



T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DNA TOPOİZOMERAZ IIB’NIN LPS İLE İNDÜKLENMİŞ HMC3
HÜCRELERİNDE NÖROİNFLAMASYONA ETKİSİ**

Rümeysa AKBAYIR

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

İSTANBUL-2022

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DNA TOPOİZOMERAZ IIB’NIN LPS İLE İNDÜKLENMİŞ HMC3
HÜCRELERİNDE NÖROİNFLAMASYONA ETKİSİ**

Rümeysa AKBAYIR

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sevim IŞIK

İSTANBUL-2022

ÖZET

DNA TOPOİZOMERAZ IIB'NİN LPS İLE İNDÜKLENMİŞ HMC3 HÜCRELERİNDE NÖROİNFLAMASYONA ETKİSİ

Tip II topoizomerazların bir izoformu olan DNA topoizomeraz Iİβ (topo Iİβ), gelişmekte olan beynin post-mitotik nöronal hücrelerinde bol miktarda ifade edilir. Topo Iİβ aktivitesinin, nörit büyümesi ve akson rehberliği gibi kritik nöral farklılaşma olaylarında rol aldığı bilinmektedir.

Topo Iİβ'nın nörodejenerasyon ile ilişkisi kanıtlanmıştır fakat nörodejenerasyon nöroinflamasyon ilişkisi hala aydınlatılması gereken bir alandır. Topo Iİβ'nın nöroinflamasyon ile ilişkisi ilk olarak topo Iİβ susturulmuş ve nöral indüklenmiş mezenkimal kök hücrelerin mikroarray analizinde nöroinflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonun artması ile iddia edilmiştir.

Bu çalışmada topo Iİβ'nın aşırı ifade edildiği insan mikroglia kolon 3 (HMC3) hücrelerinde Lipopolisakkarit (LPS) ve interferon gamma (IFNγ) ile mikroglia aracılı nöroinflamasyon modeli oluşturularak topo Iİβ ve nöroinflamasyon ilişkisinin aydınlatılması yolunda öncül data oluşturulması amaçlandı.

LPS ve IFNγ ile oluşturulan modelde akış sitometrisi aracılığıyla mikrogliaların M1 ve M2 polarizasyon durumu karşılaştırıldı ve sonuç olarak topo Iİβ'nın aşırı ifade edilmesi durumunda aktif mikroglia fenotipleri ile ilişkili belirteçlerin ifadesinin değiştiği görülmüştür. Ulaşılan bu sonuçlar öncül data olarak ele alınıp mekanizmanın daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA Topoizomeraz Iİβ, HMC3, Mikroglia, Nörodejenerasyon, Nöroinflamasyon

ABSTRACT

EFFECT OF DNA TOPOISOMERASE II β ON NEUROINFLAMMATION IN LPS-INDUCED HMC3 CELLS

DNA Topoisomerase II β (topo II β), an isoform of type II topoisomerases, is abundantly expressed in post-mitotic neuronal cells of the developing brain. Topo II β activity is known to be involved in critical neural differentiation events such as neurite outgrowth and axon guidance.

The relationship of topo II β with neurodegeneration has been proven, but the relationship between neurodegeneration and neuroinflammation is still an area that needs to be clarified. The association of topo II β with neuroinflammation was first suggested by increased expression of neuroinflammation-related genes in microarray analysis of topo II β silenced and neural-induced mesenchymal stem cells.

In this study, it was aimed to create preliminary data for elucidating the relationship between topo II β and neuroinflammation by creating a microglia-mediated neuroinflammation model with Lipopolysaccharide (LPS) and Interferon gamma (IFN γ) in Human microglia colon 3 (HMC3) cells where topo II β is overexpressed.

In the model created with LPS and IFN γ , the M1 and M2 polarization status of microglia were compared by means of flow cytometry, and as a result, it was observed that the expression of markers associated with active microglia phenotypes changed when topo II β was overexpressed. These results should be considered preliminary data and the mechanism should be investigated in further studies.

Keywords: DNA Topoisomerase II β , HMC3, Microglia, Neurodegeneration, Neuroinflammation

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca her anımda desteklerini esirgemeyen öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışmanım sevgili Prof. Dr. Sevim IŞIK hocama desteği, güveni ve rehberliği için çok teşekkür ederim. Her zaman bilime olan katkılarını ve bilim anlayışını örnek alacağım kıymetli hocama sonsuz saygılarımı sunarım.

Bu yolda engin tecrübeleri ile bana yol gösteren Dr. Cihan TAŞTAN, Doç. Dr. Yeşim NEĞİŞ ve Doç. Dr. Timuçin AVŞAR hocalarıma ve eğitim hayatım boyunca bana katkıları olan tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

ÜSKÖKMER’ de çalışmalarım boyunca sabırla ve büyük bir özveri ile bana öğreten laboratuvar sorumlumuz Berçem Yeman KIYAK hocama, ÜSKÖKMER laboratuvar arkadaşlarıma ve TRGENMER laboratuvarındaki arkadaşlarıma sevgiyle teşekkür ederim.

Her zaman varlığı ile bana destek olan sevgili laboratuvar arkadaşım Tahire ARPACI’ ya dostluğumuz ve bana olan katkıları için ayrıca teşekkür etmek istiyorum.

Son olarak beni hep maddi ve manevi destekleyen bugün olduğum kişi olmamı sağlayan sevgili aileme; babam Yüksel Akbayır, annem Naciye AKBAYIR ve sevgili kardeşlerim Abdülaziz, Abdulkadir ve Sümeyye AKBAYIR’a her şey için teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

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 řkdar niversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim

21.08.2022

Rümeysa AKBAYIR

İmzası

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR	III
BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. DNA Topoizomerazlar	3
2.1.1. Tip 2 DNA Topoizomerazlar	3
2.1.2. Topoizomeraz IIβ.....	5
2.2. Nöroinflamasyon	7
2.3. Mikroglia	9
2.4. HMC3 hücre hattı	14
2.5. Nöroinflamasyon Modeli.....	15
2.6. Amaç	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. HMC3 Hücre Hattının Kültürü	18
3.1.1. HMC3 Hücre Hattının Temin edilmesi	18
3.1.2. HMC3 Hücre Hattının Dondurulması ve Çözülmesi.....	18
3.1.3. HMC3 Hücre Kültürü Şartları Optimizasyonu	19
3.1.4. HMC3 Hücre Kültürü	19
3.2. Topo IIB Plazmid İzolasyonu ve Teyidi.....	20

3.2.1. Sıvı luria broth (LB) besiyerinin ve LB agarın hazırlanması	20
3.2.1. Topo IIβ Plazmit Kesimi.....	21
3.3. HMC3 Hücre Hattında Topo IIβ Geninin Aşırı İfade Edilmesi	22
3.3.1. PEI Transfeksiyonu.....	22
3.3.2. Lipofectamine LTX Transfeksiyonu	22
3.3.3. NEON Transfeksiyon	22
3.3.4. 4D Nucleofector™ System (Lonza)	23
3.3.5. Lipofectamine 3000 ile Transfeksiyon	23
3.4. HMC3 Hücre Hattında Topo IIβ Aşırı İfade Eden Hücrelerin Ayrıştırılması	23
3.5. <i>İn vitro</i> Nöroinflamasyon modeli oluşturma optimizasyonları.....	24
3.5.1. LPS.....	24
3.5.2. IFN γ	24
3.5.3. ATP.....	24
3.5.4. HMC3 Hücre Hattına LPS, IFN- γ , ATP Uygulama	25
3.6. İnflamasyon Belirteçlerinin İmmüno Floresan Boyama ile Gösterimi.....	25
3.7. İnflamasyon Belirteçlerinin Akış Sitometrisi ile Analizi	26
3.7.1. Hücrelerin akış sitometri için hazırlanması	26
3.7.1.1. Hücre Yüzeyi/Yüzey Markerı Boyama	26
3.7.1.2. Hücre içi boyama	27
3.7.2. Akış Sitometrisi ile Analiz Edilmesi	28
3.7. Deney Gruplarının Tasarlanması	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. HMC3 Hücre Hattının Kültürü	30
4.2. Topo IIB Plazmid İzolasyonu ve Teyiti.....	31
4.3. HMC3 Hücre Hattında Topo IIβ Geninin Aşırı İfade Edilmesi	33
4.3.1. PEI Transfeksiyonu.....	33
4.3.2. Lipofectamine LTX Transfeksiyonu	34

4.3.3. NEON Transfeksiyon	34
4.3.4. 4D Nucleofector™ system (Lonza)	36
4.3.5. Lipofectamine 3000 ile Transfeksiyon	38
4.4. Topo IIβ Aşırı İfade Eden Hücrelerin Ayırıştırılması.....	38
4.4. <i>In vitro</i> Nöroinflamasyon modeli oluşturma optimizasyonları.....	40
4.4.1. LPS Sitotoksitesi Analizi	40
4.4.2. LPS uygulamaları ve İnflamasyon Belirteçlerinin Akış Sitometrisi ile Analizi...	40
4.4.3. LPS ve IFN-γ uygulamaları ve İnflamasyon Belirteçlerinin Akış Sitometrisi ile Analizi.....	43
4.4.4. IFN-gamma uygulamaları ve İnflamasyon Belirteçlerinin Akış Sitometrisi ile Analiz.....	45
4.4.2. LPS ve IFN-gamma uygulamaları ve İnflamasyon Belirteçlerinin İmmün Boyama ile Analizi.....	53
4.4.2. Deney gruplarına LPS, IFN-γ uygulanması ve İnflamasyon Belirteçlerinin Akış Sitometrisi ile Analizi	55
5.TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Sıvı luria broth (LB) besiyerinin hazırlanması.....	20
Tablo 2: LB agarın hazırlanması	20
Tablo 3: Enzim Kesim Kombinasyonu 1:.....	21
Tablo 4: Enzim Kesim Kombinasyonu 2:.....	21
Tablo 5: Neon Transfeksiyon ile denenen elektroporasyon protokolleri	22
Tablo 6: Deney gruplarına günlere göre yapılan uygulama planı	29



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1: Tip 2 topoizomerazların çalışma prensibi (Wang JC., 2002).....	4
Şekil 2 : Ökaryotik Topo II, 2 izoform halinde bulunur: SDS-PAGE jellerinde α (170-kDa) ve β (180-kDa) (Fred Drake ve ark., 1987).	4
Şekil 3: İnsan topo II β 'nin domainlerinin şematik gösterimi.N-Terminal ATPaz alanı kırmızı, Merkezi çekirdek kırılma-birleşme alanı yeşil ve C-terminal alanı mavi ile gösterilmiştir (Austin ve ark., 2018).	5
Şekil 4: Nöroinflamasyonun olumlu ve olumsuz yönleri (DiSabato ve ark., 2016) orijinal görselden Türkçeleştirilmiştir.	9
Şekil 5: Aktifleşen mikroglialının kemotaksis yoluyla göç edebilmesi için yaptığı morfolojik değişimler (Stence ve ark., 2001).	11
Şekil 6: Aktif mikroglialının iki farklı polarize hali olan M1 ve M2 fenotiplerinin gösterimi (Jurga ve ark., 2020). (Orijinal görselden Türkçeleştirilmiştir).....	13
Şekil 7: HMC3 hücrelerinin ATCC tarafından yayınlanan hücre morfolojisini gösteren kültür görüntüsü.....	15
Şekil 8: LPS aracılı Nöroinflamasyonun başlatılmasının şematik gösterimi (Mazgaen ve Gurung, 2020)	16
Şekil 9: M1, M2 mikroglia analizleri görseldeki gibi yapılacaktır.	28
Şekil 10: HMC3 hücre hattının kültür şartlarında 10x ve 40x objektif altında (Zeiss, Zen 3.3) morfolojileri, A) yoğun B) seyrek ekilmiş 10X görüntüleri, C) 40X objektifte alınmış görüntüler.....	31
Şekil 11: pEGFP-N1 (4.7 kb) vektörünün haritası	32
Şekil 12: Farklı restriksiyon enzim kombinasyonları ile TOP2B Plazmit DNA'nın kesimi M:Marker 1: TOP2B plazmiti, 2: XhoI+SmaI, 3:XhoI+BamHI	33
Şekil 13: PEI ile kimyasal transfeksiyon yapılan HMC3 hücrelerinin faz ve floresan görüntüleri Transfeksiyon verimi %3 olarak belirlendi. (Görüntüler 10X objektif altında çekildi.)	33
Şekil 14: Lipofectamine LTX 2 μ l (üst) ve 3 μ l (alt) μ l oranlarıyla kimyasal transfeksiyon yapılan HMC3 hücrelerinin faz ve floresan görüntüleri (görüntüler 10X objektif altında çekildi.)	34
Şekil 15: Protokol 3 ile yapılan kontrol plazmit(A) ve pEGFP-Topo II β plazmid (B) transfeksiyonu (görüntüler 10X objektif altında çekildi.).....	35

Şekil 16: HEPG programı ile yapılan pmaxGFP plazmit (üst) ve pEGFP-Topo IIβ plazmid (alt) transfeksiyonu (görüntüler 10X objektif altında çekildi.	37
Şekil 17: Lipofectamine 3000 reaktifi ile transfekte edilen hücrelerin faz ve floresan görüntüleri. Görüntüler 10X objektifte çekilmiştir.....	38
Şekil 18: BD Influx™ Cell Sorter cihazı ile ayrıştırılan HMC3 hücrelerinin kapı ayarı ve istatistik bilgileri	39
Şekil 19: BD Influx™ Cell Sorter cihazı ile ayrıştırılan HMC3 hücrelerinin faz ve floresan görüntüleri, görüntüler 10X objektif ile çekilmiştir.....	39
Şekil 20: Farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat uygulanan LPS'nin hücre canlılığına etkisi. 0.01 µg/ml, 0.05 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.75 µg/ml, 1 µg/ml ve 2 µg/ml oranlardaki lipopolisakkarit konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulandıktan sonra MMT analizi ile yapılan hücre canlılığı ölçümleri.....	40
Şekil 21: Literatürde en yaygın kullanılan LPS konsantrasyonları olan 0,1 µg/ml ve 1 µg/ml LPS konsantrasyonların 24 ve 48 saatlik uygulamalarının akış sitometrisi ile analizi	41
Şekil 22: 0.1 µg/ml; 0.5 µg/ml; 1 µg/ml; 2.5 µg/ml; 5 µg/ml konsantrasyonlarda LPS ile 48saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206 ve CD86 yüzey markerları ile boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri (A) ve sütun grafiği gösterimi(B).43	43
Şekil 23: 1 µg/ml LPS + 25 ng/ml IFN _γ , 1 µg/ml LPS + 50 ng/ml IFN _γ konsantrasyonlarda LPS ve IFN _γ birlikte 24 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206 ve CD86 yüzey markerları ile boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri (A) ve sütun grafiği gösterimi (B).	44
Şekil 24: 1 µg/ml LPS + 25 ng/ml IFN _γ , 1 µg/ml LPS + 50 ng/ml IFN _γ konsantrasyonlarda LPS ve IFN _γ birlikte 48 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206 ve CD86 yüzey markerları ile boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri (A) ve sütun grafiği gösterimi (B).	45
Şekil 25: 10 ng/ml IFN _γ , 50 ng/ml IFN _γ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206, CD86, CD45, CD11b ve iNOS ile boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri (A) ve sütun grafiği gösterimi (B).	47
Şekil 26: LPS, IFN _γ , ATP konsantrasyonları ve kombinasyonları ile 24 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206, CD86, CD45 ve CD11b boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri (A, B) ve sütun grafiği gösterimi (C).....	49

Şekil 27: LPS, IFN γ , ATP konsantrasyonları ve kombinasyonları ile 48 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206, CD86, CD45 ve CD11b boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri ve sütun grafiği gösterimi.	51
Şekil 28: LPS, IFN γ , ATP konsantrasyonları ve kombinasyonları ile 48 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206, CD86, CD45 ve CD11b boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri ve sütun grafiği gösterimi. Bu analiz her parametrenin ikili çalışılması ve ikili okutulması ile yapılmıştır.....	53
Şekil 29: LPS ve IFN γ 'nın farklı konsantrasyonları ile 2 4 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin iNOS ile boyanması ile yapılan immün boyama görüntüleri, görüntüler 20X objektif ile alındı.	54
Şekil 30: LPS, IFN γ , konsantrasyonları ve kombinasyonları ile 24 saat muamele edilmiş kontrol ve Topo II β + HMC3 hücrelerinin CD16, CD206, CD86, CD45, CD11b ve iNOS boyamasıyla yapılan Akış sitometrisi analizleri (A, B) ve sütun grafiği gösterimi (C). 57	
Şekil 31: HMC3 hücrelerinde topo II β ekspresyonunun SH-SY5Y hücrelerine kıyasla düşüklüğünü gösteren western blot sonucu	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH: Alzheimer Hastalığı

ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz

A β : Amiloid beta

ATCC® : American Type Culture Collection

ATP : Adenozin trifosfat

CD: (Cluster of Differentiation) Farklılaşma Kümesi

CGNs : Serebellar Granül Nöronları

CNs : Kortikal Nöronlar

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

DRGs : Dorsal kök gangliyonlar

EGFP : (Enhanced Green Fluorescence Protein) Geliştirilmiş Yeşil Floresan Protein

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting

FBS : Fetal Bovine Serum

FD : Frontotemporal Demans

FSC-A : Forward Scatter Area

FSC-H : Forward Scatter Height

GFAP : Glial Fibriler Asidik Protein

HMC3 : insan mikrogial 3. klonu

IBA 1: Allograft İnflammatory Faktör 1

IFN γ : Interferon Gamma

IL : İnterlökin

iNOS : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

LB : luria broth

LCD : Lewy Cisimcikli Demans

LPS : Lipopolisakkarit

M1 : Mikroglia Fenotip I

M2 : Mikroglia Fenotip II

MHCI : Majör Histokompatibilite Kompleksi I

MHCII : Majör Histokompatibilite Kompleksi II

MINT : Microglia-İnduced Neurotoxicity

MKH : Mezenkimal Kök Hücre

MS : Multiple Skleroz

MSS : Merkezi Sinir Sistemi

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

NGS : Normal Goat Serum

NHS Normal Horse Serum

NO: Nitrit Oksit

NURR 1: Nükleer Reseptör 4A2

PBS : Phosphate-buffered saline

PEI : Polyethylenimine

PH : Parkinson Hastalığı

RCF : Relative centrifugal force

ROS :Reaktif Oksijen Türleri

RPM : revolutions per minute

SDS-PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez

SH-SY5Y : Nöroblastoma Hücre Hattı

SSC-H : Side Scatter Height

SV40 : Simian Virüs 40

TLR : Toll Benzeri Reseptör Ailesi

TLR4 : Toll Benzeri Reseptör 4

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TOPII α :Topoizomeraz II alfa Geni

TOPII β :Topoizomeraz II beta Geni

TOPO I : Topoizomeraz I Gen Ailesi

TOPO II : Topoizomeraz II Gen Ailesi

Topo II β :Topoizomeraz II beta Proteinini

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artmasına paralel olarak yaşlı insan nüfusu hızlı bir biçimde artmaktadır. Yaşlanan nüfus ile birlikte nörodejeneratif hastalıkların ağır yükü de acil çözüme ulaştırılması gereken bir konu haline gelmektedir. Fakat nörodejeneratif hastalıkların karmaşık mekanizması bunu engellemektedir. Nörodejenerasyon birçok sistemle ilişkili bir patolojidir. Özellikle sinir sisteminin bağışıklık mekanizması olan nöroinflamasyon ile henüz tam olarak açıklanamayan bir ilişkisi bulunmaktadır. Var olan kanıtlar nöroinflamasyonun, bazı nörodejeneratif bozukluklarda gözlenen ortak bir özellik olan nöronal dejenerasyonun ilerlemesinde yer alan çok önemli bir süreç olduğunu göstermektedir. (Glass ve ark., 2010; Lucin ve Wyss-Coray, 2009). Nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi, semptomları ve ilerlemesi farklılıklar gösterse de nöroinflamasyon bu hastalıklarda ortak bir süreçtir. Beyin veya omurilikte oluşan enfeksiyon, travma, iskemi, yaralanma, toksinler ve protein agregasyonları gibi patolojik uyarılar glial hücreleri aktive ederek nöroinflamasyona sebep olur. Beyinde nöroinflamasyon, yüksek proinflamatuvar sitokin seviyeleri, makrofaj (mikroglia) aktivasyonu, periferik lökosit infiltrasyonu ve sinir dokusunda hasar olarak kendini gösterir (Estes ve McAllister, 2014; Woodburn ve ark., 2021).

Beyindeki yerleşik astrositlerin ve mikrogliaların aracılık ettiği aktif inflamatuvar yanıtın varlığı bir süredir bilinmektedir. Fakat bu konuda net kanıtlar McGeer ve çalışma arkadaşlarının, substantia nigra'da aktive edilmiş mikroglial hücrelerin ve infiltrasyonun varlığını tanımlaması ile gelişti (McGeer vd. 1988). Giderek artan kanıtlar, beyindeki yerleşik makrofaj benzeri bağışıklık hücreleri olan mikroglia'nın aracılık ettiği nöroinflamasyonun, Parkinson hastalığı gibi diğer nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

DNA topoizomeraaz enzim ailesi çift zincirli DNA'nın topolojik stresin giderilmesi dolayısıyla DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon, kromozom yoğunlaşması ve ayrılması, DNA tamiri gibi çeşitli hayati öneme sahip genetik süreçlerde etkin rol alır. Tip II topoizomeraazların memeli hücrelerinde iki izoformu (topo II α ve topo II β)

bulunmaktadır. Topo II α mitotik süreçlerde görev alır ve çoğalan dokularda ve bölünen hücrelerde bulunurken, topo II β ise özellikle farklılaşmış dokularda olmak üzere bütün dokularda bulunur. Topo II β 'nın beyin gelişimi, akson ve nörit gelişimi, kortikogenez ve özellikle nöron gelişimi gibi çok önemli aşamalarda aktif rolü olduğu bilinmektedir. Topo II β 'nın nöron gelişimi ve iletimi için önemli genlerin transkripsiyonu ile doğrudan bağlantısı olduğunu ve dolaylı olarak TOP2B'deki mutasyonlar veya topo II β ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin nörodejeneratif bozukluklara yol açabileceğini göstermektedir (Terzioglu-Usak ve ark., 2017). Yine aynı grubun bir diğer çalışması ile nöral farklılaşmaya indüklenmiş mezenkimal kök hücrelerde topo II β 'nın susturulması, inflamasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının anlamlı miktarda arttığı görülmüştür (Işık ve ark., 2015, Yayınlanmamış Data). Topo II β ve nöroinflamasyon ilişkisinin gösterilmesi nöroinflamasyonun kontrol edilmesi ve nöroinflamasyon ilişkili nörodejenerasyona karşı koruyucu bir strateji geliştirilmesine öncü olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DNA Topoizomerazlar

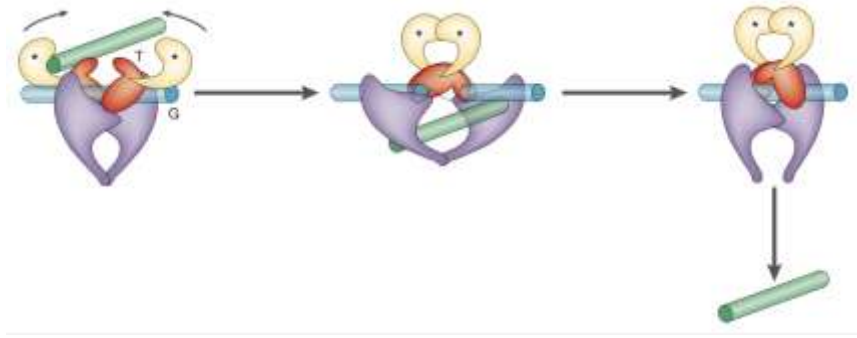
Çift zincirli DNA tersiyer yapısı nedeniyle topolojik strese eğilimlidir. Topolojik stres replikasyonu ve transkripsiyonu engelleyebilecek bir süper helikal gerilim oluşturur (Lin ve ark., 2013; Schoeffler ve Berger, 2005 ve Tsutsui ve ark., 2001a).

DNA topoizomerazlar DNA'nın primer yapısında değişiklik yapmadan kendisini fosfat omurgasına kovalent olarak ekleyip doğrudan tersiyer yapısını etki ederek DNA'nın topolojisini değiştirebilen nükleazlardır (Sano ve ark., 2008; Schoeffler ve Berger, 2005). DNA sarmalında geçici çentiklere sebep olurlar ve bu şekilde DNA sarmallarının veya çift sarmalların birbirinden geçmesini sağlarlar (Wang JC., 2002).

DNA topoizomerazların, DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon, kromozom yoğunlaşması / dekonkonsansasyonu ve kardeş kromatid ayrımı gibi çeşitli genetik işlemlerde süper katlanma problemlerinin çözülmesinde önemli rolleri vardır.

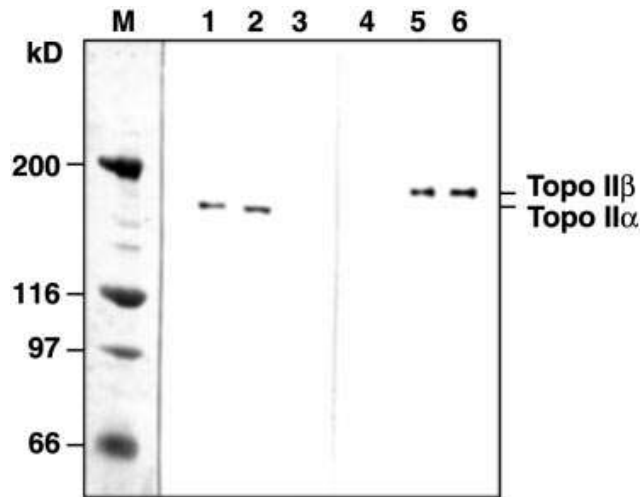
2.1.1. Tip 2 DNA Topoizomerazlar

Tip I topoizomerazlar DNA sarmalını tek zincir üzerinden kırarken, tip 2 topoizomerazlar Şekil 1'de görüldüğü üzere iki zincire de bağlanarak geçici bir kırılma yapar (Wang JC., 2002). Tip II DNA topoizomerazlar (EC 5.99.1.3), genomik DNA'daki topolojik değişiklikleri ATP bağımlı bir şekilde katalize eden nükleazlardır (Austin ve ark., 2018; Heng ve Le, 2010). Bu nükleaz aktivitesi, transkripsiyon da dahil olmak üzere bir dizi hücresel süreç için gereklidir. Tip II topoizomerazların omurgalılarda DNA topoizomeraz II α (topo II α , 170-kDa) ve DNA topoizomeraz II β (topo II β , 180-kDa) olmak üzere iki izoformu vardır (Şekil 2). Bu iki izoform farklı genlerden kodlanır fakat amino asit dizilerinde %72'lik bir benzerlik taşırlar (Austin ve ark. 1993; Tsutsui ve ark. 2001).



Şekil 1: Tip 2 topoizomerazların çalışma prensibi (Wang JC., 2002)

Bu iki izoform, N-terminal ATPaz ve merkezi çekirdek bölgeleri açısından oldukça homologdur, ancak C-terminal bakımından büyük farklılıklar gösterir. N-terminal alanı ATPaz fonksiyonuna sahiptir ve türler arasında en çok korunmuş olan bölgedir. Merkezi bölge de yüksek oranda korunmuştur ve aktif bölge DNA kırılması ve yeniden birleşme aktivitesine sahiptir. C-terminal alanı, iki izoformun hem *in vitro* hem de *in vivo* farklılaşmada rol oynayabileceğini düşündürmektedir. C-terminal alanı izoformlar arasında en az homolojiye sahip olan bölgedir ve nükleer lokalizasyon sinyallerinin ve sumolasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon, asetilasyon dahil olmak üzere birçok post translasyonel modifikasyonun yeridir.



Şekil 2 : Ökaryotik Top II, 2 izoform halinde bulunur: SDS-PAGE jellerinde α (170-kDa) ve β (180-kDa) (Fred Drake ve ark., 1987).

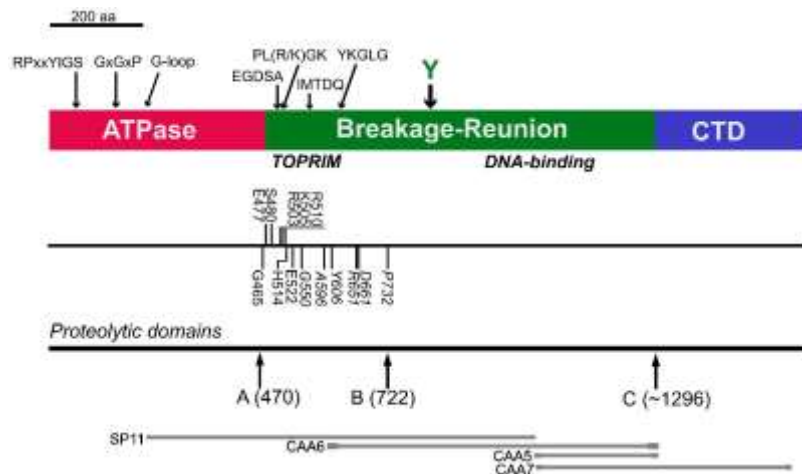
2.1.2. Topoizomeraz IIβ

İnsan TOPIIB geni 3. Kromozomun p24 kolunda bulunur ve protein dizisi 1621 aminoasitten oluşur.

Beynin farklı bölgelerindeki topo IIβ izoformunun protein ve aktivite seviyelerinde yaşa bağlı değişiklikler bildirilmiştir. Topo IIβ seviyesi tüm beyinde ve ayrıca serebellum, serebral korteks ve orta beyin dahil olmak üzere 3 spesifik bölgede analiz edilmiştir.

Topo IIβ'nın aktivitesi "Genç" sıçan beyinde en yüksek, "Yetişkin" beyinde orta ve "Yaşlı" beyinde en düşüktür. Topo IIβ'nın protein seviyesi, enzimatik aktivitesi ile iyi bir korelasyon göstermektedir; bu da topo IIβ'nın enzimatik aktivitesinin ve protein seviyesinin genç beyinde yüksek olduğunu ve bu seviyelerin yaş arttıkça azaldığını göstermektedir (Kondapi ve ark., 2004; Heng ve Le, 2010).

DNA topo IIβ'nın subselüler konumu kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Aktivitesi hücre döngüsü boyunca sabittir. Mevcut fikir birliği, interfaz sırasında topo IIβ'nın nükleerde bulunduğu, mitoz sırasında ise ağırlıklı olarak sitozolik bir konuma sahip olduğu yönündedir (Chaly ve ark., 1996; Heng ve Le, 2010). Ek olarak, embriyonik aşamada, beyindeki topo IIβ nükleoplazmik bir enzimdir. TOP2B ağırlıklı olarak nükleerdir; topo IIα ve topo IIβ'nın C-terminal alanı nükleer lokalizasyon sinyalleri içerir (şekil 3) ve her iki izoform da nükleer ihraç sinyallerine sahiptir.



Şekil 3: İnsan topo IIβ'nın domainlerinin şematik gösterimi. N-Terminal ATPaz alanı kırmızı, Merkezi çekirdek kırılma-birleşme alanı yeşil ve C-terminal alanı mavi ile gösterilmiştir (Austin ve ark., 2018).

In vitro olarak benzer katalitik özellikleri olmasına rağmen Tip II α izoformu mitotik süreçlerde çok önemlidir, sadece çoğalan dokularda ve bölünen hücrelerde ifade edilir ve temel olarak kromozom ayrımı için gereklidir. Bölünen hücrelerde G₂M fazında enzim seviyesi artar. Tip II β izoformu ise olgunlaşan beyindeki post-mitotik nöronal hücrelerde ve farklılaşmış hücrelerde artış gösterir. (Kawano ve ark., 2010; Lyu ve ark., 2006).

Benzer sonuçlar ile topo II β 'nın hücre canlılığı için elzem olmadığı canlılarda daha spesifik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir.

Tüm vücut hücrelerinde topo II β ifade edilmeyen (knock-out) farelerle yapılan deneyler sonucu perinatal ölüm gerçekleşmesi (Yang ve ark., 2000) ve sadece beyin hücrelerinde topo II β ifade edilmeyen farelerde ise beyin gelişimi esnasında kortikogenezde hasar meydana gelmesi (Lyu ve ark., 2006), topo II β 'nın beyin gelişimi ve nöral farklılaşmadaki önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca topo II β eksik (null) fare embriyolarında beyin gelişimi hariç hücre farklılaşması ve organ gelişimi normal devam etmiştir. Bundan yola çıkarak topo II β 'nın nöronal genlerin transkripsiyonuna spesifik olduğunu söyleyebiliriz (Heng, X. ve Le, W.-D. 2010). Bu konuda yapılan çalışmalarda topo II β 'nın post-mitotik nöronlarda ve hücrelerde belirli genlerin ekspresyonunu etkileyerek genetik ifadenin düzenlenmesinde çok önemli rolü olduğunu göstermiştir (Lyu ve ark., 2006).

Nörit büyümesi, akson rehberliği ve nöral göç gibi aşamalar nöral ağ oluşumu ve gelişmesinde esas noktalardır. Ayrıca akson rehberliği ve büyüme büyüme konisi tarafından kontrol edilir. Topo II β 'nın katalitik olarak engellendiği bir çalışma ile serebellar granül nöronları (CGNs), dorsal kök gangliyonları (DRGs) ve kortikal nöronlarda (CNs) nörit büyümesi ve büyüme konisi oluşumunun da önemli ölçüde engellendiği sonucuna varılmıştır (Nur-E-Kamal 2007). Topo II β 'sız farelerde nöron aksonlarının omirilik ve kaslara ulaşamadığını (Yang ve ark.2000) topo II β 'sız embriyolardan elde edilen kortikal nöronların kontrol grubuna göre daha kısa nörit oluşturduğu (Heng ve Le., 2010) görülmüştür. Benzer şekilde topo II β gen ifadesi susturulmuş Mezenkimal Kök Hücreleri (MKH)'nin yönlendirilmiş nöral farklılaşması ile elde edilen nöronların aksonlarının normalden daha kısa olduğu gösterilmiştir (Isık ve ark. 2015) Yapılan çalışmalar topo II β ifadesinin nöral ağ oluşumunun aşamalarında ne derece önemli olduğu kanıtlar niteliktedir. Tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurularak topo II β 'nın nöron gelişimi ve iletimi için önemli genlerin transkripsiyonu ile doğrudan

bağlantısı olduğunu ve dolaylı olarak TOP2B'deki mutasyonlar veya topo II β ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler nörodejeneratif bozukluklara yol açabileceğini göstermektedir (Terzioğlu-Usak ve ark., 2017).

TOP2B geni, beyin gelişimi ve nöral farklılaşmada anahtar role sahip bir genidir. Topo II β 'nın, Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneze katkıda bulunabilecek bir rolü olduğu da gösterilmiştir. Dolayısıyla, TOP2B'deki mutasyonlar veya topo II β ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin nörogelişimsel veya nörodejeneratif bozukluklara yol açabileceğini düşündürmektedir.

Tip II topoizomerazın susturulması, topo II α ve topo II β 'nin işlevini araştırmak için yararlı bir yöntem olmuştur. Veriler, topo II α devre dışı bırakıldığında topo II β 'nın kromozom yoğunlaşması sırasında topo II α 'nın işlevinin yerine geçebileceğini, ancak kromozom ayrışmasının gerçekleşmediğini göstermektedir.

TOP2B eksikliği olan farelerde, diyafram kasındaki motor nöronların kusurlu innervasyonu (Yang ve ark., 2000), serebral kortikal nöronların anormal göçü ve serebral korteksin anormal laminasyonu (Yang ve ark., 2000; Lyu ve Wang 2003) gibi nöral gelişim kusurları gözlenmektedir. Araştırmalar göstermiştir ki embriyonik kök hücre kaynaklı nöronlarda, topo II β 'nin yokluğu hücre ölümüyle sonuçlanır (Tiwari ve ark., 2012). TOP2B nakavt farelerde retinası kusurlu laminer yapı ve nörit büyümesi gösterir. Ayrıca retina kalınlığını azaltır ve daha sonra apoptotik hücre ölümünün artmasına neden olur (Li ve ark., 2014).

2.2. Nöroinflamasyon

Nöroinflamasyon immünojenik uyaranlar tarafından tetiklenir. Bağışıklık sisteminin homeostaziye yönelik tehditleri ortadan kaldırmak amacıyla verdiği tepkinin biyokimyasal basamakları ile sonuçlanır. (Leng ve Edison, 2021; Woodburn ve ark., 2021)

Çoğunlukla Beyin veya omurilikte oluşan enfeksiyon, travma, iskemi, yaralanma, toksinler ve protein agregasyonları gibi patolojik uyaranlar glial hücreleri aktive ederek nöroinflamasyon olarak adlandırılan immunolojik reaksiyonlara neden olmaktadır. Her ne kadar nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi, semptomları ve ilerlemesi farklılıklar gösterse de nöroinflamasyon bu hastalıklarda ortak bir süreçtir. Nöroinflamasyonun,

nörodejenerasyonun nedeni veya sonucu olabileceği için, nörodejeneratif hastalıklara nasıl katkıda bulunduğu hala tartışma konusudur.

Beyinde, nöroinflamasyon, yüksek proinflamatuvar sitokin seviyeleri, makrofaj (mikroglia) aktivasyonu, periferik lökosit infiltrasyonu ve sinir dokusunda hasar olarak kendini gösterir (Estes ve McAllister, 2014; Woodburn ve ark., 2021). Bu iltihaplanmaya sitokinlerin, kemokinlerin, reaktif oksijen türlerinin ve ikincil habercilerin üretimi aracılık eder. Bu araçlar, yerleşik MSS glia (mikroglia ve astrositler), endotelial hücreler ve periferik olarak türetilmiş bağışıklık hücreleri tarafından üretilir (DiSabato ve ark., 2016). Bu nöroinflamatuvar yanıtların immün, fizyolojik, biyokimyasal ve psikolojik sonuçları vardır.

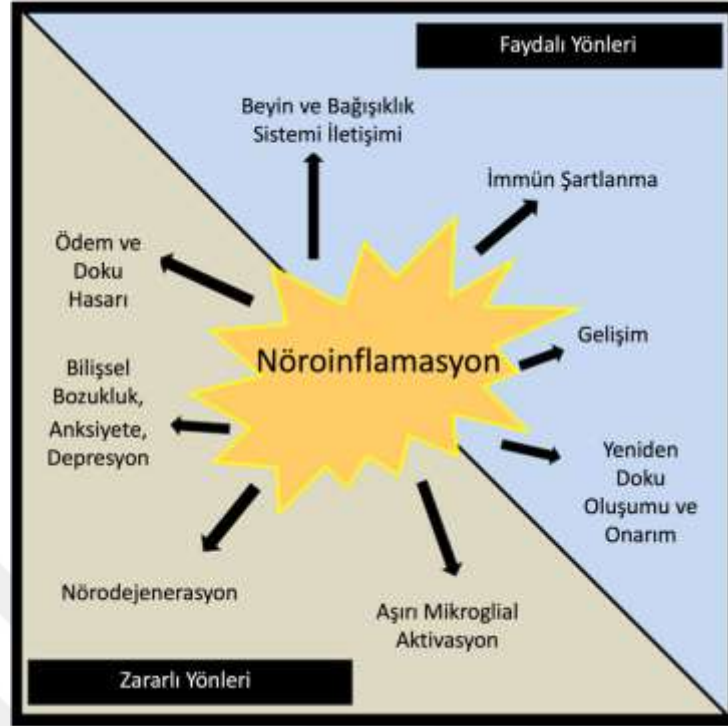
Merkezi sinir sistemi, nöronlar ve nöroglial hücrelerden oluşur. Nöroglial hücreler ayrıca astrositleri, oligodendrositleri, mikroglia ve ependimal hücreleri içerir. Özellikle mikroglia, yetişkin beynindeki glial hücre popülasyonunun yaklaşık %10-15'ini oluşturur (Nayak ve ark., 2014; Subhramanyam ve ark., 2019). Beyin parankiminde bulunurlar ve beynin yerleşik bağışıklık hücreleri olarak gösterilirler. Nöroektodermden türetilen nöronlar ve diğer nöroglial hücrelerden farklı olarak, mikroglia, embriyonik yolk kesesinden ilkel makrofajlar olarak köken alır ve dolaşım sistemi yoluyla MSS'ye katılırlar. Subhramanyam ve ark., 2019.

Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri arasında mikroglia, nöroinflamasyonda birincil oyuncular. Mikroglial aktivasyon, merkezi sinir sisteminin yerleşik makrofajları olarak, fizyolojik ve nöroprotektif kilit bir role sahiptir (Orihuela vd. 2016). AH, PH ve multiple skleroz (MS) da dahil olmak üzere çoklu nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde rol oynar (Graeber vd. 2011).

Ayrıca, nöroinflamasyonun derecesi, birincil uyaran veya hakaretin bağlamına, süresine ve seyrine bağlıdır.

Bağışıklık sistemi, patojenlere ve tümörlere karşı korumayı teşvik etmede ve hasarlı dokuların onarımında faydalı olabilecek bir süreç olan iltihabın düzenlenmesinde temel bir rol oynar, ancak aynı zamanda kronik olarak indüklendiğinde zararlı olabilir (Takeuchi ve Akira, 2010; González ve ark., 2014).

Akut nöroinflamasyon koruyucu bir rol oynamasına rağmen, kronik nöroinflamasyon sinir dokusuna zararlı olarak kabul edilmektedir (Russo vd. 2018).



Şekil 4: Nöroinflamasyonun olumlu ve olumsuz yönleri (DiSabato ve ark., 2016) orijinal görselden Türkçeleştirilmiştir.

A β plakları ve α -sinüklein gibi nörodejeneratif hastalıkların patolojisi ile ilişkili bazı yanlış katlanmış veya anormal kümelenmiş proteinler, immün sistemin Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) adı verilen reseptörleri yoluyla inflamatuvar tepkileri indükleyebilir veya düzenleyebilir (Roodveldt vd. 2013, Stewart vd. 2010), böylece her iki işlem arasında moleküler bir bağlantı sağlayabilirler (Timmerman vd. 2018).

Merkezi sinir sisteminin inflamasyonu olan nöroinflamasyon, birçok farklı patolojik durumun belirgin bir özelliği olarak kabul edilmektedir (Glass ve ark., 2010). Bu bağlamda, birkaç kanıt dizisi, nöroinflamasyonun, birkaç nörodejeneratif bozuklukta gözlenen ortak bir özellik olan nöronal dejenerasyonun ilerlemesinde yer alan çok önemli bir süreç olduğunu kuvvetle önerir (Glass ve ark., 2010; Lucin ve Wyss-Coray, 2009).

2.3. Mikroglia

Nöronlar ve diğer nöroglial hücrelerden farklı olarak, mikroglialar, embriyonik yolk kesesinden ilkel makrofajlar olarak üretilir ve dolaşım sistemi yoluyla beynine göç ederek Merkezi sinir sistemine katılırlar (Ginhoux ve ark., 2010; Subhramanyam ve ark.,

2019) ve bu ilkel hematopoietik progenitörler embriyogenez sırasında beyni kolonize ederler ve MSS'nin mikro-ortamının etkisi altında yuvarlak bir amoeboid morfolojisine farklılaşır (Ling ve ark., 1980), doğum sonrası gelişim sırasında, dinlenme evresini gösteren dallanmış bir morfoloji kazanmaya başlarlar (Kaur ve ark., 1985; Kaur ve Ling, 1991) ve embriyonun ve gelişmiş beynin yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglialar haline gelirler (Ginhoux ve ark., 2010; Pinto ve Fernandes, 2020; Yona ve ark., 2013).

MSS'nin yerleşik bağışıklık hücreleri ve makrofajları olan mikroglialar, beyin hücrelerinin %15'ini (Cardona ve ark., 2006) aynı zamanda glial hücrelerin %10'unu (Perry ve ark., 2010; Soulet ve Rivest 2008) oluşturur (Pinto ve Fernandes, 2020). Yaralanma sonrası monositik hücrelerin periferik kandan MSS'ye alındığı ve burada mikroglial hücrelere farklılaştığına dair kanıtlar vardır (Mildner ve diğerleri, 2007).). Bu nedenle, mikroglia beyinde yerleşik makrofajlardır, ancak patolojik koşullarda kan dolaşımından gelen monositlerle birlikte popülasyonları artar (Arcuri ve ark., 2017).

Merkezi sinir sisteminin yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglialar, doku homeostazının korunmasında önemli bir rol oynar. ve normal koşullarda beyin gelişimine katkıda bulunur (Subhramanyam ve ark., 2019).

Fizyolojik koşullar altında dallanmış mikroglialar sinapslar ve aksonlar dahil olmak üzere nöronal ağ yapılarıyla geçici temas kurarak beyin mikroçevresini sürekli araştıran, hasar sinyallerini algılayan homeostatik bir fenotip sergilerler (Nimmerjahn ve diğerleri, 2005). Nörogenez, sinaptik budama gibi rollerle nöral sağ kalımı ve sinaptik plastisiteyi korur. Bu amaçla belirli yüzey moleküllerini ifade ederler, astrosit ve nöron fonksiyonunu etkileyen çözülebilir faktörler salgırlar (Kettenmann ve diğerleri, 2011).

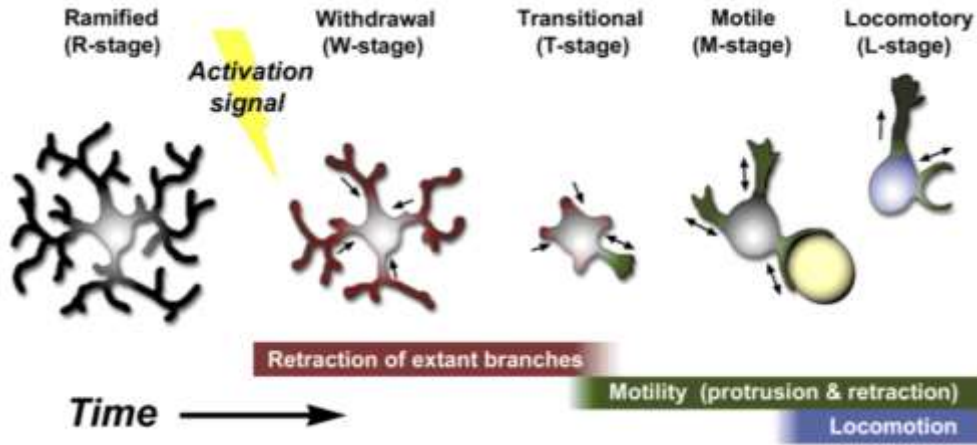
Bununla birlikte doku gözetimi, Hücre artıklarının birikmiş proteinlerin ve patojenlerin uzaklaştırılması ve yaralanmaya yanıt gibi klasik olarak bağışıklıkla ilişkili rolleri yerine getirirler (Hanisch ve Kettenmann, 2007; Nimmerjahn ve diğerleri, 2005).

Mikroglialar beyin homeostazındaki değişikliklere çok duyarlıdır. Yaralanma ve hasar durumunda mikrogliaların kemotaksis yoluyla bulundukları yerden merkezi sinir sisteminin lezyonlu bölgesine göç ederler ve bağışıklık tepkisini başlatmak için aktifleşirler.

Mikroglia kaynaklı nörotoksiste, mikrogliaların aracılık ettiği inflamasyonun merkezi sinir sisteminde nöronal yapıların veya işlevlerin kaybına neden olmasıyla ortaya çıkar ve inme, omurilik yaralanması, sepsis, AH), PH, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Frontotemporal Demans (FD) ve Lewy Cisimcikli Demans (LCD) gibi nörodejeneratif hastalıklar ve hatta psikiyatrik hastalıklarla ilişkilidir.

Birkaç deneysel çalışma nöronal hücre ölümünün bir inflamatuvar süreci indükleyebileceğini ve inflamasyonun kendi başına hücre ölümüne yol açabileceğini göstermiştir (Ransohoff, R. M., 2016; Batista ve ark., 2019). Nöronal hasar veya başka bir hasar olduğunda, uyarının tipine ve büyüklüğüne bağlı olarak, mikroglialar, sitotoksisteyi artıran proinflamatuvar faktörleri ve yara iyileşmesine ve doku onarımına yardımcı olan anti-inflamatuvar nöroprotektif faktörleri salgılamak için aktive olurlar (Subhramanyam ve ark., 2019).

Mikroglial aktivasyona morfolojik ve moleküler değişiklikler eşlik eder. Hücreler şekil 5’ te görüldüğü gibi dallanmış dinlenme formundan çıkıntılarını azalttığı ara bir form olan daha az dallanmış forma ve sonunda tam bir çubuk ve amoeboid şekle veya tamamen aktif hale dönüşen süreçlerinde kısmen geri çekilir (Stence ve ark., 2001; Orr ve ark., 2009; Pinto ve Fernandes, 2020).



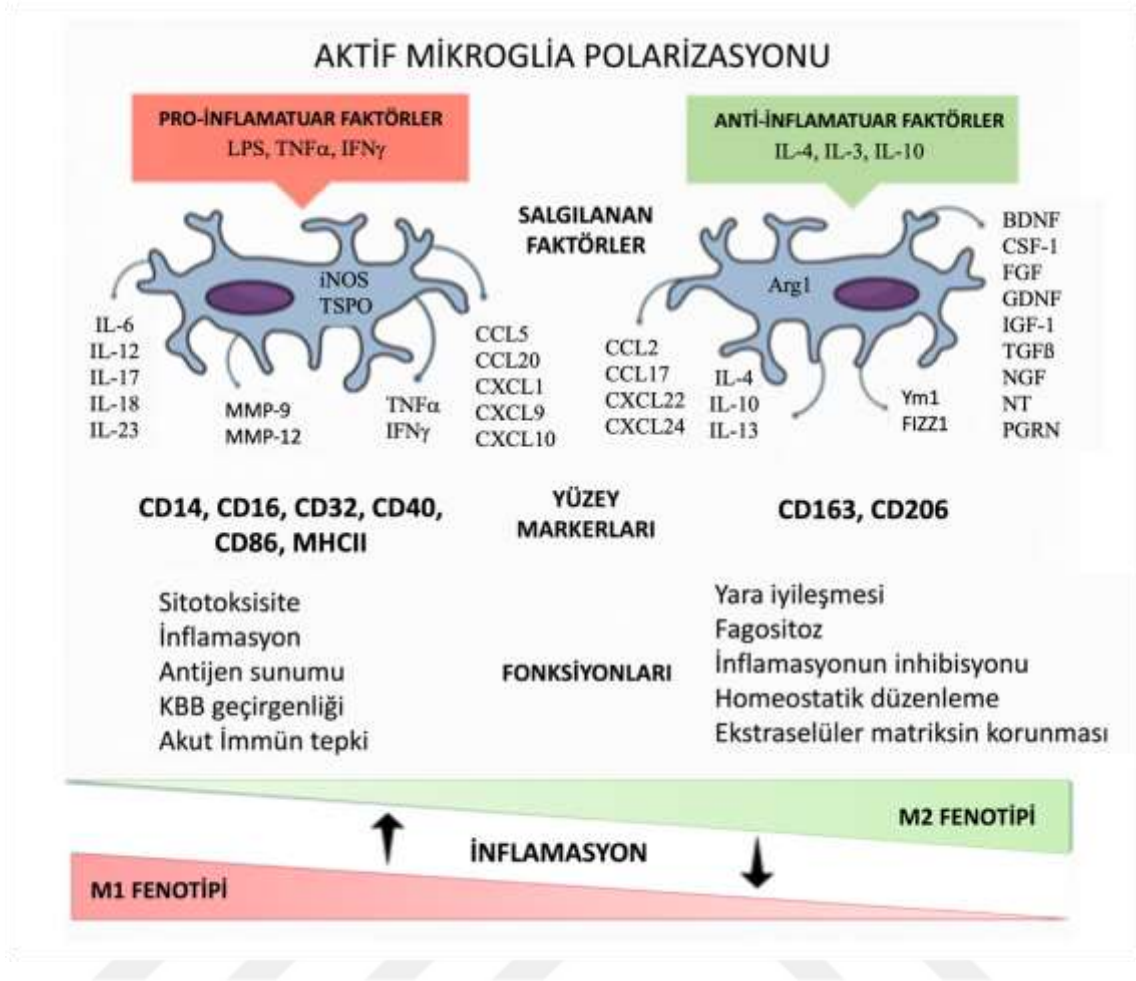
Şekil 5: Aktifleşen mikrogliaların kemotaksis yoluyla göç edebilmesi için yaptığı morfolojik değişimler (Stence ve ark., 2001).

Aktif mikroglia genel olarak M1 tipi (klasik/ pro-inflamatuvar aktivasyon) ve M2 tipi (alternatif /anti-inflamatuvar aktivasyon) olmak üzere iki fonksiyonel polarizasyon durumuna sınıflandırılırlar ve Şekil 6’da görüldüğü üzere farklı fonksiyonlara sahip olurlar

(Aguzzi vd. 2013, Jha vd. 2016). M1 fenotipi, mikroglia'nın inflamatuvar ve nörotoksik rolüne aracılık etmede kritik bir rol oynar ve aşırı aktivasyon halinde nöronlar üzerinde zararlı bir etkiye sahiptir (Kigerl vd. 2009, Liao vd. 2012). M1 mikroglia, tümör nekroz faktörü (TNF)- α , interlökin (IL)-1 β ve nitrik oksit (NO)'i içine alan molekülleri ifade eder.

Morfolojik dönüşümlerine paralel olarak, aktive olmuş mikroglia, iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül-1 (Iba-1), majör histo-uyumluluk kompleksi antijen sınıf II (MHC-II) ve CD11b ve CD68 gibi mikrogliyal fagositik belirteçlerin yüksek ekspresyonu ile karakteristik bir genetik profil ifade eder (Lynch M. A., 2009; Hendrickx ve ark., 2017; Pinto ve Fernandes, 2020;).

Diğer yandan, M2 fenotipinin daha nöroprotektif bir fonksiyonu olduğu düşünülmektedir ve IL-4, IL-10 ve CD206'nın ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. Biriken kanıtlar M2 mikroglia'nın nöroinflamasyonu baskıladığını, homeostazisi koruduğunu ve anti-inflamatuvar sitokinler ve doku onarıcı sitoaktif faktörler üreterek sinir dokularını koruduğunu göstermektedir (Colton 2009). Dahası, M2 fenotipi ayrıca nörodejeneratif hastalıklara karşı nöroprotektif bir rol de oynayabilir. Bu nedenle, polarize mikroglia'nın M1 fenotipinden M2 fenotipine kaydırılması, nörodejeneratif ve nöroinflamatuvar bozuklukların tedavisi için fonksiyonel bir yaklaşım olabilir.



Şekil 6: Aktif mikroglialının iki farklı polarize hali olan M1 ve M2 fenotiplerinin gösterimi (Jurga ve ark., 2020). (Orijinal görselden Türkçeleştirilmiştir)

Aşırı mikroglial aktivasyon, çevreleyen sağlıklı sinir dokusuna zarar verir ve ölü veya ölmekte olan nöronlar tarafından salgılanan faktörler sırayla mikroglia'nın kronik aktivasyonunu şiddetlendirerek ilerleyici nöron kaybına neden olur.

Mikroglial fonksiyonlar, mikroglial hücrelerin *in vitro* kemirgen kültürleri kullanılarak kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, kemirgen mikroglia, insan mikroglia ile karşılaştırıldığında önemli biyokimyasal ve farmakolojik farklılıklar göstermektedir. Ayrıca, insan primer mikroglia hücrelerinin kullanıldığı deneysel çalışmalar, primer kaynakların kısıtlı kullanılabilirliği nedeniyle oldukça sınırlıdır. Bu bağlamda, insan mikroglial hücre hattı, HMC3 (insan mikroglial 3. klonu), bu sınırlamaların aşılmasını sağlamakta ve değerli bir deneysel model olarak kabul edilmektedir (Russo vd. 2018).

2.4. HMC3 hücre hattı

Mikroglial fonksiyonlar, 1-2 günlük yenidoğan hayvanların beyin kortekslerinden türetilen sıçan primer kültürleri (Lin ve ark., 2017) ya da ölümsüzleştirilmiş murin hücre hatları (Figuera-Losada ve ark., 2014) gibi mikroglial hücrelerin kemirgen kültürleri kullanılarak ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmiştir.

Kemirgen mikroglia ile, insan mikroglia karşılaştırıldığında önemli biyokimyasal ve farmakolojik farklılıklar göstermektedir. Ayrıca, insan primer mikroglia hücrelerinin fetal doku, hasta biyopsisi, beyin tümörü ile alınan normal doku veya ölüm sonrası beyin dokusu gibi kaynakların kısıtlı kullanılabilirliği ve etik kaygılar nedeniyle oldukça kısıtlı kaynak profili vardır.

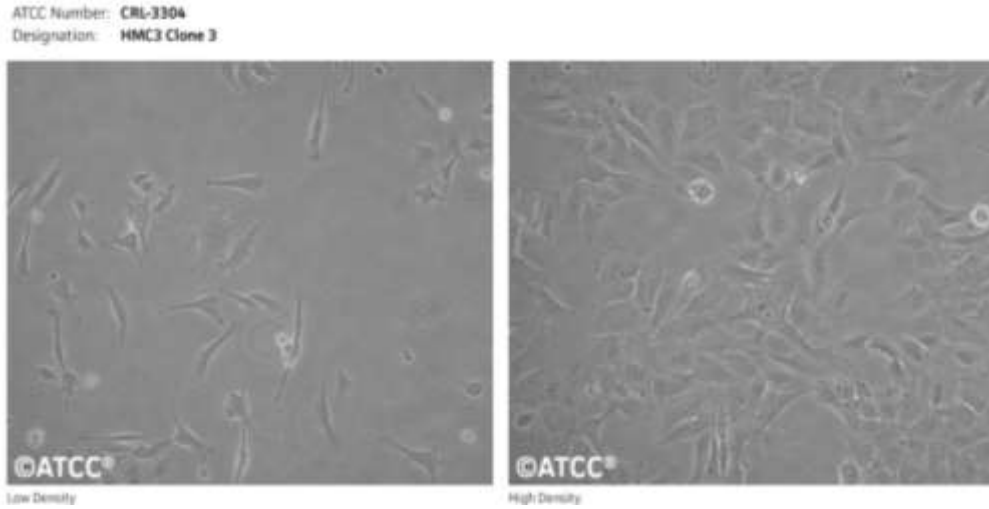
Bu nedenle mikroglia aracılı nöroinflamasyon modellerinin oluşturulması ve mikroglial fonksiyonların araştırılması açısından İnsan mikroglia Hücre hattı olan HMC3 (insan mikroglial kolon 3) hücre hattının kullanılması bu sınırların aşılması bakımından önemli bir deneysel model olarak kabul edilmektedir (Russo vd. 2018).

Farklı laboratuvarlarda yetişkin beyin dokusundan mikroglial hücre hatları elde edilmiş (Garcia-Mesa ve ark., 2017; Nagai ve ark., 200) ve bu hücre hatları SV40'a bağımlı olarak ölümsüzleştirilmiştir (Janabi ve ark., 1995). HMC3 hücre hattı da bu hücre hatları içinde bulunmaktadır.

Hücrelerin çok düşük yoğunlukta büyüyememesi (Şekil 7) nedeniyle klon bilgisi tam olarak doğrulanamasa da ölümsüzleştirilmiş hücrelerin birkaç klonu izole edildi (Janabi ve ark., 1995) Ayrıca birincil MSS kültürlerinin parankimal mikroglia ile sınırlı olmadığı ve bu kültürlerde muhtemelen kültür heterojenliğine katkıda bulunan diğer miyeloid popülasyonlarının bulunabileceği belirtilmelidir.

HMC3 hücre hattı ilk olarak Prof. Tardieu'nun laboratuvarında 8 ila 12 haftalık insan embriyolarının omuriliği ve kortikal alanından alınan primer hücrelerinin dairesel çalkalama yoluyla izole edilmesiyle elde edildi.

HMC3, 2016 yılında American Type Culture Collection (ATCC®) tarafından doğrulanmıştır ve ATCC® tarafından HMC3 (ATCC®CRL-3304)adı altında ticari olarak dağıtılmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7: HMC3 hücrelerinin ATCC tarafından yayınlanan hücre morfolojisini gösteren kültür görüntüsü

Dinlenme halindeki HMC3 hücreleri, mikrogliya/makrofaj belirteci IBA1 için güçlü pozitif, endotoksin reseptörü CD14 için pozitif, ancak astrosit belirteci GFAP için negatif olarak belirlenmiştir (Janabi ve ark., 1995). Aktifleştirilmiş mikrogliya belirteçleri; MHCII, CD68 ve CD11b, dinlenme halindeki HMC3 hücrelerinde negatif iken IFN-gamma (10 ng/ml, 24 saat) ile aktivasyondan sonra yukarı regüle oldukları belirlenmiştir (ATCC).

Ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarının, primer kültürlerle göre LPS' ye daha az yanıt verdiği bildirilmiştir. (Janabi ve ark., 1995; Sébire ve ark., 1993).

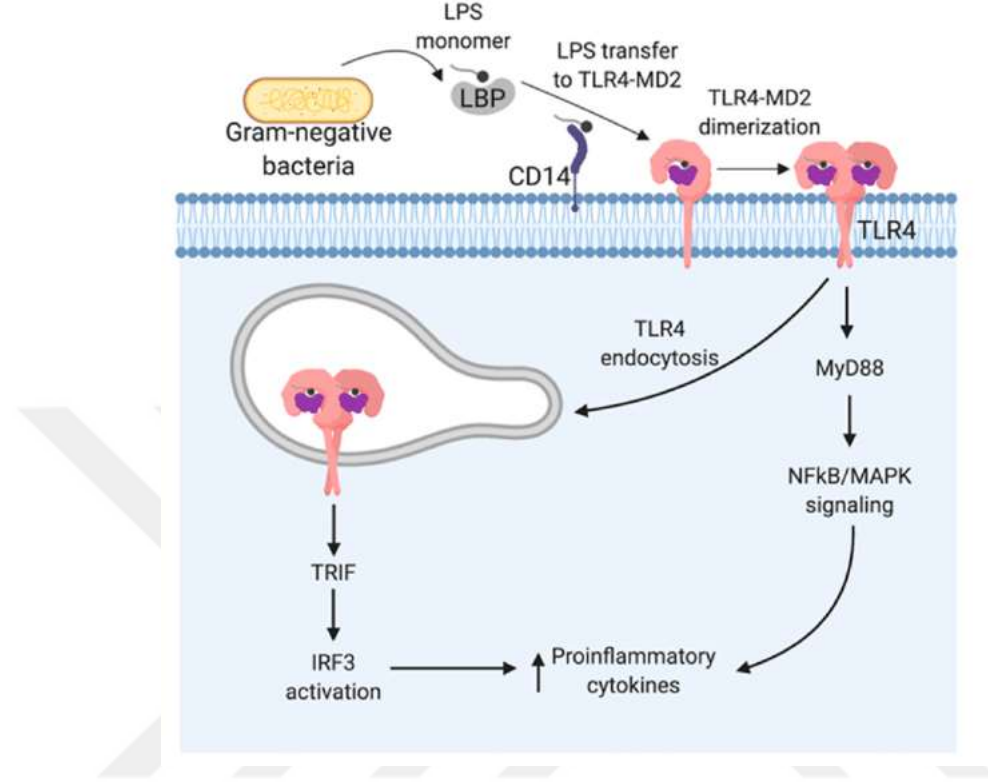
2.5. Nöroinflamasyon Modeli

Mikrogliya aracılı nöroinflamasyon modellerinde en yaygın kullanılan uyarıcı olan LPS, Gram- negatif bakterilerin dış membranında bulun ve doğuştan gelen immün yanıtı başlatan bir endotoksin olan Lipid A'yı içeren lipopolisakkarittir (Raetz ve Whitfield, 2002).

Şekil 8 de şematize edildiği gibi LPS, mikrogliya üzerinde bulunan toll benzeri reseptör 4'e (TLR4) bağlanarak etki eder ve daha sonra enflamatuar faktörlerin üretimi için gerekli genlerin transkripsiyonu başlatan hücre içi proteinleri aktive eder (Batista ve ark., 2019).

LPS genellikle dışarıdan gelen tehdit olan bakteriyel bir enfeksiyonu yani eksojen bir uyarıcıları temsil etmek için kullanılır. Ancak inme ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok steril hastalıklarda mikrogliya, hücre hasarından salınan maddeler ve pro-

inflatuar sitokinler IFN- γ ve TNF- α gibi diğ r endojen uyar nlar tarafından aktive edilir (Brow ve Vilalta, 2015). Dolayısıyla, bunlar çeşitli mikroglia aracılı nöroinflamasyon modellerinde de kullanılmıştır



Şekil 8: LPS aracılı Nöroinflamasyonun ba latılmasının şematik gösterimi (Mazgaen ve Gurung, 2020)

Mikroglia sadece dışarıdan gelen tehditler tarafından değıl, aynı zamanda hücre stresi, hücre hasarı ve hücre ölümü gibi endojen tehditler tarafından da aktive edilir (Brow ve Vilalta, 2015). Hasarlı ve  l  hücrelerden salınan sitoplazmik maddelere ve diğ r hücreler tarafından üretilen sitokinlere yanıt vererek aktive olurlar. Makrofaj ve mikroglia aktivasyonu için IFN- γ önemli bir sitokindir. IFN- γ , periferik sinir hasarı sırasında omuriliğ n dorsal oynuzunda (Sonekatsu ve ark., 2016), ya lı beyinlerde, travmatik beyin hasarını takiben, Alzheimer, Parkinson ve vasküler demans gibi nörodejeneratif hastalıkların erken aşamalarında (Guevara ve ark., 2020) yukarı doğru düzenlenir. Bu yüksek IFN- γ seviyelerine maruz kalan mikroglia daha sonra reaktif bir forma dönüşerek diğ r proinflatuar sitokinleri üretir (Takeuchi ve ark., 2006; Mount ve ark., 2007). Bu nedenle, n roinflatuar çalışmalarda LPS'nin yanı sıra IFN- γ da mikroglia aktivasyonunun bir uyarıcısı olarak kullanılmaktadır. LPS spesifik bir dışsal tehdidi, yani enfeksiyonu temsil ederken, IFN- γ daha genel ve endojen bir yanıtı temsil eder.

2.6. Amaç

Daha önceden de bahsedildiği gibi nörodejenerasyon ve nöroinflamasyon birbirinin tamamlayıcısı olan fakat nöroinflamasyonun, nörodejenerasyonun nedeni veya sonucu olabileceği için, nörodejeneratif hastalıklara nasıl katkıda bulunduğu hala tartışma ve araştırma konusudur.

Topo IIβ'nın nöron gelişimi ve iletimi için önemli genlerin transkripsiyonu ile doğrudan bağlantısı olduğunu ve dolaylı olarak TOP2B'deki mutasyonlar veya topo IIβ ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler nörodejeneratif bozukluklara yol açabileceği gösterilmiştir (Terzioglu-Usak ve ark., 2017).

Daha önceden Prof Dr. Sevim Işık ve ekibi tarafından yapılan nöral indüklenmiş mezenkimal kök hücrelerde topo IIβ'nın susturulması ile yapılan çalışmada inflamasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının anlamlı miktarda artmasına yol açtığı görülmüştür (Işık ve ark., 2015, Yayınlanmamış Data). Yine aynı ekip tarafından yapılan çalışmalar topo IIβ'nın Nurr1 ekspresyonu üzerinde düzenleyici bir etkisi olduğunu göstermiştir (Terzioglu ve ark. 2017, Zaim ve Isik 2018). Nurr1 proteinin Parkinson hastalığında nöroinflamasyona karşı nöroprotektif rolü olduğunu bilinmektedir. Bu durumda, topo IIβ, Nurr1 üzerinden özellikle Parkinson hastalığında olmak üzere nörodejeneratif patolojilerde nöroinflamasyona karşı nöroprotektif bir rol alabilir.

Bu çalışmalar ve literatürden anlaşıldığı üzere topo IIβ'nın nöron gelişimi ve Nörodejenerasyon ile doğrudan ilişkisi kanıtlara dayanmaktadır fakat nörodejenerasyon ile nöroinflamasyonun ilişkisi göz önünde bulundurularak topo IIβ'nın nöroinflamasyonda ve özellikle nöroinflamasyonun birincil hücreleri olan mikrogliadaki fonksiyonunu araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, topo IIβ'nın varlığının arttırılmasının, beynin daimî bağışıklık hücreleri olan mikrogliya aracılı nöroinflamasyon durumunda, pro-inflamatuar M1 ve anti-inflamatuar M2 fenotipi dönüşümlerinde, özellikle M1 fenotipinden M2 fenotipine geçişte olası modülatör rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Topo IIβ'nın mikrogliya fenotipleri üzerinde etkin bir rolünün olması durumunda nöroinflamasyonun TOP2B aracılı düzenlenmesi iyi bir tedavi stratejisi olabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HMC3 Hücre Hattının Kültürü

3.1.1. HMC3 Hücre Hattının Temin edilmesi

HMC3 hücre hattı ATCC (American Type Culture Collection) firmasından satın alındı ve uzun süreli kullanım için sıvı azot tankında saklandı. Hücreler besiyerine %20 FBS (Fetal Bovine serum, Thermo Fisher, 102701006) ile ekildi. Hücre yoğunluğu %70 ve üzeri olduğunda %0.25 Trypsin/EDTA (Thermo Fisher, 25200056) çözeltisi ile kültür kabı zemininden kaldırıldı. Hücreler tekrar pasajlanacak yoğunluğa erişince HMC3 hücre stoğu oluşturmak için %90 FBS ve %10 DMSO (Dimethyl Sulfoxide, GENAXXON, M6323.0100) içinde çözülerek sıvı azot tankında stoklandı.

3.1.2. HMC3 Hücre Hattının Dondurulması ve Çözülmesi

Hücreleri uzun süreli koruma amacıyla dondurmak için, kültürden alınan hücreler 0,5-1X 10⁶ hücre/ml yoğunlukta FBS içinde yeniden süspanse edilmiştir. Cryovial tüpler buz üzerine yerleştirildi ve her tüpe 900 µl hücre çözeltisi eklendi. Ardından kristalize olmasını önlemek için 100 µl DMSO damla damla ve karıştırılarak eklendi. Hücre canlılığın korunması için aşamalı olarak dondurmak amacıyla önce -20 °C'de 1-2 saat, ardından -80 °C'de bir gece bırakıldı. Ertesi gün, hücreler uzun süreli kullanım için sıvı nitrojen tankında -196 °C'de saklandı.

Hücre çözmek için önceden 37°C lik su banyosunda ısıtılmış MEM (Minimum Essential Medium, Capricorn, MEM.XA) den 10 ml 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Nitrojen tankından alınan cryovial tüpler hızlıca 37 °C lik su banyosunda en fazla 2 dakika olacak şekilde eritildi. Çözülen hücreler önceden ısıtılmış 10 ml MEM içinde oda sıcaklığında 1800 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı Süpernatant pellet dağıtılmadan dikkatlice atıldı ve kalan DMSO'nun uzaklaştırıldığından emin olmak için aynı işlem tekrar edildi. Yapılan yıkamalardan sonra pellet %10 FBS, %1 Sodyum pirüvat (Capricorn, NPY.B), %1 L-glutamin (Capricorn, GLN.B) ve 0,1 mg/ml primosin (Invivogen, ant-pm-2) içeren 5 ml MEM içinde CO₂ dolaşımına izin vereb 25 cm² lik

ventilli flaska ekildi ve 37 °C, %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde inkübe edildi. Ölü hücreleri uzaklaştırmak için 24 saatte bir medium yenileme yapıldı. Hücre yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek %80 yoğunluğa ulaşınca çalışmaya başlandı.

3.1.3. HMC3 Hücre Kültürü Şartları Optimizasyonu

Hücreler besiyeri şartları ve hücre yoğunluğunu optimize etmek amacıyla kültürde büyötmeye devam edildi. Hücrelerin kültür şartları DMEM (Capricorn, DMEM.HXA) ve %10 oranında fetal sığır serumu (FBS), 0,1 mg/ml primosin içeren besiyerinde başlatıldı. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda hücrelerin büyüme hızına ve morfolojisine göre HMC3 hücrelerinin besiyeri MEM: FBS oranı %10 olarak belirlendi. Ayrıca HMC3 hücrelerinin ekim yoğunluğu, gerçek zamanlı hücre analiz cihazı (Real Time Cell Analyzer: RTCA; Xcelligence, Roche) kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmaları ile 2×10^4 /cm² olarak belirlendi. Kültüre 37°C, %5 CO₂ inkübasyon şartlarında devam edildi. HMC3 hücrelerine haftada iki kere pasaj yapıldı ve diğer günler besiyeri yarı yarıya yenilenerek taze tutuldu.

3.1.4. HMC3 Hücre Kültürü

Çözdürölen hücrelerin ekilmesinin ardından hücre yoğunluğu yaklaşık %70-75'e ulaştığında, hücreler pasajlandı. Pasaj öncesinde; complete MEM, PBS (Phosphate Buffered Saline, Capricorn, PBS.1A) ve Trypsin/EDTA solösyonu 37 °C su banyosunda ısıtıldı. Flasktaki eski besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler kalsiyum ve magnezyum içermeyen 3 ml PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml %0,25 Trypsin/EDTA solösyonu ile 37 °C'de 1-2 dakika inkübe ederek yüzeyden kaldırıldı. Hücrelerin ayrılması mikroskop altında görüntölendi ve enzimin aktivitesi FBS içeren 3 ml medium eklenerek durduruldu. Medium eklenmiş tripsinli hücreler 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktararak oda sıcaklığında 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre peleti yaklaşık 1 ml besiyeri içinde pipetaj yapılarak süspanse edildi. Hücre canlılığı Trypan Blue (Sigma; kat. no: T8154) boyaması ile membran bütönlüğü bozulan ölü hücrelerin boyanarak dışlanması ve boyanmayan parlak canlı hücrelerin sayılması ile thoma lamında yapıldı. Daha sonra hücreler 2×10^4 hücre/cm² %5 FBS, %1 Sodyum pirüvat, %1 L-glutamin ve 0,1 mg/ml primosin içeren 5 ml MEM içinde 25 cm² lik yeni flaska ekildi. Flask 37 °C, %5 CO₂ şartlarında CO₂

inkübatöründe inkübe edildi. Her 24 saatte bir medium yenilendi. HMC3 hücreleri haftada 3 kez aynı şartlarda pasajlandı.

3.2. Topo IIB Plazmid İzolasyonu ve Teyidi

PEGFP-topo II β plazmidi, C-terminaline kaynaşmış gelişmiş yeşil floresan protein (EGFP) sekansı ile tam uzunlukta sıçan topo II β 'yı kodlar. Topo II β genini içeren pEGFP-N1 plazmidi, Okayama Üniversitesi Tıp Fakültesi (Japonya)'nden Prof. Ken Tsutsui tarafından hediye edilmiştir.

3.2.1. Sıvı luria broth (LB) besiyerinin ve LB agarın hazırlanması

Tablo 1' de miktarları verilen toz LB distile su ile iyice çözündürüldükten sonra çözelti sıvı programda (121°C, 20 dakika) otoklavlandı. Dokunulabilecek sıcaklığa geldiğinde 50 μ l kanamisin antibiyotiği eklendi ve 4°C'de saklandı

Tablo 1: Sıvı luria broth (LB) besiyerinin hazırlanması

		Final konsantrasyon
LB besiyeri(toz)	10 g	25 g/L
dH ₂ O	400 ml e kadar	
Toplam	400 ml	

Tablo 2' de miktarları verilen toz LB agar distile su ile iyice çözündürüldükten sonra çözelti sıvı programda (121°C, 20 dakika) otoklavlandı. Dokunulabilecek sıcaklığa geldiğinde 50 μ l kanamisin antibiyotiği eklendi ve 100 mm'lik petrilere petri başına 20 ml olacak miktarda koyuldu ve katılaşınca ters çevrilip 4°C'de saklandı. Otoklav aşamasından sonra tüm işlemler laminar kabinde (Nüve, MN 120) yapıldı.

Tablo 2: LB agarın hazırlanması

		Final konsantrasyon
LB agar besiyeri(toz)	3,7 g	37 g/L
dH ₂ O	100 ml e kadar	
Toplam	100 ml	

Gliserol stok kanamisin antibiyotiği içeren ağara tek düşürme tekniği ile ekildi. 37°C’ de 16 saat inkübe edildi ardından oluşan kolonilerden seçilerek %1 kanamisin içeren 5 ml LB’ye ekildi ve 24 saat 37°C çalkalamalı inkübatörde büyütüldü. 24 saat sonra EGFP-N1 plazmidi, CompactPreb Plazmid Maxi Kit (Qiagen,128663) ile üreticinin talimatları takip edilerek izole edildi. İzole edilen plazmid DNA’sının konsantrasyonu LVis plate ile Multimod Mikroplate okuyucu (BMG LABTECH, FlouOstar Omega) kullanılarak ölçüldü.

3.2.1. Topo IIβ Plazmit Kesimi

Transfeksiyondan önce, topo IIβ gen ekinin teyidi için plazmit DNA ‘nın kesimi Tablo 3 ve tablo 4’te yer alan koşullara göre gerçekleştirilmiş ve farklı enzim kombinasyonları kullanılmıştır.

Plazmidin uygun enzimler ile FastDigest BamHI (Thermo Scientific, FD0054), FastDigest XhoI(,Thermo Scientific, FD0694), FastDigest SmaI (Thermo Scientific, FD0663) kesimi koloni PCR yöntemi kullanılarak yapıldı. Kesim reaksiyonu sonuçları %1’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir

Tablo 3: Enzim Kesim Kombinasyonu 1:

Plazmid DNA (500ng)	1.6 µl	37°C, 5 dakika
10X FastDigest™ Green Buffer	1 µl	
FastDigest XhoI	0.5 µl	
FastDigest SmaI	0.5 µl	
Nükleaz Free Su	6.4 µl	
Toplam	10 µl	

Tablo 4: Enzim Kesim Kombinasyonu 2:

Plazmid DNA (500ng)	1.6 µl	37°C, 5 dakika
10X FastDigest™ Green Buffer	1 µl	
FastDigest XhoI	0.5 µl	
FastDigest BamHI	0.5 µl	
Nükleaz Free Su	6.4 µl	
Toplam	10 µl	

3.3. HMC3 Hücre Hattında Topo IIβ Geninin Aşırı İfade Edilmesi

3.3.1. PEI Transfeksiyonu

HMC3 hücre hattının TOP2B geni içeren plazmit ile transfeksiyonu daha önce HUVEC, U87 ve SH-SY5Y memeli hücre hatlarında yapılan transfeksiyon optimizasyon denemelerinde belirlenen değerler olan 5000 ng/μl plazmid ve 1:1, 1:2, 1:3 oranlarında PEI kullanılarak yapıldı. Transfeksiyondan 12 saat sonra besiyerleri yenilendi.

Hücrelerin 24, 48 ve 72. saatte floresan mikrokobunda hücre görüntüleri çekildi. Elde edilen görüntülere göre transfeksiyon verimi hesaplandı.

3.3.2. Lipofectamine LTX Transfeksiyonu

Lipofectamine LTX kiti (Invitrogen™ 15338100) üretici firmanın talimatlarına göre farklı konsantrasyonları kullanıldı. Hücrelerin 24. ve 48. saatte floresan mikrokobunda hücre görüntüleri çekildi. Elde edilen görüntülere göre transfeksiyon verimi hesaplandı.

3.3.3. NEON Transfeksiyon

Cihaz ile transfeksiyon protokole uygun olarak planlandı, hücrelerin transfeksiyona hazırlığı yoğunluğun %70 ve üstü olmasına göre belirlendi ve transfeksiyon için hücreler toplandı ve sayıldı 1x10⁶ hücre 100 μl R Buffer ile çözüldü hücre sayısına göre 10 μg TOPO 2β plazmiti tüpe eklendi ve NEON pipet ile 100 μl'lik neon tipe 100 μl mix çekilerek istasyona yerleştirildi. Farklı hücreler için firma tarafından verilen öneriler referans alınarak 3 farklı elektroporasyon protokol oluşturuldu (Tablo 5). 24 saat sonra besiyeri yenilendi.

Tablo 5: Neon Transfeksiyon ile denenen elektroporasyon protokolleri

	Voltaj (V)	Darbe Aralığı (ms)	Darbe sayısı
Protokol 1	1200 V	20	3
Protokol 2	1300 V	20	2
Protokol 3	1100 V	50	1

HMC3 hücrelerine pEGFP-Topo II β plazmid transfeksiyonu, GFP ekspresyonu için floresan mikroskobu altında kontrol edildi. Transfeksiyon verimi hesaplandı.

3.3.4. 4D Nucleofector™ System (Lonza)

HMC3 hücreleri Topo II β geni ile transfekte etmek için 4D Nucleofector™ sistemi (Lonza) kullanıldı. Hücreler Trisin-EDTA solüsyonu ile toplandı tyrpsini inaktive etmek için FBS eklendi. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti nükleofektör solüsyonu toplam 20 μ l solüsyon içinde yeniden süspanse edildi. Her 20 μ l çözeltiye kontrol 1 μ g pmaxGFP plazmidi ve 4, 6, 8, 10 μ g topo II β plazmidi eklendi ve 20 μ l'lik nükleoküvetler içine aktarıldı. HMC3 hücrelerine yakın olan HepG2 hücrelerine ait olan program uygulandı. Nükleofeksiyondan sonra, hücreler 500 μ l önceden ısıtılmış %10 FBS içeren MEM içinde yeniden süspanse edildi ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi ve önceden ısıtılmış MEM ve %10 FBS içeren kuyucuklu plakalara ekildi. Transfeksiyon floresan mikroskop altında kontrol edildi

3.3.5. Lipofectamine 3000 ile Transfeksiyon

HMC3 hücreleri ekimi yapıldıktan sonra hücre yoğunluğunun yaklaşık %70-%90'a ulaşması beklenildi. Hücreler uygun yoğunluğa ulaştığında Üretici firmanın talimatları takip edilerek Lipofectamine 3000 (Invitrogen katalog no: L3000-008) ile transfekte edildi. Üretici firmanın protokolüne göre Lipofectamine™ 3000 Reagentı optimem içinde dilüe edildi, başka bir tüp içinde P3000™ Reagentı Topo II β plazmit DNA'sı ile birlikte optimem içinde dilüe edildi. Daha sonra DNA ve reagentları içeren tüpler iyice karıştırılarak birleştirildi. Karışım 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen DNA-lipid kompleksi besiyeri tazelenen hücrelerin üzerine damla damla bırakıldı. Hücreler 24 saat içinde floresan mikroskop ile takip edildi.

3.4. HMC3 Hücre Hattında Topo II β Aşırı İfade Eden Hücrelerin Ayırıştırılması

Lipofectamine 3000 ile transfeksiyondan yaklaşık 36 saat sonra transfekte edilen yaklaşık 5×10^6 hücre %0,25 Tripsin/EDTA solüsyonu ile 37 °C'de 1-2 dakika inkübe ederek yüzeyden kaldırıldı. Hücrelerin ayrılması mikroskop altında görüntülendi ve enzimin aktivitesi FBS içeren medium eklenerek durduruldu. Medium eklenmiş tripsinli

hücreler 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarılarak oda sıcaklığında 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pellet %2 FBS içeren PBS içinde pipetaj yapılarak süspanse edildi. Medipol Üniversitesi REMER bünyesindeki BD Influx™ Cell Sorter cihazı ile ayrıştırıldı.

3.5. *İn vitro* Nöroinflamasyon modeli oluşturma optimizasyonları

3.5.1. LPS

LPS(Lipopolisakkarit) (Sigma-Aldrich, L4391-1MG) üretici firmanın talimatlarına göre 1 ml steril PBS eklenerek çözüldü ve 100 µl'lik alikotlar halinde -20°C'de saklandı. Daha sonra istenilen konsantrasyonları hazırlamak için seri dilisyon yapıldı. Alikotların konsantrasyonu 1mg/ml' den istenilen konsantrasyonlara çekildi.

Literatürden en yaygın kullanılan farklı konsantrasyonların toksisite seviyesi değerlendirildi. Bunun için başlangıçta 0.01 µg/ml, 0.05 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.75 µg/ml, 1 µg/ml ve 2 µg/ml oranlardaki lipopolisakkarit konsantrasyonları denendi. Farklı lipopolisakkarit konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulayarak MTT analizi (BOSTER, MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit Cat No:AR1156) ile yapıldı. Absorbans ölçümü Multimod Mikroplate okuyucu (BMG LABTECH, FlouOstar Omega) ile 570 nm'de alındı.,

3.5.2. IFN γ

Human IFN-gamma Protein (Gibco, PHC4031) PBS ile dilüe edilerek farklı konsantrasyonlara getirildi. Kullanıma hazır konsantrasyonlar alikotlanarak uzun süreli kullanım için -80°C'de saklandı. Düşük konsantrasyonlarda hazırlanan alikotlar ise kısa süreli kullanım için -20°C'de muhafaza edilmektedir.

3.5.3. ATP

ATP Solution (100 mM, 025 ml) (Thermo Fisher, R0441) alikotlanarak üretici firmanın talimatlarına göre -20°C'de muhafaza edildi.

3.5.4. HMC3 Hücre Hattına LPS, IFN- γ , ATP Uygulama

HMC3 hücre hattına nöroinflamasyon modeli oluşturmak için LPS, IFN- γ ve ATP farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarda uygulanmıştır. Nöroinflamasyon optimizasyonları 12 kuyulu plakalarda 1.5 ml besiyeri/kuyu olarak yapıldı.

İlk olarak literatürde en çok uygulan ve hücreler için toksik olmayan doz olan 0,1 μ g/ml ve 1 μ g/ml LPS 24 ve 48 saat olarak uygulandı. Buna ek olarak 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml LPS 48 saat uygulama yapıldı. Uygulama en az 24 saat önce ekimi yapılmış tutunmuş hücrelerde mediuma eklenerek uygulandı.

Daha sonra LPS ve IFN- γ 'nın farklı kombinasyonları uygulandı. 1 μ g/ml LPS+10 ng IFN- γ ve 1 μ g/ml LPS+50 ng IFN- γ 24 ve 48 saat olarak uygulandı.

ATTC' önerisi olan 10 ng/ml IFN- γ ve ek olarak 50 ng/ml IFN- γ 24 saatliğine uygulandı. Son olarak LPS'nin oluşturduğu mitokondrial disfonksiyonun etkisini azaltmak ve nöroinflamasyonu desteklemek için 50 μ M ATP kullanıldı. LPS'nin kullanıldığı HMC3 grupları LPS uygulanmadan önce ATP ile 10 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edildi.

3.6. İnflamasyon Belirteçlerinin İmmüno Floresan Boyama ile Gösterimi

24 kuyulu plakadan HMC3 hücrelerinin medimu uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelerin sabitlenmesi için %4 PFA/PBS ile oda sıcaklığında 10 dakika boyunca çalkalamalı olarak inkübe edildi. %4 PFA/PBS uzaklaştırıldıktan sonra, her biri 5 dakika olmak üzere üç kez 1XPBS ile yıkandı. Oda sıcaklığında 30 dakika boyunca %0,3 PBS/Triton X (PBS-Tx) içinde %10 NGS (Normal Goat Serum, Cell Signaling, 5425) ve %10 NHS (Normal Horse Serum, Sigma-Aldrich, H0146-10ML) ile bloke edildi. Bloke edilen hücreler 30°C'de 2 saat boyunca hedeflenen proteine özgü primer antikorların %3 normal at serumu içeren %0,3 PBS-Tx solüsyonu içinde seyreltilerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince kuyuların üstü parafilm ile kapatıldı. İnkübasyon sonrasında kuyular %0,3 PBS-Tx ile çalkalamalı olarak her biri 5 dakikalık olan 3 yıkamaya maruz bırakıldı. Ardından hücreler 30°C'de 1 saat süreyle primer antikora uygun hosta sahip Alexa Fluor etiketli sekonder antikorlarla muamele edilmiştir. Plakalar parafilm ile kapatıldı ve sekonder antikorlar ışığa duyarlı olduğu için alüminyum folyo ile kaplandı. Sekonder antikorla inkübasyon sonrası hücreler 1XPBS ile her biri 5 dakika

olmak üzere üç kez çalkalamalı olarak yıkandı. Ardından hücreler 1:15.000 oranında 1XPBS DAPI (NEOFROXX, 1322MG005) ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. DAPI buz üzerinde ve karanlıkta seyreltildi. Yıkama adımları sırasıyla 1X PBS ve distile su ile her biri 5 dakika süreyle üç kez çalkalamalı olarak yapıldı. Hücrelerin üzerine Prolong Gold Antifade Kit (Invitrogen) muamele edilerek coversliplerle kapatıldı. Hücreler floresan mikroskobu (Zeiss, Axio Observer 3) altında gözlemlendi ve fotoğraflandı. Primer antikor olarak İNOS (1:400, Cell Signaling, D6B6S). Sekonder antikor: Anti-rabbit IgG Alexa Fluor Conjugate 488 Conjugate (1:500, Cell Signaling, 4412)

3.7. İnflamasyon Belirteçlerinin Akış Sitometrisi ile Analizi

3.7.1. Hücrelerin akış sitometri için hazırlanması

3.7.1.1. Hücre Yüzeyi/Yüzey Markerı Boyama

Staining solüsyonu hazırlanması: Ticari olarak satın alın BSA stok solüsyonu (MACS Buffer, 130091376) 1:20 oranda yine ticari bir solüsyon olan Rinsing solüsyonu (MACS Buffer, 1300091222) ile dilüe edilir. 4°C’de muhafaza edilir.

Hücreler 50 µl/cm² %0,25 Trypsin/EDTA solüsyonu ile 37 °C’de 1-2 dakika inkübe ederek yüzeyden kaldırıldı. Hücrelerin ayrılması mikroskop altında görüntülendi ve enzimin aktivitesi FBS içeren 1 ml medium eklenerek durduruldu. Medium eklenmiş tripsinli hücreler 1,5 ml’lik santrifüj tüpüne aktararak oda sıcaklığında 500 RCF’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre peleti 1 ml Staining solüsyonu (%5 BSA stok solüsyonu (MACS Buffer, 130091376) içeren Rinsing Solüsyon (MACS Buffer ,1300091222)) içinde pipetaj yapılarak süspanse edildi. Süspanse edilen hücreler tekrar 500 RCF’de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Pellet 80 µl staining solüsyonu içinde çözüldü ve boyama için yüzey markerları eklendi. Antikor eklenen hücre solüsyonu hafifçe vortekslenerek homojenize edildi ve 4°C sıcaklıkta 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Boyanan hücrelere 1 ml staining solüsyonu eklenerek 500 RCF’te 5 dakika boyunca santrifüjlenerek bağlanmayan boyaların uzaklaştırılması amacıyla yıkandı. Pellet 100 µl staining solüsyonunda çözüldü ve CytoFlex cihazında (Beckman Coulter, B5-R3-V0) okutuldu. Datalar Cytexpert yazılımı ile analiz edildi.

Kullanılan antikorlar ve miktarları; 5 µl CD16 (Beckman Coulter, B49215), 2.5 µl CD86 (Beckman Coulter, B30648), 5 µl CD206 (Beckman Coulter, IM2741), 5 µl CD45 (Beckman Coulter, A07782), 1:800 CD11b (Biolegend, 101208).

3.7.1.2. Hücre içi boyama

Hücre içi boyama ticari bir boyama kiti olan Fixation/Permeabilization Kit (BD Cytotfix/Cytoperm™, 554714) kullanılarak yapıldı. BD Perm/Wash™ Buffer kullanılmadan önce 10x'ten 1x e distile su ile dilüe edildi.

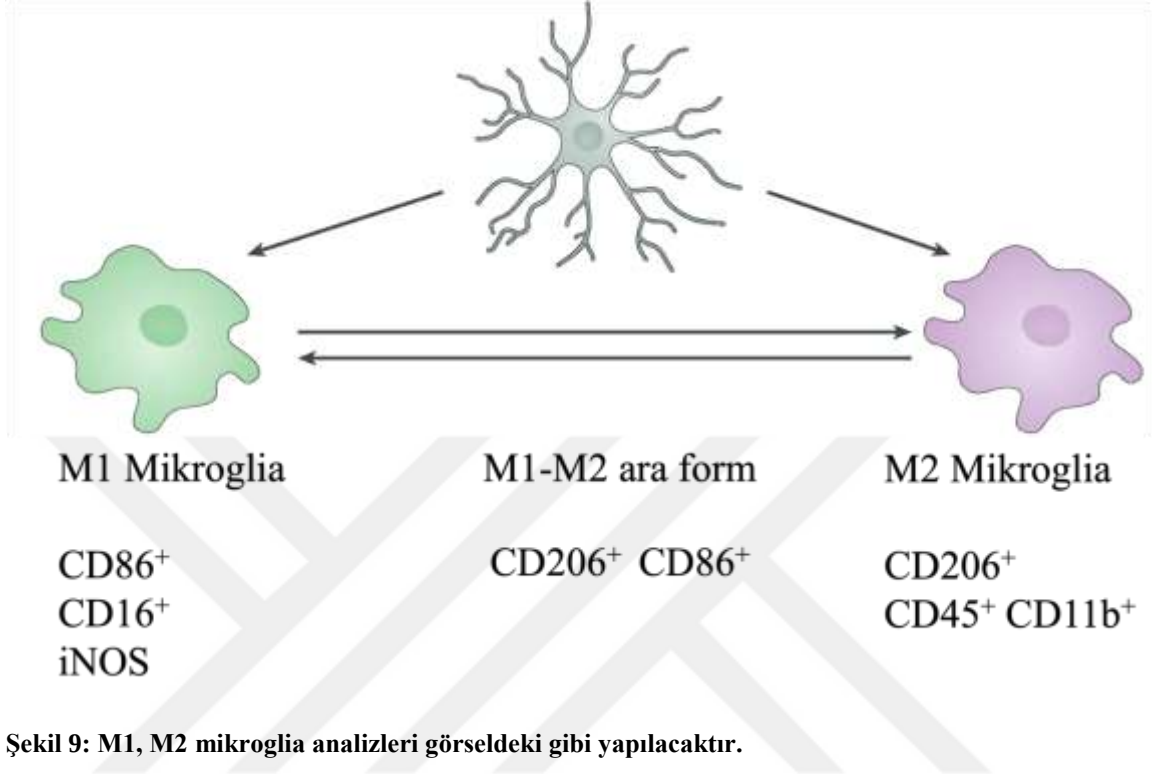
Takip edilen boyama protokolü;

Hücreler 50 µl/cm² %0,25 Trypsin/EDTA solüsyonu ile 37 °C'de 1-2 dakika inkübe ederek yüzeyden kaldırıldı. Hücrelerin ayrılması mikroskop altında görüntülendi ve enzim aktivitesi FBS içeren 1 ml medium eklenerek durduruldu. Medium eklenmiş tripsinli hücreler 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktararak oda sıcaklığında 500 RCF'te 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 200 µl Fixation/Permeabilization solüsyonu ile pipetaj yapılarak çözüldü ve 4°C sıcaklıkta 20 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra hücreler 2 kez önceden distile su ile 1:20 oranda dilüe edilmiş 1 ml 1x BD Perm/Wash™ Buffer ile yıkandı. Bu aşamada hücrelerin üzerine 1 ml perm/wash solüsyonu eklenir ve 400 RCF'te 5 dakika santrifüj edilir. İkinci yıkamadan sonra pellet 50 µl perm/wash solüsyonu ile çözüldü ve üzerine birincil antikor eklendi kısaca vortex yapılarak antikor homojenize edildi ve 30 dakika boyunca 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 2 kez 1X perm/wash solüsyonu ile yıkandı. Tekrardan 50 µl 1X perm/wash solüsyonunda çözülen pellete ikincil antikor eklendi. 30 dakika boyunca 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 2 kez 1X perm/wash solüsyonu ile yıkandı. Pellet 50 µl 1X perm/wash solüsyonu ile çözüldü ve hücreler flow cytometry cihazında okutuldu.

Kullanılan antikorlar ve miktarları; 1:800 iNOS Rabbit mAb (Cell Signaling, D6B6S), 1:800 Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 Conjugate (Cell Signaling, 4412)

3.7.2. Akış Sitometrisi ile Analiz Edilmesi

HMC3 hücrelerini tanımlamak için FSC-H'ye karşı SSC-H'ye, ardından çiftleri ve kümeleri ortadan kaldırmak için FSC-H'ye karşı FSC-A'ya bir ilk kapı oluşturuldu.



Şekil 9: M1, M2 mikroglia analizleri görseldeki gibi yapılacaktır.

3.7. Deney Gruplarının Tasarlanması

Yapılan tüm nöroinflamasyon oluşturma optimizasyonları sonucu deney gruplarına 10 ng/ml IFN- γ uygulamaya karar verildi. Bu sebeple nöroinflamasyon ve Topo II β aşırı ifade eden gruba 10 ng/ml IFN- γ uygulandı.

Nöroinflamasyon gruplarına optimizasyon sonuçlarına göre 48 saat boyunca uygulama yapıldı. 48 saatin sonunda hücreler akış sitometrisi için hazırlandı ve analiz edildi (Tablo 6).

DENEY GRUPLARI

Grup 1: Kontrol Grubu

Grup 2: Nöroinflamasyon Grubu

Grup 3: Topo II β + Grubu

Grup 4: Topo II β + Nöroinflamasyon Grubu

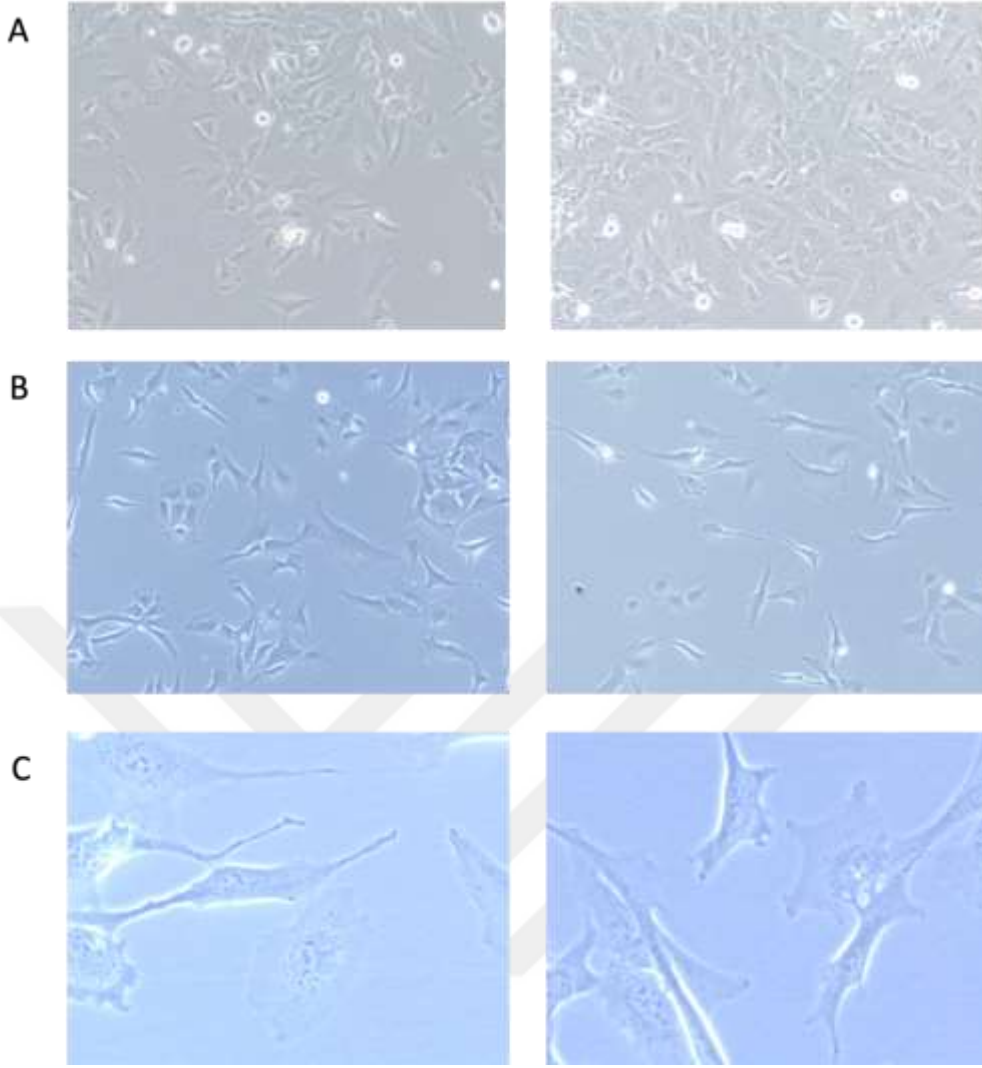
Tablo 6: Deney gruplarına günlere göre yapılan uygulama planı

	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4
-36			Lipofectamine 3000 ile topoII β plazmitinin transfeksiyonu	Lipofectamine 3000 ile topoII β plazmitinin transfeksiyonu
0	Hücre ekimi	Hücre ekimi	FACS ile ayrıştırılan TopoII β ⁺ hücrelerin ekimi	FACS ile ayrıştırılan TopoII β ⁺ hücrelerin ekimi
+24	Medium yenileme	IFN γ ile Medium Yenileme	Medium Yenileme	IFN γ ile Medium Yenileme
+48		Uygulama yok		
+72		Akış Sitometrisi ile analiz		

4. BULGULAR

4.1. HMC3 Hücre Hattının Kültürü

HMC3 hücreleri kültür ortamında takip edildi ve yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda %10 FBS, %1 l-glutamine, %1 sodyum pirüvat ve 1 mg/ml primocin içeren MEM ile %5 CO₂, 37 °C sıcaklık şartlarında olması gereken morfolojiyi gösterdi. Hücre hattı normal koşullar (ATCC' nin önerdiği kültür şartları) altında heterojen morfolojiye sahip olduğu görüldü. Aynı şartlar altında Şekil 10'da görüldüğü üzere amoeboid, çubuksu; yuvarlak, büyük ve dinlenme morfolojine sahip hücreler bir arada görülmekteydi.

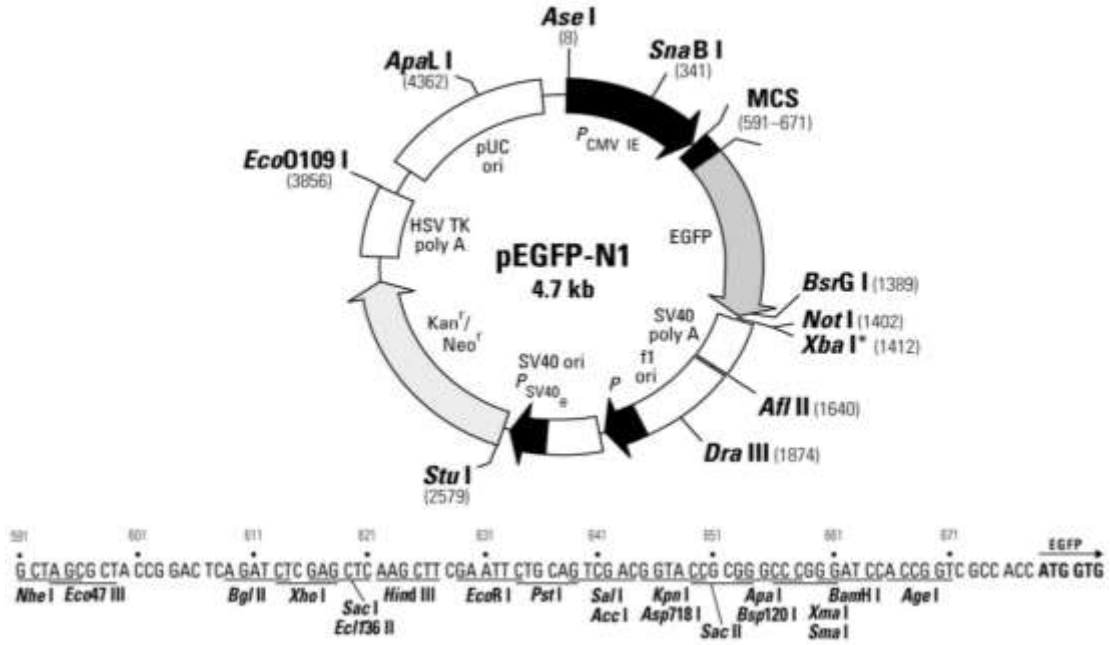


Şekil 10: HMC3 hücre hattının kültür şartlarında 10x ve 40x objektif altında (Zeiss, Zen 3.3) morfolojileri, A) yoğun B) seyrek ekilmiş 10X görüntüleri, C) 40X objektifte alınmış görüntüler.

Şekil 10 A ve B’de görüldüğü üzere HMC3 hücrelerinin yoğun ve seyrek ekiminde ciddi bir morfolojik farklılık görülmüştür. Bu sonuç ATCC’ nin hücre morfolojisi hakkındaki literatür bilgisiyle örtüşmektedir. Bu nedenle hücrenin istenilen morfolojisinin yoğun ekim ile olduğunu teyit ettikten sonra hücreler $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ yoğunlukta ve %10 FBS içeren ortamda kültürlendi. Haftada iki kere pasaj yapıldı ve diğer günler besiyeri yarı yarıya yenilenerek taze tutuldu.

4.2. Topo IIB Plazmid İzolasyonu ve Teyiti

Topo II β genini içeren pEGFP-N1 plazmidi, Okayama Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Prof. Tsutsui tarafından hediye edilmiştir. (Şekil 11).

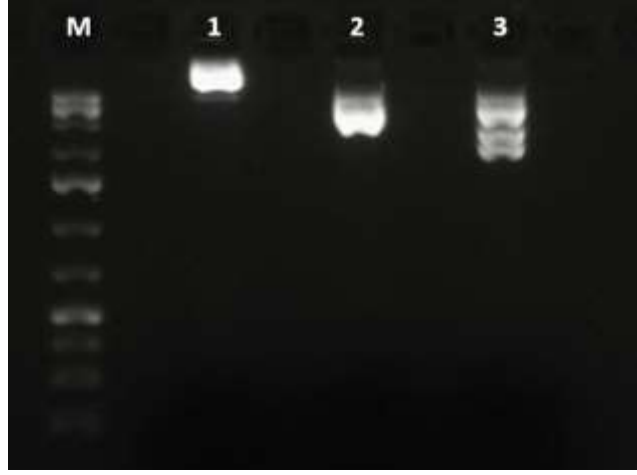


Şekil 11: pEGFP-N1 (4.7 kb) vektörünün haritası

PEGFP-topo II β plazmidi, C-terminaline kaynaşmış gelişmiş yeşil floresan protein (EGFP) sekansı ile tam uzunlukta sıçan topo II β 'yı kodlar

EGFP-N1 plazmidi, CompactPreb Plazmid Maxi Kit (Qiagen,128663) ile üreticinin talimatları takip edilerek izole edildi. İzole edilen plazmid DNA'sının konsantrasyonu Fluostar Omega kullanılarak ölçüldü. Plazmit konsantrasyonu 1,51 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi.

İzole edilen plazmit DNA'sı farklı restriksiyon enzim kombinasyonları (XhoI, SmaI, BamHI) ile kesildi %1' lik agaroz jelde yürütülerek (Şekil 12) doğrulandı.

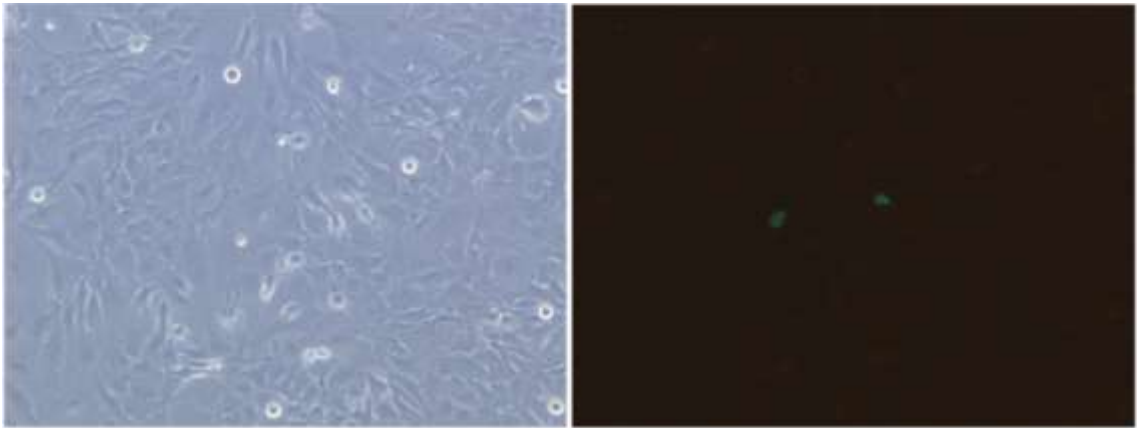


Şekil 12: Farklı restriksiyon enzim kombinasyonları ile TOP2B Plazmit DNA'nın kesimi
M:Marker 1: TOP2B plazmiti, 2: XhoI+SmaI, 3:XhoI+BamHI

4.3. HMC3 Hücre Hattında Topo II β Geninin Aşırı İfade Edilmesi

4.3.1. PEI Transfeksiyonu

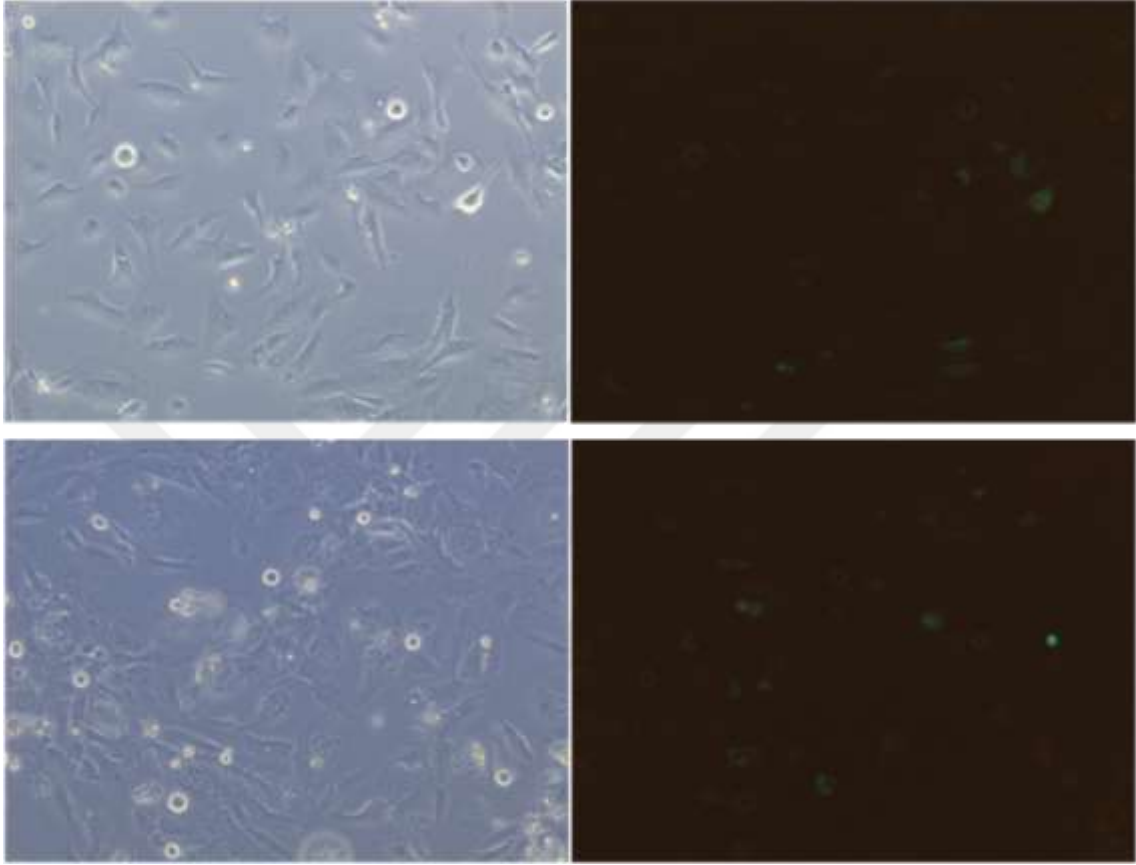
Farklı oranlarda PEI ve plazmit DNA'sı kullanılarak yapılan transfeksiyon optimizasyonları sonucunda en iyi transfeksiyon verimi olan 1:3 oranı (DNA:PEI) kullanıldı. Yapılan denemeler sonucunda en az 5 farklı olandan fotoğraf alınarak transfeksiyon verimi hesaplandı. PEI ile yapılan transfeksiyonlar sonucu verimin en fazla %3 olduğu görüldü (Şekil 13).



Şekil 13: PEI ile kimyasal transfeksiyon yapılan HMC3 hücrelerinin faz ve fleurosan görüntüleri
Transfeksiyon verimi %3 olarak belirlendi. (Görüntüler 10X objektif altında çekildi.)

4.3.2. Lipofectamine LTX Transfeksiyonu

Lipofectamine LTX kiti (Invitrogen™ 15338100) ile üretici firmanın talimatlarına göre farklı konsantrasyonlar kullanılarak yapılan transfeksiyon sonucunda transfeksiyon verimi mikroskop altında takip edildi ve verim %10'un altında bulundu (Şekil x).



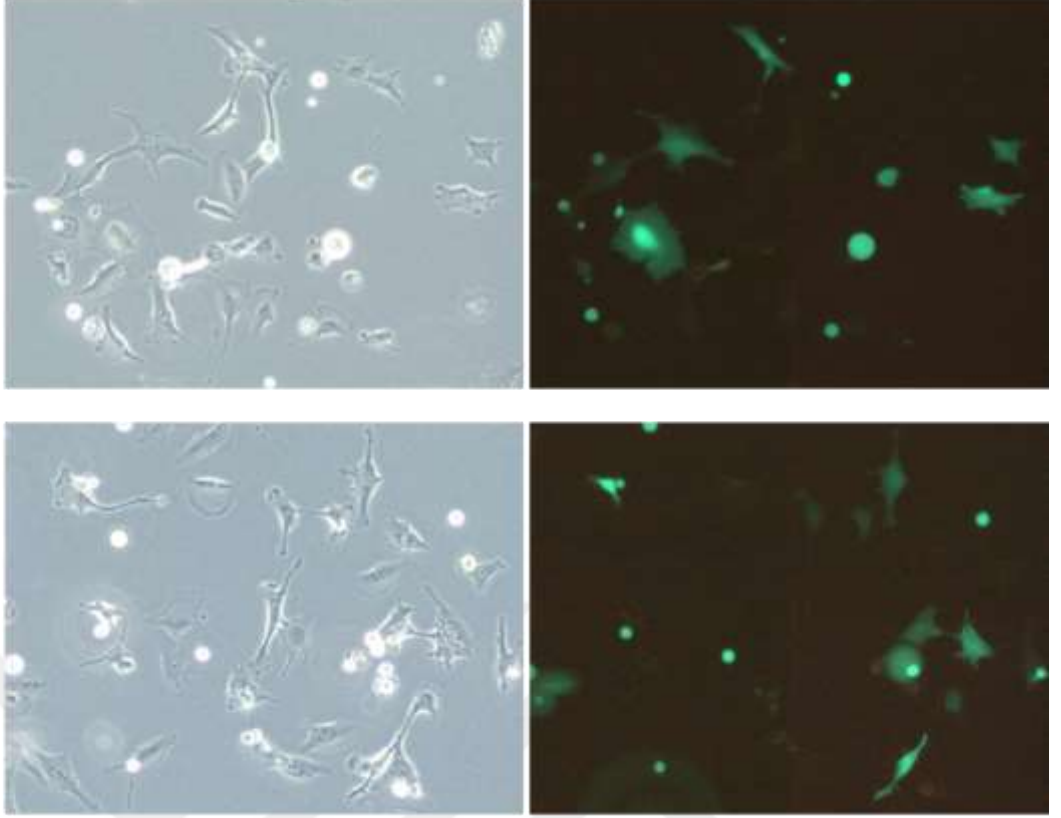
Şekil 14: Lipofectamine LTX 2 µl (üst) ve 3 µl (alt) µl oranlarıyla kimyasal transfeksiyon yapılan HMC3 hücrelerinin faz ve fleurosan görüntüleri (görüntüler 10X objektif altında çekildi.)

4.3.3. NEON Transfeksiyon

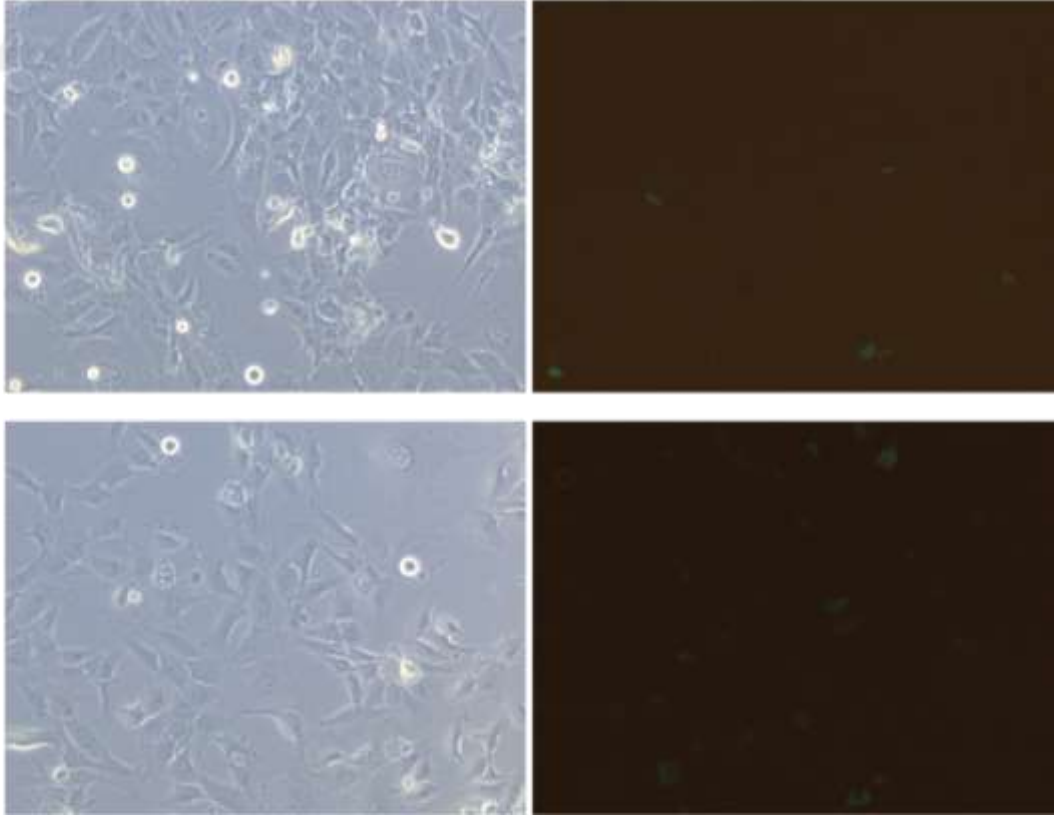
Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) EGFP içeren başka bir plazmit ile kontrollü olarak yapıldı. Denenen 3 farklı protokolden en verimli 3. Protokol olarak belirlendi.

HMC3 hücrelerine kontrol plazmit ve pEGFP-Topo IIβ plazmid transfeksiyonu, GFP ekspresyonu için floresan mikroskobu altında kontrol edildi. Transfeksiyon verimi hesaplandı. Kontrol plazmit için verim %70 civarı hesaplanırken pEGFP-Topo IIβ plazmid transfeksiyonu oldukça düşük verimle sonuçlandı (Şekil 15).

A



B



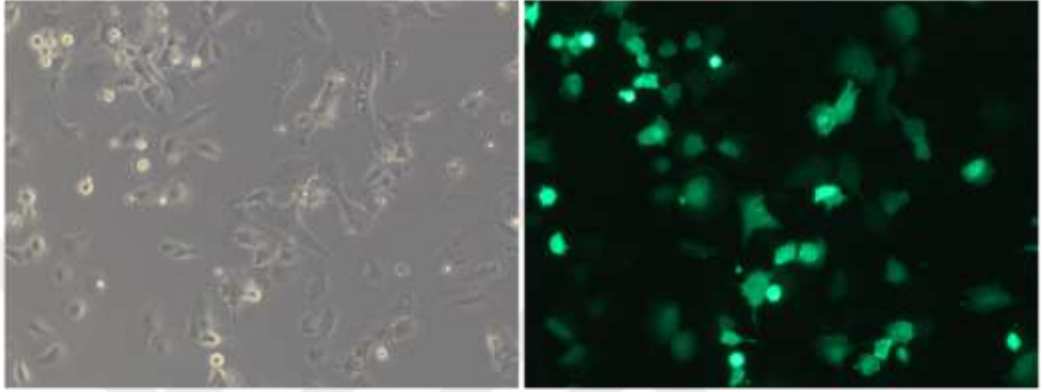
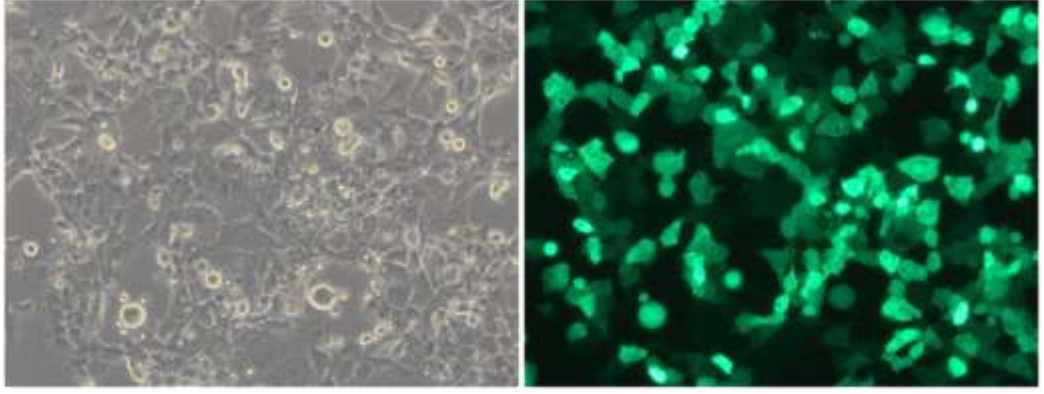
Şekil 15: Protokol 3 ile yapılan kontrol plazmit(A) ve pEGFP-Topo IIβ plazmid (B) transfeksiyonu (görüntüler 10X objektif altında çekildi).

4.3.4. 4D Nucleofector™ system (Lonza)

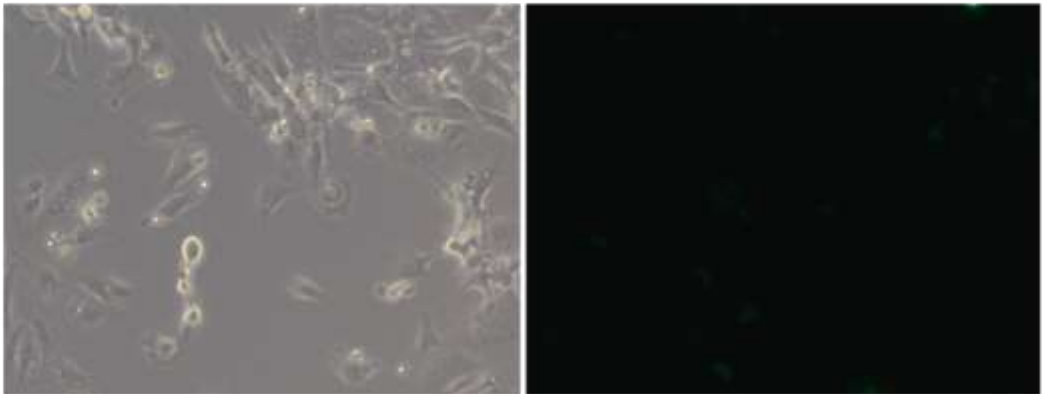
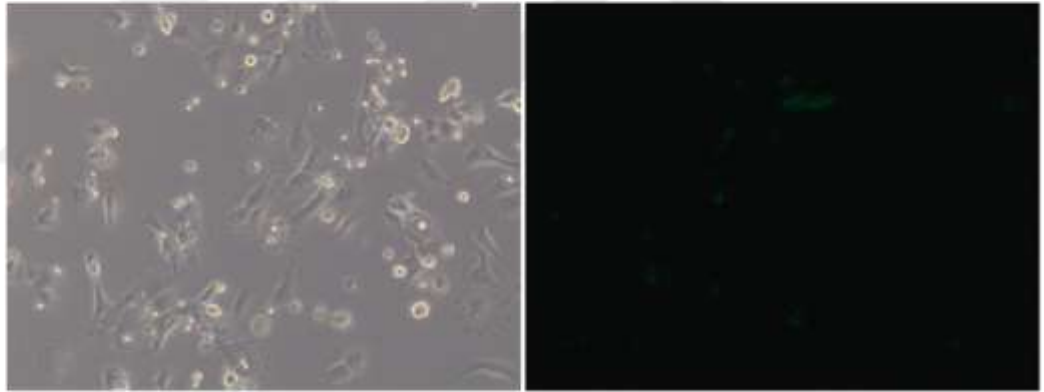
Nucleofector™ sistemi (Lonza) ile yapılan kontrol plazmit(pmaxGFP plazmit) ve pEGFP-Topo II β plazmid transfeksiyonu verimi mikroskop altında gözlemlenerek hesaplandı. Transfeksiyon verimi kontrol plazmit için çok yüksek hesaplanırken Topo II β plazmidi için çok düşük bulundu (Şekil 16). Ayrıca transfeksiyon sonrası hücrelerin sağlığı ve bütünlüğü normal değildi.



A



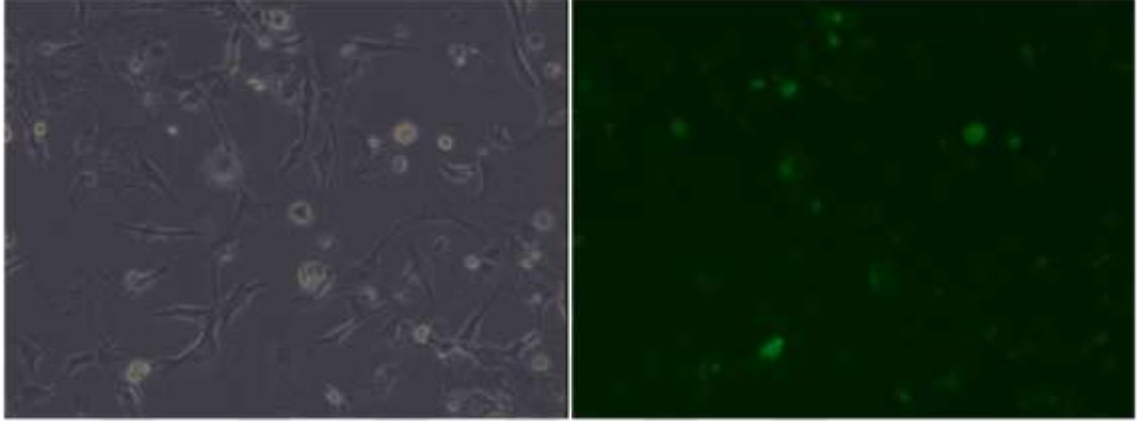
B



Şekil 16: HEPG programı ile yapılan pmaxGFP plazmit (üst) ve pEGFP-Topo II β plazmid (alt) transfeksiyonu (görüntüler 10X objektif altında çekildi).

4.3.5. Lipofectamine 3000 ile Transfeksiyon

Lipofectamine 3000 (Invitrogen katalog no: L3000-008) ile yapılan transfeksiyon verimi hesaplamak amacıyla floresan mikroskop ile takip edildi (Şekil 17). Transfeksiyon verimi en az 5 farklı alandan alınan görüntüler ile yaklaşık %15 olarak hesaplandı.



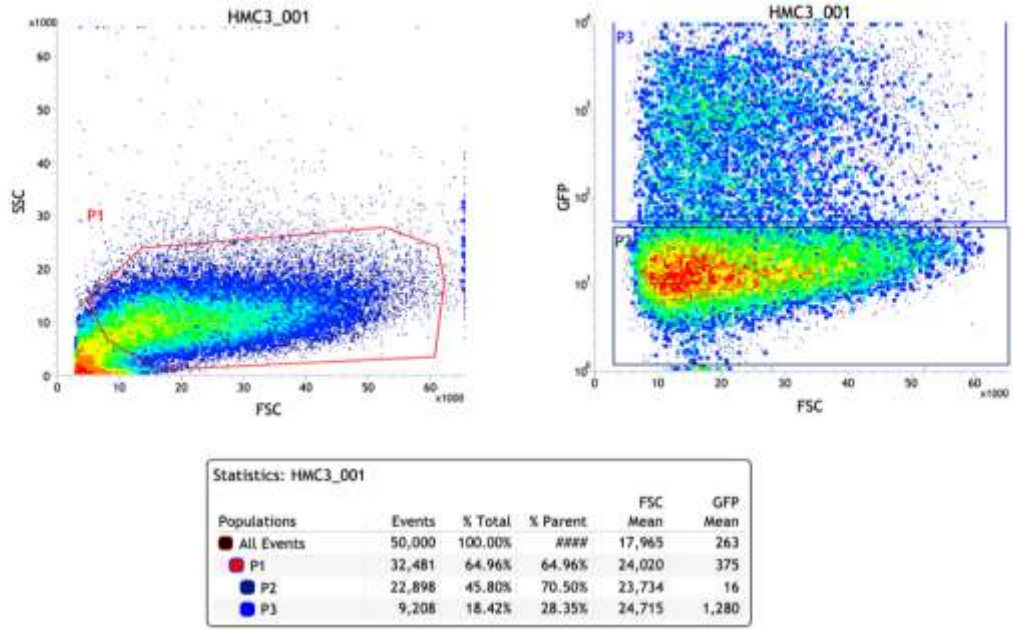
Şekil 17: Lipofectamine 3000 reaktifi ile transfecte edilen hücrelerin faz ve floresan görüntüleri. Görüntüler 10X objektifte çekilmiştir.

4.4. Topo II β Aşırı İfade Eden Hücrelerin Ayırıştırılması

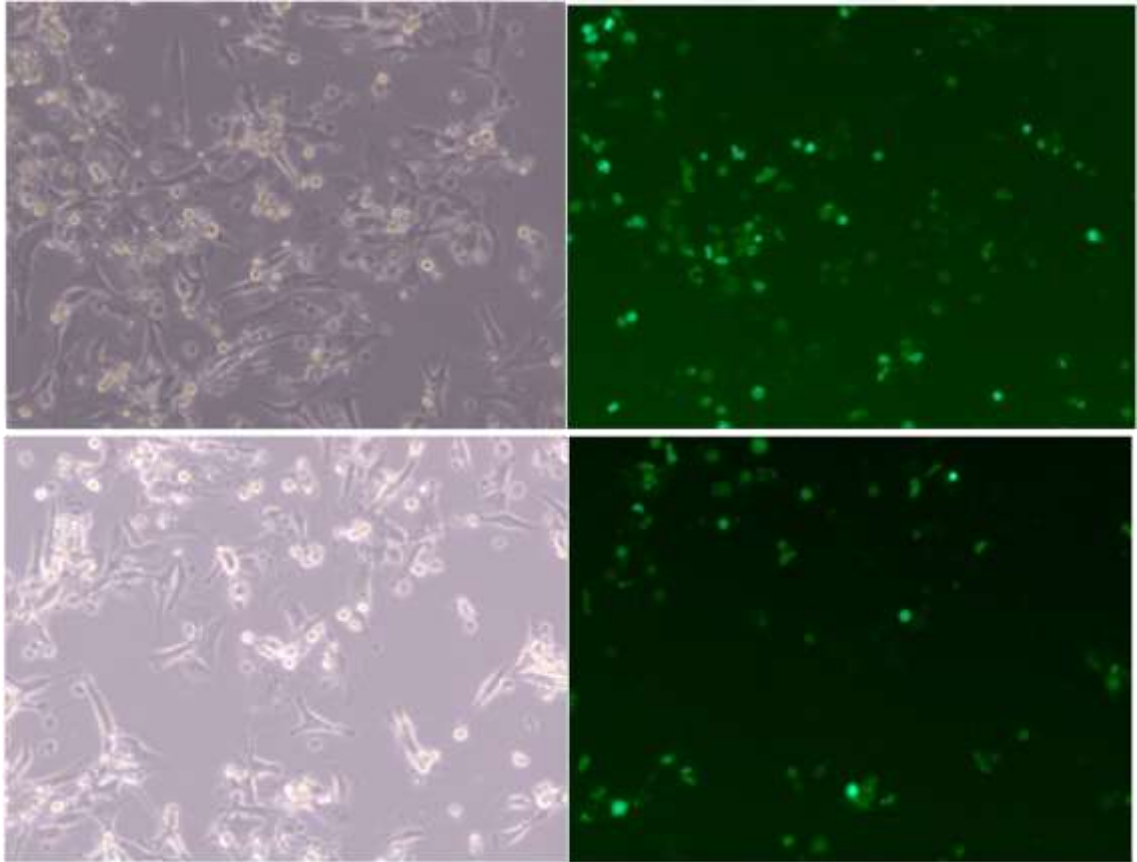
Medipol Üniversitesi REMER bünyesindeki BD Influx™ Cell Sorter cihazı ile pEGFP-Topo II β plazmid açısından pozitif ve negatif olan hücreler birbirinden ayırıştırıldı.

HMC3 hücreleri fiziksel parametrelere (FSC-H/SSC-H) göre tanımlandı, çiftler analizden çıkarıldı (FSC-A/FSC-H) ve EGFP-Topo II β ⁺ hücreleri tanındı.

Yaklaşık 8×10^4 TOPO2B plazmiti içeren HMC3 hücresi elde edildi. Hücrelerin FACS analiz sonuçları Şekil 18, FACS sonrası ekilen hücrelerin morfolojik görüntüleri ve floresan mikroskobu görüntüleri ise Şekil 19’da gösterilmiştir.



Şekil 18: BD Influx™ Cell Sorter cihazı ile ayrıştırılan HMC3 hücrelerinin kapı ayarı ve istatistik bilgileri

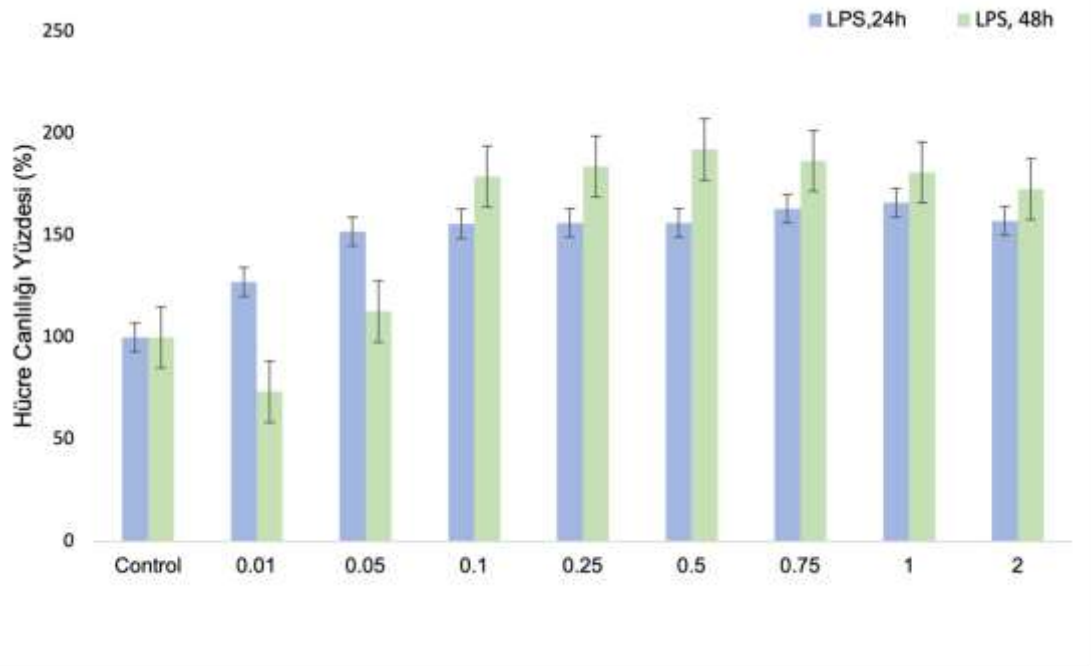


Şekil 19: BD Influx™ Cell Sorter cihazı ile ayrıştırılan HMC3 hücrelerinin faz ve floresan görüntüleri, görüntüler 10X objektif ile çekilmiştir.

4.4. *In vitro* Nöroinflamasyon modeli oluşturma optimizasyonları

4.4.1. LPS Sitotoksitesi Analizi

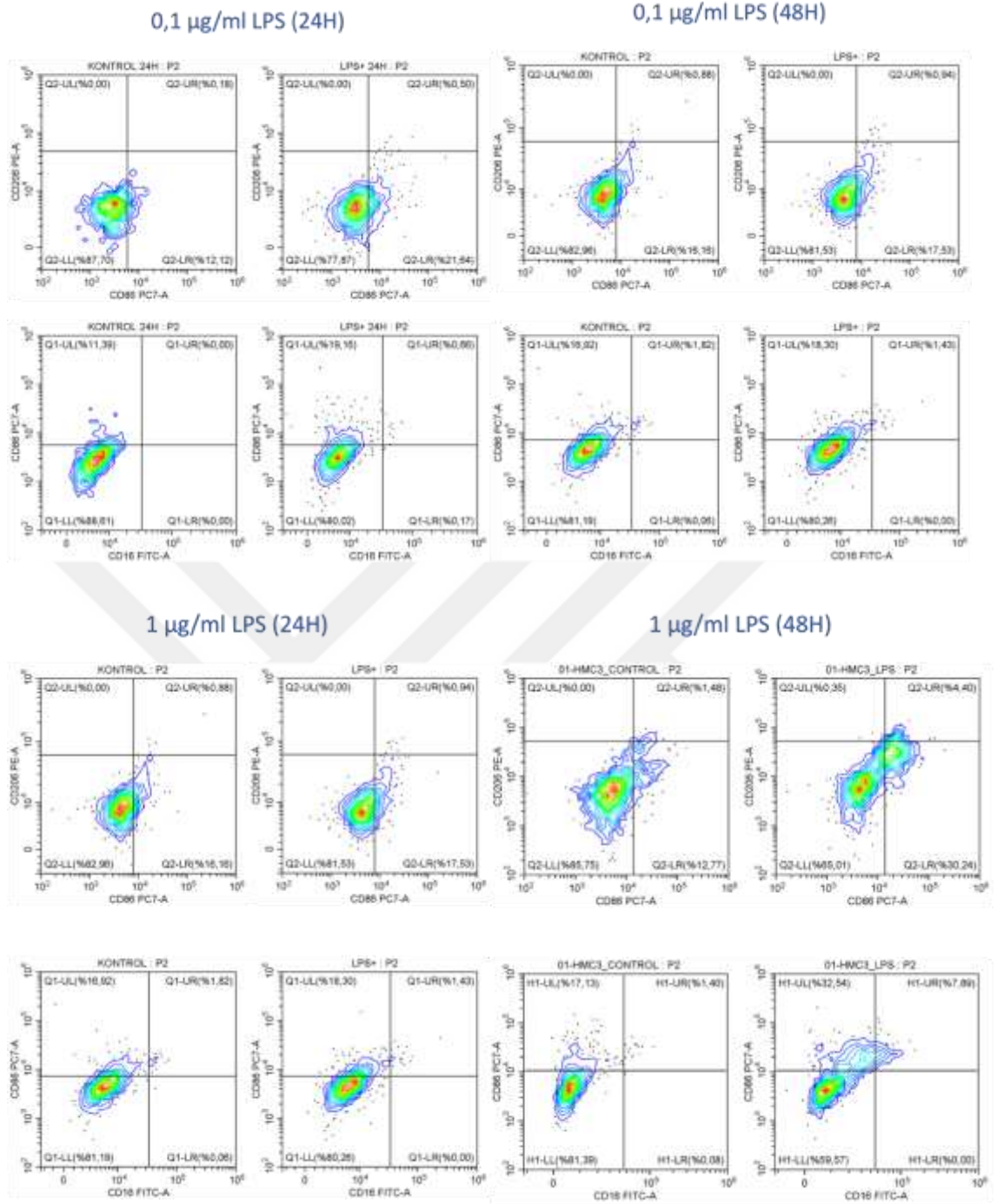
LPS sitotoksitesini ölçmek amacıyla yapılan 24 ve 48 saatlik MTT sonuçları 2 µg/ml'ye kadar LPS' nin HMC3 hücreleri için toksik olmadığı görülmüştür (şekil 20). Hatta bu oranlarda LPS'nin HMC3 hücre proliferasyonu üzerinde olumlu etkisi olduğu söylenebilir.



Şekil 20: Farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat uygulanan LPS'nin hücre canlılığına etkisi. 0.01 µg/ml, 0.05 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.75 µg/ml, 1 µg/ml ve 2 µg/ml oranlardaki lipopolisakkarit konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulandıktan sonra MTT analizi ile yapılan hücre canlılığı ölçümleri.

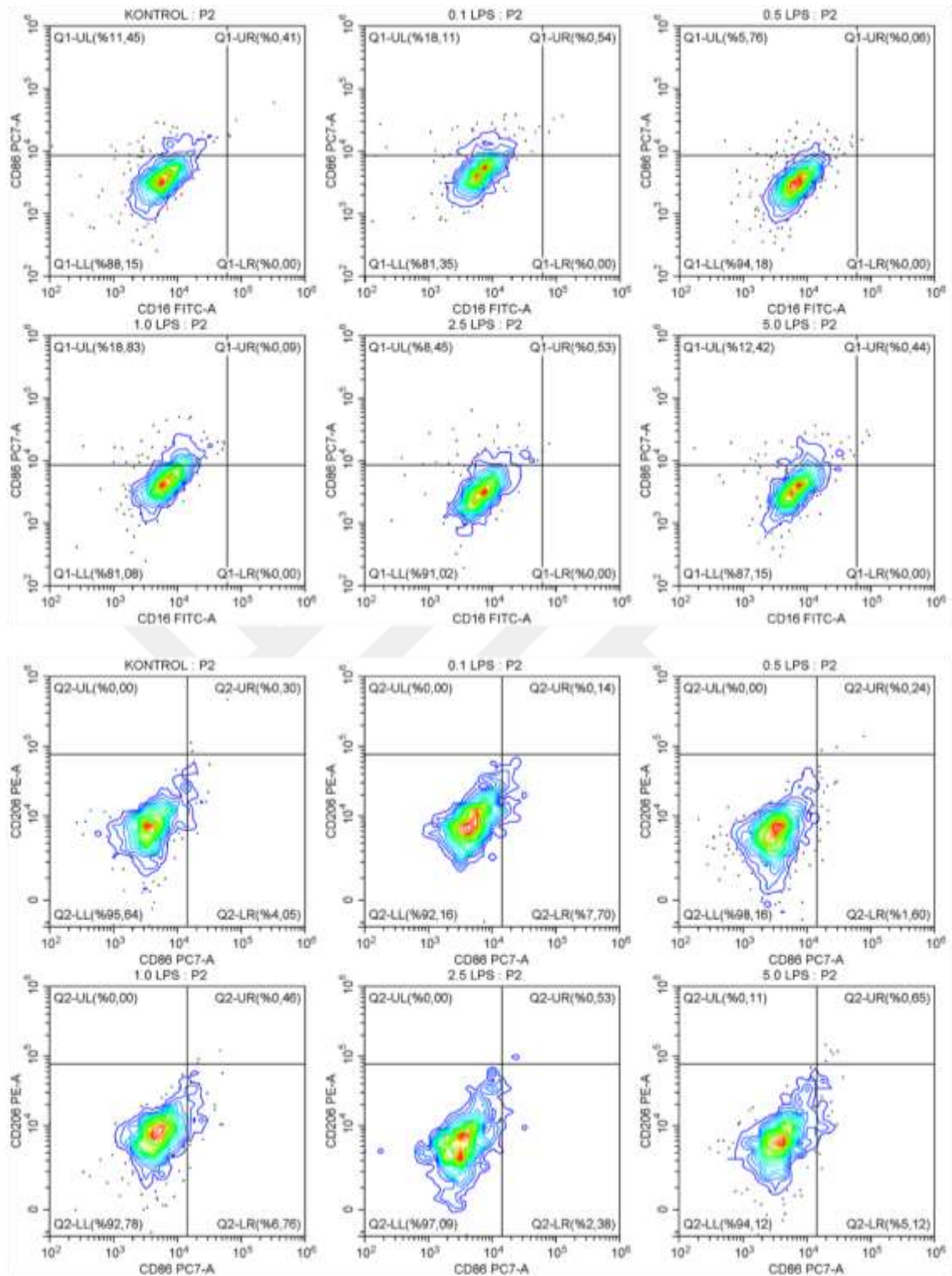
4.4.2. LPS uygulamaları ve İnflamasyon Belirteçlerinin Akış Sitometrisi ile Analizi

LPS' nin farklı konsantrasyonları ile yapılan 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonucunda HMC3 hücrelerinin indüklenmiş morfolojilerini göstermek için CD206, CD16, CD86 ve CD45 antikorları kullanıldı. Yapılan boyamaların analizler sonucunda LPS' nin en etkin konsantrasyonları olarak 0,1 µg/ml ve 1 µg/ml bulundu. Yapılan analizleer sonucunda M1 belirteci olan CD86'nın anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ().

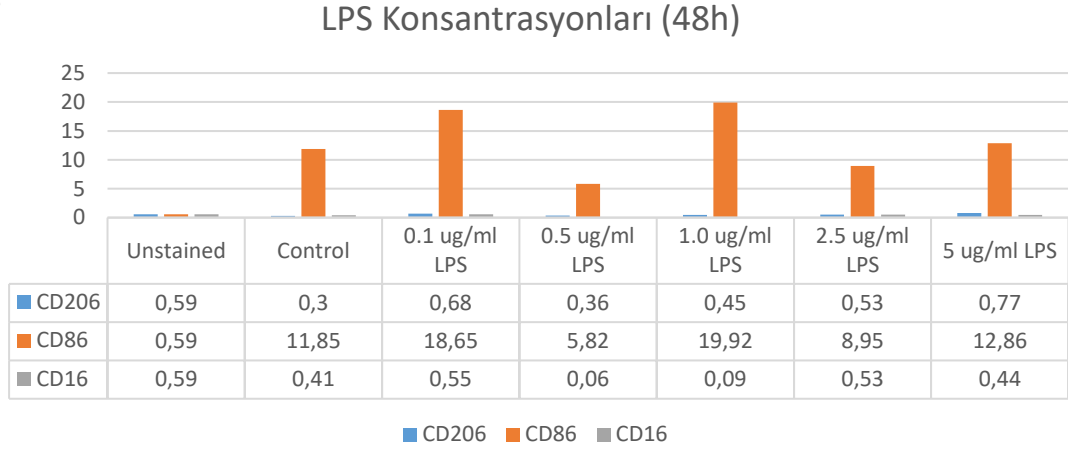


Şekil 21: Literatürde en yaygın kullanılan LPS konsantrasyonları olan 0,1 µg/ml ve 1 µg/ml LPS konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik uygulamalarının akış sitometrisi ile analizi

A



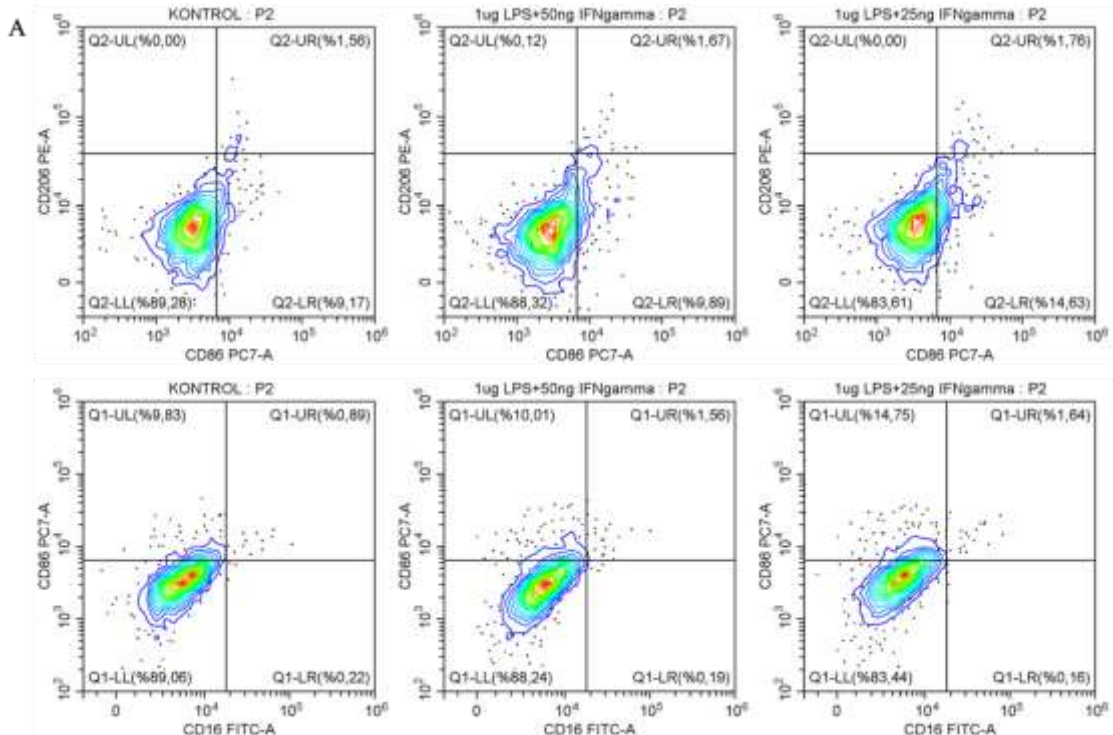
B



Şekil 22: 0.1 µg/ml; 0.5 µg/ml; 1 µg/ml; 2.5 µg/ml; 5 µg/ml konsantrasyonlarda LPS ile 48saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206 ve CD86 yüzey markerları ile boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri (A) ve sütun grafiği gösterimi(B).

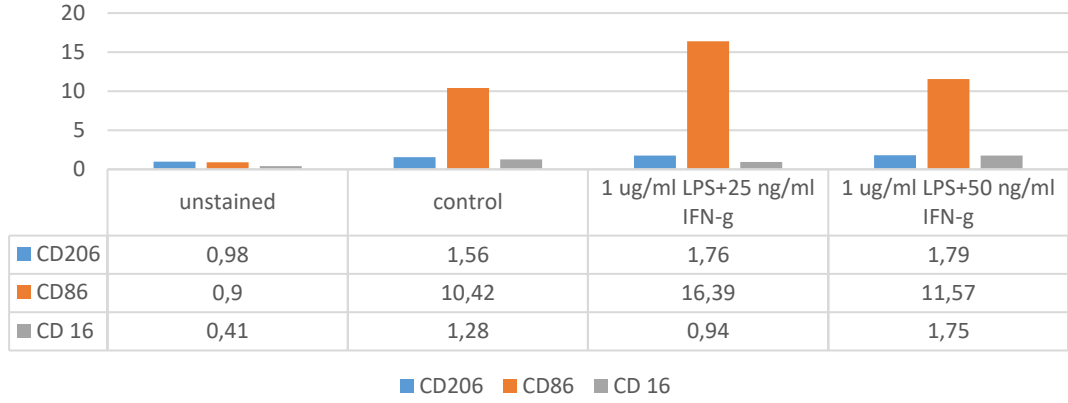
4.4.3. LPS ve IFN-γ uygulamaları ve İnflamasyon Belirteçlerinin Akış Sitometrisi ile Analizi

LPS optimizasyon çalışmaları kapsamında karar verilen 1 µg/ml LPS'ye ek olarak 25 ng/ml ve 50 ng/ml IFNγ kullanıldı. 24 saatlik uygulama sonucunda IFNγ'nın yüksek konsantrasyonunun beklenenin aksine daha düşük bir nöroinflamasyon artışına sebep olduğu görüldü (şekil 23).



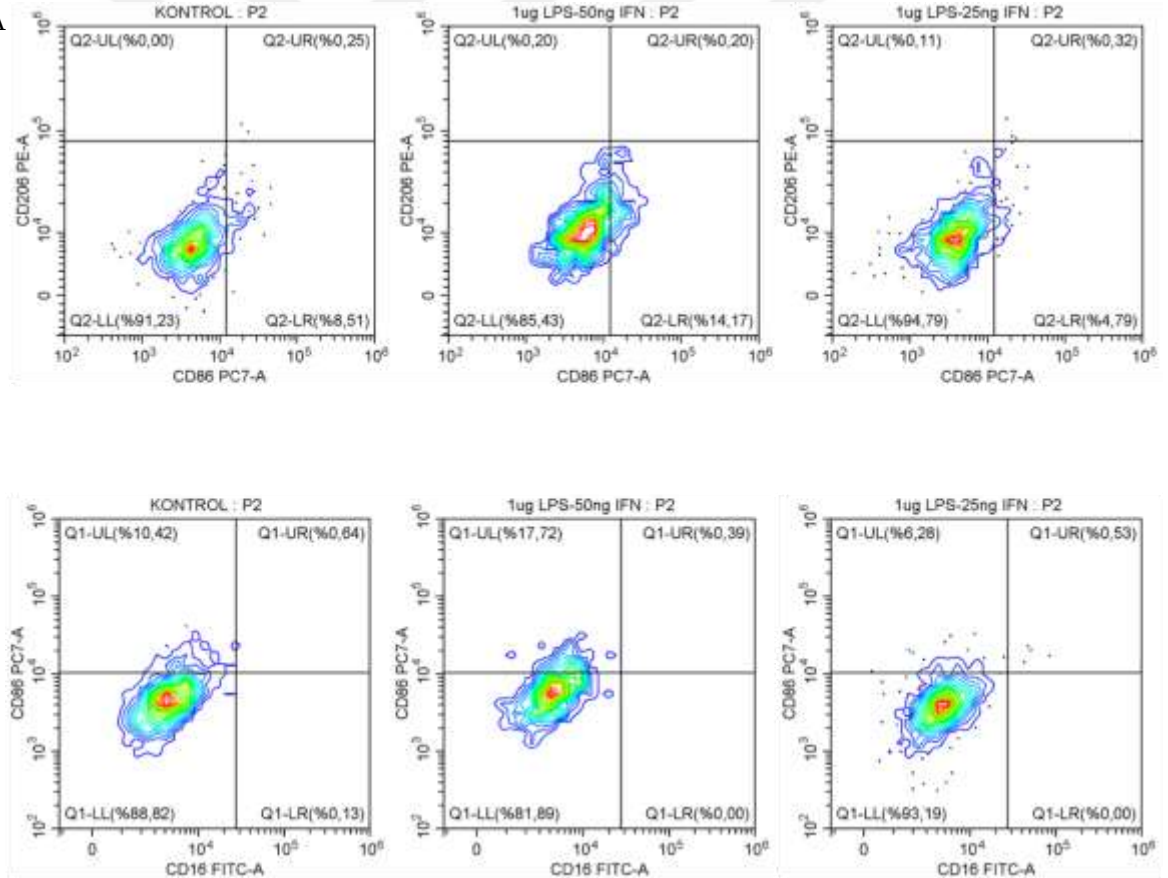
B

LPS+IFN (24H)

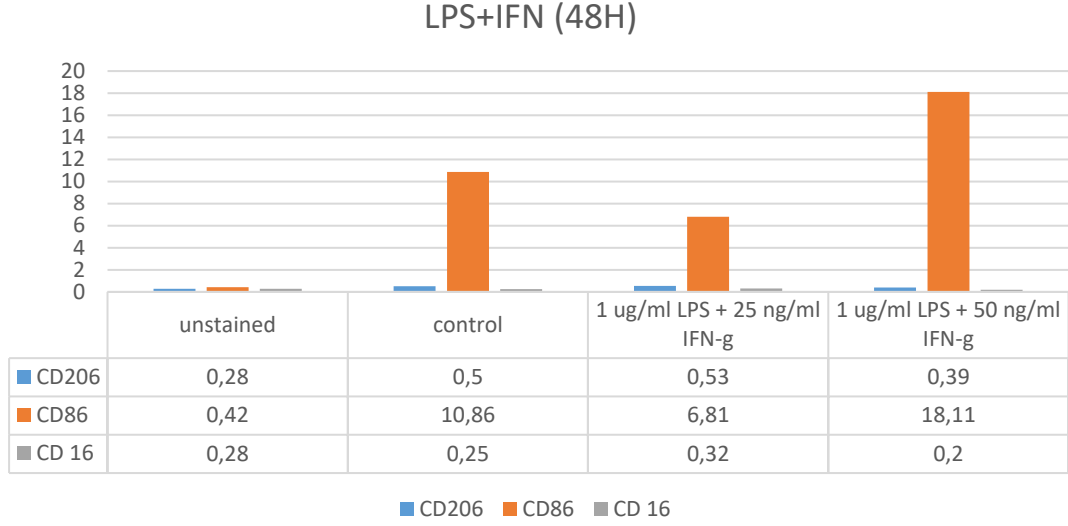


Şekil 23: 1 µg/ml LPS + 25 ng/ml IFN γ , 1 µg/ml LPS + 50 ng/ml IFN γ konsantrasyonlarda LPS ve IFN γ birlikte 24 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206 ve CD86 yüzey markerları ile boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri (A) ve sütun grafiği gösterimi (B).

A



B

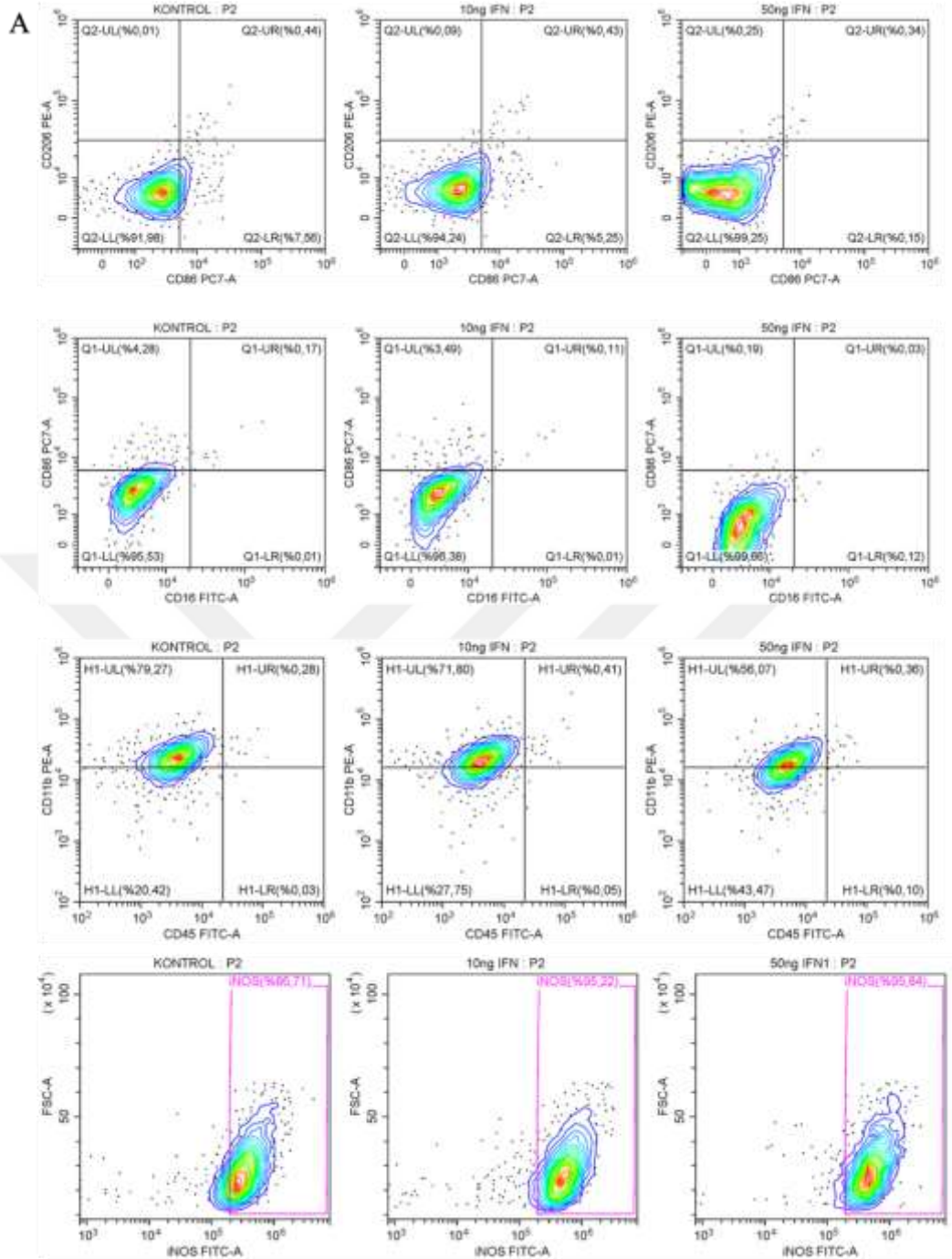


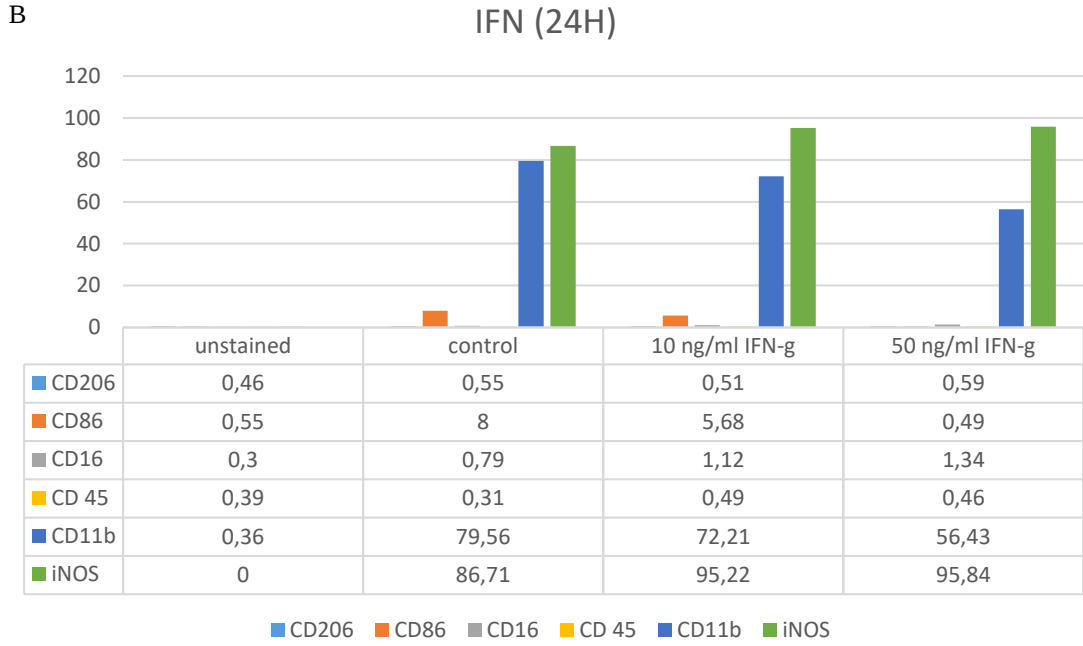
Şekil 24: 1 µg/ml LPS + 25 ng/ml IFN γ , 1 µg/ml LPS + 50 ng/ml IFN γ konsantrasyonlarda LPS ve IFN γ birlikte 48 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206 ve CD86 yüzey markerları ile boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri (A) ve sütun grafiği gösterimi (B).

4.4.4. IFN-gamma uygulamaları ve İnflamasyon Belirteçlerinin Akış Sitometrisi ile Analiz

Nöroinflamasyon optimizasyon çalışmaları kapsamında 10 ng/ml IFN γ kullanıldı. 24 saatlik uygulama sonucunda şekil 25'te de görüldüğü üzere IFN γ 'nın yüksek konsantrasyonunun beklenenin aksine düşük konsantrasyondan daha etkili olmadığı görüldü. Ayrıca IFN γ 'nın tek başına kullanılmasının daha iyi olmadığını endojen aktivatör olarak LPS'nin varlığının daha önemli olduğu görüldü.

Tüm bu bulgulara ek olarak nöroinflamasyon modellerinde iNOS seviyesinin kontrole göre artış gösterdiği görüldü. Bu boyamalarda kullanılan CD11b miktarının yüksek olması nedeniyle otofloresan ışımlar elde edildi bu sebeple CD11b'nin artışı anlamlı değildi.





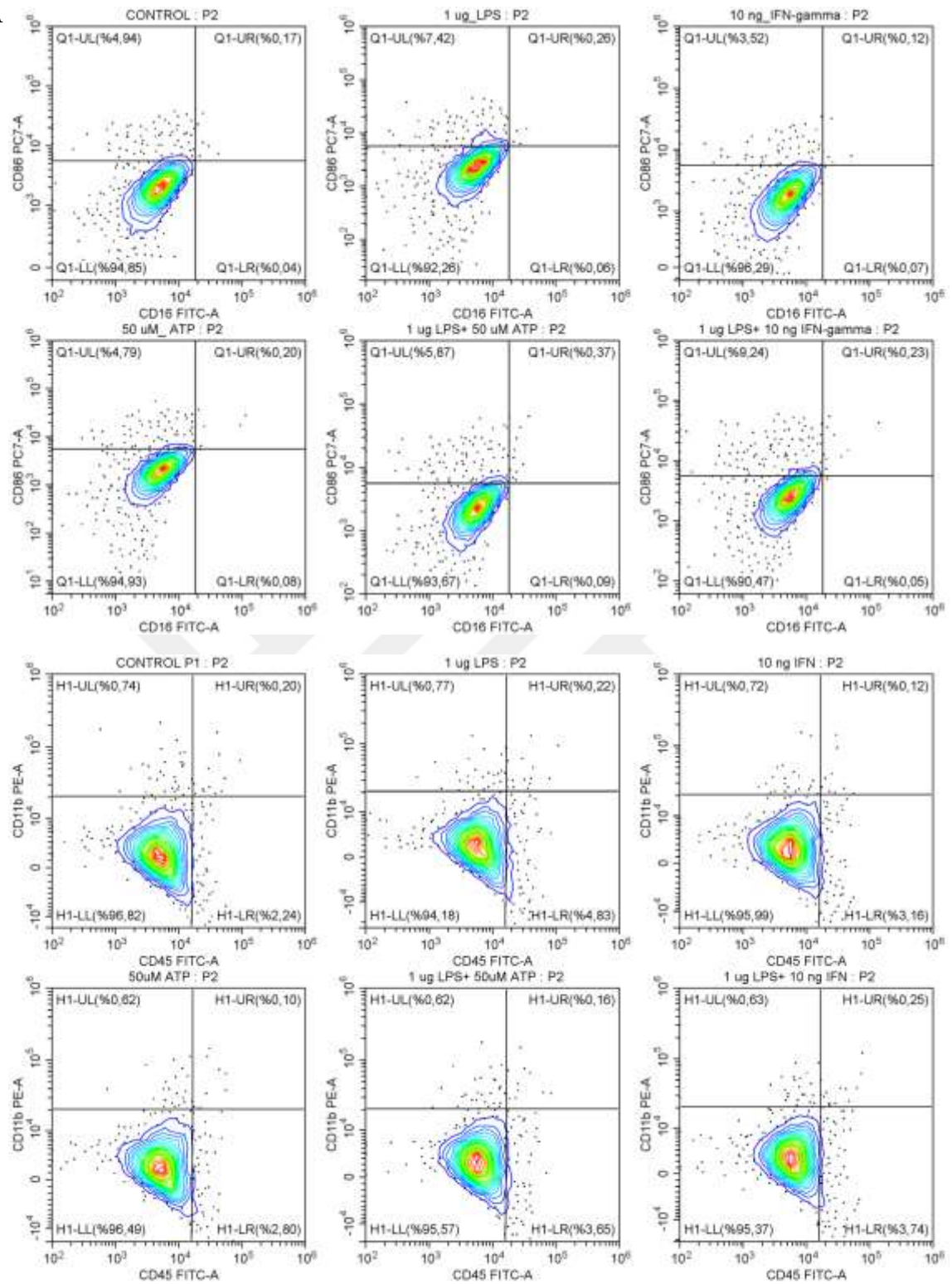
Şekil 25: 10 ng/ml IFN γ , 50 ng/ml IFN γ konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206, CD86, CD45, CD11b ve iNOS ile boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri (A) ve sütun grafiği gösterimi (B).

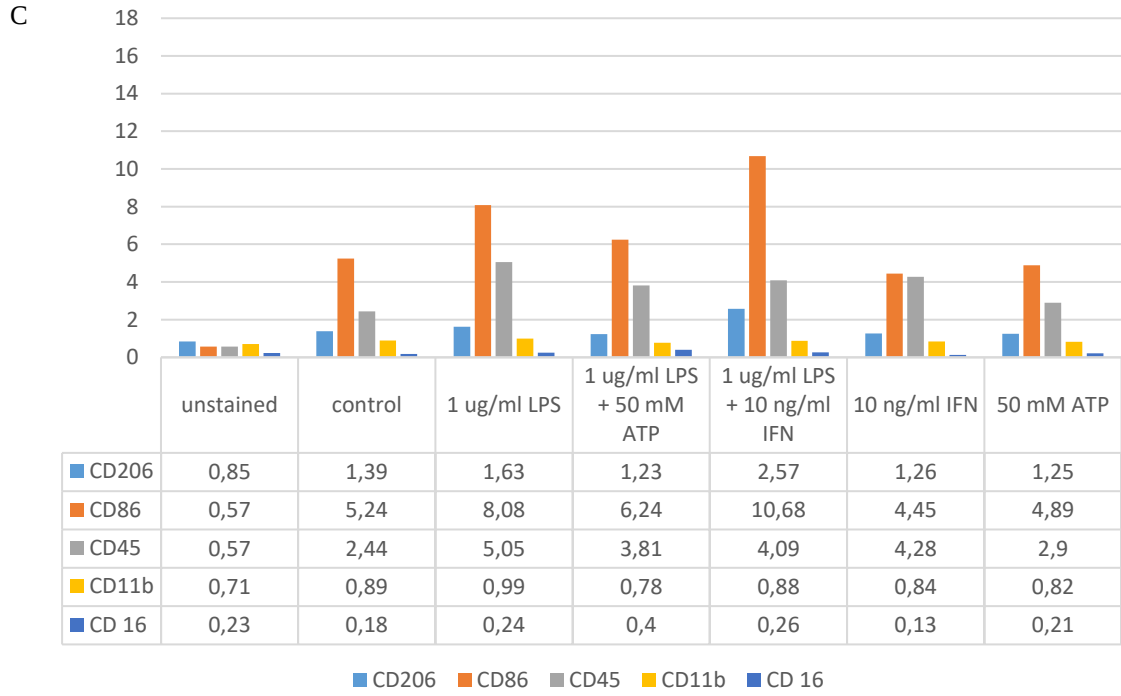
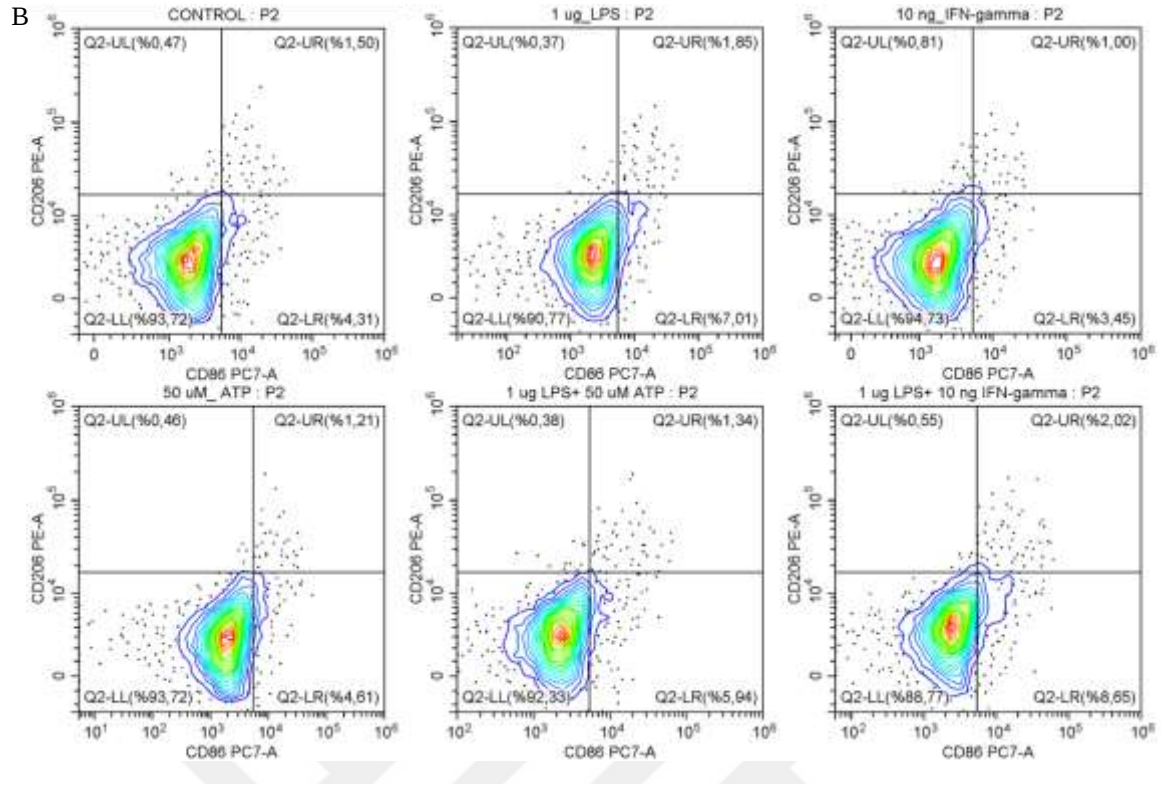
Optimizasyon çalışmaları kapsamında karar verilen 1 μ g/ml LPS ve 10 ng/ml IFN γ ' ek olarak kullanılan 50 mM ATP ile 24 ve 48 saat indüklenen HMC3 hücrelerinde en iyi nöroinflamasyon modelinin 1 μ g/ml LPS ve 10 ng/ml IFN γ 'nin birlikte kullanıldığı modelin CD86 bakımından en yüksek seviyeyi veren modeldi.

Bu çalışmalar sonucunda ATP'nin nöroinflamasyon modeli oluşturmadaki rolü hakkında net bir sonuca ulaşmamıştır.

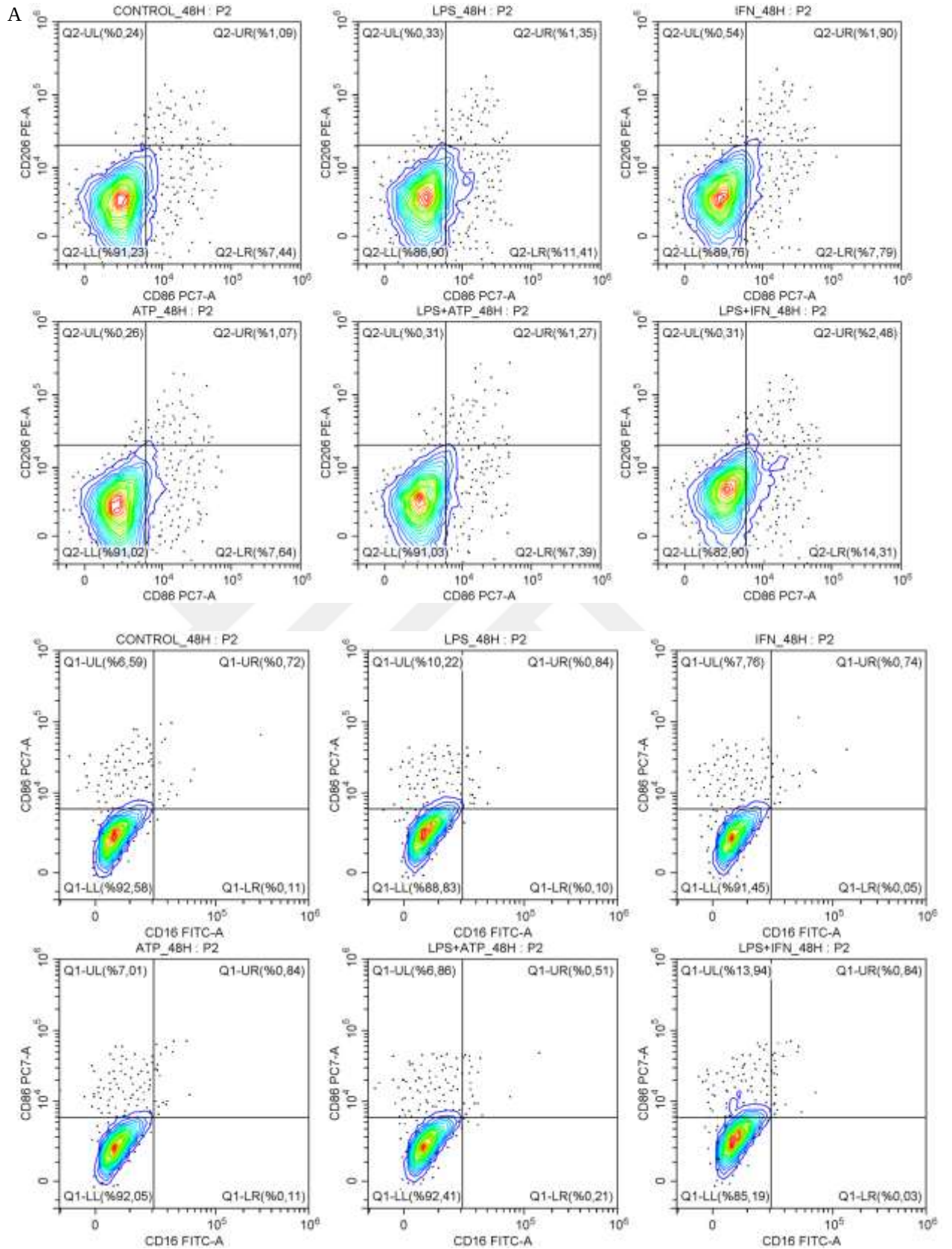
Ayrıca LPS ve IFN γ 'nın birlikte uygulandığı grupta M1'den M2'ye geçiş olarak kabul edilen CD206 ve CD86'nın birlikte artışı diğer gruplar arasında en yüksek olundu.

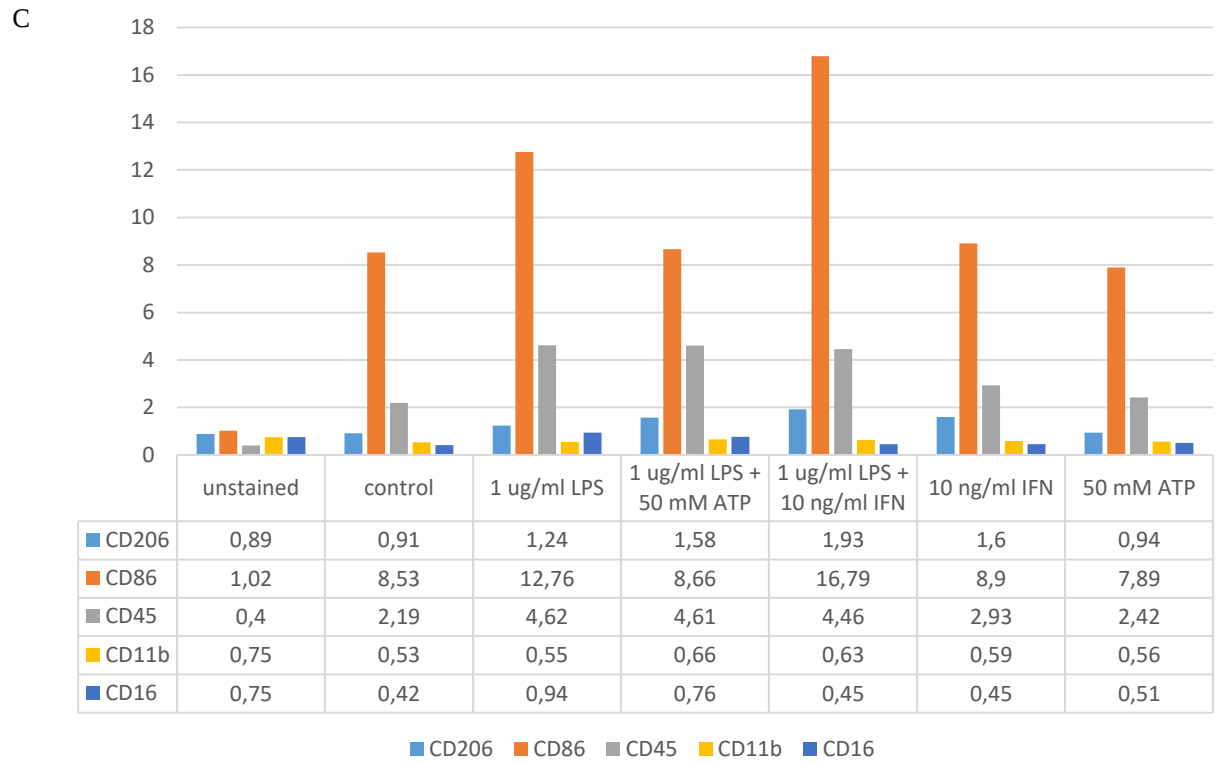
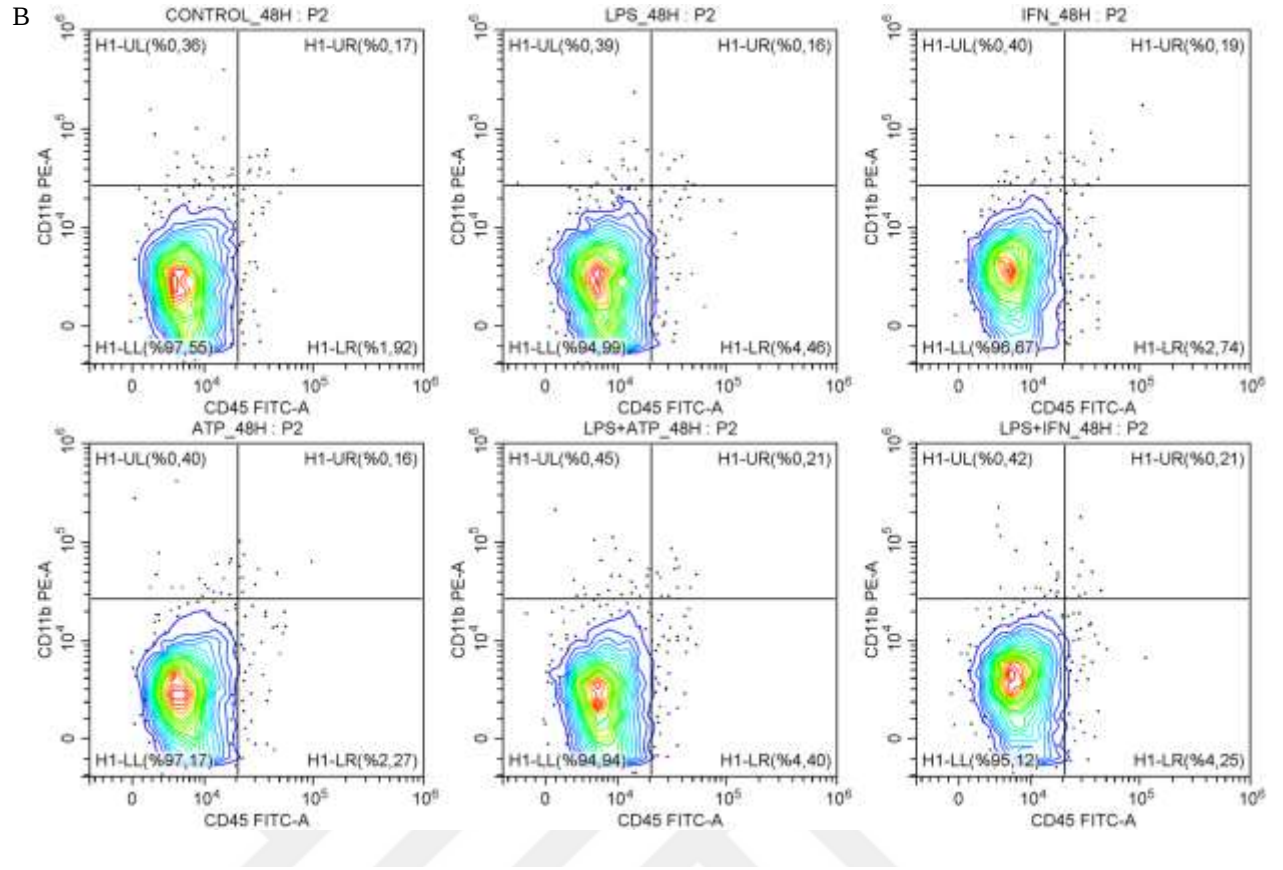
A





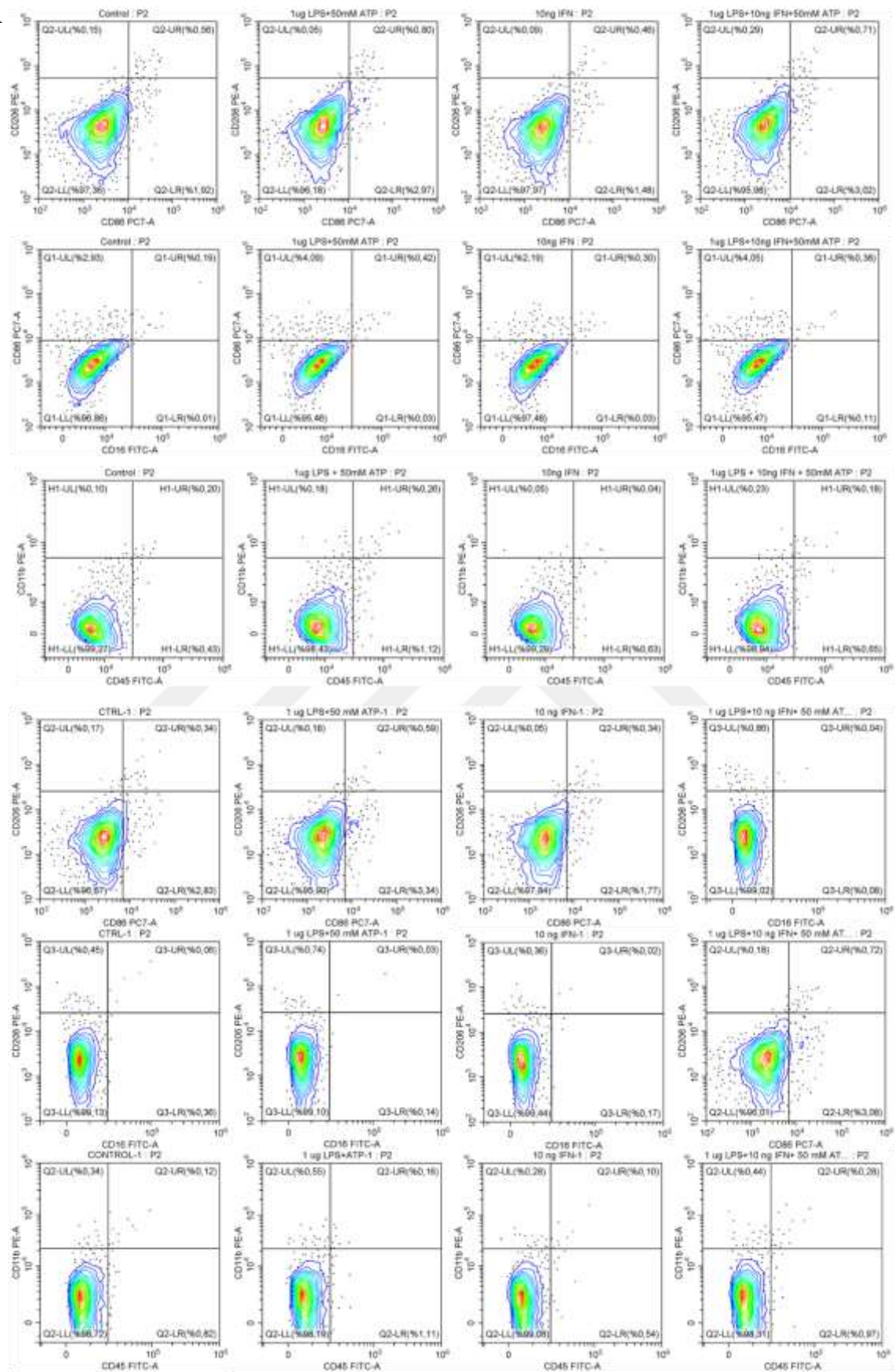
Şekil 26: LPS, IFN γ , ATP konsantrasyonları ve kombinasyonları ile 24 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206, CD86, CD45 ve CD11b boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri (A, B) ve sütun grafiği gösterimi (C).



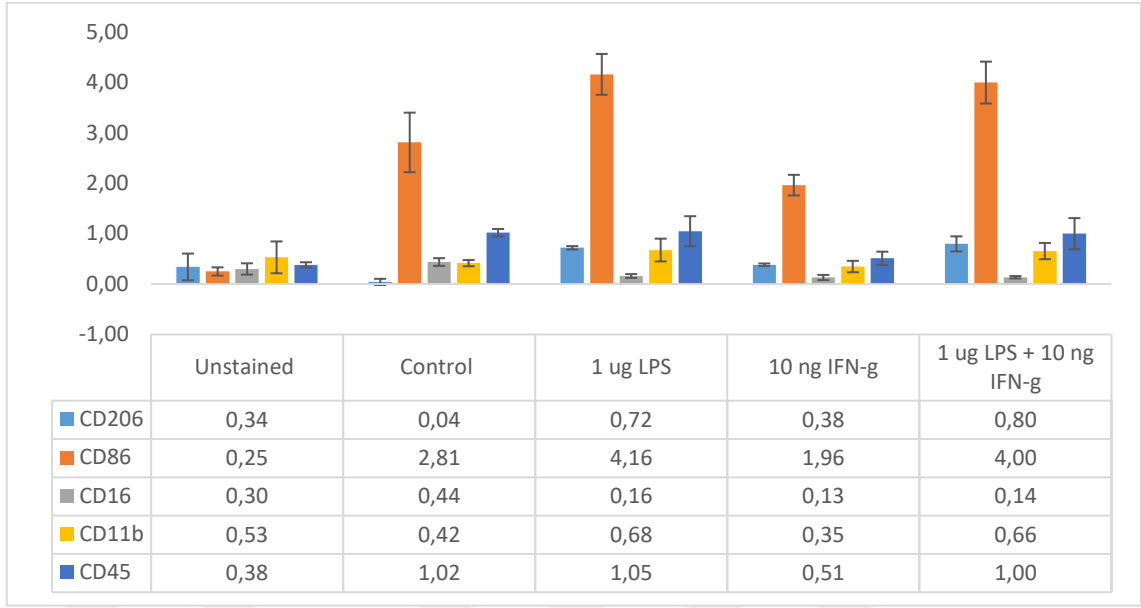


Şekil 27: LPS, IFN γ , ATP konsantrasyonları ve kombinasyonları ile 48 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206, CD86, CD45 ve CD11b boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri ve sütun grafiği gösterimi.

A



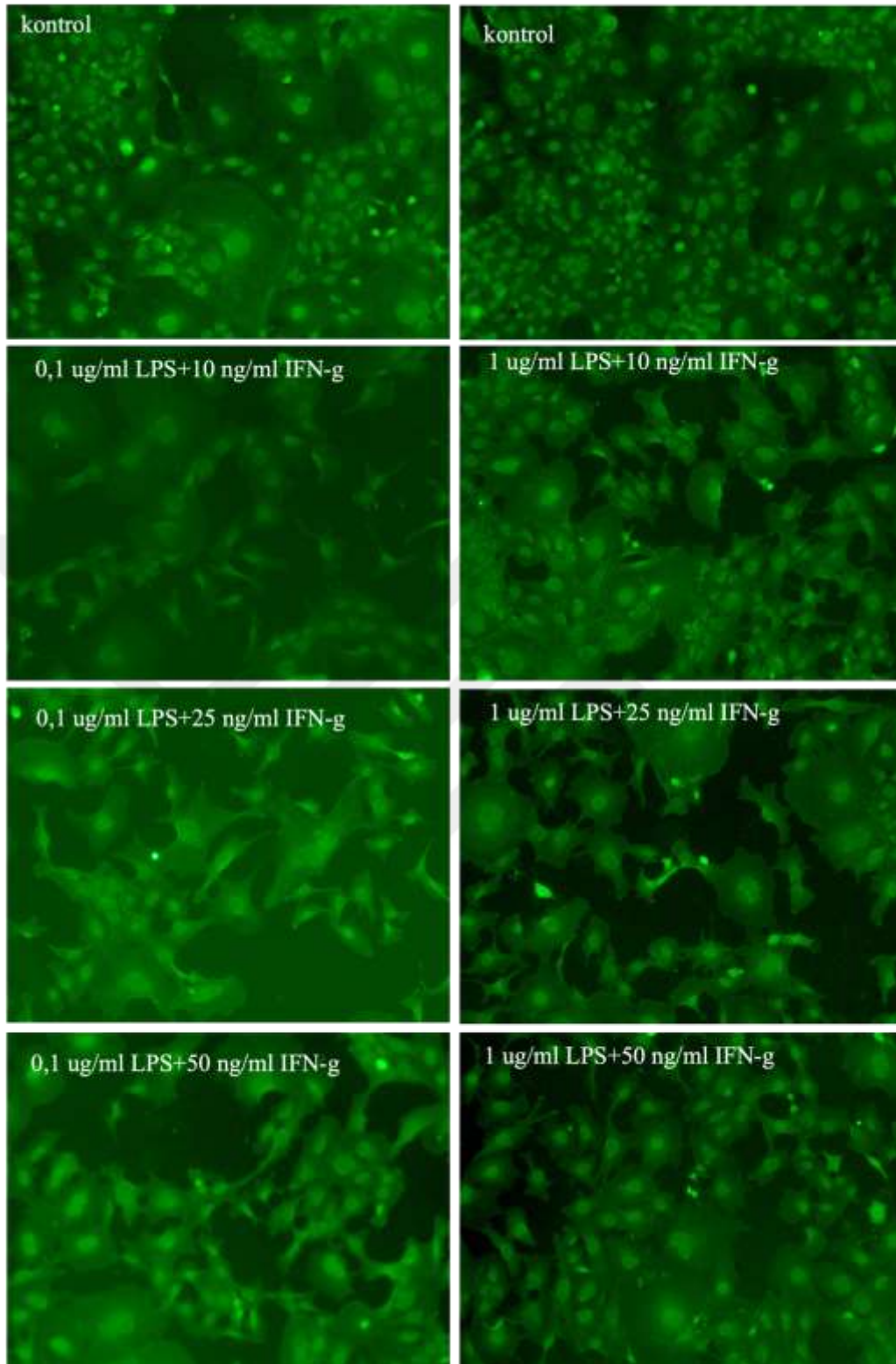
B



Şekil 28: LPS, IFN γ , ATP konsantrasyonları ve kombinasyonları ile 48 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin CD16, CD206, CD86, CD45 ve CD11b boyanması ile yapılan Akış sitometrisi analizleri ve sütun grafiği gösterimi. Bu analiz her parametrenin ikili çalışılması ve ikili okutulması ile yapılmıştır.

4.4.2. LPS ve IFN-gamma uygulamaları ve İnflamasyon Belirteçlerinin İmmün Boyama ile Analizi

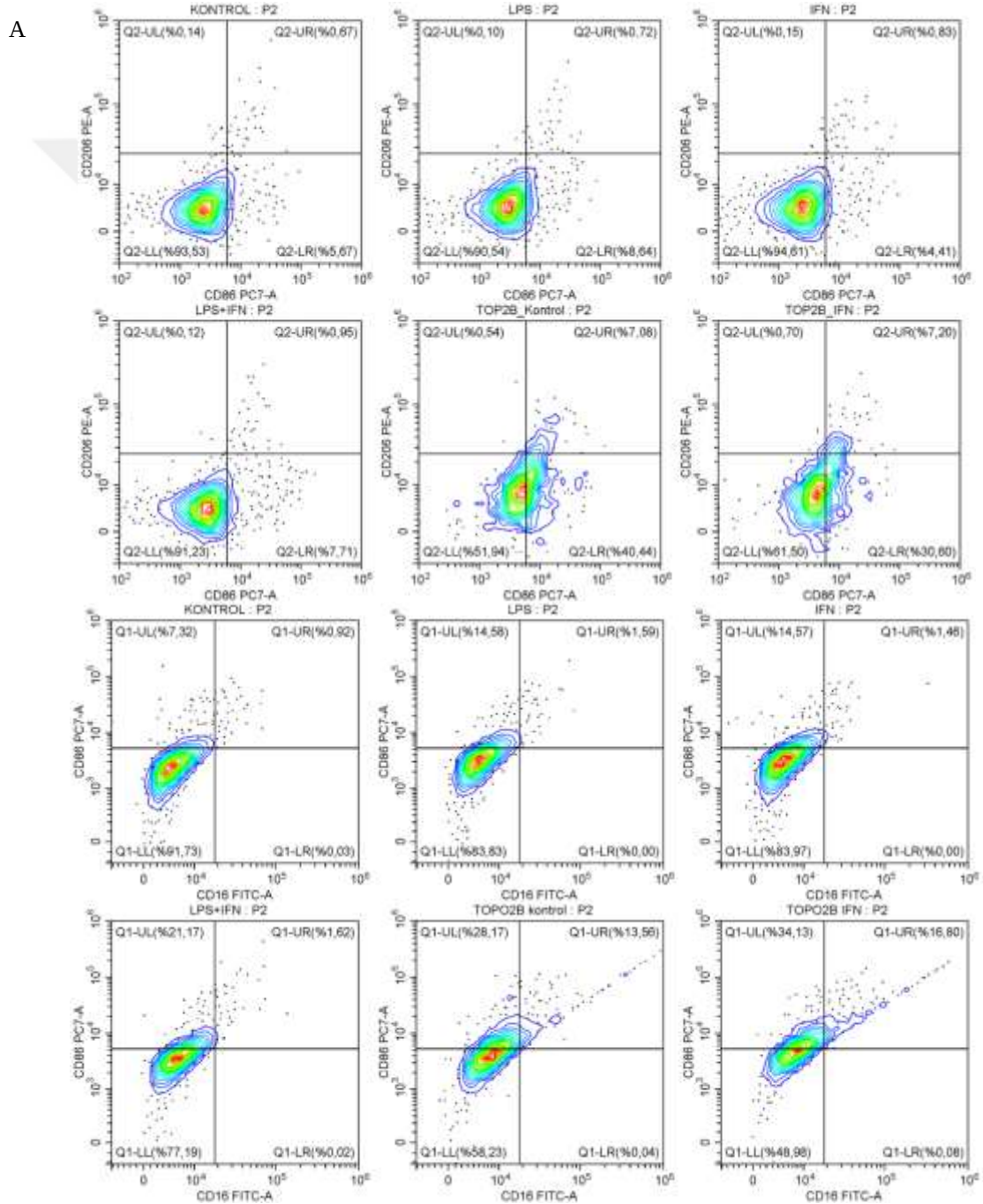
Nöroinflamasyon durumunda HMC3 hücrelerinde artan iNOS miktarını göstermek için yaptığımız boyama sonucu Şekil 29' ta verilmiştir. Boyama sonuçları M1 ve M2 morfolojilerinin gösterimi hakkında oldukça verimliydi. Nöroinflamasyon modellerinde var olan M1, M2 formunda ciddi bir artış görülmedi fakat dallanmış dinlenme formu, tam çubuk formu, amoeboid form ve büyük yuvarlak formların netleştiğini görüldü.



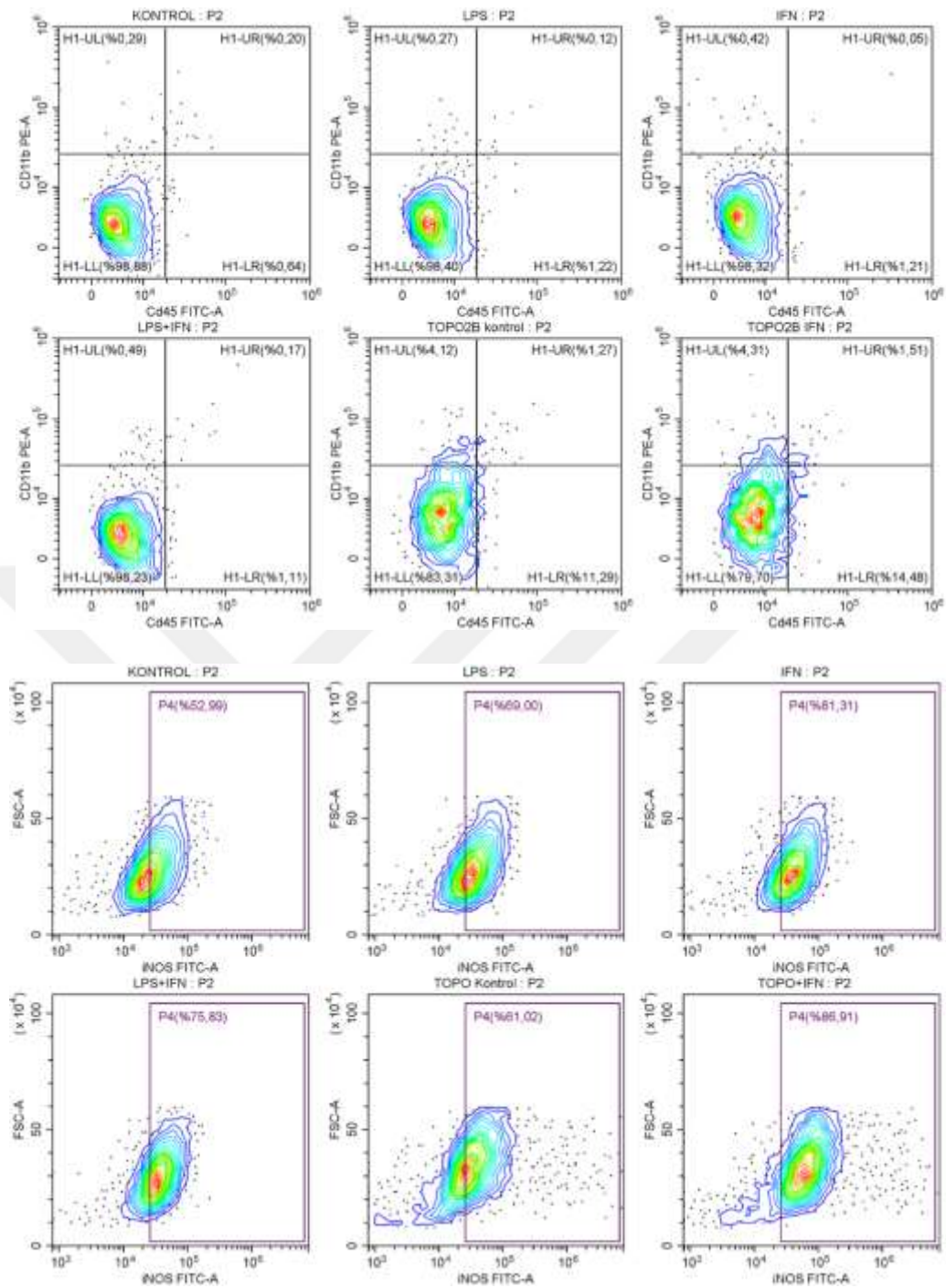
Şekil 29: LPS ve IFN γ 'nın farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiş HMC3 hücrelerinin iNOS ile boyanması ile yapılan immün boyama görüntüleri, görüntüler 20X objektif ile alındı.

4.4.2. Deney gruplarına LPS, IFN- γ uygulanması ve İnflamasyon Belirteçlerinin Akış Sitometrisi ile Analizi

Deney grupları olan nöroinflamasyon (1 μ g/ml LPS, 10 ng/ml IFN γ ve 1 μ g/ml LPS+10 ng/ml IFN γ) ve TOP2 β aşırı ifade eden grupların (kontrol ve 10 ng/ml IFN γ) analizine göre (şekil 30) TOP2 β aşırı ifadesinde M1 fenotipi olan CD86 miktarı anlamlı bir şekilde arttığı iNOS'un azaldığı görülmüştür. Ayrıca TOP2 β aşırı ifade eden nöroinflamasyon grubunda M2 belirteci olan CD206 da bir artış olmuştur.

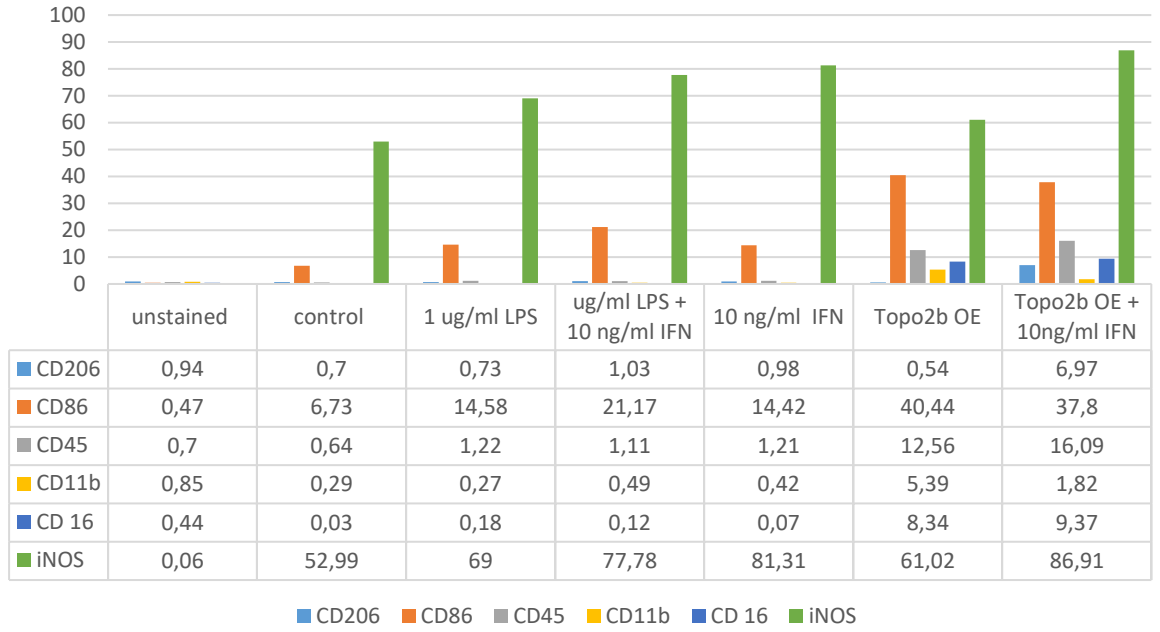


B



C

Deney Grupları (24h)



Şekil 30: LPS, IFN γ , konsantrasyonları ve kombinasyonları ile 24 saat muamele edilmiş kontrol ve Topo II β + HMC3 hücrelerinin CD16, CD206, CD86, CD45, CD11b ve iNOS boyamasıyla yapılan Akış sitometrisi analizleri (A, B) ve sütun grafiği gösterimi (C).

5.TARTIŞMA

Nöroinflamasyon süreci canlılığın devamı için bağışıklık sisteminin homeostaziye yönelik tehditlere verdiği tepkinin biyokimyasal sonucudur. Bağışıklık sisteminin hücre ve doku sağkalımı için verdiği bu inflamatuvar yanıtın immün, fizyolojik, biyokimyasal ve psikolojik sonuçları vardır.

Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri arasında mikrogliya, nöroinflamasyonda birincil oyunculardır. Mikroglial aktivasyon, merkezi sinir sisteminin yerleşik makrofajları olarak, fizyolojik ve nöroprotektif kilit bir role sahiptir (Orihuela vd. 2016). Mikroglialar bulundukları ortamda homeostazındaki değişiklikleri takip eder ve patojenlere, tümörlere karşı korumayı teşvik etmede ve hasarlı dokuların onarımında faydalı olabilecek bir süreç olan iltihabın düzenlenmesinde temel bir rol oynar, ancak aynı zamanda mikrogliya aracılı nöroinflamasyon süreci kontrollü olarak ilerlemelidir. Mikroglialar kronik olarak indüklendiğinde zararlı olabilir (Takeuchi ve Akira, 2010; González ve ark., 2014).

Nöroinflamasyon AH, PH ve multiple skleroz (MS) da dahil olmak üzere çoklu nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde rol oynar (Graeber vd. 2011). Bu nedenle nöroinflamasyonu kontrol altında tutmak nörodejenerasyonu düzenlemek yolunda iyi bir strateji olarak görülmektedir.

Her ne kadar nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi, semptomları ve ilerlemesi farklılıklar gösterse de nöroinflamasyon bu hastalıklarda ortak bir süreçtir. Nöroinflamasyonun, nörodejenerasyonun nedeni veya sonucu olabileceği için, nörodejeneratif hastalıklara nasıl katkıda bulunduğu hala tartışma konusudur.

Canlılığın devamı için DNA'nın varlığının sağlıklı bir şekilde devam etmesi ve replikasyon, transkripsiyon süreçlerinin kusursuz olması büyük önem arz etmektedir. Fakat çift zincirli DNA tersiyer yapısı nedeniyle topolojik strese çok eğilimlidir. DNA topoizomerazlar ise bu topolojik stresin önüne geçerek DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon, kromozom yoğunlaşması / dekonkonsansasyonu ve kardeş kromatid ayrımı gibi çeşitli genetik işlemlerde süper katlanma problemlerinin çözülmesinde önemli rol alırlar. Genellikle tip 1 ve tip 2 olarak sınıflandırılırlar. Tip 2

topoizomerazlar çift zincirli DNA'yı geçici olarak kırarak topolojik stresi giderir ve DNA'nın tekrar birleşmesini sağlarlar.

Tip II β izoformu özellikle olgunlaşan beyindeki post-mitotik nöronal hücrelerde ve farklılaşmış hücrelerde artış gösterir. Daha önceden yapılan çalışmalar nöral hücrelerde topo II β aktivitesinin nörolojik fonksiyonlar ile gözardı edilemeyecek bir ilişkisi olduğunu göstermektedir. *In vivo* çalışmalarda topo II β 'nın yokluğunda diğer organların etkilendiği fakat özellikle kortikogenezde olmak üzere beyin gelişiminde farklılaşmasında kusurlar olduğu, nöron aksonlarının omirilik ve kaslara ulaşamadığı ve daha kısa nörit ve aksonlara sebep olduğu görülmüştür.

Topo II β 'nın nöron gelişimi ve iletimi için önemli genlerin transkripsiyonu ile doğrudan bağlantısı olduğunu ve dolaylı olarak TOP2B'deki mutasyonlar veya topo II β ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler nörodejeneratif bozukluklara yol açabileceğini göstermektedir (Terzioğlu-Usak ve ark., 2017).

Prof Dr Sevim Işık ve ekibinin daha önceki çalışmalarında da topo II β 'nın Nurr1 ekspresyonu üzerinde düzenleyici bir etkisi olduğunu gösterilmiştir (Terzioğlu ve ark. 2017, Zaim ve Isik 2018). Ayrıca Nurr1 proteinin Parkinson hastalığında nöroinflamasyona karşı nöroprotektif rolü olduğunu bilinmektedir. Bu durumda, topo II β , Nurr1 proteini üzerinden Parkinson hastalığında nöroinflamasyona karşı nöroprotektif bir rol alabilir.

Nöral farklılaşmaya indüklenmiş mezenkimal kök hücrelerde topo II β 'nın susturulması, inflamasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının anlamlı miktarda artmasına yol açmıştır (Işık ve ark., 2015, Yayınlanmamış Data). Topo II β ve nöroinflamasyon ilişkisinin gösterilmesi nöroinflamasyonun kontrol edilmesi ve nöroinflamasyon ilişkili nörodejenerasyona karşı koruyucu bir strateji geliştirilmesine öncü olabilir.

Bu çalışmada mikrogliya aracılı nöroinflamasyon modeli oluşturmak için literatürde iyi bir *in vitro* nöroinflamasyon modeli olarak kabul edilen HMC3 hücre hattı kullanılmıştır. Her ne kadar iyi bir model olarak kabul edilse de HMC3 hücre hattı birçok açıdan eksik ve verimsiz kabul edilmektedir fakat mikrogliya olarak kabul edilen başka bir hücre hattı olmaması sebebiyle HMC3 hücre hattı bu alanda tek olarak kabul görmektedir.

HMC3 hücre hattının kültürü optimize edildi ve başarılı bir şekilde çoğaldığı görüldü. Hücre hattı kısa sürede çoğaldığı için uzun soluklu deney planları için çok uygun olmadığı görüldü. Yapılan kontrol transfeksiyonlarında görüldüğü üzere HMC3 hücre hattı plazmit transfeksiyonu için oldukça verimliydi. Fakat HMC3 hücrelerinde topo IIβ'nın aşırı ifade edilmesi daha önceden yapılmamış olması ve HMC3 hücrelerinde topo IIβ ifadesinin oldukça düşük olması (Şekil 31), plazmitin büyük ve verimli olmaması gibi faktörler bu basamağı zorlu bir süreç haline getirmiştir. Transfeksiyon için sıklıkla kullanılan başlıca fiziksel ve kimyasal yöntemler denendi fakat en yüksek verim Lipofectamine 3000 ile elde edilen %15 verimin üstüne çıkarılamamıştır. Bu nedenle pozitif hücreler Hücre ayırıştırıcı (cell sorter) ile ayırıştırılmıştır.



Şekil 31: HMC3 hücrelerinde topo IIβ ekspresyonunun SH-SY5Y hücrelerine kıyasla düşüklüğünü gösteren western blot sonucu

Nörodejeneratif hastalıkları temsil eden *in vitro* nöroinflamasyon modeli için literatürde yaygın olarak LPS kullanılmıştır. Bu nedenle LPS'nin farklı konsantrasyonları ile bu modeli oluşturmayı denedik. Yaptığımız bu denemeler sonucunda M1 fenotipinin belirteci olan CD86'nın anlamlı artışı ile LPS açısından en uygun konsantrasyonun 1 µg/ml olduğunu belirledik.

Bazı yayınlar sadece eksojen aktivatör olarak LPS'nin yeterli olmadığını buna ek olarak endojen bir aktivatör olan IFNγ veya benzer aktivatörlerin nöroinflamasyon modeli oluşturabilmek için önemli olduğunu vurgulamıştır (Puzi ve Nabilah, 2020). Özellikle HMC3 hücrelerinin tedarikçi firması olan ATCC'nin nöroinflamasyon modeli olarak 10 ng/ml IFNγ'yı önermesi nedeniyle HMC3 hücrelerinde LPS ile birlikte ve tek başına IFNγ'nin farklı konsantrasyonları ile model oluşturmayı denedik. Yaptığımız denemeler sonucunda IFNγ açısından model oluşturmaya en uygun konsantrasyonun 10 ng/ml olduğunu gördük. Tek başına kullanılan IFNγ CD86 açısından bir artışa neden olsa da CD11b açısından yeterli değildi.

LPS gibi eksojen aktivatörlerin hücrelerin mitokondri aktivitesi üzerinde olumsuz etkisi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu sebeple hücrelerin enerji

metabolizmasının bozulma ihtimaline karşı bu durumu tolere etmesi için hücreleri 50 mM ATP ile inkübe ettik. ATP uygulamasının hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadı fakat nöroinflamasyona da bir katkısı bulunmadığını gördük.

Nöroinflamasyona indüklenen hücrelerin önemli bir M1 belirteci olan CD86⁺ ve aktifleşmiş mikrogliya belirteci olan Nitrik Oksit seviyesini gösteren iNOS'un arttığı gösterilmiştir.

Deney gruplarında yaptığımız analizler topo IIβ' nın aşırı ekspresyonunun M1 fenotipi belirteci olarak kabul edilen CD86'nın artışına neden olduğu görüldü fakat bunun transfeksiyon yöntemi ve hücre ayrıştırma prosedürünün hücreler için fazla stresli bir süreç olmasından kaynaklanabileceğini ihtimalini de düşündürmektedir.

Topo IIβ aşırı ifade eden hücrelerde topo IIβ'nın varlığının hücrelere zararlı bir etkisi görülmemiştir. Topo IIβ fazla ifade edilen hücrelerde kontrol hücrelerine göre iNOS seviyesinde bir azalma görülmüştür.

Ayrıca topo IIβ aşırı ifade eden nöroinflamasyon grubunda M2 fenotipi belirteci olarak kabul edilen CD206'nın arttığı görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmada TOP2B aşırı ifade eden HMC3 hücrelerinin nöroinflamasyona indüklenmesi ile TOP2B nöroinflamasyon ilişkisini araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalara dayanarak TOP2B'nin mikroglia aracılı nöroinflamasyon üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını ve az miktarda koruyucu etkisi olabileceğini söyleyebiliriz. Sonuçlarımızın çok da yüksek olmayan artışlarının sebebi HMC3 hücrelerin metabolik hızının yaklaşık 36 saat olması ve TOP2B plazmitini çok kısa sürede kaybetmesi olabilir. Bu çalışmada HMC3 hücrelerinde TOP2B gen ifadesini transfeksiyonu yoluyla artırmaya çalıştık fakat literatürde en popüler ve en verimli transfeksiyonu yöntemlerini denememize rağmen verim artırılamadı ayrıca bu yöntem transfeksiyonun stabil kalmadığı bir yöntemdir. Bu sebeple TOP2B'nin başta HMC3 olmak üzere diğer hücrelerde transfeksiyonu stabil ve yüksek verimliliğe sahip viral transfeksiyonu yoluyla yapılması daha sağlıklı ve kesin bir sonuç verecektir.

Ayrıca bu çalışmada M1 marker belirteci olarak CD16, CD86 ve CD11b; M2 fenotipinin belirteci olarak CD206 kullanılmıştır. Bu markerlar tercih edilirken Mikroglialar ve HMC3 üzerine kapsamlı bir literatür taraması yapılmıştır. Fakat Literatürdeki mikroglia popülasyonu çoğunlukla kemirgenlerden izole edilen primer mikroglia hücre hatlarından oluşmaktadır ve HMC3 hücre hattında nöroinflamasyon modeli oluşturmak hakkında çok az literatür bulunması sebebiyle seçilen yüzey markerlarının HMC3 hücre hattındaki ifadesi hakkında bilgimiz oldukça kısıtlıydı. Bir sonraki çalışmalarda daha fazla yüzey markerları denenmeli ve buna ek olarak analizlerin geliştirilmesi için sitokin seviyesi değerlendirilmelidir.

Gerek mikroglia gerekse nöroinflamasyon çok çalışılan fakat mekanizması çok az bilinen konular olduğu için bu konuda kesin ve net bir sonuç elde etmek oldukça zordur. Bu sebeple bu çalışma birçok açıdan devam edilmesi ve mekanizma çalışmaları ile hangi yollar üzerinden ilerlediğinin araştırması ile desteklenmesi nöroinflamasyonu anlamak için iyi bir strateji olacaktır.

Yapılan bu çalışma öncül bir data olmakla birlikte mikrogliaların sinir sistemindeki rolü ve fonksiyonları düşünüldüğünde bu hipotezin sadece mikroglia kültürü üzerinden değil mikrogliaların mikroçevresinin hesaba katılarak yapıldığı bir ko-kültür çalışması ile yapılması araştırmalarımızı daha kesin bir sonuca kavuşturacaktır.

Ayrıca önerilen bu ko-kültür çalışması HMC3 gibi düşük verimli mikroglia kültürleri yerine periferik makrofajların nöroinflamasyon durumunda beyine göç ederek farklılaşması hipotezi göz önünde bulundurularak periferik makrofajlar ile denenmesi her iki hipotezinde araştırılması açısından önemli bir adım olabilir.



KAYNAKLAR

- Arcuri C, Mecca C, Bianchi R, Giambanco I, Donato R. The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance, Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CNS. *Front Mol Neurosci*. 2017 Jun 19;10:191. doi: 10.3389/fnmol.2017.00191. PMID: 28674485; PMCID: PMC5474494.
- Austin CA, Lee KC, Swan RL, Khazeem MM, Manville CM, Cridland P, Treumann A, Porter A, Morris NJ, Cowell IG. TOP2B: The First Thirty Years. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 14;19(9):2765. doi: 10.3390/ijms19092765. PMID: 30223465; PMCID: PMC6163646.
- Austin CA, Sng JH, Patel S, Fisher LM. Novel HeLa topoisomerase II is the II beta isoform: complete coding sequence and homology with other type II topoisomerases. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Mar 20;1172(3):283-91. doi: 10.1016/0167-4781(93)90215-y. PMID: 8383537.
- Ahmad Puzi, Nur Nabilah. Microglia-induced Neurotoxicity: A Review of in Vitro Co-culture Models. Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Putra Malaysia, 2020.
- Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, de Oliveira ACP. Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2019 May 9;20(9):2293. doi: 10.3390/ijms20092293. PMID: 31075861; PMCID: PMC6539529.
- Batista, C., Gomes, G. F., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B. L., & de Oliveira, A. (2019). Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2293. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
- Brown, Guy & Vilalta, Anna. (2015). How microglia kill neurons. *Brain research*. 1628. 10.1016/j.brainres.2015.08.031.
- Cardona A.E., Huang D., Sasse M.E., Ransohoff R.M. Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nat. Protoc*. 2006;1:1947–1951. doi: 10.1038/nprot.2006.327.
- Chaly, N., Chen, X., Dentry, J. et al. Organization of DNA topoisomerase II isotypes during the cell cycle of human lymphocytes and HeLa cells. *Chromosome Res* 4, 457–466 (1996). <https://doi.org/10.1007/BF02265053>
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry*, 139 Suppl 2(Suppl 2), 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- 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., Crooke S.T. Purification of topoisomerase II from amsacrine-

- resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 1987;262:16739–16747.
- Estes ML, McAllister AK. Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol.* 2014 Nov;24(6):623-30. doi: 10.1111/bpa.12198. PMID: 25345893; PMCID: PMC4365495.
- Ginhoux ve ar., 2010; Yona ve ark., 2013). Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., ... & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841-845
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918-934.
- Guevara CA, Del Valle P, Mercedes CR. Microglia and Reactive Oxygen Species Are Required for Behavioral Susceptibility to Chronic Social Defeat Stress. *J Neurosci.* 2020 Feb 12;40(7):1370-1372. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2175-19.2019. PMID: 32051290; PMCID: PMC7044733.
- Hammond TR, Marsh SE, Stevens B. Immune Signaling in Neurodegeneration. *Immunity.* 2019 Apr 16;50(4):955-974. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.016. PMID: 30995509; PMCID: PMC6822103.
- Hendrickx, D., van Eden, C. G., Schuurman, K. G., Hamann, J., & Huitinga, I. (2017). Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *Journal of neuroimmunology*, 309, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.04.007>
- Heng, X., & Le, W.-D. (2010). The function of DNA topoisomerase II β in neuronal development. *Neuroscience Bulletin*, 26(5), 411–416. <https://doi.org/10.1007/s12264-010-0625-9>
- Hugo González, Daniela Elgueta, Andro Montoya, Rodrigo Pacheco, Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases, *Journal of Neuroimmunology*, Volume 274, Issues 1–2, 2014, Pages 1-13, ISSN 0165-5728, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.012>.
- Isik, S., Zaim, M., Yildiz, M. T., Negis, Y., Kunduraci, T., Karakas, N., Arikan, G., & Cetin, G. (2015). DNA topoisomerase II β as a molecular switch in neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Annals of Hematology*, 94(2), 307–318. <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2209-7>
- Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020 Aug 6;14:198. doi: 10.3389/fncel.2020.00198. PMID: 32848611; PMCID: PMC7424058.
- Kaur, C., & Ling, E. A. (1991). Study of the transformation of amoeboid microglial cells into microglia labelled with the isolectin G
- Kaur, C., Ling, E. A., & Wong, W. C. (1985). Transformation of amoeboid microglial cells into microglia in the corpus callosum of the postnatal rat brain. An electron microscopical study. *Archivum histologicum japonicum*, 48(1), 17-25.

- Kawano, S., Miyaji, M., Ichiyasu, S., Tsutsui, K. M., & Tsutsui, K. (2010). Regulation of DNA Topoisomerase II β through RNA-dependent association with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U). *The Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26451—26460. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.112979>
- Ken Tsutsui, Kimiko Tsutsui, Kuniaki Sano, Akihiko Kikuchi, Akira Tokunaga, Involvement of DNA Topoisomerase II β in Neuronal Differentiation*, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 276, Issue 8, 2001, Pages 5769-5778, ISSN 0021-9258, <https://doi.org/10.1074/jbc.M008517200>
- Kondapi AK, Mulpuri N, Mandraju RK, Sasikaran B, Subba Rao K. Analysis of age dependent changes of Topoisomerase II alpha and beta in rat brain. *Int J Dev Neurosci*. 2004 Feb;22(1):19-30. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2003.10.006. PMID: 15013075.
- Leng, F., Edison, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. *Nat Rev Neurol* 17, 157–172 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Lin RK, Ho CW, Liu LF, Lyu YL. Topoisomerase II β deficiency enhances camptothecin-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2013 Mar 8;288(10):7182-92. doi: 10.1074/jbc.M112.415471. Epub 2013 Jan
- Ling, E. A., Penney, D., & Leblond, C. P. (1980). Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the ‘ameboid cells’ present in the corpus callosum of postnatal rats. *Journal of Comparative Neurology*, 193(3), 631-657.
- Lucin, K. M., & Wyss-Coray, T. (2009). Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little?. *Neuron*, 64(1), 110-122.
- Lynch M. A. (2009). The multifaceted profile of activated microglia. *Molecular neurobiology*, 40(2), 139–156. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8077-9>
- Lyu, Y. L., & Wang, J. C. (2003). Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase II β . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 7123—7128. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232376100>
- Lyu, Y. L., Lin, C. P., Azarova, A. M., Cai, L., Wang, J. C., & Liu, L. F. (2006). Role of topoisomerase II β in the expression of developmentally regulated genes. *Molecular and cellular biology*, 26(21), 7929–7941. <https://doi.org/10.1128/MCB.00617-06>
- Lyu, Y. L., Lin, C.-P., Azarova, A. M., Cai, L., Wang, J. C., & Liu, L. F. (2006). Role of topoisomerase II β in the expression of developmentally regulated genes. *Molecular and Cellular Biology*, 26(21), 7929–7941. <https://doi.org/10.1128/MCB.00617-06>
- Mazgaen, Lalita & Gurung, Prajwal. (2020). Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *International Journal of Molecular Sciences*. 21. 379. 10.3390/ijms21020379.
- Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U. K., Mack, M., ... & Prinz, M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2⁺ monocytes only under defined host conditions. *Nature neuroscience*, 10(12), 1544-1553.

- Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, Anisman H, Hayley S, Park DS. Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 2007 Mar 21;27(12):3328-37. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5321-06.2007. PMID: 17376993; PMCID: PMC6672486.
- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annual review of immunology*, 32, 367.
- Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases, *Journal of Neuroimmunology*, Volume 274, Issues 1–2, 2014, Pages 1-13, ISSN 0165-5728, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.012>.
- Nitiss JL. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2009 May;9(5):327-37. doi: 10.1038/nrc2608. Epub 2009 Apr 20. PMID: 19377505; PMCID: PMC2730144.
- Nur-E-Kamal, A., Meiners, S., Ahmed, I., Azarova, A., Lin, C., Lyu, Y. L., & Liu, L. F. (2007). Role of DNA topoisomerase IIbeta in neurite outgrowth. *Brain Research*, 1154, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.029>,
- Nur-E-Kamal, A., Meiners, S., Ahmed, I., Azarova, A., Lin, C., Lyu, Y. L., & Liu, L. F. (2007). Role of DNA topoisomerase IIbeta in neurite outgrowth. *Brain Research*, 1154, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.029>
- Orr, A. G., Orr, A. L., Li, X. J., Gross, R. E., & Traynelis, S. F. (2009). Adenosine A2A receptor mediates microglial process retraction. *Nature neuroscience*, 12(7), 872-878.
- Perry V.H., Nicoll J.A., Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol*. 2010;6:193–201. doi: 10.1038/nrneurol.2010.17.
- Pinto MV, Fernandes A. Microglial Phagocytosis-Rational but Challenging Therapeutic Target in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 19;21(17):5960. doi: 10.3390/ijms21175960. PMID: 32825077; PMCID: PMC7504120.
- Raetz, Christian & Whitfield, Chris. (2002). Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71: 635-700. *Annual review of biochemistry*. 71. 635-700. 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
- Ransohoff, R. M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, 353(6301), 777-783.
- Sano K, Miyaji-Yamaguchi M, Tsutsui KM, Tsutsui K. Topoisomerase IIbeta activates a subset of neuronal genes that are repressed in AT-rich genomic environment. *PLoS One*. 2008;3(12):e4103. doi: 10.1371/journal.pone.0004103. Epub 2008 Dec 31. PMID: 19116664; PMCID: PMC2605559.
- Schoeffler, A.J. and J.M. Berger, Recent advances in understanding structure- function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem Soc Trans*, 2005. 33(Pt 6): p. 1465-70.

- 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.
- Sonekatsu M, Taniguchi W, Yamanaka M, Nishio N, Tsutsui S, Yamada H, Yoshida M, Nakatsuka T. Interferon-gamma potentiates NMDA receptor signaling in spinal dorsal horn neurons via microglia-neuron interaction. *Mol Pain*. 2016 Apr 18;12:1744806916644927. doi: 10.1177/1744806916644927. PMID: 27094552; PMCID: PMC4956380.
- Soulet D., Rivest S. Bone-marrow-derived microglia: Myth or reality? *Curr. Opin. Pharmacol*. 2008;8:508–518. doi: 10.1016/j.coph.2008.04.002
- Stence, N., Waite, M., & Dailey, M. E. (2001). Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 33(3), 256–266.
- Subhramanyam, C. S., Wang, C., Hu, Q., & Dheen, S. T. (2019, October). Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 94, pp. 112-120). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.004>.
- Takeuchi H, Wang J, Kawanokuchi J, Mitsuma N, Mizuno T, Suzumura A. Interferon-gamma induces microglial-activation-induced cell death: a hypothetical mechanism of relapse and remission in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2006 Apr;22(1):33-9. doi: 10.1016/j.nbd.2005.09.014. Epub 2005 Dec 28. PMID: 16386911.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Terzioglu-Usak, S., Negis, Y., Karabulut, D. S., Zaim, M., & Isik, S. (2017). Cellular Model of Alzheimer's Disease: Aβ1-42 Peptide Induces Amyloid Deposition and a Decrease in Topo Isomerase IIβ and Nurr1 Expression. *Current Alzheimer Research*, 14(6), 636–644. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170117103217>
- Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Jun;3(6):430-40. doi: 10.1038/nrm831. PMID: 12042765.
- Wang, J. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 430–440 (2002). <https://doi.org/10.1038/nrm831>
- Woodburn, S. C., Bollinger, J. L., & Wohleb, E. S. (2021). The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. *Journal of neuroinflammation*, 18(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02309-6>
- Yang, X., Li, W., Prescott, E. D., Burden, S. J., & Wang, J. C. (2000). DNA Topoisomerase IIβ and Neural Development. *Science*, 287(5450), 131 LP – 134. <https://doi.org/10.1126/science.287.5450.131>
- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., ... & Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79-91.