

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREFRONTAL KORTEKSTE NUDT6 İFADESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
SIÇANDA DEPRESYON-BENZERİ VE ANKSİYETE-BENZERİ
DAVRANIŞA ETKİLERİ**

Dr. Fatma Özlem HÖKELEKLİ

**Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2018**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREFRONTAL KORTEKSTE NUDT6 İFADESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
SIÇANDA DEPRESYON-BENZERİ VE ANKSİYETE-BENZERİ
DAVRANIŞA ETKİLERİ**

Dr. Fatma Özlem HÖKELEKLİ

**Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Emine EREN KOÇAK**

**ANKARA
2018**

ONAY SAYFASI

PREFRONTAL KORTEKSTE NUDT6 İFADESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN SIÇANDA DEPRESYON-BENZERİ VE ANKSİYETE-BENZERİ DAVRANIŞA ETKİLERİ

Fatma Özlem HÖKELEKLİ

Danışman: Doç. Dr. Emine EREN KOÇAK

Bu tez çalışması 21.06.2018 tarihinde jürimiz tarafından “Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Turgay Dalkara

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Bülent Elibol

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Aygün Ertuğrul

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Doç. Dr. Hatice Özdemir Rezaki

(Kırıkkale Üniversitesi)

Üye:

Doç. Dr. Kemal Sayar

(Ankara Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

17 Temmuz 2018



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİRKİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

o Tezimin/Raporumun 21/06/2028 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (iç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

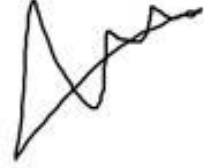
o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

21/6/2018

Fatma Özlem Hökeleli

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Emine Eren Koçak danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Fatma Özlem HÖKELEKLİ

TEŞEKKÜR

İyi bir bilim insanı olarak yetişmeme, doktora sürecime ve tezime katkıları için güler yüzünü örnek aldığım tez danışmanım Doç. Dr. Emine Eren Koçak'a; ufuk açıcı anekdotları ve doktora sürecime katkıları için yenilikçi bakış açısıyla her zaman ilerleme peşinde koşma motivasyonunu özümsemeyi dilediğim Prof. Dr. Turgay Dalkara'ya; tezime yönelik faydalı tartışmaları için Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan ve Doç. Dr. Hülya Karataş Kurşun'a teşekkür ederim.

Laboratuvarda bana gösterdiği ablalıktan dolayı Uzm. Dr. Aslıhan Taşkıran Sağ'a, tezime olan katkıları için Dr. Sinem Yılmaz Özcan'a teşekkür ederim. Canım yola çıktığım Dr. Elif Haznedaroğlu'na tüm iyi ve kötü zamanlarımda yanımda olduğu, iyimser bakış açısıyla beni yukarı çektiği için; MD-PhD yolculuğunda sonradan karşıma çıktığı halde, gönülden benimsediğim canım dostum Dr. Gökhan Uruk'a tüm yardımları ve dostluğu, ama özellikle de birlikte 6 saat boyu aralıksız kafes yıkadığımız o gün için, Dr. Zeynep Kaya'ya yardımları için; 8000 km uzaktan bile tüm sıkıntılara ve sevinçlerime ortak olabilen canım kardeşim Erdem Bektaş'a dostluğu için; tıp fakültesinin bana kattığı en güzel şey olan ve tüm başarılarımı candan bir sevinçle her zaman destekleyen, gözüm kapalı güvendiğim sevgili dostum Dr. Ümmügülsüm Gürbüz'e iyi niyete olan inancımı yitirmemi engellediği için gönülden teşekkür ederim.

Hiç şüphe yok ki teşekkürün en büyüğü benim bugüne gelmemin gerçek mimarı olan canım annem Gülseren Hökeleklî'ye aittir. Bebekliğimden bu yana, bugün de, tüm adımlarımı coşku ile karşıladığı, bana her zaman inandığı, beni her koşulda desteklediği, zor zamanlarımı kendi zor zamanları yapıp dertlendiği, tüm zorlukları birlikte aşacağımıza beni inandırdığı ve bunu başardığı için ne kadar müteşekkir olduğumu ifade edemem. Hayatımdaki tüm başarılar esasen ona aittir. Kedim İrem Badem'e sevgisi ile beni kuşattığı için candan teşekkür ederim.

Son olarak da bu çalışmayı desteklediği için Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Hökelekli, F.Ö. Prefrontal Kortekste NUDT6 İfadesindeki Değişikliklerin Sıçanda Depresyon-Benzeri ve Anksiyete-Benzeri Davranışa Etkileri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Doğal “*antisense*” transkriptler çoğunlukla protein kodlayan bir “*sense*” DNA zincirinin karşı zincirinden sentezlenen ve “*sense*” mRNA’ya tamamlayıcı olup onun ifadesini düzenleyen mRNA molekülleridir. NUDT6, FGF2'nin doğal “*antisense*” transkriptidir, FGF2 ifadesinin kontrolünde yer almaktadır. FGF2 antidepresan ve anksiyolitik, bu nedenle NUDT6'nın afektif davranıştaki rolü araştırılmalıdır. Laboratuvarımızdaki sıçan çalışmalarında, kronik hareketsiz bırakma stresinin prefrontal kortekste (PFK) NUDT6 ifadesini azalttığı gösterilmiştir. Buna dayanarak, bu çalışmada, sıçan PFK'sında NUDT6 ifadesindeki değişikliklerin depresyon- ve anksiyete-benzeri davranışla ilişkisi incelenmiştir. Prelimbik ve infralimbik kortekslerde AAV2 aracılığıyla NUDT6 fazla ifade ettirilmiş ve ifadesi baskılanmıştır. Depresyon-benzeri davranış sükröz tercihi ve zorla yüzdürme; anksiyete-benzeri davranış yükseltilmiş artı labirenti ve aydınlık-karanlık kutu; öğrenme pasif kaçınma testiyle değerlendirilmiştir ve hayvanlar sakrifiye edilerek PFK'daki moleküler değişiklikler incelenmiştir. PFK'da NUDT6 fazla ifadesinin depresojenik ve anksiyojenik olduğu, ancak ifade baskılamasının davranışta önemli bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir. Ek olarak, NUDT6 fazla ifadesinin dürtüsellik-benzeri davranışa etkisi olabileceği gözlenmiştir, bu bağlantı ileri çalışmalarla netleştirilmelidir. NUDT6'nın etkilerine aracılık eden mekanizmaların ortaya konması, depresyonun ve anksiyete bozukluklarının patogenezinin daha iyi anlaşılması için büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: NUDT6, FGF2, “*antisense*”, depresyon, anksiyete

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından THD-2016-11687 proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Hökelekli, F.Ö. The Effects of NUDT6 Expression Changes in Prefrontal Cortex on Depression- and Anxiety-like Behaviour in Rats, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences PhD thesis in Basic Neurological Sciences (Neuroscience), Ankara, 2018. Natural antisense transcripts are mRNA molecules, which are synthesized from the anti-sense strand of a protein coding gene. They are complementary to the sense transcript and thought to regulate its expression. NUDT6 is the natural antisense transcript of FGF2 and is involved in the control of FGF2 expression. The antidepressant and anxiolytic effects of FGF2 makes it worth to study the role of NUDT6 in affective behaviour. Previously in our lab, chronic restraint stress was shown to decrease NUDT6 expression in prefrontal cortex (PFC). Based on this finding, we investigated the effects of NUDT6 expression changes in rat PFC on depression- and anxiety-like behaviors. NUDT6 was overexpressed and NUDT6 expression was knocked down by AAV2 injections. Depression-like behaviour was tested using sucrose preference test and forced swim test, anxiety-like behaviour was evaluated by elevated plus maze and light-dark box test and learning was investigated using passive avoidance test. The animals were sacrificed for molecular investigations. It was shown that NUDT6 overexpression in PFC is depressogenic and anxiogenic. NUDT6 knockdown in PFC, on the other hand, does not cause any significant changes on behavior. Additionally, it was shown that NUDT6 overexpression in PFC might have an influence on impulsivity-like behaviour, which needs to be addressed in future studies. It is of great importance to elicit the molecular mechanisms underlying NUDT6 effects in order to understand the pathogenesis of major depression and anxiety disorders.

Key Words: NUDT6, FGF2, antisense, depression, anxiety

This study was supported by Hacettepe University Research Projects Coordination Unit with the project number THD-2016-11687.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİRKİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Depresyon	4
2.2. Prefrontal Korteks	5
2.3. Depresyonda FGF2	9
2.4. Doğal "Antisense" Transkriptler	11
2.5. NUDT6	12
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Deney Deseni	19
3.2. Kullanılan Hayvanlar ve Barındırma Koşulları	20
3.3. Adeno-ilişkili Virüs	20
3.4. Cerrahi	22
3.5. Cerrahi Sonrası Gözetim	25
3.6. Davranış Deneyleri	25
3.6.1. Sükroz Tercihi Testi (STT)	25
3.6.2. Yükseltilmiş Artı Labirenti (YAL)	26

3.6.3. Aydınlık-Karanlık Kutusu (AKK)	27
3.6.4. Zorla Yüzdürme Testi (ZYT)	27
3.6.5. Pasif Kaçınma Testi (PK)	28
3.7. Sakrifikasyon	28
3.8. Moleküler ve İstatistik Verilerin Analizi	30
3.8.1. Western Blotlama	30
3.8.2. İmmunohistokimya (İHK)	33
3.8.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Deneyle (PCR)	34
3.8.4. Yöntem Optimizasyonu ile İlişkili Çalışmalar	35
3.8.5. Veri Analizi	37
4. BULGULAR	38
4.1. Moleküler Deneyle	38
4.1.1. WB ve Kantitatif PCR	38
4.1.2. İHK ve PCR	42
4.2. Davranış Deneyle	47
4.2.1. NUDT6 Fazla İfadesinin Davranışsal Etkileri	47
4.2.2. NUDT6 İfade Baskılamasının Davranışsal Etkileri	58
5. TARTIŞMA	69
5.1. Viral Enfeksiyonun ve AAV2 Aracılı NUDT6 Değişikliklerinin Moleküler Teyidi	69
5.2. NUDT6 Aşırı İfadesinin Davranışsal Etkileri	71
5.3. NUDT6 İfade Baskılamasının Davranışsal Etkileri	74
6. KAYNAKLAR	78
7. EKLER	
EK 1: Etik Kurul İzni	
EK 2: Tez Çalışmasının Posteri	
EK 3: RIPA Tamponu Tarifi	
EK 4: Donma Karşıtı Çözelti Tarifi	
8. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

(e)GFP	(güçlendirilmiş) yeşil floresan protein
AAV	adeno-ilişkili virus
AKK	aydınlık-karanlık kutu
AP	anteroposterior
CMV	sitomegalovirüs
DV	dorsoventral
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FGF-AS	Fibroblast büyüme faktörü " <i>antisense</i> "i
İHK	immunohistokimya
ML	medyolateral
mm	milimetre
mRNA	mesajcı ribonükleik asit
NUDT6	Nudiks Hidrolaz 6
PBS	fosfatla tamponlanmış salin
PCR	polimeraz zincir reaksiyonu
PFA	paraformaldehit
PFK	prefrontal korteks
PK	pasif kaçınma
RNA	ribonükleik asit
rpm	dakikadaki devir sayısı
siRNA	kısa araya giren RNA
STT	sükroz tercihi testi
µg	mikrogram
WB	western blot
YAL	yükseltilmiş artı labirenti
YLD	yeti yitimi ile geçirilen yıllar (" <i>years lived with disability</i> ")
ZYT	zorla yüzdürme testi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
2.1:	Karşılaştırmalı olarak insan ve sıçan medyal PFK'sı.	6
2.2:	FGF2 ve NUDT6 genleri.	13
2.3:	Seg1 insan akciğer adenokarsinomu hücre hattında FGF2 ifadesinin NUDT6 ile kontrolü	14
3.1:	Deneylerin akış şeması.	19
3.2:	Sıçan NUDT6 mRNA dizisi .	22
3.3:	Sıçan beyin atlasında hedeflenen enjeksiyon koordinatları	24
3.4:	Parasaggital insizyon.	29
3.5:	Diğer insizyonlar.	30
3.6:	Pozitif ve negatif kontrolü ile GFP WB'si.	35
3.7:	Pozitif ve negatif kontrolü ile eGFP WB'si.	36
4.1:	NUDT6 fazla ifadesi ve kontrol grubu örneklerinin WB'si.	38
4.2:	NUDT6 siRNA ile karma siRNA grubu örneklerinin WB'si.	39
4.3:	NUDT6 fazla ifade grubunun β -Aktine oranlanmış FGF2 ve FGF2'ye oranlanmış NUDT6 protein ifadesi.	40
4.4:	NUDT6 ifade baskılaması grubunun β -Aktine oranlanmış FGF2 ve FGF2'ye oranlanmış NUDT6 protein ifadesi.	40
4.5:	Fazla ifade grubu deneylerinde NUDT6 kantitatif PCR'ında NUDT6 mRNA ifadesinin iç kontrol olarak kullanılan β -aktinin mRNA ifadesine oranı.	41
4.6:	İfade baskılaması grubu deneylerinde NUDT6 kantitatif PCR'ında NUDT6 mRNA ifadesinin iç kontrol olarak kullanılan β -aktinin mRNA ifadesine oranı.	42
4.7:	Fazla ifade grubundan bir hayvanın işaretleme olmaksızın DAPI çekirdek boyası ile kapatılmış kesidinin yeşil ve kırmızı kanallardaki görüntüleri.	43
4.8:	Fazla ifade grubundan bir hayvanın eGFP işaretlemesi.	44
4.9:	Tüm gruplarda eGFP PCR'ı.	45
4.10:	NUDT6 fazla ifadesi ve kontrol grubundan birer hayvandan alınan kesidin NUDT6 işaretlemesi.	46

4.11: NUDT6 siRNA ve karma siRNA grubundan birer hayvanın NUDT6 işaretlemesi.	47
4.12: NUDT6 fazla ifadesi grubunda YAL'de açık kolda ve kapalı kolda süre bulguları.	49
4.13: NUDT6 fazla ifadesi grubunda YAL'de açık kola girme gecikmesi (a) ve açık kola girme sayısı (b).	50
4.14: NUDT6 fazla ifadesi grubunda AKK'de gecikme.	51
4.15: NUDT6 fazla ifadesi grubunda AKK'de gecikmenin sağkalım grafiği.	52
4.16: NUDT6 fazla ifadesi grubunda AKK'de geçiş sayısı.	53
4.17: NUDT6 fazla ifadesi grubunda AKK'de aydınlıkta toplam süre.	54
4.18: NUDT6 fazla ifadesi grubunda STT bulguları.	55
4.19: NUDT6 fazla ifadesi grubunda ZYT bulguları.	57
4.20: NUDT6 fazla ifadesi grubunda PK bulguları.	58
4.21: NUDT6 ifade baskılaması grubunda YAL'de kat edilen toplam mesafe.	59
4.22: NUDT6 ifade baskılaması grubunda YAL'de açık ve kapalı kolda süre bulguları.	60
4.23: NUDT6 ifade baskılaması grubunda YAL'de açık kola girme gecikmesi (a) ve açık kola girme sayısı (b).	61
4.24: NUDT6 ifade baskılaması grubunda AKK'de gecikme.	62
4.25: NUDT6 ifade baskılaması grubunda AKK'de gecikmenin sağkalım grafiği.	63
4.26: NUDT6 ifade baskılaması grubunda AKK'de geçiş sayısı.	64
4.27: NUDT6 ifade baskılaması grubunda AKK'de aydınlıkta toplam süre.	64
4.28: NUDT6 ifade baskılaması grubunda STT bulguları.	65
4.29: NUDT6 ifade baskılaması grubunda ZYT bulguları.	67
4.30: NUDT6 ifade baskılaması grubunda PK bulguları.	68

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	NUDT6 ve FGF2'yi bir arada ele alan hücre kültürü ve doku çalışmaları.	15
2.2.	Stres ile NUDT6 ifadesindeki değişimi inceleyen çalışma sonuçlarının karşılaştırması.	18
4.1.	Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması YAL'de distal açık kola girme yüzdeleri.	61



1. GİRİŞ

Doğal “*antisense*” transkriptler çoğunlukla protein kodlayan bir DNA zincirinin (“*sense*” zincir) karşı zincirinden (“*antisense*” zincir) sentezlenen ve “*sense*” mRNA’ya tamamlayıcı (“*complementary*”) olan, onun ifadesini düzenlemekte görev alan mRNA molekülleridir. Fare ve insan transkriptomundaki transkriptlerin %72’ye yakınının “*antisense*” partnerleri olduğu ve yüzlerce “*sense-antisense*” çiftinin türler arasında korunduğu; dolayısıyla doğal “*antisense*” transkriptlerin yaygın bir fenomen olduğu bilinmektedir (1). Bu çiftlere bir örnek FGF2 ve onun “*antisense*” partneri Nudiks Hidrolaz 6 (NUDT6)'dır (diğer isimleriyle FGF-AS ya da GFG) (2,3).

NUDT6, FGF2 ifadesini düzenleyen bir doğal “*antisense*” transkripttir. Bu çalışmada NUDT6’nın duygudurum düzenlenmesindeki rolünün araştırılma nedeni “*sense*” partneri FGF2’nin depresyon ve anksiyete patofizyolojisindeki rolünün önceki çalışmalarda ortaya konmuş olmasıdır. Depresyonun nörotrofik hipotezinde son 10 yılda en çok ele alınan moleküllerden biri FGF2’dir. Majör depresif bozukluğu olan hastaların ölümardı beyin incelemesinde, hipokampusta, dorsolateral prefrontal kortekste ve anterior singulat kortekste FGF2’nin ifadesinin azaldığının gösterilmesi (4,5) nörotrofik hipotezde diğer büyüme faktörlerinin yanı sıra FGF2’nin rolünü de gündeme getirmiş ve sonrasında yapılan hayvan çalışmaları ile bu bulgular desteklenmiştir. Hayvanlarda depresyonu modellemek için kullanılan sosyal yenilgi stresinde hipokampal FGF2 ifadesinin azaldığı (6), depresyona meyilli ve anksiyetesi yüksek olacak biçimde seçilerek kendi aralarında çiftleştirilen hayvan gruplarında FGF2 ifadesinin nesiller boyu düşük seyrettiği gösterilmiştir (7). Buna karşılık, FGF2’nin parenteral ve intraserebroventriküler verilmesinin antidepresan ve anksiyolitik etkinliği olduğu ortaya konmuştur (7–10). Ayrıca, antidepresan tedavi ile FGF2 düzeyinin kortekste ve hipokampusta arttığı gösterilmiştir (11,12). FGF reseptörünü antagonize eden bir molekülün verilmesinin, antidepresanların kronik tahmin edilemeyen stres paradigması ile oluşturulan depresyon-benzeri davranışı engelleyici etkisinin önüne geçmesi de (10), FGF2’nin depresyon patogenezindeki rolünü destekleyen önemli bir bulgudur. Tüm bu veriler bir arada

değerlendirildiğinde, FGF2 afektif davranışın düzenlenmesinde önemli rolü olan bir moleküldür. FGF2 ifadesini düzenleyen moleküllerin araştırılması hem depresyon patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasını hem de yeni antidepresan tedavi hedefleri belirlenmesini sağlama potansiyeline sahiptir. Söz konusu düzenleyici moleküller arasında yer alan NUDT6 literatürde az ele alınmıştır ve bu bağlamdaki rolü ortaya çıkarılmalıdır.

Literatürde NUDT6'ya yer verilen oldukça az sayıdaki çalışmada, çoğunlukla molekülün proteine çevrildiği, hücrenin çekirdek ve mitokondrisinde çokça bulunurken lizozomlarda neredeyse hiç bulunmadığı, yüksek oksidatif strese maruz kalan karaciğer, beyin ve testis gibi dokularla ifadesinin arttığı ortaya konmuştur (13–15). Bununla birlikte, moleküle net bir işlev atfedilememiştir. Bu molekülü içeren hücre kültürü ve doku çalışmalarında NUDT6'nın FGF2'yi düzenleyici etkisine yer verilmiştir ve çoğunlukla bu iki molekülün ifadesinin ters ilişkili olduğu, yani biri artarken diğerinin azaldığı gösterilmiştir (16–19). Ancak bunun aksini gösteren çalışma bulgusu da vardır (20). NUDT6 ve stres ilişkisi ise literatürde yalnızca bir tek çalışmada ele alınmıştır. Bu çalışmada, akut stres, kuyruk şoku ile modellenmiş ve şoku takiben hipokampusta NUDT6 mRNA'sının azaldığı, FGF2 mRNA düzeyinin ise değişmediği gösterilmiştir. Şokun ardından 2.saatte ise NUDT6 düzeyi bazal seviyesine dönmüştür ve FGF2 mRNA'sı artmıştır (21). Laboratuvarımızda daha önceden yapılmış bir çalışmada, kronik hareketsiz bırakma stresinin PFK'da NUDT6 protein ifadesinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır (22). Bu çalışmaların ortak sonucu, stresle NUDT6 ifadesinin azalmasıdır. Bu bulguyu iki biçimde yorumlamak mümkündür: İlki, NUDT6, stres etkisiyle azalıyor olabilir veya ikinci olarak, stresin etkilerini dengelemek amacıyla NUDT6 ifadesi, organizma tarafından, telafi edici bir yöntem olarak azaltılıyor olabilir.

Bu bulgulardan yola çıkılarak bu çalışmada NUDT6 molekül seviyesindeki artma ve azalmanın depresyon- ve anksiyete-benzeri davranışa etkisi incelenmiştir. Çalışma için insanda depresyon ve anksiyete ile bağlantısı olduğu ortaya konmuş olan medyal PFK'ya sıçan beyinde karşılık gelen prelimbik ve infralimbik korteksler seçilmiştir. Bu

bölgenin seçilmesinin bir nedeni yukarıdaki paragrafta belirtildiği gibi laboratuvarımızda kronik stresin PFK NUDT6 düzeylerinde azalmaya yol açtığı tespit edilmesidir. Bunun yanı sıra literatürde hem depresyon hastalarının PFK hacminde küçülme (23,24) hem de ölümdür beyin incelemelerinde PFK sinaps sayısında azalma gösterilmiştir (25). Bu bulguları destekleyecek şekilde, kemirgenlerde stres ile PFK'da nöronal atrofi ve glia kaybı bildirilmiştir (26,27). Prelimbik ve infralimbik bölgelerin birlikte seçilmesinin nedeni, literatürde stres ve depresyon alanındaki çalışmaların birçoğunda iki korteksin birlikte çalışılmış olmasıdır (28–31).

Bu çalışma, NUDT6'nın depresyon- ve anksiyete-benzeri davranış ile ilişkisini ortaya koymak üzere iki bölümden oluşturulmuştur. Çalışmanın ilk bölümünde NUDT6 fazla ifadesi; ikinci bölümünde ise NUDT6 ifade baskılaması sıçan prelimbik ve infralimbik kortekslerinin her ikisine de AAV2 enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon etkisinin yerleşmesi için 4 hafta beklenmiş, bu sürenin ardından depresyon-benzeri davranış sükröz tercihi testi ve zorla yüzdürme testi ile; anksiyete-benzeri davranış yükseltmiş artı labirenti ve aydınlık-karanlık kutu testi ile; öğrenme ise pasif kaçınma testi ile değerlendirilmiştir. Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesinin depresojenik ve anksiyojenik olduğu, fakat bağlamsal öğrenmeyi değiştirmedeği gösterilmiştir. Buna ek olarak, NUDT6 fazla ifadesinin dürtüsellik-benzeri davranışı artırıyor olabileceği ortaya konmuştur. NUDT6 ifade baskılaması deneyleri sonucunda öğrenmeyi de içerecek biçimde ne depresyon- ne de anksiyete-benzeri davranışta önemli bir değişiklik gözlenmiştir. Bu sonuç medyal PFK'da NUDT6 fazla ifade eden grubun sonuçlarıyla çelişmektedir. Viral enfeksiyonun gerçekleştiği gösterildiği halde, NUDT6 ifadesinin baskılandığının moleküler deneylerle teyit edilememesi, baskılanma sağlanamamış olması olasılığını akla getirmektedir. NUDT6 ifadesinin baskılanmamış olması, fazla ifade ve ifade baskılaması deneylerinin afektif davranışla ilişkili sonuçları arasındaki çelişkiyi açıklayabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Depresyon

Major depresif bozukluk; çökkün duygudurum, hayattan zevk alamama, umutsuzluk, iştah ve uyku problemleri, artmış ya da azalmış aktivite, enerji yoksunluğu, suçluluk ve değersizlik düşünceleri, dikkat ve odaklanmada güçlük, ölüm ve intihar düşünceleri ile karakterize klinik bir sendromdur. Depresyon uzun süreli ve ağır hal alabilir, bu durumda kişinin günlük yaşamını, iş performansını, aile ve arkadaş ilişkilerini etkileyen önemli bir sağlık sorunu teşkil eder (32).

Depresyon hem düşük hem yüksek gelirli ülkelerde görülmektedir, dünya toplumları için ortak bir sorundur (33). Dünya çapında en az 300 milyon insan depresyonla yaşamaktadır (32). Her yıl yaklaşık 20 milyon depresyon hastası intihara teşebbüs etmekte, bunlardan 1 milyonu hayatına son vermektedir (34).

Depresyon çocukluktan yaşlılığa kadar neredeyse her yaş grubunda görülmektedir, özellikle üretime katılan yaştaki bireylerde depresyon oldukça sıktır (35). Depresyonun en çarpıcı etkisi hastalığa bağlı yeti yitimi ile geçirilen yıllar ("*years lived with disability*"- YLD) üzerinedir. Ruhsal hastalıklar ve madde bağımlılıkları dünya çapında %22.9 ile YLD'de ilk sırayı almaktadır ve bu grup içinde en büyük pay ise %42.5 ile depresif bozukluklara aittir (35).

Depresyon tedavisinde kullanılmakta olan antidepresanların etkinliğini sınırlayan çok sayıda önemli sorun vardır. Bunlardan ilki, kısmi ve tam ilaç cevapsızlığı, diğer adıyla ilaç direncidir. Depresyon hastalarının yaklaşık %30'u tedaviye dirençlidir (36). İkinci sorun, geç ilaç yanıtıdır: İlaça cevap veren hastalarda klinik cevabın ortaya çıkması haftaları bulabilmektedir. Son olarak da, ilaçların etkinlik süreleri kullanıldıkları dönemle sınırlıdır (37) ve kronik depresyonda hasta, yaşamı boyu ilaç kullanmak durumunda kalmaktadır.

Yaygınlığının ve tedavi güçlüğüünün doğal bir sonucu olarak, depresyonun ekonomik yükü, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde 2010 yılında 210.5 milyar

dolardır. Bu yükün %45'i doğrudan depresyonla ilgili harcamalara aitken, %5'i intiharla ilişkili, %50'si işe gidememe ve işgücü kaybını içerecek şekilde işyeri ilişkili harcamalara aittir (38). Depresyon, ilişkili olduğu belirtiler nedeniyle bireyin yaşamı ve yaşam kalitesi ile ilgili olduğu kadar, toplumsal yükü nedeniyle halk sağlığı açısından da çok önemli bir sorundur.

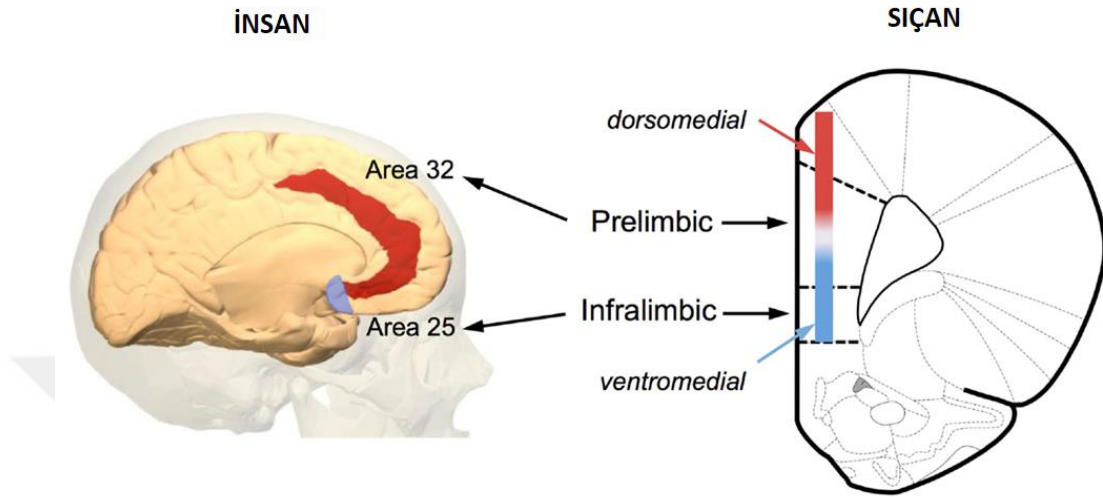
Antidepresan tedavideki zorlukların yanı sıra, depresyon tanısında ve tedavi takibinde kullanılacak bir biyolojik belirtecin olmaması, hastalığın tanı ve takibini güçleştirmektedir. İlaç direncinin yüksekliği düşünüldüğünde, kullanılmakta olan ilacın tedavide etkin olmadığı erken dönemde belirlenmesi çok önemlidir. Depresyon patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması, hem tanı ve tedavide kullanılacak biyolojik belirteçlerin tespitine hem de daha etkin ve hızlı etkili antidepresanların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu nedenle depresyon patofizyolojisinin ortaya konması büyük önem taşımaktadır.

2.2. Prefrontal Korteks

Prefrontal korteks (PFK), değişen çevresel ihtiyaçlara göre davranışı yöneten bilişsel, davranışsal ve nöroendokrin süreçleri düzenleyen yürütücü işlevlerin merkezidir (39) ve depresyonda önemi literatürde çokça çalışılmış bir beyin bölgesidir. Majör depresyon tanısı almış hastalarda yapılan görüntüleme çalışmaları, hastaların PFK hacminin küçüldüğünü (23,24); ölüm-ardı beyin araştırmaları depresyon hastalarının PFK'larında sinaps sayısının azaldığını göstermiştir. Bunu destekleyecek şekilde kemirgenlerde depresyonu modellemek amacıyla uygulanan stresin PFK'da nöron ile glia kaybına ve dendritik atrofiye neden olduğu bildirilmiştir (26,27).

PFK, fonksiyonlarının karmaşıklığı ile uyumlu olarak pek çok alt bölgeye sahiptir. Primat PFK'sı en genel haliyle 3 bölgeye ayrılır: medyal, orbital ve dorsolateral. Medyal PFK evrimsel süreçte en korunmuş olan bölümdür ve insanda Broadmann'ın 10, 24, 25 ve 32 numaralı alanlarını kapsayan kısımdır (40). Sığıncada ise medyal PFK birbirinden net yapısal sınırlarla ayrılmayan prelimbik ve infralimbik korteks olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Sınırların belirsizliğine binaen bölge,

prelimbik korteksi içine alan dorsomedyal korteks ve infralimbik korteks ile ventral prelibmik korteksi içine alan ventromedyal korteks olarak da sınıflandırılmaktadır (41; Şekil 2.1). Bu çalışmada prelibmik ve infralimbik korteks ifadeleri tercih edilmiştir.



Şekil 2.1: Karşılaştırmalı olarak insan ve sıçan medyal PFK'sı.

Alan 32, prelibmik kortekse; alan 25 ise infralimbik kortekse karşılık gelmektedir. *Şekil, Gass, 2017'den uyarlanmıştır (41).*

Anatomik bağlantılarına ve hüresel mimari organizasyona (*cytoarchitecture*) dayanarak yapılan belirlemelere göre sıçan infralimbik korteksi insanda 25 numaralı subgenual alana denk gelmektedir. Prelimbik korteks ise, kabaca, insanın Broadmann'ın 32 numaralı perigenual korteksine denk gelmektedir. Detaylı olarak değerlendirildiğinde ise, bu korteksin 32ac ya da 32 pl bölümüne karşılık geldiği görüşünü destekleyen argümanlar bulunmaktadır (Bu konudaki gözden geçirme için bakınız (42)). Sıçan ve insan beyin bölümleri arasındaki bu analogi, fonksiyonel benzerlikten çok anatomik benzerliğe dayanmaktadır (43).

Sıçan medyal PFK'sı beyinde pek çok bölge ile bağlanmaktadır. Prelimbik ve infralimbik kortekslerin talamus ve olfaktör önbeyin ve kortekse projeksiyonları ortaktır, fakat bunun dışındaki projeksiyonları önemli farklılıklar göstermektedir. Buna göre prelibmik korteks temel olarak insula, akkumbens çekirdeği, raphe çekirdekleri, amigdalanın santral ve basolateral çekirdeklerine projeksiyonlara sahipken; infralimbik korteks hipotalamusa, beyin sapının soliter ve parabrakial

çekirdeğine, amigdalanın medyal, basomedyal, santral ve kortikal çekirdeklerine projekte olmaktadır. İki bölgenin bu farklı projeksiyon örüntüleri prelimbik korteksin limbik ve bilişsel fonksiyonlarıyla ve infralimbik korteksin viseral ve otonomik fonksiyonlarıyla uyumludur (44).

İnsanda, sıçandaki prelimbik ve infralimbik korteksin karşılığı olan subgenual ve perigenual kortekslerin fonksiyonuna ilişkin çeşitli çalışmalar vardır. Görüntüleme çalışmaları, depresyonda subgenual kortekste aktivite artışı olduğunu (45–49), antidepresan ilaç ve derin beyin uyarımına cevap veren hastalarda tedaviyi takiben bu bölgenin aktivitesinde azalma eğilimi olduğunu göstermiştir (14-16). Hatta sağlıklı bireylerde olumsuz duygulanımda bu bölgenin aktifleştiği (51–53) ve bu bölgenin olumlu ya da nötr uyaranlardan çok itici (*aversive*) uyarana cevap verme eğilimde olduğu ortaya konmuştur (54). Aksine, depresyonda perigenual anterior singulat kortekste aktivitenin azaldığı gösterilmiştir (42). İnsan korku çalışmalarında ventromedyal PFK'nın korku ifadesini (*fear expression*) baskıladığı ve korku sönmesi (*fear extinction*) sırasında aktivitesinin arttığı gösterilmişse de bu etkilerin gözlemlendiği bölgelerin sıçandaki herhangi bir bölgenin doğrudan analogu olmadığı ifade edilmiştir (42).

Sıçanda prelimbik ve infralimbik korteksi korku, stres ve depresyon alanlarında ele alan birçok çalışma yapılmıştır. Korku çalışmalarında, prelimbik korteksin elektriksel uyarımının korku ifadesini artırdığı ve korku sönmesini engellediği gösterilmiştir (55). Bu bölgenin farmakolojik inaktivasyonunun korku ifadesini azalttığı (56,57), ancak korku sönmesine etkisiz olduğu bildirilmiştir (57). İnfalimbik korteksin elektriksel uyarımının ise prelimbik korteksin elektriksel uyarımının tam aksine, korku ifadesini azalttığı ve korku sönmesini güçlendirdiği gösterilmiştir (58). Yine prelimbik korteksin tersine, infralimbik korteksin farmakolojik inaktivasyonunun korku ifadesine etkisinin olmadığı ancak korku sönmesini bozduğu ifade edilmiştir (57). Dolayısıyla iki bölgenin korku alanında birbiri ile uyumsuz, yer yer birbirine ters etkileri literatürde ortaya konmuştur.

Sıçanda prelimbik ve infralimbik korteksi stres ve depresyon alanlarında ele alan çalışmalara gelindiğinde, stres yanıtında bu bölgelerin etkili olduğu gösterilmiştir. Akut hareketsiz bırakma stresinin sıçanda belirgin taşikardiye yol açtığı bilinmektedir. Korku çalışmaları bulgularından farklı olarak, prelimbik korteksin farmakolojik inaktivasyonu akut hareketsiz bırakma stresi ile tetiklenen taşikardiyi artırırken infralimbik korteksin farmakolojik inaktivasyonu taşikardiyi azaltmaktadır (28). Laboratuvarımızda önceki çalışmalarda kronik hareketsiz bırakma stresinin prelimbik ve infralimbik korteksi içine alan PFK'da NUDT6 ifadesinde %40'a ulaşan anlamlı bir azalmaya neden olduğu literatürde ilk kez gösterilmiştir. Bu bulgular, akut ve kronik stres ile prelimbik ve infralimbik korteksin bağlantısını ortaya koymakta ve NUDT6'yı bu bağlantıda araştırılması gereken bir molekül olarak öne çıkarmaktadır (22).

Prelimbik ve infralimbik korteksin akut hareketsiz bırakma stresi üzerine birbirine zıt fonksiyonları ile uyumlu biçimde, depresyon çalışmalarında da bu beyin bölgelerinde aktivite farklılıkları gösterilmiştir. Sıçanda infralimbik korteksin, tek başına, optogenetik olarak uyarımının ketaminin hızlı başlayan ve uzun süren antidepresan etkilerini taklit ettiği, yani antidepresan nitelikte olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık prelimbik korteks benzer şekilde uyarıldığında depresyon-benzeri davranışta değişiklik olmadığı ifade edilmiştir (29). Bunun yanı sıra, infralimbik korteksin farmakolojik aktivasyonunun hızlı bir antidepresan etki yaptığı, fakat prelimbik korteksin farmakolojik aktivasyonunun etkisiz olduğu da ortaya konmuştur (30). İnftralimbik korteksin bu alandaki önemini destekler şekilde, bu bölgeye doğrudan ketamin ya da sitalopram enjeksiyonunun antidepresan etki ile sonuçlandığı gösterilmiştir (29,30). Bu çalışmalardan farklı olarak, prelimbik korteksin ve infralimbik korteksin ayrı ayrı farmakolojik inaktivasyonunun her ikisinin de antidepresan etki gösterdiği de bildirilmiştir (59). Bu çalışma ile uyumlu olarak, insanda tedaviye dirençli depresyon tedavisinde etkili olduğu bildirilen ve inhibitör mekanizmaları uyararak etki gösterdiği düşünülen subkallosal singulat girus derin beyin uyarımını modellemek amacıyla, sıçanda infralimbik ve ventral prelimbik korteksi içine alan geniş bir bölgeye derin beyin uyarımı yapılmış ve antidepresan ile

anksiyolitik etkinlik gözlenmiştir (31). Bir arada değerlendirildiğinde, bu çalışmalar iki bölgenin depresyonda ve antidepresan etkinliğe aracılıktaki rolünde literatürde bir birlik olmadığını ortaya koymaktadır.

Literatür özetlendiğinde, prelimbik ve infralimbik korteksin ve bunlara karşılık gelen insan perigenual ve subgenual korteksinin stres, depresyon ve korku öğrenimi alanında önemli beyin bölgeleri olduğu görülmektedir. Bu nedenle NUDT6 ifade değişikliklerinin depresyon- ve anksiyete-benzeri davranışa etkilerine bu bölgelerin aracılık edip etmediğinin araştırılması önem taşımaktadır.

2.3. Depresyonda FGF2

Depresyon patofizyolojisinde büyüme faktörlerinin rolü birçok çalışmada ortaya konmuştur ve "depresyonun nörotrofik hipotezi" olarak literatürde yerini almıştır. Söz konusu büyüme faktörlerinden biri fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2)'dir (4). FGF2, nörotrofik, anjiojenik, onkojenik aktivitesi bulunan, yaygın sentezlenen bir proteindir (3). Erken embriyonik gelişim sırasında nöral tüp tarafından ifade edilmekte ve nöral indüksiyonda görev almakta (60); embriyonik gelişimin daha geç safhalarında gelişmekte olan korteks ile nöral prekürsör hücreler tarafından ifade edilmekte ve nöral kök hücrelerin çoğalmasında etkili olmaktadır (61). Erişkinde ise, nöronlar ve glial hücreler tarafından yaygın olarak ifade edilmekte (62); bu hücrelerin hayatta kalımı, farklılaşması ve çoğalmasında rol almaktadır. Bununla uyumlu olarak, yeni sinaps oluşumu, nörogenez, öğrenme ve bellekte etkili olduğu da ortaya konmuştur (63–65).

Son 15 yılda yapılan 2 çalışmada majör depresif bozukluğu olan hastaların ölüm sonrası beyinlerinde FGF2 ifadesinin hipokampusta ve dorsolateral PFK ile anterior singulat kortekste azaldığı gösterilmiştir (4,5). Bununla uyumlu olarak, hayvanlarda depresyonu modellemek için kullanılan sosyal yenilgi stresinde hipokampal FGF2 ifadesinde düşme olduğu (6), antidepresan tedavi ile serebral korteks ve hipokampusta FGF2 düzeyinin arttığı gösterilmiştir (11,12). Ancak antidepresan tedavi sırasında FGF reseptör antagonisti (SU5402) verildiğinde FGF2

artışı görülmemiştir. SU5402 uygulaması, antidepresan etkiyi de ortadan kaldırmıştır (10). Takip eden çalışmalarda, FGF2'nin periferden ya da beyne doğrudan intraserebroventriküler olarak verilmesinin antidepresan ve anksiyolitik etkinliği olduğunun gösterilmesi FGF2'nin depresyon patofizyolojisinde doğrudan rolü olduğunu ortaya koymuştur (7–10).

Buna ek olarak, anksiyete-benzeri davranış bakımından anksiyetesi düşük ya da yüksek olarak sınıflanarak birbiriyle çiftleştirilen ve böylece nesiller boyu depresyona meyilli ve anksiyetesi yüksek seyreden hayvan gruplarında, FGF2 ifadesi düşük bulunmuştur. Bu hayvan gruplarında FGF2'nin periferal verilmesinin anksiyeteyi azalttığı gösterilmiştir. Kemirgenlerde anksiyete-benzeri davranış azalttığı bilinen çevresel zenginleştirmenin, bu hayvan grubunda hipokampal FGF2 düzeyini artırdığı belirtilmiştir (3,7,10). Tüm bunlarla uyumlu olarak, PFK'nın prelimbik bölümüne yapılan FGF2 infüzyonunun, kronik öngörülemeyen stres paradigması tarafından oluşturulan depresyon- ve anksiyete-benzeri davranış gelişimini engellediği ortaya konmuştur (10). Benzer şekilde, FGF2 ifadesinin hipokampusta RNA interferansı ile baskılanmasının anksiyete-benzeri davranış artırması (66), FGF2'nin endojen bir anksiyolitik molekül olabileceği hipotezini gündeme getirmiştir (67).

Anksiyolitik ve antidepresan özellikleri yanında, FGF2 bilinen bir onkojendir; ifadesinin bozulmasının glial kökenli santral sinir sistemi tümörlerinin patogeneğinde yer aldığı gösterilmiştir. Malign gliomların %90'dan çoğunda FGF2 ifade edilmektedir (68). Dolayısıyla, antidepresan ve anksiyolitik özelliklerine rağmen, FGF2 tümör gelişimine neden olmaktadır ve bu durum, FGF2'nin klinikte antidepresan olarak kullanılmasını sınırlandırmaktadır. Buna karşın, FGF2 ifadesini düzenleyen moleküllerin araştırılması hem depresyon patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasını hem de yeni antidepresan tedavi hedefleri belirlenmesini sağlayabilir.

2.4. Doğal “Antisense” Transkriptler

Doğal “*antisense*” transkriptler çoğunlukla protein kodlayan bir DNA zincirinin (“*sense*” zincir) karşı zincirinden (“*anti-sense*” zincir) sentezlenen ve “*sense*” mRNA’ya kısmen ya da tamamen tamamlayıcı (“*complementary*”) olan mRNA molekülleridir. “*Sense*” ve “*antisense*” çiftlerin genomdaki yerleşimi ve birbirlerini tamamlayıcılıklarının derecesi ele alınan “*sense-antisense*” çiftine göre büyük değişiklik göstermektedir. Genelde, “*sense*” zincirden protein sentezlenirken, “*antisense*” mRNA proteine çevrilmemektedir, fakat bu durumun istisnaları da mevcuttur (2).

Doğal “*antisense*” transkriptlerin işlevine yönelik en çok kabul gören görüşe göre doğal “*antisense*” transkriptler, fizyolojik ve patolojik koşullar altında “*sense*” mRNA ifadesinin düzenlenmesinde görev almaktadır ve bunu mRNA’dan proteine çevirimin neredeyse her aşamasıyla etkileşerek yapabilmektedir (69). Bu moleküllerin, prokaryotlarda “*sense*” mRNA’dan protein sentezini düzenlediği on yıllardır biliniyor olmasına rağmen, son yıllarda daha yüksek yapılı canlılarda da benzer rolü olduğu ortaya konmuştur (70,71). “*Sense*” ve “*antisense*” transkriptler arasındaki ilişki oldukça karmaşıktır, birbirlerinin ifadelerini benzer veya zıt yönde etkileyebilirler. Başka bir deyişle birinin ifadesindeki artış diğerinin ifadesini artırabilir (benzer yönde) ya da azaltabilir (zıt yönde) (2,69).

Yapılan çalışmalar, önceden kabul edilen aksine, doğal “*antisense*” transkriptlerin nadir bir fenomen olmadığını, fare ve insan transkriptomundaki transkriptlerin %72’ye yakınının “*antisense*” partnerleri olduğunu ve yüzlerce “*sense-antisense*” çiftinin türler arasında korunduğunu göstermektedir (1). Bu çiftlerden biri FGF2 ve onun “*antisense*” partneri Nudiks Hidrolaz 6 (NUDT6)’dır (Diğer isimleriyle FGF-AS ya da GFG) (2,3). p15 ve p15-AS, p21 ile p21-AS, ApoE ve ApoE-AS “*sense-antisense*” çiftlere örnek olarak verilebilir (2). Doğal “*antisense*” transkriptler odaklanmış etkileri ve düşük yan etki profilleri nedeniyle klinik çalışmalarda da kullanılmaktadır. Örneğin, fomivirsen sodyum insan sitomegalovirüsünün “*major immediate early region 2*” mRNA’sında bir bölgeyi tamamlayıcı diziye sahiptir, bu

tamamlayıcılık neticesinde söz konusu mRNA'ya bağlanmakta ve onun proteine çevrilmesini, dolayısıyla virüsün çoğalmasını ve CMV retinitini engellemektedir (69,72). Fomivirsen sodyum, FDA tarafından 1998'de onaylanarak tedavide kullanılan ilk "*antisense*" antiviral ilaç olmuştur.

FGF2'nin bir önceki bölümde bahsedilen, depresyon ve anksiyete ile ilişkisi göz önüne alındığında, FGF2 ve NUDT6, doğal "*antisense*" transkriptlerin bu alanlardaki olası rolünün açığa çıkarılması için iyi birer aday olabilir.

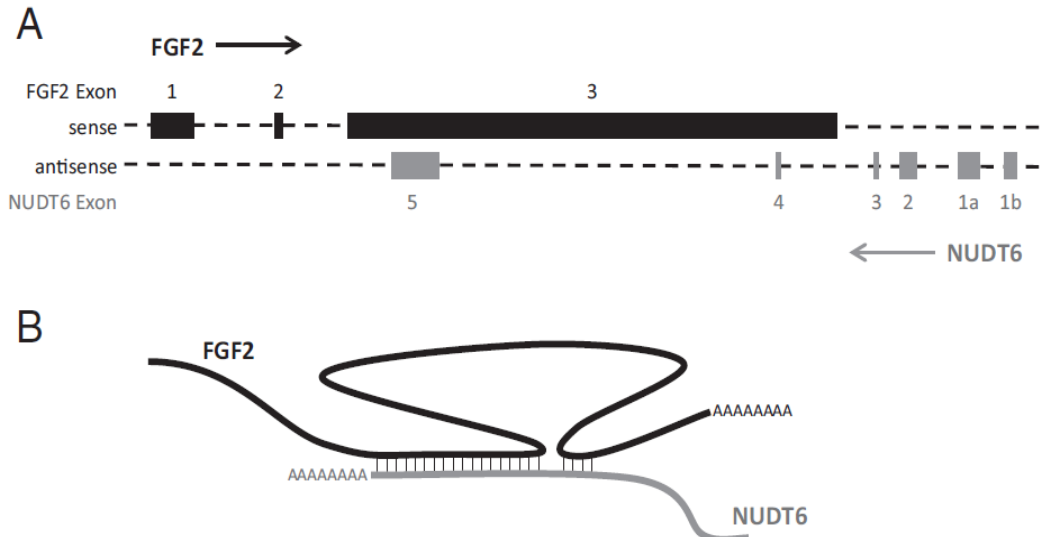
2.5. NUDT6

FGF2 geninin "*antisense*" transkripti NUDT6, FGF2 mRNA'sının düzenlenmesinde ve stabilitesinde rol oynayan bir moleküldür (2,3). İnsan kromozomunda 4q26'da bulunan FGF2 geni, FGF2'nin yanı sıra, FGF2'nin sentezlendiği zincirin karşı zincirinden NUDT6 transkriptini de ifade eder (19). İnsanda "*sense*" ve "*antisense*" transkriptler FGF2'nin 3' proteine çevrilmeyen ucunda 2 ayrı bölgede sırasıyla 583 ve 56 baz çiftini içerecek şekilde birbirini tamamlayıcıdır (Şekil 2.2). NUDT6'nın varlığı ilk kez *Xenopus laevis*in döllenmemiş oositlerinde; ardından tavuk, sıçan ve insanı da içeren pek çok türde gösterilmiştir (73). FGF2 ve *antisense*'inin yer aldığı gen bölgesinin omurgalı türleri boyunca iyi korunmuş olması bu etkileşimin önemli bir işleve hizmet ettiğine işaret etmektedir (19).

FGF2'nin "*antisense*" transkripti olan NUDT6, protein kodlayan bir doğal "*antisense*" transkripttir ve 35 kDa ağırlığında, işlevi henüz bilinmeyen bir proteini kodlamaktadır. NUDT6 proteininin Nudiks Hidrolaz (NUDT) enzim ailesinin bir alt kolu olan ve spontan mutasyonları engellemekte etkili olan MutT enzimlerinin karakteristik MutT bölgesine sahip olduğu bilinmektedir (73).

NUDT6 karaciğer, beyin, böbrek, böbrek üstü bezi, testisi de içeren pek çok dokuda ifade edilmektedir (13–15). Sıçan beyinde hipotalamus, hipokampus, hipofiz, serebellum ve korteks gibi farklı bölümlerde ifade edildiği ortaya konmuştur (17). En yüksek doku dağılımının karaciğer, böbrek ve beyin gibi yüksek oksidatif metabolizmaya sahip dokularda görülmesi dikkat çekicidir (14). Hücre içindeki

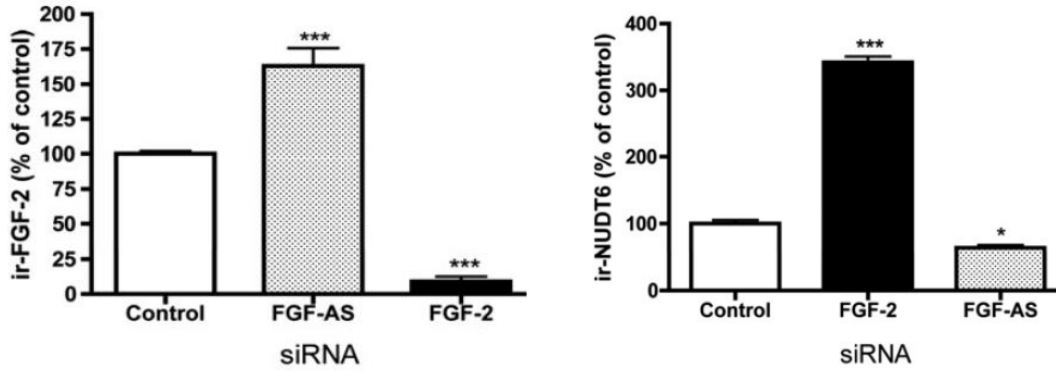
dağılımına bakıldığında, NUDT6 proteinin en çok çekirdekte, daha az mitokondride ve sitoplazmada bulunduğu; fakat mikrozom ya da lizozomda bulunmadığı gösterilmiştir (29).



Şekil 2.2: FGF2 ve NUDT6 genleri.

Bu genler, FGF2'nin 3' proteine çevrilmeyen ucunda proksimal ve distal poliadenilasyon bölgelerini içine alacak şekilde kuyruk kuyruğa örtüşme göstermektedir. Poliadenilasyon bölgeleri RNA stabilitesinde ve translasyonun başlatılmasında önem taşır. *Şekil McEachern, 2014'ten alınmıştır (74).*

Farklı hücre hatlarında *in vitro* olarak NUDT6 ve FGF2'nin aynı hücrede birlikte ifade edildikleri gösterilmiştir. Bu hücre hatları arasında C6 sıçan glioma, Seg1 insan akciğer adenokarsinomu ve insan ile sıçan lenfoma ve lösemi hücre hatları sayılabilir (18,75,76). C6 sıçan glioma hücre hattı çalışmalarında, NUDT6 ve FGF2'nin mRNA düzeylerinin karşılıklı olarak birbirini etkilediği ortaya konmuştur. Buna göre, FGF2 ya da NUDT6 mRNA'larından herhangi birinin kısa araya giren RNA (siRNA) aracılı ifade baskılanmasının diğer molekülün mRNA veya protein düzeyinde belirgin bir artışa yol açtığı ifade edilmiştir (75).



Şekil 2.3: Seg1 insan akciğer adenokarsinomu hücre hattında FGF2 ifadesinin NUDT6 ile kontrolü.

Bu hücre hattında, siRNA aracılı, sırasıyla, FGF2 ya da NUDT6 ifade baskılaması tamamlayıcı transkriptin stabilitesini artırmakta; tamamlayıcı transkript ve proteinde artışa neden olmaktadır. *Şekiller MacFarlane L.,2010'dan alınmıştır (19).*

Müdahaleler sonucu NUDT6 ve FGF2 düzeylerindeki karşılıklı değişimlerin hücre siklusuna etkisi birçok çalışmada ele alınmıştır (16,18,19,75). C6 sıçan glioma hücre hattında, NUDT6 mRNA'sının fazla ifadesi, FGF2 ifadesini azaltmış, FGF2 izoformlarının çekirdekte birikmesini engellemiş ve hücrenin siklusun S fazına girmesinde gecikmeye neden olmuştur (16). Buna karşılık, hem FGF2 hem de NUDT6 ifadelerinin baskılanmasının, benzer bir etkiyle, hücre çoğalmasını inhibe ettiği, hücre-ortam yapışmasını engellediği, yara iyileşmesinde belirgin gecikmeye yol açtığı da gösterilmiştir (75).

Seg1 insan akciğer adenokarsinomu hücre hattında ise, NUDT6 ifade azaltılması, C6 sıçan glioma hattında olduğu gibi, FGF2 ifadesini artırmış, fakat C6 sıçan glioma hücre hattının aksine, hücre-ortam yapışmasında ve invazyonda belirgin artışa yol açmıştır. Öte yandan, bu her iki hücre hattından çok daha farklı olarak, hipofiz kaynaklı GH4 mammosomatotrop hücre hattında NUDT6 fazla ifadesinin FGF2 düzeylerinde değişime yol açmaksızın hücre çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (20). Literatürde NUDT6'ya ilişkin hücre kültürü dışında yapılmış az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalarda, insan hipofiz adenomu ve özofagus adenokarsinomunda FGF2 düzeyi yüksek, NUDT6 düzeyi düşük bulunmuştur (20,77). Bir diğer çalışmada ise NUDT6 ve FGF2'nin domuzların karaciğer, yağ, akciğer, kalp, dalak ve böbrek

dokusunda ters ifade edildiği ve domuzda yağ depolanmasında önemli olabileceği ortaya konmuştur (78). Hücre kültür ve doku çalışmaları kısaca Tablo 2.1'de bir araya getirilmiştir. Tabloda iki molekülün pek çok doku ve hücrede bir arada ifade edildiği ve kimi dokularda ifadelerinin karşılıklı olarak düzenlendiği görülmektedir.

Tüm bu çalışmalar göstermektedir ki NUDT6 ve FGF2 arasındaki ilişki karmaşıktır ve farklı dokularda, farklı koşullarda ve gelişimin farklı evrelerinde değişiklik göstermesi olasıdır. Bu ilişkinin ileri çalışmalarla derinleştirilmesi gerekmektedir.

Tablo 2.1: NUDT6 ve FGF2'yi bir arada ele alan hücre kültürü ve doku çalışmaları.

Hücre Hattı ya da Doku	NUDT6 ve FGF2
C6 sıçan glioma hücre hattı	Aynı hücrede birlikte ifade edilir. NUDT6 mRNA fazla ifadesi, FGF2 ifadesini azaltır (16,17). NUDT6 ve FGF2 ifade baskılanması diğer molekülün mRNA düzeyini artırır (75).
Seg1 insan akciğer adenokarsinomu hücre hattı	Aynı hücrede birlikte ifade edilir. NUDT6 ve FGF2 ifade baskılanması diğer molekülün mRNA düzeyini artırır (18,19).
Hipofiz kaynaklı GH4 mammosomatotrop hücre hattı	Normal hipofiz dokusunda yalnızca NUDT6 ifade edilirken hipofiz adenomunda ikisi birlikte ifade edilir. GH4 hücre hattında NUDT6 fazla ifadesinde FGF2 düzeyinde değişme yoktur (20).
Çeşitli insan ve sıçan lösemi ve lenfoma hücre hatları	Aynı hücrede birlikte ifade edilir. Serum ve sitokin uyarımıyla FGF2 ve NUDT6 düzeyleri yükselir (76).
İnsan özofagus kanser dokusu	Aynı dokuda birlikte ifade edilir. FGF2 fazlalığı ve NUDT6 azlığı rekürrens ve mortalite riskini artırır (77).
Çeşitli domuz dokuları	Aynı dokuda birlikte ifade edilir. Yağ depolanmasıyla NUDT6 ifadesi arasında bir ilişki olabilir (78).

Literatürde NUDT6'yı içeren çok az sayıda *in vivo* çalışmadan biri, NUDT6-öğrenme ilişkisine dairdir. Bu çalışma NUDT6'yı hızlı ve yavaş öğrenen fareler arasında ifadesi anlamlı olarak farklılık gösteren proteinlerden biri olarak ortaya çıkarmıştır (79). Bu çalışmaya göre NUDT6, hızlı öğrenen farelerin PFK'sında daha düşük hızda

öğrenen farelere göre daha fazla ifade edilmiştir. NUDT6 ve öğrenme arasındaki ilişkiye dair ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Psikiyatri literatüründe NUDT6 ve FGF2'yi karşılıklı olarak inceleyen yalnızca bir çalışma mevcuttur (21). Bu çalışmada, stresin FGF2 ve NUDT6 ifadeleri üzerine etkileri incelenmiştir. Stresi modellemek için kaçınılabilen ve kaçınılamayan kuyruk şoku uygulanmıştır. Buna göre, benzer özellikte kafeslerde özdeş (aynı şiddette, aynı sıklıkta ve aynı süre) kuyruk şokları verilen sıçanlardan birinde sıçan beklenen davranışı gerçekleştirdiğinde (çemberi çevirdiğinde) şok sona ermektedir. Bu kafeste sıçanın şoku sonlandırması, paralel kafeste bulunan ve özdeş şoka maruz kalan sıçanın da şokunu sonlandırmaktadır, başka bir deyişle her iki hayvan aynı şiddette, aynı sıklıkta ve aynı süre aynı şoka maruz kalmaktadır, fakat bir grubun şoku sonlandırmak üzerine hiçbir kontrolü bulunmazken (kaçınılamayan şok grubu), diğer sıçanlar şoku kontrol edebilmektedir (kaçınılabilen şok grubu). Bu çalışmada, kuyruk şoku ile indüklenen stresin, şoktan hemen sonra hipokampal NUDT6 mRNA'sını azalttığı, FGF2 mRNA düzeyini etkilemediği, dolayısıyla FGF2/NUDT6 oranını arttırdığı saptanmıştır. Hem kaçınılabilir hem de kaçınılamayan kuyruk şokunun benzer etkileri olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak görülen etki stresörün kontrol edilebilirliği ile ilişkili bulunmamıştır. Şoklardan sonraki 2. saatte ise NUDT6 mRNA'sının bazal düzeyine döndüğü ve FGF2 mRNA'sının ise arttığı, dolayısıyla FGF2/NUDT6 oransal ifadesinin arttığı görülmüştür. Bu nedenle FGF2/NUDT6 oranı tek başına bu iki molekülün düzeylerini değerlendirmekten daha iyi bir belirteç olabilir (21).

Stresin etkilerine glukokortikoidlerin aracılık edip etmediğini anlamak için, aynı çalışmada glukokortikoid enjeksiyonundan yaklaşık 2 saat sonra NUDT6 ve FGF2 ifadeleri incelenmiştir (21). Kuyruk şokları ile indüklenen stres paradigmasını taklit eder şekilde, hipokampal NUDT6 mRNA düzeyi değişmemiş bulunmuş, fakat FGF2 mRNA'sının arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada NUDT6 ve FGF2 düzeylerinde glukokortikoid enjeksiyonundan hemen sonraki değişim değerlendirilmemiştir. Bu nedenle NUDT6'da erken dönemde oluşan değişim gözlenmemiş olabilir. Stresöre bağlı FGF2 ve NUDT6 ifade değişikliklerinin glukokortikoid aracılı olup olmadığı anlamak için,

akut hareketsiz bırakma stresi sırasında glukokortikoid sentez inhibitörleri verilmiş ve sentez inhibitörlerinin her iki molekülün düzeyinde stresi takiben oluşan değişiklikleri önlediği görülmüştür. Buna göre, stresin FGF2 ve NUDT6 düzeylerini glukokortikoid aracılı olarak değiştirdiği sonucuna varılmıştır (21).

Laboratuvarımızda daha önceden yapılan çalışmalarda sıçanda 1 saatlik akut hareketsiz bırakma stresinin stresin uygulanmasından 2, 6 ve 24 saat sonra sakrifiye edilen hayvanların prefrontal NUDT6 protein ifadesinde herhangi bir değişiklik yapmadığı; FGF2'nin ise stresten sonraki 2.saatte arttığı, 6 ve 24. saatte kontrol seviyesine düştüğü saptanmıştır (80). Bu bulgular, Frank'ın çalışması ile, akut strese cevaben 2.saatte düzeyi değişmeyen NUDT6 ve artan FGF2 düzeyleri açısından uyumludur. Fakat ele alınan doku (hipokampus karşılık PFK) ve değerlendirilen örnek çeşidinin farkı (mRNA'ya karşılık protein) göz önünde bulundurulmalıdır. Buna karşılık, 21 gün boyunca her gün 1 saat uygulanan kronik hareketsiz bırakma stresinin PFK'da NUDT6 protein ifadesinde stresten 2, 6 ve 24 saat sonra anlamlı bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır (22). FGF2 protein ifadesinin ise stresten sonraki 2.saatte değişmediği, 6. ve 24. saatte ise anlamlı olarak azaldığı ortaya konmuştur.

Her iki grubun çalışmalarının karşılaştırılmasına Tablo 2.2'de yer verilmiştir. Değerlendirilen beyin bölgesi ve örnek farkına rağmen, her iki grubun çalışmasında da, akut stres NUDT6 düzeyini stres sonrası 2.saatte değiştirmezken FGF2 düzeyini artırmıştır.

Tablo 2.2: Stres ile NUDT6 ifadesindeki değişimi inceleyen çalışma sonuçlarının karşılaştırması.

alışan Grup	Stres eşidi	Kullanılan Paradigma	Değerlendirilen Beyin Bölgesi ve rnek	Değerlendirilen Zaman	Kontrole Göre Değişim	
					NUDT6	FGF2
Frank ve arkadaşları	Akut stres	Kaılabilen ve kaılamayan kuyruk şoku	Hipokampus-mRNA	0.dakika	Azalma	Fark yok
				2.saat	Fark yok	Artma
				2.saat	Fark yok	Artma
Eren-Koçak ve arkadaşları	Akut stres	Akut hareketsiz bırakma stresi	PFK- Protein	6.saat	Fark yok	Fark yok
				24.saat	Fark yok	Fark yok
	Kronik stres	Kronik hareketsiz bırakma stresi	PFK- Protein	2.saat	Azalma	Fark yok
				6.saat	Azalma	Azalma
				24.saat	Azalma	Azalma

Bu çalışmaların ortak sonucu, stresle NUDT6 ifadesinin azalmasıdır. Bu bulgu iki şekilde yorumlanabilir: NUDT6, stres etkisiyle azalıyor olabilir veya stresin etkilerini dengelemek amacıyla telafi edici bir yöntem olarak NUDT6 ifadesi azaltılıyor olabilir.

Tüm bu bilgilerin ışığında, depresyon patofizyolojisinde NUDT6'nın rolünün ileri çalışmalarla derinleştirilmesi depresyon patogeneziine ilişkin bilgilerimizi artırmak açısından gereklidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Deseni

Bu tez çalışmasında yapılan deneyler Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Çalışmanın birinci ve ikinci aşaması için aynı şema izlendi. Buna göre Kasım 2016- Ocak 2017 arasında NU DT6 fazla ifadesi deneyleri yapıldı (1. Grup deneyler). Şubat- Nisan 2017 arasında NU DT6 ifade baskılaması grubu deneyleri yapıldı (2. Grup deneyler).

Şekil 3.1’de görüldüğü üzere, sıçanlar temin edildikleri kaynaktan deneylerin yapılacağı laboratuvara getirildikten sonra 1 hafta boyunca hayvanların yeni laboratuvar ortamına alışmaları için beklendi. Takiben virüs enjeksiyonları 4 gün içinde tamamlandı. Virüs enjeksiyonlarının ardından yaklaşık 4 hafta boyunca virüsle hedeflenen etkinin yerleşmesi için beklendi. Virüs enjeksiyonundan 3 hafta sonra (davranış deneylerinden önceki hafta) her bir sıçan tez öğrencisi Fatma Özlem Hökeleki tarafından ele alınarak araştırmacıya alışmaları (“*handling*”) sağlandı. Virüs enjeksiyonlarından 4 hafta sonra davranış deneylerine başlandı, sıçanlarda depresyon-benzeri davranış sükröz tercihi testi ve zorla yüzdürme testi ile; anksiyete-benzeri davranış yükseltilmiş artı labirenti ve aydınlık-karanlık kutu testi ile; öğrenme pasif kaçınma testi ile değerlendirildi. Davranış testleri hayvanların sirkadien ritimlerindeki değişikliklerin davranış deney sonuçlarına etkisini kontrol etmek amacıyla 8.30-14.00 arasında gerçekleştirildi. Testler arasında en az 2-3 gün beklenerek testlerin birbirini etkilemesinin önüne geçildi. Tüm testler 4 hafta içinde tamamlandı. Deneylerin tamamlanmasından sonraki gün hayvanlar sakrifiye edildi ve elde edilen dokular ile moleküler çalışmalar gerçekleştirildi.



Şekil 3.1: Deneylerin akış şeması. Bu şema 1. grup deneyleri ve 2. grup deneyleri için aynıdır.

3.2. Kullanılan Hayvanlar ve Barındırma Koşulları

Sıçanda yapılmış olan bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu tarafından 07.06.2016 tarihli, 2016/24 sayılı toplantıda onaylanmıştır. Karar numarası 2016/24-02'dir. Bu çalışmada toplamda 66 adet erkek, başlangıç ağırlıkları 200-300 gr arasında olan yetişkin, yabanıl tip ("*wild type*") Sprague Dawley sıçan kullanıldı. Hayvanlar enstitü laboratuvarına getirilmelerinden itibaren $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de, saydam pleksiglas kafeslerde her bir kafeste iki sıçan olacak şekilde barındırıldı. 2. Grup deneylerinde kullanılan sıçanlar kavga edip birbirlerini yaraladıklarından bu grup her kafeste tek sıçan olacak şekilde barındırıldı. Günün 12 saati aydınlık, 12 saati karanlık döngüde yaşayan hayvanlara su ve yem *ad libitum* olarak sağlandı.

3.3. Adeno-ilişkili Virüs

Adeno-ilişkili virüs [*adeno-associated virus* (AAV)] tek zincirli, zarfsız, ikozohedral kapside sahip bir virüstür. Yardımcı bir virüs olmaksızın tek başına çoğalamaz ve yayılamaz. İnsan dahil, pek çok hayvan dokularından izole edilmiş olmasına rağmen herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. Bugüne dek gösterilen çok sayıda serotipi ile geniş bir doku tropizmine sahiptir; hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmektedir. Dışarıdan verildiğinde bağışıklık sistemini minimal uyarmaktadır. Uzun süreli ve etkili gen transferi sağlayabilir (81). AAV aracılı gen ifadesindeki değişikliğin enjeksiyon sonrası 2. hafta kadar erken başlayıp 3-4. haftada stabil düzeye ulaştığı ve 18 aya dek sürdüğü gösterilmiştir (82–85). Tüm bu özellikleri nedeniyle AAV son yıllarda pek çok alanda yaygın olarak gen ifadesinin değiştirilmesinde, yeni gen transferlerinde kullanılmaktadır. İnsanda Parkinson Hastalığı, Alzheimer Hastalığı, epilepsi, geç infantil nöronal lipofuksinozis, musküler distrofi ve Canavan Hastalığı gibi hastalıklarda gen transferinde kullanımını araştıran çok sayıda Faz 1 çalışması vardır (86).

AAV ile PFK'da gen ifadelerinin başarılı bir şekilde değiştirilebildiği çok sayıda yayında gösterilmiştir (87–94). Bu yayınlarda farklı serotiplerin enjeksiyonu ile başarı

elde edilebilmiştir. Bu projede literatürde en çok tercih edilmiş olan, nöronları enfekte ettiği bilinen AAV2 serotipi kullanılmıştır. 1. Grup ve 2. Grup deneylerinde kullanılan AAV2'ler ve özellikleri şöyle özetlenebilir:

1. Grup NUdT6 Fazla İfadesi Deneyleri

- Sıçan NUdT6 proteini ifade eden, *promoteri* CMV, işaretleyicisi (*reporter*) güçlendirilmiş yeşil floresan protein (eGFP) olan adeno-ilişkili virüs (NUdT6 AAV-CMV- GFP): Ticari bir firmadan (Abmgood) kullanıma hazır şekilde, titresi 1×10^9 genom kopyası/mL olacak şekilde temin edildi.
- NUdT6 protein ifade etmeyen, *promoteri* CMV olan ve işaretleyici ifade etmeyen boş (*blank*) kontrol adeno-ilişkili virüsü (AAV blank control virus – CMV): Ticari bir firmadan (Abmgood) titresi 1×10^9 genom kopyası/mL olacak şekilde kullanıma hazır halde temin edildi.

2. Grup NUdT6 İfade Baskılaması Deneyleri:

- NUdT6 protein ifadesini baskılayacak siRNA ifade eden AAV (NUdT6 AAV siRNA pooled virus): Ticari bir firmadan (Abmgood) titresi 1×10^9 genom kopyası/mL olacak şekilde temin edildi.
- Kontrol karma ("*Scrambled*") siRNA ifade eden AAV: Ticari bir firmadan (Abmgood) titresi 1×10^9 genom kopyası/mL olacak şekilde temin edildi. Kontrol siRNA hiçbir memeli genini hedef almayacak bir diziyeye sahiptir.

NUdT6 ifadesini baskılayacak diziler daha önce laboratuvarımızda yapılan deneylerde NUdT6 ifadesinde baskılamaya yol açtığı tarafımızca gösterilen diziler (mRNA dizisinde 1 ve 2 olarak numaralanan diziler) ve bu dizilere ek olarak, söz konusu dizilere yakın yerleşimli olan fakat bu dizilerle üst üste gelme içermeyen, üretici firmanın tavsiye ettiği 2 dizi (mRNA dizisinde a ve b olarak işaretlenmiş diziler) seçilerek belirlendi. Firma tarafından bu 4 dizi tek bir virüs içinde bir araya getirildi, böylece ifade baskılamasının etkinliğinin artırılması amaçlandı.

AATTCGGCACGAGCTGAAAGGCAAGGTGCAACAATGTGGTGGGCGAGCAGAGCGCGATGGTTGTTCTCGGC
 TTTGCTCGACGTGGGCGGAGTCGGACTCCGGGCTAGGCGGCGCACTGCCTCGAGCGGCCTGGAGATCACGG
 GCTCCTGCGGGGGCGAGCTACAAGGCGAGCTGGACAGATTTGGGGGCATCTCGGTGCACTTGTGCGGGCACC
 GCACCCTGCACCGGCTGGATGCCGCCCTTCCGGAGGCTCTTGCAAGCCGCCAT¹TCAGCAGTGGCGAGCG
^{GAA}GGAAGATCGCTGCATGGCTGCACATCCCCATCTGCAGAGCCACTTCATCGCCCTGCTGCCTCTCGG
 GCTTCTGCTTCCACC^aACGCAGAACCGCACTTGTCAACGCTGACTCTGTGGTTGGGAGAAGGACCCAGCAGAC
 TCCCGGGGTATGCCACACACCAAGTAGGGGTTGCAGGTGCCGTATTTGATGTTAGCACCAGGAAAGTACTGG
 TTGTACAAGATCGAAATAAATTGAAAAACATGTGGAAGTTTCCAGGAGGCC^bTGTCAGAGCCTGGAGAAGAT
^{ATTGGAGAC}ACAGCAGTCCGAGAGGTGTTGAAGAGACTGGTGTCAAGTCAGAATTCAGGTCTCTGTTGAGC
 ATCCGGCAGCAACACAGGAGCCCTGGGGCCTTTGGATGTGACACATGTACCTGATCTGCCGCCTGCAGCCG
 CGTTCCTTACCATCAACTTCTGCCAGCAGGAATGCTTGAAGTGTGAATGGATGGATCTAGAAAGCCTGGCCA
 GGACTAAACACACAACCCCATCACCAGCAGGGTGGCTAGGCTACTACTATA²CGGACACAGGGAAGGGTTT
 GACAAGATTGACCTCAGCATGGAGGAACTCCCTGCAGTATACACAGGCCTGTTCTACAAGCTCTACCACAGGG
 GACTGCCTGAGAGGTACAAGGCTGAAATGGGAACAGATTGAATGCCAGCCTTCTCACATACTTGTGTTTCCA
 GGGTAGAAATTCACAAATGTGAATTTTGTGAATATATGTTTAAATCCTCTTTTCAAATAAAGGAAATACGTGAC
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Şekil 3.2: Sıçan NUDT6 mRNA dizisi (95).

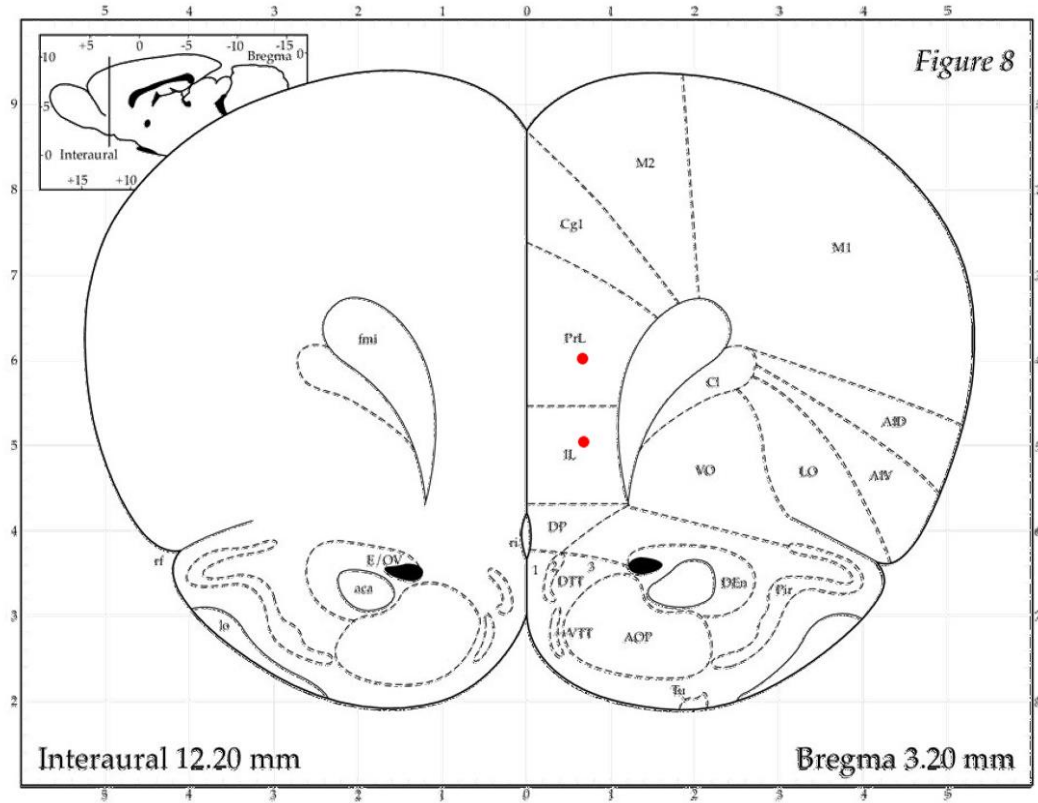
Bu dizide 1 ve 2 rakamları ile başlangıçları işaretlenmiş olan diziler, daha önce gerçekleştirdiğimiz ifade baskılaması deneylerinde davranış değişimine yol açtığını gösterdiğimiz diziler olup a ve b ile işaretlenmiş diziler ise firma tarafından önerilmiş dizileri göstermektedir.

3.4. Cerrahi

Sıçanlar deney protokolünde belirtilen zamanda, stereotaksik enjeksiyon için negatif basınçlı *in vivo* deney odasına getirildi. Odaya yalnızca görevlilerin girmesine izin verildi, odanın kapısına Biohazard etiketi herkesin görebileceği şekilde yapıştırıldı. Odada her hayvan için şu protokol takip edildi: Ketamin (100 mg/kg)- ksilazin (5 mg/kg) kokteylinin intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi sağlandı. Anestezi cevabı tırnak yatağına verilen ağırlı uyaran ile değerlendirildi. Hayvan stereotaksiye yerleştirildi. Cerrahi boyunca rektal termometre ile sıcaklık takibi yapıldı ve hayvan elektrikli battaniye ile ısıtarak vücut sıcaklığı normal aralıkta tutuldu.

Enjeksiyon koordinatlarını belirlemek için literatür tarandı. Literatürde kemirgenlerde bu bölgeyi değerlendiren çalışmaların prelimbik ve infralimbik korteks ayrımı yapmaksızın medyal PFK'yı bir bütün halinde ele aldığı ve elde edilen sonuçları genel olarak medyal PFK işlevi olarak yorumladığı görüldü (87,90,91,94,96). Literatürle uyumlu olarak, laboratuvarımızda yapılan önceki sıçan çalışmalarında da PFK, prelimbik ve infralimbik kortekslerin ikisini de içine alır şekilde değerlendirilmişti. Ayrıca, prelimbik ve infralimbik korteksleri yapısal olarak ayıran anatomik bir sınır olmaması ve kullanılan maddenin ya da virüsün difüzyonu nedeniyle tek bir bölgeye özgü enjeksiyonun pratikte yapılabilirliği tartışmalı bulundu. Bunlara dayanarak, bu tez çalışmasında, PFK'da NUDT6 ifadesinin depresyon patofizyolojisinde doğrudan rolü olup olmadığının incelenmesi için, enjeksiyon başarısını artırmak amacıyla, sıçanda prelimbik ve infralimbik kortekslerin ikisinde birden NUDT6 ifadesinde deneysel olarak oluşturulan artış ve azalmanın depresyon-benzeri ve anksiyete-benzeri davranış ile bağlamsal öğrenme üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Literatürdeki çalışmalardan yola çıkarak belirlenen koordinatların uygunluğunu teyit etmek için kasım 2016'da 6 adet erişkin yabanıl tip Sprague Dawley sıçana ketamin (100mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) anestezisi altında literatürde geçen 3 farklı koordinata (90,91,96) **a.** 3.0 mm anteroposterior (AP); 0.7 mm mediolateral (ML); 3.5 mm dorsoventral (DV); **b.** +2.7 mm AP, ± 0.5 mm ML, 4.5 mm DV (96); **c.** +3.5 mm AP, ± 0.5 mm ML, -4.0 mm DV) %1 metilen mavisi enjekte edildi. Laboratuvarımızda üretilmiş iki taraflı kanül tutucu kullanılarak ulaşılabilen en uygun koordinatın AP: +3.2 mm, ML: 0.7 mm ve DV: -4.0 mm (prelimbik korteks için) ve DV: -5.0 mm (infralimbik korteks için) olduğuna karar verildi. Söz konusu koordinatların beyin atlasındaki karşılıkları Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.3: Sıçan beyin atlasında hedeflenen enjeksiyon koordinatları

PrL: prelibik korteks, IL: infralimbik korteks <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/> adresinden alınmıştır (97).

Kafa cildi bistüri ile orta hattan 2-3 cm açıldı, cilt altı dokusu ayrıldı. Bregma ve lambda bulundu, bregma ve lambdanın aynı DV hizada olduklarına emin olundu. Bregmanın koordinatları kaydedildi, bregmaya göre enjeksiyon koordinatları işaretlendi ve işaretlenen bölgede kafatası drillenerek inceltildi. Kemik doku tamamen drillendiğinde enjektör -4.0 mm (DV) koordinatına yavaşça indirildi. Pompalı sisteme bağlı enjektör yardımıyla buzda beklemekte olan ilgili AAV enjekte edildi.

1. Grup deneylerinde NUDT6 ifade eden AAV (n=16) ya da boş kontrol plazmidi içeren AAV (n=13) enjekte edildi. 2. Grup deneylerinde ise NUDT6 ifadesini azaltacak siRNA-AAV (n=16) ya da karma kontrol siRNA-AAV (n=13) enjekte edildi. Her iki grupta da virüs enjeksiyonu, 0.25 mikrolitre/dakika hızında 1 mikrolitre hacminde gerçekleştirildi. Enjeksiyonun ardından 5 dakika beklendi, enjektör -5.0 mm (DV) koordinatına getirilip bu bölgeye de 0.25 mikrolitre/dakika hızında 1 mikrolitre enjeksiyon yapıldı. Bu enjeksiyonun ardından da virüsün yayılması için 5 dakika

beklendi. Bu işlem iki kollu enjektör tutucusu yardımıyla her iki hemisfere eşzamanlı olarak yapıldı. Kesilen cilde eriyebilen dikiş atıldı. Cerrahi bitiminde vücut sıcaklığına ısıtılmış 1 mL serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edilerek hayvanların dehidrate olmaları önlendi. Flunixin (2,5 mg/kg, subkutan) ile cerrahi sonrası ağrı kontrolü sağlandı.

Hayvanlar anesteziden uyanıncaya dek kafeslerde tek başlarına tutuldu, kafes altlarında elektrikli battaniye ile vücut sıcaklıklarının düşmesi önlendi. Gıda alabilir hale geldiklerinde eski düzenlerine göre kafeslere kondu ve cerrahinin ertesi günü tekrar sıçan odasına alındı.

3.5. Cerrahi Sonrası Gözetim

Cerrahiden davranış deneylerinin bitimindeki sakrifikasyona dek hayvanların sağlık durumları belirtilen şekilde takip edildi: Haftada 2 gün ağırlık tartımı, 5 gün genel inceleme (davranış, aktivite ile postür değişikliklerinin ve kürk durumunun kontrolü). Özellikle cerrahiye takip eden yaklaşık 10 gün cerrahi yapılan bölge enfeksiyon belirtileri (şişlik, kızarıklık, kaşıntı, akıntı, hayvanda belirgin huzursuzluk) açısından dikkatle incelendi. Hayvan ağırlığı, genel sağlık durumu ve iyi beslenmenin bir göstergesi olarak ele alındı. Kürk durumu hayvanın özbakımının bir yansıması olarak değerlendirildi. Davranış, aktivite ile postür değişiklikleri de hayvanın genel sağlık durumu açısından incelendi.

Hayvanların izlemlerinin devam ettiği iki ay boyunca beklendiği gibi, zamanla tartı kazandıkları görüldü ve sağlıklarında herhangi bir bozulma izlenmedi.

3.6. Davranış Deneyleri

3.6.1. Sükroz Tercihi Testi (STT)

Sıçanlar sükrozlu suyu, çeşme suyuna tercih etmeye meyillidir. Sükrozlu suyun tüketiminde azalmanın depresif bir belirti olan anhedoniye (hayattan keyif alamama) modellediği düşünülmektedir.

İlk gün her bir kafese, kafesin sağına ve soluna olmak üzere, ikisinde de %1'lik sükröz çözeltisi olan 2 suluk kondu. Böylece hayvanların sükrözlü su tadına alışmaları sağlandı. Ertesi gün, hem NUDT6 ifadesi değiştirilen hem de kontrol gruplarındaki tek numaralı kafeslerin (kafes 1, kafes 3,...) sağ tarafına %1'lik sükröz, sol tarafına çeşme suyu içeren suluk yerleştirildi. Çift numaralı kafeslerinse (kafes 2, kafes 4, ...) kafesin soluna %1'lik sükröz, sağına çeşme suyu içeren suluklar kondu. Sulukların yerleştirilmesinden 24 saat sonra tüm su ve sükröz tüketimleri ölçüldü (1.ölçüm).

Ölçümün ardından tüm suluklar, bu kez yönleri bir gün öncekinin tam tersi olacak şekilde kondu. Bu durumda 3.gün tek numaralı kafeslerin sağına su, solunda sükröz; çift numaralı kafeslerin sağına sükröz, solunda ise su bulunuyordu. Sulukları bu şekilde yerleştirilerek hayvanların olası yön eğilimlerinin test sonuçları üzerine etkisini kontrol etmek amaçlandı. Suluklar 24 saatin sonunda kaldırıldı, su ve sükröz tüketimleri ölçüldü (2.ölçüm).

Hayvanların sükröz tercihi her 2 ölçüm için aşağıdaki formülle hesaplandı:

Sükröz Tercih İndeksi= Sükröz Tüketimi/ (Su Tüketimi+Sükröz Tüketimi)* 100

3.6.2. Yükseltilmiş Artı Labirenti (YAL)

Hayvanın anksiyete-benzeri davranışının değerlendirilmesi için uygulanan bir testtir. Karşılıklı ikisi kapalı ve ikisi açık, yerden yüksekliği 50 cm olan, 45 cm uzunluğunda ve 12 cm genişliğinde 4 kola sahip bir düzendir ve deney loş ışıkta gerçekleştirilir. Sıçan bu düzeneğe yüzü kapalı kollardan birine bakar şekilde kolların kesiştiği bölgeden konup 5 dakika boyunca serbestçe hareket etmesine izin verildi. Bu süreçte hareketi videoya alındı, video kayıtları Ethovision XT v.8 yazılımı ile kör bir gözlemci tarafından skorlandı ve değerlendirildi. Açık ve kapalı kollara giriş sıklığı, bu kollarda geçirdiği zaman ve açık kollara girme gecikmesi hesaplandı. Hayvanın açık kola girmesi ve burada zaman geçirmesi anksiyetesinin azlığı lehine yorumlanmaktadır.

3.6.3. Aydınlık-Karanlık Kutusu (AKK)

Hayvanın anksiyete-benzeri davranışının değerlendirilmesi için uygulanan bir testtir. Aydınlık-karanlık kutusu her biri 22cmx22cmx22cm boyutlarında olan ve birbirine sıçanın geçebileceği büyüklükte bir kapı ile bağlanan biri kapalı, siyah ve karanlık; diğeri beyaz, camla kapanmış ve aydınlatılan iki bölmeden oluşan bir düzenektir. Sıçan bu düzeneğe yüzü duvara bakar şekilde karanlık bölmeden kondu ve hareketi 5 dakika boyunca gözlemlendi. Hayvanın aydınlık bölmeye girme sıklığı, bu bölmede geçirdiği zaman ve ilk kez aydınlık bölmeye girene kadarki gecikmesi kör gözlemci tarafından elle bir kronometre yardımıyla kaydedildi. Anksiyetesi daha az olan hayvanların aydınlık kutuya daha çok girmesi ve burada daha çok zaman geçirmesi beklenmektedir.

3.6.4. Zorla Yüzdürme Testi (ZYT)

Hayvanın depresyon-benzeri davranışının değerlendirilmesi için uygulanan bir testtir. Zorla yüzdürme testi için sıçanlar ilk gün 15 dakikalığına 30 cm derinlikte 22-24°C sıcaklıkta su bulunduran, 26 cm çapında, 43 cm yüksekliğinde ve kendi çabalarıyla içinden çıkamayacakları su tanklarına kondu ve videoya kaydedildi. 15 dakikanın sonunda sıçanlar sudan çıkarılıp kurulandı. Ertesi gün sıçanlar 5 dakika aynı düzeneğe bırakıldı, düzenek videoya kaydedildi. Sürenin sonunda hayvanlar sudan çıkarılıp kurulandı. Video kayıtları kör bir gözlemci tarafından Ethovision programının manuel seçimi aracılığıyla skorlandı. Hareketsizlik süresi, depresyonun bir belirtisi olan umutsuzluğun bir modeli olarak değerlendirilmektedir.

3.6.5. Pasif Kaçınma Testi (PK)

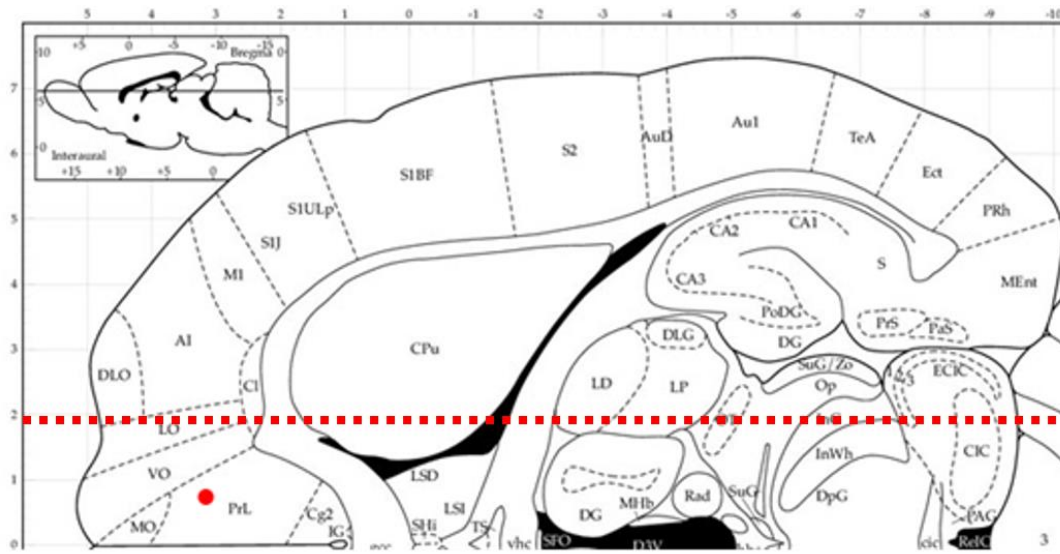
Bağlamsal öğrenmeyi değerlendirmekte kullanılan bir testtir. Sıçanlar her biri 22cmx22cmx22cm boyutlarında olan ve birbirine küçük bir kapı ile bağlanan biri kapalı ve karanlık; diğeri beyaz ve aydınlık iki bölmeden oluşan bir düzeneğe aydınlık bölümden kondu, aradaki kapı başlangıçta kapalı idi. Kapı otomatize sistem tarafından hayvan düzeneğe girdikten 5 saniye sonra açıldı. Hayvan doğal eğilimi gereği kapı açıldıktan sonra karanlık bölmeye geçti. Hayvan karanlık bölmeye girdiğinde kapı kapandı, sıçan 2 saniye süreli 0.9 miliamper şiddetinde elektrik şoku aldı. Hayvan şoku aldığı karanlık bölmede 15 saniye daha tutuldu ve böylece ortamı tanıdı, 15 saniyenin ardından araştırmacı tarafından kafesine alındı. Öğrenme aşaması olan bu fazı takiben belleği değerlendirmek amacıyla aynı prosedür 6 ve 24 saat sonra elektrik verilmeksizin tekrarlandı. Karanlık bölmeye geçmeyen hayvanlar 5 dakikanın bitiminde aydınlık bölmeden alınıp kafesine kondu. Hayvanın karanlık bölmeye geçip geçmediği ve geçtiyse kaç saniye sonra geçtiği (gecikmesi) kaydedildi. Hayvanın karanlık bölmeye geçmemesi veya geçmekte gecikmesi elektrik şokunu hatırladığı ve karanlık kutuyu elektrik şokuyla ilişkilendirmeyi öğrendiği şeklinde yorumlanmaktadır.

3.7. Sakrifikasyon

Davranış deneylerinin tamamlanmasının ardından 1. Grup ve 2. Grup deneylerdeki 16'şar hayvan (n=16/grup) dekapitasyon ile sakrifiye edildi, beyinleri hızla çıkarılarak PFK ayrıldı. Sağ hemisfer PFK'sı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışmalarında kullanılmak üzere *RNA later* çözeltilisine alındı ve -20 derecede saklandı. Sol hemisfer PFK'sı ise Western blotlama (WB) çalışmalarında kullanılmak üzere beyin kalanından ayrıldı, izopentanda hızla donduruldu. Beyinler WB'de kullanılabilecek şekilde -80°C'de saklandı.

Bu çalışmada, PFK'nın çıkarılmasında, prelimbik ve infralimbik korteksi içeren bölgeyi mümkün olduğunca çevre yapıları almadan çıkarıp bölgesel etkinin seyrelmesinin önüne geçmek için literatürde daha önce denenmemiş bir diseksiyon

yöntemi uygulandı. Bu yöntemde WB ve PCR yapılacak olan beyinler buz üzerine alındığında öncelikle serebellum ayrıldı, ardından beyin hemisferlerine ayrıldı. AAV2'nin yaklaşık 1 mmlik bir çapta yayıldığı (98) ve enjeksiyon koordinatının ML: 0.7 mm olduğu düşünülerek, hemisfer medyalden laterale yaklaşık 2 mmlik bir parasagittal insizyon ile ayrıldı. Böylece medyal PFK lateraldeki yapılardan diseke edildi. İnsizyonun yerleşimi Şekil 3.4'te görülmektedir.



Şekil 3.4: Parasagittal insizyon.

<http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/> adresinden alınmıştır (97).

Medyaldeki 2 mmlik doku, laterali aşağıda kalacak ve medyali yukarı bakacak şekilde diseksiyon camına yatırıldı. Korpus kallosumun görülebilen en anterior kıvrımından yaklaşık 45 derecelik bir açıyla PFK dorsal ve posteriordaki; korpus kallosumun en ventral ucundan yaklaşık 105 derecelik bir insizyon ile ventraldeki diğer beyin yapılarından ayrıldı. Son olarak olfaktor bulbus ayrıldı. İnsizyonlar ve kalan beyin bölgesi Şekil 3.5'te görülmektedir.

tanındı. Ardından örnekler +4°C'de 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant ayrıldı. Süpernatandan iki kez distile edilmiş suyla 1/100 ve 1/500'lük dilüsyonlar hazırlandı. Bu dilüsyonlarda Pierce BCA Assay ile protein tayini yapıldı. Her bir kuyucuğa 50 mikrogram (μg) total protein yüklemek için örnekten alınması gerekli hacim belirlendi.

Yüklenmesi Gereken Protein Hacmi (uL) = $50(\mu\text{g}) / \text{Örnek Toplam Protein Konsantrasyonu } (\mu\text{g/uL})$

Kuyucuğa yüklenecek toplam hacmin %25'i örnek tamponu, %10'u merkaptotanol olacak ve yukarıdaki formüle göre hesaplanan proteini içerecek şekilde, iki kez distile edilmiş su ile hesaplanan hacme ulaşıldı. Her bir ependorf santrifüj cihazında 3000 rpm'e gelene dek çevrildi. Örnekler protein denatürasyonu için 5 dakika 95 °C'de ısıtıldı. Örnekleri yüklemek için ticari hazır jeller (Thermo Fisher NuPAGE %4-12 Bis-Tris) kullanıldı. En başa ladder (7 mikrolitre) olmak üzere tüm örnekler jeldeki kuyucuklara yüklendi. Örneklerin jelle yüklenme sıralaması not edildi.

Yürütme düzeneğinin kapağı anot-katoda dikkat edilerek kapatıldı. Güç kaynağı 75 volta ayarlandı, yürütme 75 voltta 15-20 dakika devam ettikten sonra 100 volta yükseltildi. Yürütme bittikten sonra jeller üzerinde yürütülmüş olan proteinler PVDF membranlarına (Thermo Fisher Invitrolon PVDF filter paper) transfer edildi:

Ladder solda kalacak şekilde transfer sandviçi hazırlandı:

- 3 tabaka kağıt havlu
- Whatmann kartonu
- Jel
- Membran
- Whatmann kartonu
- 3 tabaka kağıt havlu

Sandviç transfer tamponu ile ıslatılarak hazırlanıp transfer cihazına yerleştirildi. Eğer birden fazla sandviç hazırlandıysa sandviçlerin birbirine temas etmemesine özen gösterildi. Transfer cihazı vidaları sıkıldı ve membran başına 120 miliamper olacak şekilde transfer gerçekleştirildi.

Blokaj ve Antikorlar

1. Membran oda sıcaklığında 1 saat blokaj karışımında [tris ile tamponlanmış salin-Tween (%0.1) (TBS-T) içine hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu] bir karıştırıcı üzerinde bekletildi.
2. Primer antikorlar aşağıda belirtilen* dilüsyonlarda blokaj karışımında hazırlandı, membran primer antikorda +4°C'de gece boyu (12-16 saat) bir karıştırıcı üzerinde inkübe edildi.
3. Primer antikor sonrası membran oda sıcaklığında 3 kez 10'ar dakika boyunca bir karıştırıcı üzerinde TBS-T ile yıkandı.
4. Sekonder antikorlar aşağıda belirtilen* dilüsyonlarda TBS-T'de hazırlandı, membran sekonder antikor ile bir karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
5. Membran oda sıcaklığında 3 kez 10'ar dakika boyunca TBS-T ile bir karıştırıcı üzerinde yıkandı.

* Kullanılan primer ve sekonder antikor dilüsyonları ve primer antikorların üretildikleri canlı türü ile kodları antikorlara göre aşağıda sırasıyla belirtilmiştir:

- NUDT6 1/500 1/5000 (tavşan, Proteintech 11881-1AP)
- FGF2 1/500 1/5000 (fare, Millipore 05-118)
- β -Aktin 1/7500 1/7500 (fare, Sigma A5441)
- GFP 1/1000 01/15000 (tavuk, Abcam ab13970)
- eGFP 1/1000 01/15000 (fare, Abcam ab184601)

Görüntüleme: Membran Kodak cihazında üzerine kemolüminesan (West Femto Maximum Sensitivity Substrate) eklenerek görüntülendi. Görüntüler ilgili dosyaya kaydedildi ve TIFF formunda RGB Color'a çevrilerek Image J programında analiz edildi. Bant büyüklükleri *integrated density* olarak ölçüldü ve yükleme kontrolü olan β -Aktin'e oranlanarak değerlendirildi.

3.8.2. İmmunohistokimya (İHK)

İHK için beyinlerden 20 mikrometre kalınlıkta free float kesitler kızaklı mikrotom ile donma karşıtı çözeltiliye (İçeriği için bkz. EK4) alındı ve -20°C'ta saklandı. Kesitlerde NUDT6 ve eGFP İHK'sı yapıldı.

İlgili NUDT6 ve eGFP İHK protokolü aşağıda maddeler halinde sunulmuştur:

1. Beyin kesitleri oda sıcaklığında 3 kez 5'er dakika boyunca fosfat ile tamponlanmış salin-Triton X (%0.3) karışımı (PBS-T) ile yıkandı.
2. Yıkanan kesitlerde antijenlerin açığa çıkarımı (*antigen retrieval*) için tripsin çalışma solüsyonu kullanıldı. Kesitler, önceden 37 °C'ye ısıtılmış tripsin çalışma solüsyonunda 15 dakika boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi.
3. Kesitler oda sıcaklığında 3 kez 5'er dakika boyunca PBS-T ile yıkandı.
4. Kesitler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında PBS-T içine hazırlanmış %10'luk normal keçi serumunda bekletilerek antijenik epitoplara bloke edildi.
5. Blokajın ardından kesitler, blokaj solüsyonuna 1/200 oranında hazırlanan tavşan anti-NUDT6 antikoru ya da 1/250 oranında hazırlanan fare anti-eGFP antikoru içinde gece boyu +4 °C'de bekletildi.
6. Kesitler oda sıcaklığında 3 kez 5'er dakika boyunca PBS-T ile yıkandı.
7. NUDT6 İHK'sı için blokaj solüsyonuna 1/200 oranında Cy3 keçi anti-tavşan sekonder antikoru; eGFP İHK'sı için 1/500 oranında Cy2 keçi anti-fare antikoru hazırlandı. Kesitler, sekonder antikorda 90 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
8. Kesitler oda sıcaklığında 3 kez 5'er dakika boyunca PBS-T ile yıkandı.

9. Serbest yüzmekte olan kesitler poli-l-lizin kaplı lamlara aktarıldı, DAPI çekirdek boyası ile lamel lam üzerine kapatıldı.
10. Lamel çevresi ojelenerek lam ile lamel arasına hava girmesi önendi. Kesitler ojeleri kuruduktan sonra floresan ve konfokal mikroskopta incelendi.

3.8.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Deneyleri (PCR)

RNA later saklama solüsyonunda bekletilen dokulardan RNAeasy Miniprep Kit (QIAGEN) ile RNA izole edildi. Nanodrop ile RNA konsantrasyonu ve kalitesi ölçüldü. Komplementer DNA sentezi RevertAid First Strand cDNA sentez kiti ile gerçekleştirildi. Sentezlenen komplementer DNA, PCR için kullanıldı.

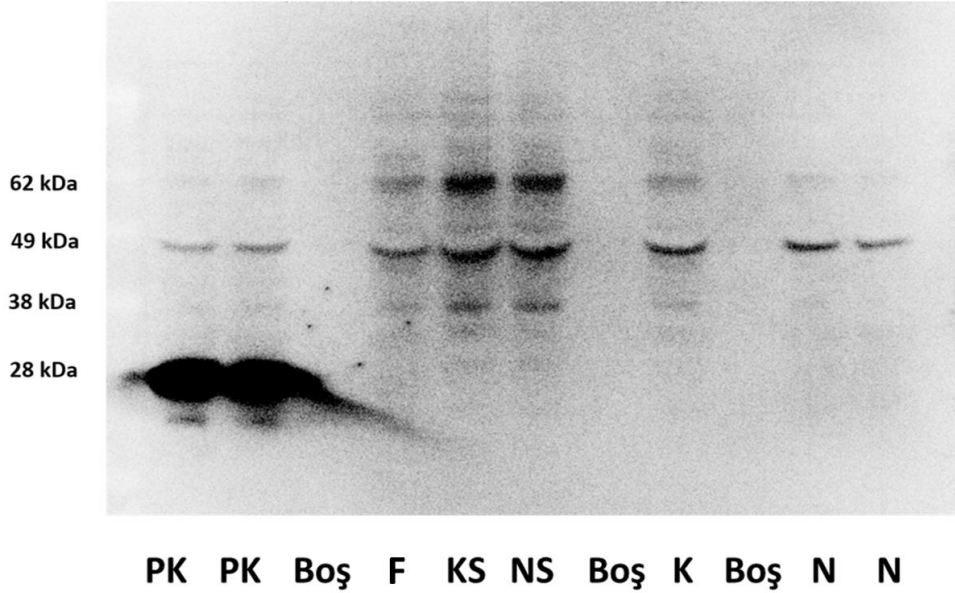
eGFP PCR'ı için ileri ("*forward*") primer dizisi CACTACCAGCAGAACACCCC; geri primer dizisi ("*reverse*") TTGTACAGCTCGTCCATGCC olarak seçildi. 1 ul ileri, 1 ul geri primer dizisi, 10 ul DNA polimerazı ve deoksinükleotitleri içeren Hot Start *Taq* master karışım, 1 ul komplementer DNA ve 7 ul nükleazdan arındırılmış su her bir örnek için bir ependorfta bir araya getirildi. PCR reaksiyonu Thermal Cycler aletinde gerçekleştirildi. Başlangıç denatürasyonu 30 saniye boyunca 95°C'ta gerçekleştirildi. Ardından 35 döngü boyunca, sırasıyla, 30 saniyelik 95°C'ta denatürasyon, 30 saniyelik 57°C'ta primerlerin bağlanması ve 20 saniyelik 68°C'ta polimerizasyon basamakları meydana geldi. Bunu, 5 dakika boyunca 68°C'ta yapılan son polimerizasyon basamağı izledi. Böylece 173 baz çiftlik DNA ürünleri elde edildi. Ürünler agaroz jelde yürütüldü, etidyum bromid ile görüntülendi.

Kantitatif PCR deneylerinde Taqman prob teknolojisinden yararlanıldı. NUDT6 geni için Taqman prob kodu Rn00710461_m1 olan, β -aktin geni için Taqman prob kodu Rn00667869_m1 olan proplar kullanıldı. Her bir örnek için 1 ul Taqman probu, 10 ul Taqman gen ekspresyon karışımı, 2 ul komplementer DNA ve 7 ul nükleazdan arındırılmış su bir ependorfta bir araya getirildi. Reaksiyon Applied Biosystem Step One Plus aletinde 30 saniyelik 95°C'ta denatürasyon ile başladı, ardından 40 döngü boyunca 30 saniyelik 95°C'ta denatürasyon ve 1 dakikalık 60 °C'ta primer bağlanması ve polimerizasyon gerçekleştirildi. Pipetlemeden kaynaklanan hataların önlenmesi

için reaksiyona ROX pasif referans boyası eklendi. Endojen kontrol olarak, β -aktin geni kullanıldı ve normalize edilmiş relatif gen ifadesi alet tarafından hesaplandı.

3.8.4. Yöntem Optimizasyonu ile İlişkili Çalışmalar

Bu çalışmada, viral enfeksiyonun gerçekleştiğini teyit etmek için AAV2'lerin *reporter*ı olan eGFP'nin dokudaki ifadesinin belirlenmesi planlandı. GFP endojen ifade edilmediğinden, saptanan miktarın tamamı viral enfeksiyona bağlı olacaktı. GFP ifadesini değerlendirmek amacıyla yapılan WB'larda pozitif kontrolde GFP bandı (yaklaşık 28 kDa) gözlenmesine rağmen fazla ifade, kontrol, NUDT6 siRNA ile karma siRNA gruplarını temsilen yüklenen örneklerin hiçbirinde GFP olduğu düşünülen ve yaklaşık 28 kDa'ya denk gelen spesifik banda rastlanmadı.

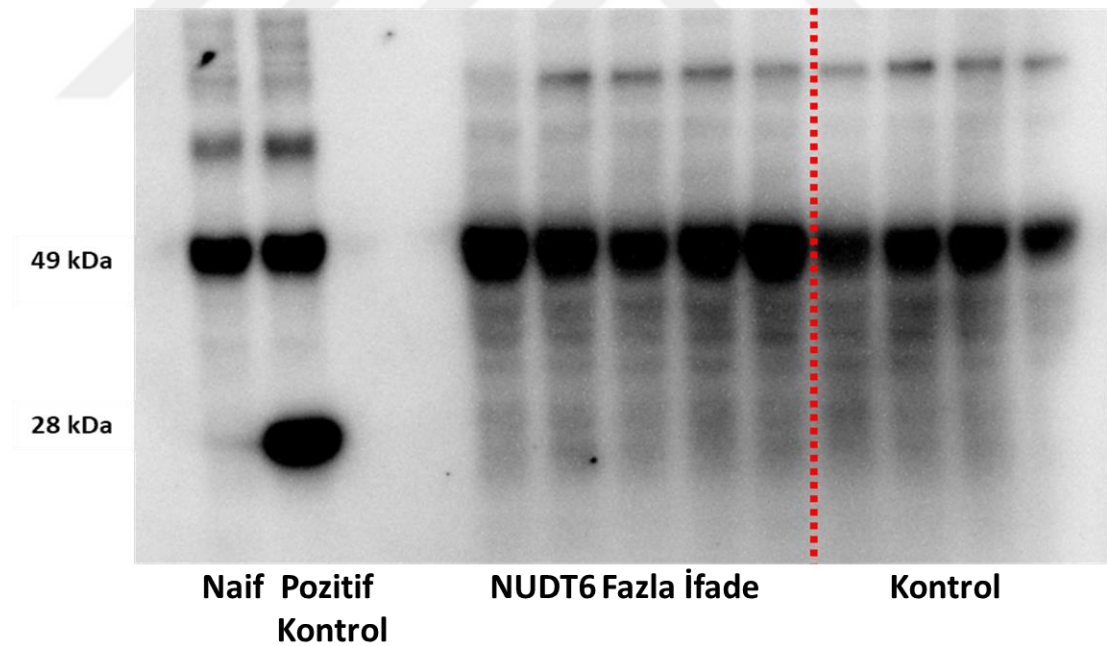


Şekil 3.6: Pozitif ve negatif kontrolü ile GFP WB'si.

GFP ifade ettiği bilinen örneklerin yüklendiği ilk iki kuyucukta belirgin sinyal olmasına rağmen fazla ifade, kontrol, NUDT6 siRNA ile karma siRNA örneklerinin yüklendiği diğer kuyucuklarda GFP olduğu düşünülen sinyal görülmemektedir. Örneklerin hangi gruba ait olduğu altlarındaki kısaltmalarla ifade edilmiştir (PK: Pozitif Kontrol, F: Fazla İfade, KS: Karma siRNA, NS: NUDT6 siRNA, K: Kontrol, N: Naif.)

Bununla birlikte, molekül ağırlığı yaklaşık 40 kDa, 50 kDa ve 60 kDa civarında olan bantlara rastlandı (Şekil 3.6). WB'de rastlanan fakat molekül ağırlığı GFP'ninkinden daha yüksek olan bu bantların, ilk önce, eGFP dimerleri ya da oligomerleri olabileceği düşünüldü; fakat GFP ifade etmediği bilinen kontrol virüsü

enjekte edilmiş örnekte ve naif hayvanlarda da bu bantların görülmesi bu fikirden uzaklaşılmasına neden oldu. Bu bantların bir kısmının molekül ağırlıklarının, sıçan immunoglobulin G'sinin moleküler ağırlığı 50 kDa olan ağır zinciri ile uyumlu olduğu görüldü. WB için dokunun perfüze edilmeksizin alındığı göz önüne alınarak, bu bantların GFP'ye spesifik olmadığı, poliklonal olan tavuk karşıtı sekonder antikorunun beyin dokusundaki immunoglobulin G fragmanlarına ya da olası başka proteinlere spesifik olmayan bağlanmaları olabileceği sonucuna varıldı. Virüsteki eGFP'yi daha iyi ortaya çıkarabileceği ve anti-tavuk sekonder antikorun spesifik olmayan bağlanmalarından kurtulmak düşüncesiyle farede üretilmiş eGFP antikorunu temin edildi. Farede üretilmiş eGFP antikorunu ve anti-fare sekonder antikorunu kullanarak farklı eGFP WB protokolleri denenmesine rağmen (blokajı 1 saatten gece boyuna çıkarma, primer antikorunu daha konsantre verme, sekonder antikorunu blokaj solüsyonu içinde ancak daha düşük konsantrasyonda verme) pozitif kontrolde sinyal görülmesine karşın örneklerde spesifik bir eGFP sinyaline rastlanmadı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Pozitif ve negatif kontrolü ile eGFP WB'si.

İlk kuyucukta naif hayvana ait örnek varken ikinci kuyucukta pozitif kontrol görülmektedir. Pozitif kontrolün ardından gelen iki kuyucuk boş bırakılmıştır. Bunun sağında birbirini takip eden 5 kuyucuğa fazla ifade ve bunları takip eden 4 kuyucuğa kontrol örnekleri yüklenmiştir. Pozitif kontrolde yaklaşık 28 kDa'da belirgin sinyal varken naifte ve örneklerde bu moleküler ağırlıkta banda rastlanmamıştır. Yüklenen tüm örneklerde yaklaşık 50 kDa'da görülen bantlar sıçan immunoglobulin G'sinin ağır zinciri olabilir.

Literatürde, insan hemogloblin zincirleri ve α -sinüklein proteininin WB sırasında kolayca membrandan ayrılabilirdiği ve WB'de konvansiyonel değışiklikler denenmesine rağmen gösterilemeyebildiği, fakat bu moleküllerin WB'sinde, membranin PFA ile muamelesi sonucu bantların ortaya çıktığı ifade edilmiştir (99,100). Bu çalışmalara göre, PFA ile muamele ile proteinler membrana fikse olmakta ve WB prosedürü sırasında membrandan ayrılmayarak görüntülenebilmektedir. Bundan hareketle, örneklerin bir kısmına rutin protokolle WB yapıldı, protokol sırasında transferin ardından membran blokaja alınmadan evvel 30 dakika oda sıcaklığında %4'lük PFA ile muamele edildi. Ardından rutin protokole devam edildi. Fakat bu girişim de eGFP bantlarının görüntülenmesini sağlamadı.

3.8.5. Veri Analizi

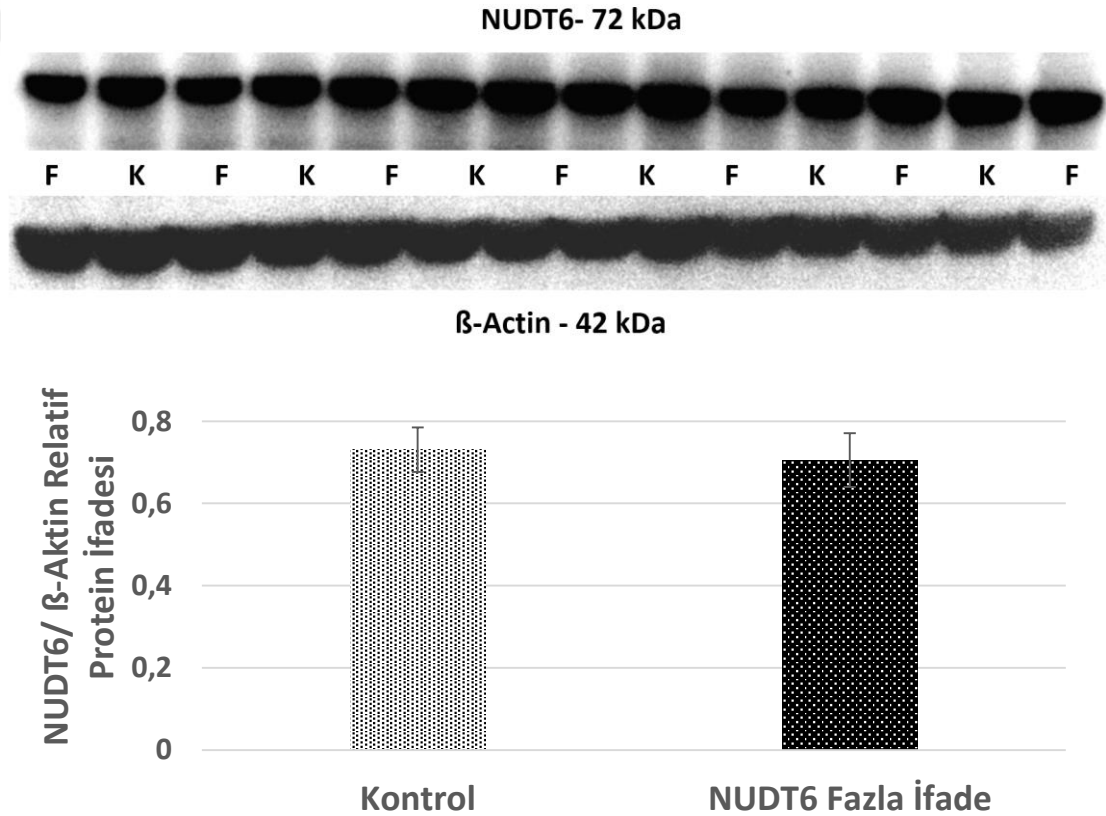
Davranış deneylerinin verileri Ethovision yazılımı aracılığıyla ya da elle değerlendirildi. Verilerin değerlendirilmesinde kullanılan her bir parametre SPSS programında normal dağılıma uygunluk açısından incelendi. Ortalamanın iki standart sapma üstünde ve altında kalan değerler aşırı uç değer kabul edilerek analiz dışı bırakıldı. Normal dağılan veriler Student t testi ile gruplar arasında karşılaştırılırken, normal dağılıma uymayan veriler için Mann Whitney U testi ya da sayısal veriler gruplanarak çapraz tablo istatistiği yapıldı. Çapraz tablo istatistiğinde ki kare testi kullanıldı, ki kare testi varsayımlarının sağlanmadığı durumlarda ise Fisher testi yapıldı. 300 saniyelik deney süresi nedeniyle tavan etkisine uğrayan davranış testi verilerinde tavan etkisinin veri üzerine etkisini kontrol etmek amacıyla Kaplan Meier sağkalım analizi yapıldı ve gruplar Log rank karşılaştırması ile karşılaştırıldı. WB sonucu elde edilen bantların dansiteleri Image J programı ile ölçüldü, ölçülen NUDT6 dansiteleri yükleme kontrolü olan β -Aktin'e oranlanarak Student t testi ile karşılaştırıldı. NUDT6 gerçek zamanlı kantitatif PCR verisi internal kontrol olan β -Aktin'e oranlanarak relatif miktar olarak değerlendirildi, gruplar Student t testi ile karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Moleküler Deneyler

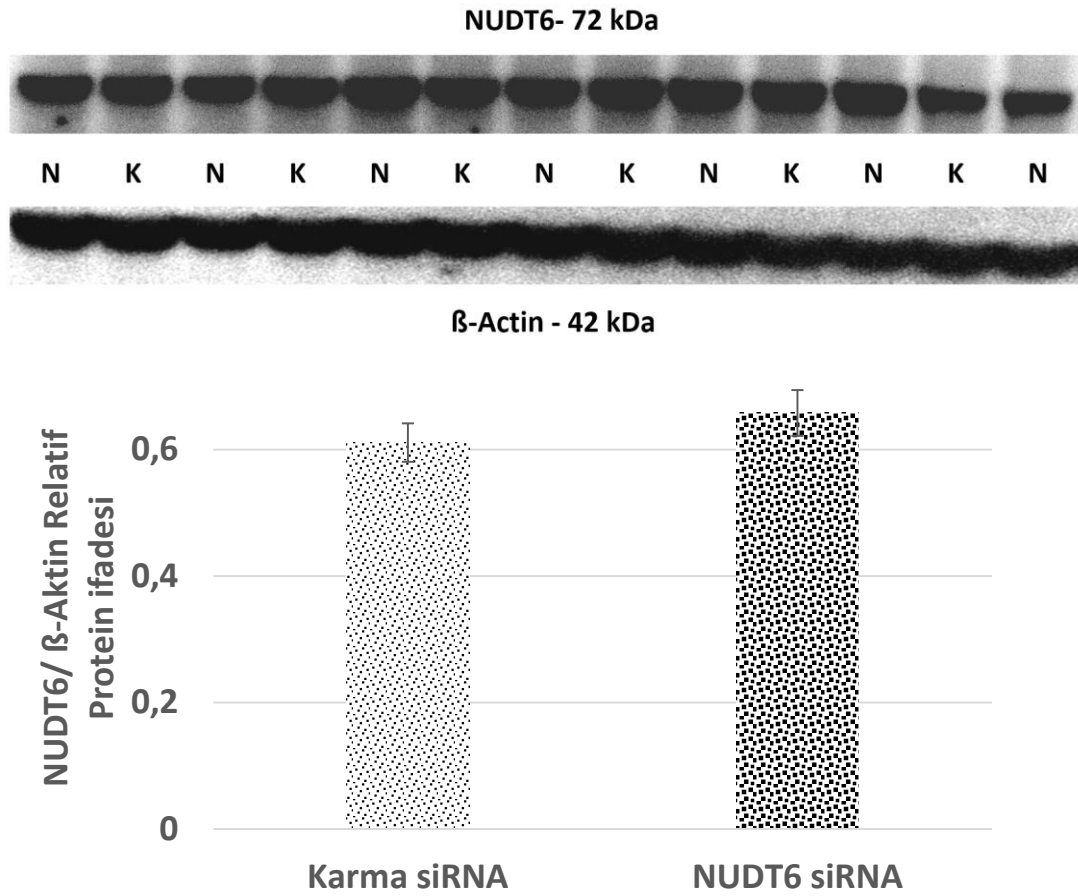
4.1.1. WB ve Kantitatif PCR

İlk olarak, NUDT6 fazla ifadesi ve ifade baskılamasının gerçekleştiğini moleküler düzeyde kanıtlamak üzere NUDT6 WB'si yapıldı. Ne NUDT6 fazla ifadesi ve kontrol grubu karşılaştırmasında ne de NUDT6 siRNA ile karma siRNA grubu karşılaştırmasında NUDT6 protein ifadesi farklı bulundu (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1: NUDT6 fazla ifadesi ve kontrol grubu örneklerinin WB'si.

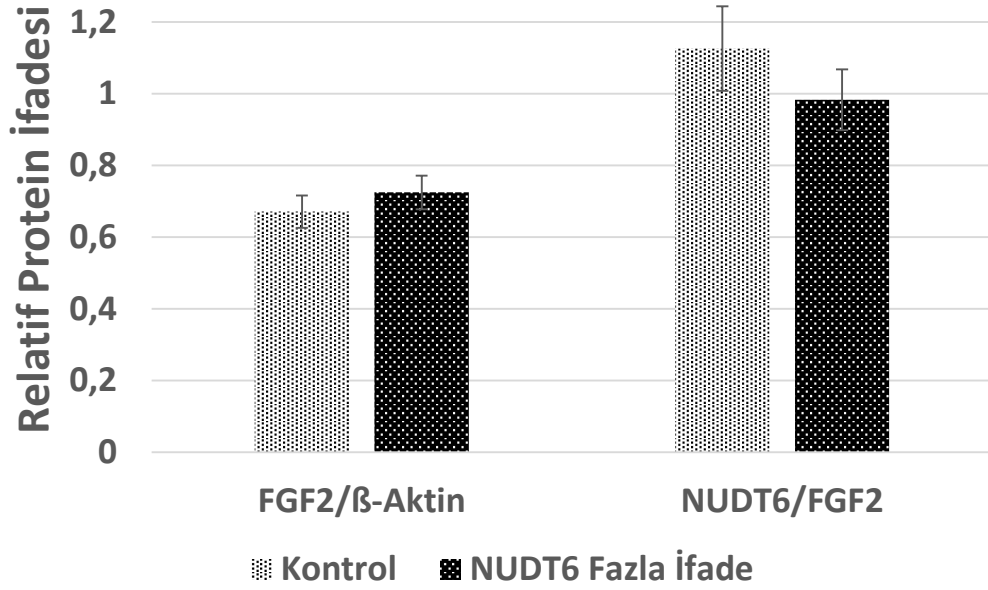
72 kDa'da NUDT6 bantları ve 42 kDa'da β-Aktin bantları görülmektedir (F: NUDT6 fazla ifadesi, K: kontrol). NUDT6 fazla ifadesi ve kontrol grubu arasında NUDT6'nın yükleme kontrolü olan β-Aktine oranlanmış ifadesi farklı değildir ($t=0,297$, $p=0,771$).



Şekil 4.2: NUDT6 siRNA ile karma siRNA grubu örneklerinin WB'si.

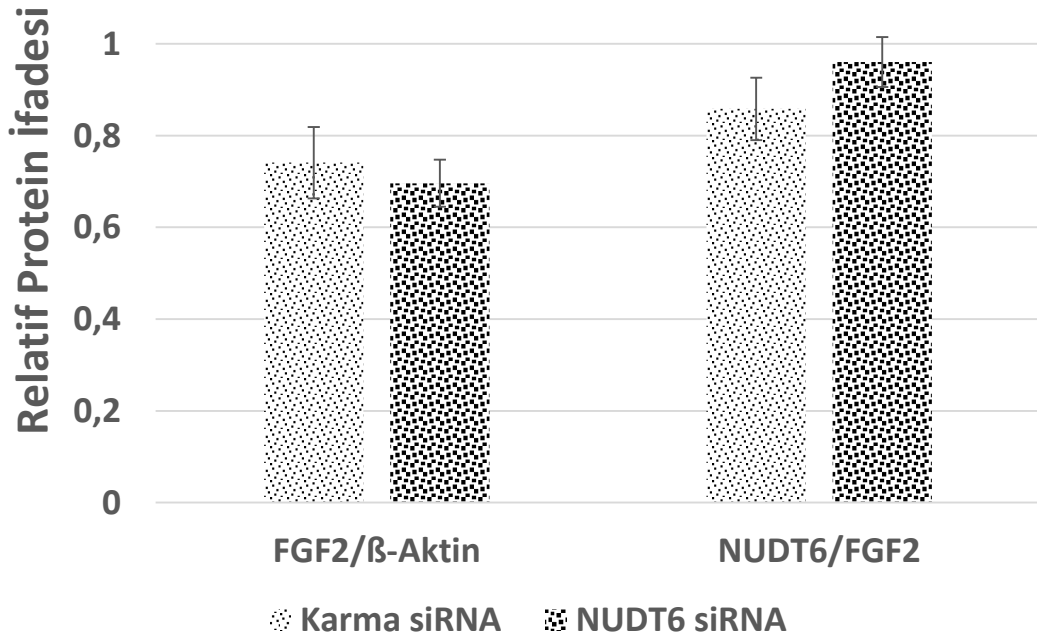
72 kDa'da NUDT6 bantları ve 42 kDa'da β -Aktin bantları görülmektedir (N: NUDT6 siRNA, K: karma siRNA). NUDT6 siRNA ile karma siRNA grubu arasında NUDT6'nın yükleme kontrolü olan β -Aktine oranlanmış ifadesi farklı değildir ($t=-0,810$, $p=0,439$).

WB'de, NUDT6'nın "*antisense*" partneri olduğu ve hücre hattı çalışmalarında çokça birlikte ele alındığı FGF2'nin ifadesi değerlendirildi. NUDT6 fazla ifade ile kontrol grubu; NUDT6 siRNA ile karma siRNA grubu arasında FGF2'nin β -aktine relatif ifadesi farklı bulunmadı (Şekil 4.3). FGF2 ifadesi ve NUDT6 ifadesinden daha iyi bir belirteç olabileceği için NUDT6/FGF2 oransal ifadesi de gruplar arasında ele alındı ve bu oran da gruplar arasında benzer bulundu (Şekil 4.4).



Şekil 4.3: NUDT6 fazla ifade grubunun β-Aktine oranlanmış FGF2 ve FGF2'ye oranlanmış NUDT6 protein ifadesi.

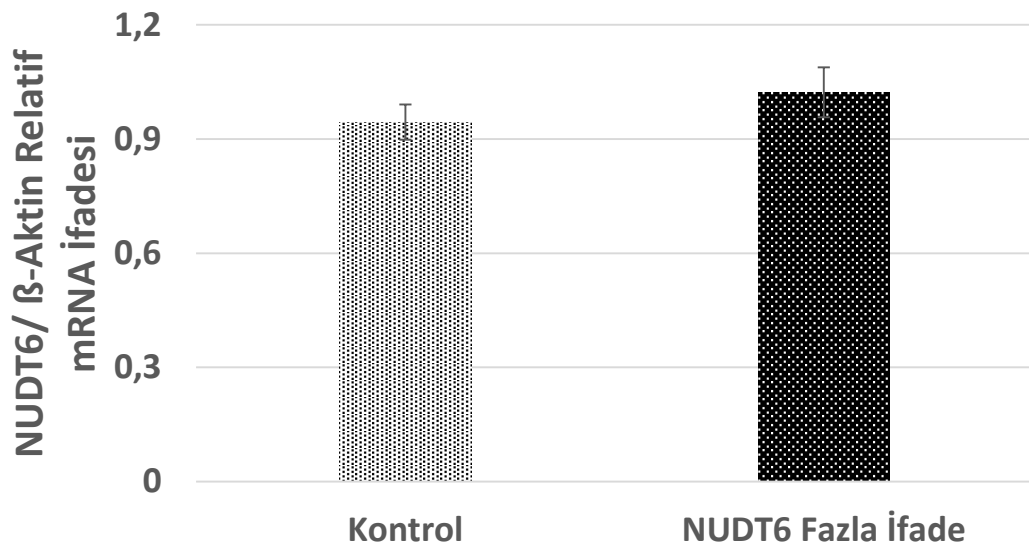
PFK'da NUDT6 fazla ifadesi FGF2'nin yükleme kontrolü olan β-Aktine oranlanmış ifadesini değiştirmemektedir ($t=0,829$, $p=0,426$). NUDT6/FGF2 oransal ifadesi de gruplar arasında benzerdir ($t=0,983$, $p=0,345$).



Şekil 4.4: NUDT6 ifade baskılaması grubunun β-Aktine oranlanmış FGF2 ve FGF2'ye oranlanmış NUDT6 protein ifadesi.

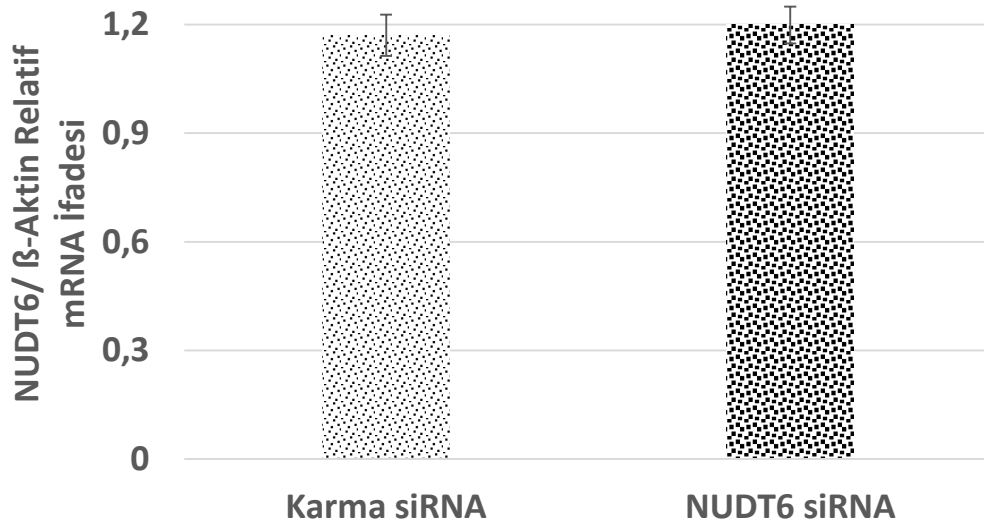
PFK'da NUDT6 ifade baskılaması FGF2'nin β-Aktine oranlanmış ifadesini değiştirmemektedir ($t=0,494$, $p=0,631$). NUDT6/FGF2 oransal ifadesi de gruplar arasında farklı değildir ($t=-1,184$, $p=0,261$).

NUDT6 fazla ifadesinin ve eGFP ifadesinin WB'de gösterilemiyor olmasına karşın, fazla ifade grubunda kontrol grubuna göre davranışsal farklar tespit edilmesi nedeniyle AAV2 aracılı moleküler değişikliklerin geliştiği ve davranışsal yansımalara dönüştüğü düşünüldü. Mesajcı RNA'nın (mRNA) proteinden daha hassas bir gösterge olması nedeniyle NUDT6 fazla ifadesi ve ifade baskılaması kantitatif PCR ile gösterilmek istendi. Fakat her iki grubun da PCR'ında varyasyon çok genişti ve fazla ifade ile kontrol grubu; NUDT6 siRNA ile karma siRNA grubu arasında NUDT6'nın β -aktine relatif ifadesi farklı bulunmadı (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5: Fazla ifade grubu deneylerinde NUDT6 kantitatif PCR'ında NUDT6 mRNA ifadesinin iç kontrol olarak kullanılan β -aktinin mRNA ifadesine oranı.

NUDT6 fazla ifade grubunda NUDT6 mRNA'sının β -Aktin mRNA'sına relatif ifadesi kontrol grubundan farklı değildir ($t=-0,948$, $p=0,360$).



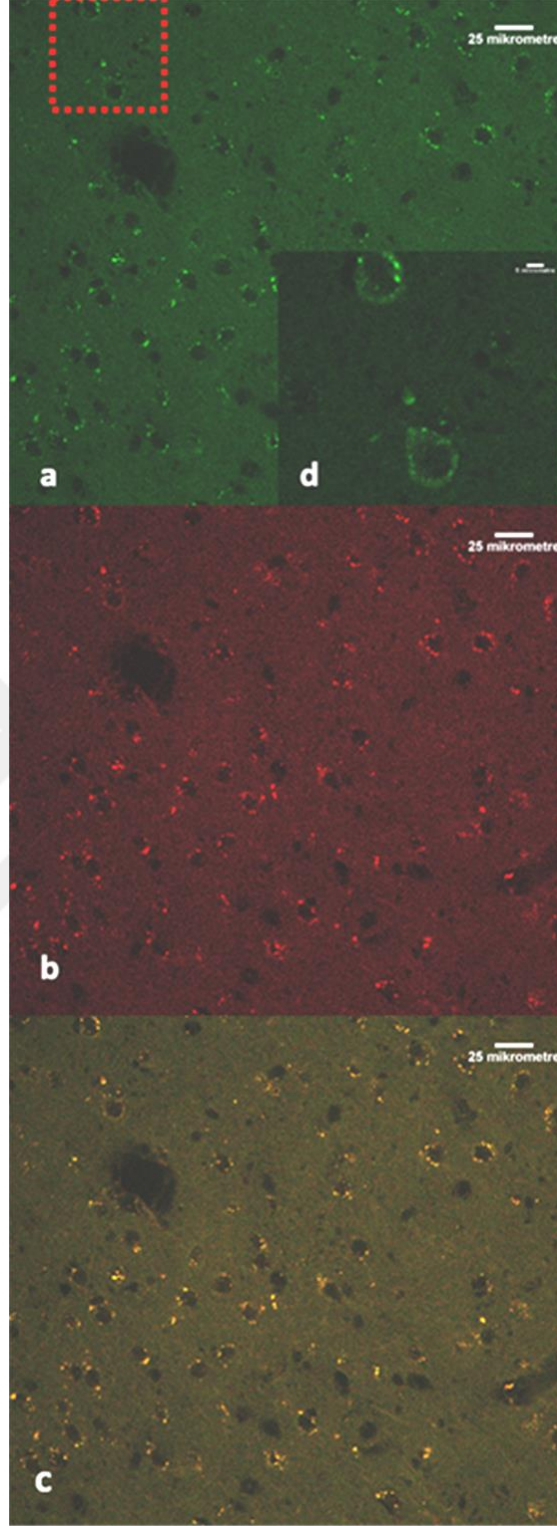
Şekil 4.6: İfade baskılaması grubu deneylerinde NUDT6 kantitatif PCR'ında NUDT6 mRNA ifadesinin iç kontrol olarak kullanılan β-aktinin mRNA ifadesine oranı.

NUDT6 siRNA grubunda NUDT6 mRNA'sının β-Aktin mRNA'sına relatif ifadesi karma siRNA grubuna benzerdir ($t=0,375$, $p=0,714$).

Gerçekleştiği ve davranışsal fark yarattığı düşünülen moleküler değişikliklerin WB ve PCR yönteminden kaynaklanan dezavantajlar nedeniyle bu teknikler ile ortaya konamamış olabileceği düşünüldü. Her iki yöntem için de en önemli dezavantaj, tekniğin kısıtlılığı nedeniyle, enjeksiyon alanı dışında kalan çevre dokuların da alınmasıyla etkinin seyrelmesidir. Buna AAV2'nin dokuda az sayıda hücreyi enfekte etmesinin de etkisinin olabileceği düşünüldü. Bu nedenle moleküler değişikliklerin bölgesel olarak ufak alanlarda değerlendirilebileceği İHK ile gösterilmesi planlandı.

4.1.2. İHK ve PCR

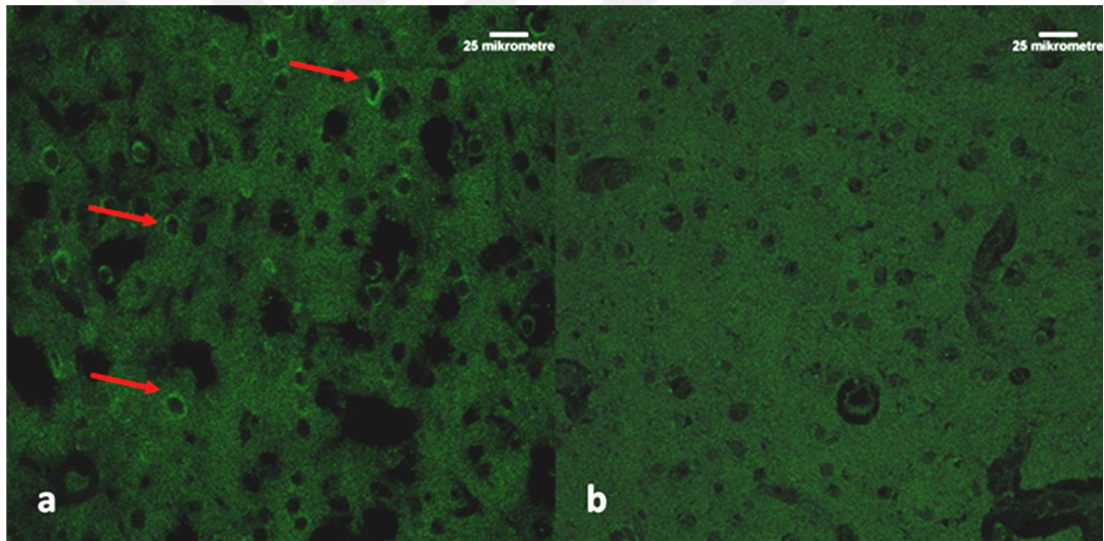
Fazla ifade ve kontrol gruplarından alınan kesitler GFP sinyali açısından önce GFP antikoruyla işaretleme yapılmaksızın konfokal mikroskopta değerlendirildi. Kesitlerde yaygın ve enjeksiyon bölgesinden uzakta da gözlenen perinükleer noktasal yeşil sinyal olduğu görüldü (Şekil 4.7a). Bu noktasal sinyal dışında fazla ifade grubunda kimi hücrelerde perinükleer halo şeklinde yeşil bir sinyal olduğu fark edildi (Şekil 4.7d).



Şekil 4.7: Fazla ifade grubundan bir hayvanın işaretleme olmaksızın DAPI çekirdek boyası ile kapatılmış kesidinin yeşil ve kırmızı kanallardaki görüntüleri.

Yeşil kanalda perinükleer noktasal sinyal belirgindir (a), bu sinyal birebir kırmızı kanalda da görülmektedir (b). İki görüntü üst üste konduğunda söz konusu noktaların rengi birebir örtüşme ile uyumlu olacak şekilde sarıya dönmektedir (c), bu da söz konusu noktaların GFP için spesifik dalga boyunda değil, daha geniş dalga boyunda sinyal veren bir molekül olduğunu düşündürmektedir. Yeşil kanalda perinükleer halo şeklindeki sinyalin büyütülmüş görüntüsüne yer verilmiştir (d).

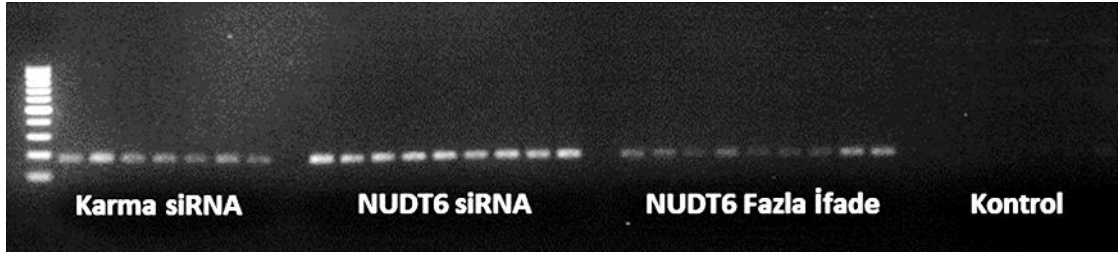
Noktasal sinyallerin baskınlığı nedeniyle bu halo şeklindeki sinyal ileri değerlendirilemedi. Noktasal sinyal en başta GFP olarak düşünülmüş olmasına rağmen, bu sinyalin yaygınlığı ve kırmızı kanalda daha düşük lazer gücü altında birebir görülmesi (Şekil 4.7), eGFP ifade etmediği bilinen kontrol hayvanlarında ve hatta naif hayvanda da olması nedeniyle görülenin spesifik olmayan bir sinyal olduğuna kanaat getirildi. GFP'nin perfüzyonla floresan sinyalinin azaldığını ifade eden gözlemlerden yola çıkarak GFP sinyalini artırmak için eGFP antikoru ile İHK yapıldı. Bu antikarla boyanan fazla ifade grubu kesitlerinde hücrelerde perinükleer halo şeklinde yeşil floresan sinyale rastlandı (Şekil 4.8a). Kontrol grubu hayvanında benzer sinyale rastlanmaması üzerine bu sinyalin eGFP olduğuna ve viral enfeksiyonun gerçekleştiğine protein düzeyinde emin olundu (Şekil 4.8b).



Şekil 4.8: Fazla ifade grubundan bir hayvanın eGFP işaretlemesi.

Yaygın perinükleer yeşil sinyal görülmektedir, sinyallerden birkaçı kırmızı ok ile gösterilmiştir (a). Kontrol grubundan bir hayvanın eGFP işaretlemesinde ise fazla ifade grubuna benzer sinyalin olmaması dikkat çekmektedir (b).

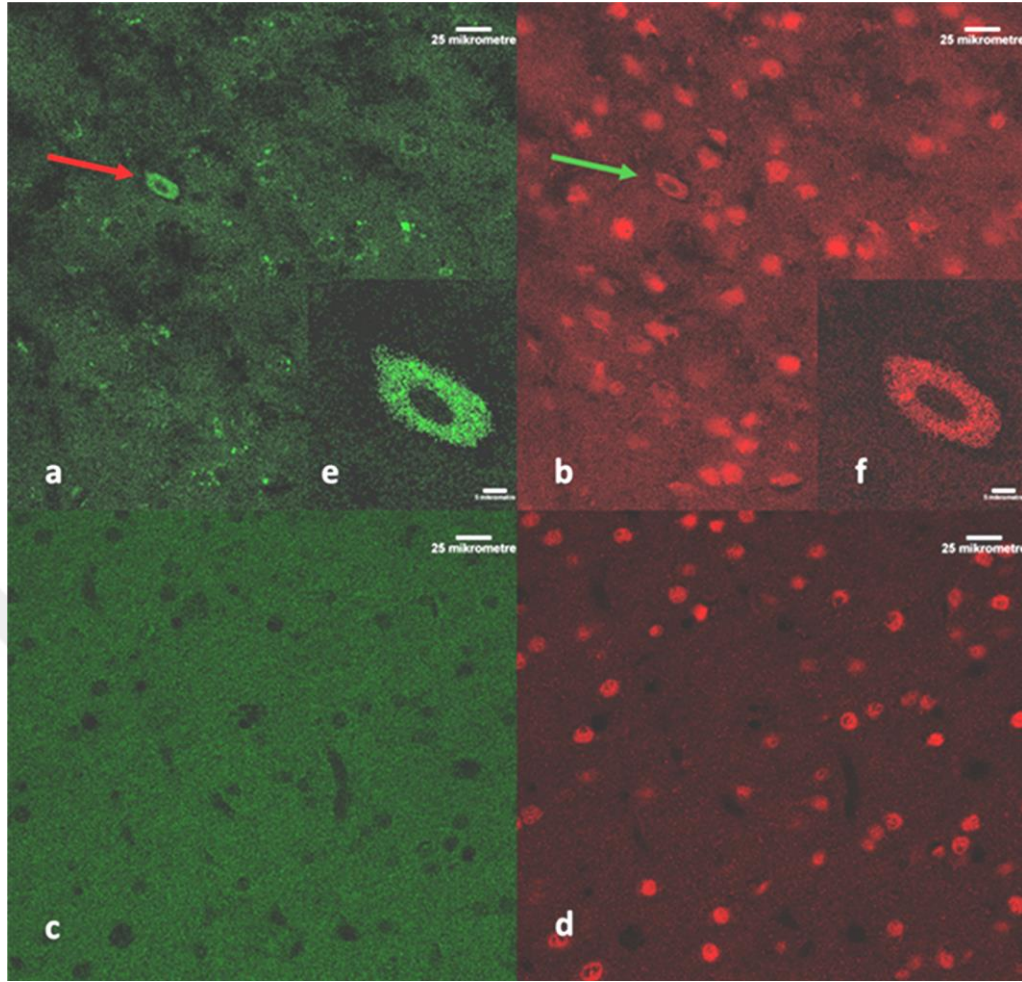
Viral enfeksiyonun gerçekleştiğini bir de mRNA düzeyinde teyit etmek için eGFP PCR'ı yapıldı. eGFP ifade eden virüslerin verildiği NUDT6 fazla ifade, NUDT6 siRNA ile karma siRNA gruplarının tüm hayvanlarında eGFP bandı olduğu görüldü. Aksine, eGFP içermediği bilinen boş kontrol virüsü enjekte edilmiş hiçbir hayvanda eGFP bandına rastlanmadı (Şekil 4.9). Böylece İHK'daki protein bulguları mRNA düzeyinde desteklendi.



Şekil 4.9: Tüm gruplarda eGFP PCR'ı.

Kontrol grubunda hiç bant yokken diğer üç grupta eGFP ile uyumlu bantların olduğu görülmektedir.

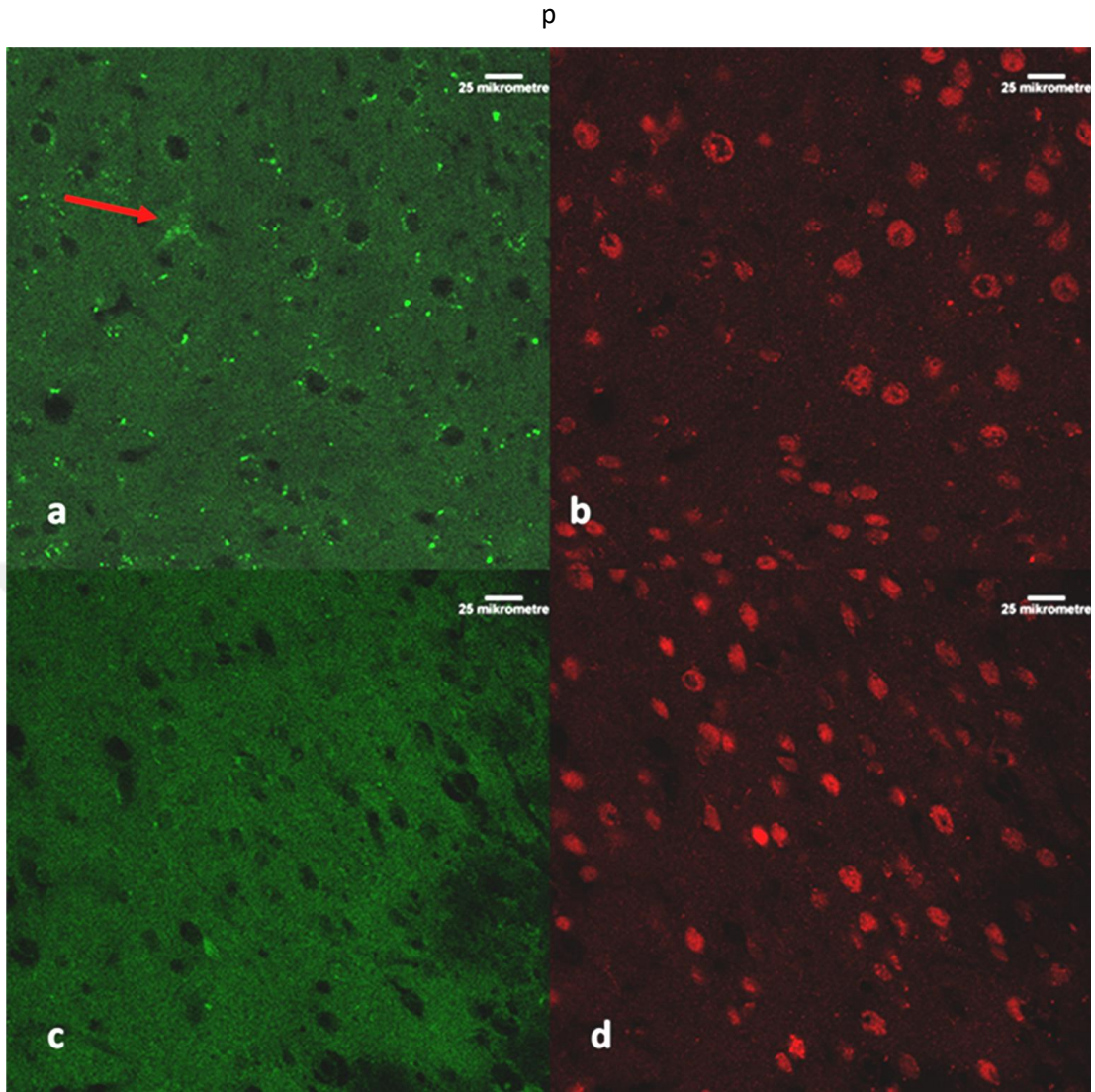
Viral enfeksiyonun moleküler olarak mRNA ve protein düzeyinde kanıtlanmasının ardından NUDT6 fazla ifadesi ve ifade baskılaması İHK aracılığıyla gösterilmek istendi. NUDT6 sinyali PFK'da yaygın ve nükleerdi (Şekil 4.10 b,d). Fazla ifade grubu hayvanlarında nükleer sinyale ek olarak, sitoplazmik NUDT6 sinyaline de rastlandı ve bu sinyalin eGFP ifade eden hücrelerde olduğu görüldü (Şekil 4.10a ve b). Bu sitoplazmik sinyalin eGFP ifade etmeyen hücrelerde olmaması nedeniyle AAV2 ilişkili fazla ifadede kaynaklandığına kanaat getirildi. Kontrol grubu kesitleri incelendiğinde nükleer NUDT6 sinyalinin olduğu, fakat sitoplazmik sinyalin olmadığı görüldü (Şekil 4.10c ve d).



Şekil 4.10: NUDT6 fazla ifadesi ve kontrol grubundan birer hayvandan alınan kesidin NUDT6 işaretlemesi.

Fazla ifade grubundaki hayvanda eGFP sinyali görülmektedir (a). Aynı hayvanda nükleer ve yaygın NUDT6 sinyali vardır (b). Buna ek olarak, eGFP sinyalinin olduğu, okla gösterilmiş hücrede sitoplazmik NUDT6 sinyali gözlenmektedir (b). Söz konusu hücrenin büyütülmüş yeşil kanal görüntüsü e, kırmızı kanal görüntüsü f şekillerinde yer almaktadır. Kontrol grubu hayvanının NUDT6 işaretlemesinde ise eGFP ifadesi yoktur(c) ve NUDT6 sinyali nükleerdir (d).

İfade baskılaması grubunun NUDT6 İHK değerlendirmelerinde yaygın nükleer NUDT6 ifadesi her iki grupta da görüldü ve iki grup arasında fark gözlenmedi (Şekil 4.11). Ancak bazı hücrelerin hiç endojen NUDT6 ifadesi olmadığı fark edildi, bu nedenle ifade baskılamasının sağlıklı değerlendirilemeyeceği düşünüldü. Ancak NUDT6 ifade eden ve etmeyen hücrelerin hangi tip hücreler olduğuna dair çalışmalar aracılığıyla NUDT6 ifadesindeki endojen farkların daha iyi anlaşılmasının ardından NUDT6 İHK'sı ile NUDT6 ifade baskılamasının etkin değerlendirilebileceğine kanaat getirildi.



Şekil 4.11: NUDT6 siRNA ve karma siRNA grubundan birer hayvanın NUDT6 işaretlemesi.

NUDT6 siRNA grubundaki hayvanın eGFP sinyali görülmektedir (a). NUDT6 işaretlemesinde NUDT6 yaygın ve nükleerdir, kimi hücrelerde hiç ifade edilmemektedir (b). a'da okla gösterilen hücrede eGFP sinyali olduğu halde NUDT6 sinyali olmaması dikkat çekicidir. Karma siRNA grubundan bir hayvanın eGFP sinyali görülmektedir (c). NUDT6 siRNA grubuna benzer şekilde NUDT6 işaretlemesinde sinyal yaygın ve nükleerdir (d).

4.2. Davranış Deneyleri

4.2.1. NUDT6 Fazla İfadesinin Davranışsal Etkileri

Hayvanların araştırmacıya alıştırmaları için ele alınmalarının ardından sükröz tüketim testi (STT), aydınlık-karanlık kutusu (AKK), yükseltilmiş artı labirenti (YAL),

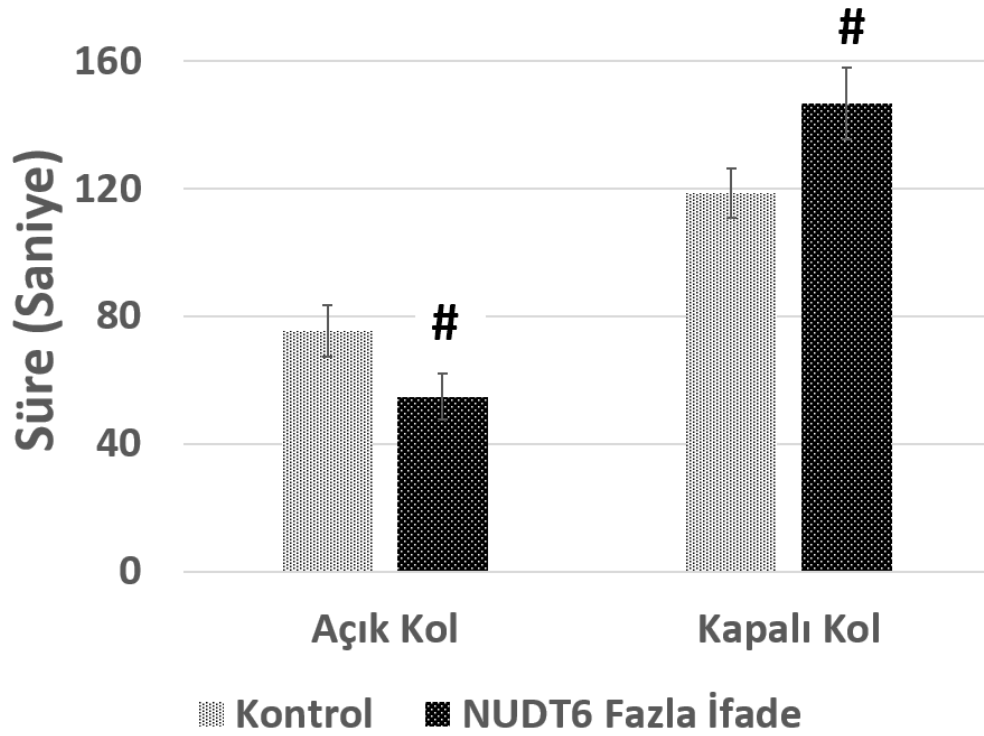
zorla yüzdürme testi (ZYT) ve pasif kaçınma (PK) testleri daha önce belirtilen prosedürlere uygun şekilde gerçekleştirildi. Her iki grupta da değerlendirme deney gruplarına kr bir gözlemci tarafından yapıldı. Analizlerde ortalamanın 2 standart sapmasının altında ve üstünde kalan u değerler analiz dışı bırakıldı. Grafiklerde veriler ortalama (\pm SEM) olarak gösterildi. Anlamlı değerler * sembolü, anlamlılığa yaklaşan değerler # sembolü ile ifade edildi.

NUDT6 Fazla İfadesinin Anksiyete- benzeri Davranışı zerine Etkileri

Yükseltilmiş Artı Labirenti (YAL)

Lokomotor aktivitenin göstergesi olarak değerlendirilen bir parametre olan test süresince kat edilen toplam mesafe iki grup arasında benzer bulundu: NUDT6 fazla ifade eden grup (n=16) test boyunca ortalama 1379 (\pm 69) cm hareket ederken kontrol grubu (n=13) 1441 (\pm 70) cm hareket etti ($t=0,619$, $p=0,541$).

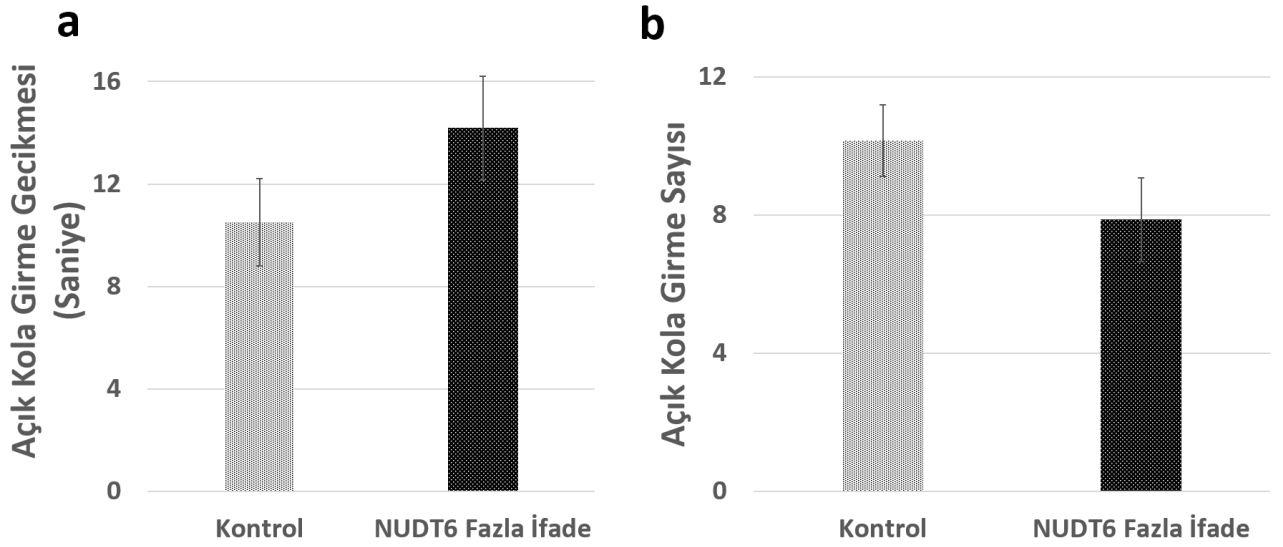
NUDT6 fazla ifade eden grup (n=16) açık kolda 55 (\pm 7) saniye, kontrol grubu (n=13) 75 (\pm 8) saniye kaldı. Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesi, YAL'de açık kolda geçirilen süreyi azalttı ve bu etki istatistiksel anlamlılık sınırında bulundu ($t=1,898$, $p=0,068$) (şekil 4.12). Açık kolda geçirilen süreyle uyumlu olacak şekilde, NUDT6 fazla ifadesi (n=16), karanlık kolda geçirilen süreyi kontrol grubuna (n=12) göre uzattı ve bu etki de istatistiksel anlamlılık sınırında bulundu [sırasıyla, 147 (\pm 11) saniyeye karşın 119 (\pm 8) saniye; $t=-2,052$, $p=0,051$] (şekil 4.12).



Şekil 4.12: NUDT6 fazla ifadesi grubunda YAL'de açık kolda ve kapalı kolda süre bulguları.

NUDT6 fazla ifade eden grup kontrol grubuna göre açık kolda daha az, kapalı kolda ise daha fazla zaman geçirmektedir, bu etki istatistiksel anlamlılık sınırındadır. (# $p \leq 0,13$)

NUDT6 fazla ifade eden grup ($n=15$) kontrol grubundan ($n=12$), açık kola girme gecikmesi açısından farklı değildi [14 (± 2) saniye ile 11 (± 2) saniye; Mann Whitney U testi, $p=0,183$] (Şekil 4.13a). Uyumlu olarak, NUDT6 fazla ifade grubu ($n=15$) ile kontrol grubunun ($n=13$) açık kola girme sayıları [8 (± 1) ile 10 (± 1)] da benzerdi ($t=1,412$, $p=0,170$, Şekil 4.13b).



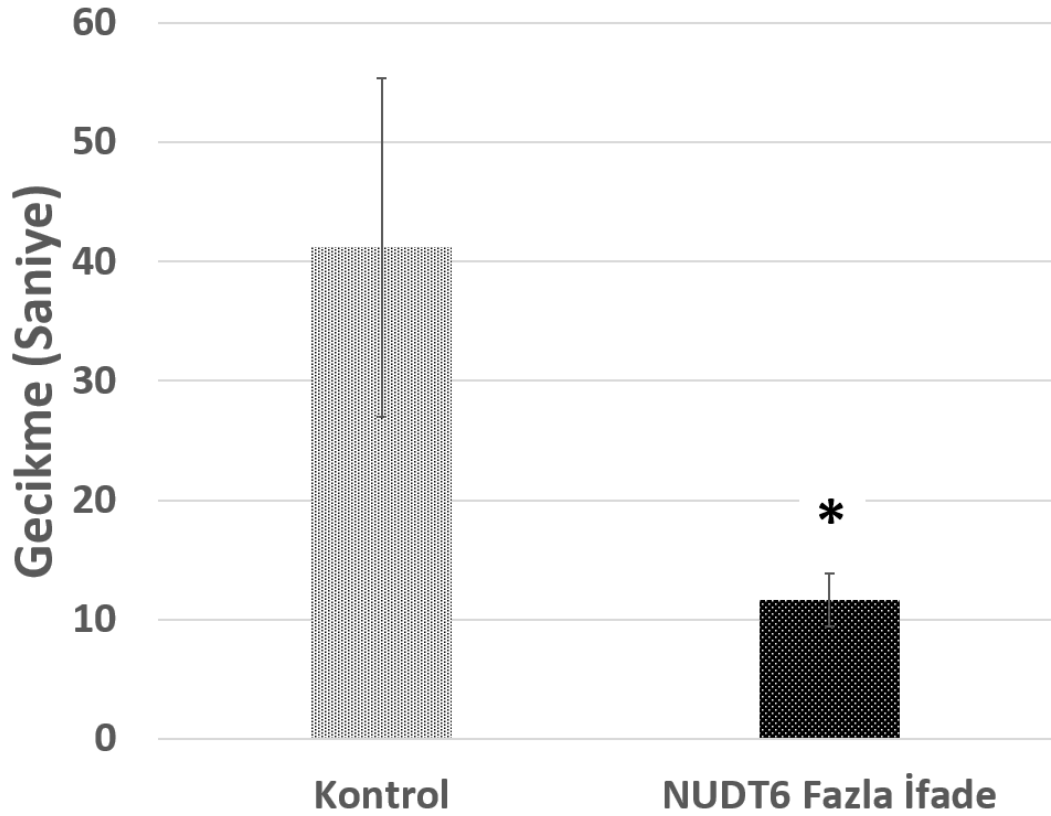
Şekil 4.13: NUDT6 fazla ifadesi grubunda YAL'de açık kola girme gecikmesi (a) ve açık kola girme sayısı (b).

Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesi, YAL'de açık kola girme gecikmesini ve geçiş sayısını değiştirmemektedir.

Açık kolların daha distal ucuna gidebilme düşük anksiyete ile korele olduğundan, açık kolların distal yarısında geçirilen süre, distal açık kola girme sayısı ve distal açık kola girme gecikmesi ayrıca değerlendirildi. Gruplar arasında bu parametrelerin hiçbirinde fark bulunmadı (sırasıyla, Mann Whitney U $p=1,000$; $p=0,820$ ve $p=0,648$).

Aydınlık-Karanlık Kutusu (AKK)

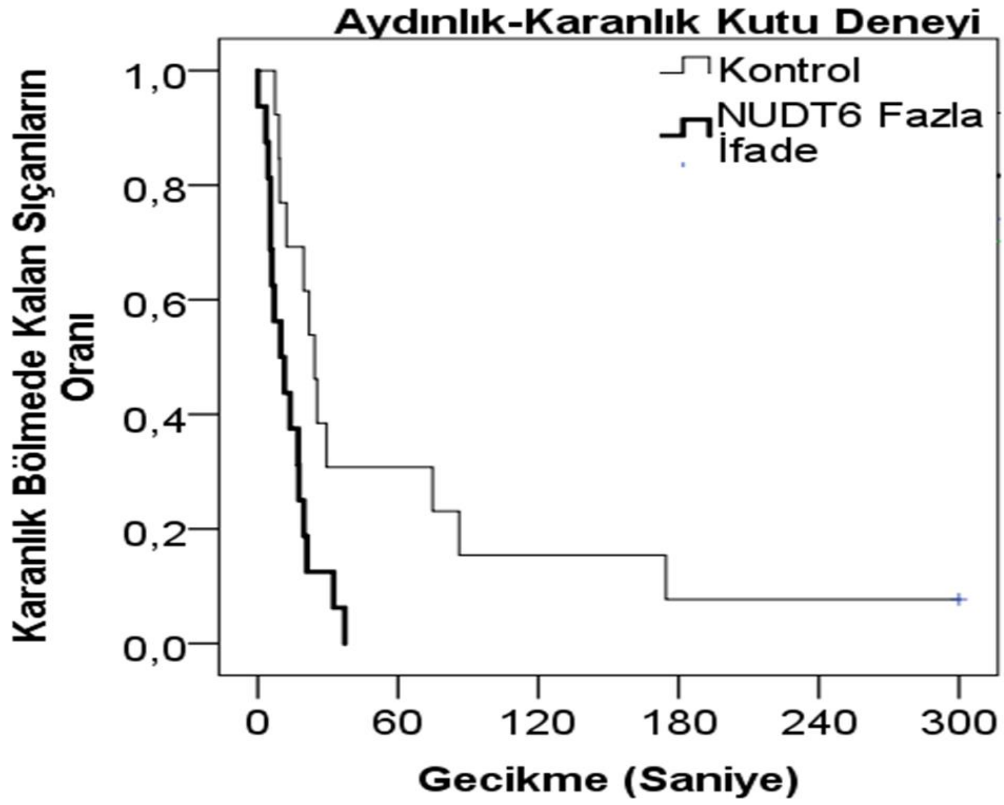
Bu deneyde anksiyete-benzeri davranışı değerlendirmek için kullanılan, karanlık bölmeden aydınlık bölmeye geçme gecikmesi NUDT6 fazla ifade eden grup ($n=14$) için $12 (\pm 2)$ saniye iken bu değer kontrol grubu ($n=13$) için $41 (\pm 14)$ saniye olarak bulundu. Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesi, aydınlık bölmeye geçme gecikmesini istatistiksel olarak anlamlı biçimde kısalttı (Mann Whitney U testi, $p=0,009$, Şekil 4.14).



Şekil 4.14: NUDT6 fazla ifadesi grubunda AKK'de gecikme.

Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesi, aydınlık bölme geçme gecikmesini istatistiksel olarak anlamlı azaltmaktadır (* $p < 0,05$).

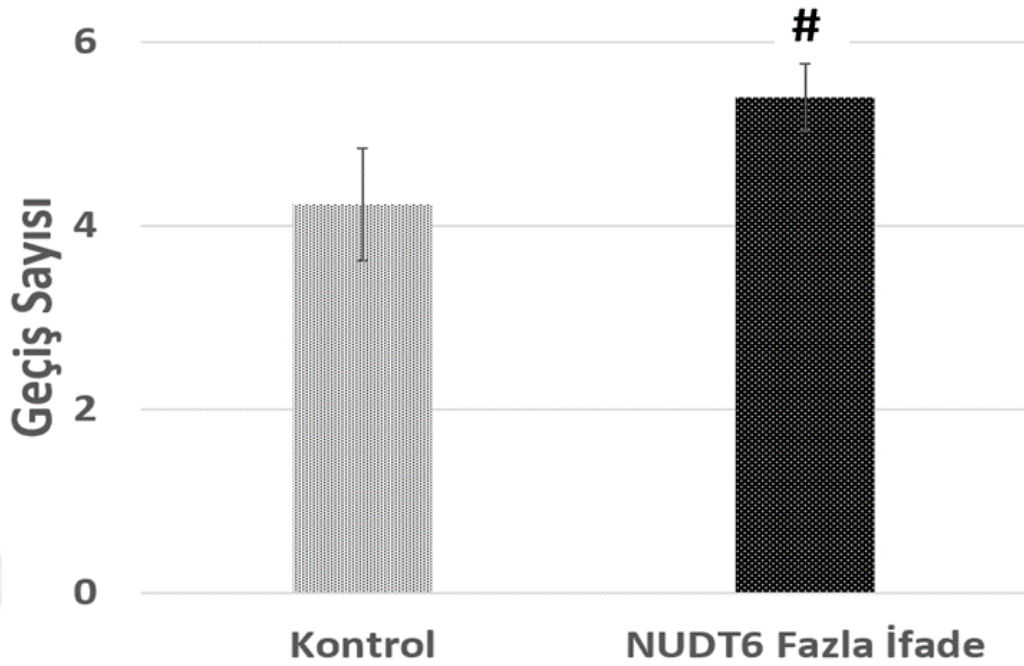
Bu testte aydınlık bölme testin tüm süresi olan 300 saniye boyunca hiç geçmeyen bir hayvan vardı. Bu hayvanın geçiş gecikmesi test süresi olan 300 saniye olarak değerlendirildi, ancak deney 300 saniyeden daha uzun sürse idi bu hayvanın ne zaman aydınlık bölme geçeceği net olarak bilinebilecekti. Bu nedenle veri, sansürlü veri olarak değerlendirildi ve Kaplan Meier sağkalım analizi yapıldı. Aşağıda sunulan sağkalım grafiğinde, iki gruba ait eğrilerin hiçbir noktada kesişmediği görülmektedir (Şekil 4.15). Buna göre, iki grubun aydınlık bölme geçme gecikmeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (Kaplan Meier sağkalım analizi, Log Rank karşılaştırması, $p=0,008$).



Şekil 4.15: NUDT6 fazla ifadesi grubunda AKK'de gecikmenin sağkalım grafiği.

Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesi, aydınlık bölmeye geçme gecikmesini istatistiksel anlamlı şekilde kısaltmaktadır.

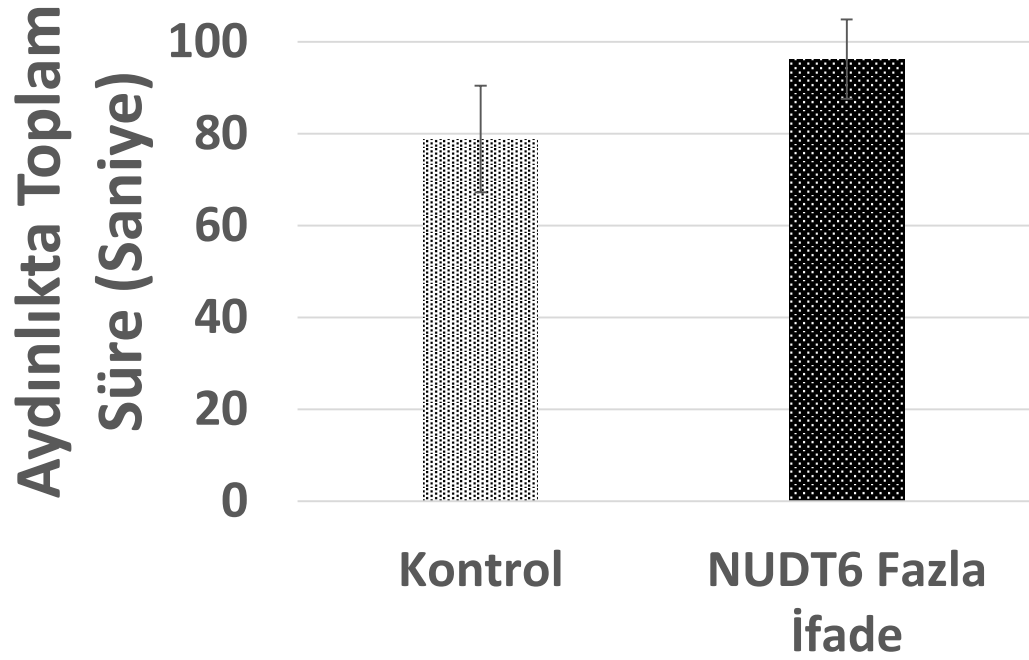
Aydınlık bölmeye geçiş sayısı ele alındığında, NUDT6 fazla ifade eden grup (n=15) için aydınlık bölmeye geçiş sayısı 5,4 ($\pm 0,4$) iken bu değer kontrol grubu (n=13) için 4,2 ($\pm 0,6$) idi ve NUDT6 fazla ifadesinin geçişleri artırma yönünde eğilimi olduğu görüldü ($t=-1,697$, $p=0,102$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: NUDT6 fazla ifadesi grubunda AKK'de geçiş sayısı.

Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesi, AKK'da aydınlık bölme geçiş sayısını artırma eğilimindedir. ($\#p \leq 0,13$)

AKK bulgularının bir diğer önemli özelliği ise, hayvanların aydınlık bölme geçme davranışının niteliği idi. Buna göre, fazla ifade grubu hayvanları, aydınlık bölme aniden giriyor, bölme oldukça hızlı tarayıp yine aniden ve hızlıca karanlık bölme geçiyordu. Bununla uyumlu olacak şekilde, NUDT6 fazla ifade grubu kontrole göre çok daha erken aydınlık bölme girdiği halde, iki grubun aydınlık bölme geçirdikleri zaman benzer bulundu. NUDT6 fazla ifade grubu ($n=15$) aydınlık bölme 96 (± 9) saniye geçirirken kontrol grubu ($n=13$) 79 (± 12) saniye geçirdi ($t=-1,223$, $p=0,232$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: NUDT6 fazla ifadesi grubunda AKK'de aydınlıkta toplam süre. Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesi, AKK'da aydınlık bölmede geçirilen toplam süreyi değiştirmemektedir.

NUDT6 fazla ifade grubu hayvanlarının aydınlık bölmeye daha erken ve daha sık girmelerine rağmen, burada geçirdikleri sürenin kontrol grubundan farklı olmaması bu davranışın dürtüsellikle ilişkili olabileceğini düşündürdü. Bu bağlamda, AKK'de hayvanın risk değerlendirme davranışının ve dürtüsellikinin bir ölçütü olabilecek aydınlık bölmeye geçiş başına süre değerlendirildi, bu parametre NUDT6 fazla ifade grubu (n=15) ve kontrol grubu (n=12) arasında fark göstermedi ($t=0,151$, $p=0,487$).

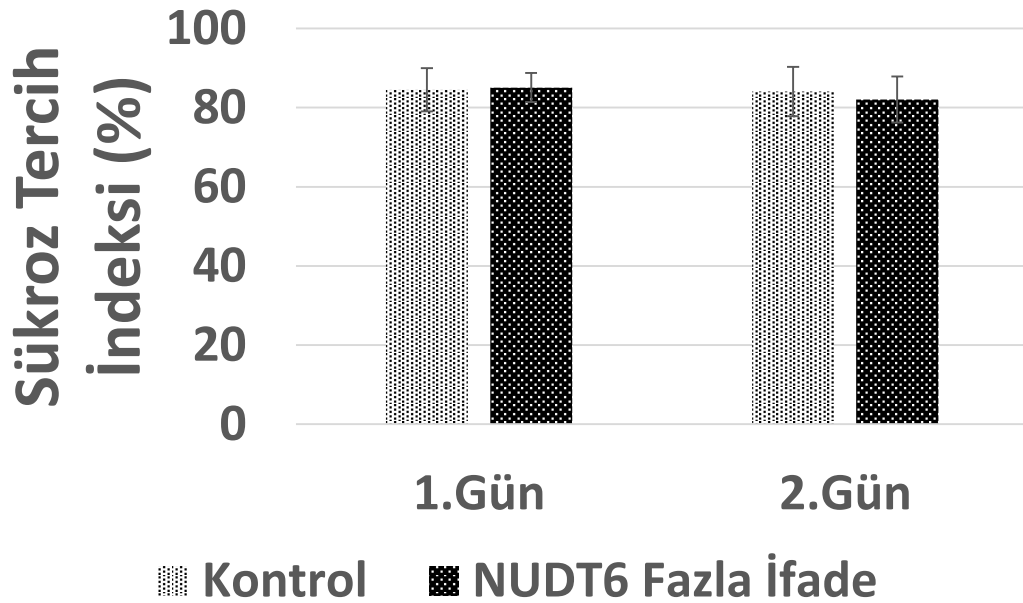
AKK'nin dürtüsellik-benzeri davranışta artma göstermesi üzerine, YAL parametreleri bu bakımdan incelendi ve eldeki veriden bu davranışı değerlendirmekte kullanılabilecek yeni parametreler araştırıldı. Dürtüsellik bir ölçütü olabilecek, açık kola geçiş başına geçirilen süre (açık kolda geçen süre/açık kola giriş sayısı) ve tüm kollara giriş sayısı gruplar arasında farklı bulunmadı (Sırasıyla, Mann Whitney U testi, $p=0,786$ ve Student t testi $t=0,352$, $p=0,728$).

NUDT6 Fazla İfadesinin Depresyon- benzeri Davranışa Etkileri

Sükroz Tercih Testi (STT)

Sükroz tercih indeksi hem 1.gün, 2.gün ölçümleri için ayrı ayrı hesaplandı. Hesaplanan indeksler NUDT6 fazla ifade eden grup (n=9 kafes) ve kontrol grubu (n=7 kafes) arasında karşılaştırıldı. Her iki grupta her iki günde tüketilen toplam sıvı miktarları benzerdi (Sırasıyla, $t=-0,873$, $p=0,397$ ve $t=-1,416$, $p=0,179$).

NUDT6 fazla ifadesi grubunun (n=8 kafes) 1.günkü sükroz tercih indeksi 85,1 ($\pm 3,7$) iken aynı grubun (n=9 kafes) 2.günkü sükroz tercih indeksi 82,0 ($\pm 5,8$) olarak hesaplandı. Kontrol grubunda (n=7 kafes) bu değer 1.gün için 84,5 ($\pm 5,5$) ve 2.gün için 84,1 ($\pm 6,2$) idi. Gruplar arasında 1.gün ve 2.gün ölçümleri için yapılan ayrı ayrı karşılaştırmalarda sükroz tercihi farklı bulunmadı (Mann Whitney U, sırasıyla $p=0,694$ ve $p=0,470$) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: NUDT6 fazla ifadesi grubunda STT bulguları.

Sükroz tercihleri NUDT6 fazla ifade eden grup ve kontrol grubu arasında 1.gün ya da 2.gün farklı değildir.

Zorla Yüzdürme Testi (ZYT)

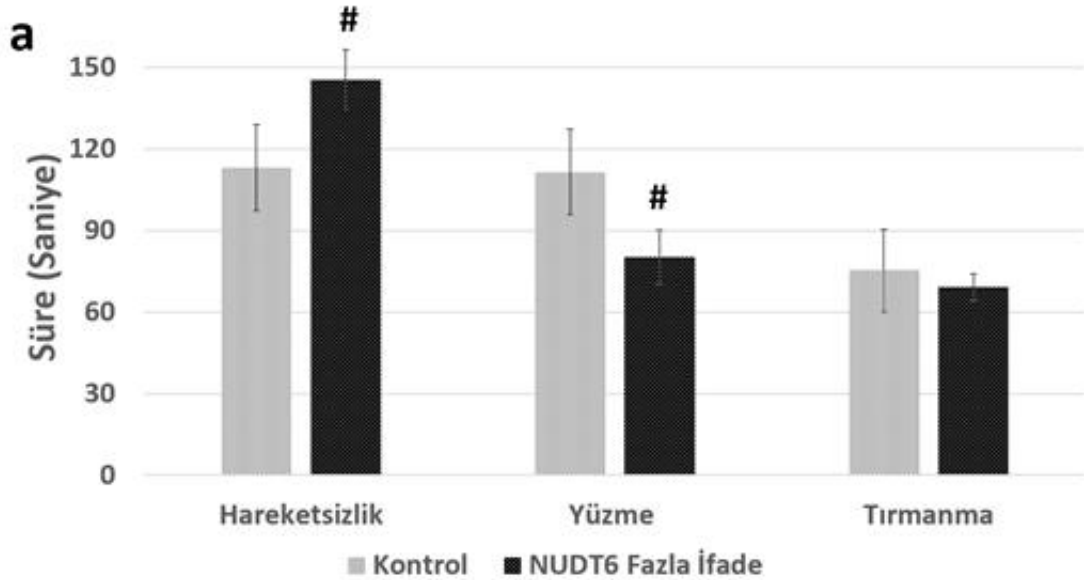
ZYT'de 2. gün 5 dakika boyunca hareketsiz kalmaya kadar geçen süre, hareketsiz geçirilen süre, yüzmeye ve tırmanma süreleri değerlendirildi. Bu testte, test

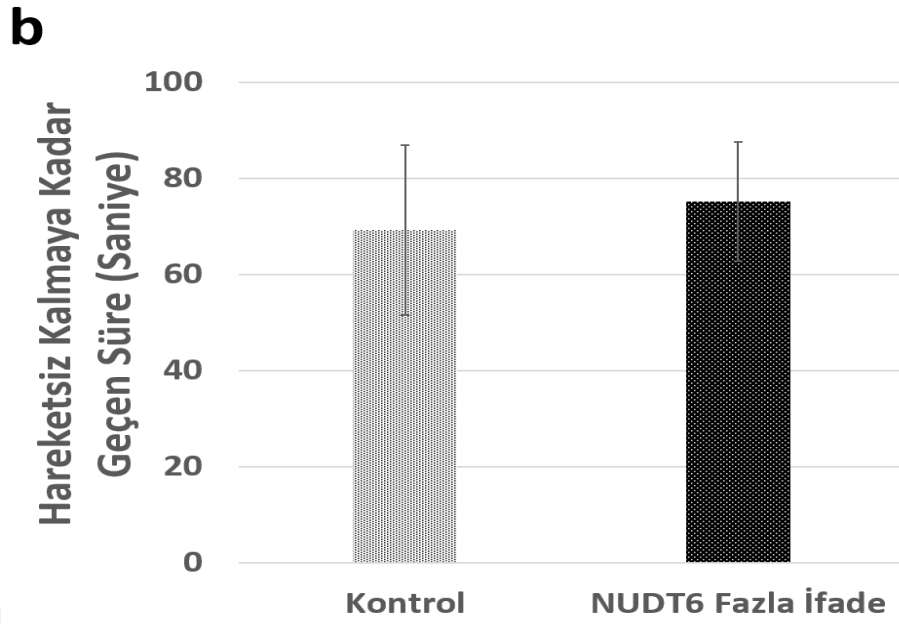
boyunca deney yapılan varile tutunması nedeniyle kontrol grubundan bir hayvan analiz dışı bırakıldı.

NUDT6 fazla ifade grubu(n=15) ile kontrol grubu(n=12) arasında hareket edilen toplam mesafe benzerdi ($t=0,236$, $p=0,815$).

NUDT6 fazla ifade grubu (n=15) 145 (± 11) saniyeyi testte hareketsiz geçirirken bu süre kontrol grubu (n=12) için 113 (± 16) saniye idi; yüzme süresi ise sırasıyla, 80 (± 10) saniye ve 112 (± 16) saniye olarak hesaplandı. Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesi ZYT'de hareketsiz geçen zamanı uzatma ve yüzerek geçen zamanı kısaltma eğiliminde bulundu (sırasıyla, $t=-1,734$, $p=0,095$ ve $t=1,748$, $p=0,093$). Tırmanma süresi NUDT6 fazla ifade grubunda 69 (± 5) saniye iken kontrol grubunda 75 (± 15) saniye idi ve iki grup arasında farklı bulunmadı ($t=0,396$, $p=0,698$) (Şekil 4.19a).

Hareketsiz kalmaya kadar geçen süre de iki grup arasında fark göstermedi [sırasıyla; 75 (± 12) saniye ile 69 (± 18) saniye, Mann Whitney U testi $p=0,568$] (Şekil 4.19b).



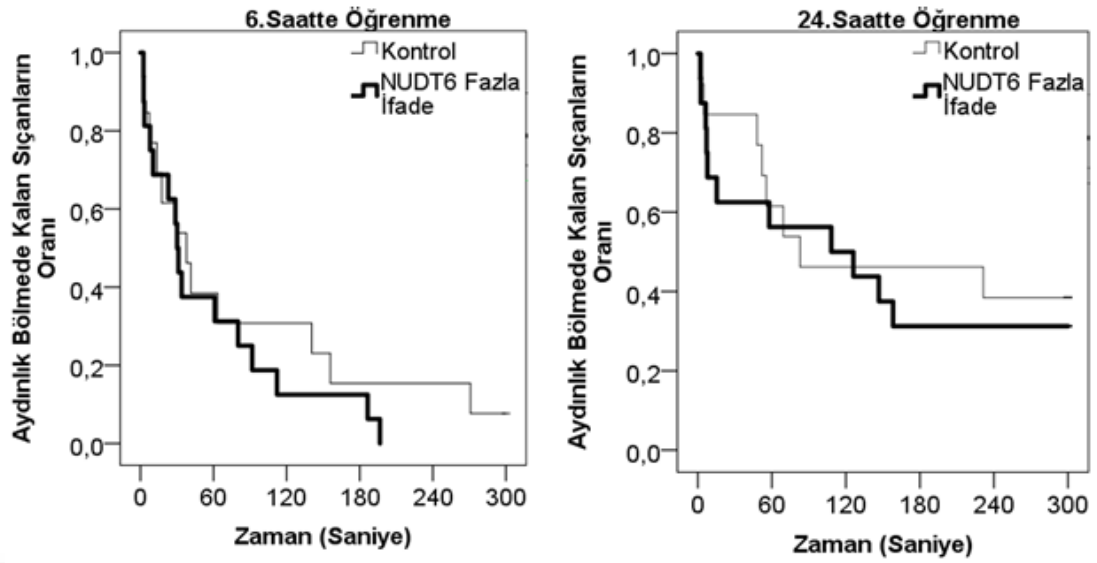


Şekil 4.19: NUDT6 fazla ifadesi grubunda ZYT bulguları.

NUDT6 fazla ifadesi hareketsiz geçen zamanı uzatma, yüzerek geçen zamanı kısaltma eğiliminde iken tırmanma zamanını değiştirmemektedir (a). Hareketsiz kalmaya kadar geçen süre iki grupta benzerdir (b). (# $p \leq 0,13$)

NUDT6 Fazla İfadesinin Öğrenme Davranışına Etkisi- Pasif Kaçınma (PK)

PK'da öğrenmeden 6 saat sonra NUDT6 fazla ifade eden grup ($n=16$) ortalama $56 (\pm 16)$ saniyelik bir gecikme ile elektrik şokunun verildiği karanlık bölmeğe geçerken kontrol grubu aynı bölmeğe $83 (\pm 28)$ saniyelik bir gecikme ile geçti. 24. saatte ise bu gecikme NUDT6 fazla ifadesi için $134 (\pm 32)$ saniye iken kontrol grubunda $158 (\pm 36)$ saniye olarak bulundu. 5 dakikalık deney süresi boyunca karanlık bölmeğe geçmemiş hayvanların sansürlü veri olduğu düşünüldüğünde, tavan etkisini kontrol edecek bir yöntem olan Kaplan Meier testi ile analizler yapıldı. Bu analizlerle PK'da öğrenme aşamasının hem 6 saat ve hem de 24 saat sonrasında 2 grup arasında öğrenme performansları benzer bulundu (Sırasıyla, Kaplan Meier analizi, Log rank testi $p=0,397$ ve $p=0,672$) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: NUDT6 fazla ifadesi grubunda PK bulguları.

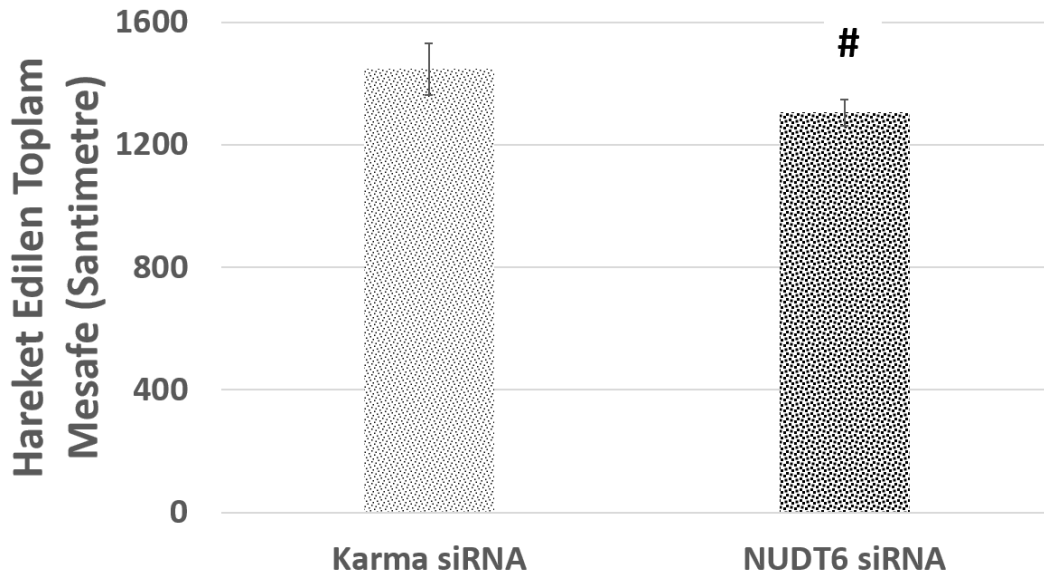
Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesi, PK ile değerlendirilen öğrenme performansında 6 ve 24.saatlerde değişime yol açmamaktadır.

4.2.2. NUDT6 İfade Baskılamasının Davranışsal Etkileri

NUDT6 İfade Baskılamasının Anksiyete- benzeri Davranışa Etkileri

Yükseltilmiş Artı Labirenti (YAL)

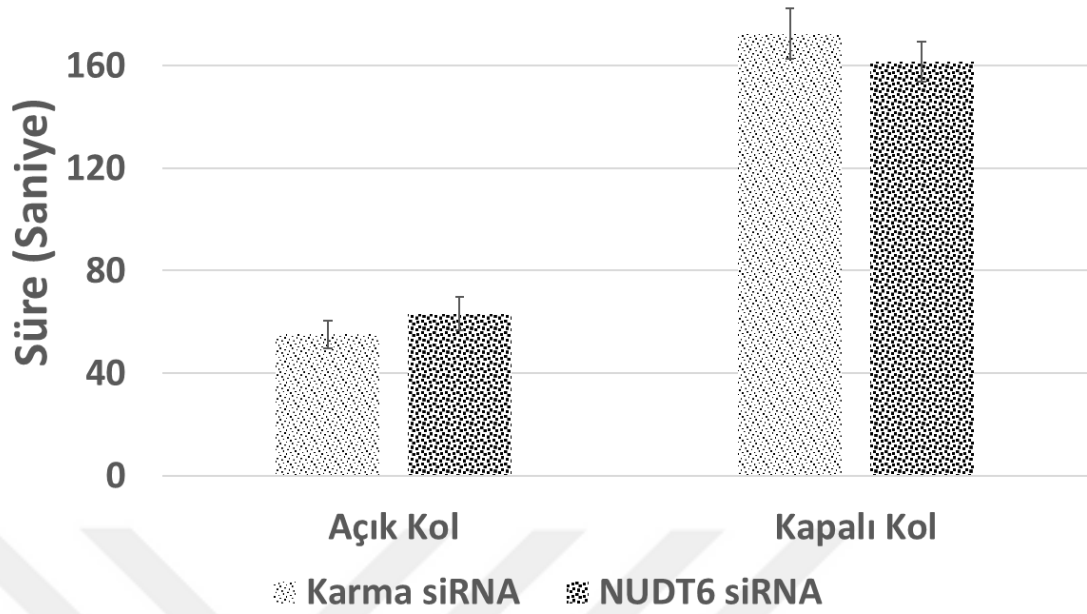
YAL'de değerlendirilen ilk parametre test boyunca kat edilen mesafeydi. NUDT6 siRNA grubu (n=14) test boyunca 1305 (± 42) cm kat ederken karma siRNA grubu (n=12) 1447 (± 85) cm kat etti ve NUDT6 siRNA grubunun lokomotor aktivitesi daha az olma eğiliminde bulundu ($t=1,566$, $p=0,130$) (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: NUDT6 ifade baskılaması grubunda YAL'de kat edilen toplam mesafe.

Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması YAL'de kat edilen toplam mesafeyi kısaltma eğilimindedir. (# $p \leq 0,13$)

NUDT6 siRNA grubu ($n=15$) açık kolda $63 (\pm 6)$ saniye geçirdi, öte yandan bu süre karma siRNA grubu ($n=13$) için $55 (\pm 5)$ saniye idi. İki grubun, YAL'de açık kolda geçirdiği süre benzer bulundu ($t=-0,962$, $p=0,345$) (Şekil 4.22). Bununla benzer olarak, kapalı kolda geçirilen süre de NUDT6 siRNA grubu ($n=15$) ve karma siRNA grubu ($n=13$) arasında benzer bulundu ($t=0,873$, $p=0,391$) (Şekil 4.22).

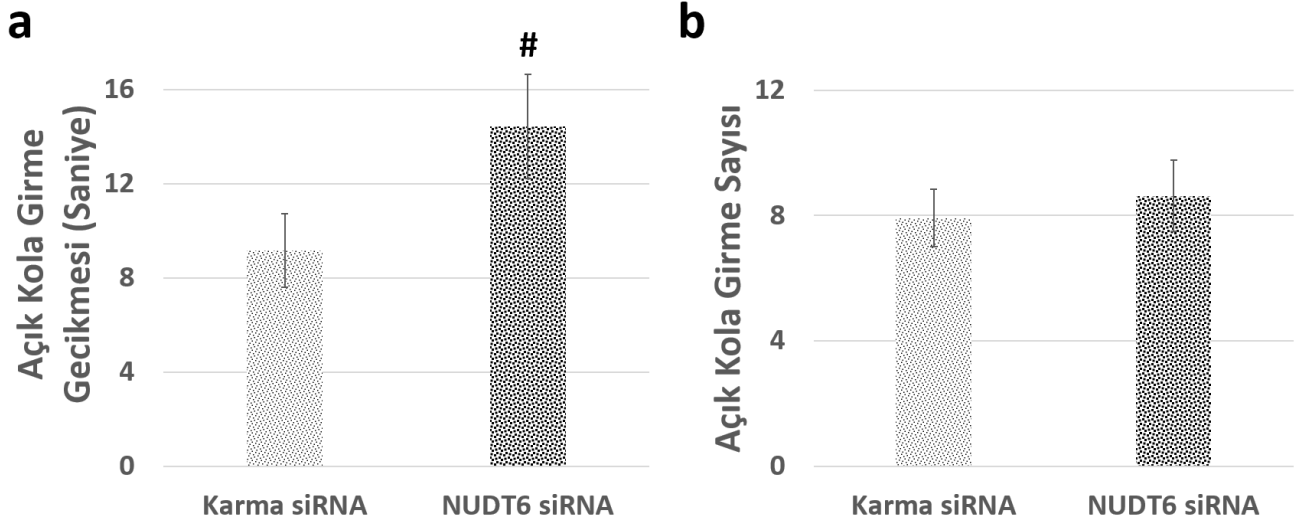


Şekil 4.22: NUDT6 ifade baskılaması grubunda YAL'de açık ve kapalı kolda süre bulguları.

Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması YAL'de açık kolda ve kapalı kolda geçirilen süreyi değiştirmemektedir.

YAL'de açık kola girme gecikmesi NUDT6 siRNA grubunda (n=15) 14 (± 2) saniye iken karma siRNA grubunda (n=12) bu değer 9 (± 2) saniye olarak hesaplandı ve medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması açık kola girme gecikmesini artırma eğiliminde bulundu (Mann Whitney U testi, $p=0,083$) (Şekil 4.23a). Buna karşılık, açık kola girme sayısı NUDT6 siRNA grubu (n=16) için 8,63 ($\pm 1,14$) iken karma siRNA grubu (n=12) için 7,92 ($\pm 0,92$) olarak bulundu ve iki grup arasında bu parametrede fark gözlenmedi ($t=-0,460$, $p=0,649$) (Şekil 4.23b). Diğer parametrelerin iki grup arasında benzer olduğu göz önünde bulundurulduğunda, NUDT6 siRNA grubunun YAL'de kat ettiği toplam mesafenin daha az olmasının bu grubun açık kola girme gecikmesinin

artma eğiliminde olması üzerine etkisi olabileceği, bu sonucun doğrudan, anksiyetenin artması ile ilişkilendirilemeyeceği düşünüldü.



Şekil 4.23: NUDT6 ifade baskılaması grubunda YAL'de açık kola girme gecikmesi (a) ve açık kola girme sayısı (b).

Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması YAL'de açık kola girme sayısını değiştirmemektedir; açık kola girme gecikmesini ise artırma eğilimindedir. (# $p \leq 0,13$)

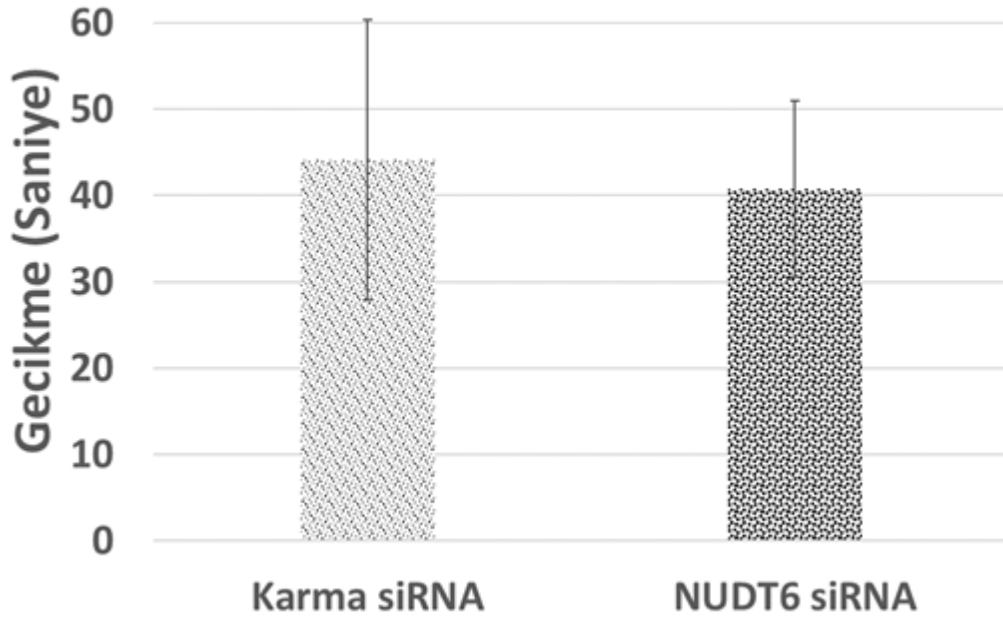
2.Grup deneylerinde distal açık kola geçen hayvan sayısının her iki grupta da az olması nedeniyle distal açık kola geçme durumu çapraz tablo istatistiği yapılarak değerlendirildi. Buna göre, NUDT6 siRNA grubunun (n=16) %31,3'ü distal açık kola geçerken bu yüzde karma siRNA grubunda %15,4 olarak bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Fisher testi, $p=0,410$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması YAL'de distal açık kola girme yüzdeleri.

	Distal Açık Kola Geçme Durumu					
	Geçmeyen		Geçen		Toplam	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
NUDT6 siRNA Grubu	11	68,8	5	31,3	16	100
Karma siRNA Grubu	11	84,6	2	15,4	13	100

Aydınlık-Karanlık Kutusu (AKK)

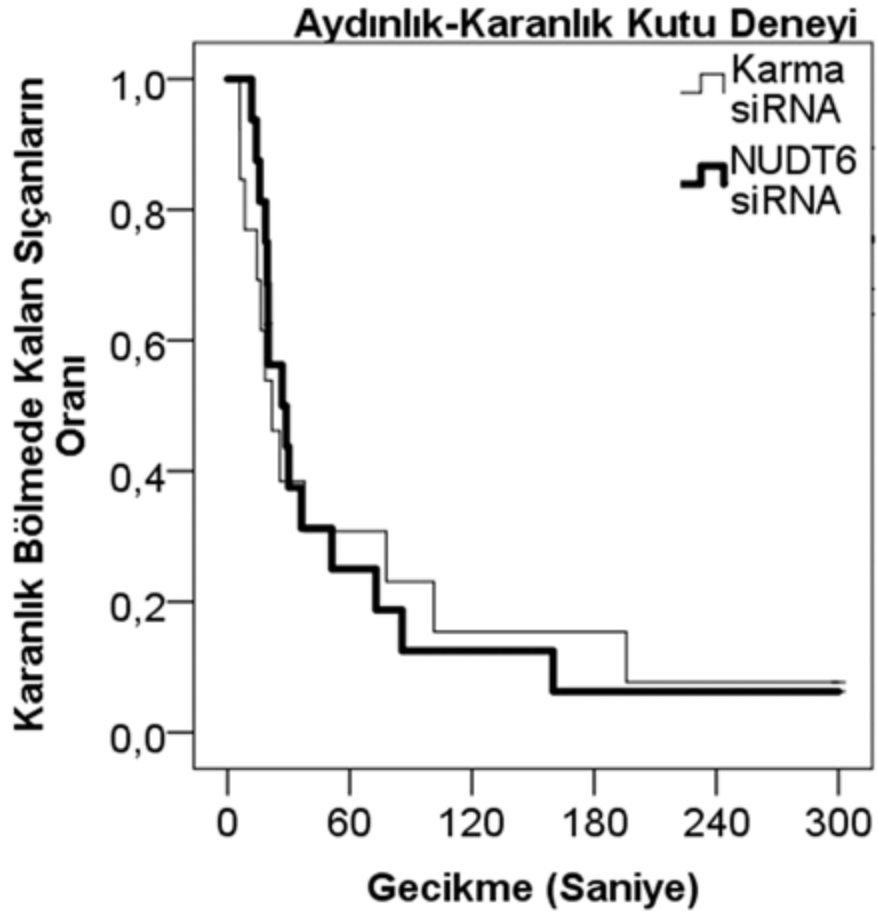
AKK'de aydınlık bölmeye geçme gecikmesi NUDT6 siRNA grubunda ($p=15$) 40,7 ($\pm 10,2$) saniye iken karma siRNA grubunda ($p=12$) 44,2 ($\pm 16,2$) saniye idi. Gecikme açısından iki grup arasında fark bulunmadı (Mann Whitney U testi, $p=0,486$, Şekil 4.24).



Şekil 4.24: NUDT6 ifade baskılaması grubunda AKK'de gecikme.

Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması AKK'de aydınlık bölmeye geçme gecikmesini değiştirmemektedir.

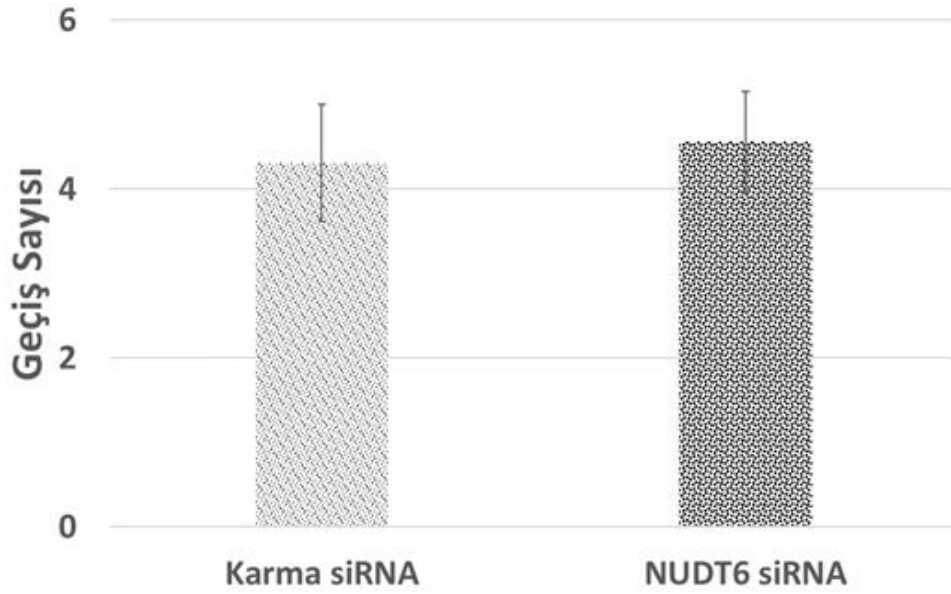
Bu grupta 300 saniye boyunca aydınlık bölmeye geçmeyen iki hayvan vardı. Bu hayvanların deney süresi nedeniyle tavan etkisine uğramasını engellemek amacıyla Kaplan Meier sağkalım analizi yapıldı. İki grubun eğrisinin pek çok noktada kesiştiği ve grupların gecikmeleri arasında bir fark olmadığı görüldü (Kaplan Meier sağkalım analizi, Log Rank karşılaştırması, $p=0,975$) (Şekil 4.25).



Şekil 4.25: NUDT6 ifade baskılaması grubunda AKK'de gecikmenin sağkalım grafiği.

Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması AKK'de aydınlık bölme geçme gecikmesinde değişikliğe neden olmamaktadır.

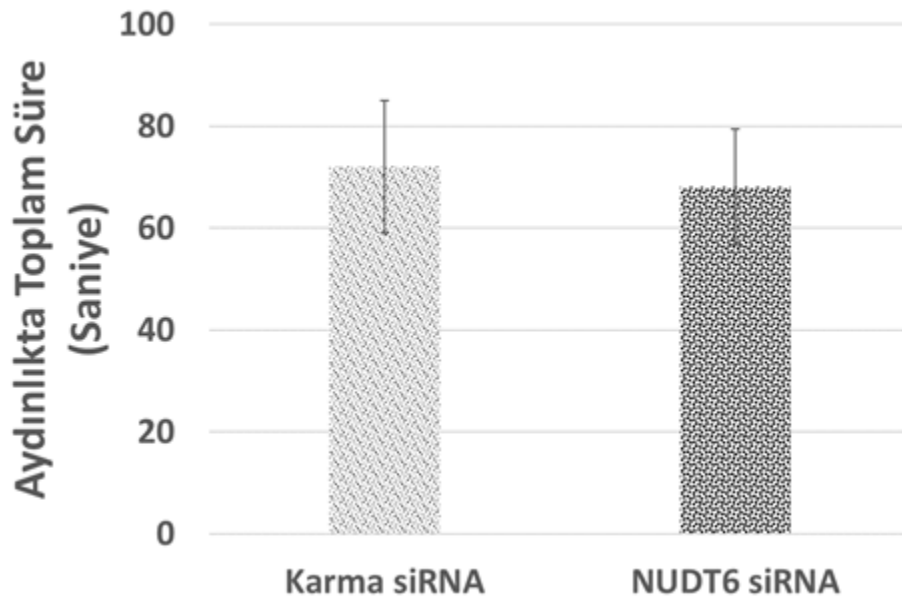
Aydınlık bölme geçiş sayısı ele alındığında, NUDT6 siRNA grubu (n=16) için aydınlık bölme geçiş sayısı $4,6 (\pm 0,6)$ iken bu değer karma siRNA grubu (n=13) için $4,3 (\pm 0,7)$ idi ve iki grubun aydınlık bölme geçiş sayıları benzer bulundu ($t=-0,281$, $p=0,780$) (Şekil 4.26).



Şekil 4.26: NUDT6 ifade baskılaması grubunda AKK'de geçiş sayısı.

NUDT6 siRNA grubu ve karma siRNA grubu arasında aydınlık bölme geçiş sayısı farklı değildir.

NUDT6 siRNA grubu (n=16) aydınlık bölmede $68 (\pm 11)$ saniye geçirirken karma siRNA grubu (n=13) $72 (\pm 13)$ saniye geçirdi. İki grubun aydınlıkta geçirdiği süre benzer bulundu ($t=-0,231$, $p=0,819$) (Şekil 4.27).



Şekil 4.27: NUDT6 ifade baskılaması grubunda AKK'de aydınlıkta toplam süre.

Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması, AKK'da aydınlık bölmede geçirilen süreyi değiştirmemektedir.

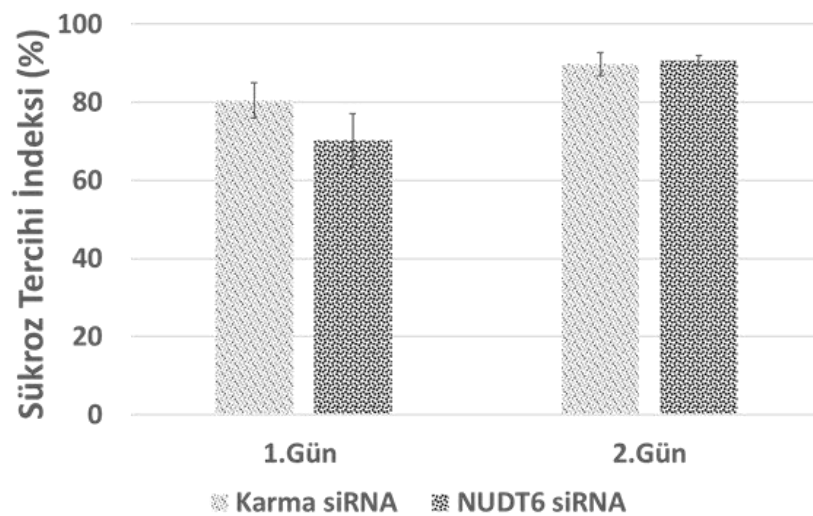
NUDT6 İfade Baskılamasının Depresyon- benzeri Davranışa Etkileri

Sükroz Tercih Testi

Sükroz tercih indeksi hem 1.gün, 2.gün ölçümleri için ayrı ayrı hesaplandı. Bu analizlerde talaşlarının ıslak olduğu görülen kafesler, suların suluklardan dökülmüş olduğu düşünülerek analiz dışı bırakıldı (1.gün 27 numaralı; 2.gün 17, 19 ve 20 numaralı kafesler).

1.gün NUDT6 siRNA grubu (n=15) 73 (\pm 4) ml sıvı tüketirken bu sayı karma siRNA grubu (n=13) için 85 (\pm 8) ml idi ve iki grup arasında 1.günkü toplam sıvı tüketimi benzer bulundu. Buna karşılık, toplam sıvı tüketim değerleri 2. günde NUDT6 siRNA grubu (n=15) için 68 (\pm 4) ml iken karma siRNA grubunda (n=13) 88 (\pm 6) ml olarak hesaplandı ve 2.günkü toplam sıvı tüketimi NUDT6 siRNA grubunda istatistiksel anlamlı olacak şekilde azalmış bulundu (Sırasıyla, $t=1,412$, $p=0,175$ ve $t=2,958$, $p=0,007$).

Sükroz tercih indeksi NUDT6 siRNA grubu (n=15) için 1.gün 70,2 (\pm 6,9) idi, 2. gün ise 90,7 (\pm 1,3) idi. Bu parametre karma siRNA grubunda 1.günde (n=12) 80,5 (\pm 4,5) ve 2.günde (n=11) 89,8 (\pm 3,0) olarak hesaplandı. Her iki günde de grupların sükroz tercihleri benzer bulundu (Mann Whitney U testi, $p=0,277$ ve $p=0,467$; Şekil 4.28).



Şekil 4.28: NUDT6 ifade baskılaması grubunda STT bulguları.

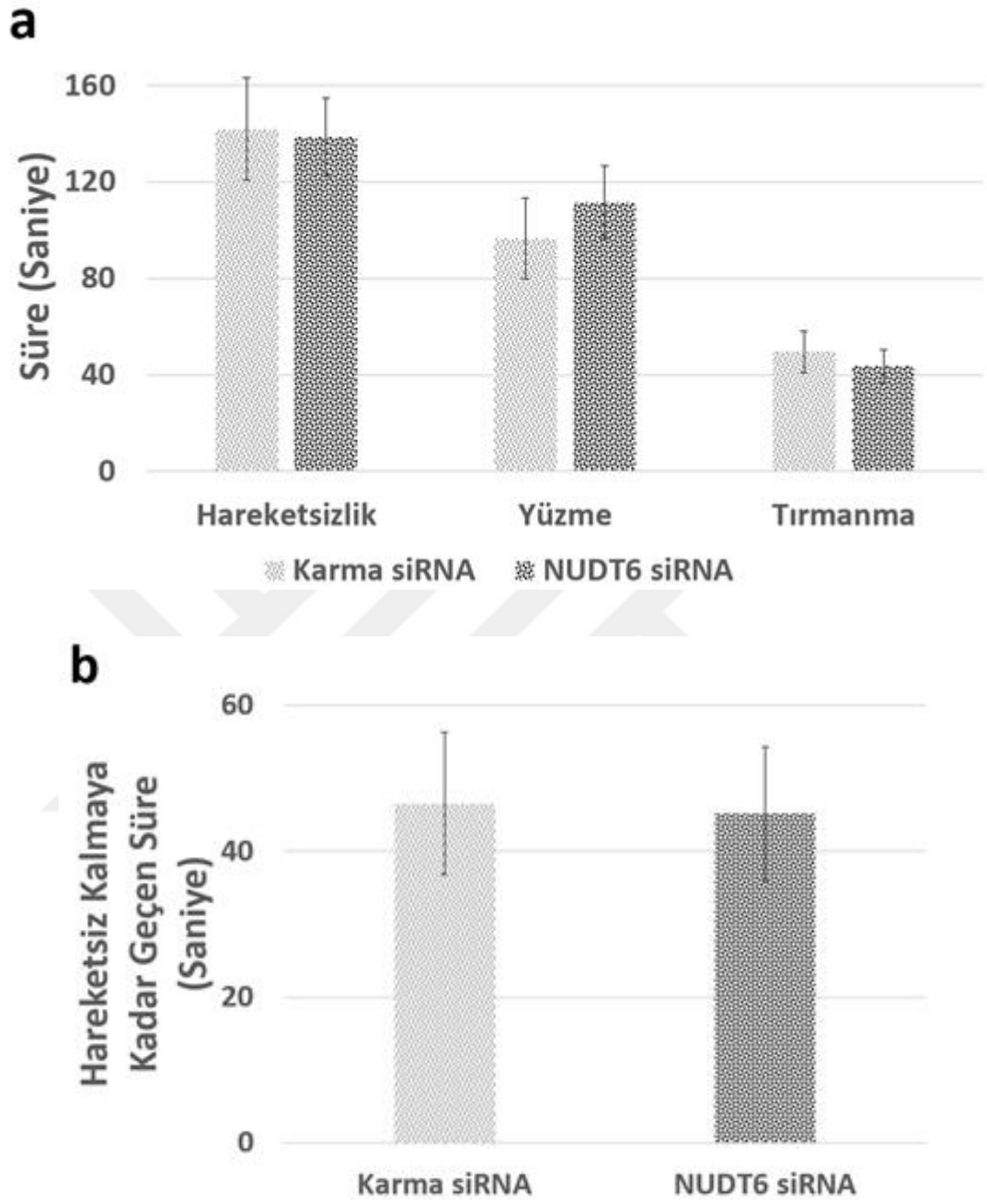
Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması sükroz tercih indeksini değiştirmemektedir.

Zorla Yüzdürme Testi

ZYT'de 2. gün 5 dakika boyunca hareketsiz kalmaya kadar geçen süre, hareketsiz geçirilen süre, yüzme ve tırmanma süreleri değerlendirildi. Bu testte, deney yapılan varile tutunması nedeniyle NUDT6 siRNA grubundan bir hayvan analiz dışı bırakıldı.

NUDT6 siRNA grubu (n=15) ile karma siRNA grubu (n=13) arasında hareket edilen toplam mesafe benzerdi ($t=-0,668$, $p=0,510$).

ZYT'de NUDT6 siRNA (n=15) grubu 138,7 ($\pm 16,1$) saniyeyi hareketsiz geçirirken karma siRNA grubu (n=13) 142,0 ($\pm 21,3$) saniyeyi hareketsiz geçirdi. NUDT6 siRNA (n=15) grubu 112 (± 15) saniyeyi yüzerek geçirdi, karma siRNA grubu (n=12) ise 97(± 17) saniye boyunca yüzdü. Değerlendirilen bir diğer parametre olan tırmanma süresi ise NUDT6 siRNA (n=14) grubunda 44 (± 7) saniye iken karma siRNA grubunda (n=13) 50 (± 9) saniye olarak bulundu. Hareketsiz geçen süre, yüzme süresi ve tırmanma süresi iki grupta benzerdi (Sırasıyla, $t=0,125$, $p=0,901$; $t=-0,662$, $p=0,514$; $t=0,553$, $p=0,585$) (Şekil 4.29a). ZYT'de değerlendirilen son parametre hareketsiz kalmaya kadar geçen süreydi. NUDT6 siRNA (n=14) grubu için bu değer 45,1 ($\pm 9,2$) saniye iken karma siRNA grubunda (n=12) 46,5 ($\pm 9,8$) saniye olarak bulundu. İki grup hareketsiz kalmaya kadar geçen süre bakımından da benzerdi (Mann Whitney U testi, $p=0,820$; Şekil 4.29b).

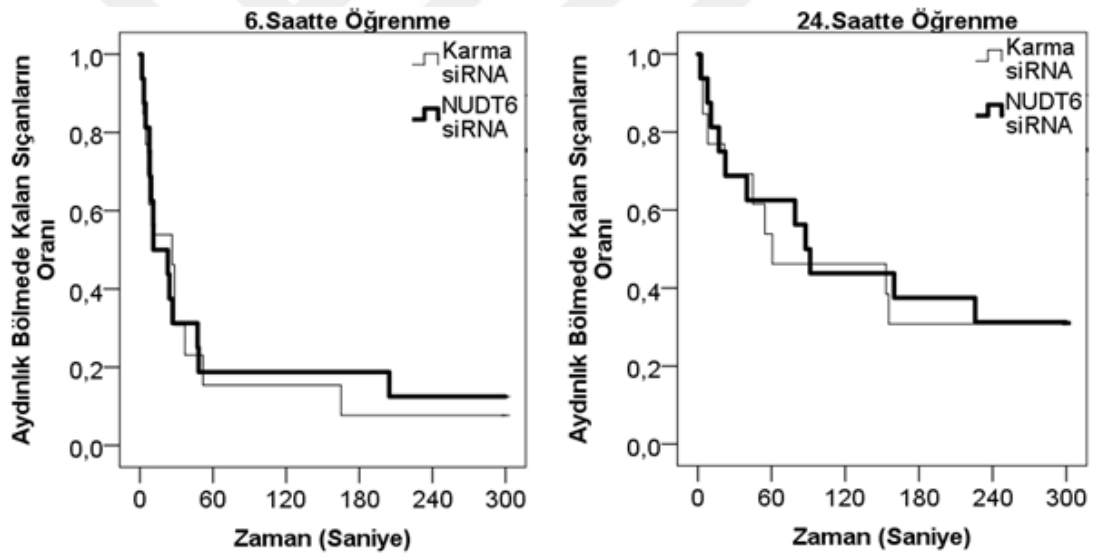


Şekil 4.29: NUDT6 ifade baskılaması grubunda ZYT bulguları.

Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması ZYT'de hareketsizlik, yüzme ya da tırmanma süresini değiştirmemekte (a) ve hareketsiz kalmaya kadar geçen sürede farka neden olmamaktadır (b).

NUDT6 İfade Baskılamasının Öğrenme Davranışına Etkisi- Pasif Kaçınma(PK)

PK'da öğrenmeden 6 saat sonra NUDT6 siRNA grubu (n=16) ortalama 64 (\pm 26) saniyelik bir gecikme ile elektrik şokunun verildiği karanlık bölmeye geçerken karma siRNA grubu (n=13) aynı bölmeye 52 (\pm 24) saniyelik bir gecikme ile geçti. Öğrenmeden sonraki 24.saatte ise, NUDT6 siRNA grubu (n=16) 140 (\pm 31) saniye, karma siRNA grubu ise (n=13) 131 (\pm 35) saniye gecikmeyle karanlık bölmeye geçti. Beş dakikalık deney süresi boyunca karanlık bölmeye geçmemiş hayvanların sansürlü veri olduğu düşünüldüğünde, tavan etkisini kontrol edecek bir yöntem olan Kaplan Meier testi ile analizler yapıldı. Bu analizlerle PK'da öğrenme aşamasının hem 6 saat ve hem de 24 saat sonrasında 2 grup arasında öğrenme performansları benzer bulundu (sırasıyla, Kaplan Meier analizi, Log rank testi p=0,838 ve p= 0,856; Şekil 4.30).



Şekil 4.30: NUDT6 ifade baskılaması grubunda PK bulguları.

Medyal PFK'da NUDT6 ifade baskılaması PA'daki öğrenme performansını 6.saatte ve 24.saatte değiştirmemiştir.

5. TARTIŞMA

5.1. Viral Enfeksiyonun ve AAV2 Aracılı NUDT6 Değişikliklerinin Moleküler Teyidi

Bu çalışmada, NUDT6'nın depresyon- ve anksiyete-benzeri davranış ile ilişkisini ortaya koymak üzere, insandaki medyal PFK'nın sıçanda analogu olarak ele alınan prelimbik ve infralimbik kortekslerin her ikisine de NUDT6 ifadesini artırmak veya azaltmak üzere desenlenmiş plazmidleri içeren AAV2 enjekte edilmiştir. NUDT6 ifade artışının ve ifade baskılamasının gerçekleştiği hem protein (WB) hem de mRNA (kantitatif PCR) düzeyinde teyit edilmek istenmiş, ancak her ikisinde de iki grup arasında fark bulunmamıştır. WB ve kantitatif PCR ile NUDT6 ifadesinde değişiklik görülmemesinin aşağıda belirtilen birçok nedeni olabilir. İlk olarak, AAV2'nin nöron seçici olduğu bilinmektedir (98,101–103). Oysaki enjeksiyon bölgesinden WB ve PCR için çıkarılan dokuda, nöron ve glial hücreler karışıktır. Bunların yanı sıra AAV2'nin diğer AAV suşlarına göre daha sınırlı bir yayılım gösterdiği ve etkinliğinin daha az olduğu da bilinmektedir (98,104–106). Dolayısıyla AAV2'nin nöronların sadece belli bir bölümünü enfekte etmesi beklenmektedir. Literatürde AAV2'nin enfekte ettiği nöron sayısında beyin bölgesine göre önemli değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Örneğin, substantia nigra pars kompaktadaki nöronların önemli kısmını enfekte ediyorken (107) hipokampusun dentat granüler hücre tabakasının AAV2 enfeksiyonuna dirençli olduğu ifade edilmiştir (103). Ancak literatürde AAV2'nin medyal PFK'daki nöronların ne kadarını enfekte ettiğini gösteren bir çalışma yoktur. Tüm bu faktörler AAV2'nin dokudaki etkisinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle etki, WB ve PCR ile gösterilememiş olabilir. Öte yandan, WB ve PCR'da diseksiyon sırasında çevre dokuların da tekniğin kısıtlılığı nedeniyle alınması, zaten sınırlı ve lokal olan etkinin moleküler analiz için çıkarılan dokuda seyrelmesine neden olmuş, böylece etkinin belirtilen yöntemlerle gösterilmesini güçleştirmiş olabilir.

Fazla ifade grubu hayvanlarda NUDT6 ifadesinde görülen varyasyon bazı enjeksiyonların başarısız olma olasılığını akla getirdiğinden, medyal PFK'da AAV2 ile enfeksiyon başarısını teyit etmek üzere virus "*reporter*"ı olan eGFP ifadesi

incelenmiştir. eGFP ifadesi, yani viral enfeksiyonun gerçekleştiği, eGFP WB'sinde gösterilememiştir, ancak PCR ile eGFP mRNA'sının varlığı deney gruplarında teyit edilmiştir. Boş virüs (eGFP ifade etmeyen virüs) enjekte edilen kontrol grubunun PCR'ında beklendiği gibi eGFP bandına rastlanmamıştır. Diğer tüm grupların (NUDT6 fazla ifade eden grup, NUDT6 siRNA ve karma siRNA grupları) PCR'ında eGFP bandı olduğu gösterilmiştir. eGFP ifadesinin WB ile gösterilemezken, PCR ile gösterilebilmiş olması dikkat çekicidir. Buna göre, AAV2 aracılı ifade, eGFP WB'sine yansımayacak kadar sınırlı ve lokal gerçekleşmiş olabilir ve eGFP mRNA'sının amplifikasyonunu içerdiği için PCR ile gösterilebilmiş olabilir.

Viral enfeksiyonun gerçekleştiğinin teyit edilmesinin ardından, FGF2 ifadesindeki değişiklikler WB ile incelenmiştir. NUDT6/FGF2 oranının tek başına bu iki molekülün düzeylerini değerlendirmekten daha iyi bir belirteç olabileceğinden hareketle, hem FGF2 ifadesi hem de NUDT6 ifadesinin FGF2 ifadesine oranı her iki grupta ele alınmıştır. NUDT6 fazla ifadesi ve ifade baskılaması gruplarının hiçbirinde değerlendirilen parametreler kontrol grubu ile müdahale grubu arasında farklı bulunmamıştır. Bu sonuç WB'a ilişkin yukarıda belirtilen yöntemsel kısıtlılıklarla ilgili olabileceği gibi, sıçan PFK'sında NUDT6 ve FGF2 arasında sıçan hücre hattı çalışmalarındaki kadar doğrudan bir ilişkinin olmadığını da düşündürebilir.

Viral enfeksiyonun yalnızca eGFP PCR'ı ile gösterilebilmesi üzerine, moleküler değişikliklerin bölgesel olarak ufak alanlarda değerlendirilebileceği İHK'da kesitler incelenmiştir. PCR'da eGFP bandı görülen üç gruba ait hayvanların kesitlerinin konfokal mikroskopta incelenmesiyle de eGFP ile uyumlu sitoplazmik yeşil floresan sinyal görülmüştür. Yine beklendiği gibi, NUDT6 fazla ifade grubu deneylerinin kontrol grubundan alınan kesitlerde sinyale rastlanmamıştır. Viral enfeksiyonun gerçekleştiğinin GFP ile ortaya konmasının ardından AAV2 aracılı NUDT6 ifade değişikliklerini teyit etmek için NUDT6 İHK'sı yapılmıştır. NUDT6'nın PFK'da endojen olarak sadece nükleer ifade edildiği görülmüş, ancak fazla ifade grubu hayvanlarında nükleer sinyale ek olarak, sitoplazmik NUDT6 sinyaline de rastlanmış ve bu sinyalin yalnızca eGFP ifade eden hücrelerde olduğu gösterilmiştir. Kontrol grubu kesitlerinde ise NUDT6 ifadesi yaygın ve nükleer bulunmuştur, sitoplazmik NUDT6 sinyaline

rastlanmamıştır. Dolayısıyla NUDT6 fazla ifadesinin özellikle sitoplazmada NUDT6 ifadesini artırdığı sonucuna varılmış, bu yolla NUDT6 fazla ifadesinin gerçekleştiği moleküler olarak teyit edilmiştir.

NUDT6 siRNA ve karma siRNA gruplarının NUDT6 İHK'sı değerlendirildiğinde, her ikisinde de nükleer ve yaygın NUDT6 ifadesi görülmüştür. Bununla birlikte, NUDT6 siRNA grubu hayvanlarında kimi hücrelerde eGFP sinyali olduğu halde NUDT6 sinyalinin olmadığı gözlenmiştir. Fakat bu hücrelerin başlangıçta endojen olarak NUDT6 ifade edip etmedikleri bilinmemektedir, dolayısıyla hücrelerin NUDT6 ifade etmiyor olma nedeninin siRNA aracılı ifade baskılaması olup olmadığı değerlendirilememektedir. Bu nedenle, NUDT6 siRNA ve karma siRNA gruplarında beyinde GFP ifadesinin görülmesi ile viral enfeksiyonların gerçekleştiği teyit edilmiş olmakla birlikte, NUDT6 siRNA grubunda NUDT6 ifadesindeki azalma gösterilememiştir. Literatürde beyinde NUDT6'nın hangi hücrelerde ifade edildiğini ortaya koyan çalışma yoktur, NUDT6 sadece nöronlarda ya da glial hücrelerde ifade ediliyor olabilir ya da nöronal ya da glial hücre alttıplerinde (glutamaterjik-GABAerjik, oligodendrosit-mikroglia ve benzeri) farklı oranlarda ifade ediliyor olabilir. Gözlemlerimiz beyinde bazı hücrelerde NUDT6'nın hiç ifade edilmediğine, bazılarında ise yoğun olarak çekirdekte ifade edildiğine işaret etmektedir. Dolayısıyla, NUDT6'nın ifade edildiği hücre çeşidinin ileri çalışmalarla gösterilmesine ihtiyaç vardır. Hücre çeşidinin belirlenmesi sonrasında NUDT6 ifade ettiği saptanmış hücre çeşidine ve NUDT6'ya yönelik ikili işaretlemenin bir arada değerlendirilmesi siRNA deneylerinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğine dair bilgi verebilir.

5.2. NUDT6 Aşırı İfadesinin Davranışsal Etkileri

Sıçan medyal PFK'sında NUDT6 fazla ifadesi YAL'de açık kolda geçirilen süreyi azaltma, buna karşılık kapalı kolda geçirilen süreyi artırma eğilimi göstermiştir; yani anksiyojenik etkilidir. Bu bulgu, daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Bu çalışmalarda, kronik intraserebroventriküler NUDT6 ifade eden plazmid enjeksiyonunun YAL'de açık kolda geçirilen zamanı kısaltma, yani anksiyeteyi artırma eğiliminde olduğu gösterilmişti (Emine Eren Koçak, 2014, yayınlanmamış data). Yine bu çalışmalarda, anksiyete- ve depresyon-benzeri davranışı

artırdığı bilinen kronik hareketsiz bırakma stresinin PFK NUDT6 ifadesinde %40'a ulaşan anlamlı bir azalmaya neden olduğu ortaya konmuştu. İlk bakışta birbiriyle uyumsuz gibi görünen bu bulgular, organizmanın kendini kronik stresin olumsuz etkilerinden korumak için kronik strese PFK'da NUDT6 düzeylerini azaltarak yanıt verdiğini düşündürmektedir.

PFK'da NUDT6 fazla ifadesinin AKK'de aydınlık bölmeye geçme gecikmesini azaltması ve aydınlık bölmeye geçme sayılarını artırma eğiliminde olması literatürde klasik olarak anksiyetenin azlığı şeklinde değerlendirilir; ancak bu bulgu PFK'da NUDT6 fazla ifadesiyle anksiyetede artış yönünde kuvvetli bir eğilim olduğunu gösteren YAL deneyleri ile çelişir görünmektedir. Bununla beraber, AKK verileri dikkatle incelendiğinde, hayvanların aydınlık bölmeye geçme davranışının niteliği dikkat çekicidir. Buna göre, fazla ifade grubu hayvanları, aydınlık bölmeye girdikten sonra tekrar hızla karanlık bölmeye geçmiştir, dolayısıyla aydınlık bölmede uzun zaman geçirmemiştir ve bununla uyumlu olarak aydınlık bölmede geçirdikleri süre kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Belirtilen nitelikleri itibarıyla bu davranışın, dürtüsel davranışla uyumlu olduğu düşünülmüştür (108,109).

Kaba bir tanımlamayla, dürtüsellik iki bileşenden oluşmaktadır: dürtüsel eylem ve dürtüsel seçim. Dürtüsel eylemde, birey, yiyecek, cinsellik gibi kazançları elde etmeye yönelik motor eylemleri engelleyememekte, dürtü kontrolünü gerçekleştirememektedir. Dürtüsel seçim ise bireyin daha uzak zamanda gelecek daha büyük bir ödül ile yakın zamandaki daha küçük bir ödül arasında seçimi yakın zamanlıdan yana kullanmasını ifade eder (110). Bu çalışmada, sıçanlarda gözlemlenen bulgunun dürtüsel eylem olduğu düşünülmüştür. Literatürdeki insan çalışmalarında PFK'nın davranışın inhibitör kontrolünde etkili olduğu bilinmektedir. Örneğin, dürtüsel eylemi değerlendirmekte kullanılan dur işareti tepki süresi testinde frontal lezyonların dur işaretine verilen yanıtı geciktirdiği, dolayısıyla dürtüsellik artırdığı gösterilmiştir (111). Benzer şekilde, yine dürtüsel eylemin değerlendirilmesinde kullanılan ve motor inhibisyon gerektiren yap-yapma testinde, frontal lezyonları takiben yanıt engellenmesinde bozukluklar meydana gelmiştir, yani bireyler daha dürtüsel davranmıştır (112). Bu bulgulardan hareketle, sıçanlarda da PFK'nın

dürtüsellikle ilişkisi çalışılmıştır. Sıçanda infralimbik korteksin bilateral inhibisyonunun beş seçenekli sıralı tepki zamanı testinde uygunsuz ve dürtüsel prematür cevapları artırdığı gösterilmiştir (113). Buna karşılık, daha yakın zamanlı bir çalışmada infralimbik korteksin optogenetik inaktivasyonunun prematür cevapları engellediği, buna karşılık prelimbik korteksin optogenetik inaktivasyonunun prematür cevapları artırdığı da ortaya konmuştur (114). Yönü ne olursa olsun prelimbik ve infralimbik kortekslerin dürtüsellik-benzeri davranışla bağlantılı olduğu açıktır. Bu bağlantı göz önünde bulundurulduğunda, AKK'deki davranışların anksiyeteye değil, dürtüsellikle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. İleride yapılacak çalışmaların, dürtüsellik değerlendirilen beş seçenekli sıralı tepki zamanı testi gibi testlere de yer vermesi, NUDT6 ve dürtüsellik-benzeri davranış ilişkisinin daha iyi anlaşılması açısından önerilmektedir.

Bu çalışmada PFK'da NUDT6 fazla ifadesinin depresyon-benzeri davranışa etkisi STT ve ZYT'de incelenmiştir. NUDT6 fazla ifadesinin yüzme süresini kısaltma ve hareketsiz geçen süreyi uzatma eğiliminde olduğu ortaya konmuştur. ZYT'de depresojenik etki görülürken, STT ile depresojenik etki saptanmamıştır. Bu bulgu, daha önce laboratuvarımızda yapılan ve intraserebroventiküler NUDT6 enjeksiyonu ile oluşturulan NUDT6 fazla ifadesinin ZYT'de hareketsiz geçen zamanı uzatma eğilimi olduğunu, yani depresojenik olduğunu, fakat STT'de değişikliğe yol açmadığını gösteren çalışma sonuçları ile uyumludur. ZYT'nin esas olarak davranışsal umutsuzluğun, STT'nin ise anhedoninin modeli olduğu düşünülürse medyal PFK'da NUDT6 ifadesindeki artışın davranışsal umutsuzlukla daha ilişkili olduğu düşünülebilir. Anhedoniye aracılık eden diğer beyin bölgelerinde NUDT6'nın etkilerinin incelenmesi bu konunun daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. Öte yandan, STT'nin uygulanış biçimi de deney sonuçlarını etkiliyor olabilir. Bu çalışmadan sonra laboratuvarımızda yapılan deneylerde edinilen tecrübe, arka arkaya günler boyu sükröz hayvanlara sunulduğunda, hayvanların sükröz suya alışıyor olabileceğini göstermiş ve 3.günkü sükröz tüketiminin anhedoninin iyi bir göstergesi olmayabileceği şüphesini gündeme getirmiştir. Bunu destekleyecek şekilde, laboratuvarımızda gerçekleştirilen diğer deneylerde 2.gün ve 3.gün arasında STT'ye 1 gün ara verildiğinde, 2.günkü sükröz tercih indeksleri benzer olduğu halde 3.gün sonuçlarında farklılık görülmüştür. Bir

diğer göz önünde bulundurulması gereken nokta, hayvanların sosyal yapıları nedeniyle kafeslerde ikiyeşerli barındırılmış olduğundan STT bireysel tercih indeksi değil, kafese ait bir indeksi iki hayvan için hesaplamıştır. Bu durum aynı kafesin iki üyesinin birbirinden farklı olabilecek tercih indekslerinin aynıymış gibi değerlendirilmesine neden olmuş olabilir.

Son olarak, NUDT6 ve bağlamsal öğrenme ilişkisi PK ile değerlendirilmiştir. Bu testte NUDT6 fazla ifade ile kontrol grupları arasında 6.saat ve 24.saatteki öğrenme performansları benzer bulunmuştur. NUDT6-öğrenme ilişkisine yer veren literatürdeki tek çalışma, NUDT6'nın, hızlı öğrenen farelerin PFK'sında RNA düzeyinde daha fazla ifade edildiğini ortaya koymuştur (79). Bu çalışmada yazarlar öğrenmeyi aralarında PK'nın da olduğu bir set deneyi bir arada değerlendirerek hayvanlara öğrenme skoru atamış, ardından bu skoru hayvanlar arasında karşılaştırarak daha hızlı öğrenen farelerde NUDT6'nın daha fazla ifade edildiğini bulmuşlardır. Bulgular arasındaki uyumsuzluk, öğrenmeyi değerlendirmek amacıyla kullanılan testlerin farklılığı ile ilgili olabilir. NUDT6-öğrenme ilişkisi öğrenmeyi değerlendiren daha çeşitli testler yapılarak derinleştirilebilir. Sonuçları yorumlarken deneyde kullanılan hayvan türlerinin farklılığı (fareye karşı sıçan) da göz önünde bulundurulmalıdır.

Tüm bulgular bir arada değerlendirildiğinde, medyal PFK'da NUDT6'nın ifadesinin depresojenik ve anksiyojenik olduğu, bağlamsal öğrenme üzerine etkisinin olmadığı ve dürtüsellik- benzeri davranışı artırıyor olabileceği görülmüştür.

5.3. NUDT6 İfade Baskılamasının Davranışsal Etkileri

Bu çalışmanın ikinci bölümünde prelimbik ve infralimbik kortekslerin her ikisindeki NUDT6 ifade baskılamasının anksiyete- ve depresyon-benzeri davranış ile bağlamsal öğrenmeye etkisi değerlendirilmiştir. Anksiyete-benzeri davranışı değerlendiren YAL'de NUDT6 ifade baskılaması grubunun lokomotor aktivitesinde azalma eğilimi olduğu görülmüş ve açık kola geçme gecikmesinin arttığı, fakat anksiyete-benzeri davranışı değerlendiren diğer YAL parametreleri ile AKK'nin hiçbir parametresinde fark olmadığı ortaya konmuştur. Bu nedenle, açık kola geçme gecikmesindeki artışın azalmış lokomotor aktiveye bağlı olduğu düşünülmüş ve bu

davranış anksiyete-benzeri davranış ile ilişkilendirilmemiştir. Aynı şekilde, depresyon-benzeri davranışı değerlendiren STT ve ZYT'de NUDT6 ifade baskılaması karma siRNA grubuna göre davranışsal farklılığa neden olmamıştır. STT'de iki grup arasında gözlenen tek fark, NUDT6 ifade baskılaması grubunun 2.günlük toplam sıvı tüketimlerinin azalması olmuştur. Sükroz tercih indeksi toplam sıvı tüketimin miktarından bağımsız olacak şekilde tasarlandığından bu durum sükroz tercihlerinin değerlendirilmesini etkilememiştir.

Medyal PFK'da NUDT6 fazla ifadesi ve ifade baskılamasının davranış testlerinde birbirine ters etki yapması beklenirken, böyle bir etki gözlenmemiştir. Bu durumun istisnası, hem NUDT6 fazla ifadesi ve hem de ifade baskılamasının STT'de sükroz tercihini ve PK'da öğrenme performansını değiştirmemesi olmuştur. Diğer bir deyişle, fazla ifadenin davranışsal etki yaptığı gösterilen AKK, YAL ve ZYT'de ifade baskılaması etki yapmamıştır. Bu durumun olası birkaç nedeni vardır. Bunlardan ilki, viral enfeksiyon gerçekleştiği halde AAV aracılı ifade baskılamasının gerçekleşmemiş olması olabilir. Bu çalışmada ifade baskılaması etkinliğini artırmak için farklı siRNA sekansları havuzlanarak aynı virüs içinde bir araya getirilmiş ve bu virüs kullanılmıştır (NUDT6 siRNA AAV). Bu sekanslardan ikisi daha önceden laboratuvarımızdaki sıçan deneylerinde lentivirüslerle ayrı ayrı ifade ettirildiğinde davranışsal etkileri gösterilmiş olan siRNA sekanslarıdır. Şimdiki çalışmada NUDT6 ifade baskılanmasının gerçekleşmemiş olması havuzlanan sekansların birbiri ile etkileşmesi ve böylece etkilerinin azalması gibi siRNA'ların havuzlanmasından doğacak etkilerden kaynaklanmış olabilir. Bir diğer olasılıkta ise, siRNA aracılı ifade baskılaması gerçekleşmiştir, fakat davranışsal değişikliğe yol açan eşik düzeye ulaşmamıştır. Buna göre, NUDT6 endojen olarak yaygın ifade edilmekte olan bir moleküldür ve dışarıdan AAV verilerek yapılan ifade baskılaması, NUDT6 ifade düzeyinde özellikle nöronları etkileyen ve lokal kalan ufak bir değişime yol açmış; bu değişim de davranışsal çıktı oluşturmak için yeterli olmamıştır. Daha sonraki çalışmalarda ilgili siRNA'ların ayrı ayrı virüslerde verilmesi ve toksik olmayacak en yüksek virüs titrelerinin seçilmesi etki gücünü artırmak için iyi bir yöntem olabilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

- Bu çalışmada, sıçan medyal PFK'sındaki NUDT6 fazla ifadesinin anksiyojenik ve depresojenik olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, bu çalışma, NUDT6'nın bu özelliklerine aracılık eden bölgelerden birinin PFK olduğunu düşündürmektedir.
- NUDT6 fazla ifadesinde depresojenik etkinin FST'de gösterilmesine rağmen STT'de gösterilememesi STT'nin yöntemsel özellikleri ile ilişkili olabilir. İlerleyen çalışmalarda, STT'nin ardışık günlerde yapılmaması önerilir.
- NUDT6 ve dürtüsellik-benzeri davranış ilişkisi ilk kez bu çalışmada gündeme gelmiştir, bu ilişkinin dürtüsellığı değerlendiren testlerle ilerleyen çalışmalarda ele alınması önerilir.
- NUDT6-öğrenme ilişkisi bu çalışmada sadece PK ile değerlendirilmiş ve ilişki bulunmamıştır. NUDT6-öğrenme ilişkisinin öğrenmeyi değerlendiren daha çeşitli testler yapılarak daha detaylı araştırılması önerilir.
- Bu çalışmada NUDT6'nın endojen olarak tüm hücrelerde ifade edilmediği görülmüştür. NUDT6 ifade eden hücre tiplerinin belirlenmesi NUDT6 ifade baskılamasını endojen ifade etmemeden ayırt etmekte kritiktir. Sonraki çalışmalarda hücrelerin NUDT6 ifade profillerinin ortaya konması önerilir.
- NUDT6 fazla ifadesinin tersine, PFK'da NUDT6 ifade baskılaması davranışsal değişikliğe neden olmamıştır. Daha belirgin etki için ilerleyen çalışmalarda mRNA'sına yönelik farklı siRNA sekanslarının ayrı ayrı virüslerde ve daha yüksek virüs titresinde verilmesi önerilir.
- Bu çalışmada prelimbik ve infralimbik korteksler bir arada değerlendirilmiştir ve görülen etki ikisi üzerinden yorumlanmıştır. Bu

beyin bölgelerinin anksiyete ve depresyon üzerine bireysel etkilerinin anlaşılması için ilerleyen araştırmalarda bu bölgelerin ayrı ayrı çalışılması önerilir.



KAYNAKLAR

1. Werner A, Sayer JA. Naturally occurring antisense RNA: function and mechanisms of action. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18(4):343–9.
2. Faghihi MA, Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(9):637–43.
3. Turner CA, Watson SJ, Akil H. The Fibroblast Growth Factor Family: Neuromodulation of Affective Behavior. *Neuron*. 2012;76(1):160–74.
4. Evans SJ, Choudary P V, Neal CR, Li JZ, Vawter MP, Tomita H, vd. Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15506–11.
5. Gaughran F, Payne J, Sedgwick PM, Cotter D, Berry M. Hippocampal FGF-2 and FGFR1 mRNA expression in major depression, schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Res Bull*. 2006;70(3):221–7.
6. Turner CA, Calvo N, Frost DO, Akil H, Watson SJ. The fibroblast growth factor system is downregulated following social defeat. *Neurosci Lett*. 2008;430(2):147–50.
7. Perez JA, Clinton SM, Turner CA, Watson SJ, Akil H. A New Role for FGF2 as an Endogenous Inhibitor of Anxiety. *J Neurosci*. 2009;29(19):6379–87.
8. Turner CA, Clinton SM, Thompson RC, Watson SJ, Akil H. Fibroblast growth factor-2 (FGF2) augmentation early in life alters hippocampal development and rescues the anxiety phenotype in vulnerable animals. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(19):8021–5.
9. Turner CA, Gula EL, Taylor LP, Watson SJ, Akil H. Antidepressant-like effects of intracerebroventricular FGF2 in rats. *Brain Res*. 2008;1224:63–8.
10. Elsayed M, Banasr M, Duric V, Fournier NM, Licznanski P, Duman RS. Antidepressant Effects of Fibroblast Growth Factor-2 in Behavioral and Cellular Models of Depression. *Biol Psychiatry*. 2012;72(4):258–65.
11. Bachis A, Mallei A, Cruz MI, Wellstein A, Mochetti I. Chronic antidepressant

- treatments increase basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor-binding protein in neurons. *Neuropharmacology*. 2008;55(7):1114–20.
12. Mallei A, Shi B, Mocchetti I. Antidepressant treatments induce the expression of basic fibroblast growth factor in cortical and hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*. 2002;61(5):1017–24.
 13. Knee R, Li AW, Murphy PR. Characterization and tissue-specific expression of the rat basic fibroblast growth factor antisense mRNA and protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(10):4943–7.
 14. Li AW, Too CKL, Murphy PR. The basic fibroblast growth factor (FGF-2) antisense RNA (GFG) is translated into a MutT-related protein in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;223(1):19–23.
 15. Zhang S, MacDonald KA, Baguma-Nibasheka M, Geldenhuys L, Casson AG, Murphy PR. Alternative splicing and differential subcellular localization of the rat FGF antisense gene product. *BMC Mol Biol*. 2008;9:1–15.
 16. Baguma-Nibasheka M, Li AW, Murphy PR. The fibroblast growth factor-2 antisense gene inhibits nuclear accumulation of FGF-2 and delays cell cycle progression in C6 glioma cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;267(1–2):127–36.
 17. Li AW, Murphy PR. Expression of alternatively spliced FGF-2 antisense RNA transcripts in the central nervous system: Regulation of FGF-2 mRNA translation. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;162(1–2):69–78.
 18. MacFarlane LA, Murphy PR. Regulation of FGF-2 by an endogenous antisense RNA: Effects on cell adhesion and cell-cycle progression. *Mol Carcinog*. 2010;49(12):1031–44.
 19. MacFarlane L-A, Gu Y, Casson AG, Murphy PR. Regulation of Fibroblast Growth Factor-2 by an Endogenous Antisense RNA and by Argonaute-2. *Mol Endocrinol*. 2010;24(4):800–12.

20. Asa SL. The Endogenous Fibroblast Growth Factor-2 Antisense Gene Product Regulates Pituitary Cell Growth and Hormone Production. *Mol Endocrinol.* 2001;15(4):589–99.
21. Frank MG, Der-Avakian A, Bland ST, Watkins LR, Maier SF. Stress-induced glucocorticoids suppress the antisense molecular regulation of FGF-2 expression. *Psychoneuroendocrinology.* 2007;32(4):376–84.
22. Eren-Koçak E, Başar K, Yılmaz M, Ayhan Y, Dalkara T. The role of FGF2-AS in stress and depression-like behavior in rats [Poster]. Society for Neuroscience Meeting; 2013; San Diego, ABD.
23. Kumar A, Schweizer E, Zhisong J, Miller D, Bilker W, Swan LL, vd. Neuroanatomical Substrates of Late-Life Minor Depression. *Arch Neurol.* 1997;54(5):613.
24. Chang C-C, Yu S-C, McQuoid DR, Messer DF, Taylor WD, Singh K, vd. Reduction of dorsolateral prefrontal cortex gray matter in late-life depression. *Psychiatry Res Neuroimaging.* 2011;193(1):1–6.
25. Kang HJ, Voleti B, Hajszan T, Rajkowska G, Stockmeier CA, Licznanski P, vd. Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat Med.* 2012;18(9):1413–7.
26. Banasr M, Dwyer JM, Duman RS. Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(6):730–7.
27. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 2008;455(7215):894–902.
28. Tavares RF, Corrêa FMA, Resstel LBM. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J Neurosci Res.* 2009;87(11):2601–7.
29. Fuchikami M, Thomas A, Liu R, Wohleb ES, Land BB, DiLeone RJ, vd. Optogenetic stimulation of infralimbic PFC reproduces ketamine's rapid and sustained antidepressant actions. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(26):8106–11.

30. Gasull-Camós J, Arrés-Gatius MT, Artigas F, Castañé A. Glial GLT-1 blockade in infralimbic cortex as a new strategy to evoke rapid antidepressant-like effects in rats. *Transl Psychiatry*. 2017;7(2):1–10.
31. Hamani C, Diwan M, Macedo CE, Brandão ML, Shumake J, Gonzalez-Lima F, vd. Antidepressant-Like Effects of Medial Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation in Rats. *Biol Psychiatry*. 2010;67(2):117–24.
32. Dünya Sağlık Örgütü [İnternet]. 2018 [Erişim Tarihi 27 Nisan 2018]. Erişim adresi: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
33. Kessler RC, Bromet EJ. The Epidemiology of Depression Across Cultures. *Annu Rev Public Health*. 2013;34(1):119–38.
34. WHO. Depression, a global public health concern. *WHO Dep Ment Heal Subst Abus*. 2012;1–8.
35. Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, Baxter AJ, Ferrari AJ, Erskine HE, vd. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2013;382(9904):1575–86.
36. Al-harbi KS. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence*. 2012;6:369.
37. Gaynes BN, Warden D, Trivedi MH, Wisniewski SR, Fava M, Rush AJ. What Did STAR*D Teach Us? Results From a Large-Scale, Practical, Clinical Trial for Patients With Depression. *Psychiatr Serv*. 2009;60(11):1439–45.
38. Greenberg PE, Fournier A-A, Sisitsky T, Pike CT, Kessler RC. The Economic Burden of Adults With Major Depressive Disorder in the United States (2005 and 2010). *J Clin Psychiatry*. 2015;2010(February):155–62.
39. McLaughlin RJ, Hill MN, Gorzalka BB. A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews Elsevier Ltd*; 2014. s. 116–31.

40. Ongür D, Price JL. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb cortex*. 2000;10(3):206–19.
41. Gass JT, Chandler LJ. The Plasticity of Extinction: Contribution of the Prefrontal Cortex in Treating Addiction through Inhibitory Learning. *Front Psychiatry*. 2013;4(May):1–13.
42. Myers-Schulz B, Koenigs M. Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: Implications for mood and anxiety disorders. *Molecular Psychiatry* Nature Publishing Group; 2012. s. 132–41.
43. Wallis CU, Cardinal RN, Alexander L, Roberts AC, Clarke HF. Opposing roles of primate areas 25 and 32 and their putative rodent homologs in the regulation of negative emotion. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(20):E4075–84.
44. Vertes RP. Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. *Synapse*. 2004;51(1):32–58.
45. Greicius MD, Flores BH, Menon V, Glover GH, Solvason HB, Kenna H, vd. Resting-State Functional Connectivity in Major Depression: Abnormally Increased Contributions from Subgenual Cingulate Cortex and Thalamus. *Biol Psychiatry*. 2007;62(5):429–37.
46. Keedwell P, Drapier D, Surguladze S, Giampietro V, Brammer M, Phillips M. Neural markers of symptomatic improvement during antidepressant therapy in severe depression: Subgenual cingulate and visual cortical responses to sad, but not happy, facial stimuli are correlated with changes in symptom score. *J Psychopharmacol*. 2009;23(7):775–88.
47. Matthews SC, Strigo IA, Simmons AN, Yang TT, Paulus MP. Decreased functional coupling of the amygdala and supragenual cingulate is related to increased depression in unmedicated individuals with current major depressive disorder. *J Affect Disord*. 2008;111(1):13–20.
48. Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, vd. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*. 2005;45(5):651–60.

49. Mayberg HS, Brannan SK, Tekell JL, Silva JA, Mahurin RK, McGinnis S, vd. Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol Psychiatry*. 2000;48(8):830–43.
50. Drevets WC, Bogers W, Raichle ME. Functional anatomical correlates of antidepressant drug treatment assessed using PET measures of regional glucose metabolism. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2002;12(6):527–44.
51. Kross E, Davidson M, Weber J, Ochsner K. Coping with Emotions Past: The Neural Bases of Regulating Affect Associated with Negative Autobiographical Memories. *Biol Psychiatry*. 2009;65(5):361–6.
52. Mayberg HS, Liotti M, Brannan SK, McGinnis S, Mahurin RK, Jerabek PA, vd. Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: Converging PET findings in depression and normal sadness. *Am J Psychiatry*. 1999;156(5):675–82.
53. Zald DH, Mattson DL, Pardo J V. Brain activity in ventromedial prefrontal cortex correlates with individual differences in negative affect. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(4):2450–4.
54. Kawasaki H, Adolphs R, Oya H, Kovach C, Damasio H, Kaufman O, vd. Analysis of Single-Unit Responses to Emotional Scenes in Human Ventromedial Prefrontal Cortex. *J Cogn Neurosci*. 2005;17(10):1509–18.
55. Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem*. 2006;13(6):728–33.
56. Corcoran KA, Quirk GJ. Activity in Prelimbic Cortex Is Necessary for the Expression of Learned, But Not Innate, Fears. *J Neurosci*. 2007;27(4):840–4.
57. Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(2):529–38.

58. Milad MR, Vidal-Gonzalez I, Quirk GJ. Electrical Stimulation of Medial Prefrontal Cortex Reduces Conditioned Fear in a Temporally Specific Manner. *Behav Neurosci.* 2004;118(2):389–94.
59. Scopinho AA, Scopinho M, Lisboa SF, Correa FM de A, Guimarães FS, Joca SRL. Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. *Behav Brain Res.* 2010;214(2):437–42.
60. Ford-Perriss M, Abud H, Murphy M. Fibroblast Growth Factors In The Developing Central Nervous System. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001;28(7):493–503.
61. Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Nilsen J, Rhee J, Zhou M, vd. Erratum: Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci.* 1999;2(3):246–53.
62. Gonzalez AM, Berry M, Maher PA, Logan A, Baird A. A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Res.* 1995;701(1–2):201–26.
63. Gómez-Pinilla F, So V, Kesslak J. Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neuroscience.* 1998;85(1):53–61.
64. Turner CA, Akil H, Watson SJ, Evans SJ. The Fibroblast Growth Factor System and Mood Disorders. *Biol Psychiatry.* 2006;59(12):1128–35.
65. Mason I. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(8):583–96.
66. Eren-Koçak E, Turner CA, Watson SJ, Akil H. Short-Hairpin RNA Silencing of Endogenous Fibroblast Growth Factor 2 in Rat Hippocampus Increases Anxiety Behavior. *Biol Psychiatry.* 2011;69(6):534–40.
67. Turner CA, Watson SJ, Akil H. Fibroblast growth factor-2: an endogenous antidepressant and anxiolytic molecule? *Biol Psychiatry.* 2012;72(4):254–5.

68. Takahashi J a, Mori H, Fukumoto M, Igarashi K, Jaye M, Oda Y, vd. Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(15):5710–4.
69. Su WY, Xiong H, Fang JY. Natural antisense transcripts regulate gene expression in an epigenetic manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(2):177–81.
70. Yelin R, Dahary D, Sorek R, Levanon EY, Goldstein O, Shoshan A, vd. Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nat Biotechnol*. 2003;21(4):379–86.
71. Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, vd. Molecular biology: Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science (80-)*. 2005;309(5740):1564–6.
72. Detrick B, Nagineni CN, Grillone LR, Anderson KP, Henry SP, Hooks JJ. Inhibition of human cytomegalovirus replication in a human retinal epithelial cell model by antisense oligonucleotides. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(1):163–9.
73. Li AW, Too CKL, Knee R, Wilkinson M, Murphy PR. FGF-2 antisense RNA encodes a nuclear protein with MutT-like antimutator activity. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;133(2):177–82.
74. McEachern LA, Murphy PR. Chromatin-Remodeling Factors Mediate the Balance of Sense-Antisense Transcription at the FGF2 Locus. *Mol Endocrinol*. 2014;28(4):477–89.
75. Baguma-Nibasheka M, Macfarlane LA, Murphy PR. Regulation of fibroblast growth factor-2 expression and cell cycle progression by an endogenous antisense RNA. *Genes (Basel)*. 2012;3(3):505–20.
76. Baguma-Nibasheka M, Li AW, Osman MS, Geldenhuys L, Casson AG, Too CKL, vd. Coexpression and regulation of the FGF-2 and FGF antisense genes in leukemic cells. *Leuk Res*. 2005;29(4):423–33.

77. Barclay C, Li AW, Geldenhuys L, Baguma-Nibasheka M, Porter GA, Veugelers PJ, vd. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) overexpression is a risk factor for esophageal cancer recurrence and reduced survival, which is ameliorated by coexpression of the FGF-2 antisense gene. *Clin Cancer Res.* 2005;11(21):7683–91.
78. Sun L, Yu S, Wang H, Fan B, Liu B. NUDT6, the FGF-2's antisense gene, showed associations with fat deposition related traits in pigs. *Mol Biol Rep.* 2012;39(4):4119–26.
79. Kolata S, Light K, Wass CD, Colas-Zelin D, Roy D, Matzel LD. A dopaminergic gene cluster in the prefrontal cortex predicts performance indicative of general intelligence in genetically heterogeneous mice. *PLoS One.* 2010;5(11).
80. E Eren-Koçak E, Yilmaz M, Basar K, Ayhan Y, Ozdemir H, Sen ZD. The role of fibroblast growth factor antisense in modulation of affective behaviour [Poster]. ECNP Congress; 2013; Barselona, İspanya.
81. Zinn E, Vandenberghe LH. Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr Opin Virol.* 2014;8:90–7.
82. Klugmann M, Symes CW, Leichtlein CB, Klaussner BK, Dunning J, Fong D, vd. AAV-mediated hippocampal expression of short and long Homer 1 proteins differentially affect cognition and seizure activity in adult rats. *Mol Cell Neurosci.* 2005;28(2):347–60.
83. Richichi C, Lin E-JD, Stefanin D, Colella D, Ravizza T, Grignaschi G, vd. Anticonvulsant and Antiepileptogenic Effects Mediated by Adeno-Associated Virus Vector Neuropeptide Y Expression in the Rat Hippocampus. *J Neurosci.* 2004;24(12):3051–9.
84. Xu R, Janson C, Mastakov M, Lawlor P, Young D, Mouravlev A, vd. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. *Gene Ther.* 2001;8(17):1323–32.
85. Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, vd. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet.* 1994;8(2):148–54.

86. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):583–93.
87. Murray AJ, Woloszynowska-Fraser MU, Ansel-Bollepalli L, Cole KLH, Foggetti A, Crouch B, vd. Parvalbumin-positive interneurons of the prefrontal cortex support working memory and cognitive flexibility. *Sci Rep.* 2015;5(November):1–14.
88. Nakajima M, Görlich A, Heintz N. Oxytocin modulates female sociosexual behavior through a specific class of prefrontal cortical interneurons. *Cell.* 2014;159(2):295–305.
89. Soumier A, Sibille E. Opposing effects of acute versus chronic blockade of frontal cortex somatostatin-positive inhibitory neurons on behavioral emotionality in mice. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(9):2252–62.
90. Ota KT, Liu R-J, Voleti B, Maldonado-Aviles JG, Duric V, Iwata M, vd. REDD1 is essential for stress-induced synaptic loss and depressive behavior. *Nat Med.* 2014;20(5):531–5.
91. Dietz DM, Kennedy PJ, Sun H, Maze I, Gancarz AM, Vialou V, vd. Δ fosB induction in prefrontal cortex by antipsychotic drugs is associated with negative behavioral outcomes. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(3):538–44.
92. Jakovcevski M, Bharadwaj R, Straubhaar J, Gao G, Gavin DP, Jakovcevski I, vd. Prefrontal cortical dysfunction after overexpression of histone deacetylase 1. *Biol Psychiatry.* 2013;74(9):696–705.
93. Suska A, Lee BR, Huang YH, Dong Y, Schluter OM. Selective presynaptic enhancement of the prefrontal cortex to nucleus accumbens pathway by cocaine. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(2):713–8.
94. Cao X, Li LP, Wang Q, Wu Q, Hu HH, Zhang M, vd. Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat Med.* 2013;19(6):773–7.

95. *Rattus norvegicus* nudix hydrolase 6 (Nudt6), mRNA [Internet]. [Erişim Tarihi 3 Mayıs 2018]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/31343426>
96. Klugmann M, Goepfrich A, Friemel CM, Schneider M. AAV-Mediated Overexpression of the CB1 Receptor in the mPFC of Adult Rats Alters Cognitive Flexibility, Social Behavior, and Emotional Reactivity. *Front Behav Neurosci*. 2011;5(July):1–10.
97. Gaidi M. Rat Brain Atlas [Internet]. 2016. [Erişim Tarihi 26 Mayıs 2018]. Erişim adresi: <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>
98. Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, vd. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther*. 2004;10(2):302–17.
99. Lee BR, Kamitani T. Improved immunodetection of endogenous α -synuclein. *PLoS One*. 2011;6(8):e23939.
100. Suzuki Y, Takeda Y, Ikuta T. Immunoblotting conditions for human hemoglobin chains. *Anal Biochem*. 2008;378(2):218–20.
101. Murlidharan G, Samulski RJ, Asokan A. Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Front Mol Neurosci*. 2014;7(September):1–9.
102. Davidson BL, Stein CS, Heth J a, Martins I, Kotin RM, Derksen T a, vd. vectors : Transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Pnas*. 2000;97(7):3428–32.
103. Bartlett JS, Samulski RJ, McCown TJ. Selective and Rapid Uptake of Adeno-Associated Virus Type 2 in Brain. *Hum Gene Ther*. 1998;9(8):1181–6.
104. Watakabe A, Ohtsuka M, Kinoshita M, Takaji M, Isa K, Mizukami H, vd. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neurosci Res*. 2015;93:144–57.

105. Aschauer DF, Kreuz S, Rumpel S. Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain. Qiu J, editör. PLoS One. 2013;8(9):e76310.
106. Taymans J-M, Vandenberghe LH, Haute C Van Den, Thiry I, Deroose CM, Mortelmans L, vd. Comparative Analysis of Adeno-Associated Viral Vector Serotypes 1, 2, 5, 7, And 8 in Mouse Brain. Hum Gene Ther. 2007;18(3):195–206.
107. Klein RL, Meyer EM, Peel AL, Zolotukhin S, Meyers C, Muzyczka N, vd. Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. Exp Neurol. 1998;150(2):183–94.
108. Ozdemir P, Selvi Y, Aydin A. Impulsivity and Its Treatment. Psikiyatr Guncel Yaklasimler - Curr Approaches Psychiatry. 2012;4(3):293.
109. Evenden JL. Varieties of impulsivity. Psychopharmacology (Berl). 1999;146(4):348–61.
110. Yazici K YA. DÜRTÜSELLİK Nöroanatomik ve Nörokimyasal Temelleri. Curr approaches psyciatry. 2010;2(2):254–80.
111. Aron AR, Robbins TW, Poldrack RA. Inhibition and the right inferior frontal cortex. Trends Cogn Sci. 2004;8(4):170–7.
112. Godefroy O, Rousseaux M. Divided and focused attention in patients with lesion of the prefrontal cortex. Brain Cogn. 1996;30(2):155–74.
113. Chudasama Y, Passeti F, Rhodes SEV, Lopian D, Desai A, Robbins TW. Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: Differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. Behav Brain Res. 2003;146(1–2):105–19.
114. Hardung S, Epple R, Jäckel Z, Eriksson D, Uran C, Senn V, vd. A Functional Gradient in the Rodent Prefrontal Cortex Supports Behavioral Inhibition. Curr Biol. 2017;27(4):549–55.

EKLER

EK 1: ETİK KURUL İZİNİ



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 -55

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 07.06.2016 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2016/04
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2016/24
KARAR NUMARASI	: 2016/24 - 02
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Doç. Dr. Emine Eren KOÇAK
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Dr. Fatma Özlem HÖKELEKLİ, Doç. Dr. Emine Eren KOÇAK
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Prof. Dr. Turgay DALKARA, Prof. Dr. Müge Yemişçi ÖZKAN, Doç. Dr. Hülya Karataş KURŞU : 78 Adet Sprague Dawley Sıçan (Erişkin 200-300 Gram)

Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Emine Eren KOÇAK'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2016/24 kayıt numaralı "*Prefrontal Kortekste NUDT6 İfadesindeki Değişikliklerin Sıçanda Depresyon-Benzeri ve Anksiyete-Benzeri Davranışa Etkileri*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK 2: TEZ ÇALIŞMASININ POSTERİ

E. Eren-Koçak, Ö. Hökeleli, H. Karataş-Kurşun, M. Yemişçi, T. Dalkara. FGF-AS Overexpression in medial prefrontal cortex regulates anxiety-like behavior in rats [Poster]. 30. ECNP Kongresi; 2017; Paris, Fransa.



EK 3: RIPA tamponu aşağıdaki tarife göre hazırlandı.

10 mL tampon için:

- 89,1 mg Sodyum klorür (NaCl)
- 10 uL Triton-100-X
- 52 mg Sodyum deoksikolik asit
- 333,5 uL Tris Buffer (pH= 8.00, 1,5 M)
- 50 uL %10 SDS

EK 4: Donma karşıtı çözeltinin tarifi aşağıda verilmiştir.

1 litre çözelti için:

- 13,75 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 25,75 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 400 mililitre distile su
- 300 mililitre etilen glikol
- 300 mililitre gliserol

ÖZGEÇMİŞ

I- KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatma Özlem Hökelekli
Doğum Yeri ve Tarihi : Yozgat, 20.07.1992
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
İletişim Adresi ve Telefonu : Kıbrıs Caddesi, 14/9, Kurtuluş, Ankara.
05558561619

II- EĞİTİMİ

2012-2018 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi MD-PhD bütünleşik programı,
Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı
2010-2018 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
2006-2010 Ankara Gazi Anadolu Lisesi

III- MESLEKLİ DENEYİMİ

2017-2018 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Intern Doktor

IV- BİLİMSEL FAALİYETLERİ

2012-2018 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi MD-PhD bütünleşik programı,
Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programında MD-PhD
öğrencisi
Eylül 2016 Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından onaylanan hızlı destek projesi (THD-2016-11687)
Ocak 2016 Temel Nörolojik Bilimler(Neuroscience) alanında yeterlilik

Posterleri

Eylül 2017 FGF-AS Overexpression in Medial Prefrontal Cortex Regulates
Anxiety-like Behavior in Rats, E. Eren-Koçak, Ö. Hökelekli, H.
Karataş-Kurşun, M. Yemişçi, T. Dalkara. 30. ECNP Kongresi, 2017,
Paris, Fransa.

- Mayıs 2017** The Effect of NUDT6 Expression on Contextual Learning Assessed by Passive Avoidance Test, Fatma Özlem Hökelekli, Murat Yılmaz, Emre Cem Esen, Koray Başar, Yavuz Ayhan, Turgay Dalkara, Emine Eren-Koçak. Annual Meeting of American Psychiatric Association 2017, San Diego, ABD (Sunucu).
- Mayıs 2017** Role of a Natural Antisense Transcript, FGF2-AS, in Affective Behavior, Fatma Özlem Hökelekli, Murat Yılmaz, Koray Başar, Yavuz Ayhan, Turgay Dalkara, Emine Eren-Koçak. 72nd Annual Scientific Convention of Society of Biological Psychiatry 2017, San Diego, ABD (Sunucu).
- Mayıs 2017** The Relationship of NUDT6-Overexpression with Dendritic Spine Density, Fatma Özlem Hökelekli, Murat Yılmaz, Emre Cem Esen, Koray Başar, Yavuz Ayhan, Turgay Dalkara, Emine Eren-Koçak. 15.Ulusal Sinirbilim Kongresi, Sakarya, Türkiye.
- Nisan 2017** Hippocampal NUDT6 Knockdown Promotes Learning in Passive Avoidance Test, Fatma Özlem Hökelekli, Turgay Dalkara, Emine Eren-Kocak. The Brain Conference on Learning, Memory and Synaptic Plasticity of Federation of European Neuroscience Societies 2017, Kopenhag, Danimarka (Sunucu).

Ödülleri ve Bursları

- Temmuz 2018** MD-PhD bütünleşik program başarı plaketi
- Ekim 2015- Mayıs 2017** Vehbi Koç Vakfı Bursu
- Nisan 2015** Prof. Dr. Şeref Zileli Yılın Başarılı Stajyeri Ödülü
- Mayıs 2011** 7. Tıpta İnsan Bilimleri Kongresi'nde "Doktor-Hasta İlişisine Sanatsal Bir Bakış: Sana Gül Bahçesi Vadetmedim" sunumu ile sunum birincilik ödülü
- Ocak 2011- Ocak 2017** Kredi ve Yurtlar Kurumu İlk 100 Bursu
- Ekim 2010** İş Bankası "Altın Gençler" başarı plaketi ve bursu
- Haziran 2010** Ankara Gazi Anadolu Lisesi okul birinciliği plaketi