TÜBİTAK

Hareketli *C.elegans*'ın Sinir Sisteminde Dopamin Salgılanmasının Optik Olarak Ölçülmesi

Program Kodu: Cost

Proje No: 115S666

Proje Yürütücüsü:

Aşkın Kocabaş

Mayıs 2018

İSTANBUL

Önsöz

Bu raporda TÜBİTAK-Cost tarafından desteklenen 115566 numaralı “Hareketli *C.elegans*’ın sinir sisteminde dopamin salgılanmasının optik olarak ölçülmesi“ başlıklı araştırma projesinde yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar açıklanmaktadır.

Bu proje kapsamında model organizma olan *C.elegans* canlısının beyin aktivitelerini kontrol eden dopamin molekülünün salgılanması optik olarak görüntülenmiştir. Geliştirilen yeni bir yaklaşımla *C.elegans* canlısının beynindeki bir sinir hücresi genetik ve optogenetik metotlar kullanılarak optik bir dopamin algılayıcısına dönüştürülmüştür. Ayrıca canlıyı hareketli halde iken beyin aktivitelerini takip edebilen bir mikroskop sistemi kurulmuştur.

Canlı yiyecek olarak gördüğü bakteriden sızan kimyasal molekülleri takip ederek bakteriyi bulma davranışı sırasında, geliştirilen mikroskop sistemi ile uzun süre beyin aktivitelerinin görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu görüntüleme işlemlerinde temel olarak dopamin molekülünün salgılanma anları ve bu salgılanmanın sinir aktivitelerini hangi yönde etkilediği incelenmiştir.

Projedeki çalışmalar Koç Üniversitesindeki proje ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Proje Yrd. Doç. Dr. Aşkın Kocabaş tarafından yürütülmüştür.

İçindekiler

1.Giriş 8

2.Literatür Özeti ve Projenin Amacı 11

2.1. Dopamin salgılanması ve beyin aktivitelerine etkisi 11

2.1.1.Dopamin molekülünün ödüllendirme tabanlı davranışlarda etkisi. 11

2.1.2. Dopamin molekülünün retinadaki ışık duyarlılığına etkisi 11

2.1.3. Dopamin sinirlerindeki aktivitelerin ölçülmesi 12

2.2.Hassas beyin görüntüleme ve takip sistemleri 14

2.3.Projenin Amacı.....16

3.Mikroskop ve mikro enjeksiyon sistemleri 20

3.1.Mikroskop sistemi..... 20

3.2.C.elegans üretim ve bakım sistemlerinin kurulması ve canlı hayvan üretimi..... 22

3.2.1.Mikro enjesiyon sisteminin kurulması 22

4. Dopamin reseptörü plazmidleri ve hazırlanması.....24

4.1.*C.elegans* cDNA bankasının oluşturulması Dop-3 reseptörünün elde edilmesi.....25

4.2.Gibson ile ligasyon ve klonlama.....26

5.Dopamin salgılanması ve sinir aktivitelerinin görüntülenmesi.....27

5.1.Kontrol deneyleri 27

5.2.Dopamin üreten CEP sinir hücresindeki hızlı aktivitelerin görüntülenmesi..... 31

5.3.Dopamin algılayan AFD sinir hücresindeki aktivitelerin görüntülenmesi.....

6.Sonuç..... 36

7.Kaynakça.....38

Şekiller Listesi

Şekil 1: *C.elegans*'ın görüntüsü ve bütün sinir sisteminin şematik gösterimi. Dopamin sinirlerinin GFP ile işaretlenmiş görüntüsü..... 14

Şekil 2 A) *C.elegans* koku seviyesini takip ederek bakteri bölgesini bulma davranışının temsili gösterimi. B) Bu davranış sırasında koku seviyelerinin değişimi. C) *C.elegans* yön bulurken sinir aktivitelerinin optik olarak ölçmemizi sağlayacak olan optik takip ve görüntüleme sistemi. D) Örnek sinir aktivitelerini gösteren kamera görüntüsü..... 16

Şekil 3 Dopamine duyarlı optik reseptör hücre metodu. C.elegans'ın sinir sisteminde sıcaklık algılayan AFD siniri tetanus toxin (TeTx) proteini sayesinde diğer sinir hücreleri ile olan bağlantıları kesilecektir. İzole kalan AFD siniri Dopamin reseptörü sayesinde (D1 veya D2) dopamine duyarlı hale getirilecektir. Son aşama olarak GCaMP6 optogenetik proteini ile sinir aktivitesi optik olarak okunacaktır..... 17

Şekil 4 3 Boyutlu takip sisteminin genel bir görünümü 21

Şekil 5 Optik takip sisteminin ayrıntılı bir görünümü. 50 X büyütme yapabilen objektif ve mekanik kızaklar sayesinde canlı hareketli olmasına rağmen yüksek çözünürlükte optik görüntüleme yapabilmektedir. 22

Şekil 6 Mikro enjeksiyon sistemi ve mekanik kızaklar üzerinde bulunan enjeksiyon iğnesi. 23

Şekil 7 Mikro enjeksiyon sonrası elde edilen transgenik *C.elegans* ve GCaMP proteini üreten sinir hücresinin görüntüsü..... 25

Şekil 8: Resimde Dop-1 ve Dop-3 reseptörlerinin cDNA ekstraksiyon sonundaki PCR sonuçları görülmektedir. En soldaki merdiven (ladder) 1kb olup, PCR bantlarının boylarını anlamamızı sağlamaktadır. Saflaştırmadan sonra sadece Dop-3 reseptörü istenilen boyutta (1.8 kb) tek bant olarak elde edilmiştir.....28

Şekil 9 gcy-8:Dop-3. Gcy:8:GCaMP içeren plasmitin gen haritası.....**Error! Bookmark not defined.**

Şekil 10 Kontrol amaçlı GCaMP sinyalinin görüntülenmesi. GCaMP sinyali canlı tamamen hareketli halde iken 1 saat boyunca görüntülenebilmektedir. A) GCaMP sinyalinin canlının takip ettiği yol ile beraber gösterilmiştir. B) (Mavi

grafik) GCaMP sinyalinin zamana göre değişimi gösterilmektedir. (Kırmızı grafik) Canlının hareket hızını göstermektedir. 29

Şekil 11 AFD GCaMP sinyalinin sıcaklıktan bağımsız olduğunu gösteren deney sonucu. A) AFD sinir hücresinin kamera görüntüsü, B) *C.elegans* bütün vücudunu gösteren kamera görüntüsü. C) Deney sırasında canlının harket ettiği güzergah. D) GCaMP sinyalinin zamana göre değişimi. Sinyalin zamanla değişmediği gözlemlenmiştir. 30

Şekil 12 CEP sinir hücresinden gelen GCaMP6f sinyalinin hızlı değişimlerini gösteren deney sonucu. A) CEP sinir hücresinin kamera görüntüsü, B) *C.elegans* bütün vücudunu gösteren kamera görüntüsü. C) Deney sırasında canlının hareket ettiği güzergah. D) GCaMP6f sinyalinin zamana göre değişimi. *C.elegans'*ın kendi vücuduna dokunduğu an oluşan sinyaller gözükmektedir. ... 32

Şekil 13 Dopamin algılayıcısı ile dopamin salgılanmasının ölçülme deneyi. A) Etrafı bakteri olan bos bir bölgeye bırakılan C.elegans'ın deney sırasındaki güzergahı. B) Deney sırasında dopamine duyarlı AFD sinirinden gelen GCaMP6s sinyali. Sinyalin zamanla arttığı ve bakteriye girince düştüğü gözükmektedir..... 34

Şekil 14 Dopamin salgılanması sırasındaki hız değişimi. Canlı bakteriye dokunduğu anlarda hızı ani bir şekilde azalmaktadır. 35

Şekil 15 Dop-3 reseptörü için deney sonuçlarından çıkarılan model. Dopamin Dop3 reseptörü ile sinir hücrelerinin aktivitesini engelleme yönünde işlem yapmaktadır. 36

Özet

Dopamin canlıların sinir sistemi üzerinden birçok temel davranışın kontrol ve düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu molekülün sinir sisteminde eksikliği temel psikolojik hastalıklara yol açmaktadır. Canlıların beyin yapılarında dopamin salgılanması ve aynı zamanda canlının hareketlerine olan etkisinin aynı anda tespit edilmesi oldukça zor bir problemdir. Böyle bir çalışmanın Parkinson ve şizofrenlik gibi psikolojik hastalıkların, ayrıntılı anlaşılmasında ciddi bir önemi vardır. Bu projede temel olarak özgün optik ve genetik metotlar geliştirerek *C.elegans*'ın beyin hücrelerinde dopamin salgılanmasının ölçülmesi ve bu salgılanmanın canlının davranışları üzerine olan temel etkileri incelenmiştir.

Bu projede geliştirilen özgün metot temel olarak; *C.elegans*'ın beyin hücrelerinden bir tanesinin fonksiyonlarının değiştirilerek dopamine duyarlı hale dönüştürülmesi ve optogenetik proteinler sayesinde dopamin seviyesinin optik sinyal olarak okunmasına dayanmaktadır. Bu metodu "optik reseptör hücre metodu" olarak adlandırmaktayız. Bu metot; canlı, doğal davranışlarını gerçekleştirirken aynı zamanda dopamin seviyesinin de tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu ölçüm *C.elegans* için literatürde ilk kez gerçekleştirilmiştir. Bu alandaki zorluk dopamin salgılayan hücrelerdeki aktivitelerin ölçülememesinden kaynaklanmaktadır. Literatürde kullanılan alternatif metotlarda, canlıdan alınan örneklerin analizi sonucunda dopamin seviyesi tespit edilebilmektedir, yada beyin bölgesine yerleştirilen elektrotlar sayesinde seçici olmadan ölçüm yapılabilmektedir. Bir diğer metod ise dopamine duyarlı hücrelerin enjeksiyon ile beyin dokusuna yerleştirilmesidir. Bu metotlarin hiç biri *C.elegans* gibi hassas canlılar için uygun değildir. Geliştirdiğimiz metot bu problemleri tamamen aşabilecek kapasitede olup aynı zamanda canlının davranışlarını uzun süre takip etmemize de olanak sağlamaktadır.

Bu metot sayesinde gözlemlediğimiz temel davranış, yiyecek bulma sırasında kimyasal koku takibidir. Bugüne kadarki çalışmalar, dopaminin algılayıcı (sensör) sinirlerdeki sinyalin okunmasında ve canlının yiyecek bulma sırasında ödüllendirilme güdülerinde çok temel roller oynadığını göstermiştir. *C.elegans*'ın bu davranışı ve dopamin seviyesinin tespiti sayesinde bütün bu kontrol mekanizmalarının ayrıntılarını ortaya çıkarmayı amaçlamaktayız.

Bu proje sayesinde geliştirdiğimiz temel metot ve elde ettiğimiz sonuçlar şunlardır;

1- Dopamine duyarlı optik reseptör hücre oluşturulması
2- Hareketli canlıda takip ve görüntüleme mikroskobu geliştirilmesi
3- Canlının davranış sırasında dopamin seviyesi takibi ve ölçümü.

Anahtar Kelimeler

***C.elegans*, Optik görüntüleme, Dopamin, Optogenetik**

Abstract

Dopamine plays an essential role in controlling and modulating animal behaviors through the neural circuitry. Several important diseases such as Parkinson's disease and schizophrenia are related to the uncontrolled dopamine release. Understanding the detailed mechanism of dopamine signaling in a nervous system is one of the important goals of neuroscience. Inability to record simultaneously the dopamine release and animal behaviors makes this goal challenging. In this project we aim to develop opto-genetic techniques to record dopamine release in the brain of *C.elegans* while precisely monitoring the animal responses.

The main idea of this project is based on converting a specific type of nerve cells of C.elegans to dopamine detector using genetic manipulations and optogenetic techniques. Furthermore using optical tracking systems we aim to correlate dopamine release and behavioral responses in a freely moving animal. This kind of approach is novel and hasn't been shown for *C.elegans*. Alternative methods used in other model systems are mainly based on large sample collections and an implantation of cells or a fiber into the brain structure to record dopamine release in vivo. Due to the sensitivity and compact structure of *C.elegans* brain, however, all these techniques are not applicable. Our proposed method aims to overcome all these technical challenges to record both dopamine release and animal behavior simultaneously.

During this project, particularly we will record the dopamine release during chemotaxis behavior of *C.elegans.* Using this model behavior we aim to understand the detailed mechanisms of both reward based behaviors and the dynamics of sensory signal correlated with dopamine release.

The specific achievements of the project are :

1. Developing methods to induce dopamine sensitive nerve cell in *C.elegans* brain.
2. Developing microscopy system for continuous recording of brain activities of *C.elegans*
3. Optical recording of dopamine release in a freely moving animal during a food seach behaviour.

Keywords

***C.elegans*, Optical imaging, Dopamine, Optogenetics**

1 Giriş

Sinir sistemi, sinir hücreleri arasındaki iletişim sayesinde çevresel bilgileri işleyerek canlıların davranışlarının oluşturulmasını ve bu davranışların kontrol edilmesini sağlar. Sinir sisteminde sinyal iletimi iki temel mekanizma sayesinde olmaktadır. Basitçe ifade edecek olursak bu mekanizmalar elektriksel iletişim ve kimyasal iletişimdir. Elektiriksel iletişim, iki sinir hücresinin birbirlerine elektriksel olarak direk bağlı olmasından kaynaklanır. Bu bağlılık (gap junction) (Altun, 2009) sayesinde bir sinirdeki aktivite diğerine iletilmiş olur. Kimyasal iletişim (White, 1986) ise ikiye ayrılabilir; ilk olarak hücreler arası oluşan sinapsler ile olmaktadır. İki hücre arasında üretilen proteinler sayesinde bilgi aktarımı sağlanır. Bir diğer kimyasal mekanizma ise sinapslerden bağımsız olarak sinir hücrelerinin ürettiği küçük kimyasal moleküller sayesinde daha geniş bir alandaki sinir hücresi ağını kontrol etmeye yarayan sinir modülasyonlarıdır (Flavell, 2013). Bu işlemlerde kullanılan ve en çok bilinen moleküllerden bazıları dopamin ve serotonindir. Bu moleküller yapısal olarak küçük olmalarından dolayı beyin dokusu içerisinde yayılarak ve uzak mesafelerdeki hücreleri de etkileyebilir. Bu tarz etkileşimler sinapsler arası etkileşime göre oldukça yavaş olmakla beraber etki alanı oldukça geniştir ve bu moleküllere kendilerine duyarlı reseptörler sayasinde beyin dinamiklerini geniş biçimde kontrol etme özellikleri sayesinde canlıların davranışlarını çok ciddi şekilde kontrol eder ve düzenlenmesini sağlarlar. Ve bu moleküllerin eksiklikleri çok önemli hastalıklara sebep olmaktadır.

Bu projede özellikle dopamin molekülünün beyin içerisinde ne zaman üretildiğini ve canlının davanışlarını nasıl kontrol ettiğini anlamaya çalıştık. Bu projede üzerine çalışacağımız canlı iplik kurdu olarak bilinen *C.elegans*'tır. Bu canlı küçük sinir sistemi sayesinde diğer karışık canlılarda ölçülemeyecek ayrıntılı bilgiler elde etmemize olanak sağlamaktadır (Brenner, 1974). Şu ana kadarki litaratürden öğrendiğimize göre dopamin canlılarda temel olarak ödüllendirilme (Steinberg, 2013) mekanizmasını kontrol etmektedir. Ve ayrıca retinadaki reseptor hücrelerin (Witkovsky, 2004) gece ve gündüz arasındaki ışık farkını tolere edebilmesi için ışığa duyarlılık seviyelerini kontrol etmektedir. *C.elegans*'ta ise bu iki işlem yani hem ödüllendirilme hem de sensör duyarlıkları aynı anda olmaktadır. Görme duyusundan farklı olarak koku sinyali, direk olarak yiyeceğin varlığı ile orantılıdır. Bu yüzden *C.elegans'ta* yaptığımız bu çalışma, bu işlerin aynı anda bir canlıda nasıl düzenlendiğini göstermektedir.

*C.elegans'*ın yiyecek ararken kokuyu takip ederek yön bulma mekanizması (kemotaksis) (Kocabas, 2012; Lino, 2009) sırasında dopamin salgılanmasını ölçmeye çalıştık. Bu davranış hem dışarıdan alınan sinyalin ve duyarlılığın dopamin ile ilişkisini hem de yiyecek bulduğunda ödüllendirilmesinden dolayı olan davranıştaki değişiklikleri anlamamızı sağlamaktadır. *C.elegans'*ın dopamin üreten sinirleri literatürden bilinmektedir ancak bu sinirlerdeki aktivite optik veya elektiriksel olarak davranış sırasında ölçülememektedir. Bu problem dopamin ile davranış arasındaki doğrudan ilişkiyi anlamamıza da engel olmaktadır. Bu problemi çözebilmek için geliştirdiğimiz metot optik reseptör hücre metodudur. Bu metot temel olarak, *C.elegans'*taki (çalışacağımız davranış üzerinde etkisi olmayan) bir sinir hücresinin genetik yollar ile dopamine duyarlı hücreye çevrilmesine dayanmaktadır. Bu çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar ilk kez literatüre girmektedir. Proje temel olarak üç bölümden oluşmaktadır;

1- Hassas ve hızlı beyin aktivite görüntülemesi yapabilen mikroskop sisteminin kurulması (İP1, İP4)
2- Genetik metotlar sayesinde dopamine duyarlı reseptör hücre oluşturulması (İP2, İP3)
3- Optik metotlar sayesinde *C.elegans'ın* dopamin aktivitesinin ölçülmesi (İP5, İP6)

Bu proje süresince (24 ay) elde edilen sonuçların yayınlanacağı makale halen hazırlık aşamasındadır. Projemizdeki özgün yaklaşımın ve elde ettiğimiz sonuçların derlendiği makaleyi yüksek etki faktörlü bir dergiye sunmayı planlıyoruz.

Bu proje sonuç raporu projedeki tüm etkinlikleri ve elde edilen sonuçları içermektedir. Raporun aşağıda sıralanan alt başlıkları ilerleyen bölümlerde detaylandırılmıştır:

[1.] Giriş

[2.] Literatür özeti ve projenin amacı

[3.] Mikroskop ve mikro-enjeksiyon sistemleri

[4.] Dopamin reseptörü plasmidleri ve hazırlanması

[5.] Dopamin salgılanması ve sinir aktivitelerinin görüntülenmesi

[6.] Sonuç

[7.] Kaynakça

2 Literatür Özeti ve Projenin Amacı

2.1 Dopamin salgılanması ve beyin aktivitelerine etkisi

Dopamin ve serotonin (Steinberg, 2013; Dernovici, 2006; Gaglia, 2009; Schultz, 1997) gibi küçük moleküller sinir sisteminin aktivitelerini modüle ederek canlıların davranışlarını düzenler. Bu moleküllerin etki alanları sinaptik bağlantılarla sınırlı değildir (Flavell, 2013). Küçük yapılarından dolayı beyin içerisinde yayılıp geniş alanda etki yapabilirler. Eksiklikleri ise ciddi psikolojik hastalıklara sebep olmaktadır. Dopamin molekülünün sosyal davranışlardan gelişime kadar birçok fonksiyonda etkili olmasına rağmen dikkat çeken en önemli iki fonksiyonu ödüllendirme tabanlı davranışların kontrolü ve retinadaki ışık duyarlılığını ayarlamasıdır.

2.1.1 Dopamin molekülünün ödüllendirme tabanlı davranışlarda etkisi

Bugüne kadarki çalışmalar memeli canlılarda dopamin salgılanmasının ödüllendirmeye dayalı davranışlar sırasında oluştuğunu göstermektedir (Schultz, 1997,Glimcher, 2011; Steinberg, 2013;). Basitçe ifade edecek olursak beklenmeyen bir ödüllendirme oluştuğu zaman beyindeki dopamin salgılayan sinirlerin aktivitesi artmaktadır. Canlının beklenmedik bir yerden yiyecek bulduğu durumlar buna örnek gösterilebilir. Ayrıca beklenen ödüllendirmelerde ise bu sinirlerde herhangi bir değişiklik olmamaktadır. Beklentinin tersi durumlarla karşılaşıldığında ise bu sinirlerin aktivitesi azalmaktadır. Bu sinirlerin aktivitelerinin veya dopamine duyarlı reseptörler aracılığı ile etkilediği sinir ağlarının incelenmesi ve davranışlar üzerindeki direk etkilerinin gözlemlenmesi çok ciddi bir önem arz etmektedir.

2.1.2 Dopamin molekülünün retinadaki ışık duyarlılığına etkisi

Diğer bir fonksiyon olarak dopamin retinada ışık duyarlılığını kontrol etmektedir (Witkovsky, 1991; Djamgoz MBA, 1991; Witkovsky, 2004). Hava kararıp ışık yoğunluğu azaldığı zaman, retinada duyarlılığı yüksek olan çubuk hücreleri yoğunlukla ışığı görmemizi sağlamaktadır. Diğer taraftan gündüz olduğu zaman ise duyarlılıktan ziyade parlak cisimler arasındaki farkı ayırt edebilmek için retinada koni hücreleri aktif çalışmaktadır. Gece ve gündüz arasındaki bu

hassasiyet değişimi ışığa adapte olabilmek için vazgeçilmez bir fonksiyondur. Yapılan çalışmalar retinadaki bu ışık duyarlılığı kontrolünün dopamin tarafından düzenlendiğini göstermektedir. Güneş doğumundan hemen önce retinadaki amakrin hücreleri dopamin salgılamaya başlar ve çubuk hücrelerinin aktivitesini azaltarak koni hücrelerini baskın hale getirir. Hava karardığında ise bu işlem tersine döner ve çubuk hücreleri daha aktif çalışarak duyarlılığı arttırır.

Bahsettiğimiz bu iki mekanizma ödüllendirilme ve ışık duyarlılıkları birbirlerinden çok farklı iki fonksiyon gibi gözükmektedir. Bunun temel nedeni ise ışık ve görüntünün, yiyecek bulma ve güdülenme davranışlarında ikincil bir sinyal vazifesini görmesidir. Ancak bu iki farklı mekanizma *C.elegans* sinir sisteminde birarada bulunmaktadır. *C.elegans'*ın ışığa duyarlılığı yoktur. Görme sistemi bulunmamaktadır. Bunun yerine yiyecekleri kokuyu takip ederek bulmaktadır (Lino, 2009). Ayrıca *C.elegans* sinir sistemi oldukça yoğun bir yapıya sahiptir (Şekil 1) (White, 1986). Kokunun takibi, duyarlılıktaki değişim, yiyeceğin bulunması ve ödül mekanizması aynı sinirler üzerinden olmak zorundadır. *C.elegans'ın* beyin ağında bu iki sistemin birbiriyle tamamen iç içe çalışması ve etkileşim halinde olması gerekmektedir. Şu anki literatür bilgimize göre bu önemli sistemin nasıl çalıştığına dair herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

2.1.3 Dopamin sinirlerindeki aktivitenin ölçülmesi

Dopamin seviyesinin ölçülmesi diğer canlılarda da önem arz etmekte ve literatürde bu konuda ciddi çalışmalar bulunmaktadır (Day, 2001). Bu çalışmaların en önde gelenleri beyine yerleştirilen elektrotlar sayesinde oluşan elektriksel sinyallerinin ölçülmesidir (Robinson, 2003). Bu metodun tam olarak dopamine hassasiyeti yoktur. Dopamine yapısal olarak benzeyen diğer ufak moleküller de aynı sinyali ürettiğinden bu metodun ayırt etme özelliği zayıftır. Son zamanlarda bu metoda alternatif olarak beynin içine yerleştirilen dopamine duyarlı hücreler sayesinde dopamin seviyesi FRET sinyali sayesinde ölçülebilmektedir (Muller, 2014). Bu metot oldukça iyi sonuçlar vermiştir ve bizim çalışmamıza da yol göstermiştir. Ancak, bu metodun *C.elegans'ta* uygulanma şansı yoktur. Çünkü *C.elegans'ın* beyin yapısına hücre yerleştirmek ve orada gelişmesini beklemek mümkün değildir. Temel zorluk ise basınçlı iç yapısından dolayı enjeksiyon sırasında beynin tamamen deforme olması ve canlının ölmesidir.

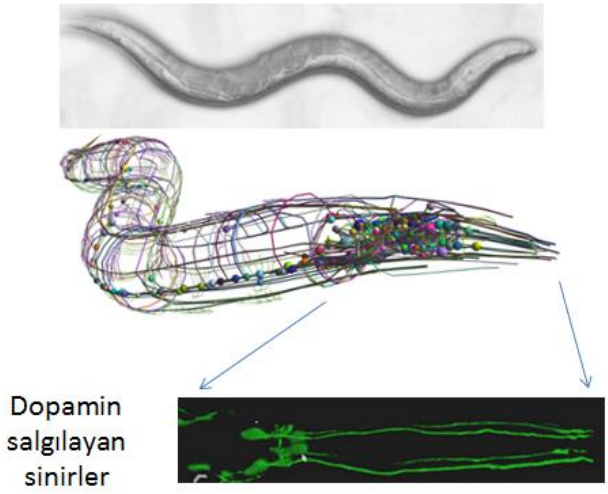
Son zamanlarda geliştirilen optogenetik metotlar sayesinde fare beyninde dopamin hücrelerinin bulunduğu VTA bölgesindeki aktivite (Gunaydin, 2014) hayvan canlı iken ölçülebilmiştir. Bu çalışmada beynin içine VTA sinirlerinin yakınına yerleştilen fiber kablo ve hücredeki optogenetik proteinler (GCaMP5) sayesinde zayıf olan optik sinyal okunabilmiştir.. Benzer şekilde bu tarz bir metodun yine *C.elegans*'ta kullanılabilirliği yoktur. Aktivitenin zaten düşük olması ve ayrıca canlıya fiber enjeksiyonunun yapılamaması bu metodu kullanışsız kılmaktadır.

Şu ana kadarki literatür bilgilerine göre dopamin salgılanması *C.elegans*'ta yön değiştirme hızını kontrol etmektedir (Gaglia, 2009; Hills, 2004). Bu kontrol, *C.elegans* bakteri bölgesinden dışarı çıkarıldığı anda gözlemlenebilmektedir (Bakteri *C.elegans* için temel yiyecektir). Bunun sebebi dopamin salgılanmasındaki değişimdir. Dopamin sinirleri ayrıca mekanik olarak duyarlı olduklarından bakterinin varlığını tespit edebilmektedirler. Bakteri bulunan bölgede dopamin aktivitesinin arttığı tahmin edilmektedir. Bu çalışmada ödüllendirilme anı, bakteri bölgesinin tespiti olarak ele alınacaktır.

C.elegans bakteriyi ararken kokunun yüksek olduğu yöne gitmektedir. Son zamanlarda yaptığımız çalışmalar bu yönelme mekanizmasını ispatlamaktadır (Kocabas, 2012). Bu yön bulma sırasında canlı çok değişik sinyalleri analiz edebilmektedir. Örneğin, hiç yiyeceğin olmadığı anda yön değiştirmelerin hızı tamamen değişmektedir. Ayrıca bakteriye yaklaştığı anda kokunun artışı ve bakteri bölgesi içerisinde çok yüksek bir koku ortamına girmesi, algılamaya çalıştığı koku oranlarındaki farklılıkları ortaya koymaktadır (Şekil 2A). Bu yüzden, yön değiştirmeler ve dopamin salgılanması arasında çok ciddi bir ilişki olduğunu tahmin etmekteyiz. Henüz literatürde bu ilişki tamamen bilinmemektedir. Bu çalışma sayesinde, ilk olarak, yön bulma sırasında dopamin aktivitesi tespit edilecektir.

Projemizin özgünlüğüyle ilgili, yön bulma sırasında dopamin sinyal seviyesindeki değişikliğin incelendiği literatürde bir yayın yoktur. Bunun temel sebebi ise hassas takip ve görüntüleme sistemlerinin olmayışıdır. Bu projede tahmin ettiğimiz mekanizma; kokunun miktarının artması ile dopamin salgılanmasının azalması ve duyarlılığın düşmesidir. Retina örneğinde olduğu gibi ışık seviyesine

göre bir değişim olma ihtimali üzerinde durulacaktır. Bu tür herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte tam ters bir şekilde yani tehlikeli kimyasallar için duyarlılığın serotonin ve dopamin ile değiştiği bilinmektedir (Barrios, 2008; Harris, 2009; Ezcurra, 2011). Bu çalışmalardaki mekanizmalar tamamen farklı olmasına rağmen tahmin ettiğimiz tezi destekler niteliktedir. Geliştireceğimiz metot sayesinde dopamin mekanizmasının ayrıntıları tespit edilecektir.



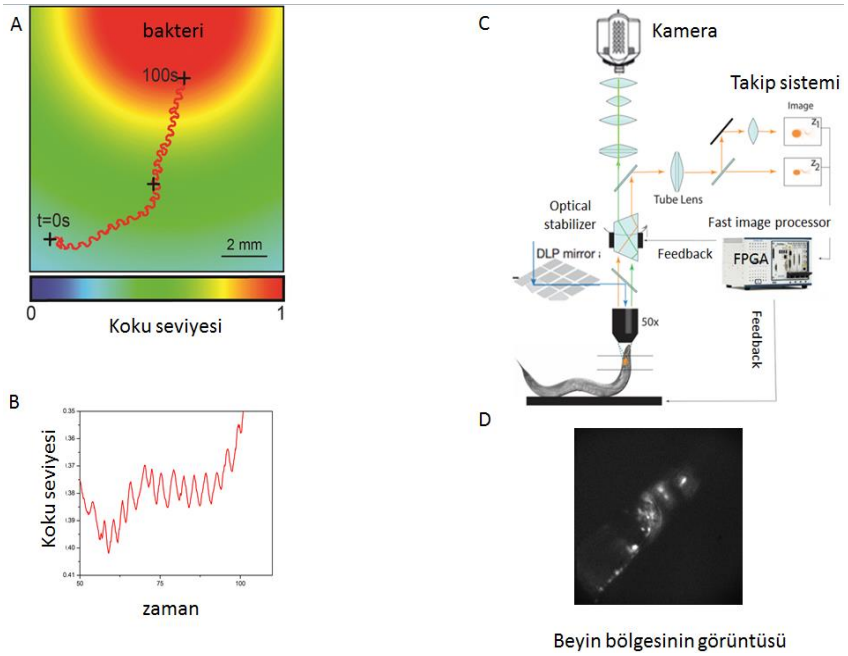
Şekil 1: *C.elegans*'ın görüntüsü ve bütün sinir sisteminin şematik gösterimi. Dopamin sinirlerinin GFP ile işaretlenmiş görüntüsü.

2.2 Hassas beyin görüntüleme ve takip sistemleri

Proje amaçlarından bir diğeri dopamin salgılanmasını canlı tamamen hareketli halde iken gözlemlemektir. Bu amaç, hassas takip ve görüntüleme yapan mikroskop sistemi tasarımı gerektirmektedir. Doktora sonrası yaptığımız çalışmalar sayesinde kapsamlı bir şekilde *C.elegans'*ın sinir sistemini takip edebilen optik metotlar ve hassas uyarma sistemleri oluşturulmuştur (Kocabas, 2012). Bu projede ise eski çalışmalardan tamamen özgün olarak hassas görüntüleme sistemi geliştirilecektir. Bu sistemde hızlı elektronik ve mekanik devreler sayesinde canlının istenilen beyin bölgesi takip edilecektir. Bu sistemin şematik gösterimi Şekil 2'de verilmiştir. Bu sistemin dayandığı temel teknik kabiliyeti FPGA denilen hızlı görüntü işleme sistemidir. Bu sistem sayesinde gerçek zamanlı canlı takibi ve görüntüleme yapılacaktır. Normal bilgisayarlardan

farklı olarak bu elektronik sistem, gecikme olmadan işlem yapmayı sağlamaktadır. Bu sistemlerin geliştirilmesindeki en büyük zorluk programlama kısmıdır. Şu an laboratuvarımızda bu programlamayı yapacak bilgi ve tecrübe mevcuttur. Projemiz kapsamında bu özgün sistem kurulacak ve geliştireceğimiz reseptör hücre metodu sayesinde dopamin aktivitesi ölçümünde kullanılacaktır.

Temel olarak bu görüntüleme sistemi iki bölümden oluşmaktadır. Birinci bölüm takip, ikinci bölüm ise optik görüntülemedir. Bu sistemin şematik gösterimi Şekil 2'de verilmiştir. *C.elegans* agar yüzey üzerinde tamamen hareketli halde iken takip edebilmek için hızlı bir kamera sistemine ihtiyaç vardır. Bu sistem ile canlının hızı ve yer değiştirmesi gerçek zamanlı hesaplanmaktadır. Bu hesaplama gerçek zamanlı olarak yukarıda bahsi geçen FPGA denilen elektronik sistemle gerçekleştirilecektir. Bu hesaplanan hareketlere ters yönde otomatik kızaklar sayesinde geri besleme yapılmakta ve canlı hareketli halde olmasına rağmen sürekli olarak yüksek çözünürlüklü objektifin altında tutulmaktadır. Bu sistemin en özgün tarafı kullanılacak olan FPGA sistemidir. Literatürde bu sistemle çalışan ve gerçek zamanlı görüntü işleyebilen başka bir sistem yoktur; bizim çalışmamız ilk olacaktır. Bu takip sistemi sayesinde, hareketli halde objektif altında tutulan *C.elegans'ın* başka bir kamera aracılığı ile de sinir aktiviteleri ölçülecektir. Buradaki temel problem ise sinir aktivitelerinde oluşan optik sinyalin zayıflığıdır. Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle beraber sinir hücresindeki voltaj değişimlerinin az seviyede olmasından kaynaklanmakta olduğu düşünülmektedir. Bu amaç için kullanılacak olan optogenetik protein GCaMP6 proteinidir. Bu proteininin florasan sinyali, sinir hücresi içerisindeki kalsiyum yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Yüksek kalsiyum yani aktif durumda daha verimli yeşil ışık bandında florasan üretmektedir. Bu sinyali takip ederek sinir aktivitesini ölçmek mümkündür. Bu proteinin birçok türü üretilmiş olmakla beraber şu an literatürdeki en hassas olan versiyonu GCaMP6s'tir. Bu proteinin *C.elegans* sinir sisteminde üretilebilip çalıştığı grubumuz tarafından da teyit edilmiştir.



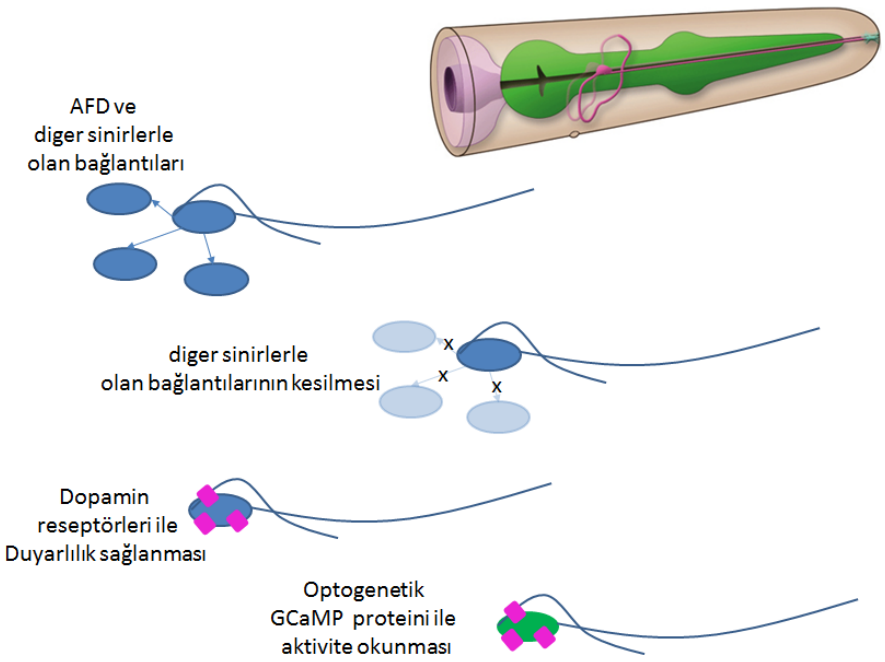
Şekil 2: A) *C.elegans* koku seviyesini takip ederek bakteri bölgesini bulma davranışının temsili gösterimi. B) Bu davranış sırasında koku seviyelerinin değişimi. C) *C.elegans* yön bulurken sinir aktivitelerini optik olarak ölçmemizi sağlayacak olan optik takip ve görüntüleme sistemi. D) Örnek sinir aktivitelerini gösteren kamera görüntüsü.

2.3 Projenin Amacı

Bu proje temel olarak iki metodun geliştirilip kullanılmasına dayanmaktadır. Birinci metot dopamine duyarlı reseptör hücre geliştirmektir. İkinci metot ise teknik olarak bu hücreden gelen optik sinyalleri okuyabilecek optik takip sistemi geliştirilmesidir.

Bu projedeki temel hedeflerimiz; *C.elegans'taki* dopamin değişimini gerçek zamanlı olarak kaydetmektir. Özellikle ilgilendiğimiz iki farklı zaman vardır. İlki, *C.elegans'ın* yiyecek aradığı yani kokuyu takip edip yön bulduğu zamandır. İkincisi ise yiyeceği bulduğu zamandır (ödüllendirme aşaması). Bu hedef için aşılması gereken temel problem dopamin sinirlerindeki aktiviteyi ve davranışı takip edebilmektir. Ancak *C.elegans* birçok dopamin siniri bulundurmasına rağmen bu sinirlerden, canlı hareketli iken herhangi bir aktivite

gözlemlenememektedir. *C.elegans* CEP ve ADE (Hills, 2004; Kang, 2010) isimli sinirler olmak üzere iki temel dopamin üreten sinir hücresine sahiptir. Bu sinir hücrelerinin GFP (**G**reen **F**lorasan **P**rotein) ile görüntülenmiş resimleri Şekil 1'de mevcuttur. Buradaki temel problem bu sinirlerdeki hücre zarı voltaj değişimlerinin çok düşük olması ve elimizdeki tekniklerle bu değişimin gözlemlenememesinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 3: Dopamine duyarlı optik reseptör hücre metodu. *C.elegans'ın* sinir sisteminde sıcaklık algılayan AFD sinirinin, tetanus toxin (TeTx) proteini sayesinde diğer sinir hücreleri ile olan bağlantıları kesilecektir. İzole kalan AFD siniri dopamin reseptörü sayesinde (D1 veya D2) dopamine duyarlı hale getirilecektir. Son aşama olarak GCaMP6 optogenetik proteini ile sinyal seviyesindeki değişim okunacaktır.

C.elegans çalışmalarında bu problemleri aşabilmek için dopamine duyarlı reseptör hücre metodunu geliştirmeyi amaçlıyoruz.. Bu metotta *C.elegans'ın* bir sinir hücresini genetik manipülasyon yöntemiyle dopamine duyarlı hale getirip bu sinir üzerinde oluşan aktiviteleri ölçmeyi ve dopamin seviyesindeki değişimleri davranış sırasında gözlemlemeyi planlamaktayız. Bu maksatla *C.elegans*'ın AFD diye adlandırılan sıcaklık algılayıcı siniri dopamine duyarlı hale getirilecektir (Şekil 3). AFD siniri canlının büyüdüğü sıcaklık ortamını tekrar bulabilmesini sağlayan

bir sinirdir. Ancak sıcaklığı sabit bir ortamda bu sinir işlemsizdir. Canlının kokuyu takip edip yön bulması sırasında, tamamen homojen bir ortam oluştuğunda, bu sinir de aktivite olmamaktadır. Sıcaklık algılama duyusu sabit tutulamadığı durumlar için sinirdeki sıcaklığa duyarlılığı sağlayan tax-2/tax4 (Satterlee, 2004) denilen proteinin mutasyonu sayesinde canlının sıcaklığı algılamasının da önüne geçilebilmektedir. İkinci aşama olarak, bu sinirde dopamin salgılanmasını algılamak için dopamin reseptörü (Chase, 2004) üretilmesi sağlanacaktır. Bu reseptörler ve AFD sinir hücresine özel promoter sekansları (gcy-8 ve gcy-18 genleri, sadece AFD sinirinde ifade olunmaktadır) kullanılarak AFD siniri, dopamin algılayıcı hücreye (dopamin sensörü) dönüştürülebilir. Ayrıca AFD siniri, reseptörlerin yoğunlukları arttırılarak çok düşük dopamin seviyelerine bile duyarlı hale getirilebilir. Dopamin algılayıcısının canlının davranışlarını bozma ihtimaline karşı üçüncü aşama olarak bu sinirin (AFD) tetanus toxin (TeTx) (Guo, 2014) diye bilinen bir toksin sayesinde, diğer hücrelerle olan bağlantıları kesilerek, sadece kendi içerisinde dopamine duyarlı hale getirilecektir. Bu aşamalar Şekil 3'te gösterilmiştir. Bu aşamalar sayesinde bir sinir hücresi hem beyinden bağlantısal olarak izole edilecek hem de dopamine duyarlı hale getirilecektir. Bu aşamalardan sonra canlının beyin hücreleri görüntülenip, AFD sinirindeki aktivite canlının davranışları ile beraber takip edilecektir. Bu aşamada bahsedilen yaklaşımlar ihtiyaç kalması durumunda uygulanacak olan kontrol metotlarıdır. AFD sinir hücresi sıcaklık değişmediği durumlarda sabit aktivite göstermesi durumlarda bu metodlara gerek kalmayabilir.

Dopamin salgılayan sinirler aktive olduğu zaman dopamin üreterek hücre dışı ortama salınır ve beyin içerisinde dağılırlar. AFD siniri, doğal durumda dopamin üreten sinirlere oldukça yakın ve beyin sisteminin tam orta bölgesinde yer almaktadır. Bu sayede yayılan dopamin dağılmadan önce gözlemleme şansı elde edilecektir. Dopamine duyarlı reseptör sinir hücresine dönüşmüş olan AFD üzerinde bulundurduğu D1(dop1-dop2) veya D2(dop3-dop4) tipindeki reseptörler sayesinde sinir aktivitesi değişecektir. Bu reseptörler G-protein bağlantılı reseptörler olup, dopamine bağlanacak ve dopamin seviyesi hakkında bize bilgi verecektir. Ayrıca AFD içerisinde bulundurduğu GCaMP (We, 2013) sayesinde bu aktivite değişimleri optik olarak ölçülecektir.

C.elegans bakteri kolonisinden yayılan kokuyu algılayan sinir hücreleri vasıtası ile o yöne gidebilmektedir. Şekil 2'de temsili olarak bu yönelme gösterilmiştir. Bu yön

bulma sırasında koku sinyali giderek artmakta ve çok değişik seviyelere ulaşmaktadır. Bu projede geliştireceğimiz optik takip ve görüntüleme sistemi sayesinde, dopamin seviyesi yukarıda bahsedilen metotlar ile görüntülenecektir. *C.elegans*'ın bu yön bulma davranışı sırasındaki sinyal seviyesi, doğru yöne yönlenme ve geriye dönme hareketlerindeki değişiklikler ve bu değikliklerle orantılı olarak dopamin seviyesindeki artışlar analiz edilecektir. Bir diğer aşamada ise *C.elegans'ın* bakteri bölgesini tespit ettikten sonra yine dopamin seviyesine göre ne tür davranış ve sinyal değişiklikleri oluşturduğu incelenecektir.

3 Mikroskop ve mikro enjeksiyon sistemleri

3.1 Mikroskop sistemi

Bu bölümdeki çalışmalar **iş paketi 1 ve iş paketi 4**'ü kapsamaktadır.

C.elegans canlısı ortalama olarak saniyede 150 mikron hızla hareket edebilmektedir. Bu canlı hareket halindeyken, 3-5 mikron arasında büyüklüğü olan sinir hücrelerinin görüntülenmesi oldukça zor bir işlemdir. Bu zorluğu aşabilmek için hızlı görüntüleme yapabilen opto-mekanik (optik ve mekanik sistemler birarada) bir mikroskop sistemi tasarladık ve laboratuvarımızda kurulumunu gerçekleştirdik. Bu mikroskop 50x büyütme yaparak, EMCCD kamera sayesinde, canlıdaki bir sinir hücresini 3-boyutlu bir şekilde takip edebilmektedir. Şekil 4 bu mikroskop düzeneğinin genel bir görünümünü göstermektedir. Bu takip sistemi FPGA diye adlandırılan çok hızlı görüntü işleme kabiliyeti olan bir elektronik sistem tarafından kontrol edilmektedir. Bu sistemin bütün yazılımları laboratuvarımızda gerçekleştirilmiştir. Bu tarz bir takip sistemi henüz literatürde olmayıp bu alandaki çalışmalara ciddi bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

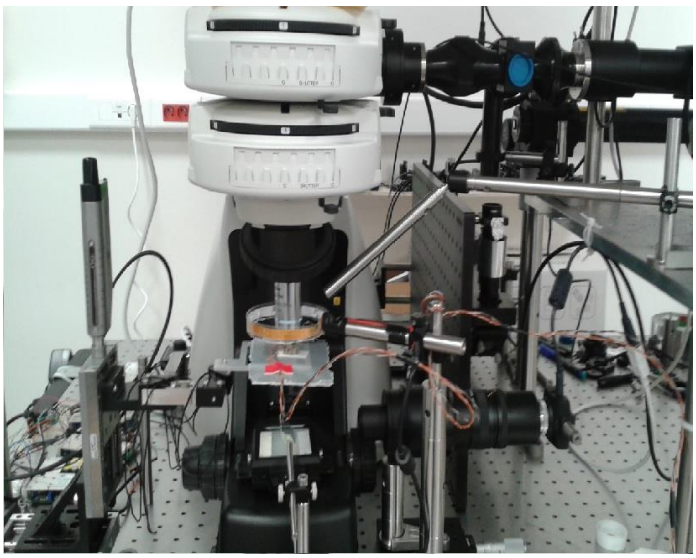


Şekil 4: 3 Boyutlu takip sisteminin genel bir görünümü

Mikroskop sisteminin ayrıntılı görünümü Şekil 5'de verilmiştir. Temel olarak sistemimiz Nikon mikroskop yapısı üzerine kurulmuştur. Bu yapı gerekli optik malzemelerin organize bir şekilde hizalanmasını kolaylaştırdığı için seçilmiştir. Bu yapı, florasan mikroskobu olup 480 nm ve 542 nm dalga boylarındaki uyarma demeti sayesinde 515 nm ve 560 nm dalga boylarında görüntüleme yapabilmektedir. Buna ilave olarak 650 nm dalga boyunda karanlık alan aydınlatması ile canlının bütün vücut yapısı gözlemlenebilmektedir.

Elde edilen florasan görüntü, hassas elektronik sistem sayesinde, Şekil 5'te sol tarafta bulunan hızlı mekanik kızakları kontrol edebilmektedir. Bu mekanik kızaklar hem uzun mesafe gidebilmekte hem de üzerlerinde bulunan piyezo kızaklar sayesinde mikro-metre hassasiyetinde bir çözünürlüğe sahiptir. Bütün bir mikroskop sistemi titreşim yalıtımı olan bir optik masa üzerine monte edilmiş ve hava yastıkları sayesinde (yüzer bir şekilde) deney yapmaya olanak sağlamaktadır.

Bu optik sistem, 5 mikron büyüklüğündeki sinir hücresini +/-5 mikron çözünürlükle takip ve görüntüleme yapmamıza olanak sağlamaktadır. Proje kapsamında hedeflenen dopamin görüntüleme işlemleri için oldukça yeterli hız ve çözünürlüğe ulaşılmıştır.



Şekil 5: Optik takip sisteminin ayrıntılı bir görünümü. 50 X büyütme yapabilen objektif ve mekanik kızaklar sayesinde canlı hareketli olmasına rağmen yüksek çözünürlükte optik görüntüleme yapabilmektedir.

3.2 *C.elegans* üretim ve bakım sistemlerinin kurulması ve canlı hayvan üretimi

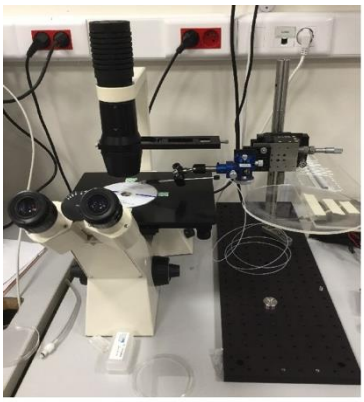
C.elegans üretim ve bakımı NGM (**N**ematode **G**rowth **M**edia) denilen bir ortamda yapılmaktadır. Laboratuvarımızda bu ortam, steril bir şekilde başarı ile hazırlanmıştır. Bu ortamın üzerine yiyecek olarak OP50 bakteri tipi ekilmektedir. Bu bakteri türü *C.elegans* tarafından ezilerek yenilebilmektedir ve ayrıca *C.elegans* içinde bir zarar teşkil etmemektedir. Şu an laboratuvarımızda 20'den fazla *C.elegans* türü canlı deneyler için yetiştirilebilmektedir.

3.2.1 Mikro enjeksiyon sisteminin kurulması

C.elegans hermafrodit olduğu için yumurta ve sperm üretebilmektedir. Döllenme işlemi sırasında yumurtalıklarına dışarıdan gönderilen yabancı DNA parçaları

C.elegans'ın hücre çekirdeğine girebilmektedir. Bu işlem mikro enjeksiyon olarak bilinmektedir. Transgenik canlı üretebilemek için bu işlemin çok hayati bir önemi bulunmaktadır. *C.elegans'*ın yumurtalıkları oldukça küçük bir bölgedir. Bu bölgeye hazırladığımız DNA parçalarını 40X büyütmeli faz kontrast mikroskobu ile enjekte etmekteyiz. Şu anda bu sistem laboratuvarımızda tamamen fonksiyonel bir şekilde çalışmaktadır. Bu sistem bizim laboratuvarımızın dışında diğer gruplar tarafından da kullanılmaktadır.

Bu enjeksiyon sistemi Şekil 6'da gösterilmektedir. Sistem temel olarak mikroskop ve hassas mekanik kızaklar üzerinde bulunan enjeksiyon iğnesinden oluşmaktadır.



Şekil 6:Mikro enjeksiyon sistemi ve mekanik kızaklar üzerinde bulunan enjeksiyon iğnesi.

Mikro enjeksiyon sırasında canlının hareketsiz durması gerekmektedir. Bu hareketsiz ortamı oluşturabilmek için %2 agar hazırlanarak ince mikroskop camı üzerinde kurutulmaktadır. Bu kuru agar *C.elegans* için yapışkan bir ortam oluşturmaktadır. Ayrıca halokarbon yağ kullanarak *C.elegans'ı* kuruyarak ölmeden önce, 5 dakika boyunca, agar üzerinde hareketsiz bir şekilde tutabilmekteyiz. Bu işlem sırasında, içleri DNA ile doldurulmuş olan cam iğneler yumurtalık bölgesine yerleştirilmekte ve yüksek basınç sayesinde bütün yumurtalıkların DNA ile doldurulması sağlanmaktadır. Bu işlem en az 10 canlı icin tekrar edilerek yavru üretmeleri sağlanmaktadır. Bir sonraki nesilde yavrular eklenen DNA'lara sahip bir şekilde elde edilebilmektedir. Bu sistem başarılı bir şekilde laboratuvarımızda kurulmuştur.

Bu işlemler sırasında karşılaştığımız en büyük zorluk, ısıtılarak elde edilen cam iğnelerin uçlarının kapalı olması ve kapalı olan bu uçların kırılarak açılmasıdır. Bu

işlemler maalesef çok verimsiz olmakta ve saatler süren tekrarlar gerekmektedir. Bu zorluğu aşabilmek için çok uzun bir optimizasyon yaptık ve cam iğnenin çekme hızı ile sıcaklığını ayarlayarak açık uçlu, çok sivri iğneler üretmeyi başardık. Bu işlem sayesinde 10 canlıya enjeksiyon yapma süresi 1 saatin altına indirilmiştir.

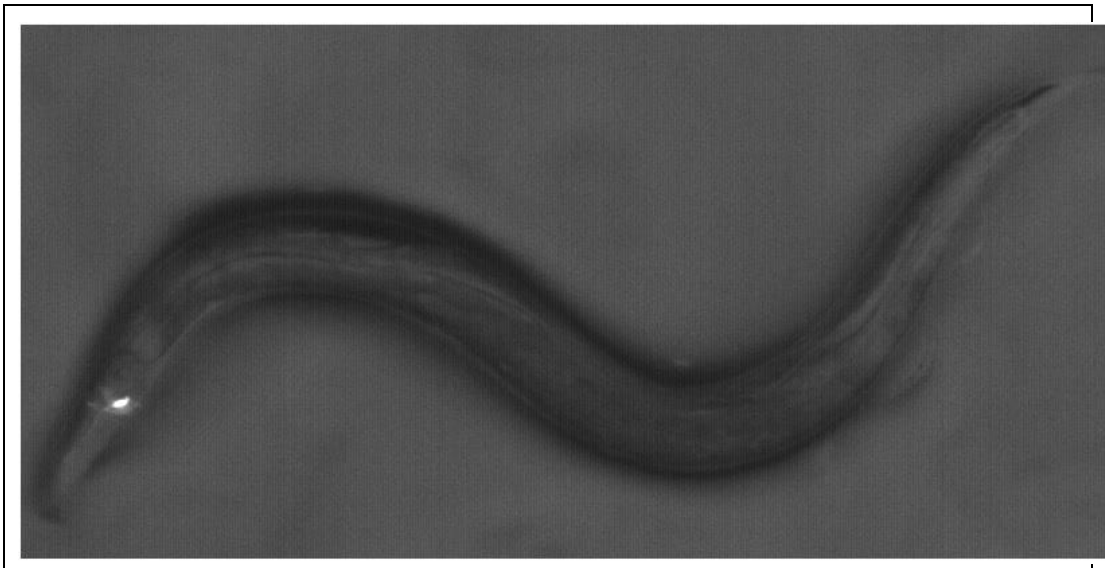
4 Dopamin reseptörü plazmidleri ve hazırlanması

Bu bölümdeki çalışmalar **iş paketi 2 ve iş paketi 3**'ü kapsamaktadır.

Proje kapsamında dopamin salgılanmasının optik olarak okunması hedeflenmiştir. Bu amaç için dopamine duyarlılığı olmayan AFD siniri, dopamin reseptörü sayesinde dopamine duyarlı hale getirilecek ve AFD sinirinde üretilecek olan GCaMP sayesinde bu sinirin aktivitesi optik olarak okunacaktır.

Bu aşamaları yapabilmek için AFD siniri genetik yollarla modifiye edilmiştir. Genetik ayrıntılar bir sonraki bölümde verilmiştir. Bu modifikasyonlar ile hazırlanan DNA parçalarının mikro enjeksiyon metodu ile *C.elegans'a* aktarılması gerekmektedir. Bu işlemler için hazırlanan mikro enjeksiyon düzeneğinde transgenik canlı üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir.

İlk aşamada AFD sinirinde GCaMP proteini üretilmesi hedeflenmiştir. Gcy-8 ve Gcy-18 promoter sekansları *C.elegans*'ta AFD sinirine özeldir. Bu promoter bölgelerinin DNA dizilimi GCaMP geninin önüne klonlanarak GCaMP proteininin sadece AFD sinirinde üretilmesini sağlanmıştır. Bu DNA dizilimlerine ek olarak 3'UTR denilen ve *C.elegans*'ta gen aktivitesini düzenleyen ilave bir dizilim eklenmesi gereklidir. Bu aşama projenin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Bu işlemleri test etmek için GCY-18:GCaMP:3'UTR DNA dizilimi mikro enjeksiyon metodu ile canlının yumurtalıklara enjekte edilmiş ve bir sonraki nesilde transgenik hayvanlar elde edilmiştir. Bu transgenik canlıların GCaMP proteini üretme özellikleri florasan mikroskobu ile görüntülenmiştir. Şekil 7, AFD sinirinde oluşan GCaMP proteininin siyah beyaz görüntüsünü göstermektedir. Asıl görüntü beklendiği üzere yeşil renkte olup sadece AFD sinirinde bulunmaktadır. Oluşan şekil daha önceden literatürde rapor edildiği gibi sadece AFD siniridir. Bu sinirin kafa bölgesinde beklendiği posizyonda olması AFD sinirinin varlığını doğrulamaktadır. İlave olarak AFD sinirinin uzantısının *C.elegans'ın* burun kısmına gidişi de ayrıntılı bir şekilde gözükmektedir.



Şekil 7: Mikro enjeksiyon sonrası elde edilen transgenik *C.elegans* ve GCaMP proteini üreten sinir hücresinin görüntüsü.

AFD siniri için literatürden iki farklı promoter tespit edilmiştir; bunlar gcy-8 ve gcy-18'dir (Wang, 2013; Kagoshima, 2015) Bu promoter sekansları, dopamin reseptör geninin (Dop-3) AFD sinirinde üretilmesi ve ayrıca bu sinirde GCaMP üretimini kontrol etmek için kullanılmıştır. Gerekli olan uygun genetik parçalar üretilmiştir.

Bu genetik parçalar, plazmid şeklinde hazırlanmıştır. Bu hazırlama sürecinde temel moleküler biyoloji teknikleri kullanılmıştır. PCR ve bakteride klonlama gibi işlemler ile hazırlanan plazmidler, daha sonra *C.elegans'ın* yumurtalıklarına enjekte edilmektedir.

4.1 *C.elegans* cDNA bankasının oluşturulması Dop-3 reseptörünün elde edilmesi

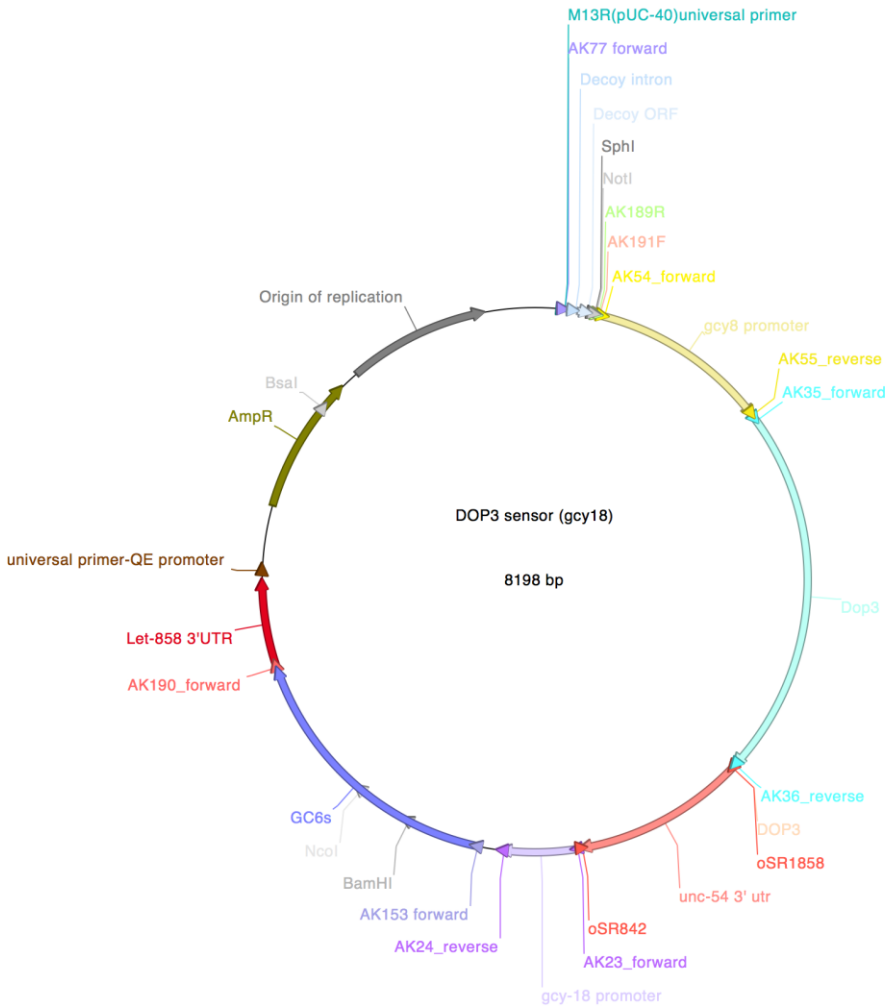
C.elegans'tan total RNA ekstraksiyonu, DNA'dan pürifikasyon ve cDNA sentezi yapıldıktan sonra elde edilen cDNA bankasından istenilen PCR ile kontrol edilmiştir. Tüm işlemler için Northwestern üniversitesinin cDNA protokolü kullanılmıştır. Şekil 8'de Dop-3 reseptörünün PCR sonucu görülmektedir. Boyu 1800 bp olan bu gen, agaroz elektroforez sonucunda görülebilir. Ayrıca Dop-1 geni de denendi, ancak Dop-3 geni başarılı bir şekilde çıkarıldığı için bu gen ile dopamin algılayıcı hücre yapıldı.



Şekil 8: Resimde Dop-1 ve Dop-3 reseptörlerinin cDNA ekstraksiyon sonundaki PCR sonuçları görülmektedir. En soldaki merdiven (ladder) 1kb olup, PCR bantlarının boylarını anlamamızı sağlamaktadır. Saflaştırmadan sonra sadece Dop-3 reseptörü istenilen boyutta (1.8 kb) tek bant olarak elde edilmiştir. Bundan sonraki kısımda da Dop-3 ile devam edilmiştir.

4.2 Gibson ile ligasyon ve klonlama

Promoter ve Dop3 reseptör sekansları Gibson metodu ile birleştirilmiştir ve daha sonra bakteriye transformasyon yapılmıştır. Böylece istenilen genetik parça çoğaltılmıştır. Gibson ligasyon ve transformasyon protokolü için standart protokol takip edilmiştir. Elde edilen plazmid gen haritası Şekil 9'da verilmiştir. Transformasyondan sonra kontrol için koloni PCR yapılmıştır. Plazmid DNA'lardaki mutasyonlar DNA sekanslama yöntemi ile de kontrol edilmiştir.



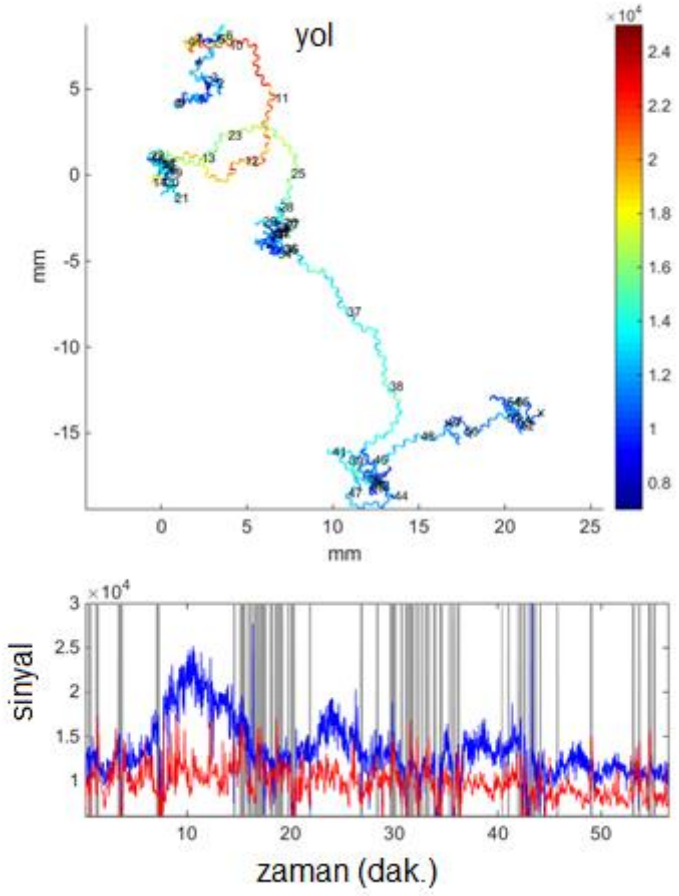
Şekil 9:gcy-8:Dop-3::gcy-18:GCaMP6s içeren plazmidin gen haritası.

5 Dopamin salgılanması ve sinir aktivitelerinin görüntülenmesi

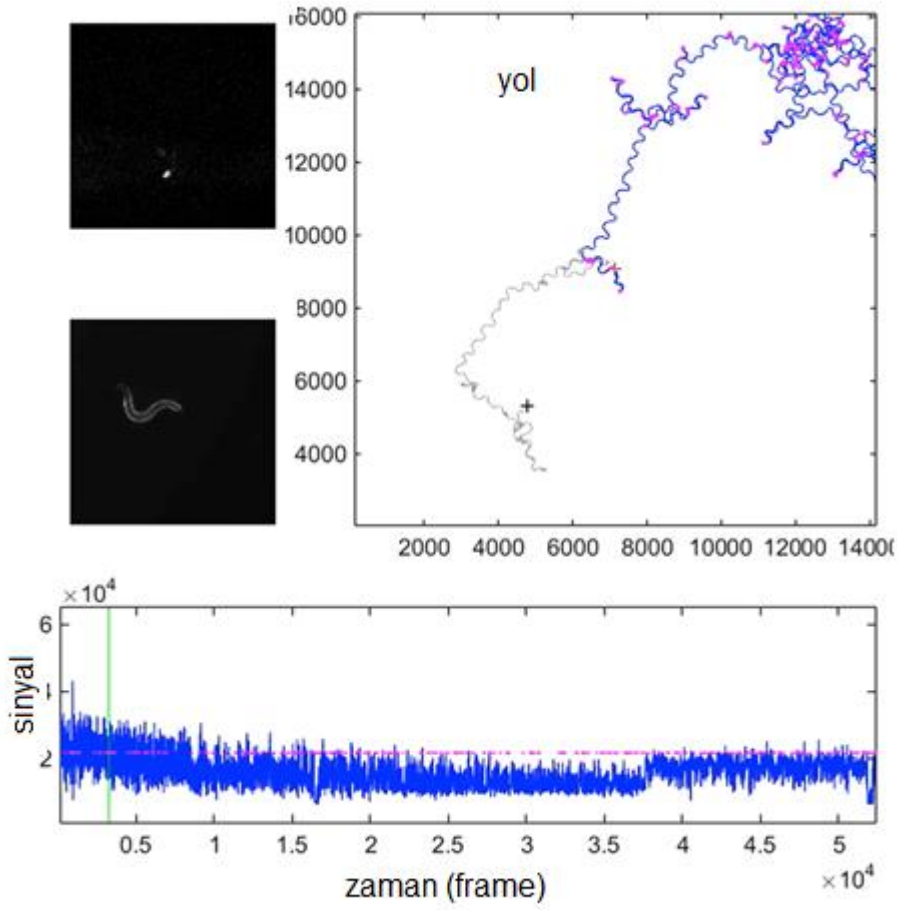
5.1 Kontrol deneyleri

Bu bölümdeki çalışmalar **iş paketi 5 ve iş paketi 6**'yı kapsamaktadır.

Kurulan mikroskop sistemi ile ilk aşamada kontrol deneyleri yapılmıştır. Kontrol deneylerinde hazırlanan ve laboratuvarımızda daha önceden aktivite bilgileri tespit edilmiş olan AIY sinir hücresinin zamanla değişimi görüntülenmiştir. AIY sinir hücresine özel bir promoter olan ttx-3 promoter sekansı ile GCaMP6s üretimi sağlanmış ve *C.elegans'ın* besinsiz bir ortamda sinir aktivitesi ölçülmüştür. Bu kontrol deneyinin temel amacı uzun süreli ölçüm kabiliyetinin test edilmesidir. Şekil 9, deney sonucunu özetleyen bir grafiği içermektedir. Grafikte *C.elegans'ın* ilerlediği yol ve bu yol boyunca sinir hücresindeki aktivitenin değişimleri görülmektedir. Değişimlerin arkasındaki sebep, bu proje kapsamı dışında olduğu için bu aşamada üzerinde durulmamıştır. Bu deney, kurulan mikroskop sisteminin uzun süreli (1 saat) görüntüleme işlemleri için yeterli takip kapasitesine sahip olduğu ispatlamaktadır.



Şekil 10: Kontrol amaçlı GCaMP sinyalinin görüntülenmesi. GCaMP sinyali canlı tamamen hareketli halde iken 1 saat boyunca görüntülenebilmektedir. A) GCaMP sinyalinin canlının takip ettiği yol ile beraber gösterilmiştir. B) (Mavi grafik) GCaMP sinyalinin zamana göre değişimi gösterilmektedir. (Kırmızı grafik) Canlının hareket hızını göstermektedir.



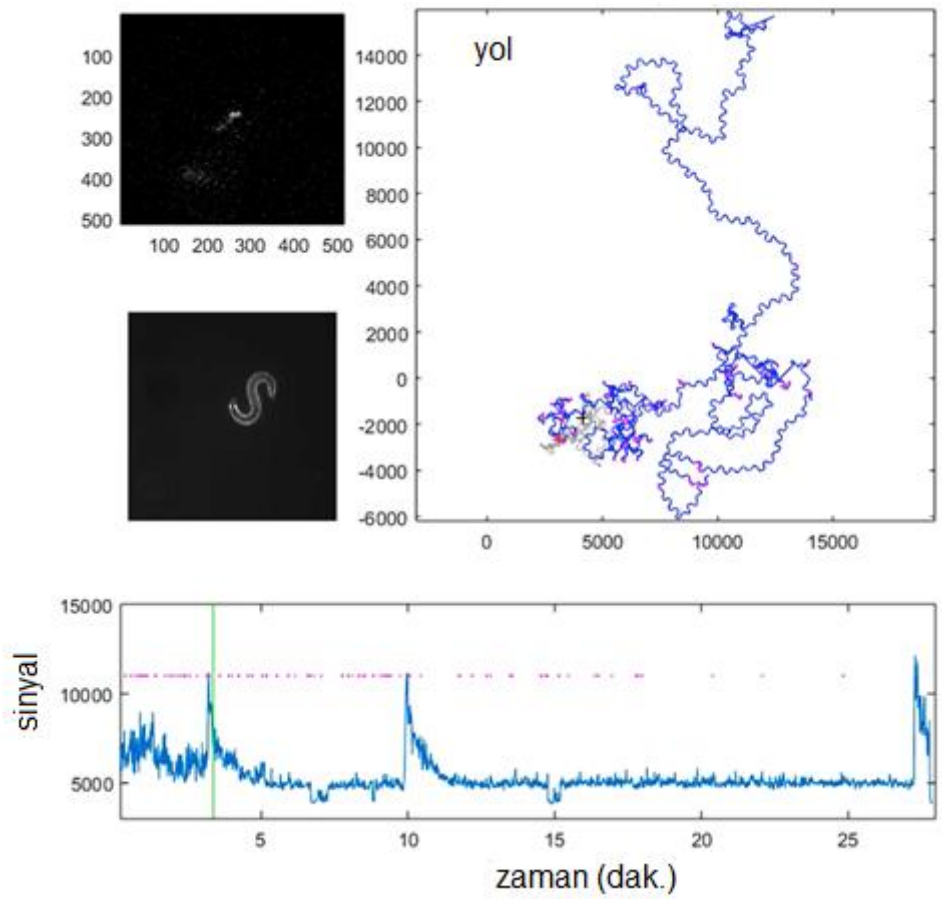
Şekil 11:AFD GCaMP sinyalinin sıcaklıktan bağımsız olduğunu gösteren deney sonucu. A) AFD sinir hücresinin kamera görüntüsü, B) *C.elegans* bütün vücudunu gösteren kamera görüntüsü. C) Deney sırasında canlının hareket ettiği güzergah. D) GCaMP sinyalinin zamana göre değişimi. Sinyalin zamanla değişmediği gözlemlenmiştir.

İkinci kontrol deneyi olarak AFD sinir hücresindeki GCaMP aktivitesi ölçülmüştür. Bu ölçüm, projenin tamamlanabilmesi için en kritik aşamalardan birini oluşturmaktadır. Dopamin salgılanmasından dolayı oluşacak aktivitenin AFD sinir hücresinin kendi aktiviteleri yüzünden yok olmaması gerekmektedir. AFD siniri normal şartlarda ortamın sıcaklık değişimlerini algılayan bir sinir hücresidir. Ortam sıcaklığı sabit kaldığı sürece herhangi bir aktivitenin oluşmaması gerekmektedir. Bu deneyde amaçladığımız durum oda sıcaklığında büyütülmüş olan canlıların

deney sırasında sıcaklık farkı hissetmemeleri ve sabit bir aktivite göstermesidir. GCaMP6s proteini gcy-8 promoter sekansı kullanılarak AFD hücresinde ürettirilmiştir. Bu kontrol canlısı bir önceki kontrol deneyinde olduğu gibi besin ortamı olmadan, sabit oda sıcaklığında (21 ^{0}C) görüntüleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 11 dört farklı veriyi özetlemektedir. Sol-üst bölge sinir hücresinin kamera görüntüsü, *C.elegans'ın* kamera görüntüsü, canlının hareket ettiği güzergah bilgisi ve sinir hücresinin parlaklığının zamana göre değişimi. Sonuç olarak, sinir hücresinde kendiliğinden kaynaklanan herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır. Böylece tetanus toxin (TeTx) proteini veya ekstra başka bir yöntem kullanmadan AFD sinir hücresini algılayıcıya dönüştürebileceğimiz anlaşılmıştır. Projemiz sonucunda görülen aktivite değişikliklerinin ise sağlıklı bir şekilde sadece dopaminden kaynaklanacağının güçlü bir delilini oluşturmaktadır.

5.2 Dopamin üreten CEP sinir hücresindeki hızlı aktivitelerin görüntülenmesi

CEP sinir hücresi dokunma duyusuna bağlı olarak dopamin üreten temel bir sinir hücresidir. Bu sinir hücresinde bugüne kadar yaptığımız bütün çalışmalarda herhangi bir ölçülebilen aktiviteye rastlanmamıştır. Proje çalışmaları sırasında bu problemin, oluşan aktivitenin çok hızlı olma ihtimali yüzünden okunamayabileceği ihtimali ortaya çıkmıştır. Bu aşamada son olarak kullandığımız GCaMP6s proteininin yeni üretilmiş hızlı bir versiyonu olan GCaMP6f proteini ile değiştirdik. Bu yeni versiyon CEP sinir hücresinde oluşan hızlı aktiviteleri okuyabilme ihtimali sağlamıştır. Şekil 12'de bu deney sonucu verilmektedir. İlginç bir şekilde canlı kendi üzerine dokunduğu anlarda gözlemlenebilir bir aktivite oluşmaktadır. Bu grafikte görüleceği üzere deney boyunca canlı üç kez kendisine dokunmakta ve 3 farklı sinyal üretilmektedir. Bu sonuç direk olarak dopamin üretimini göstermekle beraber temel bir engeli de ortaya koymaktadır. Bu sinirdeki ölçümler hızlı aktiviteler için iyi sonuç verebilir ancak ancak az miktarda salgılanan ve zamanla değişen aktiviteler için uygun değildir. Bir sonraki aşamada, projede geliştirdiğimiz teknikle ise bu yavaş oluşan aktiviteler üzerine odaklanılmıştır.



Şekil 12: CEP sinir hücresinden gelen GCaMP6f sinyalinin hızlı değişimlerini gösteren deney sonucu. A) CEP sinir hücresinin kamera görüntüsü, B) *C.elegans* bütün vücudunu gösteren kamera görüntüsü. C) Deney sırasında canlının harket ettiği güzargah. D) GCaMP6f sinyalinin zamana göre değişimi. *C.elegans'*ın kendi vücuduna dokunduğu an oluşan sinyaller gözükmektedir.

5.3. Dopamin algılayan AFD sinir hücresindeki aktivitelerin görüntülenmesi

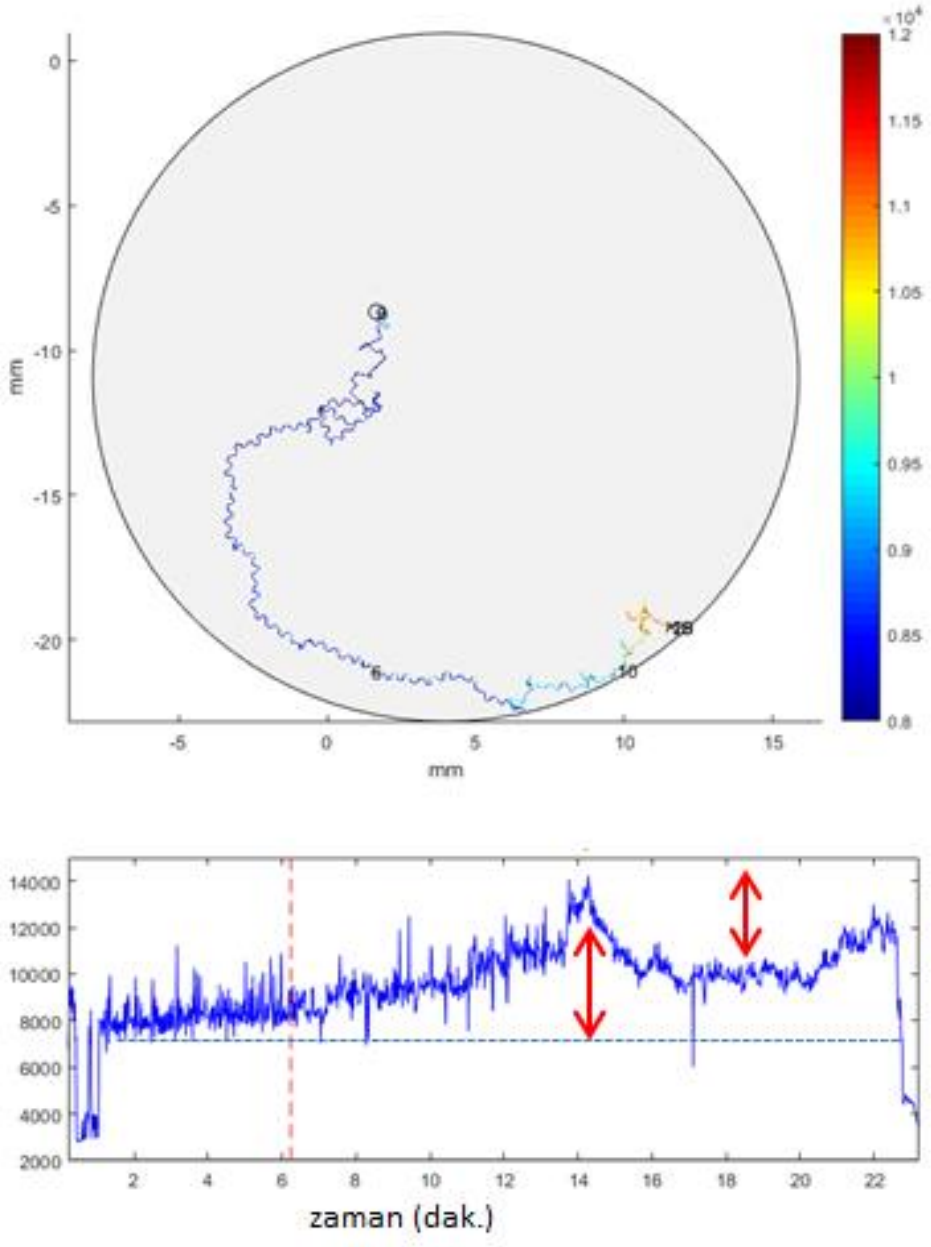
Bugüne kadarki çalışmalarda CEP sinir hücresinden dopamin salgılanmasına yönelik gözlemleyebildiğimiz tek sinyal hızlı olan aktivitelerdir. Ancak bu aktivitelerin davranışları etkileyen herhangi bir etkisi olmamıştır. Ancak dopamin molekülünün beyin genelinde çok ciddi bir değişime sebep olduğu kesindir. Bu sonuçlar altındaki öngörümüz oluşan hızlı aktiviteler sırasında dopamin üretiminin

çok az olduğu ve etkisinin de hızlı bir şekilde kaybolduğu yönündedir. Dopamin, *C.elegans* bakteriye dokunduğu anda salgılanan bir moleküldür. Bu deneyde gördüğümüz salgılama kendine dokunduğu anı göstermektedir. Kendine dokunma işlemi hızlı ve kısa sürelidir, oysa bakteriye dokunma ise uzun süreli bir işlemdir.

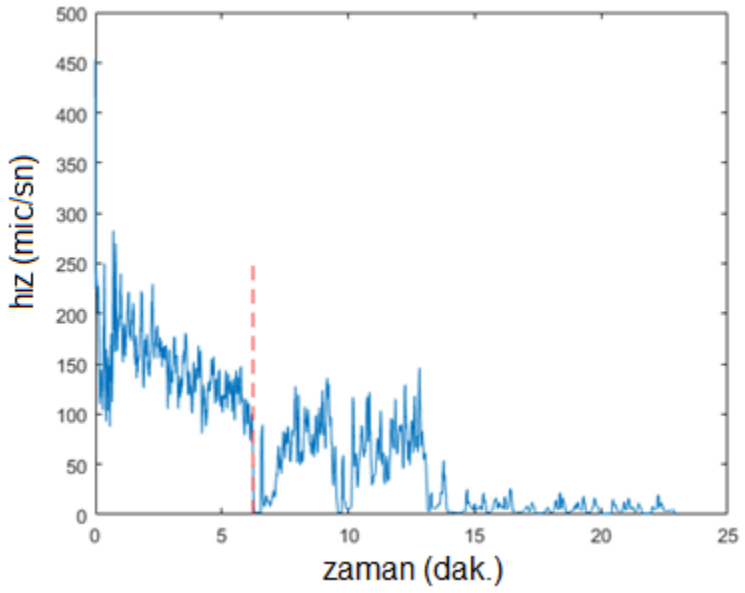
Proje kapsamında geliştirdiğimiz dopamin algılayıcısı ise *C.elegans'ın* beyninde salgılanacak olan dopamin sinyalini optik sinyale cevirecektir. Bu işlem sırasında yavaş oluşan molekül üretiminin dopamin reseptörlerine bağlanarak uzun süreli etki oluşturması öngörülmüştür. Bu sonucu test etmek için bugüne kadarki çalışmalarda elde ettiğimiz Dop-3 reseptörü ve AFD:GCaMP6s proteini içeren canlı, sabit sıcaklık altında görüntülenmiştir. Bu deney sırasında, *C.elegans,* etrafı bakteri ile çevrilmiş bir bölgenin ortasına yerleştirilmiştir. Canlı, bu bölgenin merkezinden harekete başlamaktadır. Bu deney taslağı canlının hem bakterisiz bölgede hemde bakteriye ulaşınca oluşacak olan aktiviteleri gözlemlemek için tasarlanmıştır.

Şekil 13 bu deney sonucunu özetlemektedir. Şekil 13'de canlının boş bölgeden başlayarak gittiği güzergah ve bu hareket sırasında oluşan aktiviteleri görülmektedir. Grafikten anlaşılacağı üzere AFD sinirinden okunan sinyal ilk önce artış göstermektedir. Bu artış canlı bakteriye dokunduğu anda ani bir azalışa dönüşmektedir.

Şekil 14 bu deney sırasında canlının hızını gösteren verileri içermektedir. Bu grafiğin de desteklediği üzere dopamin sinyalinin azalışa geçtiği an, canlının bakteriye girdiği zamandır. Bakteriye dokunan (14. dakika) canlı ani bir yavaşlama yapmakta ve bakteri yemeye başlamaktadır. Bu anda bakteriye dokunmadan kaynaklanan dopamin üretilmekte ve bu üretilen dopamin, AFD sinir hücresinindeki aktiviteyi azaltmaktadır. Bu öngörüye paralel olarak ilk aşamadaki AFD sinyaliyle alakalı olarak; bakterisiz ortamda bulunmaktan dolayı dopamin üretimi durmuş ve var olan dopamin molekülleri reseptörlerden zamanla ayrılmaya başlamıştır. Grafik üzerindeki kırmızı oklar aktivitedeki artış ve azalışları göstermektedir.



Şekil 13: Dopamin algılayıcısı (Dop-3 sensör) ile dopamin salgılanmasının ölçülme deneyi. A)Etrafı bakteri olan boş bir bölgeye bırakılan *C.elegans'ın* deney sırasındaki güzergahı. B) Deney sırasında dopamine duyarlı AFD sinirinden gelen GCaMP6s sinyali. Sinyalin zamanla arttığı ve bakteriye girince düştüğü gözükmektedir.

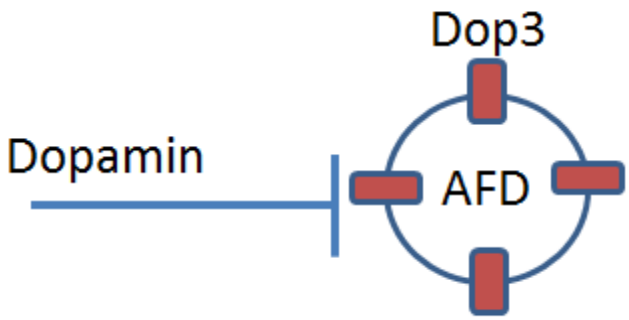


Şekil 14: Dopamin salgılanması sırasındaki hız değişimi. Canlı bakteriye dokundugu anlarda hızı ani bir şekilde azalmaktadır.

Bu deney sırasında kullanılan reseptör Dop-3 reseptörüdür. Bu sonuçlara göre Dop-3 reseptörü dopamin ile aktiviteyi azaltıcı yönde çalışmaktadır. Şekil 15 ise bu deneyler sonucu ulaştığımız modeli göstermektedir. Dopamin, Dop3 reseptörü üzerinden sinir aktivitesini azaltmaktadır. Dopamin, bakteri ile olan etkileşimden dolayı salgılanmakta ve *C.elegans* bakteriden ayrıldığında, zamanla azalmaktadır. Bu deney sonucunda, dopamin ile Dop-3 reseptörü arasındaki ters etkileşimden dolayı GCaMP sinyalinde artış görülmüştür. Bu sonuçlar bu proje kapsamında hedeflediğimiz en çarpıcı veriyi göstermektedir.

Proje önerisi sırasında ileri attığımız hipotez dopamin molekülünün ödüllendirme ve sinyal işleme görevlerini kontrol ettiği yönündeydi. Bu deney sonuçlarına göre bakteriye dokunma ve dopamin salgılanması bir ödüllendirme mekanizması gibi çalışmaktadır. Bu veriye ek olarak bakteri ortamında koku seviyesi oldukça yüksektir. Dop-3 reseptörü ile belirli bir sinir hücresi kümesinin aktivitesi azalmaktadır. Bu işlem retinada gördüğümüz ışık yoğunluğu kontrolüne çok benzemektedir. Dop-3 reseptörünün hangi sinirlerde üretildiği ve bu sinirlerin hangi fonksiyonlarının kontrol edildiği üzerine gidilmesi gereken yeni bir konudur.

Bunlara ilave olarak, *C.elegans'ın* bakterisiz bir ortamda dopamin molekülünün azaldığı görülmektedir. Bu veri hipotezimizi desteklemektedir. Çünkü bakteriden uzak bölgelerde koku seviyesi düşmekte ve hassasiyetin arttırılması gerekmektedir. Bu verilerin retina ile olan çarpıcı benzerliği projenin genel hitap ettiği kesimi genişletmektedir. Bu sonuçlar oldukça heyecen verici olmakla beraber birçok soruyu daha ortaya çıkarmıştır. Proje ileriki zamanlarda bu yönlere doğru genişletilecektir.



Şekil 15: Dop-3 reseptörü için deney sonuçlarından çıkarılan model. Dopamin reseptörü (Dop-3) ile sinir hücrelerinin aktivitesini engelleme yönünde işlem yapmaktadır.

6 Sonuç

Bu proje kapsamında *C.elegans* sinir sisteminde salgılanan dopamin molekülünün üretilmesi gözlemlenmiştir. Bu molekül üretildikten sonra beyin bölgesinde yayılarak sinir hücrelerinin aktivitelerini kontrol etmektedir. Ancak *C.elegans* model canlısında bu molekülün salgılanmasının incelenmesi teknik olarak mümkün değildir. Bu projede dopamin molekülüne has bir reseptör (Dop3) kullanılarak AFD sensör siniri dopamine duyarlı hale getirilmiştir. Optogenetik GCaMP proteini, reseptör ile beraber üretilerek dopamin molekülünün etkisi optik sinyale dönüştürülmüştür.

Proje kapsamında geliştirilen mikroskop sistemi ile canlı hareket halinde yiyecek ararken dopamin molekülünün salgılanması gözlemlenmiştir. Bu projede daha

önceden öngörülmemiş, hızlı ve yavaş olmak üzere, iki farklı aktivite dinamiği ortaya çıkmıştır. Hızlı dopamin etkisi CEP sinir hücrelerini direk olarak okuyarak gözlemlenmiştir. Ancak bu salgılamanın davranışlar üzerine olan etkisi henüz anlaşılamamıştır. Bir diğer taraftan yavaş olan dopamin aktivitesi ise geliştirilmiş olan dopamin algılayıcı hücresi ile gözlemlenmiştir. Üretmiş olduğumuz yeni metod ile yavaş ve az üretilen bu molekülün etkisini ölçebilecek kabiliyete sahip olduğumuz gösterilmiştir.

Bu projede Dop-3 reseptörünün sinir hücreleri üzerinde aktiviteyi engelleyici bir etki yaptığı ortaya çıkmıştır. Algılayıcı sinyal olarak bu etki, dopamin arttığında, GCaMP aktivitesinde azalan bir sinyal olarak gözükmektedir.

İleriki çalışmalarda bu metodu diğer dopamin reseptörleri ve serotonin gibi diğer önemli moleküllerin salgılanmasının incelenmesinde de kullanmayı öngörüyoruz.

Bu proje kapsamında elde edilen veriler literatüre tamamen yeni bir katkı sağlayacaktır, verileri içeren yayın hazırlık aşamasındadır.

7 Kaynakça

Arantza Barrios, S. N. (2008). "Sensory Regulation of C. elegans Male Mate-Searching Behavior", Current Biology, 18(2), 1865–1871.

Arnaud Muller, V. J. (2014). "C ell-based reporters reveal in vivo dynamics of dopamine and norepinephrine release in murine cortex", Nature methods, 5(1), 1245-1252.

Brenner, S. (1974). "The genetics of Caenorhabditis elegans", Genetics, 2(2), 71-94.

Chase DL, P. J. (2004). "Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in Caenorhabditis elegans" , Nature Neurosci. , 10(1), 1096-1103.

Chen, T.-W. e. (2013). "Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity", Nature , 499(12), 295–300.

Day, J. K. (2001). "Application of in vivo microdialysis to the study of cholinergic systems" , Methods, 5(32), 21-39.

Djamgoz MBA, W. H.–J. (1991). " Localization and function of dopamine in the adult retina" , Neurochem. Int, 139-191.

Elizabeth E Steinberg, R. K. (2013). " A causal link between prediction errors, dopamine neurons and learning", Nature Neuroscience, 966-973.

Gareth P. Harris, V. M. (2009). "Three Distinct Amine Receptors Operating at Different Levels within the Locomotory Circuit Are Each Essential for the Serotonergic Modulation of Chemosensation in Caenorhabditis elegans", The Journal of Neuroscience, 29, 1446 –1456.

Glimcher, P. (2011). "Understanding dopamine and reinforcement learning: the dopamine reward prediction error hypothesis", Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 15647–15654.

Hills T, B. P. (2004). "Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in Caenorhabditis elegans", J Neurosci. , 1217-1242.

Iino, Y. &. (2009). "Parallel use of two behavioral mechanisms for chemotaxis in Caenorhabditis elegans", J Neurosci, 29, 5370-80.

John S. Satterlee, W. S. (2004). "The CMK-1 CaMKI and the TAX-4 Cyclic Nucleotide-Gated Channel Regulate Thermosensory Neuron Gene Expression and Function in C. elegans", Current Biology, 14, 62-68.

Kagoshima H. (2015). Co-expression of the transcription factors CEH-14 and TTX-1 regulates AFD neuron-specific genes gcy-8 and gcy-18 in C. elegans. Dev Biol. 399(2):325-36.

Kocabas, A. S. (2012). "Controlling interneuron activity in Caenorhabditis elegans to evoke chemotactic behaviour" , Nature , 940, 273–277.

Lijun Kang, J. G. (2010). "C. elegans TRP Family Protein TRP-4 Is a Pore-Forming Subunit of a Native Mechanotransduction Channel" , Neuron, 381–391.

Lisa A. Gunaydin, L. G. (2014). "Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behavior" , Cell, 157, 1535-1551.

Marina Ezcurra, Y. T. (2011). "Food sensitizes C. elegans avoidance behaviours through acute dopamine signalling" , The EMBO Journal, 1–13.

Marta Maria Gaglia, C. K. (2009). "Stimulation of Movement in a Quiescent, Hibernation-Like Form of Caenorhabditis elegans by Dopamine Signaling" , The Journal of Neuroscience, 7302-7314.

Min Guo, T.-H. W.-X.-H.-M.-P.-L.-J.-L.-M.-P.-X. (2014). " Reciprocal inhibition between sensory ASH and ASI neurons modulates nociception and avoidance in Caenorhabditis elegans" , Nature Communications, 6, 5655-5660.

Nagel, G. e. (2003). " Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel", Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 13940-5.

Robinson, D. V. (2003). "Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry in vivo", Clin. Chem., 1763–1773.

Schultz, W. D. (1997). "A neural substrate of prediction and reward" , Science, 1593–1599.

Serge Dernovici, T. S. (2006). "The Serotonin Receptor SER-1 (5HT2ce) " , InterScience, 189-204.

Steven W. Flavell, N. P. (2013). "Serotonin and the Neuropeptide PDF Initiate and Extend Opposing Behavioral States in C. elegans", Cell, 154(5), 1023–1035.

Wang D. (2013). “GCY-8, PDE-2, and NCS-1 are critical elements of the cGMP-dependent thermotransduction cascade in the AFD neurons responsible for C. elegans thermotaxis”. J Gen Physiol. 142(4):437-49.

White, J. S. (1986). "The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans" ,Philos Trans R Soc Lond B Biol Sc, 1-340.

Witkovsky P, D. A. (1991). " Functional roles of dopamine in the vertebrate retina" , Prog Ret Res , 247–292.

Witkovsky, P. (2004). "Dopamine and retinal function" , Documenta Ophthalmologica, 17-40.

Zeynep F. Altun, B. C.-W. (2009). "High resolution map of Caenorhabditis elegans gap junction proteins" , Developmental Dynamics, 1936–1950.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. AŞKIN KOCABAŞ
Proje No:	115S666
Proje Başlığı:	Hareketli C.Elegans'ın Sinir Sisteminde Dopamin Salgılanmasının Optik Olarak Ölçülmesi
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	KOÇ Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/09/2015 - 01/09/2017
Onaylanan Bütçe:	562000.0
Harcanan Bütçe:	423638.88
Öz:	Dopamin canlıların sinir sistemi üzerinden birçok temel davranışın kontrol ve düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu molekülün sinir sisteminde eksikliği temel pisikolojik hastalıklara yol açmaktadır. Canlıların beyin yapılarında dopamin salgılanması ve aynı zamanda canlının hareketlerine olan etkisinin aynı anda tespit edilmesi oldukça zor bir problemdir. Böyle bir çalışmanın Parkinson ve şizofrenlik gibi pisikolojik hastalıkların, ayrıntılı anlaşılmasında ciddi bir önemi vardır. Bu projede temel olarak özgün optik ve genetik metotlar geliştirerek C.elegans in beyin hücrelerinde Dopamin salgılanmasının ölçülmesi ve bu salgılanmanın canlının davranışları üzerine olan temel etkileri incelenmiştir. Bu projede geliştirilen özgün metot temel olarak C.elegans in beyin hücrelerinden bir tanesinin fonksiyonlarının değiştirilerek dopamine duyarlı hale dönüştürülmesi ve bu duyarlılık ve optogenetik proteinler sayesinde dopamin seviyelerinin optik sinyal olarak okunmasına dayanmaktadır. Bu metodu optik reseptör hücre metodu olarak adlandırmaktayız. Bu metot sayesinde canlının davranışlarını gerçekleştirirken aynı zamanda dopamin seviyesinin de tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu ölçüm C.elegans için literatürde ilk kez gerçekleştirilmiştir. Bu alandaki zorluk dopamin salgılayan hücrelerdeki aktivitelerin ölçülememesinden kaynaklanmaktadır. Literatürde kullanılan alternatif metotlar canlıdan alınan örneklerin analizi sonucunda dopamin seviyesi tespit edilebilmektedir, yada beyin bölgesine yerleştirilen elektrotlar sayesinde seçici olmadan ölçüm yapılabilmektedir. Bir diğer metod ise dopamine duyarlı hücreler enjeksiyon ile beyin dokusuna yerleştirilmesidir. Bu metotlarin hiç biri C.elegans gibi hassas canlılar için uygun değildir. Geliştirdiğimiz metot bu problemleri tamamen aşabilecek kapasitede olup ayni zamanda canlının davranışlarını uzun süre takip etmemizde olanak sağlamaktadır. Bu metod sayesinde gözlemlediğimiz temel davranış yiyecek bulma sırasında kimyasal koku takibidir. Bugüne kadarki çalışmalar dopamin in sensor sinirlerde sinyal algılamasında ve canlının yiyecek bulma sırasında ödüllendirilme güdülerinde çok temel roller oynadığını göstermiştir. C.elegans in bu davranışı ve dopamin seviyelerinin tespiti sayesinde bütün bu kontrol mekanizmalarının ayrıntılarını ortaya çıkarmayı amaçlamaktayız.
Anahtar Kelimeler:	Dopamin, C.elegans, optik görüntüleme, optogenetik
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

TÜBİTAK