



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**PRADER-WILLI SENDROMUNA DAYALI MORBİD
OBEZİTENİN NÖRONAL KÖKENLERİ**

MERVE ÖNCÜL

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. DENİZ ATASOY

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora ()

Anabilim Dalı :

Tez Sahibi :

Tez Başlığı :

Sınav Yeri :

Sınav Tarihi :

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan ve Adı)

Kurumu

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

MERVE ÖNCÜL

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasındaki bilimsel araştırmalar İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi (REMER)'nde gerçekleşmiştir. Öncelikle, bu araştırmaların gerçekleşmesi için bize sağladıkları olanaklar için sayın hocalarım Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e ve Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a çok teşekkür ederim.

Doktora süresince iyi bir bilim insanı olmam için bana öğrettiği her şey için ve en önemlisi bana bu şansı verdiği için danışmanım Doç. Dr. Deniz Atasoy'a ve her zaman yanımda olup, ne zaman olursa olsun yardımını esirgemeyen ikinci danışmanım Dr. Nilüfer Sayar Atasoy'a çok teşekkür ederim. İkinize de çok şey borçluyum, doktor olabiliyorsam bu sizin sayenizde.

Bu çalışmada emeği geçen ve bana yardımlarını esirgemeyen Pelin Dilsiz ve Tayfun Ateş başta olmak üzere değerli çalışma arkadaşlarım Fulya Köksalar Alkan, Utku Cebecioğlu, İlknur oban, Öykü Dinkol, İltan Aklan, Edanur Ateş Öz, Gizem Filiz, İskalen Cansu Topçu, Cihan Civan Civaş, Muhammed İkbal Alp'e destekleri için çok teşekkür ederim. Ve tabiki şuan aynı labda olmasakta bu sürece beraber başladığım arkadaşlarım Özge Başer ve Özlem Mutlu'ya çok teşekkür ederim. Kerman Labdan Tuba Oğuz'a ve tüm REMER ailesine de destekleri için çok teşekkür ederim.

Son olarak, benim bu sürece kadar gelmemde maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, beni hep cesaretlendiren ve yanımda olan gerçek arkadaşlarıma ve kedime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
RESİMLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Hipotalamus ve beslenme davranışının fizyolojisi	5
4.2. Genetik varyasyonların obezitedeki rolü	8
4.3. Prader-Willi sendromu (PWS).....	9
4.4. Deney hayvanlarında Prader Willi sendromuna yol açtığı bilinen moleküllere bağlı aday genlerin araştırılması	12
4.5. Oksitosin ve Prader-Willi sendromu ile ilişkisi	15
4.5.1. Parvosellüler oksitosin nöronları	20
4.5.2. Magnosellüler oksitosin nöronları	22
4.6. AGRP ve POMC nöronları ve Prader-Willi sendromu ile ilişkisi.....	25
5. MATERYAL VE METOD.....	27
5.1. Materyal	27
5.2. Deney hayvanları	27
5.3. Genotipleme	28
5.3.1. DNA izolasyon protokolü	28
5.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu	28
5.3.3. Agaroz jel elektrofrezisi	29
5.4. İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiye virüs enjeksiyonu.....	29

5.5. Elektrofizyoloji	31
5.5.1. Solusyonlar	31
5.5.2. Hücre içi solüsyon.....	32
5.5.3. Hücre dışı solusyonlar.....	32
5.5.4. Elektrofizyoloji ekipmanları	32
5.5.5. Yöntem.....	33
5.6. Doku fiksasyonu ve kesit alma	34
5.7. Mikroskopik görüntüleme ve analiz	34
5.8. Kimyasal aktivasyon.....	34
5.9. Kimyasal inhibisyon	35
5.10. İstatistik.....	35
6. BULGULAR.....	36
6.1. PVN oksitosin nöronlarına gelen sinaptik inputların <i>Magel2</i> eksik farede değerlendirilmesi.....	36
6.2. PVN nöronlarının otonom ateşleme ve dinlenme potansiyeli özelliklerinin normal ve PWS modelinde belirlenmesi.....	40
6.3. PVN oksitosin nöronlarına gelen sinaptik inputların release probability özelliklerinin <i>Oxt-Cre</i> ve <i>Magel2</i> eksik farelerde değerlendirilmesi	45
6.4. PVN oksitosin nöronlarının aktivasyonu ve bu aktivasyonunun <i>Oxt-Cre</i> ve <i>Magel2</i> eksik farelerde besin tüketimine olan etkisi.....	48
6.5. PVN oksitosin nöronlarının inhibisyonu ve bu inhibisyonun <i>Oxt-Cre</i> ve <i>Magel2</i> eksik farelerde besin tüketimine olan etkisi.....	49
6.6. <i>Magel2</i> eksik farelerin şekerli beslenmeye olan tercihi.....	51
6.7. AGRP ve POMC nöronlarının ateşleme özelliklerinin normal ve PWS modelinde belirlenmesi	53
6.8. AGRP ve POMC nöronlarının aktivasyonu ve bu aktivasyonunun normal ve <i>Magel</i> KO farelerde besin tüketimine olan etkisi	56
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
8. KAYNAKLAR	65
9. ETİK KURUL ONAYI.....	71
10. ÖZGEÇMİŞ	72

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

- AGRP: Agouti ilişkili protein
BBS: Bardet-Biedl sendromu
BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CCK: Kolesistokinin
CNO: Clozapine-N-Oxide
CRF: Kortikotropin salgılayıcı faktör
DMV: Vagusun dorsal motor çekirdeği
EPSC: Uyarıcı input
GLP1: Glukagon benzeri peptid 1
IPSC: İnhibe edici sinaptik
LHA: Lateral hipotalamus
MC4R: MC4 reseptör
NPY: Nöropeptid Y
NTS: Nukleus traktus solitari
OT: Oksitosin
PACAP: Hipofiz bezi adenilat siklaz polipeptid
PFA: Paraformaldehit fiksatif
POMC: Proopiomelanokortin
PPR: Nörotransmitter salınım olasılığı oranı
PrRP: Prolaktin salgılayıcı peptidi
PVN: Paraventricular çekirdek
PWS: Prader-Willi sendromu
TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu
VMH: Ventromedial hipotalamusta
VTA: Ventral tegmental bölge

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. TÜİK verilerine göre Türkiye'deki obezite oranları.	3
Şekil 4.1. Yeme davranışını ve enerji metabolizmasını düzenleyen hipotalamustaki nöropeptidler arasındaki etkileşimler.....	7
Şekil 4.2. Prader-Willi sendromu ile ilişkili kromozom 15 üzerindeki q11-q13 bölgesindeki genlerin şematik gösterimi.	10
Şekil 4.3. Prader-Willi sendromuna yol açan birbirini etkileyen ve birbiri ile bağlantılı olan olası mekanizmaları gösteren teorik diagram.	14
Şekil 4.4. Oksitosinin enerji dengesine olan etkilerini gösteren devrelerin şematik olarak gösterilmesi.....	17
Şekil 4.5. Yemek alımını kontrol eden oksitosin nöronal devrelerini gösteren mekanizmalar.....	18
Şekil 4.6. Oksitosinin kalorili besin alımına etkilerini gösteren mekanizmalar.....	19
Şekil 4.7. Hipotalamik paraventriküler çekirdekteki (PVN) parvosellüler vemagnosellüler nöronların şematik gösterimi.....	24
Şekil 4.8. AgRP ve POMC nöronları beslenme ile ilişkili sinyallere cevap olarak beslenmeyi düzenler.....	26
Şekil 5.1. Koronal beyin kesitinde florasan boncuk ile paraventriküler çekirdeğin (PVN) hedeflenmesi.....	30
Şekil 6.1. <i>Magel2:Oxt-cre</i> ikili transgenik fare hattının üretimi.....	36
Şekil 6.2. <i>Oxt-Cre</i> ya da <i>Oxt-Cre :: Magel2</i> eksik farede AAV-Flex-GFP virüsü ile PVN'deki oksitosin nöronlarının işaretlenmesi.....	37
Şekil 6.3. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen <i>Oxt-Cre :: Magel2+/-</i> ve <i>Oxt-Cre</i> farelerde PVN'deki oksitosin nöronlarından EPSC (uyaran input) akımlarının ölçülmesi.....	38
Şekil 6.4. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen <i>Oxt-Cre :: Magel2+/-</i> ve <i>Oxt-Cre</i> farelerde PVN'deki oksitosin nöronlarından IPSC (baskılayan input) akımlarının ölçülmesi.....	39
Şekil 6.5. Oksitosin nöronları üzerindeki dendritik dalların yoğunluğunun <i>Oxt-Cre</i> ve <i>Magel2</i> eksik farelerde karşılaştırılması.....	40

Şekil 6.6. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen <i>Oxt-Cre</i> :: <i>Magel2</i> ^{+/-} ve <i>Oxt-Cre</i> farelerde PVN'deki oksitosin nöronlarından elektrofizyolojik ölçümlerin alınması...	42
Şekil 6.7. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen <i>Oxt-Cre</i> :: <i>Magel2</i> ^{+/-} ve <i>Oxt-Cre</i> farelerde hücre otonom özelliklerinin karşılaştırılması.....	43
Şekil 6.8. Akım-voltaj eğrisi.....	44
Şekil 6.9. NMDA/AMPA oranı.....	44
Şekil 6.10. <i>Oxt-Cre</i> ve <i>Magel2</i> eksik farelerde uyarıcı sinaptik inputların release probability özelliklerinin değerlendirilmesi.....	46
Şekil 6.11. <i>Oxt-Cre</i> ve <i>Magel2</i> eksik farelerde inhibe edici sinaptik inputların release probability özelliklerinin değerlendirilmesi.....	47
Şekil 6.12. <i>Oxt-Cre</i> ve <i>Magel2</i> eksik farelerde kemogenetik olarak oksitosin nöronlarının aktivasyonunun besin tüketimine olan etkisi.....	49
Şekil 6.13. Kimyasal olarak oksitosin nöronlarının inhibisyonunun besin tüketimine olan etkisi.....	50
Şekil 6.14. <i>Magel2</i> eksikliğinin şekerli beslenmeye olan etkisi. a) <i>Magel2</i> eksik ve WT farelerin sakarine olan tercihi.....	51
Şekil 6.15. <i>Magel2</i> eksikliğinin yüksek şekerli beslenmeye olan etkisi. a) <i>Magel2</i> eksik ve WT farelerin yüksek şekerli beslenme tercih oranı grafiği.....	52
Şekil 6.16. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen <i>Agrp-Cre</i> :: <i>Magel2</i> ^{+/-} ve <i>Agrp-Cre</i> farelerde aç ve tok durumda ARC deki AGRP nöronlarından elektrofizyolojik ölçümlerin alınması.....	54
Şekil 6.17. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen <i>Pomc-Cre</i> :: <i>Magel2</i> ^{+/-} ve <i>Pomc-Cre</i> farelerde tok durumda ARC deki POMC nöronlarından elektrofizyolojik ölçümlerin alınması.....	55
Şekil 6.18. Kimyasal olarak AGRP nöronlarının aktivasyonunun besin tüketimine olan etkisinin normal ve <i>Magel2</i> eksik farelerde karşılaştırılması.....	57
Şekil 6.19. Kimyasal olarak AGRP nöronlarının aktivasyonunun besin tüketimine olan etkisinin normal ve <i>Magel2</i> eksik farelerde karşılaştırılması.....	59

RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.1. Prader-Willi sendromuna sahip bir hastanın fenotipik karakteristik özellikleri.	11
Resim 5.1. %3 agaroz jelde pcr ürünleri görüntüsü.....	29



TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.1. Polimeraz zincir reaksiyonu programı.....28

Tablo 5.2. Alınan ve üretilen virüs çeşitleri.....31



1. ÖZET

PRADER-WILLI SENDROMUNA DAYALI MORBİD OBEZİTENİN NÖRONAL KÖKENLERİ

Prader-Willi sendromu (PWS) kromozom 15 in paternal kopyasındaki q11-q13 bölgesinin inaktive olması sonucu meydana gelen bir genetik nörogelişimsel bir hastalıktır. *Magel2* geni, bu bölgede bulunan ve inaktive olan genlerden biridir. PWS, hiperfaji ve sosyal bozukluklar gibi çeşitli fizyolojik ve davranışsal problemler ile ilişkilidir. *Magel2* nin hipotalamusta yüksek derece ifade edildiği bilinmektedir. Oksitosin, iştah ve besin alımını dizginleyerek tokluğu sağlayan başlıca nöropeptilerden biridir. PWS hastalarında yapılan postmortem analizler sonucu elde edilen bulgular oksitosin sentezleyen nöronların seviyelerinde ciddi miktarlarda azalmalar olduğunu göstermiştir. Bu bulgulara ilaveten oksitosin nöronlarının tokluk hissi oluşumunda oynadığı önemli rol de göz önüne alındığında, bu sistemdeki bozuklukların PWS hastalarında görülen aşırı iştaha katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu güne dek yapılan çalışmalar oksitosin nöropeptidinin gen ifadesi yada nöropeptidin post-translasyonel olgunlaşması aşamalarında yoğunlaşmıştır. Buna karşın sağlıklı ve PWS'li hayvan modellerinde, oksitosin nöronlarının içinde bulunduğu hipotalamik sinir ağlarının anatomisi ve fizyolojisi hakkında yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu projede hipotezimiz *Magel2* geninin delesyonunun oksitosinerjik devre bozukluklarına PWS fenotipine yol açabileceğidir. Bu hipotezi test etmek amacıyla *Magel2* eksik farelerde oksitosin nöronlarının fonksiyonel özelliklerini irdeledik. Çalışmalarımız sonunda oksitosin nöronlarına gelen sinaptik inputların *Magel2* eksikliğinde dramatik bir şekilde değiştiğini ve bu nöronların aktivitesinin azaldığını gözlemledik. Bu çalışmalar hipotalamik sinir devrelerinde işlevi bozulan unsurların tanımlanmasına ve PWS'deki tokluk devrelerinin patogenezi anlamaya yardımcı olacaktır (* $p < 0.05$).

Anahtar kelimeler: Prader-Willi sendromu, *Magel2*, hipotalamus, oksitosin

2. ABSTRACT

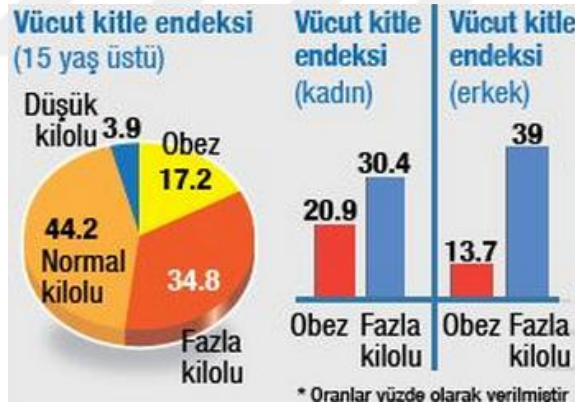
CIRCUITRY SUBSTRATES OF MORBID OBESITY IN PRADER-WILLI SYNDROME

Prader-Willi syndrome (PWS) is a genetic disorder caused by disruption of a well-defined region on chromosome 15, which contains several paternally active genes including *Magel2*. Insatiable appetite and the resulting morbid obesity is a significant problem in PWS. A constant desire to eat makes PWS the most common genetic cause of life threatening childhood obesity. The chromosomal abnormalities that underlie PWS leads to inactivation of several genes, a condition that is thought to cause hypothalamic dysfunction. PWS is associated with several physiological and behavioral problems including hyperphagia and social deficits. Oxytocin is an important neuropeptide for controlling satiety following food intake and also, it has been implicated in both social and feeding behaviours. The number of oxytocin neurons has been shown to be reduced in PWS patients as well as mouse models of PWS. Much of the research has been focused on the oxytocin neuropeptide and defects in its processing in PWS, however very little is known about the circuitry formed by oxytocin expressing neurons. Defects in satiety-circuits defined by oxytocin neurons may underlie the voracious appetite seen in PWS patients. Since *Magel2* is highly expressed in hypothalamus, we hypothesized that its deletion may cause oxytocinergic circuit defects that may contribute to PWS phenotype. To understand full scope of oxytocinergic circuitry defects, we examined circuit properties of oxytocin neurons in *Magel2* null mice, our results suggest that synaptic inputs to oxytocin neurons are dramatically altered that drive reduced activity in *Magel2*-deficient oxytocin neurons. These studies will help to identify dysfunctional circuit elements at synaptic resolution and elucidate pathogenesis of satiety circuits in PWS, which could lead to targeted therapeutic interventions to restrain insatiable hunger (* $p < 0.05$).

Key words: Prader-Willi syndrome, *Magel2*, hypothalamus, oxytocin

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite, son yıllarda dünyada ve ülkemizde en önemli toplumsal sağlık problemleri arasına girmiş bulunmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, ülkemizde her altı kişiden birisi obez ve her iki kişiden birisi de fazla kilolu kategorisine girmektedir (Şekil 3.1). Daha da endişe verici olan ise, gerekli tedbirler alınmadığı taktide bu oranların önümüzdeki yıllarda daha da artacağı tahmin edilmesidir. Obezite, kişilerin yaşam kalitesini doğrudan etkilemekten öte, birçok farklı hastalığın görülme riskini de arttırarak ciddi sağlık problemlerine davetiye çıkarmaktadır. Bunların arasında kardiyovasküler rahatsızlıklar, diyabet ve kanser gibi mortalite riski yüksek hastalıklar bulunmaktadır (1). Üstelik diyet, egzersiz ve ilaca dayalı tedavi yöntemleri şu ana kadar beklenen etkiyi göstermekte başarısız kalmıştır (2).



Şekil 3. 1. TÜİK verilerine göre Türkiye'deki obezite oranları (3).

Beslenme ve enerji dengesini kontrol eden mekanizmalar hakkındaki son derece sınırlı olan bilimsel birikim, yeni tedavi yollarının aranmasının önündeki en büyük engellerden birini teşkil etmektedir. Dolayısıyla kısa vadede bu süreçlerin, yani açlık ve tokluğun ve bununla ilintili fizyolojik olayların vücut tarafından nasıl kontrol edildiğinin açığa kavuşturulması gerekmektedir. Beynin hipotalamus bölgesi bu

görev için özelleşmiş sinir ağlarını barındırmaktadır. Tarihsel gelişimi açısından ele alındığında hipotalamus bölgesinin iştahı ve beslenme davranışını etkilediği 100 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir. İlk bulgular yüzyılın başlarındaki beyin hasarı ve tümör oluşumuna dayalı olarak hastalarda görülen metabolik bozukluk gözlemlerinden oluşmaktadır. Yüzyılımızın ortasında hayvan deneklerde gerçekleştirilen kapsamlı hipotalamik lezyon haritalamalarıyla bu bölgenin çeşitli çekirdeklerinde oluşturulan hasarların obeziteye ya da iştah kaybına yol açtığını göstermiştir (4).

Yapılan araştırmalar arkuat çekirdek (ARC) ve paraventriküler hipotalamik çekirdekte (PVN) bulunan sinir hücrelerinin beslenme davranışını doğrudan düzenlediğini göstermiştir. PVN deki oksitosin nöronları yemek alımının düzenlenmesinde önemli role sahiptir. PVN nin rolüyle ilgili pek çok bulguya rağmen alt bağlantı yolları ve PVN nin nasıl bir mekanizmayla açlığı kontrol ettiği şu an açıklanamamaktadır. Dahası, PWS fare modellerinde temel oksitosin sinirsel anatomisinin ve işlevinin nasıl değiştiği de tam olarak anlaşılamamıştır. Optogenetik ve farmakogenetik yaklaşımların elektrofizyolojik ve davranışsal analizler ile birleştirilmesi sayesinde, artık tek bir hücre tipinin bir organizmanın fizyolojisi ve davranışına olan etkisini belirlemek mümkün olabilmektedir (53). Bu teknikler oksitosin nöronlarındaki işlevsel ve bağlantısal özelliklerin PWS modellerinde nasıl etkilendiğini belirlemek için kullanılmıştır. PWS hastalarında aşırı iştaha yol açan merkezi sinir sistemi devrelerindeki patolojik değişimleri daha iyi anlayabilmek için, normal ve bir PWS modeli olan *Magel2* eksik fare modelinde ilgili nöronlarının bağlantı anatomisini ve bu bağlantıların sinaptik özelliklerini kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

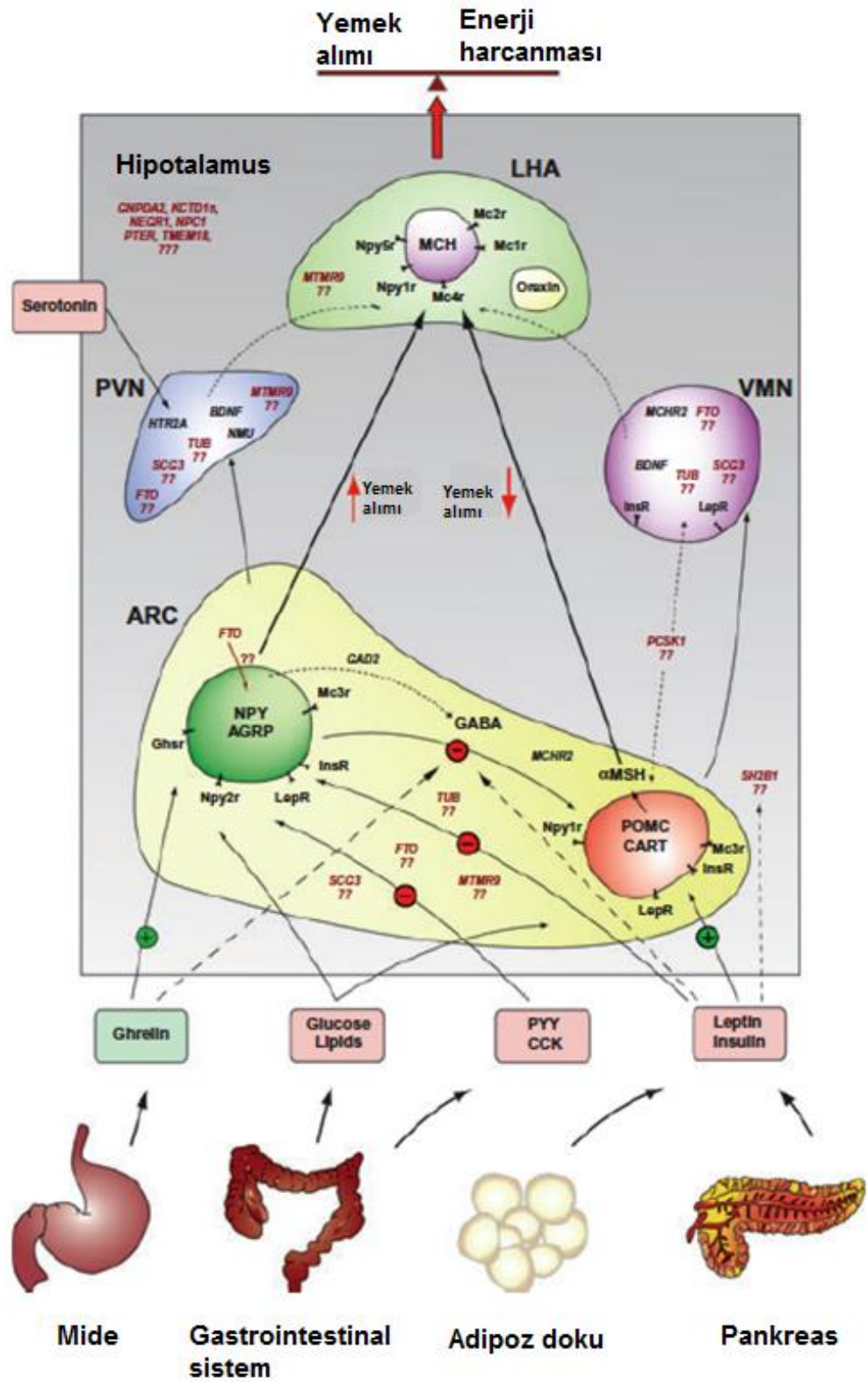
4.1. Hipotalamus ve beslenme davranışının fizyolojisi

Hayvan çalışmaları beslenmenin ve metabolizmanın düzenlenmesinde hipotalamusun önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Hipotalamus sürekli olarak periferel sistemden sinyalleri kabul eden ve yeme davranışını düzenleyen bir bölgedir (örn; yemek aramak ya da tok hissetmek) ve metabolizma hızına bağlı olarak buna bir cevap oluşturur (5). Enerji dengesinin kontrolü gastrointestinal sistem, adipozite ve besin ile ilişkili sinyaller tarafından gelen tokluk sinyallerinin birleşimini içerir. Yemek alımına cevap olarak, bağırsaktan tokluk hissini sağlayarak yemek alımını inhibe eden kolesistokinin (CCK) ve peptid YY salgılanır ve bunun sonucu olarak aşırı besin tüketimini önler. Bu peptidlere zıt olarak, ghrelin aç olunca mideden salgılanır ve iştah artışına yol açar (6). Adiposit sinyaller vücut enerji depolarından beyne geri bilgi akışı sağlar ve hormonların dolaşımına aracılık eder (7). Leptinin vücut yağına orantılı seviyelerde sirkülasyonu olur ve plazmadaki yüksek konsantrasyonu beslenmeyi inhibe eder. Buna zıt olarak, yemek kısıtlandığı zaman leptin seviyeleri düşerek, leptin reseptörleri yoluyla hipotalamustaki iştahı artıran yolakları aktive eder. İnsülin de aynı yolaklar yoluyla benzer şekilde etki eder. Hem insülin hem de leptin sinyal yolaklarındaki hipotalamik sorunlar yemek alımında artışla ya da vücut ağırlığındaki artışla ilişkilidir (8).

Hipotalamusun arkuat çekirdeğinde bulunan iki farklı nöron popülasyonundan biri olan iştahı uyaran ve nöropeptid Y (NPY) ve agouti ilişkili protein (AGRP) üreten nöronlar yemek alımını kontrol eder, bu nöronal aktivite kilo kaybı ve açlığın artması durumunda gözlenir (9). Proopiomelanokortin (POMC) yoluyla etki eden diğer iştah baskılayıcı nöronlar alfa melanosit uyarıcı hormon ve kokain ve amfetamin düzenleyici transkript salgılanması yoluyla yemek alımını baskılar (10). NPY/AGRP nöronları POMC/CART hücrelerinin aktivitesi üstüne inhibe edici bir etkisi vardır (11). Arkuat çekirdekte bulunan bu nöron gruplarının her ikisinde periferel sistemden gelen input sinyaller için bir çok reseptör eksprese eder. Bu sinyaller CCK, peptid YY, leptin ve insulin yoluyla iletilir ve NPY/AGRP nöronlarının aktivitesini baskılar

ve POMC/CART hücrelerinin aracılık ettiği anoreksijenik yolağa değiştirerek besin alımının azalmasına yol açar (5).

ARC nöronlarından sinyaller, melanokortin receptörü eksprese eden nöronlara ve paraventrikular çekirdek (PVN) ve lateral hipotalamus (LHA) bölgesi gibi hipotalamusun diğer bölgelerine gönderilir. Özellikle MC4R yemek alımını azaltmak ve metabolizma hızını artırmak üzerine başlıca etkileri olmasıyla enerji dengesini kontrol etmek için önemlidir. Hayvanlar üzerine yapılan fonksiyonel çalışmalar farklı beyin bölgelerindeki melanokortin sinyal yolağının obezitenin farklı karakteristik özelliklerine katkısını içerir. PVN deki bozulmalar hiperfajiyi uyarır ve vücut ağırlığı artışına neden olur (5, 12). LHA daki bozulmalar ise yüksek yağlı diette obezitenin oluşumunu hızlandırır. İştahi düzenlemede önemli bir nöropeptid olan oreksin, LHA da yaygın bir şekilde eksprese edilir ve açlık durumunda yemek arama davranışını stimüle eder, ventromedial hipotalamusta (VMH) salgılanan beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), MC4R sinyal yolağı yoluyla beslenme ile ilgili duruma cevap olarak yemek alımını azaltır ve farklı hipotalamik bölgelerde bulunan 5-hidroksitriptamin reseptör tokluğu düzenler (Şekil 4.1) (13).



Şekil 4. 1. Yeme davranışını ve enerji metabolizmasını düzenleyen hipotalamustaki nöropeptidler arasındaki etkileşimler (5).

4.2. Genetik varyasyonların obezitedeki rolü

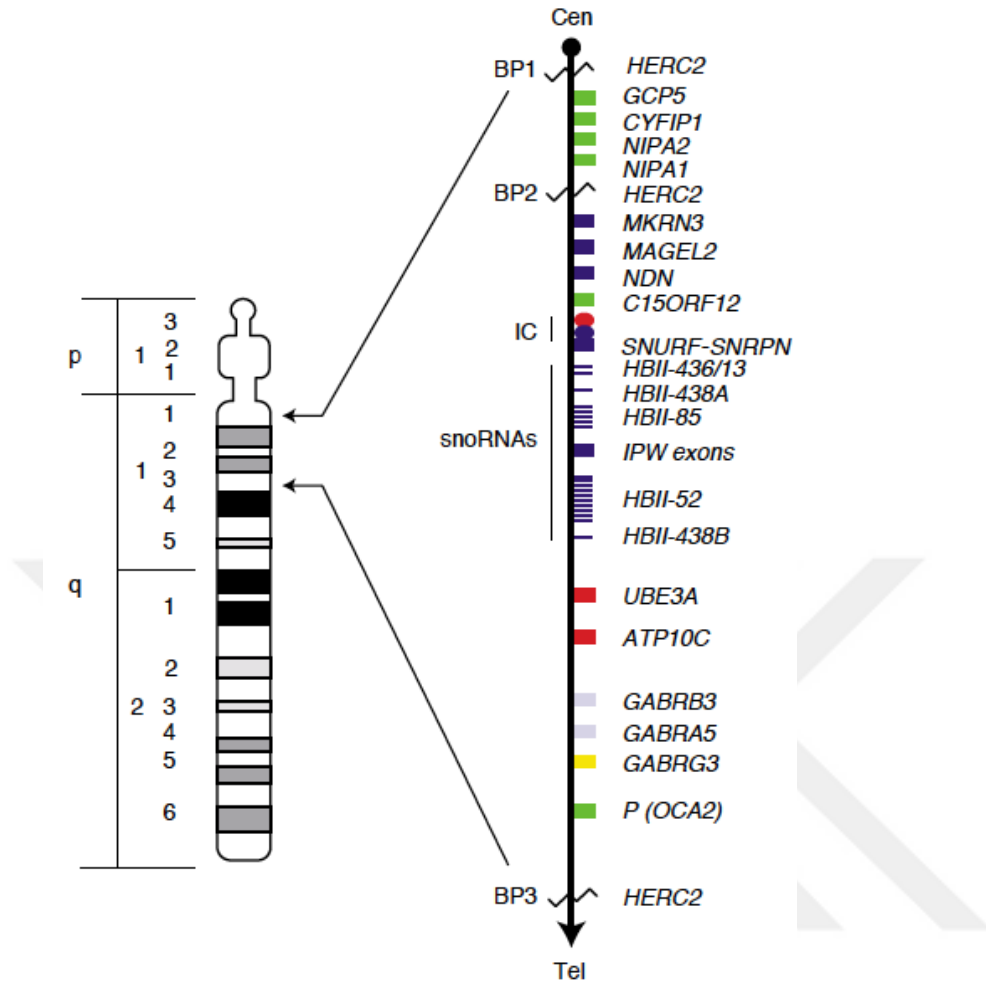
Obezite ve obezite sonucu ortaya çıkan bozukluklar hastalığa yakalananların sayısı, ölüm oranı ve fazla sağlık masraflarının en başlıca nedenidir. Yetişkinlerdeki tahmini vücut ağırlığı indeksi %40-70 iken çocuklar ve gençlerde vücut ağırlığı varyasyonunun %80 den fazlasına genetik faktörler katkıda bulunur (14, 15). Bir çok obeziteye yol açan gen merkezi sinir sisteminde etkisini gösterir (10). Çalışmalar obeziteyi anlamak ve tedavi etmek için yüksek potansiyele sahip olduğu gösterilmiş yeni obezite genlerini ve yolaklarını tanımlamış ve karakterize etmiştir. Hipotalamusta enerji dengesini kontrol eden devrelerde önemli rol oynayan genlerdeki nadir mutasyonlar çocuklukta ortaya çıkan, şiddetli, sendromik veya kalıtsal obezite formlarına neden olur (5). Protein kodlayan genlerde meydana gelen hem nadir mutasyonlar hem de yaygın varyasyonlar adipoz dokuda üretilen önemli bir hormon olan leptine olan nöronal cevapları etkiler. Bu genlerdeki mutasyonlar vücut ağırlığını dramatik bir şekilde etkiler ve diğer genler ve yolaklar tarafından kompanse edilemez. Dahası, leptin direnci diete bağlı obezitenin ayırıcı bir özelliğidir. Daha önceki bir çalışmaya göre obezite ilişkili bir genin eksikliği sonucu hipotalamustaki leptin sinyalini bozduğu gösterilmiştir (15). Leptin, reseptörü ve sinyal yolağındaki komponentleri kodlayan genlerdeki mutasyonları olan obez çocuklar, güçlü açlık duygusu ve yemek için agresif davranışlar gösterebilirler. Buna benzer olarak leptin ya da leptin reseptörü eksik fareler hipoaktif, hiperfajik, kısır ve obezdir (16). Diğer obez çocuklar leptin devreleriyle ilişkili yolaklardaki melanokortin veya beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) yolakları ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonları taşıyabilir. Örneğin, melanokortin-4 reseptör genindeki varyasyonlar monogenik obezitenin en sık nedenidir ve SIM1 genindeki bozukluklar hipotalamik leptin-melanokortin yolağını bozarak sendromik obeziteye neden olur. Bardet-Biedl sendromu (BBS) gibi diğer nadir çocukluk obezite sendromları sinyal transdüksiyon yolaklarını koordine etmek için hücresel anten olarak hareket eden ve hücre büyüme ve farklılaşmasını kontrol eden sil komponentlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşur (17).

Fare obezite mutasyonlarında bulunan sorumlu genlerin tanımlanması, insan vücut ağırlığının düzenlenmesi ile ilgili hastalıkların anlaşılması ve tedavi edilmesi için önem taşımaktadır ve bu genlerden bazıları önemli fizyolojik yolları ortaya çıkarmaktadır. Mutant hayvanlar ise endokrinoloji, metabolizma ve davranış araştırmaları için kullanılmıştır (18).

4.3. Prader-Willi sendromu (PWS)

Obezitenin tüm sendromik formları içinde Prader-Willi sendromu (PWS) genetikçilerin ve obezite çalışan araştırmacıların en çok aklını karıştıran hastalıktır. Leptin yolağında mutasyonları olan çocuklar gibi, PWS'li çocuklar artmış yağ kas oranı ve durmak bilmeyen bir açlık hissine sahiptirler. Bu da morbid obeziteye yol açar. PWS hastalarının yemek çaldığı, sakladığı ve yemek için yalvardığı, yemek için para çaldığı biliniyordur. Bu nedenle, PWS açlığın genetik bir modeli olarak tanımlanmıştır çünkü benzeri yemek arama davranışı ve enerji harcanmasının azalması aç bırakılan hayvanlarda da gözlemlenmiştir (19).

Güçlü yeme isteği ve bunu takiben oluşan morbid obezite Prader-Willi Sendromu'nda (PWS) temel bir sorundur. Hatta PWS, çocuklardaki obezitenin bir numaralı genetik kökenli sebebi olarak gösterilir (20). PWS dünya genelinde 15000-30000 arası doğumda bir görülen kompleks bir nörogelişimsel bir hastalıktır. Neonatal hipogonadizm ve ciddi hipotani ile karakterize edilmesinin yanında yeme problemleri ve gelişimin ilk yıllarında bozukluk, nefes alma problemleri, spesifik davranış ve çeşitli endokrin fonksiyon bozuklukları bunu takip eder (21). PWS nin genetik sebepleri kromozom 15 in paternal kopyasındaki q11-q13 bölümünün inaktive olması ve maternal kopyadaki aynı bölümün genomik imprinting sonucu sessizleştirilmesini içerir (Şekil 4.2). Bu bölgede maternal imprintinge maruz kalan pek çok gen bulunur ve bu genlerin işlevini kaybetmesinin hipotalamik fonksiyon yetmezliğine yol açtığı düşünülmektedir (22).



Şekil 4. 2. Prader-Willi sendromu ile ilişkili kromozom 15 üzerindeki q11-q13 bölgesindeki genlerin şematik gösterimi (23).

Bu sendrom zeka geriliği, duygusal dengesizlik, kaslarda güç kaybı ve hipotonus, iştah artışı, öğrenme zorluğu, öfke patlaması ve karamsarlığa kapılma, öğrenme güçlüğü, inatçılık, öğrenme zorluğu, kompulsif davranışlar, uyku problemleri gibi gelişimsel, davranışsal ve obezite ile ilişkili bozukluklar görülür. Bu hastalar dış görünüş olarak birbirlerine benzerler ve fenotipik karakteristik özellikleri küçük el ve ayaklar, gözlerin badem şeklinde olması, kısa boy, görme bozuklukları ve dar yüz hatlarını içerir (Resim 4.1). Ciddi obezite farklı beslenme ile ilişkili evrelerde gelişir. Bu evrelerin klasik tanımlanması iki faz ile ilişkilidir: infant dönemde beslenme güçlüğü, hipotani ve büyüme ve gelişmede problemler (faz 1, 0-9 ay arası), bunu hiperfaji izler ve hastalar obez hale gelir (faz 2, 9 aylıktan yetişkinliğe kadar olan

süre). Bunlar hastanın beslenmesine, davranışına ve vücut kütleindeki artışa bağlıdır (24).

PWS sendromal obezitenin en çok rastlanılan nedeni olmasına ve metabolik komplikasyonların esas nedeni olmasına rağmen, obezitenin gelişmesindeki asıl mekanizma tam olarak anlaşılmış değildir. Hipotalamik tokluk merkezindeki ve hormonal döngüdeki anormallikler enerji harcanmasını, yemek alımını ve hormonal olayları etkiler (24).



Resim 4. 1. Prader-Willi sendromuna sahip bir hastanın fenotipik karakteristik özellikleri (23).

Beslenme davranışında ve nörolojik fonksiyonda görev alan ghrelin, büyüme ve cinsiyet hormonları ve GABA gibi bir çok nöropeptid ve hormonun anormal seviyeleri PWS de olduğu gösterilmiştir. Bu dengesiz sonuçların ve klinik

özelliklerin moleküler mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Fakat somatik ve beyin dokularının nöropatoloji ve mikroarray gen ekspresyon analizlerinden, moleküler çalışmalardan gelen bulgulara göre 15q11-q13 bölgesindeki ve dışındaki gen etkileşim paternini ve yolaklarını tanımlamak için başlangıç olmuştur ve PWS ye neden olduğu düşünülen özelliklerin moleküler mekanizmasına ışık tutmuştur (20, 23).

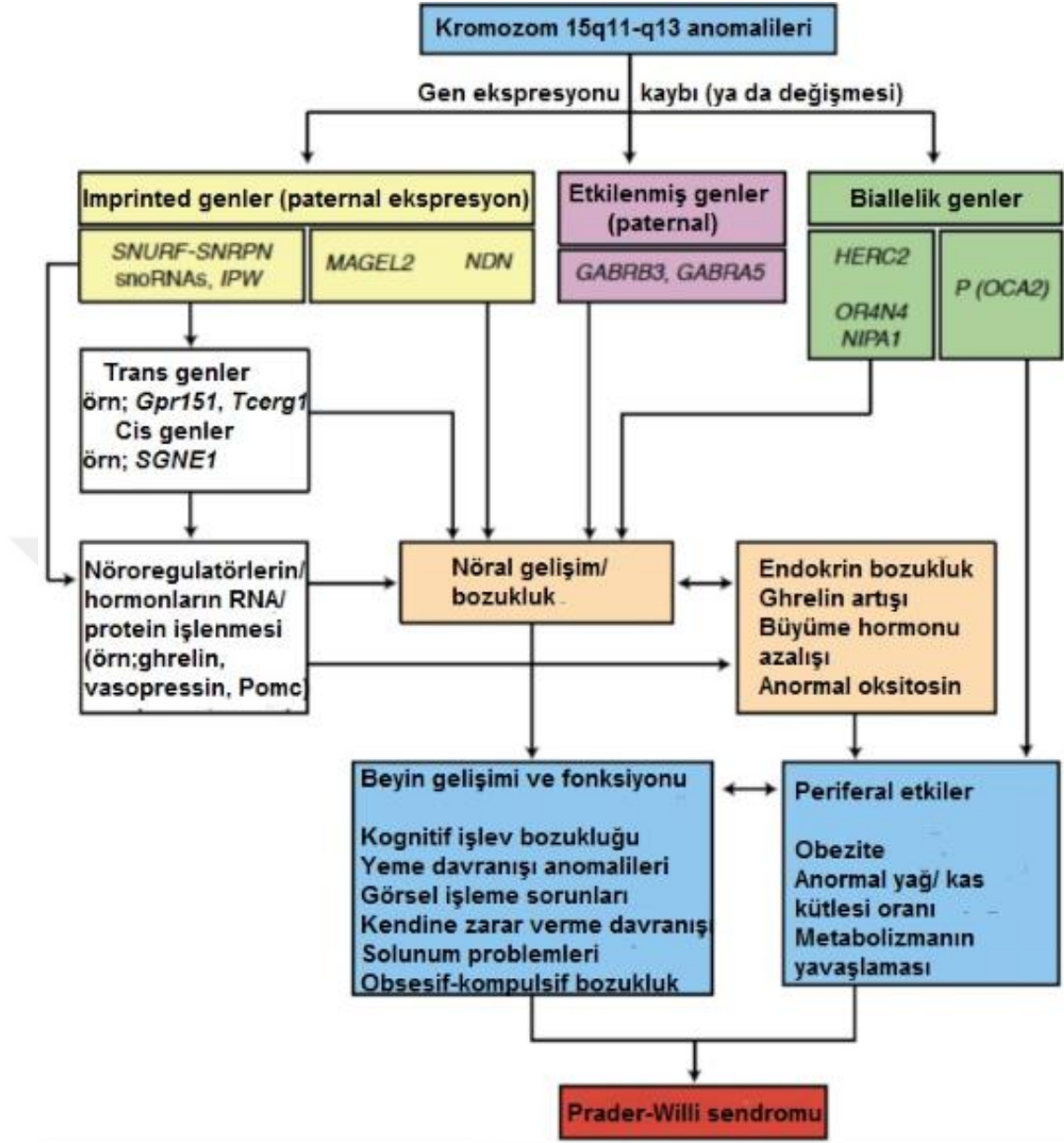
Mideden kan dolaşımına salgılanan ghrelin peptidi bir çok dokuda sentezlenir ve hem endokrin hem de parakrin etkilere sahiptir. Bunlar iştah artışı, büyüme hormonunun uyarılması, prolaktin ve adenokortikotropik hormonun salgılanması ve enerji dengesinin düzenlenmesidir. PWS ye sahip çocuk ve yetişkinlerde ghrelin seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Ghrelin yemeyi uyarır, oysa bağırsaktan salgılanan peptid YY yemeyi inhibe eder (23, 25)

Leptin, melanokortin, BDNF ya da ilişkili yolakların bozulmasına neden olan genlerle ilgili bir çok genetik obezite hastalıklarına rağmen PWS deki hiperfajik obezitenin nedeni bilinmiyordur. PWS ile ilişkili obezite düşünüldüğünde leptin - melanokortin yolağını içeren bir bozukluk en az bilgi verici açıklamadan biridir. Fakat şimdiye kadar herhangi bir PWS geni ve beyindeki bir spesifik yolak arasındaki bir mekanizmayı içeren bir bağlantı gösterilmemiştir (15).

4.4. Deney hayvanlarında Prader Willi sendromuna yol açtığı bilinen moleküllere bağlı aday genlerin araştırılması

Prader-Willi sendromuna ilişkin kromozom bölgesi MKRN3, MAGEL2, NDN, SNORD116, ve bicistronic SNURF-SNRPN imprint olan genleri içerir. Bu genlerin her birinin kaybı PWS fenotipini farklı şekilde etkiler, fakat her birinin önemi tam olarak anlaşılmamıştır (18). SNORD116 ve MAGEL2 büyük bir çoğunlukla beyinde ifade edilir. SNORD116 uyku hastalılarını açığa çıkarmak ve katkıda bulunmak için PWS için gereklidir. PWS fare modellerinde Snord116 delesyonları beyin morfolojisinde değişiklikler ve hipokampus boyutunda azalma ile sonuçlanır (26). MAGEL2 hipotalamusta bulunan bir protein kodlar ve beyin gelişimi sırasında

eksprese edilir, nöral farklılaşma için önemlidir. MAGEL2 sirkadyan ritimde de fonksiyonel görevi vardır ve ASD riski ile de ilişkilidir (18). MAGEL2 nin PWS ile ilişkili obezitede rol aldığını gösteren ilk ipucu, sirkadyan ritmi ve enerji dengesini kontrol eden hipotalamus bölgelerinde *Magel2* nin yüksek miktarda eksprese olduğunun gözlemlenmesi ile ortaya çıkmıştır (26). *Magel2* eksik fareler aşırı kilolu ve iki katı daha fazla yağ kütlesine sahiptir, orantılı olarak daha yüksek leptine, daha az kas ve kemik kütlesine sahiptir (27). Ndn geni tarafından kodlanan Necdin sinir sisteminde yüksek miktarda ifade edilir. Necdin kaybı merkezi ve periferik sinir sistemlerinin anormal gelişimi ile sonuçlanır, PWS de hipogonadotrofik hipogonadizme yol açabilir (28). Farelerde Necdin and *Magel2* delesyonları OT üretiminin azalması ve otizm davranışlarının görülmesi ile sonuçlanır (29). PWS de diğer kromozomlardaki anormallikler beyin gelişimini ve davranışını etkileyebilir. Embriyogenesis de rol oynayan bir reseptör olan 5HTR2B ve yeme davranışı ve obezitede rol oynayan genler (ADIPOR2, MC2R, HCRT) ve OXTR geninin ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir (23). Aynı zamanda steroid sentezi için önemli olan STAR ve G protein bağlı reseptörlerin desensitize olmasında önemli olan genlerin ekspresyonunda da azalma gözlemlenmiştir. Oksitosin (OT) sentezinde gerekli olan MAGED1 kaybı OT prekürsörlerinin normal seviyelerde olmasına rağmen hipotalamusta OT üretiminde azalmaya neden olur, ve bu farelerde obezite, sosyal etkileşim ve cinsel davranışta bozulmalara yol açtığı gösterilmiştir (Şekil 4.3) (30).



Şekil 4. 3. Prader-Willi sendromuna yol açan birbirini etkileyen ve birbiri ile bağlantılı olan olası mekanizmaları gösteren teorik diagram. Prader-Willi sendromundaki (PWS) kromozom 15q11-q13 anomalileri üç kategoride (imprinted, etkilenmiş ya da biallelik) gruplanmıştır ve o bölgedeki genlerin ekspresyonunun değişmesine ya da kaybına yol açar. Ek olarak, trans etkilerin (örneğin, RNA işlenmesinde görev alan 15q11-q13 genlerinin ekspresyonunun kaybı) ve cis etkilerin (*SGNE1* ekspresyonunun kaybı ya da azalması) sonucu olarak downstream genlerin ekspresyonu etkilenir. Gen ekspresyonundaki bu bozulmaların çoğu

nöroregulatörlerin/hormonların RNA ve/veya protein işlenmesini etkileyebilir. Bu aynı zamanda nöral gelişimin ve endokrin fonksiyon bozukluğunun düzenlenmesinin bozulmasına yol açabilir. NDN (hücre siklusu regülatörü), GABA reseptörleri (GABRB3, GABRA5) ve olfaktör reseptörleri (OR4N4) kodlayan genler gibi diğer genlerin ekspresyonundaki bozulmalar nöral fonksiyonda direkt etkilere neden olabilir ve P (OCA2) bozulması pigmentasyonu direkt olarak etkileyebilir. Ekspresyon paternine ve klinik sonuçlara göre varsayılan ve rollerine göre şekilde gruplandırılan genler örneklendirilmiştir (23).

4.5. Oksitosin ve Prader-Willi sendromu ile ilişkisi

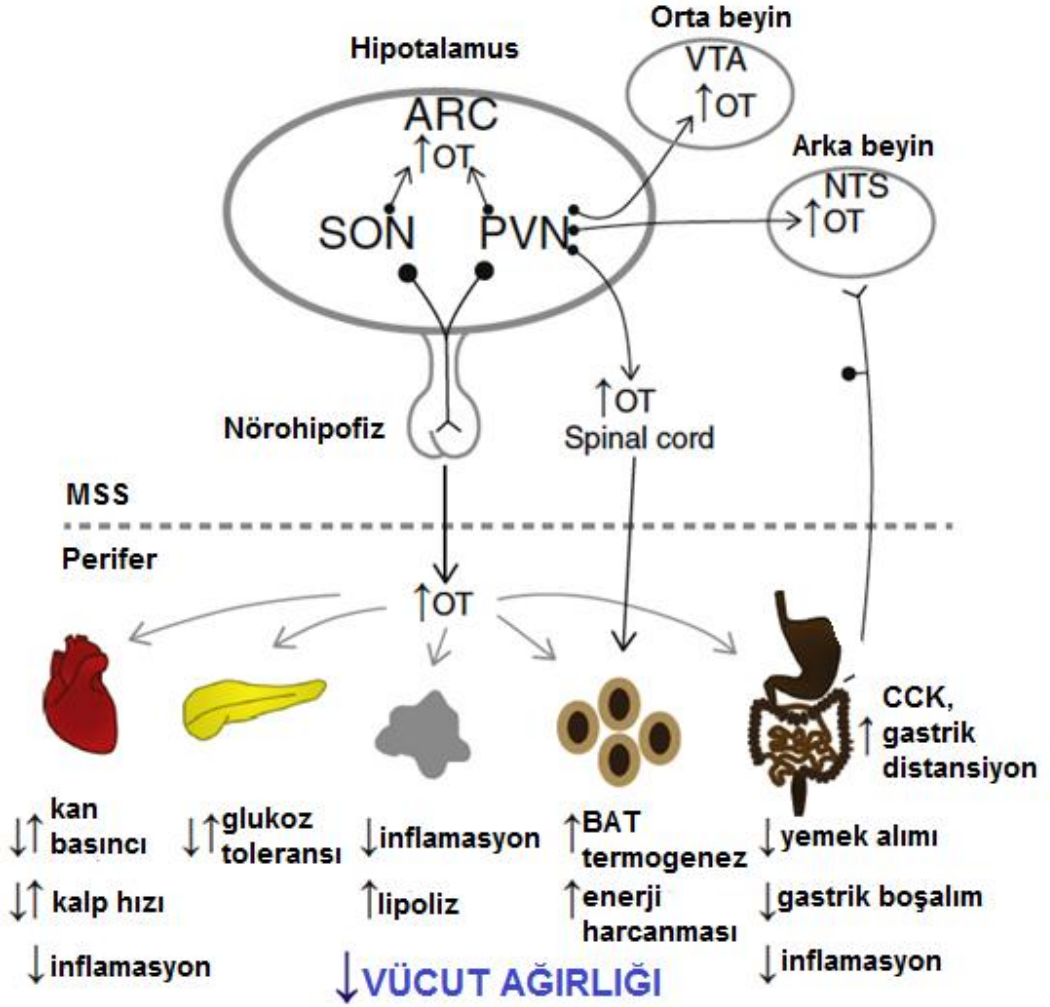
Prader-Willi hipotalamusta fonksiyon bozukluğuna yol açan bir çok endokrin anormallikler ile karakterize edilir. Hipotalamusta SON ve PVN de üretilen oksitosin seviyeleri büyüme hormonu, oreksin ve nöropeptid Y (NPY) gibi diğer hipotalamik ürünlerin seviyelerinde olduğu gibi anormallik olduğu bilinmektedir (18). Postmortem çalışmalar PVN deki oksitosin nöron sayısında azalma olduğunu göstermiştir ve başka çalışmalarda plazma ve serobrospinal sıvıda oksitosin seviyelerinde azalma olduğu bulunmuştur. Görüntüleme çalışmalarında ise PWS hastalarında hipotalamusun normale göre daha küçük olduğu gösterilmiştir (18, 31, 32).

Hayvan çalışmalarına göre hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinde bulunan oksitosin nöronları yemek alımının düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Oksitosin, iştah ve besin alımını dizginleyerek tokluğu sağlayan başlıca nöropeptitlerden biridir. PVN bölgesine yapılan küçük lezyonların iştah artışına sebep olduğu ve obeziteye yol açtığı gösterilmiştir, ve PVN bölgesindeki belli bir nöron grubunun uyarılması önemli ölçüde gastrik asit salınımı artışı ile sonuçlanır. Merkezi oksitosin ve oksitosin agonistleri verilmesi yemek alımını ve gastrik hareketi inhibe eder ama bu etkiler oksitosin reseptörü antagonistleri tarafından korunabilir. Buna dayanarak PVN deki oksitosin nöronlarının yeme davranışında ve vücut ağırlığında inhibe edici etkisi olduğu söylenebilir (32).

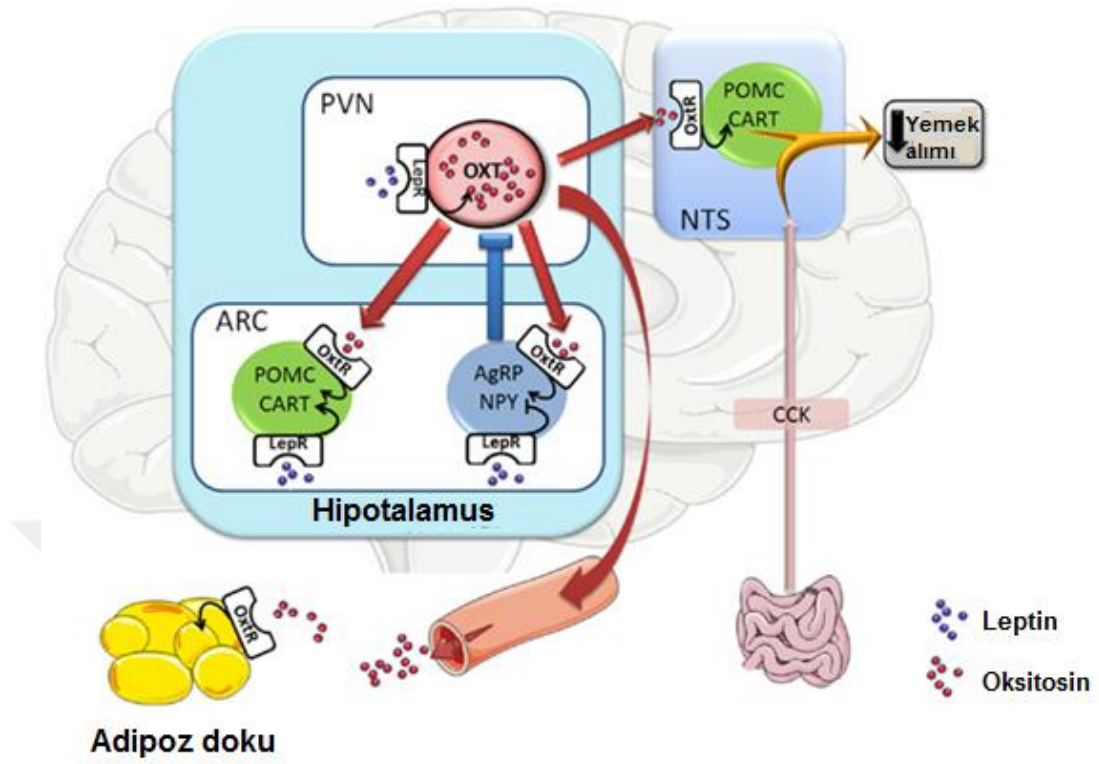
Oksitosin G proteini bağı reseptör ailesine üye olan, oksitosin reseptörüne bağlanan dokuz amino asitten oluşan bir peptid hormondur. Yeme davranışı ve metabolizmanın düzenlenmesi gibi fizyolojik olayları düzenler (Şekil 4.4). Oksitosin hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinde ve supraoptik çekirdeğinde üretilir ve dendritik difüzyon yoluyla oksitosin enerji metabolizmasında görev yapan beyin bölgelerine salınır, aynı zamanda parvosellüler oksitosin nöronlarının arkuat çekirdek, ventral tegmental bölge, nukleus akkumbens, nukleus traktus solitarius ve spinal kord gibi diğer bölgelere olan aksonal bağlantıları yoluyla taşınır (33). Magnosellüler oksitosin nöronlarının oksitosini periferal dolaşıma salgılayan posterior hipofiz bezine aksonal bağlantıları vardır. Ayrıca oksitosin reseptörleri yoluyla otokrin ve parakrin etkilerini gösterdiği gastrointestinal sistem gibi lokal dokularda üretilir ve salgılanır. Oksitosin reseptörü genellikle merkezi sinir sisteminde bulunur (örneğin, hipotalamus, basal ganglia, VTA, nukleus akkumbens, frontal korteks, insula, NTS ve spinal kord) (34).

Oksitosin reseptörü yemek alınımı ve metabolizmanın kontrol edilmesinde önemli role sahip olan merkezi sinir sistemi ve periferal bölgelerde yaygın bir şekilde bulunur (Şekil 4.5). Hayvan çalışmalarına göre oksitosin kalorik besin alınımı ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli role sahiptir (Şekil 4.6). Oksitosin ve oksitosin reseptör knockout farelerde kilo artışı, obezite ve glukoz metabolizmasında bozukluk görülmüştür (35). Hayvanlarla yapılan çalışmalara göre oksitosin kalorik tüketiminde azalma görülmüştür. Oksitosin *Sim1* eksik farelerde yemek alınımı ve kilo artışı gözlemlenmiştir (36). Klinik öncesi çalışmalar ise oksitosinin karbonhidrat tüketimini azalttığını ve yüksek yağlı besin tüketimini baskıladığını göstermektedir (33). Ayrıca oksitosin iştahı düzenleyen hormon seviyelerini değiştirerek (örneğin, anoreksijenik hormon olan kolesistokinin (CCK) ve glukagon benzeri peptid 1 (GLP1)) iştahı dolaylı yoldan etkilemektedir. Dahası, oksitosinin yağ ve karbonhidrat oranı yüksek daha lezzetli besinlerin tüketiminde azalmaya yol açması, ödül ile ilişkili besin motivasyonu yoluyla oksitosin besin alınımını inhibe eder. PVN den oksitosin projeksiyonları kabul eden ve oksitosin reseptörü eksprese eden ödül yolağı

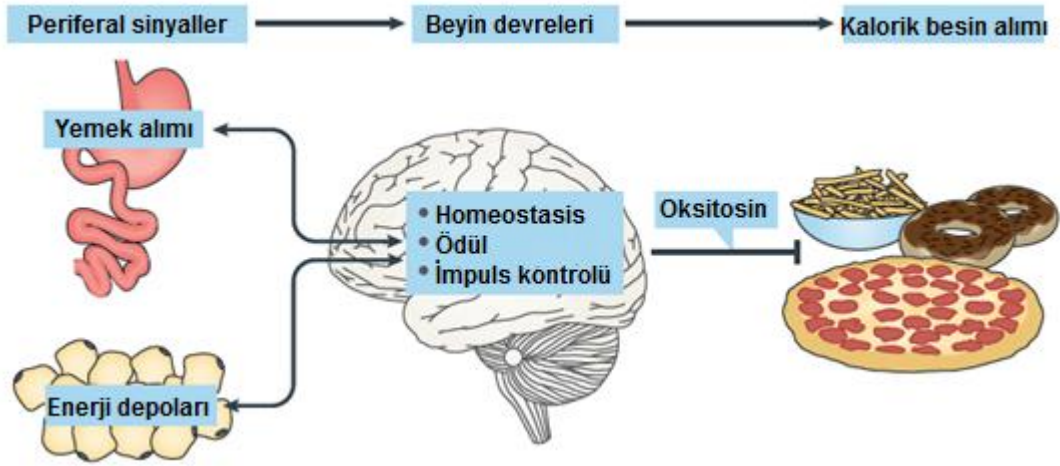
ile ilişkili ventral tegmental bölge (VTA) ve nukleus akkumbens gibi beyin bölgelerine oksitosin verilmesi sonucunda şükroz alınımı inhibe edilmiştir (33).



Şekil 4. 4. Oksitosinin enerji dengesine olan etkilerini gösteren devrelerin şematik olarak gösterilmesi. Oksitosin merkezi sinir sistemi içinde spinal kord ve nörohipofizden dolaşıma salınır (siyah okla gösterilmiştir), metabolik olayları etkileyebilir (gri ile gösterilmiştir) ve bu vücut ağırlığında azalma ile sonuçlanır. Kısaltmalar: ARC, arkuat nukleus; CCK, kolesistokinin; BAT, kahverengi yağ dokusu; NTS, nukleus traktus solitari; PVN, paraventriküler nukleus; SON, supraoptik nukleus; ve VTA, ventral tegmental bölge (37).



Şekil 4. 5. Yemek alımını kontrol eden oksitosin nöronal devrelerini gösteren mekanizmalar. Leptin leptin reseptörü (LepR) yoluyla paraventricüler çekirdekteki (PVN) oksitosin (Oxt) nöronlarını ve hipotalamik arkuat çekirdekteki POMC/CART nöronlarını aktive eder, ARC deki AgRP/NPY nöronlarını inhibe eder. Oksitosin nöronları aktive olduktan sonra hipotalamik ARC çekirdekteki POMC/CART nöronlarını ve arka beyindeki NTS bölgesini aktive eder. Bu da yemek alımının azalmasına yol açar. Dahası, oksitosin nöronlarının aktivasyonu negatif bir mekanizmayı tetikler, PVN oksitosin nöronları arkuat çekirdekteki AgRP/NPY nöronları ile bağlantı yapar ve bu PVN oksitosin nöronlarını inhibe eder. Bunun yanında oksitosin nöronlarının posterior hipofiz bezi ile bağlantısı vardır ve aktivasyonu dolaşıma oksitosin salgılanmasına yol açar. Böylece oksitosin adipoz doku gibi hedef dokulara ulaşır (38).



Şekil 4. 6. Oksitosinin kalorili besin alımına etkilerini gösteren mekanizmalar. Periferal sinyallere cevap olarak, oksitosin beyin devrelerini kontrol ederek kalorik besin alımını, özellikle daha lezzetli besin alımını azaltır (33).

PWS fenotipinin ortaya çıkmasında rol oynayan genlerden biri olan *Magel2* eksik yeni doğanların hipotalamusunda oksitosinin azaldığı gösterilmiş ve yaşamın ilk 5 saatinde tek doz oksitosin verilmesinin erken ölümleri engelleyerek ve normal süt emme davranışını yeniden sağlayarak anormal yeme davranışlarını düzeltmiştir. Başka bir çalışmada ise *Magel2* eksik farelerde yaşamın ilk haftasında 1 hafta oksitosin tedavisinden sonra anormal sosyal tanıma ve etkileşim davranışları düzeltilmiştir. İnsanlar ile yapılan çalışmaların birinde yetişkin PWS hastaları intranasal oksitosin ya da plasebo ile tedavi edilmiştir. Oksitosin ile tedavi gören hastaların diğer kişilere karşı güven artışı, üzüntünün azalması ve daha az rahatsız edici davranış gibi sosyal davranışların gelişmesini sağlamıştır (33).

Benzer şekilde, Necdin knockout fare modelinde oksitosin sisteminde bir azalma görülmüştür. Dahası, kromozom 15 üzerinde bulunan maternal olarak imprint olan protein kodlayan genlerden biri olan *Magel2* geninin eksik olduğu diğer bir PWS fare modelinde oksitosin nöronlarında anormallikler olduğu gösterilmiştir. Buna dayanarak PWS fenotipinde anormal oksitosin nöronlarının olduğu söylenebilir.

Oksitosin PVN ve supraoptik çekirdek diye adlandırılan iki hipotalamik çekirdekte üretilir. En iyi bilinen periferik etkileri uterusun kasılması ve süt salgılanması olmasının yanında anoreksijenik bir hormon olarak bilinen oksitosinin etkileri tokluğu sağlamasıdır (32). Ek olarak, oksitosin sosyal davranışlar içinde önemli olan bir nöropeptiddir. İnsanlarda nasil oksitosin alınımı sağlıklı ve otistik bireylerde duygusal becerileri geliştirmiştir. Bu nedenle olası oksitosin fonksiyonundaki bozukluklar PWS hastalarındaki zayıf sosyal beceriler ve duygularını kontrol etmedeki yetersizlikler ile ilişkili olabilir ve bu onların tahmin edilemeyen rahatsız edici davranışlarını ve sıklıkla olan ani öfkelenmelerini açıklayabilir. PWS hastalarıyla yapılan bir çalışmada normal hastalara göre intranasal oksitosin alınımı sonucunda önemli ölçüde diğer kişilere karşı güven artışı olmuş, üzgün olma eğilimi azalmış, daha az rahatsız edici davranış ve yemek alınımında azama olduğu gösterilmiştir (29).

4.5.1. Parvosellüler oksitosin nöronları

Prader-Willi sendromuna sahip çocukların doğduklarındaki vücut ağırlıkları genelde normalin altındadır. Sonraki iki sene içerisinde diğer çocuklardan daha fazla kilo almaya başlarlar. Zihinsel gerilik daha ciddi bir boyutta olduğu zaman iştah kontrolü daha kötü bir hal alabilir. Obeziteye yeme isteğinde artış ve tokluk mekanizmasındaki bozukluk neden olabilir. Bu fonksiyonlardan her ikisinde hipotalamus tarafından kontrol edilir. Hayvan deneylerine göre parvosellüler oksitosin nöronları yemek alınımının düzenlenmesi için önemlidir (23).

PVN iştahın ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir ve metabolizmayı nöroendokrin nöronlar yoluyla düzenler, bu nöronlar tiroid bezini düzenlemek için tirotropin salgılayıcı hormonu salgılar (39, 40). Hipofiz bezi adenokortikotropin salgılanmasını düzenleyerek glukokortikotropin üretimini düzenler ve pre-otonomik nöronların büyük bir popülasyonu yoluyla sempatik sinir sistemini düzenler (39, 41). Fakat SON de bulunan oksitosin nöronları gibi PVN deki oksitosin nöronları a-MSH için dikkat çeken hedeflerdir ve özellikle yeme alımı ve çeşitli besinle ilişkili sinyaller tarafından güçlü bir şekilde etkilenir (39, 42). Sıçanlar ile

yapılan bir çalışmada açlık durumunda PVN deki oksitosin mRNA sının ekspresyonu önemli derecede azalmıştır, bu azalma leptin verilmesi durumunda tersine çevrilmiştir ve bu etkiler anlaşıldığı üzere magnosellüler ve parvosellüler nöronların her ikisininide içerir (Şekil 4.7) (36, 39). PVN deki oksitosin nöronları arkuat çekirdeğin NPY/AgRP/GABA nöronlarından gelen fiberler tarafından bağlantı kurar. PVN çok sayıda GABA ve NPY Y1 reseptörü eksprese eder. PVN deki GABAerjik aksonların optogenetik aktivasyonu arkuat çekirdekten doğru olur ve yemek alımını artırır (39, 43). Benzer şekilde PVN oksitosin nöronlarının direkt optogenetik aktivasyonu bu nöronlardaki c-Fos ekspresyonunu artırır ve yemek alımını baskılar. Aynı çalışmada farmakogenetik bir yaklaşım arkuat POMC nöronlarının akut olarak sessizleştirilmesine rağmen ilginç bir şekilde küçük bir etkisi kalsada Sim-1 eksprese eden PVN nöronlarının önemli derecede yemek alımını artırdığı gösterilmiştir (39, 44).

Bir çok parvosellüler oksitosin nöronları kaudal beyin sapındaki nukleus traktus solitari (NTS) bölgesine projeksiyon gönderir, bu bölgede oksitosin vagal efferent yollarını modüle ederek gastrik hareketi düzenler. Bu nöronlar ciddi derecede yemek alımı ile tetiklenen refleks olayı ile ilişkilidir ve gastrik gerilme ve onikiparmak bağırsağından CCK salgılanmasının bir parçası olarak aracılık eder. CCK in periferal olarak verilmesi gastrik vagal afferent nöronların ve beyin kökü yapılarının (özellikle NTS ve ventrolateral medulla) aktivasyonunu sağlar. CCK uyarıcı NTS nöronları yoğun olarak PVN deki oksitosin içeren fiberler ile bağlantılıyken parvosellüler oksitosin nöronlarını içeren tekrarlanan bir devre vardır, bu gastrointestinal vago-vagal refleksi modüle eder (39, 45).

Gastrointestinal vago-vagal refleks esas olarak üç komponenti içerir: gastrointestinal sistem, NTS ve vagusun dorsal motor çekirdeği (DMV). Sindirim ile ilişkili bilgiyi taşıyan viskeral afferent fiberleri vagus sinirden başlar ve medial NTS te sonlanır. NTS nöronları bilgiyi entegre eder ve DMV ye afferent projeksiyonlar gönderir ve DMV nöronları gastrointestinal sistemdeki intrinsik gangliaya geri projeksiyon yapar. Bu esas döngüye ek olarak, NTS in katekolaminerjik ve peptiderjik nöronlar PVN i içeren ön beyindeki yapılara projeksiyon gönderir ve parvosellüler PVN nöronları

hem NTS hem DMN e geri projeksiyon gönderir. DMN de oksitosin gastrik hareketi inhibe etmek için rol oynar: DMN oksitosin reseptörlerini içerir ve oksitosin antagonistleri zıt bir etkiye sahipken DMN içine oksitosin enjeksiyonu gastrik hareketi azaltır. PVN nin elektrik ile uyarılması gastrik hareketi inhibe eder ve bu etki DMN e oksitosin antagonist enjeksiyonu yoluyla azaltılabilir (39). Diğer yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar gözlemlenmiştir, hayvan deneylerine göre icv oksitosin enjeksiyonu ve PVN in uyarılması sonucunda gastrik hareket azalmıştır, her iki durumda da bu inhibisyon icv oksitosin antagonisti enjeksiyonu sonucu önlenmiştir. Sonuç olarak, sadece icv oksitosin antagonistin verilmesi gastrik hareketi artırmıştır. Fakat gastrik hareketin CCK uyarılmış inhibisyonu icv oksitosin antagonist enjeksiyonu ile önlenmezken gastrik hareket üzerine olan CCK in inhibe edici etkisine oksitosin aracılık eder (39).

4.5.2. Magnosellüler oksitosin nöronları

Magnosellüler oksitosin nöronları iştahı düzenlemekte önemli bir role sahiptir, fakat bu görevi gerçekleştirebilmesi için sadece oksitosinin olması gerekli değildir. SON ve PVN in magnosellüler nöronlarında oksitosin CART, hipofiz bezi adenilat siklaz polipeptid (PACAP), kortikotropin salgılayıcı faktör (CRF), CCK ve nesfatin-1 gibi nöropeptidleri içeren birkaç anoreksijenik faktör ile kolokalize olur (46). Nesfatin-1 PVN de oksitosin salgılanmasını uyarmasının ve oksitosin antagonisti tarafından nesfatin-1 in anoreksijenik etkisinin bloklanması yanında, oksitosin nesfatin-1 in yemek alımına olan inhibe edici etkisine aracılık eder. Yağ kütlesi ve obezite ilişkili (FTO) gen insanlarda obezite ile ilişkilidir ve PVN ve SON de oksitosin ile kolokalize olur. Bu gen transkripsiyon ko-faktörü (Fto) kodlar ve iştahla ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlediği düşünülür, ve Fto nun aşırı ekspresyonu hücre kültüründe oksitosin mRNA seviyelerini artırır (39, 47).

Magnosellüler oksitosin nöronları beslenme sırasında aktive olur. Her gün 2 saat yemek alarak eğitilmiş hayvanlarda, PVN ve SON deki magnosellüler oksitosin nöronlarında yemek alımının başlamasının hemen ardından yoğun olarak Fos proteini ekspresyonu vardır. Bu nöronlar gastrik hareket ve CCK ve GLP-1 gibi tokluk

peptidlerinin sistemik uygulanması sonucunda aktive olur. Dahası, vagus sinirinin aktivasyonu sonucu yemeyi baskılayan intestinal lipid amid oleoilethanolamid (OEA) PVN ve SON de oksitosin mRNA ekspresyonunu uyarır, bu anoreksik etki merkezi oksitosin reseptörlerinin bloklanması sonucu önlenir (39, 48).

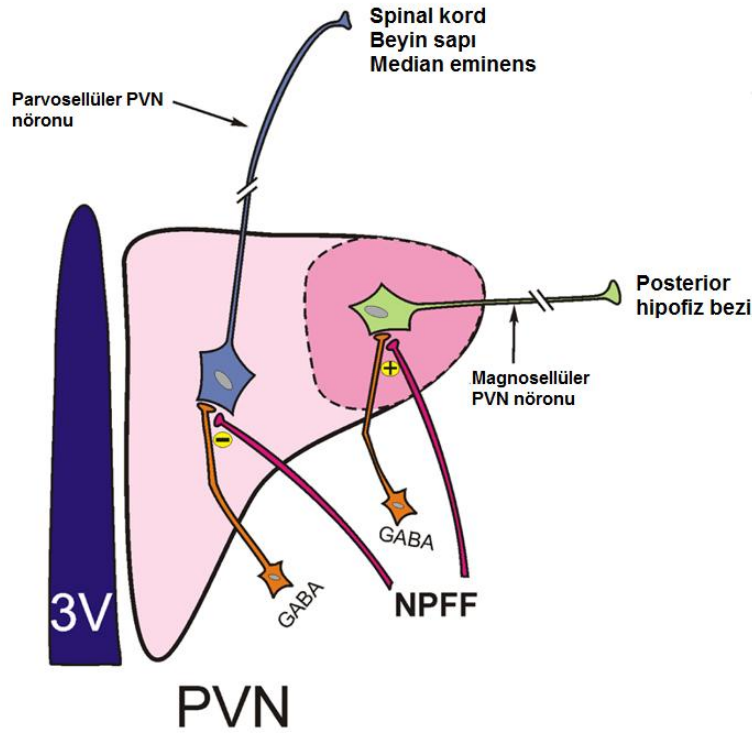
Magnosellüler oksitosin nöronlarının yeme uyarıcı aktivasyonunu içeren en iyi anlaşılmiş yolak CCK in periferik enjeksiyonları sonucu posterior hipofiz bezinden oksitosin salgılanmasıdır. Kısaca yemek alımına cevap olarak CCK onikiparmak bağırsağından salgılanır ve CCK in periferik verilmesi vagal afferent nöronların uyarılması ve beyinsapı yapılarının (NTS ve ventrolateral medulla) aktivasyonu sonucunda yemek alımı inhibe olur. İntraperitoneal veya intravenöz olarak CCK uygulanması PVN ve SON deki oksitosin nöronlarında Fos ekspresyonunu artırır, SON de oksitosin nöronlarının elektriksel aktivitesini artırır ve plazma oksitosin salgılanmasını artırır (49). A2 hücre grubu noradrenerjik nöronlarının direkt projeksiyonu bu etkilere aracılık eder, bu hücre grubu potent iştah inhibe edici peptid prolaktin salgılayıcı peptidi (PrRP) koekspresye eder. Oksitosin nöronlarının aktivasyonu noradrenerjik afferentlerin seçici lezyonu ve noradrenalinin SON deki etkilerinin bloklanması ya da PrRP deki etkilerin bloklanması sonucunda bloke olur. İlginç olarak, merkezi oksitosin reseptör antagonist tedavisi CCK in anoreksijenik etkisini azaltır, oksitosinin CCK uyarıcı tokluğuna aracılık eder (39).

Parvosellüler oksitosin nöronları gibi, magnosellüler oksitosin nöronları çok miktarda leptin reseptörünü ekspresye eder ve bu önemli hormon için hedeflidir. Leptin PVN de Fos ekspresyonunu aktive eder, özellikle NTS teki CCK ye duyarlı nöronlara projeksiyon yapan parvosellüler PVN nöronları. Fakat SON de leptinin merkezi olarak verilmesi Fos ekspresyonunu veya STAT3 ün nükleer translokasyonunu uyarmaz, fakat nükleer STAT5 ekspresyonunu artırır (39).

Leptinin bu direkt modülasyonuna ek olarak, magnosellüler oksitosin nöronları indirekt olarak arkuat çekirdeğin POMC nöronlarına leptinin etkileri yoluyla düzenlenir. PVN gibi SON de POMC nöronlarından güçlü projeksiyonlar kabul eder. SON deki oksitosin nöronları PVN dekiler gibi yoğun olarak a-MSH reseptörlerini

(MC4) eksprese eder. α -MSH güçlü bir anoreksijenik peptiddir, yemek alımını ve vücut ağırlığını azaltır, ve MC4 reseptörleri eksik fareler hiperfajik ve obezdir. *Sim1* heterozigot fare modelinde yapılan çalışmada α -MSH ve oksitosin arasındaki ilişki incelenmiştir. Yabanıl tip farelerde, α -MSH MC4 reseptör (MC4R) agonisti yemek alımını azaltmış ve PVN nöronlarında Fos ekspresyonunu uyarmıştır (50).

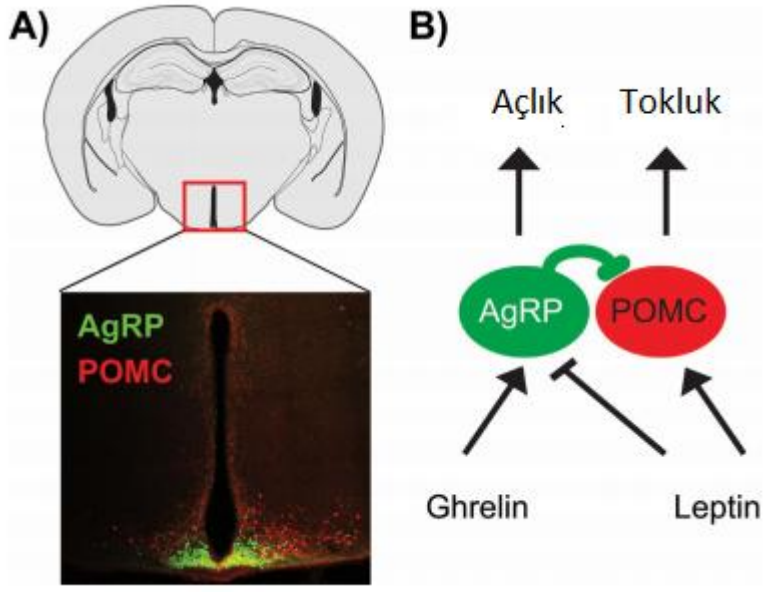
Fakat *Sim1* heterozigot farelerde, MC4R agonistinin yemek alımında ve PVN de Fos ekspresyonu üzerine azaltıcı bir etkisi vardır. Farelerde oksitosin üretiminin eksik olması durumunda α -MSH agonistinin *Sim1* farelerin PVN nindeki etkileri bozulmuştur (50, 51).



Şekil 4. 7. Hipotalamik paraventriküler çekirdekteki (PVN) parvosellüler ve magnosellüler nöronların şematik gösterimi. NPFF parvosellüler ve magnosellüler nöronlara olan GABAerjik inputu modüle eder (52).

4.6. AGRP ve POMC nöronları ve Prader-Willi sendromu ile ilişkisi

Magel2 geninin eksikliğine sahip farelerde vücut ağırlığının arttığı ve yüksek leptin seviyelerine sahip oldukları görülmüştür. Hipotalamusta *Magel2* arkuat çekirdekte yüksek miktarda eksprese edilir. Bu bölge iştahı ve enerji harcanmasını zıt şekilde düzenleyen farklı nöronal popülasyonlara sahiptir. Bunlardan AGRP nöronları besin tüketimini artırır ve enerji harcanmasını azaltır, POMC nöronları ise MC4R nöronlarını aktive ederek besin tüketimini azaltır ve enerji harcanmasını artırır. AGRP nöronları beynin farklı bölgeleri ile projeksiyon yapar ve bunun yanında nöropeptid Y ve GABA'nın antagonistik etkileri ile lokal POMC nöronlarını inhibe eder (Şekil 4.8) (54). AGRP nöronları yeme davranışını akut olarak etki ederken POMC nöronları uzun sürede beslenmeyi etkiler. Bu nedenle AGRP nöronlarına bağlı POMC nöronlarının baskılanması akut beslenme davranışı için gerekli değildir (44). Optogenetik teknikler AGRP nöronlarının aktivitesi ve davranışı arasındaki ilişkiyi araştırmak için kullanılmıştır. Bu yöntem AGRP nöronlarını ve bu nöronların beslenme davranışını etkileyen sinyal yollarını araştırmaya olanak sağlar. Bu nöronların uyarılması yemeye olan cevabı aktive etmek için yeterlidir (55). Dahası, PVH, BNST ve LH gibi beyin bölgelerine AGRP nin aksonal projeksiyonları vardır. Özellikle PVH bölgesine olan projeksiyon yeme davranışının düzenlenmesinde önemli role sahiptir. AGRP nöronlarının PVH de bulunan nöronları inhibe ederek beslenmeyi artırdığı gösterilmiştir (44). Hem oreksijenik AGRP hem de anoreksijenik POMC nöronlarının *Magel2* transkriptine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *Magel2* eksik farelerde leptine olan cevabın bozulduğu gösterilmiştir. Dahası, *Magel2* knock-out farelerin MC4R aktivasyonuna daha hassas olduğu görülmüştür ve azalan POMC nöron akson dallanma fenotipi ortaya çıkmıştır. Önceki çalışmalara göre POMC nöronlarındaki leptin duyarlılığının değişmesi enerji dengesinin bozulmasına yol açabilir. Fakat *Magel2* eksikliğinin POMC nöronlarının davranışa olan etkisi bilinmemektedir (15).



Şekil 4. 8. AgRP ve POMC nöronları beslenme ile ilişkili sinyallere cevap olarak beslenmeyi düzenler. A. AgRP ve POMC nöronları hipotalamusun arkuat çekirdeğinde bulunur. Anoreksijenik hormon leptin ve oreksijenik hormon ghrelin AgRP ve POMC nöronlarını zıt bir şekilde düzenlerler (56).

5. MATERYAL VE METOD

5.1. Materyal

Primerler (Sentegen)

Agaroz (Sigma)

Paraformaldehit (Sigma)

SafeView (Alfagen)

Fluoromount Mountin Medium (Sigma)

Clozapine N-Oxide (Enzo Life Sciences)

Ensure (Abbott)

MicroPunch (Harvard Apparatus)

Micromanipulator (Narishige)

Anestezi cihazı (Beyza Medikal)

Mikropipet (Fisher Scientific)

PCR tüpü (Isolab)

Ear Tag (Harvard Apparatus)

Microcentrifuge tüp (Sigma)

Santrifüj (Orto Alsera)

Manyetik karıştırıcı (Benchmark Scientific)

ChemiDoc (BioRAD)

Tartı (Ohaus Explorer)

Vibratom (Leica)

Ozmometre (Advance Instruments)

Mikropipet çekici (Sutter instruments)

5.2. Deney hayvanları

Jackson Laboratuvarı'ndan satın alınan C57BL/6-*Magel2*^{tm1Stw}/J veya kısa adıyla *Magel2* Knock out erkek transgenik fareler, dişi B6;129S-*Oxt*^{tm1.1(cre)Dolsn}/J veya kısa adıyla *Oxt-Cre* fareler ile çaprazlanarak çift transgenik fareler üretildi. aynı

zamnada, *Magel2* Knock out erkek transgenik fareler, dişi *Agrp^{tm1(cre)Low/J}* veya kısa adıyla *Agrp-Cre* ve *Pomc^{ILow/J}* veya kısa adıyla *Pomc-Cre* fareler ile çaprazlanarak çift transgenik fareler üretildi. Fareler 28 gnlge ulaştıklarında, anestezi altında yavruların kulaklarından doku örnekleri alınarak genotipleri belirlendi. Genotipleme sonucuna göre dişi ve erkek transgenik fareler ayrıldı. Deneyler sırasında hem dişi hem erkek fareler kullanıldı. Transgenik farelerin bakimi ve etimi İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi tarafından (MEDİTAM) gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İM-HADYEK) tarafından onaylanmıştır.

5.3. Genotipleme

5.3.1. DNA izolasyon protokolü

75 ul 25mM NaOH/0,2 mM EDTA içeren Alkalin solüsyon içerisine fareden alınan doku eklenir. PZR cihazına konarak 1 saat 98 C de, daha sonra 15C ye dşrlr. Kaynamış olan doku pipetaj yapılarak doku bütünlüğü kaybetmesi sağlandıktan sonra 75 ul 40 uM Tris HCl (pH:5,5) solüsyonu eklenerek 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatan ayrılır, pelet atılır.

5.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

1 rnek için: 2,4 ul Magnezyum içermeyen 10X Tampon zelti, 0,5ul dNTP, 0,8ul Primer a,0,8 ul Primer b, 0,125ul tag polimeraz, 2ul MgCl₂,14,375ul ultra distile su ve 4ul izole edilen dna eklenerek pcr programı çalıştırılır. Tüplere ekleme sırası olarak en yüksek hacim ilk konur prensibi izlenir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. Polimeraz zincir reaksiyonu programı

1-94C -2dakika

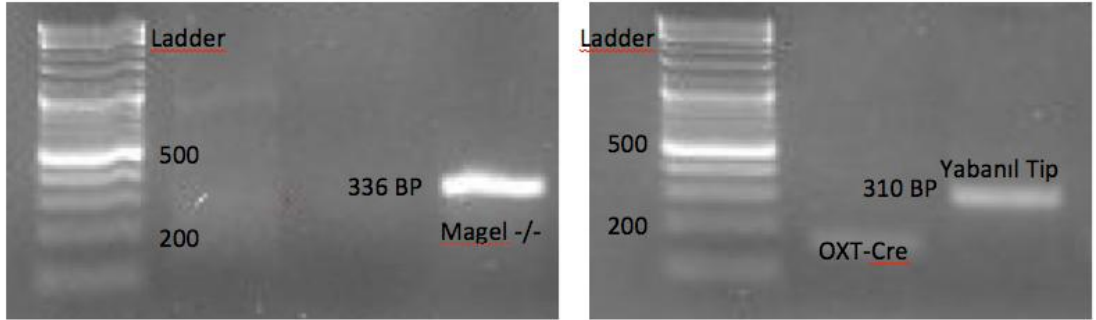
2-94C-20saniye

3-65C-15saniye (her döngüde 0,5C düşer)

- 4-68°C-10saniye
- 5-Tekrar programı (2-4 arası program 10x tekrar)
- 6-94°C-15saniye
- 7-60°C-15saniye
- 8-72°C-10saniye
- 9-Tekrar programı (6-8 arası program 28x tekrar)
- 10-72°C-2dakika
- 11-4°C-bekleme.

5.3.3. Agaroz jel elektrofrezisi

Program çalıştırdıktan sonra tüplerden 10ul alınarak 2ul 6x boya eklenerek %3lük agaraya yüklenir, 80V.ta 1xTAE tampon çözelti içerisinde 1 saat yürütülür ve görüntülenir (Resim 5.1).



Resim 5.1. %3 agaroz jelde pcr ürünleri görüntüsü. Magel2 +/- hattı transgenik bant uzunluğu 336 baz çiftidir. Oxt-cre hattı bant uzunluğu 200 baz çiftidir.310 baz çifti uzunluğunda görünen ise dna örneğinde çoğaltılan gen bölgesinde bulunan yabanıl tip alleli göstermektedir. Bu DNA örneği için heterozigottur yorumu yapılır.

5.4. İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiy virüs enjeksiyonu

30 günlük dişi veya erkek fareler stabil anestezi altında stereotaksik çerçeveye sabitlendi. Kafanın düz ve sabit olduğundan emin olunmasıyla, kafa derisi Betadin ile temizlendi ve bisturi ile kesildi. Kafatasına uygulanan hidrojen peroksit ile kemikler

belirgin hale getirildi. Kafatası hidrojen peroksitten arındırıldı ve SteREO Discovery V8 mikroskop altında kraniyal koordinatlar belirlendi. Florasan boncuk kullanılarak daha önceden bu koordinatlar belirlenmiştir. Narishige mikromanipulator yardımıyla Bregma noktasında tüm koordinat değerleri sıfırlandı ve Paraventriküler çekirdek (PVN) bölgesi için koordinat düzleminde Anterior/Posterior (A/P): -0,8 mm ve Medial/Lateral (M/L): 0,25 mm olacak şekilde ilerlendi. Arkuat çekirdek (10) bölgesi için koordinat düzleminde Anterior/Posterior (A/P): -1,5 mm ve Medial/Lateral (M/L): 0,25 mm olacak şekilde ilerlendi Kafatası bu noktada freze yardımıyla delindi. Sutter P-1000 Mikropipet çekici ile cam mikropipetler ısı yardımıyla inceltirilerek hazırlandı. İçine mineral yağ doldurulan cam mikropipet Narishige enjektöre takıldı. Rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü mikropipete dolduruldu (Tablo 5.2). Belirtilen A/P ve M/L koordinatlarında beyin yüzeyi Dorsal/Ventral (D/V) olarak sıfır alındı ve PVN için D/V: -4,9 mm olacak şekilde beyin içinde ilerlendi, ARC için ise D/V: -5,6 mm olacak şekilde beyin içinde ilerlendi (Şekil 5.1). Narishige enjektör ile 300 nl enjeksiyon yapıldı. 10 dakika beklemenin ardından cam mikropipet beyinden çıkarıldı, kafa derisi dikildi ve fareler operasyon sonrası bakıma alındı. Virüsün iyice enfekte olabilmesi için fareler 1-2 hafta operasyon sonrası bakımda bekletildi. Daha sonra fareler elektrofizyolojik kayıt alınmak üzere ayrıldı.



Şekil 5.1. Koronal beyin kesitinde florasan boncuk ile paraventriküler çekirdeğin (PVN) hedeflenmesi.

Tablo 5.2. Alınan ve üretilen virüs çeşitleri

Elektrofizyolojik kayıt almak için kullanılacak Chr2 virüsleri

- pAAV-CAG-Rev-ChR2-tdTomato
- pAAV-CAG-Rev-CHR2-tdTomato
- pAAV-CAG-CHR2-tdTomato

Anatomik inceleme için nöron işareleyici floresan taşıyan virüsler

- pAAV-rev-GFP
- pAAV-CAG- rev-tdTomato

Sinaptik salgıyı belirli bölgelerde inhibe etmekte kullanılacak proton pompası Arch virüsleri

- pAAV-CAG-ArchT-GFP
- pAAV-FLEX-ArchT-tdTomato
- pAAV-FLEX-ArchT-GFP

5.5. Elektrofizyoloji

5.5.1. Solusyonlar

Yapay beyin omurilik sıvısı: 119 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 11 mM D-glukoz, 2.5 mM KCl, 1.25 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ and 1.25 mM NaH₂PO₄

Kesim solüsyonu: 234 mM sükröz, 28 mM NaHCO₃, 7 mM D-glukoz, 2.5 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM sodyum askorbat, 3 mM sodyum piruvat and 1.25 mM NaH₂PO₄

Hücre içi solüsyon: 125 mM CsCl, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0.6 mM EGTA, 4 mM Mg-ATP, 0.3 mM Na₂GTP, 10 mM lidokain *N*-etil bromid (pH 7.35 and 290 mOsm)

5.5.2. Hücre içi solüsyon

- CsCl (Sigma-Aldrich)
- EGTA (Sigma-Aldrich)
- NaCl (Sigma-Aldrich)
- HEPES (Sigma-Aldrich)
- Mg-ATP (Sigma-Aldrich)
- Na₂GTP (Sigma-Aldrich)
- Lidokain *N*-etil bromid (Sigma-Aldrich)

5.5.3. Hücre dışı solusyonlar

- NaCl (Sigma-Aldrich)
- D-glukoz (Sigma-Aldrich)
- KCl (Sigma-Aldrich)
- MgCl₂ (Sigma-Aldrich)
- CaCl₂ (Sigma-Aldrich)
- HEPES (Sigma-Aldrich)
- NaHCO₃ (Sigma-Aldrich)
- NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich)
- Sükroz (Sigma-Aldrich)
- Sodyum askorbat (Sigma-Aldrich)
- Sodyum piruvat (Sigma-Aldrich)

5.5.4. Elektrofizyoloji ekipmanları

- Vibrasyon engelleyici masa (Scientifica)
- Faraday kafesi
- Mikroskop (Olympus)
- Objektif (Olympus)
- Mikromanipulator (Scientifica)
- Basınç kontrol sistemi

- Amplifier (Axon Digidata 1550 ve MultiClamp 700B)
- Elektrofizyoloji platformu (Scientifica)
- Bilgisayar
- Cam mikropipet (Harvard Apparatus)
- Mikropipet çekici (Sutter Instruments)
- Data analiz sistemi (Molecular Devices)
- Kamera (Zeiss)
- Kamera ekranı
- Perfüzyon pompası
- Karbojen (%95 O₂ and %5 CO₂)
- Osmometre (Advanced Instruments)

5.5.5. Yöntem

Elektrofizyolojik kayıt öncesi beyin kesitleri hazırlandı. Bunun için 234 g/mM sükröz, 28 g/mM NaHCO₃, 7 g/mM dekstroz, 7 g/mM MgCl₂, 0,5 g/mM CaCl₂, 1 g/mM sodyum askorbat, 3 g/mM sodyum pürivat ve 1,25 mM NaH₂PO₄ içeren, kesme solüsyonu önceden hazırlandı ve -80°C’de soğutuldu. Fareler fikse edilmeden sakrifiye edildi. Canlı beyin dokusundan, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile havalandırılan kesme solüsyonu içinde vibratom (Leica) ile 300 µm kalınlığında kesitler alındı. Ardından bu kesitler 119 g/mM NaCl, 25 g/mM NaHCO₃, 7 g/mM dekstroz, 2,5 g/mM KCl, 7 g/mM MgCl₂, 0,5 g/mM CaCl₂, 1 g/mM sodyum askorbat, 3 g/mM sodyum pürivat ve 1,25 mM NaH₂PO₄ içeren, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile havalandırılan yapay beyin omurilik sıvısı (aCSF) içerisine konuldu. Elektrofizyoloji deneyine başlamadan önce beyin kesitlerinin 30dk kadar yapay beyin beyin omurilik sıvısında iyileşmesi beklendi. Beyin kesitleri daha sonra elektrofizyoloji platformunda bulunan ve aCSF ile perfüze olan bölmeye alındı. İlgilendiğimiz alanı ekranda bulup mikropipete hücre içi sıvısı (125 mM CsCl, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0.6 mM EGTA, 4 mM Mg-ATP, 0.3 mM Na₂GTP, 10 mM lidokain *N*-etil bromid (pH 7.35 and 290 mOsm)) dolduruldu. Pipet takıldıktan sonra pozitif basınç verildi ve pipet beyin kesitine yaklaştırıldı. Pipet solusyona değdiği zaman bilgisayar programında

(Clampex) direnci görülür. Eğer ideale objektif 4x ten 40x e alınır, 40x objektif solusyona değdiği zaman hücreler görülür. Canlı bir hücre seçildikten sonra pipet hücreye yavaşça yaklaştırılır. Pipet hücreye değdiği zaman çukur bir görüntü oluşacak, o noktada pozitif basınç açılır sonra negatif basınç verilerek hücrenin pipete yapışması sağlanır. Daha sonra whole cell kayıt için hücre -60mV ta tutulur ve hücrenin kırıldığından emin olununca elektrofizyolojik kayıt alınır. Elektrofizyolojik kayıtlar amplifier sistemi kullanılarak görüntülenir. Cell-attached kayıt için ise hücre zarı kırılmadan veya hücre herhangi bir voltajda tutulmadan spontane aktivite ölçülür ve pipet içine aCSF doldurulur. Pipet direnci 4-6 MΩ olarak belirlendi. Cam pipetler Sutter P-1000 Mikropipet çekici ısı yardımıyla inceltilerek hazırlandı.

5.6. Doku fiksasyonu ve kesit alma

Davranış deneyleri sonrasında farelere sırasıyla fosfat tamponlu tuz çözeltisi ve %4 paraformaldehit fiksatif (PFA) ile kardiyak perfüzyon yapıldı. Sakrifiye edilen farelerin beyinleri çıkarıldı. Beyinler önce 4°C’de 4 saat %4’lük PFA içinde, sonra 4°C’de 24 saat %30’luk sükröz çözeltisi içinde bekletildi. 10 mL H₂O içine 0,4 g düşük donma sıcaklığına sahip agaroz katıldı ve çözelti berraklaşana kadar kaynatıldı. Beyinler fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkandıktan sonra bu çözelti içine gömüldü ve jel kıvamına gelene kadar beklendi. VT1000S vibratom ile 75 µm kalınlığında kesitler alındı.

5.7. Mikroskopik görüntüleme ve analiz

Beyin kesitlerinin görüntüleme işlemi Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskop ile yapıldı.

5.8. Kimyasal aktivasyon

30 günlük erkek Magel KO ve Oxt-cre, Agrp-cre ve Pomc-cre transgenik farelere intrakraniyal olarak enjekte edilen rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry virüsü ile 14 gün süreyle nöronlar enfekte edildi. Operasyon sonrası bakım süresi sonunda fareler davranış deneyleri için tekli kafeslere alındı. Farelerin bu kafeslere alışması için 2 gün süre tanındı. Ardından, günlük besin tüketimi gözlenmeye başlandı. Besin

tüketimi stabil hale geldiğinde *ad libitum* olarak davranış deneyleri başlatıldı. İntraperitoneal (i.p.) CNO enjeksiyonları gerçekleştirildi. İntraperitoneal enjeksiyonlar sonrasında 30 dakika arayla 2 saat boyunca besin tüketimi gözlemlendi ve vücut ağırlığı değişimi ölçüldü.

5.9. Kimyasal inhibisyon

30 günlük erkek Magel KO ve Oxt-cre transgenik farelere intrakraniyal olarak enjekte edilen rAAV-hSyn-FLEX-hM4D(Gi)-mCherry virüsü ile 14 gün süreyle PVN bölgesindeki oksitosin nöronları enfekte edildi. Operasyon sonrası bakım süresi sonunda fareler davranış deneyleri için tekli kafeslere alınmıştır. Farelerin bu kafeslere alışması için 2 gün süre tanınmıştır. Ardından, günlük besin tüketimi gözlenmeye başlanmıştır. Besin tüketimi stabil hale geldiğinde *ad libitum* olarak davranış deneyleri başlatılmıştır. İntraperitoneal Clozapine-N-Oxide (CNO) enjeksiyonlar sonrasında 30 dakika arayla 2 saat boyunca besin tüketimi gözlenmiştir.

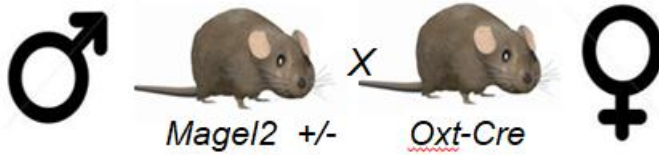
5.10. İstatistik

Elektrofizyoloji ve davranış deneylerini analiz etmek için Student's t-test kullanıldı. $p < 0.05$; *, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$; *** olarak kabul edildi. $p > 0.05$, istatistiksel olarak anlamsız kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. PVN oksitosin nöronlarına gelen sinaptik inputların *Magel2* eksik farede değerlendirilmesi

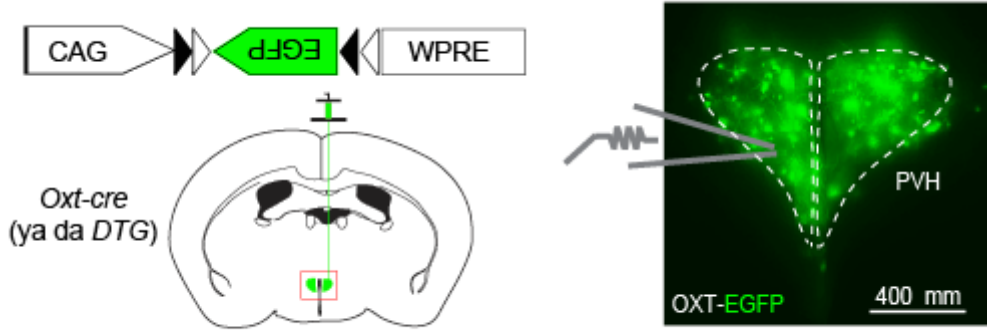
Bu proje kapsamında bir Prader Willi Sendromu (PWS) modeli olan *Magel2*-eksik fare modeli ve toklukla ilişkisi olduğu bilinen oksitosin salan nöronlarında cre rekombinaz enzimi içermesi sağlanmış *Oxt-cre* fare modeli ile çalışılmıştır. *Magel2*-eksik fare hattı ile Prader Willi Sendromuyla ilgili nöronların bağlantı anatomisini ve bu bağlantıların sinaptik özelliklerini analiz etmeyi amaçladık. PWS ile bağlantılı olduğu görülen oksitosinin nöronal aktivitesindeki yetersizliğin sebepleri araştırılırken *Oxt-cre* hattı kullanıldı. Sonrasında *Magel2* KO ve *Oxt-cre* hatlarının çaprazlanması ile çift transgenik; *Magel2* geninin parental kopyası bozulmuş ve oksitosin nöronları cre rekombinaz eksprese etmesi sağlanmış PWS modelinde oksitosin nöronlarının anatomisi incelenerek ve araştırmalar sonucunda normal, PWS li fare modelinde ve oksitosin nöronları manipule edilebilen PWS fare modelinde oksitosin nöronlarına gelen inputlarda bir değişiklik olup olmadığı saptanarak, oksitosin nöronal aktivitesindeki yetersizliğin yetersiz uyarılmadan mı, otonom bir bozukluktan mı kaynaklanıyor olduğu sorusu açıklığa kavuşturulması amaçlanmıştır (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. *Magel2:Oxt-cre* ikili transgenik fare hattının üretimi.

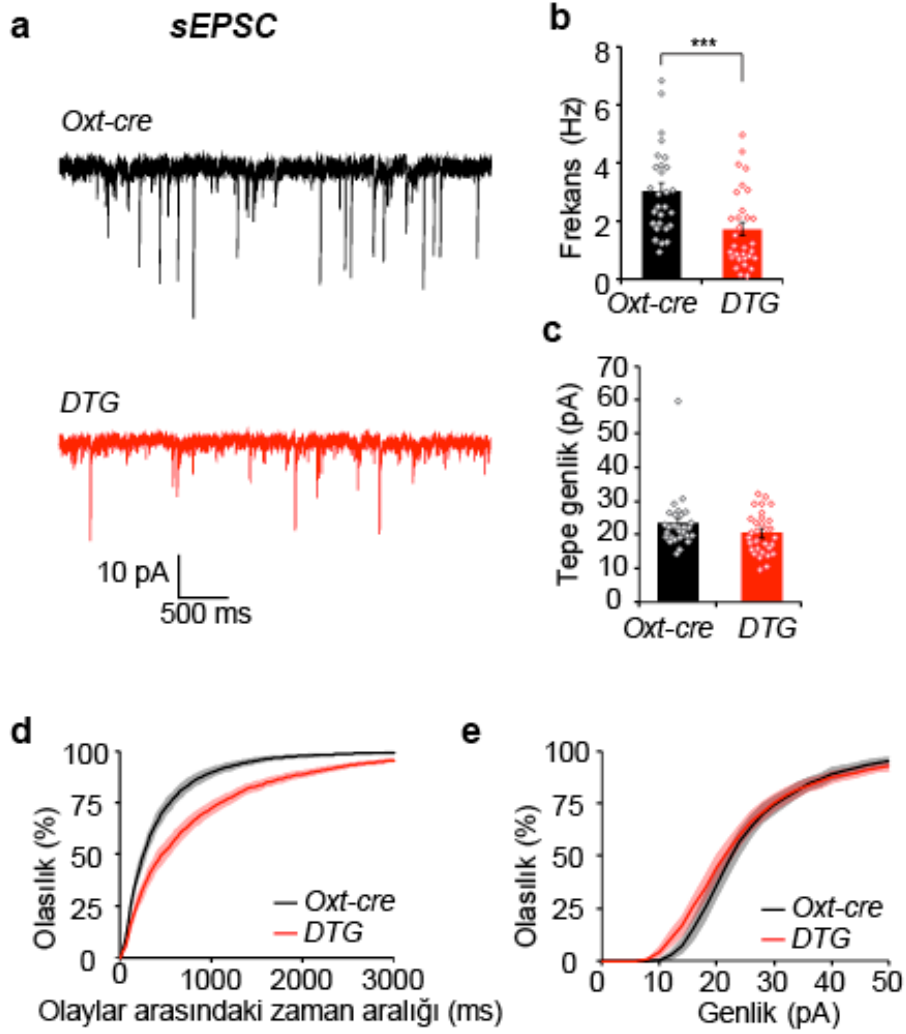
Magel2 eksikliğinde oksitosin nöronlarının fonksiyonunda bir bozukluk olup olmadığını anlamak için bu nöronlara gelen sinaptik inputları inceledik. Elektrofizyolojik ölçümlerin öncesinde *Oxt-cre* ve *DTG* (*Magel2* geninin paternal kopyası bozulmuş ve oksitosin nöronları Cre rekombinazı eksprese eden fareler)

yavrulara 30 günlük olduklarında stereotaktik çerçeve ve mikropipet yardımıyla PVN bölgesine PVN bölgesine AAV-Flex-GFP virüsü enjekte ederek oksitosin nöronları florasan olarak işaretlendi (Şekil 6.2).

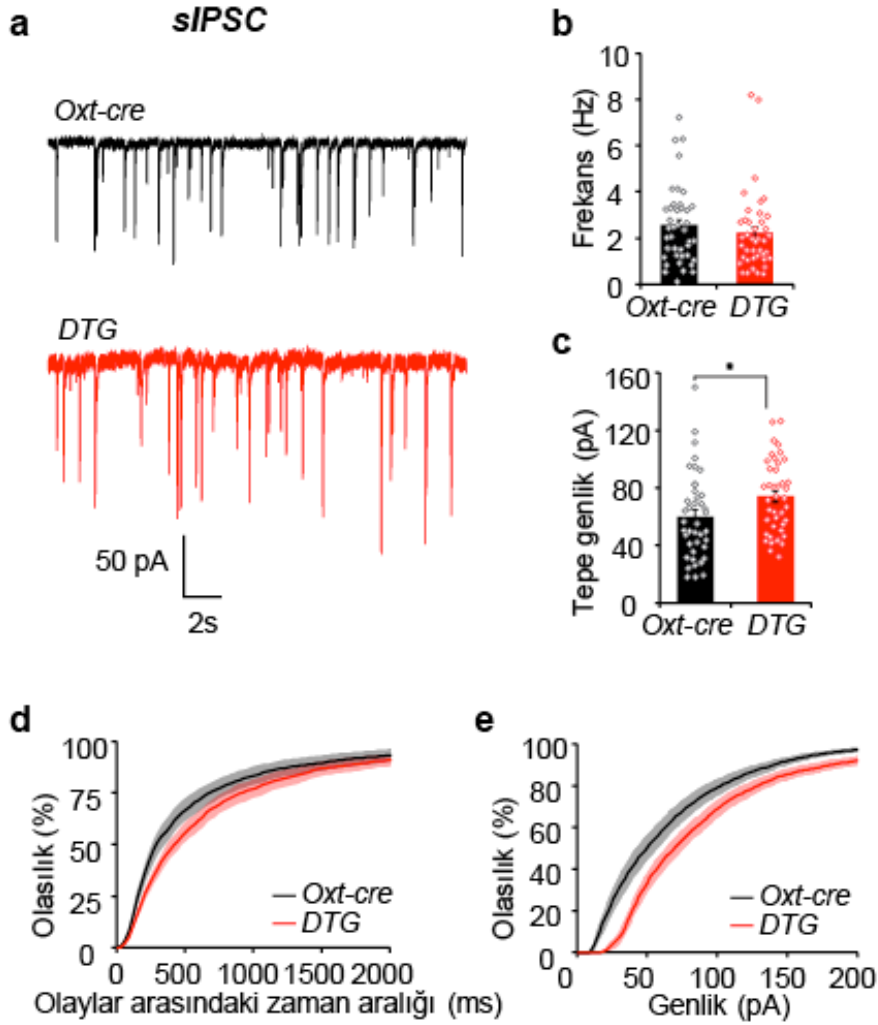


Şekil 6.2. *Oxt-Cre* ya da *DTG* farede AAV-Flex-GFP virüsü ile PVN deki oksitosin nöronlarının işaretlenmesi.

İki hafta boyunca viral vektörün taşıdığı transgenin ifade olmasını bekledikten sonra akut olarak beyin kesiti alınmış ve yeşil florasan ile işaretlenen PVN deki oksitosin nöronlarından kayıt alınmıştır. *Magel2* eksikliğinde PVN-oksitosin nöronlarındaki olası presinaptik input anomalilerinin spontane (EPSC veya IPSC) akımların ölçülmesiyle test edilmesi hedeflenmiştir. Bunun için yeşil florasan ile işaretli oksitosin nöronlarından tam hücre yama kısıncı (whole-cell patch clamp) kayıtları toplanmaya başlanmıştır. Elektrofizyoloji sonuçlarına göre *Magel2* eksikliğinde oksitosin nöronlarına gelen EPSC sinaptik inputlarında (uyaran input) önemli bir oranda azalma gözlemlenmiştir ama tepe genlik (peak amplitude) değerinde bir fark yoktur (Şekil 6.3). Aynı zamanda IPSC sinaptik input (baskılayan input) kayıtları alınmıştır. Bunun sonucunda *Magel2* eksikliğinde hem oksitosin nöronlarına gelen IPSC sinaptik inputlarında değişiklik yoktur ama tepe genlik değerinde bir artış vardır (Şekil 6.4).

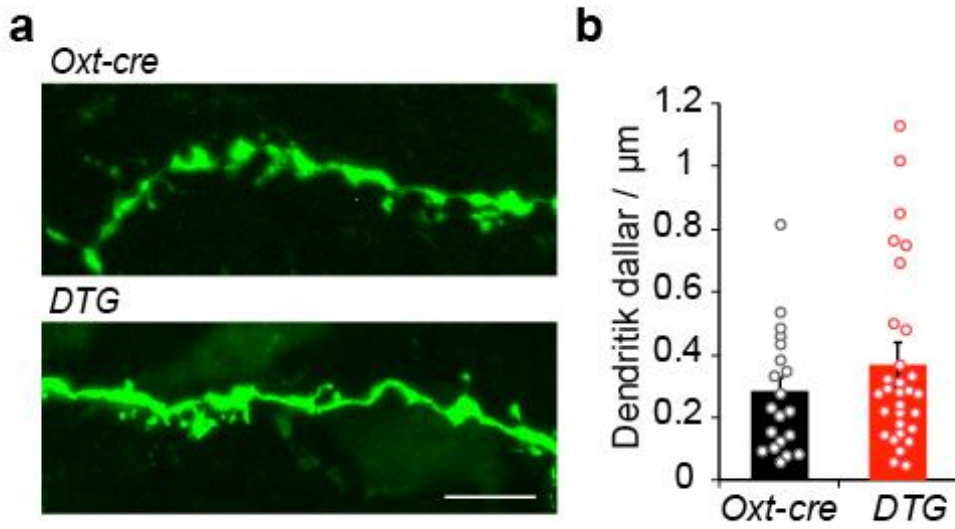


Şekil 6.3. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen *Oxt-Cre* ve *DTG* farelerde PVN'deki oksitosin nöronlarından EPSC (uyaran input) akımlarının ölçülmesi. a) *Oxt-Cre* ve *DTG* farede yeşil florasan ile işaretli oksitosin nöronundan alınan tam hücre yama kısılacı (whole-cell patch clamp) kayıt. b) EPSC elektrofizyolojik kayıtların frekans grafiği (*Oxt-cre*: 3.02 ± 0.28 Hz, n=28 nöron / 4 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{m/p}*: 1.70 ± 0.23 Hz, n=31 nöron / 4 fare; p=0.0006). c) EPSC elektrofizyolojik kayıtların tepe genlik (peak amplitude) grafiği (*Oxt-cre*: 23.43 ± 1.53 pA, n=28 nöron / 4 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{m/p}*: 20.43 ± 1.09 pA, n=31 nöron / 4 fare; p=0.11). d) Uyarıcı sinaptik olayların arasındaki zaman aralığına bağlı kümülatif olasılık grafiği. e) EPSC elektrofizyolojik kayıtların tepe genlik (peak amplitude) değerleri ile ilişkili kümülatif olasılık grafiği. (p < 0.001).



Şekil 6.4. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen *Oxt-Cre* ve *DTG* farelerde PVN'deki oksitosin nöronlarından IPSC (baskılayan input) akımlarının ölçülmesi. a) *Oxt-Cre* ve *DTG* farede yeşil florasan ile işaretli oksitosin nöronundan alınan tam hücre yama kısılacı (whole-cell patch clamp) kayıt. b) IPSC elektrofizyolojik kayıtların frekans grafiği (*Oxt-cre*: 2.53 ± 0.26 Hz, n=41 nöron / 6 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{+m/p}*: 2.21 ± 0.26 Hz, n=41 nöron / 6 fare; p=0.39). c) IPSC elektrofizyolojik kayıtların tepe genlik (peak amplitude) grafiği (*Oxt-cre*: 60.02 ± 4.64 pA, n=41 nöron / 6 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{+m/p}*: 73.90 ± 3.94 pA, n=41 nöron / 6 fare; p=0.02). d) İnhibe edici sinaptik olayların arasındaki zaman aralığına bağlı kümülatif olasılık grafiği. e) IPSC elektrofizyolojik kayıtların tepe genlik (peak amplitude) değerleri ile ilişkili kümülatif olasılık grafiği. (*p < 0.05).

Dendritik dallar, merkezi sinir sistemindeki uyarıcı (excitatory) sinaptik iletimin esas bölgeleridir. Dendritik dalların yoğunluğu nöral devre fonksiyonunu etkiler. Bu nedenle, uyarıcı akımlardaki azalma dendritik uzantıların yoğunluğunda bir azalma olması ile ilişkili olabilir. Fakat, dendritik uzantıların yoğunlukları karşılaştırıldığında *Magel2* eksik farelerin dendritik uzantılarında bir azalma olmadığı görülmüştür (Şekil 6.5).

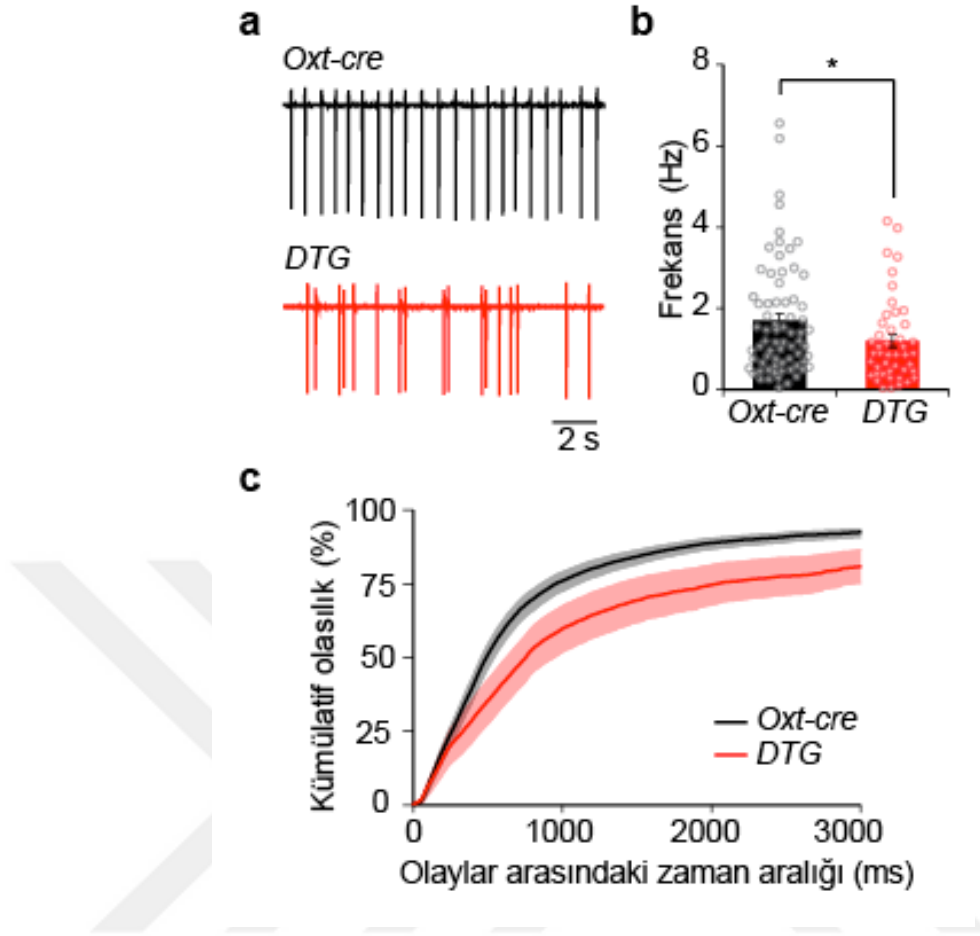


Şekil 6. 5. Oksitosin nöronları üzerindeki dendritik dalların yoğunluğunun *Oxt-Cre* ve *Magel2* eksik farelerde karşılaştırılması. a) *Oxt-Cre* ve *DTG* faredeki dendritik segmentler. b) Dendritik dalların yoğunluk grafiği (*Oxt-cre*: 0.27 ± 0.04 , $n=20$ dendrit / 4 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{m/p}*: 0.36 ± 0.05 , $n=30$ dendrit / 3 fare; $p=0.24$).

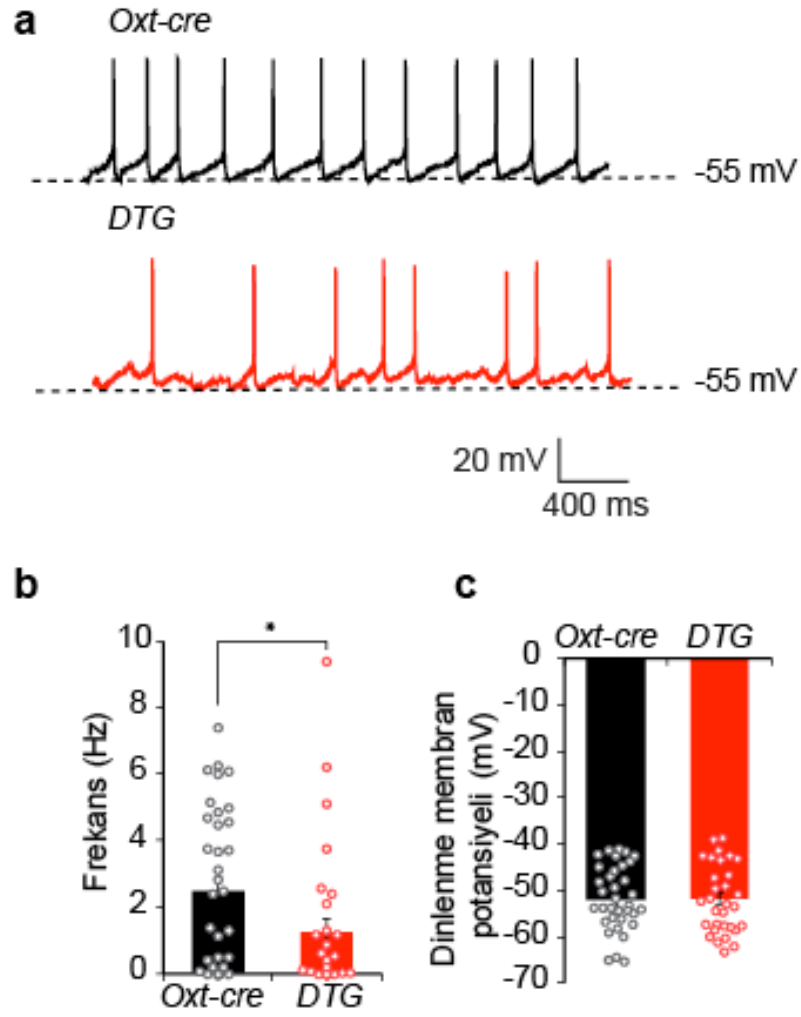
6.2. PVN nöronlarının otonom ateşleme ve dinlenme potansiyeli özelliklerinin normal ve PWS modelinde belirlenmesi

Oksitosin nöronlarına gelen inputlardaki değişiklikleri belirledikten sonra bu nöronların hücre otonom özelliklerini değerlendirdik. Oksitosin nöronlarının temel elektrofizyolojik özelliklerinin PWS modellerinde değişip değişmediğini belirlemeyi hedefledik. Bunun için akut hazırlanan beyin kesitlerinde kontrol ve *Magel2* eksik

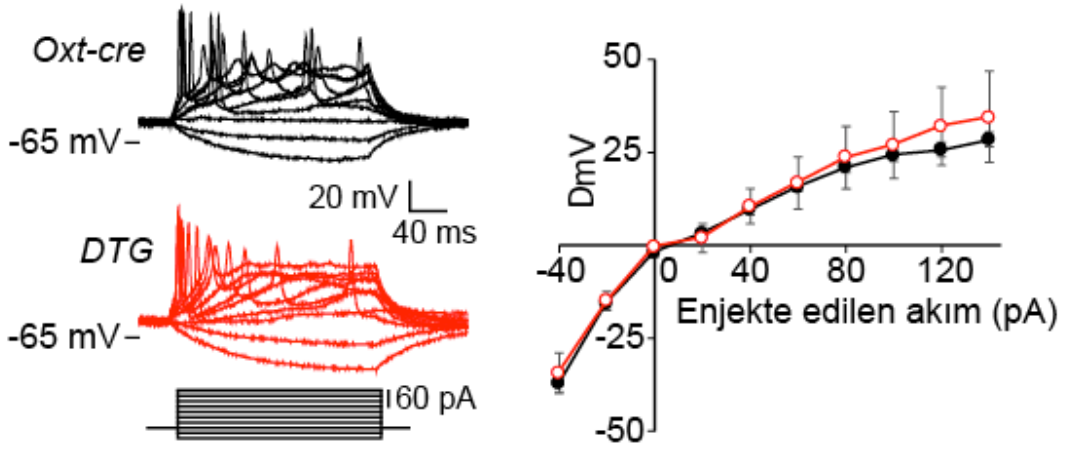
farelerdeki oksitosin membranı dinlenme potansiyelini, frekans değişimini ve spontane ateşleme hızını ölçüp karşılaştırdık. Elektrofizyoloji sonuçlarına göre *Oxt-Cre* farede spontane aktivite frekansı tok durumda daha yüksekken *Magel2* eksik olduğunda spontane aktivite frekansında bir azalma vardır (Şekil 6.6). Bunun yanında *Magel2* eksik farelerde nöronların ateşlemesinde bir azalma gözlemdi ama membran potansiyeli özelliklerinde bir değişiklik gözlemlenmedi (Şekil 6.7). Ayrıca akım-voltaj değerlerinde de anlamlı bir fark yoktur (Şekil 6.8). Merkezi sinir sisteminde excitatory sinapslar glutamat salgılar ve bu nörotransmitter iki bölgede etki eder: AMPA ve NMDA reseptörleri. AMPA reseptörleri, post-sinaptik depolarizasyonu sağlar ve bu nöronun ateşlemesini başlatır. NMDA reseptörleri ise sinaptik plastisiteyi başlatır. NMDA ve AMPA akımlarının ölçüm sonuçlarına göre NMDA/AMPA oranında bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 6.9). Bu sonuçlar sinaptik bağlantıdaki bozulmanın hücrelerin ateşleme özelliklerini doğrudan etkilediğini göstermektedir, fakat nöronların uyarılabilirlik özelliklerinde bir değişiklik yoktur.



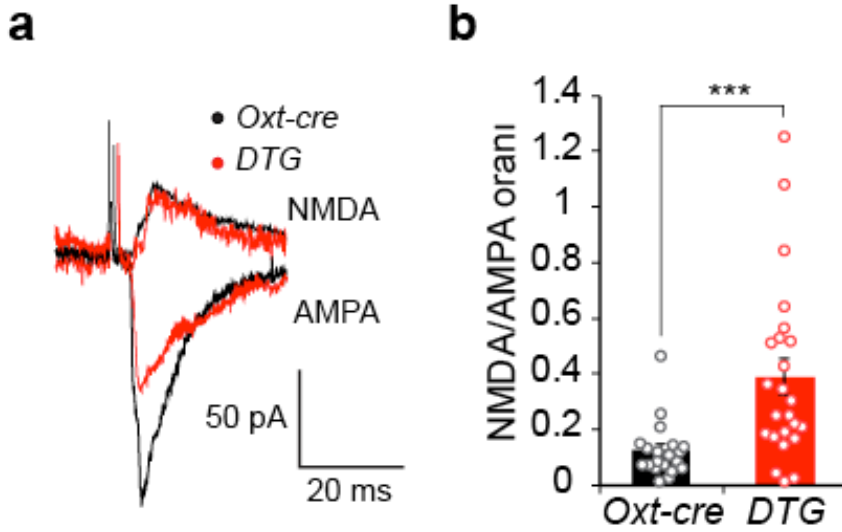
Şekil 6.6. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen *Oxt-Cre* ve *DTG* farelerde PVN'deki oksitosin nöronlarından elektrofizyolojik ölçümlerin alınması. a) *Oxt-Cre* ve *DTG* yeşil florasana ile işaretli oksitosin nöronundan alınan cell-attached kayıt. b) Elektrofizyolojik kayıtların frekans grafiği (*Oxt-cre*: 1.68 ± 0.16 Hz, n=70 nöron / 7 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{m/p}*: 1.19 ± 0.15 Hz, n=45 nöron / 5 fare; p=0.04). c) Spontane olayların arasındaki zaman aralığına bağlı kümülatif olasılık grafiği. (*p < 0.05).



Şekil 6.7. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen *Oxt-Cre* ve *DTG* farelerde hücre otonom özelliklerinin karşılaştırılması. a) *Oxt-Cre* ve *DTG* farede yeşil florasan ile işaretli oksitosin nöronundan alınan tam hücre yama kısıncı (whole-cell patch clamp) kayıt. b) Elektrofizyolojik kayıtların frekans grafiği (*Oxt-cre*: 2.45 ± 0.40 Hz, n=36 nöron / 6 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{m/p}*: 1.23 ± 0.39 Hz, n=31 nöron / 5 fare; p=0.03). c) Membran potansiyeli grafiği (*Oxt-cre*: -52.40 ± 1.26 mV, n=36 nöron / 6 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{m/p}*: -52.13 ± 1.33 mV, n=31 nöron / 5 fare; p=0.88). (*p < 0.05).



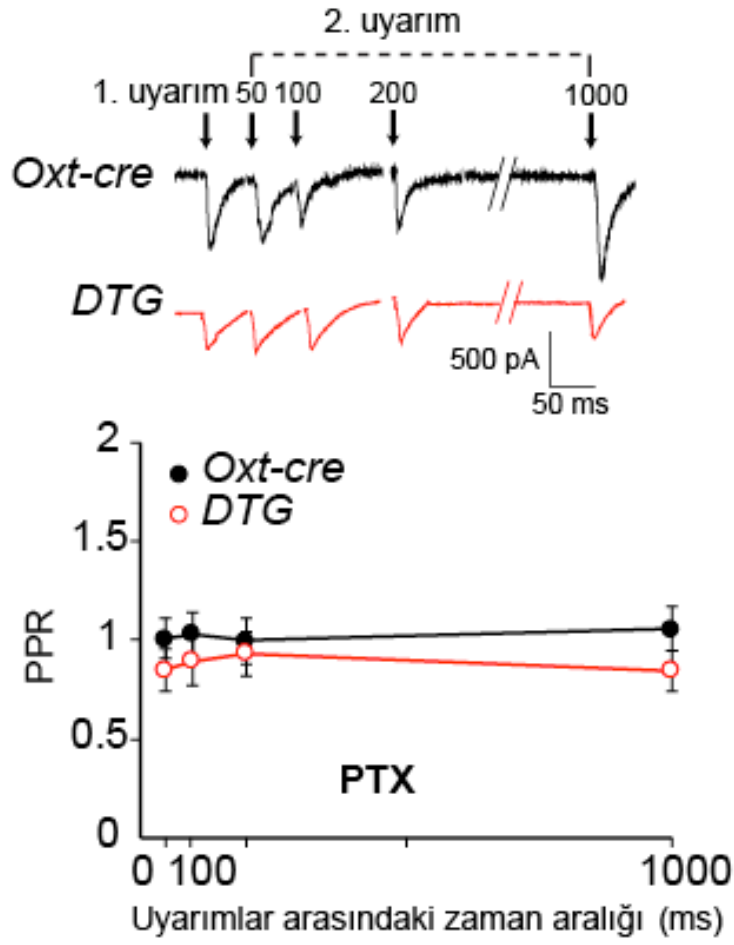
Şekil 6.8. Akım-voltaj eğrisi (*Oxt-cre*: n=20 nöron / 3 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{+/p}*: n=16 nöron / 2 fare).



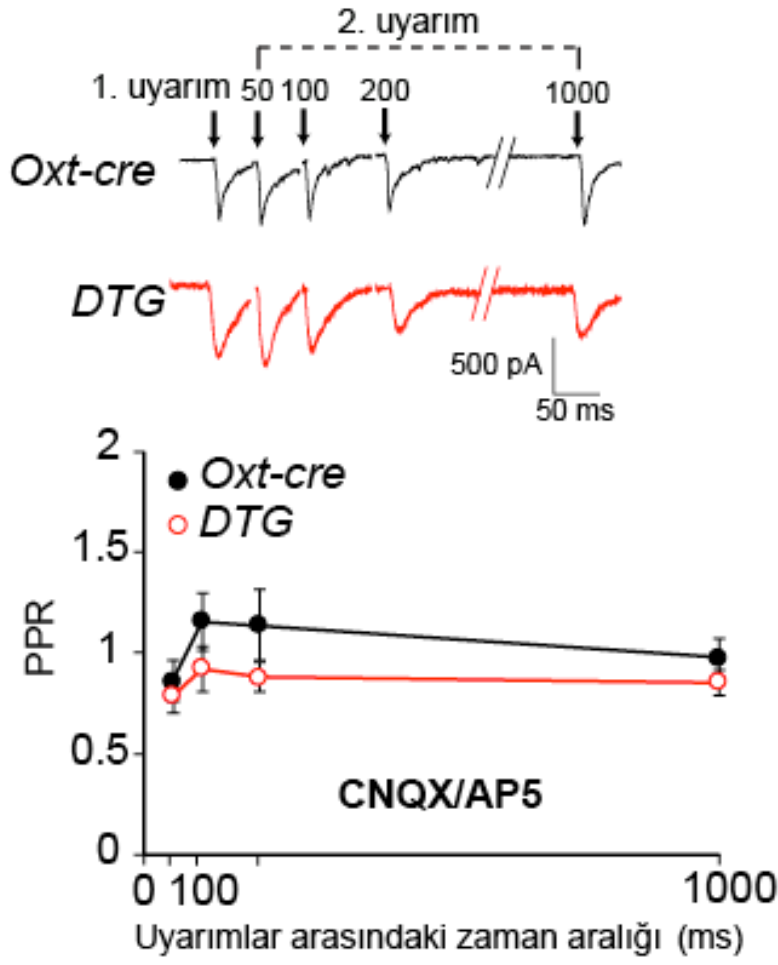
Şekil 6.9. NMDA/AMPA oranı. a) *Oxt-Cre* ve *DTG* farede ölçülen NMDA ve AMPA akımları gösteren kayıtlar. AMPA akımları voltaj -60 ta tutularak ölçülmüştür, NMDA akımları ise voltaj +40 ta tutularak ölçülmüştür. b) NMDA/AMPA oranı grafiği (*Oxt-cre*: 0.12 ± 0.02 , n=20 nöron / 3 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{+/p}*: 0.38 ± 0.06 , n=24 nöron / 3 fare; p=0.0009). (***) $p < 0.001$).

6.3. PVN oksitosin nöronlarına gelen sinaptik inputların release probability özelliklerinin *Oxt-Cre* ve *Magel2* eksik farelerde değerlendirilmesi

Elektrofizyolojik ölçümlerin öncesinde *Oxt-cre* ve *DTG* (*Magel2* geninin paternal kopyası bozulmuş ve oksitosin nöronları Cre rekombinazı eksprese eden fareler) yavrulara 30 günlük olduklarında stereotaktik çerçeve ve mikropipet yardımıyla PVN bölgesine AAV-Flex-GFP virüsü enjekte ederek oksitosin nöronları florasan olarak işaretlendi. İki hafta boyunca viral vektörün taşıdığı transgenin ifade olması bekledikten sonra akut olarak beyin kesiti alınmış ve yeşil florasan ile işaretlenen PVN deki oksitosin nöronlarından kayıt alınmıştır. *Magel2* eksik farelerde meydana gelen input değişikliklerinin nedenini araştırmak için oksitosin nöronlarına gelen sinaptik inputların release probability özelliklerini inceledik. Nörotransmitter salınım olasılığı oranı (PPR) presinaptik hücrenin salınım özelliklerini ifade eder. İki uyarı sonucu oluşan postsinaptik cevaptan ikincinin birinciye oranıdır. Eğer presinaptik hücre yüksek salınım özelliğine sahipse, ilk uyarıda nörotransmitter salımını meydana gelir, ikinci uyarıda daha az nörotransmitter salınır. Böylece daha küçük bir PPR oranı meydana gelir. Eğer presinaptik hücre düşük salınım özelliğine sahipse ilk uyarıda daha düşük bir postsinaptik cevap oluşacak, ikinci uyarıda daha büyük bir nörotransmitter salımını meydana gelir. Böylece daha büyük bir PPR oranı meydana gelir. Kayıtlar sırasında sinaptik transmisyonu engelleyen kimyasallar kullanılmıştır. Böylece excitatory (uyarıcı) ve inhibitory (inhibe edici) akımlar ayrı ayrı incelenmiştir. PTX (inhibe edici akımları ortadan kaldırır) eklenen kayıtlarda excitatory akımların release probability özellikleri incelenmiştir. Bu deneyin sonucuna göre normal ve *Magel2* eksik farelerde PPR oranında anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 6.10). CNQX ve AP5 (uyarıcı akımları ortadan kaldırır) eklenen kayıtlarda ise inhibitory akımların release probability özellikleri incelenmiştir. Bu deneyin sonucuna göre de normal ve *Magel2* eksik farelerde PPR oranında anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 6.11). Sonuç olarak, uyarıcı akımlarda ve inhibe edici akımlarda meydana gelen değişiklik release probability ile ilişkili değildir, input sayısında bir değişiklik meydana gelmiş olabilir.



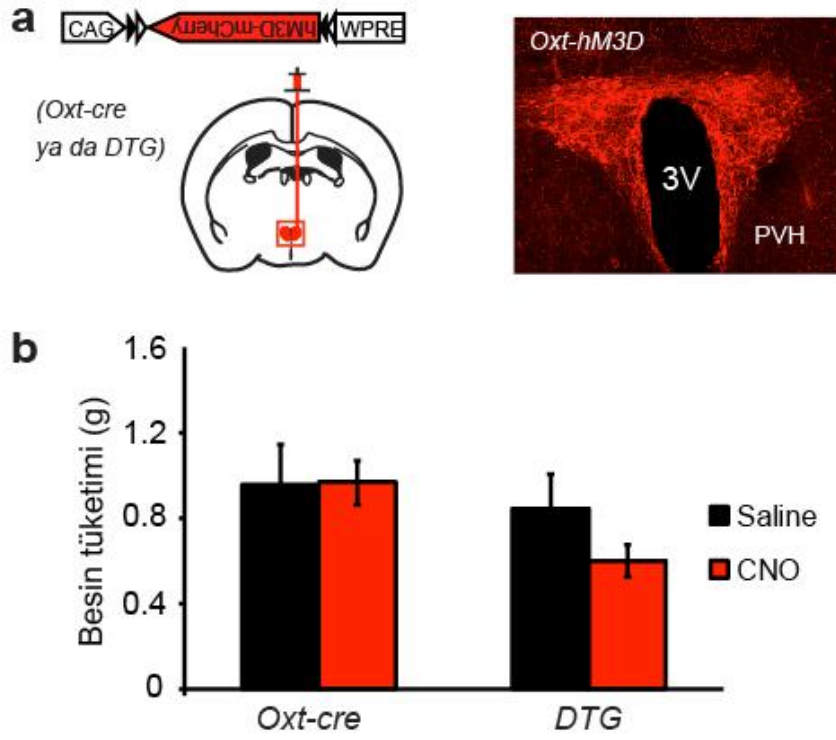
Şekil 6.10. *Oxt-Cre* ve *Magel2* eksik farelerde uyarıcı sinaptik inputların release probability özelliklerinin değerlendirilmesi (*Oxt-cre*: n=25 nöron / 5 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{m/p}*: n=28 nöron / 4 fare).



Şekil 6.11. *Oxt-Cre* ve *Magel2* eksik farelerde inhibe edici sinaptik inputların release probability özelliklerinin değerlendirilmesi (*Oxt-cre*: n=28 nöron / 5 fare ve *Oxt-cre::Magel2^{+/p}*: n=24 nöron / 5 fare).

6.4. PVN oksitosin nöronlarının aktivasyonu ve bu aktivasyonunun *Oxt-Cre* ve *Magel2* eksik farelerde besin tüketimine olan etkisi

Davranış deneylerinin öncesinde *Oxt-cre* ve *DTG* (*Magel2* geninin paternal kopyası bozulmuş ve oksitosin nöronları Cre rekombinazı eksprese eden fareler) yavrulara 30 günlük olduklarında stereotaktik çerçeve ve mikropipet yardımıyla PVN bölgesine AAV-Flex-hM3D virüsü enjekte edildi. Kemogenetik manipülasyonu sağlamak amacıyla verilen hM3D, aktivatör Gq protein bağlı bir reseptördür. hM3D reseptörü aktive edildiğinde hücrelerin ateşlemesini sağlar. Aktif duruma geçmesi için Clozapine-N-Oxide (CNO) adı verilen bir liganda ihtiyaç duyarlar. Farelere intraperitoneal (i.p.) olarak CNO verilmesi durumunda hM3D reseptörleri aktif faza geçer. Bu manipülasyon kısa sürelidir. CNO'nun yıkımıyla reseptörler yine inaktif duruma dönerler. Dolayısıyla kemogenetik manipülasyonlar daha az invaziv, uzaktan kontrollü ve geri dönüşümlüdür. İntraperitoneal (i.p.) olarak CNO verilerek bu nöronlar aktive edilmiş ve daha sonra besin tüketimi gözlemlenmiştir. Besin ölçümü sonucuna göre oksitosin nöronlarının aktivasyonu sonucunda farelerin besin tüketiminde kontrol durumuna göre anlamlı bir azalma gözlemlenmemiştir (Şekil 6.12).

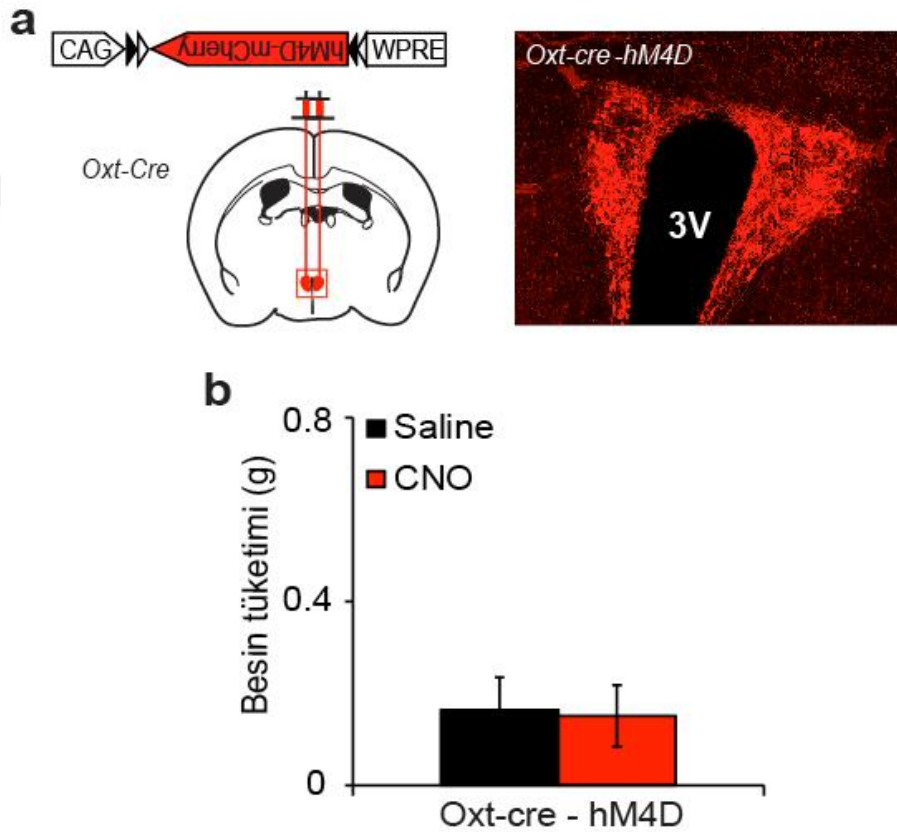


Şekil 6.12. *Oxt-Cre* ve *Magel2* eksik farelerde kemogenetik olarak oksitosin nöronlarının aktivasyonunun besin tüketimine olan etkisi. a) *Oxt-Cre* ve *DTG* farelerde AAV-Flex-hM4D virüsü ile PVN'deki oksitosin nöronlarının işaretlenmesi. b) *Oxt-Cre* ve *DTG* farelerde oksitosin nöronlarının aktivasyonunun besin tüketimine etkisi (Saline- *Oxt-cre*: 0.95 ± 0.18 g, n=9 ve *DTG*: 0.84 ± 0.16 g, n=7; p=0.82; CNO- *Oxt-cre*: 0.96 ± 0.10 g, n=9 ve *DTG*: 0.59 ± 0.07 g, n=7; p=0.76).

6.5. PVN oksitosin nöronlarının inhibisyonu ve bu inhibisyonun *Oxt-Cre* ve *Magel2* eksik farelerde besin tüketimine olan etkisi

Kimyasal inhibisyon öncesinde *Oxt-Cre* farelere stereotaktik çerçeve ve mikropipet yardımıyla PVN bölgesine AAV-Flex-hM4D virüsü enjekte edilmiştir. Kemogenetik manipülasyonu sağlamak amacıyla verilen hM4D inhibitör Gi protein bağlı reseptördür. hM4D reseptörü aktive edildiğinde hücrelerin sessizleşmesini sağlar. Aktif duruma geçmesi için Clozapine-N-Oxide (CNO) adı verilen bir liganda ihtiyaç duyarlar. Farelere intraperitoneal (i.p.) olarak CNO verilmesi durumunda hM4D reseptörleri aktif faza geçer. Bu manipülasyon kısa sürelidir. CNO'nun yıkımıyla

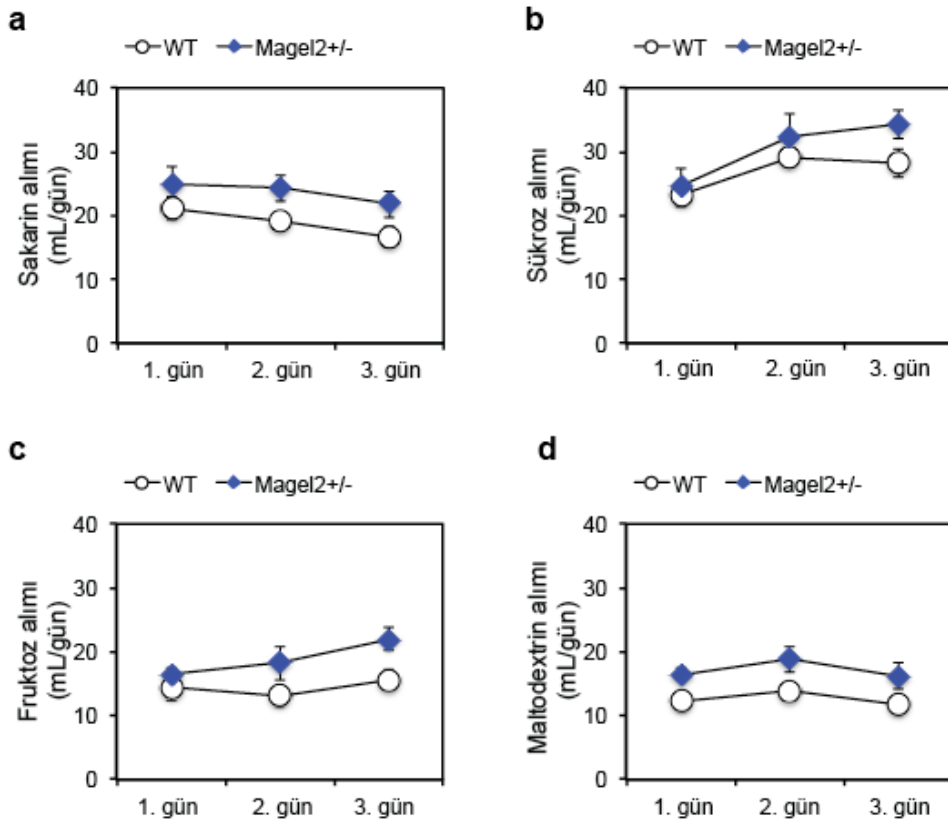
reseptörler yine inaktif duruma dönerler. Dolayısıyla kemogenetik manipölasyonlar daha az invaziv, uzaktan kontrollü ve geri dönuşümlüdür. İntraperitoneal (i.p.) olarak CNO verilerek oksitosin nöronlar inhibe edilmiş ve daha sonra besin tüketimi ölçülmüştür. Oksitosin nöronlarının inhibisyonu sonucunda farelerin besin tüketiminde bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 6.13).



Şekil 6.13. Kimyasal olarak oksitosin nöronlarının inhibisyonunun besin tüketimine olan etkisi. a) *Oxt-Cre* farelerde AAV-Flex-hM4D virüsü ile PVN deki oksitosin nöronlarının işaretlenmesi. b) *Oxt-Cre* farelerde oksitosin nöronlarının inhibisyonunun besin tüketimine etkisi (Saline: 0.16 ± 0.07 g, $n=6$ ve CNO: 0.15 ± 0.06 g, $n=6$; $p=0.87$).

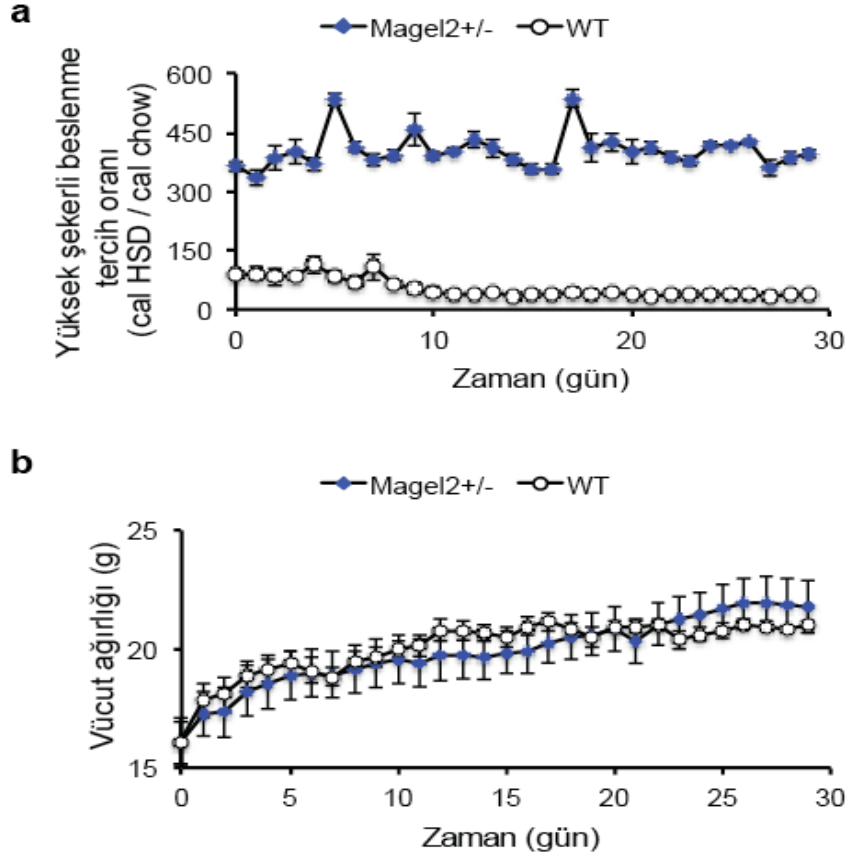
6.6. *Magel2* eksik farelerin şekerli beslenmeye olan tercihi

Magel2 eksikliğinin şekerli beslenmeye olan etkisini incelemek için *Magel2*^{+/-} fareler deney için kullanıldı ve wild type farelerle karşılaştırıldı. Şeker tercihinin test edebilmek için kafeslere su ya da şekerli (sakarın, sükröz, früktoz ve maltodextrin) su içeren iki suluk yerleştirildi. Böylece farelerin *Magel2* KO olduğu durumda şekere olan ilgisi ölçülmüş oldu. Deneylerin sonucuna göre *Magel2* eksikliğinde farelerin şekere olan tercihi kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 6.14). Ayrıca fareler yüksek şekerli besinle beslendiğinde kontrolle karşılaştırıldığı zaman *Magel2* eksik farelerin normal yem yerine daha çok yüksek şekerli yemi tercih ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 6.15).



Şekil 6.14. *Magel2* eksikliğinin şekerli beslenmeye olan etkisi. a) *Magel2* eksik ve WT farelerin sakarine olan tercihi (WT: 8 fare ve *Magel2*^{+m/-p}: 8 fare). b) *Magel2* eksik ve WT farelerin sükröza olan tercihi (WT: 8 fare ve *Magel2*^{+m/-p}: 8 fare). c)

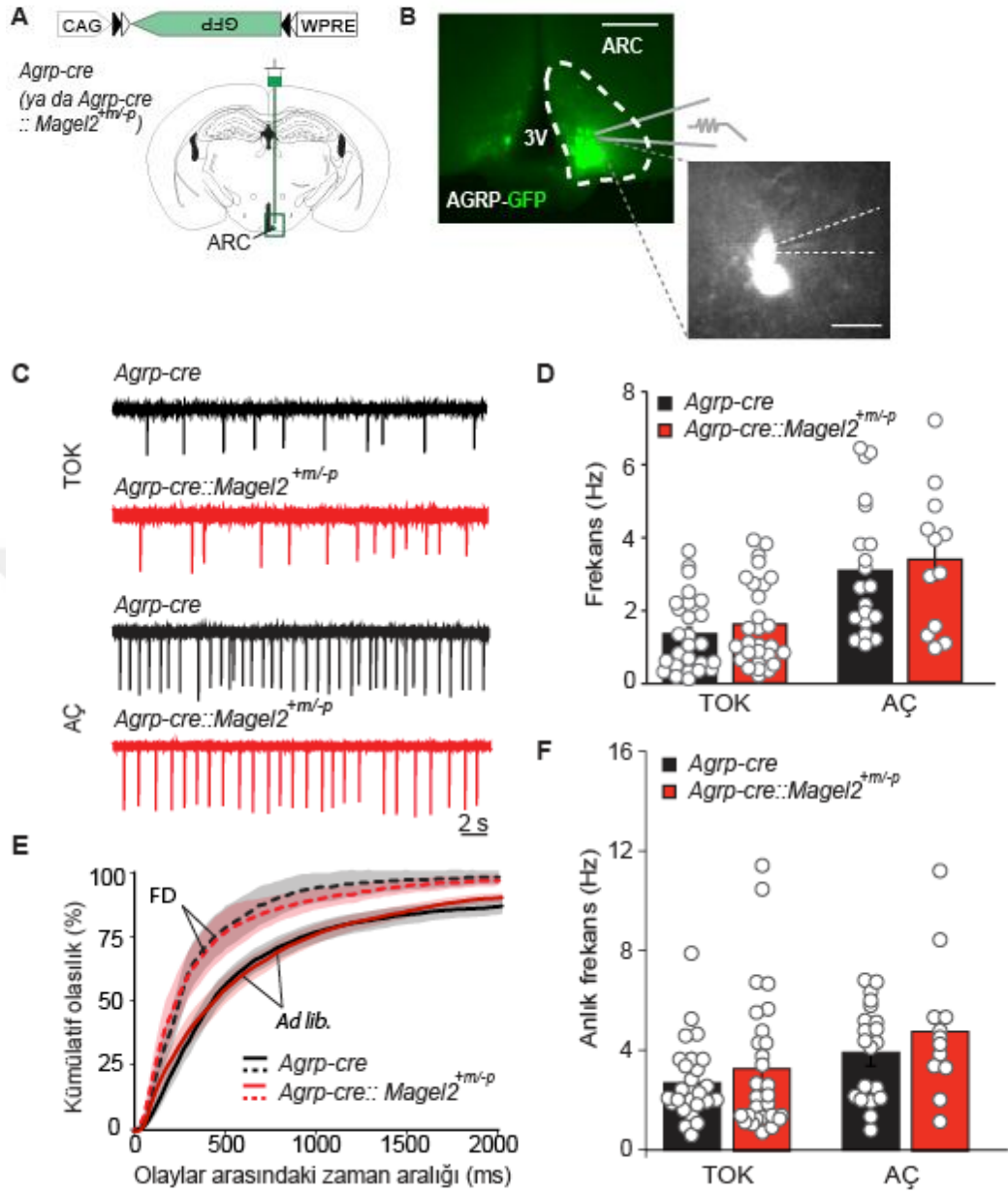
Magel2 eksik ve WT farelerin fruktoza olan tercihi (WT: 8 fare ve *Magel2*^{+m/p}: 8 fare). d) *Magel2* eksik ve WT farelerin maltodextrine olan tercihi (WT: 8 fare ve *Magel2*^{+m/p}: 8 fare).



Şekil 6.15. *Magel2* eksikliğinin yüksek şekerli beslenmeye olan etkisi. a) *Magel2* eksik ve WT farelerin yüksek şekerli beslenme tercih oranı grafiği (WT: 8 fare ve *Magel2*^{+m/p}: 8 fare). b) *Magel2* eksik ve WT farelerin vücut ağırlığı grafiği (WT: 8 fare ve *Magel2*^{+m/p}: 8 fare).

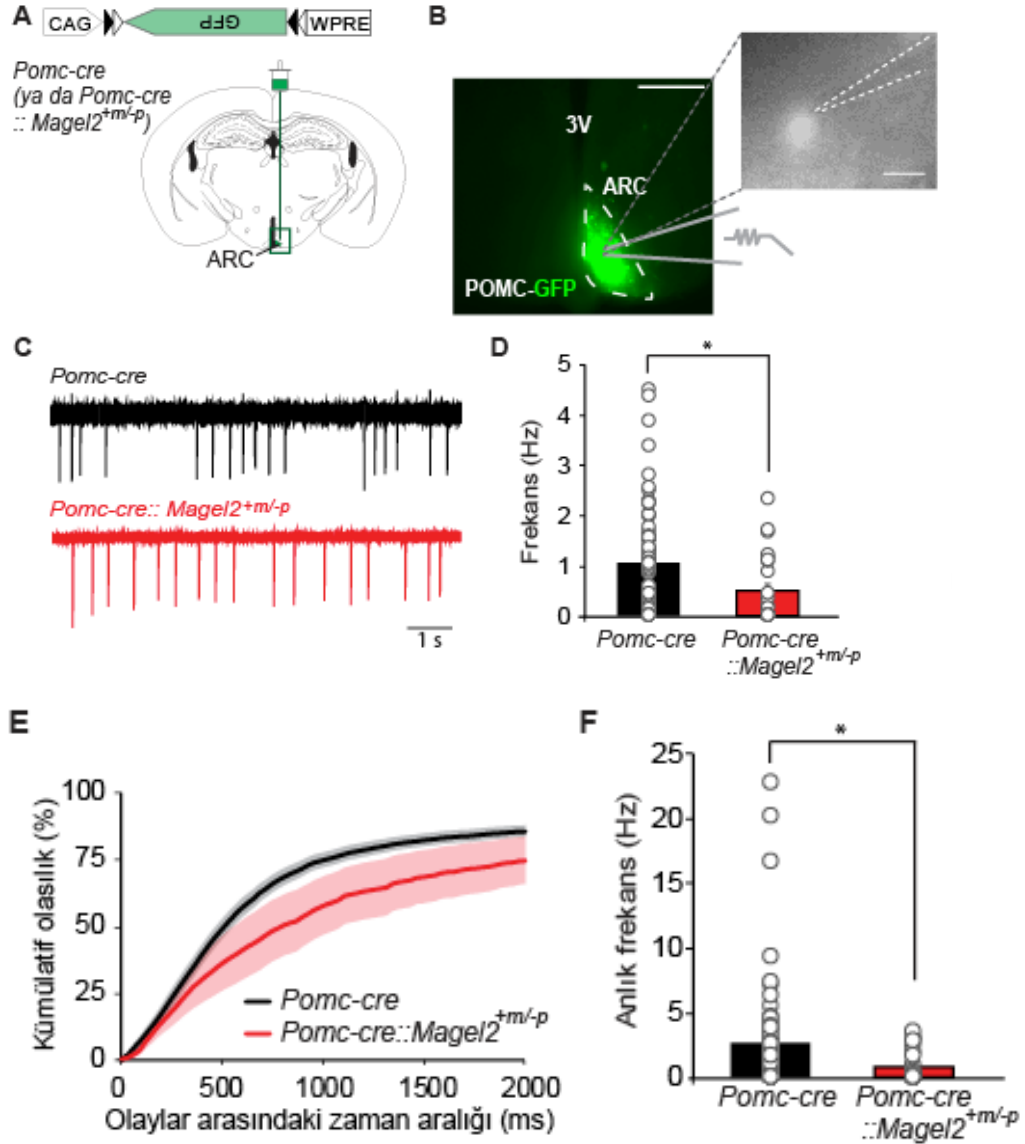
6.7. AGRP ve POMC nöronlarının ateşleme özelliklerinin normal ve PWS modelinde belirlenmesi

Elektrofizyolojik ölçümlerin öncesinde farelere 30 günlük olduklarında stereotaktik çerçeve ve mikropipet yardımıyla ARC bölgesine AAV-Flex-GFP virüsü enjekte edilerek AGRP ve POMC nöronları floresan olarak işaretlendi. Bu nöronların temel elektrofizyolojik özelliklerinin PWS modellerinde değişip değişmediğini belirlemeyi hedefledik. Bunun için akut hazırlanan beyin kesitlerinde kontrol ve *Magel2* eksik farelerdeki spontane ateşleme hızını ölçüp karşılaştırdık. Elektrofizyoloji sonuçlarına göre *Agrp-Cre* farelerde spontane aktivite frekansı açlık durumunda tok farelere göre daha yüksektir. Fakat *Magel2* eksik fareler ve kontrol fareleri arasında anlamlı bir fark yoktur (Şekil 6.16). *Pomc-Cre* farelerde ise tok durumda *Magel2* eksikliğinde spontane aktivite frekansında bir azalma vardır. Aynı zamanda anlık frekansta da bir azalma vardır (Şekil 6.17).



Şekil 6.16. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen *Agrp-Cre* ve *Agrp-cre::Magel2*^{+m/-p} farelerde aç ve tok durumda ARC'deki AGRP nöronlarından elektrofizyolojik ölçümlerin alınması. A,B) *Agrp-Cre* ve *Agrp-cre::Magel2*^{+m/-p} farelerin yeşil florasana ile işaretlenmesi. C) *Agrp-Cre* ve *Agrp-cre::Magel2*^{+m/-p} farede yeşil florasana ile işaretli AGRP nöronlarından alınan cell-attached kayıtlar. D) Elektrofizyolojik kayıtların frekans grafiği. Tok: (*Agrp-cre*: 1.32 ± 0.20 Hz, n=26 nöron / 5 fare and *Agrp-cre::Magel2*^{+m/-p}: 1.59 ± 0.21 Hz, n=28 nöron / 3 fare; p=0.37). Aç: (*Agrp-cre*: 3.07 ± 0.40 Hz, n=20 nöron / 3 fare ve *Agrp-cre::Magel2*^{+m/-p}: 3.37 ± 0.56 Hz,

n=12 nöron / 2 fare; p=0.66). E) Spontane olayların arasındaki zaman aralığına bağlı kümülatif olasılık grafiği. F) Elektrofizyolojik kayıtların anlık frekans grafiği. Tok: (Agrp-cre: 2.71 ± 0.30 Hz, n=26 nöron / 5 fare ve Agrp-cre::*Magel2*^{+m/p}: 3.30 ± 0.52 Hz, n=28 nöron / 3 fare; p=0.34). Aç: (Agrp-cre: 3.93 ± 0.42 Hz, n=20 nöron / 3 / ve Agrp-cre::*Magel2*^{+m/p}: 4.75 ± 0.78 Hz, n=12 nöron / 2 fare; p=0.33).



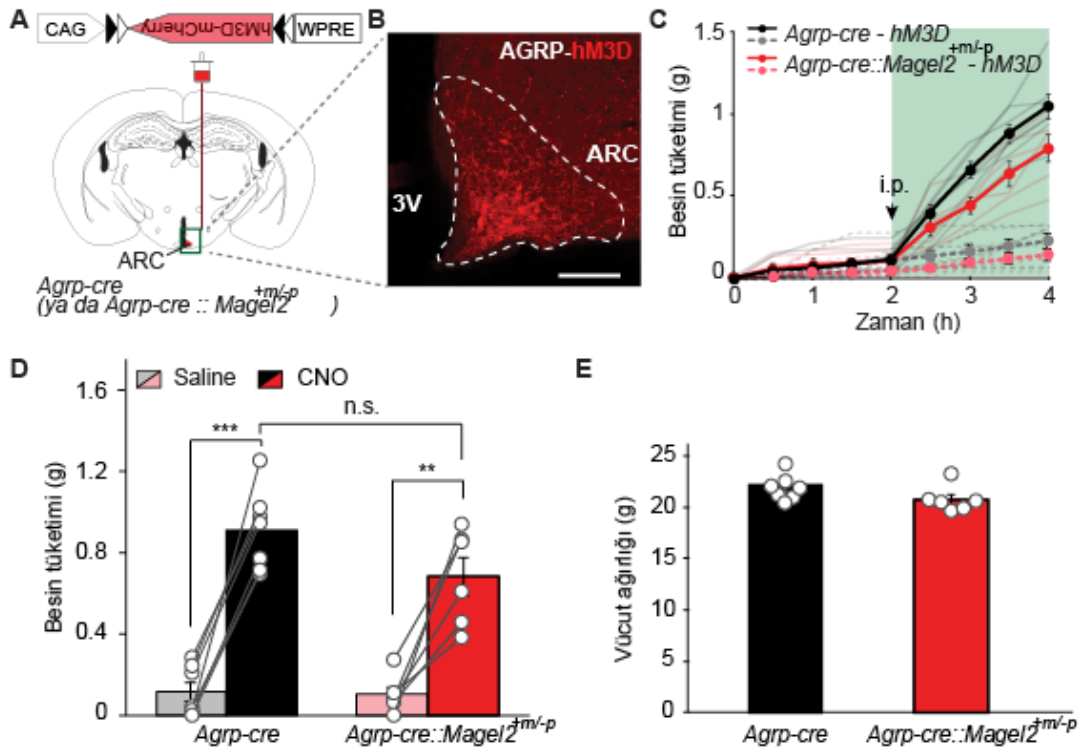
Şekil 6.17. AAV-Flex-GFP virüsü ile işaretlenen *Pomc-Cre* ve *Pomc-cre*::*Magel2*^{+m/p} farelerde tok durumda ARC'deki POMC nöronlarından elektrofizyolojik ölçümlerin alınması. A,B) *Pomc-Cre* ve *Pomc-cre*::*Magel2*^{+m/p}

farelerin yeşil florasan ile işaretlenmesi. C) *Pomc-Cre* ve *Pomc-cre::Magel2^{m/p}* farede yeşil florasan ile işaretli POMC nöronlarından alınan cell-attached kayıtlar. D) Elektrofizyolojik kayıtların frekans grafiği. (*Pomc-cre*: 1.03 ± 0.11 Hz, n=82 nöron / 4 fare ve *Pomc-cre::Magel2^{m/p}*: 0.48 ± 0.13 Hz, n=25 nöron / 3 fare; p=0.01). E) Spontane olayların arasındaki zaman aralığına bağlı kümülatif olasılık grafiği. F) Elektrofizyolojik kayıtların anlık frekans grafiği (*Pomc-cre*: 2.60 ± 0.42 Hz, n=82 nöron / 4 fare ve *Pomc-cre::Magel2^{m/p}*: 0.83 ± 0.24 Hz, n=25 nöron / 3 fare; p<0.02). (*p < 0.05).

6.8. AGRP ve POMC nöronlarının aktivasyonu ve bu aktivasyonunun normal ve Magel KO farelerde besin tüketimine olan etkisi

Davranış deneylerinin öncesinde farelere 30 günlük olduklarında stereotaktik çerçeve ve mikropipet yardımıyla ARC bölgesine AAV-Flex-hM3D virüsü enjekte edildi. Kemogenetik manipülasyonu sağlamak amacıyla verilen hM3D, aktivatör Gq protein bağlı bir reseptördür. hM3D reseptörü aktive edildiğinde hücrelerin ateşlemesini sağlar. Aktif duruma geçmesi için Clozapine-N-Oxide (CNO) adı verilen bir liganda ihtiyaç duyarlar. Farelere intraperitoneal (i.p.) olarak CNO verilmesi durumunda hM3D reseptörleri aktif faza geçer. Bu manipülasyon kısa sürelidir. CNO'nun yıkımıyla reseptörler yine inaktif duruma dönerler. Dolayısıyla kemogenetik manipülasyonlar daha az invaziv, uzaktan kontrollü ve geri dönüşümlüdür.

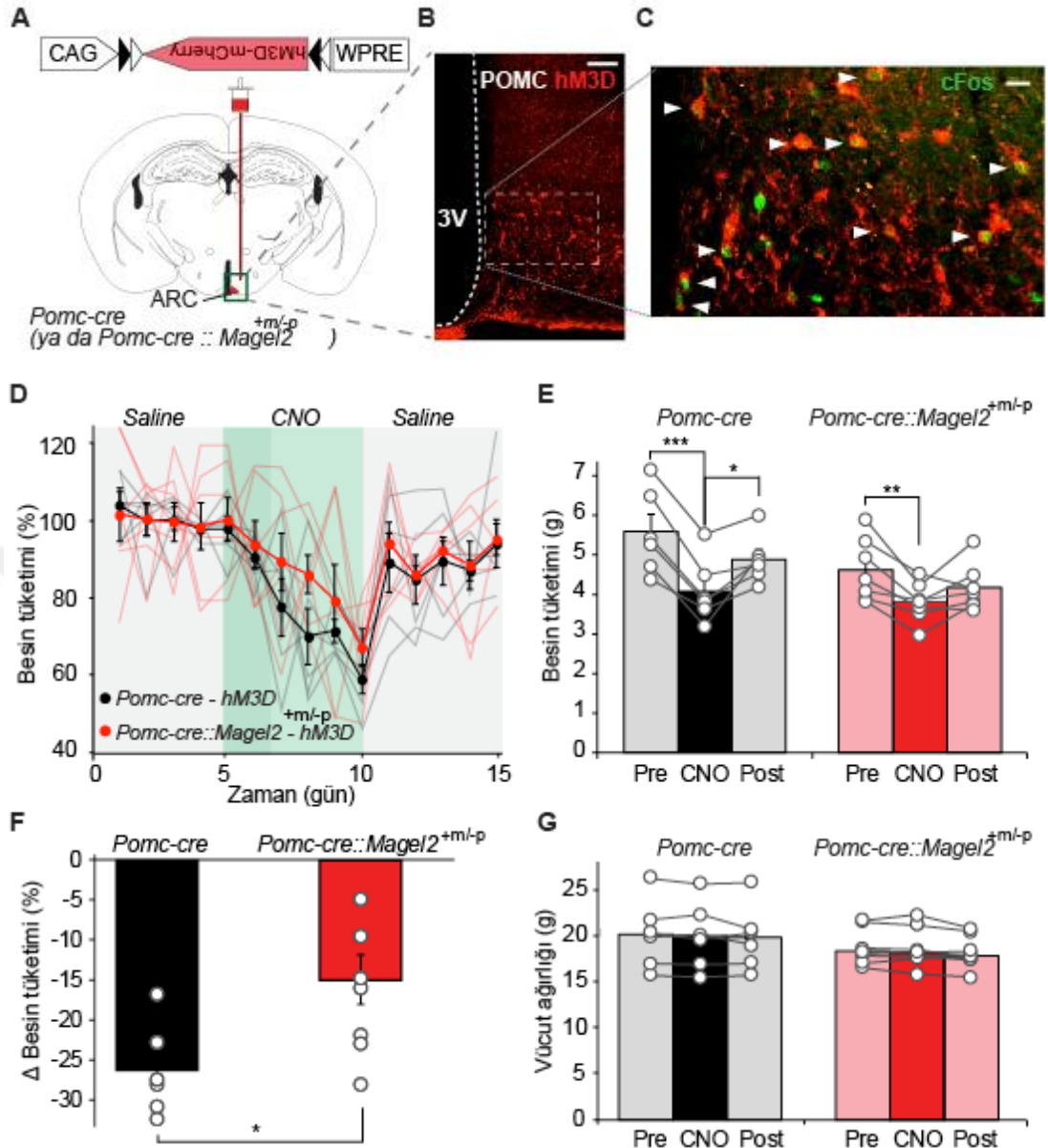
AGRP nöronları açlıkla ilişkili olan bir nöron grubudur. İntraperitoneal (i.p.) olarak CNO verilerek bu nöronlar aktive edilmiş ve daha sonra besin tüketimi gözlemlenmiştir. Besin ölçümü sonucuna göre AGRP nöronlarının aktivasyonu sonucunda farelerin besin tüketiminde kontrol durumuna göre bir artış gözlemlenmiştir. Fakat *Magel2* nin eksik olması bu nöronların aktivitesini etkilememiştir. Ayrıca vücut ağırlığında bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 6.18).



Şekil 6.18. Kimyasal olarak AGRP nöronlarının aktivasyonunun besin tüketimine olan etkisinin normal ve *Magel2* eksik farelerde karşılaştırılması. A,B) *Agrp-Cre* ve *Agrp-cre::Magel2^{+m/p}* farelerde AAV-Flex-hM3D virüsü ile ARC'deki AGRP nöronlarının işaretlenmesi. C,D) AGRP nöronlarının aktivasyonunun sonucu besin tüketimi değişimi (Saline- *Agrp-cre*: 0.11 ± 0.04 g, n=7 ve *Agrp-cre::Magel2^{+m/p}*: 0.10 ± 0.037 g, n=6; p=0.86; CNO- *Agrp-cre*: 0.92 ± 0.076 g, n=7 ve *Agrp-cre::Magel2^{+m/p}*: 0.69 ± 0.096 g, n=6; p=0.087). E) AGRP nöronlarının aktivasyonunun sonucu vücut ağırlığı değişimi (*Agrp-cre*: 21.76 ± 0.047 g, n=7 ve *Agrp-cre::Magel2^{+m/p}*: 20.69 ± 0.051 g, n=6; p=0.16).

POMC nöronları toklukla ilişkili olan bir nöron grubudur. İntraperitoneal (i.p.) olarak CNO verilerek bu nöronlar aktive edilmiş ve daha sonra besin tüketimi gözlemlenmiştir. Besin ölçümü sonucuna göre POMC nöronlarının aktivasyonu sonucunda farelerin besin tüketiminde kontrol durumuna göre bir azalış gözlemlenmiştir. *Magel2* eksikliğinde ise bu nöronların aktivitesinde bir bozulma meydana gelmiştir ve besin alımını baskılamada daha zayıf kalmıştır. Fakat vücut ağırlığında bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 6.19).





Şekil 6.19. Kimyasal olarak AGRP nöronlarının aktivasyonunun besin tüketimine olan etkisinin normal ve Magel2 eksik farelerde karşılaştırılması. A,B,C) *Pomc-Cre* ve *Pomc-cre::Magel2^{+m/p}* farelerde AAV-Flex-hM3D virüsü ile ARC'deki POMC nöronlarının işaretlenmesi. D,E,F) POMC nöronlarının aktivasyonunu sonucu besin tüketimi değişimi (*Pomc-cre*: Pre- 5.54 ± 0.08 g, CNO- 4.07 ± 0.30 g, Post- 4.85 ± 0.08 g, n=6; Pre vs CNO p=0.0003, CNO vs Post p=0.018 ve *Pomc-cre::Magel2^{+m/p}*: Pre- 4.59 ± 0.02 g, CNO- 3.78 ± 0.21 g, Post- 4.15 ± 0.08 g, n=7; Pre vs CNO p=0.004, CNO vs Post p=0.109). G) POMC nöronlarının aktivasyonunu sonucu

vücut ağırlığı değişimi (*Pomc-cre*: -26.35 ± 2.33 %, n=6 ve *Pomc-cre::Magel2^{m/p}*: -14.96 ± 3.05 %, n=7; p=0.034). (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001).



7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Prader Willi Sendromu yol açtığı hormonal, sinirsel ve sosyal davranış bozuklukları sebebiyle çok yönlü bir hastalıktır. PWS nin genetik sebepleri kromozom 15 in paternal kopyasındaki q11-q13 bölümünün inaktive olması ve maternal kopyadaki aynı bölümün genomik imprinting sonucu sessizleştirilmesini içerir. Bu bölgedeki genlerin işlevini kaybetmesinin söz konusu hastalık patogenezine katkısı halen tam olarak anlaşılamamıştır. Her ne kadar delesyon bölgesinde 5 farklı gen varsa da, bu genler arasında *Magel2* diğerlerinden farklı bir konuma sahiptir. Şöyle ki, *Magel2* geni neredeyse özel olarak merkezi sinir sisteminin hipotalamus bölgesinde yoğun olarak ifade edilmektedir. Hastalığın beslenme ve sosyal davranış fenotipleri düşünüldüğünde, bu gen ifadesi konumu daha da bir önem arz etmektedir. Dolayısıyla, proje önerimizde belirttiğimiz gibi, çalışmamızda özellikle de bu genin eksikliğinin fenotipik sonuçlarının irdelenmesi, moleküler ve hücrel mekanizmaların araştırılması üzerinde yoğunlaştık. Oksitosin nöronları hem sosyal davranış hem de tokluk hissi ile olan ilişkisi nedeniyle, PWS’de gözlenen fenotipik bozukluklar açısından ilginç bir kesişme noktasında bulunmaktadır. Buna, PWS hastalarının post mortem beyin dokusu analizlerinde gözlenen oksitosin nöron kaybını (31) ve yine PWS modellerinde gözlenen oksitosin hormonu seviyesi değişimleri ve halen devam etmekte olan PWS hastalarında faz-2 oksitosin tedavisi çalışmaları (32) eklenince, bu nöronların hastalık etiyojisinde merkezi bir rol oynaması çok muhtemel görünmektedir.

PVN nin rolüyle ilgili pek çok bulguya rağmen alt bağlantı yolları ve PVN nin nasıl bir mekanizmayla açlığı kontrol ettiği şu ana kadar çok iyi açıklanamamıştır. Bu çalışmada elektrofizyolojik teknikler kullanılarak oksitosin nöronlarındaki işlevsel ve bağlantısal özelliklerin PWS modellerinde nasıl etkilendiğini araştırılmıştır ve *Magel2* eksik fare modelinde oksitosin nöronlarının bağlantı anatomisi ve bu bağlantıların sinaptik özellikleri kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir.

Bu çalışmada *MAGEL2* eksik PWS fare modelinde PVN oksitosin nöronlarındaki fonksiyonel değişiklikleri kapsamlı ve sistematik olarak karakterize ettik. Bunlar

sırasıyla, MAGEL2 eksik farede oksitosin nöronlarına gelen (a) presinaptik input anomalitelerinin spontane (EPSC veya IPSC) akımların ölçülmesi (b) oksitosin nöronlarına sinaptik input yollayan başlıca afferent kaynağın tespit edilmesi, (c) MAGEL2 yokluğunda oksitosin nöronlarının otonom ateşleme ve dinlenme potansiyeli gibi özelliklerinin karakterizasyonu (d) oksitosin nöronlarının sinaptik çıktılarının MAGEL2 yokluğunda karakterizasyonu ve son olarak (e) MAGEL2 yokluğunda oksitosin nöronlarında yapılacak aktivite baskılamasının davranışsal sonuçları. Aynı zamanda, MAGEL2 eksik PWS fare modelinde ARC AGRP ve POMC nöronlarındaki fonksiyonel değişiklikleri karakterize ettik.

Elektrofizyoloji sonuçlarına göre MAGEL2 eksikliğinde oksitosin nöronlarına gelen EPSC sinaptik inputlarında (uyaran input) önemli bir oranda azalma gözlemlenmiştir, ama bu hücrelere gelen inhibe edici sinaptik (IPSC) sinaptik inputlarında bir değişiklik yoktur. En az iki sebepten dolayı bu gözlem son derece önem arz etmektedir. Birincisi, şimdiye kadar yapılan onlarca çalışmada PWS, Schaaf–Yang sendromu (*MAGEL2* özel mutasyonu) ve otizm spektrum rahatsızlıklarında oksitosin bozukluğu olabileceği hipotez edilmiş fakat fonksiyonel olarak doğrudan bir bağ kurulamamıştı (57, 58). İlk defa bu çalışmada bir nörogelişimsel sosyal davranış bozukluğu içeren rahatsızlığın modelinde oksitosin nöronlarında dramatik fonksiyon bozuklukları gözlenmiş oluyor.

Dahası, oksitosin nöronlarına gelen inputlardaki değişiklikleri belirledikten sonra bu nöronların hücre otonom özelliklerini değerlendirdik. Amacımız oksitosin nöronlarının temel elektrofizyolojik özelliklerinin PWS modellerinde değişip değişmediğini belirlemesiydi. İn vitro akut olarak hazırlanan beyin kesitlerinden yaptığımız elektrofizyolojik kayıt sonuçlarına göre normal farelere göre MAGEL2 eksikliğinde spontane ativitede önemli azalma gözlemlenmiştir. Bunun yanında MAGEL2 eksik farelerde nöronların ateşlemesinde bir azalma gözlemledik ve dinlenme membran potansiyelinde bir değişiklik görmedik. Bunların yanı sıra, oksitosin nöronlarının MAGEL2 varlığında ve yokluğunda membran direnç değerlerini ve voltaj akım eğrilerini de çıkardık. Söz konusu membran potansiyeli farkı ve ateşleme azalmasının hücrenin kendinden kaynaklı mı yoksa gelen sinaptik

inputlardaki değişikliklerden mi kaynaklandığını anlamak için, aynı ölçümleri sinaptik reseptör blokerleri (glutamat ve GABA) varlığında tekrarladığımızda, farkın ortadan kalktığını gözlemledik. Bu sonuçlar, sinaptik bağlantılardaki değişikliğin, hücrenin ateşleme özelliklerini doğrudan etkilediğini göstermektedir. Ayrıca, bu sonuçlar, oksitosin nöron aktivitesinin MAGEL2 yokluğunda yetersiz kaldığını da kanıtlamış olmaktadır. Dahası, AMPA reseptörlerindeki azalma oksitosinerjik sistemdeki bozulmanın mekanizmasını açıklayabilir.

Aynı zamanda, normal ve MAGEL2 olmayan farelerde oksitosin nöronların fonksiyonel ve davranışsal değerlendirmesini gerçekleştirdik. Bunun için, farmakogenetik DREADD teknolojisinden faydalandık. Bu amaçla normal ve MAGEL2 eksik – oksitosin-cre ikili transgenik oksitosin nöronlarını hM3D ve hM4D farmakogenetik inhibitor proteini taşıyan rAAV virüsü ile enjekte edip CNO ligandını intraperitoneal vermek suretiyle bu nöronları akut olarak aktive ve inhibe ettik. Aktivasyonun ve inhibisyonun beslenmeye olan etkilerini gözlemlediğimizde, bu nöronların doğrudan bir etkisi olmadığını fark ettik. Sonuç itibariyle oksitosin nöronlarının akut aktivasyonu ve inhibisyonu hem normal hem de MAGEL2 eksik farede akut besin alımını tetiklemek için yeterli değildir diyebiliriz. Fakat, fareler *Magel2* eksik farelerin normal yem yerine daha çok yüksek şekerli yemi tercih ettiği gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada MAGEL2 eksik PWS fare modelinde ARC ve AGRP POMC nöronlarındaki fonksiyonel değişiklikler de karakterize edilmiştir. Daha önceki çalışmalara göre leptin → POMC sinyal yolağındaki bozulmaların POMC nöron aktivitesini etkilediği gösterilmiştir (15, 59) ve ARC deki POMC nöron sayısında azalma olduğu gözlemlenmiştir (15). Ayrıca, AGRP nöronlarına zıt olarak POMC nöronları iştah üzerine kısa sürede sınırlı etkisi vardır (60, 61, 62). Elektrofizyolojik kayıt sonuçlarına göre normal farelere göre MAGEL2 eksikliğinde AGRP nöronlarında spontane ativitede bir değişiklik yoktur. Fakat, POMC nöronlarının spontane ativitesinde önemli bir azalma gözlemlenmiştir. Davranış deneyleri sonuçlarına göre ise MAGEL2 proteini AGRP nöronlarına bağlı iştah için gerekli

değildir. Ama *Magel2* eksikliği POMC nöronlarının fonksiyonunda bir bozulmaya yol açmaktadır.

MAGEL2 eksikliği, hem Prader Willi sendromu, hem de hastalarının yaklaşık %75i otizm fenotipi gösteren Schaaf-Yang sendromunda görülmektedir. Bu fare modelinde oksitosin gibi anahtar rol oynayan nöronların fizyolojik ve davranışsal özelliklerini ilk kez kapsamlı ve sistematik olarak gerçekleştirmeyi başardık ve bu nöronların çalışmasında ciddi bozulmalar olduğunu gözlemledik. Söz konusu oksitosin sinir ağı hasarlarının hastalık etiopatogenezinde, özellikle de iştah ve sosyal davranış bozukluklarında önemli bir rol oynaması oldukça muhtemeldir.



8. KAYNAKLAR

1. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA*. 1999;282(16):1523-9
2. Dietrich MO, Horvath TL. Limitations in anti-obesity drug development: the critical role of hunger-promoting neurons. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(9):675-91.
3. Türkiye Sağlık Araştırması. Türkiye İstatistik Kurumu 2015;18854.
4. Sternson SM. Hypothalamic survival circuits: blueprints for purposive behaviors. *Neuron*. 2013;77(5):810-24.
5. van Vliet-Ostaptchouk JV, Hofker MH, van der Schouw YT, Wijmenga C, Onland-Moret NC. Genetic variation in the hypothalamic pathways and its role on obesity. *Obes Rev*. 2009;10(6):593-609.
6. Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest*. 2007;117(1):13-23.
7. Niswender KD, Schwartz MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24(1):1-10.
8. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000;289(5487):2122-5.
9. Berthoud HR, Morrison C. The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol*. 2008;59:55-92.
10. Bradfield JP, Taal HR, Timpson NJ, Scherag A, Lecoeur C, Warrington NM, et al. A genome-wide association meta-analysis identifies new childhood obesity loci. *Nat Genet*. 2012;44(5):526-31.
11. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev*. 2005;85(4):1131-58.
12. Kas MJ, Tiesjema B, van Dijk G, Garner KM, Barsh GS, ter Brake O, et al. Induction of brain-region-specific forms of obesity by agouti. *J Neurosci*. 2004;24(45):10176-81.
13. Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*. 2004;25(3):473-504.

14. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2013;309(1):71-82.
15. Mercer RE, Michaelson SD, Chee MJ, Atallah TA, Wevrick R, Colmers WF. *Magel2* is required for leptin-mediated depolarization of POMC neurons in the hypothalamic arcuate nucleus in mice. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003207.
16. Friedman JM. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(3):973S-9S.
17. Ranadive SA, Vaisse C. Lessons from extreme human obesity: monogenic disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(3):733-51, x.
18. Kabasakalian A, Ferretti CJ, Hollander E. Oxytocin and Prader-Willi Syndrome. *Curr Top Behav Neurosci*. 2017.
19. Holland A, Whittington J, Hinton E. The paradox of Prader-Willi syndrome: a genetic model of starvation. *Lancet*. 2003;362(9388):989-91.
20. Butler MG. Prader-Willi Syndrome: Obesity due to Genomic Imprinting. *Curr Genomics*. 2011;12(3):204-15.
21. Tacer KF, Potts PR. Cellular and disease functions of the Prader-Willi Syndrome gene *MAGEL2*. *Biochem J*. 2017;474(13):2177-90.
22. Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Genet Med*. 2012;14(1):10-26.
23. Bittel DC, Butler MG. Prader-Willi syndrome: clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Expert Rev Mol Med*. 2005;7(14):1-20.
24. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Mechanisms of obesity in Prader-Willi syndrome. *Pediatr Obes*. 2018;13(1):3-13.
25. Korbonits M, Grossman AB. Ghrelin: update on a novel hormonal system. *Eur J Endocrinol*. 2004;151 Suppl 1:S67-70.
26. Lee S, Kozlov S, Hernandez L, Chamberlain SJ, Brannan CI, Stewart CL, et al. Expression and imprinting of *MAGEL2* suggest a role in Prader-willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet*. 2000;9(12):1813-9.

27. Bischof JM, Stewart CL, Wevrick R. Inactivation of the mouse *Magel2* gene results in growth abnormalities similar to Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet.* 2007;16(22):2713-9.
28. Priano L, Miscio G, Grugni G, Milano E, Baudo S, Sellitti L, et al. On the origin of sensory impairment and altered pain perception in Prader-Willi syndrome: a neurophysiological study. *Eur J Pain.* 2009;13(8):829-35.
29. Schaller F, Watrin F, Sturny R, Massacrier A, Szepetowski P, Muscatelli F. A single postnatal injection of oxytocin rescues the lethal feeding behaviour in mouse newborns deficient for the imprinted *Magel2* gene. *Hum Mol Genet.* 2010;19(24):4895-905.
30. Dombret C, Nguyen T, Schakman O, Michaud JL, Hardin-Pouzet H, Bertrand MJ, et al. Loss of *Maged1* results in obesity, deficits of social interactions, impaired sexual behavior and severe alteration of mature oxytocin production in the hypothalamus. *Hum Mol Genet.* 2012;21(21):4703-17.
31. Swaab DF. Prader-Willi syndrome and the hypothalamus. *Acta Paediatr Suppl.* 1997;423:50-4.
32. Swaab DF, Purba JS, Hofman MA. Alterations in the hypothalamic paraventricular nucleus and its oxytocin neurons (putative satiety cells) in Prader-Willi syndrome: a study of five cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(2):573-9.
33. Lawson EA. The effects of oxytocin on eating behaviour and metabolism in humans. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(12):700-9.
34. Ohlsson B, Truedsson M, Djerf P, Sundler F. Oxytocin is expressed throughout the human gastrointestinal tract. *Regul Pept.* 2006;135(1-2):7-11.
35. Camerino C. Low sympathetic tone and obese phenotype in oxytocin-deficient mice. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17(5):980-4.
36. Kublaoui BM, Gemelli T, Tolson KP, Wang Y, Zinn AR. Oxytocin deficiency mediates hyperphagic obesity of *Sim1* haploinsufficient mice. *Mol Endocrinol.* 2008;22(7):1723-34.
37. Blevins JE, Baskin DG. Translational and therapeutic potential of oxytocin as an anti-obesity strategy: Insights from rodents, nonhuman primates and humans. *Physiol Behav.* 2015;152(Pt B):438-49.

38. Altirriba J, Poher AL, Rohner-Jeanrenaud F. Chronic Oxytocin Administration as a Treatment Against Impaired Leptin Signaling or Leptin Resistance in Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:119.
39. Sabatier N, Leng G, Menzies J. Oxytocin, feeding, and satiety. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:35.
40. Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008;18(2):158-68.
41. Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24(3):151-80.
42. Kim MS, Rossi M, Abusnana S, Sunter D, Morgan DG, Small CJ, et al. Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes*. 2000;49(2):177-82.
43. Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C, Buijs RM. Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci*. 2004;24(35):7604-13.
44. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 2012;488(7410):172-7.
45. Simpson K, Parker J, Plumer J, Bloom S. CCK, PYY and PP: the control of energy balance. *Handb Exp Pharmacol*. 2012(209):209-30.
46. Yosten GL, Samson WK. The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(6):R1642-7.
47. Olszewski PK, Klockars A, Olszewska AM, Fredriksson R, Schioth HB, Levine AS. Molecular, immunohistochemical, and pharmacological evidence of oxytocin's role as inhibitor of carbohydrate but not fat intake. *Endocrinology*. 2010;151(10):4736-44.
48. Lo Verme J, Gaetani S, Fu J, Oveisi F, Burton K, Piomelli D. Regulation of food intake by oleylethanolamide. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(6):708-16.

49. Caquineau C, Douglas AJ, Leng G. Effects of cholecystokinin in the supraoptic nucleus and paraventricular nucleus are negatively modulated by leptin in 24-h fasted lean male rats. *J Neuroendocrinol.* 2010;22(5):446-52.
50. Sabatier N, Leng G. Presynaptic actions of endocannabinoids mediate alpha-MSH-induced inhibition of oxytocin cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(3):R577-84.
51. Kublaoui BM, Holder JL, Jr., Gemelli T, Zinn AR. Sim1 haploinsufficiency impairs melanocortin-mediated anorexia and activation of paraventricular nucleus neurons. *Mol Endocrinol.* 2006;20(10):2483-92.
52. Jhamandas JH, Goncharuk V. Role of neuropeptide FF in central cardiovascular and neuroendocrine regulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:8.
53. 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.
54. Kim ER, Wu Z, Sun H, Xu Y, Mangieri LR, Xu Y, et al. Hypothalamic Non-AgRP, Non-POMC GABAergic Neurons Are Required for Postweaning Feeding and NPY Hyperphagia. *The Journal of Neuroscience.* 2015;35(29):10440.
55. 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.
56. Chen Y, Lin Y-C, Zimmerman CA, Essner RA, Knight ZA. Hunger neurons drive feeding through a sustained, positive reinforcement signal. *eLife.* 2016;5:e18640.
57. Schaaf, C.P., Gonzalez-Garay, M.L., Xia, F., Potocki, L., Gripp, K.W., Zhang, B., Peters, B.A., McElwain, M.A., Drmanac, R., Beaudet, A.L. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat. Genet.* 2013;45, 1405-1408.
58. Fountain, M.D., Jr., Schaaf, C.P. MAGEL2 and Oxytocin-Implications in Prader-Willi Syndrome and Beyond. *Biol. Psychiatry.* 2015;78, 78-80.
59. Wijesuriya, T.M., De Ceuninck, L., Masschaele, D., Sanderson, M.R., Carias, K.V., Tavernier, J. and Wevrick, R. The Prader-Willi syndrome proteins MAGEL2

and necdin regulate leptin receptor cell surface abundance through ubiquitination pathways. *Hum. Mol. Genet.* 2017;26, 4215-4230.

60. Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J.E., Lin, S., Bao, J., Wu, P., Luo, M. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J. Neurosci.* 2013;33, 3624-3632.

61. Aponte, Y., Atasoy, D., Sternson, S.M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 2011;14, 351-355.

62. Fenselau, H., Campbell, J.N., Verstegen, A.M., Madara, J.C., Xu, J., Shah, B.P., Resch, J.M., Yang, Z., Mandelblat-Cerf, Y., Livneh, Y. A rapidly acting glutamatergic ARC-->PVH satiety circuit postsynaptically regulated by alpha-MSH. *Nat. Neurosci.* 2017;20, 42-51.

9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.

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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
04/09/2014	42		Deniz ATASOY

"Prader Willi Sendromuna dayalı morbid obezitenin nöronal kökenleri" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 36 ay

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

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Merve	Soyadı	Öncül
------------	-------	---------------	-------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Oxford Brookes Üniversitesi	2013
Lisans	İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik	2012
Lise	Kartal Fatin Rüştü Zorlu Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Araştırmacı	MRC National Institute for Medical Research	(10/2013-12/2013)

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

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	81,41793	78,94780	64,01970

TOEFL IBT Puanı	
------------------------	--

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

Sertifikalar

İstanbul Üniversitesi	Medipol	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2014
--------------------------	---------	---	------