T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OPTOGENETİK UYARIMLA NF-κB AKTİVASYONU YAPAN BİR YÖNTEMİN MSS'DE İNFLAMASYONUN PRİMER DEPRESYON PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ AMACIYLA *IN VIVO* KOŞULLAR İÇİN GELİŞTİRİLMESİ

Dr. Emre Cem ESEN

Temel Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OPTOGENETİK UYARIMLA NF-κB AKTİVASYONU YAPAN BİR YÖNTEMİN MSS'DE İNFLAMASYONUN PRİMER DEPRESYON PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ AMACIYLA *IN VIVO* KOŞULLAR İÇİN GELİŞTİRİLMESİ

Dr. Emre Cem ESEN

Temel Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Emine EREN KOÇAK

ANKARA
2022

OPTOGENETİK UYARIMLA NF-κB AKTİVASYONU YAPAN BİR YÖNTEMİN MSS'DE İNFLAMASYONUN PRİMER DEPRESYON PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ AMACIYLA IN VIVO KOŞULLAR İÇİN GELİŞTİRİLMESİ

Dr. Emre Cem ESEN

Danışman: Prof. Dr. Emine EREN KOÇAK

Bu tez çalışması 29/11/2022 tarihinde jürimiz tarafından "Temel Nörolojik Bilimler Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Turgay DALKARA
	(Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Bülent ELİBOL
	(Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Remzi ERDEM
	(Başkent Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Aygün ERTUĞRUL
	(Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	Doç. Dr. Ergin DİLEKÖZ
	(Gazi Üniversitesi)

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

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" kapsamında tezimin YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılmasına izin veriyorum.

08/11/2022

Dr. Emre Cem ESEN

ETİK BEYAN

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

08/11/2022

Dr. Emre Cem ESEN

TEŞEKKÜR

Öncelikle bana sadece nörobilimi değil, bilimi ve bilimsel düşünmeyi öğreten; laboratuvarda çalışmayı büyük bir keyif haline getiren, elde ettiğimiz her sonuç yeni bir soruya yol açtığında ümitsizliğe kapılmamamı, daha fazla merak etmemi ve tekrar ayağa kalkıp çalışmalarıma devam edebilmemi sağlayan danışmanım Prof. Dr. Emine Eren Koçak'a ve 12 yıllık doktora serüvenim boyunca elde ettiğim en büyük değerlerin başında kendisi ile dostluğum gelen Dr. Aslıhan Bahadır Varol'a teşekkür etmek istiyorum. Sizlerle çalışmam sayesinde her türlü zorluğa rağmen doktora çalışmalarımı tamamlayabiliyorum, ikiniz de iyi ki varsınız, sizleri çok seviyorum.

Beni bilimin içinde büyüten, kendileri için zaman zaman sinir bozucu hale gelse de her zaman sorgulamamı destekleyen, her zaman bana inanan ve en büyük destekçilerim olan, her adımımda yanımda olduklarını tüm kalbimle hissettiğim ailem Prof. Dr. Nuran Esen ve Prof. Dr. A. Adil Esen'e,

Doktora çalışmalarımı tamamlayabilmem için her zaman arkamda olan ve destekleyen Balıkesir Üniversitesi Psikiyatri Anabilim Dalı'ndan hocalarım Prof. Dr. Tunay Karlıdere, Doç. Dr. Hayriye Baykan ve Dr. Öğretim Üyesi Merve Şahin Can'a

Her sorunu çözebilen, yaptığı her işe sevgisini katan enstitümüzün bel kemiği canım abim Mesut Fırat'a,

Beni her zaman güler yüzle karşılayıp, vaktini ve dikkatini asla esirgemeyip tezimi geliştirmeme yardımcı olan hocam Prof. Dr. Remzi Erdem'e,

Bilgisi ve deneyimi ile tezime büyük katkı sunan Doç. Dr. Evren Erdener'e,

Tıp fakültesine ve bütünleşik doktora programına başladığımdan beri bana rol model olan hocalarım Prof. Dr. Turgay Dalkara, Prof. Dr. Bülent Elibol, Prof. Dr. Hülya Karataş-Kurşun ve Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan'a ve tüm Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü ailesine,

Türkiye Psikiyatri Derneği Merkez Yönetim Kurulu'nda birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım meslektaşlarım Prof. Dr. Ejder Akgün Yıldırım, Dr. Nezaket Kaya, Doç. Dr. Deniz Ceylan, Doç. Dr. İrem Ekmekçi Ertek, Dr. Emre Mutlu ve Dr. Alper Bülbül'e,

Laboratuvarda çalışırken bana evlerini açan, hiç üşenmeden her seferinde sıçanlarımın nasıl olduğunu sormayı ihmal etmeyen anneannem, dedem ve teyzeme,

Ankara ve Balıkesir arasında 6.5 yılda toplam 200.000 km'den uzun yolda eskittiğim üç arabama ve geceleri laboratuvarı benimle paylaşan sıçanlarıma,

Tez çalışmaları için maddi desteği sağlayan TUBİTAK'a (118S558 nolu proje),

Teşekkür ederim. Sizler olmadan doktora tezimi tamamlayamazdım;

Dr. Emre Cem ESEN

ÖZET

Esen, EC. Optogenetik Uyarımla NF-κB Aktivasyonu Yapan Bir Yöntemin MSS'de İnflamasyonun Primer Depresyon Patofizyolojisindeki Rolünün İncelenmesi Amacıyla *In Vivo* Koşullar İçin Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler Programı Doktora Tezi, Ankara, 2022. Nöro-inflamasyonun depresyon üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmaların önemli kısıtlılıklarından biri inflamasyonun lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel bir endotoksin aracılığı ile tetiklenmesi ve primer depresyonun patofizyolojisi ile uyumlu bir model kullanılmamasıdır. Bu nedenle nöro-inflamasyon ile depresyon arasındaki karmaşık ilişkinin aydınlatılabilmesi için beyinden köken alan nöro-inflamasyon için güvenilir bir model geliştirilmesi gereklidir. Bu gereklilikten hareketle fizyolojik koşullarda stresle tetiklenen inflamatuvar yanıta benzer şekilde beyinden köken alan inflamasyonu tetikleyen *in vitro* etkinliği gösterilmiş bir sistemin *in vivo* koşullara adapte edilmesi amacıyla bu tez çalışması gerçekleştirildi. Bunun için optik uyarı ile hücre zarı üzerinde dimerize olan kriptokrom 2 ($CRY2_{PHR}$) ve "kriptokrom ile etkileşen basit heliks-loop-heliks 1" (CIB1) reseptör sisteminden faydalanıldı. Bu reseptörlerin sitoplazmik bölgelerine eklenen "interferon düzenleyici faktörlerin DNA'ya bağlı aktivatörü" (DAI) moleküllerinin, $CRY2_{PHR}$ / CIB1 dimerizasyonu ile bir araya gelerek interferon düzenleyici faktörleri (IRF) ve NF-κB transkripsiyon faktörlerini aktive etmesi yoluyla beyinden köken alan inflamasyonun uyarılması amaçlandı. $CRY2_{PHR}$-DAI/ CIB1-DAI kriptokrom reseptörlerini içeren plazmidler tekrarlayan enjeksiyonlarla hipokampusta ifade ettirildi ve sonrasında tekrarlayan optik uyarılar gerçekleştirildi. Optimal inflamasyona yol açacak enjeksiyon ve optik uyarım dozu ve süresinin belirlenmesi amacıyla farklı protokollerle plazmid enjeksiyonları ve optik uyarımlar gerçekleştirildi. Ancak optik uyarım yapılmayan ve plazmid enjekte edilmeyen kontrol gruplarında da hipokampal bölgede mCherry sinyali ile uyumlu yoğun sinyal gözlendi. Bunun plazmidin tekrarlayan enjeksiyonunun yol açtığı doku travması nedeni ile ortaya çıkmış olabileceği, bu sinyal yoğunluğu içinde gerçek sinyalin güvenilir biçimde tayin edilmesinin mümkün olmadığı değerlendirildi. İleride yapılacak çalışmalarda girişimsel işlemlere bağlı travmanın yol açtığı inflamasyonu en düşük düzeye indirebilmek için, beyinde inflamasyonu modellemek için geliştirilecek yöntemlerde tekrarlayan plazmid enjeksiyonları yerine plazmidin virüsler aracılığı ile kalıcı olarak ifade ettirilmesi, virüs enjeksiyonundan 4-6 hafta sonra optik uyarımlara başlanması önerilir.

Anahtar kelimeler: optogenetik, nöro-inflamasyon, NF-κB, hipokampus, depresyon

Bu çalışma TUBİTAK SBAG (118S558) tarafından desteklenmektedir.

ABSTRACT

Esen, EC. Development of a Method Activating NF-κB by Optogenetic Stimulation for In Vivo Conditions to Examine the Role of CNS Inflammation in the Pathophysiology of Primary Depression, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, PhD thesis in Basic Neurological Sciences (Neuroscience), Ankara, 2022. One of the critical limitations of the studies examining the effects of neuro-inflammation on depression is not implementing a protocol compatible with the pathophysiology of primary depression instead of using a protocol that inflammation is triggered by a bacterial endotoxin such as lipopolysaccharide. In order to elucidate the complex relationship between neuro-inflammation and depression, it is necessary to develop a reliable model for neuro-inflammation originating from the brain. Based on this requirement, this thesis study was carried out in order to adapt a system with in vitro activity that triggers inflammation originating from the brain, similar to the inflammatory response triggered by stress in physiological conditions, to in vivo conditions. For this purpose $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI cryptochrome receptors were transferred intrahippocampally with repeated plasmid injections and activated with repetitive optical stimulations. Plasmid injections and optical stimulation were performed with different protocols in order to determine the injection and optical stimulation dose and duration that would lead to optimal inflammation. However, an intense signal consistent with the mCherry signal was observed in the hippocampal region in the control groups that were not optically stimulated and were not injected with plasmid. It was evaluated that this may have arisen due to tissue trauma caused by repeated injection of the plasmid, and it was not possible to reliably determine the true signal within this signal intensity. In future studies, in order to minimize the inflammation caused by trauma due to interventional procedures, it is recommended to permanently express the plasmid by viruses instead of repetitive plasmid injections in methods to be developed to model inflammation in the brain, and to start optical stimulation 4-6 weeks after virus injection.

Key words: optogenetics, neuro-inflammation, NF-κB, hippocampus depression

This study is supported by TUBİTAK SBAG (118S558).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI		iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI		iv
ETİK BEYAN SAYFASI		v
TEŞEKKÜR		vi
ÖZET		vii
ABSTRACT		viii
İÇİNDEKİLER		ix
SİMGELER VE KISALTMALAR		xi
ŞEKİLLER		xiii
1.	**GİRİŞ**	**1**
2.	**GENEL BİLGİLER**	**3**
2.1.	İnflamasyon	3
2.2.	Nöro-inflamasyon	4
	2.2.1. NF-κB'nin İnflamasyonda ve Nöro-inflamasyondaki Yeri	8
	2.2.2. Merkezi Sinir Sistemi Hücreleri ve Nöro-inflamasyon	12
2.3.	Majör Depresif Bozukluk ve Nöro-inflamasyon	15
2.4.	Optogenetik Yöntem ve Kriptokrom Reseptörler	19
2.5.	CRY2PHR/CIB1 Kriptokrom Reseptörleri ile Optogenetik Olarak İnflamasyon Kaskadının Tetiklenmesi	21
3.	**GEREÇ VE YÖNTEMLER**	**23**
3.1.	Optogenetik CIB1-DAI/CRY2PHR-DAI Kriptokrom Reseptörlerin Optimizasyonu	23
3.2.	Cerrahi Koordinatlarının Optimizasyonu	24
3.3.	Sıçanlara Cerrahi Olarak Kanül Yerleştirilmesi	25
3.4.	Sıçanlara İntrahipokampal Plazmid Enjeksiyonu	29
3.5.	Sıçanlara İntrahipokampal Optik Uyarım Uygulanması	33
3.6.	Sıçanların Beyin Kesitlerinin Hazırlanması	35

3.7. Sıçanların Beyin Kesitlerinde İmmünohistokimyasal Olarak NF-κB'nin İşaretlenmesi 36
3.9. CRY2PHR-DAI/CIB1-DAI Dimerizasyonunun Uyarılma (Eksitasyon) ve Işıma (Emisyon) Taraması ile Teyit Edilmesi 38
4. BULGULAR 41
4.1. Birinci Optimizasyon Deneyleri 41
4.2. İkinci Optimizasyon Deneyleri 43
4.3. Üçüncü Optimizasyon Deneyleri 46
4.4. Dördüncü Optimizasyon Deneyleri 51
4.5. Beşinci Optimizasyon Deneyleri 55
5. TARTIŞMA 60
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 68
7. KAYNAKLAR 69
8. EKLER
8.1. Ek-1 Tez Çalışması Etik Kurullar
8.2. Ek-2 Tez çalışması Orjinallik Raporu
9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

BDNF	Beyin-türevli nörotrofik faktör
LPS	Lipopolisakkarit
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler paternler
PRR	Patern tanıma reseptörleri
PAMP	Patojen-ilişkili moleküler paternler
TLR	Toll-benzeri reseptörler
NLR	NOD-benzeri reserptörler
NF-κB	Aktive B hücrelerin nükleer faktör κ-hafif-zincir-uyarıcısı
MSS	Merkezi sinir sistemi
KBB	Kan beyin bariyeri
CSF-1	Koloni uyarıcı faktör 1
LTP	Uzun dönemli potansiyel artışı
TNF	Tümör nekroz faktörü
COX	Siklooksijenaz
LOX	Lipoksijenaz
IKK	κB kinaz inhibitörünü
IκB	κB inhibitörü
BAF	B hücre aktive edici faktör
LTβ	Lenfotoksin β
RANK	NF-κB'nin reseptör aktivatörü
NIK	NF-κB uyarıcı kinaz
TRAF	TNF reseptörü ile ilişkili faktör

NMDA	N-metil-D-aspartat
GluR1	Glutamat reseptörü 1
KÖHS	Kronik öngörülemeyen hafif stres
IFN-γ	İnterferon-gama
IDO	İndolamin 2,3-dioksijenaz
ChR	Channelorhodopsin
$CRY2_{PHR}$	PHR alanı içeren kriptokrom 2
CIB1	kriptokrom ile etkileşen basit heliks-loop-heliks 1
IFN	İnterferon
DAI	İnterferon düzenleyici faktörlerin DNA'ya bağlı aktivatörü
ZBD	DNA'nın N-terminal Z-DNA bağlayıcı bölgeleri
IRF	IFN düzenleyici faktörleri
RIP	Reseptör etkileşim proteini
RHIMs	Reseptör etkileşim proteini homotipik etkileşim motifleri
OmFC	Optik çoklu sıvı infüzyon kanülü
AP	Anteroposterior
ML	Mediolateral
DV	Dorsoventral
IP	İntra-peritoneal
N/P	Nitrojen ve nükleik asit fosfatı oranı
PBS	Fosfat tamponlu salin
NKS	Normal keçi serumu
AAV	Adeno ilişkili virüs

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	KBB'nin hasar görmediği durumlarda sistemik dolaşımdaki inflamatuvar sitokin artışının nöro-inflamasyonu tetikleme mekanizmaları	6
2.2.	Yerleşik ve yerleşik olmayan NF-κB yolları	11
2.3.	Kronik stres ile tetiklenen nöro-inflamasyonda MSS hücreleri	16
2.4.	$CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom reseptörleri ile optogenetik sistemi	22
3.1.	Optik çoklu sıvı infüzyon kanülü	26
3.2.	Enjeksiyon için hedeflenen hipokampusta CA3 katmanının CA2'ye yakın kısmı.	25
3.3.	Sıçanın kafatasında, kanülün takılacağı bölgenin etrafına dört adet vidanın sabitlenmiş ve kanül takılacak noktaya kafatasında Omni-drill® ile pencere açılmış hali.	27
3.4.	OmFC aracılığı ile sıvı enjeksiyonunun şematik gösterimi	31
3.5.	İntrahipokampal plazmid enjeksiyonu	31
3.6.	Optik uyarı sistemi	33
3.7.	Doric Neuroscience Studio® Programı	34
3.8.	Sıçanlara intrahipokampal optik uyarı	35
3.9.	$CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI yapılarının optik uyarı ile dimerizasyonu sonrası mCherry floresan proteininin yapısının tamamlanması	38
3.10.	mCherry floresan proteininin uyarılma ve ışıma grafiği	39
3.11.	Beyin kesitlerinin 552 nm dalga boyu ışık ile uyarılma sonrası 560-750 nm dalga boyları arasında ışıma taramaları	40
4.1.	Birinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı ve yalancı uygulama gruplarına uygulanan protokolün şematik gösterimi	41
4.2.	Birinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı ve yalancı uygulama gruplarındaki sıçanların beyin kesitlerinde NF-κB işaretlemesini gösteren konfokal mikroskop görüntüleri	42
4.3.	İkinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı ve yalancı uygulama gruplarına uygulanan protokolün şematik gösterimi	43

4.4. İkinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı ve yalancı uygulama gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntüleri 44
4.5. İkinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı ve yalancı uygulama gruplarındaki sıçanlar ait beyin kesitlerinde NF-κB işaretlemesini gösteren konfokal mikroskop görüntüleri 45
4.6. Üçüncü optimizasyon deneylerinde birinci ve ikinci optik uyarı, yalancı uygulama ve kontrol gruplarına uygulanan protokolün şematik gösterimi 46-47
4.7. Üçüncü optimizasyon deneylerinde birinci ve ikinci optik uyarı ve yalancı uygulama gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntüleri 48-49
4.8. Üçüncü optimizasyon deneylerinde birinci ve ikinci optik uyarı, ve yalancı uygulama gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinde NF-κB işaretlemesini gösteren konfokal mikroskop görüntüleri 49-50
4.9. Dördüncü optimizasyon deneylerinde optik uyarı ve kontrol gruplarına uygulanan protokolün şematik gösterimi 52
4.10. Dördüncü optimizasyon deneylerinde optik uyarı ve yalancı uygulama gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntüleri 53-54
4.11. Tüm gruplar için beşinci optimizasyon deneyinin şematik gösterimi 55
4.12. Optik uyarı, yalancı uygulama ve kontrol gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntüleri 56-57
4.13. Optik uyarı, yalancı uygulama ve kontrol gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntülerinde hipokampus CA3 alt bölgesinde NF-κB işaretlemeleri 57
4.14. Beşinci optimizasyon deneylerinde beyin kesitlerinde hipokampusta enjeksiyon yapılan bölgelerde IL-6 işaretlemesini gösteren konfokal mikroskop görüntüleri 58
4.15. Beşinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı ve kontrol gruplarından elde edilen beyin kesitlerinin uyarılma ve ışıma taraması 59

1. GİRİŞ

Nörotransmiter dengesinin bozulmasının depresif bozukluğa yol açtığı hipotezi ile birlikte psikiyatri için devrimsel nitelikte olan psikiyatrik hastalıkların da biyolojik bir sebebi olduğu düşüncesi ortaya konmuştur (1). Mono-aminerjik teori sayesinde onlarca yeni ilaç geliştirilmiş olsa da, 50 yıl boyunca depresyonun patofizyolojisinde ortaya atılan diğer hipotezler kanıtlanamamıştır (2-4). Antidepresan ilaçlar bir devrim niteliğindeydi ancak majör depresif bozukluğu olan hastaların dörtte birinden fazlasının antidepresan tedaviye yanıt vermediği görülmüştür (5). Bunun en önemli nedenlerinden biri de tedavilerin depresyonun patofizyolojik mekanizmaları hedef alınarak yapılmamış olmasıdır. Bu nedenle depresyonun altında yatan patofizyolojik mekanizmaların anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF) düzeyinin azalması (nörotrofik model) (6), limbik-kortikal model (7), kortiko-striatal model (8) gibi majör depresif bozukluğun sebepleri ile ilgili yeni hipotezler geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan "depresyonun inflamatuvar hipotezi" ile depresyon patofizyolojisinde inflamatuvar sürecin rolü olduğu ileri sürülmüştür. Bu hipotez birçok araştırmanın konusu olsa da kanıtlar dolaylı olup çalışmaların çoğu periferik inflamatuvar yanıtın beyin üzerindeki etkilerine odaklandığından beyin-kaynaklı inflamasyonun depresyon patofizyolojisinde doğrudan etkileri olup olmadığı henüz gösterilmemiştir.

Depresyon ve inflamasyon arasında ilişki olduğu hipotezi ilk defa insan çalışmaları ile ortaya konmuştur. Ancak insanlar üzerine yapılan çalışmalar bu karmaşık patofizyolojiyi tam olarak modelleyebilmek için tek başına yeterli değildir (9). Nörobilim araştırmalarında kullanılan yöntemlerin ilerlemesi sayesinde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile depresyon ve inflamasyon alanında yeni bir çağa girilmiştir. *In vitro* çalışmalar, hücre düzeyinde büyük katkılar sunmuş olsa da depresyonun sadece bir veya birkaç hücre serisi ile oluşturulan protokoller ile modellenemeyecek kadar karmaşık olması sebebiyle *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır (9). Nöro-inflamasyonun depresyon üzerindeki etkilerini inceleyen *in vivo* çalışmaların önemli kısıtlılıklarından biri inflamasyonun lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel bir

endotoksin ile modellenmesidir (10). Ancak bu model infeksiyon hastalıklarına veya periferik kanda sitokinlerin artışıyla karakterize diğer hastalıklara ikincil depresyon için uygun bir model olsa da primer depresyonun patofizyolojisinin çalışılmasında uygun bir model değildir.

Beyinden köken alan nöro-inflamasyonun tetiklenmesinin depresyon ve anksiyeteye etkilerini inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Beyinden köken alan ve ekzojen bir tehditle tetiklenmeyen inflamatuvar süreçlerin depresyondaki rolünün incelenmesi için daha güvenilir modellere ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasında optogenetik yöntemler ile beyinde hedeflenen bölgede nöro-inflamasyonu uyaracak *in vivo* protokol geliştirilmesi, dolayısıyla da beyin kökenli inflamasyonu güvenilir şekilde modellenmesi amaçlandı.

Beyinde hedeflenen bölgede nöro-inflamasyonu uyaracak *in vivo* protokol geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen deneylerde hipokampusa stereotaksik cerrahi ile kanül yerleştirildikten sonra tekrarlayan plazmid enjeksiyonları ile $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom reseptörleri aktarıldı. Sonrasında kriptokrom reseptörler optik uyarı ile aktive edildi. Optimizasyon deneyleri ile plazmid enjeksiyonunun kaç günde bir tekrarlanacağı, toplam enjeksiyon sayısı, enjeksiyon hacmi, plazmid enjeksiyonundan ne kadar süre sonra optik uyarı verileceği, optik uyarının özellikleri ve en son optik uyarıdan ne kadar süre sonra sakrifiye edileceği ile ilgili parametrelerin optimize edilmesi amaçlandı.

Optimizasyon deneyleri sonucunda tekrarlayan plazmid enjeksiyonun yol açtığı travmanın yoğun otoflörosans sinyaline sebep olduğunu ve bu kadar yaygın bir sinyal içinde araştırılan sinyalleri saptamanın mümkün olmadığını değerlendirildi. Bu sebeple tekrarlayan plazmid enjeksiyonları ile aktarılan $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom reseptörlerinin optik olarak uyarılmasının hipokampusta tetiklenen nöro-inflamasyonun depresyon ve anksiyete ile ilişkili davranışlara yol açacağı hipotezini test etmek için uygun bir yöntem olmadığı sonucuna varıldı.

Tekrarlayan enjeksiyonların sebep olduğu bu sorunun üstesinden gelebilmek için gelecek çalışmalarda $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom reseptörlerinin plazmid yerine viral vektörler ile tek enjeksiyonda aktarılması planlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamasyon

Bağışıklık sisteminin, hücre hasarına ve yabancı antijenlere verdiği yanıta inflamasyon denir (11-13). İnflamasyon sayesinde immün sistemin bileşenleri hasarın gerçekleştiği veya enfekte olan dokuya gider ve onarım sürecini başlatır (11-13).

İmmün sisteminin fonksiyonları üç adımda özetlenebilir. İlk olarak, başlatan sebebin dış kaynaklı (eksojen) patojenler mi yoksa içten kaynaklanan (endojen) tehlike ve hasarlar mı olduğunun ayırt edilmesidir. İkinci adım, başlatan sebebin sınırlandırılması ve sonlandırılmasıdır. Son olarak da verilen yanıtın kontrol edilmesi ve durdurulmasıdır (11). İmmün sistemin verdiği yanıtın şiddeti veya bölgesi sınırlandırılamazsa kendisi dokuya zarar vermeye başlar (14). Yetersiz inflamasyon hücre hasarının veya enfeksiyonun sınırlandırılamamasına sebep olurken, aşırı ve kontrolsüz inflamasyon ise doku hasarına sebep olur (15).

İmmün sistem, hasarla ilişkili moleküler paternleri (*damage associated molecular patterns,* DAMP) patern tanıma reseptörleri (*pattern recognition receptors,* PRR) aracılığıyla tespit eder. DAMP'lar hem iç tehditlere bağlı salıverilen "alarminler" hem de dış kaynaklı "patojen-ilişkili moleküler paternler" (*pathogen associated molecular pattern,* PAMP) olabilir (11, 16). Sonuç olarak çevresel koşullardaki değişime/tehdite dair immün sinyal oluşur ve patojene/hasara ait özellikler tanınır (11, 16). PRR'lar hücrede bulundukları konuma göre ikiye ayrılır. Membrana bağlı PRR'ler Toll-benzeri reseptörler (TLR) olarak adlandırılırken, sitoplazmada bulunan PRR'lere NOD-benzeri reseptörler (NLR) denir (17).

Vücutta hücre hasarı tehdidi ortaya çıktığında veya gerçekleştiğinde çift zincirli DNA, HMGB1, sitokrom c, ATP, S100 proteinleri gibi DAMP'lar açığa çıkar (16). DAMP'lar TLR ve NLR gibi PRR'leri veya CD44, CD91, integrinler, ileri glikalizasyon son ürün reseptörü (*receptor for advanced glycation endproducts*, RAGE) gibi PRR olmayan reseptörleri uyarır (16, 18). TLR ve NLR'ler uyarıldığında aktive B hücrelerin nükleer faktör κ-hafif-zincir-uyarıcısı (NF-κB), kaspaz 1, MAP kinaz gibi inflamatuvar kaskadları başlatır (11).

2.2. Nöro-inflamasyon

Uzun yıllar boyunca merkezi sinir sisteminin (MSS) immün-ayrıcalıklı olduğuna inanılmaktaydı. Kan beyin bariyeri (KBB) sebebiyle periferdeki immün sistem hücrelerinin ve sitokinlerin, sağlam MSS'ye geçiş yapamadığı; kortikal parankimde özelleşmiş myeloid hücreler olan mikrogliaların MSS'deki inflamasyondan sorumlu olduğu ve bu işlevi sistemik dolaşımdan bağımsız olarak gerçekleştirdiği düşünülmekteydi (19, 20). Fakat son yıllarda immün sistem ile MSS arasında karşılıklı etkileşimler olduğu ortaya konmuştur. İnflamatuvar moleküllerin MSS'nin sadece patolojik süreçlerinde değil aynı zamanda fizyolojik işlevlerinde de görev aldığı gösterilmiştir (20). Söz konusu gelişmeler "nöro-inflamasyon" kavramını ortaya çıkarmıştır.

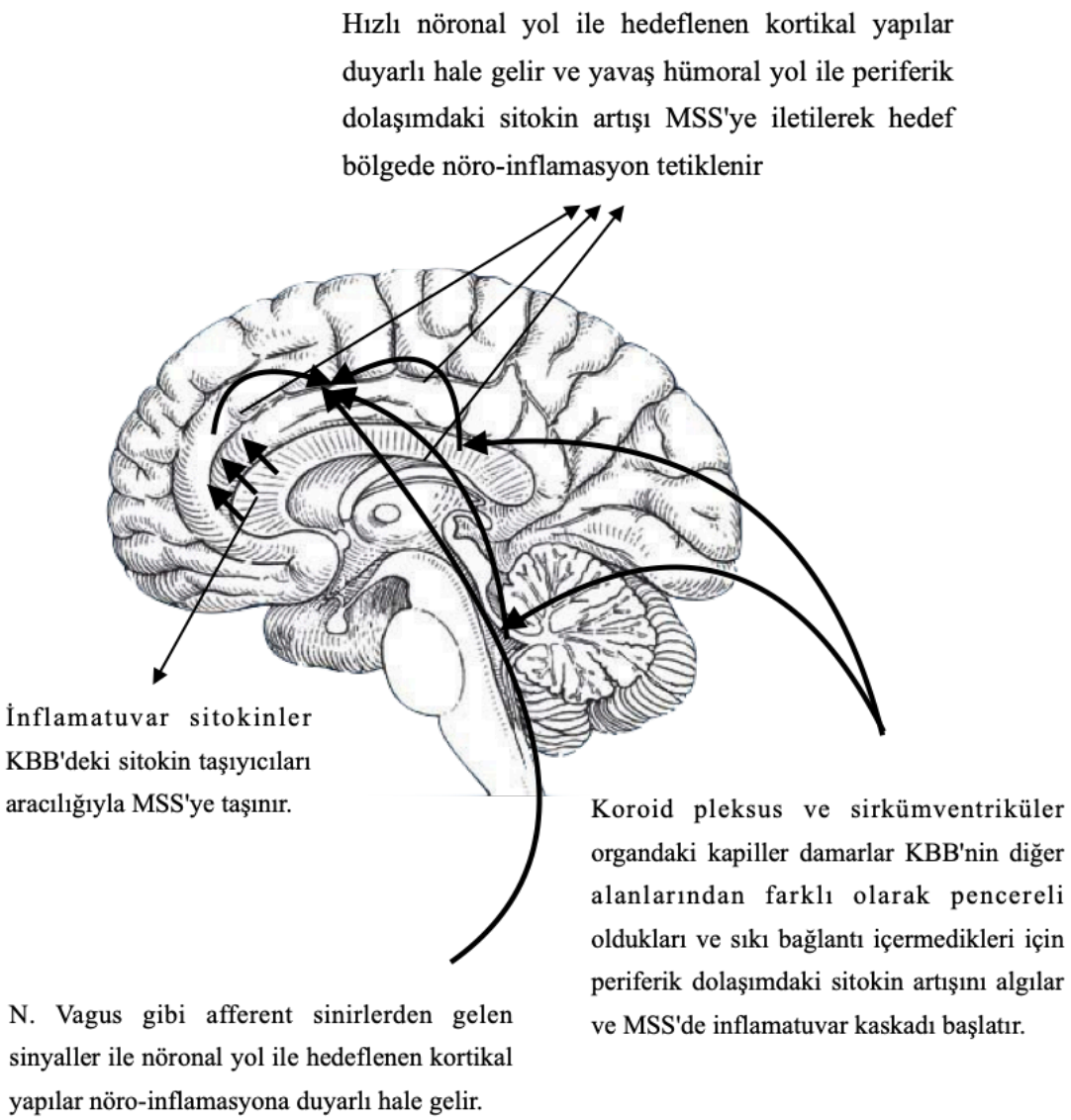
Nöro-inflamasyon hızla gelişen geniş bir konudur (20, 21). Bu bölümde, tez çalışmalarında bu konunun neden tercih edildiğini daha iyi açıklayabilmek ve deney sonuçlarını tartışabilmek için nöro-inflamasyonun ilgili alanları hakkındaki güncel literatür bilgileri özetlenmiştir.

Nöro-inflamasyon; en basit haliyle, beyin ve medulla spinalisin inflamasyonu olarak tanımlanabilir. Nöro-inflamasyon; enfeksiyon, travma ve toksik metabolitler gibi MSS'de doku hasarına sebep olan etmenlere verilen yanıt ile sınırlı değildir. Nöro-inflamasyon; sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen molekülleri ve ikincil mesajcı moleküller ile düzenlenen MSS'deki tüm inflamatuvar sinyalleşmeleri kapsar (22). Nöro-inflamatuvar sinyalleşme, MSS'nin gelişiminde, öğrenme gibi hayati fizyolojik işlevlerinin sürdürülmesinde ve değişen iç ve dış çevre koşullarına uyumlu yanıtlar geliştirmesinde görev alır (22, 23).

Becher ve arkadaşları (2017) MSS'deki inflamatuvar süreçleri (1) merkezi sinir sistemine kandan giren immün hücrelerden kaynaklı ve (2) merkezi sinir sisteminde yerleşik hücrelerden kaynaklı olarak ikiye ayırmışlardır (20). Ensefalit ve demiyelizan hastalıklarda MSS'deki inflamasyon KBB bütünlüğünün bozulması sonucu sistemik dolaşımdaki lökositlerin ve myeloid hücrelerin MSS parankimini infiltre etmesi sonucu ortaya çıkar. Bu hücreler MSS'yi invaze ettikten sonra

salıverdikleri sitokinlerle inflamatuvar kaskadı başlatır. Sonuç olarak diğer inflamatuvar hücrelerin de bu bölgeye gelmesini ve aktive olmasını uyarırlar (20). (2) Fizyolojik mekanizmalarla parçalanamayan proteinlerin beyin parankiminde birikmesi (Parkinson hastalığında α-sinüklein proteini, Alzheimer hastalığında Aβ protein, vb) sonucu ortaya çıkan nörodejeneratif hastalıklarda ise inflamasyon beyin içindeki homeostazın bozulmasına yanıt olarak tetiklenir. Bu sürece periferik immün hücrelerin katılımı sınırlıdır. Ancak patolojinin ileri aşamalarında KBB'nin bütünlüğünün bozulmasıyla periferdeki immün hücreler de MSS'deki inflamasyona katkı sağlayabilir (20).

KBB'nin hasar görmediği durumlarda da sistemik inflamasyon MSS'yi etkileyebilir (24, 25). Sistemik dolaşımdaki sitokin miktarı arttığında, KBB'yi oluşturan endoteliyal hücrelerdeki sitokin taşıyıcıları aracılığıyla sitokinler MSS parankimine taşınır (26). Koroid pleksus ve sirkümventriküler organdaki kapiller damarlar KBB'nin diğer alanların farklı olarak pencereli oldukları ve sıkı bağlantı içermedikleri için sistemik dolaşımdaki sitokinler bu bölgelerden beyin parankimine girebilir (25, 27, 28). Bunun yanısıra koroid pleksus ve sirkümventriküler organda yerleşik makrofaj benzeri hücreler, TLR'ler aracılığıyla sistemik dolaşımdaki sitokin artışını algılar ve MSS'de inflamatuvar kaskadı başlatır (29, 30). Ancak sistemik dolaşımdan MSS'ye aktarılan inflamatuvar sinyaller rastgele olarak bütün kortikal alanlarda uyarıya sebep olmaz. İnflamatuvar sinyaller, MSS'de vagal sinir gibi afferent nöronlarla özgül olarak inflamasyona duyarlı hale getirilen bölgede etki gösterir (24, 25).



Şekil 2.1. KBB'nin hasar görmediği durumlarda sistemik dolaşımdaki inflamatuvar sitokin artışının nöro-inflamasyonu tetikleme mekanizmaları [(24, 25, 31) kaynaklarındaki şekillerden uyarlanmıştır]

Şekil 2.1'de gösterildiği gibi nöro-inflamasyon özgüllüğü yüksek bir yolaktır. Sistemik dolaşımda artan sitokinler MSS'nin rastgele bir bölgesinde veya genelinde inflamasyona sebep olmaz. Özgül olarak inflamasyona duyarlı hale getirilen bölgelerde inflamasyon tetiklenir (24, 25). Örneğin gribal bir üst solunum yolu

enfeksiyonu sistemik dolaşımda proinflamatuvar sitokinlerin artmasına sebep olur. Öncelikle afferent sinirlerden gelen uyarılar ile lateral hipotalamusun nöro-inflamasyona duyarlılığı artar. Sonrasında perivasküler makrofajlar ve beyin venüllerindeki endoteliyal hücrelerin IL-1 reseptörleri, koroid pleksus ve sirkümventriküler organdaki miyeloid kökenli hücrelerin TLR'leri ve KBB'deki sitokin taşıyıcıları aracılığı ile MSS'ye, sistemik dolaşımda bir inflamatuvar süreç olduğu uyarısı gider. Bu uyarı duyarlılığı artmış olan lateral hipotalamusa iletilir. Vücudun enerji dengesi ve besin alımından sorumlu merkezi lateral hipotalamusta nöro-inflamatuvar bir süreçle uyarıldığında gribal üst solunum yolu enfeksiyonunda iştahsızlık semptomu ortaya çıkar. Özetle sitokin ve inflamatuvar moleküller uyarıyı başlattıkları reseptör aracılığı ile oluşan nöro-inflamasyonunun etkilediği beyin bölgelerini ve verilecek tepkiyi düzenler.

Öte yandan nöro-inflamasyon sadece patolojik süreçlerde değil fizyolojik süreçlerde de rol alır. Örneğin MSS'nin gelişme sürecinde düşük düzeyde nöro-inflamasyon gereklidir (22). IL-34, mikroglialardaki koloni uyarıcı faktör 1 (CSF-1, *colony stimulating factor 1*) reseptörünü uyarır. Bu uyarı mikroglial hücrelerin gelişme sürecinde ve homeostazlarının devam ettirilmesinde rol alır. Nöro-inflamasyon ayrıca KBB bütünlüğünün sürdürülmesinde de rol alır (20). IL-1β, IL-6, TNF-α ve IFN-γ gibi sitokinlerin nöronal gelişme sürecinde, nöro-plastisitede, sinaps oluşumunda ve MSS'de doku onarımında görevleri vardır (32). Nöro-inflamatuvar sinyaller hafıza oluşma mekanizmasında da rol oynar (22). Hipokampusta uzun dönemli potansiyel artışı (LTP, *long term potentiation*) sonrası IL-1β sentezinin artması hafızanın oluşturulmasını destekler (33, 34).

Özetle, beyinde inflamatuvar sinyalleşme hafıza ve hasar sonrası tekrar yapılanma (*remodelling*) gibi fizyolojik süreçlerde rol oynarken, bu sinyalleşmenin düzenlenmesinde bozulma sonucu ortaya çıkan şiddetli ve/veya kronik nöro-inflamasyon MSS'de hasara sebep olur (22).

2.2.1. NF-κB'nin İnflamasyonda ve Nöro-inflamasyondaki Yeri

NF-κB inflamasyon kaskadında merkezi bir role sahiptir ve kaskat içinde, üzerinde en çok çalışılmış transkripsiyon faktörlerinden biridir (35, 36). Memelilerde; p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 ve p52/p100 yapıları NF-κB ailesini oluşturur (37). NF-κB sinyal yolağı yerleşik veya yerleşik olmayan iki yoldan biriyle aktive olur ve hücre çekirdeğine geçer (36, 38). Aktifleşen NF-κB molekülü hücre çekirdeğine geçtikten sonra; bazı sitokinler [IL-1, IL-6 ve tümör nekroz faktörü (TNF)], adezyon molekülleri ve enzimler [siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LOX)] gibi inflamasyon ile ilişkili yüzlerce farklı genin ifade edilmesini düzenler (38).

Şekil 2.2'de gösterildiği gibi NF-κB, yerleşik ve yerleşik olmayan olarak adlandırılan iki farklı yol aracılığıyla uyarılır (36, 38). Her iki yolda da mikroçevrede bir değişimi haber veren sinyaller reseptörlere bağlanarak κB kinaz inhibitörü (IKK) kompleksini uyarır. IKK kompleksi, kinaz özelliğine sahip IKKα ve IKKβ alt parçalarından ve düzenleyici IKKγ parçasından oluşur (36, 38). Yerleşik yolun işlev gösterebilmesi için IKKβ ve IKKγ alt ünitelerine ve yerleşik olmayan yolun işlevsel olması içinse IKKα alt ünitesine ihtiyaç vardır (36, 38). Yerleşik NF-κB yolunda IKKγ, IKKβ aktivitesini düzenler (36).

Yerleşik yolda, p50 ve p65 (RelA) kompleksi aktif NF-κB sinyalini oluşturur. Uyarı olmadığında bu kompleks sitoplazma içinde κB inhibitörüne (IκB) bağlı olarak inaktif halde bulunur (36, 38). Yerleşik NF-κB yolu; IL-1, LPS ve TNF gibi proinflamatuvar moleküllerin sırasıyla IL-1 reseptörü, TLR ve TNF reseptörüne bağlanması ile uyarılır. Uyarı geldiğinde IKKβ aktive olarak IκB'yi serin amino asitlerinden fosforile eder, p50 ve p65 (RelA) kompleksinden ayırır (38). Açığa çıkan p50 ve p65 (RelA) kompleksi hücre çekirdeğine geçerek ilgili genlerin promotörlerinde κB bölgesine bağlanır ve genin ifade edilmesini düzenler (38, 39). Şekil 2.2'nin üst kısımda yerleşik NF-κB yolu gösterilmiştir. Yerleşik NF-κB yolu akut ve kronik inflamasyon yanıtlarının oluşmasında büyük öneme sahiptir (38).

Yerleşik olmayan NF-κB yolu; B hücre aktive edici faktör (BAF), CD40, lenfotoksin β (LTβ), NF-κB'nin reseptör aktivatörü (RANK) tarafından uyarılır (38). Yerleşik yoldan farklı olarak yerleşik olmayan NF-κB yolunda IKKα ve NF-κB uyarıcı kinaz (NIK) görev alır (36, 38). Uyaran olmadığında IKKα sitoplazmada dimer yapıda inaktif halde bulunur (36). Yerleşik olmayan NF-κB yolunda uyarı geldiğinde öncelikle TNF reseptörü ile ilişkili faktör (TRAF) 2 aktive olarak TRAF3'ün yıkımını uyarır. NIK'in susturulmasını sağlayan TRAF3 yıkılınca yeni sentezlenen NIK'lerin aktiviteleri önündeki engel kalkar (38). Yeni sentezlenen NIK'lar belli bir düzeye ulaştıktan sonra IKKα'yı uyarır. IKKα aktive olduğunda, RelB ile inaktif kompleks oluşturan p100'ü fosforile ederek yıkar ve p52 oluşmasını sağlar (38). Yerleşik olmayan yolda aktif NF-κB sinyalini oluşturan p52 ve RelB kompleksi hücre çekirdeğine geçerek ilgili genlerin ifade edilmesini düzenler (Şekil 2.2'in alt kısımda yerleşik olmayan NF-κB yolu gösterilmiştir).

Yerleşik olmayan NF-κB yolunun aktive olabilmesi için yeni NIK sentezlenmesi ve yeterli miktarda birikmesi gerekir. Bu nedenle yerleşik olmayan yol yerleşik yola göre daha yavaş çalışır (38, 40).

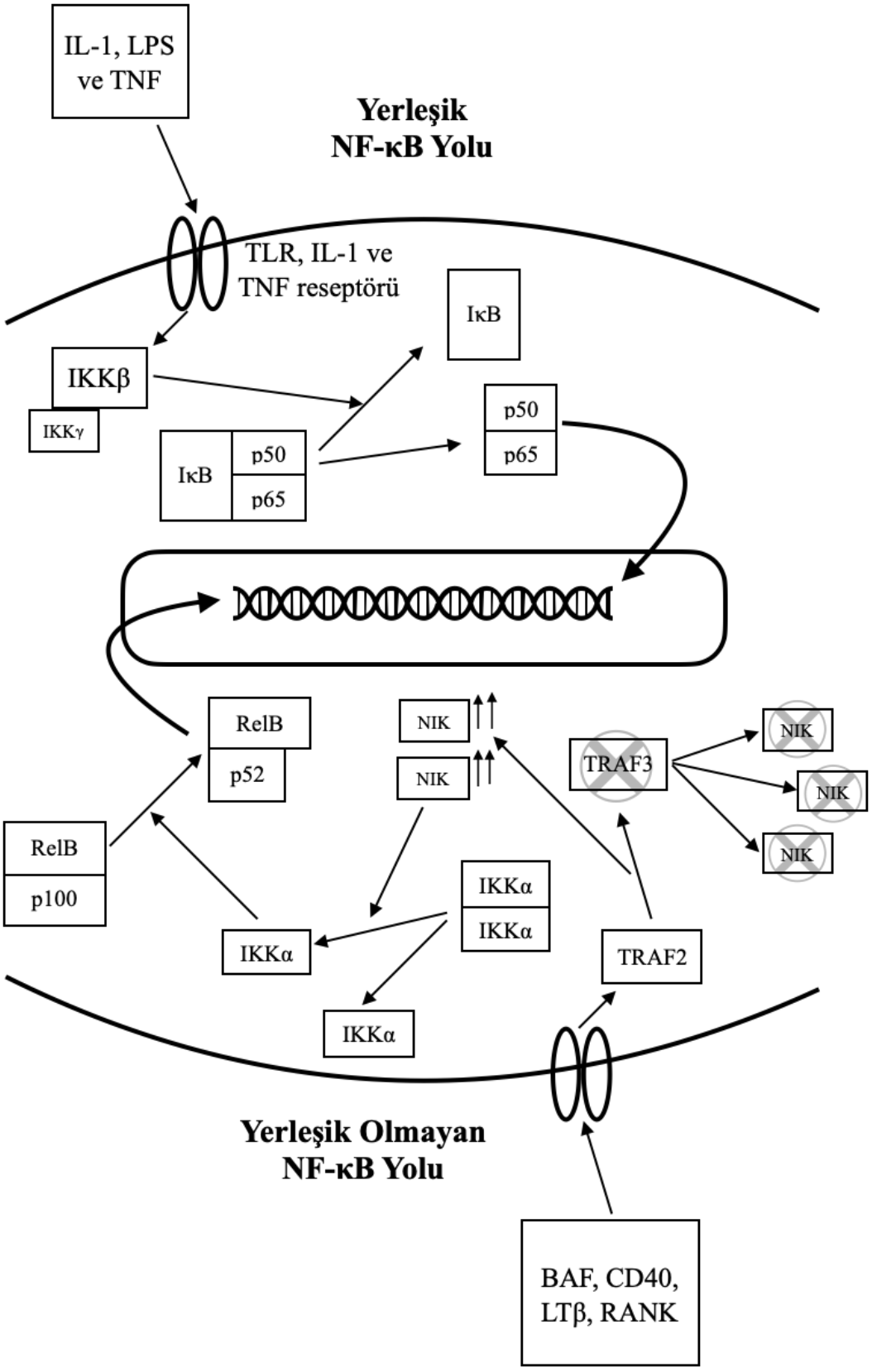
NF-κB'yi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu MSS'de oldukça yaygındır (38). Mikroglia ve astrositlerin MSS'de doku hasarına verdikleri gliozis yanıtı NF-κB aracılığıyla gerçekleşir (41, 42). NF-κB sinyali ayrıca KBB'nin geçirgenliğini düzenlemede rol oynar (43). Ayrıca NF-κB sinyalinin MSS'yi eksitotoksisite ve oksidatif stres gibi etkenlere karşı koruduğunu gösteren kanıtlar da mevcuttur (44, 45). Mikroglialarda bazal NF-κB aktivitesi nöronlardakine göre düşük olmasına karşın daha uyarılabilir olma özelliğine sahiptir (46).

MSS'de NF-κB yolakları büyük oranda mikroglia ve astrositlerde çalışılmış olsa da, nöronlarda NF-κB sinyalinin işlevlerini inceleyen çalışmalar da vardır (47-53). Korteks ve hipokampus gibi bölgelerdeki glutamaterjik nöronlarda aktif NF-κB sinyali olduğu ve bu sinyalin N-metil-D-aspartat (NMDA), AMPA ve L tipi kalsiyum kanal inhibitörleri ile baskılanabildiği gösterilmiştir (48, 49). NF-κB

kaskadının nöronal bilgi işlenmesinde ve sinaptik plastisitede rolü olduğu gösterilmiştir (51, 53). Ayrıca nörogenez sürecinde NF-κB sentezi artar (47, 50, 52).

MSS'de nöron ve glial hücrelerde NF-κB sinyali baskın olarak yerleşik yol üzerinden, p50 ve p65 (RelA) dimer sentezi aracılığı ile oluşur (54). Nörogenez ve yeni sinaps oluşumu ile nöro-inflamasyon arasındaki ilişki önemli ölçüde p50 ve p65 molekülleri üzerinden çalışılmıştır (55). NF-κB'nin depresif bozukluk üzerine etkilerini inceleyen araştırmaların çoğunluğu çalışma protokollerini yerleşik NF-κB yolağı üzerinden belirlemiştir (55-60). Nöro-inflamasyonun, psikolojik stresin depresif bozukluğa yol açmasında kolaylaştırıcı bir rolü olduğu hipotezini ortaya atan çalışmalar genel olarak p50 ve p65 molekül ekspresyonu aracılığı ile NF-κB sinyalini incelemiştir (55, 57, 58, 60).

Son yıllarda nöro-inflamatuvar süreçlerde NF-κB kaskadının, yerleşik ve yerleşik olmayan yolların ötesinde, daha karmaşık rollere sahip olduğu gösterilmiştir (45). NF-κB ailesini oluşturan beş molekülün ve oluşturdukları dimerlerin, özgül olarak birbirlerinden farklı süreçlerde görev aldığı ortaya konmuştur (45). Örneğin, yerleşik yolda ortaya çıkan p50/RelA dimeri iskemi ve nörotoksisite sonrası ortaya çıkan nörodejeneratif süreçlerde görevlidir (45, 61, 62). RelA'nın ayrıca Alzheimer hastalığı patofizyolojisinde de rolü olduğu düşünülmektedir (63). Ayrıca c-Rel içeren NF-κB dimerlerinin Bcl-xL ve MnSOD aracılığıyla anti-apoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir (38). Bu sebeple c-Rel'in nöroprotektif etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (45, 64). Migren aurasını modelleyen kortikal yayılan depresyonun erken döneminde (1-5 saat) proinflamatuvar p65/p50 çiftleri baskınken, 24. saatte antiinflamatuvar p65-cRel çiftlerinin baskın hale geldiği gösterilmiştir (65). Bu da önceki çalışmalara paralel olarak, cRel'in kortikal yayılan depresyonun tetiklediği inflamasyonun çözülmesinde rolü olduğuna işaret etmektedir.

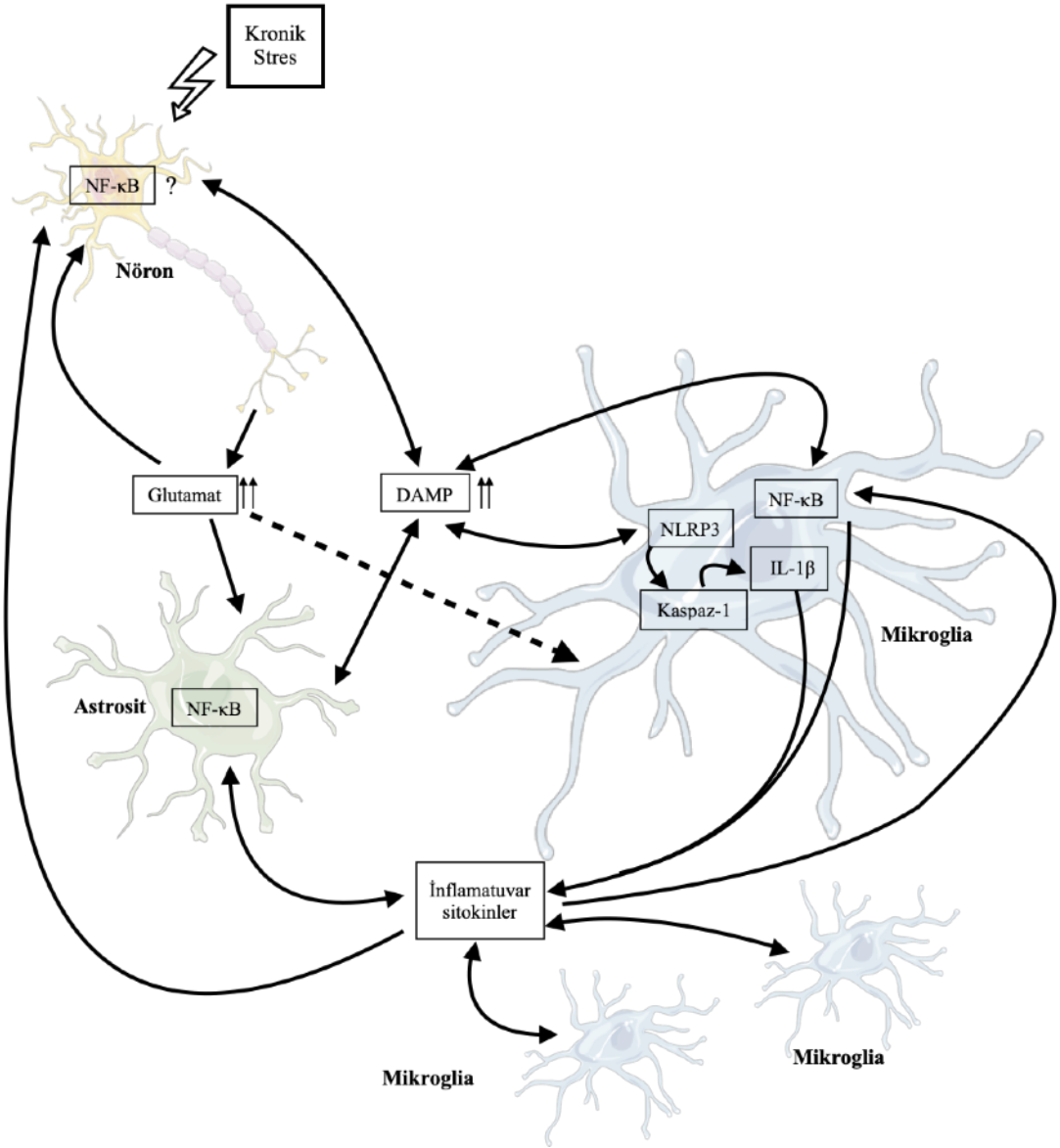


Şekil 2.2. Yerleşik (üst) ve yerleşik olmayan (alt) NF-κB yolları [(36, 38, 66) kaynaklarındaki şekillerden uyarlanmıştır]

2.2.2. Merkezi Sinir Sistemi Hücreleri ve Nöro-inflamasyon

Mikroglia ve astrositler beyin parankiminde inflamatuvar sinyaller aracılığıyla tehdide yol açan etmenleri saptar ve bu tehdide karşı yeni yanıtlar geliştirerek homeostazın devamını sağlar (67-69). Bu amaçla özellikle mikroglialar hücre uzantıları ile yakın çevrelerindeki PAMP'lar, DAMP'lar ve sitokinler gibi haberci molekülleri tespit etmekle görevlidir (20, 70) (Şekil 2.3). Astrositler, DAMP ve PAMP sinyal moleküllerine mikroglialar kadar duyarlı olmasalar da, kortikal parankimde özellikle glutamat, D-serin, ve ATP konsantrasyonunu denetlemede görev alırlar (20, 70). Uyarılan mikroglialar TNF-α, IL-6, IL-1α ve IL-1β gibi pro-inflamatuvar sitokinler salıvererek nöro-inflamasyonun ilerlemesini sağlar (71, 72) (Şekil 2.4). Mikroglia ve astrositler arasında inflamatuvar sinyaller aracılığı ile yoğun bir bilgi alışverişi mevcuttur (70, 72). Mikroglialardan salıverilen pro-inflamatuvar sitokinler, astrositlerde inflamatuvar moleküllerin ekspresyonunu arttırır ve nöronlarda glutamat reseptörü 1 (GluR1) gibi reseptörlerin ekspresyonunu azaltarak LTP oluşumunu ve nöroplastisiteyi sınırlar (34, 70, 72) (Şekil 2.3). Eksitotoksisite ve oksidatif stres gibi merkezi sinir sistemindeki tehditlere karşı verilen nöro-inflamasyon yanıtının öncelikli amacı nöronların korunmasını sağlamaktır (38). Ancak mikroglia, astrosit ve nöronlardan DAMP sinyal moleküllerinin salıverilmeye devam etmesi durumunda nöro-inflamasyonun büyümesi ve süreğenleşmesi nöronal hasarın artmasına sebep olur (38, 73) (Şekil 2.4).

Yakın zamana kadar nöronlar ve mikroglia hücreleri arasındaki iletişimin sadece tek yönlü olduğu ve nöronların nöro-inflamatuvar süreçlerde pasif bir rol oynadığı düşünülüyordu. Ancak son yıllardaki çalışmalar bu ilişkinin tek yönlü olmadığını göstermiştir (69). Glutamaterjik uyarı artışı nöronlardan ve astrositlerden ATP salıverilmesini tetikler (10, 74, 75). Beyin parankiminde hücre dışı alanda ATP artışı pürinerjik reseptörler aracılığı ile mikrogliaların aktive olmasını ve pro-inflamatuvar sitokin salıvermelerini sağlar (20, 69, 70) (Şekil 2.4).



Şekil 2.3. Kronik stres ile tetiklenen nöro-inflamasyonda MSS hücreleri [(10) makalesindeki uyarlanmıştır]

MSS'de nöro-inflamatuvar sinyaller mikro çevredeki değişikliklere yanıt oluşturması dışında beynin fizyolojik işleyişi için de gereklidir (69, 70, 72). Beyin dokusunda NF-κB gen ifadesini yapısal ve uyarılabilir olarak ikiye ayırabiliriz (38). Özellikle serebral korteks ve hipokampusta bulunan glutamaterjik nöronlarda yüksek düzeyde olduğu gösterilen bazal NF-κB aktivitesi, yapısal NF-κB olarak adlandırılmıştır (46, 76) (Şekil 2.3). Glutamat antagonistleri ve L-tipi kalsiyum kanal blokörleri ile baskılanabiliyor olması yapısal NF-κB aktivitesinin, bazal sinaptik aşırım sebebiyle kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir (38, 46, 49, 77).

Yapısal NF-κB aktivitesinin genetik olarak bozulduğu hayvan modeli çalışmalarında öğrenme ve hafıza oluşumunun bozulduğu, hipokampusta sinaptik dansitenin azaldığı ve yosunsu lif (*mossy fiber)* projeksiyonlarının azaldığı bildirilmiştir (46). Sonuç olarak yapısal NF-κB aktivitesinin nöronal bilgi işlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir (38).

Merkezi sinir sisteminde astrosit ve mikroglia gibi nöron dışındaki hücrelerde bazal NF-κB aktivitesi mevcut değildir, mikro çevredeki değişiklikler sonrası uyarılır (38, 46) (Şekil 2.3). Ayrıca nöronlarda yapısal NF-κB aktivitesinin yanında uyarılabilir NF-κB aktivitesi de mevcuttur (49, 78). Yapısal NF-κB aktivitesine benzer olarak, merkezi sinir sisteminde uyarılabilir NF-κB aktivitesi bellek oluşmasında görev alır. Özellikle glutamaterjik sinyaller, sinapslarda bulunan uyarılabilir NF-κB aktivitesini arttırır (49, 78). p65 (RelA) geni baskılanmış farelerde glutamaterjik sinyaller ile sinapslarda NF-κB aktivitesinin değişmediği ve bu farelerin öğrenme güçlükleri yaşadıkları gösterilmiştir (49). Bu nedenle kısa süreli sinaptik sinyallerin, sinapsta bulunan uyarılabilir NF-κB gen ifade değişiklikleri aracılığıyla kalıcı değişiliklerde, yani uzun süreli hafıza oluşumunda görev aldığı düşünülmektedir (38, 49, 78).

Spinal dorsal kökte ağrıya karşı aşırı duyarlılık çalışmalarında; ATP'nin mikroglial hücrelerde purinerjik reseptörlere bağlanmasının LTP oluşumunu desteklediği, purinerjik reseptörler inhibe edildiğinde tetanik sinir uyarısı sonrası LTP oluşmadığı ve ağrıya karşı aşırı duyarlılık gelişmediği gösterilmiştir (79, 80). Nöronlardan salıverilen ATP düşük konsantrasyonda ise mikroglialardan salıverilen plazminojenin, nöro-protektif etkisi olduğu düşünülmektedir (69). Mikroglialar, bunun yanısıra, aldıkları sinyale göre IL-10 ve TGF-β gibi anti-inflamatuvar sitokinler de üretebilirler (69). Ancak nöronların hasar görmesi durumunda salıverilen yüksek miktarda nükleotid, mikroglialardan TNF-α ve IL-6 salıverilmesine ve nöro-inflamasyonun artmasına sebep olur (Şekil 2.3). Sonuç olarak, mikroglia hücrelerinin orta şiddette ve kısa süreli inflamatuvar sinyallerle aktivasyonu MSS'nin işlevlerini sürdürebilmesine ve hasardan korunmasını sağlarken yüksek şiddette ve uzamış inflamatuvar sinyallerle tetiklenen mikroglial aktivasyon nöronal hücre ölümünün artmasına sebep olur (22, 72, 81).

2.3. Majör Depresif Bozukluk ve Nöro-inflamasyon

Majör depresif bozukluk ve inflamasyon arasında ilişki olduğu hipotezi 50 yıldan uzun süre önce, MSS enfeksiyonu dışındaki kronik inflamatuvar hastalıkların duyguduruma etkilerinin araştırılması ile ortaya atılmıştır (82). Majör depresif bozukluğu olan hastalarda IL-1β, IL-6 ve TNFα gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin kan düzeylerinin daha yüksek olduğunun tespit edilmesi ile bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır (83, 84). Özellikle klasik antidepresan tedavilerine dirençli depresyon hastalarında dolaşımdaki pro-inflamatuvar sitokin düzeylerinin tedaviye yanıt veren hastalara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (85). Ayrıca antidepresan ilaç kullanımının inflamatuvar sitokinlerin normal seviyeye gelmesine yardımcı olduğu ve non-steroid anti-inflamatuvar ilaç eklenmesinin depresyon tedavisini güçlendirdiği bildirilmiştir (86-88). Antidepresan ilaçlar sadece sistemik dolaşımda değil beyin parankiminde de inflamatuvar sinyallerin normal seviyeye gelmesine yardımcı olmaktadır. Örneğin fluoksetin hipokampusta reaktif oksijen radikal düzeyini azaltarak NLRP3 aktivitesini inhibe eder ve kaspaz-1, IL-1β düzeylerinin normale dönmesini sağlamaktadır (89). Sistemik dolaşımda pro-inflamatuvar sitokin artışının iştahsızlık, psikomotor yavaşlama, sosyal olarak içe kapanma, motivasyonda azalma gibi hastalık ile ilişkili davranışlara yol açtığının gösterilmesi ile inflamasyonun depresyon patofizyolojisinde rolü olduğu hipotezi daha da güçlenmiştir (22, 24, 90, 91).

Yukarıda anlatıldığı gibi, depresyon ve inflamasyon arasında ilişki olduğu hipotezi ilk defa insan çalışmalarıyla ortaya konmuştur. Özellikle kanda sitokin düzeyi ve ölüm ardı elde edilen beyin dokuları ile yapılan çalışmalar bu alanda öncü olmuştur (gözden geçirme için bkz. (9)). Ancak deneysel araştırma protokollerindeki kısıtlılıklar sebebiyle insan üzerine yapılan çalışmalar, depresyon ve nöroinflamasyon arasındaki ilişki gibi karmaşık bir patofizyolojiyi tam olarak modelleyebilmek için tek başına yeterli değildir. Nörobilim araştırmalarında kullanılan yöntemlerin ilerlemesi sayesinde yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile depresyon ve inflamasyon alanında yeni bir çağa girilmiştir.

In vitro çalışmalar, nöro-inflamasyon arasındaki ilişkinin hücre düzeyinde anlaşılması, moleküler yolakların ve farmakolojik hedeflerin ortaya çıkarılması için büyük katkılar sunmuştur (gözden geçirme için bkz. (9, 92)). Ancak depresyon sadece bir veya birkaç hücre serisi ile oluşturulan protokoller ile modellenemeyecek kadar karmaşık bir patofizyolojiye sahiptir. Bu kısıtlılığın üstesinden gelebilmek için, *in vitro* çalışmalar ile elde edilen bilgilerin *in vivo* protokoller ile desteklenmesi gerekmektedir (9).

Yaklaşık on yıl öncesine kadar inflamasyon ve depresyon arasındaki ilişkinin; sistemik dolaşımdaki inflamatuvar sinyal artışının MSS'yi etkileyerek depresif semptomlar ile sonuçlanması ile sınırlı olduğu görüşünün hakim olması ve yöntemsel kısıtlılıkların bulunması sebebiyle, depresyon patogenezinde inflamasyonun rolünü inceleyen *in vivo* çalışmalarda LPS gibi bakteriyel bir endotoksinin enjeksiyonu ile enfeksiyona ikincil depresyon modellenmiştir (56, 60, 93-96). Ancak son yıllarda LPS ile modellenen depresyon, klinikte görülen majör depresyon için iyi bir model olmadığı; majör depresyonun daha iyi anlaşılabilmesi için MSS-kökenli nöro-inflamasyonun modellenmesi gerektiği görüşü hakim olmaya başlamıştır (10).

İlk defa Ronald Duman ve ekibi yazdıkları derlemede (2013) psikolojik stresin inflamasyon kaskadını uyarabileceği hipotezini ortaya atmıştır (90). Hipotezi ortaya atan yazarların da dahil olduğu ekip, 2016 yılında yayınladıkları çalışmalarında öne sürdükleri hipotezi test etmiştir. Sıçanlarda akut hareket kısıtlaması ile tetiklenen stres sonrası, hipokampus bölgesinde NLRP3 inflamazom aktivasyonunun arttığı; hücre dışı ATP, glutamat, IL-1β ve TNF seviyelerinin yükseldiği saptanmıştır (10). Akut hareket kısıtlaması yapılmadan önce sıçanlara P2X7R antagonisti verildiğinde yukarıda bahsedilen, stres ile tetiklenen inflamatuvar değişikliklerin gözlenmediği bildirilmiştir (10). P2X7R antagonisti verilen sıçanlarda ve transgenik olarak NLRP3 geni silinmiş farelerde, kontrol gruplarının aksine kronik öngörülemeyen hafif stres (KÖHS) protokolü sonrası anhedoni ve anksiyete ile ilişkili davranışların ortaya çıkmadığı gösterilmiştir (10). Ancak bu çalışmanın önemli kısıtlılığı nöro-inflamatuvar değişikliklerin ve inflamazom kompleksi oluşumunun yalnızca akut stres sonrası incelenmiş olmasıdır. Akut stres yanıtının

bozulan homeostazı yeniden kurmak için adaptif bir yanıt olduğu, ancak bu yanıtın kronikleşmesinin maladaptif sonuçlar doğurduğu iyi bilinmektedir (97). Bu nedenle genellikle hayvanlarda depresyon için tercih edilen model kronik strestir.

Son 10 yıldaki hayvan deneyi çalışmaları ile kronik stresin MSS'de ve özellikle hipokampus bölgesinde NF-κB ve NLRP3 sinyallerinde artışa sebep olduğunun gösterilmesi, Ronald Duman ve ekibinin hipotezini desteklemiştir (56, 58, 59, 96). Pan ve arkadaşları (2014) 12 hafta boyunca sıçanlara KÖHS protokolü uyguladıklarında MSS'de inflamatuvar belirteçlerde artış olduğu halde kandaki inflamatuvar sitokinlerin düzeyinde değişme olmadığını göstermişlerdir (98). Takip eden çalışmalar enfeksiyonla ilişkili sinyaller veya sistemik dolaşımda inflamatuvar değişiklikler olmaksızın kronik stresin nöro-inflamasyona sebep olabildiği hipotezini güçlendirmiştir (10, 99).

Kronik stresin depresif bozukluk ile sonuçlanmasının patogenezinde nöro-inflamasyonun rolü konusunda önerilen farklı mekanizmalar vardır. Örneğin, MSS'de pro-inflamatuvar sitokin artışının ventromedial prefrontal korteks, subgenual dorsal anterior singulat korteks ve bazal gangliada dopamin miktarını azalttığı ve bu nedenle ödüle karşı daha az aktivasyon görülmesine sebep olduğu hipotezi ileri sürülmüştür (25, 100).

Başka bir görüş, şiddetli ve/veya uzun süreli nöro-inflamasyonun glutamaterjik NMDA reseptör agonisti olan kinolinik asit salıverilmesine bağlı olarak nörotoksisiteye sebep olduğunu öne sürmüştür (91). Bu hipoteze göre psikolojik stres sonrası öncelikle NLRP3 aktivasyonu gerçekleşir ve sonrasında daha uzun süren TNF-α artışı takip eder (10, 101). TNF-α, interferon-gama (IFN-γ) ile birlikte indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) enziminin aktivitesini indükleyerek triptofanın serotonin sentezi yerine kinürenin metabolizmasına girmesine, kinürenin ve kinolinik asite yıkılmasına sebep olur (24, 102). Sonuç olarak şiddetli ve/veya uzun süreli nöro-inflamasyon aşırı NMDA uyarısına bağlı olarak nörotoksisiteye sebep olur (91).

Yukarıda bahsedilen çalışmalar sonucunda, kronik stresle tetiklendiği gösterilen MSS'deki NF-κB ve inflamazom gibi inflamatuvar yolaklar majör depresif

bozukluk için potansiyel bir tedavi hedefi haline gelmiştir. Bu hipotezi inceleyen araştırmalarda, hayvan deneylerinde farmakolojik müdahaleler ile MSS'de NF-κB ve inflamazom yolakları inhibe edildiğinde, stresle tetiklenen depresyon ile ilişkili davranışların önlenebildiği bildirilmiştir (53, 58, 59, 95, 96). Bunu destekleyecek şekilde, NF-κB yolağının uyarılmasının veya inflamazom kompleksinin oluşumunun transgenik olarak engellendiği hayvanların kronik stresin depresif etkilerine karşı naif kontrollerden daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (58, 99, 103).

Beyinden köken alan nöro-inflamasyonun tetiklenmesinin depresyon ve anksiyeteye olan etkilerini inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Beyinden köken alan ve ekzojen bir tehditle tetiklenmeyen inflamatuvar süreçlerin depresyondaki rolünün incelenmesi için daha güvenilir modellere ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasında, optogenetik yöntemler ile beyinde hedeflenen bölgede nöro-inflamasyonu uyaracak *in vivo* protokol geliştirilmesi, dolayısıyla da beyin kökenli inflamasyonu güvenilir şekilde modellenmesi amaçlanmıştır.

Transgenik yöntemler özgül olarak seçilen inflamatuvar yolağın tetiklenmesine olanak sağlar. Ancak transgenik yöntemlerle yapılan müdahalelerin zamansal özgüllüğü düşüktür, kullanılan deney hayvanının konsepsiyonundan itibaren etkileri görülür. Ayrıca genetik teknikler ile oluşturulan değişiklikler bütün organizmayı etkileme potansiyeline sahiptir (104). Nöro-inflamatuvar sinyallerin fizyolojik koşullarda da işlevleri olması sebebiyle transgenik yöntemler beyin kökenli nöro-inflamasyonun tetiklenmesinin depresyon ve anksiyeteye olan etkilerini incelemek için uygun değildir. Farmakolojik yöntemler zamansal olarak özgül müdahale yapılmasına olanak sağlar. Beyin kökenli nöro-inflamasyonun tetiklenmesinin depresyon ve anksiyeteye olan etkilerini farmakolojik bir yöntem ile test etmek için tekrarlayan enjeksiyonlar yapılması gerekir. İntrakortikal enjeksiyon hacmi ve tekrar sayısı arttıkça hedeflenen inflamatuvar yolak dışında etkiler gözleneceği için farmakolojik yöntemlerin tez çalışmasında kurulan hipotezi test etmek için uygun değildir (105). Bu nedenlerle bu tez çalışmasında optogenetik uyarı ile inflamatuvar sinyalin aktive edilebildiği bir sistem kullanılmıştır

2.4. Optogenetik Yöntem ve Kriptokrom Reseptörler

Optogenetik yöntemin geliştirilmesi nörobilim alanındaki çalışmalar için bir devrim niteliğindedir (106). Optogenetik yöntem iki aşamalı olarak uygulanır. İlk aşamada optogenetik yöntemde kullanılacak reseptörü kodlayan genetik materyal hedef hücrelere aktarılır (107). Genetik materyal, doğrudan plazmid enjeksiyonu ile aktarılacağı gibi adeno-ilişkili virüs, lentivirüs gibi viral vektörler aracılığıyla da aktarılabilir (107, 108). Viral vektörler ile genetik materyali aktarmanın faydaları tekrarlamaya ihtiyaç olmaması ve kullanılan virüslerin hedef hücreleri enfekte etmek üzere programlanabilmesidir (107, 109). İkinci aşamada aktarılan reseptörü aktif hale getiren dalga boyunda optik uyarı verilir (105).

Opsin protein ailesi ışığa duyarlı bir molekül olduğu için ilk geliştirilen optogenetik reseptör, bu ailenin bir parçası olan bakteriyorodopsindir (mikrobiyal rhodopsin). Günümüzde de optogenetik deneylerde en yaygın olarak tercih edilen reseptörler *channelorhodopsin* (ChR) çeşitleridir (110). ChR reseptörleri duyarlı oldukları dalga boyundaki ışık ile uyarıldıklarında yapılarındaki iyon kanalları açılır (105). Bu sayede hedeflenen bölge ile sınırlı, sadece hedeflenen reseptör üzerinden ve zamansal olarak hassas bir sinyal oluşturulur (105).

ChR reseptörleri özelikle nöronal hücrelerde aksiyon potansiyeli düzenlenmesi için ideal bir araç olsa da diğer biyolojik mekanizmalarda sınırlılıkları mevcuttur. Transkripsiyon, GTPaz sinyali, protein üretimi ve yıkımı gibi aksiyon potansiyeli dışındaki hücresel işlevleri düzenlemek amacıyla yeni optogenetik reseptörler geliştirilmiştir (111).

PHR alanı içeren kriptokrom 2 ($CRY2_{PHR}$) ve kriptokrom ile etkileşen basit heliks-loop-heliks 1 (CIB1) reseptörleri bu amaçla geliştirilmiş optogenetik reseptörlerdendir (111, 112). Mavi ışık ile optik uyarı sonrası $CRY2_{PHR}$/CIB1 reseptörleri hücre zarı üzerinde dimerize olur (113, 114). Hücre zarındaki $CRY2_{PHR}$ ve CIB1 reseptörlerinin sitoplazma içindeki kısımları da etkileşime geçer. $CRY2_{PHR}$ ve CIB1'ye eklenen sitoplazma içindeki yapılar sayesinde hücre zarı fosfoinozitol

metabolizması, gen transkripsiyonu ve hücre içi kaskadlar gibi birçok hücresel işlev düzenlenebilir (112).

Optik uyarı başladıktan yaklaşık 300 ms sonra $CRY2_{PHR}$ ve CIB1 geri dönebilir şekilde dimerize olmaya başlar ve yaklaşık 10 saniye içinde dimerizasyon %90 oranında tamamlanır (115). Optik uyarı sonlandıktan sonra $CRY2_{PHR}$ ve CIB1 reseptörleri yavaşça birbirinden ayrılmaya başlar ve yaklaşık 12 dakika sonunda tamamen birbirinden ayrılır (111, 115).

Optik uyarının doku üzerinde çeşitli olumsuz etkileri bildirilmiştir. Lazer ile optogenetik uyarılarda ısınma ve sitotoksisite daha sık görülürken LED ile optik uyarıda benzer yan etkiler daha nadir görülür (116). $CRY2_{PHR}$ ve CIB1 optogenetik reseptörlerini kullanan çalışmalar arasında optik uyarı ile sitotoksik bir etki bildiren bulunmadığı halde yaklaşık 10 W/m^2'den daha güçlü uyarıların fototoksisiteye yol açabileceği düşünülür (117).

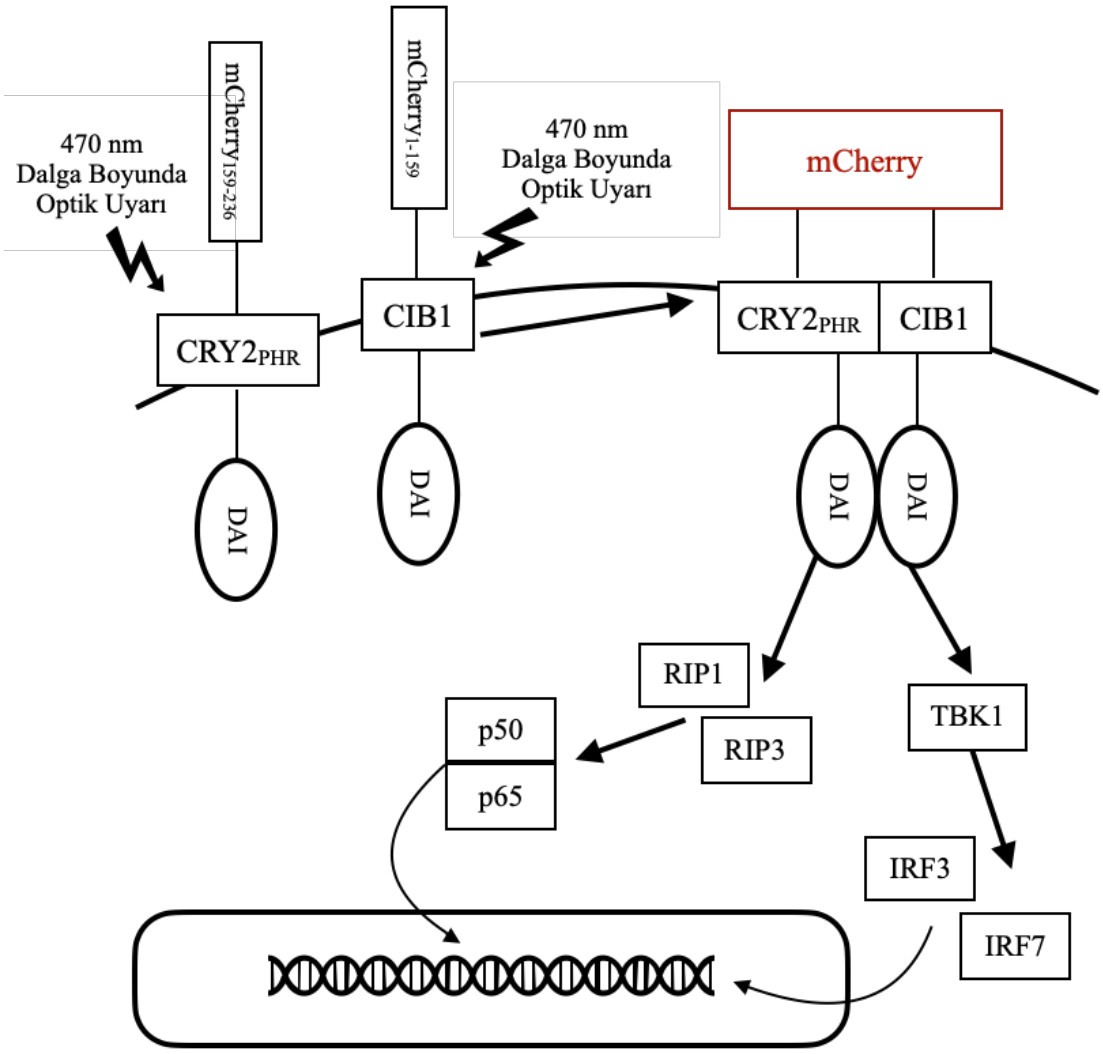
2.5. $CRY2_{PHR}$/CIB1 Kriptokrom Reseptörleri ile Optogenetik Olarak İnflamasyon Kaskadının Tetiklenmesi

İnterferon (IFN) düzenleyici faktörlerin DNA'ya bağlı aktivatörü (DAI), hücre sitoplazmasındaki serbest çift zincirli DNA'nın N-terminal Z-DNA bağlayıcı bölgelerine (ZBD) bağlanır (118). ZBD bölgelerine bağlanan DAI moleküllerinde ortaya çıkan yapısal değişiklik sonucu dimerize olmaya hazır hale gelirler (118, 119). Dimerize olan DAI'ler IFN düzenleyici faktörleri (IRF) ve NF-κB transkripsiyon faktörlerini aktive ederek inflamasyonu uyarır (120). Dimerize DAI'ler, TANK-bağlayıcı kinaz-1 (TBK1) serin/treonin kinaz ile etkileşime geçerek IRF-3 ve IRF-7'yi aktive eder (120). DAI üzerindeki reseptör etkileşim proteini (RIP) homotipik etkileşim motifleri (RHIMs), RHIM içeren kinazları (RIP1 ve RIP3) uyararak yerleşik NF-κB yolundaki p50 ve p65 kompleksini aktif hale getirir (120-123).

Moser ve Esser-Kahn (2017) çalışmalarında, optogenetik yöntemle özgül olarak NF-κB kaskadını uyarmak için mavi ışıkla aktive edilebilen $CRY2_{PHR}$ ve CIB1 reseptörlerine DAI eklemişlerdir (124). Bu sistem mavi ışıkla (470 nm) uyarıldığında hücre zarı üzerindeki $CRY2_{PHR}$ ile CIB1 dimerize olur. Bu sayede iki reseptörün sitoplazmik kısmında bulunan DAI üniteleri etkileşime geçer. İki DAI molekülünün etkileşimi ile NF-κB ve interferon regüle edici transkripsiyon faktörü 3 (IRF3) aracılı olarak hücrede inflamatuvar kaskad uyarılmış olur (124) (Şekil 2.4'te $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom reseptörleri ile oluşturulan optogenetik sistemi şematik olarak gösterilmiştir).

Moser ve Esser-Kahn, *in vitro* koşullarda gerçekleştirdikleri çalışmalarında $CRY2_{PHR}$/DAI ve CIB1/DAI reseptörlerini ifade eden genleri ayrı ayrı lentivirüsler içinde makrofaj ve HEK293 hücrelerine aktarmışlardır (124). 470 nm dalga boyunda, 60 Hz frekansından ve 1,2 W/m^2 şiddetinde optik uyarıyı; 2 farklı deney grubunda 2 ve 4 saat boyunca uygulayarak optik uyarının inflamatuvar yanıtı tetiklediğini gözlemişlerdir. Optik uyarı süresi 2 saatten 4 saate çıkarıldığında inflamatuvar yanıtın arttığı saptanmış, optik uyarıya bağlı herhangi bir sitotoksisite bildirilmemiştir. (124).

Araştırmacılar dimerizasyonun gerçekleştiğini teyit etmek için 236 baz uzunluktaki mCherry işaretleyici molekülünü ikiye bölmüşlerdir. $mCherry_{1-159}$'u $CRY2_{PHR}$/DAI yapısına ve $mCherry_{159-236}$'yı CIB1/DAI yapısına eklemişlerdir (Şekil 2.4). Sonuç olarak yazarlar mCherry ile uyumlu kırmızı floresan sinyali saptanmasının, $CRY2_{PHR}$ ve CIB1 dimerizasyonu sonucu mCherry molekülünün tamamlanmasını, yani reseptör aktivasyonu gerçekleştiği anlamına geldiğini tartışmışlardır (124).



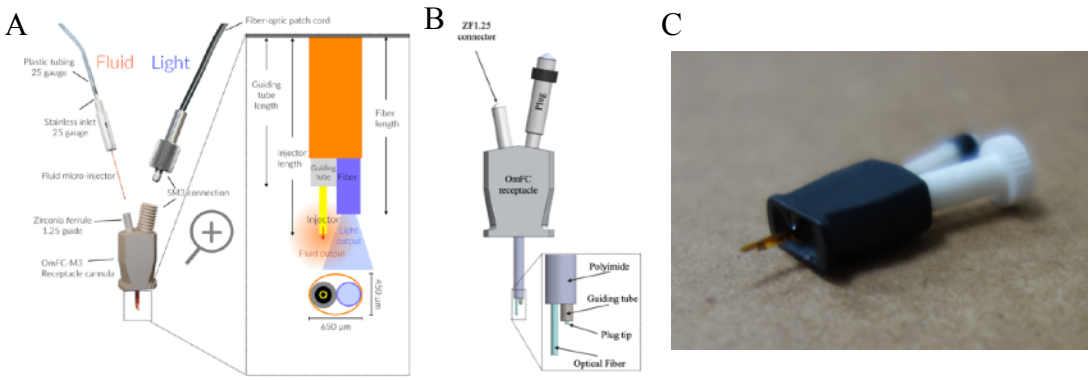
Şekil 2.4. $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom reseptörleri ile optogenetik sistemi [(120, 124) kaynaklarındaki şekillerden uyarlanmıştır]

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Optogenetik CIB1-DAI/CRY2PHR-DAI Kriptokrom Reseptörlerin Optimizasyonu

Tez hipotezi belirlendikten sonra kurulan hipotezi test etmek için uygun protokolün belirlenmesi üzerine çalışıldı. Moser ve Esser-Kahn (2016)'ın geliştirdikleri mavi ışıkla aktive edilen, $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom sisteminin, tasarlanan deney protokolü için uygun bir yöntem olduğuna karar verildi (124). Moser ve Esser-Kahn'ın (2016) çalışmasında $CRY2_{PHR}$-DAI ve CIB1-DAI genetik kodlarını içeren plazmidler birbirinden ayrı lentiviral vektörlere yüklenmiştir (124). Hücre kültürü ortamında HEK293T hücrelerine iki lentivirüs de enjekte edilerek transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Ancak *in vivo* koşullarda $CRY2_{PHR}$-DAI ve CIB1-DAI yapılarının iki farklı viral vektör içinde enjekte edilmesi durumunda, iki ayrı virüsle verilecek plazmidlerin aynı hücreyi enfekte etme ihtimalinin daha düşük olması olasılığına karşın iki yapının tek bir lentiviral plazmid içinde enjekte edilerek aynı hücrede ifade ettirilmesi çözümü ortaya konmuştur. Bu amaçla Esser-Kahn ve ekibinin yardımıyla $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI yapılarını tek bir plazmidde ifade eden yeni bir desen yapıldı. Amacımız bu yeni plazmidin lentivirüsler içinde paketlenerek grubumuza iletilmesiydi. Ancak CIB1-DAI ve $CRY2_{PHR}$-DAI yapılarını içeren genlerin bir plazmid içine aktarılması, plazmidin boyut olarak büyümesi ile sonuçlandı. Bu, lentiviral vektörler ile aktarılabilecek genetik yapı büyüklüğünü aştığı için üretilen yeni plazmid lentiviral vektöre yerleştirilemedi. Viral vektör ile aktarılmaya izin vermeyecek büyüklükteki genetik materyaller alternatif olarak plazmid olarak kortikal doku içine enjekte edilebilmektedir (125). Ancak viral vektör yerine doğrudan plazmid enjeksiyonu ile genetik materyal aktarımının en önemli kısıtlılıklarından biri uzun süreli bir transfeksiyon için çok sayıda enjeksiyon yapma gerekliliğidir (126). Plazmidin doğrudan transfeksiyon ajanı ile birlikte enjekte edilmesine karar verildi. Enjekte edilen plazmidlerin hedef hücre zarlarından sitozole geçmesi ve sonrasında içerdikleri genin ekspresyonun gerçekleşebilmesi için plazmid transfeksiyon ajanına eklenerek verildi. Transfeksiyon ajanı olarak daha önce

laboratuvarımızda *in vivo* deneylerde başarıyla kullanmış olduğumuz *in vivo*-jetPei® (Polyplus-transfection) kullanılmasına karar verildi. Deneylerde hem tekrarlayan intra-kortikal enjeksiyonlara hem de optik uyarılara imkan sağlayan Optik çoklu sıvı infüzyon kanülleri "*Optical Multiple Fluid Cannula* (OmFC)" kullanılmasına karar verildi (Şekil 3.1).

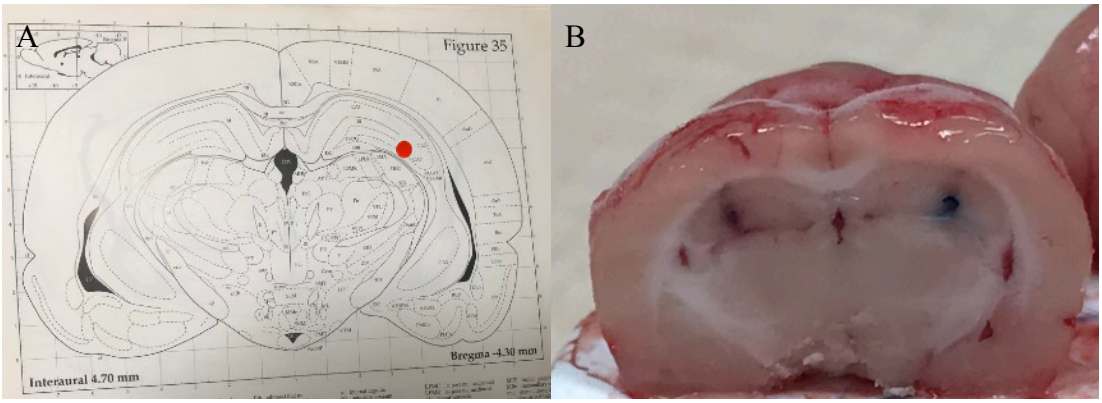


Şekil 3.1. Optik çoklu sıvı infüzyon kanülü (OmFC). A ve B'de OmFC'nin şematik gösterimi verilmiştir. A, "Doric Lens Inc. Mono Opto-Fluid Cannulas (OFC) implantation and fluid injection Application note, Version 1.1"den alıntılandırılmıştır ve B, Doric Lens. Inc.'den Dr. Yoan LaChasseur tarafından çizilmiştir.

3.2. Cerrahi Koordinatlarının Optimizasyonu

Optogenetik uyarı için hipokampusta CA3 katmanının CA2'ye yakın kısmı hedeflendi (Şekil 3.2). Kronik stresle oluşturulan depresyon modelinde inflamatuvar değişiklikler bu bölgede gözlemlendiği için bu bölge seçildi. Deneylerde kullanılacak OmFC'ler sipariş edilmeden önce dorsoventral koordinatların, bir başka ifadeyle kanül uzunluklarına karar verilmesi için enjeksiyon hedef bölgesi koordinatları belirlendi. Paxinos ve Watson sıçan beyin atlasına göre belirlenen koordinatlara stereotaksik yöntemlerle metilen mavisi enjeksiyonu yapıldı. Metilen mavisi enjeksiyonundan sonra sıçan sakrifiye edilip beyni çıkarıldı ve -80°C'de donduruldu

ve alınan kesitlerde enjeksiyon yapılan bölge değerlendirilerek koordinatlarda gerekli düzeltmeler yapıldı (Şekil 3.2, A). Sonuç olarak enjeksiyon hedef bölgesi için ön-arka ("anteroposterior", AP) 4,7; iç-dış ("mediolateral", ML) 2,8 ve sırt-karın yönünde ("dorsoventral", DV) 4,1 koordinatları belirlendi.



Şekil 3.2. Enjeksiyon için hedeflenen hipokampusta CA3 katmanının CA2'ye yakın kısmı. A'da atlasta gösterimiş ve hedeflenen bölge kısmı kırmızı nokta ile gösterilmiştir(127). B'de Sıçan beynine stereotaksik olarak inktrakortikal metilen mavisi enjeksiyonu ile hedeflenen bölge işaretlenmiştir.

Belirlenen koordinatlara göre; hipokampus CA3 bölgesine enjeksiyon yapmak üzere, enjektör uzunluğu 4,1 milimetre, kılavuz tüp uzunluğu 3,25 milimetre ve fiberoptik kablo uzunluğu 3,85 milimetre olan OmFC siparişi verildi.

3.3. Sıçanlara Cerrahi Olarak Kanül Yerleştirilmesi

Deney protokolünde Sprague-Dawley ırkı 8-12 haftalık 200-300 gram aralığında vücut ağırlığına sahip toplam 32 erkek sıçan kullanıldı. İlk hafta boyunca sıçanlar günlük olarak beşer dakika ele alındı (*handling*) ve iki günde bir vücut ağırlıkları ölçüldü. Laboratuvarımıza gelişlerinin 2. haftasında tüm sıçanların hipokampusuna kanüller aşağıda belirtildiği şekilde yerleştirildi:

1- Anestezi için sıçanlara intraperitoneal (IP) olarak 75 mg/kg ketamin, 7,5 mg/kg ksilazin enjekte edildi.

2- Sıçan cerrahi anestezi evresine girdikten sonra stereotaksi standına yerleştirildi.

3- İki göz arasındaki orta noktasının yaklaşık 1 cm kaudalinden başlayarak cerrahi müdahale yapılacak alan forseps ile tutularak makas yardımı ile kesildi. Yaklaşık olarak çapı 2-2,5 cm dair şeklinde cilt ve skalp dokusu kesilerek çıkarıldı. Kafatası temizlenip bregma ve lambda noktalarının yerleri net bir şekilde ortaya kondu.

4- Kanül; stereotaksi çerçevesine bağlı kanül tutacağına takıldı.

5- Kanülün alt uç noktası kafatası üzerinde işaretlenen bregma ve lambda noktalarına getirildi ve bu noktalardaki AP, ML, DV koordinatları not alındı.

6- Eğer kanülün alt uç noktası bregma ve lambda noktalarına dokunduğunda stereotaksi standında okunan ML koordinatları arasında fark varsa sıçanın stereotaksi standına uygun yerleştirilmemiş olduğu kanaatine varılarak sıçan stereotaksi çerçevesine yeniden yerleştirildi [1].

7- Bregma ve lambda noktalarının yaklaşık ortasında bir nokta seçildi. Seçilen noktanın sağ ve sol iki mm lateralinde kanülün alt uç noktasının kafatasına değdiği noktada stereotaksi standında okunan DV koordinatları not alındı. Her iki noktada kanülün alt uç noktasının kafatasına değdiği noktada stereotaksi standında okunan DV koordinatları arasında fark varsa sıçan kulak barlarına uygun şekilde yerleştirilmediği anlaşıldı ve üçüncü basamaktan itibaren yapılan işlemler tekrarlandı. Okunan DV koordinatları aynı ise sıçan stereotaksi standına doğru bir şekilde yerleştirildiği anlaşıldı ve bir sonraki adıma geçildi.

---

[1] Sıçan stereotaksi çerçevesine iyi yerleştirilmediyse, kanülün alt uç noktası bregma ve lambda noktalarına dokunduğunda stereotaksi standında okunan DV koordinatları arasında fark görülür. Kanülün alt uç noktası bregma noktasındayken, lambda noktasına göre daha dorsaldeyse ağız barı aşağı indirilir. Kanülün alt uç noktası bregma noktasındayken, lambda noktasına göre daha ventraldeyse ağız barı yukarı çıkarılır. Bu işlem kanülün alt uç noktası bregma ve lambda noktalarına dokunduğunda stereotaksi standında okunan DV koordinatları aynı olana kadar tekrarlanır.

8- Hipokampus CA3 bölgesine kanülü yerleştirmek için AP 4,3; ML 3,9 ve DV 4,1 koordinatları belirlendi. Kanül takılı haldeyken, stereotaksi standının AP ve ML koordinatları hedef koordinatlara getirildi. Hedef AP ve ML koordinatlarına getirildikten sonra yavaşça ventrale doğru indirildi ve kanülün kafatasına değdiği nokta belirlendi ve bu nokta işaretlendi.

9- Kanülü dental akrilik ile sabitleyebilmek için kafatasında dört noktaya vida takıldı (Şekil 3.3).

10- Kanülün yerleştirileceği ve 8. adımda kafatasında işaretlenmiş olan noktada kafatası Omni-drill® ile törpülenerek pencere açıldı (Şekil 3.3).

Şekil 3.3. Sıçanın kafatasında, kanülün takılacağı bölgenin etrafına dört adet vidanın sabitlenmiş ve kanül takılacak noktaya kafatasında Omni-drill® ile pencere açılmış hali.

11- Kanül AP ve ML düzlemlerde hedef noktadayken hedeflenen DV koordinatlarının 3,8 mm üzerine kadar getirildi. Sonrasında hedef DV koordinatına ulaşana kadar her 15 saniyede 0,2 mm olacak hızda ventrale doğru ilerletildi.

12- Kanül belirlenen koordinatlara yerleştirildikten sonra, kanülü ve tüm vidaları çevreleyecek şekilde cerrahi bölgenin üzerine dental akrilik döküldü. Dental akriliğin sertleşip kanül sabitlendiğine emin olunduktan sonra stereotaksi kanül bağlantısı dikkatlice uzaklaştırıldı.

13- Optogenetik kanül hedef koordinata stereotaksik olarak yerleştirildikten sonra bir hafta boyunca sıçanlar günlük olarak beşer dakika ele alınmaya ve iki günde bir vücut ağırlıklarının takip edilmesine devam edildi. Sıçanların ağrısı olduğunun değerlendirilmesi durumunda sıçanın vücut ağırlığına göre her kilograma 1 mg olacak şekilde subkutan meloksikam enjeksiyonu gerçekleştirildi.

Optimizasyon deneyleri sırasında karşılaşılan en önemli problemlerden biri OmFC kanülün enjeksiyon için olan bölümünün tıpasının çıkarılması ve enjeksiyon iğnesinin takılmasında yaşanan komplikasyonlardı. Bu işlemler sırasında sıçanın kafasını oynatması iğnenin ucunun kırılarak kanülün içinde kalmasına ve kanülü tıkamasına sebep oldu. Sıçanın kafasını oynatmaması için daha sıkı tutulduğunda ise OmFC kanül ile birlikte sabitlemeyi sağlayan dental akrilik kafatasından ayrıldı. 2. optimizasyon deneylerinde kullanılan 10 sıçandan üçünde yukarıda bahsedilen sorunlar yaşandı. Bunun yanısıra kanülün takılması için yapılan operasyon sonrasında enjeksiyon yapılan kanülün içine kan girebildiği gözlendi. Enjeksiyon kanülünün içine giren kanın, kanül tıkacı ile kanül arasında pıhtılaşarak, kanül tıkacının yerinden çıkmasını zorlaştırdığı gözlendi. Bu sebeple her plazmid enjeksiyonundan sonra kanül tıkacı önce alkolle, sonra distile su ile yıkandıktan sonra sıçanın kafasına yerleştirildi. Öncesinde kanülü sabitlemek için kafatasına yerleştirilen iki adet vida ile dental akriliğin yerinden çıkabildiği gözlendikten sonra vida sayısı üçe çıkarıldı.

Tekrarlayan enjeksiyonlara ve plazmide bağlı olası inflamasyonu en aza indirmek için 5. optimizasyon deneylerinde enjeksiyon hacminin 1 µl'den 0,3 µl'ye düşürülmesine karar verildi. Enjeksiyon iğnesinin kırılması, enjeksiyon iğnesinin takıldığı kanülün tıkanması, kanülün kafatasından çıkması gibi daha önceki protokollerde yaşanan sorunlar optimizasyon ile minimuma indirildi. Bu amaçla sipariş edilen yeni kanüller kullanıldı. Ayrıca kanüllerin yerinden çıkabilme sorununu gidermek üzere, dental akrilik dökülmeden önce kanüller kafatasına, son dönemde yaygın olarak kullanıldığı bildirilen "Superbond" ile yapıştırıldı. Beşinci optimizasyon deneylerinde yapılan bu değişiklik sonrası, daha önceki optimizasyon

deneylerinde %30-50 arası görülebilen enjeksiyon iğnesinin kırılarak kanül içinde kalma komplikasyonu sadece 1 sıçanda (n=9) görüldü. İğnenin kırılması 3. enjeksiyon tamamlandıktan sonra iğnenin kanülden çıkarılması sırasında gerçekleşti. 5. optimizasyon deneylerindeki son komplikasyon ise bir sıçanın, enjeksiyonları tamamlandıktan sonra, gece saatlerinde kafese çarparak kanülünün enjeksiyon yapılan kısmını kırmasıydı.

3.4. Sıçanlara İntrahipokampal Plazmid Enjeksiyonu

Plazmidlerin hücre içine geçişini sağlamak için transfeksiyon ajanı olarak *in vivo*-jetPEI® (Polyplus-transfection) kullanılmasına karar verildi. *In vivo*-jetPEI® ile yapılmış olan çalışmalardan (128) Polyplus-transfection firması tarafından verilen öneriler ile protokol oluşturuldu.

In vivo-jetPEI® ve kullanılacak olan nükleik asit miktarının dengesi transenfeksiyon gerçekleşmesi için çok önemlidir. Nükleik asitlerin hücreye girebilmesi için karışımın katyonik olması gereklidir. N/P oranı pozitif yüklü amin (nitrojen) ile negatif yüklü nükleik asit fosfatı oranını ifade eder. *In vivo*-jetPEI® içindeki üç nitrojen atomundan biri katyoniktir. 1 µg nükleik asitte 3 nanomol fosfat bulunur. *In vivo*-jetPEI®/nükleik asit karışımı N/P oranı 2-3'ten büyük olduğunda nötr yüke sahip olur. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda oluşturulan protokolde N/P oranının 6 olması hedeflendi.

Hedeflenen N/P oranının elde edilebilmesi için kullanılması gereken *in vivo*-jetPEI® hacmi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı;

In vivo-jetPEI® hacmi (µl) = (kullanılan DNA preparatı (µg)) x N/P oranı / 150 (Ticari paket içinde gelen *in vivo*-jetPEI® içeriğinin milimolar cinsinden derişimi)

1- Enjekte edilecek plazmid karışımının homojen olabilmesi için her enjeksiyondan önce en az 20 µL karışım hazırlandı.

2- Brittany A. Moser and Aaron P. Esser-Kahn tarafından gönderilen, $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom reseptör yapılarını içeren plazmid, steril su ile 3-7 μg/μL yoğunluğunda olacak şekilde karıştırıldı.

3- 2. adımda elde edilen karışımdan, içinde toplam 10 μg DNA olacak hacimde alındı ve 5 μL %10 glukoz çözeltisinin üzerine eklendi.

4- Bir önceki basamaktaki karışıma steril su eklenerek, toplam karışım hacmi 10 μL'ye tamamlandı.

5- Bu karışım nazikçe girdaplanarak (*vortex*) karıştırıldı ve sonrasında kısaca santrifüj uygulandı.

6- Ayrı bir tüp içine, *in vivo* deneylerde DNA, si/miRNA transenfeksiyonu sağlanması için kullanılan polimer bazlı ajan olan *in vivo*-jetPEI®'den 1,2 μL ve 5 μL %10 glukoz eklendi.

7- Bir önceki basamaktaki *in vivo*-jetPEI® karışımının hacmi 10 μL'ye tamamlanacak şekilde üzerine steril su eklendi.

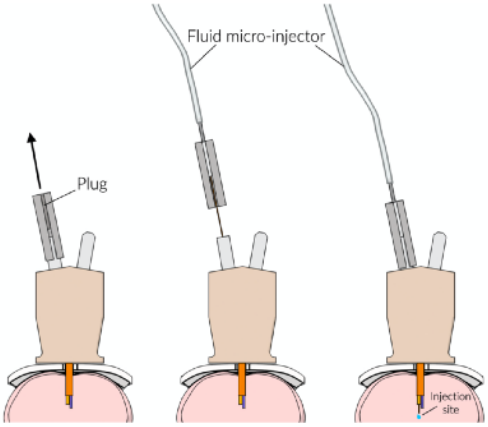
8- Bu karışım nazikçe girdaplanarak karıştırıldı ve sonrasında kısaca santrifüj uygulandı.

9- 10 μL *in vivo*-jetPEI® karışımı tek seferde 10 μL DNA karışımına eklendi.

10- Bu son karışım kısaca girdaplanarak karıştırıldı ve sonrasında kısaca santrifüj uygulandı.

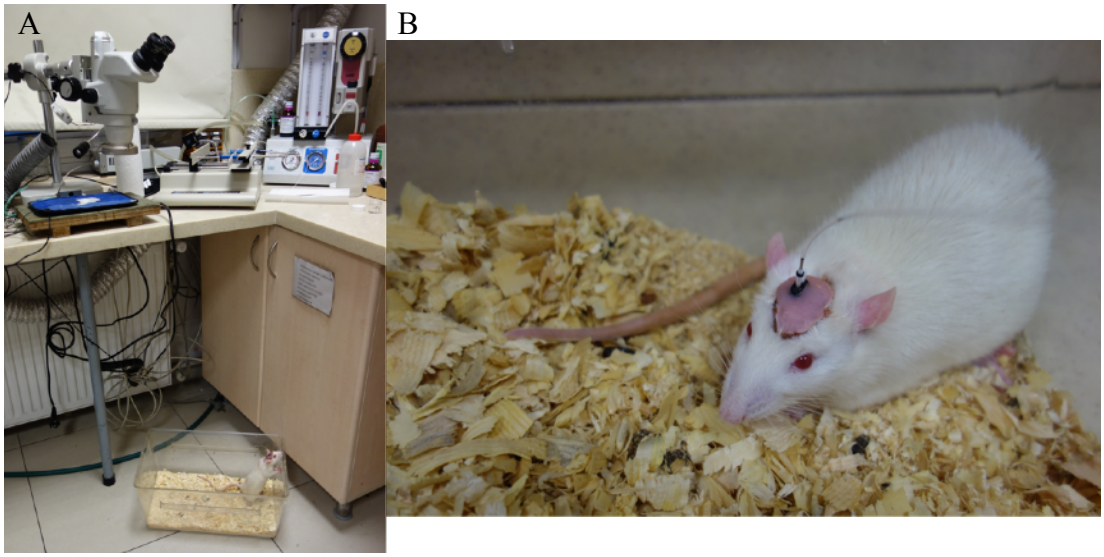
11- 10. adımda elde edilen karışım 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilerek inkübe edildi.

12- Sıçanın kafasındaki kanüle bağlı olan üst kısmındaki kapalı iğne ucu çıkarıldı ve plazmid enjeksiyonu yapılacak iğne ucu sıçanın kanülünün içine yavaşça ve nazikçe yerleştirildi (Şekil 3.4 Doric Lens Inc. Mono Opto-Fluid Cannulas (OFC) implantation and fluid injection Application note, Version 1.1'den alıntılandırılmıştır).



Şekil 3.4. OmFC aracılığıyla sıvı enjeksiyonunun şematik gösterimi (Doric Lens Inc. Mono Opto-Fluid Cannulas (OFC) implantation and fluid injection Application note, Version 1.1'den alıntılandırılmıştır).

13- Toplam 1 µL plazmid karışımının infüzyonu; Hamilton® şırınga ve elektronik infüzyon pompası yardımıyla, 0,1 µL/saniye hızında yapıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. İntrahipokampal plazmid enjeksiyonu

Bu aşamada sıçanın, kafesinde mikro tüp sistemine zarar vermediği ve kafasındaki kanüle müdahale etmediğine emin olunarak serbest dolaşmasına izin verildi. Otomatik pompa ile enjeksiyon yapılırken mikro tüp sisteminden plazmid karışımının ilerleyip ilerlemediği kontrol edildi. Hamilton® şırınganın pistonu ilerlediği halde mikro tüp sisteminden plazmid karışımının ilerlemediği gözlendiği durumlarda iğne çıkarılıp tıkanıklık açıldıktan sonra enjeksiyona devam edildi.

14- Enjeksiyon tamamlandıktan sonra plazmid karışımının iğneden ve iğnenin çıkış yolundan geri kaçmasını en aza indirmek için 10 dakika boyunca beklendi.

Sıçanın kafasında sabit olan kanülden tıkaç çıkarılırken ve enjeksiyon iğnesi takılırken sıçanı mümkün olduğunca sabitleyebilmek için tutuş tekniği optimize edildi. Sıçanın yüzü araştırmacıya bakacak şekilde araştırmacının göğsüne konulup sol elin avuç içi ile sıçanın gövdesi tutuldu ve sol elin parmakları ile sıçanın kafası ve dental akrilik desteklendi. Sağ elin baş parmak ve orta parmak tırnakları ile tıkacın altından yavaşça yukarı doğru itildiğinde ve bu sırada aynı parmaklarla nazikçe tıkaca rotasyon hareketi yapıldığında tıkacın en rahat şekilde yerinden çıktığı gözlendi. Bu işlem sırasında sıçanın hareketlerinin dikkatle takip edilmesi ve sakinleştiği anlaşıldıktan sonra tıkacı yerinden çıkarmanın komplikasyonları azalttığı gözlemlendi. Ancak tekniğe rağmen sıçanın kaygısının devam etmesi ve sürekli hareket etmesi durumunda sıçana kısa süreli inhalar anestezik (izofluran) verilmesi tartışıldı. Ancak anestezik verilmesi hipokampustaki nöro-inflamasyonu etkileyebileceğinden deney protokolü için uygun olmadığına karar verildi.

3.5. Sıçanlara İntrahipokampal Optik Uyarı Uygulanması

1- Şekil 3.6'da görülen şekilde 465 nm dalga boyundaki mavi LED ışık kaynağı, fiberoptik döner bağlantısı ve fiberoptik kablolar birbirlerine monte edilerek bağlantı tamamlandı.

Şekil 3.6. Optik uyarı sistemi (Doric Lens. Inc.'den Dr. Yoan LaChasseur tarafından çizilerek tarafımıza gönderilmiştir.)

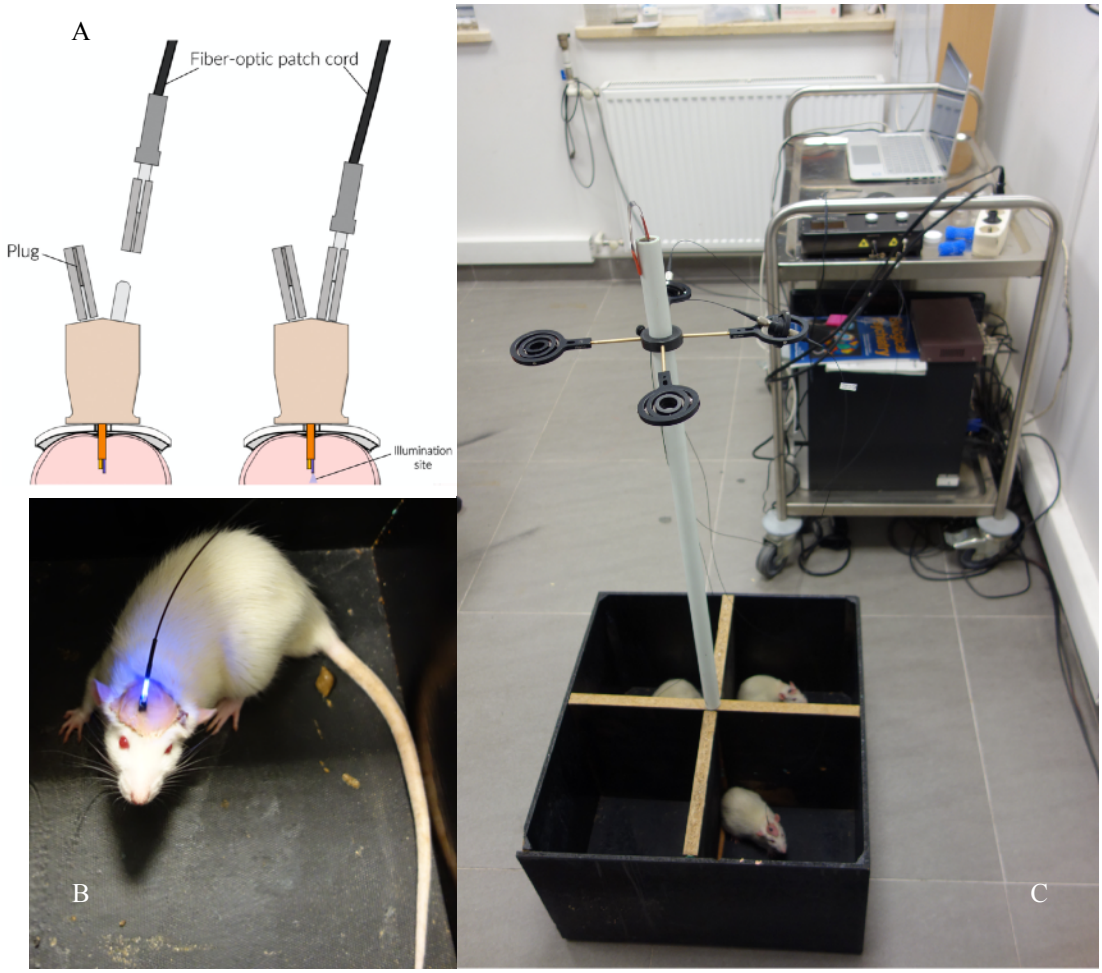
2- Doric Neuroscience Studio® programı aracılığı ile verilecek optik uyarının özellikleri belirlendi. Program üzerinden "Square Sequence(s)" seçildi (Şekil 3.7, B), ışık uyarı akımı (gücü) "Current" 1000 mA olarak ayarlandı (Şekil 3.7, C), "Trigger options - Mode" seçeneğinde "Manual" seçildi (Şekil 3.7, D). "Sequence(s) Options"

ayarlarında, "Starting Delay" "00:00:00:000" olarak düzenlendi (Şekil 3.7, E), "Frequency" seçeneğinde 0,50 Hz olarak ayarlandı (Şekil 3.7, F), "Duty Cycle" seçeneğinde 80,00 % olarak ayarlandı (Şekil 3.7, G). "Pulse(s) per Sequence" 60 olarak ayarlandı (Şekil 3.7, H), "Number of Sequence(s)" seçeneği 5 olarak ayarlandı (Şekil 3.7, I). "Delay Between Sequences" seçeneği "00:10:00:000" olarak ayarlandı (Şekil 3.7, J). Ayarlar doğru yapıldığında toplam sürenin 50 dakika olduğu görüldü (Şekil 3.7, K).

Şekil 3.7. Doric Neuroscience Studio® Programı

3- Sıçanın kafasındaki optik kanüle bağlı olan kapak çıkarıldı. Fiberoptik kabloya bağlı olan zirkonyum bileziğin açıkta kalan ucu sıçanın kafasındaki optik kanüle nazikçe bağlandı (Şekil 3.8, A) (Doric Lens Inc. Mono Opto-Fluid Cannulas (OFC) implantation and fluid injection Application note, Version 1.1'den alınmıştır).

4- Uyarı süresince sıçanların kafasındaki optik kanülün üzerinde mavi ışık gözlendi (Şekil 3.8, B ve C).



Şekil 3.8. Sıçanlara intrahipokampal optik uyarı uygulanması. A, Doric Lens Inc. Mono Opto-Fluid Cannulas (OFC) implantation and fluid injection Application note, Version 1.1'den alıntılandırılmıştır.

3.6. Sıçanların Beyin Kesitlerinin Hazırlanması

Sıçanlar 1 ml %10 kloralhidrat IP enjeksiyonu ile sakrifiye edildikten sonra kalbin sol ventrikülüne %4 paraformaldehit karışımı enjekte edilerek perfüzyon gerçekleştirildi. Dokuya zarar vermeden beyin kafatasından çıkarıldı. Beyin beş gün boyunca +4°C'de, %4 PFA karışımı içinde muhafaza edildi. Sonrasında bir gün boyunca +4°C'de, %30 sükroz çözeltisi içinde bekletildi.

Hazırlanan beyin dokusundan kriyostat cihazı yardımı ile 20 mikron kalınlığında kesitler alındı. Hipokampusu içeren beyin kesitleri poli-l-lizin kaplı lamlar üzerine aktarıldı.

3.7. Sıçanların Beyin Kesitlerinde İmmünohistokimyasal Olarak NF-κB Translokasyonunun İncelenmesi

1- Antijen açığa çıkarma için su banyosu 80°C'ye dereceye kadar ısıtıldıktan sonra %1 derişimindeki sitrat çözeltisi, cam bir kap içinde su banyosunun içine konuldu ve bu çözeltinin sıcaklığı 80°C'ye ulaştıktan sonra beyin kesitlerinin bulundukları lamlar sitrat çözeltisinin bulunduğu cam kabın içinde 15 dakika bekletildi.

2- Kesitler sitrat çözeltisinden çıkarıldıktan sonra kuru bir kağıt havlunun üzerine lamların uzun kenarları değdirilerek sitrat tamponu kesitlerin üzerinden uzaklaştırıldı. Bu işlem yapıldıktan sonra kesitlerin üzerinde hala sitrat tamponu bulunuyorsa, beyin kesitlerine değmemeye dikkat ederek kağıt havlunun ucu ile sitrat tamponu uzaklaştırıldı.

3- Örneklerin üzerine Pastör pipeti ile fosfat tamponlu salin (PBS) eklendi ve beş dakika sonra örnekler yan çevrilip lamın uzun kenarı kağıt havluya değdirilerek PBS örnek üzerinden uzaklaştırıldı. PBS ile yıkama işlemi 4 kere tekrarlandı.

4- Kesitlerin etrafı Pap-pen ile çizildi.

5- Bir birim normal keçi serumu (NKS) ve 9 birim PBST ile karıştırılarak, %10 NKS karışımı hazırlandı. Her beyin kesitinin üzerine %10 NKS karışımından 30 mikrolitre eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

6- Kesitlerin üzerindeki NKS 2. basamaktakine benzer şekilde beyin kesitlerinin üzerinden uzaklaştırıldı.

7- NF-κB p65 poliklonal antikoru (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Katalog No #51-0500) (1:100) NKS içinde hazırlandı. Her beyin kesidinin üzerine

30 mikrolitre NF-κB p65 poliklonal antikor karışımından eklenerek 24 saat süre ile +4°C derecede inkübe edildi.

8- 24 saat sonra örneklerin üzerindeki primer antikor karışımı uzaklaştırıldı.

9- Örnekler PBS ile 4 kere yıkandı.

10- Altıncı basamakta örnekler üzerine eklenen miktarda %10 NKS karışımının içine 1/200 oranında olacak şekilde CY2 sekonderi antikoru (keçi anti-tavşan IgG (H+L) Sekonder Antikor-HRP, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Katalog No #31460) eklendi. Sekonder antikor basamağından sonra gerçekleştirilen her adımda kesitlerin ışıkla temas etmemesine özen gösterildi.

11- Örneklerin etrafı Pap-pen ile tekrar çizildi ve sonrasında her beyin kesitinin üzerine 30 mikrolitre sekonder antikor eklendi. Bir saat boyunca +4°C'de bekletildikten sonra sekonder antikor örneklerin üzerinden uzaklaştırıldı.

12- Örnekler PBST ile 4 kere beşer dakika boyunca yıkandı.

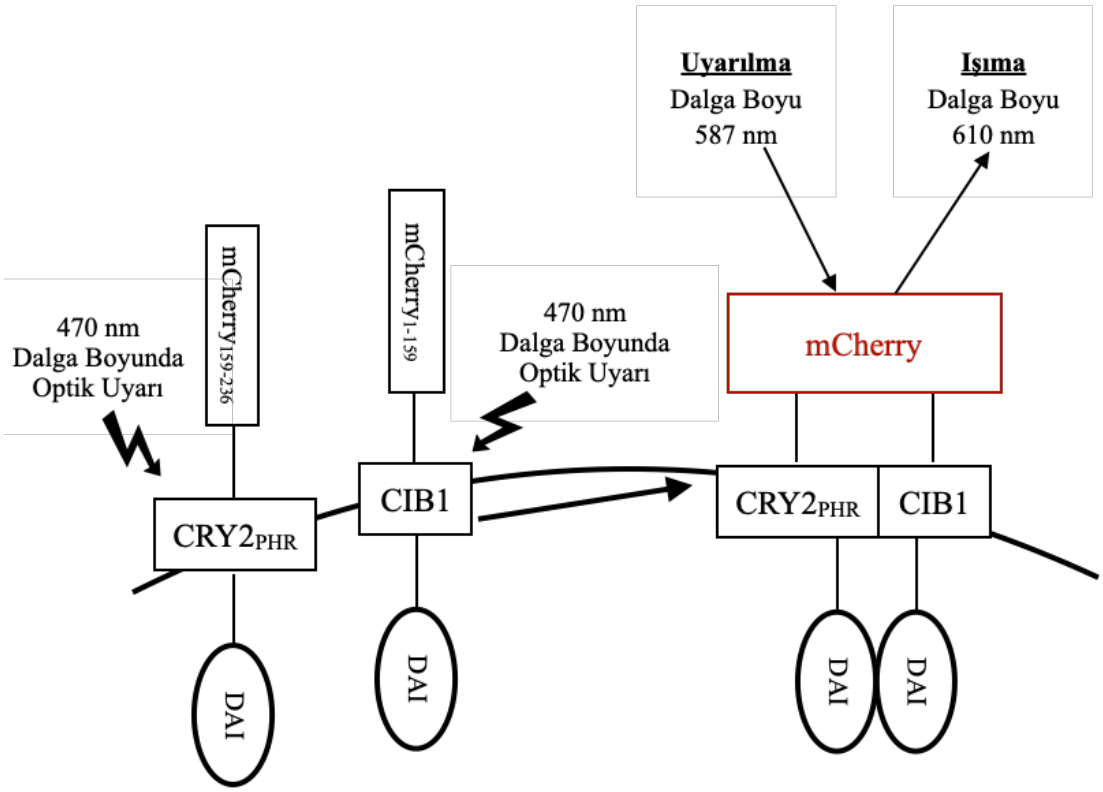
13- Her beyin kesidinin üzerine 30 mikrolitre Hoechst boyası damlatıldı.

14- Lam ile lamel arasında hava kalmadığına emin olunduktan sonra hava girmesini engellemek amacıyla lamel kenarlarından oje ile lama yapıştırıldı.

15- CY2 sekonder florofor boyasıyla işaretlenmiş NF-κB moleküllerini saptamak için beyin kesitleri konfokal mikroskopta (Leica) 25x ve 40x objektifler altında 488 nm dalga boyu lazer ile uyarılarak görüntülendi. Hoechst boyasına bağlı sinyallerin incelenmesi için aynı kesitler 405 nm dalga boyu lazer ile uyarılarak ve mCherry sinyallerinin incelenmesi için 552 nm dalga boyu lazer ile uyarılarak görüntülendi.

3.9. CRY2$_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI Dimerizasyonunun Uyarılma (*Eksitasyon*) ve Işıma (*Emisyon*) Taraması ile Teyit Edilmesi

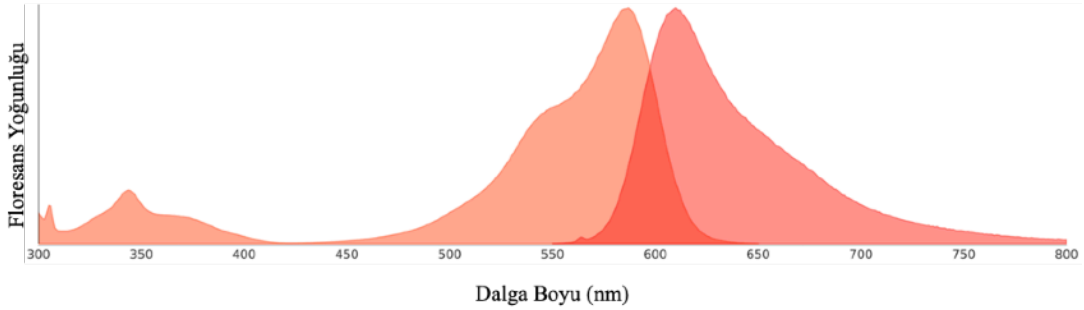
Plazmid aracılığı ile genler hedef hücreye aktarıldıktan sonra CRY2$_{PHR}$-DAI ve CIB1-DAI yapıları sentezlenir ve hücre zarına yerleşir. mCherry maksimum olarak 587 nm dalga boyundaki ışık ile uyarılırken ve en fazla ışımayı 610 nm dalga boyunda gerçekleştirir (129). Haberci olarak plazmide dimerizasyon ile bir araya gelecek 2 parça biçiminde yerleştirilen mCherry sinyalinin gözlenmesi şekil 3.9'da görüldüğü gibi CRY2$_{PHR}$-DAI ve CIB1-DAI yapılarının hücrede ifade edildiğini ve ışık uyarısıyla dimerize olduğunu gösterir.



Şekil 3.9. CRY2$_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI yapılarının optik uyarı ile dimerizasyonu sonrası mCherry floresan proteininin yapısının tamamlanması [(124) kaynağındaki şekillerden uyarlanmıştır].

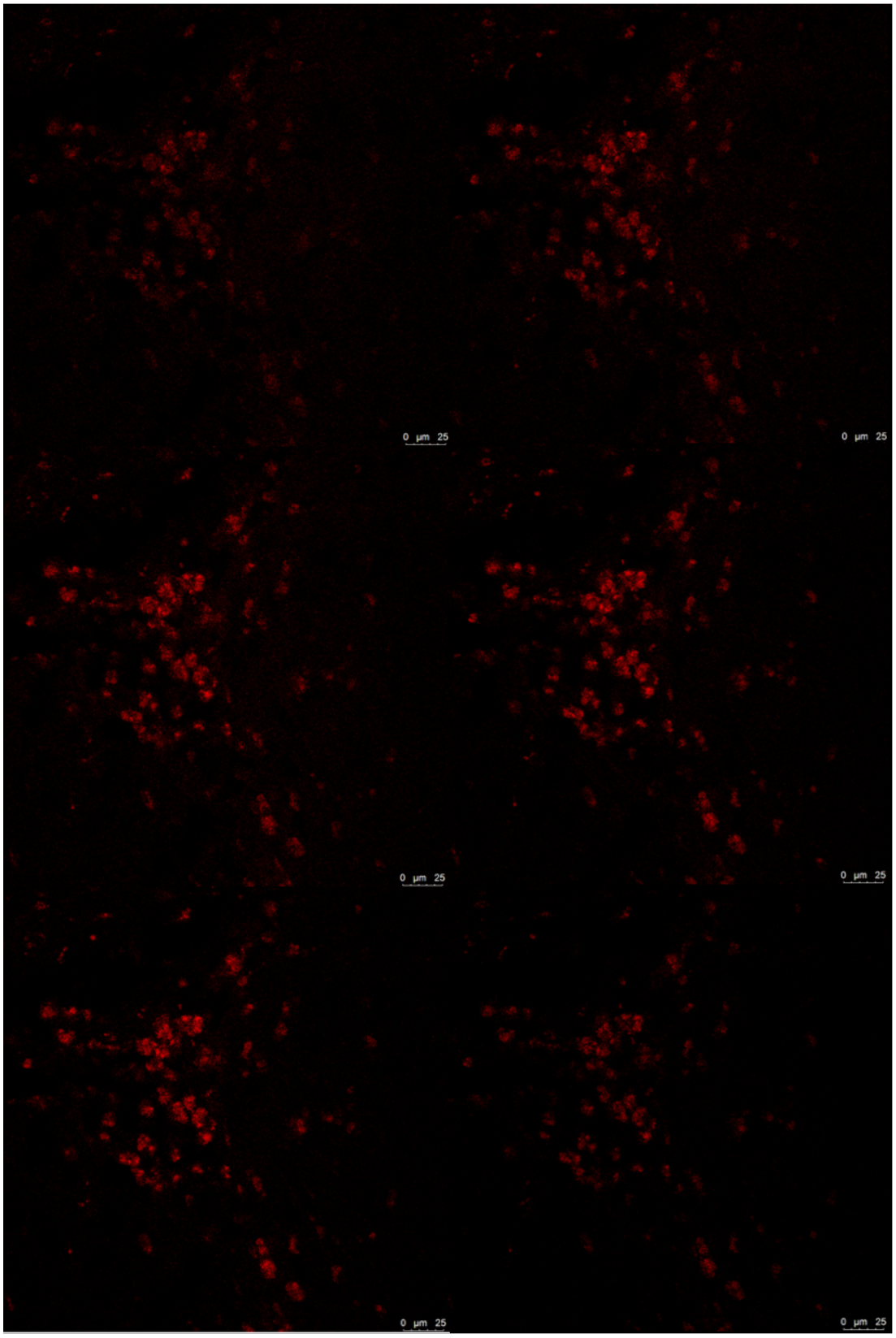
Uyarılma ve ışıma taraması, florofor yapıların hangi dalga boyundaki ışıklarla uyarıldığını ve yanıt olarak hangi dalga boyunda ışıma yaptığını gösterir (130, 131).

Uyarılma ve ışıma grafiği, bütün florofor yapıları için bir parmak izi gibi özgündür. mCherry floresan proteininin uyarılma ve emisyon değerlerine dair dalga boyu ve floresans yoğunluğu grafiği şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10. mCherry floresan proteininin uyarılma ve ışıma grafiği [Grafik (132) kaynağından uyarlanmıştır].

CRY2$_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI dimerizasyonunu teyit etmek için beyin kesitlerinde konfokal mikroskop (Leica TCS SP8) ile uyarılma ve ışıma taraması "*lambda scan*" yapıldı (133). Taramada mCherry floresan proteini ile uyumlu bir sinyal olup olmadığı incelendi. Bu amaçla, konfokal mikroskopta beyin kesit örneklerinde plazmid enjeksiyonunun ve optik uyarının yapıldığı alan öncelikle 405 nm dalga boyu ışık ile uyarıldı ve ışıması 420-750 nm dalga boyları arasında 5 nm dalga boyu aralıklarla tarandı. Sonrasında, 488 nm dalga boyu ışık ile uyarıldı ve ışıması 500-750 nm dalga boyları arasında 5 nm dalga boyu aralıklarla tarandı. Son olarak, 552 nm dalga boyu ışık ile uyarıldı ve ışıması 560-750 nm dalga boyları arasında 5 nm dalga boyu aralıklarla tarandı (Şekil 3.11). Sonuç olarak laboratuvarımızda mevcut olan 405, 488 ve 552 nm dalga boyundaki ışık uyarıları ile beyin kesitlerinin ışımaları incelendi. Uyarılma ve ışıma taraması sonuçlarında mCherry floresan protein ile uyumlu bir sinyal olup olmadığı değerlendirildi.

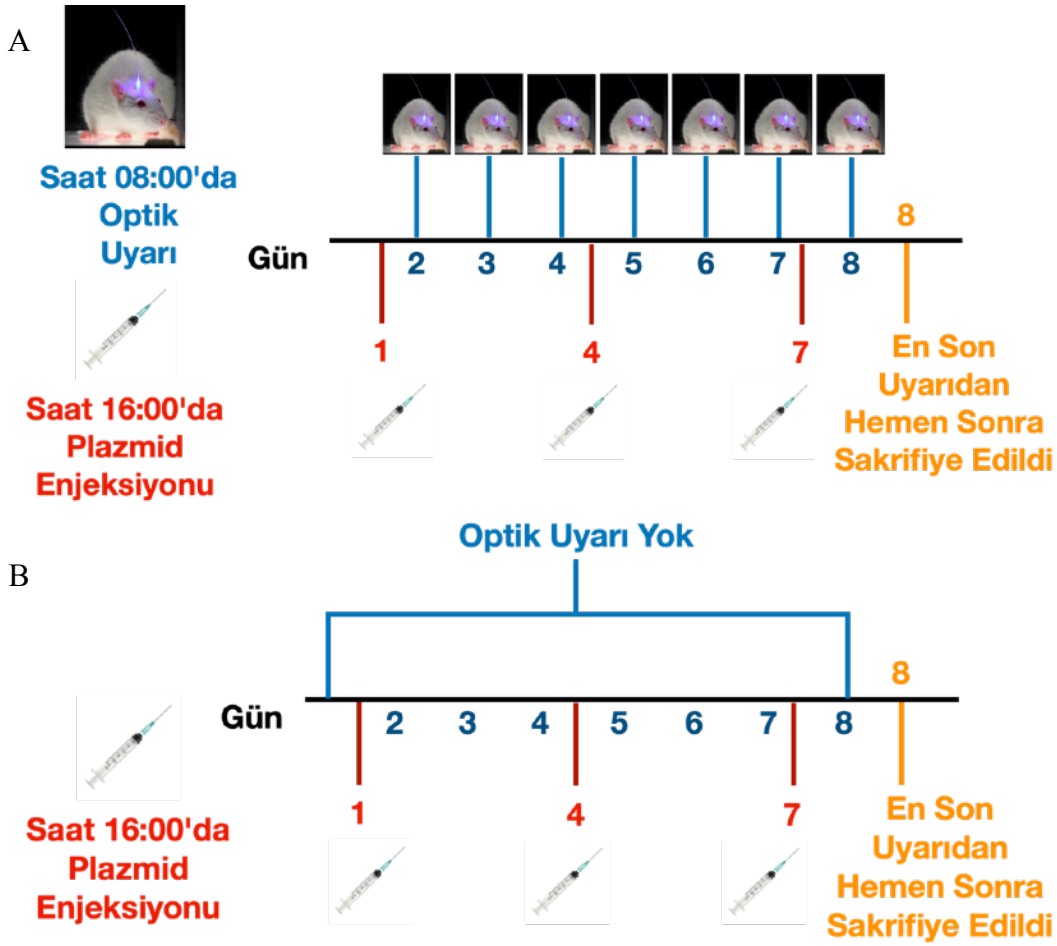


Şekil 3.11. Beyin kesitlerinin 552 nm dalga boyundaki ışık ile uyarılmasından sonra 560-750 nm dalga boyları arasında ışıma taramaları

4. BULGULAR

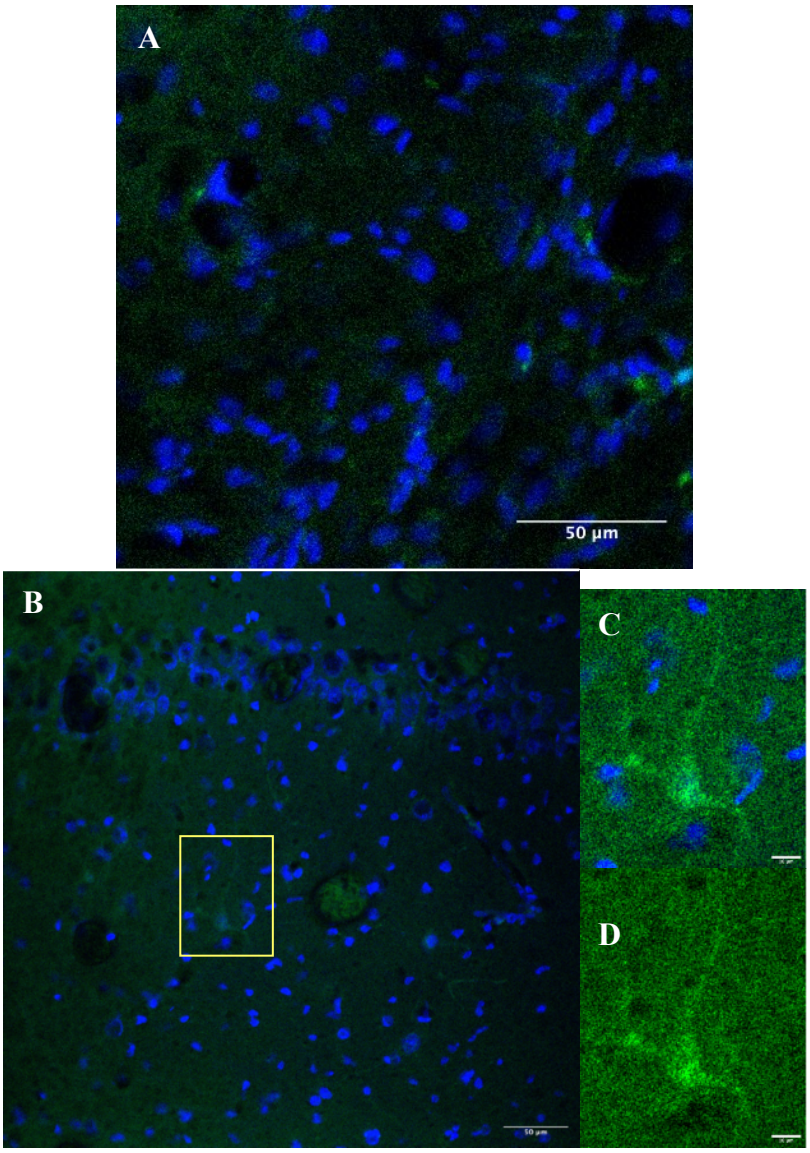
4.1. Birinci Optimizasyon Deneyleri

Birinci optimizasyon deneyinde tüm sıçanlara üç gün ara ile (1., 4. ve 7. gün), toplam üç kere enjekte intrahipokampal plazmid enjeksiyonu gerçekleştirildi. Optik uyarı grubundaki sıçanlara her gün art arda beş kere, 2 dakika süre ile (0,5 Hz; 3,5 W/m2) optik uyarı uygulanırken (n=2) (şekil 4.1, A), yalancı uygulama grubundaki sıçanlar optik uyarı sistemine bağlandı, ancak uyarı gerçekleştirilmedi (n=2) (Şekil 4.1, B).



Şekil 4.1. Birinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı (A) ve yalancı uygulama (B) gruplarına uygulanan protokolün şematik gösterimi

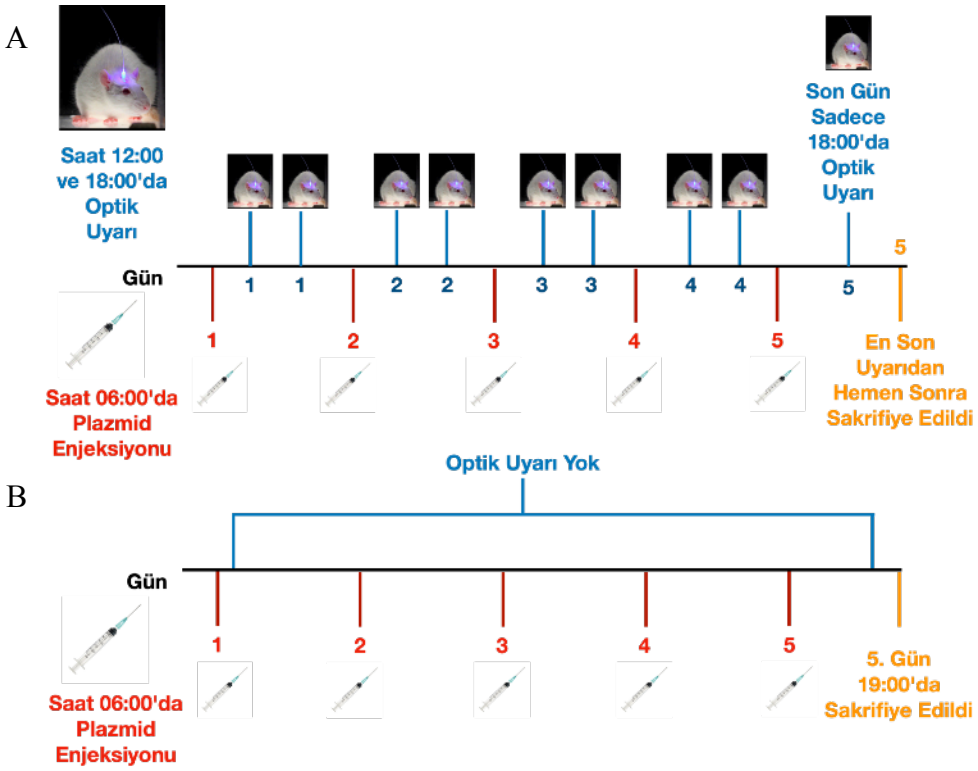
İki gruptaki sıçanların beyin kesitlerinin incelemelerinde de plazmidin iki parçasının optik uyarı ile başarıyla bir araya geldiğini haber veren mCherry sinyali gözlenmedi. Ayrıca iki gruptaki sıçanların beyin kesitlerinin incelemelerinde NF-κB sinyalinin düşük olduğu gözlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Birinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı (A) ve yalancı uygulama (B, C, D) gruplarındaki sıçanların beyin kesitlerinde NF-κB işaretlemesini gösteren konfokal mikroskop görüntüleri (Mavi renk Hoecst çekirdek boyası, yeşil NF-κB antikoru) **A., B.** Hipokampus CA3 alt bölgesinde NF-κB işaretlemelerine ait görüntüler sunulmuştur (skala 50 µm). **C., D.** B'de gösterilen sarı kare içindeki alanın büyütülmüş görüntüsü sunulmuştur (skala 10 µm).

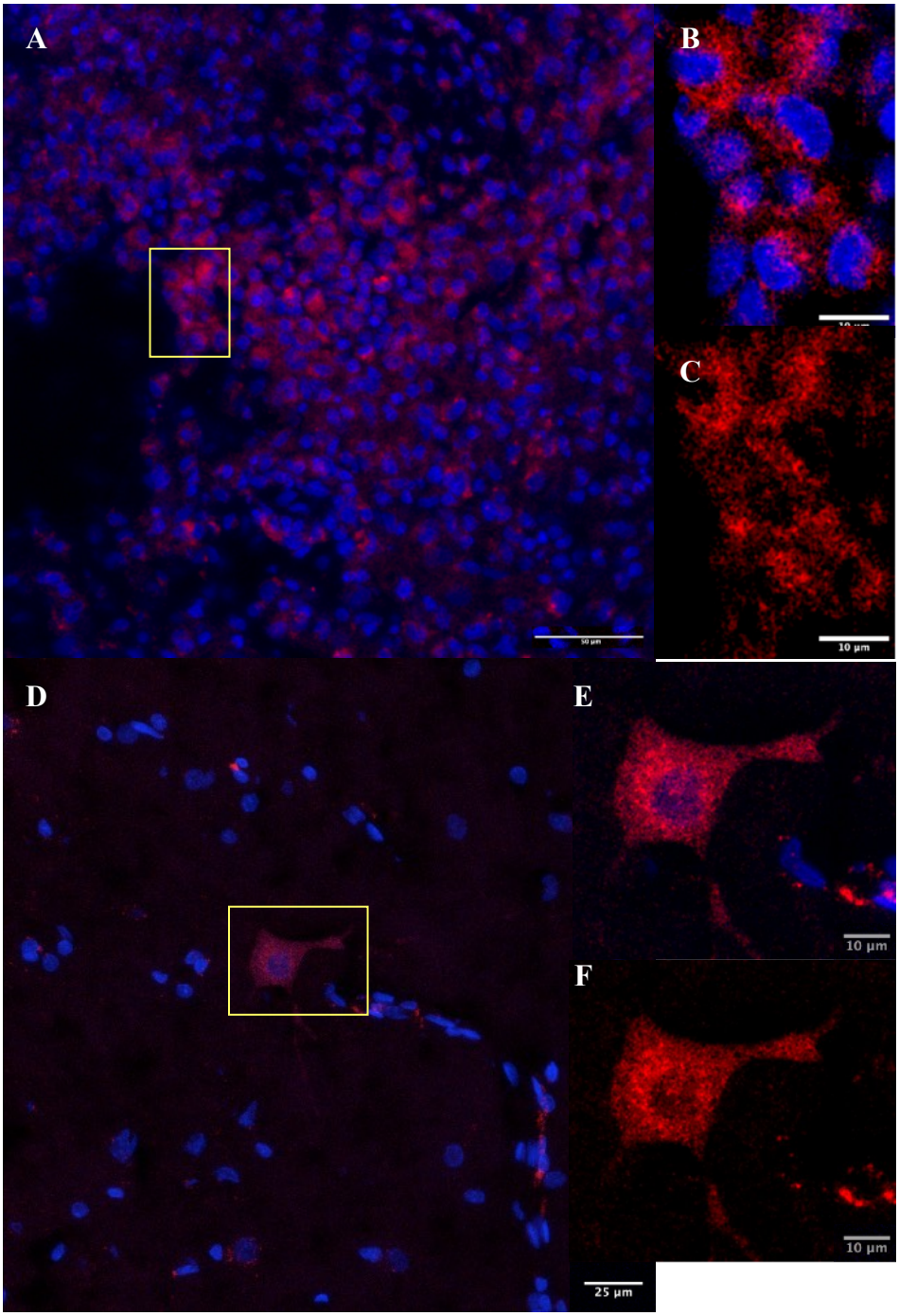
4.2. İkinci Optimizasyon Deneyleri

İkinci optimizasyon deneyinde tüm sıçanlara beş gün boyunca her gün intrahipokampal plazmid enjeksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 4.3). Optik uyarı grubundaki sıçanlara her plazmid enjeksiyonundan 6 ve 12 saat sonra günde toplam iki kere intrahipokampal optik uyarı uygulandı (n=4) (Şekil 4.3, A.) Uygulanan optik uyarı şiddeti 5 W/m²'ye çıkarıldı, optik uyarı dizileri aralıksız 1 saat boyunca uygulandı (Şekil 4.3, A). Yalancı uygulama grubundaki sıçanlar optik uyarı sistemine bağlandı, ancak uyarı uygulanmadı (n=2) (Şekil 4.3, B).

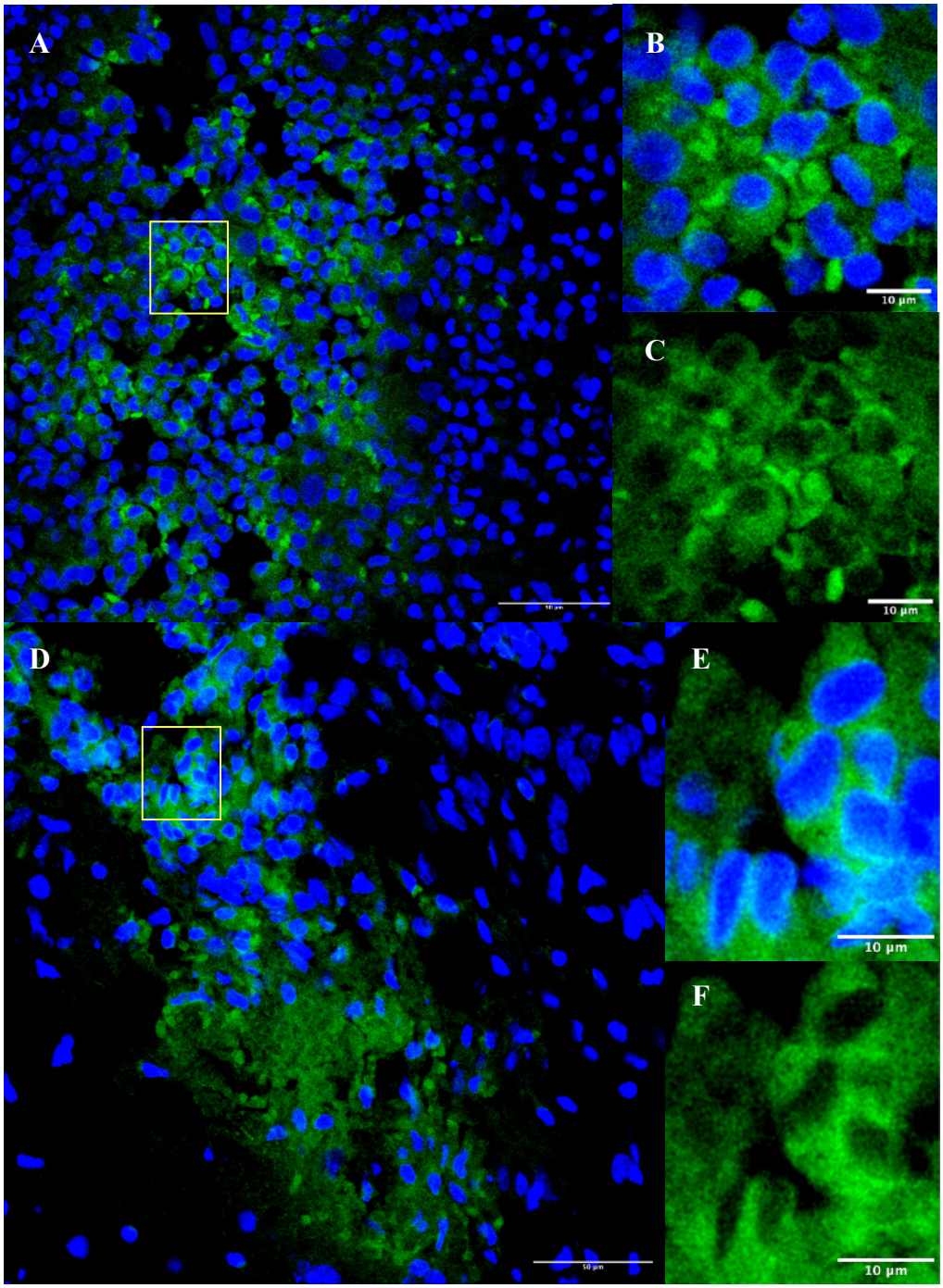


Şekil 4.3. İkinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı (A) ve yalancı uygulama (B) gruplarına uygulanan protokolün şematik gösterimi

Hem optik uygulama hem de yalancı uygulama grubundaki sıçanlardan elde edilen beyin kesitlerinde mCherry ile uyumlu olduğu değerlendirilen sinyalin bulunduğu (Şekil 4.4) ve NF-κB'yi işaretleyen CY2 sinyalinde artış olduğu gözlendi (Şekil 4.5).



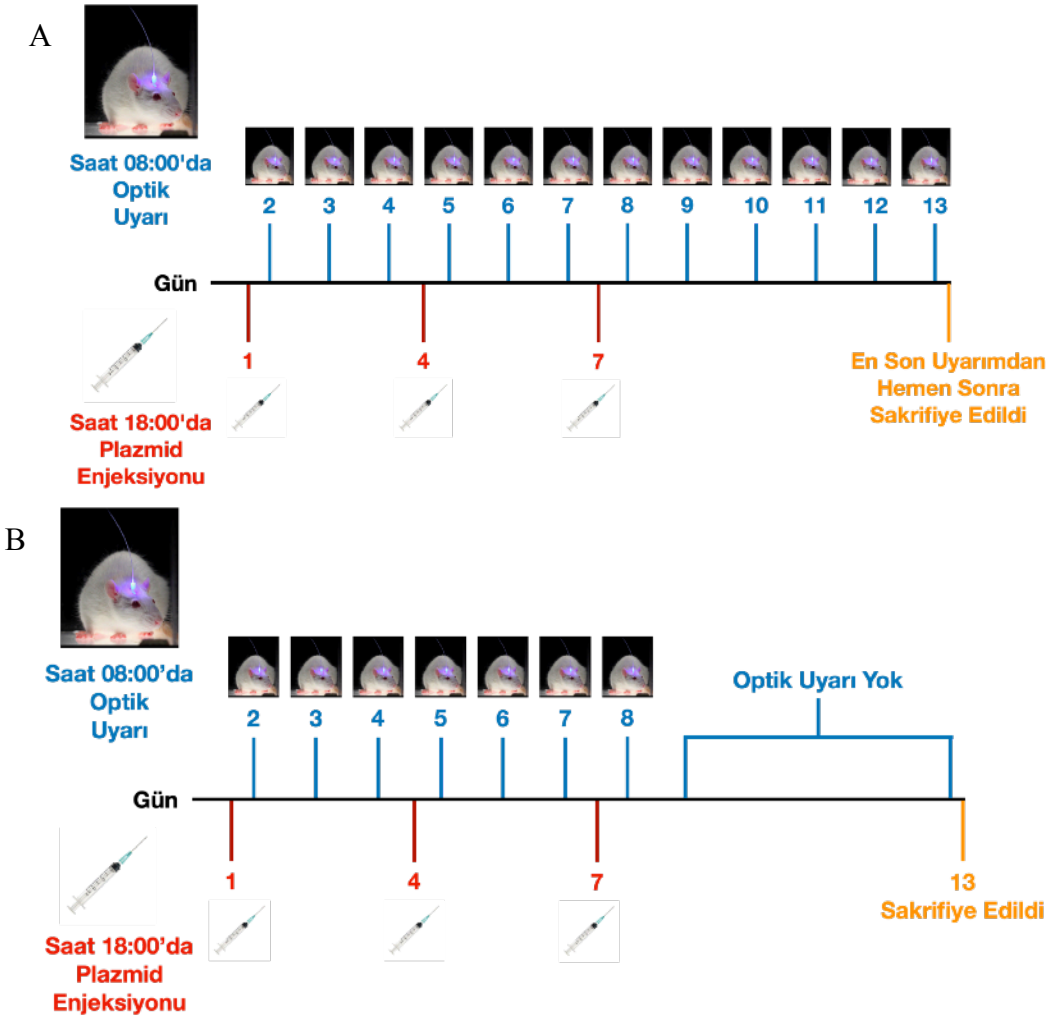
Şekil 4.4. İkinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı (A, B, C) ve yalancı uygulama (D, E, F) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntüleri (Mavi Hoecst çekirdek boyası, kırmızı mCherry) **A., D.** Hipokampus CA3 alt bölgesinde mCherry haberci proteini ile uyumlu sinyallere ait görüntüler sunulmuştur (skala 50 µm) **B., C, E., F.** B ve C için A'da ve E ve F için D'de gösterilen sarı kare içindeki alanın büyütülmüş görüntüsü sunulmuştur (skala 10 µm).



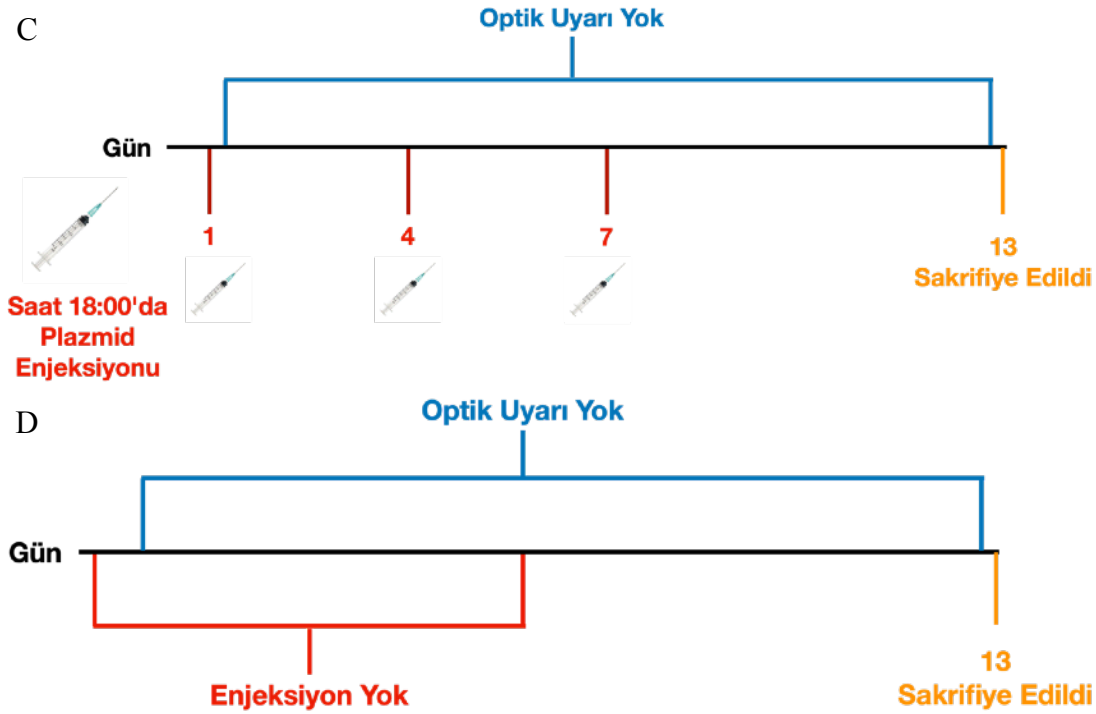
Şekil 4.5. İkinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı (A, B, C) ve yalancı uygulama (D, E, F) gruplarındaki sıçanlar ait beyin kesitlerinde NF-κB işaretlemesini gösteren konfokal mikroskop görüntüleri (Mavi Hoecst çekirdek boyası, yeşil NF-κB antikoru) **A., D.** Hipokampus CA3 alt bölgesinde NF-κB işaretlemelerine ait görüntüler sunulmuştur (skala 50 µm). **B., C, E., F.** B ve C için A'da ve E ve F için D'de gösterilen sarı kare içindeki alanın büyütülmüş görüntüsü sunulmuştur (skala 10 µm).

4.3. Üçüncü Optimizasyon Deneyleri

Üçüncü optimizasyon deneylerinde optik uyarı gruplarında hipokampal plazmid enjeksiyonu üç kez, üç gün ara ile (1., 4. ve 7. gün); optik uyarı ikinci günün sabahından itibaren günde bir kez gerçekleştirildi (Şekil 4.6, A, B). Birinci optik uyarı grubunda 12 kez optik uyarı gerçekleştirilirken (n=2) (Şekil 4.6, A), ikinci optik uyarı grubunda sinyalin plazmid enjeksiyonundan sonra da devam edip etmediğini test etmek için 7 kere optik uyarı gerçekleştirildi (n=2) (Şekil 4.6, B). Yalancı uygulama grubunun (n=2) (Şekil 4.6, C) yanı sıra sadece kanül takılan ancak plazmid enjeksiyonu ve optik uyarı yapılmayan bir kontrol grubu eklendi (n=2) (Şekil 4.6, D).

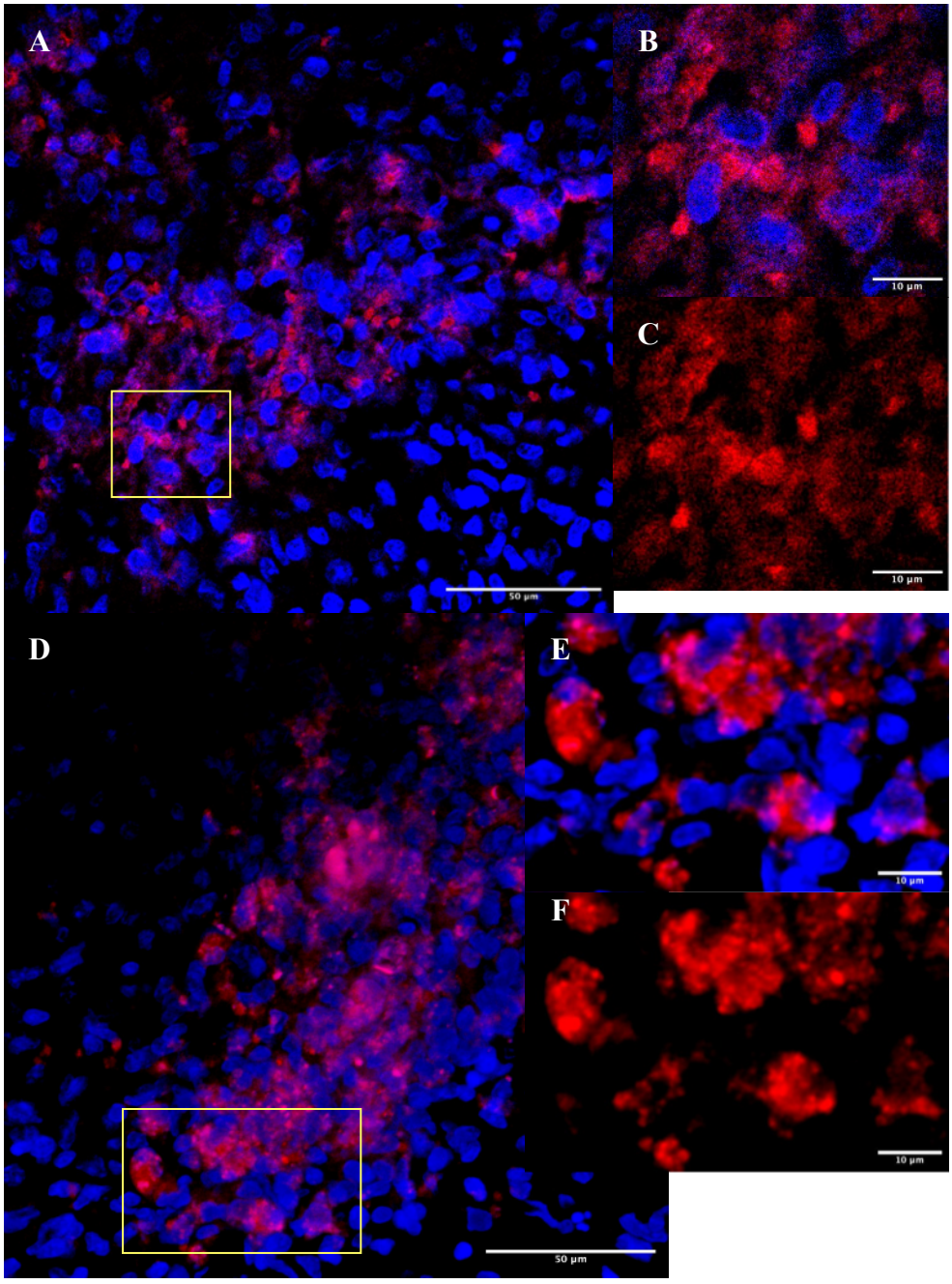


Şekil 4.6. Üçüncü optimizasyon deneylerinde birinci (A) ve ikinci (B) optik uyarı gruplarına uygulanan protokolün şematik gösterimi

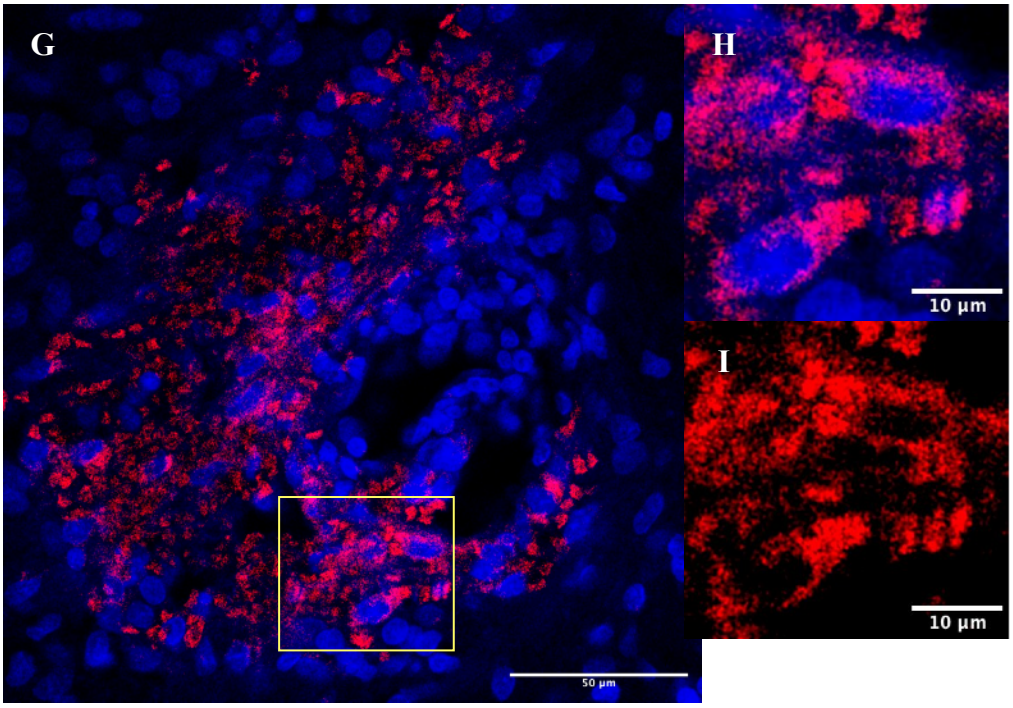


Şekil 4.6 (Devam). Üçüncü optimizasyon deneylerinde yalancı uygulama (C) ve kontrol (D) gruplarına uygulanan protokolün şematik gösterimi

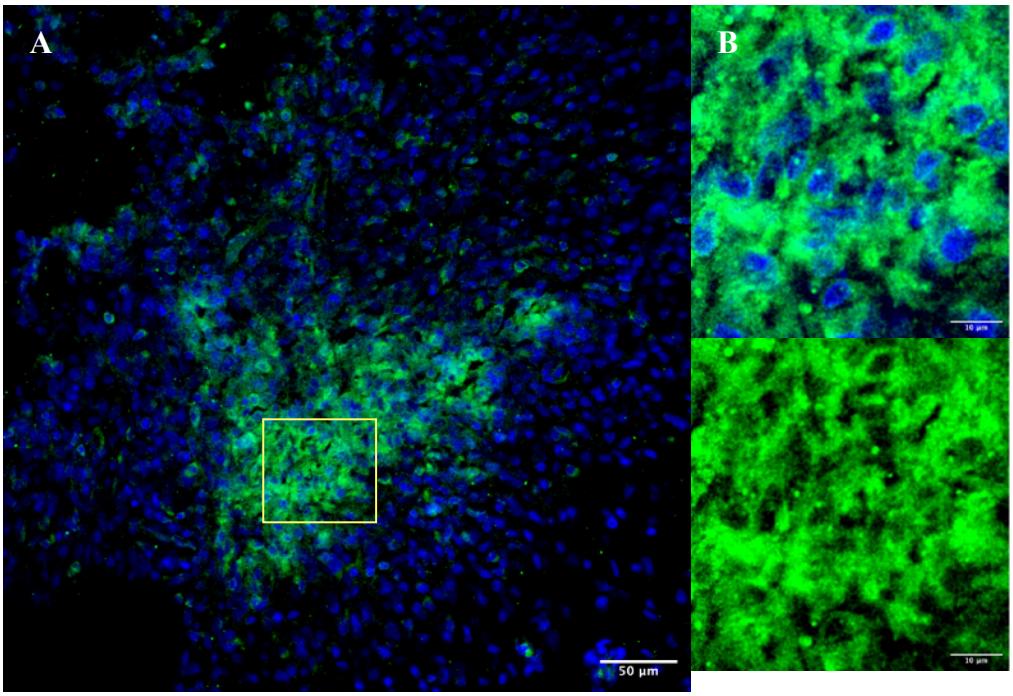
Birinci ve ikinci optik uygulama grubunda ve de yalancı uygulama grubundaki sıçanlardan elde edilen beyin kesitlerinde mCherry ile uyumlu olduğu değerlendirilen sinyalin bulunduğu (Şekil 4.7) ve NF-κB'yi işaretleyen CY2 sinyalinde artış olduğu gözlendi (Şekil 4.8). Kontrol grubundan elde edilen beyin kesitlerinde mCherry ile uyumlu olduğu değerlendirilen sinyal gözlenmedi.



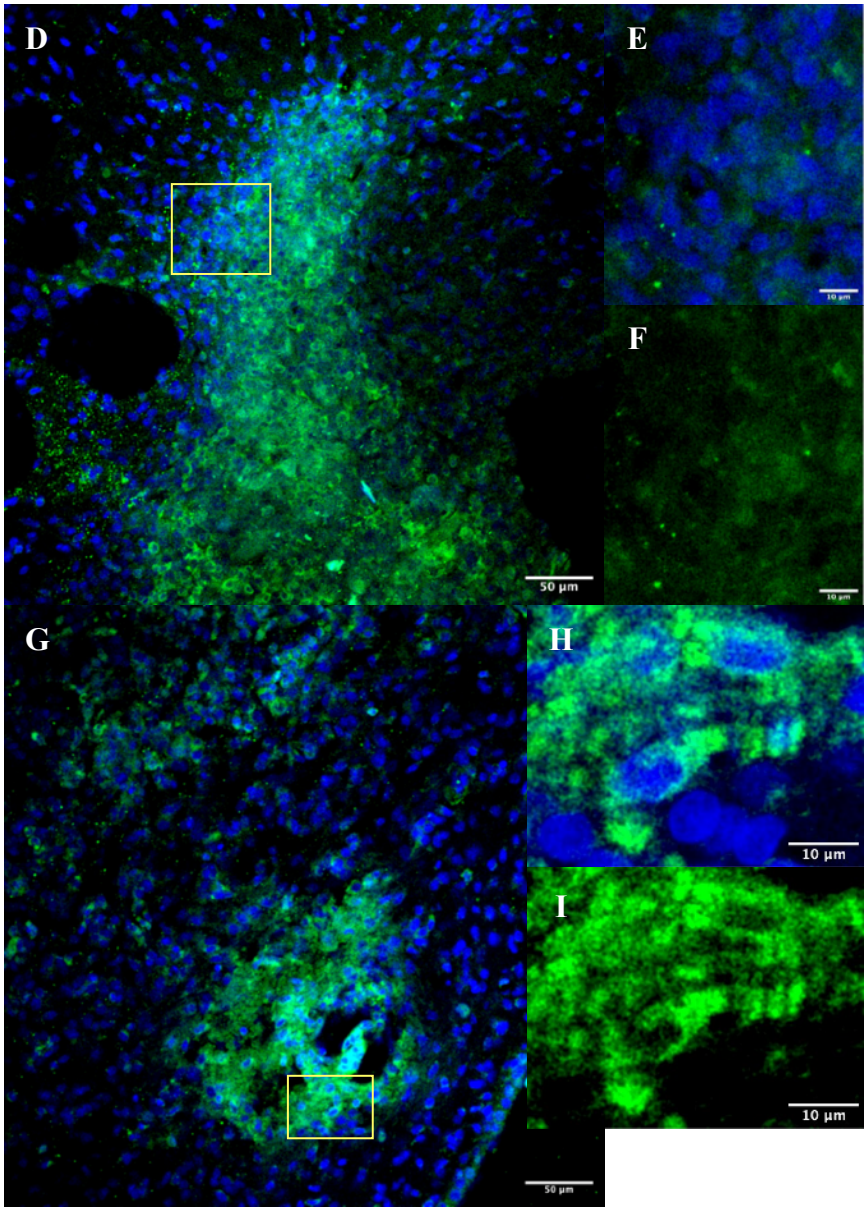
Şekil 4.7. Üçüncü optimizasyon deneylerinde birinci (A, B, C) ve ikinci optik uyarı (D, E, F), ve yalancı uygulama (G, H, I) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntüleri (Mavi Hoecst çekirdek boyası, kırmızı mCherry) **A., D., G.** Hipokampus CA3 alt bölgesinde mCherry haberci proteini ile uyumlu sinyallere ait görüntüler sunulmuştur (skala 50 µm). **B., C, E., F., H., I.** B ve C için A'da, E ve F için D'de, H ve I için G'de gösterilen sarı kare içindeki alanın büyütülmüş görüntüsü sunulmuştur (skala 10 µm).



Şekil 4.7. (Devam) Üçüncü optimizasyon deneylerinde birinci (A, B, C) ve ikinci optik uyarı (D, E, F), ve yalancı uygulama (G, H, I) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerin konfokal mikroskop görüntüleri



Şekil 4.8. Üçüncü optimizasyon deneylerinde birinci (A, B, C) ve ikinci optik uyarı (D, E, F), ve yalancı uygulama (G, H, I) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinde NF-κB işaretlemesini gösteren konfokal mikroskop görüntüleri

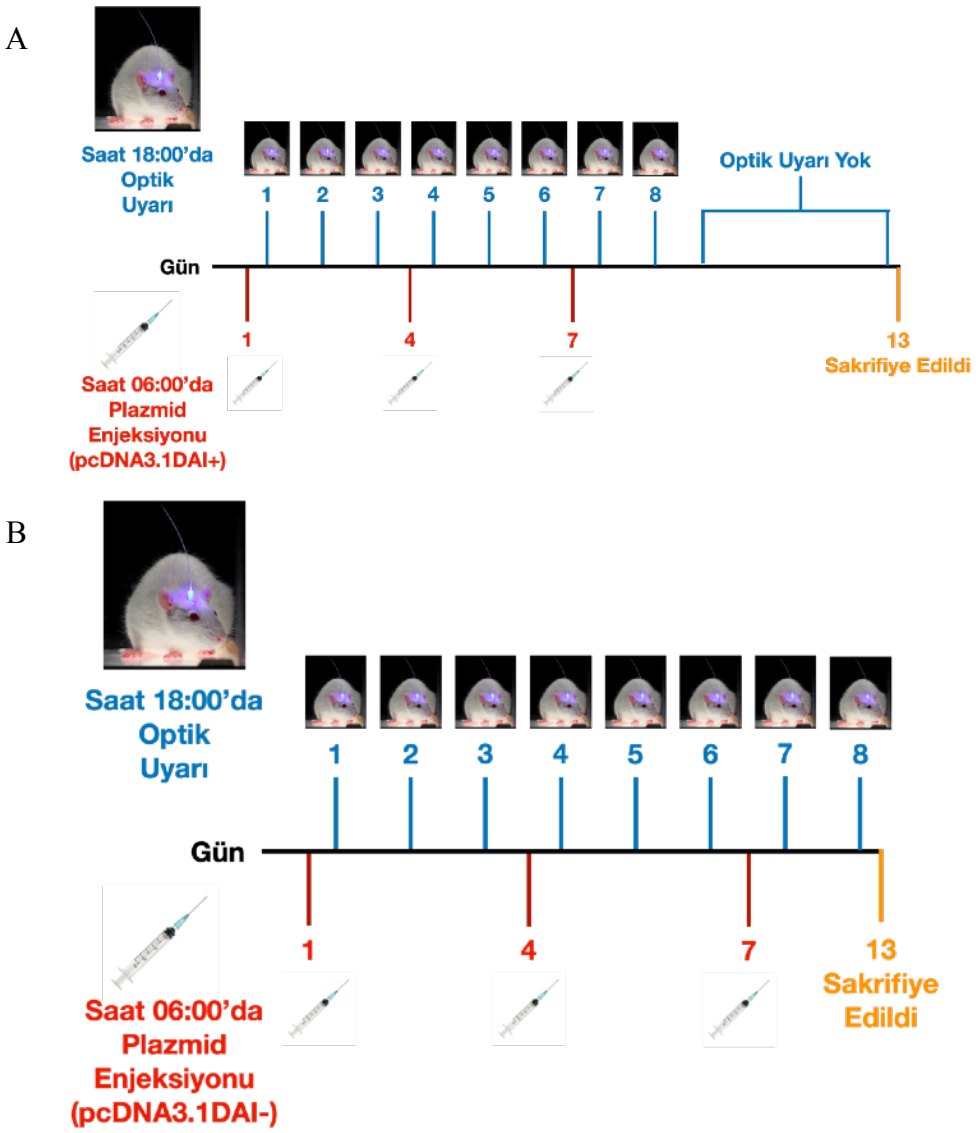


Şekil 4.8. (Devam) Üçüncü optimizasyon deneylerinde birinci (A, B, C) ve ikinci optik uyarı (D, E, F), ve yalancı uygulama (G, H, I) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerin Üçüncü optimizasyon deneylerinde birinci (A, B, C) ve ikinci optik uyarı (D, E, F), ve yalancı uygulama (G, H, I) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinde NF-κB işaretlemesini gösteren konfokal mikroskop görüntüleri (Mavi Hoecst çekirdek boyası, yeşil NF-κB antikoru) **A., D., G.** Hipokampus CA3 alt bölgesinde NF-κB işaretlemelerine ait görüntüler sunulmuştur (skala 50 µm). **B., C, E., F., H., I.** B ve C için A'da, E ve F için D'de, H ve I için G'de gösterilen sarı kare içindeki alanın büyütülmüş görüntüsü sunulmuştur (skala 10 µm).

4.4. Dördüncü Optimizasyon Deneyleri

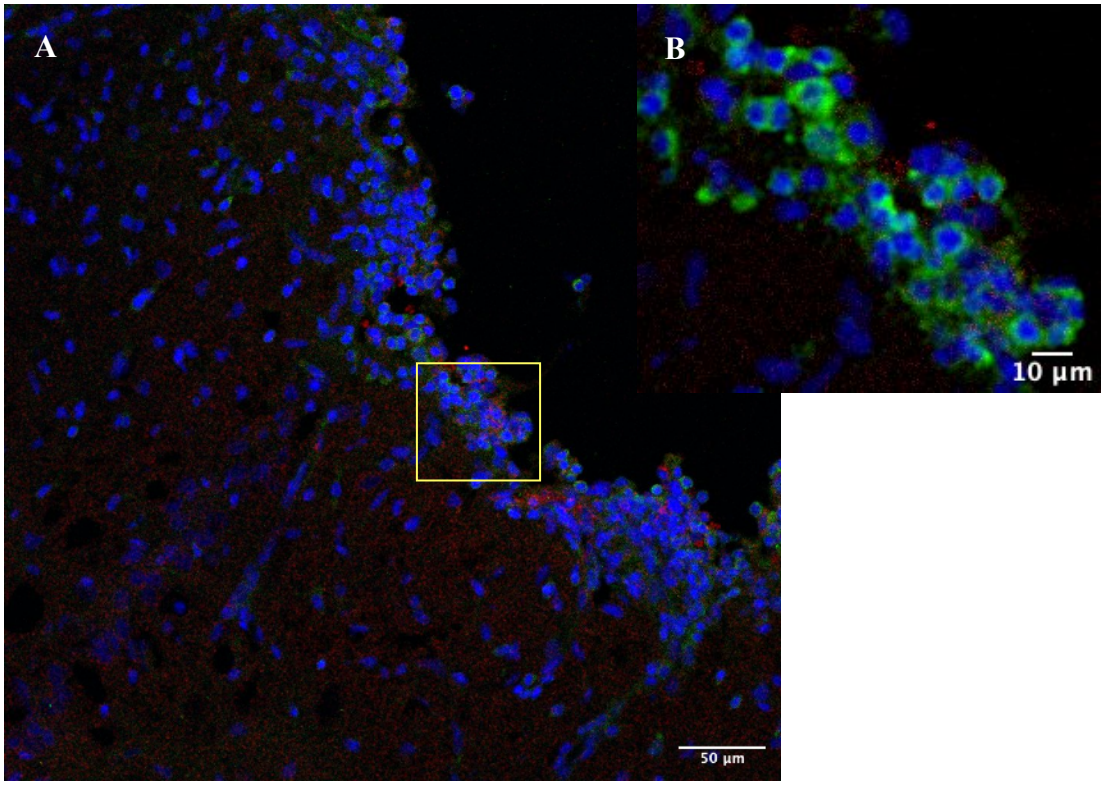
Optimizasyon deneyleri sonuçları üzerine Esser-Kahn ve ekibi ile yapılan bilimsel tartışmalar sonucu mevcut plazmidin (pUC57) memeliler dışında ifade sağladığı, bu nedenle ilk üç optimizasyon deneyinden elde edilen beyin kesitlerinin NF-κB antikoru ile işaretlemeleri sonrası konfokal mikroskopu ile yapılan incelemelerde zemin aktivitesinde artışa sebep olmuş olabileceği değerlendirildi. Memeli promoteri altında $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI yapısını içeren pcDNA3.1 plazmidi veya DAI içermeyen $CRY2_{PHR}$/CIB1 yapısını içeren kontrol pcDNA3.1 plazmidi ile deneyler tekrarlandı.

Dördüncü optimizasyon deneylerinde üç gün ara ile (1., 4. ve 7. gün) hipokampal plazmid enjekte edildi, optik uyarı ikinci günün sabahından itibaren sekiz gün, günde bir kez gerçekleştirildi (Şekil 4.9). $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI pcDNA3.1 plazmidi enjekte edilen optik uyarı grubundaki sıçanlar, son optik uyarıdan 120 saat (5 gün) sonra sakrifiye edildi (n=3) (Şekil 4.9, A). DAI içermeyen $CRY2_{PHR}$/CIB1 pcDNA3.1 plazmidi enjekte edilen yalancı uygulama grubundaki sıçanlar ise inflamatuvar sinyal yollarında tekniğe bağlı uyarılma oluyorsa bunun zamanla kaybolma olasılığına karşın son optik uyarıdan 1 saat sonra sakrifiye edildi (n=2) (Şekil 4.9,B).

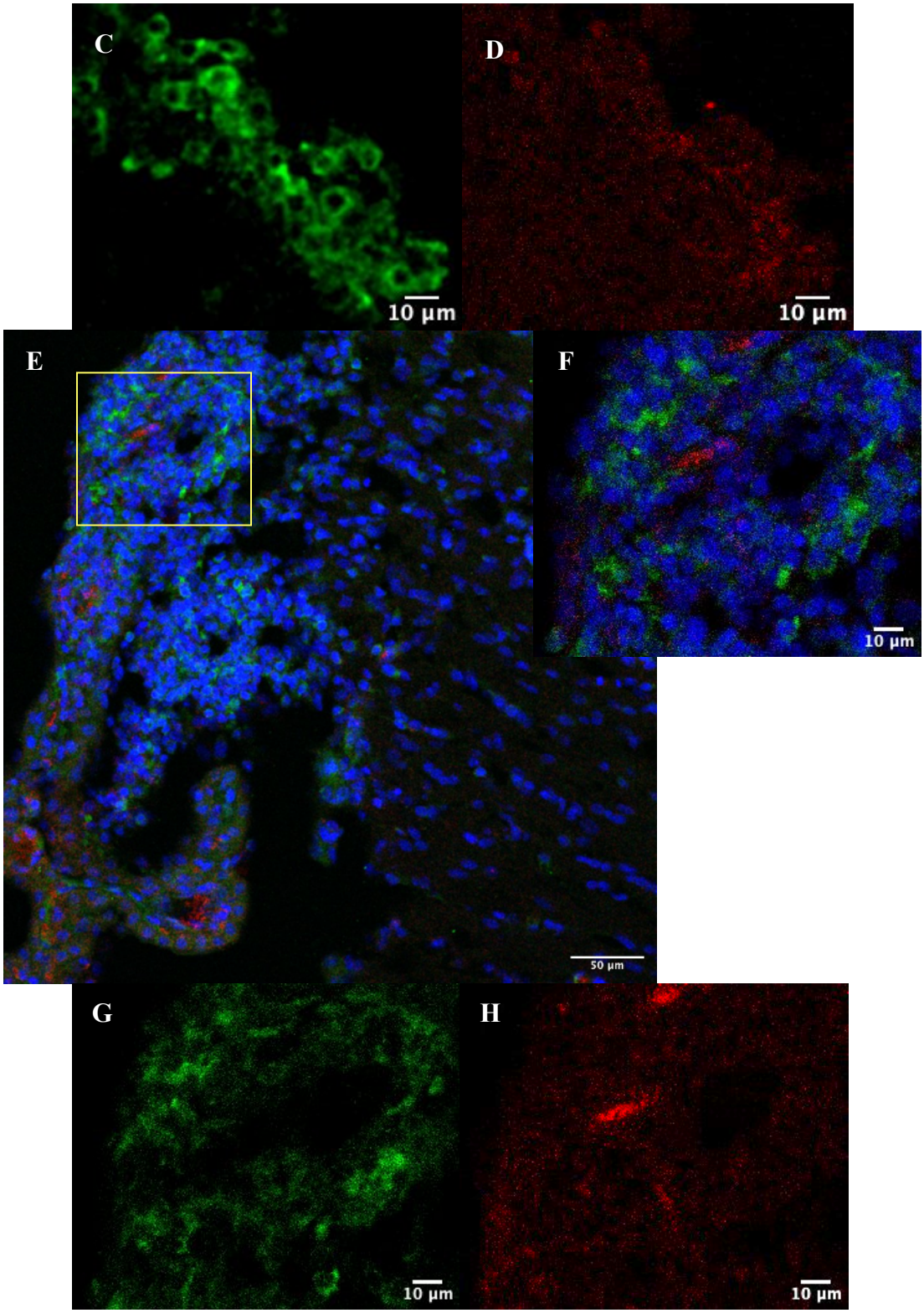


Şekil 4.9. Dördüncü optimizasyon deneylerinde optik uyarı (A) ve kontrol (B) gruplarına uygulanan protokolün şematik gösterimi

Hem DAI içeren plazmid enjekte edilen optik uyarı grubundaki hem de DAI içermeyen kontrol plazmidi enjekte edilen yalancı uygulama grubundaki sıçanların beyin kesitlerinde mCherry ile uyumlu olduğu değerlendirilen sinyalin bulunduğu (Şekil 4.10) ve NF-κB'yi işaretleyen CY2 sinyalinde artış olduğu gözlendi (Şekil 4.10).



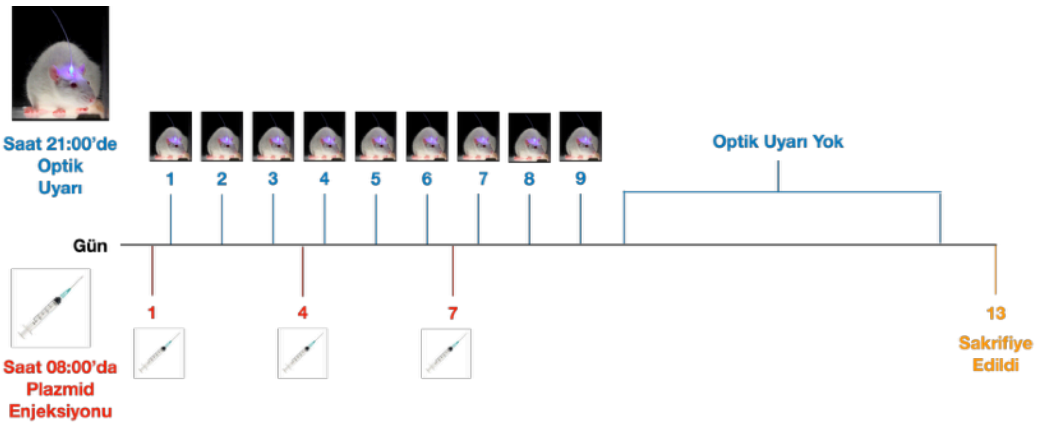
Şekil 4.10. Dördüncü optimizasyon deneylerinde optik uyarı (A, B, C, D) ve yalancı uygulama (E, F, G, H) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntüleri (Mavi Hoecst çekirdek boyası, yeşil NF-κB antikoru, kırmızı mCherry). **A., E.** Hipokampus CA3 alt bölgesinde mCherry haberci proteini ile uyumlu sinyallere ve NF-κB işaretlemelerine ait görüntüler sunulmuştur (skala 50 µm). **B., F.** Sırasıyla A ve E'de gösterilen sarı kare içindeki alanın büyütülmüş görüntüsü sunulmuştur (skala 10 µm). **C., G.** Sırasıyla A ve E'de gösterilen sarı kare içindeki alandaki sadece NF-κB işaretlemelerine ait görüntüler sunulmuştur (skala 10 µm). **D., H.** Sırasıyla A ve E'de gösterilen sarı kare içindeki alandaki sadece mCherry haberci proteini ile uyumlu sinyallere ait görüntüler sunulmuştur (skala 10 µm).



Şekil 4.10. (Devam) Dördüncü optimizasyon deneylerinde optik uyarı (A, B, C, D) ve yalancı uygulama (E, F, G, H) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntüleri

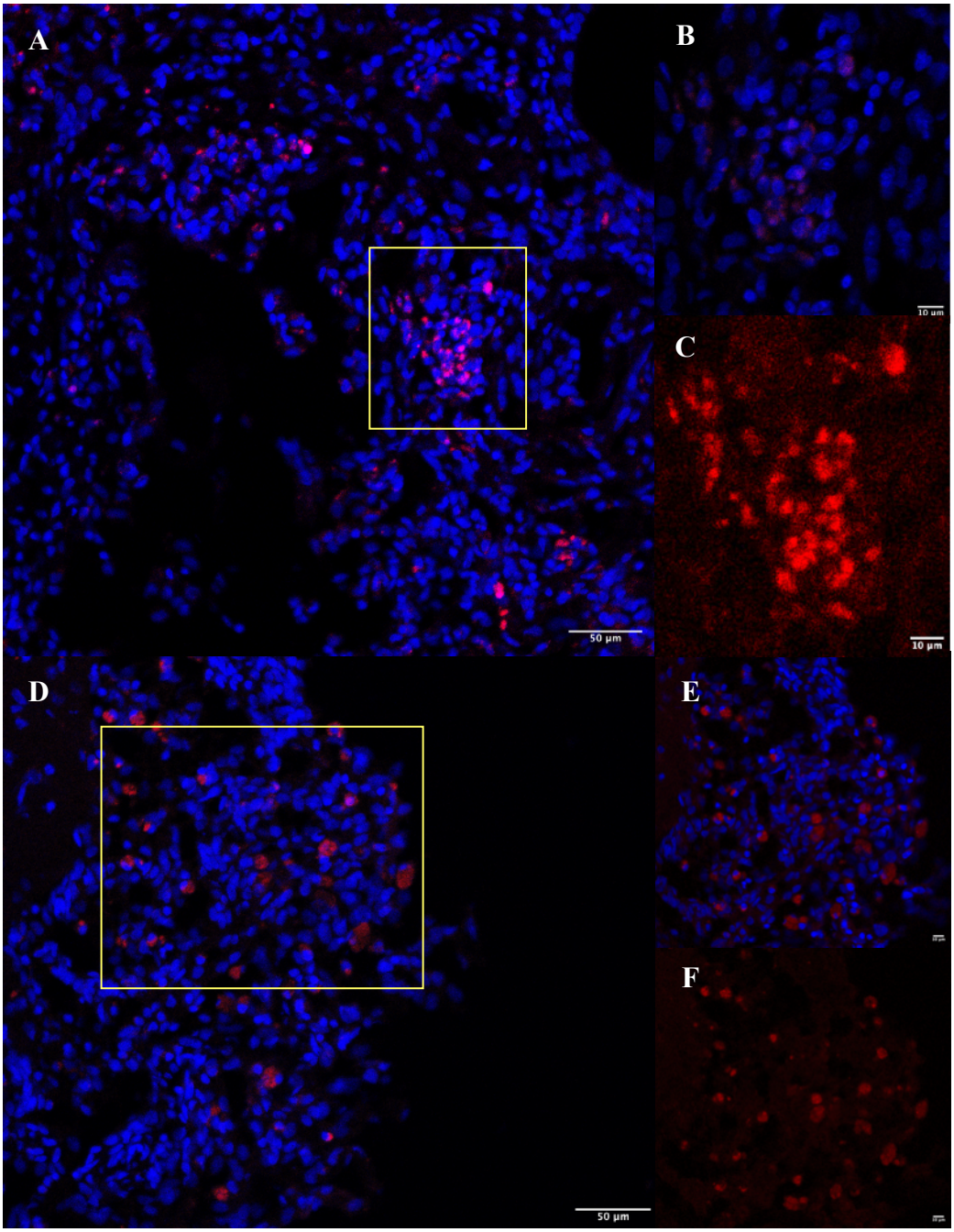
4.5. Beşinci Optimizasyon Deneyleri

Beşinci optimizasyon deneylerinde; optik uyarı grubundaki sıçanların hipokampuslarına $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI plazmidi (n=3); yalancı uygulama grubundaki sıçanların hipokampuslarına DAI içermeyen $CRY2_{PHR}$/CIB1 plazmidi (n=3) ve kontrol grubundaki sıçanların hipokampuslarına plazmid olmaksızın sadece transfeksiyon ajanı (*in vivo*-jetPEI®) (n=3) enjekte edildi. Beşinci optimizasyon deneylerinde, tüm gruplara 72 saat aralıklarla üç kere enjeksiyon gerçekleştirildi (Şekil 4.11). Tüm gruplara, ilki ilk enjeksiyondan 12 saat sonra olacak ve sonuncusu son enjeksiyondan 60 saat sonra olacak şekilde, 24 saat aralıklarla dokuz kere bir saatlik optik uyarı yapıldı (Şekil 4.11).

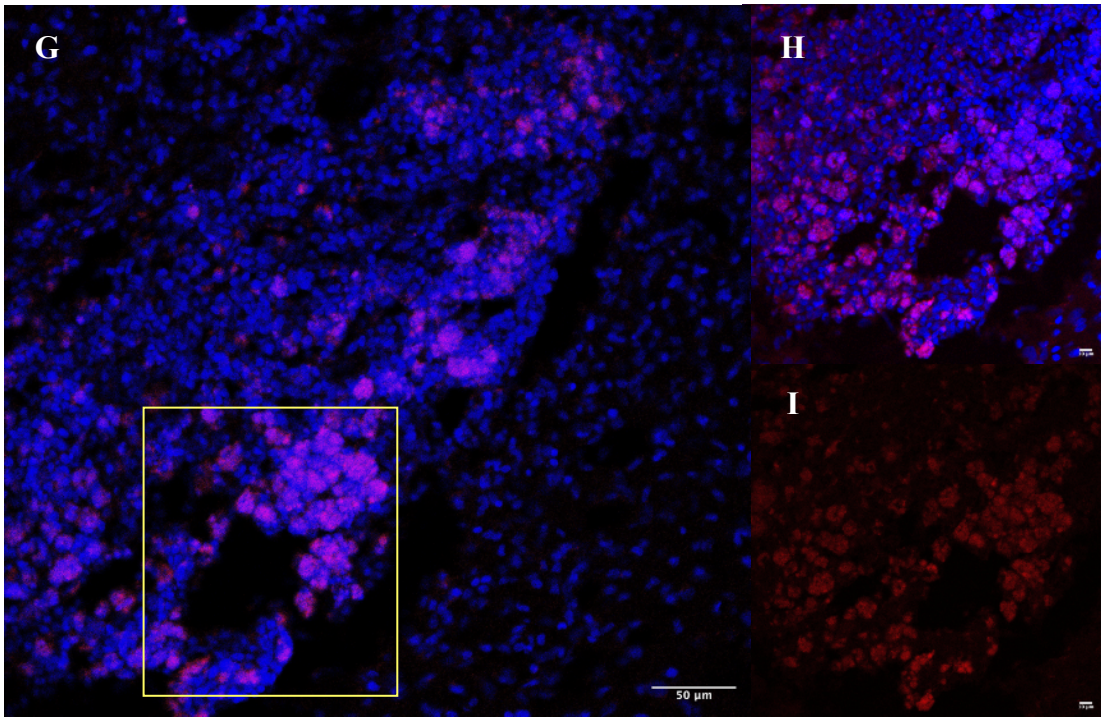


Şekil 4.11. Tüm gruplar için beşinci optimizasyon deneyinin şematik gösterimi

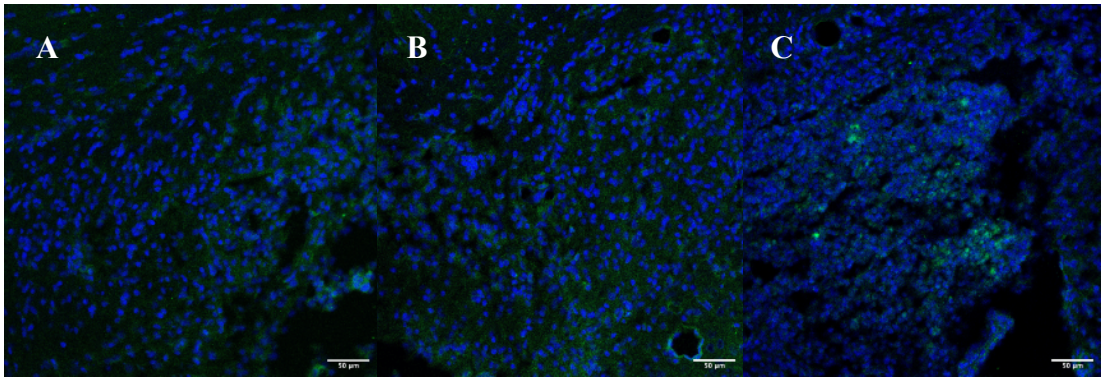
Optik uyarı, yalancı uygulama ve kontrol gruplarındaki sıçanlardan elde edilen beyin kesitlerinde mCherry ile uyumlu olduğu değerlendirilen sinyalin bulunduğu (Şekil 4.12) ve NF-κB'yi işaretleyen CY2 sinyalinde artış olduğu gözlendi (Şekil 4.13). Enjeksiyon bölgesinde artan hücre yoğunluğu sebebiyle NF-κB translokasyonu kantifiye edilemedi. Bu nedenle beyin kesitlerinde NF-κB hedef genlerinden IL-6 immünohistokimyasal olarak işaretlendi (Şekil 4.14). Hem optik uyarım, hem yalancı uygulama hem de kontrol gruplarında benzer şekilde enjeksiyon bölgesinde IL-6 sinyal artışı olduğu değerlendirildi.



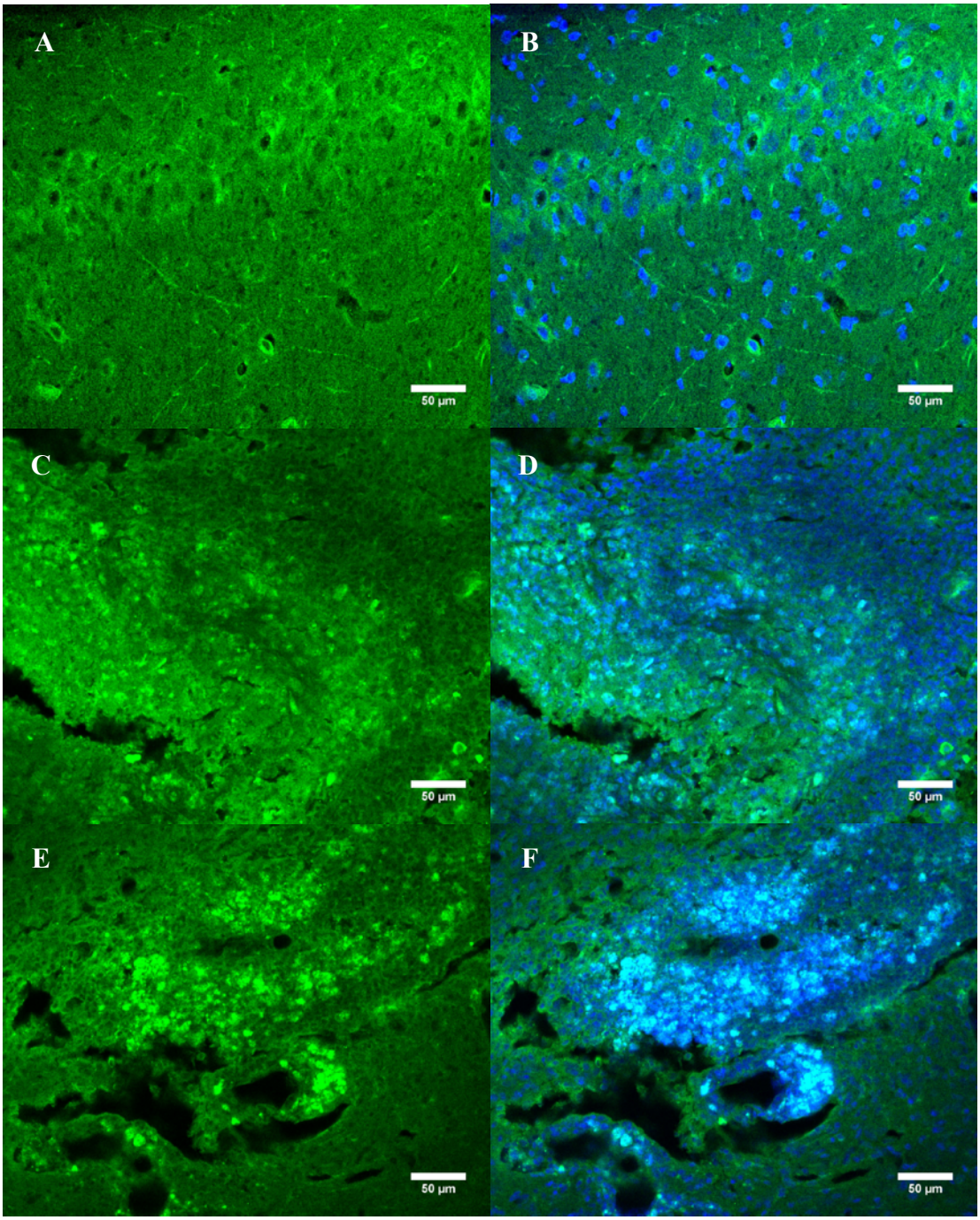
Şekil 4.12. Optik uyarı (A, B, C), yalancı uygulama (D, E, F) ve kontrol (G, H, I) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntüleri (Mavi Hoecst çekirdek boyası, kırmızı mCherry). **A., D., G.** Hipokampus CA3 alt bölgesinde mCherry haberci proteini ile uyumlu sinyallere ait görüntüler sunulmuştur (skala 50 µm). **B., C, E., F., H., I.** B ve C için A'da, E ve F için D'de, H ve I için G'de gösterilen sarı kare içindeki alanın büyütülmüş görüntüsü sunulmuştur (skala 10 µm).



Şekil 4.12. (Devam) Optik uyarı (A, B, C), yalancı uygulama (D, E, F) ve kontrol (G, H, I) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerin konfokal mikroskop görüntüleri

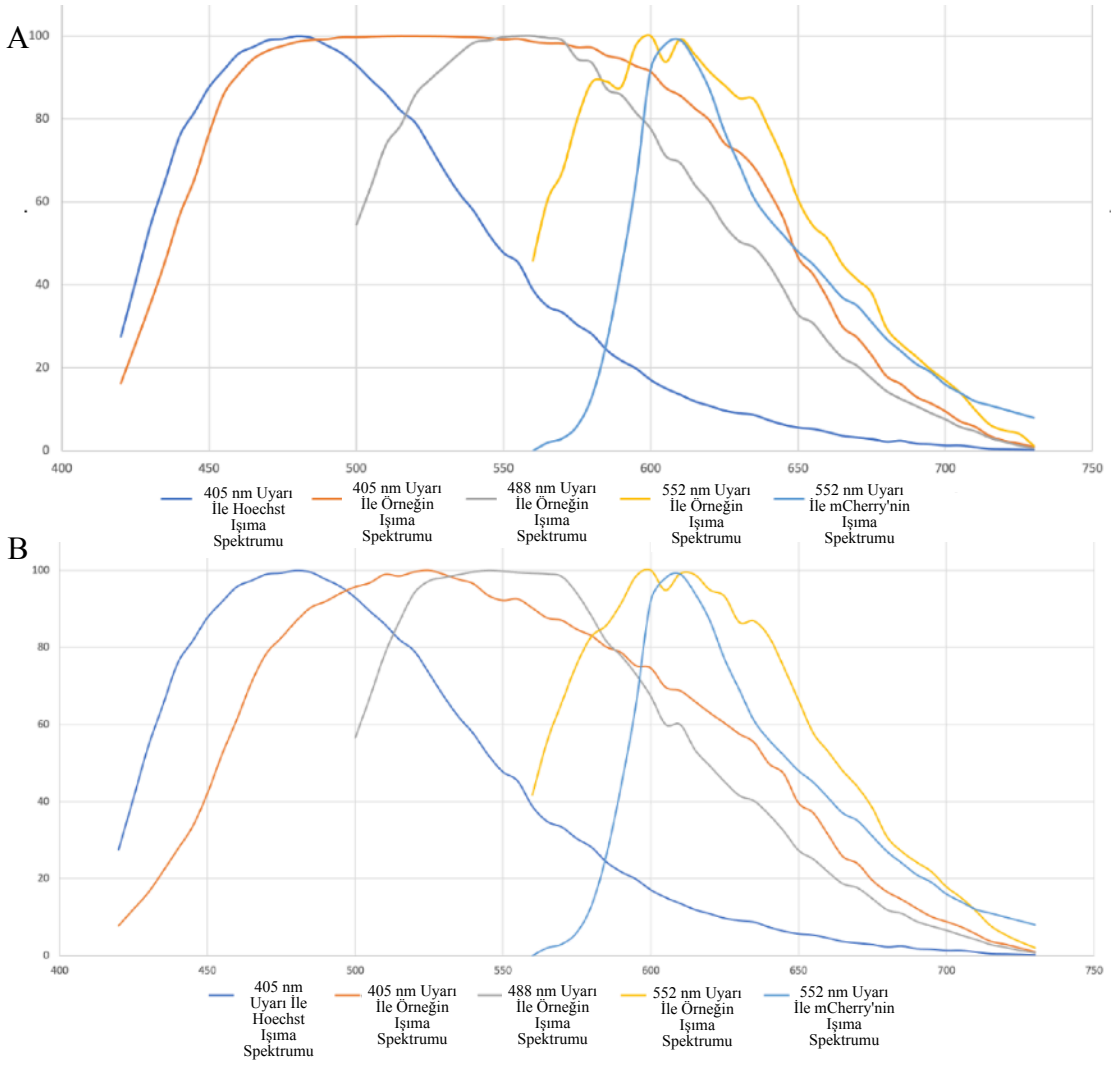


Şekil 4.13. Optik uyarı (A), yalancı uygulama (B) ve kontrol (C) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinin konfokal mikroskop görüntülerinde hipokampus CA3 alt bölgesinde NF-κB işaretlemeleri (skala 50 µm) (Mavi Hoecst çekirdek boyası, yeşil NF-κB antikoru).



Şekil 4.14. Beşinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı (A, B) ve yalancı uygulama (C, D) ve kontrol (E, F) gruplarındaki sıçanlara ait beyin kesitlerinde hipokampusta enjeksiyon yapılan bölgelerde IL-6 işaretlemesini gösteren konfokal mikroskop görüntüleri (Mavi Hoecst çekirdek boyası, yeşil IL-6 antikoru) (skala 50 µm)

Beklenmedik biçimde sadece transfeksiyon ajanı (*in vivo*-jetPEI®) enjekte edilen grupta da hem mCherry ile uyumlu olarak değerlendirilen sinyallerin görülmesi üzerine, spektral ayrıştırma konularında deneyimli bir araştırmacı olan Doç. Dr. Şefik Evren Erdener ile gerçekleştirilen tartışmalar sonrasında optik uyarı grubunun (Şekil 4.14, A) ve sadece *in vivo*-jetPEI® enjekte edilen kontrol grubunun (Şekil 4.14,B) beyin kesitlerinde uyarılma ve ışıma taraması gerçekleştirildi. Her iki grubun beyin kesitlerinde de konfokal mikroskopta saptanan kırmızı sinyalin mCherry'nin uyarılma ışıma spekturumu ile uyumlu olmadığı değerlendirildi.



Şekil 4.15. Optik uyarı (A) ve kontrol (B) gruplarından elde edilen beyin kesitlerinin uyarılma ve ışıma taraması. Açık mavi renk ile mCherry'nin, sarı renk ile optik uyarı (A) ve kontrol (B) gruplarından alınan beyin kesitlerinin 552 nm dalga boyundaki uyarı ile uyarılma ve ışıma spekturumu gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Yaklaşık on yıl öncesine kadar inflamasyon ve depresyon arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar, sistemik dolaşımdaki inflamatuvar sinyal artışının MSS'yi etkileyerek depresif belirtilere yol açtığına işaret ediyordu (56, 60, 93-96). Bunun en önemli nedenlerinden biri, depresyon patogenezinde nöro-inflamasyonun rolünü inceleyen çalışmaların çoğunda depresyonun LPS gibi bakteriyel bir endotoksin ile modellenmesiydi (56, 60, 93-96). Bu model sekonder depresyon için uygun bir model olabilir, ancak primer depresyonun patofizyolojisini çalışmak için uygun değildir. İlk defa 2013 yılında Ronald Duman ve ekibi tarafından psikolojik stresin inflamasyon kaskadını uyarabileceği gösterilmiştir (90). Ancak bu çalışmada nöro-inflamatuvar değişikliklerin ve inflamazom kompleksi oluşumunun akut stres sonrası incelenmiş olması önemli bir kısıtlılıktır. Akut stres yanıtı bozulan homeostazı yeniden kurmak için adaptif bir yanıt olup, bu yanıtın kronikleşmesi maladaptif sonuçlar doğurur (97). Bu nedenle çalışma bulgularının adaptif bir süreçle mi, yoksa patolojik bir süreçle mi ilişkili olduğunu yorumlamak güçtür. Ayrıca nöro-inflamatuvar sinyal yollarındaki artışın depresyondaki bozuk moleküler mekanizmaları frenlemek üzere telafi edici bir mekanizma olarak ortaya çıkmış olması da olasıdır.

Nöro-inflamasyon ve depresyon arasındaki karmaşık ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi için, beyinden köken alan inflamasyon sinyallerinin tetiklenmesinin depresyona etkisinin araştırılması gereklidir. Ancak MSS kökenli nöro-inflamatuvar süreçlerin depresyon ile ilişkisini doğrudan ortaya koyan bir çalışma yoktur. Bu tez çalışması, fizyolojik koşullarda stresle tetiklenen inflamatuvar yanıta benzer şekilde beyinden köken alan inflamasyonu modellemek için *in vitro* etkinliği gösterilmiş bir sistemin *in vivo* koşullara adapte edilmesi amacıyla gerçekleştirildi.

Optogenetik teknikler, özgül olarak hedeflenen inflamatuvar yolakta nöro-inflamasyonu tetiklemeye olanak sağlaması sebebiyle tercih edildi. Bu amaçla Moser ve Esser-Kahn'ın (2017) çalışmalarında özgül olarak NF-κB kaskadını uyarmak için

geliştirdikleri mavi ışıkla aktive edilebilen $CRY2_{PHR}$/DAI-CIB1/DAI kriptokrom sisteminin kullanılmasına karar verildi (124). Orjinal çalışmada ışıkla dimerize olan $CRY2_{PHR}$-DAI ve CIB1-DAI bileşenleri iki ayrı lentiviral vektör aracılığı ile hücre kültürlerine verilmişti. Ancak *in vivo* koşulların iki boyutlu hücre kültürlerine göre farklı olması ve bu nedenle plazmidleri ifade eden virüslerin beyne ayrı ayrı enjekte edilmesi durumunda aynı hücreyi enfekte etmemesi riski göz önünde bulundurularak $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom sistemini geliştiren Esser-Kahn ekibinden plazmidlerin bileşenlerini tek bir plazmid içine yerleştirmeleri istendi (124).

Lentiviral vektörler ile toplam 9000 baz büyüklüğüne kadar olan genetik yapılar aktarılabilirken adeno-ilişkili viral vektörler ile yaklaşık 4800 baz büyüklüğüne kadar olan genetik materyaller aktarılabilir (134). Esser-Kahn ve ekibinin tarafından $CRY2_{PHR}$-DAI ve CIB1-DAI kriptokrom reseptörlerini kodlayan genler tek bir plazmid içine yerleştirilerek 6272 baz çifti büyüklüğünde genetik yapı elde edildi. Esser-Kahn ve ekibi elde ettikleri genetik yapıyı viral vektör paketleme omurgasının içine yerleştirmeyi denedikleri halde, yapının büyüklüğü sebebiyle bu işlemi gerçekleştiremedi. Bu nedenle laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalardan edinilen bilgi ve tecrübeler doğrultusunda plazmidin bir transfeksiyon ajanı olan *in vivo*-jetPei® ile intrahipokampal olarak enjekte edilmesine karar verildi (135, 136).

Deneyler için hem tekrarlayan intrahipokampal enjeksiyonlara hem de optik uyarı yapılmasına imkan sağlayan optik çoklu sıvı infüzyon kanülleri tercih edildi.

Optimizasyon deneyleri ile aşağıdaki sorulara cevap bulunması amaçlandı:

- Plazmid enjeksiyonunun hacmi, tekrarlanma sıklığı ve toplam enjeksiyon sayısı

- Plazmid enjeksiyonundan ne kadar süre sonra optik uyarı verileceği

- Optik uyarının parametreleri [gücü (W/m^2), frekansı (Hz), süresi ve dizisi (train), kaç gün verileceği]

- Sıçanların en son optik uyarıdan ne kadar süre sonra sakrifiye edileceği

Her gün plazmid enjeksiyonu yapmanın neden olabileceği inflamatuvar yanıt ve kümülatif intrahipokampal enjeksiyon hacminin sebep olabileceği sorunlar sebebiyle ilk optimizasyon deneylerinde plazmid enjeksiyonlarının üç günde bir, toplam üç kere gerçekleştirilmesine karar verildi.

Doğrudan plazmid enjeksiyonundan 8-72 saat sonra transfeksiyon gerçekleşmesi sebebiyle (137), optik uyarıya ilk plazmid enjeksiyonundan 16 saat sonra başlanması kararlaştırıldı. Birinci optimizasyon deneylerinde, optik uyarı grubundaki sıçanlara ilki ilk plazmid enjeksiyonundan 16 saat sonra ve sonuncusu son plazmid enjeksiyonundan 16 saat sonra olmak üzere toplam 7 kere optik uyarı verildi. Yalancı uygulama grubundaki sıçanlara sadece plazmid enjeksiyonu yapıldı. Yalancı uygulama grubundaki sıçanlar optik uyarı grubundaki sıçanlar ile aynı süre boyunca fiberoptik ferül ile optik uyarı sistemine bağlandı ancak optik uyarı verilmedi.

İlk deney planında iki taraflı enjeksiyon gerçekleştirilip optik uyarı verilmesi planlanmıştı. Laboratuvarımızdaki LED optik uyarı sisteminde iki taraflı optik uyarı vermek için kullanılan sistem en yüksek 3,5 W/m^2 şiddetinde optik uyarı sağladığı ve bu şiddette optik uyarı ile sitotoksisite bildirilmemesinden dolayı birinci optimizasyon deneylerinde bu değerde ışık şiddetinin kullanılmasına karar verildi (117). *In vivo* koşullarda $CRY2_{PHR}$/CIB1 optogenetik sistemini kullanan çalışmalar kaynak alınarak birinci optimizasyon deneylerinde 0,5 Hz frekansta optik uyarı gerçekleştirildi (113, 115, 137-139).

In vitro koşullarda $CRY2_{PHR}$/CIB1 reseptörlerinin 10 saniyelik optik uyarı ile %90 oranında dimerize oldukları bildirilmiştir (115), ancak *in vivo* koşullarda optik uyarının etkinliğinin düşebileceği de göz önünde bulundurularak birinci optimizasyon deneylerinde optik uyarıların 2 dakika süre ile uygulanması kararlaştırıldı. Literatüre göre optik uyarı sonlandıktan $CRY2_{PHR}$ ve CIB1 reseptörleri yavaşça birbirinden ayrılmaya başlar ve yaklaşık 12 dakika sonunda tamamen birbirinden ayrılır (111, 115). Bu bilgi doğrultusunda ilk optimizasyon

deneylerinde $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI dimerizasyonunu arttırmak amacıyla uyarı dizileri arasında 10 dakikalık aralar verilmesine karar verildi.

Tez çalışması planlanırken $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom reseptörlerinin iki taraflı olarak enjekte edilmesi ve optik uyarı verilmesi hedeflenmişti. Ancak OmFC kanüllerin boyutu sebebiyle iki taraflı olarak yerleştirmeye uygun olmadığı değerlendirildi ve optimizasyon deneylerinde OmFC kanülleri tek taraflı olarak yerleştirilerek plazmid enjeksiyonu ve optik uyarı gerçekleştirildi. Gelecekte genetik materyalin viral vektör ile sıçan beyinlerine aktarılması planlanan deneylerde yine aynı kanüllerin kullanılması planlanmaktadır.

Birinci optimizasyon deneyinden sonra sıçanların beyin kesitleri immünuhistokimyasal olarak işaretlenip konfokal mikroskop ile incelendiğinde, iki grupta da düşük şiddette NF-κB sinyali gözlendi ve iki grupta da mCherry ile uyumlu değerlendirilen sinyal gözlenmedi. Bu sonuçlarla optik uyaranın veya enjekte edilen plazmid miktarının yetersiz kalmış olabileceği değerlendirildi. Bu nedenle ikinci optimizasyon deneyinde plazmid enjeksiyonunun günde bir kere olmak üzere toplam beş kere yapılmasına karar verildi. Aynı zamanda ikinci optimizasyon deneyinde optik uyarı sıklığının günde iki kere olmasına karar verildi.

İlk optimizasyon deneylerinde, tüm sıçanlara optik uyarı verilmesinden sonra sıçanlar sakrifiye edilmeye başlandı. Bu nedenle sıçanlar en son optik uyarı tamamlandıktan yaklaşık 60 ile 120 dakika sonra sakrifiye edildi. İlk optimizasyon deneyleri sonrasında konfokal mikroskopta mCherry ile uyumlu olduğu değerlendirilen sinyal gözlenememesinin optik uyarı ile sakrifiye edilmesi arasında geçen süre içinde dimerlerin birbirinden ayrılmasına bağlı olabileceği düşünülerek en son optik uyarı ile sakrifiye edilmesi arasındaki sürenin kısaltılmasına, sıçanların en son optik uyarıdan sonra dakikalar içinde sakrifiye edilmesine karar verildi. Bu amaçla, son optik uyarının bitiminden 1-2 dakika önce sıçanlara kloralhidrat (%10 derişimdeki çözeltiden 1 ml IP) enjekte edildi. Anestezi gerçekleşir gerçekleşmez perfüzyon işlemine geçildi. Bu şekilde sıçanlara son optik uyarıdan ortalama 3-6

dakika sonra heparinle, ortalama 10 dakika sonra da paraformaldehitle perfüzyona başlandı.

İkinci optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen hipokampal kesitlerde hem mCherry hem de NF- κB işaretlemesi pozitif olarak değerlendirildiğinden;

- Plazmidin hipokampustaki hedef bölgesine başarıyla enjekte edildiği, $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI yapılarının üretildiği ve hücre zarına çıktıkları,

- $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI reseptörlerinin optik uyarı ile dimerize olarak mCherry molekülünü tamamladıkları,

- NF-κB sinyal yolağının aktive edildiği değerlendirildi.

İkinci optimizasyon deneylerinde optik uyarı verilmeyen grupta da NF-κB sinyal yolağının aktive olmasının kanülün yerleştirilmesi ve plazmid enjeksiyonu aracılığı ile gerçekleşen mekanik travma nedeniyle ortaya çıkmış olabileceği düşünüldü ve üçüncü optimizasyon deneylerinde enjeksiyon sıklığının ve enjeksiyon hacminin azaltılmasına karar verildi.

Tez çalışması ile beyinden köken alan inflamasyonu modelleyen bir in *vivo* protokol geliştirildikten sonra nöro-inflamasyon ile depresyon ve anksiyete arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla planlanan protokolde, davranış deneylerinin optik uyarının bitiminden itibaren 5 gün boyunca yapılması tasarlanmıştı. Davranış deneyleri esnasında optik uyarı verilmeyeceğinden, son optik uyarıdan 5 gün sonra NF-κB aktivasyonunun devam edip etmediğini değerlendirmek için üçüncü optimizasyon deneylerine ikinci bir optik uyarı grubu eklendi. İki optik uyarı grubuna da toplam üç kere olmak üzere üç günde bir plazmid enjeksiyonu yapıldı. Birinci optik uyarı grubundaki sıçanlar ilki ilk plazmid enjeksiyonundan 14 saat sonra ve sonuncusu son plazmid enjeksiyonundan 132 saat sonra olmak üzere toplam 12 kere optik uyarı aldı ve son optik uyarıdan hemen sonra sakrifiye edildi. İkinci optik uyarı grubundaki sıçanlar ilki ilk plazmid enjeksiyonundan 14 saat sonra ve sonuncusu son plazmid enjeksiyonundan 14 saat sonra olmak üzere toplam 7 kere optik uyarı aldı ve son optik uyarıdan 5 gün sonra sakrifiye edildi.

Üçüncü optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen hipokampal kesitlerin konfokal mikroskobisi sonucunda;

- Plazmid enjeksiyonunun sıklığı azaltıldığında mCherry ve NF-κB sinyallerinin devam ettiği,

- Plazmid enjeksiyonu veya optik uyarının bitiminden sonra 5 gün beklenen sıçanlarda da mCherry ve NF-κB sinyalinin devam ettiği,

- İkinci optimizasyon deney sonuçlarına benzer şekilde, optik uyarı olmadan sadece plazmid enjeksiyonu yapılan yalancı uygulama grubunda da mCherry ve NF-κB sinyallerinin bulunduğu değerlendirildi.

Literatürde bildirilen $CRY2_{PHR}$/CIB1 kriptokrom reseptörlerinin, düşük oranda da olsa, optik uyarı olmadan kendiliğinden dimerize olabildiği bilgisinden yola çıkılarak; $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI yapılarını içeren plazmidlerin enjeksiyonunun, optik uyarı olmadan NF-κB sinyal yolağını aktive etmiş olabileceği olasılığı üzerinde duruldu (115). Bunu test etmek amacıyla dördüncü optimizasyon deneylerinde DAI yapılarını içermeyen $CRY2_{PHR}$/CIB1 reseptörlerini barındıran kontrol plazmidleri kullanılmasına karar verildi.

Plazmid enjeksiyonunun, $CRY2_{PHR}$/CIB1 kriptokrom reseptörlerin aktivitesinden bağımsız olarak, yabancı bir antijenin doku içine enjekte edilmesi sebebiyle inflamasyonu beklenenden fazla tetikleyebileceği hipotezi ortaya atıldı. Bu nedenle Esser-Kahn grubunun önerisiyle plazmid hacmini düşürmek için bir sonraki optimizasyon deneylerinde, plazmid yapıları içerisinde bakteriyel promoter (pUC57) yerine memeli promoteri (pcDNA3.1) kullanılmasına karar verildi. Bu değişiklik sayesinde sıçan beyinlerindeki hücrelerde $CRY2_{PHR}$/CIB1 kriptokrom reseptörlerinin ekspresyonunun artabileceği ve daha düşük hacimde plazmid enjeksiyonu ile benzer etki sağlanabileceği düşünüldü.

Bu sebeplerle dördüncü optimizasyon deneylerinde optik uyarı grubuna memeli promoteri (pcDNA3.1) içeren $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI yapısını içeren plazmidi 72 saat aralıklarla toplam 3 kere enjekte edildi. Yalancı uygulama grubuna

ise memeli promoteri (pcDNA3.1) $CRY2_{PHR}$/CIB1 yapısını içeren ancak içeren ve DAI yapısını içermeyen kontrol plazmidleri 72 saat aralıklarla toplam 3 kere enjekte edildi. İki gruba da ilki ilk plazmid enjeksiyonundan 12 saat sonra ve sonuncusu son plazmid enjeksiyonundan 36 saat olacak şekilde, 24 saat aralıklarla sekiz kere birer saatlik optik uyarı gerçekleştirildi.

Tez çalışması ile beyinden köken alan inflamasyonu modelleyen bir in *vivo* protokol geliştirildikten sonra nöro-inflamasyon ile depresyon ve anksiyete arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla planlanan protokolde, davranış deneyleri boyunca optik uyarı verilmemesine karar verildiği için, optik uyarının etkisinin bu süre içinde devam edip etmediğini teyit etme amacıyla optik uyarı grubundaki sıçanlar son optik uyarıdan 5 gün ve son plazmid enjeksiyonundan 6 gün sonra sakrifiye edildi. Yalancı uygulama grubuna da aynı sayıda optik uyarı verildi. Ancak yalancı uygulama grubunda optik uyarı ile NF-κB yolağı uyarılmayacağı için optik uyarı grubuna göre daha düşük düzeyde inflamasyon oluşacağı öngörüsü ile sakrifikasyon ne kadar erken yapılırsa oluşabilecek minimal inflamasyonun gözlemlenme şansının o kadar yüksek olacağı değerlendirildi. Bundan hareketle kontrol plazmidlerin yapabileceği en yüksek inflamatuvar etkinin tespit edilebilmesi için son optik uyarıdan 1 saat sonra sakrifiye edildi.

Dördüncü optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen hipokampal kesitlerin NF-κB işaretlemelerinde, beklenenin aksine DAI içermeyen $CRY2_{PHR}$/ CIB1 kontrol plazmid enjeksiyonu ile gerçekleştirilen yalancı uygulama grubunda NF-κB sinyalinin daha fazla olduğu gözlendi. Daha önceki optimizasyon deneylerinde tartışıldığı gibi, bu sonucun kanül ve enjeksiyona bağlı mekanik travmaya bağlı olabileceği düşünüldü ve beşinci optimizasyon deneylerine dördüncü optimizasyon deneylerindeki gruplara ek olarak plazmid olmaksızın sadece transfeksiyon ajanı (*in vivo*-jetPEI®) enjekte edilen kontrol grubu eklendi. Bu gruptan elde edilen hipokampal kesitler 552 nm dalga boyunda lazer ile uyarılarak konfokal mikroskopta görüntülendiğinde beklenmedik biçimde daha önceki optimizasyon deneylerinde mCherry ile uyumlu olduğu değerlendirilen sinyallere rastlandı ve bu sinyallerin optik uyarı grubu ve yalancı uygulama grubun göre önemli

bir farklılık göstermediği değerlendirildi. Bunun üzerine, gözlenen sinyallerin mCherry olup olmadığını değerlendirmek için uyarılma ve ışıma taraması gerçekleştirildi. Optik uyarı grubunun ve sadece in *vivo*-jetPEI® enjeksiyonu yapılan kontrol grubunun 552 nm dalga boylarındaki uyarılarla ışıma spektrum grafikleri arasında fark olmadığı ve iki grafiğin de mCherry'nin ışıma spekturumu ile uyumlu olmadığı değerlendirildi. Optik uyarı ve kontrol grubunun 552 nm dalga boylarındaki uyarılarla ışıma spektrum grafiklerinde elde edilen sonuçların plazmid enjeksiyonun yol açtığı travmaya yanıt olarak ya o bölgeye göç eden mikroglia/makrofajlara, ya da tetiklenen apoptoza bağlı olarak yoğun otofloresans sinyali olabileceği değerlendirildi. Bu kadar yaygın bir sinyal içinde plazmide bağlı mCherry'nin seçilmesinin mümkün olmadığı değerlendirildi.

Başlangıçta plazmid enjekte edilen ve optik uyarım yapılan grupta yoğun NF-κB ve IL-6 işaretlemesi görülmesi modelin yordama geçerliliği olduğu biçiminde yorumlanmıştı. Ancak beşinci optimizasyon deneyinde sadece in vivo-jetPEI® enjeksiyonu yapılan kontrol grubunda da benzer sinyal gözlenmesi ve konfokal mikroskopta 552 nm dalga boyu lazer ile uyarılarak gözlenen sinyalin, uyarılma ve ışıma taramasında mCherry'e uymaması nedenleriyle tekrarlayan plazmid enjeksiyonlarının beyinde *de novo* inflamasyonu modellemek için uygun bir yöntem olmadığı sonucuna varıldı.

Sonuç olarak bu tez araştırmasında tekrarlayan plazmid enjeksiyonlarının *in vivo* inflamasyonu modellemek için uygun bir model olmadığı gösterilmiştir. İleride yapılacak çalışmalarda tekrarlayan hipokampal plazmid enjeksiyonları ve optik uyarılar sonrasında enjeksiyon yapılan bölgede görülen sinyalin ortaya çıkmasını engellemek için gelecekteki deneylerde genetik materyalin viral vektör ile sıçan beyinlerine aktarılması planlanmaktadır. $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom sistemini üreten Esser-Kahn ve ekibinin de dahil olduğu grup tartışmalarında, viral vektörle aktarılmasının kalıcı ifade sağlayabileceği ve bu sebeple tekrarlayan enjeksiyonlara gerek kalmayacağı, kanülünün yerleştirilmesi ve virüs enjeksiyonu için gerekli cerrahiden sonra dokunun iyileşmesi için 4-6 hafta beklenebileceği ve sonrasında optik uyarıya başlanabileceği için uygulanan işlemlere bağlı travmanın yol açtığı inflamasyonun en düşük düzeye indirilebileceği değerlendirilmiş ve bu konudaki çalışmalar başlatılmıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Fizyolojik koşullarda stresle tetiklenen inflamatuvar yanıta benzer şekilde beyinden köken alan inflamasyonu tetikleyen *in vivo* model geliştirilmesi amacıyla $CRY2_{PHR}$-DAI/CIB1-DAI kriptokrom reseptörleri tekrarlayan intrahipokampal plazmid enjeksiyonları aracılığı ile aktarıldı ve sonrasında tekrarlayan optik uyarılar gerçekleştirildi.

Tekrarlayan hipokampal plazmid enjeksiyonları ve optik uyarılar sonrasında enjeksiyon yapılan bölgede hedeflenen moleküller haricinde yoğun bir sinyal gözlenmiştir. Gözlenen yoğun sinyal, $CRY2_{PHR}$ ve CIB1 dimerizasyonu sonucu yapısı tamamlanan mCherry florofor proteinin konfokal mikroskopta saptanmasını engellemiş ve bu sebeple kriptokrom reseptörlerini kodlayan genlerin hipokampusta hücrelere aktarılarak üretildiği ve optik uyarı ile dimerize oldukları teyit edilememiştir.

Kalıcı ifade sağlayarak tekrarlayan enjeksiyon ihtiyacını ortadan kaldırabileceği, kanülünün yerleştirilmesi ve intrahipokampal enjeksiyondan 4-6 hafta beklenip sonrasında optik uyarıya başlanabileceği için uygulanan girişimsel işlemlere bağlı travmanın yol açtığı inflamasyonu en düşük düzeye indirebileceği düşünceleri ile gelecek deneylerde genetik materyalin viral vektörle aktarılması önerilir.

7. KAYNAKLAR

1. Albert PR, Benkelfat C, Descarries L. The neurobiology of depression--revisiting the serotonin hypothesis. I. Cellular and molecular mechanisms. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2012;367(1601):2378-81.

2. Brigitta B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. Dialogues Clin Neurosci. 2002;4(1):7-20.

3. Lopez-Munoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. Curr Pharm Des. 2009;15(14):1563-86.

4. Jesulola E, Micalos P, Baguley IJ. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? Behav Brain Res. 2018;341:79-90.

5. Fava M, Davidson KG. Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. Psychiatr Clin North Am. 1996;19(2):179-200.

6. Lee BH, Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. Psychiatry Investig. 2010;7(4):231-5.

7. Mayberg HS. Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 1997;9(3):471-81.

8. Heller AS. Cortical-Subcortical Interactions in Depression: From Animal Models to Human Psychopathology. Front Syst Neurosci. 2016;10:20.

9. Afridi R, Suk K. Neuroinflammatory Basis of Depression: Learning From Experimental Models. Front Cell Neurosci. 2021;15:691067.

10. Iwata M, Ota KT, Li XY, Sakaue F, Li N, Dutheil S, et al. Psychological Stress Activates the Inflammasome via Release of Adenosine Triphosphate and Stimulation of the Purinergic Type 2X7 Receptor. Biol Psychiatry. 2016;80(1):12-22.

11. Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW. Fundamentals of inflammation. Cambridge ; New York: Cambridge University Press; 2010. xiv, 473 p. p.

12. Parham P, Janeway C. The immune system. Fourth edition. ed. New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2015. 1 volume (various pagings) p.

13. Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 13th edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. xix, 1145 pages p.

14. Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, Cominelli F, Donath MY, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. A guiding map for inflammation. Nat Immunol. 2017;18(8):826-31.

15. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. Nat Med. 2015;21(7):677-87.

16. Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. Annu Rev Pathol. 2020;15:493-518.

17. Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS. Nat Rev Neurosci. 2014;15(2):84-97.

18. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(3).

19. Waisman A, Liblau RS, Becher B. Innate and adaptive immune responses in the CNS. Lancet Neurol. 2015;14(9):945-55.

20. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. Nat Rev Immunol. 2017;17(1):49-59.

21. Cattaneo A, Macchi F, Plazzotta G, Veronica B, Bocchio-Chiavetto L, Riva MA, et al. Inflammation and neuronal plasticity: a link between childhood trauma and depression pathogenesis. Front Cell Neurosci. 2015;9:40.

22. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. J Neurochem. 2016;139 Suppl 2(Suppl 2):136-53.

23. Garay PA, McAllister AK. Novel roles for immune molecules in neural development: implications for neurodevelopmental disorders. Front Synaptic Neurosci. 2010;2:136.

24. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci. 2008;9(1):46-56.

25. Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. Nat Rev Immunol. 2016;16(1):22-34.

26. Banks WA. The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology. Immunol Allergy Clin North Am. 2009;29(2):223-8.

27. Siegel GJ. Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. xxi, 1183 p.

28. Benarroch EE. Circumventricular organs: receptive and homeostatic functions and clinical implications. Neurology. 2011;77(12):1198-204.

29. Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, Jacque C. Cytokine signals propagate through the brain. Mol Psychiatry. 2000;5(6):604-15.

30. Konsman JP, Vigues S, Mackerlova L, Bristow A, Blomqvist A. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. J Comp Neurol. 2004;472(1):113-29.

31. Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. Front Neurosci. 2014;8:315.

32. Jeon SW, Kim YK. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? World J Psychiatry. 2016;6(3):283-93.

33. Schneider H, Pitossi F, Balschun D, Wagner A, del Rey A, Besedovsky HO. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(13):7778-83.

34. Liu M, Li J, Dai P, Zhao F, Zheng G, Jing J, et al. Microglia activation regulates GluR1 phosphorylation in chronic unpredictable stress-induced cognitive dysfunction. Stress. 2015;18(1):96-106.

35. Ahn KS, Aggarwal BB. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. Ann N Y Acad Sci. 2005;1056:218-33.

36. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009;1(6):a001651.

37. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5(5):392-401.

38. Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. Front Mol Neurosci. 2015;8:77.

39. Giuliani C, Bucci I, Napolitano G. The Role of the Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B in Thyroid Autoimmunity and Cancer. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:471.

40. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. Annu Rev Immunol. 2009;27:693-733.

41. Akira S, Takeda K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. C R Biol. 2004;327(6):581-9.

42. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. Trends Immunol. 2007;28(3):138-45.

43. Yakovleva T, Bazov I, Watanabe H, Hauser KF, Bakalkin G. Transcriptional control of maladaptive and protective responses in alcoholics: a role of the NF-kappaB system. Brain Behav Immun. 2011;25 Suppl 1:S29-38.

44. Mattson MP. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. Neurochem Res. 2005;30(6-7):883-93.

45. Sarnico I, Lanzillotta A, Benarese M, Alghisi M, Baiguera C, Battistin L, et al. NF-kappaB dimers in the regulation of neuronal survival. Int Rev Neurobiol. 2009;85:351-62.

46. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009;1(3):a001271.

47. Bakalkin G, Yakovleva T, Terenius L. NF-kappa B-like factors in the murine brain. Developmentally-regulated and tissue-specific expression. Brain Res Mol Brain Res. 1993;20(1-2):137-46.

48. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(21):9618-22.

49. Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. Nat Neurosci. 2003;6(10):1072-8.

50. O'Riordan KJ, Huang IC, Pizzi M, Spano P, Boroni F, Egli R, et al. Regulation of nuclear factor kappaB in the hippocampus by group I metabotropic glutamate receptors. J Neurosci. 2006;26(18):4870-9.

51. Schultz C, Konig HG, Del Turco D, Politi C, Eckert GP, Ghebremedhin E, et al. Coincident enrichment of phosphorylated IkappaBalpha, activated IKK, and phosphorylated p65 in the axon initial segment of neurons. Mol Cell Neurosci. 2006;33(1):68-80.

52. Ahn HJ, Hernandez CM, Levenson JM, Lubin FD, Liou HC, Sweatt JD. c-Rel, an NF-kappaB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation. Learn Mem. 2008;15(7):539-49.

53. Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(6):2669-74.

54. Gutierrez H, Davies AM. Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-κB. Trends Neurosci. 2011;34(6):316-25.

55. Caviedes A, Lafourcade C, Soto C, Wyneken U. BDNF/NF-kappaB Signaling in the Neurobiology of Depression. Curr Pharm Des. 2017;23(21):3154-63.

56. Garate I, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Caso JR, Alou L, Gomez-Lus ML, et al. Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. Biol Psychiatry. 2013;73(1):32-43.

57. Cui J, Yang K, Yu X, Wang JL, Li J, Zhang Y, et al. Chronic Fluoxetine Treatment Upregulates the Activity of the ERK1/2-NF-κB Signaling Pathway in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of Rats Exposed to Forced-Swimming Stress. Med Princ Pract. 2016;25(6):539-47.

58. Su WJ, Zhang Y, Chen Y, Gong H, Lian YJ, Peng W, et al. NLRP3 gene knockout blocks NF-kappaB and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model. Behav Brain Res. 2017;322(Pt A):1-8.

59. Xu X, Piao HN, Aosai F, Zeng XY, Cheng JH, Cui YX, et al. Arctigenin protects against depression by inhibiting microglial activation and

neuroinflammation via HMGB1/TLR4/NF-kappaB and TNF-alpha/TNFR1/NF-kappaB pathways. Br J Pharmacol. 2020;177(22):5224-45.

60. Cao P, Chen C, Liu A, Shan Q, Zhu X, Jia C, et al. Early-life inflammation promotes depressive symptoms in adolescence via microglial engulfment of dendritic spines. Neuron. 2021;109(16):2573-89 e9.

61. Inta I, Paxian S, Maegele I, Zhang W, Pizzi M, Spano P, et al. Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF-kappa B subunit RelA in cerebral ischemia. J Neurosci. 2006;26(50):12896-903.

62. Sarnico I, Lanzillotta A, Boroni F, Benarese M, Alghisi M, Schwaninger M, et al. NF-kappaB p50/RelA and c-Rel-containing dimers: opposite regulators of neuron vulnerability to ischaemia. J Neurochem. 2009;108(2):475-85.

63. Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, et al. NF-kappaB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. J Clin Invest. 2012;122(7):2601-12.

64. Pizzi M, Sarnico I, Lanzillotta A, Battistin L, Spano P. Post-ischemic brain damage: NF-kappaB dimer heterogeneity as a molecular determinant of neuron vulnerability. FEBS J. 2009;276(1):27-35.

65. Kaya Z. Kortikal Yayılan Depresyonun Tetiklediği Nöroinflamasyonun Çözülmesi ve Bunun Migren Baş Ağrısı Patofizyolojisindeki Yeri. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2019.

66. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 2017;2.

67. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci. 2005;8(6):752-8.

68. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science. 2005;308(5726):1314-8.

69. Mizuno T. Neuron–microglia interactions in neuroinflammation. Clinical and Experimental Neuroimmunology. 2015;6.

70. Liu LR, Liu JC, Bao JS, Bai QQ, Wang GQ. Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit. Front Immunol. 2020;11:1024.

71. John GR, Lee SC, Brosnan CF. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. Neuroscientist. 2003;9(1):10-22.

72. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. Transl Neurodegener. 2020;9(1):42.

73. Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. Glia. 2016;64(2):300-16.

74. Dissing-Olesen L, LeDue JM, Rungta RL, Hefendehl JK, Choi HB, MacVicar BA. Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. J Neurosci. 2014;34(32):10511-27.

75. Czapski GA, Strosznajder JB. Glutamate and GABA in Microglia-Neuron Cross-Talk in Alzheimer's Disease. Int J Mol Sci. 2021;22(21).

76. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. Constitutive NF-kappa B activity in neurons. Mol Cell Biol. 1994;14(6):3981-92.

77. Lilienbaum A, Israël A. From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. Mol Cell Biol. 2003;23(8):2680-98.

78. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. Mech Dev. 1993;43(2-3):135-47.

79. Ikeda H, Tsuda M, Inoue K, Murase K. Long-term potentiation of neuronal excitation by neuron-glia interactions in the rat spinal dorsal horn. Eur J Neurosci. 2007;25(5):1297-306.

80. Chu YX, Zhang Y, Zhang YQ, Zhao ZQ. Involvement of microglial P2X7 receptors and downstream signaling pathways in long-term potentiation of spinal nociceptive responses. Brain Behav Immun. 2010;24(7):1176-89.

81. Norden DM, Godbout JP. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013;39(1):19-34.

82. Lipozencic M. [CHRONIC INFLAMMATIONS OF THE PARANASAL SINUSES AND MENTAL DISTURBANCES. (PRELIMINARY REPORT)]. Pract Otorhinolaryngol (Basel). 1964;26:334-44.

83. Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. Psychosom Med. 2009;71(2):171-86.

84. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. Biol Psychiatry. 2010;67(5):446-57.

85. O'Brien SM, Scully P, Fitzgerald P, Scott LV, Dinan TG. Plasma cytokine profiles in depressed patients who fail to respond to selective serotonin reuptake inhibitor therapy. J Psychiatr Res. 2007;41(3-4):326-31.

86. Kenis G, Maes M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. Int J Neuropsychopharmacol. 2002;5(4):401-12.

87. Cai W, Khaoustov VI, Xie Q, Pan T, Le W, Yoffe B. Interferon-alpha-induced modulation of glucocorticoid and serotonin receptors as a mechanism of depression. J Hepatol. 2005;42(6):880-7.

88. Müller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Cerovecki A, Goldstein-Müller B, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. Mol Psychiatry. 2006;11(7):680-4.

89. Du RH, Tan J, Sun XY, Lu M, Ding JH, Hu G. Fluoxetine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation: Implication in Depression. Int J Neuropsychopharmacol. 2016;19(9).

90. Iwata M, Ota KT, Duman RS. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. Brain Behav Immun. 2013;31:105-14.

91. Haapakoski R, Ebmeier KP, Alenius H, Kivimaki M. Innate and adaptive immunity in the development of depression: An update on current knowledge and technological advances. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2016;66:63-72.

92. Troubat R, Barone P, Leman S, Desmidt T, Cressant A, Atanasova B, et al. Neuroinflammation and depression: A review. Eur J Neurosci. 2021;53(1):151-71.

93. Park SE, Lawson M, Dantzer R, Kelley KW, McCusker RH. Insulin-like growth factor-I peptides act centrally to decrease depression-like behavior of mice treated intraperitoneally with lipopolysaccharide. J Neuroinflammation. 2011;8:179.

94. Walker AK, Budac DP, Bisulco S, Lee AW, Smith RA, Beenders B, et al. NMDA receptor blockade by ketamine abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in C57BL/6J mice. Neuropsychopharmacology. 2013;38(9):1609-16.

95. Huang X, Fei GQ, Liu WJ, Ding J, Wang Y, Wang H, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells protect against CMS-induced depression-like behaviors in mice via regulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF-kappaB signaling pathways. Acta Pharmacol Sin. 2020;41(5):612-9.

96. Li Y, Song W, Tong Y, Zhang X, Zhao J, Gao X, et al. Isoliquiritin ameliorates depression by suppressing NLRP3-mediated pyroptosis via miRNA-27a/SYK/NF-kappaB axis. J Neuroinflammation. 2021;18(1):1.

97. Gold PW. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. Mol Psychiatry. 2015;20(1):32-47.

98. Pan Y, Chen XY, Zhang QY, Kong LD. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1beta-related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. Brain Behav Immun. 2014;41:90-100.

99. Li MX, Zheng HL, Luo Y, He JG, Wang W, Han J, et al. Gene deficiency and pharmacological inhibition of caspase-1 confers resilience to chronic social defeat stress via regulating the stability of surface AMPARs. Mol Psychiatry. 2018;23(3):556-68.

100. Felger JC, Li Z, Haroon E, Woolwine BJ, Jung MY, Hu X, et al. Inflammation is associated with decreased functional connectivity within corticostriatal reward circuitry in depression. Mol Psychiatry. 2016;21(10):1358-65.

101. Velasquez S, Rappaport J. Inflammasome Activation in Major Depressive Disorder: A Pivotal Linkage Between Psychological Stress, Purinergic Signaling, and the Kynurenine Pathway. Biol Psychiatry. 2016;80(1):4-5.

102. Liu YN, Peng YL, Liu L, Wu TY, Zhang Y, Lian YJ, et al. TNFα mediates stress-induced depression by upregulating indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. Eur Cytokine Netw. 2015;26(1):15-25.

103. Alcocer-Gomez E, Ulecia-Moron C, Marin-Aguilar F, Rybkina T, Casas-Barquero N, Ruiz-Cabello J, et al. Stress-Induced Depressive Behaviors Require a Functional NLRP3 Inflammasome. Mol Neurobiol. 2016;53(7):4874-82.

104. Redchuk TA, Karasev MM, Verkhusha PV, Donnelly SK, Hülsemann M, Virtanen J, et al. Optogenetic regulation of endogenous proteins. Nat Commun. 2020;11(1):605.

105. Mahmoudi P, Veladi H, Pakdel FG. Optogenetics, Tools and Applications in Neurobiology. J Med Signals Sens. 2017;7(2):71-9.

106. Rost BR, Schneider-Warme F, Schmitz D, Hegemann P. Optogenetic Tools for Subcellular Applications in Neuroscience. Neuron. 2017;96(3):572-603.

107. Lonser RR, Akhter AS, Zabek M, Elder JB, Bankiewicz KS. Direct convective delivery of adeno-associated virus gene therapy for treatment of neurological disorders. J Neurosurg. 2020;134(6):1751-63.

108. Merienne N, Le Douce J, Faivre E, Deglon N, Bonvento G. Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors. Front Cell Neurosci. 2013;7:106.

109. Aschauer DF, Kreuz S, Rumpel S. Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. PLoS One. 2013;8(9):e76310.

110. Shirai F, Hayashi-Takagi A. Optogenetics: Applications in psychiatric research. Psychiatry Clin Neurosci. 2017;71(6):363-72.

111. Hallett RA, Zimmerman SP, Yumerefendi H, Bear JE, Kuhlman B. Correlating in Vitro and in Vivo Activities of Light-Inducible Dimers: A Cellular Optogenetics Guide. ACS Synth Biol. 2016;5(1):53-64.

112. Che DL, Duan L, Zhang K, Cui B. The Dual Characteristics of Light-Induced Cryptochrome 2, Homo-oligomerization and Heterodimerization, for Optogenetic Manipulation in Mammalian Cells. ACS Synth Biol. 2015;4(10):1124-35.

113. Pathak GP, Strickland D, Vrana JD, Tucker CL. Benchmarking of optical dimerizer systems. ACS Synth Biol. 2014;3(11):832-8.

114. Pathak GP, Spiltoir JI, Höglund C, Polstein LR, Heine-Koskinen S, Gersbach CA, et al. Bidirectional approaches for optogenetic regulation of gene expression in mammalian cells using Arabidopsis cryptochrome 2. Nucleic Acids Res. 2017;45(20):e167.

115. Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, Schwartz JW, Ehlers MD, Tucker CL. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. Nat Methods. 2010;7(12):973-5.

116. Sato K, Watanabe R, Hanaoka H, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. Comparative effectiveness of light emitting diodes (LEDs) and Lasers in near infrared photoimmunotherapy. Oncotarget. 2016;7(12):14324-35.

117. Muhlhauser WW, Horner M, Weber W, Radziwill G. Light-Regulated Protein Kinases Based on the CRY2-CIB1 System. Methods Mol Biol. 2017;1596:257-70.

118. Ha SC, Kim D, Hwang HY, Rich A, Kim YG, Kim KK. The crystal structure of the second Z-DNA binding domain of human DAI (ZBP1) in complex with Z-DNA reveals an unusual binding mode to Z-DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(52):20671-6.

119. Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, et al. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(14):5477-82.

120. Furr SR, Marriott I. Viral CNS infections: role of glial pattern recognition receptors in neuroinflammation. Front Microbiol. 2012;3:201.

121. Kaiser WJ, Upton JW, Mocarski ES. Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. J Immunol. 2008;181(9):6427-34.

122. Rebsamen M, Heinz LX, Meylan E, Michallet MC, Schroder K, Hofmann K, et al. DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. EMBO Rep. 2009;10(8):916-22.

123. Hayashi T, Nishitsuji H, Takamori A, Hasegawa A, Masuda T, Kannagi M. DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors enhances the transcription of HIV-1 through NF-κB. Microbes Infect. 2010;12(12-13):937-47.

124. Moser BA, Esser-Kahn AP. A Photoactivatable Innate Immune Receptor for Optogenetic Inflammation. ACS Chem Biol. 2017;12(2):347-50.

125. Tsuda M, Imaoka T. Chapter 14 - Direct injection of plasmid DNA into the brain. In: Latchman DS, editor. Genetic Manipulation of the Nervous System. London: Academic Press; 1995. p. 235-48.

126. Shi L, Tang GP, Gao SJ, Ma YX, Liu BH, Li Y, et al. Repeated intrathecal administration of plasmid DNA complexed with polyethylene glycol-grafted polyethylenimine led to prolonged transgene expression in the spinal cord. Gene Ther. 2003;10(14):1179-88.

127. Paxinos G, Watson C. Paxino's and Watson's The rat brain in stereotaxic coordinates. Seventh edition. ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier; 2014. 1 volume (unpaged) p.

128. Batassa EM, Costanzi M, Saraulli D, Scardigli R, Barbato C, Cogoni C, et al. RISC activity in hippocampus is essential for contextual memory. Neurosci Lett. 2010;471(3):185-8.

129. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. Nat Biotechnol. 2004;22(12):1567-72.

130. SP5X USER INTERFACE: Λ2-MAPPING GUIDELINE: Leice Microsystems; [Available from: https://downloads.leica-microsystems.com/Leica%20TCS%20SP5%20X/User%20Manuals/SP5X_lambda_lambda_guideline.pdf.

131. Borlinghaus R. The white confocal. The European Physical Journal Plus. 2012;127.

132. Lambert TJ. FPbase: a community-editable fluorescent protein database. Nat Methods. 2019;16(4):277-8.

133. Confocal Application Notes, Lambda Scan: Leica Microsystems; 2006 [4: [Available from: https://btiscience.org/wp-content/uploads/2014/04/app_note_Lambda_Scan_SP5.pdf.

134. Ingusci S, Verlengia G, Soukupova M, Zucchini S, Simonato M. Gene Therapy Tools for Brain Diseases. Front Pharmacol. 2019;10:724.

135. Hökelekli F, Yılmaz M, Basar K, Ayhan Y, Dalkara T, Eren Koçak E. Role of a Natural Antisense Transcript, FGF2-AS, in Affective Behavior. Biological Psychiatry. 2017;81:S57-S8.

136. Uzay B, Hokelekli F, Yilmaz M, Esen E, Basar K, Bahadır Varol A, et al. NUDT6, the Antisense Protein of FGF2 Gene, Plays a Depressogenic Role by Promoting Inflammation and Suppressing Neurogenesis without Altering FGF2 Signaling2022.

137. Zhang M, Lin X, Zhang J, Su L, Ma M, Ea VL, et al. Blue light-triggered optogenetic system for treating uveal melanoma. Oncogene. 2020;39(10):2118-24.

138. Benedetti L, Barentine AES, Messa M, Wheeler H, Bewersdorf J, De Camilli P. Light-activated protein interaction with high spatial subcellular confinement. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(10):E2238-E45.

139. Yamada M, Suzuki Y, Nagasaki SC, Okuno H, Imayoshi I. Light Control of the Tet Gene Expression System in Mammalian Cells. Cell Rep. 2018;25(2):487-500.e6.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurullar

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-60

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	:	29.05.2018 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	:	2018/05
DOSYA KAYIT NUMARASI	:	2018/25
KARAR NUMARASI	:	2018/25 – 08
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	:	Doç. Dr. Emine Eren KOÇAK
HAYVAN DENEYLERİNDE GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	:	Dr. Emre Cem ESEN, Aslıhan Bahadır VAROL, Uzm. Dr. Gül Yalçın ÇAKMAKLI, Doç. Dr. Emine Eren KOÇAK
DİĞER YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	:	Prof. Dr. Turgay DALKARA, Prof. Dr. Bülent ELİBOL, Doç. Dr. Hülya Karataş KURŞUN, Prof. Dr. Müge Yemişçi ÖZKAN, Dr. Buket Dönmez DEMİR
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	:	***180 Adet Spraque Dawley Rat (200-250 gr.)***

Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Emine Eren KOÇAK'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2018/25 kayıt numaralı ***"Optogenetik Tekniği İle Oluşturulan Santral Sinir Sistemi İnflamasyonunun Depresyon İle İlişkisinin İncelenmesi"*** isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü Kurulumuza araştırma projesinin bitiş tarihini bildirmek ve proje sonuç raporunu sunmak ile yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php
Ayrıntılı Bilgi için:

EK-2: Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

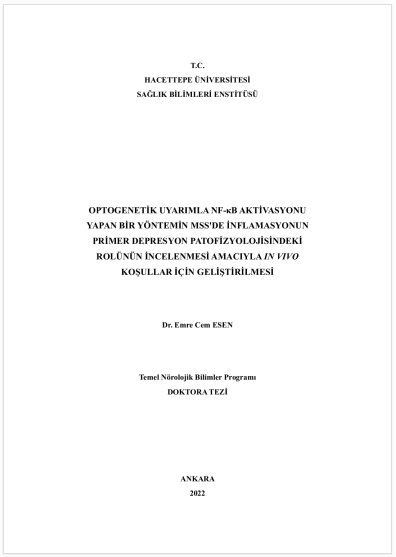
turnitin

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Emre Cem Esen
Ödev başlığı:	Optogenetik Uyarımla NF-κB Aktivasyonu Yapan Bir Yöntemi...
Gönderi Başlığı:	Optogenetik Uyarımla NF-κB Aktivasyonu Yapan Bir Yöntemi...
Dosya adı:	ROL_N_N_NCELENMES_AMACIYLA_IN_VIVO_KO_ULLAR_N_GEL...
Dosya boyutu:	26.32M
Sayfa sayısı:	69
Kelime sayısı:	12,257
Karakter sayısı:	83,341
Gönderim Tarihi:	11-Oca-2023 08:35ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1991322929



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OPTOGENETİK UYARIMLA NF-κB AKTİVASYONU YAPAN BİR YÖNTEMİN MSS'DE İNFLAMASYONUN PRİMER DEPRESYON PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ AMACIYLA *IN VIVO* KOŞULLAR İÇİN GELİŞTİRİLMESİ

Dr. Emre Cem ESEN

Temel Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2022

Copyright 2023 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

Optogenetik Uyarımla NF-κB Aktivasyonu Yapan Bir Yöntemin MSS'de İnflamasyonun Primer Depresyon Patofizyolojisindeki Rolünün İncelenmesi Amacıyla In Vivo Koşullar İçin Geliştirilmesi

ORİJİNALLİK RAPORU

%3	%3	%1	%0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	speakerdeck.com İnternet Kaynağı	<%1
5	open.library.ubc.ca İnternet Kaynağı	<%1
6	dmsjournal.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	<%1
7	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.harmonic-lightwaves.com İnternet Kaynağı	<%1
9	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
10	tfd.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
11	www.jove.com İnternet Kaynağı	<%1

Alıntıları çıkart üzerinde
Bibliyografyayı Çıkart üzerinde
Eşleşmeleri çıkar < 5 words

9. ÖZGEÇMİŞ