

SIĞNEM EYUBOĞLU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KİSSPEPTİN NÖRONLARININ SİNAPTİK
BAĞLANTILARININ FONKSİYONEL VE ANATOMİK
KARAKTERİZASYONU**

SİĞNEM EYUBOĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. ÜMMÜHAN İŞOĞLU-ALKAÇ**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2018



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KİSSPEPTİN NÖRONLARININ SİNAPTİK
BAĞLANTILARININ FONKSİYONEL VE ANATOMİK
KARAKTERİZASYONU**

SİĞNEM EYUBOĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. ÜMMÜHAN İŞOĞLU-ALKAÇ
PROF. DR. BAYRAM YILMAZ**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Programında Doktora öğrencisi **Sig̈nem EYÜBOĞLU** tarafından **Prof. Dr.Ümmühan İŞOĞLU-ALKAÇ** ve **Prof.Dr. Bayram YILMAZ**'nın danışmanlığında hazırlanan “**Kisspeptin nöronlarının sinaptik bağlantılarının fonksiyonel ve anatomik karakterizasyonu**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **31/07/2018** tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof.Dr. Fatma Aytül UYAR
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji AD

Jüri-Danışman

Prof.Dr. Ümmühan İŞOĞLU-ALKAÇ
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji AD

Jüri

Prof.Dr.Sacit KARAMÜRSEL
İstinye Üniv.Tıp Fakültesi
Fizyoloji AD

Jüri

Prof.Dr. Hüsniye BİRMAN
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji AD

Jüri

Prof.Dr.Güler ÖZTÜRK
İst.Medeniyet Üniv.Tıp Fak.
Fizyoloji AD

BEYAN

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

Sig̈nem Eyuboğlu

İTHAF

Kıymetli *BÜYÜKANNEME* ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Kendisinden ders alma şansı bulduğum ve sonrasında desteklerini hiç esirgemeyen, tez çalışmam ve tez izleme sürecimde gösterdiği ilgili yaklaşım ve destek için İstanbul Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aytül UYAR' a;

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde desteği çok büyük olan, her zaman duruşunu, iletişimini, sabrını örnek aldığım, eğitimim boyunca sanattan bilime birçok konuda değerli bilgilerini ve tecrübelerini öğrencileriyle paylaşan ve bundan mutluluk duyan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer danışman hocam, akademik annem, Prof. Dr. Ümmühan İŞOĞLU ALKAÇ' a;

Öğrencisi olduğum ilk günden itibaren bilime teknolojiye olan merakımı bir kere bile törpülemeyip, bu zorlu yolda her zaman hevesle ve inançla yürümeme standartların üstünde olanak sağlayan, beyin araştırmaları ekibinin bir parçası olmaktan gurur duyduğum, inceliklerle dolu akademik hayatını rol model aldığım, her konuda öğrencilerine anlayışla ve ilgiyle destek olan, çok kıymetli hocam, eş danışmanım Prof. Dr. Bayram YILMAZ' a;

Öğrencileri olarak derslerine katılmaktan onur duyduğumuz, akademik vizyonu ve bilime bakışıyla örnek aldığım, kazandırdığı bilimsel bakış açısı ve tez izleme sürecimde gösterdiği destekleyici yaklaşımlar için Prof. Dr. Sacit KARAMÜRSEL' e;

Tez çalışmamda bilimsel katkıları ve dünyada sayılı laboratuvarlarda kullanılan optogenetik ve kemogenetik araştırma teknolojiyi ülkemize kazandırmada katkısı çok büyük olan, beraber çalışma fırsatı bulduğum Doç. Dr. Deniz ATASOY ve muhteşem araştırma ekibine;

Yeditepe Üniversitesi Beyin Araştırmaları ekibinde beraber çalışmaktan onur duyduğum, her adımında en az benim kadar emeği geçen Araş. Gör. Özge BAŞER başta olmak üzere Araş. Gör. Yavuz YAVUZ, Araş. Gör. Sami AĞUŞ, Araş. Gör. Ozan TUZCU ve Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesindeki tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Mehtap KAÇAR, Doç. Dr. Burcu GEMİCİ, Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR'a; Vet. Hek. Engin SÜMER başta olmak üzere deneysel katkılarından ötürü tüm YUDETAM ekibine, her türlü teknik donanım ve desteklerini esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi Bilgi İşlem Teknik Şefi Gürsoy ATASOY ve ekibine;

Ayrıca kıymetli zamanlarını ayırıp tezimi değerlendiren ve bana yapıcı eleştirilerde bulunup kendimi bilimsel açıdan geliştirmeme katkıda bulunan değerli tez jürisi hocalarımdan Prof. Dr. Hüsnüye BİRMAN, Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK'e,

Her ihtiyacım olduğunda hiç yorulmadan benimle beyin fırtınası yapan ve ufuk açan kıymetli dostlarım Dr. Birsan ELİBOL, Dr. Ayca Zeynep AKÜLKE, her zaman destekçim olan canım aileme; anneme, babama, kardeşlerim Gizem EYUBOĞLU, Özgür EYUBOĞLU'na ve neşe kaynağımız sevimli kedimiz MUFİDİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İV
BEYAN.....	V
İTHAF.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kisspeptin/ GPR54 sistemi	3
2.2. Kisspeptin'in fizyolojik rolü.....	5
2.3. Konvansiyonel yöntemlerden günümüze Kisspeptin nöron ağı haritalama.....	10
2.4. Adeno ilişkili virüs (AAV) sistemleri ile nöronal işaretlemeler ve Optogenetik Yaklaşımlar	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Deney Hayvanı.....	13
3.1.1. Farelerin Üretim Stratejisi.....	13
3.1.2. Kuyruk Biyopsi Örneğinden Genomik DNA İzolasyonu	14
3.1.3. DNA miktarının ölçülmesi.....	14
3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	14
3.2. Cre Rekombinaz Bağımlı AAV tipi virüslerin üretilmesi	16
3.2.1. Bakteriden Plazmit Çoğaltma	16
3.2.2. AAV293 Hücre hattının virüs üretimi için transfeksiyonu	18
3.2.3. Virüslerin iyodiksanol ile konsantre edilmesi ve saflaştırılması	20
3.3. Cre rekombinaz Bağımlı AAV virüslerin İntrakraniyal Enjeksiyonu	21
3.4. Kisspeptin nöronlarının aksonal projeksiyonların nöroanatomik incelenmesi	24
3.4.1. Kardiyak Perfüzyon / Fiksasyon ve Postmortem Beyin Dokusunun Alınması	24

3.4.2. Vibrotomda koronal beyin kesitlerinin alınması.....	24
3.4.3. Analiz	25
3.5. Kiss1 ^{Cre} nöronların Elektrofizyolojik etkilerinin araştırılması	25
3.5.1. Beyin preparatlarının hazırlanması	25
3.5.2. Elektrodların hazırlanması	28
3.5.3. Cell-attached Patch-clamp Kayıt	28
3.5.4. İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Kisspeptin nöronlarının projeksiyonlarının belirlenmesi.....	31
4.1.1. Arkuat Kisspeptin Nöronları	40
4.1.2. AVPV Kisspeptin Nöronları	47
4.2. Arkuat kisspeptin nöronlarının fonksiyonel bağlantılarının belirlenmesi	49
4.2.1. Intrakranyal Viral Enfeksiyon Merkezinin Belirlenmesi.....	49
4.2.2. Arkuat kisspeptin nöronlarının fonksiyonel projeksiyonlarının araştırılması...50	
5. TARTIŞMA	55
KAYNAKLAR	60
ETİK KURUL KARARI	69
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	70
ÖZGEÇMİŞ	71

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Deneylerde kullanılan fareler ve virüslerin gruplara dağılımı.	13
Tablo 3-2: Transgenik fare genotipleme için kullanılan primer dizileri ve PZR ürünü büyüklüğü.	14
Tablo 3-3: Transgenik fare genotipleme için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri, konsantrasyonları ve kullanılan hacimleri.	15
Tablo 3-4: Transgenik fare genotipleme için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.	15
Tablo 3-5: Transfeksiyon için kullanılan karışımın bileşenleri ve miktarları.	19
Tablo 3-6: İyodiksanol ile farklı faz konsantrasyonlarında (%17, %25, %40, %60) hazırlanan çözelti içerikleri.	20
Tablo 3-7: Beyin izolasyon çözeltisinin kimyasal içeriği.	27
Tablo 3-8: ACSF için kullanılan kimyasal bileşenler ve konsantrasyonları.	27
Tablo 4-1: Erkek ve Dişilerde Arkuat enjeksiyonu sonrası endojen floresan (TdT/GFP) yoğunlukları ve tüm gruplarda ortak olan yoğun beyin bölgeleri.	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: İnsan Kiss1 geninin kromozomal (sitogenetik) lokasyonu (GeneID: 3814)....	3
Şekil 2-2: Kisspeptin prekürsöründen (insan) kırılmalar sonrası oluşan farklı uzunlukta amino asit dizisi içeren kisspeptin ürünleri. (Pinilla ve ark. 2012; Roa ve ark. 2008' den değiştirilmiştir).....	4
Şekil 2-3: Kisspeptin reseptörünün aktivasyonu sonrası bilinen hücre içi sinyal yolları (Castano ve ark. 2009 Pinilla ve ark. 2012, Roa ve ark. 2008'den derlenmiştir).	5
Şekil 2-4: Farelerde GPR54 reseptör geni susturma stratejisi (panel A) ve GPR54 ^{-/-} mutant farelerle yabanıl farelerin gonad anatomilerinin karşılaştırılması (panel B) (Seminara ve ark. 2003'den Türkçeleştirilmiştir).	6
Şekil 2-5: Hipotalamik hipofizer gonadal aksis (HPG) ve kisspeptin nörobiyolojisi (d'Anglemont de Tassigny Colledge 2010 ve Pinilla ve ark. 2012'den derlenmiştir).	7
Şekil 3-1: Kuyruk biyopsilerinden elde edilen genomik DNA'ların PZR sonrası temsili jel görüntüsü, resim renkleri ters (invert) çevrilmiştir.	16
Şekil 3-2: Çalışmada kullanılan Adeno bağımlı virüslerin (AAV) tam ve kısaltma adı.	16
Şekil 3-3: Çizgisel yayma yöntemiyle bakteri ekimi ve tek koloni izolasyonu.	17
Şekil 3-4: Tek koloni izolasyonundan sıvı besiyerine aktarım ve plazmit izolasyonu şematize gösterimi.	17
Şekil 3-5: Bakteri ekiminden transgen plazmitlerin çöktürülerek elde edilmesi basamağına kadar olan protokol aşamalarının şematik anlatımı.	18
Şekil 3-6: AAV293 hücre hattının transfeksiyonu için kullanılan vektörler.	19
Şekil 3-7: Yoğunluk faz solüsyonlarının ve virüs içeren lizatın OptiSeal tüp içerisinde karıştırılması ve ultra santrifüj sonrası tüpün fazlara göre son görünümü.	21
Şekil 3-8: Virüs enjeksiyonu için kullanılan masaüstü düzeneğin şeması.	22
Şekil 3-9: Stereotaksiye yerleştirilen farenin bregma ve lamda süturları (sağda), enjeksiyona hazır virüs çekilen cam pipet solda.	22
Şekil 3-10: Projeksiyonların belirlenmesi için virus partikülleri intrakranyal olarak enjekte edildi.	23
Şekil 3-11: Postmortem beyin dokusunun fiksasyonu, sü kroza doyurulması, agaroz gömülmesi ve vibrotomda koronal kesit alımını gösteren iş akışı şeması.	24
Şekil 3-12: Optogenetik çalışmalar için rAAV-ChR2-EYFP virus partikülleri intra-arkuat olarak enjekte edildi.	26

Şekil 3-13: Taze beyin dokusunun izolasyonu, vibrotoma yerleştirilmesi ve koronal preparatların karbojenle gazlanan ACSF çözeltisinde inkübasyonu	26
Şekil 3-14: Vertikal pipet çekiciye cam pipetlerin yerleştirilmesi ve elektrodların hazırlanması.....	28
Şekil 3-15: Fluoresan işaretli kanalrodopsin geni ifade eden arkuat Kiss1 nöronlarının sinaps yaptığı düşünülen beyin bölgelerindeki nöronlardan kayıt alınarak sinaptik bağlantıların control edilmesini anlatan illüstrasyon.	29
Şekil 3-16: Optogenetik aktivasyon için üretilen lazer ünitesi ve Faraday kafesi ile çevrelenen elektrofizyoloji kayıt cihazı.	30
Şekil 4-1: Kiss1 ^{CRE} nöronlarına özgü seçici rAAV-Sinaptofizin-GFP gen ifadesiyle presinaptik terminallerin floresan işaretlenmesi, konfokal mikroskop görüntüsü. Kırmızı (tdT) floresan Kiss1 pozitif nöronları, yeşil (GFP) floresan Syn (Sinaptofizin) proteinini göstermektedir. Mikrofotoğrafta beyaz üçgen nöron gövdesini (soma), kırmızı üçgen aksonal uzantıları göstermektedir (bar 20 µm).	32
Şekil 4-2: Yoğun titrasyonda virüs enjeksiyonu sonrası tdTom ile işaretlenen kiss1 soma ve fiberlerin beyin bölgelerine dağılımı. (Konfokal görüntüleri Adobe Illustator CS6 ile birleştirildi)	34
Şekil 4-3: Yoğun titrasyonda virüs enjeksiyonu sonrası tdTom ile işaretlenen kiss1 soma ve fiberlerin beyin bölgelerine dağılımı (devamı) (Konfokal görüntüleri Adobe Illustator CS6 ile birleştirildi).	35
Şekil 4-4: Yoğun titrasyonda virüs enjeksiyonu sonrası tdTom ile işaretlenen kiss1 soma ve fiberlerin beyin bölgelerine dağılımı (devamı) (Konfokal görüntüleri Adobe Illustator CS6 ile birleştirildi).	36
Şekil 4-5: Retrosplenial granüler (RSG) korteks Kiss1 ^{Cre:EGFP} nöronları ve korpus collosum (CC)'a uzanan aksonal uzantıları. Kiss1 (kırmızı) ve sinaptofizin (yeşil) ifadeleri konfokal mikroskopta görüntülenmiştir (Bar 20µm).	37
Şekil 4-6: Hipokampal Kiss1 ^{Cre:EGFP} nöronları ve dentat girus'a uzanan aksonal uzantıları (Bar 20µm).....	38
Şekil 4-7: Zona inserta bölgesinde bulunan Kiss1 ^{Cre:EGFP} nöronları (Bar 20µm).	39
Şekil 4-8: Mammillar çekirdekte bulunan Kiss1 ^{Cre:EGFP} nöronları ve aksonal uzantıları.	39
Şekil 4-9: Bilateral olarak vurulan arkuat çekirdek ve hipotalamik alanların konumları (hipotalamik konumlar için Paxinos G ve ark., 2001'den değiştirilmiştir).	40

Şekil 4-10: Dişi transgenik farelerde Arkuat kiss1 nöronları AAV virüs kullanılarak işaretlendi. (Konfokal mikroskop, 10X büyütme).	40
Şekil 4-11: Dişi transgenik farelerde Arkuat kiss1 nöronları AAV virüs kullanılarak işaretlendi. (Konfokal mikroskop, 20X büyütme).	41
Şekil 4-12: Erkek transgenik farelerde Arkuat kiss1 nöronları AAV virüs kullanılarak işaretlendi (20X büyütme).	41
Şekil 4-13: Enjeksiyon bölgesinde bilateral Arkuat <i>Kiss1</i> nöronları TdT pozitif hücreler.	42
Şekil 4-14: Arkuat kiss1 nöronlarına ait ön beyin bölgesinde aksonal lifler ve presinaptik terminallerin dağılımı. Dişiler için atlasın sağ tarafı, erkekler için sol tarafı kullanılmıştır. 3 aylık fareler için yeşil nokta, 6 aylık fareler için kırmızı nokta sinaptofizin için, çizgiler lifler için kullanılmıştır.	43
Şekil 4-15: Analiz edilen koronal ön beyin kesit görüntüleri (5X büyütme).	44
Şekil 4-16: Arkuat kiss1 nöronlarına ait ön beyinde striatum bölgesinde aksonal lifler ve presinaptik terminallerin dağılımı. Dişiler için atlasın sağ tarafı, erkekler için sol tarafı kullanılmıştır. 3 aylık fareler için yeşil nokta, 6 aylık fareler için kırmızı nokta sinaptofizin için, çizgiler lifler için kullanılmıştır.	44
Şekil 4-17: Anterior komisürün etrafındaki ön beyin bölgeleri ve AVPV'deki aksonlar ve sinaptofizin (10X, bar).	45
Şekil 4-18: PVN bölgesinde yoğun fiber ve sinaptofizin işaretlenmesi görüldü (5X büyütme).	45
Şekil 4-19: PVN bölgesi için yoğun kiss1 fiberleri ve sinaptofizin fluoresan ifadesi (10X büyütme).	46
Şekil 4-20: Arkuat <i>Kiss1</i> nöronlarının ME (medianeminens) bölgesine projeksiyonu (20X).	46
Şekil 4-21: <i>Kiss1</i> AVPV nöronları için enjeksiyon yeri (20X büyütme).	47
Şekil 4-22: AVPV <i>kiss1</i> nöronlarının TdT pozitif lif dağılımı a) 10X büyütme ile genel görüntü b) MnPO'daki yoğun lif görüntüsü 20X büyütme c) Pe ve MPOA'daki yoğun lif görüntüsü 20X büyütme.	48
Şekil 4-23: Arkuat <i>Kisspeptin</i> nöronlarının ışığa duyarlı katyon kanalı gen ifadesi için intrakranyal viral vektörle işaretleme stratejisi.	50
Şekil 4-24: İntrakranyal virüs enfeksiyonunun koronal kesitlerde epifloresan mikroskopta incelenmesi (a-c; sırasıyla 4X, 40X ve 60X büyütme). d) Kanalrodopsin	

protein ifadesi görülen fluoresan işaretli kiss1 nöronlarından mavi lazer uyarısına cevap olarak oluşan postsinaptik nörondan spontan ateşleme kaydı görüntüsü. e) Fluoresan işaretli olmayan nöronlardan mavi lazer uyarısına karşı değişmeyen spontan nöronal ateşleme kaydı görüntüsü. Mavi bar lazer ışığının uygulandığı süreyi temsil etmektedir.

..... 51

Şekil 4-25: Arkuat Kiss1 nöronlarından alınan 5, 10, 20 ve 30 Hz uyarım yanıtları. Arkuat Kiss1 nöronlarından farklı frekanslarda uygulanan 473nm mavi lazer uyarısına cevap olarak alınan nöronal ateşleme frekansı değişimleri. 0-20 sn arası stimülasyon öncesi, 31-50 sn arası stimülasyon sonrası olarak kabul edildi. Her kayıt için öncesiyle karşılaştığında lazer uyarısının ateşleme frekansını anlamlı arttırdığı gösterilmiştir (***) $p<0,0001$) 52

Şekil 4-26: Arkuat Kisspeptin nöronlarının optogenetik aktivasyonu. A) Kisspeptin nöronlarının ChR2 geni transfeksiyonunun görüntülenmesi (4X büyütme). B) ChR2 ifade eden Kiss1 nöronlarının 10sn 10 Hz mavi ışık uyarımı sırasında PVN nöronundan alınan represantatif “cell attached”, voltaj clamp kaydı (Mavi kesikli çizgi ışık uyarımı zamanını göstermektedir). C) PVN’e arkuat nükleustan gelen aksonal uzantıların mikroskop görüntüsü (4X). D) PVN nöronlarından kaydedilen spontan aktivite frekansı grafiği (*; $p<0,05$)..... 53

Şekil 4-27: Arkuat Kiss1 nöronlarının optogenetik aktivasyonu. A) Kisspeptin nöronlarının ChR2 geni transfeksiyonunun görüntülenmesi (4X büyütme). B) ChR2 ifade eden kiss1 nöronlarının 10sn 10 Hz mavi ışık uyarımı sırasında MPOA nöronundan alınan represantatif cell attached, voltaj clamp kaydı (Mavi kesikli çizgi ışık uyarımı zamanını göstermektedir). C) MPOA arkuat nükleustan gelen aksonal uzantıların mikroskop görüntüsü (4X). D) MPOA nöronlarından kaydedilen spontan aktivite frekansı grafiği (*; $p<0,05$)..... 54

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

aa: Amino asit
AAV: Adeno bağımlı virus
AcbC: Nükleus akumbens
ARC: Arkuat çekirdek
AVPE: Anteroventral periventriküler çekirdek
BDA: Biyotinlenmiş dekstran amid
BSTn: Stria terminalisin yatak çekirdeği
CaCl₂: Kalsiyum klorür
ChR2: Kanalrodopsin-2
CPu: Kaudal putamen (striatum)
DAG: diaçilgliserol
DMN: Dorsomedial nükleus
FSH: Folikül stimule edici hormon
GFP: Yeşil floresan protein
GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon
HH: hipogonadotropik hipogonadizmi
IP₃: inositol 3-fosfat
KCl: Potasyum klorür
LH: Lutheinizan serbestleştirici hormon
LHn: lateral hipotalamik nükleus
LSr: Lateral septal nükleusun rostrali
ME: Median eminens
MgCl₂: Magnezyum klorür
MPO: Medial preoptik alan
MS: Medial septal nükleus
mTOR: Rapamisinin memelilerdeki hedef proteini
NaCl: sodyum klorür
NaH₂PO₄: Sodyum dihidrojen fosfat
NaHCO₃: Sodyum bi karbonat
LepR: Leptin reseptörü
PAG: Periaquaduktal gri

PBS: Fosfat tamponu
PeN: Periventriküler nükleus
PFA: Paraformaldehit
PHA-L: Phaseolus vulgaris Agglutinin
PKC: Protein kinaz-C
PLC: fosfolipaz-C
POA: Preoptik alan
PVN: Paraventriküler nükleus
RF: Arjinin-Fenilalanin motifi
SHy: Septohipotalamik nükleus
Syn: Sinaptofizin
TdT: Kırmızı floresan protein
YFP: Sarı floresan protein

ÖZET

Eyuboğlu, S. (2018). Kisspeptin nöronlarının sinaptik bağlantılarının fonksiyonel ve anatomik karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. İstanbul.

Kisspeptin, insan metastatik melanoma kanser hücrelerinde yapılan çalışmada metastaz baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır. Kisspeptinin, GnRH nöronları üzerindeki Kiss1r reseptörlerini uyararak gonadotropin salgılatıcı hormon salınımının kontrolünde, puberteye geçişte ve üreme fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli görevleri olduğu bilinmektedir. Kisspeptin veya kiss1r genindeki mutasyonlar hipogonadotropik gonadizm gibi üreme sistemi hastalıklarına neden olmaktadır. Fizyolojik açıdan üreme sistemi başta olmak üzere birçok farklı fonksiyonu olduğu bilinen kisspeptinin, beyinde hangi sinir ağları üzerinden etki ettiği henüz aydınlatılmamıştır. Yapılan bu çalışmada, kisspeptinin üretildiği bilinen başlıca iki önemli hipotalamik çekirdek, arkuat nükleus (ARC) ve anteroventral periventriküler (AVPV) nükleus, özgül olarak hedeflenerek buralardaki kiss1 nöronlarının beynin diğer bölgeleriyle ilişkisi incelenmiştir. Kiss1-Cre transgenik fare ile yapılan deneylerde, viral sistemler kullanılarak aynı kisspeptin nöronuna ait *sinaptofizin* ve *kiss1* genlerinin ilk kez beraber ifadesinin endojen floresan işaretli görüntülenmesine dayanarak nöroanatomik projeksiyonları gösterilmiştir. Buna göre ARC Kiss1 nöronlarının paraventriküler nükleus (PVN), medial preoptik alan (MPO), AVPV bölgeleri başta olmak üzere beynin birçok bölgesindeki lifleri ve presinaptik terminalleri hem dişi hem de erkek yetişkin farelerde gösterilmiştir. Ayrıca AVPV Kiss1 nöronlarının lateral septum, ARC, MPO'ya projeksiyon yaptığı ve periventriküler nükleus, medial septum, Broca'nın diagonal bandı (DBB) gibi birçok bölgeye uzanan lifleri bulunmuştur. Yapılan optogenetik deneylerde seçilmiş beyin bölgelerinden alınan elektrofizyolojik kayıtlar ile arkuat kiss1 nöronlarının bağlantıları fonksiyonel olarak da kontrol edilmiştir. Optogenetik uyarılar sonrası PVN, MPO, kontralateral ARC bölgelerinde bulunan nöronların spontan nöronal ateşleme sıklığındaki değişiklikler gözlemlenmiştir ve bu bölgelerde ARC kiss1 nöronlarından sinyaller alan nöronlar bulunduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, kiss1 nöronlarının diğer beyin bölgeleriyle ilişkili farklı fonksiyonel bağlantıları olabileceğine dair önemli bulgular elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arkuat nükleus, elektrofizyoloji, kisspeptin, optogenetik, sinaptofizin.

Bu çalışma, TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu) tarafından desteklenmiştir. Proje No: 115S327

ABSTRACT

Eyuboğlu, S. (2018). Functional and anatomical characterization of Kisspeptin Neuron's Synaptic Connections İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Physiology, PhD thesis, İstanbul.

Kisspeptin is defined as a metastatic suppressor gene in human metastatic melanoma cancer cells. Furthermore, it is known that Kisspeptin has important roles in regulating gonadotropin releasing hormone secretion, onset puberty and maintaining reproductive function by stimulating Kiss1r receptors on GnRH neurons. Also, Kiss1r mutations cause reproductive system diseases such as hypogonadotropic gonadism. Yet, the neuronal circuits in mammals that depend on kisspeptins which thought to have many physiological functions remain unidentified. In this study, the projections between the kiss1 neurons and other brain regions were investigated by specifically targeting the two major kiss1 neuron populations of the hypothalamic area, the arcuate nucleus (ARC) and the anteroventral periventricular (AVPV) nucleus. In this experiments conducted with Cre transgenic mice, neuroanatomical projections have been shown for the first time using combine virus based systems for imaging coexpression of synaptophysin and kiss1. Accordingly, ARC kiss1 neuron fibers with presynaptic terminals have been demonstrated in both female and male adult mice in several brain regions primarily paraventricular nucleus (PVN), medial preoptic area (MPO), AVPV. In addition, AVPV kiss1 neurons projected to lateral septum, ARC, MPO, and its extending fibers have been found in many locations such as periventricular nucleus, medial septum, Broca's diagonal band (DBB). Through the electrophysiological recordings from selected brain regions in the established optogenetic experiments, the projections of ARC kiss1 neurons were also functionally examined. Changes in the frequency of spontaneous neuronal firing of postsynaptic neurons in the PVN, MPO, contralateral ARC regions after optogenetic stimulation were observed, and these regions were found to have neurons receiving signal from ARC kiss1 neurons. Thus, important findings have been obtained that kiss1 neurons may have different functional associations with other brain regions.

Key Words: Arcuate nucleus, electrophysiology, Kisspeptin, Optogenetic, Synaptophysin

The present work was supported by TÜBİTAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey). Project No. 115S327

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kiss1 geninden ifade olunan 145 amino asitlik öncül peptidin alternatif kırpılmalarıyla oluşturduğu, farklı sayıda aminoasit içeren kisspeptinler, tüm bu kırpılmalara rağmen karboksil uçlarında ortak arjinin-fenilalanin (RF) ve amid (NH₂) motifi içerdiğinden RF amid grubu nöropeptid ailesindendir. Bu motifi taşıyan peptidlerin ve bu motifi tanıyan reseptör ailesinin ortak özelliği nöroendokrin, davranışsal ve duyuşsal olmak üzere önemli fizyolojik etkilerinin olmasıdır. Kisspeptinlerin, metastaz inhibitör olarak keşfedilmesinden bu yana üreme sistemi ve GnRH nöronları ile ilişkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Plasenta, ovaryum, testis, karaciğer, pankreas, böbrek, beyin gibi bir çok dokuda kendisinin ve reseptörünün (*GPR54* veya *KISS1R*) varlığı gösterilmiştir. Beyinde kisspeptin nöronlarının lokasyonları ve aksonal projeksiyonlarını belirlemek için geleneksel immün reaksiyon yöntemler kullanılıyordu. Fizyolojik koşullar değiştikçe kisspeptin nöronları pozitif ve negatif geribildirimler aldığından farklı lokasyonlardaki kisspeptin yoğunlukları değişmektedir. Bu değişiklikleri algılayabilecek hassasiyette ve sadece istenilen nöronlara özel işaretleme yapabilmeyi kolaylaştıran viral sistemler farklı nöron gruplarının haritalamalarında kullanılmaya başlandı. Kisspeptinerjik sinir devrelerinin anlaşılabilmesi bu nöronlar aktive olduğunda postsinaptik nörondaki değişikliklerin aydınlatılması kisspeptinin fizyolojik rolünün anlaşılması için oldukça önem taşımaktadır.

Son yıllarda kisspeptin ile ilişkili infertiliteden, hipogonadotropik hipogonadizm, anksiyeteye, obezite ve cinsel davranışlardan kansere kadar bir çok konuda araştırmalar yapılmaktadır. Bu kadar geniş bir etki ağına sahip kisspeptinler için in situ hibridizasyon, immunohistokimyasal boyama, konvansiyonel boya (trace) enjeksiyon teknikleri gibi birçok yöntem ile retrograd ve anterograd projeksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yöntemler oldukça önemli bulgular elde edilmesine vesile olmuştur ancak çapraz reaksiyonlar gibi teknik sebeplerden dolayı daha spesifik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu doğrultuda, çalışmamızda ilk kez hipotalamik *kiss1* nöronları anterograd (akson ucuna doğru) viral sistemler aracılığıyla (AAV-FLEEx-tdTomato ve AAV-FLEEx-Syn-GFP kombinasyonu kullanılarak) transgenik farelerde işaretleyip aksonal

projeksiyonlarının belirlenmesi hedeflendi. Dahası hipotalamik presinaptik *kiss1* nöronlarının optogenetik yöntemlerle uyarılıp postsinaptik nöronlardaki elektrofizyolojik değişikliklerin incelenmesi ve böylece arkuat *kiss1* nöronları için belirlenen projeksiyon bölgelerine sinaptik bağlantı varlığının gösterilmesi amaçlandı.

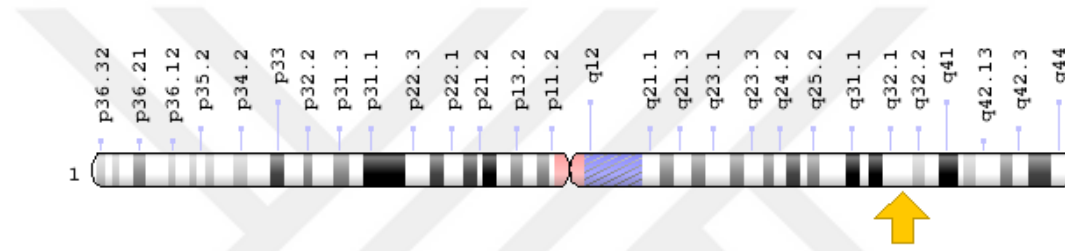
Kiss1 nöronların lif dağılımının yetişkin (3-6 aylık) transgenik farelerde detaylı haritalanması, bu nöronların beynin diğer bölgelerindeki etkilerini anlamada ve sonrasında *kiss1* bağımlı davranış ile ilgili parametrelerin incelenmesinde referans bir kaynak oluşturması hedeflendi.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kisspeptin/ GPR54 sistemi

Kisspeptin, 1. kromozomun uzun kolunda (1q32.1) lokalize olmuş Kiss1 geni (Şekil 2.1) tarafından kodlanmaktadır (West ve ark., 1998). Bu gen hidrofobik 145 amino asitten (aa) oluşan prekürsör proteini kodlar ve bu prekürsörün farklı kırpılma işlemlerine uğramasıyla genel adıyla kisspeptinler denilen farklı uzunlukta amino asit dizisi (54, 14, 13 ve 10 aa) içeren peptidlerden oluşur. Özellikle Kp-145 ve Kp-54 peptidlerinin ubiquitinizasyon ve proteozomal parçalanmaya yatkınlığı sağlayan bir amino asit dizisi taşıdığı düşünülmektedir (Gottsch ve ark., 2009; Harms ve ark., 2003).



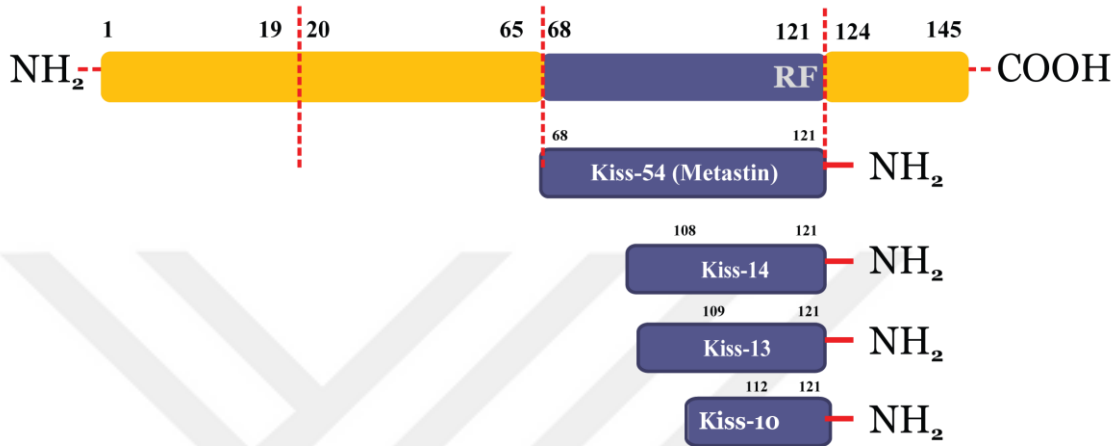
Şekil 2-1: İnsan Kiss1 geninin kromozomal (sitogenetik) lokasyonu (GeneID: 3814).

Öncül peptidin kırpılmasıyla oluşturulan yeni kisspeptinler farklı büyüklükte olmalarına rağmen hepsinin ortak özelliği karboksil uçlarının Arjinin-Fenilalanin (RF) motifi ile bitmesi ve bu uçtan amidlenmesidir (NH₂ eklenmesi). Bu nedenle, RF amid grubu nöropeptid ailesinin bir üyesidir (Clements ve ark., 2001; Kotani ve ark., 2001). Karboksil ucundaki bu RF-NH₂ motifi reseptöre bağlanma bölgesidir (Clements ve ark., 2001; D. K. Lee ve ark., 1999; Muir ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001).

GPR54, Kiss1R, AXOR12 gibi çeşitli isimler alan kisspeptin reseptörünü kodlayan genin kromozomal lokasyonu türler arasında farklılık göstermektedir, insanda 19., farede 10., sıçanda ise 7. kromozom üzerinde bulunuyor olmasına rağmen karşılaştırıldığında türler arası geçişte bu gen dizisi bakımından oldukça korunmuş G protein aracılı bir reseptör olduğu gösterilmiştir (Parhar ve ark., 2004).

GPR54'ün işlevsel özelliklerinin değerlendirilmesi için yapılan çalışmada bütün kisspeptin fragmentlerinin reseptörü aktive ettiği ve Kp-10'un maksimal reseptör aktivitesini koruduğunu ortaya koymuştur (Kotani ve ark., 2001). Buna karşın insan dolaşımında miktar olarak en çok metastin olarak da bilinen Kp-54 bulunur, bu da daha sonra Kp-14, Kp-13 ve Kp-10 peptidlerine parçalanabilir (Şekil 2.2) (Kotani ve ark.,

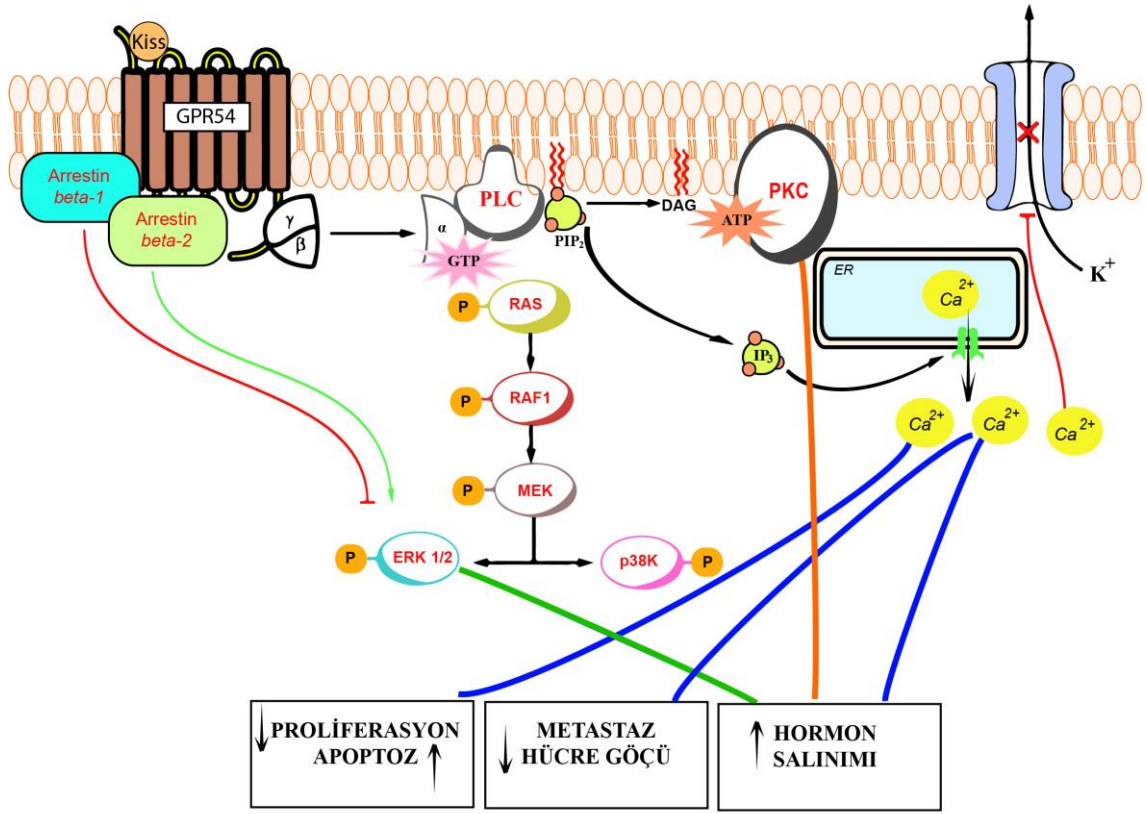
2001). Kiss1r ilk kez sıçanlarda galanin reseptör-2 ile homoloji gösteren ligandı bilinmeyen (orphan) reseptör olarak keşfedilmiştir (D. K. Lee ve ark., 1999). Farklı araştırmacıların eş zamanlı çıkardıkları makalelerde GPR54, hOT7T175, HH8, AXOR12 gibi çeşitli isimlendirmeler yapılmıştır (Kotani ve ark., 2001; Muir ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001).



Şekil 2-2: Kisspeptin prekürsöründen (insan) kırılmalar sonrası oluşan farklı uzunlukta amino asit dizisi içeren kisspeptin ürünleri. (Pinilla ve ark. 2012; Roa ve ark. 2008' den değiştirilmiştir).

Kisspeptin, ligandı olduğu reseptörüne bağlandığı zaman fosfolipaz-C (PLC) aktifleşir, bu da ikincil hücre içi habercileri, inositol 3-fosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) yolları üzerinden endoplazmik retikulumdan hücre içi kalsiyum salınımını indükler ve protein kinaz-C (PKC)' ı etkinleştirir (Constantin ve ark., 2009; Liu ve ark., 2008; Muir ve ark., 2001). PLC'den bağımsız bir mekanizmayla potasyum kanallarını açtığı düşünülmektedir. Bahsi geçen olaylar depolarize kisspeptin nöronlarında gerçekleşmektedir (Şekil 2.3).

Metastin (Kp-54), başlangıçta metastazın önlenmesinde önemli bir role sahip kanser baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır (J. H. Lee ve ark., 1996). Çok kısa bir süre sonra yapılan çalışmalarda kiss1 reseptörünü (Kiss1R, GPR54, Axor-12) kodlayan gendeki mutasyonların idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm ve infertiliteye yol açtığı gösterildiğinden bu alandaki çalışmalar bu sistemin üreme fonksiyonları üzerine etkilerine yoğunlaştırılmıştır (de Roux ve ark., 2003; Seminara ve ark., 2003).



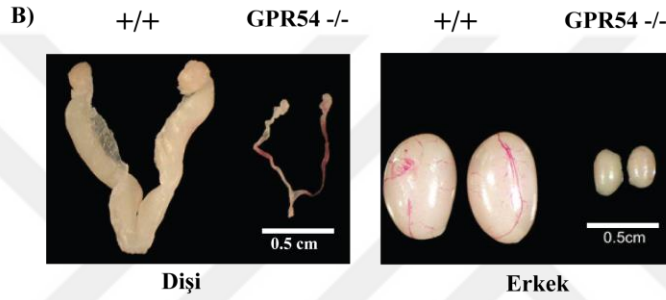
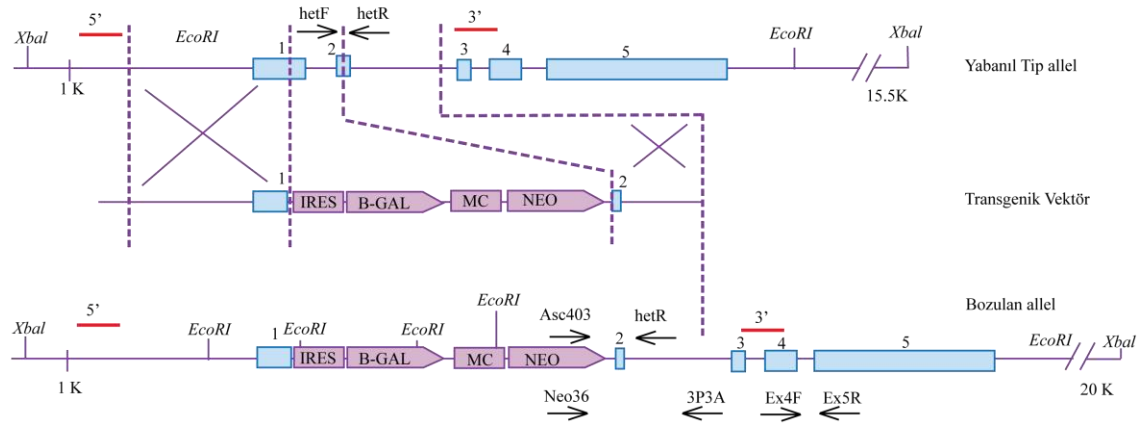
Şekil 2-3: Kisspeptin reseptörünün aktivasyonu sonrası bilinen hücre içi sinyal yolları (Castano ve ark. 2009 Pinilla ve ark. 2012, Roa ve ark. 2008'den derlenmiştir).

2.2. Kisspeptin'in fizyolojik rolü

Kiss1 ve GPR54 sisteminin, insan ve diğer türlerde üreme fizyolojisinin ergenlik döneminin başlamasında ve kontrol altında tutulmasındaki fizyolojik önemi için kanıtlar, hipogonadotropik hipogonadizmi (HH) olan insanlarda kisspeptin reseptöründe fonksiyon kaybı mutasyonlarının gösterilmesine (de Roux ve ark., 2003) ve bu çalışmadan bağımsız olarak yapılan GPR54 geni çıkarılmış transgenik farelerde gösterilen bulgulara (Seminara ve ark., 2003) kadar uzanmaktadır (Şekil 2.4). GPR54 geninde homozigot değişiklik yaparak (Şekil 2.4 panel A) bu genin fonksiyonel işlevinin kaybolması sonucu gonadal farklılıklar gösterilmiştir (Şekil 2.4 panel B). Bu çalışmaya göre yabanıl tip fare ile kıyaslandığında mutant farelerin testislerinin, over ve uteruslarının boyutunda azalma gösterilmiştir.

Sonrasında idiopatik hipogonadotropik hipogonadizmi olan geniş bir ailede yapılan klinik araştırmada (Topaloglu ve ark., 2012) Kiss1 genini inaktive eden mutasyonun tanımlanması, pubertal geçişteki başarısızlıkla kisspeptinin fonksiyonel olmasının ilişkili olduğunu göstermektedir.

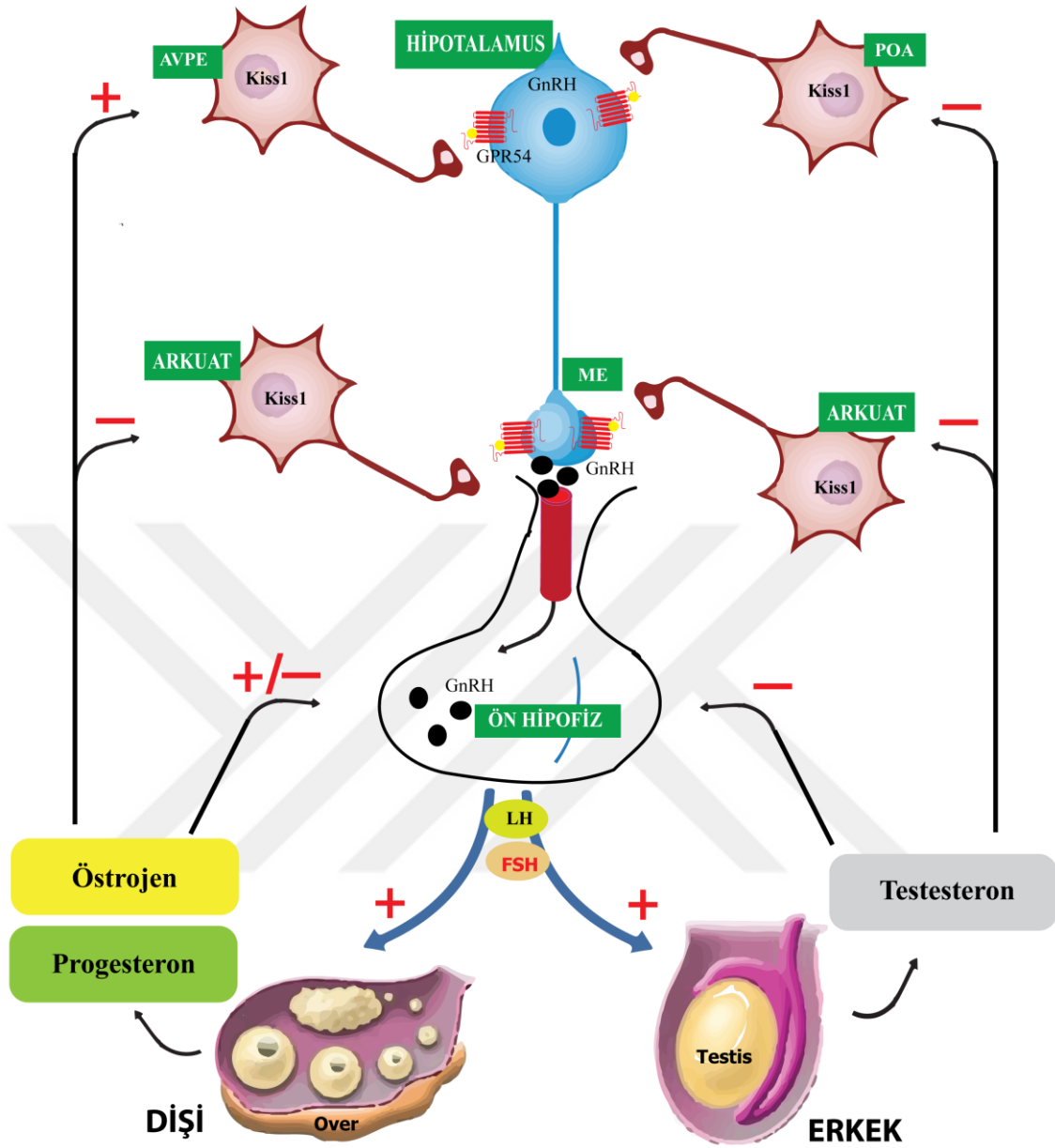
A)



Şekil 2-4: Farelerde GPR54 reseptör geni susturma stratejisi (panel A) ve GPR54^{-/-} mutant farelerle yabancı farelerin gonad anatomilerinin karşılaştırılması (panel B) (Seminara ve ark. 2003'den Türkçeleştirilmiştir).

Hipogonadotropik hipogonadizmden etkilenen bireylerde yapılan bu araştırmalar sonucu HH hastalığının, hasarlı bir hipofiz yanıtından yada embriyonal dönemde nazal plakoddan GnRH nöronlarının uygun şekilde hücre göçünün yapılamamasından kaynaklanmadığı ortaya çıkmıştır (Pinilla ve ark., 2012). GnRH salınımı için GPR54 ve kisspeptin sisteminin fonksiyonel sinyalleşmesine gerek olduğu dolaylı olarak gösterilmiştir (de Roux ve ark., 2003; Seminara ve ark., 2003; Topaloglu ve ark., 2012).

Kisspeptin, Kiss1 geni tarafından kodlanan üreme sisteminde özellikle puberte ve ovulasyonda kilit rol oynayan bir nörohormondur. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) üreten hücrelerde bulunan Kiss1R (veya GPR54) reseptörünün aktivasyonu sonucu hipotalamik-hipofizer-gonadal aksı kontrol ederek ovülasyon ve ergenlik gibi üreme fonksiyonları üzerine etki eder (d'Anglemon de TassignyColledge, 2010) (Şekil 2.5).



Şekil 2-5: Hipotalamik hipofizer gonadal eksen (HPG) ve kisspeptin nörobiyolojisi (d'Anglemont de Tassigny Collège 2010 ve Pinilla ve ark. 2012'den derlenmiştir).

GnRH, GnRH nöronunun median eminens (ME)'deki akson uçlarından hipofizer portal dolaşıma salınır ve ön hipofizden LH ve FSH salınımını uyarır (Tena-Sempere, 2005). Gonadotropik hormonlar dişilerde overleri erkeklerde testisleri gametogenezis ve üreme için uyarırlar. Arkuat çekirdekte bulunan kisspeptin nöronları gonadal steroidlerin negatif kontrolü altındadır. Östrojen, arkuat bölgesindeki kiss1 nöronlarının kisspeptin üretimini gen ifadesi düzeyinde baskılar ve kiss1 nöronları östrojen reseptörü içermeyen GnRH nöronları ile gonadlar arasında iletişimi sağlarlar (Herbison, 2008; Smith ve ark., 2005). Arkuat Kiss1 nöronlarının median eminens

(ME)'deki GnRH nöronlarının akson uzantılarına sinaps yaptığı (Ramaswamy ve ark., 2008) ve GnRH salınmasını steroid bağımlı olarak düzenlediği düşünülmektedir (Pinilla ve ark., 2012). Öte yandan AVPV bölgesinde bulunan Kiss1 nöronlarının ovulasyon öncesi dönemde artan östrojen düzeyinin etkisiyle kisspeptin mRNA miktarını arttırdığı dolayısıyla östrojenin bu nöronlar üzerine pozitif etki yaptığı gösterilmiştir (d'Anglemont de Tassigny Colledge, 2010; Smith ve ark., 2005). Overektomize edilmiş farelere östrojen tedavisinin kisspeptin mRNA miktarını overektomize gruba göre arkuat çekirdekte anlamlı olarak azalttığını, AVPV'de ise arttırdığını bildirdikleri çalışma östrojenin iki ayrı kisspeptin popülasyonu üzerine pozitif ve negatif etkilerini göstermektedir (Smith ve ark., 2005). Kisspeptinin GnRH nöronları üzerindeki reseptörüne bağlanarak GnRH salınımını uyarır (Kotani ve ark., 2001). GnRH'ın bu iki farklı lokasyondaki Kiss1 nöron popülasyonlarının kontrolünde düzenlendiği öne sürülmektedir (d'Anglemont de Tassigny Colledge, 2010). Arkuat Kiss1 nöronlarının bazal koşullardaki GnRH salınımını pulsatil olarak düzenlenmesinde, AVPV nöronlarının ise ovülasyon öncesindeki LH salınımında görev aldığı tahmin edilmektedir (GuSimerly, 1997; Kinoshita ve ark., 2005; Pinilla ve ark., 2012).

Gonadotropik eksenin harekete geçmesi ve normal pübertal gelişim optimal enerji depolama homeostazına bağlıdır (EvansAnderson, 2012). Beyine enerji rezervi ile ilgili metabolik sinyal adiposit kökenli leptin ile taşınmaktadır (Bouret ve ark., 2004; ElmquistFlier, 2004). Arkuat kisspeptin nöronlarında leptin reseptörünün bulunması ve leptinin LH salınımı için indükleyici olması bu indirekt fizyolojik etkide kiss1 nöronlarının aracı olduğunu düşündürmektedir (Smith ve ark., 2006). Leptin eksikliğinde görünen üreme kusurlarının (infertilite) ve püberteye geçişteki gecikmenin kısmen Kiss1'in azalmış ifadesi ile ilişkili olduğu düşüncesini kuvvetlendirmektedir (Castellano ve ark., 2005; Donato ve ark., 2011; Quennell ve ark., 2009).

Sıçan beyinlerinde yapılan immunohistokimya çalışmalarında GnRH nöronlarında leptin reseptörünün (Ob-R) olmadığı gösterilmiştir (Hakansson ve ark., 1998). Bir başka çalışmada Rhesus maymunlarının beyinleri in-situ hibridizasyon tekniği ile Ob-R lokalizasyonu araştırıldığında GnRH nöronları leptin reseptörü ifade etmediği gösterilmiştir (Finn ve ark., 1998). Reseptörü olmasa da GnRH nöronları bu metabolik uyarıcıların kontrolü altındadır, kisspeptin nöronlarının aracı düzenleyici

etkisi ile bu metabolik sinyalleri ilettiği düşünülmektedir (Backholer ve ark., 2010; Castellano ve ark., 2010).

Leptin adipositlerden salınan, iştah düzenleyici bir hormondur (Schwartz ve ark., 2000; Y. Zhang ve ark., 1994). Tıpkı Kiss1R genindeki delesyon mutasyonunda olduğu gibi bu kez leptin veya leptin reseptöründeki (LepR) mutasyona bağlı olarak puberteye geçişte gecikmenin ve HH'in görüldüğü, fare ve insanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar leptin'in kisspeptinle bağlantılı olabileceği hipotezini düşündürmüştür (Chehab ve ark., 1996; Clement ve ark., 1998). Sonrasında arkuat çekirdekteki Kiss1 nöronlarının LepR'ü ifade ettiği ve ob/ob farelerde (leptin yoksunu transgenik fare modeli) intraperitoneal leptin tedavisinin hipotalamik Kiss1 mRNA'sını arttırdığı gösterilmiştir. Bu da Kiss1 nöronlarının leptin regülasyonu için doğrudan hedef olduğunu göstermiştir (Smith ve ark., 2006). Yapılan bir başka çalışmada yüksek yağ içeren besin tüketimi sonrası sıçanlardan alınan beyaz adipoz dokuda Kiss1 ifadesi düşerken, açlık ve gonadal steroidler arttığında Kiss1 ifadesinin arttığını gösterildi (Brown ve ark., 2008), obez prepubertal kızların periferik dolaşımındaki kisspeptinlerin kaynağı olarak beyaz yağ doku olabileceğini düşündürmüştür (Pita ve ark., 2011).

Yapılan bir başka çalışmada Kiss1R yoksunu transgenik dişi farelerde yabani tip farelerle kıyaslandığında, leptin seviyesinde, yağ dokusunda ve vücut ağırlığında artış gösterilirken, erkeklerde vücut ağırlığı açısından fark gözlemlenmemiştir (Tolson ve ark., 2014). Bu çalışma da aynı zamanda günlük enerji ihtiyacı, besin alımı ve lokomotor aktivitenin de düştüğünün gösteriliyor olması kisspeptinin üreme dışında fizyolojik rolleri olabileceğini düşündürmektedir.

Rapamisin'in memelilerdeki hedef proteini (mTOR), açlık durumunda enerji homeostazının düzenlenmesinde özellikle hücre büyümesi ve farklılaşmayı azaltmada etkili bir rol oynar (SchmelzleHall, 2000). Yapılan çalışmalarda kisspeptinin başka bir fizyolojik etkisi olarak mTOR ile olan ilişkisi gösterilmiştir. Rapamisin (mTOR antagonisti) verildikten sonra hipotalamusta özellikle arkuat çekirdekte kisspeptinin azaldığı ve plazmada LH seviyesinde düşüş olduğunu gösterilen çalışmada, puberteye geçişte mTOR'un kisspeptin sistemi üzerinden düzenleyici etkisi ve kisspeptinerjik sistemle yakından ilişkisi olabileceği önerilmiştir (Roa ve ark., 2009).

Kisspeptin güçlü bir vazokonstriktördür ve anjiyogenez inhibitörüdür (Mead ve ark., 2007). İnsan aort, koroner arter ve umbilikal ven düz kaslarında hem kisspeptin

hem de reseptörünün gen ifadesini gösterdikleri araştırma kisspeptinin insanlarda kardiyovasküler sistem için önceden tanımlanmamış bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Mead ve ark., 2007). Yapılan başka bir çalışma sonucuna göre sıçanlara intraperitoneal uygulanan kisspeptinin koagülasyon zamanı, kanama zamanı ve protrombin zamanını anlamlı olarak uzattığı ve kisspeptinin antikoagulant etkilerinin olabileceği gösterilmiştir (QureshiKanwal, 2011).

2.3. Konvansiyonel yöntemlerden günümüze Kisspeptin nöron ağı haritalama

İmmunohistokimya ve in situ hibridizasyon gibi teknikler kisspeptin nöronlarını belirlemek için kullanılmıştır. Dokulardaki gen ifadeleri mRNA ve protein düzeylerinde araştırılmıştır. GPR54 için yapılan çalışmada beyin, hipofiz, omurilik, pankreas, dalak, lenfositler, adipoz dokuda, testis, overler ve plasenta gibi bir çok dokuda farklı oranlarda ifade edilmektedir (Kotani ve ark., 2001), kisspeptinin dokulardaki dağılımları benzerlik göstermektedir (Colledge, 2008). Kiss1 geni özellikle plasentada yoğun olarak ifade edilirken, böbrek, pankreas, karaciğer, prostat, akciğer ve gonadlarda daha düşük düzeyde ifade edilir (Muir ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001).

Kiss1R'nin beyindeki dağılımına RT-PZR ile bakıldığında hipotalamus, nükleus akumbens, talamus, serebellum, amigdala, singulat korteks, substansiya nigra, hipokampus, pons ve medullada yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir (Colledge, 2008; Kotani ve ark., 2001; Muir ve ark., 2001).

Beyinde özellikle memelilerde kisspeptin nöron popülasyonu olarak hipotalamusta arkuat çekirdek (ARC) ve preoptik alan (POA) olmak üzere iki önemli bölge olduğu düşünülmektedir (GoodmanLehman, 2012; Gottsch ve ark., 2004; Semaan ve ark., 2013). Özellikle GnRH nöronlarının aktivasyonu ve GnRH salınımı konusunda anahtar role sahip olması nedeniyle bu iki nöron popülasyonu oldukça dikkat çekmiştir (Herbison, 2008). POA kiss nöronları, dişilerde pubertal olgunlaşmanın yanısıra preovulator GnRH/LH dalgalandırmalarını (surge) başlatmada görevli GnRH nöronlarının aktivasyonunda rol oynar (Adachi ve ark., 2007; Kinoshita ve ark., 2005). Kemirgenlerde, koyun ve keçiler üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda ise ARC kiss nöronlarının östrojen negatif geribesleme mekanizmasına ve muhtemel GnRH nöron pulsatilitesine katkıda bulunduğu öne sürülmektedir (Adachi ve ark., 2007). Bunların dışındaki kiss popülasyonlarının, GnRH nöron aktivitesini nasıl kontrol ettiği halen tam olarak bilinmemektedir. Elektrofizyolojik ve görüntüleme teknikleri ile yapılan

araştırmalar kisspeptinin median eminesteki GnRH nöron sinir terminal uçlarının uyarılmasında düzenleyici olası etkileri olabileceğini göstermiştir (Qiu ve ark., 2016).

Bu lokasyonlardaki nöronların aksonal lif dağılımının haritalanması için çeşitli retrograd ve anterograd boyalarla işaretleme ve immünohistokimya teknikleri kullanılmıştır (True ve ark., 2011). Farelerde ARC ve RPV3 kiss nöron popülasyonlarının retrograde ve anterograde projeksiyon yollarının belirlenmesi için konvansiyonel boyalar (trace) denenmiştir (YeoHerbison, 2011). Anterograd boyama için farelerin arkuat çekirdeğine PHA-L (*Phaseolus vulgaris* Agglutinin), AVPV’ye ise BDA (biyotinlenmiş dekstran amid) iyontoforez yöntemiyle enjekte edildi ve bir hafta sonra boyalar yollarını tamamladıktan sonra beyin dokuları incelendiğinde arkuat çekirdekte somaları bulunan nöronların roastralden kaudale doğru sırasıyla septohipotalamik nükleus (SHy), stria terminalisin yatak ekirdeği (BSTn), preoptik alana (MEPO, MPN, MPA, LPO, AVPV PVpo), periventriküler nükleus (PeN), paraventriküler nükleus (PVN), lateral hipotalamik nükleus (LH), dorsomedial nükleus (DMN), periakvaduktal gri (PAG) bölgelerinde anti-Kiss ve anti-PHA-L ile immnreaktiviteye uğramış kolokalize olan/olmayan çok sayıda arkuat bölgesinden gelen aksonal uzantılar gösterilmiştir (Yeo Herbison, 2011).

Antikorların spesifik seçici olmayışı, RF amid protein ailesinin üyelerine karşı çapraz reaksiyon göstermesi bu proteini üreten nöronların belirlenmesini güçleştiriyordu. Daha zel işaretleyciler ya da tekniklere ihtiyaç olduğundan, Kiss1 geninin kodlama bölgesine moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak Cre-GFP transgeni eklendiği ve genin işlevinin bozulduğu transgenik fare modeli üretildi (Yeo ve ark., 2016). Bu transgenik fareler Kiss1 promoter bölgesine eklenen Cre-GFP’yi ürettiğinden fonksiyonel kisspeptin retemiyordu. Kiss-CRE farelerle, Cre-bağımlı-TdTomato fareler iftleştirildi ve elde edilen ifte transgenik farelere “clarity” yöntemi uygulanarak şefflaştırılan beyinlerde AVPV ve arkuat kiss1 nöronları için GFP ve TdT ko-lokalizasyonları incelendi. Arkuat bölgesinde kolokalize olmuş çok sayıda nöron belirlendi ve ifte transgenik farelerin dişilerinde AVPV TdT ile kolokalize olan kiss1 nöronlarının erkeklerle kıyasla fazla olması bu bölge için dimorfizm olduğunu düşündürmektedir. Lateral septum, anterodorsal preoptik nükleus, amigdala, DMH, VMH, PAG ve MM’de az sayıda TdT ile işaretlenen nöronlar belirlendi. Yine bu

çalışmada arkuat Kiss1 nöronlarından POA, AVPV ve lateral hipotalamusa sinir liflerinin gittiği gösterildi (Yeo ve ark., 2016).

2.4. Adeno ilişkili virüs (AAV) sistemleri ile nöronal işaretlemeler ve Optogenetik Yaklaşımlar

Rekombinant adeno ilişkili virüs (rAAV) (Samulski ve ark., 1989) beyine gen aktarımı için yaygın olarak kullanılan (Zingg ve ark., 2017), yaklaşık 20-25 nm çapında (Timpe ve ark., 2005), kapsidini kodlayan gen içermediğinden patojenik olmayan başlanan taşıyıcı bir vektördür (Gao ve ark., 2005; Glover ve ark., 2002). Nöronlarda uzun süreli gen ekspresyonuna olanak sağlayan (Glover ve ark., 2002; Glover ve ark., 2003), genomunu enfekte ettiği konak hücreye dahil edebilen bu viral sistemler sayesinde bir gene ait ayrıntılı haritalar çıkarılıp nöral devrelerin belirlenmesine olanak sağladı (BetleySternson, 2011). Yine aynı viral sistemler kullanılarak dışarıdan hücre genomuna kanal proteinleri kodlanıp konak nöronun aktivitesini kontrol etmek mümkün hale geldi (Fenno ve ark., 2011; HuangZeng, 2013).

Bu alanda değişik davranış modellerinde nöronların lokasyonlarının belirlenmesi ve aktivasyonunun kontrolü için bu viral sistemlerden ve moleküler biyoloji tekniklerinden faydalanılmıştır. Kisspeptinin fizyolojik rolünün araştırılması konusunda yine bu sistemler kullanılmıştır. Kisspeptin nöronlarında Cre rekombinaz enzimi geni bulunduran transgenik farelerin arkuat nükleustaki Kiss1 nöronları hedeflenerek Cre bağımlı çalışan kanalrodopsin (ChR2) ifade eden rAAV vektörü intrakraniyal enjeksiyon ile veriliyor, enfeksiyon süresi geçtikten hedef bölge üzerine yerleştirilen fiber optik kablo kullanılarak 473 nm mavi lazer ile bu hücreler uyarıldı ve LH miktarının kanda arttığı gösterilmiştir (Han ve ark., 2015). Yine rAAV-ChR2 viral sistemleri kullanılarak yapılan çalışmada arkuat Kiss1 nöronlarının AVPV Kiss1 nöronlarına glutamaterjik bağlantısı ve median eminense sonlanan GnRH nöron terminallerine input gönderdiği gösterilmiş, AVPV'deki Kiss1 nöronlarının modülasyonu ile GnRH salınımı için hücrelerin uyarıldığı ileri sürülmüştür (Qiu ve ark., 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiş (Proje no: 115S327) ve Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu' (YÜDHEK) 24.05.2016 tarihinde 534 nolu kararla onaylanmıştır.

3.1. Deney Hayvanı

Bu tez çalışmasında transgenik Kiss1Cre:EGFP (Jax. Lab. #017701) (M. L. Gottsch ve ark., 2011; Popa ve ark., 2013) ve yabanıl tip C57BL/6 fareler kullanılmıştır. Bu fareler TÜBİTAK 115S327 nolu proje kapsamında Jax Lab.'dan ithal edilmiş ve üretilmiştir. Deney hayvanları 21 ± 1 °C sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık-karanlık ortamda tutuldular. Farelere *ad libitum* olarak standart fare yemi ve normal musluk suyu verildi. Kullanılan fare sayısı ve gruplara dağılımı Tablo 3.1' de belirtilmiştir.

Gruplar	Enjeksiyon Bölgesi	Cinsiyet	Yaş	N (adet)
1	Arkuat (ARN)	Dişi	3-6 aylık	4
2	Arkuat (ARN)	Erkek	3-6 aylık	4
3	AVPV	Dişi	3-6 aylık	4
4	Arkuat (ARN)	Dişi	3-6 aylık	4
5	Arkuat (ARN)	Erkek	3-6 aylık	4

Tablo 3-1: Deneylerde kullanılan fareler ve virüslerin gruplara dağılımı.

3.1.1. Farelerin Üretim Stratejisi

Kiss1^{Cre:EGFP} (Jax Lab Kat No: 017701) transgenik fare hattının çoğaltılması için satın alındığı Jackson laboratuvarın önerdiği şekilde heterozigot x yabanıl tip C57BL/6 çiftleşme stratejisi kullanıldı. Bu stratejiye uygun olarak iki dişi ve bir erkekten oluşan çiftleşme kafesi oluşturuldu ve hayvanlar iki siklus süresi (sekiz gün) bir arada üretim kafeslerinde tutuldu, süre sonunda erkek fare dişilerin yanından alındı ve dişilerin gebelik durumları takip edildi. Gebe kalan fareler belirlenerek bireysel kafeslere alındı. Üretilen yeni farelerin genotiplenmesi için, yavrular 22 günlük olduğunda sütten kesildikleri sırada kuyruk biyopsileri alındı.

3.1.2. Kuyruk Biyopsi Örneğinden Genomik DNA İzolasyonu

İzofluoran ile hafif anestezi altına alınan farelerin kuyruk ucundan 2 mm uzunlukta kesilen doku örnekleri deney tüplerine alındı ve genomik DNA izolasyonu yapıldı (Truett ve ark., 2000). Dokunun üzerini örtecek şekilde 75 µl alkali lizis çözeltisi (25 mM NaOH/ 0,2 mM EDTA) konularak 1 saat, 98 °C’de inkübe edildi. Süre sonunda tüpler buzun üzerine alındı ve üzerine 75µl nötralizasyon tampon çözeltisi (40 mM Tris-HCl, pH 5,5) eklendi. Elde edilen karışım 3 dk. 4000 rpm’ de santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı ve yeni deney tüpüne aktarıldı.

3.1.3. DNA miktarının ölçülmesi

İzole edilen genomik DNA miktarları ve kalitesinin kontrolü için Gen5-BioTEK (Take3) sistemi kullanılarak örneklerin optik yoğunluğu ölçüldü. Bunun için Take3 plaka üzerindeki nokta şeklindeki alanlara 1 µl örnek konuldu ve çift sarmal DNA örneğinin 260 nm (DNA için) ve 280 nm (Protein için) dalga boylarına karşı ölçülen absorbans değerleri kaydedildi. A260/ A280 oranı değerlendirildi (Wilfinger ve ark., 1997) ve bu oranın 1,8-2,0 arasında olan örnekler genotiplemede kullanıldı.

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Agaro Jel Elektroforezi

Genotipleme için Tablo 3.2’ de dizisi belirtilen primerler (Michelle L. Gottsch ve ark., 2011) ve Tablo 3.3’ de gösterilen PZR karışımı (NEB katalog no: M0270L) kullanıldı. Buna göre PZR solüsyonu hazırlandı ve cihaza (Multigene Optimax, TC9610 model) yerleştirilen örnekler Tablo 3.4’ deki koşullarda reaksiyona sokuldu.

Primer	Primer Sekansı (5' --> 3')	PZR Ürünü
Primer M (Mutant)	GGC AAA TTT TGG TGT ACG GTC AG	250 bp
Primer W (Yabanıl)	GAG CCT CCA GTG CTC ACA GC	337 bp
Primer F	GAC CTA GGC TCT GGT GAA G	

Tablo 3-2: Transgenik fare genotiplemesi için kullanılan primer dizileri ve PZR ürünü büyüklüğü.

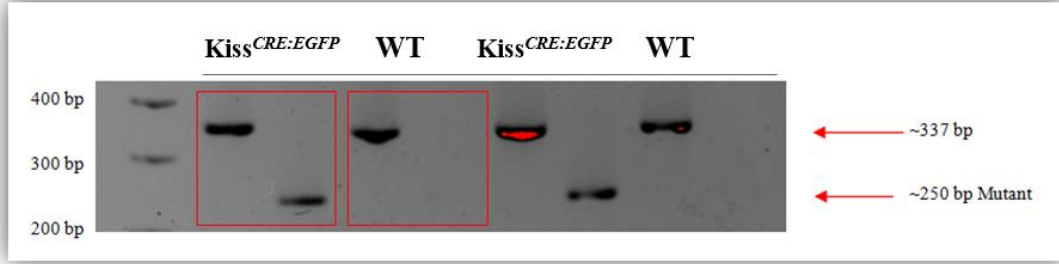
Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri	Son konsantrasyon	Son Hacim (µl)
Taq 2X karışımı	1 X	6,25
Primer M (mutant) veya W (yabanıl)	0,25 µM	0,30
Primer F	0,25 µM	0,30
ddH ₂ O	-	4,65
DNA örneği	-	1

Tablo 3-3: Transgenik fare genotiplemesi için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri, konsantrasyonları ve kullanılan hacimleri.

Adımlar	Sıcaklık (°C)	Süre	Notlar
1	94	2 dk	
2	94	20 sn	her döngüde -0,5 °C azaltılarak (Touchdown teknîği)
3	65	15 sn	
4	68	10 sn	
5	2-4 arası adımlar 10 döngü tekrarlandı		
6	94	15sn	
7	60	15 sn	
8	72	10 sn	
9	6-8 arası adımlar 28 döngü tekrarlandı		
10	72	1 dk	
11	4	α	

Tablo 3-4: Transgenik fare genotiplemesi için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.

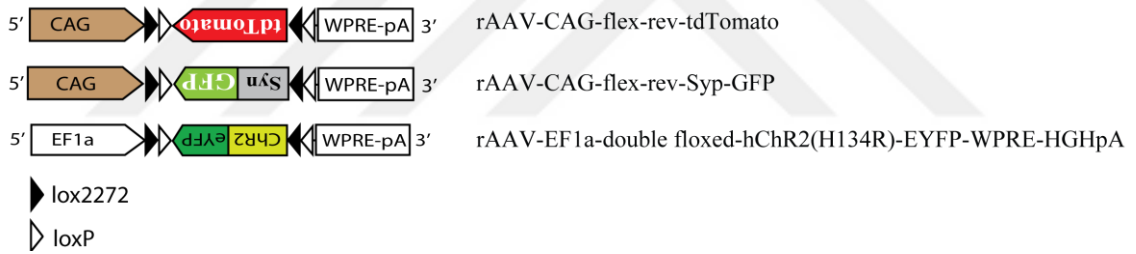
PZR ürünleri, 0,5 X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu (içeriği: 40 mM Tris-Cl, 45 mM borik asit ve 1 mM EDTA) ile hazırlanan % 2 agaroz jele yüklendi ve 120 V' ta 15 dk. yürütüldü. Jeller Biorad Chemidoc görüntüleme sisteminde (UV lamba altında) incelendi ve mutant gen olması durumunda ~250 baz, yabanıl tip durumunda ~337 baz, heterozigot olma durumunda ise ~ 250 baz ve ~337 baz olmak üzere bantlar elde edildi (Şekil 3.1). Bantların baz cinsinden büyüklüklerine göre fare genotipleri belirlendi. Deneylerde heterozigot fareler kullanıldı.



Şekil 3-1: Kuyruk biyopsilerinden elde edilen genomik DNA'ların PZR sonrası temsili jel görüntüsü, resim renkleri ters (invert) çevrilmiştir.

3.2. Cre Rekombinaz Bağımlı AAV tipi virüslerin üretilmesi

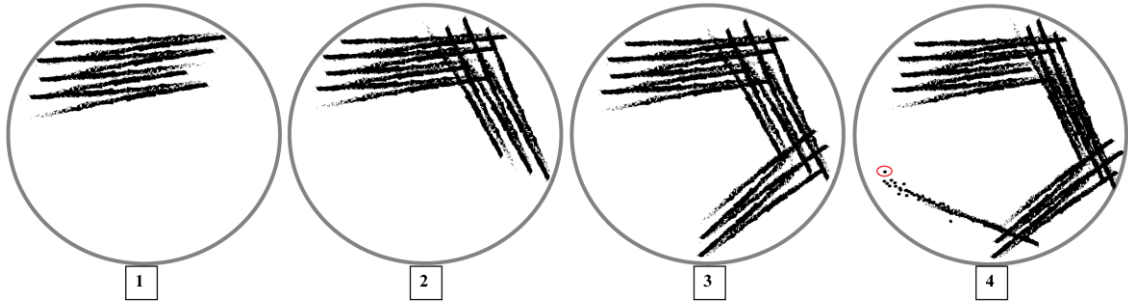
Virüs üretimi için Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Araştırma laboratuvarı ve Medipol Üniversitesi REMER laboratuvarları alt yapı olanakları kullanılmıştır. Yardımcı vektörler ve transgen plazmit içeren bakteriler TÜBİTAK 115S327 projesi kapsamında temin edilmiştir. Aşağıda tam adı belirtilen virüsler üretilip deneylerde kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3-2: Çalışmada kullanılan Adeno bağımlı virüslerin (AAV) tam ve kısaltma adı.

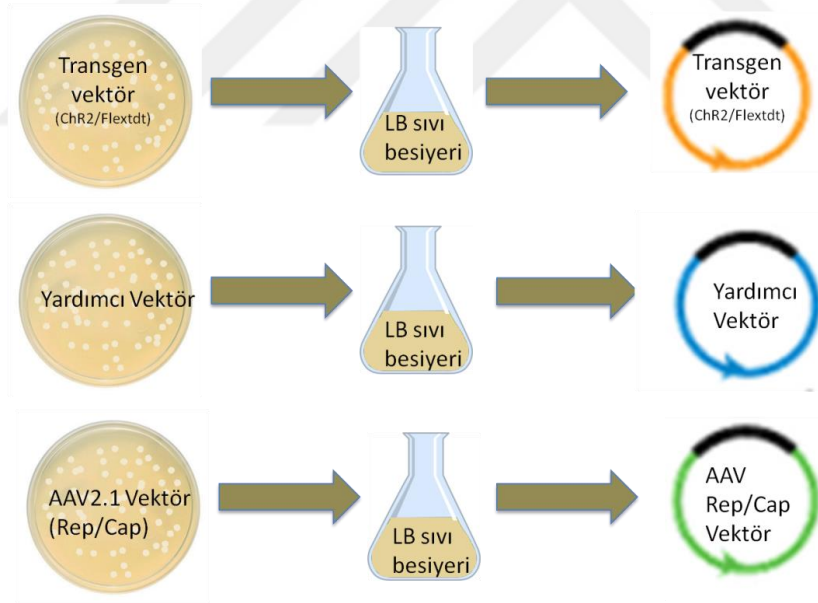
3.2.1. Bakteriden Plazmit Çoğaltma

Yardımcı vektör, pAAV2.1 plazmitleri içeren bakteri (*DH5-Alpha E. Coli*) stokları açıldı ve ampisilinli (100 µg/ml) Luria-Bertani (LB) agar (35 g/L, Biomatik, A8523) petrilere çizgisel yayma yöntemi ile (Şekil 3.3) aseptik koşullara dikkat edilerek ekildi (Sanders, 2012). 37 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün ampisilin dirençli bakteriyel kolonilerden tek düşen koloni öze yardımıyla alındı ve 100 ml LB sıvı kültür ortamına (20 g/L, Biomatik, A8521) aktarıldı (Şekil 3.4).

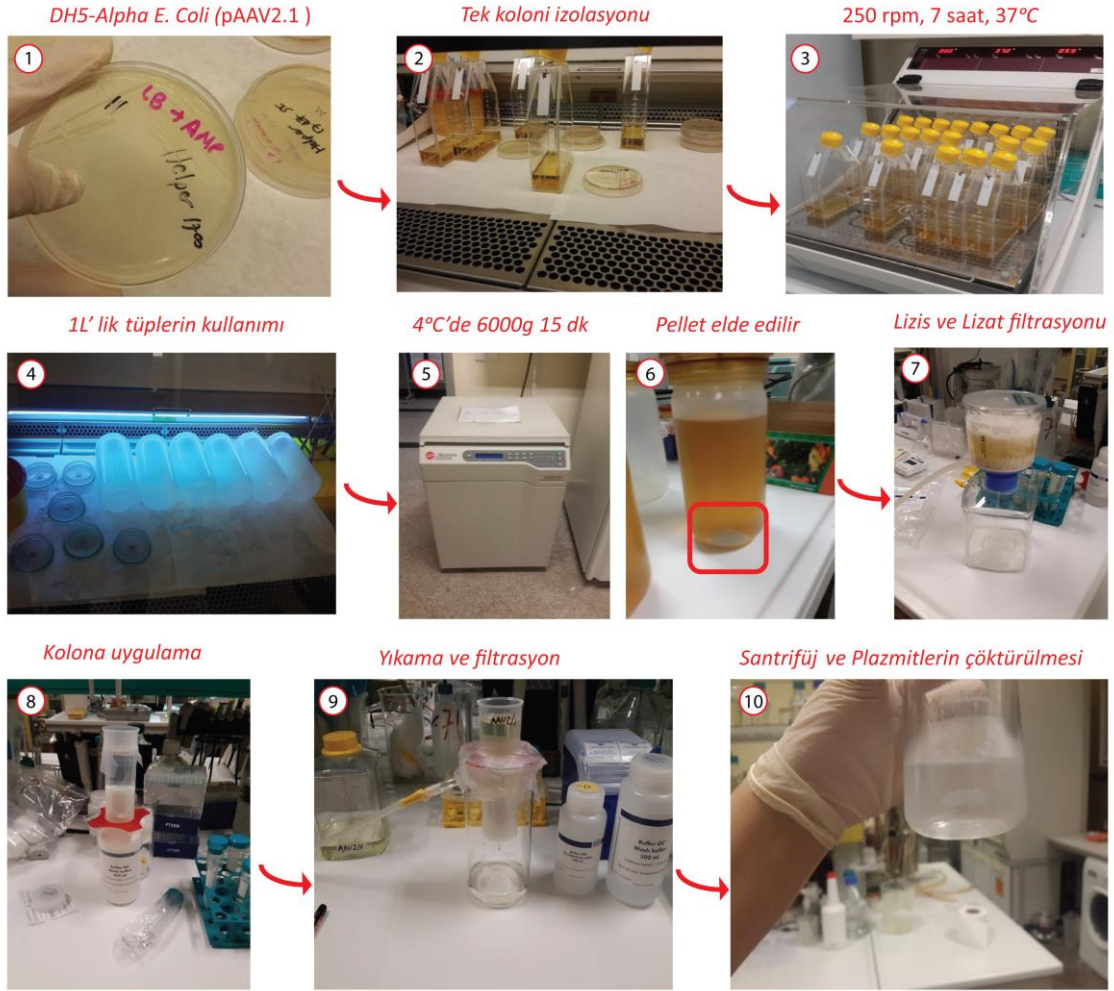


Şekil 3-3: Çizgisel yayma yöntemiyle bakteri ekimi ve tek koloni izolasyonu.

Çalkalamalı inkübatörde 37 °C’de, 250 rpm’ de 7 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitince besiyerinin tamamı 500 ml taze LB Broth sıvı besiyerine aktarıldı ve tekrar çalkalamalı inkübatörde 37 °C’de, 250 rpm’de 16 saat inkübe edildi. Sıvı besiyeri, 4 °C’de 6000 g de 15 dk. santrifüj edilerek bakteri pelleti elde edildi. Süpernatant atıldı ve Endofree Plasmid Kit (Qiagen, 12362) ile bakteri pelletinden plazmit izolasyonu yapıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3-4: Tek koloni izolasyonundan sıvı besiyerine aktarım ve plazmit izolasyonu şematize gösterimi.



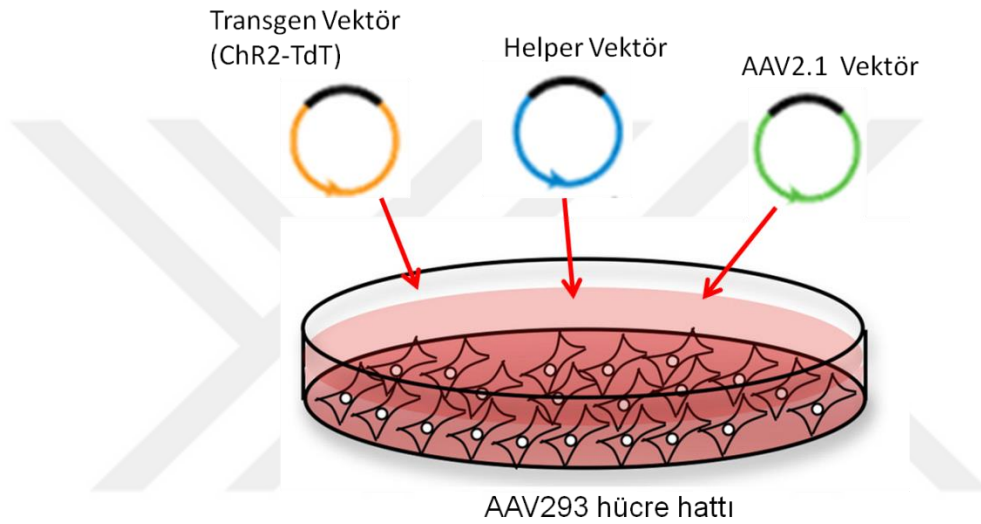
Şekil 3-5: Bakteri ekiminden transgen plazmitlerin çöktürülerek elde edilmesi basamağına kadar olan protokol aşamalarının şematik anlatımı.

3.2.2. AAV293 Hücre hattının virüs üretimi için transfeksiyonu

AAV293 hücreler 1×10^7 hücre/ml konsantrasyonda 150 mm steril petri kaplarına ekildi ve ertesi gün hücre yoğunluğu petri kabının % 70-80'ini kapladı. Bir seferde 10 petri olacak şekilde Tablo 3.5' deki birleşim 15 ml'lik tüpte hazırlandı ve 5-10 sn. karıştırıldıktan sonra 10 dk. oda ısısında inkübe edildi. Hücrelerin üzerine bu karışımdan 1 ml'lik sıvı damla damla eklendi (Şekil 3.6) ve hücreler 72 saat inkübe edildi.

Transfeksiyon Bileşenleri	Miktarı
Transgen Vektör (ChR2-tdT)	255,2 µg
Yardımcı Vektör	505,6 µg
AAV2.1 Vektör (Rep/Cap)	422,9 µg
OptiMEM	10,5 ml
PEI (polyethylenimine)	1775,4 µg (1,5 :1)

Tablo 3-5: Transfeksiyon için kullanılan karışımın bileşenleri ve miktarları.



Şekil 3-6: AAV293 hücre hattının transfeksiyonu için kullanılan vektörler.

Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler kültür besiyeri içinden kazınarak toplandı (150 ml) ve 1100 rpm' de 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatant (üst faz) uzaklaştırıldı. Oluşan çökelti (pellet) 9 ml lizis tampon ile çözüldü (Lizis tamponu (50 ml): 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 47,5 ml H₂O). Dondur-çöz yöntemiyle hücreler patlatıldı. Bunun için kuru buzda donduruldu ve 37 °C su banyosunda çözündürüldü, bu işlemler 3 kez tekrarlandı. Ardından tüpler yaklaşık 3 dk. sonikatöre yerleştirilerek inkübe edildi. MgCl₂ final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde tüplere eklendi ve iyice karıştırıldı. Benzonaz (Sigma E8263-25K) final konsantrasyonu 250 U/ml olacak şekilde eklendi. Vorteks ile iyice karıştırıldı. Tüpler 37 °C'de 20 dk. ara sıra ters-düz ederek inkübe edildi. Parçalanmış hücre parçaları 4000 rpm' de 4 °C'de 20 dk. santrifüj edilerek çöktürüldü.

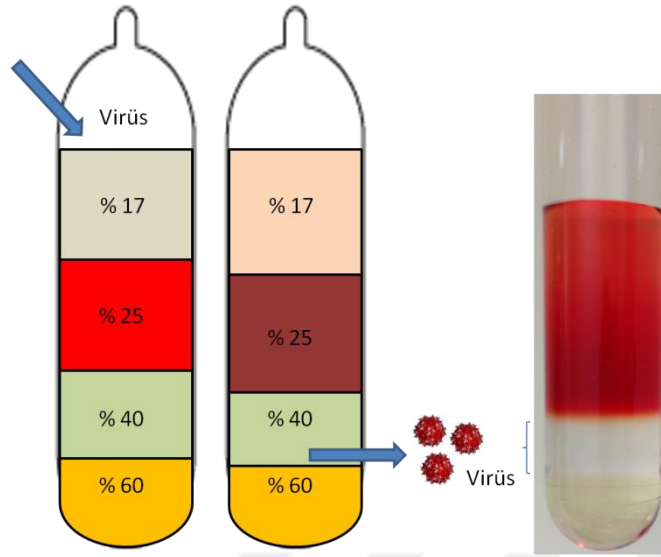
3.2.3. Virüslerin iyodiksanol ile konsantre edilmesi ve saflaştırılması

Süpernatant da kalan virüsler ve hücresel atıkların ayrıştırılması için iyodiksanol (“Optiprep” Sigma D1556-250mL) faz (gradient) oluşturuldu (Zolotukhin ve ark., 1999). Bunun için Tablo 3. 6’daki solüsyonlar hazırlandı.

Çözelti içerikleri	%17	%25	%40	%60
PBS (10X)	5 ml	5 ml	5 ml	-
MgCl ₂ (1 M)	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
KCl (1 M)	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml
NaCl (5 M)	10 ml	-	10 ml	-
Opti-PREP (Iodixanol) (Sigma kat. No: Sigma D1556)	12,5 ml	20 ml	33,3 ml	49,8 ml
Fenol Kırmızısı 0,5% (wt/vol) (Sigma kat. No: P0290)	-	0,1 ml	-	0,025ml
ddH ₂ O	22,325 ml	24,725 ml	1,525 ml	-

Tablo 3-6: İyodiksanol ile farklı faz konsantrasyonlarında (%17, %25, %40, %60) hazırlanan çözelti içerikleri.

OptiSeal tüplerin (Beckman kat. no: 361625) içerisinde konsantrasyona bağlı fazları oluşturmak için sırasıyla % 60’lık solüsyondan 3 ml, % 40’lık solüsyondan 5 ml ve % 25’lik solüsyondan 6 ml, son olarak % 17’lik iyodiksanol solüsyonundan 6 ml konuldu ve tüpler virüs içeren lizat ile dolduruldu (Şekil 3.7). 50 000 rpm’de 90 dk. 18 °C’de santrifüj edildi (Beckman kat no: Ti70 rotor). Santrifüj sonrasında virüs fraksiyonları % 40’lık solüsyonun olduğu yerden 2 mm’lik bir alandan 18 G şırınga iğnesiyle % 25’lik tabakaya değmeden yaklaşık 4 ml toplandı.

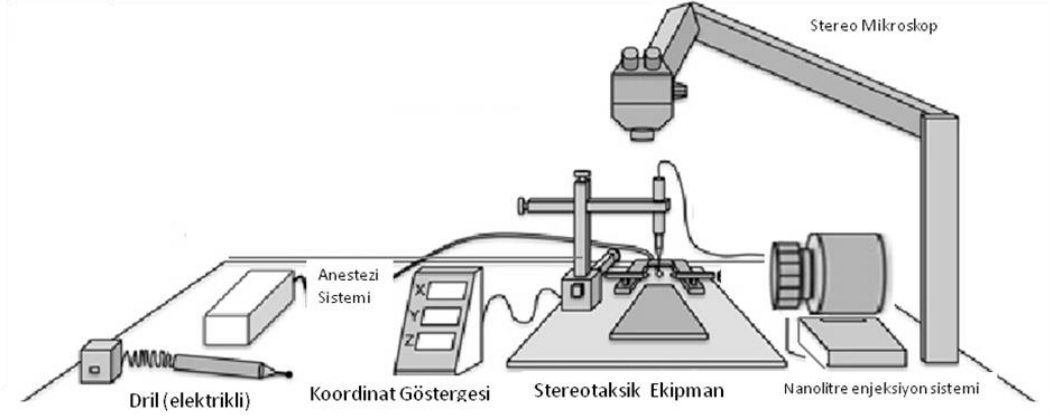


Şekil 3-7: Yoğunluk faz solüsyonlarının ve virüs içeren lizatın OptiSeal tüp içerisinde karıştırılması ve ultra santrifüj sonrası tüpün fazlara göre son görünümü.

Virüs fraksiyonu, 1 X saklama tamponu (100 ml 10X PBS, 50 gr D-sorbitol, 42,4 ml 5 M NaCl, 1L'ye dH₂O ile tamamlanır) içine alındı ve 15 ml'ye tamponla tamamlandı, iyice karıştırıldı ve virüs fraksiyonu önceden ısıtılmış Millipore Amicon 100K columns-UFC910024 içine yüklendi. Bu işlem iyodiksanolü uzaklaştırmak ve virüsü yoğunlaştırmak için yapıldı. Kolon 4 °C'de 30 dk. 3500 rpm' de (Eppendorf kat no: 5810R) santrifüj edildi, altta toplanan fraksiyonlar atıldı ve kolon 1X saklama tamponu ile dolduruldu (15 ml), pipetleme yöntemi ile iyice karıştırıldı. Tekrar santrifüj edildi. Bu şekilde yıkama ve çöktürme işlemi 3 kez tekrarlandı. En son yıkama sonrası tüp içeriği temiz tüpe alındı ve küçük hacimlere bölünerek -80 °C'de saklandı. Virüs üretim işlemleri sonrasında titrasyon 2×10^{12} - 10^{14} genomik kopya/ml olarak belirlendi ve etkinlikleri beyin içi enjeksiyonlarla kontrol edildi.

3.3. Cre rekombinaz Bağımlı AAV virüslerin İntrakraniyal Enjeksiyonu

Kiss1-CreGFP olduğu PZR ile tespit edilen transgenik farelerin hipotalamuslarında Arkuat (ARC) çekirdeğe rAAV-Flex-TdT virüsü bilateral olarak stereotaksik yöntemle enjekte edildi. Virüs enjeksiyonları için 2,5 aylık ve 5,5 aylık fareler kullanıldı, enfeksiyon süresi olarak operasyon sonrası fareler 15 gün bekletildi. Virüs enjeksiyon işlemi sırasında stereotaksik çerçeve (David Kopf instruments, Tujunga, CA, ABD) ve izofluoran gaz anestezisi kullanılmıştır (Şekil 3.8). Fareler, stereotaksi cihazına hafif izofluoran anestezisinde yerleştirildi (Şekil 3.9).

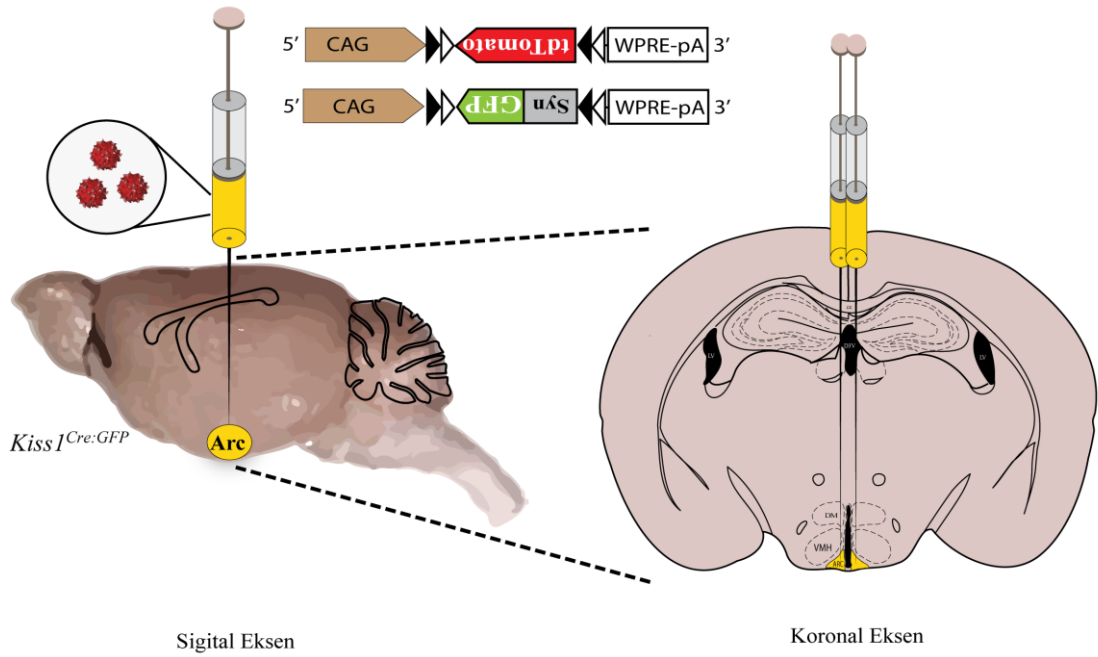


Şekil 3-8: Virüs enjeksiyonu için kullanılan masaüstü düzeneğin şeması.

Sonrasında % 2 izofluoran gaz anestezisi sistemi ile derin anestezide alındı ve operasyon sırasında % 1,25 oranı ile devam edildi. Öncelikle farenin kafası tıraş edildi. İyotlu antiseptik temizleyiciler ile insizyon yapılacak bölge silindi. Farenin parmak kısırtma yanıtları ve göz refleksleri izlenerek anestezinin derinliği kontrol edildi. Spontan hareketleri kaybolan farenin kafatası derisi bisturi ile kesilerek kemik yapıya ulaşıldı. Kemik yüzeyindeki dokular oksijenli su ile ıslatılmış pamuk yardımıyla temizlenerek bregma ve lamda açıkça görünür hale getirildi (Şekil 3.9). Bregma ve lambda arası ölçülerek, fare beyin atlasından (Paxinos G ve ark., 2001) belirlenen referans ARC koordinatları hesaplandı. Kiss1^{Cre:GFP} transgenik fareler için ARC enjeksiyon koordinatları bregmadan 1,55 mm posteriyor (arka), $\pm 0,30$ mm lateral (yan taraf), vertikal (dikey) 5,90 mm (Şekil 3.10) olarak belirlendi. Suya dayanıklı kalemle işaret konulan noktalara dril (cerrahi matkap) ile delik açıldı.



Şekil 3-9: Stereotaksiye yerleştirilen farenin bregma ve lamda süturları (sağda), enjeksiyona hazır virüs çekilen cam pipet solda.



Şekil 3-10: Projeksiyonların belirlenmesi için virus partikülleri intrakranyal olarak enjekte edildi.

Taze çekilen 40-50µm uç çapına sahip cam mikro pipet (Drummond Scientific, Wiretrol, Broomall, PA, ABD) mineral yağ ile dolduruldu ve narishige hidrolik enjeksiyon sistemine bağlandı. Yaklaşık 250-300 nl rAAV-Flex-TdT ve rAAV-Flex-Syn-GFP virüs karışımından (1:1) çekildi (2×10^{12} genomik kopya/ml) ve pipet stereotaksi cihazının tutucusuna yerleştirildi. Tekrar bregma referans alınarak belirlenen koordinatlara gidildi ve intrakranyal beyin enjeksiyonları bilateral gerçekleştirildi. Enjeksiyon hızı bir mikromanipülatör (Narishige, East Meadow, NY, ABD) tarafından 30 nl /dk olarak ayarlandı. Her enjeksiyon sonrası 10dk beklendikten sonra pipet yavaşça çekildi ve insizyon bölgesi 3.0 ipek iplik ile dikildi. Bu bölgeye iyotlu antiseptik çözelti sürüldü ve fare uyanana kadar ısıtıcı tabla üstündeki bireysel kafese alındı. Farelere operasyon sonrası iyileşme ve transgen gen ifadesi süresi olarak 15 gün verildi.

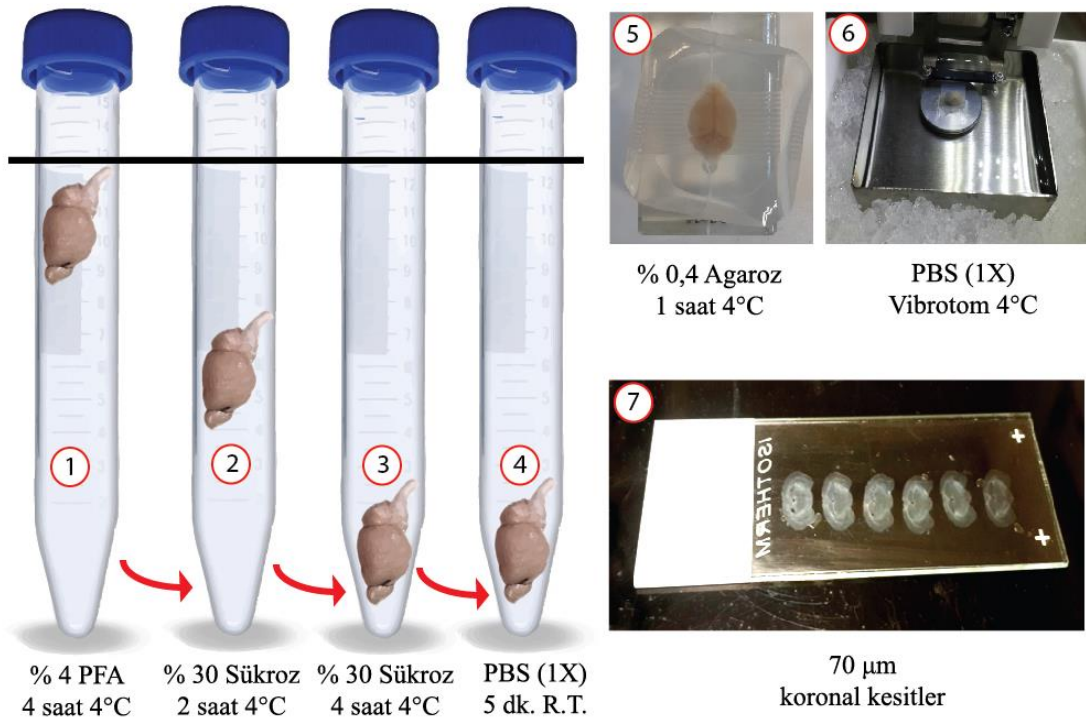
3.4. Kisspeptin nöronlarının aksonal projeksiyonların nöroanatomik incelenmesi

3.4.1. Kardiyak Perfüzyon / Fiksasyon ve Postmortem Beyin Dokusunun Alınması

İzofluoran ile anesteziye alınan hayvanın anestezisi doğrulandıktan sonra, fare ekstremiteler ve kuyruk kısımlarından diseksiyon paneline flaster (içi yapışkan sentetik bant) ile sabitlendi. V kesi ile sternum (göğüs kemiği) kaldırılarak toraks (göğüs boşluğu) açıldı. Kalbin apeksinden kelepçe iğne ile girilerek sol ventriküle dikkatli bir biçimde iğne ucu sabitlendi. Daha sonra sağ atriyum kesik atıldı ve üç yollu kanülden önce 5 dk. süreyle heparinize serum fizyolojik verilerek perfüzyon sağlandı. Sağ atriyumdan akan kanın berraklaştığı görüldüğünde kanülün vanası diğer girişe çevrilerek fosfat tamponu içinde % 4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi verilmek suretiyle 5 dk. süreyle perfüzyon fiksasyonu gerçekleştirildi. Hemen akabinde beyinler bütün olarak çıkartıldı.

3.4.2. Vibrotomda koronal beyin kesitlerinin alınması

Çıkarılan beyinler, beyin sapından bir pens yardımıyla tutularak, hızla % 4 PFA çözeltisine alındı ve 4 saat 4 °C’de inkübe edildi. Metal tartım kaşığı yardımıyla beyin bütünlüğüne hasar vermeden dokular % 30 süktroz-PBS çözeltisine aktarıldı (Şekil 3.11). Beyinler çökene kadar 4 °C’de inkübe edildi.



Şekil 3-11: Postmortem beyin dokusunun fiksasyonu, süktroza doyurulması, agarozda gömülmesi ve vibrotomda koronal kesit alınımını gösteren iş akışı şeması.

Sükroz solüsyonunda tüpün dibine çöken beyinler, 1X PBS ile 5 dk. çalkalayıcı üzerinde yıkandı. % 0,4'lük agaroz jel (Low Melting Point, Sigma: A9414) hazırlandı. Beyinler hazırlanan ve oda ısısına soğutulmuş agaroz jel içerisine gömüldü, kalıp olarak tartım kapları kullanıldı.

Agaroz jelin donması için 4 °C'de 1 saat inkübe edildi. Agaroz gömülü olarak çıkarılan beyinlerin etrafındaki fazla jel kesildi ve vibratomun doku kaseti üzerine yapıştırıldı. Bu şekilde hızlıca 4 °C'de soğutulmuş 1X PBS içine alınarak vibrotomda (Campden Instruments Model: 5100mz) 70 µm koronal (yanay-dikey) kesitler alındı. PBS (1X) içine toplanan kesitler tüm beyinden örneklemeler yapılarak polilizin kaplı lamlara alındı. Flouromount (Sigma katalog no: F4680) kapatma solüsyonu ile kesitler kapatıldı (Şekil 3.11).

3.4.3. Analiz

Endojen floresan işaretlerin (*tdtomato*; kırmızı, *GFP*; yeşil) gen spesifik soma ve akson terminallerinde Cre bağımlı ifadesi prensibine dayanarak projeksiyonların belirlenmesi için konfokal mikroskopta (Carl Zeiss Model: LSM700; yazılım: ZEN 2011, ver 8.0) görüntülendi. Kisspeptin nöronlarının projeksiyon dağılımının analizi için ön beyinden beyin sapına kadar haritalama yapıldı.

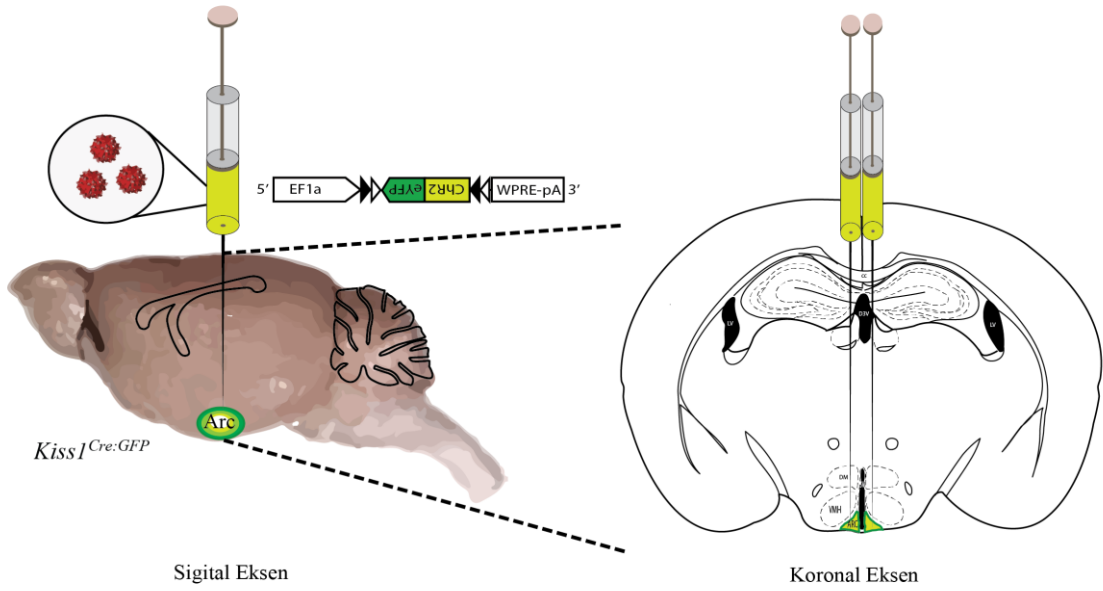
3.5. Kiss1^{Cre} nöronların Elektrofizyolojik etkilerinin araştırılması

Arkuat çekirdekteki kisspeptin nöronlarının projeksiyon devrelerinin analizinde optogenetik ve elektrofizyoloji yöntemleri birlikte kullanıldı. Tüm ex vivo kayıtlar sabah saatlerinde alındı. Viral olarak kanalrodopsin-2 (ChR2) geni transfekte edilen presinaptik kisspeptin nöron aksonlarının fotostimülasyonuna cevaben postsinaptik nöronlardan hücre bağlı yama kenetleme (Cell-attached patch clamp) yöntemi ile sinaptik devrenin elektrofizyolojik özelliklerinin analiz edildi.

3.5.1. Beyin preparatlarının hazırlanması

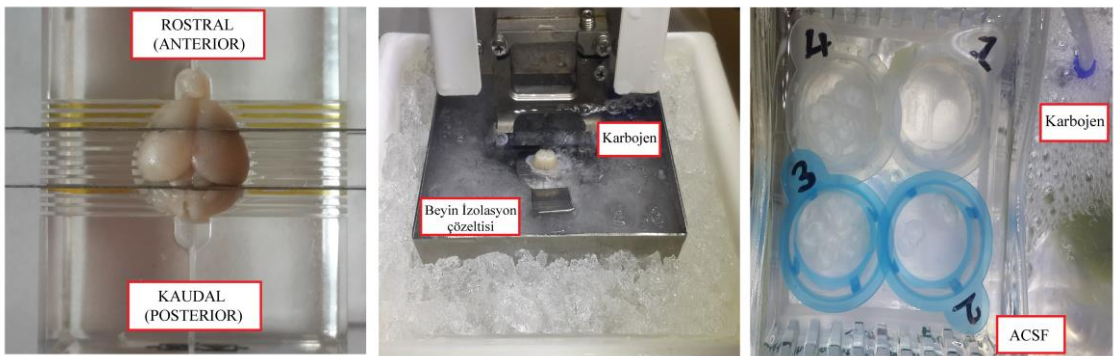
Kiss1^{Cre:GFP} transgenik farelere (2,5 aylık, erkek) virüs enjeksiyonları yukarıda metodolojide tarif edildiği gibi stereotaksi yardımı ile intrakraniyal yapıldı. Kısaca, hazırlanan rAAV-EF1a-doublefloxed-hChR2(H134R)-EYFP (rAAV-ChR2-EYFP) virüsü intrakraniyal olarak arkuat çekirdeğe bilateral enjekte edildi (Şekil 3.12).

Virüsün kisspeptin nöron spesifik enfeksiyonu ve kanalrodopsin gen transfeksiyonu için 15 gün iyileşme/enfeksiyon süresi beklendi.



Şekil 3-12: Optogenetik çalışmalar için rAAV-ChR2-EYFP virus partikülleri intra-arkuat olarak enjekte edildi.

Elektrofizyolojik deney koşullarını optimize etmek için farelerden her seferinde sabah 10-11 saatleri arasında taze beyin dokusu alındı ve her kayıt gününde 1 tane transgenik fare ile çalışıldı. İzofluoran inhalasyon gaz anestezisi altında; Tablo 3.7’da içeriği belirtilen % 95 oksijen % 5 karbondioksit ile gazlanmış, soğutulmuş *beyin izolasyon çözeltisi* (X. Zhangvan den Pol, 2016) ile intrakardiyak perfüzyon yapıldı ve fareler hızla dekapite edildi. Beyin dokusu en fazla 1 dk. içinde çıkarılarak soğutulmuş beyin izolasyon çözeltisine alındı ve vibrotomda bu solüsyonla koronal 250 µ kalınlığında taze beyin dilimleri elde edildi (Şekil 3.13).



Şekil 3-13: Taze beyin dokusunun izolasyonu, vibrotoma yerleştirilmesi ve koronal preparatların karbojenle gazlanan ACSF çözeltisinde inkübasyonu

Dokular 30 dk. 32-34°C kimyasal içeriği Tablo 3.8’de belirtildiği gibi hazırlanan ve karbojen (% 95 oksijen % 5 karbondioksit) ile gazlanan yapay beyin omurilik sıvısı (ACSF) içerisinde inkübe edildi.

Kimyasal Bileşenler	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Final Konsantrasyonu (mM)
Sükroz	342,3	220
KCl	74,55	2,5
NaHCO ₃	84,01	26
NaH ₂ PO ₄	119,98	1,23
CaCl ₂	110,98	1
MgCl ₂	203,31	6
Glukoz	180,16	10

Tablo 3-7: Beyin izolasyon çözeltisinin kimyasal içeriği.

Kesitler, oda ısısında olan ACSF solüsyonu ile 60 dk. bekletildi. Elektrofizyolojik kayıt için oda ısısında sürekli karbojenle gazlanan ACSF solüsyonu, doku haznesine deney boyunca akış hızı 2-4 ml/dk. olacak şekilde sürekli perfüze edildi.

Beyin dokularına 4X ve 60X objektiflerle bakılarak enfeksiyon bölgesi belirlendi. YFP (Sarı floresan protein) ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş hücreler belirlendi.

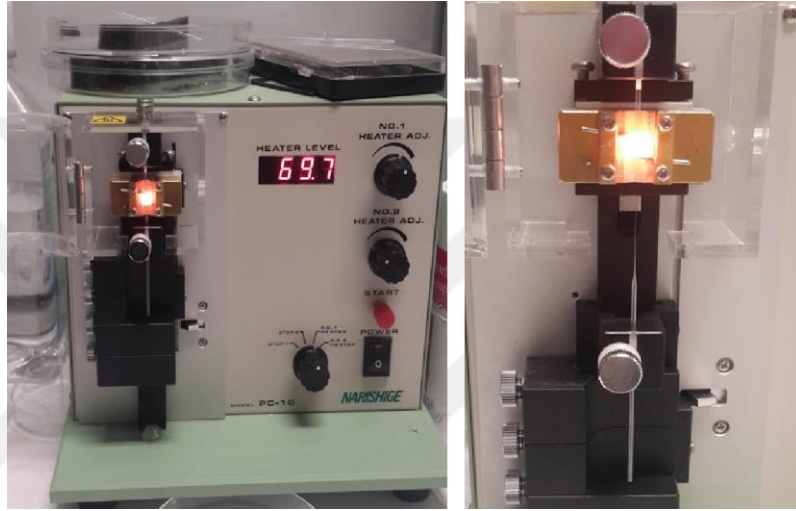
Kimyasal Bileşenler	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Final Konsantrasyonu (mM)
NaCl	58,44	124
KCl	74,55	2,5
NaHCO ₃	84,01	26
NaH ₂ PO ₄	119,98	1,23
CaCl ₂	110,98	2
MgCl ₂	203,31	2
Glukoz	180,16	10

Tablo 3-8: ACSF için kullanılan kimyasal bileşenler ve konsantrasyonları.

Elektrofizyoloji kayıtları sırasında taze beyin kesitleri, sinaptik bağlantıların ve devrelerin korunduğu preparatlar olduğu için tercih edildi.

3.5.2. Elektrodların hazırlanması

İnce cidarlı, dış çapı 1,5 mm iç çapı 1,1 mm, borosilikat kapiller cam pipetler (Narishige marka GD-1.5) kayıtlar için kullanıldı. Vertikal pipet çekici (Narishige, model no: PC-10) kullanılarak elektrofizyolojik kayıt alabilecek pipetler hazırlandı (Şekil 3.14). Pipet uçlarının uzunluk ve açıklıkları, ekstrasellüler solüsyon ile doldurulduklarında elektriksel dirençleri (8-10 M Ω) olacak şekilde optimize edildi. Maksimum kanal aktivitesi için ve yüksek akım amplitüdleri (genlik) için pipetler 150 mM NaCl ekstrasellüler solüsyon (Perkins, 2006) ile dolduruldu.



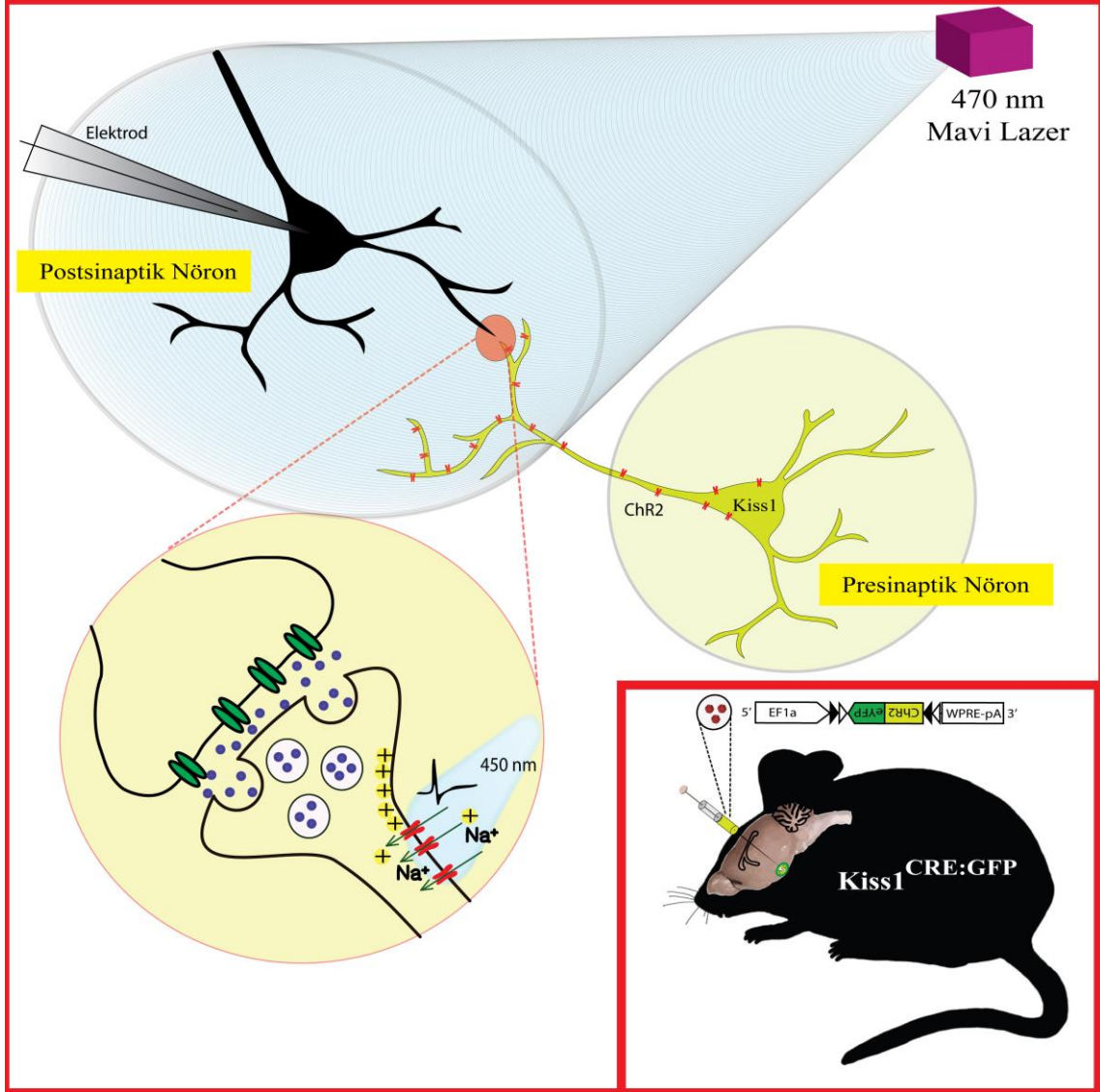
Şekil 3-14: Vertikal pipet çekiciye cam pipetlerin yerleştirilmesi ve elektrodların hazırlanması.

3.5.3. Cell-attached Patch-clamp Kayıt

Kanalrodopsin-2 üreten Kiss1^{Cre:EGFP} nöronları intrakranyal virüs enjeksiyonu sonrasında sarı fluoresan protein (YFP) işaretli olduğundan mikroskop yardımıyla enfekte olan hücreler ayırt edilebilmektedir.

Enjeksiyon bölgesini içeren koronal beyin kesitleri kontrol edilerek viral enfeksiyonun yayılımı kontrol edildi. Uygulanan yöntemle göre virüsün enfekte ettiği hücrelerden sadece Kiss1^{Cre} olan nöronlarda ChR2 ve YFP üretileceğinden kisspeptinerjik sisteme özelleşmiş bir işaretleme kullanıldı.

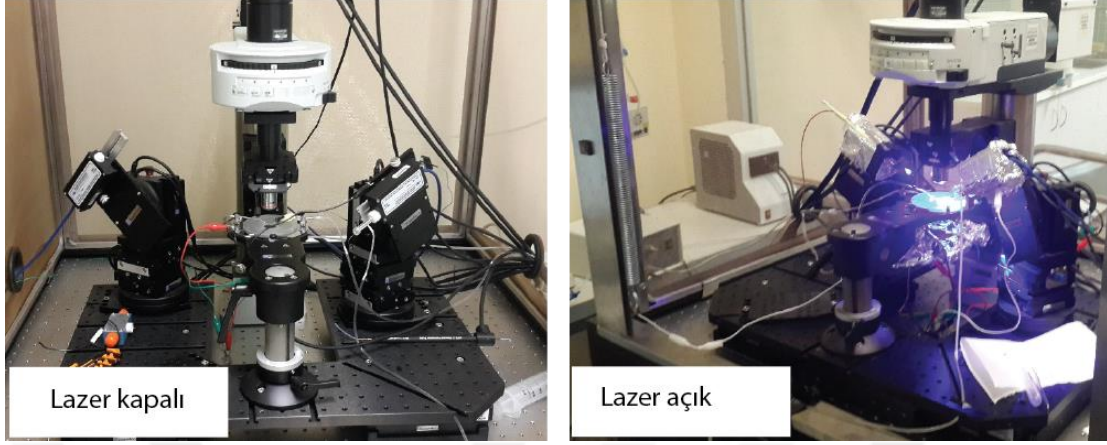
YFP pozitif hücelere ait aksonlar 470 nm dalga boyunda ve çeşitli frekans/sürelerde uyarılarak stimüle edildi, presinaptik nöronun aksonu boyunca yayılan ChR2'nin lazerle aktivasyonu sonucu sodyumun hücre içine girmesiyle membran depolarizasyonu gerçekleşti ve postsinaptik olduğu deneysel olarak gösterilmiş nöronlardan kayıtlar alındı, yapılan deneysel işlem şekil 3.15'da şematize edilmiştir.



Şekil 3-15: Fluoresan işaretli kanalrodopsin geni ifade eden arkuat Kiss1 nöronlarının sinaps yaptığı düşünülen beyin bölgelerindeki nöronlardan kayıt alınarak sinaptik bağlantıların control edilmesini anlatan illüstrasyon.

Cre-bağımlı rAAV-ChR2-EYFP virüs ile enfekte olmamış (YFP negatif) projeksiyon bölgelerindeki postsinaptik nöronlar epifloresan mikroskop (Zeiss) yardımıyla 4X ve 40X büyütmelemlerde belirlendi, bu hücrelerden, hazırlanan pipetler (8-10 MΩ dirençli) seçilerek kayıtlar alındı. Pipetlere pozitif basınç verilerek ACSF içerisindeki beyin kesitine yaklaştırıldı. Kayıt alınacak bölge 4X büyütmede belirlendikten sonra sistemin mikro manipülatör kollarıyla hassas bir şekilde kayıt alınacak YFP negatif hücreye yanaşıldı. Hücre membranına kenetlendikten sonra referans olacak spontan ateşleme değerleri kaydedildi, sonra lazerle aksonlar uyarılarak hücre yama kısılacı metodu ile kayıt alınmaya devam edildi. Elektrofizyolojik kayıtlar

için patch clamp amplifier (axon) ve Clampex 10.4 yazılımı kullanıldı ve sonuçlar Clampfit ile analiz edildi.



Şekil 3-16: Optogenetik aktivasyon için üretilen lazer ünitesi ve Faraday kafesi ile çevrelenen elektrofizyoloji kayıt cihazı.

Enfekte olan nöronların optogenetik stimülasyonları için Yeditepe Üniversitesi Beyin Araştırmaları laboratuvarlarında üretilen ve bilgisayarla kontrol edilebilen 470 nm mavi lazer ışık kaynağı kullanıldı (Şekil 3.16). 10 ms süreyle ve 10, 20, 30 Hz frekanslarda stimülasyon sağlanarak ChR2 sentezleyen Kiss1-CreGFP hücrelerinin aksonal projeksiyon bölgelerinden floresan işaretlenmeyen hücrelerden “cell attached” yöntemiyle elektrofizyolojik değişiklikler kaydedildi.

3.5.4. İstatistiksel Analiz

Alınan kayıtlardan 0-10 sn 10-20 sn 20-30 sn 30-40 sn 40-50 sn arasındaki nöronal ateşleme frekansları Clampex 10.4 yazılımı kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasındaki fark SPSS programı ile değerlendirildi. One-way ANOVA testi , Tukey post hoc testi ile değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi. %95 güven aralığında yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Kisspeptin nöronlarının projeksiyonlarının belirlenmesi

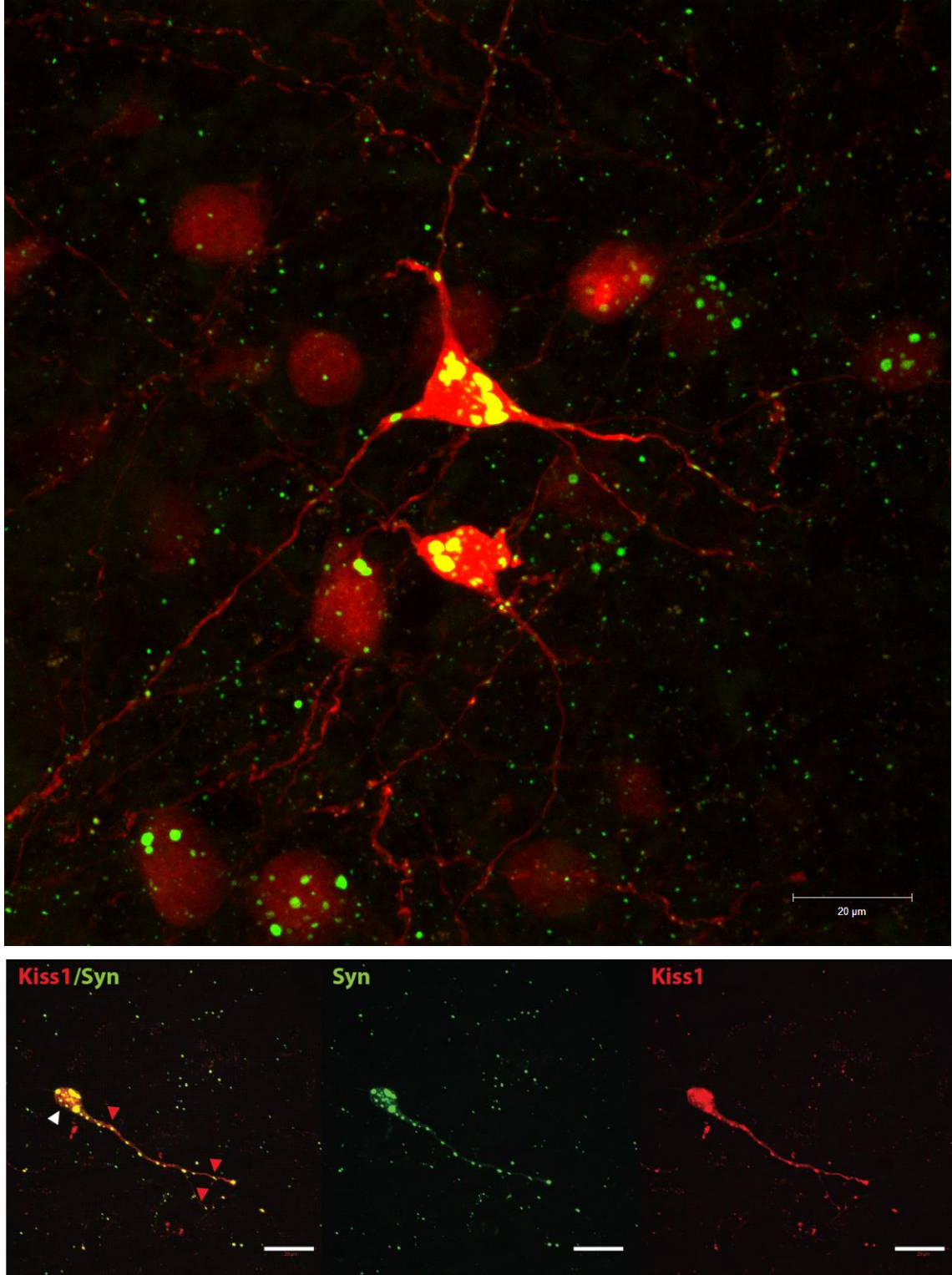
İşaretleme stratejisine göre Kiss1 nöron gövdeleri, proksimal dendritleri ve aksonal uzantıları cre bağımlı olarak kırmızı (*tdTomato*) floresan işaretini endojen olarak ifade etmekteyken, aynı stratejiden yararlanarak akson boyunca (anterograd olarak) presinaptik sinaptofizinle (Syn; *sinaptik vezikül proteini*) beraber ifade olunan yeşil (*GFP*) floresan proteini ifade etmektedir (Şekil 4.1).

Yetişkin *Kiss1^{CRE:EGFP}* transgenik dişi ve erkek farelerde, viral vektörlerle enfekte edilerek endojen floresan işaretlenen kisspeptin nöronlarının aksonal projeksiyonları anteriordan posterior doğru haritalanmıştır.

Hipotalamik arkuat çekirdekteki Kiss1 nöronları hedeflenerek yapılan enjeksiyonlarda (intra-arkuat) tüm gruplarda arkuat çekirdekte yoğun hücre popülasyonları tespit edildi, enfeksiyon bölgesi bilateral ve unilateral olarak değerlendirildi. Virüs titrasyonu ve enjeksiyon volümüne bağlı olarak farklı beyin bölgelerindeki Kiss1 nöronları da enfekte oldu ancak bu nöronların projeksiyonları göz ardı edildi.

Kisspeptin nöronları viral enjeksiyonlarla işaretlenirken arkuata özgül olmayan hücre popülasyonlarıyla karşılaştı, özellikle korteks, ventromedial nükleus (vmh) ve hipokampüste; bulunduğu beyin lokasyonlarına göre farklı morfolojilerde ve büyüklükte Kiss1 perikaryaları olduğu gözlemlendi, özellikler hücre yoğunluğu bakımından arkuat nöronlarının somaları daha yuvarlak şekilli ve aksonal uzantıları oldukça yoğun, ventrikül yakınlarındaki Kiss1 nöronları yassı ve ventriküle paralel uzanıyorlardı.

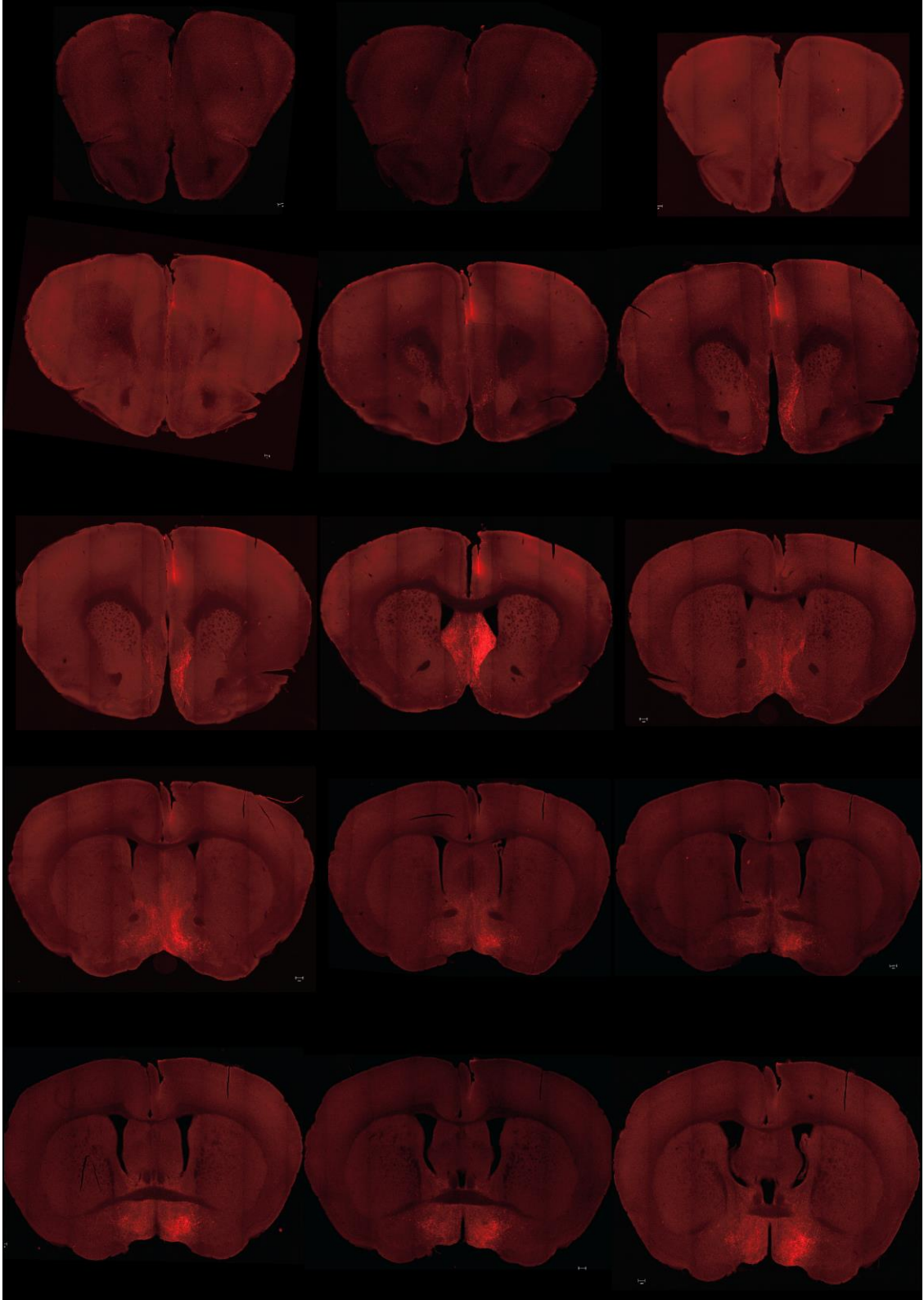
Olgularda ARC *Kiss1* nöronlarının, TdT ve SYN+GFP endojen gen ifadesi gözlemlendi. Kisspeptin ifade eden hipotalamik/ arkuat nükleus veya AVPV dışında kaçırılan enjeksiyonlar ya da yabancı tip farelere enjekte edilen virüsler Cre rekombinaz yokluğunda çalışmadığından negatif kontrol görevi gördü. TdT-pozitif nöronlar (kırmızı) kisspeptin popülasyonunu gösterdiğinden koronal beyin kesitlerinde enjeksiyonun bilateral ya da unilateral olduğu göz önünde bulundurularak enjeksiyon bölgesi arkuat veya AVPV olan olgular belirlendi. Ark^{Kiss1} ve AVPV^{Kiss1} için TdT ve GFP ifadesinin nöroanatomik dağılımı, enjeksiyonu başarılı olguda analiz edildi.



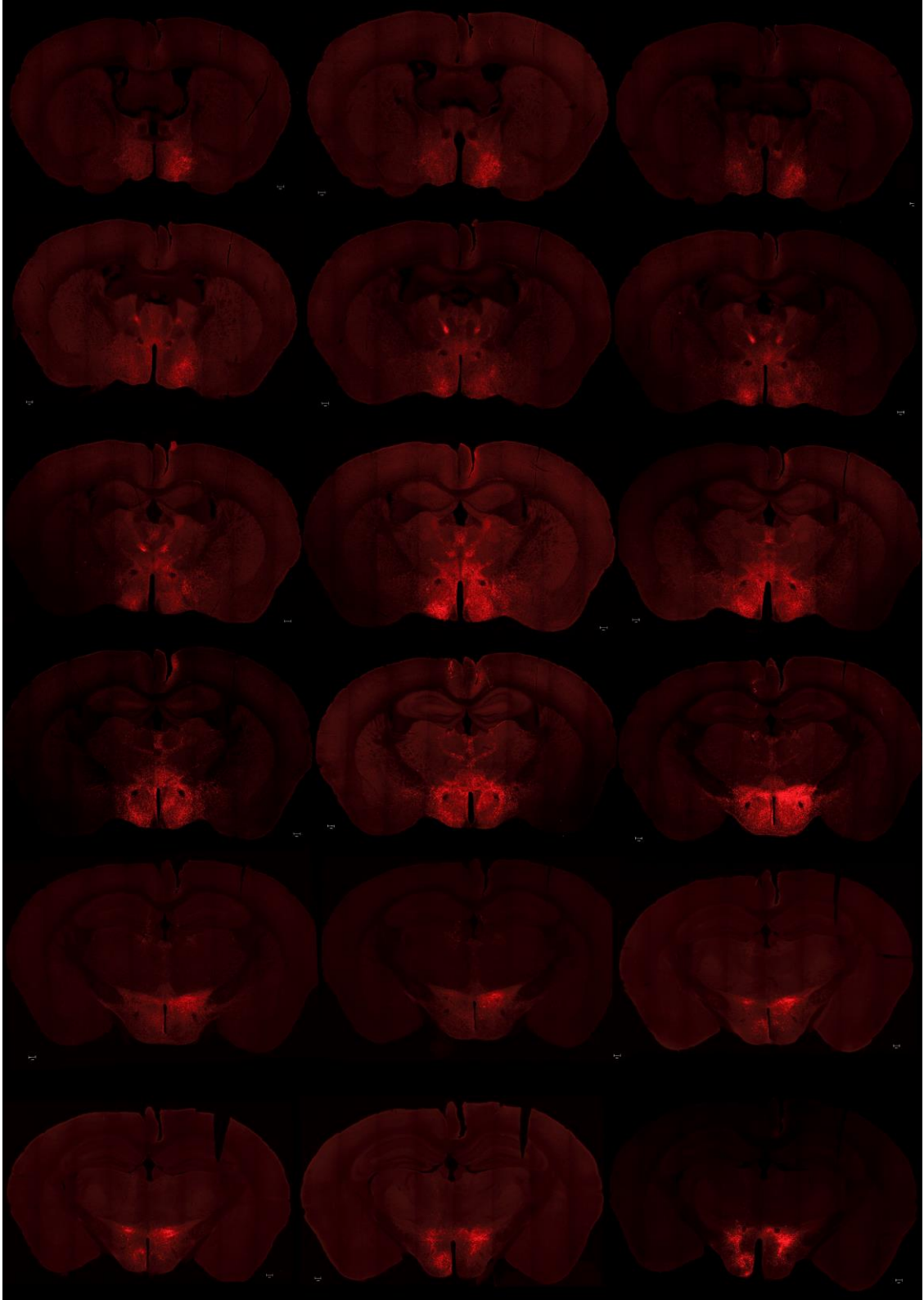
Şekil 4-1: Kiss1^{CRE} nöronlarına özgü seçici rAAV-Sinaptofizin-GFP gen ifadesiyle presinaptik terminallerin floresan işaretlenmesi, konfokal mikroskop görüntüsü. Kırmızı (tdT) floresan Kiss1 pozitif nöronları, yeşil (GFP) floresan Syn (Sinaptofizin) proteinini göstermektedir. Mikrofotoğrafta beyaz üçgen nöron gövdesini (soma), kırmızı üçgen aksonal uzantıları göstermektedir (bar 20 μm).

Başlangıçta yoğun virüs titrasyonuna bağlı olarak ön göremediğimiz geniş enfeksiyon alanı oluştu (Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4). Ancak kullanılan yöntem genetik olarak Kiss1 nöronlarına seçici olduğundan elde edilen tablo literatürde bilinenin dışında çok farklı bölgelerde de Kiss1 nöronlarının ve liflerinin varlığı gösterilmiş oldu. Anteriorden posteriore doğru yoğun lifler ve somaların varlığı bu peptidin bu bölgelerdeki önemini arttırmaktadır.

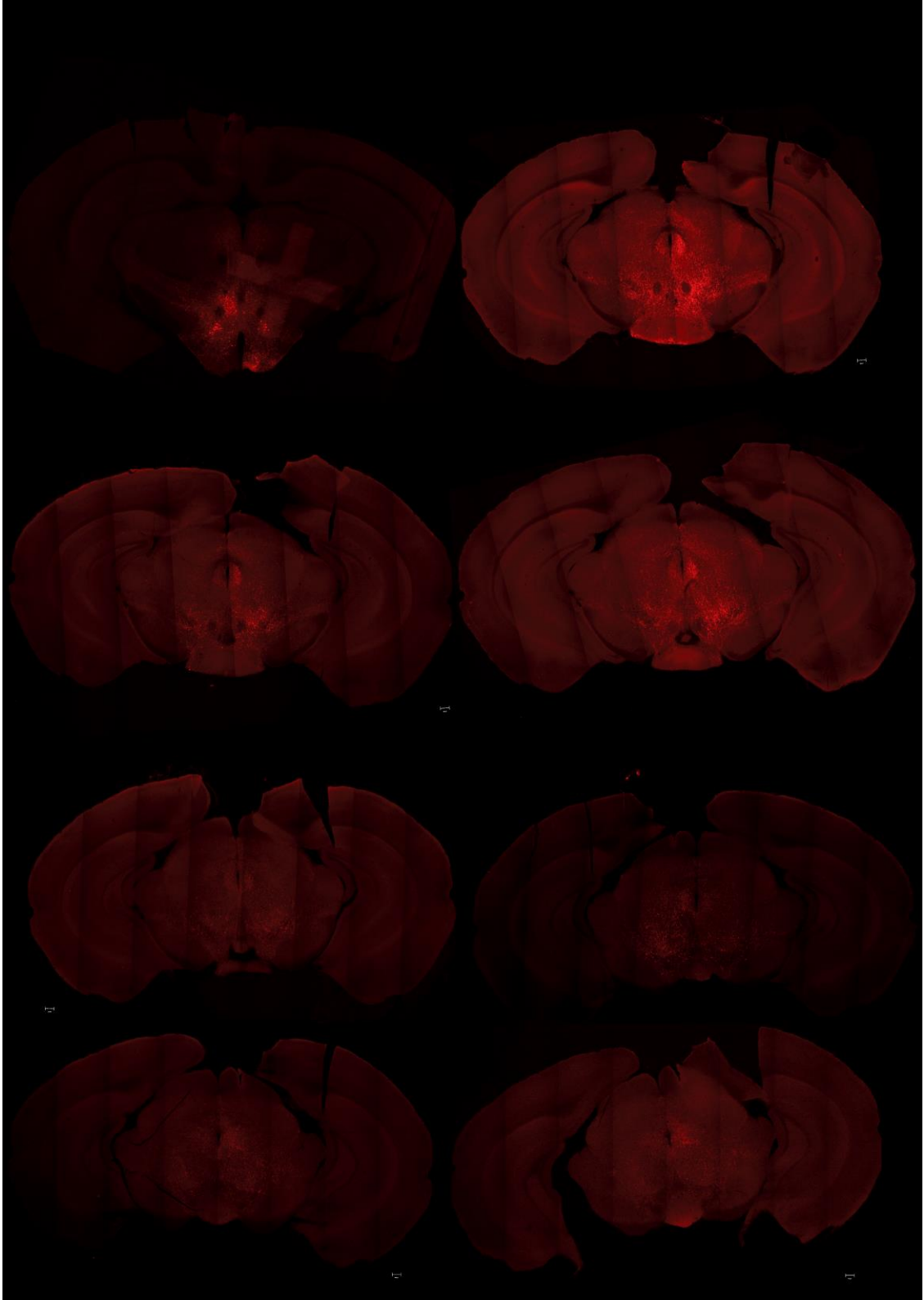
Yoğun titrasyon sonucu daha önce literatürde belirtilmeyen bölgelerde kiss1 nöron popülasyonları tanımlandı. Bunlar retrosplenial granüler (RSG) korteks (Şekil 4.5), hipokampal piramidal yol (py) (Şekil 4.6), zona inserta (ZI) (Şekil 4.7). Ayrıca hücre sayısı bakımından oldukça az olduğu idda edilen bölgelerde kiss1 nöron popülasyonları belirlendi (Şekil 4.8)



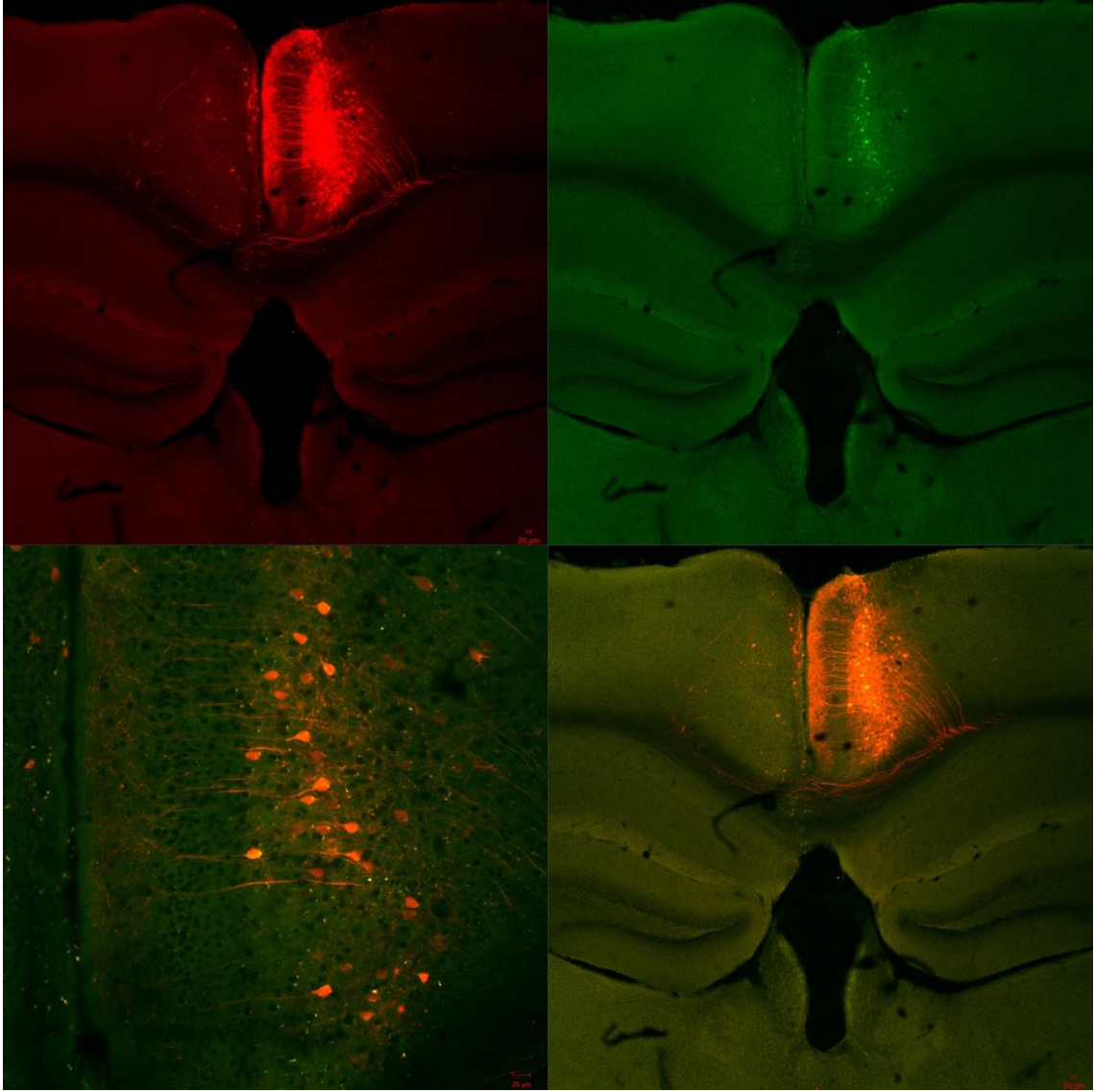
Şekil 4-2: Yoğun titrasyonda virüs enjeksiyonu sonrası tdTom ile işaretlenen kiss1 soma ve fiberlerin beyin bölgelerine dağılımı. (Konfokal görüntüleri Adobe Illustrator CS6 ile birleştirildi)



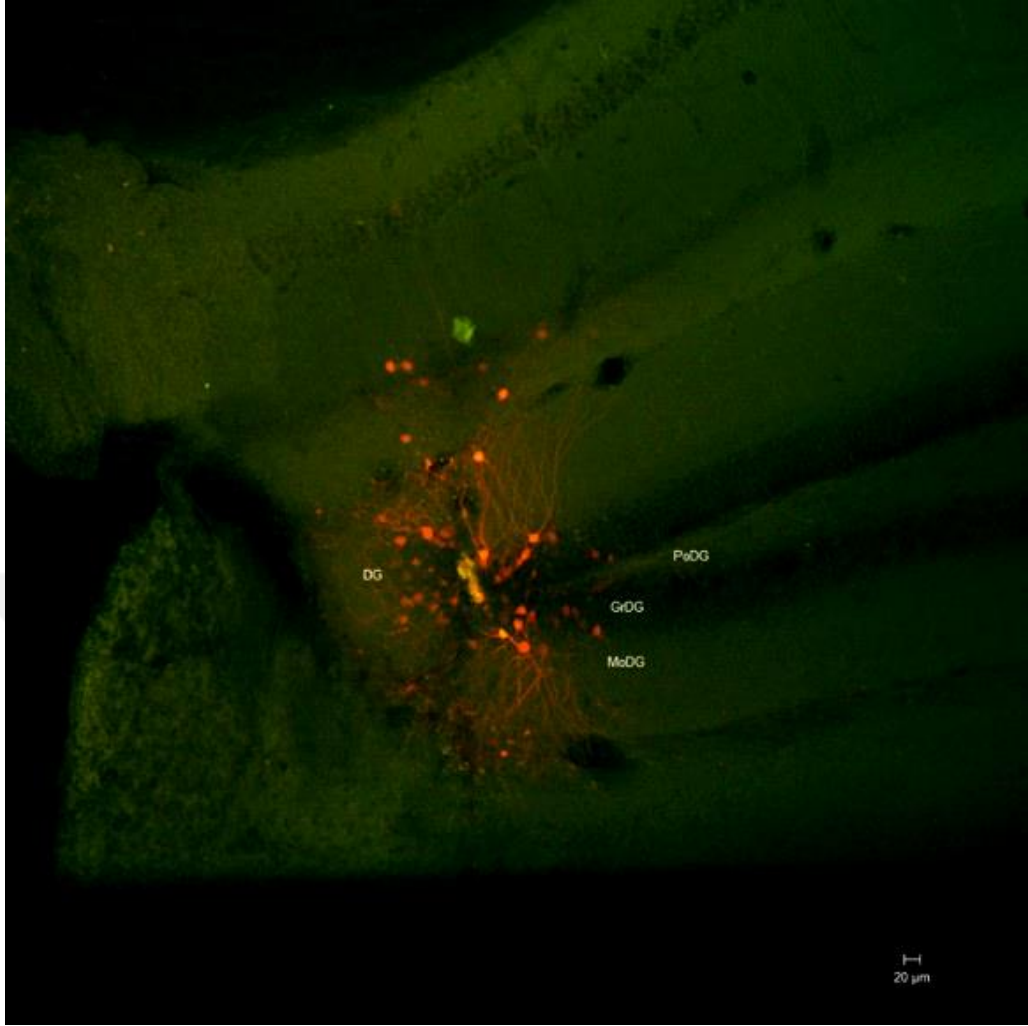
Şekil 4-3: Yoğun titrasyonda virüs enjeksiyonu sonrası tdTom ile işaretlenen kiss1 soma ve fiberlerin beyin bölgelerine dağılımı (devamı) (Konfokal görüntüleri Adobe Illustrator CS6 ile birleştirildi).



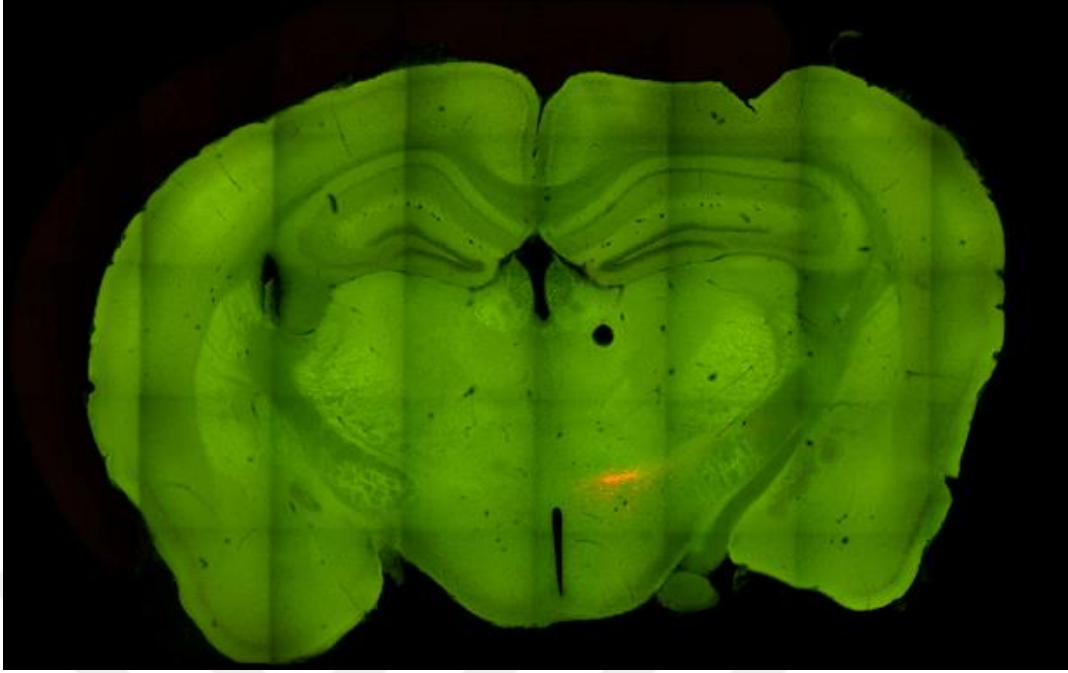
Şekil 4-4: Yoğun titrasyonda virüs enjeksiyonu sonrası tdTom ile işaretlenen kiss1 soma ve fiberlerin beyin bölgelerine dağılımı (devamı) (Konfokal görüntüleri Adobe Illustrator CS6 ile birleştirildi).



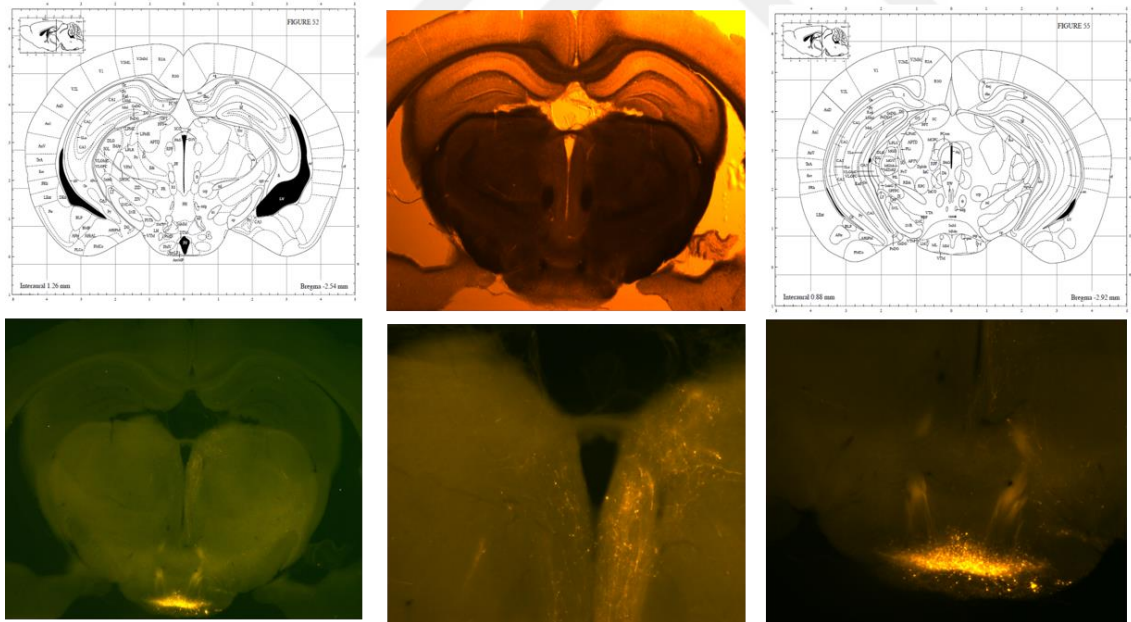
Şekil 4-5: Retrosplenial granüler (RSG) korteks $Kiss1^{Cre:EGFP}$ nöronları ve korpus collosum (CC)'a uzanan aksonal uzantıları. Kiss1 (kırmızı) ve sinaptofizin (yeşil) ifadeleri konfokal mikroskopta görüntülenmiştir (Bar 20µm).



Şekil 4-6: Hipokampal Kiss1^{Cre:EGFP} nöronları ve dentat girus'a uzanan aksonal uzantıları (Bar 20μm).



Şekil 4-7: Zona inserta bölgesinde bulunan Kiss1^{Cre:EGFP} nöronları (Bar 20µm).

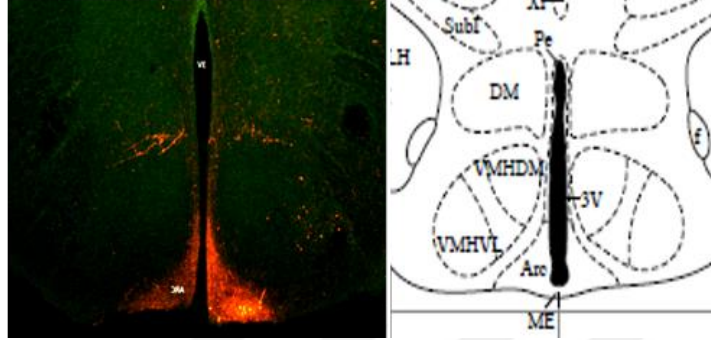


Şekil 4-8: Mammillar çekirdekte bulunan Kiss1^{Cre:EGFP} nöronları ve aksonal uzantıları.

4.1.1. Arkuat Kisspeptin Nöronları

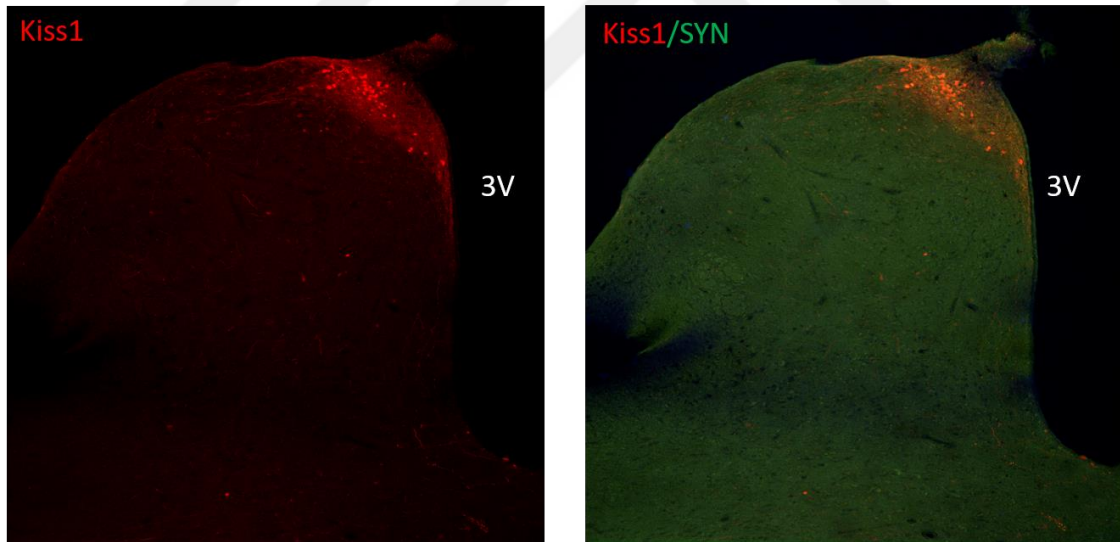
Arkuat kisspeptin nöronları bilateral olarak işaretlendi ve projeksiyon datası bilateral ve unilateral enjeksiyon durumlarına göre değerlendirildi.

Arkuat Çekirdek

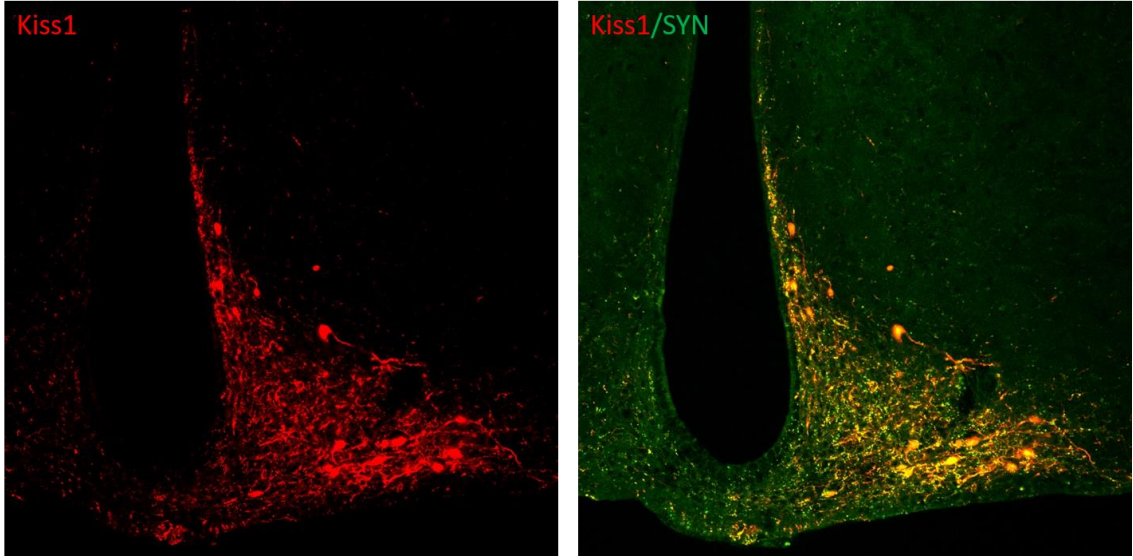


Şekil 4-9: Bilateral olarak vurulan arkuat çekirdek ve hipotalamik alanların konumları (hipotalamik konumlar için Paxinos G ve ark., 2001'den değiştirilmiştir).

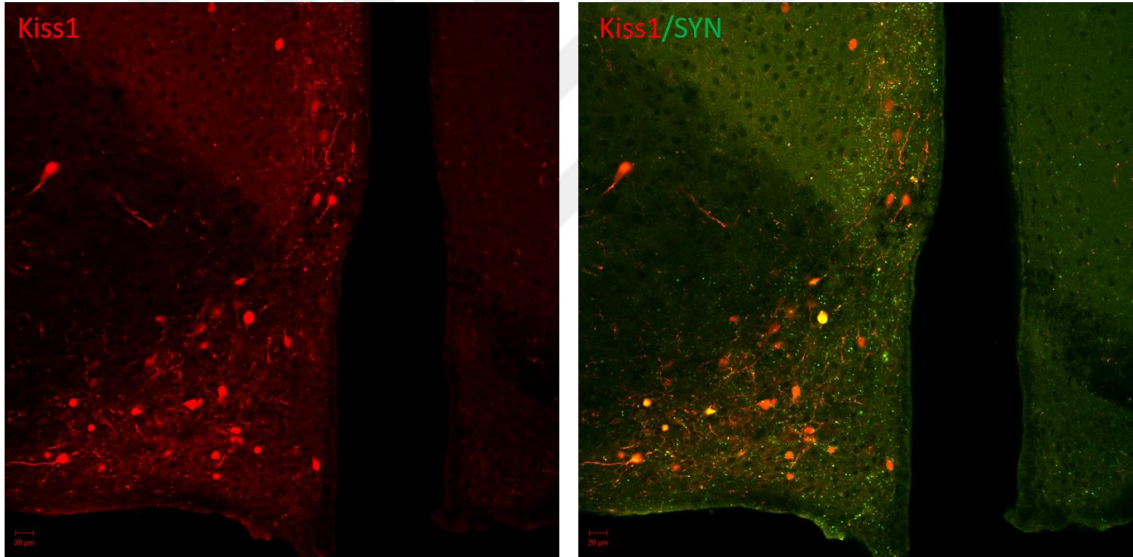
Düşük titrasyonda verilen AAV-tdTom ve AAV-Syn enfeksiyonları sonrası arkuat çekirdekle sınırlı Kiss1 nöronları işaretlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4-10: Dişi transgenik farelerde Arkuat kiss1 nöronları AAV virüs kullanılarak işaretlendi. (Konfokal mikroskop, 10X büyütme).



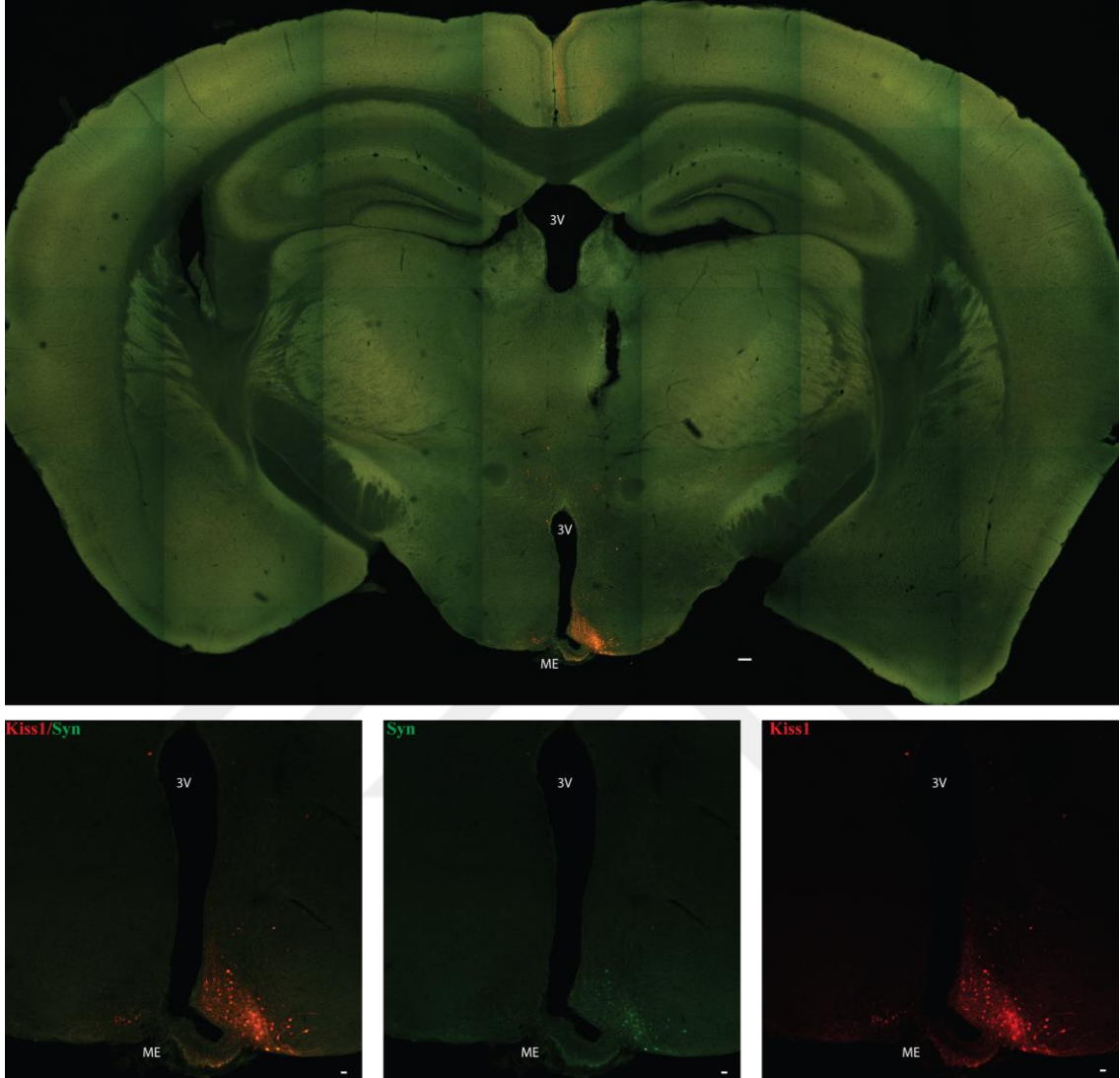
Şekil 4-11: Dişi transgenik farelerde Arkuat kiss1 nöronları AAV virüs kullanılarak işaretlendi. (Konfokal mikroskop, 20X büyütme).



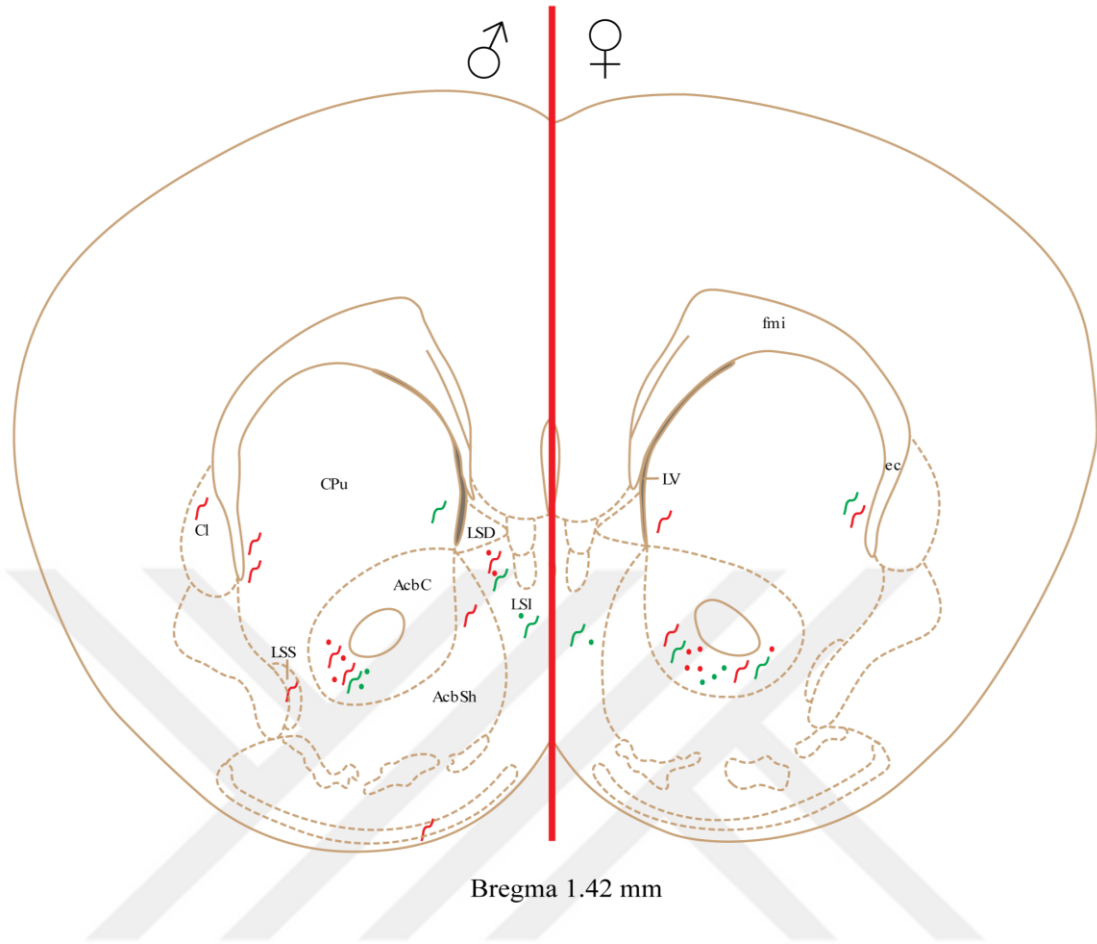
Şekil 4-12: Erkek transgenik farelerde Arkuat kiss1 nöronları AAV virüs kullanılarak işaretlendi (20X büyütme).

Somaları arkuat çekirdekte olan Kiss1 nöronlarına ait aksonal iplikçikler için kıyaslama yapıldığında 3-6 aylık erkek farelerde ön beyinde genç erkekte nukleus akumbens (AcbC), kaudal putamen (striatum) (CPu), lateral septal nükleusun rostrali (LSr), medial septal nükleus (MS) bölgelerinde nadir rastlanırken, yaşlı erkekte bu bölgelerde nispeten fazla görülmektedir, bununla beraber sinaptofizin her iki grupta stria terminalisin yatak çekirdeği (BST) bölgesinde gözlemlendi. Dişilerde ön beyinde nükleus akumbensin kor bölgesinde (AcbC), kaudal putamen (striatum) (CPu), lateral

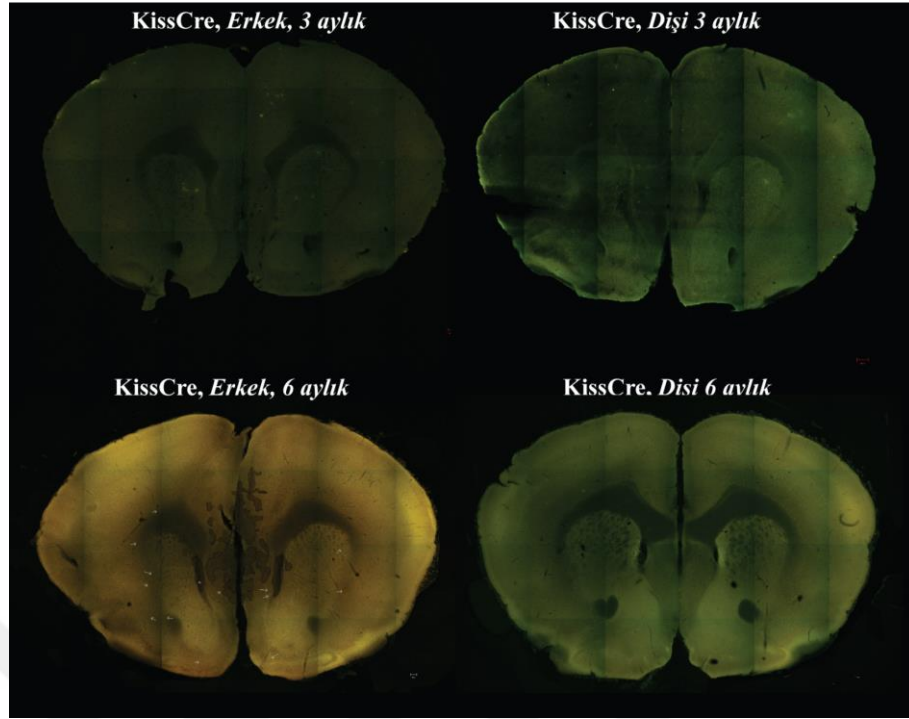
septal nükleusun ventral (LSV) ve rostralinde (LSr) aksonal uzantılar gözlemlendi. Yapılan çalışmada 3 ve 6 aylık transgenik fareler arasında anatomik farklılıklar görülmedi.



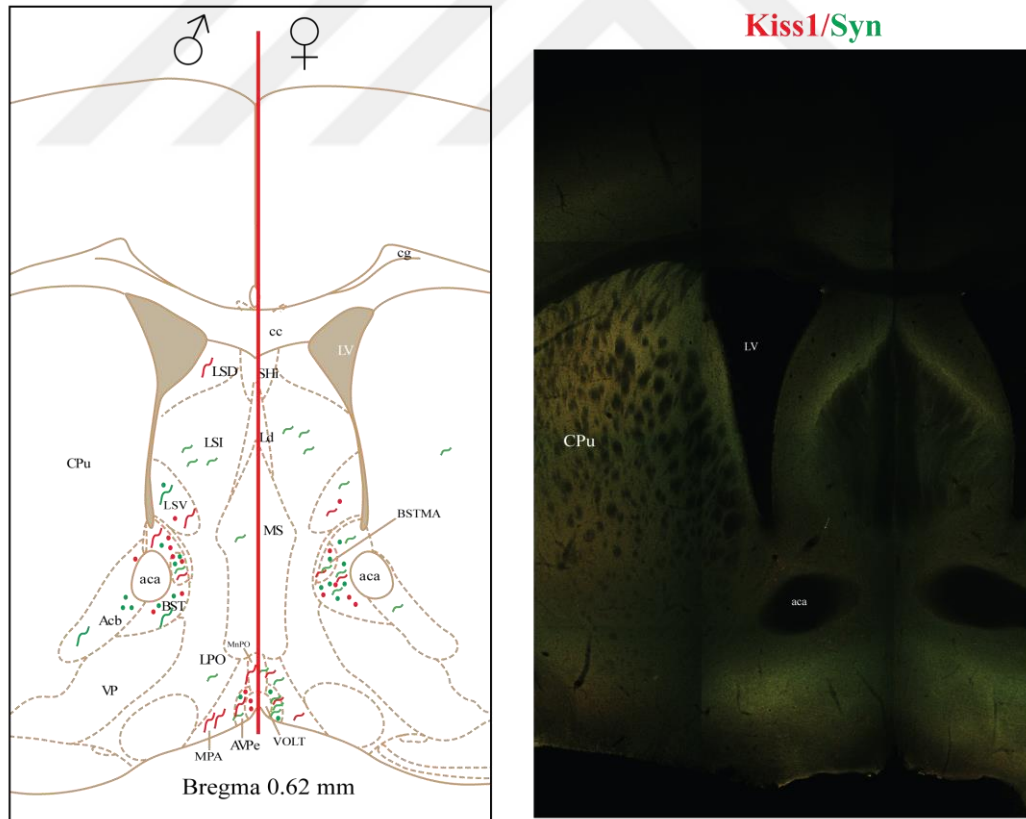
Şekil 4-13: Enjeksiyon bölgesinde bilateral Arkuat *Kiss1* nöronları TdT pozitif hücreler.



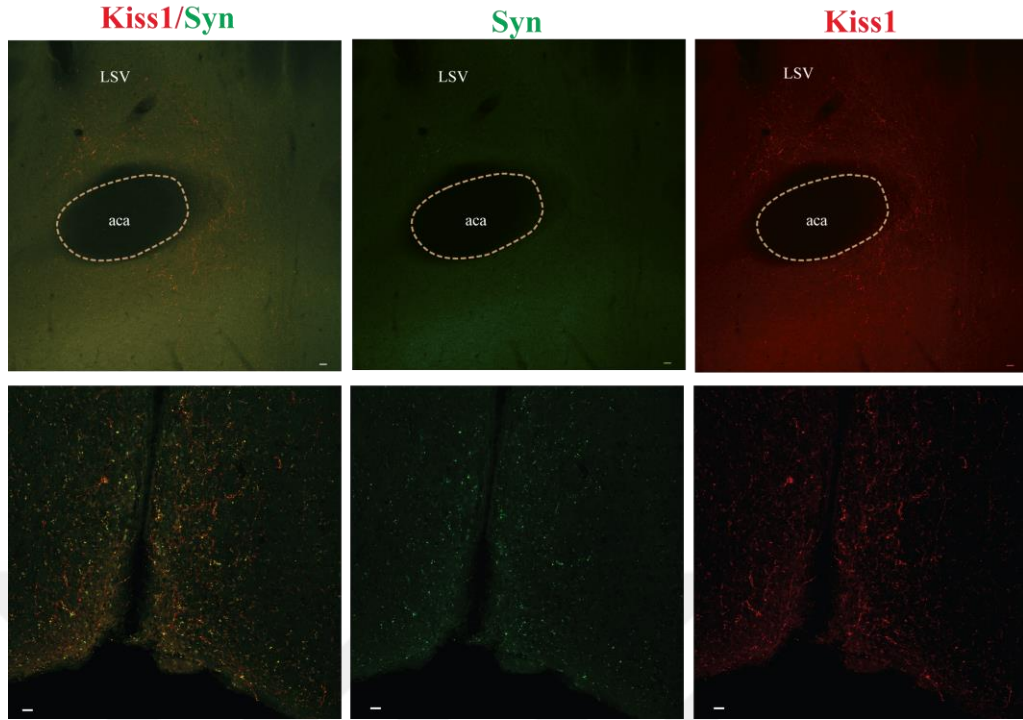
Şekil 4-14: Arkuat kiss1 nöronlarına ait ön beyin bölgesinde aksonal lifler ve presinaptik terminallerin dağılımı. Dişiler için atlasın sağ tarafı, erkekler için sol tarafı kullanılmıştır. 3 aylık fareler için yeşil nokta, 6 aylık fareler için kırmızı nokta sinaptofizin için, çizgiler lifler için kullanılmıştır.



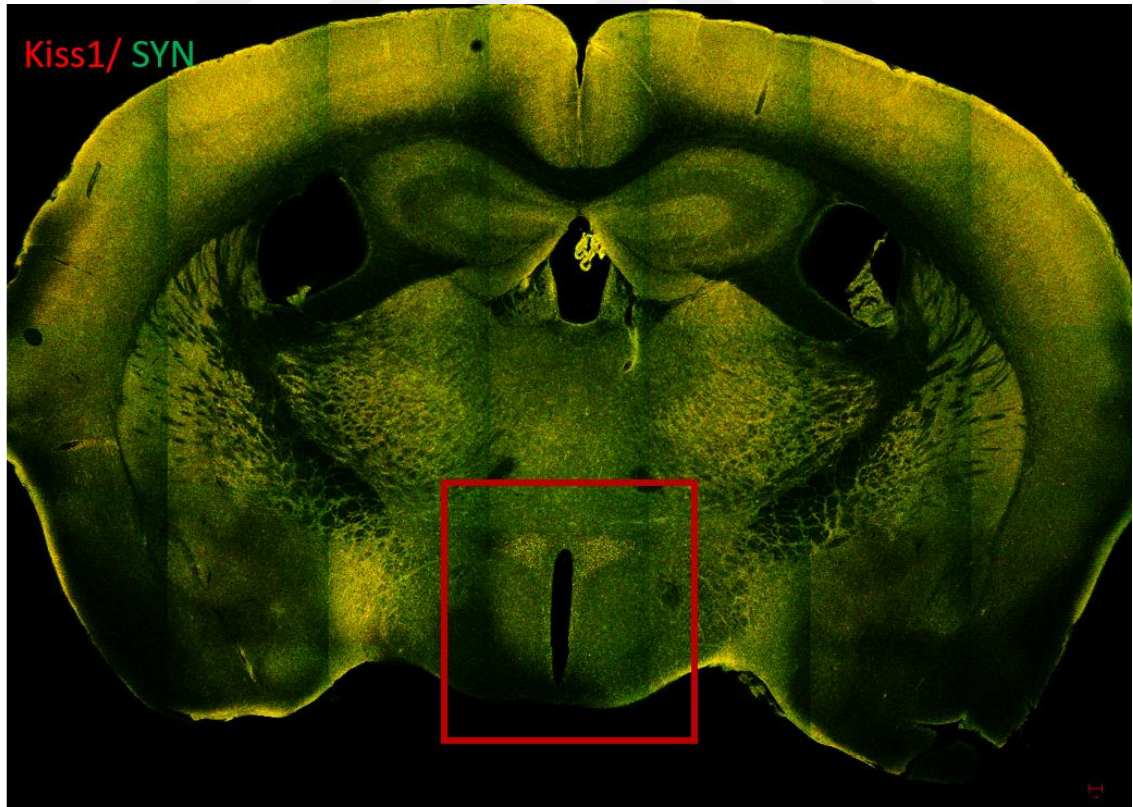
Şekil 4-15: Analiz edilen koronal ön beyin kesit görüntüleri (5X büyütme).



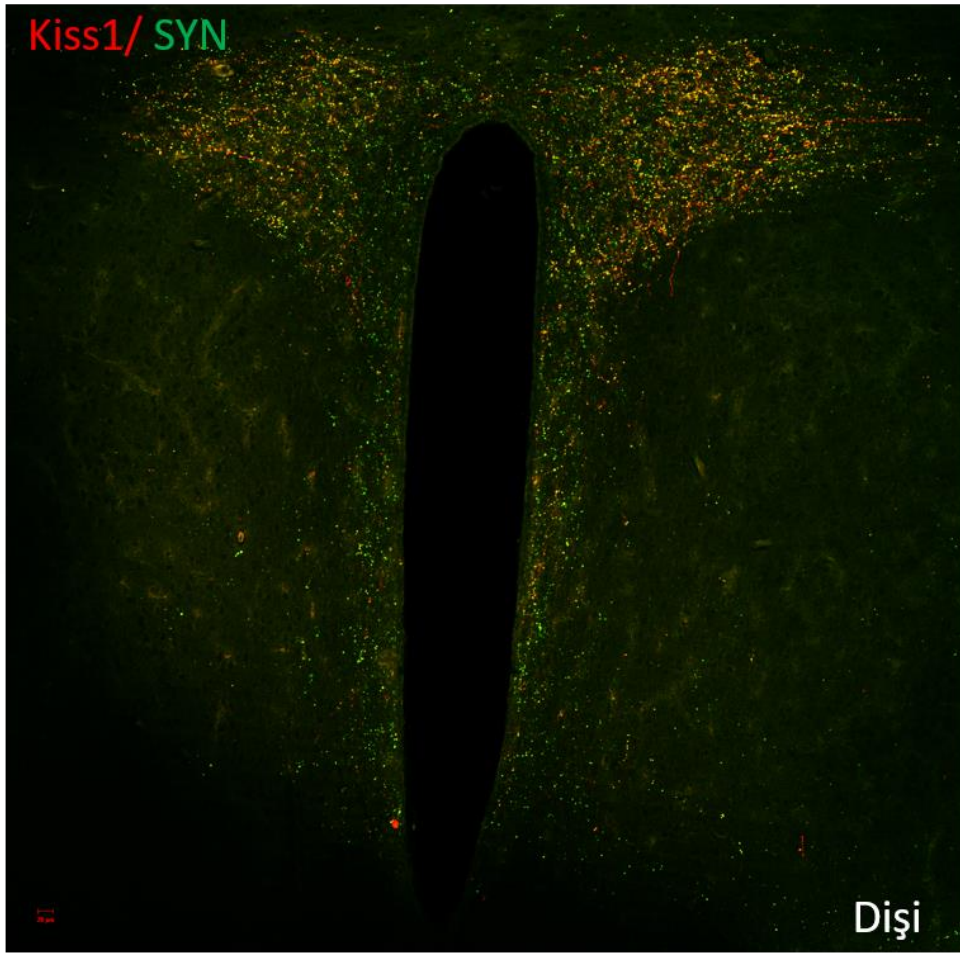
Şekil 4-16: Arkuat kiss1 nöronlarına ait ön beyinde striatum bölgesinde aksonal lifler ve presinaptik terminallerin dağılımı. Dişiler için atlasın sağ tarafı, erkekler için sol tarafı kullanılmıştır. 3 aylık fareler için yeşil nokta, 6 aylık fareler için kırmızı nokta sinaptofizin için, çizgiler lifler için kullanılmıştır.



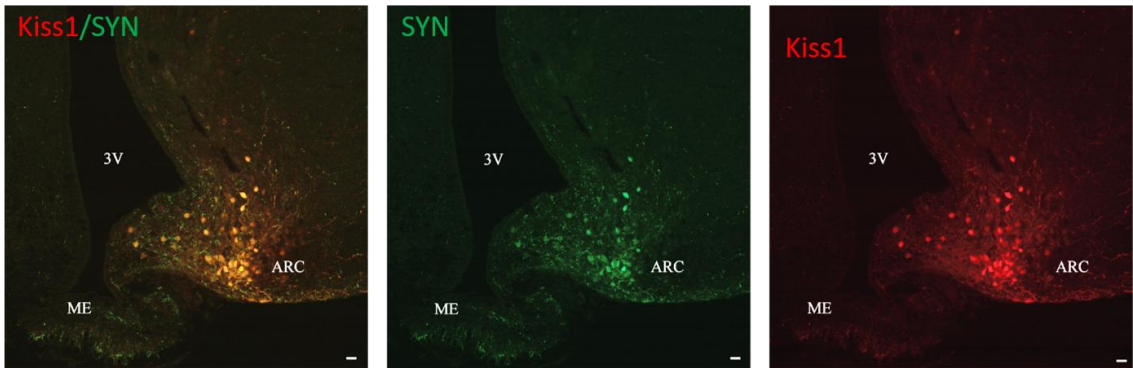
Şekil 4-17: Anterior komisürün etrafındaki ön beyin bölgeleri ve AVPV'deki aksonlar ve sinaptofizin (10X, bar).



Şekil 4-18: PVN bölgesinde yoğun fiber ve sinaptofizin işaretlenmesi görüldü (5X büyütme).



Şekil 4-19: PVN bölgesi için yoğun kiss1 fiberleri ve sinaptofizin fluoresan ifadesi (10X büyütme).



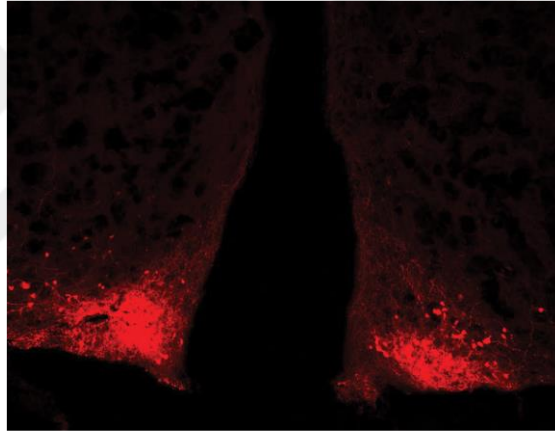
Şekil 4-20: Arkuat Kiss1 nöronlarının ME (medianeminens) bölgesine projeksiyonu (20X).

Arkuat *kiss1* nöronlarının lateral hipotalamus (LH), premamillar çekirdeğin ventrali (PMV), ventral tegmental alan (VTA) ve mamillar çekirdeğe, periventriküler hipotalamik çekirdek (Pe), lateral (LPO) ve medial (MPO) preoptik alana, az da olsa retrokiazmatik (RCh) ve suprakiazmatik (SCh) çekirdeklere uzanan lifleri gösterilmiştir.

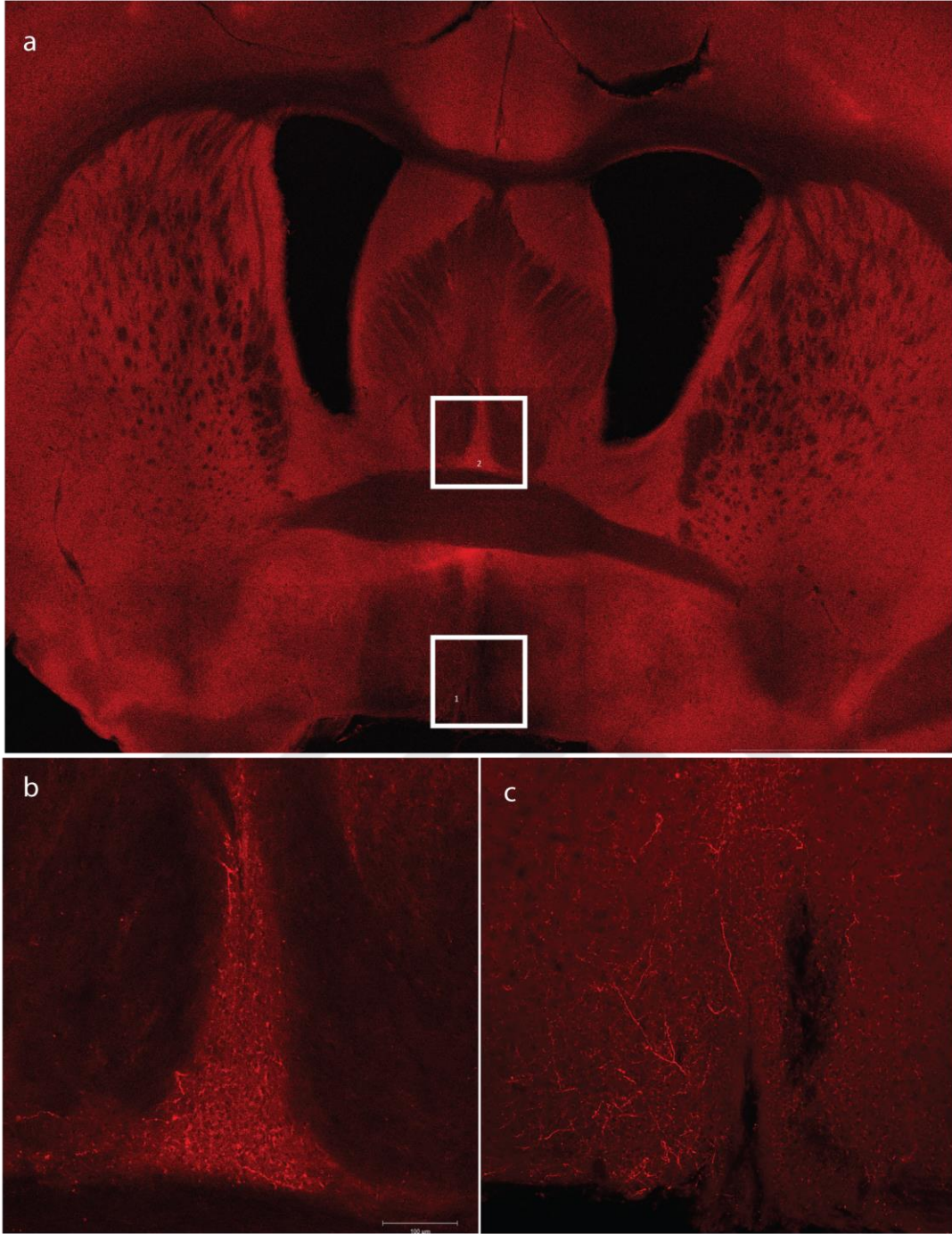
AVPV bölgesine yoğun projeksiyonlar gönderdiği hem lif yoğunluğu hem de işaretli sinaptofizin varlığı ile birlikte ikili kontrol sağlanarak dişi ve erkeklerde ilk kez gösterilmiştir.

4.1.2. AVPV Kisspeptin Nöronları

AVPV enjeksiyonu sonrası *Kiss1* nöronlarının projeksiyonları incelendiğinde enfeksiyon alanının AVPV ve Pe bölgelerini kapsayan bir alana yayılmış olduğu gösterildi. Buradaki somalardan yayılan liflerin lateral septum (LS)'a projeksiyon yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca periventriküler alanda (Pe) lifler ve ARC bölgesinde presinaptik sonlanmalar görülmüştür. AVPV *kiss1* nöronlarının arkuat çekirdeğe, median preoptik nükleus (MnPO), preoptik alan (POA), medial septum (MS) ve Broca'nın diagonal bandı (DBB) bölgelerine uzanan lifleri bulunmuştur.



Şekil 4-21: Kiss1 AVPV nöronları için enjeksiyon yeri (20X büyütme).



Şekil 4-22: AVPV kiss1 nöronlarının TdT pozitif lif dağılımı a) 10X büyütme ile genel görüntü b) MnPO'daki yoğun lif görüntüsü 20X büyütme c) Pe ve MPOA'daki yoğun lif görüntüsü 20X büyütme.

Oldukça yaygın soma ve fiber dağılımı gösteren kiss1 nöronları için tüm gruplarda ortak projeksiyon bölgeleri belirlendi (Tablo 4.1) ve bu bölgelerden elektrofizyolojik kayıtlar alınarak olası bağlantılar gösterilmeye çalışıldı.

Bölgeler	E1	E2	E3	E4	Ortalama	SD	D1	D2	D3	D4	Ortalama	SD	
Isokorteks	0,014	0,000000	0,00140	0,001100	0,005133	0,007711	0,00190	0,000000	0,001500	0,00000	0,002343	0,002697	
OLF	0,0035	0,000100	0,00020	0,000500	0,001267	0,001935	0,00070	0,000100	0,000900	0,00630	0,000713	0,000643	
Hipokampus	0,0088	0,000100	0,00070	0,000400	0,003200	0,004859	0,00190	0,000000	0,000300	0,00430	0,001432	0,001765	
Cortical Subplate	0,0123	0,000000	0,00230	0,000200	0,004867	0,006539	0,00070	0,000300	0,000200	0,00850	0,001888	0,002504	
Sitriatum	Lsv	0,0054	0,010400	0,00040	0,001300	0,005400	0,005	0,00190	0,000500	0,006300	0,00010	0,003900	0,003506
	LSc	0,0104	0,000000	0,00020	0,000000	0,003533	0,005948	0,00070	0,000000	0,000100	0,00120	0,001310	0,002225
	LSr	0,0036	0,000100	0,00140	0,010100	0,001700	0,001769	0,00140	0,000600	0,000100	0,00000	0,002146	0,003284
	Gpe	0,0012	0,000100	0,00100	0,002100	0,000767	0,000586	0,00170	0,000300	0,000000	0,00000	0,000819	0,000753
Pallidum	GPI	0	0,000000	0,00040	0,000000	0,000133	0,000231	0,00050	0,000012	0,000000	0,00000	0,000160	0,000199
	SI	0,0048	0,000100	0,00160	0,000100	0,002167	0,002401	0,00010	0,000400	0,000300	0,00100	0,000896	0,000991
	MA	0,0208	0,000300	0,00010	0,000000	0,007067	0,011894	0,00120	0,000100	0,000000	0,00000	0,002583	0,004466
	BST	0,0074	0,003300	0,00000	0,007500	0,003567	0,003707	0,00250	0,024700	0,020900	0,01640	0,008272	0,009253
Talamus	0	0,000200	0,00030	0,000600	0,000167	0,000153	0,00010	0,000500	0,002300	0,00000	0,000540	0,000733	
Hipotalamus	PVH	0,0012	0,041800	0,00120	0,001900	0,014733	0,02344	0,00033	0,124500	0,007200	0,00300	0,026888	0,041897
	ARH	0,0338	0,220700	0,04780	0,029300	0,100767	0,104101	0,02350	0,488900	0,047800	0,03110	0,132858	0,157431
	AVPV	0,0034	0,025400	0,00120	0,001200	0,010000	0,013382	0,00010	0,065800	0,005200	0,00250	0,015285	0,022087
	MPO	0,0004	0,011600	0,01032	0,001700	0,007440	0,00613	0,00020	0,044000	0,006600	0,00200	0,010999	0,013881
	ME	0,0052	0,069900	0,00000	0,003300	0,025033	0,038943	0,01150	0,000830	0,004700	0,00070	0,019276	0,024561
Midbrain	PAG	0,0113	0,000400	0,00010	0,000100	0,003933	0,006381	0,00180	0,000800	0,000300	0,00010	0,001727	0,002283

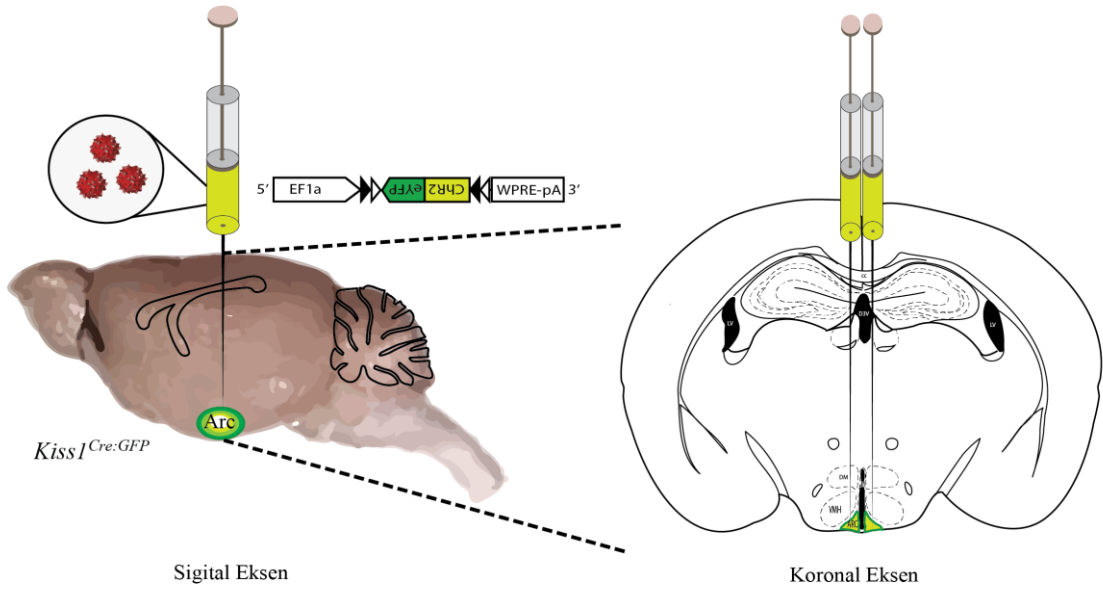
Tablo 4-1: Erkek ve Dişilerde Arkuat enjeksiyonu sonrası endojen fluoressan (TdT/GFP) yoğunlukları ve tüm gruplarda ortak olan yoğun beyin bölgeleri.

4.2. Arkuat kisspeptin nöronlarının fonksiyonel bağlantılarının belirlenmesi

4.2.1. Intrakranyal Viral Enfeksiyon Merkezinin Belirlenmesi

Arkuat çekirdekte bulunan kisspeptin (ARC^{Kiss}) nöronları rAAV- ChR2-YFP ile işaretlenerek optogenetik inceleme için hazırlandı. Enjeksiyon stratejisi şekil 4.23’de ve enjeksiyon sonuçları şekil 4.24 a-c’de gösterilmiştir.

Elektrofizyolojik kayıtlara başlamadan önce taze hazırlanan kesitlerde viral enjeksiyonun isabetli olduğu epifluoressan mikroskop altında YFP filtresinde görüntülendi. Kayıtlarda kullanılan beyinler enfeksiyonun arkuat nükleus ile sınırlı olduğu olgulardan alınmıştır. Arkuat nükleus dışında enfeksiyon bölgesi saptanan beyinlerden alınan kayıtlar analizde kullanılmamıştır.

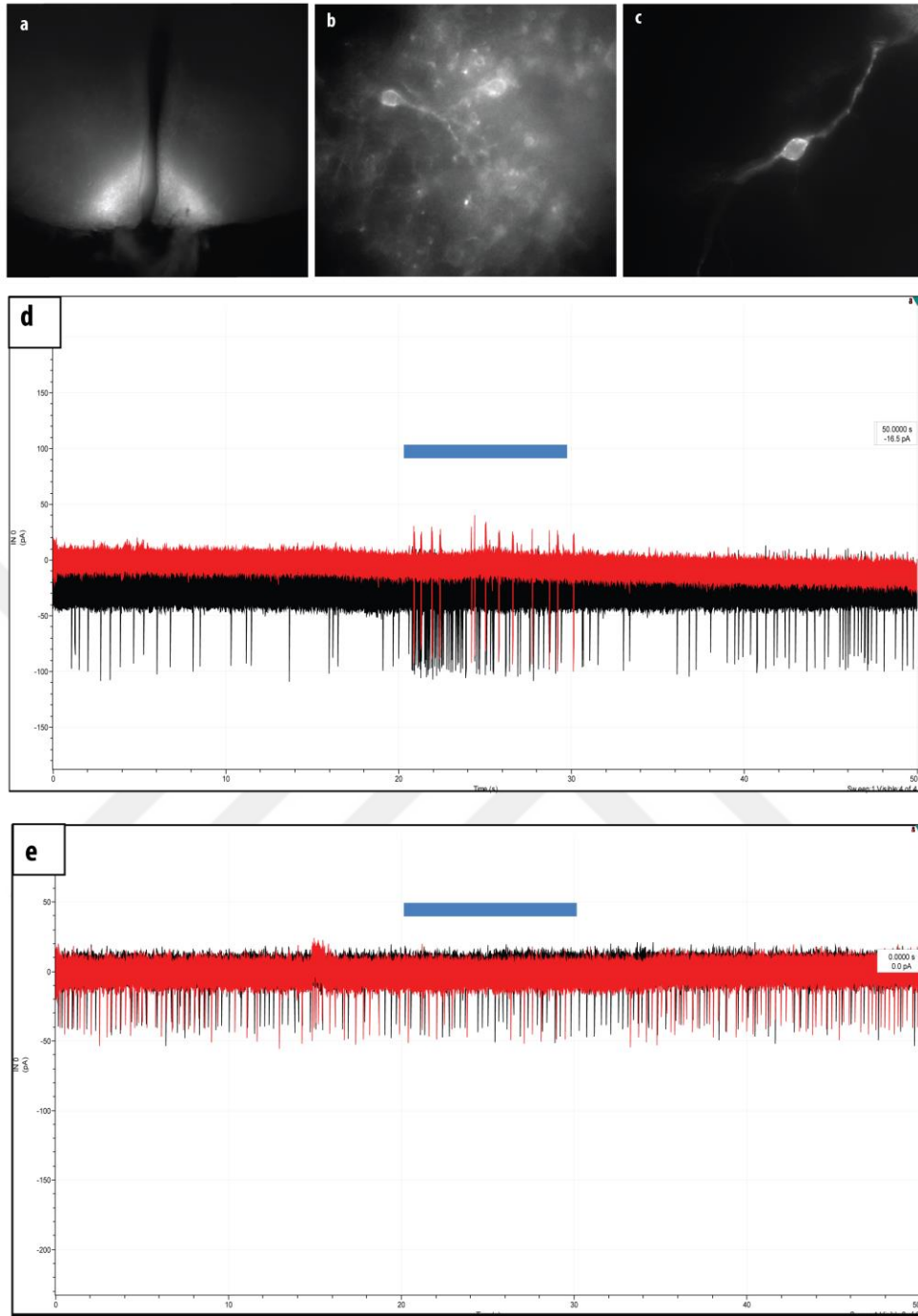


Şekil 4-23: Arkuat Kisspeptin nöronlarının ışığa duyarlı katyon kanalı gen ifadesi için intrakranyal viral vektörle işaretleme stratejisi.

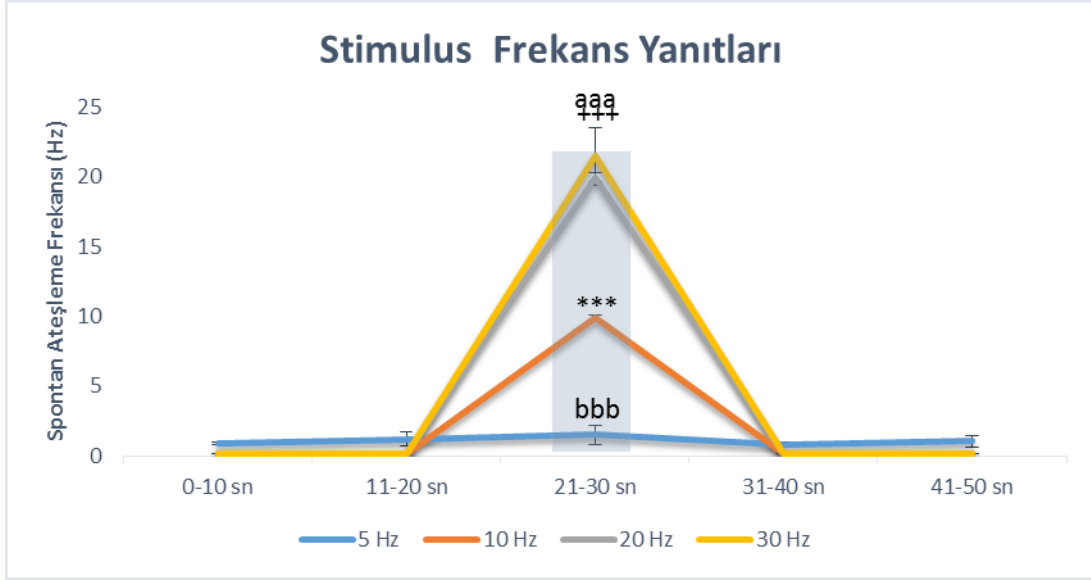
4.2.2. Arkuat kisspeptin nöronlarının fonksiyonel projeksiyonlarının araştırılması

Öncelikle enjeksiyon bölgesi epifluoresan mikroskopta hazırlanan taze beyin kesitlerinde görüntülendi. Virüsün fizyolojik fonksiyonelliği kontrol edildi. Spontan nöron ateşlemeleri görülen nöronlarda presinaptik Kiss1 bağlantısı olup olmadığı postsinaptik nöronlardan alınan kayıtlarla test edildi. Kanal rodopsin ifadesi görünen kiss1 pozitif nöronlar kırmızı (mcherry) floresan proteini içerdiğinden lazer ışığı uyarısına (473nm, 10Hz, 10sn) cevap oluşturarak spontan aktivite artışına neden oldu (Şekil 4-24-d). Bu işaretli nöronların sinaps yaptığı düşünülen bölgelerdeki floresan işareti olmayan nöronlardan alınan kayıtlarda eğer bağlantı yoksa spontan aktivite frekansını değiştirmedeği görüldü (Şekil 4-24-e).

5, 10, 20 ve 30 Hz frekanslarda lazer uyarısı test edildi ve arkuat kiss1 nöronlarının direkt kendisinden kayıt alınarak (YFP ile işaretli) lazer sistemi ve viral transgen (kanalrodopsin 2) fonksiyonu kontrol edildi. Stimulus geldiğinde 20-30. Sn arasında her frekansta uyarı öncesi ile karşılaştırıldığında spontan ateşleme frekansında anlamlı artış oldu ($p < 0,0001$) (Şekil 4.25).

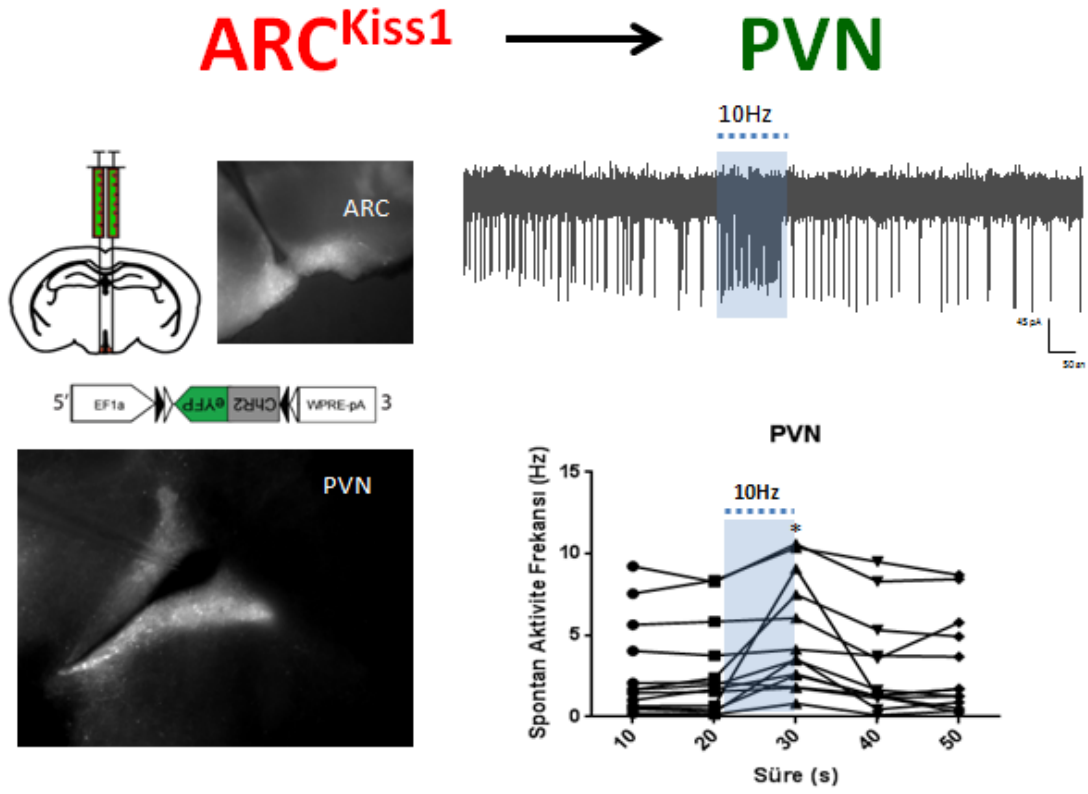


Şekil 4-24: İntrakranyal virüs enfeksiyonunun koronal kesitlerde epifloresan mikroskopta incelenmesi (a-c; sırasıyla 4X, 40X ve 60X büyütme). d) Kanalrodopsin protein ifadesi görülen fluoresan işaretli kiss1 nöronlarından mavi lazer uyarısına cevap olarak oluşan postsinaptik nörondan spontan ateşleme kaydı görüntüsü. e) Fluoresan işaretli olmayan nöronlardan mavi lazer uyarısına karşı değişmeyen spontan nöronal ateşleme kaydı görüntüsü. Mavi bar lazer ışığının uygulandığı süreyi temsil etmektedir.



Şekil 4-25: Arkuat Kiss1 nöronlarından alınan 5, 10, 20 ve 30 Hz uyarım yanıtları. Arkuat Kiss1 nöronlarından farklı frekanslarda uygulanan 473nm mavi lazer uyarısına cevap olarak alınan nöronal ateşleme frekansı değişimleri. 0-20 sn arası stimülasyon öncesi, 31-50 sn arası stimülasyon sonrası olarak kabul edildi. Her kayıt için öncesiyle karşılaştırıldığında lazer uyarısının ateşleme frekansını anlamlı arttırdığı gösterilmiştir (***;p<0,0001)

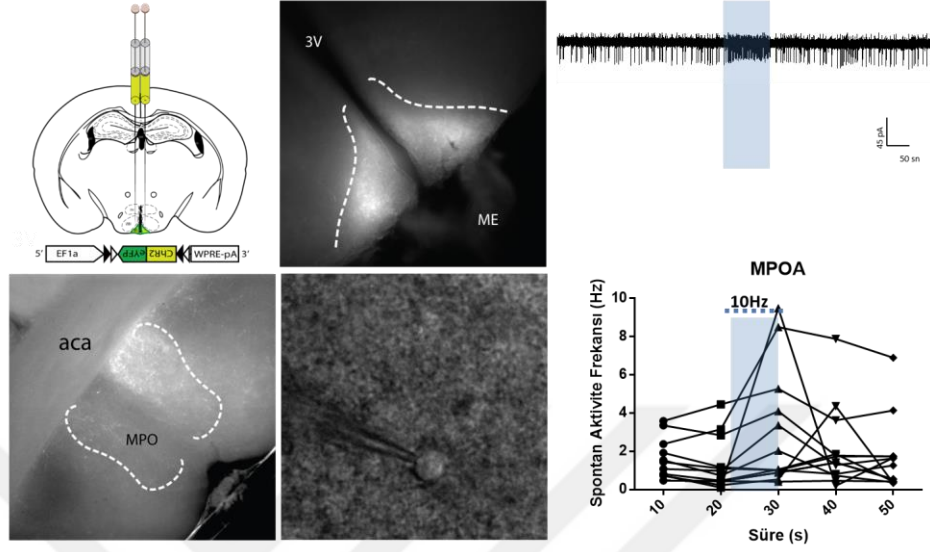
Presinaptik aksonların 10 Hz 10 sn lazer uyarımı (473 nm) sonrası PVN bölgesinde bulunan canlı hücrelerden alınan “cell attached” kaydında spontan aktivite frekansında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (Şekil 4.26). 0-10.sn ve 10-20.sn arasındaki spontan ateşleme ortalamaları bazal kayıt olarak değerlendirildi. 20-30. Sn arası 10 Hz’lik mavi lazer uyarısına PVN bölgesinden rastgele seçilen canlı nöronlardan alınan kayıtlar bazal kayıtlarla kıyaslandığında anlamlı artış görülmüştür (*; p<0,05).



Şekil 4-26: Arkuat Kisspeptin nöronlarının optogenetik aktivasyonu. A) Kisspeptin nöronlarının ChR2 geni transfeksiyonunun görüntülenmesi (4X büyütme). B) ChR2 ifade eden Kiss1 nöronlarının 10sn 10 Hz mavi ışık uyarımı sırasında PVN nöronundan alınan represantatif “cell attached”, voltaj clamp kaydı (Mavi kesikli çizgi ışık uyarımı zamanını göstermektedir). C) PVN’e arkuat nükleustan gelen aksonal uzantıların mikroskop görüntüsü (4X). D) PVN nöronlarından kaydedilen spontan aktivite frekansı grafiği (*; $p < 0,05$).

Arkuat Kiss1 aksonların 10 Hz 10sn uyarımı sonrası MPOA bölgesinde bulunan canlı hücrelerden alınan “cell attached” kaydında spontan aktivite frekansında bazal kayıtlara kıyasla (0-20 sn) istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (Şekil 4.27).

ARC^{Kiss1} → MPOA



Şekil 4-27: Arkuat Kiss1 nöronlarının optogenetik aktivasyonu. A) Kisspeptin nöronlarının Chr2 geni transfeksiyonunun görüntülenmesi (4X büyütme). B) Chr2 ifade eden kiss1 nöronlarının 10sn 10 Hz mavi ışık uyarımı sırasında MPOA nöronundan alınan represantatif cell attached, voltaj clamp kaydı (Mavi kesikli çizgi ışık uyarımı zamanını göstermektedir). C) MPOA arkuat nükleustan gelen aksonal uzantıların mikroskop görüntüsü (4X). D) MPOA nöronlarından kaydedilen spontan aktivite frekansı grafiği (*; $p < 0,05$).

Arkuat Kiss1 aksonların 10 Hz 10 sn uyarımı sonrası BST, Nükleus akkumbens, bölgelerindeki canlı hücrelerden alınan “cell attached” kaydında spontan aktivite frekansında bazal kayıtlarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, fluoresan işaretli cre bağımlı AAV virüs enjeksiyonları ile erişkin dişi ve erkek Kiss1^{CRE:EGFP} transgenik fare beyinlerinde kisspeptin nöronlarının projeksiyon yaptığı bölgeler gösterildi. Belirlenen beyin lokalizasyonlarından optogenetik teknikler kullanılarak alınan elektrofizyolojik kayıtlar ile kisspeptin nöronlarının fonksiyonel bağlantıları araştırıldı. Bu amaçla literatür bilgilerine dayanarak başlıca iki önemli kiss1 nöron popülasyonu hedeflendi: anteroventral periventriküler nükleus (AVPV) ve arkuat çekirdek (ARC). Ancak bu çalışmada elde edilen en önemli bulgulardan bir tanesi kiss1 nöronlarının çok sınırlı bir bölge içinde olmayıp beynin birçok yerinde literatürde belirtildiğinden çok daha fazla bulunmasıdır. Transgenik farelerin intra-ARC ve intra-AVPV enjeksiyonları sırasında mikropipet kaçakları ve virüs titrasyonunun ayarlanması sırasında oluşan hatalardan elde edilen bulgular birden fazla bölgede kiss1 popülasyonu olduğunu işaret etmektedir: retrosplenial granüler (RSG) korteks, medial habenula (MHb), hipokampal piramidal yol (py), zona inserta (ZI), posterior hipotalamik alan (PH), dorsamedial hipotalamik çekirdek (DMH), ventromedial hipotalamik çekirdek (VMH), ventral reuniens talamik çekirdek (VRe), parafasiküler talamik çekirdek (PF), ventral tuberomammillar çekirdek (VTM), ön komissural çekirdek (PrC), subparafasiküler talamik nükleusun parvisellüler bölümü (SPFPC), medial mamillar çekirdek (MM), anterior hipotalamik alanın posterior bölümü (AHP), medial preoptik çekirdek (MPO), anterodorsal preoptik çekirdek (ADP). Bu bölgelerde kiss1 somalarının gösterilmesi, kisspeptinerjik ağıın hipotalamus dışında beynin diğer bölgelerine de projeksiyon yaptığını göstermektedir.

Yapılan bir araştırmada postnatal gelişim sırasında dişi ve erkek fareler benzer olarak postnatal 10. güne (P10) kadar AVPV /PeN (preoptic periventriküler nükleus) bölgesinde Kiss1 nöron gövdesi görülmezken, puberte başlangıcı kabul edilen P25'ten itibaren her iki cinsten de boyanan kiss nöron sayısı artışı dişilerde dominant (erkeklere oranla 10 kat daha fazla) olmak üzere gösterilmiştir (ClarksonHerbison, 2006). Cinsiyet farklılıklarının yanı sıra fizyolojik koşullar da Kiss1 gen ifadesini değiştirdiğinden bu tez de erişkin fareler kullanıldı.

Yapılan çalışmalarda Kiss1 nöronlarının ve projeksiyonlarının görüntülenmesi için konvansiyonel boya enjeksiyonları, immün reaksiyonlar, in situ hibridizasyon gibi

yöntemler kullanılarak yapılmaya çalışılmıştır. Bu yöntemler bu konuda oldukça aydınlatıcı olmakla beraber dez avantajları nedeniyle bazı soruları tam olarak aydınlatamamıştır. Örneğin kullanılan antisera solüsyonların özellikle RF amid ailesindeki başka proteinlerle de çapraz reaksiyona girmesi bu konudaki en önemli dezavantajları olduğu bildirilmiştir (Desroziere ve ark., 2010).

Diğer yandan; geleneksel boya (trace) enjeksiyonları da enjekte edilen bölgedeki tüm nöronları işaretlediğinden aksonal uzantıların tekrar Kiss1'e özgü bir antikor yerine antisera ile işaretlendiğinden, boyanan lifler çapraz reaksiyonlar sonucu istenmeyen boyamalar olması riskini taşımaktadır (YeoHerbison, 2011). Nitekim aynı araştırma grubunun başka bir çalışmasında kendi ürettikleri Kiss1^{Cre} heterozigot fare ile Cre aktivasyonlu tdTomato geni taşıyan rapörtör fare ile çaprazlayarak elde ettikleri yeni çifte (double) transgeniklerle Kiss1 nöronlarını beyin şeffaflaştırma yöntemiyle (CLARITY) görünür kılmışlardır ancak bütün beyindeki Kiss1 nöronları ve lifleri görüntülediğinden horizontal ve koronal beyin kesitlerinde inceleme yapılarak fiberler takip edilmeye çalışılmıştır, bütün nöronlar işaretli olduğundan birçok lokasyondan gelen liflerin karışması ihtimali vardır (Yeo ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasında *kiss1* nöronları için ilk kez AAV-FLEX-tdTomato ve AAV-FLEX-Syn-GFP kombinasyonu kullanılarak projeksiyon bölgelerinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Dahası spesifik olarak işaretlenen Kiss1 somaları anterograd olarak aynı zamanda sinaptofizin ile işaretlenerek bu nöronlara ait hem lifler hem de presinaptik terminalleri eş zamanlı ilk kez bu çalışmada görüntülendi. İkili karşılaştırma imkanı veren bu teknik ile gen seçici daha özgün Kiss1 nöronları işaretleme sağlanmış ve sonucun güvenilirliği artırılmış oldu.

Yapılan diğer haritalama çalışmalarında östrojen ve testosteronun negatif geri besleme yapması nedeniyle arkuat Kiss1 nöronlarını görünür kılmak amacıyla gonadektomi yapılmıştır. Bunlardan farklı olarak viral vektörler kullanılarak yapılan bu tez çalışmasında arkuat Kiss1 nöronlarını görüntülemek için gonadların çıkarılmasına gerek kalmamıştır. Kullanılan dişi ve erkek 3-6 aylık farelerin seçilmesinin nedeni gelişimini tamamlamış yetişkin farelerdeki kisspeptin projeksiyonlarını göstermekti.

Arkuat Kiss1 nöronlarının lateral hipotalamus (LH), pre-mamiller çekirdeğin ventrali (PMV), ventral tegmental alan (VTA) ve mamiller çekirdeği, periventriküler hipotalamik çekirdek (Pe), lateral (LPO) ve medial (MPO) preoptik alana, az da olsa

retrokiazmatik (RCh) ve suprakiazmatik (SCh) çekirdeklere uzanan lifleri gösterilmiştir. AVPV bölgesine yoğun projeksiyonlar gönderdiği hem lif yoğunluğu hem de işaretli sinaptofizin varlığı ile birlikte ikili kontrol sağlanarak dişi ve erkeklerde ilk kez gösterilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, AVPV ve Pe beyin bölgelerini kapsayan alana yayılmış Kiss1 nöronlarının projeksiyonları incelendiğinde rostral POA ve Lateral septum (LS)'a projeksiyon yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca periventriküler alanda lifler ve ARC presinaptik sonlanmalar görülmüştür. Üreticinin (Jax lab.) bildirimi üzerine erkek farelerde AVPV bölgesinde Kiss1 nöronları bulunmadığı için sadece dişilerde bu bölgeye viral enjeksiyon denendi. Bu enjeksiyon sonuçlarına göre AVPV Kiss1 nöronlarının arkuat çekirdeğe, median preoptik nükleus (MnPO), preoptik alan (POA), medial septum (MS) ve Broca'nın diagonal bandı (DBB) bölgelerinde Kiss1 lifleri bulunmuştur. Bu bölgelerden özellikle preoptik alan GnRH nöronlarının yoğun olması nedeniyle özellikle LH salınımı için oldukça kritik beyin bölgelerinden biridir.

Hipotalamusun paraventriküler çekirdeği (PVN), beyinde hem nöroendokrin hem de otonomik fonksiyonları kontrol eden önemli bölgelerden biridir (Buijs ve ark., 2003; Coote, 1995; SwansonSawchenko, 1980). Oksitosin veya vazopresin üreten magnaselüler ve otonomik merkezlerle karşılıklı bağlantılara sahip parvoselüler adı verilen iki bölüme ayrılır (SwansonSawchenko, 1980).

Nükleus akumbens, bazal ön beyinde yer alan özellikle ödül ve motivasyon davranışlarıyla ilişkilendirilmiş bunların dışında beslenme (StratfordKelley, 1997; Yang ve ark., 2005), cinsel davranışlar, kahkaha (FranklinAdams, 2011), korku-kaygı (Sturm ve ark., 2003), saldırganlık, öğrenme-hafıza gibi davranışlarda etkisi olduğu düşünülen bir beyin bölgesidir. Yemek, seks, kimyasal bağımlılık gibi doğal ve yapay olarak nitelendirilebilir ödüllerin mezolimbik dopamin yolağını aktive ederek nükleus akumbensteki dopamin seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (Volman ve ark., 2013). Kisspeptin nöronal fiberlerinin (aksonal uzantılarının) özellikle nükleus akumbensin kabuk (shell) kısmında yoğun olarak bulunması ve bu bölgede floresan işaretli sinaptofizinin ifade edilmesi ödül devresinde arkuat Kiss1 nöronlarının görevi olabileceğini düşündürmüştür.

Zona inserta (ZI), belirsizlik bölgesi (zone of uncertainty) olarak da adlandırılan fonksiyonu çok bilinmeyen subtalamik çekirdeğin dorso-medialinde yer alan bir beyin

bölgesidir (Mitrofanis, 2005). Özellikle bu lokasyondaki anormal aktivite, parkinson hastalığının klinik semptomları ile ilişkilendirilmiştir. Davranışsal fonksiyonunu anlamaya yönelik çalışmalardan birinde GABA (γ -aminobutyric acid) nöronları optogenetik ile aktive edildiğinde PVT'ye kuvvetli inhibitör projeksiyonlar gönderdiği gösterilmiş, bu uyarılar sonrasında farelerde kilo artışı ve yeme davranışlarında artış tespit edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda ZI'daki GABA nöronlarının güçlü bir oreksijenik (iştah açıcı) potansiyeli olabileceği bildirilmiştir (X. Zhangvan den Pol, 2017). ZI'da kisspeptin reseptörünün (Kiss1) varlığı sıçanlarda gösterilmiş ancak farelerde gösterilememiştir (Herbison ve ark., 2010; D. K. Lee ve ark., 1999; Lehman ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ZI'da Kiss1 nöronlarına ait liflerin varlığı daha önce gösterilmiştir (Brailoiu ve ark., 2005) ancak Kiss1 nöron gövdeleri ilk kez bu tez çalışmasında görüntülenmiştir. Ancak bu nöronların fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir.

Arkuat çekirdek (ARC) Kiss1 nöronları daha önce erkek Rhesus maymunlarla (Macaca mulatta) yapılan çalışmada gösterildiği gibi GnRH'nin pulsatil salınımı için olduğu düşünülen GnRH nöronlarının aksonal uçlarına median eminens'te yakınlığı ancak bu nöronlarla çok nadir temas kurduğu kisspeptin immünreaksiyonlarla gösterilmiştir (Ramaswamy ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda farklı olarak ARC Kiss1 nöronlarının liflerinin hem ipsilateral enjeksiyon bölgesinde hem de kontralateral ARC bölgesine median eminens'ten bir kısım liflerini gönderdiği ve bu alanlarda yoğun sinaptofizin ifadesinden anlaşıldığı üzere hem median eminens'de hem de kontralateral ARC'da sinaps yaptığı görülmektedir.

Sonuç olarak, Kiss1Cre:EGFP transgenik fare ile yapılan deneylerde, viral sistemler kullanılarak aynı kisspeptin nöronuna ait sinaptofizin ve kiss1 genlerinin ilk kez beraber ifadesinin endojen floresan işaretli görüntülenmesine dayanarak nöroanatomik projeksiyonları gösterilmiştir. Buna göre ARC Kiss1 nöronlarının paraventriküler nükleus (PVN), medial preoptik alan (MPO), AVPV bölgeleri başta olmak üzere beynin birçok bölgesindeki lifleri ve presinaptik terminalleri hem dişi hem de erkek yetişkin farelerde gösterilmiştir. AVPV bölgesine yoğun projeksiyonlar gönderdiği hem lif yoğunluğu hem de işaretli sinaptofizin varlığı ile birlikte ikili kontrol sağlanarak dişi ve erkeklerde ilk kez gösterilmiştir.

Ayrıca AVPV Kiss1 nöronlarının lateral septum, ARC, MPO'ya projeksiyon yaptığı ve Pe, medial septum, Broca'nın diagonal bandı (DBB) gibi birçok bölgeye uzanan lifleri bulunmuştur. Yapılan optogenetik deneylerde seçilmiş beyin bölgelerinden alınan elektrofizyolojik kayıtlar ile arkuat kiss1 nöronlarının bağlantıları fonksiyonel olarak da kontrol edilmiştir. Optogenetik uyarılar sonrası PVN, MPO, kontralateral ARC bölgelerinde bulunan nöronların spontan nöronal ateşleme sıklığındaki değişiklikler gözlemlenmiştir ve bu bölgelerde ARC kiss1 nöronlarından sinyaller alan nöronlar bulunduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, Kiss1 nöronlarının diğer beyin bölgeleriyle ilişkili farklı fonksiyonel bağlantıları olabileceğine dair önemli bulgular elde edilmiştir.

Gösterilen bu bağlantılar sonucunda in vivo optogenetik ve farmakogenetik davranış deneyleri için temel bir bağlantı haritası elde edildi. Bu harita referans alınarak bu bölgelerdeki Kiss1 nöronlarının aktivasyonu ve inhibisyonu sonrası davranış parametrelerinin in vivo nasıl değiştiğinin incelenmesi gelecek hedeflerimizdendir. Laboratuvarlarımızda üretilen viral teknolojiler kullanılarak bu Kiss1 nöron haritasındaki projeksiyon bölgelerinde uyarım sonrası yaptığı davranışsal değişiklikler incelenerek elektrofizyolojik bağlantıların davranışla ilişkilendirilmesi sağlanabilir. Özellikle menepoz sonrası kadınlarda görülen Alzheimer hastalığı patolojisinde LH oldukça yüksek çıkmaktadır. Kisspeptin nöronlarının uyarılarak/inhibe edilerek GnRH siklusunun düzenlenmesi ve Alzheimer patolojisi üzerine etkilerinin araştırılması çalışma konularımızdan biridir. Bu doğrultuda elde edilen Kiss1 nöron projeksiyon bölgelerinin bu hastalık ile ilişkilerinin araştırılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesine katkı önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., . . . Maeda, K. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*, 53(2), 367-378.
- Backholer, K., Smith, J. T., Rao, A., Pereira, A., Iqbal, J., Ogawa, S., . . . Clarke, I. J. (2010). Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*, 151(5), 2233-2243. doi:10.1210/en.2009-1190
- Betley, J. N., & Sternson, S. M. (2011). Adeno-associated viral vectors for mapping, monitoring, and manipulating neural circuits. *Hum Gene Ther*, 22(6), 669-677. doi:10.1089/hum.2010.204
- Bouret, S. G., Draper, S. J., & Simerly, R. B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*, 304(5667), 108-110. doi:10.1126/science.1095004
- Brailoiu, G. C., Dun, S. L., Ohsawa, M., Yin, D., Yang, J., Chang, J. K., . . . Dun, N. J. (2005). KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol*, 481(3), 314-329. doi:10.1002/cne.20350
- Brown, R. E., Imran, S. A., Ur, E., & Wilkinson, M. (2008). KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol Cell Endocrinol*, 281(1-2), 64-72. doi:10.1016/j.mce.2007.10.011
- Buijs, R. M., van Eden, C. G., Goncharuk, V. D., & Kalsbeek, A. (2003). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol*, 177(1), 17-26.
- Castano, J. P., Martinez-Fuentes, A. J., Gutierrez-Pascual, E., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., & Malagon, M. M. (2009). Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides*, 30(1), 10-15. doi:10.1016/j.peptides.2008.07.025
- Castellano, J. M., Bentsen, A. H., Mikkelsen, J. D., & Tena-Sempere, M. (2010). Kisspeptins: bridging energy homeostasis and reproduction. *Brain Res*, 1364, 129-138. doi:10.1016/j.brainres.2010.08.057

- Castellano, J. M., Navarro, V. M., Fernandez-Fernandez, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., . . . Tena-Sempere, M. (2005). Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*, 146(9), 3917-3925. doi:10.1210/en.2005-0337
- Chehab, F. F., Lim, M. E., & Lu, R. (1996). Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*, 12(3), 318-320. doi:10.1038/ng0396-318
- Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., . . . Guy-Grand, B. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 392(6674), 398-401. doi:10.1038/32911
- Clements, M. K., McDonald, T. P., Wang, R., Xie, G., O'Dowd, B. F., George, S. R., . . . Liu, Q. (2001). FMRFamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochem Biophys Res Commun*, 284(5), 1189-1193. doi:10.1006/bbrc.2001.5098
- Colledge, W. H. (2008). GPR54 and kisspeptins. *Results Probl Cell Differ*, 46, 117-143. doi:10.1007/400_2007_050
- Constantin, S., Caligioni, C. S., Stojilkovic, S., & Wray, S. (2009). Kisspeptin-10 facilitates a plasma membrane-driven calcium oscillator in gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Endocrinology*, 150(3), 1400-1412. doi:10.1210/en.2008-0979
- Coote, J. H. (1995). Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Biol Signals*, 4(3), 142-149.
- d'Anglemont de Tassigny, X., & Colledge, W. H. (2010). The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology (Bethesda)*, 25(4), 207-217. doi:10.1152/physiol.00009.2010
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J. C., Matsuda, F., Chaussain, J. L., & Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19), 10972-10976. doi:10.1073/pnas.1834399100
- Desroziers, E., Mikkelsen, J., Simonneaux, V., Keller, M., Tillet, Y., Caraty, A., & Franceschini, I. (2010). Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol*, 22(10), 1101-1112. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.02053.x
- Donato, J., Jr., Cravo, R. M., Frazao, R., Gautron, L., Scott, M. M., Lachey, J., . . . Elias, C. F. (2011). Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral

- premamillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest*, 121(1), 355-368. doi:10.1172/JCI45106
- Elmqvist, J. K., & Flier, J. S. (2004). Neuroscience. The fat-brain axis enters a new dimension. *Science*, 304(5667), 63-64. doi:10.1126/science.1096746
- Evans, J. J., & Anderson, G. M. (2012). Balancing ovulation and anovulation: integration of the reproductive and energy balance axes by neuropeptides. *Hum Reprod Update*, 18(3), 313-332. doi:10.1093/humupd/dms004
- Fenno, L., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2011). The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci*, 34, 389-412. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113817
- Finn, P. D., Cunningham, M. J., Pau, K. Y., Spies, H. G., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (1998). The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology*, 139(11), 4652-4662. doi:10.1210/endo.139.11.6297
- Franklin, R. G., Jr., & Adams, R. B., Jr. (2011). The reward of a good joke: neural correlates of viewing dynamic displays of stand-up comedy. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 11(4), 508-515. doi:10.3758/s13415-011-0049-7
- Gao, G., Vandenberghe, L. H., & Wilson, J. M. (2005). New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther*, 5(3), 285-297.
- Glover, C. P., Bienemann, A. S., Heywood, D. J., Cosgrave, A. S., & Uney, J. B. (2002). Adenoviral-mediated, high-level, cell-specific transgene expression: a SYN1-WPRE cassette mediates increased transgene expression with no loss of neuron specificity. *Mol Ther*, 5(5 Pt 1), 509-516. doi:10.1006/mthe.2002.0588
- Glover, C. P., Bienemann, A. S., Hopton, M., Harding, T. C., Kew, J. N., & Uney, J. B. (2003). Long-term transgene expression can be mediated in the brain by adenoviral vectors when powerful neuron-specific promoters are used. *J Gene Med*, 5(7), 554-559. doi:10.1002/jgm.381
- Goodman, R. L., & Lehman, M. N. (2012). Kisspeptin neurons from mice to men: similarities and differences. *Endocrinology*, 153(11), 5105-5118. doi:10.1210/en.2012-1550
- Gottsch, M. L., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2009). From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, 30(1), 4-9. doi:10.1016/j.peptides.2008.06.016

- Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., . . . Steiner, R. A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145(9), 4073-4077. doi:10.1210/en.2004-0431
- Gottsch, M. L., Popa, S. M., Lawhorn, J. K., Qiu, J., Tonsfeldt, K. J., Bosch, M. A., . . . Steiner, R. A. (2011). Molecular properties of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *Endocrinology*, 152(11), 4298-4309. doi:10.1210/en.2011-1521
- Gottsch, M. L., Popa, S. M., Lawhorn, J. K., Qiu, J., Tonsfeldt, K. J., Bosch, M. A., . . . Steiner, R. A. (2011). Molecular Properties of Kiss1 Neurons in the Arcuate Nucleus of the Mouse. *Endocrinology*, 152(11), 4298-4309. doi:10.1210/en.2011-1521
- Gu, G. B., & Simerly, R. B. (1997). Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J Comp Neurol*, 384(1), 142-164.
- Hakansson, M. L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R. C., & Meister, B. (1998). Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci*, 18(1), 559-572.
- Han, S. Y., McLennan, T., Czielesky, K., & Herbison, A. E. (2015). Selective optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(42), 13109-13114. doi:10.1073/pnas.1512243112
- Harms, J. F., Welch, D. R., & Miele, M. E. (2003). KISS1 metastasis suppression and emergent pathways. *Clin Exp Metastasis*, 20(1), 11-18.
- Herbison, A. E. (2008). Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev*, 57(2), 277-287. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.006
- Herbison, A. E., de Tassigny, X., Doran, J., & Colledge, W. H. (2010). Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 151(1), 312-321. doi:10.1210/en.2009-0552
- Huang, Z. J., & Zeng, H. (2013). Genetic approaches to neural circuits in the mouse. *Annu Rev Neurosci*, 36, 183-215. doi:10.1146/annurev-neuro-062012-170307
- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., . . . Maeda, K. (2005). Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory

- luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology*, 146(10), 4431-4436. doi:10.1210/en.2005-0195
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J. M., Le Poul, E., . . . Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*, 276(37), 34631-34636. doi:10.1074/jbc.M104847200
- Lee, D. K., Nguyen, T., O'Neill, G. P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A. D., . . . O'Dowd, B. F. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett*, 446(1), 103-107.
- Lee, J. H., Miele, M. E., Hicks, D. J., Phillips, K. K., Trent, J. M., Weissman, B. E., & Welch, D. R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*, 88(23), 1731-1737.
- Lehman, M. N., Hileman, S. M., & Goodman, R. L. (2013). Neuroanatomy of the kisspeptin signaling system in mammals: comparative and developmental aspects. *Adv Exp Med Biol*, 784, 27-62. doi:10.1007/978-1-4614-6199-9_3
- Liu, X., Lee, K., & Herbison, A. E. (2008). Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology*, 149(9), 4605-4614. doi:10.1210/en.2008-0321
- Mead, E. J., Maguire, J. J., Kuc, R. E., & Davenport, A. P. (2007). Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels. *Endocrinology*, 148(1), 140-147. doi:10.1210/en.2006-0818
- Mitrofanis, J. (2005). Some certainty for the "zone of uncertainty"? Exploring the function of the zona incerta. *Neuroscience*, 130(1), 1-15. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.017
- Muir, A. I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N. A., Michalovich, D., Moore, D. J., Calamari, A., . . . Harrison, D. C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem*, 276(31), 28969-28975. doi:10.1074/jbc.M102743200
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., . . . Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411(6837), 613-617. doi:10.1038/35079135

- Parhar, I. S., Ogawa, S., & Sakuma, Y. (2004). Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology*, 145(8), 3613-3618. doi:10.1210/en.2004-0395
- Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain atlas in stereotaxic coordinates. San diego, ca: academic press, 2001.
- Perkins, K. L. (2006). Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. *J Neurosci Methods*, 154(1-2), 1-18. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.02.010
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P., & Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*, 92(3), 1235-1316. doi:10.1152/physrev.00037.2010
- Pita, J., Barrios, V., Gavela-Perez, T., Martos-Moreno, G. A., Munoz-Calvo, M. T., Pozo, J., . . . Soriano-Guillen, L. (2011). Circulating kisspeptin levels exhibit sexual dimorphism in adults, are increased in obese prepubertal girls and do not suffer modifications in girls with idiopathic central precocious puberty. *Peptides*, 32(9), 1781-1786. doi:10.1016/j.peptides.2011.07.016
- Popa, S. M., Moriyama, R. M., Caligioni, C. S., Yang, J. J., Cho, C. M., Concepcion, T. L., . . . Steiner, R. A. (2013). Redundancy in Kiss1 expression safeguards reproduction in the mouse. *Endocrinology*, 154(8), 2784-2794. doi:10.1210/en.2013-1222
- Qiu, J., Nestor, C. C., Zhang, C., Padilla, S. L., Palmiter, R. D., Kelly, M. J., & Ronnekleiv, O. K. (2016). High-frequency stimulation-induced peptide release synchronizes arcuate kisspeptin neurons and excites GnRH neurons. *Elife*, 5. doi:10.7554/eLife.16246
- Quennell, J. H., Mulligan, A. C., Tups, A., Liu, X., Phipps, S. J., Kemp, C. J., . . . Anderson, G. M. (2009). Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology*, 150(6), 2805-2812. doi:10.1210/en.2008-1693
- Qureshi, I. Z., & Kanwal, S. (2011). Novel role of puberty onset protein kisspeptin as an anticoagulation peptide. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 22(1), 40-49. doi:10.1097/MBC.0b013e328340e6a7
- Ramaswamy, S., Guerriero, K. A., Gibbs, R. B., & Plant, T. M. (2008). Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus

- of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology*, 149(9), 4387-4395. doi:10.1210/en.2008-0438
- Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., & Tena-Sempere, M. (2008). New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol*, 29(1), 48-69. doi:10.1016/j.yfrne.2007.07.002
- Roa, J., Garcia-Galiano, D., Varela, L., Sanchez-Garrido, M. A., Pineda, R., Castellano, J. M., . . . Tena-Sempere, M. (2009). The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology*, 150(11), 5016-5026. doi:10.1210/en.2009-0096
- Samulski, R. J., Chang, L. S., & Shenk, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol*, 63(9), 3822-3828.
- Sanders, E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: plating methods. *J Vis Exp*(63), e3064. doi:10.3791/3064
- Schmelzle, T., & Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103(2), 253-262.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661-671. doi:10.1038/35007534
- Semaan, S. J., Tolson, K. P., & Kauffman, A. S. (2013). The development of kisspeptin circuits in the Mammalian brain. *Adv Exp Med Biol*, 784, 221-252. doi:10.1007/978-1-4614-6199-9_11
- Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno, J. S., Jr., Shagoury, J. K., . . . Colledge, W. H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*, 349(17), 1614-1627. doi:10.1056/NEJMoa035322
- Smith, J. T., Acohido, B. V., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2006). KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*, 18(4), 298-303. doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01417.x
- Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146(9), 3686-3692. doi:10.1210/en.2005-0488

- Stratford, T. R., & Kelley, A. E. (1997). GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci*, 17(11), 4434-4440.
- Sturm, V., Lenartz, D., Koulousakis, A., Treuer, H., Herholz, K., Klein, J. C., & Klosterkötter, J. (2003). The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders. *J Chem Neuroanat*, 26(4), 293-299.
- Swanson, L. W., & Sawchenko, P. E. (1980). Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*, 31(6), 410-417. doi:10.1159/000123111
- Tena-Sempere, M. (2005). Hypothalamic KiSS-1: the missing link in gonadotropin feedback control? *Endocrinology*, 146(9), 3683-3685. doi:10.1210/en.2005-0652
- Timpe, J., Bevington, J., Casper, J., Dignam, J. D., & Trempe, J. P. (2005). Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Curr Gene Ther*, 5(3), 273-284.
- Tolson, K. P., Garcia, C., Yen, S., Simonds, S., Stefanidis, A., Lawrence, A., . . . Kauffman, A. S. (2014). Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity. *J Clin Invest*, 124(7), 3075-3079. doi:10.1172/JCI71075
- Topaloglu, A. K., Tello, J. A., Kotan, L. D., Ozbek, M. N., Yilmaz, M. B., Erdogan, S., . . . Yuksel, B. (2012). Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med*, 366(7), 629-635. doi:10.1056/NEJMoa1111184
- True, C., Kirigiti, M., Ciofi, P., Grove, K. L., & Smith, M. S. (2011). Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol*, 23(1), 52-64. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.02076.x
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., & Warman, M. L. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*, 29(1), 52, 54.
- Volman, S. F., Lammel, S., Margolis, E. B., Kim, Y., Richard, J. M., Roitman, M. F., & Lobo, M. K. (2013). New insights into the specificity and plasticity of reward and aversion encoding in the mesolimbic system. *J Neurosci*, 33(45), 17569-17576. doi:10.1523/JNEUROSCI.3250-13.2013

- West, A., Vojta, P. J., Welch, D. R., & Weissman, B. E. (1998). Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics*, 54(1), 145-148. doi:10.1006/geno.1998.5566
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22(3), 474-476, 478-481.
- Yang, S. C., Shieh, K. R., & Li, H. Y. (2005). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the nucleus accumbens participates in the regulation of feeding behavior in rats. *Neuroscience*, 133(3), 841-851. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.03.023
- Yeo, S. H., & Herbison, A. E. (2011). Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology*, 152(6), 2387-2399. doi:10.1210/en.2011-0164
- Yeo, S. H., Kyle, V., Morris, P. G., Jackman, S., Sinnott-Smith, L. C., Schacker, M., . . . Colledge, W. H. (2016). Visualisation of Kiss1 Neurone Distribution Using a Kiss1-CRE Transgenic Mouse. *J Neuroendocrinol*, 28(11). doi:10.1111/jne.12435
- Zhang, X., & van den Pol, A. N. (2016). Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. *Nat Neurosci*, 19(10), 1341-1347. doi:10.1038/nn.4372
- Zhang, X., & van den Pol, A. N. (2017). Rapid binge-like eating and body weight gain driven by zona incerta GABA neuron activation. *Science*, 356(6340), 853-859. doi:10.1126/science.aam7100
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432. doi:10.1038/372425a0
- Zingg, B., Chou, X. L., Zhang, Z. G., Mesik, L., Liang, F., Tao, H. W., & Zhang, L. I. (2017). AAV-Mediated Anterograde Transsynaptic Tagging: Mapping Corticocollicular Input-Defined Neural Pathways for Defense Behaviors. *Neuron*, 93(1), 33-47. doi:10.1016/j.neuron.2016.11.045
- Zolotukhin, S., Byrne, B. J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., . . . Muzyczka, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther*, 6(6), 973-985. doi:10.1038/sj.gt.3300938

ETİK KURUL KARARI



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

ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
24.05.2016	534	4.05.2016	Prof. Dr. Ümmühan İşoğlu Alkaç

‘Kisspeptin Nöronlarının Sinaptik Bağlantılarının Fonksiyonel ve Anatomik Karakterizasyonu’ adlı bilimsel çalışma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.		
Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 Yıl	Hayvan Türü ve cinsiyeti: Fare ♂♀	Hayvan Sayısı: 15

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	<i>E. Genç</i>
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	<i>E. Yeşilada</i>
Raportör	Prof. Dr. Işıl Aksan KURNAZ	KATILMADI
Üye	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	KATILMADI
Üye	Prof. Dr. Başar ATALAY	<i>B. Atalay</i>
Üye	Doç. Dr. Soner DOĞAN	<i>S. Doğan</i>
Üye	Yard. Doç. Dr. Ediz DENİZ	<i>E. Deniz</i>
Üye	Doç. Dr. C. Narter YEŞİLDAĞLAR	KATILMADI
Üye	Sumru KİRAZCI	<i>S. Kırazcı</i>

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KİSSPEPTİN NÖRONLARININ SİNAPTİK BAĞLANTILARININ FONKSİYONEL VE ANATOMİK KARAKTERİZASYONU

ORIJİNALLIK RAPORU

% 1	% 1	% 0	% 0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	istanbulsağlik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
2	Submitted to Yeditepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
3	www.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	jci.org İnternet Kaynağı	<% 1
5	journal.frontiersin.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.jneurosci.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	Advances in Experimental Medicine and Biology, 2013. Yayın	<% 1

Aıntıları çıkart

üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Siğnem	Soyadı	EYUBOĞLU
Doğ. Yeri	ÜSKÜDAR	Doğ. Tar.	21.07.1986
Uyruğu	TC	TC Kim No	38753000220
Email	eyuboglusignem@gmail.com	Tel	+0216-578-0533

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	2018
Yük.Lis.	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2013
Lisans	Haliç Üniversitesi	2008
Lise	Navzat Ayaz Süper Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Teknik Uzman	İstek Eğitim A.Ş.	2015 - halen
2.	Teknisyen	İstek Eğitim A.Ş.	2009 -2015

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Adobe Illustrator, Photoshop	Çok iyi
MATLAB	Çok İyi
GraphPAD, SPSS	Çok iyi

Araştırma Konuları:

- Bilişsel ve davranışsal sinirbilim,
- Optogenetik,
- Kisspeptin,
- Nöronal devreler,
- Öğrenme ve hafıza,
- Elektrofizyoloji

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI)

Marangoz D, Guzel E, **Eyuboglu S**, Gumusel A, Seckin I, Ciftci F, Yilmaz B, Yalvac I. (2017). Comparison of the neuroprotective effects of brimonidine tartrate and melatonin on retinal ganglion cells. *Int Ophthalmol*. doi:10.1007/s10792-017-0768-z

Akkaya H, **Eyuboglu S**, Erkanli Senturk G, Yilmaz B. (2017). Investigation of the effects of kisspeptin-10 in methionine-induced lipid peroxidation in testicle tissue of young rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 31(5). doi:10.1002/jbt.21881

Akkaya H, Kilic E, **Dinc S E**, Yilmaz B. (2014). Postacute effects of kisspeptin-10 on neuronal injury induced by L-methionine in rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 28(8), 373-377. doi:10.1002/jbt.21573

Kaçar E, **Dinç Eyuboğlu S**, Yılmaz B , Keleştimur, H . (2014). Leptin regulation of pubertal maturation in intact and pinealectomized female rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 43 (4), 557-561. DOI: 10.3906/sag-1208-15

Browne E P, **Dinc S E**, Punska E C, Agus S, Vitrinel A, Erdag G C, Anderton D L, Arcaro K F, Yilmaz, B. (2014). Promoter methylation in epithelial-enriched and epithelial-depleted cell populations isolated from breast milk. *J Hum Lact*, 30(4), 450-457. doi:10.1177/0890334414548224

Tug, N., Uslu, U., Cumbul, A., **Eyuboglu, S.**, Cam, C., Karateke, A., & Yilmaz, B. (2011). Effects of the gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix in the early postimplantation period on rat pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 155(2), 166-170. doi:10.1016/j.ejogrb.2010.12.015

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

Yaba A, Agus S, **Eyuboglu S**, Demir N, Yilmaz B. Effect of c-Abl gene silencing by siRNA on proliferation of Mouse granulosa cells. 26-29 August, FEPS 2015, Kaunas, Lithuania. (*Acta Physiologica*) (S11-O1)

Akkaya H, **Eyuboglu S**, Erkanli G, Sumer E, Yilmaz B. Investigation of effects of kisspeptin-10 in methionine induced lipid peroxidation in testis tissue of young male rats. 26-29 August, FEPS 2015, Kaunas, Lithuania. (*Acta Physiologica*) (P3-21)

Atasayan O, Agus S, Suakar O, **Eyuboglu S**, Bayrak O. F, Yilmaz B. Investigation of epigenetic changes in exfoliated mammary epithelial cells retrieved from lactating women. 26-29 August, FEPS 2015, Kaunas, Lithuania. (Acta Physiologica) (P3-22)

Kacar M, Seker F. B, Tuna Guvenc B, Yazihan N, Ethemoglu S, **Eyuboglu S**, Yilmaz B. Midkine, TNF-a and cytochrome C expressions in kainic acid induced epileptic seizures in rats. 26-29 August, FEPS 2015, Kaunas, Lithuania. (Acta Physiologica) (P6-34)

Agus S, **Eyuboglu Dinc S**, Apaydın A, Sandal S, Vitrinel A, Yilmaz B. Comparison of exfoliated human mammary cells count with demographical and nutritional parameters of lactating mothers. 27-30 August, FEPS 2014, Budapest, Hungary. (Acta Physiologica, August 2014 Volume 211 Supplement 697: P16.3

Eyuboglu Dinc S, Canpolat S, Akkaya H, Elibol Can B, Kilic E, Yilmaz B. Effects of chronic infusion of kisspeptin and its antagonist on cognitive functions and behavior in female rats. (2013). IUPS 2013 21-26 Temmuz 2013 Birmingham, UK. (PCC161)

Browne EP, Punska E, **Eyuboglu Dinc S**, Vitrinel A, Erdağ G, Anderton D L, Arcaro KF, Yilmaz B. “Promoter methylation in epithelial cells isolated from breast milk of women from Istanbul, Turkey”. American Association for cancer research Annual Meeting 2013, 6-10 Nisan 2013 Washington, DC. (Abstract number: 3646).

Akkaya H, **Eyuboglu S**, Kilic E, Yilmaz B. Effects of kisspeptin-45 on neural lipid peroxidation in male rats. Joint FEPS and Spanish Physiological Society Scientific Congress 2012, 8-11 September 2012, Santiago de Compostela, Spain. (P232). (Acta Physiologica 2012; Volume 206, Supplement 693:P232)

Eyuboglu S, Kelestimur T, Kilic E, Kilic U, Yilmaz B. Endocrine modulatory effects of bisphenol A and oestradiol on the brain kisspeptin / GPR54 System in immature rat uterotrophic assay model (2011). Joint Congress of FEPS and Turkish Society of Physiological Sciences, 3-7 September 2011, ISTANBUL (Acta Physiologica 2011; Volume 203, Supplement 686:OC13)

Kilic U, Yuksel A, Yilmaz B, **Eyuboglu S**, Ugur M, Kilic E. (2011). Are membrane-bound G protein coupled melatonin receptors MT1 and MT2 really necessary for the neuroprotective effects of melatonin in focal cerebral ischemia? Joint Congress of FEPS and Turkish Society of Physiological Sciences, 3-7 September 2011, ISTANBUL. (Acta Physiologica 2011; Volume 203, Supplement 686:PC016)

Akkaya H, **Eyuboglu S**, Kılıç E, Yılmaz B. Effects of kisspeptin on neural Lipid Peroxidation in male Rats Joint Congress of FEPS and Turkish Society of Physiological Sciences, 3-7 September 2011, ISTANBUL. (Acta Physiologica 2011; Volume 203, Supplement 686:PC232)

Kilic U, Ugur M, **Eyuboglu S**, Cevreli B, Cumbul A, Seker B, Yilmaz B, Kilic E. (2011). Neuroprotective effect of melatonin combined with Memantine in ischemic brain injury. XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & Xth International Conference of Quantification of Brain Function with PET, Barcelona, Spain, May 25-28, 2011 (abstract: A303-0010-01413).

Eyuboglu S, Kilic U, Ugur M, Seker B, Can B, Findik S, Yilmaz B and Kilic E. (2011). “Effects of melatonin and memantine on brain injury and intracellular signaling: roles

of AKT p38 p21 and ERK1/2 phosphorylation". British Society for Neuroendocrinology Annual Meeting, 3-5 July 2011, Cambridge University, P30.

Kelestemur T, Eyuboglu S, Sandal S and Yilmaz B. (2011). "Endocrine disruptive effects of polychlorinated biphenyls in transfected MCF-7 human breast cancer and H4IIE rat hepatoma cells using luciferase assay". British Society for Neuroendocrinology Annual Meeting, 3-5 July 2011, Cambridge University, P37.

Mete F, Kilic E, Eyuboglu S, Vitrinel A, Kilic U and Yilmaz B. (2011). Effects of hyperthermia on neurogenesis and neurobehavior in the young male rat. The Physiological Society Annual Meeting, 11-14 July 2011, Oxford University, PC290.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Eyuboğlu S, Ağuş S, Yavuz Y, Başer Ö, İşoğlu Alkaç Ü, Atasoy D, Yılmaz B. (2017) Kisspeptin Nöronlarının Sinaptik Bağlantılarının Fonksiyonel ve Anatomik Karakterizasyonu. 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 07-10 Eylül 2017, Pamukkale

Eyuboğlu S, Ağuş S, Yavuz, İşoğlu-Alkaç Ü, Atasoy D, Yılmaz B. (2017) Kisspeptin Nöronlarının Fare Beyinde Viral Vektörlerle Karakterizasyonu. 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 07-10 Mayıs 2017, Sakarya. P200

Eyuboglu S, Yılmaz B. (2015). Erişkin farelerde intra-habenular kisspeptin infüzyonunun locomotor aktivite ve anksiyete davranışlarına etkileri (Effects of kisspeptin on locomotor activity and anxiety behavior in adult mice following intra-habenular infusion). 13. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi (USK) 30 Nisan - 3 Mayıs 2015, Selçuk Üniversitesi, Konya, (P-108) (Anatomy, Volume 9, Suppl 1, April 2015, S68)

Dagdelen M, Eyuboglu S, Yılmaz B, Genc E. (2015). Parkinson modelinde valporik asidin P90RSK ve S6 Ribozomal proteinlerin ekspresyonu üzerine etkisi (Effect of valporic acid on the expression of P90RSK and S6 ribosomal proteins in Parkinson rat model). 13. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi (USK) 30 Nisan - 3 Mayıs 2015, Selçuk Üniversitesi, Konya, (P-022) (Anatomy, Volume 9, Suppl 1, April 2015, S37)

Ethemoglu MS, Kaçar M, Şeker FB, Yazıhan N, Eyuboglu S, Tuna BG, Yılmaz B. (2015). Sıçanlarda kainik asitle oluşturulmuş epileptik nöbetlerde midkin ekspresyonu (Midkine expression in kainic acid induced epileptic seizures in rats) (2015). 13. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi (USK) 30 Nisan - 3 Mayıs 2015, Selçuk Üniversitesi, Konya, (P-058), (Anatomy, Volume 9, Suppl 1, April 2015, S50)

Eyuboglu Dinç S, Canpolat S, Kılıç E, Yılmaz B. Dişi sıçanlarda Kisspeptin infüzyonu ve aromataz inhibisyonunun kongnitif fonksiyonlar ve davranış üzerine etkileri (Effects of Kisspeptin Infusion and Aromatase inhibition on cognitive functions and behavior in female rats). 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 28 Nisan-1 Mayıs 2013, Ege Üniversitesi, İzmir (P-069)

Akkaya H, Eyuboglu Dinç S, Kılıç E, Yılmaz B. (2012). Genç Sıçanlarda kisspeptin-10'un L-methiyoninle oluşturulmuş hiperhomosisteinemide testis dokusunda oksidatif stress üzerine etkilerinin araştırılması (Investigation of effects of kisspeptin-10 in methionine induced lipid peroxidation in testis tissue of young male rats). 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 25-29 Eylül 2012 Trabzon, P12.

Eyuboğlu S., Uğur M, Kılıç Ü, Cumbul A, Çevreli B, Can B, Yılmaz B ve Kılıç E. (2010). Anti-oksidan melatonin ve NMDA antagonisti memantin kombinasyonunun beyin felci sonrası oluşan beyin hasarı ve ödeme olan etkileri. 36. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 14-17 Eylül 2010, Edirne, S26.

Eyuboğlu S., Büyükgüçlü G, Uğur M, Gençol T, Piranen E, Kılıç U, Yılmaz B, Kılıç E. NMDA reseptör Antagonisti Memantin Beyin Felci Sonrası Oluşan Beyin Hasarına ve rt-PA Toksisitesine Olan Etkileri (Effect of NMDA antagonist Memantine on Brain Injury and rt-PA Toxicity after cerebral Ischemia) 9. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 13-17 Nisan 2010 Yeditepe Üniversitesi, ISTANBUL (P-017), (Türk Norol Derg 2010; 16(Ek 1): 129-245).

Kılıç U., Uğur M, Yücel M, **Eyuboğlu S.**, Büyükgüçlü G, Yılmaz B, Kılıç E. VEGF Tedavisinin Beyin Felci Sonrası Beyin Plastisitesi ve Fonksiyonel İyileşmeye olan Etkileri (Restorative Effects of VEGF on Brain Plasticity and Functional Recovery After stroke) 9. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 13-17 Nisan 2010. Yeditepe Üniversitesi, ISTANBUL (P-015), (Türk Norol Derg 2010; 16(Ek 1): 129-245)

Uğur M., Kılıç U, Yılmaz B, Büyükgüçlü G, Piranen E, **Eyuboglu S.**, Kılıç E. Melatonin reseptörlerinden MT1 ve MT2'nin beyin felci tedavisindeki rolleri (The roles of Melatonin receptor 1 and 2 in stroke treatment).9. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 13-17 Nisan 2010 Yeditepe Üniversitesi, ISTANBUL. (P-018), (Türk Norol Derg 2010; 16(Ek 1): 129-245).

Karadeli H H., **Eyuboglu S.**, Aktekin B, Kılıç E, Yılmaz B, Bingol Aykut C. Yeni doğan ratlarda kortikal displazi modelinde melatoninin davranış değişiklikleri üzerine etkileri (Effects of melatonin on behavioral changes in neonatal rat cortical dysplasia model). 9. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 13-17 Nisan 2010 Yeditepe Üniversitesi, ISTANBUL. (P-028), (Türk Norol Derg 2010; 16(Ek 1): 129-245).

Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

- Türk Nöroendokrinoloji Derneği (2009-)
- Türk Fizyolojik Bilimler Derneği (2010-)
- Türkiye Beyin Araştırmaları ve Sinirbilimleri Derneği'nin (TÜBAS) (2010-)

Ödüller

Best oral presentation award: Agus S., Eyuboglu S., Solak H., Bilgin VA., Yavuz Y., Baser Ö, Kutlu S., Bingöl CA., Atasoy D. Yılmaz B. "Chronic manipulation of arcuate kisspeptin neurons in AB-142 induced mouse model of Alzheimer's disease". 3rd International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society at the İnönü University, June 29-July 1 Malatya, Turkey.

Övgüye değer poster ödülü: Eyuboglu Dinç S., Canpolat S, Kılıç E, Yılmaz B. Dişi sıçanlarda Kisspeptin infüzyonu ve aromataz inhibisyonunun kongnitif fonksiyonlar ve davranış üzerine etkileri (Effects of Kisspeptin Infusion and Aromatase inhibition on cognitive functions and behavior in female rats). 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 28 Nisan-1 Mayıs 2013, Ege Üniversitesi, İzmir (P-069)

EPYS (European Physiologist Young Scientist) Awards 3th: Signem Eyuboglu (Yeditepe University, Istanbul, Turkey) "Endocrine Modulatory Effects of Bisphenol A and Oestradiol on the Brain Kisspeptin/GPR54 System in Immature Rat Uterotrophic Assay Model"

Poster Ödülü (sözlü sunum): Eyuboglu S, Kilic U, Ugur M, Seker B, Can B, Findik S, Yilmaz B and Kilic E. (2011). “Effects of melatonin and memantine on brain injury and intracellular signaling: roles of AKT p38 p21 and ERK1/2 phosphorylation”. British Society for Neuroendocrinology Annual Meeting, 3-5 July 2011, Cambridge University, P30.

