



T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROBİLİM ANABİLİM DALI
NÖROBİLİM YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LPS İNDÜKLÜ HMC3 MİKROGLİA NÖROİNFLAMASYON
MODELİNDE TOPOIİB GEN İFADESİNİN SUSTURULMASININ
İNCELENMESİ**

Melike Cansel EREN

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sevim IŞIK**

İSTANBUL-2022

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROBİLİM ANABİLİM DALI
NÖROBİLİM YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LPS İNDÜKLÜ HMC3 MİKROGLİA NÖROİNFLAMASYON
MODELİNDE TOPOİİB GEN İFADESİNİN SUSTURULMASININ
İNCELENMESİ**

Melike Cansel EREN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sevim IŞIK

İSTANBUL-2022

ÖZET

LPS İNDÜKLÜ HMC3 MİKROGLİA NÖROİNFLAMASYON MODELİNDE TOPOII β GEN İFADESİNİN SUSTURULMASININ İNCELENMESİ

DNA topoizomeraz enzimi DNA'nın çift sarmal yapısındaki topolojisinin kontrolü ve korunmasında etkin role sahip bir enzimdir. Memeli hücrelerinde DNA topoizomeraz II (topo II)'nin iki izoformu (topo II α ve topoII β) bulunmaktadır. Topo II β bütün dokularda özellikle farklılaşmış dokularda bulunur, bazı nöronal genlerin transkripsiyonlarının başlamasını kontrol eder.

Nörodejenerasyonun nöron bozunması ayağında topo II β 'nın etkin olduğu düşünülmektedir. Topo II β geni susturulmuş mezenkimal kök hücrelerde, nörodejeneratif hastalıklarla alakalı genlerde artış, Alzheimer modellerinde, topo II β 'nın ifade düzeyinde azalma, Parkinson modelinde Topo II β geninin ifadesinin susturulmasının nörit gelişimini bozmakta olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada nörodejeneratif hastalıkların bir başka parametresi olan nöroinflamasyon üzerinde durulmuştur. Mikroglialar iki temel fenotipe sahiptir: M1 mikroglialar akut inflamasyonda ortaya çıkarak hasar bölgesinde patojene karşı savaşırken, M2 fenotipi bölgeyi korumakta ve tekrar yapılandırmaktadır. Dolayısıyla hücrelerin popülasyonundaki polarizasyonu doğrudan hastalık sürecini etkilemektedir. Bu çalışmada Topo II β gen ifadesinin susturulmasının inflamasyon sürecine etkisi araştırılmıştır. Topo II β gen ifadesi susturulmuş HMC3 insan mikroglia hücrelerinde LPS ile inflamasyon modeli oluşturulmuş ve popülasyondaki polarizasyon değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre Topo II β gen ifadesinin susturulması M2 mikroglia fenotipinde artışa, M1 mikroglia tipinde ise azalmaya sebep olmaktadır ayrıca, kontrol grubuna kıyasla aktif inflamasyonu baskılamaktadır. Bu durum mikroglialarda topo II β gen ifadesinin susturulmasının kronik inflamasyon sürecinin bozunmasına iyileşmeye teşvikte etkin olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu fenotip değişimi mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışma daha ziyade öncül veri niteliği taşımaktadır. Fenotip değişikliği mekanizmaları, mitokondrial deformasyonların bu sürece etkisi daha ayrıntılı olarak çalışmalıdır. Bu bağlamda nöroinflamasyon mekanizmanın anlaşılması adına, olası töröpotik hedefler adına umut vericidir.

Anahtar Kelimeler: Mikroglia, HMC3, DNA Topoizomeraz II Beta, Nöroinflamasyon, Nöroimmunoloji

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SILENCING TOPOII β GENE EXPRESSION IN LPS INDUCED HMC3 MICROGLIA NEUROINFLAMMATION MODEL

DNA topoisomerase enzyme is an enzyme that has an active role in the control and protection of the topology of the double helix structure of DNA. There are two isoforms (topo II α and topoII β) of DNA topoisomerase II (topo II) in mammalian cells. Topo II β is found in all tissues, especially in differentiated tissues, controlling the initiation of transcription of certain neuronal genes.

It is thought that topo II β is active in the neurodegeneration leg of neurodegeneration. It was determined that in mesenchymal stem cells where the topo II β gene was silenced, an increase in genes related to neurodegenerative diseases, a decrease in the expression level of topo II β in Alzheimer models, and silencing of the expression of the Topo II β gene in the Parkinson model impairs neurite development. Microglia have two basic phenotypes: M1 microglia appear in acute inflammation and fight the pathogen at the site of injury, while the M2 phenotype protects and reconstructs the site. Therefore, the polarization of the cells in the population directly affects the disease process. In this study, the effect of silencing Topo II β gene expression on the inflammation process was investigated. Inflammation model was established with LPS in HMC3 human microglia cells with silenced Topo II β gene expression and polarization in the population was evaluated. According to our data, silencing of Topo II β gene expression causes an increase in M2 microglia phenotype and a decrease in M1 microglia type, and suppresses active inflammation compared to the control group. This suggests that silencing of topo II β gene expression in microglia may be effective in promoting healing and degradation of the chronic inflammation process. However, the mechanism of this phenotype change has not been fully elucidated. This study is rather preliminary data. The mechanisms of phenotype change and the effect of mitochondrial deformations on this process should be studied in more detail. In this context, the understanding of the neuroinflammation mechanism is promising for possible therapeutic targets.

Keywords: DNA TopoII β , Microglia, HMC3, Neuroinflammation, Neuroimmunology

TEŞEKKÜR

Çalışmamda bana yol gösteren ve destek olan tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Sevim IŞIK’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecim boyunca tüm araştırmalarımnda yardımcı olan başta laboratuvar sorumlumuz olan Berçem YEMAN KIYAK’a ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans hayatım boyunca ve tez yazım sürecinde verdiği destekle stresle baş etmemi sağlayan arkadaşım Osman KAMALI ve sevgili hocam Doç. Dr. Pınar ÖZ’e, hayatım boyunca beni tüm kararlarımnda destekleyen, maddi ve manevi varlıklarıyla yardımlarını esirgemeyen, her an yanımda olan haklarını asla ödeyemeyeceğim canım ailem babam ve ablama, aramızda olmasa da her zaman desteğini hissettiğim çalışkanlığını ve disiplinin örnek aldığı rahmetli anneme teşekkürleri bir borç bilirim.

TÜBİTAK 1001 219S842 nolu “DNA Topoizomeraz IIβ’nın Nöroinflamasyondaki Rolünün Parkinson Hastalığı A53T α-Sinüklein Mutant Transgenik Fare Modelinde Araştırılması ve İlgili Moleküler Yolakların *İn Vitro* Aydınlatılması” proje kapsamında gerçekleştirdiğim çalışmalarımnda katkıları için TÜBİTAK’a çok teşekkür ederim.

BEYAN FORMU

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, tarafımdan üretildiğini ve şkdar niversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim

30.06.2022

Melike Cansel EREN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN FORMU	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. DNA Topoizomerazların Yapıları, Sınıflandırılmaları ve Fonksiyonları.....	2
2.1.1. Tip I topoizomerazlar.....	4
2.1.2. Tip II DNA topoizomerazlar.....	4
2.1.3. Topoizomeraz IIβ.....	6
2.1.3.1. Topoizomeraz IIβ'nın beyin gelişimi ve nöronal farklılaşmaya etkisi	7
2.1.3.2. Topoizomeraz IIβ'nin immün sistem ile ilişkisi	9
2.1.3.3. Topoizomeraz IIβ inhibitörleri.....	10
2.2. Nöroinflamasyon	11
2.2.1. Nöroinflamasyonun olumlu sonuçları	15
2.2.2. Nöroinflamasyonun olumsuz yönleri.....	17
2.3. LPS Modeli	19
2.4. Mikroglialar	20
2.4.1. Gelişim sırasında mikrogliaların katkıları	22
2.4.2. Yetişkin beyin homeostazisi sırasında mikroglia işlevleri	24
2.4.3. MSS hastalıklarına yanıt veren ve indükleyiciler olarak mikroglia	25

2.4.4. Mikroglia polarizasyon M1/M2 fenotipleri	28
2.4.4.1. M1 polarizasyonu	29
2.4.4.2. M2 polarizasyonu	31
2.4.5. Human mikroglia kolon III(HMC3) hücre hattı	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. HMC3 Hücre Hattının Hücre Kültürü	34
3.1.1. HMC3 hücre hattın dondurulması ve çözünmesi	34
3.1.2. HMC3 hücre hattın besi yeri değişimi ve kültürlenmesi	35
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Deseninin Oluşturulması.....	36
3.2.1. Deney deseninin oluşturulması.....	36
3.2.2. Kontrol grubunun oluşturulması.....	36
3.2.3. Topoizomeraaz 2β'nın susturulması.....	37
3.2.3.1. HMC3 hücrelerinin lipofectamine RNAiMAX ile muamele edilmesi.....	37
3.2.3.2. MTT hücre proliferasyon kiti ile hücre sağkalımının saptanması	38
3.3. Nöroinflamasyon Modelinin Oluşturulması	38
3.4. Teyit Analizleri	39
3.4.1. Western blot.....	39
3.4.1.1. Protein izolasyonu.....	40
3.4.1.2. Protein tespiti	43
3.4.2. RT-QPCR.....	46
3.4.2.1. RNA izolasyonu.....	46
3.4.2.2. cDNA sentezi	47
3.4.2.3. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-QPCR).....	48
3.4.3. Nöroinflamasyon modelinin teyiti	49
3.4.3.1. Akış sitometrisi	49
4. BULGULAR.....	52
4.1. Hücre Kültürünün Optimizasyonu.....	52

4.2. TopII β İfadesinin Susturulmasının Optimizasyonu	53
4.2.1. Top II β siRNA toksisitesinin hesaplanması.....	53
4.2.2. Top II β susturulmasının protein düzeyinde ifadesinin teyit edilmesi.....	53
4.2.3. TopII β susturulmasının RNA düzeyinde ifadesinin teyit edilmesi.....	55
4.3. Nöroinflamasyon Modelinin Optimizasyonu	56
4.3.1. LPS toksisite seviyesinin saptanması	56
4.3.2. Akış sitometrisi ile nöroinflamasyon modelinin teyiti	57
4.4. TopoII β Geninin Susturulduğu HMC3 Hücre Hattında Nöroinflamasyon Modeli Oluşturulması.....	68
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
KAYNAKLAR	78

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1: 4X örnek solüsyonu (sample buffer) tablo takip edilerek hazırlanmıştır	41
Tablo 2: BSA standartları tablo takip edilerek hazırlanmıştır	42
Tablo 3: 10X blotting solüsyonu hazırlanması	45
Tablo 4: 10X TBS solüsyonunun hazırlanması	45
Tablo 5: New TBS hazırlanması.....	46
Tablo 6: TBS solüsyonun hazırlanması	46
Tablo 7: Genomik DNA uzaklaştırma reaksiyonu bileşenleri	47
Tablo 8: Ters transkripsiyon enzim reaksiyonu bileşenleri	48
Tablo 9: Ters transkripsiyon sıcaklık protokolü	48
Tablo 10: q-PCR her numune için hazırlanan reaksiyon bileşenleri	49
Tablo 11: RT-qPCR için kullanılacak primerlerin listesi.....	49
Tablo 12: 24 ve 48 saatlik örneklerin protein konsantrasyonları.....	54
Tablo 13: RNA konsantrasyonları LVisPlate ile ölçüm sonucu	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1: Topoizomerez I (a) ve Topoizomerez II (b) alt gruplarının çalışma mekanizması	3
Şekil 2: Topo IIa ve topo IIβ birincil yapısı	6
Şekil 3: Topoizomerez 2β protein modeli	6
Şekil 4: Topoizomerez 2β çalışma mekanizması	7
Şekil 5: Tüm vücut topo IIβ nakavt farelerin perinatal ölümü göstermiştir	9
Şekil 6: Topo II β inhibitörlerinin çalışma mekanizmasının gösterimidir	11
Şekil 7: Nöroinflamasyonun pozitif ve negatif etkileri	14
Şekil 8: Mikroglia fonksiyonları	22
Şekil 9: İnflamasyon durumunda mikrogliaların diğer sinir sistemi hücreleriyle etkileşimi	27
Şekil 10: Mikroglia fenotip polirizasyonu.....	29
Şekil 11: Deney deseni	36
Şekil 12: Kültürlenmiş HMC3 hücrelerinin pasaj 5 (üst) ve pasaj 18 (alt) faz fotoğrafları. Mikroskop görüntüleri 10X(sol) ve 40X(sağ) objektifte alınmıştır.....	52
Şekil 13: 24 saatlik siRNA konsantrasyonlarının (20 mg/ml;17,5 mg/ml; 15 mg/ml; 12,5 mg/ml; 10mg/ml; 7,5 mg/ ml) toksisite seviyeleri MTT analizi.....	53
Şekil 14: 24 ve 48 saatlik örneklerin protein konsantrasyonlarının standart eğrisi BCA kiti kullanılarak hazırlandı	54
Şekil 15: 24 saat boyunca 7,5, 10 ve 12,5 nM konsantrasyonlarda siRNA uygulanan HMC3 hücrelerinin western blot sonucu	55
Şekil 16: RT- qPCR eğrisi.....	56
Şekil 17: Genlerin nispi ekspresyonu $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile saptandı.....	56
Şekil 18: LPS modelinin 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri MTT analizi kullanılarak ölçülmüştür	57
Şekil 19: Unstained; kontrol; 0.1 ug/ml; 0.5 ug/ml; 1 ug/ml; 2.5 ug/ml; 5 ug/ml konsantrasyonlarda LPS ile 48 saat muamele edilmiştir	58
Şekil 20: İnterferon-gamma (10 ng/ml; 50 ng/ml) ile muamele edilmiş 24 saatlik nöroinflamasyon modeli	60

Şekil 21: 1 ug LPS + 50 ng IFN; 1 ug LPS + 25 ng IFN ile muamele edilmiş 24 saatlık nöroinflamasyon modeli	62
Şekil 22: 1 ug LPS + 50 ng IFN; 1 ug LPS + 25 ng IFN ile muamele edilmiş 48 saatlık nöroinflamasyon modeli	63
Şekil 23: 1 ug LPS; 50Mm ATP, 1 ug LPS +50 Mm ATP; 1ug LPS +10 ng IFN; 10 ng IFN ile muamele edilmiş 24 saatlık nöroinflamasyon modeli	64
Şekil 24: 1 ug LPS; 50Mm ATP; 1 ug LPS +50 Mm ATP; 1ug LPS +10 ng IFN; 10 ng IFN ile muamele edilmiş 48 saatlık nöroinflamasyon modeli	66
Şekil 25: Deney gruplarının faz fotoğrafları 10X (sol) ve 40X (sağ) merceklerle, Carl Ziess Inverted Microscope vasıtasıyla çekilmiştir	68
Şekil 26: LPS 1 ug veya interferon-gama 10 ng veya LPS 1 ug ve interferon-gama 10 ng muamelesiyle oluşturulan 24 saatlık nöroinflamasyon modelleri akış sitometrisi sonuçları	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH: Alzheimer Hastalığı

ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz

AMPA: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit

BCA: Bikinkoninik Asit Tahlili

C1q: Kompleman Proteini 1q

CREB: Cyclic Ampresponse Element Binding Protein

CX3CR1: CX3 Kemokin Reseptörü 1

GABA: Gama- Amino Bütirik Asit

IFN γ : Interferon Gamma

IGF1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1

IL: İnterlökin

İBA 1: Allograft İnflammatory Faktör 1

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

LPS: Lipopolisakkarit

M1: Mikroglia Fenotip I

M2: Mikroglia Fenotip II

MHCI: Majör Histokompatibilite Kompleksi I

MHCII: Majör Histokompatibilite Kompleksi II

MS: Multiple Skleroz

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

MTT: 3-4-,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum Bromür Testi

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Hidrojen Oksidaz

NMDA: N-metil-D-aspartik asit

NO: Nitrit Oksit

NOD: Nükleotid Bağlayıcı Oligomerizasyon Alanları

NPH: Nöronal Progenitör Hücrelerin

NURR 1: Nükleer Reseptör 4A2

O₂⁻: Süperoksit Anyonu

ONOO⁻: Peroksinitrit

P2Y12: Adenozin Difosfat Kemoreseptörü

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

PGE2: Prostaglandin E2

PH: Parkinson Hastalığı

PPP: Pentoz Fosfat Yolu

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SH-SY5Y: Nöroblastoma Hücre Hattı

siRNA: Susturucu RNA

SOD₃: Süperoksit Dismutaz

TH: Tirozin Hidroksilaz

TLR: Toll Benzeri Reseptör Ailesi

TLR4: Toll Benzeri Reseptör 4

TNF-α: Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TOPO I: Topoizomeraz I Gen Ailesi

TOPO II: Topoizomeraz II Gen Ailesi

TOPO IIα: Topoizomeraz 2 alfa Geni

TOPO IIβ: Topoizomeraz 2 beta Geni

Top IIβ: Topoizomeraz 2 beta Proteinini

TSPO: Translokator Protein



1. GİRİŞ

Kronik, dejeneratif nörolojik hastalıklarda ve nöropsikiatrik hastalıkların toplumda görülme sıklığı her geçen gün artmasına rağmen patogenezi tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Patogenezin aydınlatılması bittabi tanı ve tedavi parametrelerini baştan sona değiştirebilecek, hasta refahını optimale taşımamızı sağlayacaktır. Nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların patogenezine dair oldukça karışık pek çok genetik ve çevresel faktör öne sürülmektedir. Son yıllarda olası patoloji sebeplerinden en öne çıkanı kontrol altına alınamayan, süregelen inflamasyonun tahrip edici etkisi olduğu düşünülmektedir. Hem çevresel hem de genetiğin etkisi inflamasyon sürecini etkilerken kontrol edilemeyen inflamasyonun amacından sapıp hastalığa neden olacağı düşünülmektedir.

Beyin gibi yürütücü özelliği ile göz önünde bulunan bir organın aynı zamanda optimal korunma ve savunmayla donatılmış olması şaşırtıcı değildir. Ancak sinirbilimin başlangıcından bu yana ziyadesiyle tüm hastalıkların nöronlardaki doğrudan bozunmalar ile oluştuğu düşünülmüştür. Uzun zamandır bu alanda çalışılmasına rağmen elle tutulur yanıtlar alınamaması, sistemin daha komplike parametrelere bağlı olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda nöronların etkileşim kurduğu diğer sinir sistemi elemanları olan mikroglialar ve makroglialar önem kazanmıştır. Bu çalışma ile mikrogliaların yapıları, gen ekspresyon seviyelerinin inflamatuvar süreçlere etkisi üzerinde durulmaktadır. Konuyu en temelinden ele alıp yapısal bir yaklaşım ortaya koymak istenerek DNA morfolojisi için oldukça değerli, çok temel bir protein ailesi olan topoizomeraz grubundan topoizomeraz II β ile çalışılmıştır. Daha öncesinde yapılan çalışmalarda topo II β 'nın ekspresyon seviyesinde gerçekleşen değişimlerin nöron gelişimine etkisi kanıtlanmıştır (Yang ve ark., 2000), ayrıca bu proteinin nöron maturasyonunda oldukça önemli olduğu, gelişimsel basamaklarda hayati değer taşıdığı gösterilmiştir((Lyu ve ark. 2006, Sano ve ark. 2008), yetişkinlerde ise nöron morfolojisinde dramatik etkileri olduğu bununda nörodejeneratif hastalıklarda oldukça önem arz edebileceği düşünülmektedir (Işık ve ark., 2014; Terzioğlu-Uşak ve ark., 2017). Bu çalışma ile nöron gelişimi için bu kadar önemli olan TopII β ekspresyonun mikroglialar üzerine etkisi araştırılmış. Genin susturulmasının mikroglia fenotipine ve inflamasyon seyrine etkisi araştırılmıştır.

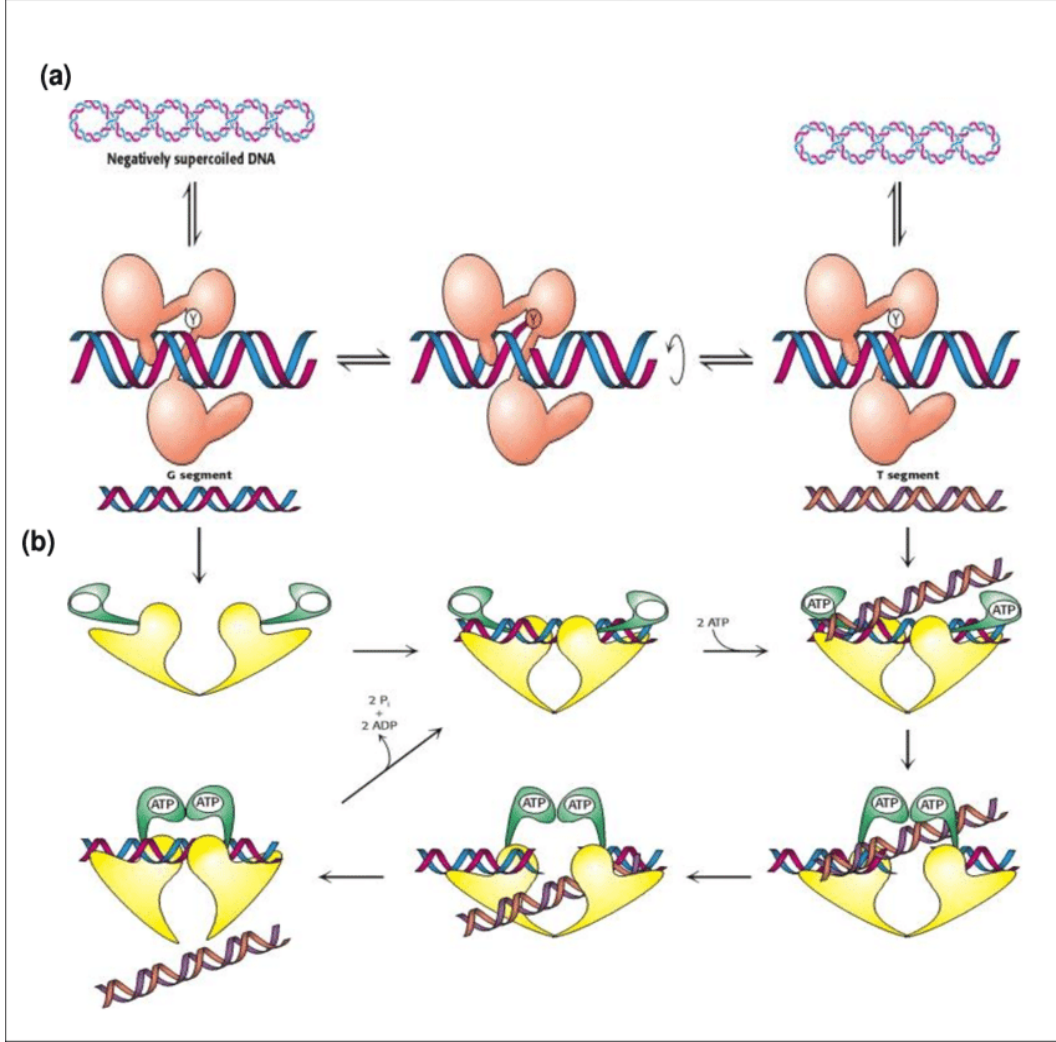
2. GENEL BİLGİLER

2.1. DNA Topoizomerazların Yapıları, Sınıflandırılmaları ve Fonksiyonları

DNA'da üretimi çok hassas bir süreç olup pek çok alt basamaktan oluşmaktadır. Bu üretim esnasında pek çok hata gelişme riski mevcuttur. DNA metabolizmasının ilerlemesi için bu topolojik bozulmalar çözülmeli ve hücrenin hücresel bölünme ve canlılık sağlamak için genomu verimli bir şekilde çoğaltmasına, transkripte etmesine ve bölümlenmesine izin verilmelidir. DNA topolojisini kontrol etmede bu hayati rolleri yerine getirmekten sorumlu olan temel proteinlere DNA topoizomerazları denir. DNA topolojisini manipüle edebilen DNA topoizomerazlar, DNA metabolizması sırasında oynadıkları sayısız rol nedeniyle hücresel hayatta kalma için çok önemlidir, tüm hücre tiplerinde bulunurlar ve vazgeçilmezdirler (Wang ve ark., 1996; Wang ve ark. 2002). Tüm topoizomerazlar, nükleik asit omurgasının fosfatına nükleofilik bağlanma yoluyla DNA bölünmesini başlatan aktif bölge tirozil kalıntılarına sahiptir. Ortaya çıkan transesterifikasyon reaksiyonu, proteini DNA zincirinin yeni oluşturulan terminaline bağlayan bir kovalent fosfotirozil bağının oluşumuyla sonuçlanır. Aynı zamanda, bölünmüş ipliğin karşı ucunda bir hidroksil parçası üretir. Kovalent enzim-DNA bağlantısı, topoizomeraz reaksiyon mekanizmasında iki önemli rol oynar. Birincisi, şeker-fosfat DNA omurgasının bağ enerjisini korur. İkincisi, parçalanmış DNA zincirinin enzimden ayrılmasına izin vermediği için protein-DNA bağlantısı, bölünme olayı sırasında genetik materyalin bütünlüğünü korumasıdır. Bu durumda açığa çıkan kovalent topoizomeraz ile parçalanmış DNA reaksiyonu ara maddesi "bölünme kompleksi" olarak adlandırılır. Bu durum topoizomerazların farmakolojik aktiviteleri ve olası tedavi molekülü olarak değerlendirilmesi adına oldukça kritiktir.

DNA topolojisinin iplik geçişi veya kontrollü rotasyon ile değiştirilmesini takiben DNA ligasyonu, terminal hidroksil parçasının fosfotirozil bağı üzerindeki nükleofilik saldırısı ile başlatılır. Bu eylem, bölünme olayının tersini temsil eder ve topoizomerazın aktif bölgesinin yanı sıra bozulmamış bir DNA zincirini yeniden oluşturur. Tüm topoizomerazların DNA bölünme-ligasyon dengesi, ligasyonu büyük ölçüde desteklemektedir. Böylelikle bölünme komplekslerinin fizyolojik seviyeleri düşük seviyelerde tutulur. Bağlanan DNA'nın kimyasal yapısı orijinal substratıyla aynıdır

ancak çift sarmalın topolojik özellikleri topoizomerazların etkisiyle değiştirilir. Bölündükleri DNA ipliklerinin sayısı ve genetik materyalin topolojik özelliklerini değiştirme mekanizmaları ile ayırt edilen iki ana topoizomeraz sınıfı vardır, tip I ve tip II bu formlarının çalışma mekanizmaları şekil 1’de gösterilmiştir (Song ve ark.,2015).



Şekil 1: Topoizomeraz I (a) ve Topoizomeraz II (b) alt gruplarının çalışma mekanizması (Champoiz,2001)

Topoizomeraz I (a) DNA gerçekleşen geçici tek sarmallı kopmaları içeren reaksiyonları katalize etmektedir. Reaksiyonlar hem tek hem de çift sarmallı ligand içeren DNA sarmallarında gerçekleşen dönme (swivel) ya da iplik geçişi (strand-passage) mekanizması denetlenirken Topoizomeraz II (b) DNA kopyalanması sırasında oluşan düğümleri ve karışıklığı gideren ve DNA sarım seviyesini düzenleyen enzimlerdir, topoizomeraz I'lerden farklı olarak bu işlem sırasında ATP kullanmamalarıdır.

2.1.1. Tip I topoizomerazlar

İlk DNA topoizomeraz, 1971 yılında James Wang tarafından bakterilerde keşfedildi ve başlangıçta ω (Omega) proteini olarak adlandırıldı (Wang ve ark., 1971) ancak kısa sürede anlaşıldı ki Wang'ın keşfi bir enzim ailesinin tek bir üyesiydi. Bu nedenle 1971'de keşfedilen bu ilk örneğe artık *Escherichia coli* (*E.coli*) topoizomeraz I (topo I) olarak adlandırılmakta ve tip IA enzim ailesinin bir temsilcisi olarak kabul edildi. Prokaryotik DNA topoizomeraz I (topo IA), negatif süper bobinleri gevşeten 97 kDa'lık bir monomerdir. Topo IA için in vivo ana rolü, transkripsiyon sırasında hiper-negatif süper bobin birikimini önlemektir yani DNA 'da gelişebilecek olan geçici tek sarmallı kopmaları içeren reaksiyonları katalize etmektir. Reaksiyonlar hem tek hem de çift sarmallı ligand içeren DNA sarmallarında gerçekleşen dönme (swivel) ya da iplik geçişi (strand-passage) mekanizmasının denetlenmesine dayanır.

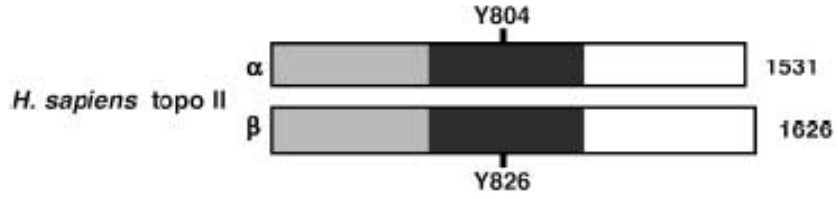
2.1.2. Tip II DNA topoizomerazlar

1987'de memelilerde ikinci tip II izoformun ilk raporu Smith Kline French'de (SKF) Fred Drake'in grubu tarafından yayınlandı; bu izoforma DNA topoizomeraz II β (TOP2B) (Drake ve ark., 1987) adı verildi. Topoizomeraz II β 'nin saflaştırılması, amsakrine direnç için seçilen bir murin P388 lösemi hücre hattından yapılmıştı (Per ve ark., 1987). Bu amsakrine dirençli hücre dizisi, topoizomeraz II'yi hedef alan diğer ilaçlara da direnç gösterdi, ancak topoizomeraz I'i hedefleyen kamptotesine karşı direnç göstermediği saptandı. Topoizomeraz II, dirençli hücre dizisinden ve hassas hücre dizisinden saflaştırıldığında 170 KDa (p170) ve 180 KDa (p180) büyüklüğünde iki farklı bant görüldü. *Staphylococcus* V8 proteaz ile kısmi proteoliz, p170 ve p180 ile farklı bölünme ürünleri ortaya çıkardı, bu da bunların farklı izoform oldukları kanıtlandı (şekil 2'de gösterilmektedir). TOP2A ve TOP2B, önemli dizi kimliğini paylaşan paraloglardır; her ikisinin de bir N terminal ATPase alanı, bir merkezi kırılma ve yeniden birleştirme alanı ve bir C-terminal alanı vardır. Alan düzenlemesi, bakteri ve faj enzimlerinden insan enzimlerine kadar tüm tip II topoizomerazlar arasında korunur. TOP2B, TOP2A ile amino asit seviyesinde %68 özdeşlik paylaşır, ancak bu, protein boyunca eşit olarak yayılmaz. ATPaz alanını ve merkezi kırılma yeniden birleştirme alanını taşıyan enzimin N-terminali dörtte üçü, %78 amino asit özdeşliğini

paylaşırken, en az korunmuş alan C-terminali alanı sadece %34 amino asit özdeşliğini paylaşır. C-terminal alanının farklı dizisi hem in vitro hem de in vivo olarak iki izoformun farklı aktivitelerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

DNA Topoizomeraz II, genetik materyalin oluşturduğu düğümleri ve karışıklığı gideren ve DNA sarım seviyesini düzenleyen enzimlerdir, topoizomeraz I'ler le aralarındaki en önemli fark topoizomeraz II ailesi bu işlem için ATP'ye ihtiyaç duymasındır. Bu enzimler hücrenin hayatta kalması için önemli rol oynamakta ve DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve rekombinasyonunu içeren neredeyse her nükleik asit prosesinde görev almaktadır (Santos-Pereira ve ark., 2018). Ökaryotik hücrelerde yer alan topoizomeraz II enzimleri, hücre döngüsünün evreleri arasında farklılık göstermekte ve böylece hücresel çoğalmayı düzenlemektedir. Bu nedenle, topoizomeraz II'yi hedef alan bileşiklerin çoğu, hücre büyümesinin ve çoğalmasının durdurulmasında görev almaktadır (Deweese ve ark., 2009; Ashley ve ark., 2016).

Topoizomeraz IIa'nın ekspresyonu, hücresel büyüme ile bağlantılıdır ve çoğalan hücrelerin hayatta kalması için esastır (Daldive ve ark., 2021; Bromberg ve ark., 2002). α izoformu farklılaşmış dokularda nerdeyse hiç bulunmaz. (Nitiss, 2009; Pommier ve ark., 2010) Topoizomeraz II α , replikasyon çatalları ile ilişkilidir ve mitoz sırasında kromozomlara sıkıca bağlı kalır. Enzim, DNA transkripsiyonu ve rekombinasyonunda rol oynar (Pendleton ve ark., 2014; Yu ve ark., 2017). Çatal yakınsaması, uygun kromozom organizasyonunun ayrılması için gerekli olup replikasyonun sonlandırılması için önemlidir (Heintzman ve ark., 2019; Ashley ve ark., 2018; Pendleton ve ark., 2014) Topoizomeraz IIa'nın aksine, hücresel düzeyde β izoformu elzem olmamasına karşın (Austin ve ark., 2018), nöronal gelişim için gereklidir (Deweese ve ark., 2008; Austin ve ark., 2018; Grueve ark., 1998). Çoğu hücre tipinde proliferasyon safhasında yüksek seviyelerde β izoformu bulunur (Christensen ve ark., 2002; Austin ve ark., 2018). Topoizomeraz II β mitoz sırasında kromozomlardan ayrışır, ancak hormonal ve gelişimsel olarak düzenlenmiş genlerin transkripsiyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. (Austin ve ark., 2018).

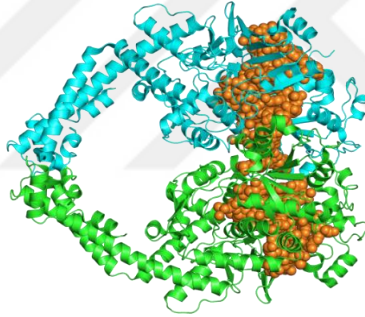


Şekil 2: Topo IIa ve topo IIβ birincil yapısı

TOP2A ve TOP2B, önemli dizi kimliğini paylaşan paraloglardır; her ikisinin de bir N terminal ATPaz alanı, bir merkezi kırılma ve yeniden birleştirme alanı ve bir C-terminal alanı vardır. Alan düzenlemesi, bakteri ve faj enzimlerinden insan enzimlerine kadar tüm tip II topoizomerazlar arasında korunur. TOP2B, TOP2A ile amino asit seviyesinde %68 özdeşlik paylaşırlar.

2.1.3. Topoizomeraz IIβ

Topoizomeraz IIβ proteininin ilk raporu 1987'deydi; ayrı bir gen tarafından kodlandığı, daha sonra cDNA'nın klonlanması ve gen konumunun haritalanmasıyla doğrulandı. Yapılan çalışmalar ile Topoizomeraz 2β Protein Modeli oluşturulmuştur (Şekil 3).

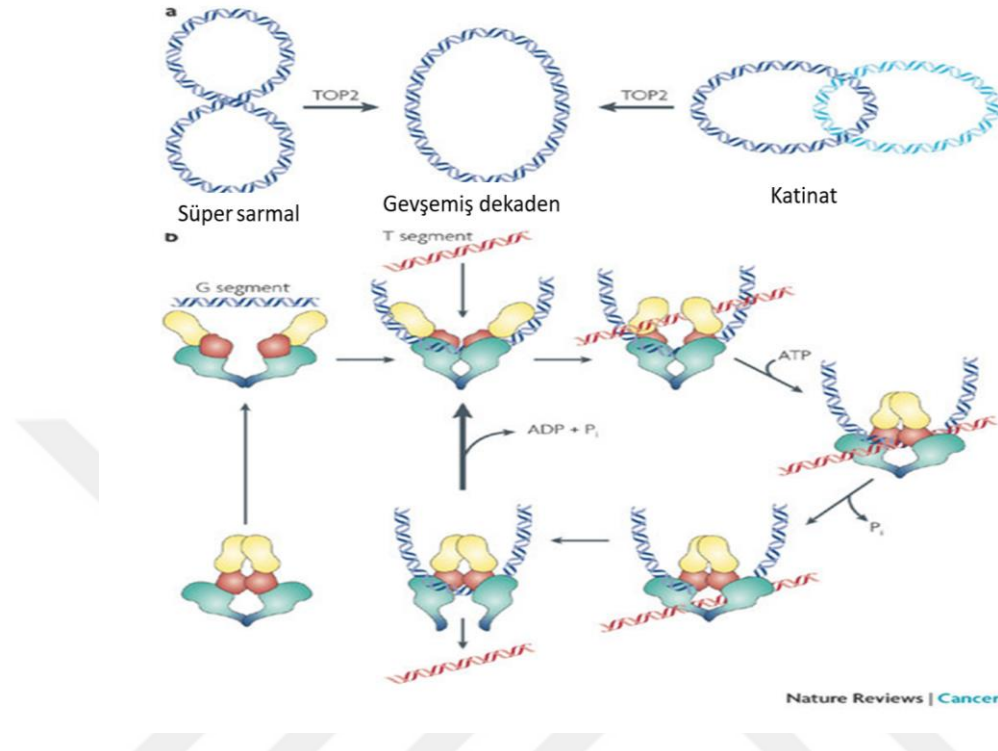


Şekil 3: Topoizomeraz 2β protein modeli (Champoux J. J. (2001))

Topoizomeraz 2β proteininin bilgisayarla oluşturulan modellemesidir.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, TOP2B'nin transkripsiyonel düzenleme ve genom organizasyonundaki önemini göstermiştir. TOP2B özellikle nöronal farklılaşma ve nöronal göçte etkin olduğu yapılan çalışmalar ve vaka analizleriyle gösterilmiştir.

Aşağıda topo IIβ'nin sinir sistemi ve bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri şekil 4'te açıklanmaktadır.



Şekil 4: Topoizomeraz 2β çalışma mekanizması, Nitis J. (2009)

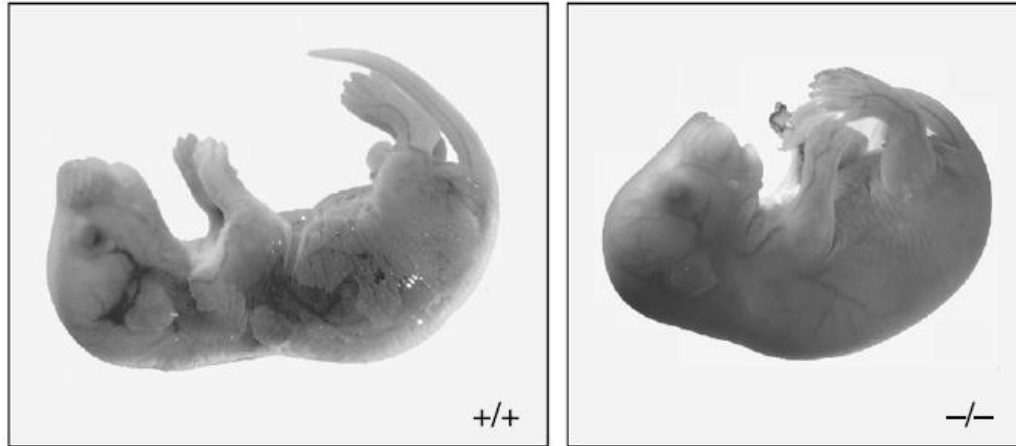
Şekilde, Topo IIβ'nin DNA çift sarmalı ile nasıl etkileştiğini açıklamaktadır. Enzim önce G segmenti adı verilen bir iplikte bir kırılma yaratır ve ardından diğer standı geçer. T segmenti, Mg²⁺ mevcut olduğunda, topo IIβ standı keser ve iplik ile her bir alt üniteye bir tirozin arasında bir fosfotirozin bağlantısı oluşturur ve daha sonra ATP'nin bağlanmasıyla kapalı klemp oluşturulur. Bu kıskaç, T ipliğinin G ipliğinden geçmesine yol açar ve T ipliği enzimi terk eder. Bu reaksiyon döngüsünde ATP hidrolizi iki kez gerçekleşir. İlk hidroliz, bir ipliğin diğerinden geçmesine yardımcı olur. İkinci hidroliz, kelepçeyi yeniden açar ve G segmentini serbest bırakır. (Nitis, 2009).

2.1.3.1. Topoizomeraz IIβ'nin beyin gelişimi ve nöronal farklılaşmaya etkisi

Invivo, Top2a'nın genetik eliminasyonu dramatik sonuçlara sahiptir, Topo2α nakavt fareler 4-8 hücre aşamasının ötesine geçemez perinatalde ölürlür (Akimitsu ve ark., 2008). Ancak Top2β farelerde doğum gerçekleşir, embriyonik dönemde öldürücü bulunmamıştır. Bunun yerine Top2β, nöronal farklılaşma sırasında, bazı nöral hücrelerin hayatta kalması ve nörit büyümesi için gereklidir (Nitiss ve ark., 2009; Tsutsui ve ark., 2001; Nur-E-Kamal ve ark., 2007). Top2β nakavt farelerde yapılan çalışmalara gösterdi ki Top2β yokluğu serebral tabakalaşma kusurları oluşturmakta ve motor aksonlar iskelet kaslarıyla temas etmesinde yani kas sinir kavşağında fonksiyon bozuklukları

görülmekteydi bu da yeni doğan farelerin doğumdan hemen sonra neonatal dönemde diyafram kasının inervasyonun gerçekleşmemesi dolayısıyla solunum apnesi sonucu öldükleri saptanmıştır, şekil 5’te gösterilmektedir. (Yang ve ark., 2000). Sadece beyin hücrelerinde topo II β ifade etmeyen farelerde ise beyin gelişimi esnasında kortikogenez hasarı görülmüştür (Lyu ve Wang 2003). Araştırmalar, topo II β baskılanmasının nörit büyümesi ve akson oryantasyonu gibi nöral ağ oluşumunun önemli aşamalarında gerekli olduğunu göstermiştir. Topo II β nakavt fareler ile yapılan bir çalışmada, motor nöron aksonlarının omuriliğe giremediği gözlenmiştir (Yang ve ark., 2000). Diğer bir çalışma, topo II β ’nın katalitik inhibitörü olan ICRF-193’ün serebellar granül nöronlarda, dorsal ganglia ve kortikal nöronlarda, nörit büyümesini ve büyüme konisi oluşumunu önemli ölçüde engellediğini göstermiştir (Nur ve ark., 2007). Topo II β nakavt embriyolardan elde edilen kortikal nöronlar, kontrol grubundan daha kısa nöritler oluşturarak topo II β ’nın nörit gelişimindeki rolünü desteklemiştir (Heng ve Le 2010). Yakın zamanda, bir vaka raporunda, tüm genom dizilim analizi ile topo II β geninde yeni bir mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonun gelişimsel gecikme, zihinsel yetersizlik, hipotoni, ilerleyici mikrosefali ve otistik özelliklerle alakalı olduğu bildirilmiştir (Lam ve ark., 2017). Ayrıca diğer çalışmalar topo II β ’nın nörit büyümesini ve aksonogenezi yöneten seçici genlerin transkripsiyonunu düzenlediğini ve aktivitesinin yeni oluşan post-mitotik nöronların düzgün gelişimi ve fonksiyonu için çok önemli olduğunu onaylamıştır. Bu durum, topo II β ’nın insanda uygun nöral gelişim ve post-mitotik nöronların da korunması için de gerekli olabileceğini düşündürmektedir. Dahası topo II β ’nın nöral farklılaşmada hücre sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde nöral polarizasyona ve Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneze katkıda bulunabilecek bir rolü olduğu gösterildi (Isik ve ark., 2014, Terzioğlu-Uşak ve ark., 2017). Yakın zamanda, topo II β ’nın susturulmasının, Rho GTPazlardaki dengenin bozulmasına sebep olarak nörodejenerasyona yol açabileceği ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneze neden olabileceği de bildirilmiştir (Zaim ve Isik, 2018). Buna ek olarak, topo II β baskılanmasının, *in vitro* SH-SY5Y hücrelerinde MPP⁺ nörotoksini ile *in vitro* oluşturulan PH modeli ile korele bir şekilde, dopamin (Dp) sentezinde kritik role sahip tirozin hidroksilaz (TH) gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olduğu ve de kültürdeki nöron hücrelerinde nörodejenerasyon benzeri etki oluşturduğu gösterilmiştir. SH-SY5Y PH modeli oluşturulan hücrelerde topo II β gen ekspresyonu ile TH gen ekspresyonun da baskılandığı da gözlenmiştir. TH gen ekspresyonundaki baskılanmanın topo II β ’ye bağlı alakasını göstermek için, topo II β spesifik siRNA’lar ile

susturulma yapılmıştır. Topo II β 'nın susturulması PH modeli ile korele bir şekilde TH geninin baskılanmasına neden olmuştur. Bu sonuca göre, topo II β proteinin, Dp sentezinde kritik bir role sahip olduğu ve yokluğunun PH belirtici olarak kullanılan TH gen ekspresyonunu düzenleyen moleküler sinyal yolları üzerinde etkili olduğu savunulabilir. Ayrıca NURR1 (nükleer reseptörle ilgili 1 protein) TOP 2B 'nin ekspresyonunu düzenler; NURR 1 nakavt farelerde TOP 2B aşağı regüle (down regüle) edildiği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Heng ve ark., 2012), bu durum TOP 2B 'nin NURR1'in aşağı akış hedefi olduğunu düşündürmektedir. Bir dizi çalışma ile, TOP 2B 'nin inhibitörlerinin nörit oluşumunu azalttığını ve TOP 2'nin susturulduğu embriyolarda nörit gelişiminin de aksadığı gösterilmiştir (Nur-E-Kamal, 2007, Zaim ve Işık, 2018). Ayrıca, TOP2B tarafından düzenlenen genler nöronal sağkalımı etkiler (Tiwari ve ark., 2012). TOP 2B, NURR1 tarafından düzenlendiğinden ve NURR1'in beyindeki dopaminerjik sistemin düzenlenmesinde yer aldığı bilindiğinden, TOP2B'nin dopaminerjik nöronlarda akson oluşumunda rolü olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 5: Tüm vücut topo II β nakavt farelerin perinatal ölümü göstermiştir (Yang ve ark. 2000)

Top2 β nakavt farelerde yapılan çalışmalara gösterdi ki Top2 β yokluğu serebral tabakalaşma kusurları oluşturmakta, postür bozukluklarına sebebiyet vermekte ve motor aksonlar iskelet kaslarıyla temas etmesinde yani kas sinir kavşağında fonksiyon bozuklukları görülmekteydi bu da yeni doğan farelerin doğumdan hemen sonra neonatal dönemde diyafram kasının inervasyonun gerçekleşmemesi dolayısıyla solunum apnesi sonucu öldükleri saptanmıştır (Yang vd. 2000).

2.1.3.2. Topoizomeraz II β 'nin immün sistem ile ilişkisi

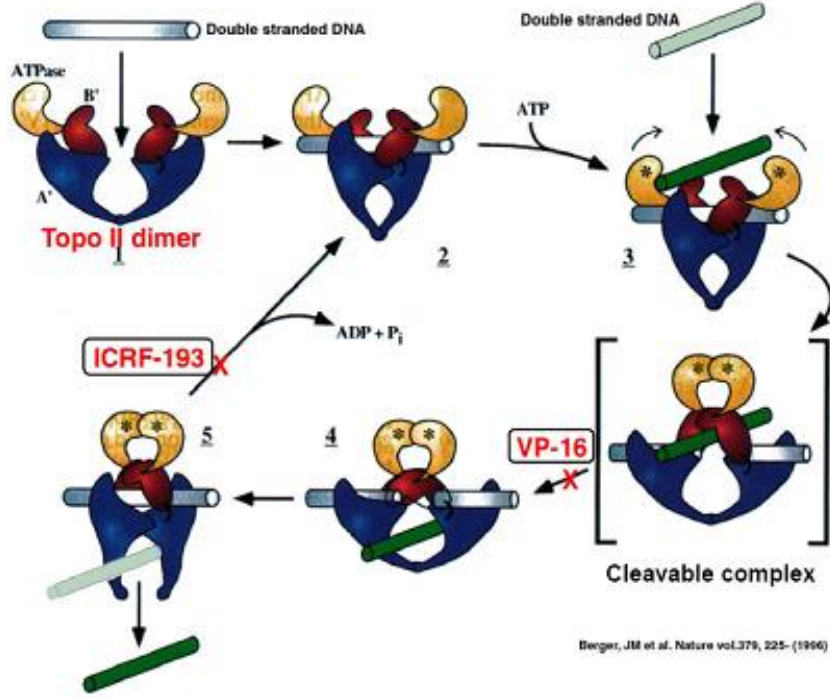
Primer insan hücrelerinde TOP2B ekspresyonunun mikrodizi analizi yayınlandığında CD34⁺ kemik iliği hücrelerinde TOP2B'nin yüksek ekspresyon seviyesi

olduğu görüldü (Krause ve ark., 1994; AbuSambra, 2017). CD34, hematopoietik kök hücrelerin (Krause ve ark., 1994) ve hematopoietik olmayan progenitör hücrelerin (Sidney ve ark., 2014; AbuSambra ve ark., 2017) bir belirteci olarak yaygın olarak kullanılan transmembran yüksek oranda glikosile edilen bir proteindir. CD34, mikrogliaya farklılaşabilecek olan hematopoietik progenitör hücrelerin proliferasyonunu ve göçünü düzenler ve MSS' ye göçü kontrol etmektedir. (Asheuer ve ark., 2004; AbuSambra ve ark., 2017). Bu alanda yapılan hayvan çalışmalarında bu veriyi desteklemekle birlikte CD34⁺ hemotopoitik hücrelerin artışının kan-beyin bariyeri hasarını indüklediği kan-beyin bariyerinin geçirgenliğini artırdığı saptandı, ayrıca KBB'nin MSS hattında etkilenen bölgelerde CD34 eksprese eden mikroglialar bulundu (Asheuer ve ark., 2004; Ladeby ve ark., 2005; Graumann ve ark., 2010). Bu durum CD34⁺ yüzey belirtecinin kan beyin bariyerini aşp aşamadığı veya ortama salınarak gen ifadelerini değiştirip değiştirmediği sorunu akıllara getirmektedir. ALS (Amyotrofik Lateral Skleroz) üzerine yapılan bir başka çalışmada ALS olan farelerinin otopsisinde BOS' larında CD34⁺ mikrogliya kümelerine rastlanmıştır, böylelikle bu CD34⁺ hücreler kan beyin bariyerini bozuyor geçirgenliğini artırarak beyinin var olan bariyer sistemini bozduğu saptanmıştır (Kovacs ve ark., 2019).

2.1.3.3. Topoizomeraz IIβ inhibitörleri

Topoizomeraz II β 'nın susturulması için pek çok yöntem mevcuttur bunlardan başlıcaları siRNA kullanarak genin belli bir süre ile susturulması, CRISPR ile gen sekansının doğrudan kesilmesi ve Topo II inhibitörleri arayıcılığı ile susturma yer alır, Topo II hücre proliferasyonu, hayatta kalımı için oldukça önemli olması sebebiyle kanser hücrelerinde bol miktarda bulunurlar. Bu nedenle kanser tedavisinde Topo II inhibitörlerini kullanılmaktadır. Kinonlar, florokinonlar ve kumarinler gibi bazı inhibitörler, bilhassa topoizomeraz 2'lere özgüdür ve bu sayede oldukça etkili antibiyotiklerdir sıklıkla kullanılmaktadırlar. TopoII inhibitörleri ya katalitik inhibitörler ya da zehirler olarak sınıflandırılır. TopoII katalitik inhibitörleri, TopoII'nin N-terminal ATPase alt birimini bağlayarak, TopII dimerinden ayrılmış DNA zincirlerinin salınmasını önler (Classen ve ark, 2003). Alternatif olarak, TopoII zehirleri, ya kovalent TopII-DNA klevaj komplekslerinin oluşumunu teşvik ederek ya da yarılan zincirin yeniden ligasyonunu inhibe ederek öldürücü DNA zincir kırıkları üretir (Premier ve ark.,

2010). Dolayısıyla Topo II inhibitörler ile genin susmasını sağlamak gen dışında pek çok mekanizmanın da devre dışı kalmasına sebep olacaktır bu mekanizmalar şekil 6'da ayrıntılı şekilde ifade edilmiştir. Bu durumda asıl hipotezi araştırılmasını zorlaştıracaktır. Bu nedenle susturucu RNA (siRNA) kullanılarak, transkripsiyondan sonra mRNA'yı bozup tamamlayıcı nükleotid dizileri ile spesifik genlerin ekspresyonuna müdahale ederek translasyon önlen ve kısa süreli inhibisyon sağlanması tercih edilmiştir.



Şekil 6: Topo II β inhibitörlerinin çalışma mekanizmasının gösterimidir (Berger, 1996)

TopoII inhibitörleri ya katalitik inhibitörler ya da zehirler olarak sınıflandırılır. TopoII katalitik inhibitörleri (5), TopoII' nin N-terminal ATPaz alt birimini bağlayarak, TopoII dimerinden ayrılmış DNA zincirlerinin salınmasını önler (Classen ve ark, 2003). Alternatif olarak, TopoII zehirleri (3), ya kovalent TopoII-DNA klevaj komplekslerinin oluşumunu teşvik ederek ya da yarılan zincirin yeniden ligasyonunu inhibe ederek öldürücü DNA zincir kırıkları üretir (Promier ve ark, 2010).

2.2. Nöroinflamasyon

Dünya genelinde artan yaşlı nüfusun artması, çeşitli nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların prevalansının artmasında beraberinde getirmiştir. Günümüzde nörodejeneratif hastalıklar kanserden sonra en yaygın görülen, ölüm riski yüksek, maliyeti yüksek patolojilerden biri olarak kabul edilmektedir. Pek çok nörodejeneratif hastalık bulunmasına karşın bütün nörodejeneratif hastalıklar en temelde isminden de anlaşıldığı üzere nöronlarda kalıcı veya geçici deformasyonlara dayanmaktadır. Bu

deformasyon sonucunda hücreler işlevlerini veya yapısal bütünlüklerini yitirmektedirler. Sinir sisteminde var olan bu bozukluk nöron ölümüne ve akabinde de çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Oluşan nörodejeneratif hastalıkların büyük bir kısmının sporadik oluşumu ve çok faktörlü sebeplere bağlı olmalarıyla de tespiti ve tedavis oldukça zor olmaktadır.

Nörodejenerasyonda oluşan nöron ölümlerinin birçok sebebi bulunmaktadır. Nöron sitoplazmasında veya sinaptik aralıkta protein birikimleri, oksidatif stres ve diğer endojen ve ekzojen etmenler nörodejenerasyonun oluşumuna zemin hazırlamaktadır.

Nörodejenerasyon gelişiminde göz önünde bulundurulması gereken bir diğer önemli konu ise inflamasyon oluşumudur. Birçok nörodejeneratif hastalıkla aynı zamanda inflamatuvar semptomların görülmesi de nörodejenerasyon ile nöroinflamasyon'un iç içe olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar zamanla ilk bakışta birbirinden çok farklı olan bu patolojilerin arasında bazı bağlantılar olabileceğini düşünmeye başlamışlardır, bu bağlantı ise ister süregelen olsun ister akut olsun tüm travmalarda iyileştirme mekanizması olarak ortaya çıkan bağışıklık sisteminin bölgedeki yaralı hücreleri iyileştirmek, ölmüş veya iyileşemeyecek kadar ağır yaralı hücrelerinin temizlenmesini sağlamak için bölgede akut inflamasyon başlatmak. Akut inflamasyon temelde yaralanmaya karşı geliştirdiği akut semptomlar sayesinde bunlar: kızarıklık, şişme, yangı, ağrı, hareket kısıtlılığı bölgeyi tabiri caizse sabitleyip ilk yardım ile iyileştirir. Ancak çeşitli nedenler ile mesela travmanın tekrarlanması, vücutta başka bir yangı odağının olması, sistemik hastalıklar, yaşlanmaya vb. inflamasyon süreci normal paterninden çok uzarsa veya tekrarlayan hale gelirse bu durumda kronik inflamasyon açığa çıkar ki bu durumun kendisi başlı başına bir hastalık sebebi olabileceği düşünülmektedir. İnflamasyon mekanizmasının vücudun temel bir hayatta kalma mekanizması düşünüldüğünde bu durum şaşırtıcı değildir. Hücre yıkımının veya yanlış katlanmış proteinlerin olduğu ortamda bağışıklık sistemi uyarılarak hemoastazın tekrar kurulması adına, hücreye zarar veren materyallerin temizlenmesi işlemi gerçekleştirilecektir. Bu durum normal süreçler içerisinde beyinde nöroinflamasyonun oluşumu beynin plastisitesi, doku tamiri ve nörokorunumluluk açısından oldukça gerekli ve faydalıdır. Ancak, kronik bir hale gelen inflamasyonun nöronlar ve çevresini sitokin yağmuruna maruz bırakacaktır. Bu yoğun sitokin uyarımı da bir süre sonra bölgede hasar almış veya sağlam ayırt etmeksizin ciddi bir nöron ölümüne sebep olmaktadır. Nörodejenerasyon eğer sadece zarar görmüş hücrelerin yok edilip sağlıklı hücrelerin refahını korumak şeklinde ilerleseydi oldukça faydalı kontrollü bir hücre ölümü anlamına gelirdi ancak malesef gerçekte olan pek böyle görünmemektedir.

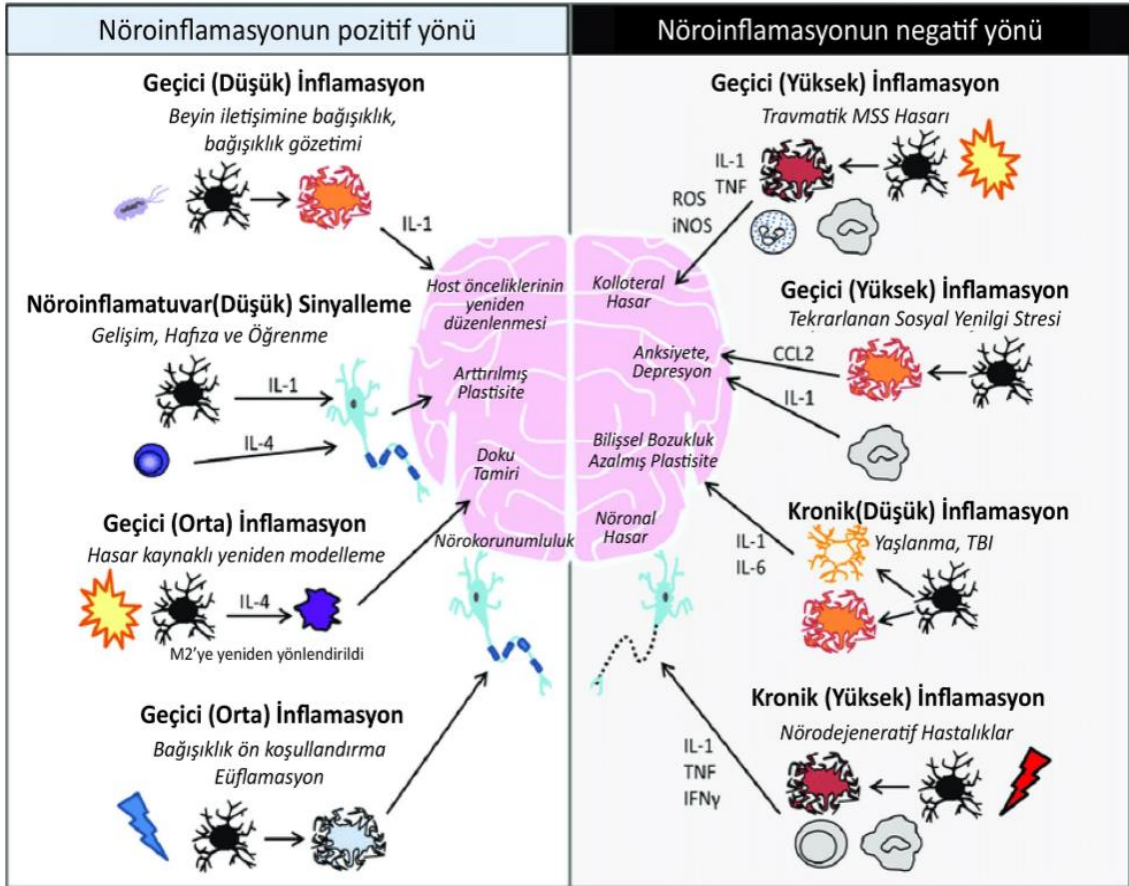
Beyinde kronik inflamasyonun oluşumu belirli immün elemanlarının alımı ve belirli sitokinlerin salınımı ile doğru orantılıdır. Ayrıca bazı hastalık ilişkili genlerde meydana gelen tek nokta mutasyonlarının maladaptif birincil immün yanıtı indüklediği de görülmüştür. Maladaptif birincil bağışıklık yanıtının yaşlanma ve epigenetik değişiklikler ile de ilişkilidir. Bu durum da yaşlanan nüfusta görülen nörodejenerasyonun moleküler bağlantısını göz önüne sermektedir.

Nöroinflamatuvar yanıt oluşması için bazı temel proinflamatuvar biyomarker aracılık eder bunların en temel olanlarından bazıları sitokinler (IL-1 β , IL-6 ve TNF α), kemokinler (CCL2, CCL5, CXCL1), ikincil haberciler (NO ve prostaglandinler) ve reaktif oksijen türleridir (ROS). Bu aracılardan çoğu, mikroglia ve astrositler dahil olmak üzere aktive edilmiş yerleşik MSS hücreleri tarafından üretilir. (Norden ve ark., 2016). Ayrıca endotel hücreleri ve perivasküler makrofajlar (Dunn ve ark., 2016), bu inflamatuvar sinyallerin MSS içinde yorumlanması ve yayılmasında önemlidir.

Nöroinflamasyon mekanizmaları hem immunolojinin hem de sinir biliminin kesiştiği bir alanda yer alır dolayısıyla patolojilerin gelişiminde farklı yaklaşımlar geliştirilmesinin önünü açmaktadır. Üstelik nöroinflamasyon tanımı oldukça geniş bir alanı ifade etmekte canlının doğum öncesinden nörogelişimine, erken çocukluk, yetişkinlik veya yaşlılıkta hayatın herhangi bir döneminde organizmaya içeriden veya dışardan gelişen bir takım bağışıklık semptomlarının tamamını ve olası bozukluklarını kapsamaktadır.

Erken beyin gelişiminde ve dolayısıyla beyin matürasyonunda aktif mikroglia ve sitokin üretimine dair kanıtlar vardır (Salter ve Beggs, 2014). Çeşitli çalışmalarda farklı gruplarca aktif mikrogliaların MSS içinde destek, sinaptik budama ve immünolojik aktivitelerle görev aldığı gösterilmiştir (Schafer ve Stevens, 2013; Derecki, 2010). Ayrıca, T-hücreleri ve yerleşik MSS hücreleri olan mikroglialar arasındaki etkileşimlerin nöroinflamatuvar sinyalleşme, normal hafıza ve öğrenme ile doğrudan ilgisi olduğu gösterilmiştir (Derecki 2010, Ziv ve ark. 2006). Bu örnekler, nöroinflamatuvar sitokin üretiminin hücrel biyokimyayı, fizyolojiyi ve gelişimi etkilemek için diğer hücreler üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir. Nöroinflamasyon orijininde yara iyileşmesi ve organizmanın fonksiyonlarını düzenleme, işleyiş kalitesini artırma anlamını

da taşımaktadır. Dolayısıyla nöroinflamasyonu sadece patolojik bir süreç gibi algılamak doğru değildir. MSS'nin iç iletişim ve düzenlenmesini sağlayan bir sistemin sürekli ve tekrarlı müdahaleye karşı bağlı patolojilerin iyileşmesine veya daha da kötüleşmesine sebep olabileceği vücudun geliştirdiği bir ilişkilene şekli olarak ifade etmek daha doğru olacaktır. Vücudun diğer tüm işlevlerinde olduğu gibi inflamasyonun da yalnızca iyi bir durum veya kötü bir durum olarak etiketlenmesi yanlıştır, inflamasyon vücudun kendini koruma ve hayatta kalma yöntemlerinden biridir yalnızca şekil 7'de nöroinflamasyonun olumlu ve olumsuz yönleri şematize edilerek anlatılmıştır. Dolayısıyla oldukça nötr bir durumdur. İlerleyen bölümlerde ifade edileceği gibi eğer doğru manipüle edilirse iyileştirici kontrolsüz ve tekrarlayıcı hale gelirse yıkıcı etkileri olacağı göz önünde bulundurulmalıdır.



Şekil 7: Nöroinflamasyonun pozitif ve negatif etkileri (Quan ve ark., 2016)

Nöroinflamasyonun pozitif yönleri şunlardır: geçici düşük inflamasyon sayesinde patojene yanıt ve hastalık sebebiyle vücut önceliklerinin yeniden düzenlenmesi, hastalık semptomlarını açığa çıkartarak ortamın iyileşme aktivitelerine uygun hale getirmek amaçlanır bu işlem IL1 aracılı gerçekleşmektedir. Ayrıca immün hafızanın gelişmesi adına plastitite seviyesi artırılmaktadır. Bu durum yine IL1 ve IL4

aracılığı ile gerçekleşmektedir. Geçici orta inflamasyon sayesinde hasar bölgesinin tamiri ve tekrar yapılandırılması görülmeye başlamaktadır bu sayede doku tamiri sağlanır ayrıca immün hafızanın sağlanması sayesinde bağışıklık ön koşulması sağlanıp olası başka yaralanma veya patojen bulunmasına karşı nörokonurluluğu artırmaya çalışmaktadır. Bu durum IL4 üzerinden gerçekleştirilmektedir. Tüm bunlar nöroinflamasyonun olumlu ve takviye edici özellikleridir. Nöroinflamasyonun negatif etkileri ise şu şekilde gelişmektedir: geçici yüksek şiddetli inflamasyondaki sebebi ister fiziksel travma (MSS’de gelişen travmatik beyin hasarları) ister psikoloji travma (tekrarlayan sosyal yenilgi, panik bozukluklar vb) kollateral hasar, anksiyete ve depresyonla sonuçlanır. Bu durumda nöron sağkalımını olumsuz etkilerken MSS’de geri dönüşü olmayan sonuçlar doğurmaktadır. Bu geri dönüşü olmayan kalıcı hasarlar oksidatif stres mekanizmasının kalıcı şekilde bozulmasına dayanmaktadır dolayısıyla IL1, TNF, CCL2, ROS, iNOS mekanizmaları üzerinden işlemektedir. Kronik düşük inflamasyon yaşlanma veya süregelen travmatik yaralanmaların ardından görülerek özellikle bilişsel kapasitede azalmaya ve plastisite yitimine sebep olmaktadır, bu mekanizma IL1 ve IL6 interlökinleri üzerinden yürümektedir. Kronik yüksek inflamasyon MSS’nin maruz kaldığı ve tolare edemeyerek nöron kaybına sebep olan tekrarlayıcı ve yüksek şiddetli inflamasyonu tanımlamakta kullanılır adından anlaşıldığı gibi merkezi sinir sisteminde hücre kaybına ve dolayısıyla çeşitli segmentlerde işlev kaybıyla sonuçlanmaktadır.

2.2.1. Nöroinflamasyonun olumlu sonuçları

Nöroinflamasyonun tüm bağışıklık tepkileri gibi hasardan minimum zararla çıkılması, hücrenin bir an önce hemoastazına kavuşması gibi çok temel savunmalar ile çalışmaktadır. Dolayısıyla doğrudan hücrenin refahını artıran, yaralanmalardan korurken, olası tehditlere karşı sürekli olarak tarama işlemi yaparak herhangi bir riski daha çok başındayken yok etmeyi amaçlayan bunu yaparken hücrenin verimliliğini artırarak ortamını iyileştiren bir yapıya sahiptir. Bağışıklık sisteminin kendine özgü bir hücresel hafızasının olması yaralanma veya kronik strese maruz kalan dokuların bu durumdan en az hasarla çıkmasını sağlayacaktır, bu etkiler şekil 7’de gösterilmiştir.

Literatürde farklı çalışmalarda MSS hasarıyla ilgili başka bağışıklık koşullandırma örnekleri de mevcuttur. Bu bağlamda, çalışmalar MSS’yi ön koşullandırmayı ve travmatik MSS hasarına karşı korumayı amaçlamıştır. Bu ön koşullandırma, LPS enjeksiyonları, izofloran gibi anesteziğin kullanımı ve hipo/hipertermiye maruz kalma gibi çok çeşitli şekillerde indüklenerek denenmiştir (Baughman ve ark., 1988; Ota ve ark., 2000; Chen ve ark., 2017). Örneğin, tekrarlanan LPS maruziyetleri, MSS’nin ön koşullanmasına yol açar. Koşullu mikrogial aktivasyon, kortikal nöronların kılıflanmasını sağladığı, olası yaralanmanın neden olduğu travmatik beyin hasarından sonra nörokoruyucu bir işlev olan inhibitör aksosomatik sinapslarda azalmaya yol açabildiği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2012). Bu işlevin etki mekanizması halen araştırılmaktadır, ancak NMDA reseptörlerinin sinaptik uyarılmasının ve CREB aktivasyonu yoluyla onların antiapoptotik sinyal yollarının sunduğu, bu sayede de

nöronun hayatta kalınımını sağladığı varsayılmaktadır (Hardingham ve ark., 2012). Bu süreç, geçici olarak aktive edilmiş mikroglia oluşturmaya yani mikroglia profilini M1'e yönlendirme ve GABAerjik sinyalleşmelerin azalmasıyla paraleldir (Chen ve ark., 2012).

Beyin gelişimi ve plastisitesinde nöroinflamatuvar sinyalleşmenin önemi büyüktür. Yukarıda ana hatlarıyla belirtildiği gibi, MSS hasarı için tartışılan gerçek nöroinflamasyonun dışında nöroinflamatuvar sinyalleri ve akut gelişen inflamatuvar etkiyi de sahiptirler. Örneğin, öğrenme ve bellekle ilgili son çalışmalar, kalıcı öğrenme sırasında karmaşık bir sitokin ağının etkinlik gösterdiğinin ayrıntılı olarak göstermiştir (del Rey ve ark., 2013). Bu çalışmada yer alan başlıca sitokinler, IL-1 β , IL-6 ve TNF α , bağışıklık hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir. Hipokampusun içindeki ve dışındaki nöronları ve sinapsların korunmasında rol oynayan astrositleri içerir (Elmariah ve ark., 2005; McAfoose ve Baune, 2009; Ullian ve ark., 2004). Hem IL-1 β hem de IL-6 uzun dönem öğrenme indüksiyonundan sonra hipokampusta aşırı eksprese edilir ve IL-1 β öğrenmeyi desteklerken, IL-6 karşıt etkiyi düzenleyerek dengenin korunmasını sağlar (Goshen ve Yirmiya, 2009). Bu sitokinlerin tümü, klasik olarak inflamatuvar moleküllerin sıklıkla gözden kaçan bir özelliği olan öğrenme süreçlerinde önemli rollere sahiptir. Hipokampustaki sitokin ekspresyonu bölgesel özgüllük gösterir. Yukarıda bahsedilen hipokampal artışlar, prefrontal kortekste (PFC) ekspresyondaki ek değişikliklerle tamamlanır. Ayrıca uzun dönem öğrenmenin kalıcılığı gibi temel, homeostatik koşullar sırasında da MSS'de sitokin sinyalleşmesinin önemini gösterir. Sitokinler tarafından öğrenme ve hafıza değişikliğine giden başka bir yol, nörotransmisyon üzerindeki modülatör etkisinde yatıyor olabilir. Astrositler, nöronal sinyalleri alır ve nöronal plastisiteyi etkilemek için NF- κ B yollarını aktive ederek karşılıklı hareket eder (del Rey ve ark. 2013, Freudenthal ve ark. 2005, Kaltschmidt ve ark., 2006). IL-1 ve IL-6 ayrıca moleküler sinyalleşme üzerinde zıt etkiler gösterir: IL-1, AMPA veya NMDA aracılı iletimi geliştirirken IL-6, glutamat salınımını ve sinaptik plastisiteyi inhibe eder ve bununla birlikte, IL-1 hipokampusta aminojik salınımı uyarır (Kabiersch ve ark., 1998). Bu durumun sonucu olarak bağışıklık hücrelerinin, özellikle T hücrelerinin yerleşik hücrelerle iletişim kurduğuna, normal hafıza ve öğrenme süreçleri için kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (Ziv ve ark., 2006; Kipnis ve ark., 2012). En nihayetinde tüm bunlar gösteriyor ki nöroinflamasyon sinyalleşmesinin beyin gelişimi, hafıza ve öğrenme süreçlerinde oldukça etkilidir.

İlginç bir şekilde, MSS'deki klasik (M1) ve alternatif (M2) aktivasyon durumları arasındaki bu denge, infiltre lökositlerin MSS'ye girişini yönetmektedir (Shechher ve ark., 2013). Açıkça, yaralanmaya verilen akut nöroinflamatuvar yanıt çok önemli bir amaca hizmet etmektedir. Bunun bir örneği, glutamat alımı yoluyla eksitotoksisite ile savaşmak için makrofajların işe alınmasıdır (Rimaniol ve ark., 2000). İkinci olarak, sızan makrofajlar yaralanmanın neden olduğu kalıntıları temizlemeye yardımcı olduğundan, bağışıklık hücrelerinin toplanması yara iyileşme sürecinin tamamlanmasına yardımcı olur. Gerçekte, onarım ve yeniden büyümeye elverişli bir mikro-ortamın teşvik edilmesi için ölü hücrelerin ve miyelin fagositozunun yapılması gereklidir (Barrette ve ark., 2008; Kotter ve ark., 2011). IL-4 veya IL-13 tarafından indüklenen M2 tipi makrofajlar, aynı anda anjiyogenezi teşvik edebilir ve periferik sinir yaralanmasının neden olduğu iltihabı baskılayabilir. Ek olarak, M2 hücreleri, engelleyici ortamlarda bile uzun mesafeli akson rejenerasyonunu destekler (Kigerl ve ark., 2009; Sica ve ark., 2006). Ayrıca TLR4 reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla oligodendrositlerin oluşumunu teşvik edebilirler (Schonberg ve ark., 2007).

Özetlemek gerekirse, mikroglia ve makrofajların alternatif aktivasyonu, periferik sinir yaralanmalarından sonra içsel onarım için çok önemlidir ve bu hücreler miyelin klirensini ve oligodendrosit rejenerasyonunu desteklemeye yardımcı olur. Yukarıda belirtildiği gibi, bağışıklık tepkileri, travmatik MSS yaralanmasından sonra doku onarım sürecine fayda sağlayabilir. Mikroglia ve makrofajları M2 tipi bir profile yeniden yönlendiren sitokin yolakları, iltihaplanma gelgitini hasardan onarıma çevirmeye yardımcı olur. Yapılan çalışmalar, mikroglia ve makrofajların M2 onarım tepkilerini desteklemenin faydalı olduğunu göstermektedir. (Zhang ve ark., 2015; Fenn ve ark., 2012).

2.2.2. Nöroinflamasyonun olumsuz yönleri

Bağışıklık ve beyin arasındaki iletişimden kaynaklanan nöroinflamasyon faydalı olsa da bazı durumlar bu dengeyi bozabilir. Buna iyi bir örnek, kronik veya travmatik stres faktörlerine verilen yanıttır. Travmatik veya kronik stresörlerin hem yerleşik mikroglia hem de kemik iliği kaynaklı makrofajları içeren daha nöroinflamatuvar bir profili desteklediği görülmektedir (Wobleb ve ark., 2014). Kemirgenlerle yapılan çok sayıda çalışma, mikroglia'nın kronik veya travmatik stres faktörlerine yanıt olarak,

inflamatuar sinyalleri aktive ederip serbest bırakarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Frank ve ark., 2017; Tynan ve ark., 2016; Wohleb ve ark., 2012; Wohleb ve ark., 2013). Tekrarlanan sosyal yenilgi, beyinde mikrogliya aktivasyonunu ve artan proinflamatuar sitokin ve kemokin ekspresyonunu indükler (Wohleb ve ark., 2013, Wohleb ve ark., 2011). Bu inflammatuar indüksiyonlar, özellikle beyin strese duyarlı bölgelerinde yani korku ve tehdit değerlendirme merkezleri olan amigdala mikroglianın artan Iba1-immünoreaktivitesi ile paralellik gösterir (Tynan ve ark., 2010; Wohleb ve ark., 2011). Stres değerlendirmesi ve mikrogliya aktivasyonu arasındaki bağlantı, nöradrenerjik sinyalleşmeye (Gyoneva ve Traynelis 2013, Johnsan ve ark., 2013), inflammatuar aktivasyona ve ATP salınımına (Iwata ve ark., 2013) atfedilmiştir.

Kronik stresin ardından bu monositlerin alınması, uzun süreli kaygı benzeri davranışların gelişimini destekler (Wohleb ve ark., 2014; Wohleb ve ark., 2013). Özellikle kemik iliğinden monosit salınımı veya beyne monosit alımı engellendiğinde, kaygı indüksiyonu de engellenir. Bu nedenle, stres kaynaklı nöroinflammatuar yanıtlar, bağışıklık fonksiyon bozukluğu ile duygudurum bozukluklarının gelişimi arasında önemli bir bağlantı olduğu düşünülmektedir. Bu durum oldukça önemlidir, çünkü klinik kanıtlar, kronik strese maruz kalan bireylerin, genel zihinsel sağlık veya yaşam kalitesinin bozulmasına katkıda bulunan kalıcı bilişsel ve duygusal düzensizlik gösterdiğini bildirmiştir (Baum ve ark., 1993; McEwen, 2013) Tüm bunlar göstermektedir ki stres kaynaklı nöropsikiyatrik rahatsızlıklar, mikrogliyal aktivasyon, monosit alımı ve gelişmiş nöroinflammatuar sinyalleşmeyi tetikleyerek nöroplastisitenin bozulmasına sebep olmaktadır tüm bu mekanizmalar şekil7’de şematize edilerek anlatılmıştır.

Yaşlanma doğası gereği, beyin ve bağışıklık sistemi arasındaki iletişim ve denge bozulmalara sebep olur. Beyinde kemirgenlerde, köpeklerde, insan olmayan primatlarda ve insanlarda daha yüksek seviyede inflammatuar profilili mikrogliya yani M1 mikrogliya saptanmıştır ayrıca CD68, CD11b, CD11c, TLR'ler ve CD86 dahil olmak üzere bağışıklık ile ilişkili bazı biyolojik belirteçlerinde artışı saptanmıştır (Frank ve ark., 2006; GodBout ve ark., 2005; Lucin ve Wyss- Coray, 2019). IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinler için inflammatuar genlerde artış (Godbout ve ark. 2005, Sierra ve ark., 2007) ve buna karşılık gelen anti-inflamatuar genlerde ve IL-10 ve IL-4 dahil sitokinlerin sentezlenme düzeyinde azalmalar saptanmıştır (Maher ve ark., 2015, Ye ve Johnson, 2001). Yaşlanmış beyin

transkriptome analizi yapıldığında ise TGF β 'ya verilen yanıtın azaldığı ayrıca M1 mikroglia sayısının daha yüksek oranlarda bulunduğu organik olarak inflamatuvar bir profil gösterdiği saptanmıştır (Youm ve ark., 2013). Tüm bunlar gösteriyor ki farklı farklı parametrelerden değerlendiren tüm çalışmalar yaş artışının doğal sonuçlarından birinin de beyinin immünolojik profilinde gerçekleşen değişimlere sebebiyet vermektir, nöronlarda yıkıma ve kayba sebep olmaktadır.

Yaşla birlikte bu artan mikroglia inflamatuvar profilinin bir başka yorumu ise, bu hücrelerin ölüme hazırlandığı veya hassaslaştığıdır. Mikroglia'nın bu hazırlanma profili üç parametre içerir: inflamasyon belirteçlerinin ve aracılarının ekspresyonunda artış, aktivasyon için eşik ve sürenin azalması, bu aktivasyonun ardından artan yanıt (Norden ve Godbout, 2013). Son araştırmalar, insanlarda mikroglial aktivasyonu değerlendirmek için pozitron emisyon tomografisini (PET) de kullanarak, mikrogliaların mitokondrilerinde translokator protein (TSPO) reseptörlerine bağlanma oranının hesaplanması ile yapılan çalışmada yaşlı bireylerde TSPO'nun arttığını gösterdi, bu da mikroglial aktivasyonun yaşla birlikte yükseldiğini gösterir (Schuitemaker ve ark., 2012). Yapılan pek çok çalışma göstermektedir ki, uyarılmış mikroglia'nın, periferik immün stimülasyonlarının ardında abartılı miktarda ve uzun süreli inflamatuvar sitokinler üretmektedir (Rosczyk ve ark., 2018). Bağışıklık yanıtının yüksekliğinin, depresyon benzeri davranışsal komplikasyonlar yarattığı ve bilişsel eksikliklerin gelişmesine sebep olduğu yapılan çalışmalarca kanıtlanmıştır (Kelley ve ark., 2013). Tüm bu çalışmalar birlikte ele alındığında, inflamatuvar aracılarda artması ve mikroglia fenotipinin yaşla birlikte değişmesi yaşlı beyinde artan inflamatuvar duruma katkıda bulunup dejenerasyon yönünde körüklendiğini söylemek yanlış olmayacaktır.

Özetleyecek olursak, Nöroinflamasyon kontrolden çıktığı takdirde kronik stres bozukluklarına ve hızlı yaşlanmaya sebep olacaktır. Çok şaşırtıcı olmayan bir şekilde bu durumun arması ise yeniden inflamasyonu şiddetlendirecek ve kendini besleyen bir kısır döngü yaratacak bu döngü ise dejenerasyon ve hücre ölümleri ile son bulacaktır.

2.3. LPS Modeli

Lipopolisakkarit (LPS; gram-negatif bakterilerin hücre duvarı immün sistemi uyarıcı bir bileşeni) ilk olarak Toll benzeri reseptör 4 (TLR-4) ligandı olarak

tanımlanmıştır (Beutler, 2000). TLR-4 temel olarak merkezi sinir sistemindeki mikroglia üzerinde eksprese edilir ve bir kez aktive edildiğinde TNF-a, IL-1 β , prostaglandin E2 (PGE2) ve NO gibi proinflatuar sitokinler üretir (Lehnardt ve ark., 2002; Mrak ve Griffin, 2005). Bu sitokinler, nöroinflamatuvar sürecin anahtar araçlarıdır. Daha da önemlisi, TLR-4 kapsamlı nöronal hücre ölümüne aracılık ettiği bildirilmiş ve TLR-4'e özgül viral inhibitör peptidin (VIPER), LPS tarafından indüklenen TLR-4 aracılı tepkileri potansiyel olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (Lysakova-Devine ve ark., 2010). Ayrıca, hayvanlara LPS verilmesi bilişsel bozulmaya neden olduğu ve nörodejeneratif hastalıklarla paralel semptomlar doğurduğu yapılan çalışmalarca kanıtlanmıştır (Lee ve ark., 2022; Shaw ve ark., 2011). Tüm bunların ışığında hem invivo çalışmalarda hem de invitro çalışmalarda nöroinflamasyon modeli oluşturmada LPS modeli oluşturulması oldukça güvenilir bir tekniktir ve oldukça sık kullanılmaktadır.

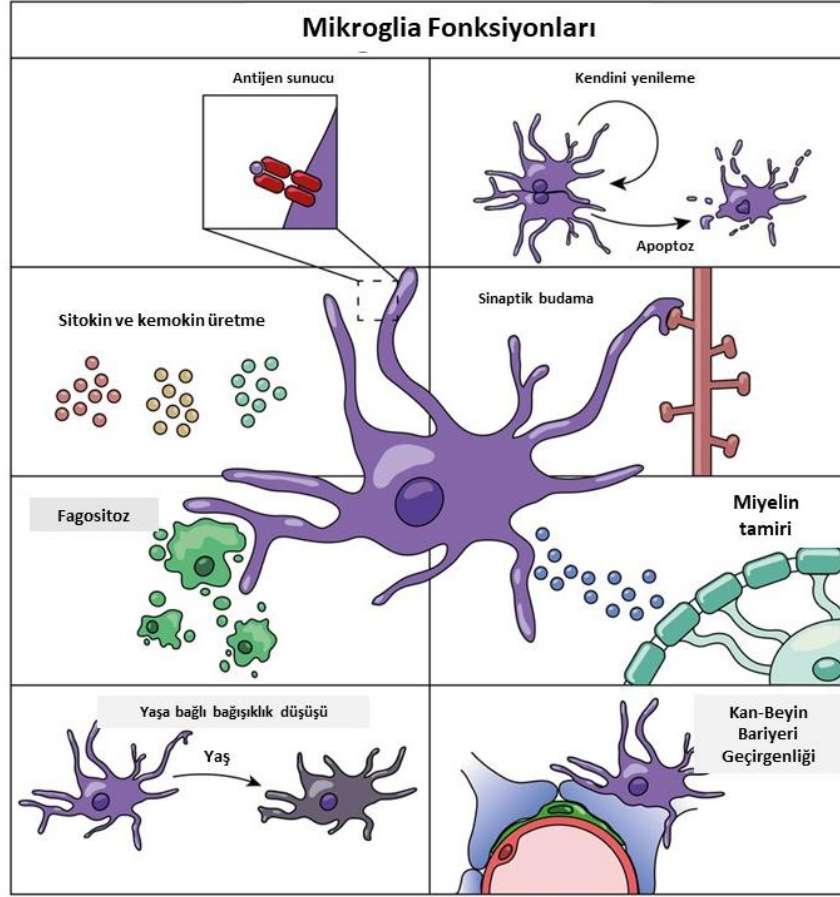
2.4. Mikroglialar

19. yüzyılın başlarındaki ilk sinirbilim araştırmacıları esas olarak, nöronların şaşırtıcı morfolojik heterojenliğini ortaya çıkarmak için hücre morfolojilerini inceleyen anatomistlerdi. Bu dönemde beyinde başka hücrelerin varlığı tespit edilememiş, glial hücreler henüz tanımlanmamıştı. Ancak 1856'da ünlü Alman patolog Rudolf Virchow, MSS'nin nöronal olmayan bölümünün tamamını tanımlamak için glia (Yunanca "tutkal") terimini kullandı. Virchow, nöroglia'yı bir tür bağ dokusu olduğunu düşünüyordu yaptığı çalışmaların sonunda bu dokunun hücresel elementler de içerdiğini buldu. Ancak, mikroglialar ve beyine özelleşmiş bir bağışıklık sistemi olabileceği o zamanlar hala bilinmiyordu. Mikrogliaların ayrı bir hücre formu olarak keşfi ise 1919'da İspanyol sinirbilimci Pío del Río Hortega'yı bekliyordu. Sonraki 100 yıllık süreçte ise mikroglialar MSS fizyolojisinin edilgen izleyicileri olarak tanımlandılar. Fakat gerçekte olan bu değildi mikroglialar bir köşede durup sadece sistemi izleyen hücreler değillerdi kısa sürede anlaşıldı ki mikroglialar sürekli, etkin ve hareketli bir şekilde MSS'nin immün gözetimini sağlamaktaydı. Günümüzde keşfedilen mikroglia işlevlerinden bazıları şu şekildedir, bunlar şekil 8' de ayrıca şematize edilerek gösterilmektedir. Mikroglialar patojen içeriğe bağlı tepkiler sağlayabilmek için hafıza benzeri işlevlerle donatılmıştır ve MSS'nin prototipik dokuda yerleşik makrofaj benzeri doğuştan gelen bağışıklık hücreleri olarak kabul edilirler. Mikroglialar nöronlar, astrositler ve oligodendrositler dahil olmak

üzere MSS'deki çok sayıda diğer hücre ile ve kendileri iç popülasyonlarıyla etkileşime girmekte ve sinir sisteminin homeostazını sağlamaktadır.

Mikroglia, herhangi bir nöroinflamasyon tartışmasının odak noktasıdır. Bunun nedeni, bu doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin, sitokinlerin ve kemokinlerin üretimi de dahil olmak üzere, MSS'nin birincil bağışıklık gözetimi ve makrofaj benzeri aktivitelerini gerçekleştirmesidir. Gerçekte, MSS'nin doğuştan gelen bağışıklık kapasitesinin çoğuna mikroglia aracılık eder. Bu hücreler, beyin ve omuriliğin hem beyaz hem de gri maddesinde bulunan yerleşik MSS hücreleridir. Genel olarak, mikroglia, MSS popülasyonunun %10'unu oluşturur. Embriyonik yolk kesesindeki miyeloid öncü hücrelerden embriyogenezde erken safhalarında gelişerek, embriyonik 8,5. gün civarında MSS bölgesine göç eder (Ginhoux ve ark., 2010), bu göçün ardından gelişen farklılaşma ile mikroglialar sahneye çıkacaktır. Ciddi hasara uğradığında MSS içindeki potansiyel bir progenitor kaynaktan mikroglia dönüşümü mümkündür (Elmore ve ark., 2014).

Bağışıklık ile ilgili diğer aktiviteler, periferde başlatılan inflamatuvar sinyallerin yayılmasını içerir (Dantzer ve ark., 2008). Bu tepkiler, bağışıklık sistemi ve beyin arasındaki koordineli iletişimde çok önemlidir. Örneğin, enfeksiyon veya hastalıkta mikroglia aktive olur ve inflamatuvar hücreler aracılığıyla işlev görür. Aktive edilmiş mikroglia, transkripsiyonel profillerini hızla değiştirir ve inflamatuvar sitokinler ve kemokinler üretir. Bağlama bağlı olarak, sitokinlerin ve kemokinlerin üretimi, beyne lökositlerin alınmasını kolaylaştırabilir (Zhou ve ark., 2006). Aktif mikroglia ayrıca hücre yüzeyindeki reseptör ekspresyon modelini değiştiren sitoskeletal yeniden düzenlemektedir. Ek olarak, bu değişiklikler mikroglianın yaralanma veya enfeksiyon bölgelerine doğru göç etmesine izin verir (Russo ve McGavern, 2015), dolayısıyla potansiyel olarak fagositik etkinliklerini artırır (Davalos ve ark., 2005). Genel olarak, mikrogliyal aktivasyon ve sitokinlerin artan ekspresyonu, MSS'yi korumayı ve konakçı organizmaya fayda sağlamayı amaçlar. Buna karşın güçlendirilmiş, abartılı veya kronik mikrogliyal aktivasyon, güçlü patolojik değişikliklere, depresyon ve bilişsel eksiklikler gibi nörodavranışsal komplikasyonlara yol açabildiği dolayısıyla aktivasyonun çok kontrollü gerçekleşmesi gerektiği bilinmektedir (Norden ve Godbout, 2013).



Şekil 8: Mikroglia fonksiyonları (Wake ve ark., 2011)

Şekilde mikrogliaların bilinen fonksiyonları şematize edilmiştir. Bunlar bağışıklık sistemi hücreleri olarak temel olan patojenlere karşı savunma sağlanması amacıyla gerçekleşen antijen sunumu ve kemokin, sitokin üretilmesi ve fagositozdur. Ayrıca sinir sistemine özelleşmiş görevleri olarak myelin kılıf oluşumunu dolayısıyla nöron ve astrosit korunumunu sağlama, dentritik dikenlerin budanması ve sinaptik budamanın kontrolü yer almaktadır. Ayrıca kanın doğrudan sinir sistemi hücrelerine temasının toksik etkileri sebebiyle oluşan kan beyin bariyerinin geçirgenliği ve yapısı özelleşmesinde mikroglialar yardımıyla sağlanmaktadır. Tüm hücrelerde hücre içi homeostaz kaynaklı görülen yaşa bağlı işlevliliğinin azalması, sağlıklı mikroglia hücrelerinde rejenerasyon yeterince sağlıklı olmayan hücrelerde apoptoz yeteneği de bulunmaktadır.

2.4.1. Gelişim sırasında mikrogliaların katkıları

Mikroglia, nöronlarla aynı zamanda ortaya çıkar ve erken doğum öncesi dönemde diğer aksesuar glia hücrelerinin yokluğunda, bu hücreler MSS'nin nöronal mimarisinin kurulmasında kritik bir rol oynar (Frost ve Schafer, 2016). Gelişmekte olan beyne mikroglial katkılar, nöronal kaderleri ve sayıları kontrol eden aktiviteleri içerir. Gelişmekte olan fare beyinlerinde yapılan çeşitli analizler göstermektedir ki mikroglialar aktif apoptoz indüksiyonu ile nöronal progenitör hücrelerin (NPH'ler)

gelişim seyrini kontrol etmektedir (Ashwell, 1990; Martin-Teva ve ark., 2004). Bununla birlikte, mikrogliaların fare hipokampusünün nörojenik alanındaki apoptotik fazla nöronları temizleyerek juvenil nöronal devreleri şekillendirerek genç yetişkinlerdeki gelişimsel süreçlere de kontrol ettiği saptanmıştır (Sierra ve ark., 2010). Nöron apoptozunu desteklemesinin yani sıra NPH' lerin ve nöronların hayatta kalmasını, çoğalmasını ve olgunlaşmasını destekleyerek nörojenezi uyardığı da yapılan çalışmalarca raporlanmaktadır (Frost ve Schafer, 2016). Erken doğum sonrasında CX3CR1 kemokin reseptöründen yoksun mikrogliaların yetersiz miktarda nörotrofik insülin benzeri büyüme faktörü 1(IGF1) ürettiği ve bu nedenle desteklemede başarısız olduğu dolayısıyla nöronal hayatta kalımının olmadığı, beyin ölümünün gerçekleştiği saptanmıştır (Ueno ve ark., 2013). Nöron sayılarını azaltmayı ve arttırmayı amaçlayan bu karşıt faaliyetlerin nasıl koordine ve dengelendiği; bunların farklı MSS bölgeleri veya mikroglia alt kümeleri ile ilişkili olup olmadığı araştırılmaya devam etmektedir.

Sinapslar, MSS' deki nöronal devrelerin kalbinde yer alır mikrogliaların özellikle doğum sonrası gelişimin ilk 2 haftasında sinapsların oluşmasında etkin rol oynadığı iyi bilinmektedir. Ayrıca, sinapsların nöronal aktiviteden etkilendiği göz önüne alındığında, mikrogliaların sadece işlevsel olmayan sinapsları ortadan kaldırmadığı, aynı zamanda sinaptik devrelerin yeniden şekillenmesinde de aktif bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Tremblay ve ark., 2010; Wake ve ark., 2013). Doğum sonrası kritik süreçte görsel korteksin sinaptik budamasının sağlanması için ayrıca purinerjik reseptörlerin modüle edilmesinde mikroglial ekspresyonunu gerektirdiği rapor edilmiştir (Sipe ve ark., 2016). Bununla birlikte, sinapslar mikroglial “beni yeme” sinyali olarak bağlayan CD47 tarafından aşırı budamadan korunduğu düşünülmektedir (Lehrman ve ark., 2018). Sinaps yeniden şekillenmesine ek olarak, mikroglialın gelişen beyindeki nöronal kablolamayı modüle ettiği de bildirilmiştir (Squarzoni ve ark., 2014). Spesifik olarak, mikroglial aktivitenin bozulmasının, ön beyindeki dopaminerjik aksonların büyümesini, neokortikal internöronların alt kümelerinin laminar konumlandırmasını etkilediği gösterilmiştir (Squarzoni ve ark., 2014).

Gelişmekte olan ve erken doğum sonrası beyindeki mikroglia, yetişkin mikrogliasından birtakım farklılıklar taşımaktadır ikinci hücrelerin çevrelerini taramasına izin veren karakteristik dallanmış uzantılardan yoksun olmaları bakımından

farklıdır. Bunun yerine, embriyo ve erken doğum sonrası hücre aktivasyonunu gösteren tipik makrofaj benzeri veya mobil amoeboid morfoloji sergiler (Lawson ve ark., 1990). Ekspresyon profili oluşturma, bunun hücrelerin fagositoz ve diğer doku yeniden şekillenme süreçlerine aktif katılımını yansıttığı varsayımını destekler (Matcovitch-Natan ve ark., 2016). Ayrıca, doğum sonrası ilk haftaya kadar, mikroglia'nın yetişkin mikrogliasından önemli ölçüde daha proliferatif olduğu gösterilmiştir (Askew ve ark., 2017; Bennett ve ark., 2018).

Nöronlarla etkileşimlerine ek olarak, mikroglia'nın oligodendrositler ve progenitörleri gibi diğer MSS hücrelerini ve ayrıca damar gelişimini desteklediği bildirilmiştir. Gelişmekte olan beyaz cevherdeki mikroglia kümelerinin normal miyelinogenez için kritik olduğu gösterilmiştir (Hagemeyer ve ark., 2017; Wlodarczyk ve ark., 2017). Nörovaskülerizasyonun mikroglia kontrolünde olduğu, zebra balığı ve fare retinasında gösterilmiştir (Fantin ve ark., 2010). Spesifik olarak, hücreler, gelişimsel anjiyogenez sırasında damar füzyonunu teşvik etmek için henüz tanımlanmamış bağımsız aktivite sağlıyor gibi görünmektedir. Tüm bunlar mikrogliaların hem nöronlarla hem de diğer hücresel elemanların gelişimi için oldukça kritik olduğunu beyin maturasyonunda temel taşı vasfesi gördüğünü kanıtlamaktadır.

2.4.2. Yetişkin beyin homeostazisi sırasında mikroglia işlevleri

Yetişkin beyninin mikrogliaları, ölü ve fazla hücreleri temizlemede oldukça etkili olduğu bilinmektedir ancak beyinin gelişimi ve yetişkin dönem maturasyonunu etkisi çok göz önünde olan bir parametre değildir (Sierra ve ark., 2010). Gelişmekte olan ve yetişkin beyninde mikrogliaların zamansal heterojenliği hali hazırda iyi bilinmektedir (Matcovitch-Natan ve ark. 2016, Masuda ve ark., 2019). Daha önce yapılan çalışmalarda, mikrogliaların bölgeye özgü yoğunluk ve morfoloji gösterdiği de bilinmektedir (Lawson ve ark., 1990). Ancak uzaysal heterojenliğin kanıtı yani korteks, hipokampus ve serebellum gibi farklı beyin bölgelerinde mikroglialar arasındaki farklılıkların nasıl düzenlendiği hala netleştirilmemiştir (Silvin ve Ginhoux, 2018).

Farklı beyin bölgelerinden izole edilen mikrogliaların toplu ve tek hücreli transkriptom profili, aksine şimdiye kadar çelişkili sonuçlar vermiştir (De Biase ve ark.,

2019; Grabert ve ark., 2016; Matcovitch-Natan ve ark., 2016), mevcut veriler genel olarak serebellumda mikroglianin bazı benzersiz özelliklerini olduğunu idaa etmektedir. Bu görüşü desteklemek amacıyla yapılan çalışmada serebellar mikrogliaların epigenetik düzenlemeyle bağlantılı olabilecek ve daha gelişmiş bir temizleme aktivitesi sergilediği gösterilmiştir ancak bu aktivitede striatal veya kortikal mikroglialarda saptanmamıştır. Dolayısıyla serebellar mikrogliaların daha niş aktiviteleri olabileceği düşünülmektedir ancak bunun için daha fazla kanıtı ihtiyaç vardır (Ayata ve ark., 2018). Özellikle, insan beyindeki mikroglianin bölgesel heterojenliği, yakın zamanda tek hücreli kütle sitometrisi ile tespit edilmiştir (Böttcher ve ark., 2019). Bu alandaki ilerleme muhtemelen mikrogliyal kimlikleri belirleyen yerel ipuçlarının tanımına ve farklı anatomik nişlerin karakterizasyonunu tespit etmeyi sağlayacaktır. Bu alandaki çalışmalar artıkça mikrogliaların ne gibi farklı alt gruplarının olduğu hangi alt grubun ve/veya hangi anatomik bölgedeki alt grubun ne işe yaradığı çok daha iyi anlaşılacaktır.

2.4.3. MSS hastalıklarına yanıt veren ve indükleyiciler olarak mikroglia

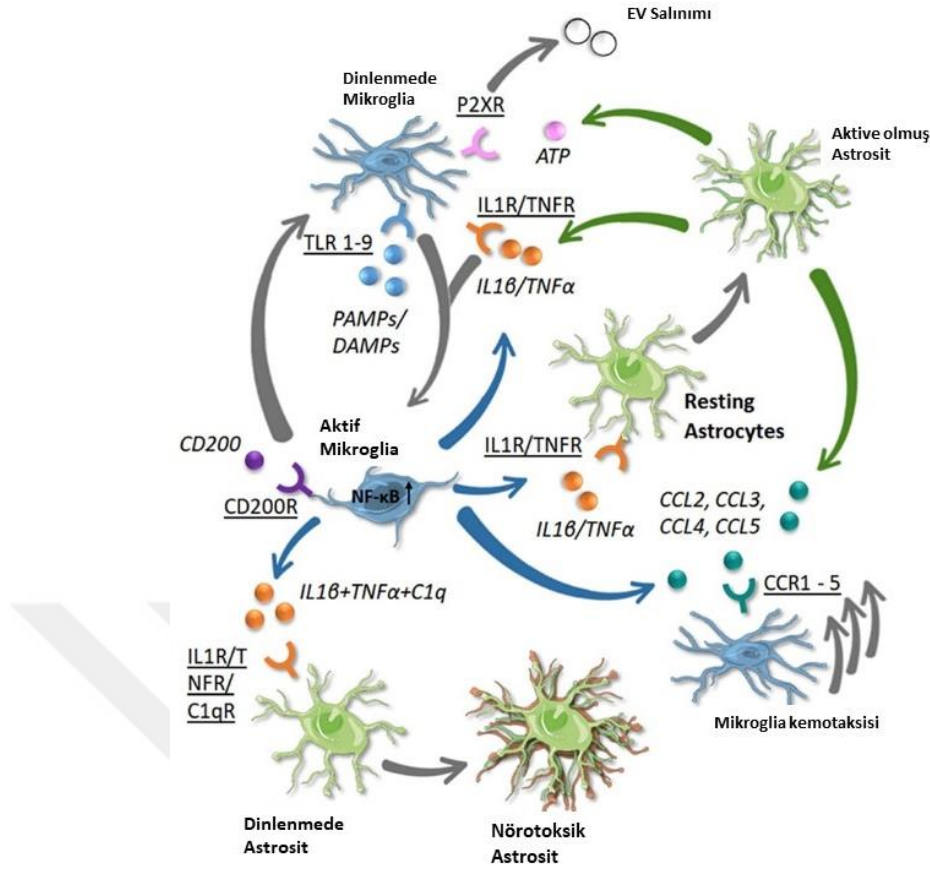
Mikroglia, MSS'nin gelişimi ve doğumdan sonra beyin homeostazının korunması için hayati önem taşıyan büyük hücre dışı parçacıkların tanınmasını, yutulmasını ve sindirilmesini içeren reseptör aracılı bir süreç olan fagositoz gerçekleştirir. Bu kapasitede, CR3 yoluyla kompleman opsonin C1q ile etiketlenen mikrogliyal sinapsları eritir (Schafer ve ark., 2012) ve TREM2 dahil olmak üzere çeşitli reseptörler yoluyla fosfatidilserini açığa çıkaran ölü veya ölmekte olan nöral hücreleri fagosit eder (Takahashi ve ark., 2005). Fagositoz için kullanılan çok çeşitli yolların Alzheimer, Parkinson, Frontotemporal demans, MS ve şizofreni gibi pek çok dejeneratif hastalıkla ilişkisi olduğu yapılan çalışmalarca kanıtlanmıştır (Guerreiro ve ark., 2013; Sims ve ark., 2017). Bazı MSS hastalıkları, örneğin şizofreni ve otizm spektrum bozukluğu gibi bozulmuş mikrogliyal fagositozla ilişkilendirilmiştir, doğrudan mikrogliaların deformitesi sonucunda sinaptik budama ve deşarjın yanlış regüle edildiğini savunan gruplar da vardır (Cronk ve ark., 2015; Schafer ve ark., 2016).

Mikroglia en temelde, MSS ortamını sürekli olarak araştırıp mikro-ortamlarındaki değişiklikleri algılar. İstilacı patojenleri, yanlış katlanmış proteinleri, kemokinleri ve sitokinleri, metabolitleri, inorganik maddeleri ve pH veya hücre dışı

matristeki değişiklikleri tanımalarına izin veren mikroglial duyu adı verilen bir dizi reseptör ile donatılmıştır, bu etkileri sayesinde de hastalıklar açısından çok temel bir noktada durmaktadırlar (Hickman ve ark., 2013). Akut yaralanmadan birkaç dakika sonra, mikrogliallar hasar bölgesine doğru harekete geçerler bu hareketin kolaylaşması adına ameboid forma dönüşen mikroglialar bölgeye ulaştıktan saatler ila günler sonra reaktif mikrogliaya dönüşerek fagositozu ve akut inflamatuvar yanıtları oluştururlar (Stence ve ark., 2001; Davalos ve ark., 2005). Mikroglialının doku hasarı bölgelerine kemotaksisi, nöral hücrelerden salınan ATP veya ADP'yi bağlayan mikroglia üzerindeki P2Y₁₂ reseptörlerinin aktivasyonuna bağlıdır (Davalos ve ark., 2005; Haynes ve ark., 2006), dolayısıyla savaşmayı sağlayacak mikroglia yanıtları için ATP elzemdir. Bu reaktif mikroglia ayrıca aşırı derecede dallanmış bir morfoloji gösterir yani M1 fenotipinde görülürler (Hellwig ve ark., 2016; Hui ve ark., 2018; Erny ve ark., 2015).

İmmünolojik ve moleküler tekniklerin ortaya çıkmasından önce, mikroglia'nın morfolojik transformasyonu, aktivasyonlarının birincil özelliği ve MSS patolojisinin bir göstergesi olarak kabul edildi. Ancak, insan serebral korteksindeki mikroglialının morfometrik analizi, psikiyatrik, nörolojik veya inflamatuvar hastalıkları olmayan kişilerde de dallanmış, hazırlanmış, reaktif ve ameboid fenotiplerin eşzamanlı varlığı saptanmıştır (Torres-Platas ve ark., 2014). Dolayısıyla ortamda M1 fenotipinde mikrogliaların görülmesi her zaman patojen veya travma varlığı göstermemektedir.

MSS'nin birincil immün efektör hücreleri olan mikroglia, MSS ortamındaki değişikliklere hızla yanıt verir ve önemli immün mediatörleri salgılayarak nöroinflamasyonu düzenler, eğer yeterince hızlı veya yeterli tepki veremezlerse patoloji oluşturmaları olasıdır. IL-1 β , IL-6, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), IL-23 ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinler salgılayabilirler. Bu sitokinlerin nörodejeneratif hastalıklarda da uyarıldığı ve çeşitli yollarla ilişkisi olduğu bilinmektedir. Aktive edilmiş mikroglia tarafından IL-1 α , TNF- α ve C1q gibi belirteçleri ifadesinin artması sadece nöronların değil astrositlerinde iç dinamiklerini bozar. Nörodejeneratif ve nöroinflamatuvar hastalıkları olan kişilerin beyinlerinde bulunabilen nörotoksik bir astrosit fenotipe dönüştürür, tüm bunlar ayrıntılı olarak şekil 9'da gösterilmiştir (Liddelov ve ark., 2017).



Şekil 9: İnflamasyon durumunda mikrogliaların diğer sinir sistemi hücreleriyle etkileşimi (Garland ve ark., 2021)

Reseptörler (altı çizili) ve sinyal molekülleri (italik), hücre kaynağını gösteren okun rengiyle gösterilir (yeşil = astrositler, mavi = mikroglia). Ortaya çıkan fenotipik değişiklikler veya hareketler gri oklarla gösterilir (sırasıyla tek veya üçlü). Mikroglia, TLR reseptörleri (mavi) aracılığıyla PAMP / DAMP sinyalizasyonu ile aktive oldukça, aktive olurlar (gri ok). Astrositleri ve diğer mikroglial hücreleri aktive etmek için IL1R ve TNFR reseptörlerine bağlanan aktif mikroglia salınımı IL1β ve TNFα. Astrositler üzerinde C1q sinyalleşmesinin eklenmesiyle yapılan bu sinyalleşme, nöroprotektif fonksiyonların kaybıyla birlikte nörotoksik bir fenotipe yol açar. Aktif astrositler, nöroinflamatuvar yanıtı yaymak için IL1β ve TNFα'yı serbest bırakır. Ayrıca, mikroglia üzerindeki P2XR reseptörlerine bağlanan ATP'yi serbest bırakırlar ve bu da hücre dışı vezikül salınımına yol açar. Aktif astrositler ve mikroglia ayrıca mikroglia (CCR1-CCR5) üzerindeki reseptörlere bağlanan ve kemotaksislerini yaralanma / patojen bölgesine doğru uyarıcı kemokinleri (CCL2-CCL5) serbest bırakabilir. İnflamasyon kısmen CD200'ün aktive mikroglia üzerinde CD200R'ye bağlanmasıyla çözümlü homeostatik bir fenotipe geri dönmelerine neden olur.

Mikrogliaya epigenetik olarak aracılık edilen bir bağışıklık hafızasının tanımlanması IL-1β, IL-6 ve TNF-α sekresyonuna bağımlı nörolojik ve psikiyatrik bozukluklar için önemli etkilere sahiptir (Wendeln ve ark., 2018). Sitokinlerin salgılanmasına ek olarak, aktive edilmiş mikroglia, mitokondriyal fonksiyonu bozan ve enerji eksikliğini yaratan önemli bir reaktif oksijen türleri (ROS) kaynağıdır dolayısıyla nörodejenerasyonu tetiklemektedir. Ayrıca, mikroglial indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojen oksidaz (NADPH) tarafından üretilen peroksinitrit, oligodendroglial hücre ölümüne aracılık

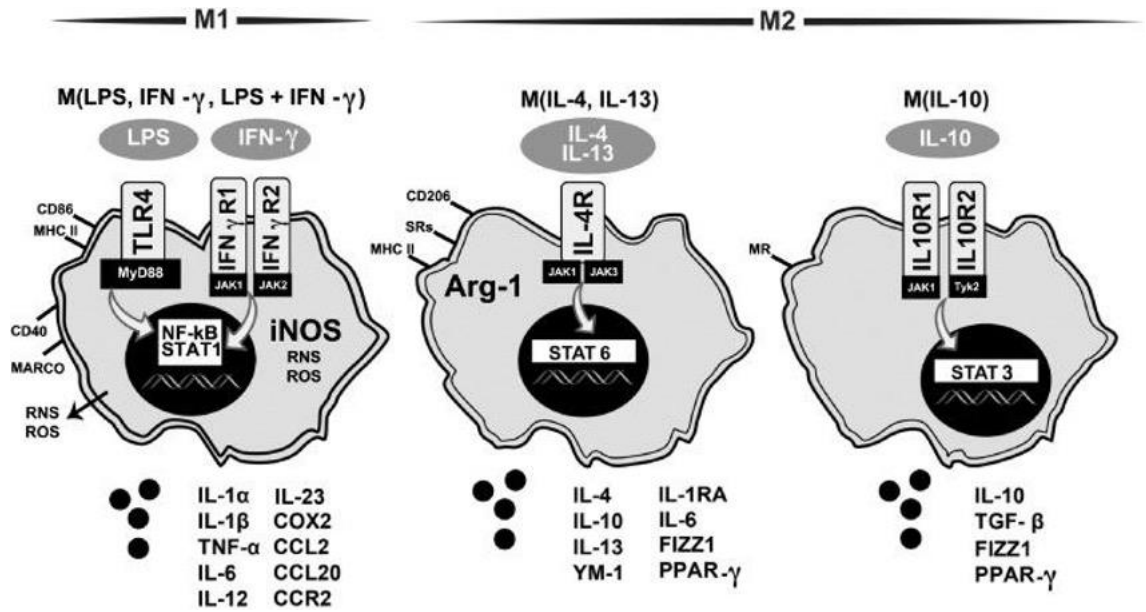
edebilir. Yaşlanma sırasında, mikroglia'daki katepsin B'nin artan ekspresyonu ve sızıntısı, artan ROS üretimi ve proinflamatuar mediatörler nedeniyle hafıza bozukluğuna katkıda bulunur (Ni ve ark., 2019).

Mikroglia geleneksel olarak MSS hastalıklarına yanıt verdikleri düşünülür bu sebeple de hücrelerin doğrudan kendilerinin hastalık sebebi olabileceği göz önünde bulundurulmaz ancak, birincil mikrogliopatiler de dejenerasyonun sebebi olabilirler (Prinz ve Priller, 2014). Somatik mutasyonları sonucunda mikrogliyal morfolojisinin değiştiği bilinmektedir. Bu da bazı semptomlara neden olmaktadır; serebellar ataksi, parezi ve kilo kaybı vb. (Mass ve ark., 2017). Mikrogliosis, astrogliosis, demiyelinizasyon, fibrozis, sinaptik kayıp ve nöronal hücre ölümünün nöropatolojik özellikleri geç ortaya çıkar ve özellikle arka beyinde belirgindir. Hipokampüse bağlı deformitelerin incelendiği bir çalışmada görülmüştür ki mikroglia'da mutasyon tanımlanıp nöronlarda veya monositlerde mutasyon bulunmadığı durumlarda da deformasyonlar devam etmektedir (Oosterhof ve ark., 2019). Bazı primer mikroglia mutasyonlarının ilerleyen dönem semptomlarında nörodejeneratif hastalık benzeri tablolar oluşturduğu bilinmektedir. Alzheimer, Parkinson, Huntington vb hastalıklardaki tanımlanan gen mutasyonlarının mikroglial gen mutasyonları olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla tüm bu bilgiler ışığında bazı gruplar nöron veya astrositlerden kaynaklanan hastalıkların en temelde mikroglia hastalığı ve burda yolunda gitmeyen şeylerin uzun dönem sonra semptomlarının nöronal bozulmalara, onların da merkezi veya periferik sendromlara dönüştüğünü savunmaktadır.

2.4.4. Mikroglia polarizasyon M1/M2 fenotipleri

Makrofajlar, enfeksiyon veya yaralanmanın ardından oluşturulan endojen uyaranlara yanıt verir ve hem patojenik hem de koruyucu roller sergiler (Boche ve ark., 2013; Wynn ve ark., 2013). Uygun uyarı üzerine, klasik olarak aktive olan proinflamatuar (M1) makrofajlar, genellikle ilk birkaç saat veya gün içinde meydana gelen doğuştan gelen bağışıklık sisteminin ilk savunma hattında hizmet eder. Bu polarizasyondaki mikroglia, periferik monositlerle aynı fenotipik özellikleri paylaşır. Bu durumda, doğuştan gelen immünolojik fonksiyonların yerine getirilmesini sağlar. Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanları (NOD'ler), NOD

benzeri reseptörler ve birçok çöpçü reseptör gibi tam bir bağışıklık reseptörleri dizisini kullanarak zararlı uyaranları tanırlar (Ransohoff ve Brown, 2012). Yaralı dokuda mikroglia, çeşitli aktivasyon durumlarında bulunur ve inflammatuar yanıt sırasında fonksiyonel olan fenotip değiştirme yeteneğini korumaktadır (Stout ve ark., 2005). Yaralanma ile, dolaşımdan sızan yerleşik mikroglia veya makrofajlar proinflammatuar sitokinlere (IFN- γ , TNF- α) veya hücre kalıntılara veya bakteriyel kalıntılara maruz kaldıklarında bir proinflammatuar (M1) fenotipine doğru polarize olurlar. Dolayısıyla proinflammatuar sitokinler (TNF- α , iIL-1 β , IL-12) üretir, antijen sunar ve NO üretimi için yüksek seviyelerde indüklenirler bu durumda da iNOS eksprese eder (Villalta ve ark., 2009). Bu eylem patojeni öldürmeye ve adaptif bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için T hücrelerini polarize etmeye yöneliktir. Birçok deneysel modelde, M1 yanıtı LPS gibi bakteri kaynaklı ürünlere veya IFN- γ gibi enfeksiyonla ilişkili sinyallere maruz kalmanın ardından artışı saptanmıştır. Mikroorganizmaların yokluğunda, travma, iskemik reperfüzyon hasarı veya kimyasal maruziyetin bir sonucu olarak benzer bir yanıt açığa çıkar, bu yanıt steril bir inflammatuar yanıt olarak adlandırılır yani inflammatuar yanıt oluşması için patojene ihtiyaç yoktur. Travmatik veya dejeneratif sendromlarda bu yanıtı oluşturur (Shechter ve Schwartz, 2013; McPherson ve ark., 2014).



Şekil 10: Mikroglia fenotip polarizasyonu (Martinez, F. O., ve Gordon, S. 2014)

Bu diyagram bu makalelere dayanmaktadır ve Martinez ve Gordon'dan (2014) uyarlanmıştır. Klasik M1 durumunda, LPS ve / veya IFN- γ maruz kalmak, sırasıyla TLR4 veya IFN- γ reseptörleri 1 ve 2'yi uyarır, bu da transkripsiyon faktörleri NF- κ B ve STAT1'in aktivasyonuna ve CD86 ve MHC-II'nin ekspresyonunun artmasına neden olur. İNOS'taki artış, ROS ve reaktif azot türlerinin (RNS) artmasına, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23, kemokinler CCL2 ve CCL20 ve reseptör CCR2, kollajenöz yapıya sahip makrofaj reseptörü (MARCO) ve COX2 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını üretir.

2.4.4.1. M1 polarizasyonu

Klasik olarak aktive edilmiş M1 makrofajlar ve dendritik hücreler metabolizmayı, glikolizi, NO düzeyi ve sitrülün üretimini artırıcı yönde manipüle eder. Bu geçiş, pentoz fosfat yolunun (PPP) aktivasyonu ve mitokondriyal oksijen tüketiminin azalması ile glukoz alımını ve laktat üretimini artırır (Krawczyk ve ark., 2010; Rodríguez-Prados ve ark., 2010). M1 makrofajlar, krebs döngüsü ara maddesi süksinatı indükleyerek, sürekli bir IL-1 β üretimini sağlar, bu sayede Interferon 1 α salınımını düzenlemektedir (Galvan-Peña ve O'Neill, 2014). Artan glikoliz, mikrobiyosidal aktiviteyi hızlı bir şekilde tetiklemeyi, hücrelerin hipoksik bir ortamda hayatta kalmasını sağlar. M1 makrofajlarının önemli bir özelliği de fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesini kolaylaştırmak için ROS üretimini artırmaktır (West ve ark., 2011). Ancak ROS üretimi hücre içi hasar, azaltılmış glutatyonun sürdürülmesi için gerekli olan artan NADPH üretimi veya NO üretimini tetiklediği için bu durumda mitokondrial hasarı neden olduğu için çok kontrollü ve sınırlı gerçekleştirilmesi gereken bir durumdur (Bredt ve Snyder, 1990; Knowles ve Moncada, 1994). Yüksek konsantrasyonlarda NO, O₂ ile rekabet ederek mitokondriyal solunumu geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Azaltılmış mitokondriyal solunum ile ROS üretimi, süperoksit anyonu (O₂⁻) artırır ve süperoksit dismutaz (SOD)₃ ile H₂O₂'ye dönüştürerek sitoplazmaya yayılmasına sebep olur (Fukai ve ark., 2002). Uzun süreli üretimi ile NO, peroksinitrit (ONOO⁻) üretmek için O₂ ile reaksiyona girebilir ve elektron taşıma zincirini geri döndürülemez şekilde inhibe edebilir (Bolaños ve ark., 2004). Fonksiyonel olarak, M1 tarafından üretilen NO, mikrobiyosidal aktiviteye ve hücre proliferasyonunu inhibe etme kapasitesine sahip bir efektör molekül olarak hizmet eder (MacMicking ve ark., 1997). Makrofajlarda bir tarama stratejisi kullanılarak, glikolitik enerji akışının spesifik modülasyonunun makrofaj aktivasyonu için kritik olduğu ve hücre polarizasyonunu tanımlaması muhtemel olduğu gösterilmiştir (Haschemi ve ark., 2012). Ancak MSS hasarında inflamatuvar aktivasyonun mitokondrial dejenerasyondaki rolünün boyutu şu an tam olarak anlaşılamamıştır bu konudaki çalışmalar devam etmektedir (de Rivero Vaccari ve ark., 2014).

2.4.4.2. M2 polarizasyonu

Makrofajların yaralanmaya ilk tepkisi bir süredir bilinmesine rağmen, doku yeniden şekillenmesi üzerindeki olumlu etkiler daha yakın zamanda kabul edilmiştir (Novak ve Koh, 2013; Shechter ve Schwartz, 2013). 1990'ların başında, makrofaj alternatif aktivasyonu kavramı, alternatif bir (M2) aktivasyon durumunun indüklenmesinde IL-4'ün rolünü gösteren çalışmaya dayandırılmıştı (Stein ve ark., 1992). Bu çalışma ile anti-inflamatuar sitokinlerin (IL4, IL10, IL13 ve TGF- β) ve ayrıca arginaz-1 (Arg1), CD206 ve Chitinase-3-like-3'ün (kemirgenlerde Ym1) ekspresyonunu indükleyerek (Colton, 2009; Henkel ve ark., 2009) antiinflamatuar mekanizmalarında kurulabileceği düşünülmüştür. M2 makrofajlar temel olarak alerji yanıtı, parazit temizleme, inflammatuar nemlendirme, doku yeniden şekillenmesi, anjiyogenez, immüno-regülasyon ve tümör teşvikinde rol oynar (Sica ve Mantovani, 2012).

M2 makrofajlar proinflammatuar hücre fenotiplerini devre dışı bırakmak ve homeostazı yeniden sağlamak için antiinflamatuar faktörler (IL-10, IL-13, TGF- β) salar ve inflamasyonun çözülmesini sağlarlar (Ortega-Gomez ve ark., 2013). Bu, inflammatuar hücreleri aşağı regüle etmek için IL-10 üretimini, Ym1/2, ornitin gibi proteinleri koruyan hücre dışı matrisi, yara onarımı için poliaminleri ve fagositoz ile ilişkili daha yüksek reseptör seviyelerini uyarırlar (Martinez ve ark., 2009). M2 aktivasyonu ile ilişkili fonksiyonel değişiklikler, IL-10 ile uyarılan hücreler tarafından apoptotik hücrelerin artan şekilde yutulmasına sebep olur (Benoit ve ark., 2008; Michelucci ve ark., 2009). M2 hücreleri kemokinleri (CCL17, CCL22 ve CCL24) eksprese eder (Mantovani ve ark., 2004) ve makrofaj aktivasyon faktörünü CD68 veya CD163 ile birlikte eksprese eder (Barros ve ark., 2013). Ancak bu belirteçlerin özgüllüğü sorgulanmaya devam etmektedir. Birkaç çalışmada, M2 mikroglia'nın özellikle nörokoruyucu etkisi ve onarım üzerindeki etkisi gösterilmiştir (Cherry ve ark., 2014; Butovsky ve ark., 2006). Bu etkinin glatiramer asetatin, nöroprotektif etki için insülin benzeri büyüme faktörü 1'i eksprese etmek üzere mikroglia'yı indükleyerek sağlandığı düşünülmektedir (Kigerl ve ark., 2009).

M2 makrofajlar, doku onarımı veya iyileşmesinde yer alan daha uzun vadeli işlevler için oksidatif metabolizmayı kullanır (Biswas ve Mantovani, 2012). M2 fenotipi ayrıca poliamin ve kolajen sentezi, fibrozis ve doku yeniden şekillenme işlevleri yoluyla

hücre proliferasyonunu ve onarımını teşvik etmek için ornitin üretimi ile yerleşik makrofajların varsayılan polarizasyonu olarak kabul edilmiştir (Murray ve Wynn, 2011). M2 makrofajlarında, glikoz tüketimi M1 ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha düşüktür (Rodriguez-Prados ve ark., 2010). Şu ana kadar yapılan çalışmalarda, mikroglia M2 aktivasyonu ile ilişkili olarak mitokondrinin rolü hakkında sınırlı veri vardır (Gimeno-Bayon ve ark., 2014). IL-4 ile uyarılan BV-2 mikroglia hücrelerinin glikoz tüketimini ve laktat üretimini azalttığını yapılan çalışmalar sonucunda rapor edilmiştir. Araştırmacılar bu kaymanın, hücrelerin fagositik eylemleri ve anabolik reaksiyonlara olan ihtiyacın azalması ile ilişkili olduğunu öne sürmüştür (Vats ve ark., 2006).

2.4.5. Human mikroglia kolon III(HMC3) hücre hattı

İnsan mikroglial klon 3 hattı, HMC3 1995 yılında Prof. Tardieu'nun laboratuvarında, insan mikroglial hücrelerinin SV40'ın ölümsüzleştirilmesi yoluyla izole edilmiştir (Janabi ve ark., 1995; Li ve ark., 2009). Hücrenin izolasyonu şu şekilde gerçekleştirilmiştir; mikroglia hücreleri 8 ila 12 haftalık insan embriyolarının omuriliği ve kortikal alanından alınan primer hücreler dairesel çalkalama yoluyla izole edilip 10-15 gün kadar kültürlenmiştir. Hücreler, farklı şekiller, vakuollü bir sitoplazma ve kısa süreçler ile karmaşık bir morfoloji göstermiştir. Hücrelerin mikroglia olduklarını teyit etmek ve fenotiplerini saptamak için farklılaşma kümesi CD68, CD11b ve CD14 dahil olmak üzere çeşitli miyeloid spesifik belirteçler ile boyanmıştır. Ölümsüzleştirilmiş hücreler, hızlı büyüme kapasitesi 24 ve 48 saat arasında değişen iki katına çıkma süreleri elde etmiştir. Boyamanın ardından alınan değerlere göre primer insandan elde edilen mikroglia hattına daha yüksek CD68 EBM/11-pozitif hücre yüzdesi ve daha düşük fagositik aktivite görülmüştür ancak birincil mikroglial hücre kaynağının fenotipik ve morfolojik özelliklerinin çoğunu koruduğu bildirilmiştir. Antijenik ekspresyonun in vitro 35 pasaja kadar stabil olduğu ifade edilmiştir. İnsan mikroglial klon 3 (HMC3 hücreleri) orijinal olarak bazal koşullar altında CD68 ve CD11b pozitif (%80-90) ve CD14, MHCII (Majör histokompatibilite kompleksi II), CD4 negatif olarak karakterize edilmiştir (Janabi ve ark.,1995). Bununla birlikte, insan rekombinant interferon-gama ile tedaviye yanıt olarak MHCII ekspresyon seviyesi arttığı bildirilmiştir (IFNy, 18 saat boyunca 100 U/ml; Boeringher-Mannheim, Mayland Fransa). IFNy ile stimülasyondan sonra. MHCII

pozitif hücrelerin yüzdesi ($43 \pm \%10, \pm SD$), diğer klonlara kıyasla HMC3 hücrelerinde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. HMC3 hücreleri dahil tüm ölümsüzleştirilmiş mikrogliyal klonlarda, IL-6'nın bazal üretimi, insan rekombinant IL-1a (10 U/ml, Boeringher-Mannheim) veya lipopolisakkarit (LPS) ile 24 saatlik tedavilerle tutarlı bir şekilde arttırıldığı rapor edilmiştir. Ancak, ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarının, primer kültürlerle kıyasla LPS'ye daha az yanıt verdiği raporlanmıştır (Janabi ve ark., 1995; Sébire ve ark., 1993). Dolayısıyla hücre hattının verimliliği tartışmalıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HMC3 Hücre Hattının Hücre Kültürü

3.1.1. HMC3 hücre hattın dondurulması ve çözünmesi

HMC3 hücre hattı ATCC (American Type Culture Collection) firmasından satın alındı. Hücre hattının uzun süreli muhafazası adına kültürdeki hücreler belli bir yoğunluğa ulaştıklarında (%95) daha uzun süreli saklamak ve sağlıklarını korumak adına dondurularak nitrojen tankında muhafaza edilmeleri gerekir. Bu işlem için, kültürden gelen hücreler FBS'de (Fetal Sığır Serum, Gibco) 1×10^6 hücre / ml yoğunluğuna ulaştığında hücreler kültürden kalma işlemleri uygulandıktan sonra uzun süreli saklama için gerekli olan krivial tüplere alındı. Kriyovial tüpler buz üzerine yerleştirildi ve her tüpe 950 µl hücre süspansiyonu eklendi. Daha sonra, kristalleşmeyi önlemek için damla damla ve karıştırılarak 50 µl DMSO (Dimetil Sülfoksit, Applichem) ilave edildi. Hücreler 1 saat boyunca -20 °C'de, daha sonra gece boyunca -80 °C'de tutuldu. Ertesi gün, hücreler uzun süreli kullanım için sıvı azot tankında -196 °C'ye alınarak burada saklandı.

İhtiyaç dahilinde daha önceden muhafaza edilmek için saklanan hücrelerin çözünme işlemi ise şu şekilde gerçekleştirildi. 10 ml önceden ısıtılmış Ham F-12 Ortamı (Biochrom, cat no: F0815) 15ml'lik falcon tüpe aktarıldı. Kriyovyal tüpler azot tankından çıkartılıp (-196°C), 37 °C dereceye hazırlanmış olan su banyosuna alındı ve hafifçe çalkalayarak hücrelerin erimesi sağlandı bu süreçte hücre sağlığı gözetilmesi optimum düzeyde olması için 2 dk'dan kısa sürede hızlıca yapıldı. Hücreler kriyovalden hemen F-12 içeren falcon tüpe alınıp 5 dakika boyunca 1800 rpm hız ve oda sıcaklığında santrifüj edildi. Bu adım hücreler için toksik olan DMSO ve istenmeyen diğer hücre artıklarından arındırmak amacıyla yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant atılırken, hücre peleti daha önceden hazırlanmış ve ısıtılmış yıkama besiyeri (%1 sodyum-prüvat, %1 L-glutamin, %1 penisilin streptomisin, %10 FBS) ile tekrar suspanse edilip içinde kalan olası hücre artıklarında uzaklaştırılması adına bir kez daha 5dk, 1600rpm ve oda sıcaklığında santrifüj edildi. Oluşan süpernatant atıldıktan sonra kalan hücre peleti önceden hazırlanmış ve su banyosunda 37 °C ısıtılmış olan %15 FBS, %1 L-Glutamin, %1 pirüvat, 100 mg/ml prymocin içeren besiyeri ile homojenize edilip 25 cm 2'lik flaska ekildi. Ekilimi tamamlanan hücreler 37 °C, %5 CO2 şartlarında çalışan inkübatöre alınarak inkübasyonu sağlandı. Flaskın kapağı mevcut haliyle hava giriş çıkışına uygun bir yapıya

sahipti. Ertesi gün ölü hücrelerden arındırmak için besi yeri yenilendi, hücrelerin morfolojileri ve yoğunlukları her gün takip edildi.

3.1.2. HMC3 hücre hattın besi yeri değişimi ve kültürlenmesi

Hücrelerin çözülmesi ve ekilmesinden sonra hücreler büyümeye ve çoğalmaya başladı. Hücrelerin çoğalma miktarı, yoğunluğu ve morfolojileri her gün kontrol edildi. Flasktaki hücre yoğunluğu %75-80 olduğunda hücrelerin refahı adına pasaj işlemleri gerçekleştirildi. Hücre pasajı öncesi; Yıkama besi yeri (%1 sodyum-prüvat, %1 L-glutamin, %1 penisilin streptomisin, %10 FBS), Tamamlanmış besi yeri (%1 sodyum-prüvat, %1 L-glutamin, 100 mg/ml prymosin, %5 FBS), Kalsiyum ve Magnezyum içermeyen PBS (Fosfat Tamponlu Salin, Biochrom) ve Tripsin/EDTA solüsyonu (Gibco; kat. no: 25200-072) 37 °C su banyosunda önceden ısıtıldı. Hücreler inkübatörden alınıp biyogüvenlik kabinine alınıp, mevcut kirli besi yerleri uzaklaştırılıp 5 ml kalsiyum-magnezyum içermeyen PBS ile nazikçe yıkandı. Ölü hücre ve hücre artıklarından kurtulmak için yıkanan hücreler PBS'ten uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml %0.25 Tripsin/EDTA solüsyonu ilave edilerek 37 °C, %5 CO₂'lik hücre inkübatöründe 2 dakika boyunca inkübe edildi. Hücrelerin hücre-hücre ve hücre kültür kabı arasında kurduğu yapışma proteinlerinin kopup kopmadığı yani hücrelerin kalkıp kalmadığı florasan mikroskop altında kontrol edildi, hücrelerin kalkmaması durumunda kültür kabı hafifçe sallanarak hücreler kaldırıldı. Enzim aktivitesinin durdurulması için 3ml yıkama besi yeri eklenen hücreler toplanıp 15ml'lik tüpe alındı. 5 dakika, 1600 rpm, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atılıp pellet 1ml tamamlanmış besi yeri eklenip homojenize edildi. Hücre canlılığının tayini için Trypan Blue (Sigma; kat. no: T8154) boya ile 20 ml hücre homojenize edilip Bio Rad-TC20 TM Automated Cell Counter ile sayıldı. Sayılan hücreler yeni doku kültürü şişesine santimetrekareye 4×10^4 hücre olacak şekilde hesaplanıp %5FBS, %1 L-glutamin, %1 sodyum-püruvat, 100mg/ml prymocin içeren besi yerine alındı ve ekildi. 37 °C, %5 CO₂ şartlarındaki hücre inkübatörüne alınıp inkübe edildi. Hücrelerin morfolojileri ve yoğunluğu her gün kontrol edildi. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığı için 3 günde bir pasajları yapıldı.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Desenin Oluşturulması

Grup I: Kontrol

Grup II: HMC3 Hücre Hattında Topo IIβ Gen İfadesinin Susturulması (knock down)

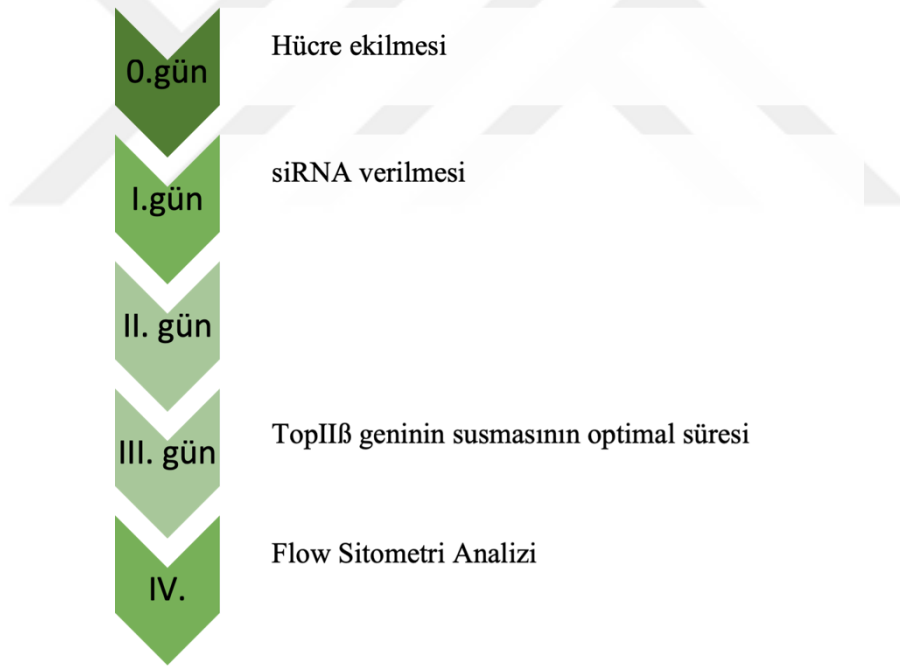
Grup III: LPS İndüklü Nöroinflamasyon Modeli HMC3 Aktivasyonun Gösterilmesi

Grup IV: Topo IIβ Gen İfadesi Susturulmuş HMC3 hücre hattında LPS ile indüklü Nöroinflamasyon Modeli

Grup IV: Topo IIβ Gen İfadesi Susturulmuş HMC3 hücre hattında IFN γ ile indüklü Nöroinflamasyon Modeli

Grup IV: Topo IIβ Gen İfadesi Susturulmuş HMC3 hücre hattında LPS VE IFN γ indüklü Nöroinflamasyon Modeli

3.2.1. Deney deseninin oluşturulması



Şekil 11: Deney deseni

Deney planı yapılan optimizasyonlar sonucunda en verimli olduğu düşünülen şekilde tasarlanmıştır.

3.2.2. Kontrol grubunun oluşturulması

Yukarıda ‘‘HMC3 Hücre Hattın Besi Yeri Değişimi ve Kültürlenmesi’’ bölümünde yazıldığı gibi kültürlenen hücreler deney grubuyla birlikte santimetrekareye 4×10^3 hücre gelecek şekilde 96 kuyulu hücre kültürü tabağına yaklaşık 5×10^3 hücre alınıp

ekildi herhangi bir işlem yapılmadan deneyin teyit edilmesi için gereken veri olarak kullanıldı.

3.2.3. Topoizomeraz 2B'nin Susturulması

3.2.3.1. HMC3 hücrelerinin lipofectamine RNAiMAX ile muamele edilmesi

Deneyin sıfıncı günü, kontrol grubu ve optimal siRNA konsantrasyonu ve süresinin hesaplanması amacıyla literatür taranarak ulaşılan 20 ul/ml; 17,5 ul/ml; 15 ul/ml; 12,5 ul/ml; 10 ul/ml ;7,5 ul/ml konsantrasyonları 24 saat ve 48 saat grupları, hiçbir muamele yapılmayan kontrol grubu ve uygulanacak reagentin etkisini kontrol etmek için gereken negatif kontrol grubu olmak üzere tüm deney grupları üçer kopya halinde "kontrol grubunun oluşturulması "bölümünde yazıldığı gibi ekildi. Ayrıca kullanılacak olan siRNA Hs_TOP2B_5 (Cat No:SI02780736) ve Hs_TOP2B_6 (SI02781135) FlexiTube siRNA (Cat No:1027415) hazırlandı. SiRNA'lerin hazırlanması: 10 uM'lik bir çözelti elde etmek için 1 nmol liyofilize siRNA içeren her tüpe 100 ul steril, RNAaz içermeyen su eklendi. Elde edilen stok, 10x 10 ul/ml alikotlanıp -80'de saklandı.

Deneyin birinci günü(24 saat sonra),Lipofectamine TM RNAiMAX (Cat No:13778-150) el kitabında yazan protokol takip edilerek 10 ul önceden su banyosunda 37 C'de ısıtılan OptiMEM TM,Reduced Serum Media (Cat No:31985070) ile karıştırılıp bir ependorfa alındı, başka bir ependorfta 1:1 oranında alınan TOP2B_5 ve TOP2B_6 alınıp OptiMEM TM,Reduced Serum Media (Cat No:31985070) ile çözüldü seri seyreltme yöntemiyle hazırlanan altı farklı siRNA konsantrasyonu hazırlandı. SiRNA ve Lipofectamine TM RNAiMAX içeren ependorflar birleştirilip 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon bekleme süresinde 96 kuyulu hücre kültürü tabağındaki tüm kuyuların besi yerleri toplanıp kontrol grubuna antibiyotikli besi yeri eklenirken geri kalanına antibiyotik içermeyen besi yeri eklendi. İnkübasyon süresi tamamlanınca hazırlanan karışım deney grubu kuyularına gerekli olan 100 ul eklenip deney tamamlandı. Hücreler hücre inkübatörü 37°C, %5 CO₂ şartlarına kaldırılıp, MTT deneyleri için 24 ve 48 saat için inkübe edildi.

3.2.3.2. MTT hücre proliferasyon kiti ile hücre sağkalımının saptanması

Bu tahlil için, MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit (Cat no. AR1156, Boster) kullanıldı. MTT tahlili hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksosite belirleme yöntemlerinin başında gelmektedir ve ‘‘altın standart’’ olarak kabul edilmektedir. MTT sarı renkli bir formazan tuzdur. Proliferasiyona uğrayan hücreler artan mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesi ile MTT’yi mor renkli suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürür. Oluşan bu kristaller dimetil sülfoksit (DMSO)’da veya izopropil alkolde çözünür. Daha sonra hücre canlılığı spektrofotometrik olarak belirlenir ve uygulama yapılmayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, uygulama yapılan hücrelerin canlılığı bu hücrelere göre yüzde (%) olarak belirlemeyi sağlar. Bu çalışmada yukarıda anlatıldığı gibi optimum siRNA konsantrasyonunu hesaplamak amacıyla kullanılmıştır. 24 saat inkübe edilen 96 kuyulu hücre tabağındaki tüm kuyuların besi yerleri aspire edilip her kuyucuğa 100 µl taze besi yeri eklenir 10 µl MTT etiketleme reaktifi verilip hücreler 37°C derece %5 CO₂ inkübasyon ortamında 4 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlanınca hücreler oda sıcaklığında ve karanlıkta MTT solventi formazan solusyonu ile muamele edildildi. Absorbans ölçümü FluOstar Omega Micro Reader cihazı OD: 570 nm ile karanlık ortamda gerçekleştirildi. Aynı işlem 48 saat için olan örneklerde tekrarlandı.

3.3. Nöroinflamasyon Modelinin Oluşturulması

1 mg LPS 1 ml steril PBS ile çözülerek 1 mg/ml konsantrasyonda stok LPS solüsyonu hazırlandı. Bu stokta tekrar alikotlanarak -20 derecede saklandı. Hücreler yukarıda anlatılan kültürleme metodunca kültürlendikten sonra literatürden ulaşılan farklı konsantrasyonlar hücrelere uygulandı. Uygun konsantrasyonlar seri dilüsyon metoduyla elde edilerek 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml, 1 mg/ml oranlardaki lipopolisakkarit konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulandı. Toksisitesi seviyesinin anlaşılması için MTT toksisite analizi (BOSTER, MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit Cat No:AR1156) uygulandı.

Yapılan çalışmada inflamasyon ajanının mikroglialara toksik gelip gelmemesinden ziyade mikrogliaların farklı işlevleri olan M1 ve M2 profillerden hangisine eğilim göstermesine sebep olacağını görmek elzem olduğundan deney akış sitometrisi tekniği ile tekrarlandı. Akış Sitometrisi bir sıvı içerisinde hücrelerin ya da

parteküllerin fiziksel ve kimyasal profillerini ayırt etmemizi sağlayan bir yöntemdir, bu teknik sayesinde hücreler hidrodinamik odaklanma sayesinde tek tek sıraya geçip üzerlerinde ayırıcı belirteçin (bizim için bunlar yüzey markerleri idi) boyanması ve lazer ışık verilerek hücre hücre aranan belirtecin varlığı yokluğu dolayısıyla popülasyondaki yüzdesi hesaplanarak saptanan güvenilirliği oldukça yüksek bir tekniktir.

Hücrelerin uzun süreli inflamasyona girmesi amaçlandığı için literatürden daha önce yapılan çalışmalar tarandı elde edilen verilere dayanarak 1 ug LPS ve 50 ng IFN γ ; 1 ug LPS ve 25 ng IFN γ ile 24 ve 48 saatler boyunca uygulama yapılması uygun görüldü. Uygulama yapılacak hücreler yukarıda geçen kültürleme teknikleri uyarınca kültürlendiler. Deney süresi dolan hücreler kültür kabından hafifçe kazıyarak toplandılar. Toplanan hücreler oda sıcaklığında 400 g'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi ardından oluşan supernatant uzaklaştırıldı. Pelet 1 ml boyama tamponu içerisinde homojen hale getirilip iki panel için iyi farklı tüpe alındı, tüpe alınan örnekler tekrar oda sıcaklığı, 400 g, 5 dk santrifüj edilip oluşan süpernatant atıldı. Oluşan hücre peletti 80 ul boyama tamponu ilave edildikten sonra homojenize edildi. Ardından karanlık ortamda analiz için gerekli yüzey markerlerinin antikorları 5 ul CD16, 5ul CD45, 5 ul CD206; 2,5 ul CD86 eklenerek 4 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler tekrar oda sıcaklığında, 400 g hızda, 5 dakika boyunca santrifüj edilip süpernatant atıldı kalan pellet 100 ul boyama tamponuyla homojenize edilerek hazırlandı. Akar hücre ölçer (Flow Cytometer, BECKMAN COULTER B5-R3-Vo Cytoflex Flow Cytometer) ile profil analizi yapıldı.

3.4. Teyit Analizleri

Tüm deney gruplarının Top2 β gen ekspresyon seviyeleri RT-QPCR ile mRNA seviyesinde ve Western Blot yöntemi ile protein düzeyinde teyit edildi.

3.4.1. Western blot

Western blot, bir protein karışımı arasından spesifik protein moleküllerini saptamak için kullanılan bir protein tespiti tekniğidir. Bu karışım, belirli bir doku veya hücre tipi ile bağlantılı tüm proteinleri içerebilir. Western blot'lar, ilgilenilen bir proteinin boyutunu değerlendirmek ve/veya protein ekspresyonunun miktarını ölçmek için

kullanılır. Western blot'taki ilk adım, önceden hazırlanmış ve denatüre edilmiş lineer zincirler halinde açılmış proteinleri ardından negatif bir yükle kaplamasını sağlayan sodyum dodesil sülfat adı verilen deterjan türeyle karıştırılıp aynı deterjan türevi (SDS) ile hazırlanmış jelle proteinlerin yüklenmesidir. Daha sonra jel elektroforezi adı verilen bir yöntemle protein molekülleri boyutlarına göre ayrılır. Ayırma sonrasında proteinler jelden bir blot membranına aktarılır. Tekniğe "western blot" adını veren bu adım olsa da terim tipik olarak tüm prosedürü tanımlamak için kullanılır. Transfer tamamlandıktan sonra, membran orijinal olarak jelin yani proteinlerin yüklendiği esas jelin üzerindeki tüm protein bantlarını taşır. Daha sonra membran istenmeyen herhangi bir spesifik olmayan reaksiyon geçirmesin diye blot adı verilen bir işlemde geçer ve inkübe edilir. Başka reaksiyonları tamamen engellenmiş membran esas olarak çalışılan proteine spesifik bağlanan ve birincil antikor adı verilen antikor ile inkübe edilir. İnkübasyonun ardından, herhangi bir proteine bağlanmamış olan yüzeyde fazla bulunan birincil antikor yıkanır ve membran bir kez daha inkübe edilir, ancak bu sefer birincil antikorunu spesifik olarak tanıyan ve ona bağlanan ikincil bir antikor ile inkübe edilir. İkincil antikor, ilgilenilen proteinin kolayca tespit edilmesini ve görüntülenmesini sağlayan renk veya ışık üreten bir raportör enzime bağlıdır. Bu sayede çalışılan numunede istenilen proteinin varlığı saptanmış olur.

3.4.1.1. Protein izolasyonu

3.4.1.1.A. Hücre kültüründen protein eldesi

Hücreler yukarıda geçen kültürlenme kuralları uyarınca kültürlendikten sonra gerekli deney müdahalesi yapıldı, deneyin ardından yapılan müdahalenin protein düzeyinde doğruluğunun teyidi için aşağıda geçen uygulamalar yapıldı.

İzolasyon için gereken Lysis solüsyonu (Lysis buffer) hazırlandı. Bunun için her bir örnek için 75 µl solüsyon olacak şekilde hesaplanarak 4x örnek solüsyonu (4x Sample Buffer, hazırlanışı tabloda gösterilmiştir)distile su kullanılarak 1X örnek solüsyonuna seyreltilti ve %1 protein inhibitörü kullanılarak örnek toplama solüsyonu elde edildi. Hücre kültür kabındaki hücrenin yüzeyi kaplama miktarı (cell confluency) %80 olduğunda uygulama yapılmaya başlandı. Hücrelerin nesi yeri toplanıp uzaklaştırıldıktan sonra kalsiyum magnezyum içermeyen PBS ile yıkanıp 5 dakika boyunca oda

sıcaklığında inkübe edildiler ve bu işlem 3 kere tekrarlandı. Ardından protein izolasyon solüsyonu eklenip hücreler hücre kültürü kabı yüzeyinden hücre kazıyıcı yardımıyla güzelce kazınarak toplandı ve ependorfa alındı, tüm bu işlemler buzun üzerinde gerçekleştirildi. Toplanan örnekler minimum hızda 10 saniye boyunca homojenezatörde homojenize edildi. Elde edilen protein örnekleri ısıtıcı (Heat Blok, DLAB HB 120-S) ile 95°C’de iki dakika boyunca kaynatıldı ardından iki dakika buza alınan örnekler iki dakika daha kaynatıldı ve örneklerin yapış yapış yapısı gidince denatüre oldukları anlaşılarak -20 °C’ye kaldırılarak saklandı.

Tablo 1: 4X Örnek solüsyonu (sample buffer) tablo takip edilerek hazırlanmıştır

Etken Madde	4X Konsantrasyon
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2 ml
0.5 M EDTA (pH 8)	160 µl
10% SDS	4 ml
B-ME	400 µl
100% Gliserol	3.2 ml
BPB	10 mg
ddH2O	240 µl
Total	10 ml

Ayrıca hem protein örneği hem de RNA örneği alınmak için kurulan deneyde QIAGEN AllPrep® RNA/Protein Kit (Cat No: 80404) kullanılarak izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kültür kabındaki hücreler kabine alınır ve buzun üzerinde hücre kazıyıcı ile kazıyarak hücreler kaldırıldı. Toplanan hücre lizatı, AllPrep döndürme kolonuna eklenip, daha çok homojenize olması için hafifçe vortekslendi. Örnek protein temizleme kolonuna alıp 750 g’ de oda sıcaklığında 3 dakika boyunca santrifüjlendi oluşan süpernatant atıldı. Oluşan pellet 500 µl dengeleme solüsyonu kullanılarak hücreler pellet homojenize edildi hafifçe vortekslendikten sonra 750 g’ de oda sıcaklığında 5 dakika boyunca santrüflendi. Protein temizleme kolonu temiz bir

ependorfa aktarılıp hücre PBS ile yıkandı. PBS'ten geçirilen örneğe APL solüsyonu eklenip homojenize edildi. Hücre parçalanması sırasında buz üzerinde inkübe edilmemesi elzemdir eğer böyle yapılırsa RNA stabilize edici ajan çökecek ve RNA'yı koruyamayacaktır. Oluşan lizat kolona yavaşça damla damla tam kolona gelecek şekilde pipetleyip, 240 g' de oda sıcaklığında 3 dakika boyunca santrifüjlendi. Kolon atılıp ependorfa alınan örnek saflaştırılmış protein örneği elde edildi. Elde edilen protein örnekleri ısıtıcı (Heat Blok, DLAB HB 120-S) ile 95°C'de iki dakika boyunca kaynatıldı örneklerin yapış yapış yapısı gidince denatüre oldukları anlaşıl原因 olarak -20 °C'ye kaldırılarak saklandı.

3.4.1.1.B. Protein konsantrasyonlarının saptanması

Bikinkoninik asit tahlili (bicinchoninic acid assay- BCA assay), Smith tahlili olarak da bilinir. Uygulanan biyokimyasal metodun temeli biüret ayırıcındaki bakır iyonlarının (Cu^{+2}) peptid azotlarına bağlanması (biüret reaksiyonu) sonucu alkali çözeltide 540-560 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanır. Bakır iyonları peptid ana zinciri üzerine bağlanması sayesinde farklı pek çok proteinde kullanılabilen erişimi ve uygulaması bait bir metottur. Solüsyonda bulunan protein miktarları absorpsiyon spektroskopisinde ölçülerek konsantrasyonları bilinen standart proteinler ile bizim ölçtüğümüz örnek proteinlerin absorpsiyon miktarları kıyaslanarak nicel veri almamızı sağlar. Protein konsantrasyonları Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Test Kiti (Thermofisher Scientific, Cat No: A53225) ile ölçüldü.

Tablo 2: BSA standartları tablo takip edilerek hazırlanmıştır

Tüpler	Seyrelticinin Hacmi (µl)	BSA Volümü (µl) ve Kaynak Tüp	Final BSA Konsantrasyonu(µg/ml)
A	0	300 (Stok)	2000
B	62,5	187,5 (Stok)	1500
C	100	100 (Stok)	1000
D	100	100 (B'den seyreltildi)	750

E	100	100(C'den seyreltidi)	500
F	100	100 (E'den seyreltidi)	250
G	100	100 (F'den seyreltidi)	125
H	160	40 (G'den seyreltidi)	25
I	200	0	0

Tablo 3: BSA standartları tablo takip edilerek hazırlanmıştır(devam)

*Seyreltici olarak kullanılan reaktif, protein örneklerinin hangi solüsyonda elde edildiğine göre değişiklik gösterecektir

Standartlar yukardaki gibi hazırlandıktan sonra, 96 kuyucuklu hücre kültürü tabağının dokuz standart ve ölçülecek protein örnekleri d H₂O ile 500 kat seyreltilerek 10 µl örnek olacak şekilde eklendi. Reaktif materyal A (working reagent) için; (standart sayısı + örneklerin sayısı) x (replikasyon sayısı) x (reaktif örneğinin kuyu başına hacmi standart olarak 0,2 ml) formülü uygulanarak total olarak hesaplandı. (9 standart + 7 örnek) x (1 replika) x (0,2 ml) = 3,2 ml olarak hesaplanıp pipetaj hatası riskine karşı 3,3 ml total reaktif materyal A hazırlanması gerekti. Reaktif materyal iki farklı reaktifin reaktif A: reaktif B ajanlarının 50:1 oranına uygun olacak şekilde 3300 µl reaktif A ve 66 µl reaktif B bit tüpte birleştirilip 5 sn vorteks yapılarak karıştırıldı. Elde edilen 200 µl reaktifler ,10 µl örneklerin üzerine eklenerek 5 dakika inkübe edildi. Microreader FluOstar OMEGA, BMG LABTECH cihazı kullanılarak 30 saniye orbital çalkalama yapıldıktan sonra 480 nm absorpsiyonda ölçüldü.

3.4.1.2. Protein tespiti

Mini-PROTEAN ® TGX Stain- Free ™ Precast Gels (Any kD ™,10 well-comb,50µl /well, Cat No: # 456-8124, BIORAD) hazır SDS-Page jelinin her kuyucuğuna 30 µg protein eşit olarak yüklenecek şekilde protein konsantrasyonları hesaplandı. Hazır jellerin oturtulduğu akımın geçişini sağlayan kasetin akıtip akıtmadığını kontrol etmek için runnig buffer eklenerek akıtmadığı teyit edildi. Jeller Mini-PROTEAN ® Tetra Vertical Electrophoresis Cell for Miniprecast Gels,2 gel (BIORAD, Cat No: #1658005) içine yerleştirilen jellere protein örnekleri yüklenip, yürütme solüsyonu (running buffer) ile 2 jel çizgisine gelene dek dolduruldu. PowerPac ™ Basic Power Supply güç kaynağı

sistemi yardımıyla 200 V, 0 mA, 50 dakika yürütüldü. Aranılan proteinlerin küçük olması sebebiyle mümkün olduğunca yavaş şekilde proteinlerin yürütmesi amaçlandı yürütme işlemi boyunca proteinler kontrol edilip jelden akıp gitmemeleri sağlandı.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack (Mini Format, 0.2 µm Nitrocellulose, Single Application Cat: #1704158, BIORAD) hazır transfer sistemi yardımıyla hazır membran ve nitrosellozdan oluşan filtre kâğıtları yardımıyla jelden membrana proteinlerin geçişi sağlanmıştır. Bunun için BIORAD Trans-Blot® Turbo™ System Tour aktarım sistemi kullanılmış 25V, 1.3 mA güçlük 10 dakikalık programı kullanılmıştır.

On dakikalık programın bitişinin ardından membrana aktarılan proteinin sabitlenebilmesi için engelleme solüsyonunda (Blocking Solution; %5 süt tozu, %0,1 Tween 20, New TBS içinde çözünerek hazırlandı) bir saat süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. SDS-PAGE jelde protein kalıp kalmadığının kontrolü için CBB (Coomassie Brilliant Blue) solüsyonu içerisine yatırılan jel oda sıcaklığında 80 rpm'de 2 saat boyunca çalkalandı ardından destaning solüsyonunda boyadan arındırarak jelde protein kalıp kalmadığına bakıldı. Membran engellenme solüsyonundaki bir saatlik inkübasyonun ardından New TBS solüsyonuna yıkanıp oda sıcaklığında, 5 dakika boyunca, 80 rpm'de çalkalayıp inkübe edildi. Bu işlem iki kere tekrarlandı. Bu işlem de bittikten sonra membran TTBS solüsyonunda yine aynı şekilde oda sıcaklığında, 5 dakika boyunca, 80 rpm'de çalkalandı, bu işlemde iki kere tekrarlandı. Ardından 1:1000 oranında Topo IIβ (BD), 1:100 oranında Actin (Abcam) gibi aranılan proteinlerin antikorlarıyla hazırlanan birincil antikor solüsyonunda çözündü (Antikor solüsyonu; %1 Tween 20 ve %5 süt tozunun New TBS içinde çözünmesiyle hazırlandı). +4° C 'de, 80 rpm' de bir gece boyunca inkübe edildi.

İnkübasyonun bitiminin ardından membran TTBS solüsyonunda yıkanıyor, 5 dakika boyunca, oda sıcaklığında, 80 rpm'de çalkalanarak yıkandı bu işlem üç kez tekrarlandı. Ardından birincil antikora bağlı olarak seçilen ikincil antikor 1:1000 oranında GAM-HRP ve 1:1000 oranında GAR-HRP ile oluşturulan ikincil antikor solüsyonu ile oda sıcaklığında bir saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran TTBS solüsyonunda oda sıcaklığı, 80 rpm hızda 5 dakika boyunca çalkalanarak yıkandı.

Ardından membran TBS solüsyonunda oda sıcaklığı, 80 rpm hızda 5 dakika boyunca çalkalayarak yıkandı.

Ölçüm için ECL solüsyonu 0,1 ml/cm² olacak şekilde hazırlanarak uygulandı 5 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildikten sonra LI-COR C-Digit ® Blot Scanner ölçüm ekranına yerleştirilen membranın ölçümü yapıldı.

Western Blot protein tahlilinde kullanılan solüsyonlar:

Tablo 4: 10X blotting solüsyonu hazırlanması

Etken Madde	Miktar
Tris	4.545 g
Glisin	21.6 g
SDS	0.75 g
Metil alkol	300 ml
d H ₂ O	Total solüsyon 1500 ml olana dek tamamlandı

Tablo 5: 10X TBS solüsyonunun hazırlanması

Etken Madde	Miktar	Son Konsantrasyon
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	200 ml	200 mM
NaCl	292.2 g	5 M
d H ₂ O	Total solüsyon 1000 ml olana dek tamamlandı	

Tablo 6: New TBS hazırlanması

Etken Madde	Miktar
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	10 ml
5 M NaCl	30 ml
d H ₂ O	960 ml
Total 1000 ml	1000 ml

Tablo 7: TTBS solüsyonun hazırlanması

Etken Madde	Miktar	Son Konsantrasyon
10X TBS	100 ml	1 X
Tween 20	0.5 ml	%0.05
d H ₂ O	900 ml	
Total	1000 ml	

3.4.2. RT-QPCR

3.4.2.1. RNA izolasyonu

RNA örneği toplamak adına kurulan deneyin örnekleri QIAGEN AllPrep® RNA/Protein Kit (Cat No: 80404) kullanılarak izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Kültür kabındaki hücreler kabine alınır ve buzun üzerinde hücre kazıyıcı ile kazıyarak hücreler kaldırıldı. Toplanan hücre lizatı, AllPrep döndürme kolonuna eklenip, daha çok homojenize olması için hafifçe vortekslendi. Örnek protein temizleme kolonuna alıp 750 g' de oda sıcaklığında 3 dakika boyunca santrifüjlendi oluşan süpernatant atıldı. Oluşan pellete 500 µl dengeleme solüsyonu kullanılarak hücreler pellet homojenize edildi hafifçe vortekslendikten sonra 750g' de oda sıcaklığında 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Protein temizleme kolonu temiz bir ependorfa aktarılıp hücre PBS ile yıkandı. PBS'ten geçirilen örneğe APL solüsyonu eklenip homojenize edildi. Hücre parçalanması sırasında buz üzerinde inkübe edilmemesi elzemdir eğer böyle yapılırsa RNA stabilize edici ajan

çökecek ve RNA'yı koruyamayacaktır. Lizat toplanıp üzerine 350 µl tampon RLT solüsyonu eklenip oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 800 g'de santrifüjlendi. Çözeltilinin üzerine 350 µl %70 etanol eklenip 700 µl numune RNaz döndürme kolonuna alınıp oda sıcaklığında, 8000 g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Kolona 700 µl Tampon RW1 eklenip oda sıcaklığında 8000g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Ardından kolona 500 µl RPE Solüsyonu eklenip oda sıcaklığında 8000g'de 30 saniye boyunca santrifüjlenip süpernatant atıldı. Aynı işlem tekrarlanarak RPE solüsyonuyla pellet tekrar yıkandıktan sonra süpernatant atıldıktan sonra, kalıntıların ayrıştırılması için maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi. Döndürme kolonu yeni bir toplama tüpüne alınıp 50 µl RNAaz içermeyen steril su doğrudan kolona pipetlenip oda sıcaklığında 800g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi.

3.4.2.2. cDNA sentezi

cDNA sentezi için gerekli RNA QIAGEN AllPrep® RNA/Protein Kit (Cat No: 80404) ile izole edilmişti, elde edilen RNA'yı cDNA çevirmek için QuantiNova Ters Transkripsiyon Kiti (QIAGEN, Cat no: 205411) kullanıldı.

RNA, QN IC RNA, gDNA Kaldırma Karışımı (Removal Mix) ve tersine çevirme enzimi (ReverseTranscription Enzyme) buzun üzerine çıkartıldı. Ters Transkripsiyon Karışımını ve RNaz içermeyen su ise oda sıcaklığına çıkartıldı. Her örnek için genomik DNA eliminasyon reaksiyonu aşağıdaki tablo 7'ye göre hazırlanmıştır.

Tablo 8: Genomik DNA uzaklaştırma reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Hacim/ Reaksiyon
gDNA silme tamponu x7	2 µl
Şablon RNA (5 µl'ye kadar)	Değişken
RNaz İçermeyen Su	Değişken
Toplam Reaksiyon Hacmi	14 µl

Hazırlanan karışım 45 °C'de 2 dakika inkübe edildikten sonra buza alındı reaksiyon buz üzerinde 10 dakikadan fazla kesinlikle tutulmamalıdır, ardından buz

üzerinde ters transkripsiyon enzimi reaksiyonu aşağıdaki tablo 8'e göre hazırlanarak uygulandı.

Tablo 9: Ters transkripsiyon enzim reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Hacim / Reaksiyon
Ters Transkripsiyon Enzimi	1 µl
RT Buffer (5X)	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
Şablon RNA (g DNA eliminasyon reaksiyonundan elde edilen)	14 µl
Total Reaksiyon Hacmi	20 µl

Her örnek için, ters transkripsiyon ana karışımı (6 µl) içeren her tüpe şablon RNA (16 µl) eklendi, iyice karıştırıldı ve buz üzerinde saklandı. Karışım, 42 °C 'de 15 dakika inkübe edildi. Sonrasında quantiscrypt ters transkriptazı inaktive etmek için 95°C'de 3 dakika boyunca inkübe edildi. Sentezlenmiş cDNA örnekleri sonrasında kullanılmak üzere -20°C saklandı.

Tablo 10: Ters transkripsiyon sıcaklık protokolü

Basamak	Süre	Sıcaklık
Ters Transkripsiyon Adımı	15 dakika	42°C
Reaksiyonun İnaktivite Edilmesi	3 dakika	95°C

3.4.2.3. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-QPCR)

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-QPCR) için QuantiNova SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Katolog No :208052) kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri aşağıda yer alan tabloya göre oda sıcaklığında hazırlandı SYBR

Green eklenmesi karanlıkta yapıldı. RT-Qpcr Roche LightCycle® 96 cihazında Actin ve Topo II β primerine göre yürütüldü.

Tablo 11: q-PCR her numune için hazırlanan reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim
2X Quantinova SYBR Green PCR master mix	7.5 μ l
Forward Primer	0.7 μ l
Ters Primer	0.7 μ l
cDNA	2 μ l
dH ₂ O	4.1 μ l
Total	15 μ l

Tablo 12: RT-qPCR için kullanılan primerlerin listesi

Primerler	Denaturasyon Sıcaklığı ve Süresi	Tavlama (Annealing) Sıcaklığı ve Süresi	Uzantı Sıcaklığı ve Süresi	Döngü Sayısı
Actin	94 °C; 30 s	59.4°C; 45 s	72 °C; 1 dakika	45
Topo II β	94 °C; 30 s	60°C; 45 s	72 °C; 1 dakika	45

Actin, amplifikasyonu normalleştirmek için housekeeper geni olarak kullanıldı. Genlerin nispi ekspresyonu $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile hesaplandı. PCR reaksiyon verimliliği %97'nin üzerindeydi ve tüm deneyler üçe katlandı.

3.4.3. Nöroinflamasyon modelinin teyiti

3.4.3.1. Akış sitometrisi

Yapılan çalışmada inflamasyon ajanının mikroglialara toksik gelip gelmemesinden ziyade mikrogliaların farklı işlevleri olan M1 ve M2 profillerden hangisine eğilim göstermesine sebep olacağını görmek elzem olduğundan deney akış sitometrisi tekniği uygulanmasına karar verildi.

Hücrelerin uzun süreli inflamasyona girmesi amaçlandığı için daha önceden yapılan optimizasyon çalışmaları gözetilerek LPS 1 ug; İnterferon-gama 10 ng; LPS 1 ug ve İnterferon-gama 10 ng 24 saatler boyunca uygulanarak yapılması uygun görüldü. Uygulama yapılacak hücreler yukarıda geçen kültürleme teknikleri uyarınca kültürlendiler. Ekildikten 24 saat sonra Topo IIβ 'nın RNAiMax ile susturulması bölümünde ifade edildiği gibi susturuldu. Optimal süre için 48 saat kültür şartlarında inkübe edildi. 48. saatin sonunda genin susturulmasının optimal devam etmesi adına siRNA işlemi tekrar edildi ve nöroinflamasyon modeli oluşturulması kuralları uyarınca LPS 1 ug; İnterferon-gama 10 ng; LPS 1 ug ve İnterferon-gama 10 ng'lık deney modelleri oluşturuldu. 24 saat inkübasyona bırakıldı,

Deney süresi dolan hücreler kültür kabındaki kuyucuk başına 150 ml trypsin eklenip 2 dakika kültür şartlarında inkübe edildi bu sayede hücrelerin yüzeyle kurduğu bağın koparılması sağlandı. İnkübasyon süresi biten hücrelere 300 ml kültür medyumunu eklenerek trypsin aktivitesi durdurulup hücrelerin ependorflara toplanması sağlandı. Toplanan hücreler oda sıcaklığında 400 g'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi ardından oluşan supernatant uzaklaştırıldı, yıkama işlemi iki kere tekrarlandı. Pelet 1 ml boyama tamponu içerisinde homojen hale getirilip iki panel ve i NOS boyaması için üç farklı tüpe alındı, tüpe alınan örnekler tekrar oda sıcaklığı, 400 g, 5 dk santrifüj edilip oluşan süpernatant atıldı. Oluşan hücre peletti 80 ul boyama tamponu ilave edildikten sonra homojenize edildi. Boyama tamponu hazırlanması için 10 ml BSA (MACS® Buffer, BSA Stock Solution, Kat No: 130-091-376) 190 ml Rinsing Solutionda (MACS Buffer, autoMACS® rinsing Solution, Kat No:130-0091-222) çözerek 1:20 oranında hazırlanmıştır. Ardından karanlık ortamda analiz için gerekli yüzey markerlerinin antikorları 5 ul CD16, 5ul CD45, 5 ul CD206; 2,5 ul CD86 eklenerek +4 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler tekrar oda sıcaklığında, 400 g hızda, 5 dakika boyunca santrifüj edilip süpernatant atıldı kalan pellet 100 ul boyama tamponuyla homojenize edilerek hazırlandı. iNOS boyaması için ayrılan hücre 200 ml perm fixatör (BD,Cytofix/Cytoperm™ Fixation /Permeabilizasyon Kit, Kat No: 554714) eklenip hafif pipetaj yapıp homojenize edildi, ardından 20 dakika +4 °C'de inkübe edildi. Ardından iki kez BD PermWash ile 400g'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Oluşan süpernatant atılıp pellet 100 ml birincil antibody solüsyonu eklenerek 30 dakika +4 °C'de inkübe edildi. Birincil antibody solüsyonu 100ml

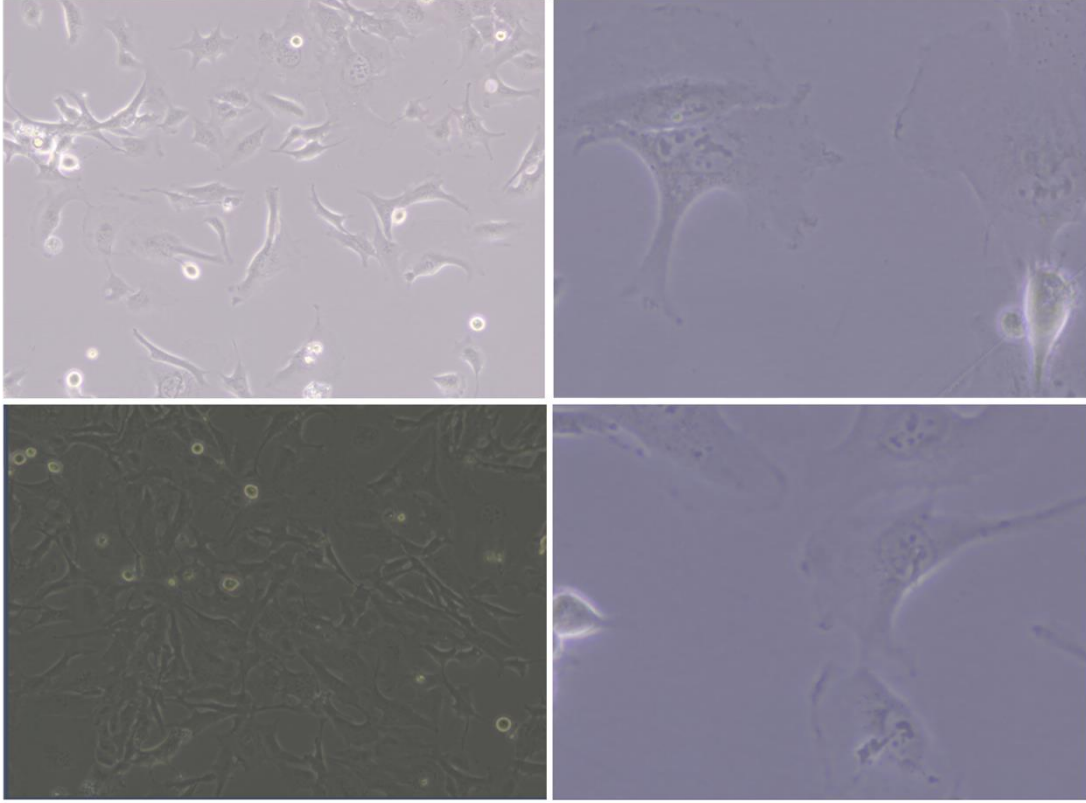
permwash içinde 0,75 µl iNOS antibody içermekteydi. İnkübasyonun ardından hücreler 2 kez 500 ml perm wash ile 400g,5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek yıkandı ve süpernatantları uzaklaştırıldı. Ardından 1:500 oranında sekonder antibodynin permwashta çözülmesiyle hazırlanan ikincil antibody solüsyonu hazırlanıp 100 ml hücrelerin üzerine eklendi,oluşan çözelti 30 dakika +4 °C’de inkübe edildi. Hazırlanan tüm deney grupları akar hücre ölçer (Flow Cytometer, BECKMAN COULTER B5-R3-Vo Cytofelx Flow Cytometer) ile profil analizi yapıldı.



4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürünün Optimizasyonu

Hücreler kültür ortamının büyümeleri gözlemlenerek (Şekil 12) optimal büyüme şartları ve cm^2 ' ye ekim sayısı değerlendirilmiştir.

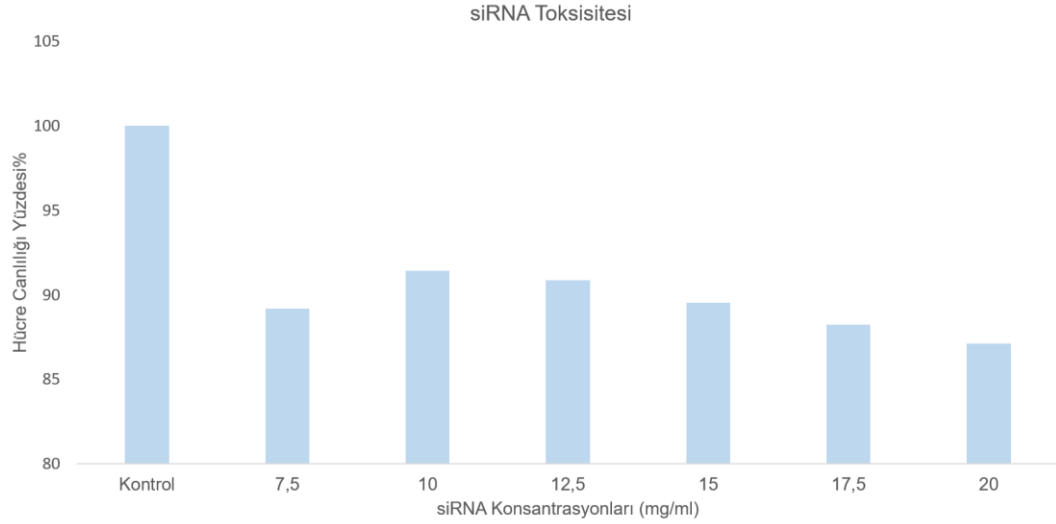


Şekil 12: Kültürlenmiş HMC3 hücrelerinin pasaj 5 (üst) ve pasaj 18 (alt) faz fotoğrafları. Mikroskop görüntüleri 10X(sol) ve 40X(sağ) objektifte alınmıştır

Hücreler kültür ortamında büyümeleri gözlemlenerek optimal büyüme şartları ve cm^2 ' ye ekim sayısı değerlendirilmiştir. Ulaşılan sonuçlara göre normal pasaj şartları %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 sodyum-püruvat, 100 mg/ml primocin içeren besi yerinde cm^2 ye 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilmesi kararlaştırılmıştır. Hücrelerin besi yeri her gün tazelenirken, 2-3 günde bir de pasaj yapıldı.

4.2. TopII B İfadesinin Susturulmasının Optimizasyonu

4.2.1. Top IIβ SiRNA toksisitesinin hesaplanması



Şekil 13: 24 saatlik siRNA konsantrasyonlarının (20 mg/ml;17,5 mg/ml; 15 mg/ml; 12,5 mg/ml; 10mg/ml; 7,5 mg/ ml) toksisite seviyeleri MTT analizi

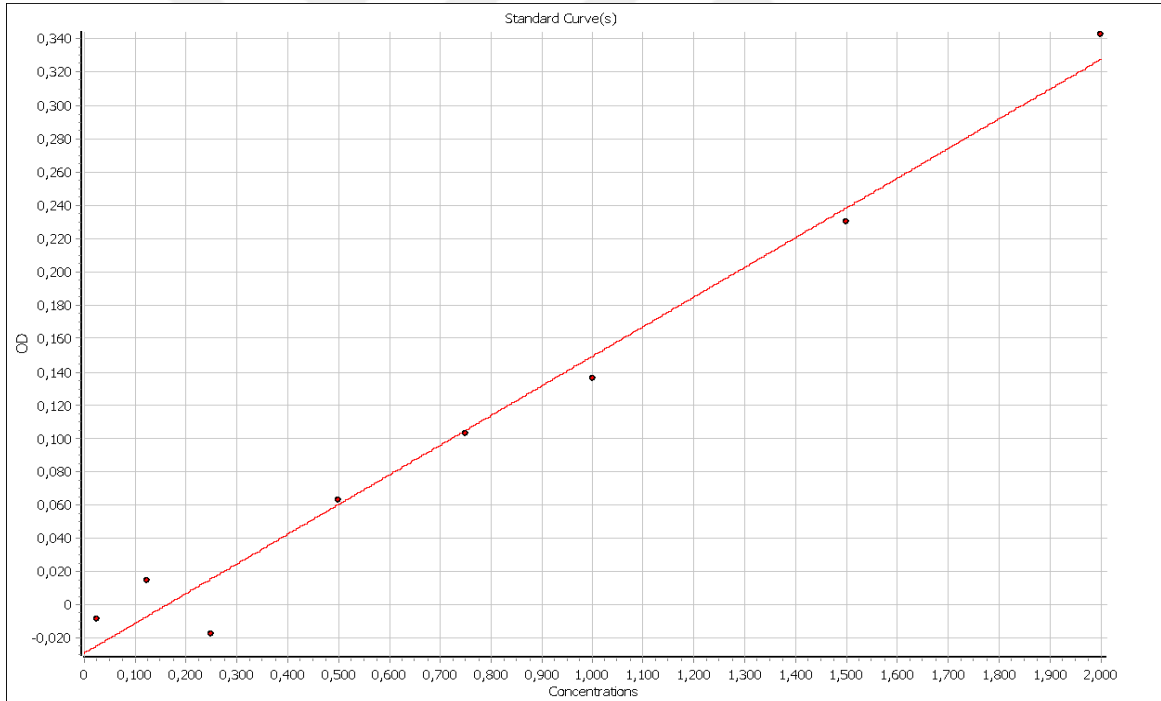
Elde edilen öncül toksisite konsantrasyonlarını referans alarak deney aralığı daraltılarak 12,5 mg/ml; 10mg/ml; 7,5 mg/ ml 'e indirildi. Ardından toksisite değişken sürelerde 24. saat ve 48. Saat toksisite değerleri değerlendirildi.

4.2.2. Top IIβ susturulmasının protein düzeyinde ifadesinin teyit edilmesi

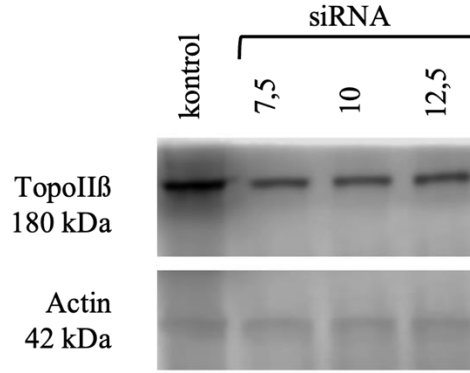
24 ve 48 saatlik örneklerin protein konsantrasyonları BCA kiti kullanılarak hazırlandı. Protein konsantrasyonları Tablo 12'de ve yapılan ölçümün standart eğrisi Şekil 14'te gösterilmiştir.

Tablo 13: 24 ve 48 saatlik örneklerin protein konsantrasyonları

Örnekleri	Protein Konsantrasyonlar(mg/ml)
Kontrol 48h	20, 4
48. saat siRNA 7.5 nm	134, 5
48. saat siRNA 10 nm	105, 1
48. saat siRNA 12.5 nm	170, 86
24. saat siRNA 7.5 nm	61, 5
24. saat siRNA 10 nm	197, 9
24. saat siRNA 12.5 nm	188, 2



Şekil 14: 24 ve 48 saatlik örneklerin protein konsantrasyonlarının standart eğrisi BCA kiti kullanılarak hazırlandı



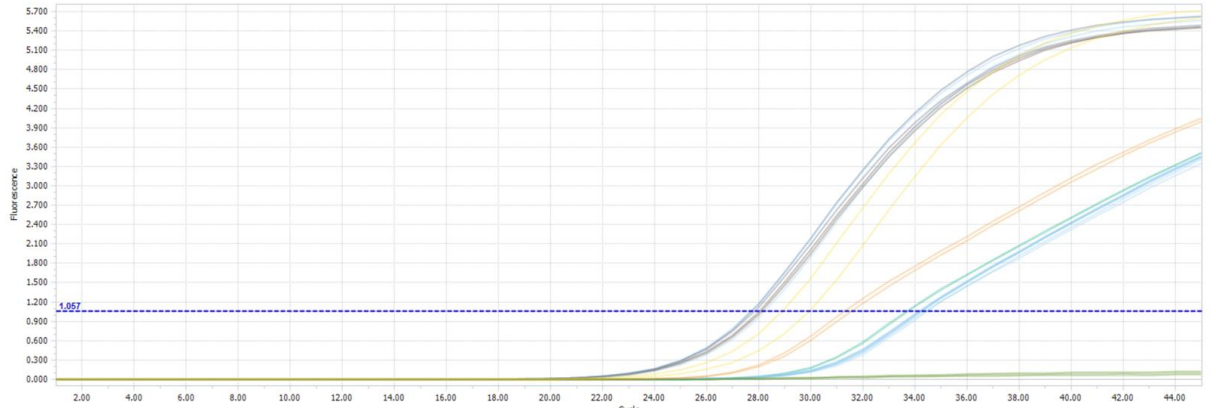
Şekil 15: 24 saat boyunca 7,5, 10 ve 12,5 nM konsantrasyonlarda siRNA uygulanan HMC3 hücrelerinin Western Blot sonucu

4.2.3. TopII β susturulmasının RNA düzeyinde ifadesinin teyit edilmesi

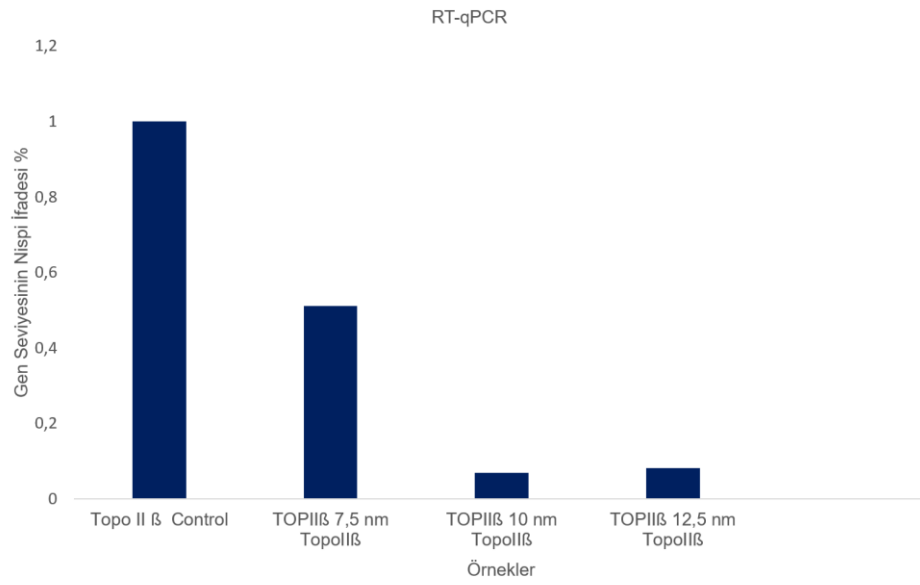
Tablo 14: RNA konsantrasyonları LVisPlate ile ölçüm sonucu

Örnek	RNA Konsantrasyonlar
Kontrol	50,64
48. saat siRNA 7.5 nM	35,325
48. saat siRNA 10 nM	50,085
48. saat siRNA 12.5 nM	34,9

Protein izolasyonundan elde edilen sonuçlar nazarında optimal şartları sağlayan 12,5 mg/ml; 10mg/ml; 7,5 mg/ ml konsantrasyondaki 48. Saatteki örneklerin RNA'ları yukarıda “RNA izolasyonu ve RT-QPCR ile RNA seviyelerinin tespiti” bölümünde yazılan protokol uygulandı. Elde edilen RNA konsantrasyonları Tablo 13'te ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon sonuçları Şekil 16'de ve Şekil 17'de yer almaktadır.



Şekil 16: RT- qPCR eğrisi

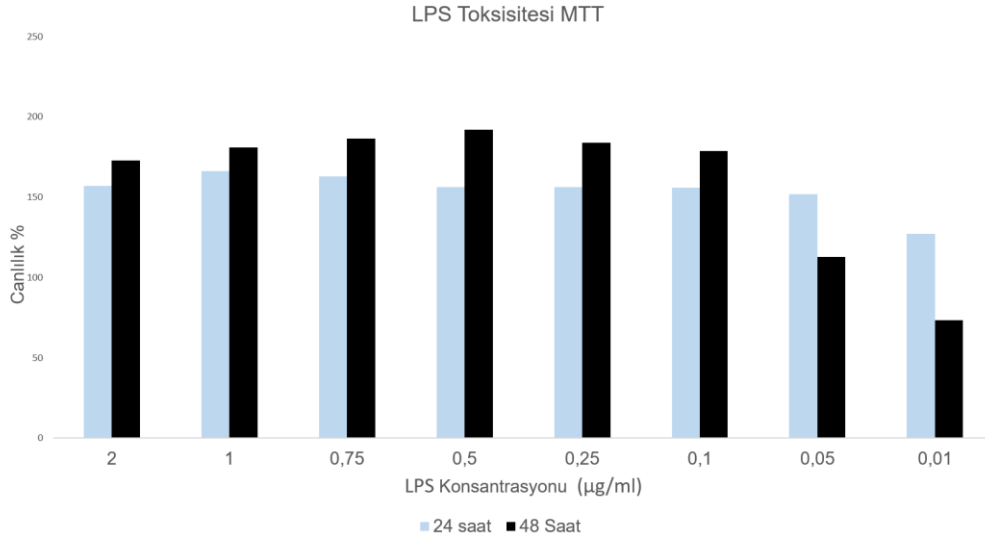


Şekil 17: Genlerin nispi ekspresyonu $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile saptandı

4.3. Nöroinflamasyon Modelinin Optimizasyonu

4.3.1. LPS toksisite seviyesinin saptanması

24 ve 48 saatlik LPS uygulamasının HMC3 hücrelerinin üzerindeki toksisite seviyesinin belirlenmesi için yapılan MTT analizi sonuçları yüzde olarak Şekil 18’da verilmiştir.

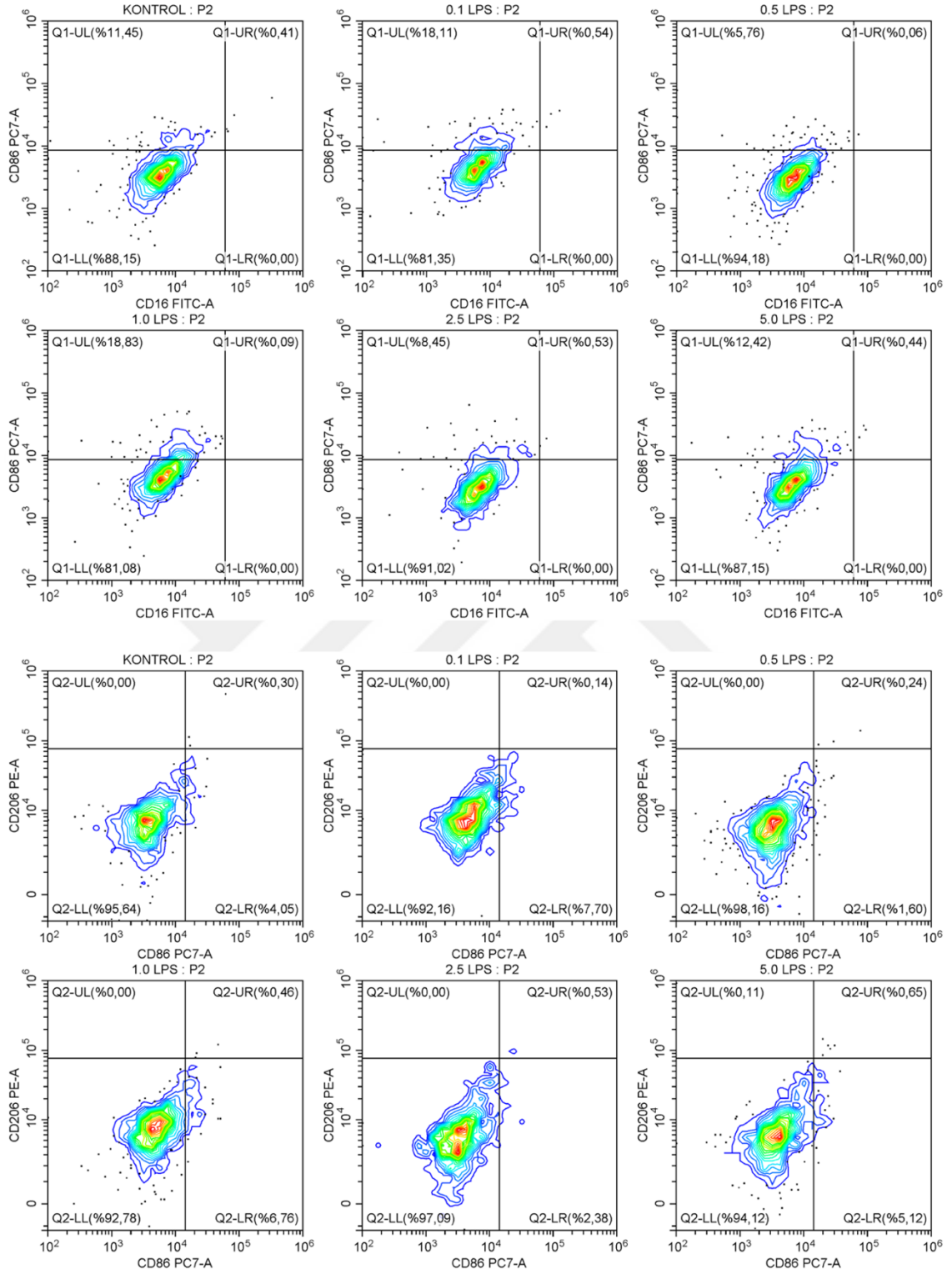


Şekil 18: LPS modelinin 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri MTT analizi kullanılarak ölçülmüştür

4.3.2. Akış sitometrisi ile nöroinflamasyon modelinnin teyiti

İnflamasyon sırasında mikrogliaların polarizasyonlarını doğru saptayabilmek adına M1 mikrogliya için referans olarak CD86, CD16; M2 mikrogliya için referans olarak da CD 206 baz alınarak akış sitometri cihazında ölçümleri alındı. Sonuçları aşağıda yer almaktadır. Nöroinflamasyon modeli sadece LPS, sadece IFN, LPS+ IFN uygulamaları olarak 3 farklı model ile tekrarlandı çalışmaya uygun olan inflamasyon modeli optimize edilmiş oldu. Hücrelerin uzun süreli inflamasyona girmesi amaçlandığı için literatürden daha önce yapılan çalışmalar tarandı elde edilen verilere dayanarak 0,1 ug/ml; 0,5 ug/ml; 1 ug/ml; 2,5 ug/ml; 5 ug/ml LPS konsantrasyonları ile 48 saat boyunca maruz bırakıldı sonuçlar analiz edildi, Deneyin sonuçları aşağıda Şekil 14’te yer almaktadır. İnterferon-gamma 10 ng/ml ve interferon-gamma 5 ng/ml ile 24 saat muamele edildi sonuçları Şekil 15’ de yer almaktadır. 1 ug LPS + 50 ng IFN ve 1 ug LPS + 25 ng IFN ile 24 saat muamele edilmiştir, sonuçları Şekil 16’da yer almaktadır: 1 ug LPS + 50 ng IFN ve 1 ug LPS + 25 ng IFN ile 48 saat muamele edilmiş, sonuçları Şekil 17’de yer almaktadır.

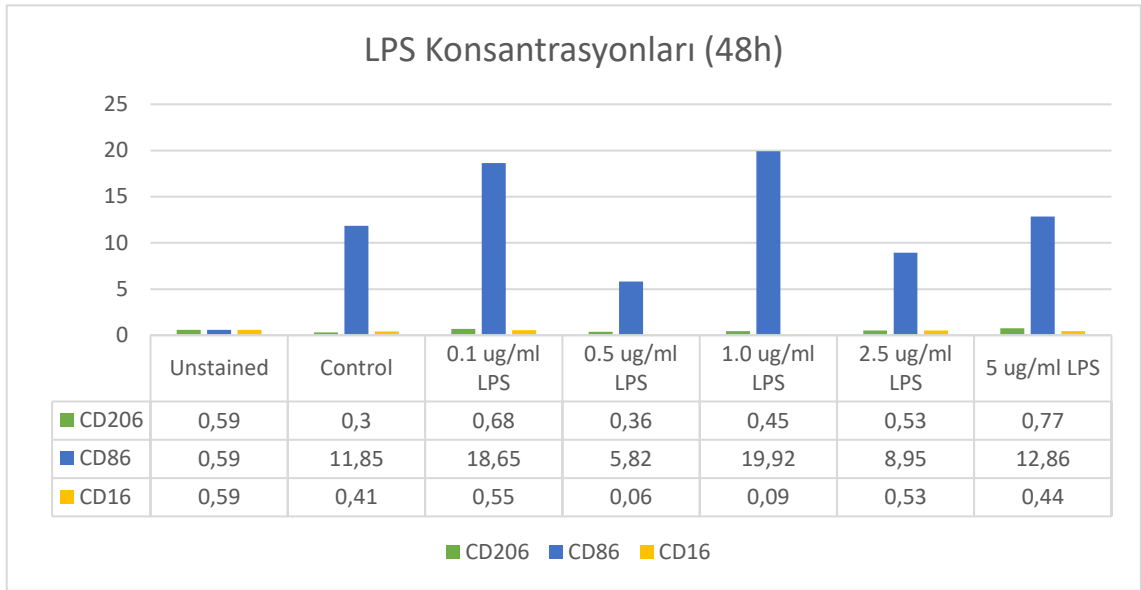
A)



Şekil 19: Unstained; kontrol; 0.1 ug/ml; 0.5 ug/ml; 1 ug/ml; 2.5 ug/ml; 5 ug/ml konsantrasyonlarda LPS ile 48 saat muamele edilmiştir

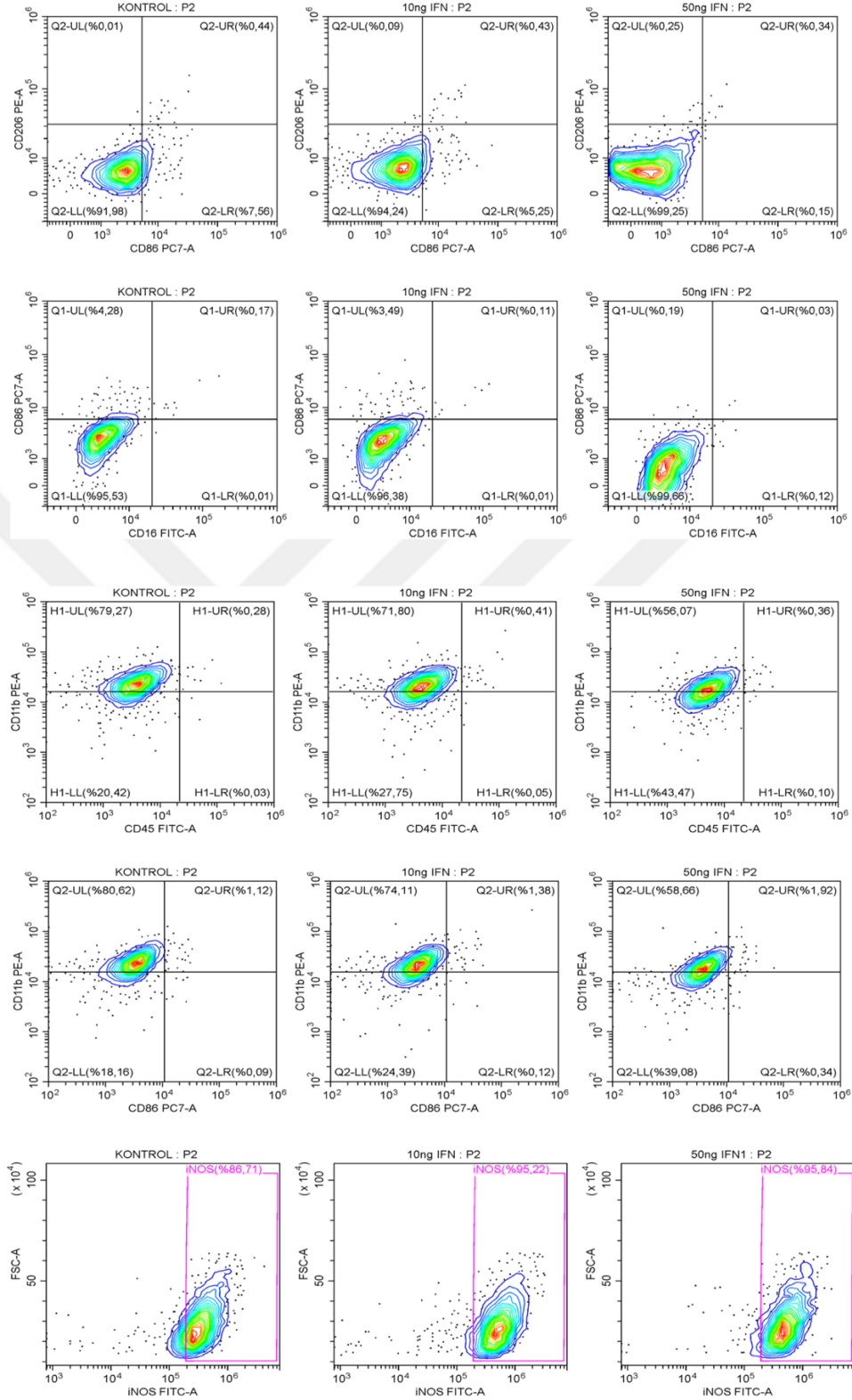
CD16-CD206 ve CD16-CD86 Boyaması (A) yapılmıştır. Yüzey markerlarının bulunma yüzdeleri grafikte (B) verilmiştir.

B)



Şekil 19: Unstained; kontrol; 0.1 ug/ml; 0.5 ug/ml; 1 ug/ml; 2.5 ug/ml; 5 ug/ml konsantrasyonlarda LPS ile 48 saat muamele edilmiştir (devam)

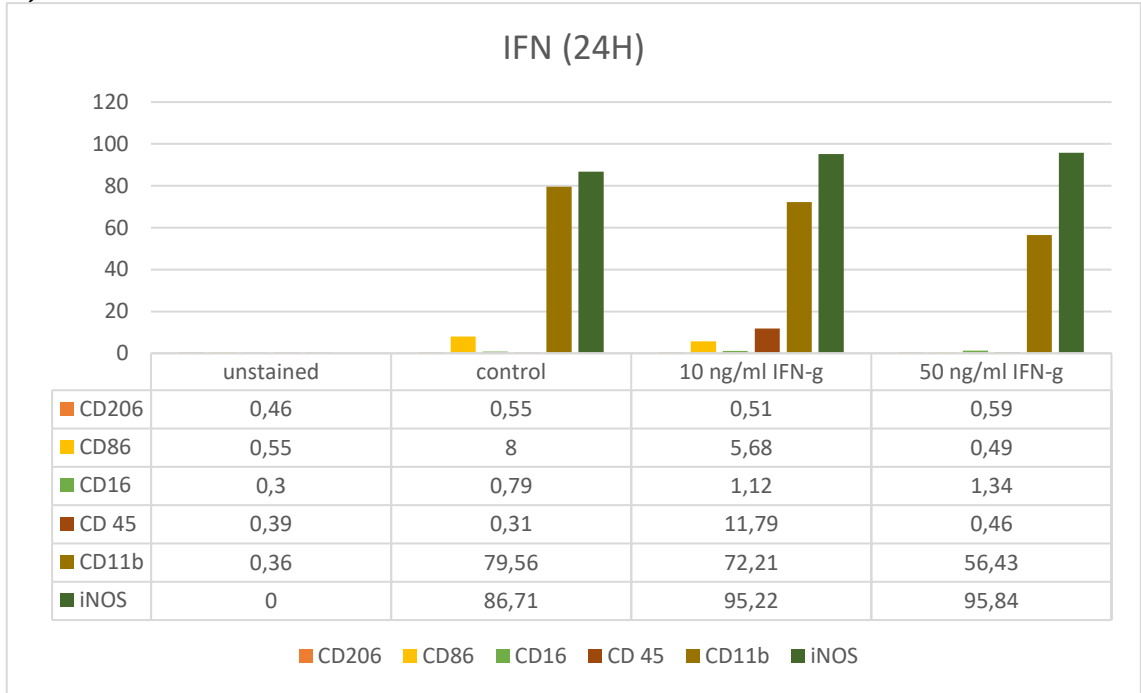
A)



Şekil 20:İnterferon-gamma (10 ng/ml; 50 ng/ml) ile muamele edilmiş 24 saatlik nöroinflamasyon modeli

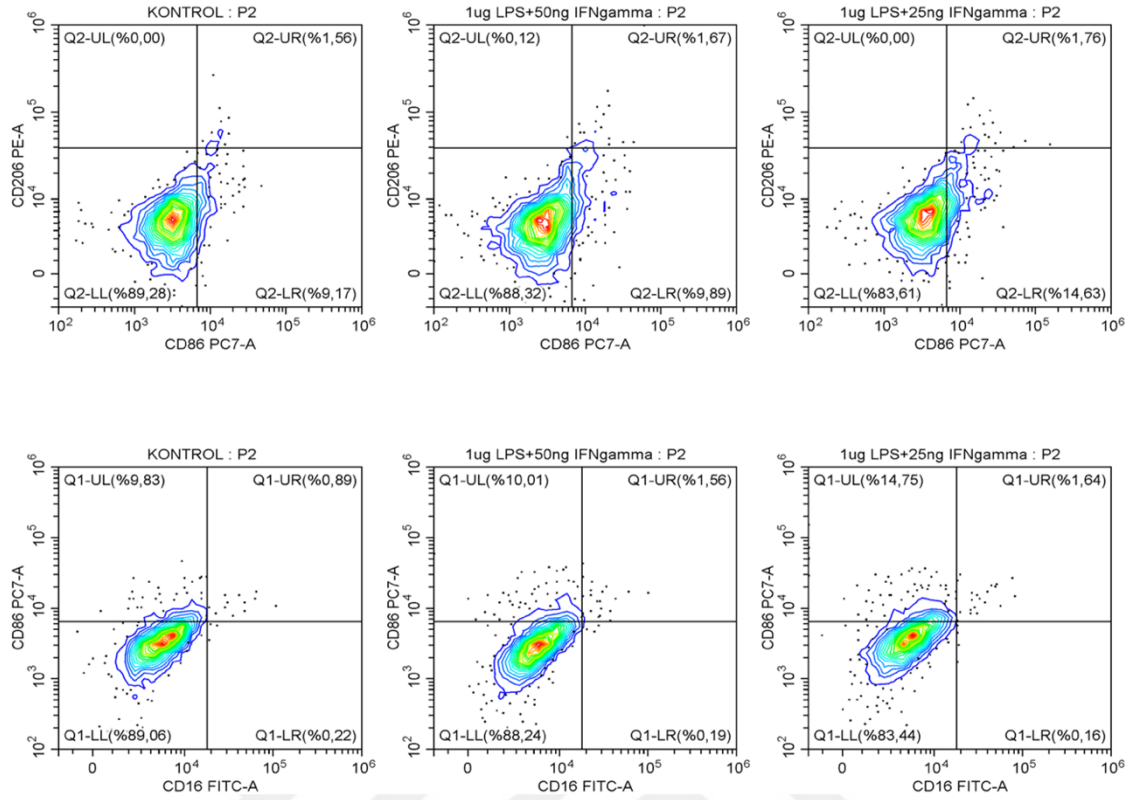
INOS, CD45-CD86, CD86-CD206, CD45-CD11b, CD86-CD16 boyamaları (A) yapılmıştır. Yüzey markerlarının bulunma yüzdeleri grafikte (B) verilmiştir.

B)

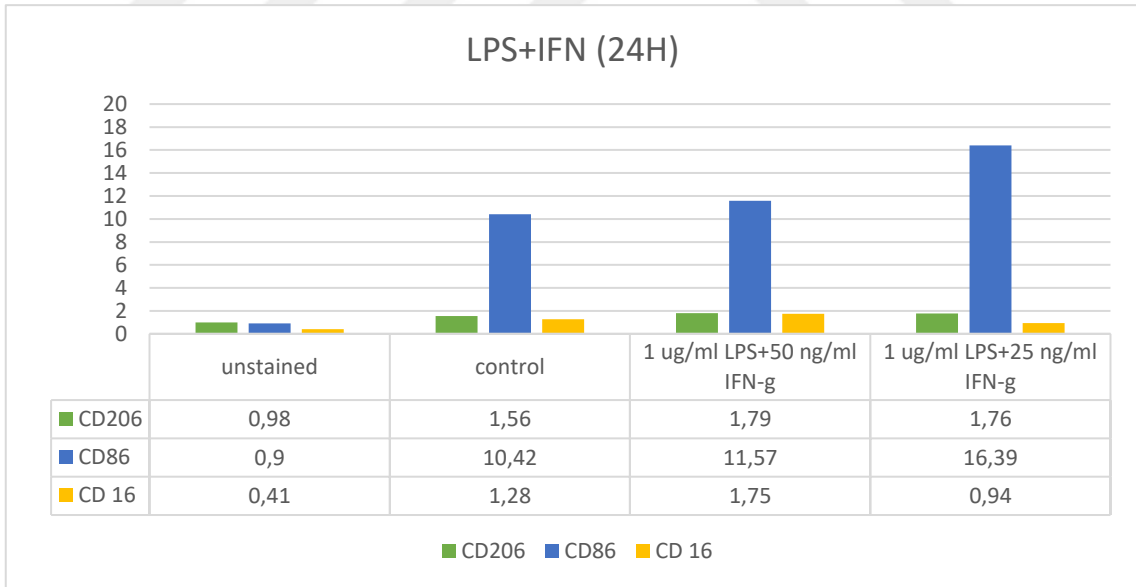


Şekil 20: İnterferon-gamma (10 ng/ml; 50 ng/ml) ile muamele edilmiş 24 saatlik nöroinflamasyon modeli (devam)

A)

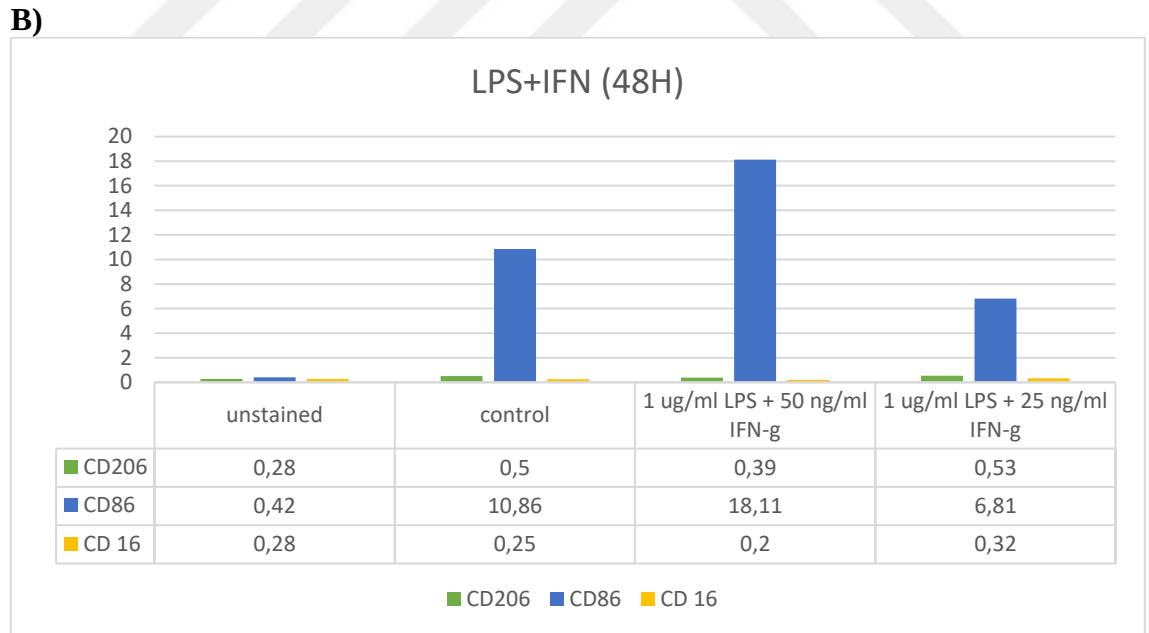
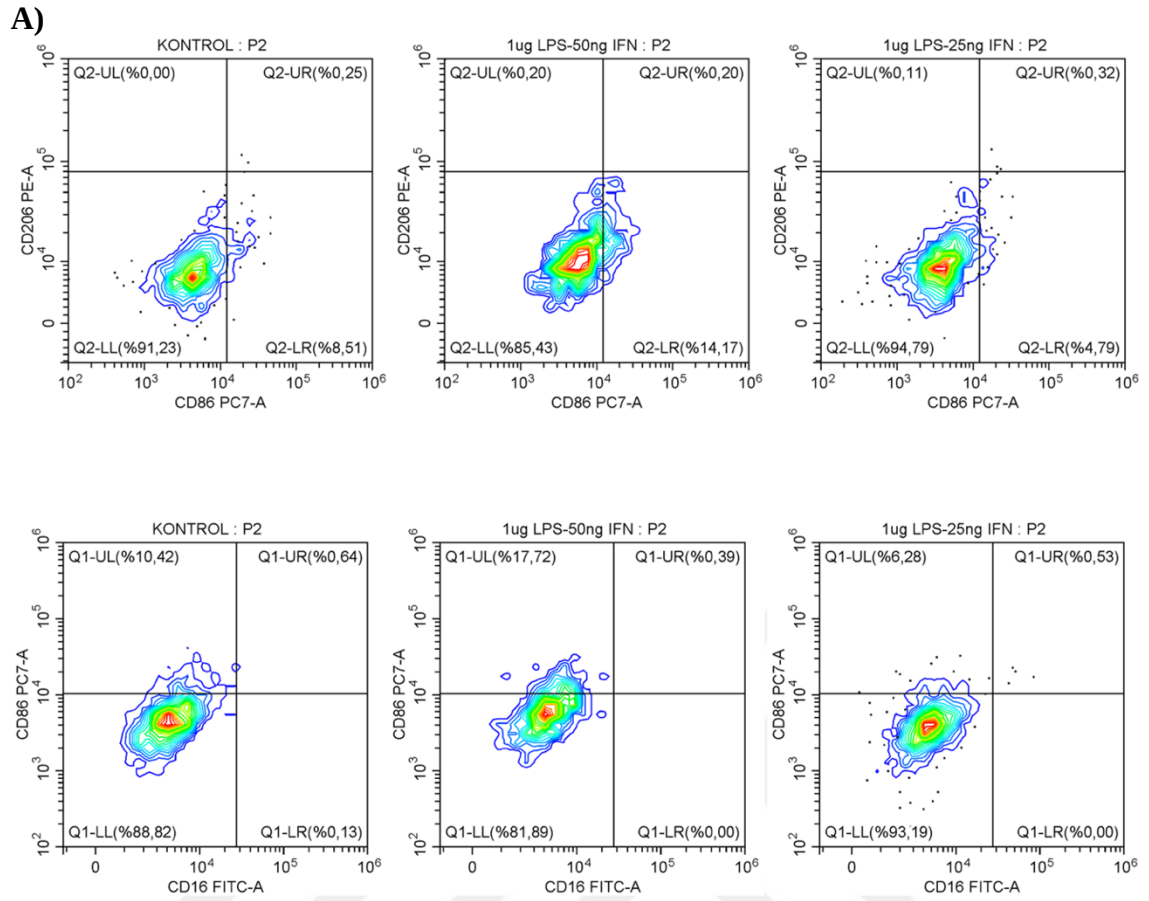


B)



Şekil 21: 1 ug LPS + 50 ng IFN; 1 ug LPS + 25 ng IFN ile muamele edilmiş 24 saatlık nöroinflamasyon modeli

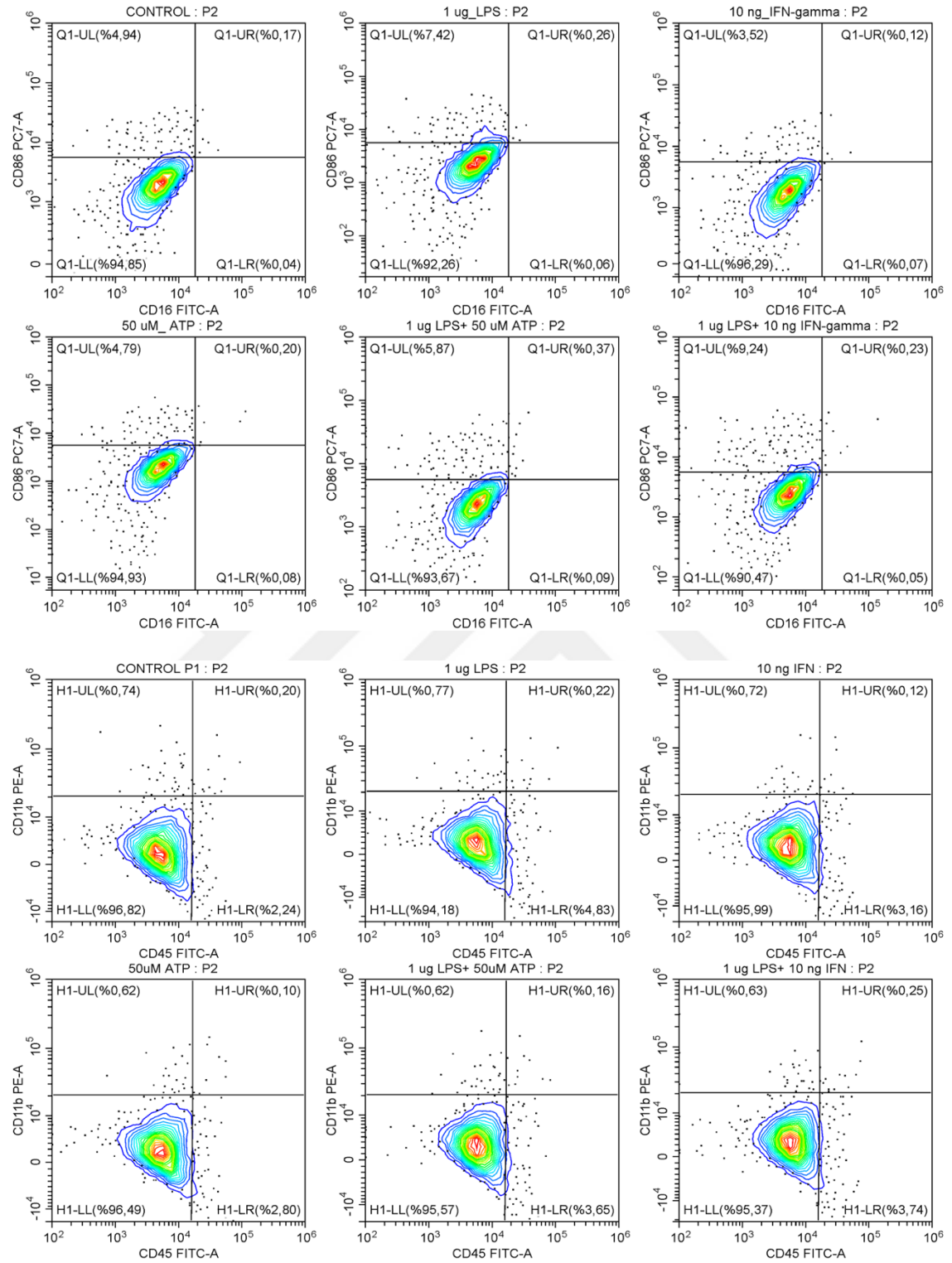
CD86-CD206 ve CD16-CD86 (A) boyanmıştır. Yüzey markerlarının bulunma yüzdeleri grafikte (B) verilmiştir.



Şekil 22: 1 ug LPS + 50 ng IFN; 1 ug LPS + 25 ng IFN ile muamele edilmiş 48 saatlık nöroinflamasyon modeli

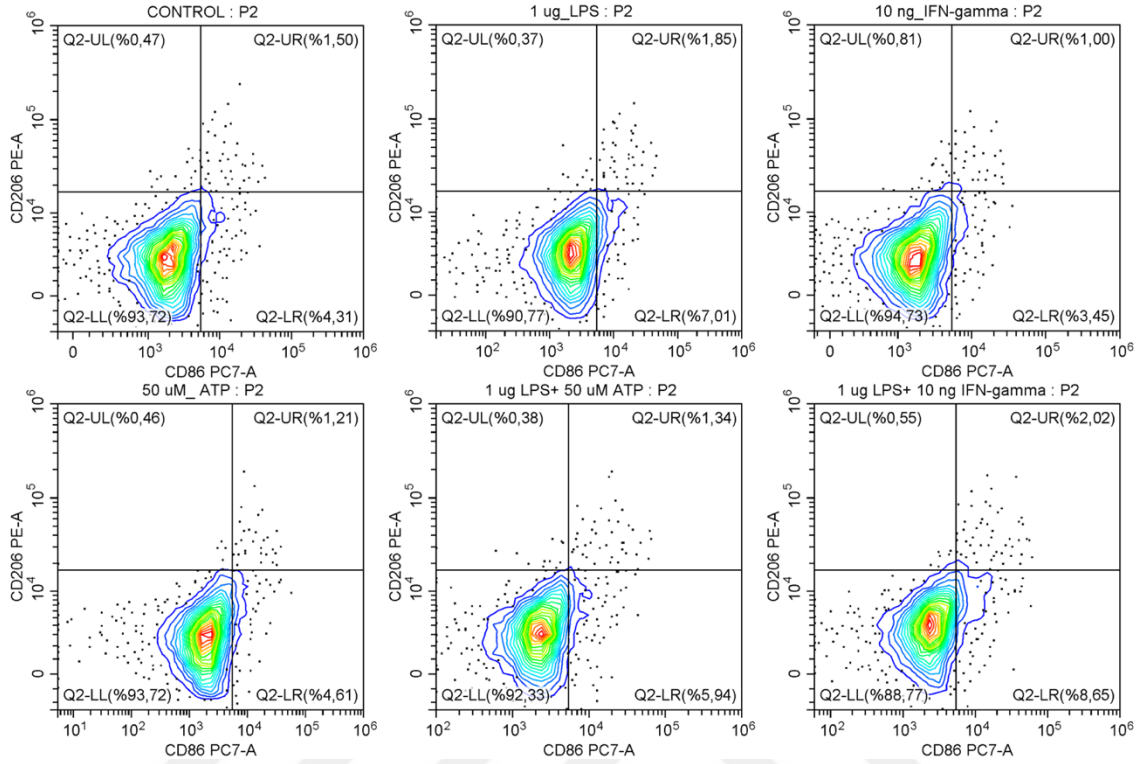
CD86-CD16 ve CD16-CD206 (A) ile boyanmıştır. Yüzey markerların bulunma yüzdeleri grafikte(B) verilmiştir.

A)

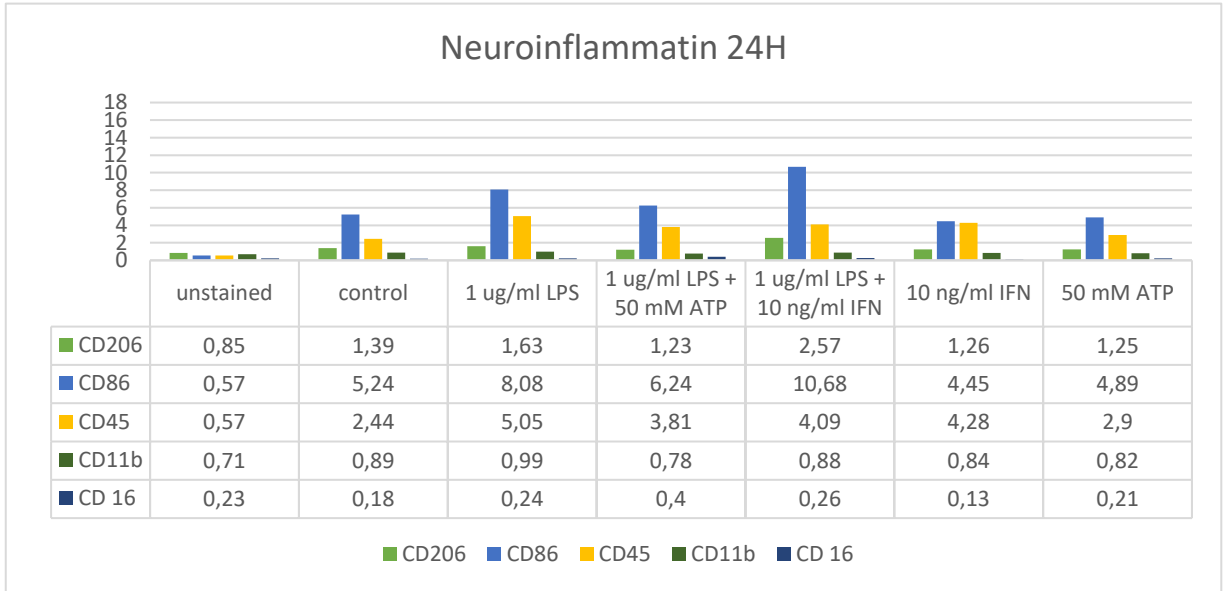


Şekil 23: 1 ug LPS; 50Mm ATP, 1 ug LPS +50 Mm ATP; 1ug LPS +10 ng IFN; 10 ng IFN ile muamele edilmiş 24 saatlık nöroinflamasyon modeli

CD86-CD206, CD16-CD86, CD11b-CD45 ve CD86-CD45 (A) ile boyanmıştır. Yüzey markerların bulunma yüzdeleri grafikte(B) verilmiştir.

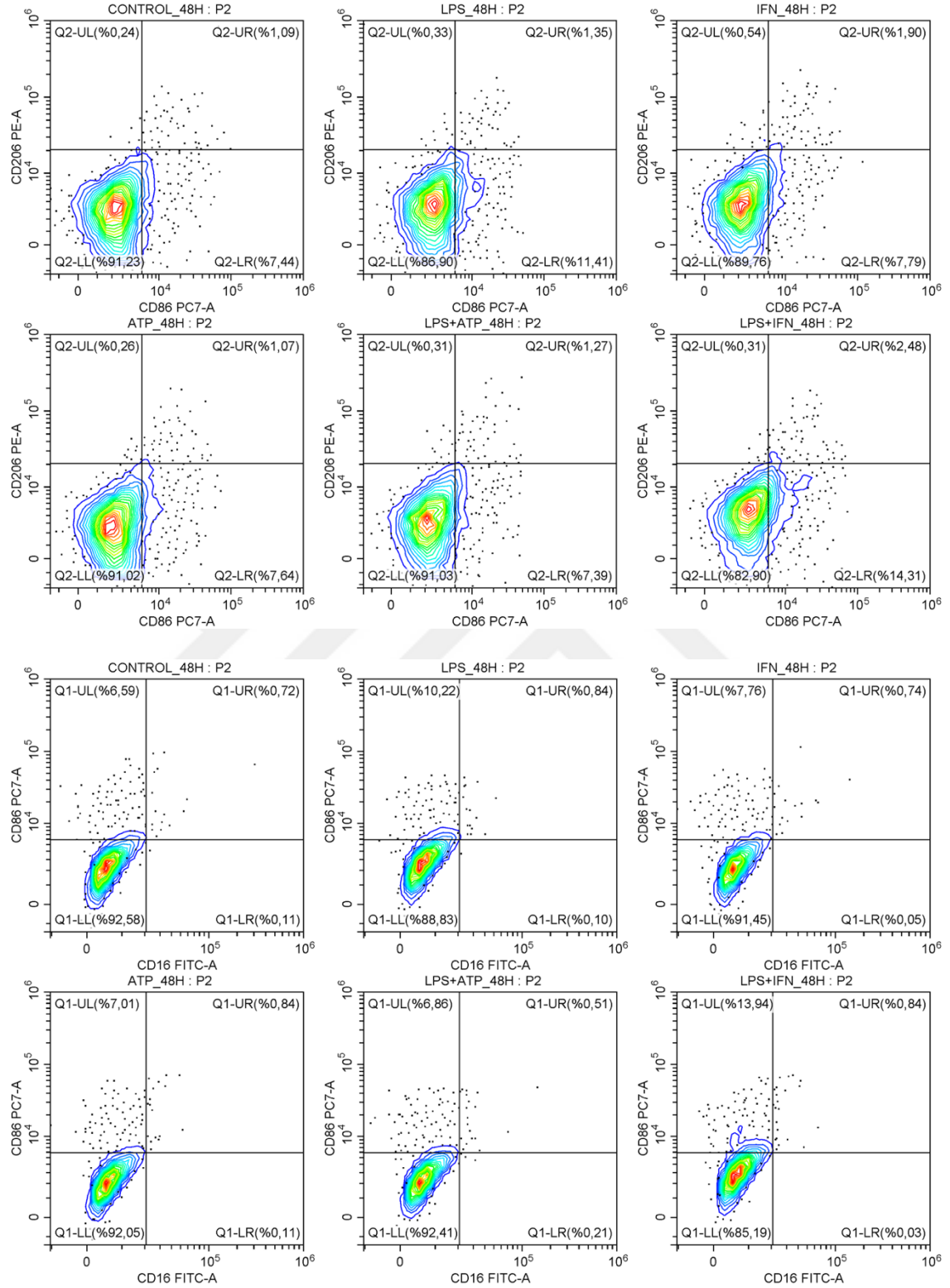


B)



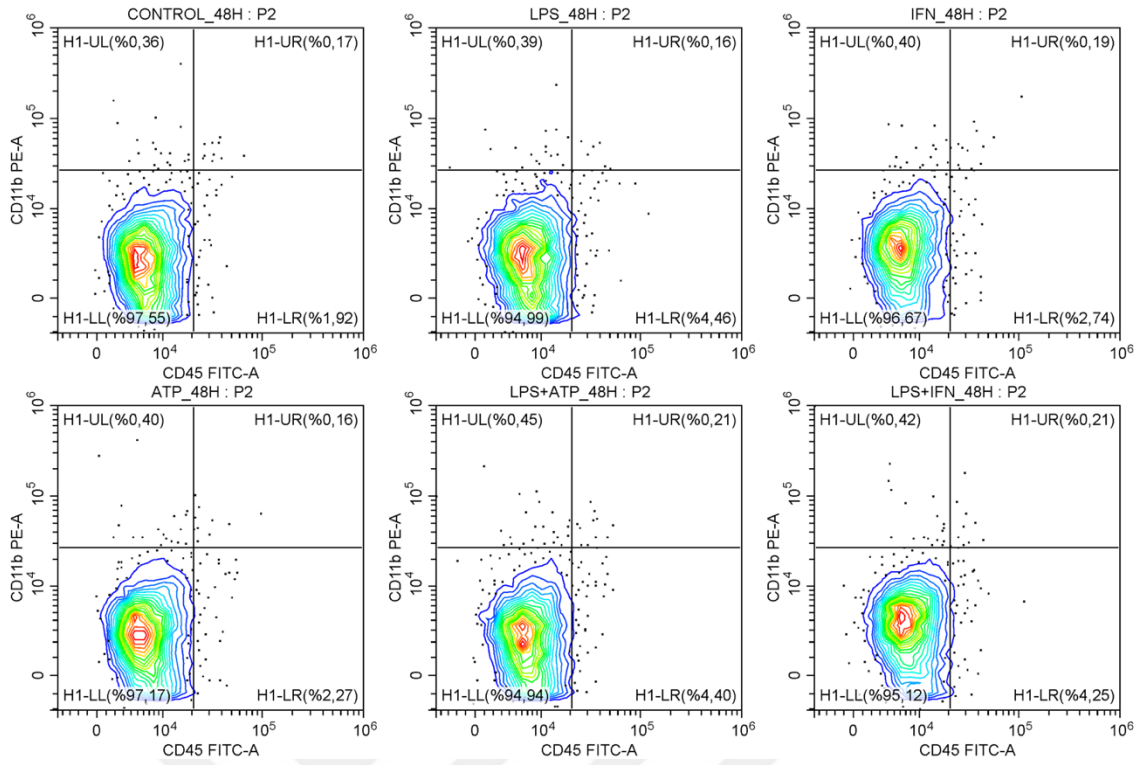
Şekil 23: 1 ug LPS; 50Mm ATP, 1 ug LPS +50 Mm ATP; 1ug LPS +10 ng IFN; 10 ng IFN ile muamele edilmiş 24 saatlık nöroinflamasyon modeli (devam)

A)

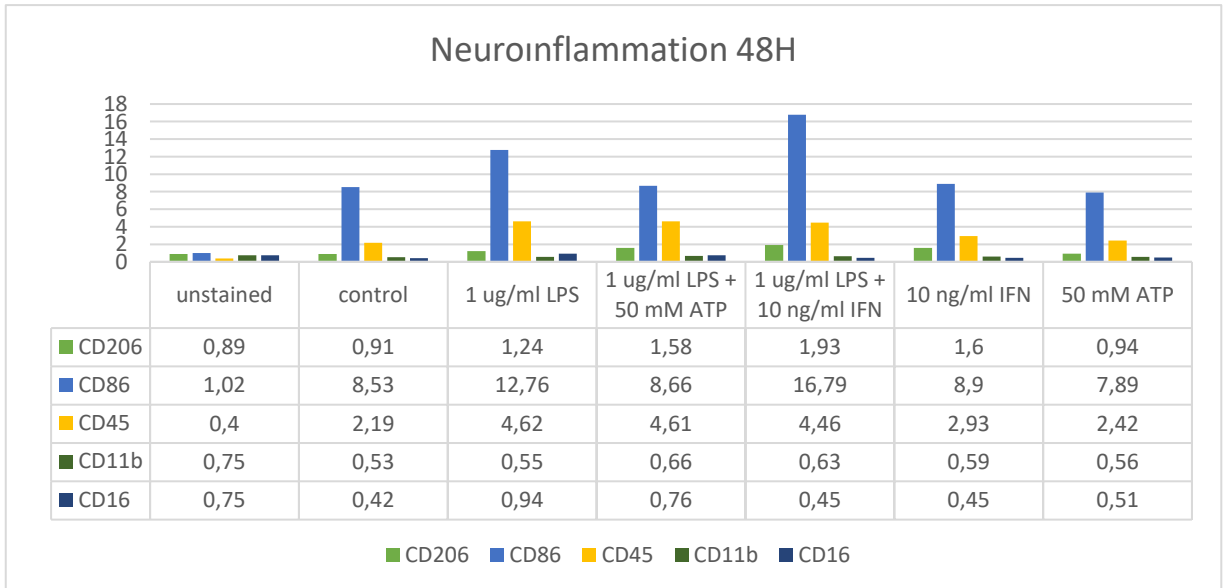


Şekil 24: 1 ug LPS; 50Mm ATP; 1 ug LPS +50 Mm ATP;1ug LPS +10 ng IFN; 10 ng IFN ile muamele edilmiş 48 saatlik nöroinflamasyon modeli

CD86-CD206(A), CD16-CD86 (B), CD11b-CD45(C) ve CD86-CD45 (D) ile boyanmıştır. Yüzey markerların bulunma yüzdeleri grafikte(E) verilmiştir.



B)

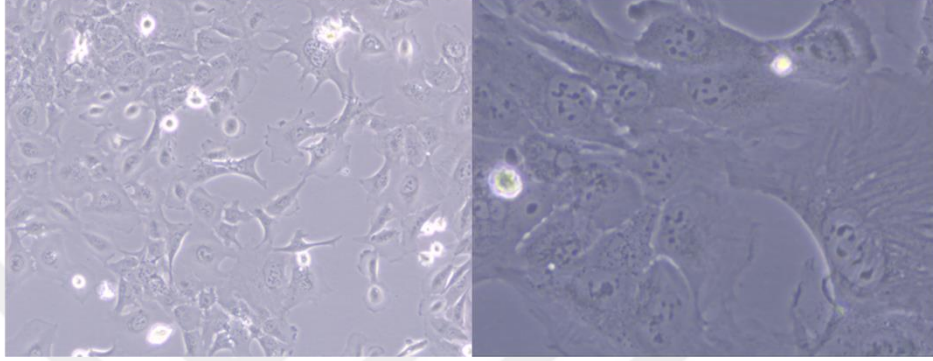


Şekil 24: 1 ug LPS; 50Mm ATP; 1 ug LPS +50 Mm ATP;1ug LPS +10 ng IFN; 10 ng IFN ile muamele edilmiş 48 saatlik nöroinflamasyon modeli (devam)

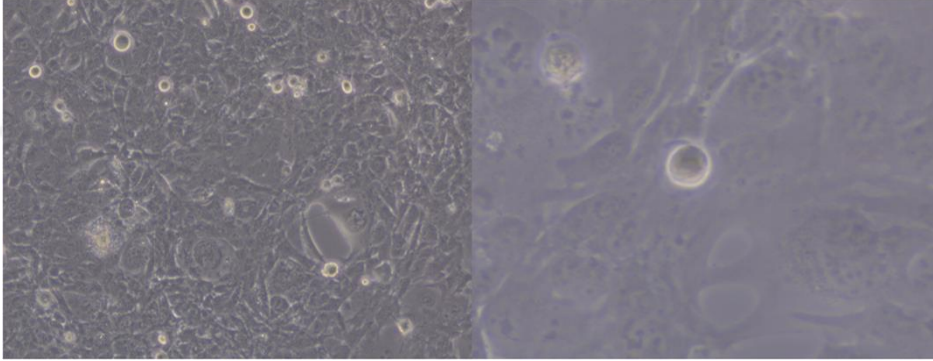
4.4. TopoII β Geninin Susturulduğu HMC3 Hücre Hattında Nöroinflamasyon Modeli Oluşturulması

TopoII β geninin susturulması optimize edildikten sonra elde edilen datalar baz alınarak LPS, IFG, LPS+ IFG uygulamaları ile 3 farklı nöroinflamasyon modeli oluşturuldu. Deney ortamındaki infalamasyonun profilini saptamamak adına akış sitometrisi uygulaması yapıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda yer almaktadır, bu sayede istenilen mikrogliya profiline göre en uyumlu olan model optimize edildi.

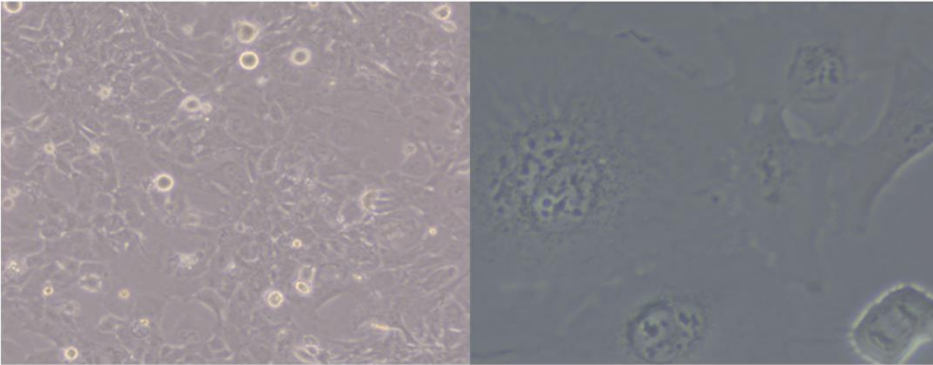
A)



B)



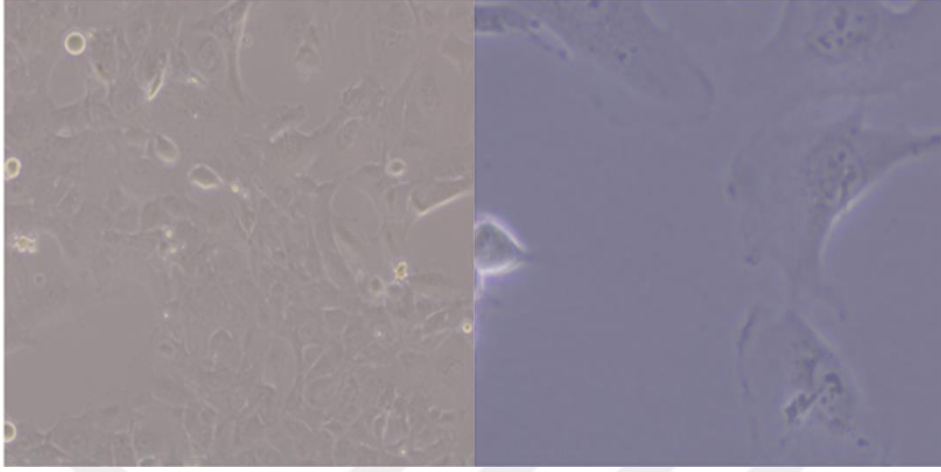
C)



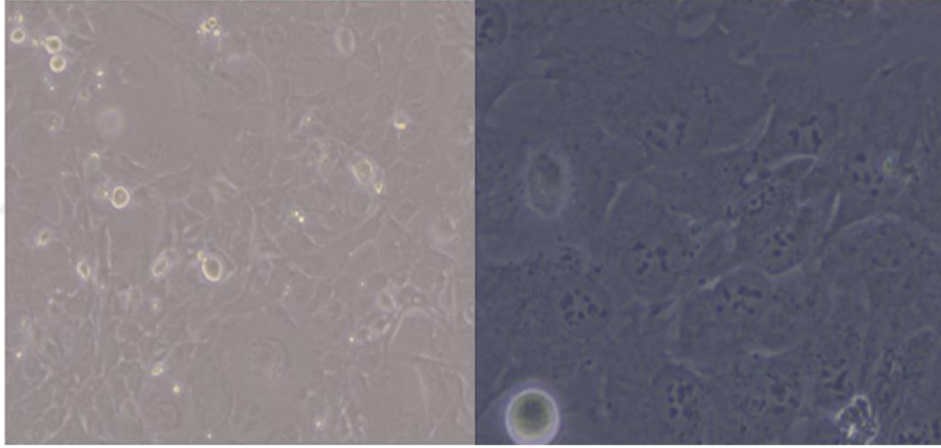
Şekil 25: Deney gruplarının faz fotoğrafları 10X (sol) ve 40X (sağ) merceklerle, Carl Ziess Inverted Microscope vasıtasıyla çekilmiştir

(A) 48 saat siRNA uygulanmış, (B) 96 saat siRNA uygulanmış, (C) 48 saat 1ug/ml LPS uygulanmış, (D) 48 saat 10 ng/ml IFN γ uygulanmış, (E) 48 saat 1ug/ml LPS ve 10 ng/ml IFN γ uygulanmış HMC3 hücrelerinin 10X(sol) ve 40X(sağ) objektifle çekilmiş faz görüntüleri.

D)



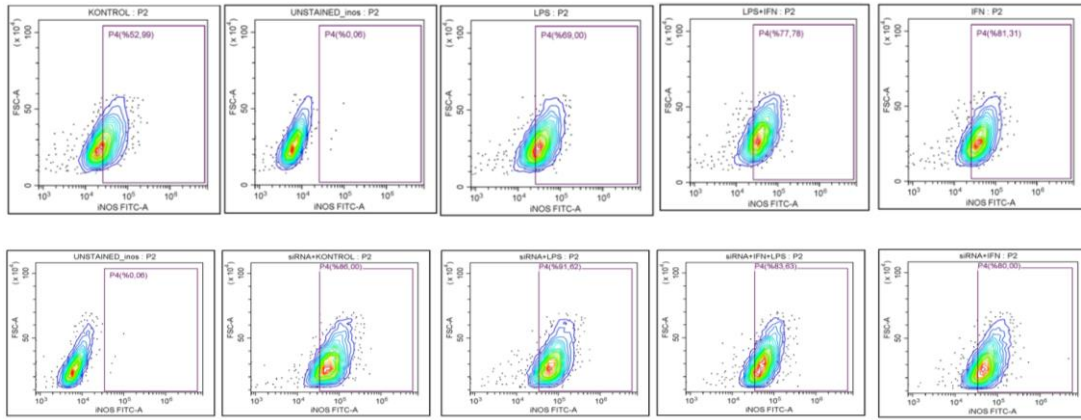
E)



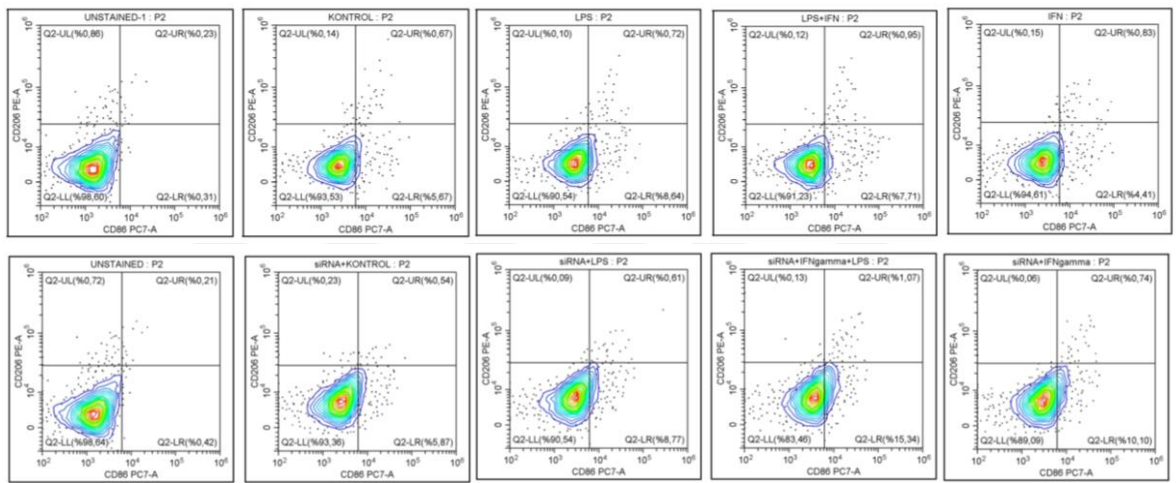
Şekil 25: Deney gruplarının faz fotoğrafları 10X (sol) ve 40X (sağ) merceklerle, Carl Ziess Inverted Microscope vasıtasıyla çekilmiştir (devam)

4.4.1. TopoII β geninin susturulduğu HMC3 hücre hattında nöroinflamasyon modelinin flow sitometri ile teyiti

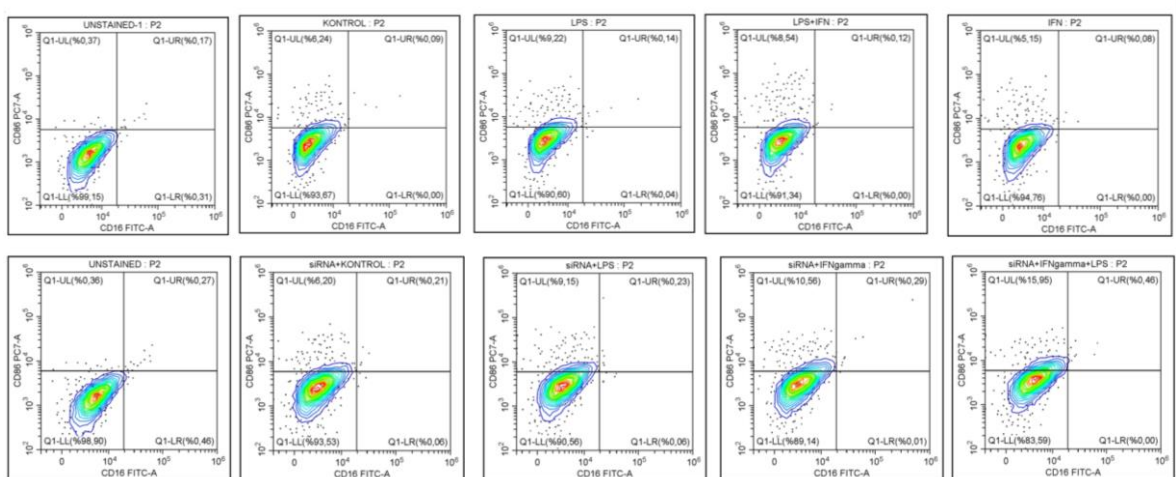
A)



B)



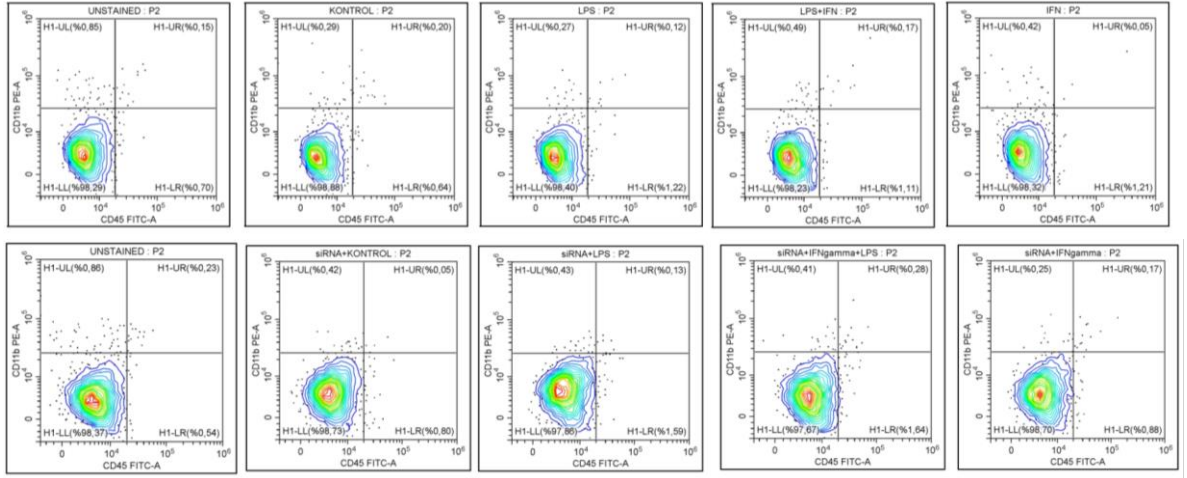
C)



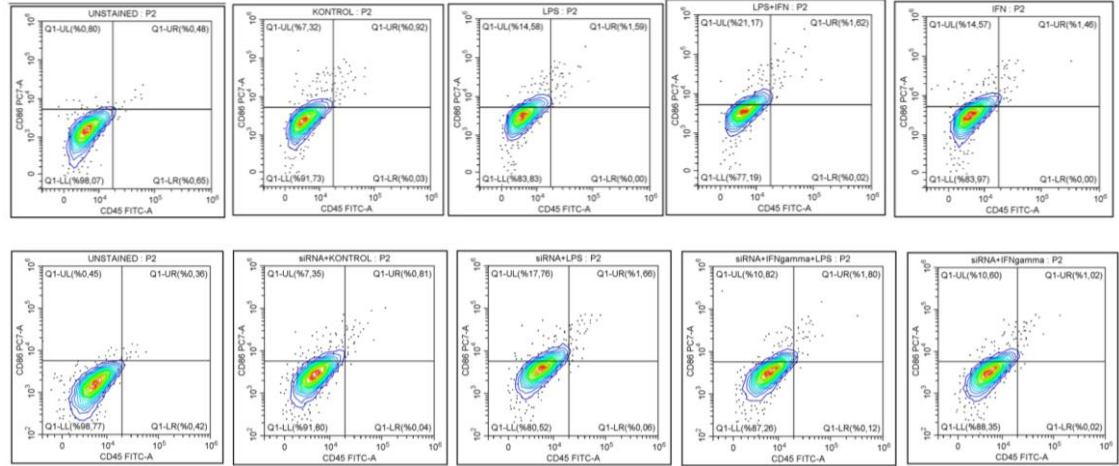
Şekil 26: LPS 1 ug veya İnterferon-gama 10 ng veya LPS 1 ug ve İnterferon-gama 10 ng muamelesiyle oluşturulan 24 saatlik nöroinflamasyon modelleri akış sitometrisi sonuçları

iNOS boyaması, kontrol grubu (A); siRNA grubu (B), CD 86-CD 16 boyaması kontrol grubu (C); siRNA grubu (D), CD 206 -CD 86 boyaması kontrol grubu (E); siRNA grubu (F), CD86-CD 45 boyaması kontrol grubu (G); siRNA grubu (H), CD11b -CD 45 boyaması kontrol grubu (G); siRNA grubu (H) verilmiştir. Grafikte Flow sitometri sonuçlarının bütünü yer almaktadır.

D)

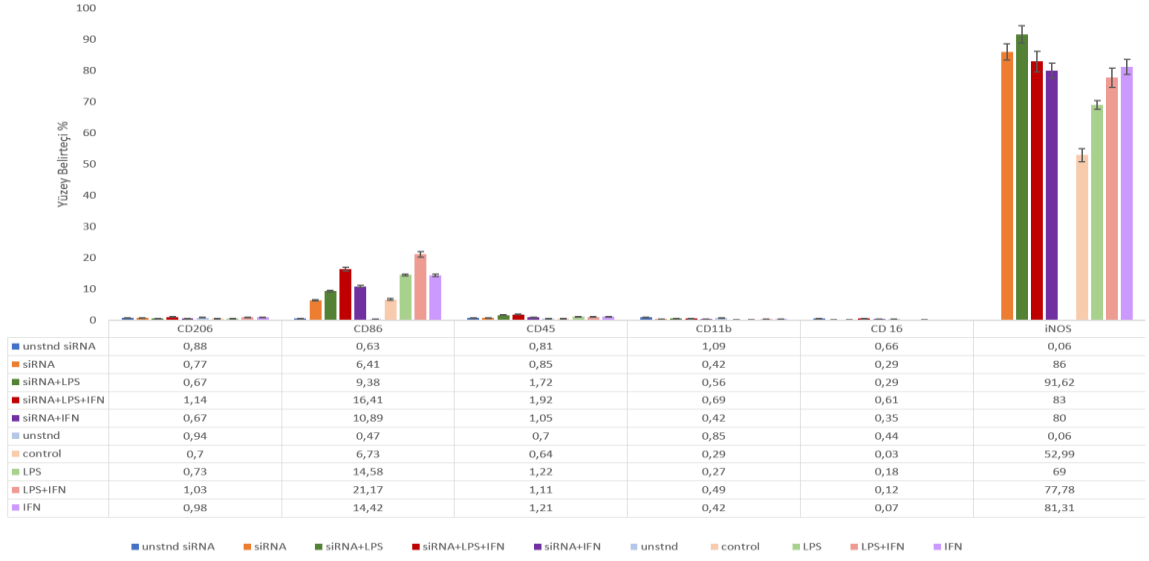


E)



Şekil 26: LPS 1 ug veya İnterferon-gama 10 ng veya LPS 1 ug ve İnterferon-gama 10 ng muamelesiyle oluşturulan 24 saatlik nöroinflamasyon modelleri akış sitometrisi sonuçları (devam)

24 Saatlik siRNA Nöroinflamasyon Modeli Flow Sitometrisi



Şekil 26: LPS 1 ug veya İnterferon-gama 10 ng veya LPS 1 ug ve İnterferon-gama 10 ng muamelesiyle oluşturulan 24 saatlik nöroinflamasyon modelleri akış sitometrisi sonuçları (devam)

5. TARTIŞMA

Nöroinflamatuvar reaksiyonlar vücudun birincil savunmasını sağlayan hayatta kalım ve hüce refahını optimize eden mekanizmalardır. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermektedir ki bu inflamasyon mekanizmasının tedavi edici ve koruyucu olabilmesi için kontrollü bir süreç geçirilmesi gerekmektedir. Nöroinflamasyonun mekanizması aktif inflamatuvar yanıt ile yaralanmış hücreleri öldürüp göreceli sağ kalımı sağlamakta etkin olduğu bilinmektedir bu da nörodejenerasyonun temelini oluşturmaktadır, benzer bir şekilde proinflamatuvar sürecin aşırı aktive olması da kontrolsüz bir hücre çoğalmasını tetiklemektedir doğrusu bu durumda da akla gelen mekanizmada kanserdir. Nöroinflamasyonun bu iki kutuplu hali hem kanser hem de nörodejeneratif bozuklukların mekanizmasını anlamamızda etkin rol oynayabilecek gibi görünmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi son yıllarda yapılan pek çok çalışmada bu düşüncayı desteklenmektedir.

Nöral hücrelerde topo II β aktivitesinin *in vitro* veya *in vivo* olarak baskılandığı ve buna bağlı olarak nöral sistemde meydana gelen, gerek morfolojik gerekse fonksiyonel değişikliklerin ifade edildiği yayınlar bulunmaktadır; bu yayınlarda, topo II β yokluğuna bağlı olarak, aksonların daha kısa geliştiği, nöromusküler bağlantıların gerçekleşmediği, nöral farklılaşma esnasında önemli genlerin ifade edilemediği ve DNA hasarında artma olduğu bilinmektedir. Topo II β 'nın susturulması insan kemik iliği MKH'de nöronal akson dejenerasyonuna neden olmakta, aşırı ekspresyonu ise RhoA/Rock2 yolunu durdurarak, aksonların korunmasını ve MKH'lerin nöral farklılaşma potansiyelinin artmasını sağlamaktadır (Zaim ve Işık, 2018). Bu durumda, topo II β nöral farklılaşma potansiyelini arttırmak ve nörit büyümesini indüklemek ve nörodejenerasyona karşı bir strateji olarak kullanılma potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir. Nöral indüklenmiş MKH'de topo II β 'nın susturulması, inflamasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının anlamlı miktarda artmasına yol açmıştır (Işık ve ark., 2015). Bu durumda, topo II β inflamasyon ile ilgili hücre sinyal yollarında koruyucu bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir. MPP+ ile indüklenmiş PH modelinde topo II β gen ekspresyonu baskılanmaktadır. Bununla birlikte topo II β 'nın susturulması TH geninin baskılanmasına neden olmuştur (Yeman ve Işık, 2019). Bu durumda topo II β , PH'da TH enziminin gen ifadesi veya başka yollar üzerinde düzenleyici bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar ile Nurr1 proteinin PH'da nöroinflamasyona karşı nöroprotektif rolü olduğunu kanıtlamakta, topo II β 'nın Nurr1

ekspresyonu üzerinde düzenleyici bir etkisi olduğunu göstermektedir (Terzioğlu ve ark., 2017, Zaim ve Isık 2018). Bu durumda, topo II β kuvvetle muhtemel, Nurr1 proteini üzerinden PH'da nöroinflamasyona karşı nöroprotektif bir rol alabileceği fikrini ortaya çıkartmıştır.

Yukarıdaki literatür taraması ve hipotezlerin dayandırıldığı yayınlardan anlaşılacağı üzere, topo II β 'nin nöral farklılaşmadaki rolüne dair çok sayıda yayın bulunmakta, ancak nöron gelişimine doğrudan etkisi olan mikrogliyal hücrelerde topo II β 'nin ekspresyonunu inceleyen ve topo II β 'nin nöroinflamasyondaki rolünü araştıran hiçbir çalışma yoktur. Bugüne kadar, mikrogliyal fenotiplerde topo II β 'nin ekspresyonu ve nöroinflamasyondaki muhtemel rolü de çalışılmamıştır. Topo II β ifadesinin susturulmasının HMC3 mikrogliyal hücre hattında mikrogliya fenotipleri (M1 ve M2) arasında özellikle fenotipler arası geçişte topo II β 'nin olası düzenleyici etkisinin araştırılmasına dair de herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu araştırma ile literatürdeki bu boşluğun doldurulması, nöroinflamasyon ve topo II β arasındaki ilişkinin aydınlatılması konusunda öncül data olması amacı taşımaktadır. Literatürde topo II β genin susturulmasının nörodejenerasyona sebep olduğu bilinmediği ve daha önceki öncül çalışmalarda genin susturulmasının inflamatuvar yanıt oluşturduğu saptandığı için bu çalışmada da topo II β susturulmasının M1 fenotipe dönüşe sebep olacağı varsayımı ile yola çıkılmıştır.

Çalışma sırasında HMC3 hücre hattı başarılı bir şekilde kültürlenmiş ve optimal şartları sağlanmıştır. Hücrelerin refahi en iyi 20.000 hücre/cm² ekildiği %10 FBS, %1 L-Glutamin, %1 Prüvat ve 100ug/ml primocin şartlarında kültürlenip ,her gün besi yeri değiştirilip 3 günde bir de pasaj yapılarak sağlandı. Primer hücre hattı yerine yapay bir kanser hücre hattı tercih edilmiştir. Zira dokudan alınarak üretilecek bir primer hücre hattının olası genetik mutasyonları saptanamayacağı ve bu durumda gene bağlı inflamasyon mekanizması araştırılan bir deneyin güvenilirliğini sarsabileceği düşünülmüştür. Ancak yapay hücre hattı HMC3 mikrogliya hattının yukarıda tartışıldığı gibi bir takım verimlilikle ilgili sorunları mevcut olup nöroinflamasyon mimikrisinin takliti için oldukça çok uğraşılmıştır. Hücre hattında çalışması araştırılan gen olan topo II β başarılı bir şekilde susturulmuştur. Susturulması için gereken konsantrasyonlar toksisite testiyle değerlendirilmiş susmanın optimal şartları olan 48 saat 10nm olarak saptanmış,

siRNA kullanımı ile protein ve m RNA düzeyinde sustuğu başarılı bir şekilde gösterilmiştir.

Kronik nöroinflamasyon modeli oluşturulmasında ise çeşitli zorluklar yaşanmıştır ,zira bu konuda literatürdeki veriler oldukça tutarsız ve yetersizdir. Kullanılan hücre hattının verimsizliği ve literatürde HMC3 hücre hattı üzerinden yapılan çalışma azlığı düşünüldüğünde bu maalesef çözülmesi gereken bir sorun doğurmuştur. Bunun için olası tüm inflamasyon modelleri denenmiştir. LPS, IFN γ , LPS+ IFN γ uygulamasının 24 ve 48 saatlik çalışmaları yapılmış. Detaylı analizin yapılabilmesi içinde akış sitometrisi tekniği kullanılarak hücrelerin inflamasyona mmaruziyetinden sonra oluşan yüzey markerları boyanmış bu sayede hücrelerin hangi fenotipe doğru polarize olduğu saptanmak istenmiştir. Bahsi geçen yüzey belirteçleri literatürde geniş çaplı yapılan çalışmanın ardından karar verilmiştir. M1 fenotipi için CD86 ve CD16 tercih edilirken M2 fenotipi için ise CD 206 yüzey belirteci tercih edilmiştir. Ayrıca CD45 ve CD11b boyamaları yapılmış CD45 düşük seviyede, CD 11b + boyamalar M1 fenotipi, CD45 yüksek seviyede CD 11b + boyamalar M2 fenotipinde kabul edilmiştir. (Kushchayev ve ark., 2012). En verimli model olarak 24 saat LPS+ IFN γ uygulaması yapılan model olarak saptanmıştır. SiRNA uygulaması yapılmış hücrelerde uygun görülen nöroinflamasyon modeli tekrarlanmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda ise topo II β geninin susturulmasının ile oluşturulan nöroinflamasyon modelinde hücre popülasyonu heterojenliğini korumaktadır bu da bize sağlıklı bir model oluşturduğumuzu göstermektedir. Popülasyonda hem M1 fenotipine dönüşümünde M2 fenotipine dönüşümlerde saptanmıştır. Ancak kontrol nöroinflamasyon modeliyle kıyaslandığında CD86 seviyesinde ciddi düşme görürken CD 206 seviyesinde de kısmi bir yükseliş olduğu saptanmıştır. Bu durum topo II β geninin susturulmasının nöroinflamasyonu iyileştirici bir etki sağladığını göstermektedir. Bu durum hem flow sitometri ile kantitatif olarak kanıtlanmış hem de kalitatif olarak faz fotoğraflarıyla gösterilmiştir. Yapılan bu çalışma istatistik anlamda da anlamlı bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma ile nörongenez ve nöron farklılaşmasıyla yakından ilişkisi olduğu bilinen ayrıca nörodejeneratif hastalıklarda oynadığı roller hali hazırda bilinen topoII β genin nöroimmunolojinin temel taşı olan mikroglialar ve dolayısıyla nöroinflamasyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuç topo II β gen ifadesinin susturulmasının nöroinflamasyonu baskılayıcı ve nöron sağ kalımını destekleyici etkisi olabileceğini göstermektedir. Ancak çalışmamız oldukça öncül bir çalışma olması sebebiyle bunu hangi yollarla yardımcıyla veya hangi mekanizmalardan yararlanarak yaptığı henüz bilinmemektedir. Bu durum araştırmanın kapsamı içerisinde yer almamaktadır, ancak araştırılmaya değer görülmektedir. Mikroglialar nöroinflamasyonda temel bir yer teşkil etmektedir ve haklarında görece az çalışılma yer almaktadır. Topo II β genin hücre sağ kalımı için önemi düşünüldüğünde mikrogliadaki ekspresyon seviyesi üzerlerinde daha fazla çalışma yapılarak etkilenen yollar değerlendirilmelidir.

Bu öncül veriye dayanarak umulur ki sonraki çalışmalarda nöroinflamasyon mekanizmasının Topo II β ile ilişkisinin aydınlatılabilmesi adına nöron-mikroglia kültürü yapılmalıdır. Sonrasında tüm “neuroinflammation cross talk”ın araştırılması adına, nöron-astrocit-mikroglia çalışması yapılmalıdır. Nörodejeneratif hastalıklarda kronik inflamasyonun zamanla mitokondrial hasara sebep olduğu bilinmektedir, ancak uyarılma yolları tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Topo II β , mitokondrial hasar ilişkisi araştırılmalıdır. CD34+ mikrogliaların hasarı artırdığı bilinmektedir, CD34+ hücrelerde topo II β ifadesinin arttığıda bilinmektedir bu artışın mekanizmasının anlaşılması topo II β ’nin etkileşim kurduğu hücresel mekanizmaların aydınlanmasını sağlayacaktır, bu da nöroinflamasyon patogenezi daha iyi anlamamızı sağlayacaktır. Topo II β ifadesinin hücre morfolojisini değiştirdiği mikroglialarda, nöronlarda ve mezenkimal hücrelerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir bu morfolojik değişimin mekanizması aydınlatılması yine inflamasyon mekanizmasının aydınlatılmasını sağlayacaktır. Ayrıca nöronal ve mikrogliyal hücre morfolojinin oluşumu ve gelişimsel mekanizmalarında aydınlatılmasını sağlayacaktır.

NURR1-TH-TOPO 2 β –Dopaminerjik nöron ilişkisi bilinmektedir. Nöroinflamasyon mekanizmasında koruyucu rol olarak GABA aktivitesi artmakta ve nöronal deşarjın inhibisyonu görölmektedir, dolayısıyla dopaminerjik aktivitede azalma saptanmaktadır. Bu durumda indirekt olarak topo II β - GABA ilişkisi araştırılmasında nörotransmitterle ile Topo II β ilişkisini aydınlatmada oldukça önemli olacaktır.

Mikrogliaların beyinde uzamsal olarak niş alanları olduğu düşünölmektedir. Beyin sapında mikrogliaların yerleşimi diğfer alanlara göre daha yoğunudur ve bu alandaki mikrogliaların fenotipi M1'e daha yakındır, topo II β ifadesinin de en yoğun olduğu nöroanatomik nişin beyinsapı olduğu bilinmektedir. Bu durum göz önünde bulundurularak bu ilişki nöroanatomik ve fonksiyonel ilişki araştırılmalıdır. Nöroinflamasyon çok geniş bir tanım ve çok geniş bir alan sunduğundan sınırlarının çizilmesi ve hücrel mekanizmaların çalışılmasını zorlaştırmaktadır. Bunun için topo II β gen ifadesi patogenezi ilişkisi hastalık spesifik çalışılara çalışmanın kapsamının daraltılması ve daha spesifik sonuçlara ulaşılmasını sağlayacaktır.

Grubumuzun yaptığı daha önce yapmış olduğu *in vitro* ve *in vivo*, Alzheimer ve Parkinson çalışılarında da elde ettiğimiz verilere dayanarak (Zaim ve Işık., 2014; Terzioğlu-Uşak, 2017; Yeman-Kıyak ve Işık., 2019) topo II β ifadesinin uygun manipölasyonun hem nöronal sağ kalım için hemde kronik nöroinflamasyonun düzenlenmesi için iyi bir teröpotik ajan niteliğı taşımaktadır. Bu konudaki önerilen çalışıların yapılmasıyla ile kliniğe taşınabilecek önemli bir teröpotik hedefdir.

KAYNAKLAR

- AbuSamra, D. B., Aleisa, F. A., Al-Amoodi, A. S., Jalal Ahmed, H. M., Chin, C. J., Abuelela, A. F., Bergam, P., Sougrat, R., ve Merzaban, J. S. (2017). Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. *Blood advances*, 1(27), 2799–2816.
- Akimitsu N. (2008). Messenger RNA surveillance systems monitoring proper translation termination. *Journal of biochemistry*, 143(1), 1–8.
- Ashley RE, and Osheroff N (2016) Regulation of DNA topology by topoisomerases: mathematics at the molecular level, In *Knots, Low-Dimensional Topology and Applications* (Adams CC, Gordon CM, Jones VFR, Kauffman LH, Lambropoulou S, Millett KC, Przytycki JH, Ricca R, and Sazadanovic R, Eds.
- Ashley RE, and Osheroff N (2016) Regulation of DNA topology by topoisomerases: mathematics at the molecular level, In *Knots, Low-Dimensional Topology and Applications* (Adams CC, Gordon CM, Jones VFR, Kauffman LH, Lambropoulou S, Millett KC, Przytycki JH, Ricca R, and Sazadanovic R, Eds.), Springer, Greece.
- Ashley, N., Caputo, V. S., Lichtenberg, J., Loaiza, S., Bodine, D. M., Karadimitris, A., Mead, A. J., & Roberts, I. (2016). Single-cell profiling of human megakaryocyte-erythroid progenitors identifies distinct megakaryocyte and erythroid differentiation pathways. *Genome biology*, 17, 83.
- Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., Tipton, T., Chapman, M. A., Riecken, K., Beccari, S., Sierra, A., Molnár, Z., Cragg, M. S., Garaschuk, O., Perry, V. H., & Gomez-Nicola, D. (2017). Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell reports*, 18(2), 391–405.
- Austin C.A., Barot H., Margerrison E.E.C., Hayes M.V., Fisher L.M. Biochemical and immunological characterization of mammalian DNA topoisomerase II. *Biochem. Soc. Trans.* 2018;17:528–529.
- Austin C.A., Barot H., Margerrison E.E.C., Hayes M.V., Fisher L.M. Biochemical and immunological characterization of mammalian DNA topoisomerase II. *Biochem. Soc. Trans.* 1989;17:528–529.
- Austin C.A., Fisher L.M. Isolation and characterization of a human cDNA clone encoding a novel DNA topoisomerase II homologue from HeLa cells. *FEBS Lett.* 1990;266:115–117.

- Ayata, P., Badimon, A., Strasburger, H. J., Duff, M. K., Montgomery, S. E., Loh, Y. E., Ebert, A., Pimenova, A. A., Ramirez, B. R., Chan, A. T., Sullivan, J. M., Purushothaman, I., Scarpa, J. R., Goate, A. M., Busslinger, M., Shen, L., Losic, B., ve Schaefer, A. (2018). Epigenetic regulation of brain region-specific microglia clearance activity. *Nature neuroscience*, 21(8), 1049–1060.
- Barrette, B., Hébert, M. A., Filali, M., Lafortune, K., Vallieres, N., Gowing, G., ... & Lacroix, S. (2008). Requirement of myeloid cells for axon regeneration. *Journal of Neuroscience*, 28(38), 9363–9376.
- Barros, M. H. M., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B., & Niedobitek, G. (2013). Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PloS one*, 8(11), e80908.
- Baughman VL, Hoffman WE, Miletich DJ, Albrecht RF, Thomas C. Neurologic outcome in rats following incomplete cerebral ischemia during halothane, isoflurane, or N2O. *Anesthesiology*. 1988;69:192–198.
- Baum A, Cohen L, Hall M. Control and intrusive memories as possible determinants of chronic stress. *Psychosom Med*. 1993;55:274–286.
- Bennett, F. C., Bennett, M. L., Yaqoob, F., Mulinyawe, S. B., Grant, G. A., Hayden Gephart, M., Plowey, E. D., ve Barres, B. A. (2018). A Combination of Ontogeny and CNS Environment Establishes Microglial Identity. *Neuron*, 98(6), 1170–1183.e8.
- Benoit, M., Desnues, B., & Mege, J. L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *The Journal of Immunology*, 181(6), 3733–3739.
- Berg BM, Godbout JP, Kelley KW, Johnson RW. Alpha-tocopherol attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice. *Brain, behavior, and immunity*. 2004;18:149–157.
- Beutler B. (2000). Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current opinion in immunology*, 12(1), 20–26.
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2012). Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell metabolism*, 15(4), 432–437.
- Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. R. (2013). Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*, 39(1), 3–18.

- Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. (2013). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*, 39(1), 3–18.
- Bolaños, C. A., & Nestler, E. J. (2004). Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromolecular medicine*, 5(1), 69-83.
- Böttcher, C., Schlickeiser, S., Sneeboer, M. A., Kunkel, D., Knop, A., Paza, E., ... & Priller, J. (2019). Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nature neuroscience*, 22(1), 78-90.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., & Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347(6295), 768-770.
- Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 109(9), 1139-1142.
- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A. E., Pluchino, S., ... & Schwartz, M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(1), 149-160.
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry*, 70(1), 369-413.
- Chen J, Buchanan JB, Sparkman NL, Godbout JP, Freund GG, Johnson RW. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain, behavior, and immunity*. 2014;22:301–311.
- Chen Q, Tarr AJ, Liu X, Wang Y, Reed NS, Demarsh CP, Sheridan JF, Quan N. Controlled progressive innate immune stimulation regimen prevents the induction of sickness behavior in the open field test. *J Inflamm Res*. 2017;6:91–98.
- Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, et al. Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci*. 2012;32:11706–11715.
- Christensen M.O., Larsen M.K., Barthelme H.U., Hock R., Andersen C.L., Kjeldsen E., Knudsen B.R., Westergaard O., Boege F., Mielke C. Dynamics of human DNA topoisomerases II α and II β in living cells. *J. Cell Biol*. 2002;157:31–44.

- Colton, C. A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of neuroimmune pharmacology*, 4(4), 399-418.
- Cronk, J. C., Derecki, N. C., Ji, E., Xu, Y., Lampano, A. E., Smirnov, I., Baker, W., Norris, G. T., Marin, I., Coddington, N., Wolf, Y., Turner, S. D., Aderem, A., Klibanov, A. L., Harris, T. H., Jung, S., Litvak, V., ve Kipnis, J. (2015). Methyl-CpG Binding Protein 2 Regulates Microglia and Macrophage Gene Expression in Response to Inflammatory Stimuli. *Immunity*, 42(4), 679–691.
- Dalvie ED, and Osheroff N (2021) DNA topoisomerases: type II, In *The Encyclopedia of Biological Chemistry* (Jez JM, Ed.) in press ed., Elsevier, Inc.
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., ve Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(1), 46–56.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., ve Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience*, 8(6), 752–758.
- De Biase, L. M., ve Bonci, A. (2019). Region-Specific Phenotypes of Microglia: The Role of Local Regulatory Cues. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 25(4), 314–333.
- del Rey A, Balschun D, Wetzel W, Randolph A, Besedovsky HO. A cytokine network involving brain-borne IL-1beta, IL-1ra, IL-18, IL-6, and TNFalpha operates during long-term potentiation and learning. *Brain Behav Immun*. 2013;33:15–23.
- Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinnies KM, Carihfield A, Lynch KR, Kipnis J. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med*. 2010;207:1067–1080
- Derecki, N. C., Cardani, A. N., Yang, C. H., Quinnies, K. M., Carihfield, A., Lynch, K. R., & Kipnis, J. (2010). Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *Journal of Experimental Medicine*, 207(5), 1067-1080.
- Deweese JE, and Osheroff N (2009) The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing, *Nucleic Acids Res*. 37, 738–749.

- Deweese JE, Burgin AB, and Osheroff N (2008) Human topoisomerase II α uses a two-metal-ion mechanism for DNA cleavage, *Nucleic Acids Res.* 36, 4883–4893.
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry*, 139, 136-153.
- dos-Santos-Pereira, M., Acuña, L., Hamadat, S., Rocca, J., González-Lizárraga, F., Chehín, R., ... & Michel, P. P. (2018). Microglial glutamate release evoked by α -synuclein aggregates is prevented by dopamine. *Glia*, 66(11), 2353-2365.
- Drake, F. H., Zimmerman, J. P., McCabe, F. L., Bartus, H. F., Per, S. R., Sullivan, D. M., Ross, W. E., Mattern, M. R., Johnson, R. K., ve Crooke, S. T. (1987). Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 262(34), 16739–16747.
- Drake, F. H., Zimmerman, J. P., McCabe, F. L., Bartus, H. F., Per, S. R., Sullivan, D. M., ... & Crooke, S. T. (1987). Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 262(34), 16739-16747.
- Dunn AJ, Swiergiel AH, Zhang H, Quan N. Reduced ingestion of sweetened milk induced by interleukin-1 and lipopolysaccharide is associated with induction of cyclooxygenase-2 in brain endothelia. *Neuroimmunomodulation*. 2006;13:96–104.
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A. L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Muhlaker, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermöhlen, O., Chun, E., Garrett, W. S., McCoy, K. D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I., ve Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature neuroscience*, 18(7), 965–977.
- Fantin, A., Vieira, J. M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhodzhiy, S., Peri, F., Wilson, S. W., ve Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 116(5), 829–840.
- Fenn AM, Henry CJ, Huang Y, Dugan A, Godbout JP. Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor- α expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice. *Brain Behav Immun*. 2012;26:766–777.

- Frank MG, Barrientos RM, Biedenkapp JC, Rudy JW, Watkins LR, Maier SF. mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging. *Neurobiol Aging*. 2006;27:717–722.
- Freudenthal R, Boccia MM, Acosta GB, Blake MG, Merlo E, Baratti CM, Romano A. NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur J Neurosci*. 2005;21:2845–2852.
- Frost, J. L., ve Schafer, D. P. (2016). Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends in cell biology*, 26(8), 587–597.
- Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG (2002). Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovas Res* 55: 239– 249.
- Galván-Peña, S., ve O'Neill, L. A. (2014). Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Frontiers in immunology*, 5, 420.
- Garland, E. F., Hartnell, I. J., & Boche, D. (2022). Microglia and Astrocyte Function and Communication: What Do We Know in Humans. *Frontiers in neuroscience*, 16, 824888.
- Gimeno-Bayón, J., López-López, A., Rodríguez, M. J., & Mahy, N. (2014). Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype. *Journal of neuroscience research*, 92(6), 723-731.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., ve Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), 841–845.
- Godbout, J. P., Chen, J., Abraham, J., Richwine, A. F., Berg, B. M., Kelley, K. W., & Johnson, R. W. (2005). Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice after activation of the peripheral innate immune system. *The FASEB journal*, 19(10), 1329-1331.
- Goshen, I., & Yirmiya, R. (2009). Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(1), 30-45.
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Baillie, J. K., Stevens, M. P., Freeman, T. C., Summers, K. M., ve McColl, B. W. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature neuroscience*, 19(3), 504–516.

- Graumann, K., Runions, J., ve Evans, D. E. (2010). Nuclear envelope proteins and their role in nuclear positioning and replication. *Biochemical Society transactions*, 38(3), 741–746.
- Grueve, P., Grässer, A., Sehested, M., Jensen, P. B., Uhse, A., Straub, T., Ness, W., ve Boege, F. (1998). Essential mitotic functions of DNA topoisomerase IIalpha are not adopted by topoisomerase IIbeta in human H69 cells. *The Journal of biological chemistry*, 273(50), 33660–33666.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J. S., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J. C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., ... Alzheimer Genetic Analysis Group (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 368(2), 117–127.
- Gyoneva S, Traynelis SF. Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *J Biol Chem*. 2013;288:15291–15302.
- Hagemeyer, N., Hanft, K. M., Akriditou, M. A., Unger, N., Park, E. S., Stanley, E. R., Staszewski, O., Dimou, L., ve Prinz, M. (2017). Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta neuropathologica*, 134(3), 441–458.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*. 2002;5:405–414.
- Haschemi, A., Kosma, P., Gille, L., Evans, C. R., Burant, C. F., Starkl, P., ... & Wagner, O. (2012). The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell metabolism*, 15(6), 813-826.
- Haynes, C., Oldfield, C. J., Ji, F., Klitgord, N., Cusick, M. E., Radivojac, P., ... & Iakoucheva, L. M. (2006). Intrinsic disorder is a common feature of hub proteins from four eukaryotic interactomes. *PLoS computational biology*, 2(8), e100.
- Heintzman, D. R., Campos, L. V., Byl, J., Osheroff, N., ve Dewar, J. M. (2019). Topoisomerase II Is Crucial for Fork Convergence during Vertebrate Replication Termination. *Cell reports*, 29(2), 422–436.e5.
- Hellwig, S., Brioschi, S., Dieni, S., Frings, L., Masuch, A., Blank, T., ve Biber, K. (2016). Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice. *Brain, behavior, and immunity*, 55, 126–137.

- Heng X., Jin G., Zhang X., Yang D., Zhu M., Fu S., Li X., Le W. Nurr1 regulates Top II β and functions in axon genesis of mesencephalic dopaminergic neurons. *Mol. Neurodegen.* 2012;7:4.
- Heng, X., & Le, W. D. (2010). The function of DNA topoisomerase II β in neuronal development. *Neuroscience bulletin*, 26(5), 411-416.
- Henkel, J. S., Beers, D. R., Zhao, W., ve Appel, S. H. (2009). Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 4(4), 389–398.
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L. C., Means, T. K., ve El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature neuroscience*, 16(12), 1896–1905.
- Hui, C. W., St-Pierre, A., El Hajj, H., Remy, Y., Hébert, S. S., Luheshi, G. N., Srivastava, L. K., ve Tremblay, M. È. (2018). Prenatal Immune Challenge in Mice Leads to Partly Sex-Dependent Behavioral, Microglial, and Molecular Abnormalities Associated with Schizophrenia. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 13.
- Iwata M, Ota KT, Duman RS. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun.* 2013;31:105–114.
- Janabi-Sharifi, F. (2005). A neuro-fuzzy system for looper tension control in rolling mills. *Control engineering practice*, 13(1), 1-13.
- Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain.* 2013;136:28–42.
- Kabiersch A, del Rey A, Honegger CG, Besedovsky HO. Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. *Brain Behav Immun.* 1988;2:267–274.
- Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, et al. NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol.* 2006;26:2936–2946.
- Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci.* 2009;29:13435–13444.

- Kipnis J, Gadani S, Derecki NC. Pro-cognitive properties of T cells. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:663–669.
- Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, 298(Pt 2), 249.
- Kotter MR, Setzu A, Sim FJ, Van Rooijen N, Franklin RJ. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia*. 2001;35:204–212.
- Kovacs, M., Trias, E., Varela, V., Ibarburu, S., Beckman, J. S., Moura, I. C., Hermine, O., King, P. H., Si, Y., Kwon, Y., ve Barbeito, L. (2019). CD34 Identifies a Subset of Proliferating Microglial Cells Associated with Degenerating Motor Neurons in ALS. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 3880.
- Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I., May W.S. CD34 structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1994 ;87:1–13.
- Krawczyk, C. M., Holowka, T., Sun, J., Blagih, J., Amiel, E., DeBerardinis, R. J., Cross, J. R., Jung, E., Thompson, C. B., Jones, R. G., ve Pearce, E. J. (2010). Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*, 115(23), 4742–4749.
- Ladeby, R., Wrenfeldt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I., ve Finsen, B. (2005). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain research. Brain research reviews*, 48(2), 196–206.
- Lam, D., Lively, S., & Schlichter, L. C. (2017). Responses of rat and mouse primary microglia to pro- and anti-inflammatory stimuli: molecular profiles, K⁺ channels and migration. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 1-30.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., ve Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1), 151–170.
- Lee, S. H., Choi, M. R., Chung, J., Choi, S. H., Park, S. K., ve Kim, Y. M. (2022). Povidone iodine suppresses LPS-induced inflammation by inhibiting TLR4/MyD88 formation in airway epithelial cells. *Scientific reports*, 12(1), 3681.
- Lehnardt, S., Lachance, C., Patrizi, S., Lefebvre, S., Follett, P. L., Jensen, F. E., ... & Vartanian, T. (2002). The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *Journal of Neuroscience*, 22(7), 2478-2486.

- Lehrman, E. K., Wilton, D. K., Litvina, E. Y., Welsh, C. A., Chang, S. T., Frouin, A., Walker, A. J., Heller, M. D., Umemori, H., Chen, C., & Stevens, B. (2018). CD47 Protects Synapses from Excess Microglia-Mediated Pruning during Development. *Neuron*, 100(1), 120–134.e6.
- Liddelw, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487.
- Liesz A, Zhou W, Mracsko E, et al. Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain*. 2011;134:704–720.
- Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*. 2009;64:110–122.
- Lysakova-Devine, T., Keogh, B., Harrington, B., Nagpal, K., Halle, A., Golenbock, D. T., Monie, T., ve Bowie, A. G. (2010). Viral inhibitory peptide of TLR4, a peptide derived from vaccinia protein A46, specifically inhibits TLR4 by directly targeting MyD88 adaptor-like and TRIF-related adaptor molecule. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 185(7), 4261–4271.
- Lyu Y.L., Wang J.C. Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase II β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100:7123–7128.
- MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*, 15, 323.
- Maher FO, Nolan Y, Lynch MA. Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. *Neurobiol Aging*. 2005;26:717–728.
- Mantovani, A., & Sica, A. (2013). Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Advances in immunology*, 120, 163-184.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25(12), 677-686.
- Marín-Teva, J. L., Cuadros, M. A., Martín-Oliva, D., & Navascués, J. (2011). Microglia and neuronal cell death. *Neuron glia biology*, 7(1), 25-40.

- Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L. R., & Ramos-Enriquez, R. (2009). Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress?. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 158-178.
- Mass, E., Jacome-Galarza, C. E., Blank, T., Lazarov, T., Durham, B. H., Ozkaya, N., Pastore, A., Schwabenland, M., Chung, Y. R., Rosenblum, M. K., Prinz, M., Abdel-Wahab, O., ve Geissmann, F. (2017). A somatic mutation in erythro-myeloid progenitors causes neurodegenerative disease. *Nature*, 549(7672), 389–393.
- Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., Böttcher, C., Amann, L., Sagar, Scheiwe, C., Nessler, S., Kunz, P., van Loo, G., Coenen, V. A., Reinacher, P. C., Michel, A., Sure, U., Gold, R., Grün, D., Priller, J., Stadelmann, C., ve Prinz, M. (2019). Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature*, 566(7744), 388–392.
- Matcovitch-Natan, O., Winter, D. R., Giladi, A., Vargas Aguilar, S., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H., David, E., Zelada González, F., Perrin, P., Keren-Shaul, H., Gury, M., Lara-Astaiso, D., Thaïss, C. A., Cohen, M., Bahar Halpern, K., Baruch, K., Deczkowska, A., Lorenzo-Vivas, E., Itzkovitz, S., ... Amit, I. (2016). Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6301), aad8670
- McEwen BS. The Brain on Stress: Toward an Integrative Approach to Brain, Body and Behavior. *Perspectives on psychological science : a journal of the Association for Psychological Science*. 2013;8:673–675.
- McPherson, K. E., Kerr, S., McGee, E., Morgan, A., Cheater, F. M., McLean, J., ve Egan, J. (2014). The association between social capital and mental health and behavioural problems in children and adolescents: an integrative systematic review. *BMC psychology*, 2(1), 7.
- Michelucci, A., Heurtaux, T., Grandbarbe, L., Morga, E., & Heuschling, P. (2009). Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β . *Journal of neuroimmunology*, 210(1-2), 3-12.
- Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of aging*, 26(3), 349-354.
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews immunology*, 11(11), 723-737.

- Ni, J. D., Gurav, A. S., Liu, W., Ogunmowo, T. H., Hackbart, H., Elsheikh, A., Verdegaal, A. A., & Montell, C. (2019). Differential regulation of the *Drosophila* sleep homeostat by circadian and arousal inputs. *eLife*, 8, e40487.
- Nitiss JL (2009) DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions, *Nat. Rev. Cancer* 9, 327–337.
- Norden, D. M., ve Godbout, J. P. (2013). Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathology and applied neurobiology*, 39(1), 19–34.
- Novak, M. L., & Koh, T. J. (2013). Macrophage phenotypes during tissue repair. *Journal of leukocyte biology*, 93(6), 875-881.
- Nur-E-Kamal A., Meiners S., Ahmed I., Azarova A., Lin C., Lyu Y.L., Liu L.F. Role of DNA topoisomerase II β in neurite outgrowth. *Brain Res.* 2007;1154:50–60.
- Oosterhof, N., Chang, I. J., Karimiani, E. G., Kuil, L. E., Jensen, D. M., Daza, R., Young, E., Astle, L., van der Linde, H. C., Shivaram, G. M., Demmers, J., Latimer, C. S., Keene, C. D., Loter, E., Maroofian, R., van Ham, T. J., Hevner, R. F., ve Bennett, J. T. (2019). Homozygous Mutations in CSF1R Cause a Pediatric-Onset Leukoencephalopathy and Can Result in Congenital Absence of Microglia. *American journal of human genetics*, 104(5), 936–947.
- Ortega-Gómez, A., Perretti, M., & Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO molecular medicine*, 5(5), 661-674.
- Ota A, Ikeda T, Xia XY, Xia YX, Ikenoue T. Hypoxic-ischemic tolerance induced by hyperthermic pretreatment in newborn rats. *J Soc Gynecol Investig.* 2000;7:102–105.
- Pendleton M, Lindsey RH Jr., Felix CA, Grimwade D, and Osheroff N (2014) Topoisomerase II and leukemia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1310, 98–110.
- Pendleton, M., Lindsey, R. H., Jr, Felix, C. A., Grimwade, D., ve Osheroff, N. (2014). Topoisomerase II and leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1310(1), 98–110.
- Pommier Y, Leo E, Zhang H, and Marchand C (2010) DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs, *Chem. Biol* 17, 421–433.
- Prinz, M., ve Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(5), 300–312.

- Ransohoff, R. M., ve Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation*, 122(4), 1164–1171.
- Rimaniol AC, Haik S, Martin M, Le Grand R, Boussin FD, Dereuddre-Bosquet N, Gras G, Dormont D. Na⁺-dependent high-affinity glutamate transport in macrophages. *J Immunol*. 2000;164:5430–5438.
- Rodríguez-Prados, J. C., Través, P. G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., ... & Boscá, L. (2010). Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *The Journal of Immunology*, 185(1), 605-614.
- Russo, M. V., ve McGavern, D. B. (2015). Immune Surveillance of the CNS following Infection and Injury. *Trends in immunology*, 36(10), 637–650.
- Salter MW, Beggs S. Sublime Microglia: Expanding Roles for the Guardians of the CNS. *Cell*. 2014;158:15–24.
- Sano, K., Mishima, K., Koushi, E., Orito, K., Egashira, N., Irie, K., ... & Fujiwara, M. (2008). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-induced catalepsy-like immobilization is mediated by decreased 5-HT neurotransmission in the nucleus accumbens due to the action of glutamate-containing neurons. *Neuroscience*, 151(2), 320-328.
- Schafer DP, Stevens B. Phagocytic glial cells: sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 2013;23:1034–1040.
- Schafer, D. P., Heller, C. T., Gunner, G., Heller, M., Gordon, C., Hammond, T., Wolf, Y., Jung, S., ve Stevens, B. (2016). Microglia contribute to circuit defects in *Mecp2* null mice independent of microglia-specific loss of *Mecp2* expression. *eLife*, 5, e15224.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., ve Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74(4), 691–705.
- Schonberg DL, Popovich PG, McTigue DM. Oligodendrocyte generation is differentially influenced by toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4-mediated intraspinal macrophage activation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66:1124–1135.
- Schuitmaker A, van der Doef TF, Boellaard R, et al. Microglial activation in healthy aging. *Neurobiol Aging*. 2012;33:1067–1072.

- Sebire, G., Emilie, D., Wallon, C., Hery, C., Devergne, O., Delfraissy, J. F., ... & Tardieu, M. (1993). In vitro production of IL-6, IL-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha by human embryonic microglial and neural cells. *The Journal of Immunology*, 150(4), 1517-1523.
- Shaw, K. N., Commins, S., ve O'Mara, S. M. (2001). Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. *Behavioural brain research*, 124(1), 47–54.
- Shechter, R., Miller, O., Yovel, G., Rosenzweig, N., London, A., Ruckh, J., Kim, K. W., Klein, E., Kalchenko, V., Bendel, P., Lira, S. A., Jung, S., ve Schwartz, M. (2013). Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity*, 38(3), 555–569.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006;42:717–727.
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Tsirka, S. E., ve Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell*, 7(4), 483–495.
- Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A. C., McEwen, B. S., & Bulloch, K. (2007). Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia*, 55(4), 412-424.
- Silvin, A., & Ginhoux, F. (2018). Microglia heterogeneity along a spatio-temporal axis: more questions than answers. *Glia*, 66(10), 2045-2057.
- Sims, R., van der Lee, S. J., Naj, A. C., Bellenguez, C., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Kunkle, B. W., Boland, A., Raybould, R., Bis, J. C., Martin, E. R., Grenier-Boley, B., Heilmann-Heimbach, S., Chouraki, V., Kuzma, A. B., Sleegers, K., Vronskaya, M., Ruiz, A., Graham, R. R., Olosa, R., ... Schellenberg, G. D. (2017). Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 49(9), 1373–1384.
- Sipe, G. O., Lowery, R. L., Tremblay, M. È., Kelly, E. A., Lamantia, C. E., ve Majewska, A. K. (2016). Microglial P2Y12 is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nature communications*, 7, 10905.

- Song, J., Qiao, Y., Kong, Y., Ruan, Z., Huang, J., Song, T., Zhang, J., ve Xie, X. (2015). Frequent topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* species. *Journal of medical microbiology*, 64(11), 1315–1320.
- Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F., ve Garel, S. (2014). Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. *Cell reports*, 8(5), 1271–1279.
- Stein, R. C., Joseph, A. E. A., Matlin, S. A., Cunningham, D. C., Ford, H. T., & Coombes, R. C. (1992). A preliminary clinical study of gossypol in advanced human cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 30(6), 480-482.
- Stence, N., Waite, M., ve Dailey, M. E. (2001). Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 33(3), 256–266.
- Takahashi, K., Rochford, C. D., ve Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *The Journal of experimental medicine*, 201(4), 647–657.
- Terzioglu-Usak, S., Negis, Y., S Karabulut, D., Zaim, M., & Isik, S. (2017). Cellular model of Alzheimer's disease: A β 1-42 peptide induces amyloid deposition and a decrease in topoisomerase II β and Nurr1 expression. *Current Alzheimer Research*, 14(6), 636-644.
- Tiwari V.K., Burger L., Nikolettou V., Deogracias R., Thakurela S., Wirbelauer C., Kaut J., Terranova R., Hoerner L., Mielke C., et al. Target genes of Topoisomerase II β regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109:E934–E943.
- Torres-Platas, S. G., Cruceanu, C., Chen, G. G., Turecki, G., ve Mechawar, N. (2014). Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain, behavior, and immunity*, 42, 50–59.
- Tremblay, M. S., Colley, R. C., Saunders, T. J., Healy, G. N., ve Owen, N. (2010). Physiological and health implications of a sedentary lifestyle. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 35(6), 725–740.
- Tsutsui K., Okada S., Watanabe M., Shohmori T., Seki S., Inoue Y. Molecular cloning of partial cDNAs for rat DNA topoisomerase II isoforms and their differential expression in brain development. *J. Biol. Chem.* 1993;268:19076–19083.

- Tsutsui, K., Tsutsui, K., Sano, K., Kikuchi, A., & Tokunaga, A. (2001). Involvement of DNA topoisomerase II β in neuronal differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5769–5778.
- Tynan RJ, Naicker S, Hinwood M, Nalivaiko E, Buller KM, Pow DV, Day TA, Walker FR. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun*. 2010b;24:1058–1068.
- Tynan, R., Lanigan, S., & O'Connor, J. J. (2016). The effects of hypoxia and inflammation on synaptic signaling in the CNS. *Brain sciences*, 6(1), 6.
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., veyamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature neuroscience*, 16(5), 543–551.
- Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J. I., Zhang, L., Smith, K. L., Morel, C. R., ... & Chawla, A. (2006). Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell metabolism*, 4(1), 13–24.
- Villalta, S. A., Nguyen, H. X., Deng, B., Gotoh, T., ve Tidball, J. G. (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Human molecular genetics*, 18(3), 482–496.
- Villalta, S. A., Nguyen, H. X., Deng, B., Gotoh, T., ve Tidball, J. G. (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Human molecular genetics*, 18(3), 482–496.
- Wake, H., Moorhouse, A. J., & Nabekura, J. (2011). Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron glia biology*, 7(1), 47–53.
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Miyamoto, A., ve Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends in neurosciences*, 36(4), 209–217.
- Walter S, Letiembre M, Liu Y, et al. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20:947–956.
- Wang J. C. (1996). DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry*, 65, 635–692.
- Wang J. C. (1998). Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quarterly reviews of biophysics*, 31(2), 107–144.

- Wang J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(6), 430–440.
- Wang, A., Kurdistan, S. K., ve Grunstein, M. (2002). Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5597), 1412–1414.
- Wendeln, A. C., Degenhardt, K., Kaurani, L., Gertig, M., Ulas, T., Jain, G., Wagner, J., Häsler, L. M., Wild, K., Skodras, A., Blank, T., Staszewski, O., Datta, M., Centeno, T. P., Capece, V., Islam, M. R., Kerimoglu, C., Staufienbiel, M., Schultze, J. L., Beyer, M., ... Neher, J. J. (2018). Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature*, 556(7701), 332–338.
- West, D. W., Burd, N. A., Coffey, V. G., Baker, S. K., Burke, L. M., Hawley, J. A., Moore, D. R., Stellingwerff, T., ve Phillips, S. M. (2011). Rapid aminoacidemia enhances myofibrillar protein synthesis and anabolic intramuscular signaling responses after resistance exercise. *The American journal of clinical nutrition*, 94(3), 795–803.
- Wlodarczyk, A., Holtman, I. R., Krueger, M., Yoge, N., Bruttger, J., Khoroshi, R., Benmamar-Badel, A., de Boer-Bergsma, J. J., Martin, N. A., Karram, K., Kramer, I., Boddeke, E. W., Waisman, A., Eggen, B. J., ve Owens, T. (2017). A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. *The EMBO journal*, 36(22), 3292–3308.
- Wohleb ES, Fenn AM, Pacenta AM, Powell ND, Sheridan JF, Godbout JP. Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2012, 37:1491–1505.
- Wohleb ES, Fenn AM, Pacenta AM, Powell ND, Sheridan JF, Godbout JP. Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2012, 37:1491–1505.
- Wohleb ES, Hanke ML, Corona AW, Powell ND, Stiner LM, Bailey MT, Nelson RJ, Godbout JP, Sheridan JF. beta-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci*. 2011; 31: 6277–6288.
- Wohleb ES, McKim DB, Shea DT, Powell ND, Tarr AJ, Sheridan JF, Godbout JP. Re-establishment of anxiety in stress-sensitized mice is caused by monocyte trafficking from the spleen to the brain. *Biol Psychiatry*. 2014, 37:1491–1505.

- Wohleb ES, Powell ND, Godbout JP, Sheridan JF. Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *J Neurosci*. 2013; 33: 13820–13833.
- Wohleb ES, Powell ND, Godbout JP, Sheridan JF. Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *J Neurosci*. 2013; 33: 13820–13833.
- Wynn, T. A., Chawla, A., ve Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), 445–455.
- Yang, Y. R., & Lam, S. S. (2000, November). General AIMD congestion control. In *Proceedings 2000 International Conference on Network Protocols* (pp. 187-198).
- Ye, S. M., & Johnson, R. W. (2001). An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. *Neuroimmunomodulation*, 9(4), 183-192.
- Youm YH, Grant RW, McCabe LR, et al. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell metabolism*. 2013;18:519–532.
- Yu, Y., Liu, J., Feng, N., Song, B., ve Zheng, Z. (2017). Combining sequence and Gene Ontology for protein module detection in the Weighted Network. *Journal of theoretical biology*, 412, 107–112.
- Zaim M., Isik S. DNA topoisomerase II β stimulates neurite outgrowth in neural differentiated human mesenchymal stem cells through regulation of Rho-GTPases (RhoA/Rock2 pathway) and Nurr1 expression. *Stem Cell Res. Ther.* 2018;9:114. doi: 10.1186/s13287-018-0859-4.
- Zhang B, Bailey WM, Kopper TJ, Orr MB, Feola DJ, Gensel JC. Azithromycin drives alternative macrophage activation and improves recovery and tissue sparing in contusion spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2015b;12:218.
- Zhou, Y., Wang, R., Li, L., Xia, X., ve Sun, Z. (2006). Inferring functional linkages between proteins from evolutionary scenarios. *Journal of molecular biology*, 359(4), 1150–1159.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci*. 2006;9:268–275.