz	29
6	BULGULAR	30
6.1	Deney Grupları ve Genotipleme.....	30
6.2	Arkuattaki kolinerjik nöronların morfolojik olarak tespiti.....	31
6.3	Arkuattaki kolinerjik nöronların projeksiyonlarının belirlenmesi.....	32
6.4	Arkuattaki kolinerjik nöronlarının aktivasyonu	33
6.4.1	Besin tüketimi ölçümü	33
6.5	Arkuattaki kolinerjik nöronların ablasyonu	35
6.5.1	Besin tüketimi ve vücut ağırlığı ölçümü	35
7	TARTIŞMA ve SONUÇ	39
8	KAYNAKLAR	43
9	ETİK KURUL ONAYI.....	46
10	ÖZGEÇMİŞ	48

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Semboller	Açıklamalar
A/P	Anterior/Posterior
AAV	Adeno-Asosiye Virüs
AGRP	Agouti ilişkili Protein
ARC	Hipotalamik Arkuat Çekirdek
ChAT	Kolinerjik neuronlarında Cre rekombinaz ifade eden fare hattı
CNO	Clozapine-N-Oxide
Cre	Causes of Recombination
D/V	Dorsal/Ventral
DMH	Dorso Medial Hipotalamus
DREADD	Dizayn Edilmiş İlaçları Aktive Eden Dizayn Edilmiş Reseptörler
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Etil Alkol
FLEX	Flip-Excision
GFP	Yeşil Floresan Protein
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür
LH	Lateral Hipotalamik
Lox	Locus of Crossing
M/L	Medial/Lateral
mAChR	Muskarinik Reseptör
ME	Median Eminens
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
nAChR	Nikotinik reseptör
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	Paraformaldehit
POMC	Pro-opiomelanocortin
rAAV	Rekombinant Adeno-Asosiye Virüs
TAE	Tris-Asetat-EDTA
i.p.	Intraperitoneal
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaHPO ₄	Sodyum Fosfat

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1: Fare beyinde hipotalamus bölgesinin sagittal gösterimi.	9
Şekil 4.2.2: Fare beyinde hipotalamus bölgesinin koronal gösterimi.	9
Şekil 4.3.1: Fare beyinde hipotalamustaki arkuat alanın koronal gösterimi.	11
Şekil 4.4.1: Kolin asetil transferaz (ChAT) mekanizması gösterimi.	12
Şekil 4.4.2: Nikotinik ve Muskarinik Reseptör Tipleri Gösterimi.	13
Şekil 4.5.1: Cre-Lox Sisteminin Şematik Gösterimi.	14
Şekil 4.5.2: Hücre özgü transgen ifadesi.	15
Şekil 4.6.1: Bir DREADD metodu olarak hM3Dq uygulaması.	16
Şekil 6.4.1: Arkuat kolinerjik nöronlarının hM3Dq aktivasyonu sonrasında besin tüketimi değişimi.	35
Şekil 6.5.1: Arkuat kolinerjik nöronlarının ablasyonu sonrası besin tüketimi.	37
Şekil 6.5.2: Arkuat kolinerjik nöronlarının ablasyonu sonrası vücut ağırlığı değişim oranı.	38

RESİMLER LİSTESİ

Resim 6.1.1: Genotipleme sonucu.	30
Resim 6.2.1: Arkuattaki kolinerjik nöronların morfolojik olarak tespiti.	31
Resim 6.3.1: ARC ^{ChAT} nöronlarının hipotalamustaki projeksiyonları.	32
Resim 6.4.1: Arkuat bölgesine yapılan enjeksiyonun görüntülenmesi.	34
Resim 6.5.1: Double transgenik (ChAT::ChR2) farelere bilateral olarak yapılan rAAV-FLEX-taCasp3-TEVp enjeksiyonunun görüntülenmesi.	36



TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1.1: TUİK verileri	7
Tablo 5.1.1: DeneYlerde Kullanılan Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	17
Tablo 5.1.2: DeneYlerde Kullanılan Gereçler	18
Tablo 5.2.2.1: Kontrol – Transgenik PZR karışımı	21
Tablo 5.2.2.2: PZR'de Kullanılan Primer Dizileri	21
Tablo 5.2.2.3: PZR Protokolü	22
Tablo 5.2.4.1: İntrakraniyal enjekte edilen rAAV	26
Tablo 5.2.9.1.1: Aktivasyon i.p. enjeksiyon saat ve miktarları.....	28
Tablo 5.2.9.2.1: Ablasyon yem tartımları	28



1 ÖZET

ARKUAT ÇEKİRDEKTEKİ KOLİNERJİK NÖRONLARIN BESLENME DAVRANIŞINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Obezite dünya üzerinde 700 milyondan fazla insanı etkileyen, yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltıp olası muhtelif hastalıkların (kardiovasküler hastalıklar, depresyon, diyabet, çeşitli kanser tipleri gibi) görülme risklerini arttırmak gibi çok yönlü etkileri olan ve belirli seviyelerinde mortaliteyle sonuçlanabilecek evrensel bir sağlık sorunudur. Günümüz mevcut yöntemlerinin yeterli düzeyde olmaması ve obezite insidansının giderek artması, obeziteyle savaşta yeni stratejilerin belirlenmesine duyulan ihtiyacı arttırmıştır. Bu hususta beyindeki enerji dengesi ve beslenmeden sorumlu alan olan hipotalamusun arkuat (ARC) çekirdek bölgesi üzerine yoğunlaşmıştır. Çünkü bu bölgenin Agouti ilişki protein (AGRP) ve Pro-opiomelanocortin (POMC) çekirdekleri üzerinden sırasıyla fizyolojik açlık ve tokluk üzerinden beslenmeyi kontrol ettiği bilinmektedir. Ancak bu kontroldeki kolinerjik nöronların rolü ve etkisinin davranışa yansımaları açığa çıkartılmamıştır. İnsanların çevresinden gözlemleyebildiği bir gerçek olan sigaraya başlayanların kilo verdiği fakat sigarayı bıraktıkları zaman hızla kilo aldıkları bu çalışma hipotezinin kurulmasında temel gözlemlerden biri olmuştur. Çünkü sigarada bulunan nikotin, nikotin reseptörleri üzerinden etkisini gösterir ki asetilkolin ifade eden kolinerjik nöronlar da temelde nikotinik (nAChR) ve muskarinik (mAChR) reseptörler üzerinden etkilerini gösterir. Yapılan bu çalışmada, hipotalamustaki kolinerjik nöronlar morfolojik olarak tespit edilip, enerji metabolizması ve beslenmeyi kontrol ettiği bilinen ARC bölgesindeki bu kolinerjik nöronların, beslenme davranışına olan etkisi incelenmiştir. ChAT (kolin asetiltransferaz) transgenik fare ile yapılan kemogenetik deneylerde, ARC'daki kolinerjik nöronların CNO ile uyarımında besin tüketiminde artış gözlenmiştir ($p=0,0014$). Aynı fare hattında ilgili bölgedeki kolinerjik nöronların ablasyonu sonrasında ise uzun vadede besin tüketiminde azalma belirlenmiştir ($p=0,038$). Dolayısıyla, ARC bölgesindeki kolinerjik nöronların beslenmenin kontrolünde kısa ve uzun vadede belirli bir şekilde rol aldığına dair önemli bulgular elde edilmiş olup, özgün sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arkuat çekirdek, kolinerjik nöron, asetilkolin, ChAT, kemogenetik, beslenme.



2 ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTS OF CHOLINERGIC NEURONS IN ARCUATE NUCLEUS ON FEEDING BEHAVIOUR

Obesity affecting more than 700 millions of people worldwide, significantly reducing life quality, increasing the likely risk of various diseases (cardiovascular diseases, depression, diabetes, definitive types of cancers) has multifaceted effects and on certain level possibly triggering mortality, is a global health problem. Since current therapeutic methods stay ineffective and obesity incidence is increasing dramatically, requirement for novel approach to treatment of obesity has emerged significantly. For this issue, arcuate nucleus (ARC) of hypothalamus, certain brain region, has been centered upon that known as control center of energy homeostasis and physiological feeding. Since this region has been known as controlling the physiological fast and feed state upon agouti related protein (AGRP) and Pro-opiomelanocortin (POMC) secreting neurons. However cholinergic neurons in these region and their effect on feeding behaviour has been remain unidentified. The fact that people observe from their environment that individuals who start smoking lose weight whereas once they quit smoking they gain weight, become one of the fundamental observation to construct hypothesis for this study. Since cigarette contains nicotine which shows its effects upon nicotinic receptors and fundamentally acetylcholine expressing cholinergic neurons exhibit their effects upon nicotinic (nAChR) and muscarinic receptors (mAChR). In this study, cholinergic neurons in arcuate nucleus are morphologically characterized and investigated the effects of those cholinergic neurons in ARC region which controls the energy homeostasis and feeding, on feeding behaviour. In the chemogenetic studies with ChAT (choline acetyltransferase) transgenic mice, cholinergic neurons in ARC stimulated with CNO shows increase in food consumption ($p=0,0014$). Ablation of cholinergic neurons in the ARC shows decrease in food consumption in the long term ($p=0,038$). Therefore our findings suggest that cholinergic neurons in ARC affects the regulation of feeding control in the short and long term, our results are novel.

Key words: Arcuate nucleus, cholinergic neurons, acetylcholine, ChAT, chemogenetics, feeding.



3 GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya nüfusunun yaklaşık %10'nu etkileyen ve prevalansı artışta olan, yaşam standartlarını önemli oranda düşüren obezite, fizyolojik ve zihinsel etkileri olan, kanser, kardiovasküler rahatsızlıklar ve diyabet gibi mortalite riski yüksek morbiditelere sebebiyet veren 21. yüzyılın önemli bir halk sağlığı sorunudur. En temelinde obezite alınan ve harcanan kalori miktarlarındaki dengesizliklerden ileri gelmektedir (1). Bunda fazlaca alınan kalori, sedanter yaşam tarzı ve genetik eğilim rol oynamaktadır. Normalde alınan enerji miktarı vücudun ihtiyacı doğrultusunda metabolize edebileceği kadardır; fakat çeşitli sebeplerle alınanın harcanandan fazla olması durumunda obezite ortaya çıkmaktadır. Kâğıt üzerinde harcanan enerjiyi alınan enerjiye denk hale getirmek sorunun çözümü gibi gözükse de günlük yaşama yansması kolay değildir. Özellikle günümüz modern toplumlarda diyetlerin enerji ve karbonhidrat yönünden yoğunlaştırılmış olması obeziteinin epidemik haline getirilmesinde büyük rol oynamaktadır (1, 2).

Beyindeki hipotalamus bölgesinin enerji metabolizması ve beslenmeyi kontrol ettiği bilinmektedir. Birçok beslenmeyle ilgili sinirsel ağ, bu bölgeden köken almakta ya da bu bölgeye bağlantı yaparak devrelerini doğrudan ya da dolaylı olarak tamamlamaktadır. Çok çeşitli nöron gruplarına ev sahipliği yapan bu bölgenin arkuat çekirdeğindeki çok çalışılan 2 grup hücre türü olan AGRP ve POMC nöronlarının, sırasıyla açlık ve tokluğu kontrol eden temel nöron grupları olduğu literatürde birçok defa açıklı kazanmıştır. AGRP nöronların açken aktif olduğu ve besin tüketimini tetiklediği, POMC nöronlarının tok durumda aktif olduğu ve besin tüketimini durduğunu bilinmektedir (3-5).

Temelde hipotalamus tarafından kontrol edildiği bilinen beslenme devrelerinin bu bölgedeki birçok çekirdeğin orkestrası tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Ayrıca hipotalamustaki bu çekirdeklerde farklı tip ve yoğunlukta dağılmış olarak kolinerjik reseptör olduğu bilinmektedir. Bu çekirdeklerden DMH (dorsomedial hipotalamus) bölgesinin ve nucleus accumbens'in beslenmeye olan etkisi literatüre kazandırılmıştır

fakat hipotalamustaki kolinerjik nöronlardan özellikle arkuat bölgesindekilerin beslenmeye olan etkisi henüz karakterize edilmemiştir (6-10).

Hali hazırda var olan tedavi yöntemleri olan farmasötik ajanlar, günlük hareketin arttırılması temeline dayanan egzersiz ve invazif girişim olan cerrahi yöntemlerin yeterli ve verimli sonuçlar sunamaması, mevcut tedavilerin dışında denenmemiş ve farklı yöntemlerin keşfi konusunda arayışlara sebebiyet vermiştir (11). İşbu sebeple, beslenme yollarının ve bu döngülerdeki düzenleyici aktörlerin haritalandırılması, buna bağlı beslenmeyi kontrol eden fizyolojik mekanizmalarının neyi, ne oranda ve nasıl kontrol ettiğinin tayin edilmesi, obezite ile mücadelede yüksek önemde rol oynayacaktır. Beynin belli bölgelerindeki kolinerjik nöronların beslenmeye olan muhtelif etkileri bilinmektedir (12), fakat beslenmeyi ana olarak kontrol eden arkuat çekirdek üzerindeki kolinerjik nöronların, bu sinir ağlarındaki fonksiyonu, beslenmeye olan etkisi ortaya çıkartılmamıştır. Dolayısıyla açlık ve tokluk durumunu merkezi olarak kontrol eden arkuat çekirdek kolinerjik nöronlarının beslenmeye olan ilişkisinin karakterize edilmesi, doğrudan ya da dolaylı olarak obeziteyle bağlantılı beslenme fonksiyonlarının merkezi düzeydeki ağsal karşılıklarının anlaşılmasında ve olası tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli rol oynayacaktır. Tüm bu bilgiler ışığında, buradaki çalışmada, beslenmeyi kontrol eden hipotalamusun arkuat bölgesinde bulunan kolinerjik nöronlar öncelikle karakterize edilip akabinde beslenmeye olan etkileri incelenmiştir.

4 GENEL BİLGİLER

4.1 Obezite

Obezite global olarak her 5 aileden birini etkileyen ve de incidansı giderek artan, küresel, halktan her kesimi etkileyen bir sağlık sorunudur. WHO (World Health Organization) datalarına göre 18 yaş üstü yetişkinlerin %39 dan fazlası overweight (fazla kilolu) kategorisindedir ve dünya nüfusunun büyük çoğunluğu, zayıflık ölümlerinden çok obezite ölümlerinin görüldüğü ülkelerde yaşamaktadır (1, 2, 11). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'in 2016 yılı verilerine göre obezite oranı %19,6' tır (13)(Tablo 4.1).

Vücut kitle indeksinin cinsiyete göre dağılımı, 2014, 2016

[15+ yaş]

Yıl ve cinsiyet		Toplam	Düşük kilolu	Normal		Obez
				kilolu	Obez öncesi ⁽¹⁾	
2014	Toplam	100,0	4,2	42,2	33,7	19,9
	Erkek	100,0	2,8	43,7	38,2	15,3
	Kadın	100,0	5,5	40,7	29,3	24,5
2016	Toplam	100,0	4,0	42,1	34,3	19,6
	Erkek	100,0	2,5	43,8	38,6	15,2
	Kadın	100,0	5,6	40,4	30,1	23,9

Tablodaki rakamlar, yuvarlamadan dolayı toplamı vermeyebilir.

(1) "Fazla kilolu" ifadesi "obez öncesi" olarak değiştirilmiştir.

Tablo 4.1.1: TÜİK verileri

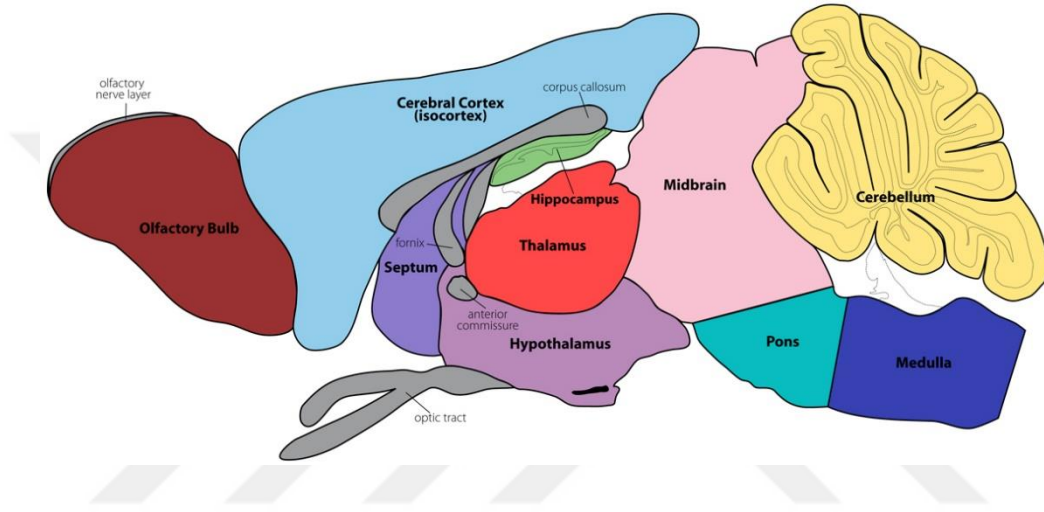
Obezite nihayetinde alınan besin enerji miktarı ile harcanan besin enerji miktarı dengesizliğinden (alınan>harcanan) kaynaklanmaktadır. Günümüz dünyasında değişen sosyokültürel roller ve yaşam standartları, beraberinde besin tüketim alışkanlıklarında da farklılıklar getirmiştir (geçmiş baz alındığında). Tarihsel süreçte besine ulaşmak için günlerce av peşinde koşan ya da saatlerce toplayıcılık yapan atalarımızın aksine oturduğumuz yerden yüksek kalorili yiyecekleri sipariş verdiğimiz, hareketsiz kaldığımız ve aldığımız enerjileri harcayamadığımız, alınan besinleri fiziksel olarak depoladığımız bir çağda yaşamaktayız ve tüm değişen bu koşullar artan obezite oranları ve sağlık sorunları olarak karşımıza çıkmaktadır (2, 14).

Obezite yalnızca artan beden yağ kütesinin yağsız kütleyle oranı, bel çevresi kalınlaşması veya kilo/boy² (vücut kütle endeksi) gibi dar kapsamlı düşünülmemelidir. Günümüzde çocuklarda da prevalansı artmakta olan, yaşam kalitesini ciddi oranda düşüren, beraberinde kanser, kardiyovasküler rahatsızlıklar, depresyon, uyku apnesi, Tip-2 diyabet, hipertansiyon gibi mortalite riski yüksek hastalıklara sebebiyet verebilmektedir (2, 11). Bu morbiditeler beraberinde ciddi ekonomik külfet doğurmakla birlikte hem hastanın kendisine hem çevresine hem de genel sağlık sistemine ağır yükler bindirmektedir. Günümüzdeki mevcut tedavi yöntemleri, egzersiz, sağlıklı beslenme ve ilaç üzerinde yoğunlaşma fakat çok yönlü bu sağlık sorunu karşısında yeterli verim alamamaktadır. Etiyolojisinin tek kaynaklı olmaması bu verim düşüklüğünü daha da arttırmaktadır. Dolayısıyla bu patolojik duruma karşı etkinliği yüksek ve güvenli farmakolojik ajanların piyasada bulunamaması, bu halk sağlığı sorununun çözüme ulaşmasında büyük engel oluşturmaktadır. Yine piyasadaki mevcut ilaçların veriminin düşük olması, yeni ilaçların piyasaya çıkmasının uzun yıllar alması- gerekli güvenlik aşamalarından ötürü-, hızlı tedavi umutlarının pahalı, yan etkilerinin ağır ve öngörülemez olması, bu sorunla mücadeleyi daha da zorlaştırmaktadır (1, 2, 11, 13, 14).

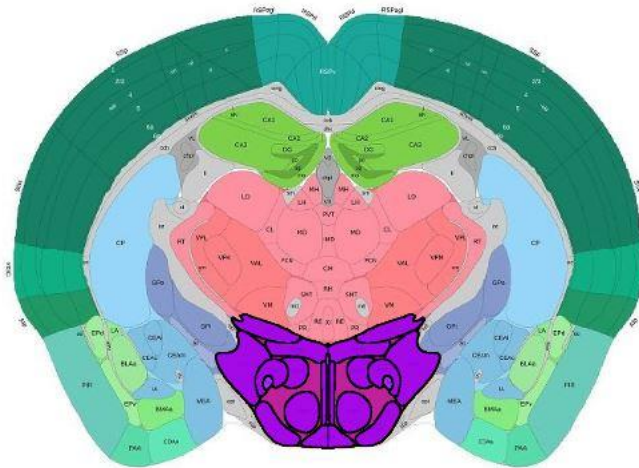
Obeziteyle mücadelede başarıya ulaşamamış olması, çeşitli alanlarda öncü araştırmalara gereksinim doğurmuştur. Bu hususta yeni mekanizmaların açığa çıkartılması ve daha önce denenmemiş metotların denemesi, olası çözümler vaat edebilme potansiyeli taşıması açısından yeni yaklaşımlara sıcak bakılmasına sebep olmuştur. Dolayısıyla beyindeki bazı bölgelerin beslenmeden sorumlu olup enerji mekanizmasını yönettiği bilgileri ışığında obeziteye sebebiyet verecek keşfedilmemiş beslenme mekanizmalarının haritalandırılıp çözümlenmesi ve buna bağlı fizyolojik olayların karakterizasyonu vasıtasıyla gelecekte ilgili yerlere gerekli müdahale ile düzenleme olasılığı sunması, tüm bu çalışmaların bu hastalıkla mücadelede önemli rol oynamasına yol açmaktadır (14).

4.2 Hipotalamus

Hipotalamus, talamusun altında, 3. ventrikülün her iki yanında, sfenoid kemiğin sella turcica bölümünün üzerinde konumlanmış, bünyesinde birçok çekirdek bulunduran, diensefalonun sinir sistemini endokrin sistemle hipofiz bezinde birleştiren, diensefalonun ön kısmından gelişip limbik sistemin parçası olan, çok çeşitli fonksiyonlarıyla badem büyüklüğü boyutunda beyin bir bölgesidir (15).



Şekil 4.2.1: Fare beyinde hipotalamus bölgesinin sagittal gösterimi. Hipotalamus bölgesi mor renkte gösterilmiştir (15).



Şekil 4.2.2: Fare beyinde hipotalamus bölgesinin koronal gösterimi. Hipotalamus bölgesi mor renkte gösterilmiştir (15).

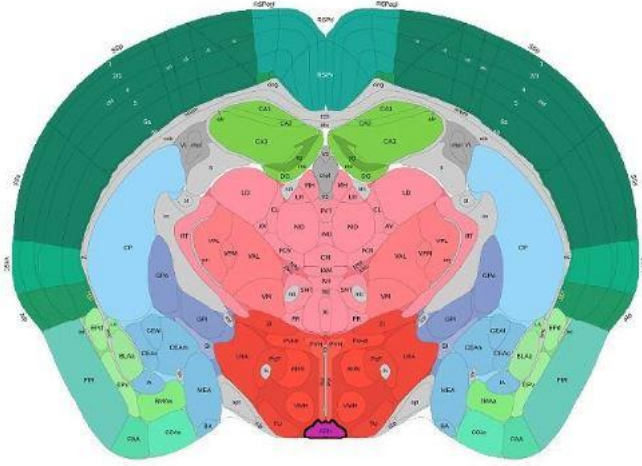
Otonomik sinir sistemi işlevleriyle beraber hipotalamus, metabolik birçok işlemi homeostasisin korunması kapsamında kontrol etmektedir. Belirli nörohormonlar sentezler ki bu salgılama hormonları hipofiz bezinin aktivitelerini kontrol eder. Hipotalamus vücudun sıcaklık, açlık, duygusal bağlılık, susuzluk, yorgunluk, uykusuzluk ve sirkadyen ritim gibi önemli mekanizmaları kontrol etmektedir (16). Evrimsel açıdan beynin en korunaklı merkezlerinden birinde yer alması, neden bu kadar hayati fonksiyonları kendisinde barındırdığına dair ipuçları taşır.

Hipotalamusta bulunan beslenmeyi düzenleyen alanlardan salgılanan hormonlardan Neuropeptit Y (NPY), Agouti ilişkili protein (AGRP), orexin A, B ve melanin konsantre eden hormonun (MCH) iştahı ve besin alınımını arttırdığı bilinmektedir, ghrelin etkisiyle birlikte. Alpha, beta, gama melanosit uyarıcı hormon (MSH), pro-opiomelanocortinin (POMC) ise tam tersi bir şekilde, leptin ve CCK etkileriyle birlikte iştahı azaltıp, beslenmeyi baskıladığı bilinmektedir (17). Bu işlevlerde en temel görev alan merkez arkuat çekirdektir.

4.3 Arkuat Çekirdek

Arkuat hipotalamusun tabanını döşeyen, 3. ventrikül ile median eminensin bağlantı noktasında konumlanmış bir çekirdektir. Çeşitli bağlantı yolları üzerinde konumlanması çok çeşitli nöron popülasyonlarına sahip olmasına yol açmıştır. Bu çeşitlilik beraberinde beslenme, metabolizma, üreme ve kardiovasküler düzenleme gibi homeostasiste önemli rol oynamasına sebebiyet vermiştir. Bu farklı nöron popülasyonları nice nöroendokrin ve fizyolojik görevleri yerine getirmek üzere çeşitli nörotransmitter ve nöropeptitler salgılayan ya da ilgili muhtelif yanıtlar veren: TIDA nöronları, kisspeptin nöronları, GHRH nöronları, NPY/AGRP nöronları ile POMC/CART nöronları ve GnRH nöronları olarak gruplara ayrılmıştır. Bunların dışında çeşitli yerlere projeksiyon yapan nöronlar, astrositler ile özelleşmiş subgrup pek çok nöron grupları olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla iç içe geçmiş, gabaerjik, dopaminerjik, kolinerjik nöronlar yumağı içinde, kolinerjiklerin salt etkisini soyutlamak teorik olarak analizi zorlayıcıdır. Çünkü kolinerjik nöronların bir kısmı POMC nöronları, bir kısmı TH, bir kısmı da AGRP ifade eden nöronlardan

oluşmaktadır (7). Buna rağmen bizim çalışmamızda beslenme metabolizmasında oynamış olduğu kilit rolden ötürü, arkuat çekirdek üzerinde yoğunlaşmış olup buradaki çok çeşitli nöron gruplarından kolinerjik nöronlar etkileri ilk defa karakterize edilerek davranışa yansımaları kavranmaya çalışılmıştır (18-21).

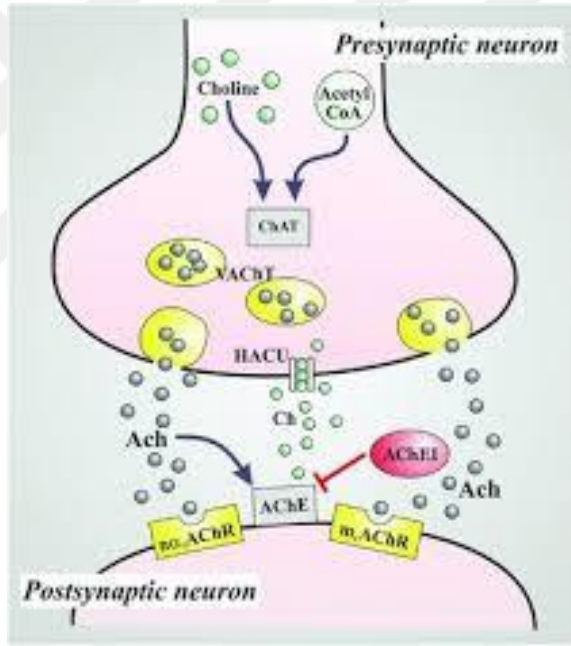


Şekil 4.3.1: Fare beyinde hipotalamustaki arkuat alanın koronal gösterimi. Arkuat bölgesi mor renkte gösterilmiştir (15).

4.4 Kolinerjik nöronlar ve ilgili reseptörleri

Kolinerjik nöronlar temelde mesajlarını iletmek için nörotransmitter olarak asetilkolin (ACh) kullanan sinir hücreleridir. İlk defa 1937 yılında Sir Henry Dale (22) tarafından ortaya atılan kolinerjik iletim hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bulunan, apoptozdan hücre çoğalmasına ve farklılaşmasına, sirkadyen ritimden öğrenmeye kadar pek çok çeşitli fizyolojik görevde rol alan, çok eski bir sinyal iletim yoludur (23, 24). Koklama davranışının gelişimi ve çağımızın yaygın nörodejeneratif hastalıklardan olan Alzheimer hastalığında da rol oynayan kolinerjik nöronlar (25, 26), etki molekülü olan asetilkolini ihtiva ettikleri kolin asetil transferaz (ChAT) enzimi tarafından sentezler. ChAT enzimi bir transfer enzimidir ve koenzim asetil KoA daki asetil grubunu koline ekler ki sonucunda asetil kolin molekülünü sentezler (27).

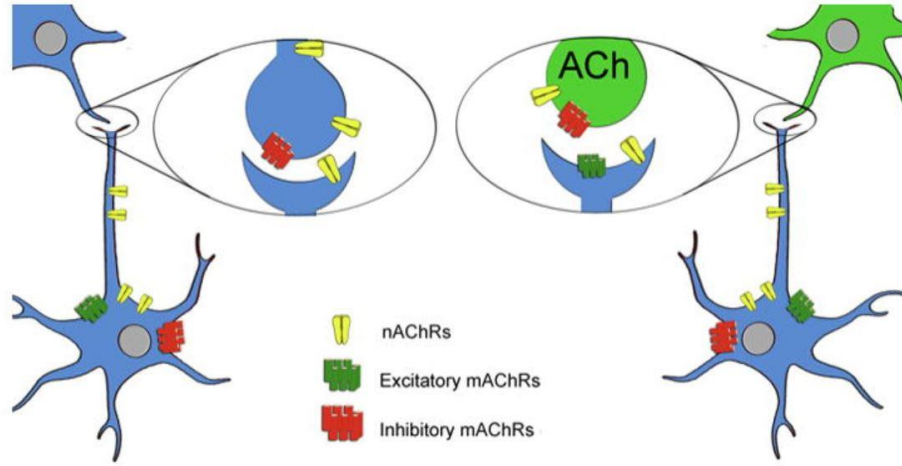
Bu da sahip olduğu sinir hücresine kolinerjik olma özelliği kazandırır. Yani merkezi sinir sistemindeki bir sinir hücresi ChAT enzimine sahipse o hücre kolinerjik olarak sınıflandırılır. Birçok canlı türünde sekansı korunmuş olan ve insanda 10. kromozomdaki ChAT geninden sentezlenen koline asetil transferaz enzimi ilk defa 1943 yılında David Nachmansohn tarafından tanımlanmıştır (27, 28). Çözünen %80 ve membrana bağlı (vChAT) %20 vesiküllerle ilişki (vChAT) olarak 2 formu olan ChAT geni, diğer çoğu sinaptik proteinler gibi somada üretilip hücre uçlarına doğru taşınır. Oluşan asetilkolin postsinaptik membradaki katalitik bir hidrolaz enzimi olan asetil kolinesteraz tarafından tekrardan kullanılmak üzere koline ve asetil yapı taşlarına degrades olur.



Şekil 4.4.1: Kolin asetil transferaz (ChAT) mekanizması gösterimi. Kolin asetil transferaz enziminin asetil Koa dan asetil grubunu koline transfer edip asetil kolin üretmesinin şematik gösterimi.

Merkezi sinir sisteminde asetilkolin etkisini, farklı alt tipleri bulunan ($\alpha 1-9$, $\beta 1-4$, γ , δ , ϵ) nikotinik (nAChRs - iyonik kanal) ve M_1 , M_2 , M_3 , M_4 and M_5 alt tipli muskarinik (mAChRs- G protein bağlı protein) reseptörler üzerinden gösterir ki bu reseptörler aynı liganda karşı farklı (hafıza, ödül, iştah, öğrenme gibi) fizyolojik tepkiler verir (12, 24). Bunlardan M_1 , M_3 , ve M_5 reseptörleri, ifade olduğu hücrede G_q yolağı üzerinden

aktive edici rol oynarken M_2 , ve M_4 reseptörleri ise G_i yolağı üzerinden ifade olduğu hücrede inhibe edici yollar üzerinden etkisini gösterir (8). Tüm aktive ve inhibe edici muskarinik ile nikotinik reseptör aynı ve de farklı hücrelerde, farklı miktar ve kombinasyonda bulunup, bağlı bulunduğu hücre tipine göre komplike yanıt algoritmalarına sebebiyet vermektedir (7, 8, 29).

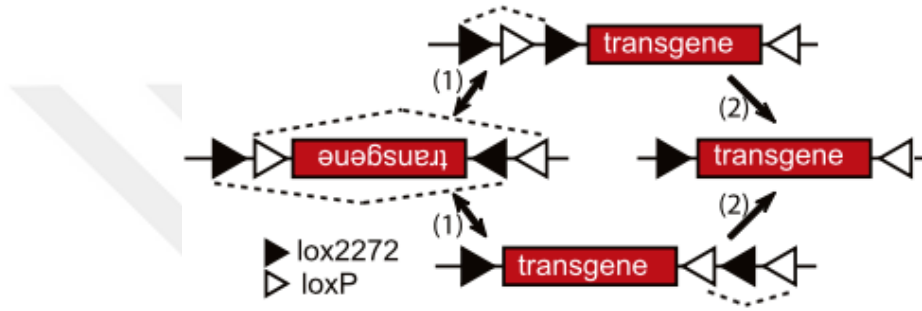


Şekil 4.4.2: Nikotinik ve Muskarinik Reseptör Tipleri Gösterimi. Asetilkolinin etki ettiği 2 tip reseptör olan nikotinik ve muskarinik reseptörlerin hücrelerdeki dağılımının şematik gösterimi (8).

4.5 Hücre Tipi Spesifik Transgen İfadesi ve Transgenik Fare Modeli

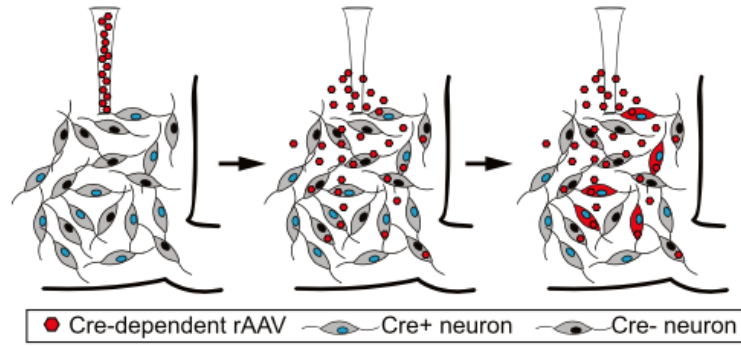
Çok çeşitli nöron tipleri olduğu için nöron altı grupları ve fonksiyonlarını belirleyebilmek için hücre tipi spesifik manipülasyonlar zaruridir. Örnekleme gerekirse yalnızca ChAT nöronlarını işaretleyip geri kalan nöron gruplarını arka planda bırakacak metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Aksi durumda, alakalı ve alakasız pek çok farklı nöron işaretlenmiş olacak, hangi nöronların ilgili davranışa etkisi olduğu ayırt edilemeyecektir. Hücre tipi özgün transgen ifadesinin burada imdada yetişmesi, söz konusu belirsizliklerin minimalize edilmesi için önemli bir çözüm oluşmuştur (30).

Bölgeye özgü rekombinasyon açılımı “causes of recombination” olan Cre enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. DNA tanıma bölgesi 34 baz çifti uzunluğuna sahip açılımı “Locus of crossing” olan LoxP tarafından sağlanır. LoxP bölgesi Cre rekombinaz enzimi tarafından tanınır. Rekombinasyon sonucu tersine çevrilmesinden faydalanılan bu teknikte eğer Locus of crossing (LoxP) bölgeleri zıt yönlerde ve aynı DNA üzerinde ise, aşağıdaki şekilde de şematize edildiği şekilde ilgili genin oryantasyonunu Cre varlığında tersine döndürür (30).



Şekil 4.5.1: Cre-Lox Sisteminin Şematik Gösterimi. Cre varlığında LoxP'in yönüne göre, terse çevirme rekombinasyonunun gerçekleşmesi (30) .

Cre knock-in transgenik farelerin satın alınmasının sebebi yukarıda bahsedilen teknikten yararlanıp hücreye özgü transgenik ifadeler elde edebilmek için ilgilili nöronlar özgü spesifik gözlemler sağlayabilmek içindir. Bu sebeptendir ki hücre tipi spesifik ifadeler, LoxP dizisine sahip rAAV virüsleri farelere enjekte edildiğinde açığa çıkabilmektedir. Dolayısıyla yalnızca, rekombinant adeno asosiyasyon virüsleri ile taşınan gen, Cre knock-in hücrelerde ifade olabilecek, geri kalanlarda ifade edilemeyecektir. Bu sadece Cre enzimi bulunan transgeni taşıyan hücrelerin işaretlenmesini sağlayacak, diğer hücreler işaretlenmeyecektir (30) (Şekil 4.5.1-Şekil 4.5.2).



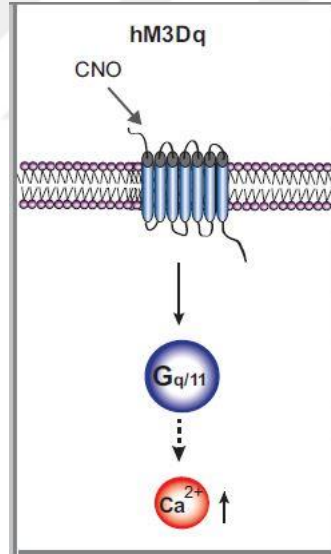
Şekil 4.5.2: Hücre özgü transgen ifadesi. Cre varlığında zıt yönlerdeki 2 LoxP dizisi arasındaki ters yöndeki genin, ters çevrilerek Cre'ye bağımlı ve anlamlı bir şekilde ifade edilmesi (30).

ChAT^{tm2(cre)Low1} fareler, yukardaki bahsedilen sebeplerden ötürü cause of rekombinasyon tekniğinden faydalanarak ilgili bölgedeki ChAT nöronlarının fonksiyonel karakterizasyonu yapılması amacıyla kullanılmıştır. Değişkenlik ya da takip için kullanılacak gen dizileri (hM3D, GFP), intrakraniyal olarak verilen ilgili LoxP dizilerine sahip rAAV virüsleriyle ters olarak verilmiş, Cre varlığında ilgili hücrelerde düz olarak ifade edilip, söz konusu nöronların fonksiyonel analizi sağlanmıştır (30).

4.6 Kemogenetik Uygulama

ChAT nöronlarının davranışına olan etkilerini karakterize edebilmek için birtakım çalışmalar yapılmıştır. Lakin söz konusu deneyler genelde oldukça invazif patojenitelerin etkisini gözlemekten ileri gelip, bazen de oluşan hasarlar geri dönüşsüz bir şekilde çeşitli ajanlarla lezyon yaratarak görevlerini anlamaya yönelik ya da fazla ifade ettirerek fonksiyondan ziyade sonuçlarını gözlemeye dayanmaktadır. Bu durum yüksek oranda deney hayvanlarının deneyi tamamlayamadan ölmeleriyle neticelenmektedir. Aşırı ifade de benzer bir durum söz konusu olup kalıcı ve yan etkileri olan ciddi hasarlar oluşmakta olup tam doğal fonksiyonu kavramaktan uzak bir netice alınmaktadır. Tüm bu sebeplerden ötürü minimal zarar veren inovatif metotlara ihtiyaç duyulmuştur.

Tüm bu sorunlara cevap olarak özel olarak dizayn edilmiş (kontrollü mutasyon sonucu) reseptörlere karşı özel olarak dizayn edilmiş ilaçlar (DREADD) geliştirilmiştir (31). Söz konusu özel olarak dizayn edilmiş G proteine temelli reseptörler, hücreye özgü transgenik ifadeyi görebilmek için, ilgili hücrelere verilir. Söz konusu reseptörler önceden bahsedilen teknik sayesinde yalnızca ilgili hücrelerde ifade edilir ve o hücrelerin manipülasyonuna zemin sağlar. Aktivatör G_q sinyal yolağını çalıştıran hM3Dq reseptörü insan M_3 tipi muskarinik reseptör türevidir ve asetilkolin ile değil de Clozapine-N-Oxide (CNO) adlı ligand varlığında aktive olur (32). Bu sırada hücre içi kalsiyum depoları sitoplazma yönünde boşalarak hücrenin uyarım oranını fazlasıyla artırır (30, 33). Farelere intraperitoneal (i.p.) verilen CNO, hM3Dq'leri aktifleştirir ve bu etki CNO'nun kısa sürede yıkımından ötürü (12 saat) uzun soluklu değildir, hızlı bir inaktivasyon yaşanır (Şekil 4.5.1). Bu da bize kullanılan tekniğin mevcut tekniklere göre daha kontrollü, tersinir ve daha az yan etkisi olan bir teknik olduğunu gösterir (30, 31, 33).



Şekil 4.6.1: Bir DREADD metodu olarak hM3Dq uygulaması. CNO varlığında hM3Dq reseptörü aktive olur ve hücre içi kalsiyum yollarını aktifleştirir. Bu hücrenin aktivitesinin artmasına sebep olur (30).

Dolayısıyla hM3Dq ile kontrollü olarak aktive edilen arkuat bölgesindeki ChAT nöronları, bizlere bu nöronların beslenmedeki rolünü daha açık bir şekilde gösterecektir.

5 MATERYAL VE METOT

5.1 Materyal

Tablo 5.1.1: DeneYlerde Kullanılan Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar

Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	Marka	Ürün Kodu
LB Agar	Biomatik	A8523-500G
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Life Technologies	51985-034
LB Broth	Biomatik	A8523-500G
Primerler	Sentegen	
293 AAV hücre hattı	Cell BioLabs	AAV-100
AVV plazmitleri	Addgene	
Sodyum Pirüvat ($C_3H_3NaO_3$)	Sigma-Aldrich	P5280
Agaroz	Sigma-Aldrich	A9539
Glasiyal Asetik Asit	Sigma-Aldrich	537020
Ethanol	Sigma-Aldrich	46139
Paraformaldehit	Sigma Aldrich	15127
Glutamax-I	Gibco	35050-061
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma-Aldrich	P9541
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich	S7653
Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich	S6014
Sodyum Fosfat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich	S8282
Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$)	Sigma-Aldrich	C1016
Magnezyum Klorür ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich	208337
Fosfat Tamponlu Tuz (PBS)	Multicell	311-010-CL
Fenol KırmızıSı	Capricorn	600-070-IG
Fluoromount Mountin Medium	Sigma-Aldrich	F4680
D-Sorbitol High purity	Sigma-Aldrich	BMA2450
Trypsin (0,25%) in DPBS	Capricorn	CPTRY2B
DMEM High Glucose	Multicell	WS319005CL
Polyethylenimine Branched	Sigma-Aldrich	SG408727
EndoFree Plasmid maxi kit	Qiagen	12362

Benzonase	Sigma-Aldrich	E8263
SafeView	Alfagen	G108
Gel Loading Dye Purple (6X)	NEB	B7024 S
Taq PCR Kit	NEB	E5000 S
LMA Agaroz	Sigma-Aldrich	F4680
Red Retrobeads™	Reducta	8060
Triton X-100	Lumafluor	R180
Trizma® HCl	Sigma-Aldrich	X100
OptiPrep™ Density Gradient Medium	Sigma-Aldrich	D1556
Clozapine N-Oxide	Enzo LifeSciences	BML-NS105
Dekstroz	Sigma-Aldrich	D9434
Sükroz	Sigma-Aldrich	0389
Sodyum Askorbat (C ₆ H ₇ NaO ₆)	Sigma-Aldrich	PHR1279
OneShot Stbl-3 Kompetant <i>E.coli</i> hücre hattı	Life Technologies	C737303
Ensure® TwoCal Strawberry	Abbott	S16630

Tablo 5.1.2: Deneyleerde Kullanılan Gereçler

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodu
ddH ₂ O Cihazı	Millipore	ZRQSV8W
OptiSeal Santrifüj Şişeleri	Thermo Scientific	7600302
MicroPunch	Harvard Apparatus	340140
Portatif Anestezi Cihazı	Beyza Medikal	
Micromotor	Istanbul Dis Deposu	
Tartı	Ahaus Explorer	EX124-US
Drummond Wiretrol™ II Kalibre	Minstar	
Mikropipet	Fisher Scientific	21-176-2A
Peristaltik Pompa		
0,2 mL PCR tüp	Isolab	123.01.002
ChemiDoc™ MP System	BioRAD	
Çalkalayıcı	Benchmark Scientific	BR2000

Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter	Millipore	UFC910024
Ear Tag	Harvard Apparatus	52-4717
Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube	Sigma-Aldrich	Z666505
Multi-Therm Shaker	Benchmark Scientific	H5000-HC
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Scientific	H400HSB
pH metre	Isolab	pH7110
PowerPac™ Universal Power Supply	BioRAD	1645070
Santrifüj	Orto Alsera	Biocen 22R
Spectrometre cihaz	BioRAD	
T100™ Thermal Cycler	BioRAD	1861096
One-axis Oil Hydraulic Micromanipulator	Narishige	MO-10
Ultrasonikator	Bandelin Sonarex	
Vorteks	Benchmark Scientific	BV1000
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM-780
PatchPad	Scientifica	
Mikropipet Çekici	Sutter Instruments	P-1000
Ozmometre	Advance Instruments	3250
SliceScope Pro3000	Scientifica	Pro300
Programmable Perfusion System	Scientifica	
Motorised Moveable Top Plate	Scientifica	
Vibratom	Leica	VT1000s
PatchStar Micromanipulator	Scientifica	
Monokrom Kamera	Watec Cameras	WAT-902H
Hava Kompresörü	Stanley	DN200/8/6
Axon Digidata Digitizer	Molecular Devices	Model 1550
Multiclamp Amplifier	Molecular Devices	Model 700B
Programmable Pulse Stimulator	A.M.P.I	Master 9
Stereo Mikroskop	Zeiss	Discovery
pE Excitation System Main Unit	CoolLED	V8
Digital Storage Osiloskop	Tektronix	244-1500
pE Excitation System Remote POD	CoolLED	TDS2001C
		244-1400

5.2 Metot

5.2.1 Deney hayvanları

Chat^{tm2(cre)Low1} veya ChAT-IRES-Cre::*frt-neo-frt* olarak da bilinen, 6410 kodlu ChAT hattı transgenik erkek fareler Jackson Laboratuvarından alınarak dişi C57BL/6 yabanıl tip farelerle çiftleştirilerek üretildi. Doğan yavruların transgenik olup olmadıkları anlamak için kulaklarından alınan dokular, yavrular yeterli olgunluğa (takriben 4 hafta) eriştikten sonra anestezi altında hızlı bir şekilde alındı. Akabinde dokulardan izole edilen DNA örneklerine genotipleme yapılarak söz konusu farelerin transgenik olup olmadıkları belirlendi vr üreme olgunluğa erişmeden cinsiyetlerine göre kafeslere ayrıldı. Deney grupları için toplamda 36 adet ChAT-Cre alınarak deneye alındı. 24 ve 12 adet ChAT-Cre transgenik fare ile deney grupları oluşturuldu. Tüm söz konusu farelerin deneyleri İMÜ-HADYEK tarafından yasal izinleri ve onayları alınmış bir şekilde yapılmış olup, barınma ve bakımları ise MEDITAM tarafından sağlanmıştır.

5.2.2 Genotipleme

C57 ile çiftleşmeden doğan 2. ve sonraki nesil yavruların transgenik olup olmadığını anlamak için, yeterli olgunluğa (4 hafta) eriştikten sonra kulaklarından doku alınıp DNA'ları izole edildikten sonra genotiplemeleri yapıldı. Cre olmayan transgenik fareler, ilgili manipölasyonlara yanıt vermeyecekleri için yalnızca transgenik olan fareler seçilip deneylere bu fareler ile devam edildi.

5.2.2.1 DNA eldesi

C57 anneden doğan farelerin kulaklarından alınan doku anestezi altında alındı. Akabinde numaralı künyeler ayırt edici olarak farelerin kulaklarına takıldı. Alınan dokular doku izolasyon protokolüne göre ele alındı. Bunun için 0.2 ml lik PCR tüplerine 75 µL 25mM NaOH/EDTA konuldu. Bu tüpler ayrışma için PCR (T100™ Thermal Cycler) cihazında 98°C sıcaklıkta 1 saat ısıtıldı. Yeni tüplere aktarılmadan

önce 40 mM Tris/HCl 75 µL kadar üzerine eklenip, 4000 rpm hızla 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı DNA içerdiği için yeni bir tüpe aktarıldı.

5.2.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Ayrıştırılan süpernatant içindeki DNA aşağıdaki solüsyonlar ile belirtilen oranlarda karıştırılarak PZR mixleri elde edildi. Tüm DNA örnekleri için ayrı ayrı kontrol ve PZR karışımı hazırlandı. Negatif kontrol için son tüpe DNA konulmadan, yerine su ve geri kalan malzemeler konularak bırakıldı. Ardından tüplerdeki son hacim 12 µL olacak şekilde ddH₂O ile dolduruldu.

Tablo 5.2.2.1: Kontrol – Transgenik PZR karışımı

Gereç		Son Konsantrasyon
10X Reaksiyon tampon çözeltisi	Aynı	1X
İç pozitif kontrol geri primer	Transgenik geri primer	0,5 µM
Ortak primer	Aynı	0,5 µM
Taq Polimeraz	Aynı	1,25 unit/50 µl PCR
dNTP Solüsyon Karışımı	Aynı	200 µM
DNA		
ddH ₂ O		

Tablo 5.2.2.2: PZR'de Kullanılan Primer Dizileri

Primer	Dizi 5' → 3'
Transgenik primer	ATC GAC CGG TAA TGC AGG CAA
Ortak primer	GAA AAG ATA AGG CCT TCA AGT GCT
İç pozitif kontrol geri primer	GAT CTT TCT GCA GTA TCT TCC TTC

PZR cihazına hazırlanan karışım aşağıdaki protokol takip edilecek şekilde ayarlanıp konuldu.

Tablo 5.2.2.3: PZR Protokolü

Döngü	Sıcaklık	Süre
1	95°C	1 dakika
	95°C	30 saniye
36	60°C	30 saniye
	68°C	1 dakika
1	72°C	5 dakika

5.2.2.3 Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme

3 g agaroz, pH:7'deki 20mM Glasiyal, 6 EDTA ve 40 mM Tristen oluşan 100 µL lik 1X TAE tampon çözeltisine eklenip agaroz çözülüne kadar 160°C'de sıcaklıkta mikrodalgada ısıtıldı. Tarakları takılarak hazır hale getirilmiş olan elektroforez kasetine, berraklaşmış hazır hale gelen çözelti, içine 5µL Safeview eklenip döküldü. 1X TAE tampon çözeltisi yüklü elektroforez tankına, yaklaşık 20 dakika sonra jel/jöle kıvamına geldiğinde aktarıldı. Bant aralıklarını görebilmek için belirteç birinci kuyucuya 5 µL kadar konulup kalan kuyulara da 1 µL yükleme boyasıyla iyice karıştırılan 9 µL PCR ürünleri konuldu. 90V'da potansiyelde 30 dakika kadar bant aralıklarının açılması için yürütüldü. Bant aralıkları yeterince açıldıktan sonra jel BioRAD ChemiDoc cihazında görüntülendi. Transgenik fareler için referans aralıkları bilinen bantlara denk gelen PCR ürünlerine sahip transgenik fareler saptanarak, bu fareler kullanılacak deneyler için transgenik olarak tayin edildi.

5.2.3 Rekombinant adeno-asosiy virüs üretimi

Addgene firması rAAV üretimi için gereken plazmitleri hazır olarak satmakta olduğundan kendilerinden ilgili plazmitler temin edildi. Bakteriyel sürüntü halinde satın alınan plazmitler, yetkin stb13 E.coli transformasyonu ile geldi.

5.2.3.1 Plazmit DNA çoğaltma

Sterilizasyon için, LB agar çözeltisi 35 g/L oranında H₂O ile karıştırılarak otoklavlandı. Antibiyotik direnci için soğutulduktan sonra bu karışıma 100 µg/mL ampisilin eklendi. Donmaya bırakmak için, LB agar, 10 cm polistiren petri kaplarının 2/3 ünü dolduracak şekilde döküldü. 37°C’de Overnight (gece boyunca) bekletilmek üzere, katılaştıran agar plazmitler yaydırıldı. Bakteri kolonileri ertesi gün petrilerin üstünde oluştu ve özeye alınan bu bakteri kolonileri, otoklavla sterile edilen 20 g/L LB sıvı besiyeri yerine transfer edildi. Yeni besiyeri yerine aktarılan bu bakteriler 37°C derece logaritmik artış evresine bırakıldı. Yeterli miktarda artış sonrası doygunluğa ulaşan bakteriler (yaklaşık 16 saat) 4°C sıcaklıkta 15 dakika boyunca 6000 rpm’de santrifüj edilip pelletteki bakteriler -20°C’deki derin donduruculara kaldırıldı. Ana vektör, yardımcı vektörler ve ana plazmit için tüm bu işlemler, her bir parça için yinelenildi.

5.2.3.2 DNA izolasyonu

Ana plazmidi oluşturan ana vektör, yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper plazmitlerden oluşan pelletler -20°C dolabından alınıp çözüldü. Çözünen bu bakteri pelletinden Qiagen plazmit kitiyle DNA’lar elde edildi ve konsantrasyon tayinleri SpektraMax ile tespit edilip tüm bu işlemler bütün plazmitler için tek tek yinelenildi.

5.2.3.3 293AAV Hücre transfeksiyonu

Cell BioLabs firmasının 293AAV hücre hattı rAAV için özelleşmiş olduğundan satın alındı. Temin edilen bu hücreler %20 O₂, %5 CO₂ ve 37°C deki koşulları sağlayan inkübatörde 10x10 cm petri kaplarına ekilip büyütüldü. Belirli doygunluklara (yüzde 70-80) geldikçe pasajlanarak çoğaltılan hücreler yeterli sayıya ulaştığında transfeksiyona hazır hale getirildi. Bunun için steril bir tüp içerisinde polietilenimin, Opti-MEM transfeksiyon medyumunu ve 24 µg yardımcı vektör helper, 20 µg yardımcı vektör 2/1 ile 12 µg ana vektör eklenip hücrelerin üzerine eklenmeye hazır hale getirmek üzerine karıştırıldı. Akabinde hücreler, verilen bu karışımla %20 O₂, %5 CO₂ ve 37°C deki koşulları sağlayan inkübatörde 3 gün boyunca bekletildi. 72 saatin

sonunda ise transfekte olmuş olan bu hücreler toplanarak 1100 rpm'de 5 dakika boyunca 4°C derecede santrifüj edildi. Dipte bulunan hücreler, çökeltinin üzerindeki süpernatantları atılarak -80°C'de muhafaza edildi.

5.2.3.4 Pürifikasyon

Elde edilen pelletteki hücreler 150mM NaCl, 20mM Tris (pH 8,0) içeren 9 ml steril liziz çözeltilisine eklendi. 3 defa tekrar edilecek bu işlemde başta Kuru buz- %70 EtOH karışımına maruz kalan hücreler, akabinde ise 120 saniye 37°C su banyosuna maruz bırakıldı. Bu işlemin ardından hücreler 3 dakika boyunca sonikatöre maruz bırakılarak içlerinde ihtiva ettikleri virüsler açığa çıkartıldı. Arkasından 250 U/mL Benzonase ve 1mM MgCl₂ pürifikasyon için eklendi. 4000 rpm'de ve 4°C sıcaklıkta 20 dakika boyunca santrifüj edildi. 10 mL 5M NaCl, 0,125 mL 1M KCl, 0,05 mL 1M MgCl₂, 5 mL 10x PBS, 12,5 mL Iodixanol, ve 50 mL'ye kadar H₂O ile tamamlanan oluşan 17%'lik çözelti; , 0,1 mL 0,5% fenol kırmızısı, 5 mL 10x PBS, 20 mL Iodixanol, 0,05 mL 1M MgCl₂, 0,125 mL 1M KCl, ve 50 mL'ye kadar H₂O oluşan 25%'lik çözelti, 10 mL 5 M NaCl, 5mL 10x PBS, 0,125 mL 1 M KCl, 0,05 mL 1 M MgCl₂, 33,3 mL Iodixanol ve 50 mL'ye kadar H₂O ile tamamlanan 40%'lik çözelti ile 0,025 mL 0,5% fenol kırmızısı, 0,05 mL 1 M MgCl₂, 50 mL Iodixanol, 0,125ml 1 M KCl dan oluşan 60%'lik çözelti hazırlandı. Hücre lizası optiseal ultrasantrifüj tüplerine şırınga yardımıyla sırasıyla %60'lık çözelti (3 mL), %40'lık çözelti (5 mL), %25'lik çözelti (6 mL) ve %17'lik çözelti (6 mL) yavaş bir şekilde damlatıldı. Yüksek bir rpm olan 60000 rpm'de bir buçuk saat 18°C sıcaklıkta santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında virüsler sedimentasyon ağırlıklarına denk gelen %40'lık çözeltilinin bulunduğu katman etrafında toplandı ve buradan şırınga yardımıyla aspire edildi. Amicon 100k Filtre kolonları, 4 mL %5 NaCl, 50 g D-Sorbitol, 10x PBS, 1 L: 100 mL den oluşan 1x tampon çözeltisiyle ıslatılıp hazır edilip bu kolonlara %40'lık çözelti içeren katman eklendi ve 15 mL'ye tamamlanana kadar başta belirtilen 1x saklama tampon çözeltisi eklendi. 3500 rpm'de 30 dakika boyunca 4°C derecede santrifüj edildi. Her işlem sonrası üstte bahsedilen 1x saklama tampon çözeltisi eklenip 2 sefer daha basamaklar tekrar edildi. Bu işlemler neticesinde filtrenin üzerinde toplanan virüsler alındı ve -80°C'de muhafaza edildi.

5.2.4 İnrakraniyal rekombinant adeno-asosiye virüs enjeksiyonu

Labımızda üretilen rAAV'ler, 4 haftayı tamamlamış ChAT-Cre transgenik farelerin hipotalamusunun arkuat çekirdeğine aşağıda belirtilen metotla intrakraniyal olarak enjekte edildi:

Gelişim sürelerini tamamlamış 4 haftalık fareler isofloran anestezisi altında stereotaksik cihaza temporal kemiklerinden sabitlererek yerleştirildi. Kordinatların doğruluğu açısından önem arz eden kafanın düz ve sabit oluşu referans noktalardan emin olunduktan sonra kafa derisi Betadin ile enfeksiyon riskini düşürmek ve kontaminasyonu engellemek için, tıraştan sonra temizlendi ve bisturi ile kesildi. Kemikleri belirgin hale getirmek için hidrojen peroksit uygulandı. Kafatasında kalan hidrojen peroksit serum fizyolojik yardımıyla temizlendikten sonra stereotaksik cihaza bağlı mikroskop altında ilgili merkez için kraniyal koordinatlar belirlendi. Narishige mikromanipulatörün ucuna eklenen iğnenin referans bulmadaki desteğiyle Bregma noktasında tüm koordinat değerleri referans olarak baz alındı (0,0,0) ve arkuat bölgesi için Anterior/Posterior (A/P) olarak 1,3 mm, Medial/Lateral (M/L) olarak 0,2 mm ve Dorsal/Ventral (D/V) de 5,6 mm olacak şekilde koordinatlar belirlendi. Tam bu noktada kafatası, diş dolgusu için de kullanılan bir alet olan driller yardımıyla matkabın duvarı delmesi gibi delindi. Bu işlemlerden sonra mikropipet çekici (Sutter P-1000) ile camı ısıtması prensibiyle cam mikropipetler ısıtılıp inceltilerek içine yağ konulup enjeksiyona hazır hale getirip, içine virüs çekmek üzere Narishige enjektöre ucuna bağlandı. Mikropipet, ilgili rAAV ile yaklaşık 1µl kadar dolduruldu. Önceden belirtilen tüm xyz koordinatları için, beyin yüzeyi bregmandan itibaren xy ilerleyerek z için varılan kordinatta arkuat için D/V: -5,6 mm olacak şekilde beynin içinde yavaşça ilerlendi. Bir turu 80 nL olan Narishige enjektör ile tek taraf için 6 tur enjeksiyon yapıldı. Virüslerin kapillar olarak geri gelmemesi ve ilgili bölgede tutması için 10 dakika beklemenin ardından cam mikropipet beyinden çok yavaşça çıkarıldı, enfeksiyon kapmaması için operasyon sonrası kafa derisi dikilip üzerine betadin uygulandı, operasyon sırasındaki su kayıpları için 300 ml serum fizyolojik subkutan olarak uygulandı ve fareler operasyon sonrası bakıma alındı. Virüslerin enfekte etmesi için 2 hafta operasyon sonrası bakımda tutulup ilgili deneylere akabinde başlandı.

Tablo 5.2.4.1: İntrakraniyal enjekte edilen rAAV

Rekombinant adeno-asosiyeye virüsler

rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry

rAAV-FLEX-GFP

5.2.5 Doku fiksasyonu ve kesit alma

Tüm deneylerin sonunda ilgili farelere, görüntülenmede gürültüleri engellemek amacıyla %4 lük PFA ile kardiyak perfüzyonu, beyindeki damarlardaki kanı da boşaltmak amacıyla yapıldı. Akabinde çok hızlı bir şekilde, farelerin beyinleri çıkartılıp önce 4 saat ve 4°C’de %4’lük PFA içinde iyice fikse olması için, sonra 24 saat suyunu iyice çekmesi için %30’luk sükröz çözeltisi içinde 4°C’de bekletildi. Ertesi gün VT1000S vibratom ile 75 µm kalınlığında kesitler alındı.

5.2.6 Mikroskopik görüntüleme ve analiz

Konfokal Mikroskop (Zeiss LSM 780) ile mikroskopik görüntülemeler yapıldı. Kırmızı florasanı görüntülemek için 610 nm, yeşili görüntüleyebilmek için 488 nm dalga boyu kullanıldı.

5.2.7 Kolinerjik nöronların morfolojik olarak belirlenmesi

Double transgenik ChAT-IRES-Cre x ChR2-EYFP fare gelişimini tamamladıktan (4 haftalıktan sonra) etik kurallara göre sakrifiye edildi. Akabinde araştırma konusu olan beyinleri fikse edilip çıkarıldı, fiksasyondan sonra tüm beyinden, hipotalamus kısmına azami özen göstermek suratiyle ,75 µm’lik kesitler alındı. Önden arkaya doğru (A →P) alınan tüm beyin kesitleri mikroskop altında kolinerjik nöronların varlığının tespiti için görüntülendi. Enfekte olan bölgelerdeki değişen florasan yoğunluğuna göre, kolinerjik nöronların varlıkları tayin edildi.

5.2.8 Kolinerjik nöronların projeksiyonlarının belirlenmesi

Projeksiyonların tespiti için arkuat çekirdeğe bilateral olarak rAAV-FLEX- GFP virüsü enjekte edildi ve enfeksiyonun tutması için 14 gün beklendi. Fareler etik kurallar ve izinler dahilinde sakrifiye edilip tüm beyinleri çıkarıldı. Fikse edilip suyundan arındırılmış beyinlerden 75 µm'lik kesitler alındı. A →P yönünde tüm beyin kesitleri ilgili mikroskop altında görüntüleri alındı ve enfeksiyon varlığında bölgelere göre değişen akson uzantıları saptanıp not edildi.

5.2.9 Davranış Deneyleri

5.2.9.1 CNO varlığında besin tüketimi ölçümü hM3Dq

ChAT nöronlarını aktive etmek için 30 günlük ChAT-Cre transgenik fareler kontrol ve deney olmak üzere gruplara ayrıldı ve test grubu farelere bilateral intrakraniyal olarak rAAV-hSyn-FLEX-hM3Dq-mCherry virüsü enjekte edildi, kontrol grubu farelere ise rAAV-FLEX-GFP virüsü enjekte edilip her iki grup fare de 14 gün boyunca yeterli enfeksiyon düzeyine ulaşması için operasyondan sonra beklendi. Bu süreçte fareler tekli kafeslere ayrılarak bu 2 haftalık alışma süresinden sonra günlük yem tüketimleri takibe alındı. Tüm fareler günlük tüketimleri stabil hale gelip ortalama beklenen tüketim miktarı olan 4-5 gram aralığına geldiğinde serbest yeme alınarak (ad libitum) beslenme deneylerine başlandı. Besin tüketimleri sabah saat 06:00'da başlayan gündüz döngüsü ile kaydedildi. CNO enjeksiyonları, toplam hacmi tek seferde 300µL olacak şekilde ayarlanan intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonlar, sabah, akşamüzeri ve gece olmak üzere günde 3 defa aşağıdaki tabloda belirtilen saatler ve dozajlarda gerçekleştirildi. 3 günlük subakut dönemde vücut ağırlıkları anlamlı bir şekilde değişmeyeceği için vücut ağırlıkları ölçülmedi.

Tablo 5.2.9.1.1: Aktivasyon i.p. enjeksiyon saat ve miktarları

Gün	Saat	i.p. enjeksiyon
1 3 set	08:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO
2 3 set	16:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO
3 3 set	24:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO

Günlük 3 defa olmak üzere yapılan enjeksiyonlar 3. günün sonunda, 3 günlük clearance'a (arınma) geçilip plasebo olarak, serum fizyolojik ve CNO'yu çözdüğümüz etanol yukardaki tabloda verilen oranlarda karıştırılarak enjekte edildi. Günlük besin tüketimleri not edildi. Günlük enjeksiyonlar belirtilen zamanlarda tartımlar ise her sabah 6'de yapıldı.

5.2.9.2 Kronik besin tüketimi ölçümü ChAT-Cre caspase

ChAT nöronlarını ablasyon etmek için ilgili farelere bilateral olarak 480 nL rAAV-FLEX-taCasp3-TEVp virüsü, ablasyon etmek istemediğimiz kontrol grubuna ise rAAV-FLEX-GFP virüsü enjekte edildi. Enfeksiyonun tutması için 14 gün tekli kafese ayrılıp farelerin ortama alışması beklendi. 14. günün sonunda tartımlara başlandı. Kronik ve uzun bir deney olduğu için 2 günde bir, saat 16.00'da yemleri ve vücut ağırlıkları 6 ay boyunca ölçüldü.

Tablo 5.2.9.2.1: Ablasyon yem tartımları

Günler	Saat	Tartımlar
0	16:00	Yem + vücut ağırlığı
2	16:00	Yem + vücut ağırlığı
4	16:00	Yem + vücut ağırlığı

5.2.10 İstatistiksel analiz

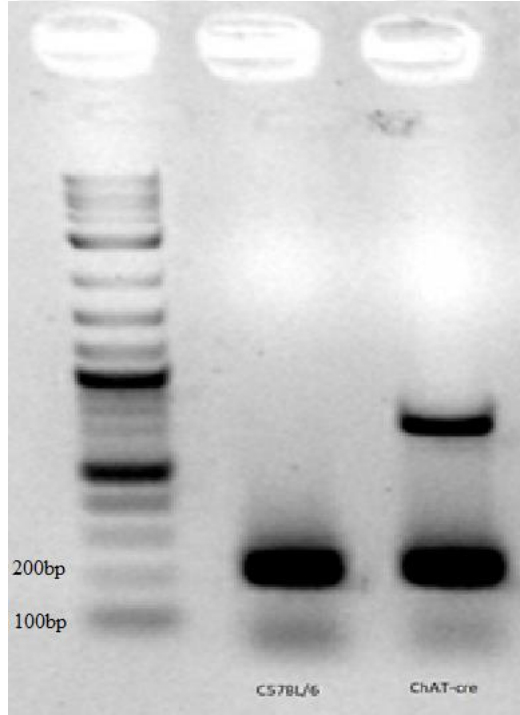
GraphPad Prism programı tüm istatistiksel analizler için kullanıldı. Standart olarak, anlamlılık için $p < 0,05$ baz alındı; standart olarak anlamsızlık için $p > 0,05$ baz alındı. \pm işaretçileri standart hata olarak gösterildi. Yıldızlarda *, $p < 0,01$; **, $p < 0,001$; *** yi ifade etmektedir.



6 BULGULAR

6.1 Deney Grupları ve Genotipleme

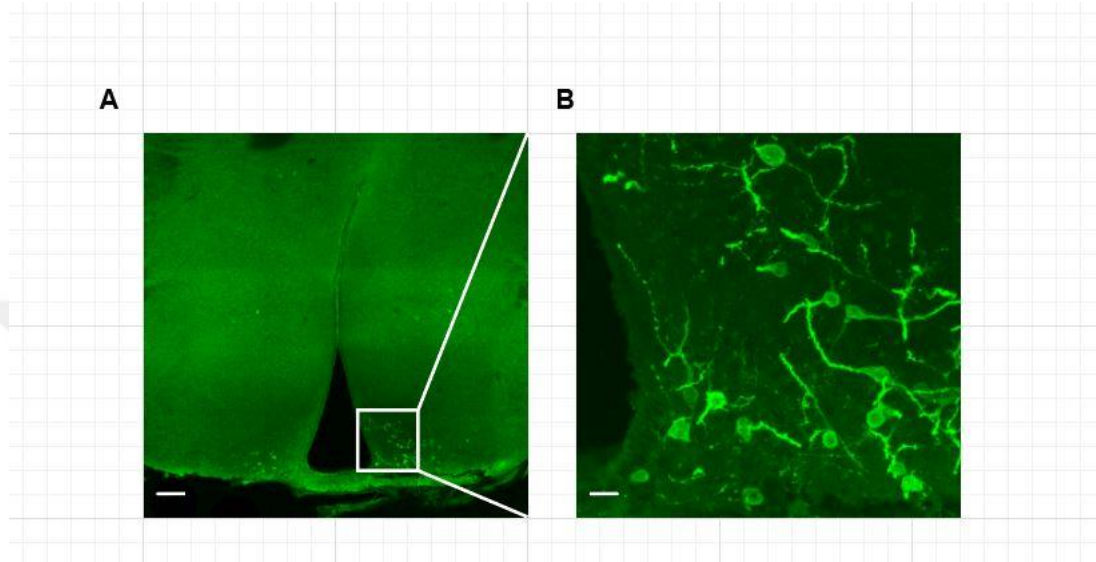
Söz konusu deneylerde 4 haftalık ChAT-Cre transgenik fareler kullanıldı. Her iki grupta da rAAV-FLEX-GFP enjeksiyonu 4 haftalık ChAT-Cre transgenik farelere kontrol amacıyla kullanıldı. İlgili gen ifadeleri transgenik hatlarda mümkün olduğu için WT (wild type) fareler sakrifiye edilerek deneye alınmadı (Resim 6.1).



Resim 6.1.1: Genotipleme sonucu. C57BL/6 ve ChAT- Cre genotipleme sonucu. Bant aralığı 100bp

6.2 Arkuattaki kolinerjik nöronların morfolojik olarak tespiti

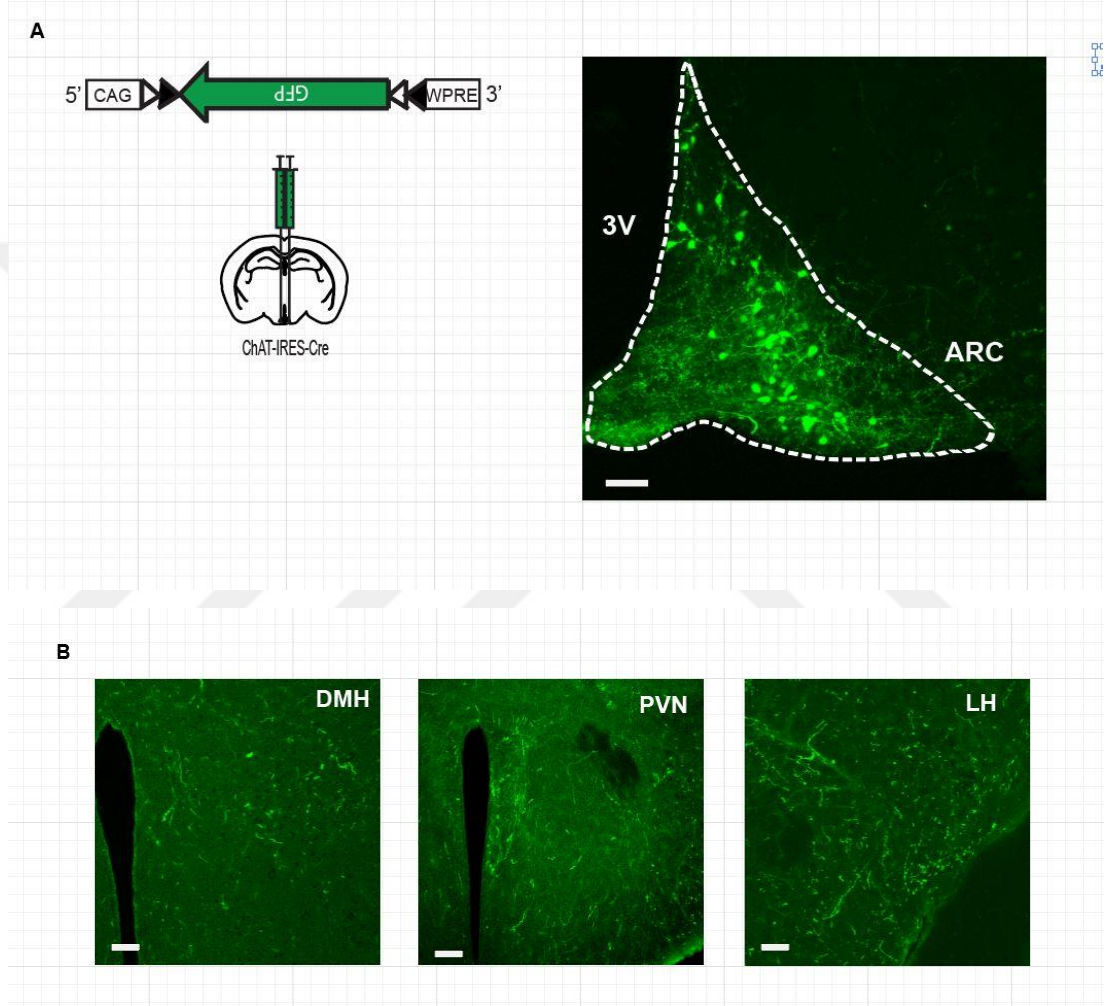
Kolinerjik nöronların arkuat bölgesindeki varlığının morfolojik tespiti için double transgenik farelerden (ChAT-IRES-Cre x ChR2-EYFP) kesit alındı.



Resim 6.2.1: Arkuattaki kolinerjik nöronların morfolojik olarak tespiti. A) Konfokal mikroskopta 10X büyütmede arkuattaki kolinerjik nöronlar. 200µm ölçü barı. B) 40X büyütme oranı

6.3 Arkuattaki kolinerjik nöronların projeksiyonlarının belirlenmesi

Transgenik ChAT-Cre knock-in farelerinin arkuat bölgesine aşağıda şematize edildiği şekilde AVV-FLEX-GFP enjeksiyonları yapılarak nöronların uzanımları saptandı.



Resim 6.3.1: ARC^{ChAT} nöronlarının hipotalamustaki projeksiyonları. A) Arkuat bölgesine yapılan enjeksiyonun şematik gösterimi, konfokal mikroskopunda görüntüleme. 20x büyütme ve 50µm ölçü barı 3V: 3.Ventrikül, ARC: arkuat bölgesi B) Arkuat bölgesine yapılan enjeksiyonun hipotalamustaki akson projeksiyonları, DMH: dorsamedial hipotalamus, PVN:paraventricular nucleus, LH:lateral hipotalamus

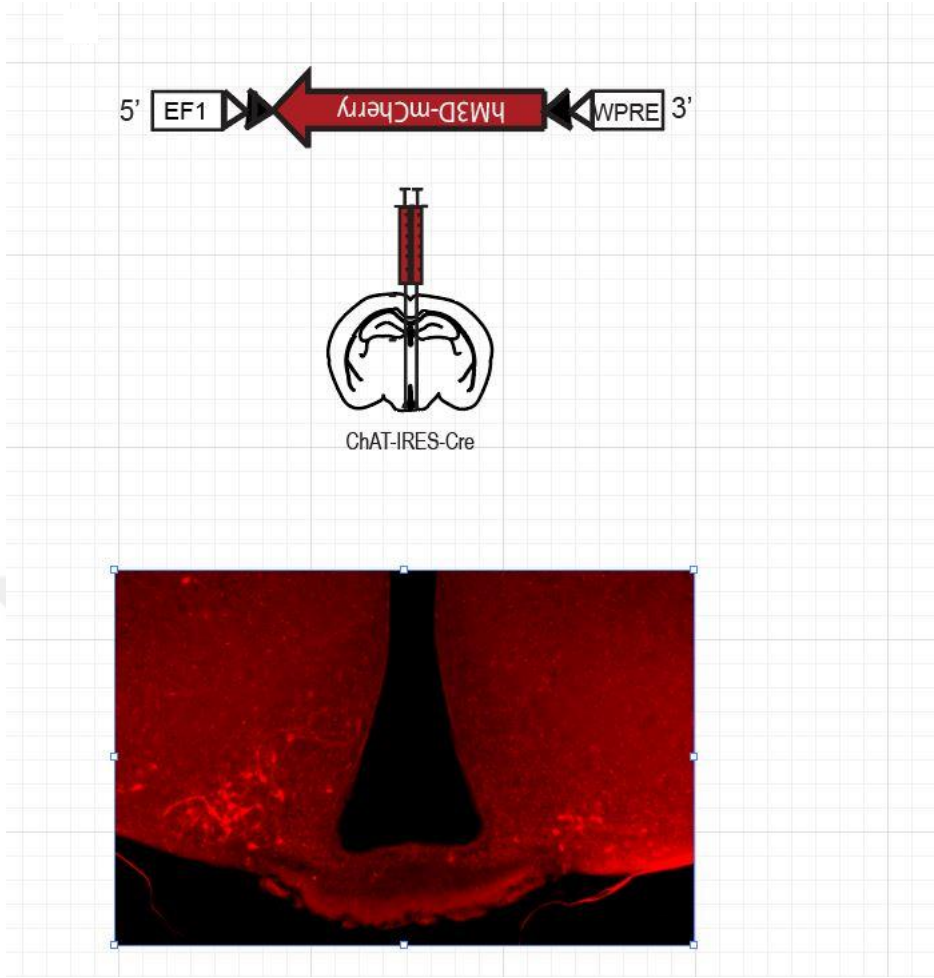
2 haftalık enfeksiyonun tutma süresinden yeşil floresan protein (GFP) molekülü kolinerjik nöronlarını enfekte edip onların akson uçları boyunca ilerledi. Tüm beyin

boyunca kolinerjik nöronların projeksiyonlarına bakıldı ve birçok bölgede yoğun akson gözlemlendi. Bunlardan özellikle DMH, PVN ve LH de yoğun olarak kolinerjik nöron aksonları saptandı.

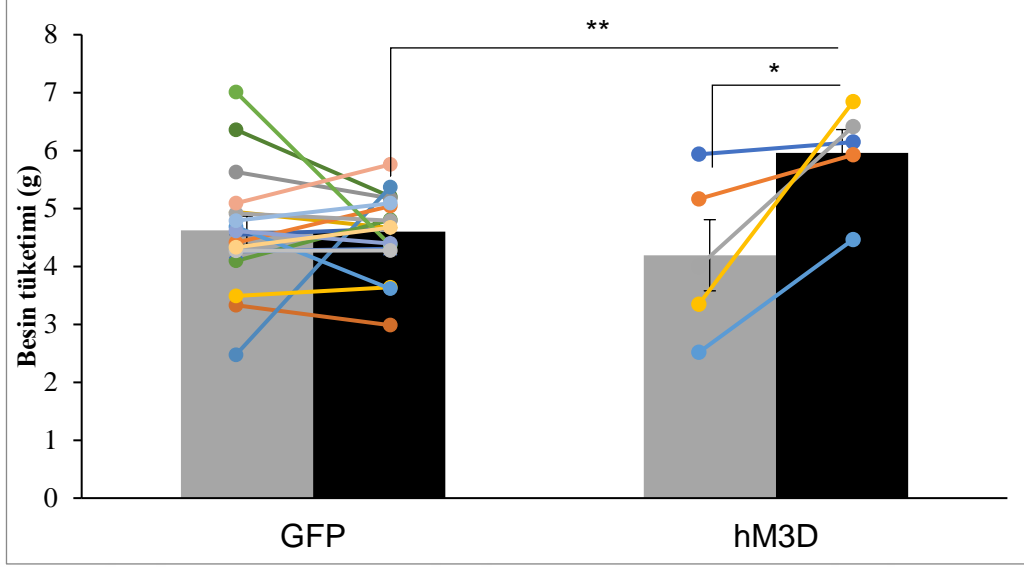
6.4 Arkuattaki kolinerjik nöronlarının aktivasyonu

6.4.1 Besin tüketimi ölçümü

Kolinerjik nöronların kemogenetik aktivasyonu durumunda besin tüketimindeki değişimi gözlemleyebilmek için bilateral ve intrakraniyal olarak rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry (n=5) ve rAAV-FLEX-GFP (n=18) enjekte edildi. Bir sonraki sayfada şematize edildiği gibi yapılan enjeksiyonlardan sonra ChAT-Cre transgenik fareler davranış deneylerine alındı.



Resim 6.4.1: Arkuat bölgesine yapılan enjeksiyonun görüntülenmesi. Arkuat bölgesine yapılan enjeksiyonun şematik gösterimi (üstte). Fare beyinde hipotalamusun ilgili bölgesine yapılan rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry enjeksiyonunun konfokal mikroskopunda görüntülenmesi ile tespiti. Arkuat bölgesindeki mCherry ifadesi, enjeksiyon koordinatlarının doğruluğunu göstermektedir. 20x büyütme, 100 µm ölçü barı (altta)



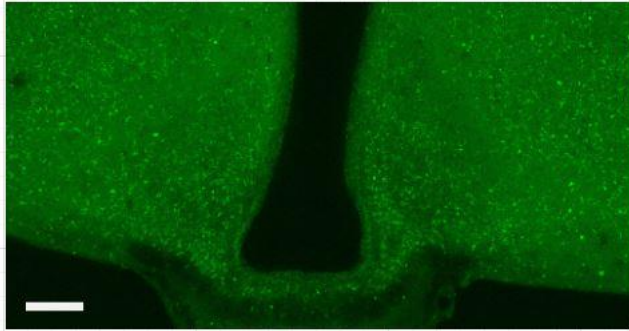
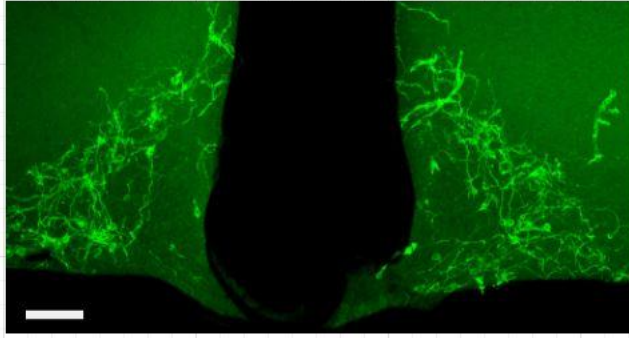
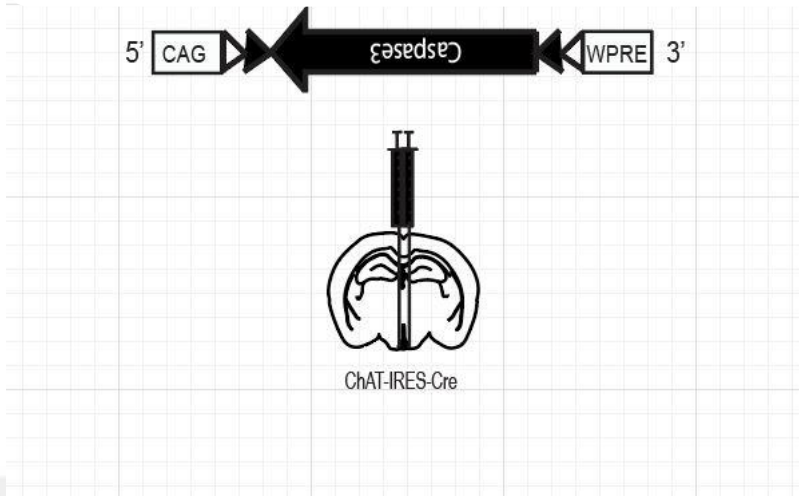
Şekil 6.4.1: Arkuat kolinerjik nöronlarının hM3Dq aktivasyonu sonrasında besin tüketimi değişimi. Arkuattaki hM3Dq ifade eden kolinerjik (ARC^{ChAT}) nöronlarının 3 gün boyunca CNO verilmesi ile aktivitesi artırılmış ve beslenmeye olan etkisi incelenmiştir. Kontrol olarak aynı farelere 3 gün boyunca salin (serum fizyolojik) verilmiştir. GFP enjeksiyonlu fareler hM3D'nin kontrol grubudur.

Yapılan analizler sonucunda arkuattaki kolinerjik nöron aktivasyonunun besin tüketimi üzerine etkisi olduğu gözlemlendi. HM3D grubu CNO verilen günler salin verilen günlere göre ortalama $4.2g (\pm 0,60 g)$ 'dan $5.9g (\pm 0,40 g)$ 'a çıkarken GFP enjeksiyonlu olan plasebo grubunun besin tüketimi $4,60 g (\pm 0,25 g)$ 'dan neredeyse değişmeyerek $4.62 g (\pm 0,16 g)$ olarak ölçüldü. HM3D'li gruplarla GFP'li gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farka rastlandı ($p=0,0014<0,05$).

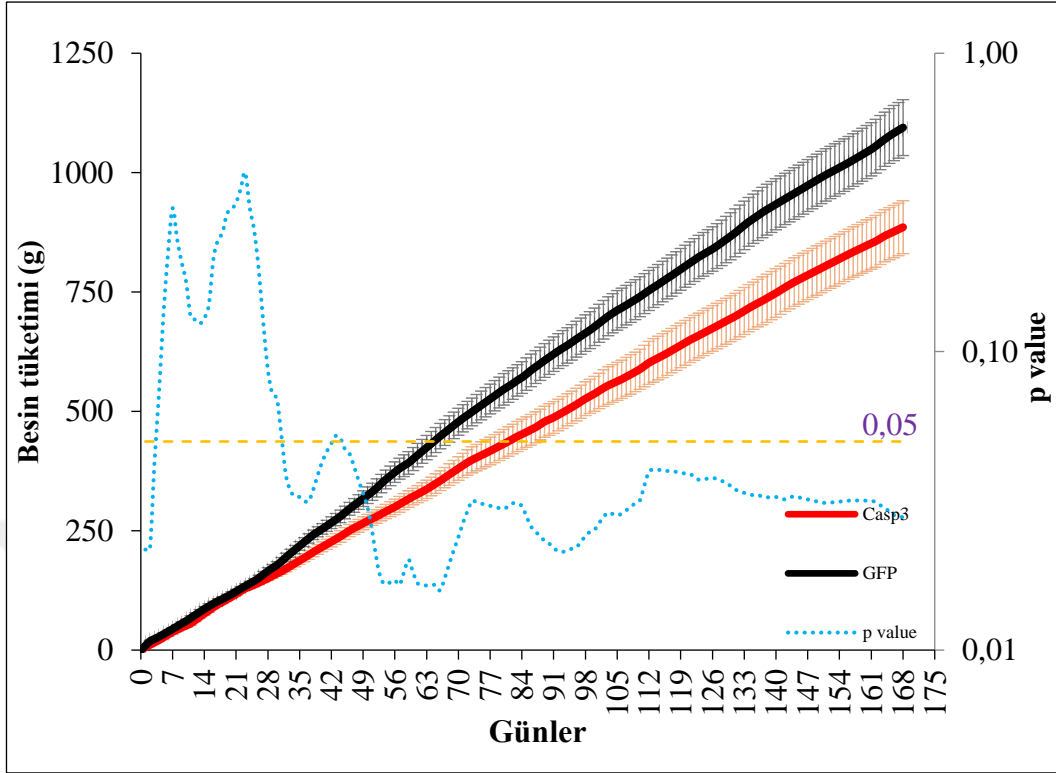
6.5 Arkuattaki kolinerjik nöronların ablasyonu

6.5.1 Besin tüketimi ve vücut ağırlığı ölçümü

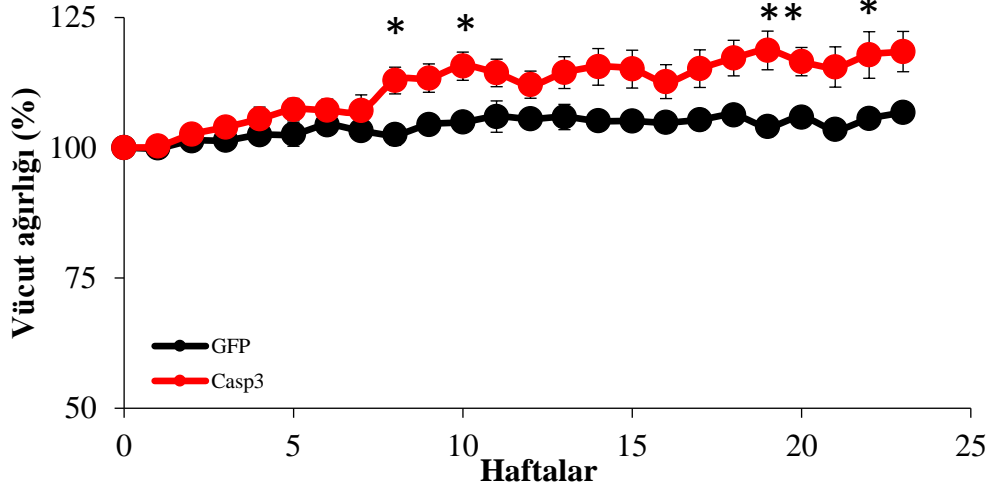
Kolinerjik nöronlarının şekilde gösterildiği gibi (Resim 6.5.1) DREADD yöntemi ile kemogenetik ablasyonu durumunda besin tüketimindeki ve vücut ağırlığındaki değişimi gözlemleyebilmek için bilateral intrakraniyal rAAV- FLEX-taCasp3-TEVp(n=7) enjekte edilmiş double transgenik fareler ile kontrol grubu (n=4) davranış deneylerine alındı.



Resim 6.5.1: Double transgenik (ChAT::ChR2) farelere bilateral olarak yapılan rAAV-FLEX-taCasp3-TEVp enjeksiyonunun görüntülenmesi. Arkuat bölgesine yapılan enjeksiyonun şematik gösterimi (üstte). Arkuat bölgesindeki kolinerjik nöronların caspase enjeksiyonu öncesi ve sonrası görüntüsü (altta).



Şekil 6.5.1: Arkuat kolinerjik nöronlarının ablasyonu sonrası besin tüketimi. Caspas3 enjeksiyonu yapılan double transgenik (ChAT::ChR2) farelerin 6 aylık kümülatif besin tüketim değerleri farkı. Casp3: caspas3 enjeksiyonu yapılan grup, GFP: GFP enjeksiyonu yapılan grup, p value: anlamlı farkı gösteren eğri, eşik değer $p=0,05$



Şekil 6.5.2: Arkuat kolinerjik nöronlarının ablasyonu sonrası vücut ağırlığı değişim oranı. Caspas3 enjeksiyonu yapılan double transgenik (ChAT::ChR2) farelerin 24 haftalık vücut ağırlıkları değişim oranı. Casp3: caspas3 enjeksiyonu yapılan grup, GFP: GFP enjeksiyonu yapılan grup, *: anlamlı farklılıklar.

Ablasyon durumunda besin tüketimi ve vücut ağırlıklarında oluşacak olan farklılıkları gözlemleyebilmek için caspase ve GFP enjeksiyonlu fareler, her biri ayrı kafese konulmak süratiyle gruplandırıldı. 2 haftalık enjeksiyonun tutması beklendikten sonra tartımlara başlandı. Caspase enjeksiyonlu deney grubunun uzun dönemde besin tüketim miktarlarının özellikle 2. aydan itibaren anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Vücut ağırlıklarında ise, caspase enjeksiyonlu grubun ağırlıklarının göreceli olarak arttığı ve kontrol grubuyla arasındaki ayrışmanın 4 farklı haftada anlamlı olduğu görülmüştür.

7 TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya nüfusunun yaklaşık %10'nu etkileyen ve milyara yaklaşan prevalansıya, birçok haneyi etkileyip yaşam standartlarını önemli oranda düşüren obezite; kanser, kardiovasküler rahatsızlıklar ve diyabet gibi mortalite riski yüksek morbiditelere sebebiyet veren, günümüz dünyası ve çağının önemli bir halk sağlığı sorunudur. En temelinde obezite, alınan ve harcanan kalori oranındaki dengesizliklerden ileri gelmektedir. Bunda ihtiyaçtan fazla alınan kalori, sedanter yaşam tarzı ve genetik eğilim rol oynamaktadır. Normalde alınması gereken enerji miktarı vücudun ihtiyacı doğrultusunda ve metabolize edebileceği kadardır; fakat çeşitli sebeplerle alınan enerjinin harcanandan fazla olması durumunda, fazla kaloriler yağ olarak depolanmakta ve nihayetinde obezite tablosu ortaya çıkmaktadır (1, 2). Kâğıt üzerinde harcanan enerjiyi alınan enerjiye denk hale getirmek sorunun çözümü gibi gözükse de günlük yaşama yansması kolay değildir. Özellikle günümüz modern toplumlarda diyetlerin enerji ve karbonhidrat yönünden zenginleştirilmesi, yaşam stillerinin ve önceliklerin değişmiş olması, obezitenin epidemik haline gelmesinde büyük rol oynamaktadır. Tedavi seçenekleri olarak yapılan cerrahi müdahaleler, ilaçlar ve diyetlerden düşük verimde yanıt alınmakta ve yaşanan durumlar çoğunlukla nüksetmektedir ki bu da obezitenin bu denli yaygın bir sağlık sorunu olmasına sebep olan başlıca faktörlerden biridir. Tüm bu gelişmeler ışığında çözüm olarak yeni ve farklı tedavi yöntemlerinin geliştirilip, inovatif yaklaşımların hayata geçirilmesine ihtiyaç her zamankinden daha çok artmıştır (1, 13).

Bu sebeple beyinde beslenme ve enerji metabolizmasını kontrol ettiği bilinen hipotalamus bölgesine yoğunlaşmıştır. Hipotalamus çok çeşitli nöron gruplarına ev sahipliği yapmaktadır (7). Fakat bunlardan arkuat çekirdeğin, özellikle AGRP ve POMC nöronlarının, ana düzenleyici olarak görev aldığı, birçok çalışmada karşımıza çıkmıştır (4, 5). İlginç olan ise çevremizde bizzat gözlemlene olasığımız olan sigara içmeye başlayanların kilo verip (34) sigarayı bıraktıklarında ise, bıraktığı andan itibaren kilo almaya başlamaları fenomeninin ana sorumlusu olan kolinerjik nöronların, söz konusu temel düzenleyici yerdeki (arkuat) etkilerinin gösterilmemiş

olmasıdır. Buradan hareketle arkuattaki kolinerjik nöronlarının önce karakterizasyonu, ve sonrasında beslenmeye etkisi bu çalışmada ele alınmıştır.

Arkuat çekirdekte bulunan kolinerjik nöronlar yalnızca kolinerjik olarak kalmamakta POMC, AGRP, TH, gabaerjik, glutamaterjik nöronları da içeren farklı nöron gruplarına dağılım göstermiştir (7). Dolayısıyla izole edip mutlak ve salt etkilerini saptamak güçleşmiştir. Farklı nöron grupları üzerine dağılım gösteren kolinerjik nöronlarla ilgili diğer bir zorluk ise spesifik olarak bu nöronları işaretlemekten ileri gelmektedir. Neyse ki Cre teknolojisi sayesinde tüm kolinerjik nöronlarda, kolin asetil transferaz enziminin başına knock-in olarak Cre eklenmiş, ne zaman bu enzim işlev yapsa (asetil grubunu, asetil-coa'dan koline transfer edip asetilkolin üretir) Cre de ifade edilecek şekilde yerleştirilmiştir ki bu yalnızca kolinerjik nöronlarda olan metabolik bir olay olduğundan kolinerjik hücrelerin başarıyla seçilebilmesini sağlamıştır (30, 33, 35).

Double transgenik hatlarımız sayesinde öncelikle kolinerjik nöronların hipotalamusun nerelerinde olduğu ve bunların akson uzantılarının nerelere gittiği bu çalışmada tespit edilmiştir. Literatürde ilk defa arkuattaki kolinerjik nöronların bağlantıları morfolojik olarak tespit edilmiş olup en yoğun bağlantıları DMH, PVN ve LH bölgelerinde görülmüştür. Akabinde transgenik ChAT hattına kemogenetikten faydalanarak hM3Dq enjekte edilmiş ve CNO ile aktivasyonunun sonuçları gözlemlenmiştir (30, 32, 35). 3 günlük aktivasyon sonucu hM3Dq ile enfekte edilen farelerin, kontrol gruba göre anlamlı oranda ($p=0,0014$) daha fazla miktarda besin tükettiği gözlemlenmiştir ki bu da genel kanı olan besin tüketiminin azalmasının tam zıttı olarak karşımıza çıkmıştır. Bunda, sigaradaki nikotinin beynin birçok bölgesinde yalnızca nikotinik reseptör üzerinden etki gösterirken burada spesifik arkuat alanında çalışmamız ve arkuattaki kolinerjik nöronların yukarıda da bahsettiğimiz gibi (7) çok çeşitli nöron gruplarıyla birlikte ifade edilmesi (AGRP, POMC, TH, Gabaerjik vb) ve tüm kolinerjik reseptörleri (nikotinik ve muskarinik) kapsayacak şekilde çalışma yapmamız rol oynamış olabilir (34). Kolinerjik reseptörlerin bulunduğu sinir hücresi gruplarının çok heterojenik bir yapı göstermekte olması ve reseptörlerinin aynı liganda karşı hem inhibe hem de aktive edici tiplerinin olması ve de bu reseptörlerin AGRP ve POMC

nöronları gibi zıt etkileri olan nöronlar üzerinde değişik oranlarda dağılım göstermesi de alınan bu yanıtta rol oynamış olabilir. Bundan dolayı aktive ettiğimiz kolinerjik nöronların etkilerini gösterdiği reseptörlerin, hangi hücrelerde ne oranda inhibe edici G_i muskarinik reseptörlere, ne oranda da aktive edici G_q reseptörlerine sahip olduğu belirleyici rol oynamaktadır (34, 36, 37). Bu tekniklerin Türkiye’de ilk defa kullanılması ve optimizasyon düzenlemelerindeki değişkenlerin minimalizasyonu sırasındaki faktörler de sonucu belirli düzeyde etkilemiş olabilir. Ayrıca, enjeksiyon merkezi ve ilgili nöronların ne oranda enfekte olduğu, ilgili bölgedeki enfekte olan hücrelerin reseptör tiplerinin aktive/inhibe edici özelliklerinin oranları ve deneyin süresine bağlı duyarsızlaşma gibi etkilere bağlı olarak çok değişken ve yönlü olarak değişebilen sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada en nihayetinde kolinerjik nöronların toplam etkisi gözlenmiştir. Tüm bu sebeplerden ötürü yalnızca kemogenetik deneyleri tutarlı sonuçlar verdiği için, yukarıdaki sebeplere bağlı paradoksal sonuçlar veren optogenetik ve elektrofizyoloji sonuçlarımız bu teze taşınmamıştır.

Caspas3 manipülasyonumuzda yine arkuattaki tüm kolinerjik nöronlar ablasyon edilmiştir. Tüm enjeksiyonlar 4 hafta süren gelişimi tamamlama sürecinden sonra yapılmış olup gelişim sırasındaki elastik ve telafi edici bağlantıların oluşması ihtimalleri engellenmiştir. Caspas3 enjeksiyonlarında da beklenenden farklı bir sonuçla karşılaşmış olup anlamlı bir şekilde besin tüketiminde azalma gözlenmiştir. ($p=0,038$). Benzer sebeple yine ilgili bölgedeki hem tüm kolinerjik nöronların ablasyona bağlı etkilenmiş olduğu, hem de nikotinik ve muskarinik reseptörlerin toplam yanıtının algoritmasını etkilenmiş olduğundan, total sonuç olarak besin tüketiminde azalma elde edilmiştir. Bu sonucu vermede başta AGRP ve POMC üzerindeki kolinerjik reseptörlerin tiplerine bağlı olarak bu nöronlardaki aktive ve inhibe edici etkilerinin oranıyla birlikte diğer tüm nöronlardaki yanıtların bileşkesi rol almıştır. Enteresan bir şekilde, kolinerjik nöronları arkuat bölgesinde ablasyon edilmiş ve daha az yemeğe başlamış grubun vücut ağırlıkları daha az yemelerine karşın kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun, lokomotor aktivitelerindeki ve/veya bazal metabolizma hızlarındaki bir düşüşten ileri gelebileceği akla gelmektedir. Çünkü normalde daha az besin tüketenin daha az enerji

aldığı dolayısıyla daha hafif vücut ağırlığına sahip olması beklenir. Ancak burada daha az yemelerine rağmen kontrol gruba göre daha kilo almış bir grup gözlenmekte ve yukarıda bahsedilen sebeplerin bunun altında yatan ana nedenlerden biri olduğu akla gelmektedir. Nasıl her bir insanın davranış şekilleri farklıysa farelerinde farklı olabileceği için, kimi davranış gruplarındaki fareler istatistiksel anlamları bozmaktadır. Tüm bu değişkenler altında çıkan davranış datası bize kümülatif olarak yine de arkuattaki kolinerjik nöronların besin tüketimi ve enerji metabolizmasını belirli bir şekilde regüle ettiğini göstermektedir ki bu da doğrudan ya da dolaylı olarak obezitenin santral istemdeki işleyişini açıklamaya bir miktar daha katkı sağlamıştır. Çalışmalarımız bunlarla sınırlı kalmayıp tartışmalarda söz konusu olan olası belirsizlikleri minimize etmek üzere devam etmektedir. Tüm bu çalışmalar literatürde ilk defa yapılmış olup datalar ve sonuçlar açısından özgün değer taşımaktadır. Daha önce DMH'deki kolinerjik nöronların beslenmeye etkisi ve bazal ön beyindeki kolinerjik nöronların beslenmeyle olan ilişkisi açığa çıkartılmış fakat çalışmanın özgün yönü olan arkuattaki kolinerjik nöronların beslenmeye etkisi ilk defa bu çalışmada açığa çıkartılmıştır (6, 9). Şu ana kadar yapılan analizler kolinerjik nöronların özgün etkilerinden ziyade bu nöronların etkilerini gösterdiği reseptörlerin beyin bölgelerindeki dağılımı ve muhtelif tiplerinin değişken etki mekanizmaları üzerine yoğunlaşmıştır. Obezitenin sofistike ve çok yönlü yapısının karakterizasyonu ile tedavisini oluşturan bu kompleks puzzle'a bir parça daha bu çalışmayla eklenmiştir. Deneyleerde kullanılan tüm farelere etik kurallar dahilinde davranılıp usulüne uygun izinleri alınmıştır.

8 KAYNAKLAR

1. Obesity and overweight: Fact Sheet [press release]. 2017.
2. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005;366(9492):1197-209.
3. Anand BK, Brobeck JR. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1951;77(2):323-4.
4. Millington GW. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)*. 2007;4:18.
5. Sternson SM, Atasoy D. Agouti-related protein neuron circuits that regulate appetite. *Neuroendocrinology*. 2014;100(2-3):95-102.
6. Jeong JH, Lee DK, Jo YH. Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate food intake. *Mol Metab*. 2017;6(3):306-12.
7. Jeong JH, Woo YJ, Chua S, Jr., Jo YH. Single-Cell Gene Expression Analysis of Cholinergic Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162839.
8. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*. 2012;76(1):116-29.
9. Pratt WE, Blackstone K. Nucleus accumbens acetylcholine and food intake: decreased muscarinic tone reduces feeding but not food-seeking. *Behav Brain Res*. 2009;198(1):252-7.
10. Tago H, McGeer PL, Bruce G, Hersh LB. Distribution of choline acetyltransferase-containing neurons of the hypothalamus. *Brain Res*. 1987;415(1):49-62.
11. Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BW, et al. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(3):220-9.
12. Yates D. Neural circuits: Halting hunger. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(12):740.
13. Türkiye Sağlık Araştırması. Türkiye İstatistik Kurumu. 2017;245737.
14. Collaborators GBDO, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*. 2017;377(1):13-27.
15. Brain explorer. Allen Mouse Brain Atlas. 2016.

16. Boeree CG. The Limbic System. The Emotional Nervous System 2016.
17. Dougherty P. Central Control of Feeding Behavior. Neuroscience online: McGovern Medical School.
18. Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity-- a review. *Neuropeptides*. 2006;40(6):375-401.
19. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci*. 2004;24(11):2797-805.
20. Carlson NR. *Physiology of Behaviour Books a La Carte Edition*. 11th ed. Boston: Pearson College Division; 2012.
21. Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA, et al. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab*. 2005;1(1):63-72.
22. Karczmar AG, SpringerLink (Online service). *Exploring the Vertebrate Central Cholinergic Nervous System*. Boston, MA: Springer Science+Business Media, LLC.; 2007. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46526-5>.
23. Hut RA, Van der Zee EA. The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory. *Behav Brain Res*. 2011;221(2):466-80.
24. Resende RR, Adhikari A. Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell Commun Signal*. 2009;7:20.
25. Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Rev Neurother*. 2008;8(11):1703-18.
26. Smith RS, Hu R, DeSouza A, Eberly CL, Krahe K, Chan W, et al. Differential Muscarinic Modulation in the Olfactory Bulb. *J Neurosci*. 2015;35(30):10773-85.
27. Strauss WL, Kemper RR, Jayakar P, Kong CF, Hersh LB, Hilt DC, et al. Human choline acetyltransferase gene maps to region 10q11-q22.2 by in situ hybridization. *Genomics*. 1991;9(2):396-8.
28. Fulton JF, Nachmansohn D. Acetylcholine and the Physiology of the Nervous System. *Science*. 1943;97(2530):569-71.

29. Calarco CA, Li Z, Taylor SR, Lee S, Zhou W, Friedman JM, et al. Molecular and cellular characterization of nAChR subtypes in the arcuate nucleus of the mouse hypothalamus. *Eur J Neurosci*. 2018.
30. Sternson SM, Atasoy D, Betley JN, Henry FE, Xu S. An Emerging Technology Framework for the Neurobiology of Appetite. *Cell Metab*. 2016;23(2):234-53.
31. Alexander GM, Rogan SC, Abbas AI, Armbruster BN, Pei Y, Allen JA, et al. Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron*. 2009;63(1):27-39.
32. Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. 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):5163-8.
33. Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron*. 2016;89(4):683-94.
34. Mineur YS, Abizaid A, Rao Y, Salas R, DiLeone RJ, Gundisch D, et al. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. *Science*. 2011;332(6035):1330-2.
35. Atasoy D, Aponte Y, Su HH, Sternson SM. A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping. *J Neurosci*. 2008;28(28):7025-30.
36. Chiolero A, Faeh D, Paccaud F, Cornuz J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(4):801-9.
37. Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des*. 2006;12(28):3573-81.

9 ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
01/02/2017	02		Yrd. Doç. Dr. Deniz ATASOY

"Beslenmenin Kolinerjik Yolaklarla Düzenlenmesi" Başlıklı Bilimsel Araştırma Etik Kurulumuzda Görüşülmüş Olup, Çalışmanın Etik Kurallara Uygun Olduğuna "Oybirliği" İle Karar Verilmiştir.
Etik Onay Geçerlilik Süresi: 24 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	



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

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.21535
Konu : Etik Kurulu Hk.

14/07/2017

Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz ATASOY

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 01/02/2017 tarihli 02 karar no ile onay verilen "Beslenmenin Kolinerjik Yolaklarla Düzenlenmesi" isimli çalışmanın başlığını "Arkuat Çekirdekteki Kolinerjik Nöronların Beslenme Davranışına Etkisinin İncelenmesi" olarak değiştirilmesi ve çalışmadaki araştırmacılardan "Özlem Mutlu"nun çalışmadan ayrılarak yerine "Utku Cebecioğlu" nun yer alması isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

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

10 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Utku	Soyadı	Cebecioğlu
------------	------	---------------	------------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2013
Lise	Manisa Fatih Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
AR-GE Uzmanı	PRZ Biyoteknoloji	2014-2016

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

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	91,53	89,57	70,89
YDS Puanı	82,5		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

Sertifikalar

İstanbul Üniversitesi	Medipol	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2016
--------------------------	---------	---	------

