

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOTOKSİNİN N9 FARE MİKROGLİAL
HÜCRE HATTINDA MİKRORNA EKSPRESYON
PROFİLİNE OLAN ETKİSİ**

SERPEN DURNAOĞLU

TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2012

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970146

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOTOKSİNİN N9 FARE MİKROGLİAL
HÜCRE HATTINDA MİKORNA EKSPRESYON
PROFİLİNE OLAN ETKİSİ**

TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

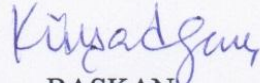
SERPEN DURNAOĞLU

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Kemal Kürşad GENÇ

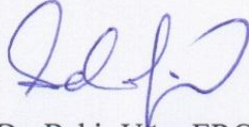
Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 109S421 proje numarasıyla desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970146

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Yüksek Lisans programı öğrencisi Serpen Durnaoğlu “**ENDOTOKSİNİN N9 FARE MİKROGLİAL HÜCRE HATTINDA MİKRORNA EKSPRESYON PROFİLİNE OLAN ETKİSİ** ” konulu Yüksek Lisans tezini 31/05/2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

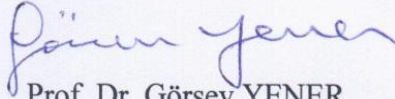

BAŞKAN

Prof. Dr. Kemal Kürşad GENÇ
Sinirbilimler Anabilim Dalı



Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
ÜYE

Doç. Dr. Pınar AKAN
Sinir Bilimler Anabilim Dalı
ÜYE



Prof. Dr. Görsev YENER
Sinir Bilimler Anabilim Dalı
ÜYE (Yedek)

Doç. Dr. İpek ERGÜR
Anatomi Anabilim Dalı
ÜYE (Yedek)

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Mikroglial Hücreler.....	4
2.1.1 Mikroglia Fonksiyonları.....	4
2.1.2 Mikroglial Aktivasyon.....	5
2.1.3 Sinir Sistemi Hastalıklarında Mikroglial Hücrelerin Rollerı.....	6
2.1.4. Mikroglia Çalışma Yöntemleri.....	7
2.2.MikroRNA.....	8
2.2.1.miRNA Biyogenezi	9
2.2.2. miRNA Deteksiyon Metodları.....	10
2.2.3. miRNA Hedef Gen Belirleme.....	12
2.2.4 Doğal Bağışıklık Sisteminde miRNA'ların Rolü.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Araştırmanın Tipi.....	14
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	14
3.3. Çalışma Materyali.....	14
3.4. Çalışmanın Değişkenleri.....	14
3.5. Veri Toplama Araçları.....	14

3.5.1. Hücre Kültürü.....	14
3.5.2. <i>In vitro</i> Deney.....	15
3.5.3. RNA İzolasyonu.....	16
3.5.4. Mikroarray Analizi.....	16
3.5.5. Kantitatif PCR Analizi.....	16
3.5.6. miRNA Hedef Genleri Analizi.....	17
3.5.7. Lusiferaz Testi.....	18
3.6. Araştırma Planı.....	20
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi.....	21
3.8. Araştırmanın sınırlılıkları.....	21
3.9. Etik Kurul Onayı.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. Mikroarray’de LPS ile Ekspresyonu Değişen miRNA’ların Belirlenmesi.....	22
4.2. qPCR Yöntemi ile LPS Uyarımıyla Ekspresyonu Değişen miRNA’ların Belirlenmesi.....	22
4.3.Ekspresyon Değişikliği Gözlenen miRNA’larda Hedef Analizi.....	24
4.4. Lusiferaz Testi ile Hedef Genlerin Validasyonu.....	24
5. TARTIŞMA.....	27
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	29
7. KAYNAKLAR.....	30
8. EKLER.....	39
EK-1 Etik Kurul Onayı.....	39

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: cDNA sentezi için gerekli bileşenler.....	17
Tablo 2: Transfeksiyon için hazırlanan gruplar.....	20
Tablo 3: Mikroarray sonucuna göre ekspresyon değişimi en çok olan 30 miRNA.....	22
Tablo 4: 10 ng/ml LPS dozunda miRNA ekspresyon değişimi.....	23
Tablo 5: 100 ng/ml LPS dozunda miRNA ekspresyon değişimi.....	23
Tablo 6: 1000 ng/ml LPS dozunda miRNA ekspresyon değişimi.....	23
Tablo 7: Hedef Genler.....	24

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Mikroglia çalışma yöntemleri	8
Şekil 2: miRNA biyogenezi.....	10
Şekil 3: miRNA genini içeren plazmit	18
Şekil 4: miRNA hedef geni içeren plazmit.....	18
Şekil 5: qPCR analizleri.....	24
Şekil 6: miR-191 hedef gen analizi.....	25
Şekil 7: miR-193 hedef gen analizi.....	25
Şekil 8: miR- 431 hedef gen analizi.....	25

KISALTMALAR

A β : Amiloid- β

Ago2: Argonaute-2

AH: Alzheimer hastalığı

ALS: Amyotrofik lateral skleroz

APC: Antijen sunucu hücreler (Antigen presenting cells)

cDNA: Komplementer DNA (Complementary DNA)

C/EBP β : CCAAT/enhancer-binding protein- β :

DGCR8: DiGeorge sendrom kritik bölge gen 8

DH: Dendritik hücre

Exp-5: Eksportin-5 (Exportin-5)

FBS: Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)

Gfi1: Growth factor independent 1

GFP: Yeşil floresan protein (Green fluorescent protein)

HSK: Hepatosellüler Karsinom

IL: İnterlökin

IRAK1: İnterlökin-1 Reseptörü İlişkili Kinaz 1 (IL-1R associated kinase 1)

JNK: c-Jun-N-Terminal Kinaz

LNA: Kilitli nükleik asit (Locked nucleic acid)

LPS: Lipopolisakkarit

M-CSF: Makrofaj koloni uyarıcı faktör-1

MCP-1: Monosit kemoatraktant protein-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)

MHC: Büyük doku uygunluk kompleksi (Major histocompatibility complex)

miRNA: MikroRNA

mRNA: Messenger RNA

MS: Multiple Skleroz

mSOD: Mutant süperoksit dismutaz

MSS: Merkezi sinir sistemi

NFI-A: Nükleer Faktör I/A

NF- κ B: Nükleer Faktör Kappa-B

NK: Doğal öldürücü hücreler (Natural killer cells)

PACT: PKR aktive edici protein

PBS: Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon (Phosphate buffered saline)

PH: Parkinson hastalığı

PVL: Periventriküler lökomalazi

pre-miRNA: Prekürsör miRNA

pri-miRNA: Primer-miRNA

PRR: Patern tanıma reseptörü (Pattern recognition receptor)

qPCR: Kantitatif PCR

RISC: RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RNA induced silencing complex)

ROS: Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species)

RPA: RNaz koruma testi (RNase protection assay)

SAGE: Gen ekspresyonunun seri analizi (Serial analysis of gene expression)

SN: Substantia nigra

TLR: Toll-like reseptör

TNF- α : Tümör nekrozis faktör α

TRBP: Transactivation-responsive RNA-binding protein

UTR: Translasyon olmayan bölge (Untranslated region)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yetişmemde emeği olan danışmanım Prof. Dr. Kemal Kürşad GENÇ'e,

Tüm çalışmalarında bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, sabır ve hoşgörü ile desteğini gördüğüm hocam Prof. Dr. Şermin GENÇ'e,

Transformasyon deneylerinde malzeme sıkıntısı çektiğimiz zaman bize laboratuvarını açan Doç. Dr. Ahmet KOÇ'a,

Lisans eğitiminden bu yana beraber okuduğum, laboratuvar çalışmalarında da yanımda olan ekip arkadaşım Kemal Uğur TÜFEKÇİ'ye,

Beni hiç yalnız bırakmayıp, manevi desteklerini esirgemeyen ekip arkadaşlarım Zeynep Filiz ZADEOĞLULARI ve Ufuk VURGUN'a,

Projeyi maddi yönden destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Serpen DURNAOĞLU

ENDOTOKSİNİN N9 FARE MİKROGLİAL HÜCRE HATTINDA MİKRORNA EKSPRESYON PROFİLİNE OLAN ETKİSİ

Serpen Durnaoglu, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinir Bilimler
Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Mikroglia, beyin makrofajı olarak tanınan glial hücre tipidir. İmmunofenotipik ve fonksiyonel olarak monosit ve makrofaj hücreleriyle benzerlik göstermektedir. Merkezi sinir sisteminde (MSS) mikroglia inflamatuvar süreçlerde önemli bir role sahiptir. Post-transkripsiyonel gen regülasyonunda büyük rol oynayan MikroRNA'lar (miRNA), küçük, kodlama yapmayan RNA'lardır. Bu çalışmada amacımız mikroglial aktivasyonda miRNA'ların rolünü araştırmaktır.

Çalışmanın ön aşamasında, N9 fare mikroglial hücreleri lipopolisakkaridin (LPS) 100 ng/ml LPS dozu kullanılarak aktive edildi. Mikrorray yöntemi kullanılarak miRNA ekspresyon değişimleri belirlendi. Bu yöntemle ekspresyon değişimi belirlenen miRNA'lardan miR-191, miR-193 ve miR-431'ün gen ekspresyonu kantitatif PCR (qPCR) yöntemiyle incelendi. Daha sonra bu miRNA'ların hedef genleri biyoinformatik yöntem aracılığıyla belirlendi. Belirlenen hedef genlerin validasyonu Lusiferaz testi ile yapıldı.

Mikroarray sonuçlarına göre ekspresyon değişimi en fazla olan 30 adet miRNA belirlendi. qPCR sonuçlarına göre miR-191, miR-193 ve miR-431'in ekspresyonun arttığı gösterildi. Biyoinformatik yöntemle belirlenen hedef genlerin (IL-6, IL-10 ve IRAK1) validasyonu yapıldı. Bu miRNA'lardan miR-191'in IL-6'yı, miR-193'ün IL-10'u ve miR-431'in IRAK1'i hedeflediği gösterildi.

Anahtar sözcükler: Mikroglial aktivasyon, Lipopolisakkarit, mikroRNA

THE EFFECT OF ENDOTOXIN ON MICRORNA EXPRESSION PROFILE IN N9 MOUSE MICROGLIAL CELL LINE

Serpen Durnaoglu, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience, 35340, İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Microglia is a type of glial cell that are known as macrophages of the brain. They are immunophenotypically and functionally similar to monocytes and macrophages. In the central nervous system (CNS), microglia plays an important role in the inflammatory process. MicroRNAs (miRNAs) which are small, non-coding RNAs have a crucial role in gene regulation at the post-transcriptional level. In this study we aimed to search the role of miRNA on microglial activation.

In the experiment, N9 cells were treated with 10-1000ng/ml doses of Lipopolysaccharide (LPS). In preliminary study, by using 100 ng/ml LPS, N9 mouse microglial cells were activated. By using microarray method, miRNA expression changes were determined. Among miRNAs which were determined by microarray, the gene expression of miR-191, miR-193 and miR-431 were examined by qPCR. Afterwards, target genes of those miRNAs were determined by bioinformatics analysis. The validation of target genes which were determined before was done by Luciferase assay.

According to qPCR data, its shown that the expression of miR-191,miR-193 and miR-431 increased. The validation of target genes (IL-6, IL-10 ve IRAK1) which were determined by bioinformatic method, were done. Of these miRNAs, it has shown that miR-191 targets IL-6, miR-193 targets IL-10 and miR-431 targets IRAK1.

Key Words: Microglial activation, Lipopolysaccharide, microRNA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikroglial hücreler merkezi sinir sisteminin immün hücreleridir. Fetal dönemde kemik iliğinden beyine göç ederek, hücre ölümü sonucu oluşan nöronal ve oligodendroglial hücre artıklarının fagosite edilmesi ve sindirilmesi sağlamaktadır. Yaşamının geri kalan evresinde enfeksiyon ve hastalık durumları dışında inaktif ve sessiz durumda kalmaktadır. Enfeksiyon durumunda sinir sisteminin enfeksiyöz etkenlere karşı korunmasına katılan bu hücreler, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif, multipl skleroz gibi otoimmün nöroinflamatuvar, stroke gibi akut vasküler nöroinflamatuvar ya da yenidoğan döneminde hipoksik-iskemik beyin hasarı ya da nöroAIDS ve şizofreni hastalıklarında aktifleşerek doku koşullarına göre iki değişik fenotipe yönelmektedir.

Nörotrofik faktörlerin üretimini yapan nöroprotektif fenotip nöron ve glial hücre koruyucu bir etki gösterirken, nörotoksik fenotip salgıladığı nitrik oksid (NO), reaktif oksijen ürünleri ya da tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) gibi proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla nöronların ve oligodendroglial hücrelerin ölümüne yol açmakta ve doku hasarını artırmaktadır.

Mikroglia hücre kültürlerine, lipopolisakkarid (LPS) gibi bakteri ürünlerinin, interferon gamma gibi proinflamatuvar sitokinlerin ya da beta amiloid gibi Alzheimer hastalığının patogenezinde yer alan nörotoksik maddelerin eklenmesi, proinflamatuvar uyaran olarak mikrogliaların aktive olmasını sağlamaktadır. Bu aktivasyon sonucu nörotoksik mikroglia fenotipinin oluşmasına neden olmaktadır.

Olgun halleri yaklaşık 22 nükleotidden oluşan miRNA'lar, kodlanmayan RNA'lardır. MikroRNA'lar hücre sitoplazmasında hedef mRNA'larının belli tanıma bölgelerine bağlanarak mRNA yıkımı ya da translasyonun başlaması ve ilerlemesini neden olmakla beraber baskılama yoluyla protein ekspresyonunu seçici olarak azaltmaktadır.

Yapılan bu çalışmada MSS'de mikroglial hücrelerde aktivasyon mekanizmalarında yer alan miRNA'ların belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda mikroglial hücreler bir çeşit endotoksin olan lipopolisakkarid (LPS) ile uyarıldı. Mikroarray ve qPCR yöntemleri ile miRNA ekspresyon değişiklikleri belirlendi. Ekspresyon değişikliği görülen miRNA'ların hedef genleri biyoinformatik yöntemle belirlendi. Lusiferaz testi ile hedef genlerin deneysel validasyonu yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroglial Hücreler

Merkezi sinir sisteminde (MSS) nöronal, glial ve vasküler olmak üzere 3 ana tipte hücre yer almaktadır. İlk kez 1932 yılında del Rio-Hortega tarafından sinir sisteminin üçüncü elemanı olarak tanımlanan mikroglial hücreler, glial hücre tipindedir [1]. Kökenleri fetal makrofajlardan gelmektedir [2,3]. Fetal yaşam döneminde kemik iliğinden beyine göç eden bu hücreler bu evrede fizyolojik programlı hücre ölümü sonucu oluşan nöronal ve oligodendroglial hücre artıklarının fagosite edilmesi ve sindirilmesi görevini gördükten sonra yaşamın geri kalan evresinde enfeksiyon ve hastalık durumları dışında inaktif ve sessiz durumda kalmaktadır [4,5].

2.1.1. Mikroglia Fonksiyonları

Makrofaj benzeri fagositik hücreler olan mikroglial hücreler, apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında yer almaktadırlar [6,7]. Mikrogliaların bu özelliklerinden dolayı beyaz cevher aksonlarının oluşumunda, beyin dokusunun gelişim sırasında şekillenmesinde ve bazı hücre projeksiyonlarının eliminasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. [8-10]. Nörogenez sırasında yönlendirici ve destekleyici etkisinin olduğu öne sürülmektedir [11,12]. Ayrıca nörogenezle beraber gelişim ve yetişkin dönemde sinaptogenezde de yer aldıkları öne sürülmektedir [7]. Aksine, uzun yıllardır sinaps eliminasyonunda da mikroglial hücrelerin etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu düşünce, aksotomize fasiyel motor nöronların sinapslarının mikroglial hücreler tarafından ortadan kaldırıldığını gösteren bir bulgu ile desteklenmiştir. [13]. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise uzun süre mikroglia ile temas halinde kalan sinapsların ortadan kaybolduğu iki-foton mikroskopi [14] tekniği ile gösterilmiştir [15]. Bu verilere göre mikroglial hücreler sinaptik plastisiteye dolaylı yoldan etki etmektedir [16].

Enfeksiyon durumunda sinir sisteminin enfeksiyöz etkenlere karşı korunmasına katılarak yararlı bir işlev gören bu hücreler, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif, multipl skleroz gibi otoimmün nöroinflamatuvar, stroke gibi akut vasküler nöroinflamatuvar ya da yenidoğan döneminde hipoksik-iskemik beyin hasarı ve periventriküler lökomalazi (PVL) gibi vasküler ya da inflamatuvar hastalık durumlarında,

nöroAIDS ve şizofreni hastalıklarında aktifleşerek (mikroglial aktivasyon), doku koşullarına göre iki değişik fenotipe yönelmektedir [17 -21].

Nörotrofik faktörlerin üretimini yapan nöroprotektif fenotipte mikroglial hücre koruyucu bir etki gösterirken, nörotoksik fenotip salgıladığı nitrik oksid (NO), reaktif oksijen ürünleri ya da TNF α gibi proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla nöronların ve multipl skleroz gibi durumlarda egemen olarak oligodendroglial hücrelerin ölümüne yol açmakta ve doku hasarını ilerletmektedir [22, 4,5].

Periferik immün sistemle kıyaslama yapıldığında mikroglial hücreler sadece inflamatuvar fonksiyon görmekten yanı sıra nöronlara destek fonksiyonu göstermektedir. Büyüme faktörü, sitokin ve nörotrofik faktör salgısı, glutamat alımı ve demir uzaklaştırılması gibi fonksiyonlarla nöronlara destek olmaktadır [23,24].

2.1.3. Mikroglial Aktivasyon

Beinde herhangi bir hasar meydana geldiğinde oluşan moleküllere karşı mikroglial hücreler aktive olup, inflamatuvar yanıt oluşturmaktadırlar. Çeşitli aktivasyon durumlarına geçerek MSS homeostazını sağlamaktadırlar [24,25]. Aktivasyon öncesi mikroglial hücrelerin inaktif olup, aktivasyon süresi boyunca yavaş yavaş aktif forma geçtiği öngörülmektedir. Fakat yapılan in vivo çalışmalarda, mikroglialların istirahat halinde bile dinamik olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle aktivasyon süreci fonksiyonel fenotipteki değişiklik olarak görülmelidir. Bu süreçte bozulan homeostaz, denetleme modundan reaktif profile geçiş yapılarak dengelenmektedir. Geçiş süresince kemotaktik düzenlemeler saniyeler içerisinde gerçekleşirken, kompleks gen kümelerinin aktive olması daha geç sürelerde gerçekleşmektedir [26].

Mikroglial aktivasyona sebep olan moleküller spesifik olarak reseptörlere bağlanmaktadır. Örnek olarak TLR'ler bakteriyel, fungal ve viral molekülleri tanıyarak hücre içi sinyalleme mekanizmasının aktive olmasını sağlamaktadır [27, 28].

Nörotransmitterlerin mikroglial aktivasyon mekanizması üzerinde yatıştırıcı etkisi bulunmaktadır. Çeşitli nörotransmitter reseptörleri mikroglial hücreler tarafından eksprese edilmektedir. Bu reseptörlerin aktive olması halinde anti-inflamatuvar yanıtlar oluşabilmektedir [29, 30].

2.1.4. Sinir Sistemi Hastalıklarında Mikroglial Hücrelerin Roller

Mikroglial hücreler MSS’nde görülen bazı nörodejeneratif, otoimmün-demyelizan ve akut vasküler nöroinflamatuvar hastalıkların patolojilerine katılmaktadırlar.

Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH) yaşlılarda en sık rastlanan demans tipidir. AH patolojisinde oluşan Amiloid- β (A β) plakları ve nörofibriler yumaklar nöronal hücre kaybına neden olmaktadır. Mikroglial hücreler oluşan A β plaklarını fagositoz yoluyla ile yok etmektedir. Bu nedenle mikroglia AH patolojisinde nöroprotektif etki göstermektedir. Ayrıca patolojik bölgede inflamatuvar yanıtların oluşmasına neden olarak doku rejenerasyonunda rol oynamaktadır [31].

Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) , AH’dan sonra en sık rastlanan nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığa beyin substantia nigra (SN) bölümündeki dopaminerjik nöronlar dejenere olması yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda mikroglial inflamasyonun PH patolojisinin ana mekanizmalarından biri olduğunu gösteren bir veri henüz elde edilmemiştir. Özellikle, SN’da yer alan spesifik dopaminerjik nöronların aktive mikroglia tarafından hedeflendiğine dair bir mekanizma yoktur [32].

SN’da büyük doku uygunluk kompleksi (Major histocompatibility complex; MHC) sınıf II moleküllerinin ekspresyonu nedeniyle mikroglial hücrelerin PH patogenezinde yer aldığı öne sürülmektedir [33]. Fakat MHC sınıf II ekspresyonu nörodejeneratif hastalıkların çoğunda rol oynamaktadır ve immünolojik saldırılara karşı güvenlik duvarı görevi görmektedir [34]. Mikroglial hücreler, PH patolojisinde yer alan α -sinüklein proteini tarafından aktif hale gelmektedirler [35].

İnme

İnme, beyne yeterli kan gitmemesi sonucu oluşan iskemik serebrovasküler bir olaydır. Dünyada birçok insan inme nedeni ile ölmektedir. Post iskemik durumlarda ilk önce penumbra da yer alan mikroglial hücreler aktif hale geçmektedirler. Sonrasında ise periferde bulunan fagositik hücreler ve lenfositler aktive olmaktadır. Akut iskemik durumda hasarlı doku tarafından ROS, kemokin ve sitokin salınımı gerçekleşir. Bu salınım sayesinde

adhezyon molekülleri periferik lenfositlerin hasarlı dokuya ulaşmasını sağlamaktadır. Periferden gelen lökositler subakut fazda sitokin, kemokin ve ROS salınımı gerçekleştirerek, beyin inflamasyonunu artırmaktadır. Bu sayede yerel mikroglial hücrelerin daha fazla aktif hale geçmesini sağlar [36].

Multiple Skleroz

Multiple Skleroz (MS), beyin ve spinal kordta yer alan nöronların aksonlarının myelin kılıflarının zarar görmesi ile oluşan inflamatuvar bir hastalıktır. MS patolojisinde mikroglialın rolü bulunmaktadır. Oligodendrosit, myelin veya aksonal hasar sonucu mikroglial aktivasyon gerçekleşmektedir. Bu aktivasyon MSS'nde sitotoksik inflamatuvar çevre meydana getirerek MS lezyonu oluşumuna neden olmaktadır [37].

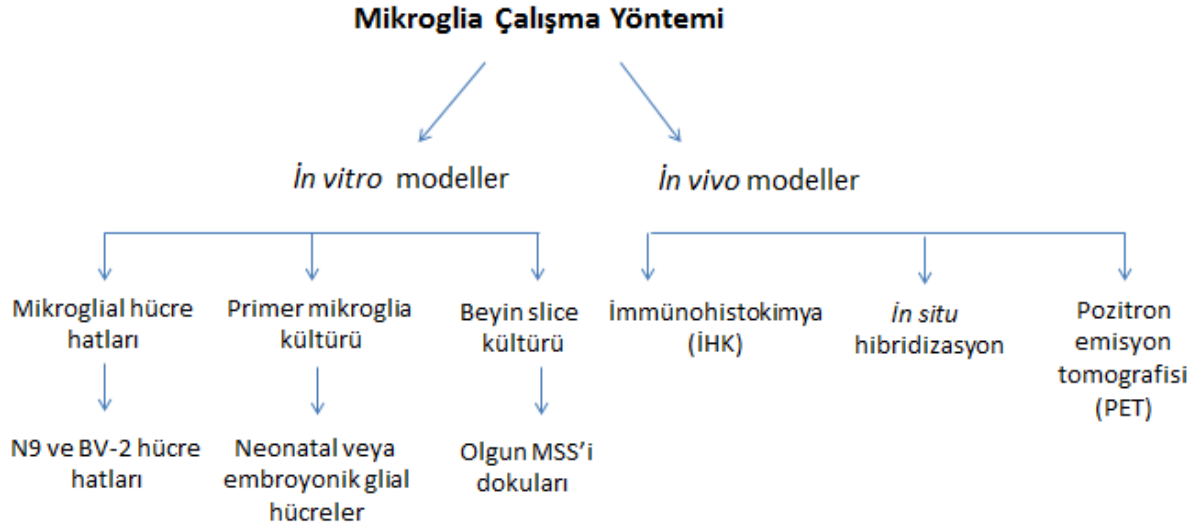
Amyotrofik Lateral Skleroz

Mikroglial hücrelerin Amyotrofik lateral skleroz (ALS) patolojisinde motor nöron ölümünde rol oynadığı düşünülmektedir [38]. Monosit kemoatraktant protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) ALS patolojisinde artmaktadır ve buna kaynak olarak mikroglial hücreler düşünülmektedir [39]. ALS'd yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre, mikroglialın nöroprotektif etkisinin olduğu fakat mutant süperoksit dismutaz (mSOD) ekspresyonu ile nörotoksik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Buna göre ALS patolojisinde meydana gelen motor nöron dejenerasyonu mikroglialın düzgün çalışmamasından kaynaklanmaktadır [40].

2.1.5. Mikroglia çalışma yöntemleri

Mikroglial hücreler hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemlerle incelenebilmektedir. *In vitro* yöntemler mikroglial hücrelerin birçok açıdan incelenmesi açısından önemlidir. Bunun için hücre hatları veya primer kültürden elde edilen hücreler kullanılmaktadır. Ancak bu hücreler ile yapılan çalışmalardaki verilerin değer kazanması için, bu çalışmaların *in vivo* ortamda da gerçekleştirilip, doğrulanması gerekmektedir [41].

İn vivo çalışmalarda ise deney hayvanları ve insan dokularında mikrogial hücreler incelenmektedir. Bunun için immünohistokimya (İHK) ve *in situ* hibridizasyon (İSH) gibi yöntemler kullanılmaktadır [42,43]. Ayrıca Pozitron emisyon tomografisi (PET) de canlı vücudunda aktive olan mikrogial hücrelerin görüntülenmesinde kullanılmaktadır [4].



Şekil 1 : Mikroglia Çalışma Yöntemleri

2.2. MikroRNA

Post-transkripsiyonel gen regülasyonunda önemli rolü olan miRNA'lar küçük, kodlama yapmayan RNA'lardır. Olgun biçimleri yaklaşık 22 nükleotidden oluşan bu moleküller primer miRNA (pri-miRNA) denilen miRNA gen transkriptlerinden enzimatik yıkımla ortaya çıkan öncü miRNA moleküllerinden (prekürsör miRNA, pre-miRNA) türemektedir.

miRNA'lar hücre sitoplazmasında hedef mRNA'larında bulunan belli tanıma bölgelerine bağlanarak mRNA yıkımı ya da translasyonun başlaması ve ilerlemesini baskılama yoluyla protein ekspresyonunu seçici olarak azaltmaktadır [44].

miRNA veritabanı olan miRBase'de yaklaşık olarak kayıtlı 19000 tane çeşitli türde miRNA bulunmaktadır (miRBase Release 17, Nisan 2011) [45].

miRNA'ların hücre çoğalması, hücre canlılığı ve ölümü, tümör oluşumu, damar

oluşumu, organ gelişimi, metabolizma, sirkadyan ritimler gibi birçok hücrel ve organizma düzeyinde işlevin gerçekleştirilmesine katıldığı belirlenmiştir [44]. Belirli miRNA'lar spesifik olarak yalnızca sinir sisteminde eksprese edilmekte ve sinir sisteminin gelişimi dahil birçok işlevde rol oynamaktadır [46-48].

Sinir sisteminde yer alan çeşitli hastalıklarda ve bu hastalıkların hayvan modellerinde beyin dokusu ya da serumda spesifik miRNA ekspresyon değişikliklerinin gözlenmesi bu moleküllerin nörolojik hastalıkların patogenezinde de önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir [46, 47,49].

2.2.1. miRNA Biyogenezi

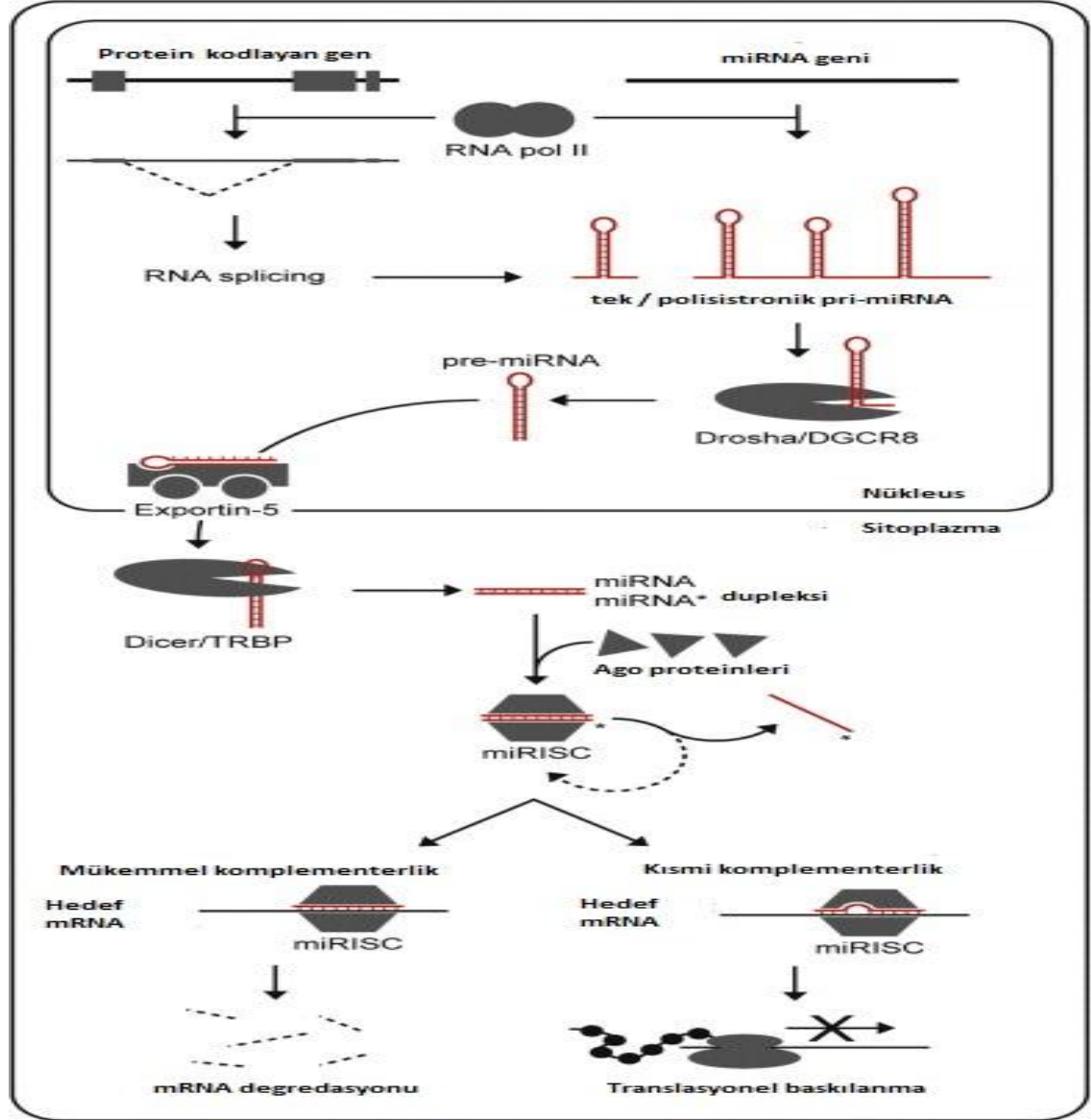
miRNA'lar, hedef mRNA'nın 3'Untranslated Region (UTR) bölgesine bağlanarak gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenlerler [50].

RNA polimeraz II enzimi ile transkribe olan miRNA'lar, nükleer genomda tek veya polisistronik halde bulunurlar. Transkripsiyon sonucunda primer mikroRNA (pri-miRNA) molekülü elde edilir [51]. Bir sonraki basamakta pri-miRNA'lar, mikroişlemci kompleks tarafından pre-miRNA (prekürsör miRNA) formuna dönüştürülür. Bu kompleks insanda Drosha ve DiGeorge sendrom kritik bölge gen 8 (DGCR8) proteinlerini içerir [52]. İlk önce DGCR proteinini, tek ve çift iplikli RNA molekülünü tanır ve ardından Drosha çift iplikli hairpin yapıdaki molekülü keserek pre-miRNA'yı oluşturur. Oluşan pre-miRNA'nın 5' ucunda monofosfat, 3' ucunda ise 2 nükleotid hidroksil uzantısı bulunur ve ekspartin-5 (Exp-5) aracılığıyla sitoplazmaya taşınır [53-55].

Sitoplazmaya taşınan pre-miRNA burda bulunan Dicer enzimi ile kesilerek matür miRNA'ya halini alır [56,57] ve miRNA duplesi açılır. Bu sayede RNA baskılanmasında yer alacak olan komplementer zincir ortaya çıkar. Genellikle tek zincir RNA-indüklenmiş susturma kompleksi'ne (RNA-induced silencing complex; RISC) girer [58] diğeri ise parçalanır [59-61].

RISC kompleksi bir Ribonükleoprotein (RNP) kompleksi olup yapısında miRNA ile beraber transactivation-responsive RNA-binding protein (TRBP), PKR aktive edici protein (PACT) ve Argonaute-2 (Ago2) proteinlerini bulundurur.

Hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanan miRISC kompleksi genellikle ekspresyonun baskılanmasına neden olur [62, 63].



Şekil 2: miRNA biyogenezi

2.2.2. miRNA Deteksiyon Metodları

miRNA ekspresyon düzeyleri hücre tipine ve içinde bulunduğu duruma göre değişiklikler göstermektedir. Bu ekspresyon düzeylerini belirlemek için kullanılan total RNA'lar 200 nükleotitten küçük RNA'lar bakımından zenginleştirilmiştir. Ekspresyonu analiz edilecek miRNA'lar belirli ise northern blot veya RNaz koruma testi (RNase

protection assay; RPA) tercih edilen yöntemlerdir [64]. *In situ* hibridizasyonda miRNA deteksiyonu için kullanılmaktadır [65]. Fakat, daha az prob ve RNA gerektiren mikroarray ile qPCR yöntemleri daha sık tercih edilmektedir [66]. Bunlara ek olarak gen ekspresyonunun seri analizi (Serial analysis of gene expression; SAGE) ve derin sekanslama teknikleri de miRNA profillemeye çalışmalarında yer almaktadır.

Mikroarray

Mikroarray hücre içerisinde meydana gelen değişiklikleri hızlı ve güvenilir bir şekilde analiz edebilen bir teknolojidir [67]. Mikroarray analizinin temel prensibi binlerce genin DNA'sını bir çipe yayıldıktan sonra işaretli komplementer problemlerle hibridizasyonuna dayalıdır. Çip üzerinde bulunan prob miktarına göre binlerce transcript veya DNA molekülü aynı anda analiz edilebilmektedir.

miRNA mikroarray uygulamalarında kullanılan total RNA örneklerinin %80-85'ini ribozomal RNA (rRNA) oluşturduğundan, bu örneklerin 200 nükleotitten küçük RNA'larca zenginleştirilmesi gerekmektedir. İlk aşama olan işaretleme ve hibridizasyonda yüksek kaliteli RNA'ların kullanılması gerektiğinden dolayı RNA kalitesinin belirlenmesi gerekmektedir [68]. Hibridizasyon sonrası yıkamalar yapılmaktadır ve ikinci aşamada lazer tarayıcılarla veri toplama işlemi gerçekleştirilmektedir. Son aşamada olan analiz kısmında ise veri normalizasyonu, analizi ve istatistiksel hesaplamalar yapılmaktadır. Veri normalizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. En sık kullanılan yöntemler arasında Quantile [69], LOESS (Locally weighted regression and smoothing scatterplot) [70], varyans stabilizasyonu [71] ve medyan normalizasyonları yer almaktadır.

Kantitatif PCR

qPCR yöntemi genellikle miRNA ekspresyon analizleri sonucu elde edilen verileri doğrulamak için yapılmaktadır. qPCR analizi sırasıyla cDNA sentezi, PCR yöntemiyle işaretli ürünlerin deteksiyonu ve data analizi olmak üzere 3 basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta miRNA'lar cDNA'ya çevrilmektedir. miRNA'lar çok az sayıda nükleotide sahip oldukları için PCR ile amplifiye edilmeleri zor olmaktadır. Bu nedenle mRNA'nın 3' ucuna poli(A) polimeraz enzimi ile Poli(A) kuyruğunun eklenmesi gerekmektedir. Daha sonra universal primer bağlanma sekanslarına sahip oligo d(T) sekansları ile cDNA sentezi yapılmaktadır. PCR basamağında, ürünlerin deteksiyonu için floresan bir boya olan SYBR green I veya spesifikiteyi artıran Taqman Problemleri kullanılmaktadır [72]. En son basamakta ise

gruplar arasında ekspresyon miktarının karşılaştırılması $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak yapılmaktadır. C_t değeri eksponansiyel çoğaltma sırasında oluşan ışımanın belli bir degree ulaşana kadar geçirdiği siklus sayısıdır [73]. Analiz sırasında normalizasyon için bir “housekeeping” genin kullanılması gerekmektedir. U6 gibi küçük RNA’lar, miRNA qPCR analizlerinde housekeeping gen olarak kullanılmaktadır [74, 75].

In situ miRNA Deteksiyon Yöntemi

In situ olarakta miRNA ekspresyon düzeyleri ölçülebilmektedir. Bunun için modifiye edilmiş kilitli nükleik asit (Locked nucleic acid; LNA) probları kullanılmaktadır. Bu problardaki ribozun 2’ ve 4’ oksijen atomları metilen köprüsü ile bağlanmıştır. Böylelikle LNA hedef bölgeye daha sıkı bağlanıp, denatürasyonu engeller ve erime sıcaklığını artırır. Erime sıcaklığı artan proplar hibridizasyon sonrası yapılan inkübasyonda hala bağlı kalmaktadır. Arka plan oluşumu bu modifikasyon sayesinde azalmaktadır. [76, 77].

2.2.3. miRNA Hedef Gen Belirleme

miRNA’lar yaklaşık birçok genin 3’-UTR bölgelerine bağlanarak bu genlerin regülasyonunda rol oynamaktadırlar. miRNA’ların hedeflemiş olduğu bu genler çeşitli biyoinformatik yöntemlerle belirlenebilmektedir. PicTar [78] , miRanda [79] , TargetScanS [80] ve TargetScan [81] hedef belirlemek için kullanılan en yaygın veritabanlarıdır.

Fakat bu yöntemlerle belirlenen miRNA hedef genleri öngörülen hedef olduklarından dolayı deneysel olarakta valide edilmeleri gerekmektedir. Hedef validasyonu için Lusiferaz veya yeşil floresan protein (green fluorescent protein; GFP) kullanılmaktadır [82].

2.2.4. Doğal Bağışıklık Sisteminde miRNA’ların Rolü

Doğal bağışıklık sistemi vücudun dışarıdan gelen patojenlere karşı savunma mekanizmasıdır. Bu mekanizmada makrofajlar, dentritik hücre (DH), nötrofiller, monositler ve doğal öldürücü hücreler (Natural killer cells, NK) yer almaktadır. Antijen sunucu hücreler (Antigen presenting cells, APC) olan makrofajlar ve dendritik hücreler gibi patojenin varlığını tespit etmektedir. Kendisine yabancı olan molekülleri tanıyan patern tanıma reseptörlerine (Pattern recognition receptor; PRR) sahiptirler. PRR’lerinin birçok çeşidi bulunmaktadır. En iyi karakterize edilenler 11 çeşide sahip olan TLR ve 10 çeşidi olan IL-1

reseptörleridir. Son yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre miRNA'ların doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin gelişim ve fonksiyonlarında rol aldıkları gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin fonksiyonlarının regülasyonuna katılan tanımlanmış miRNA'lar bulunmaktadır [83, 84].

Monosit ve makrofaj diferansiyasyonunda öneme sahip olan PU.1 transkripsiyon faktörü miR-424 transkripsiyonunu aktive edip Nükleer Faktör I/A (NFI-A)'nın translasyonunu baskılanmasına neden olur [85]. Makrofaj koloni uyarıcı faktör-1 (M-CSF) gibi diferansiyasyona özgü genler, azalan NFI-A düzeyleri ile aktif hale geçer. miR-233'ün de miR-424 gibi myeloid hücre diferansiyasyonunda yer aldığı görülmüştür [86].

Granülosit-monosit progenitörlerinden köken alan nötrofiller Growth factor independent 1 (Gfi1) tarafından farklılaşmaktadır [83]. In vitro ortamda miR-155'in sürekli ekspresyonu immatür granülositlerin artmasını sağlamaktadır. Bunun nedeninin SH2-domain içeren inositol-5-fosfataz 1 (SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase 1, SHIP1)'in katılımı olduğu düşünülmektedir [87,88]. miRNA'lar ayrıca granülosit fonksiyonunu da regüle etmektedir. Ekspresyonu PU.1 ve CCAAT/enhancer-binding protein- β (C/EBP β) tarafından indüklenen miR-223, nötrofillerin proliferasyonunu ve aktivasyonunu baskılamaktadır [89].

miRNA'ların inflamatuvar uyarana yanıt olarak indüklenmesi ve baskılanması pro-inflamatuvar veya anti-inflamatuvar etki göstermektedir [90]. Önemli pro-inflamatuvar uyarıcı olan mikrobiyal ürünler TLR ligandı olarak uyarım yaptığında miR-9, miR-125b, miR-146a ve miR-155 ekspresyonlarında değişikliğe neden olmaktadır [84]. TLR ligandları NF- κ B ve c-Jun-N-Terminal Kinaz (JNK) yollarını kullanarak makrofaj ve DH'lerde miR-155 ekspresyonunu indüklemektedir [91, 92]. Ayrıca, *in vivo* olarak LPS uyarımında miR-125 ekspresyonunda azalış ve miR-155 ekspresyonunda ise artış görülmüştür. İnflamatuvar yanıt sırasında miR-125b ekspresyonunun azalması TNF α baskılanmasını önlemektedir [92]. TLR4 uyarımı ile polimorfonükleer nötrofillerde ve monositlerde miR-9 ekspresyonunda da artış olmaktadır. TLR2 ve TLR7/8 agonistleri ve TNF- α ve IL-1 β sayesinde miR-9'un ekspresyonunu indüklenmektedir [89]. miR-146 ve miR-21 de LPS ile TLR4'ün uyarılması sonucu ekspresyonu artan miRNA'lardır [93,94]. İnflamasyonda miRNA'ların önemli regülatör görevi gördükleri yapılan çalışmalarda gösterilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Çalışma deneysel (in vitro) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Çalışmamız Mart 2011 ile Şubat 2012 tarihleri arasında 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) gerçekleştirilmiştir.

3.3. Çalışma Materyali:

Araştırmada N9 fare mikroglia ve 293T insan embriyonik böbrek hücre hatları ve *Escherichia coli* DH5a suşu kullanılmıştır.

3.4. Çalışmanın Değişkenleri:

- miRNA ekspresyon düzeyleri (bağımlı değişken)
- LPS dozu (bağımsız değişken)

3.5. Veri toplama Araçları:

3.5.1. Hücre Kültürü

Çalışmada, Dr. Paola Ricciardi- Castagnoli'den (Cellular Pharmacology Center, Milan, İtalya) sağlanan N9 fare mikroglial hücre hattı kullanıldı. N9 hücre kültürü için RPMI 1640 kültür ortamı (Biochrom AG, Almanya) kullanılarak %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS) (Biochrom AG, Almanya) ile desteklendi. Hücreler 75 cm²'lik kültür flasklarına (Greiner, Almanya) ekilerek haftada 3 kez olmak üzere % 0.05 konsantrasyonda Tripsin/EDTA (Biochrom AG, Almanya) kullanılarak pasajlandı. Hücre kültürü işlemleri için Laminar akımlı kabinet (Heraus, Almanya) kullanıldı ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) 37°C'de inkübe edildi.

Çalışmada içinde yer alan hedef gen validasyon deneyleri için HEK293 insan embriyonik böbrek hücre hattının transfeksiyona uygun bir tipi olan 293T hücre hattı DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) kullanıldı.

293T hücre kültürü için Dulbecco's MEM (Biochrom AG, Almanya) kullanılarak %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS) (Biochrom AG, Almanya) ile desteklendi. Hücreler 75 cm²'lik kültür flasklarına (Greiner, Almanya) ekilerek haftada 2 kez olmak üzere % 0.05 konsantrasyonda Tripsin/EDTA (Biochrom AG, Almanya) kullanılarak pasajlandı.

Hücreler pasajlanırken ilk olarak içinde bulunduğu ortam çekildi ve yerine 10 ml Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon (Phosphate buffered saline; PBS) eklendi. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra pipet yardımı ile PBS uzaklaştırıldı. Yıkanan hücelere 5 ml Tripsin/EDTA (%0,05/%0,02) solüsyonu eklenerek inkübatör içinde 2 dakika bekletildi. Bu sayede hücreler yapıştıkları flask yüzeyinden ayrıldı. Daha sonra flasklara 5 ml kültür ortamı eklenerek, daha önce eklenen tripsinle beraber geri alınarak 15 ml'lik tüplere aktarıldı. Hücreler 1500 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra çöken hücrelerin üzerinde kalan ortam uzaklaştırıldı. Hücreler 1 ml kültür ortamı eklenerek süspanse hale getirildi. Hücreler, Thoma lamı (Marienfeld, Almanya) kullanılarak sayıldı. Flask başına 1 x10⁶ hücre gelecek şekilde ekildi ve üzerlerine 10 ml kültür ortamı eklendi. İnverted ışık mikroskopunda (Olympus, Japonya) kontrol edilerek hücreler inkübatöre kaldırıldı.

3.5.2. *In vitro* Deney

N9 hücreleri, flask başına 5x10⁶ hücre olacak şekilde 75 cm²'lik flasklara ekildi. Bir gece boyunca inkübatörde bekletildikten sonra flask içinde bulunan ortam uzaklaştırılarak yerine 10, 100 ve 1000 ng/ml LPS (Escherichia coli 055:B5, Sigma-Aldrich, Almanya) dozlarını içeren %1 FBS ve %1 L-Glutamin 'li RPMI 1640 ortamı eklendi. Daha sonra %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılan hücreler 6 saat sonra toplandı ve bu hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı.

3.5.3. RNA izolasyonu

In vitro deney sonrasında hücrelerden total RNA izolasyonu firmanın miRNeasy RNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Öncelikle hücreler 700 µl Qiazol ile lize edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra lizatın üzerine 140 µl klorofom eklenip, sertçe çalkalandı. 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüpler 12000 xg'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan katmanlardan üst faz başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1,5 kat hacimde Etanol (%100) eklendi. Oluşan miks, RNeasy mini spin kolona aktarıldı ve oda sıcaklığında 10000 rpm'de santrifüj edildi. Kolon üzerine 700 µl RWT solüsyon eklenerek 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Sonrasında kolona iki kez olmak üzere 500 µl RPE solüsyonu eklenerek önce 15 saniye ve ikinci olarakta 2 dakika boyunca 10000 rpm'de santrifüj edildi. En son kolonlar yeni toplama tüplerine aktararak üzerlerine 30 µl RNaz-free su eklendi ve 10000 rpm'de santrifüj edildi. Sonrasında elde edilen RNA'ların konsantrasyonu spektrofotometrede (Agilent, ABD) ölçüldü.

3.5.4. Mikroarray Analizi

Mikroarray analizi Febit (Almanya) firması tarafından hizmet alınarak yapılmıştır. Bu analiz için firmanın patentli 'Microfluidic Primer Extension Assay' prensibi ile çalışan "Geniom® Biochip MPEA mus musculus" çipi kullanılmıştır. Çip üzerinde bulunan problemler MirBase Release 14 (Eylül 2009)'te (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>) bulunan tüm matür ve matür* miRNA'ların komplementer dizilerine göre tasarlanmıştır. Mikroarray çalışma prensibine göre öncelikle RNA'lar çipe hibridize edilmiştir. Problemlerin 5' uçlarında bulunan uzatma bölgeleri, hibridize olan RNA'ları primer olarak kullanarak Klenow fragmanları ile beraber biotinlenmiş nükleotidler sayesinde uzama basamağı gerçekleştirilmiştir. Biotin görüntüleme işlemi Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) molekülleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.5. Kantitatif PCR Analizi

İlk olarak, izole edilen total RNA'lardan RT² miRNA First Strand Synthesis Kit (SABiosciences, ABD) kullanılarak cDNA (Complementary DNA) sentezi gerçekleştirildi. Herbir örnek için steril PCR tüplerine, total RNA 0,5-2 µg olacak şekilde eklendi. Ardından, 1 µl miRNA RT Primer & ERC Mix (M1) , 2 µl 5X miRNA RT Buffer 2 (M5), 1 µl miRNA RT Enzyme Mix (M3), 1 µl Nucleotide Mix (M4) ve son olarak total miktarı 10 µl'e

tamamlayacak şekilde Nuclease free H₂O su eklendi. Hazırlanan bu reaksiyon karışımı, PCR cihazında (BioRad, ABD)) 37°C'de 2 saat, 95°C'de 5 dk olacak şekilde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası herbir tüpe 90µl Nuclease free H₂O eklendi.

qPCR analizinde kullanılan RT² SYBR Green Mastermix ve primerler SABiosciences (ABD) firmasından alınmıştır. Reaksiyon karışımı Tablo - 1'daki gibi hazırlandı. Housekeeping gen olarak snRNA olan U6 kullanıldı.

Tablo 1 : cDNA sentezi için gerekli bileşenler

Reaksiyon içeriği	Miktar
RT ² SYBR Green Mastermix	12,5 µl
cDNA	1 µl
Primer (1 µM)	1 µl
Nuclease free H ₂ O	10,5 µl
Toplam	25 µl

96 kuyucuklu PCR plaklarında yer alan kuyucuklara, herbir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı eklendi. Plaka Roche Lightcycler 480 cihazına yerleştirilip, uygun program ile çalıştırıldı. Cihazın yazılımı ile C_t değerleri (threshold cycle) hesaplandı. $\Delta\Delta C_t$ yöntemine göre elde edilen C_t değerleri analiz edildi. ΔC_t değerleri, $C_{t_{miRNA}} - C_{t_{U6}}$ formülüne göre Microsoft Excel kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel anlamlılığı hesaplamak için t-testi yapıldı. Ekspresyon değişimini hesaplamak içinse $\Delta C_{t_{LPS}} - \Delta C_{t_{Kontrol}}$ formülü kullanılarak $\Delta\Delta C_t$ değerleri hesaplandı. Son olarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüyle ile ekspresyon değişim miktarları belirlendi.

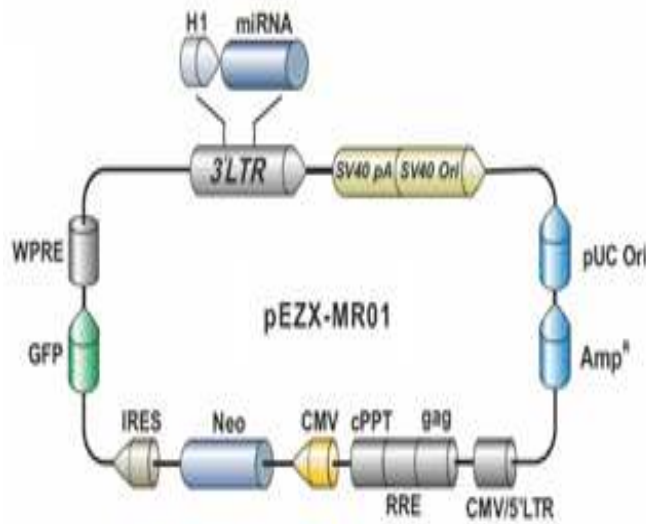
3.5.6. miRNA Hedef Genleri Analizi

Hedef gen analizleri için miRGen target veritabanı kullanılmıştır. (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>) Analiz sonucunda belirlenen hedeflerden inflamasyonla ilişkili olanlar seçildi. Fakat bu hedefler öngörülen hedef olduklarından dolayı Lusiferaz testi ile validasyonları yapıldı.

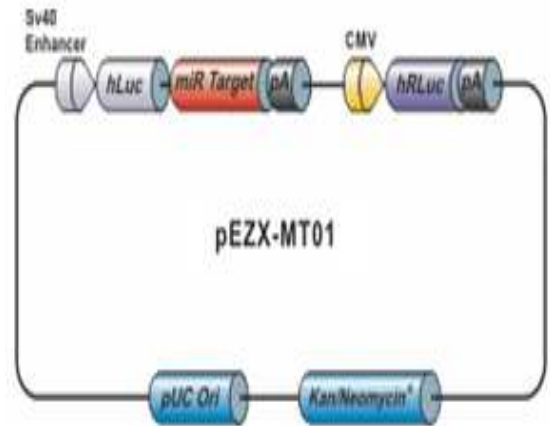
3.5.7. Lusiferaz Testi

RNA hedef genlerin validasyonu Lusiferaz testi ile yapıldı. Bu test için transfeksiyona olan yatkınlığından dolayı 293T hücre hattı kullanıldı. Test için gerekli olan miRNA genini ve hedef geni içeren plazmitler ile negatif kontrol hedef plazmitleri GeneCopoeia (ABD) firmasından alındı.

miRNA geninin bulunduğu plazmitde (pEZX-MR01) H1 promotörü ve onun arkasında miRNA geni bulunmaktadır. miRNA hedef geninin bulunduğu plazmitde (pEZX-MT01), hedef genin 3'-UTR dizisi yer almaktadır. Hedef gen analizinde belirlenen her bir hedef gen mRNA'sına göre bu diziler değişmektedir. Negatif kontrol hedef plazmitinde (pEZX-MT01) ise herhangi bir hedef bölgesi bulunmamaktadır. miRNA hedef genini içeren plazmitde, Firefly ve *Renilla* lusiferaz geni bulunmaktadır. *Renilla* lusiferaz aktivitesine göre, Firefly lusiferaz aktivitesi normalize edilmektedir. Plazmitler, Firefly lusiferaz geninin 3'-UTR bölgesinde istenen hedef genin 3'-UTR bölgesi hazır klonlanmış halde alınmıştır. Negatif kontrol plazmitinde ise 3'-UTR bölgesi bulunmamaktadır.



Şekil 3: miRNA genini içeren plazmit plazmiti



Şekil 4: miRNA hedef geni içeren

miRNA hedef genini içeren plazmit bakteriye transforme halde alındığı için öncelikle çoğaltılması gerekmektedir. Bunun için bakteriler, 100 µg/ml Kanamisin (Sigma-Aldrich, Almanya) eklenen sıvı LB içerisinde 37°C 'de çalkalamalı inkübatörde gece boyu inkübe

edildi. Daha sonra çoğalan bakterilerden Nucleospin Plasmid Kit (Macherey-Nagel,Almanya) kullanılarak, kitin protokolüne göre plasmid DNA izolasyonu yapıldı. Protokole gör öncelikle bakteriler 4000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Oluşan bakteri pelletine 250 µl A1 resüspansiyon solüsyonu eklendi ve pellet süspanse hale getirildi. 250 µl A2 lizis solüsyonu eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 300 µl A3 nötralizasyon solüsyonu eklenerek 5 dakika 11000xg’de santrifüj edildi.Elde edilen supernatant kolona aktarıldı ve 11000xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemi için 600 µl A4 yıkama solüsyonu eklenerek 11000xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında kolon boş halde 11000xg’de 2 dakika santrifüj edildi. Elüsyon kısmında ise kolon steril santrifüj tüpüne aktarılaraq üzerine 50 µl AE elüsyon solüsyonu eklendi. Kolon 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra 11000xg’de 1 dakika santrifüj edildi. İzolasyon sonrası, elde edilen plasmid DNA konsantrasyonu UV spektrofotometre ile ölçüldü.

Negatif kontrol plazmitini çoğaltmak için bakteriyel transformasyon yapıldı. Bunun için kompetent E. coli DH5α kullanıldı. Bunun için 100 µl kompetent hücrelere 100 ng plazmit eklendi. Buz üzerinde 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 2 dakika 42°C’lik su banyosunda tutuldu. Hemen ardından buz üstüne konuldu. Üzerine 250 µl SOC besiyeri eklendi ve 1 saat boyunca 37°C’de çalkalanarak inkübe edildi. Sonrasında bakteriler 100 µg/ml Kanamisinli katı LB besi yerine ekildi. Gece boyunca 37°C’de inkübe edildi. Ertesi gün oluşan kolonilerden alınarak 100 µg/ml Kanamisinli sıvı LB besiyerine ekim yapıldı. Gece boyunca 37°C’de inkübe edilerek bakteriler çoğaltıldı. Çoğalan bakterilerden plazmit DNA izolasyonu Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Almanya) kitin protokolüne göre yapıldı.

Transfeksiyon

Plasmitler çoğaltıldıktan sonra lusiferaz testi için 293T hücreleri 96 kuyucuklu plakalara herbir kuyucuğa 10000 hücre gelecek şekilde ekildi. Hücreler, plaka yüzeyine yapışabilmeleri için 48 saat boyunca %5 CO₂ içeren inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) bekletildi. 48 saat sonunda her deney grubu için transfeksiyon ortamı hazırlandı. Bunun için Endofektin (GeneCopoeia, ABD) kullanıldı. Her deney grubu plakalarda 5’er kuyucuk içerecek şekilde Tablo 2’deki gibi oluşturuldu.

Tablo 2 : Transfeksiyon için hazırlanan gruplar

Grup No	Grup içeriği
1	sadece hücre
2	sadece endofektin
3	0,14 µg/ml miRNA plazmiti ve 0,10 µg/m Hedef gen plazmiti
4	0,14 µg/ml miRNA plazmiti ve 0,10 µg/m Hedef gen plazmiti

Her grup için 5X transfeksiyon ortamı hazırlandı. Tablo 2’de belirtildiği gibi plazmitler son konsantrasyon 1X olacak şekilde eklendi. 4.32 µl Endofektin kullanıldı. Sonrasında transfeksiyon karışımına Optimem (Invitrogen, ABD) eklenerek hacim 110 µl’ye tamamlandı ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu sırada kuyucuklar optimem ile yıkandı. Gruplardan sadece hücre olana 100 µl, diğer gruplara ise 80 µl optimem eklendi. 30 dakika sonunda üzerilerine 5X transfeksiyon ortamı eklendi. Bu ortamla beraber hücreler 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ortamlara, 50 µl %30 FBS içeren Dulbecco’s MEM ortamından eklendi. Hücreler 24 saat boyunca %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

Luminometrik Analiz

İnkübasyon sonrası hücrelerin ortamı toplandı. Firefly ve *Renilla* lusiferaz aktiviteleri Luc-Pair miR Luciferase Assay Kit (GeneCopoeia, ABD) protokolüne göre luminometrik olarak ölçüldü. Firefly lusiferaz aktivitesi *Renilla* lusiferaz aktivitesi ile oranlanarak normalize lusiferaz aktivitesi hesaplandı. Analizin için negatif kontrol plazmiti eklenen grupta ve hedef gen plazmiti eklenen grup karşılaştırıldı.

3.6. Araştırma Planı

Mikroarray Analizleri - Mart 2011

qPCR Analizleri – Nisan 2011/Ekim 2011

Biyoinformatik Analizler – Kasım 2011/Aralık 2011

Lusiferaz Testi – Ocak 2012/Şubat 2012

Tez yazımı - Mart 2012/ Nisan 2012

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

SPSS for Windows istatistik programının 16.0 versiyonu kullanılarak sonuçların istatistiksel analizi yapıldı. Gruplar arası kıyaslamalarda Mann Whitney U testi uygulandı. miRNA PCR analizlerinde $\Delta\Delta C_t$ yöntemi kullanıldı. Tüm değerlendirmelerde $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3.8. Araştırmanın sınırlılıkları

Çalışmamızda transforme hücre hattı olan N9 fare mikrogial hücre hattı kullanılmıştır. Primer mikrogia kültürleri ile yapılan bazı çalışmalara göre farklı sonuçların ortaya çıktığı görülmüştür [95]. Fakat primer kültür, çalışılması teknik açıdan zor olduğu ve çok az sayıda hücre elde edilmesi nedeniyle tercih edilmemiştir. Ekspresyon değişimi belirlenen miRNA'ların ayrıca *in vivo* olarakta araştırılması çalışmasının zenginliği açısından önemlidir. Çalışmanın ilk aşamalarında yapılan mikroarray analizinde LPS'in tek doz uyarımı ile elde edilen örneklerden inceleme yapılmıştır. Fakat bu incelemenin farklı dozlar içinde yapılması gerekmektedir. Ayrıca, çalışmamızda yapılan doza bağlı miRNA ekspresyon incelemelerine ek olarak, zamana bağlı miRNA ekspresyon değişimi incelemeleri de yapılmalıdır.

3.9. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 17.3.2011 tarih ve 2011/08-07 no.lu kararında; 125-GOA protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir.

4. BULGULAR

4.1. Mikroarray’de LPS ile Ekspresyonu Değişen miRNA’ların Belirlenmesi

Mikroarray analiz sonuçlarına göre 6 saatte 100ng/ml LPS uyarımıyla ekspresyonu en çok değişen 30 tane miRNA Tablo-3 de gösterilmiştir. Değişiklik görülen miRNA’ların 12 tanesinin ekspresyonunun azaldığı, 18 tanesinin ise artmış olduğu saptandı. Fakat istatistiksel analize göre değişimlerde herhangi bir anlamlılık ($p < 0.05$) bulunmadı.

Tablo 3: Mikroarray sonucuna göre ekspresyon değişimi en çok olan 30 miRNA

Ekspresyon kat			Ekspresyon kat		
miRNA	değişimi	p değeri	miRNA	değişimi	p değeri
miR-7a	3,86	0,29	miR-669d	3,86	0,51
miR-23b	8,25	0,29	miR-669g	3,48	0,55
miR-93	3,17	0,34	miR-714	3,06	0,4
miR-125b-3p	2,81	0,52	miR-29c*	0,35	0,71
miR-130b*	3,45	0,52	miR-101a	0,35	0,44
miR-190b	4,37	0,58	miR-105	0,35	0,39
miR-191	3,12	0,51	miR-140	0,35	0,4
miR-208a	3,01	0,29	miR-193*	0,26	0,34
miR-224	3,73	0,29	miR-297c*	0,31	0,36
miR-300*	3,82	0,71	miR-324-3p	0,33	0,4
miR-376c	2,99	0,34	miR-421	0,35	0,34
miR-431*	4,62	0,29	miR-568	0,24	0,36
miR-465b-5p	2,99	0,4	miR-1190	0,28	0,34
miR-503*	3,52	0,42	miR-1196	0,19	0,43
miR-664	6,42	0,4	miR-1894-5p	0,34	0,52

4.2. qPCR Yöntemi ile LPS Uyarımıyla Ekspresyonu Değişen miRNA’ların Belirlenmesi

Ekspresyonu değişen miRNA’lar içinden miR-191, miR-193 ve miR-431 için qPCR analizleri gerçekleştirildi. Bu analizlerde LPS’in 3 farklı dozu kullanıldı. Hücrelere 6

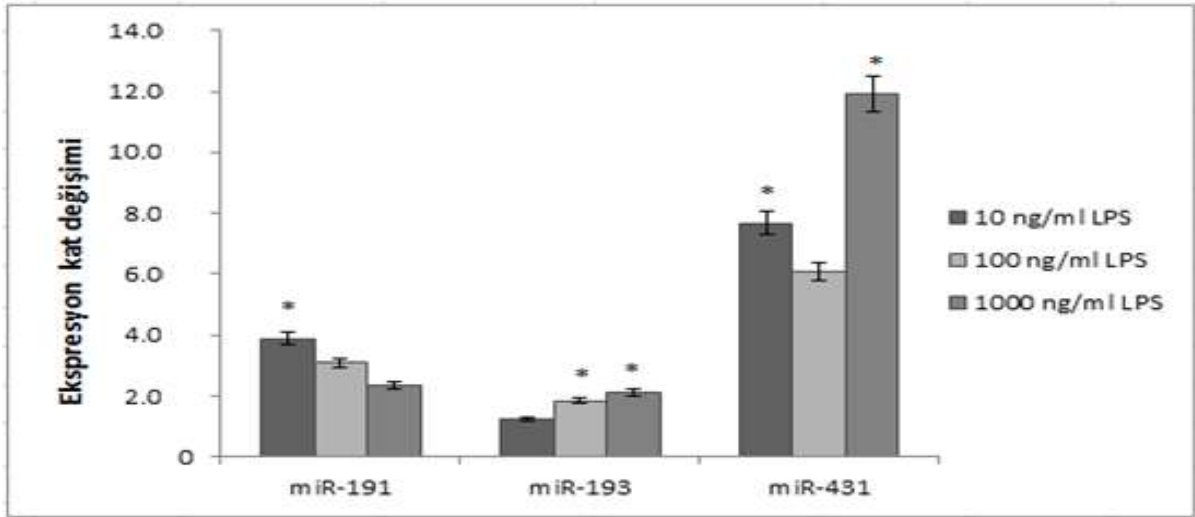
saat boyunca 10 ng/ml, 100 ng/ml ve 1000ng/ml dozlarında LPS uygulandı. Kıyaslamalar kontrol grubuna göre yapılarak ekspresyon kat değişimi yine kontrole göre verildi.

Tablo 4: 10 ng/ml LPS dozunda miRNA ekspresyon değişimi		
miRNA	Ekspresyon Kat Değişimi	p Değeri
miR-191	3.883	0.022
miR-193	1.240	0.203
miR-431	7.678	0.030

Tablo 5: 100 ng/ml LPS dozunda miRNA ekspresyon değişimi		
miRNA	Ekspresyon Kat Değişimi	p Değeri
miR-191	3.076	0.075
miR-193	1.820	0.001
miR-431	6.093	0.051

Tablo 6: 1000 ng/ml LPS dozunda miRNA ekspresyon değişimi		
miRNA	Ekspresyon Kat Değişim	p Değeri
miR-191	2.358	0.270
miR-193	2.121	0.031
miR-431	11.929	0.015

Analiz sonucu, miR-191, miR-193 ve miR-431’te anlamlı düzeyde artış saptandı. 6 saat boyunca LPS’in çeşitli dozlarında uyarımı sonucunda değişen miRNA ekspresyon düzeyi Şekil-5’te verilmiştir.



Şekil 5 : qPCR analizleri

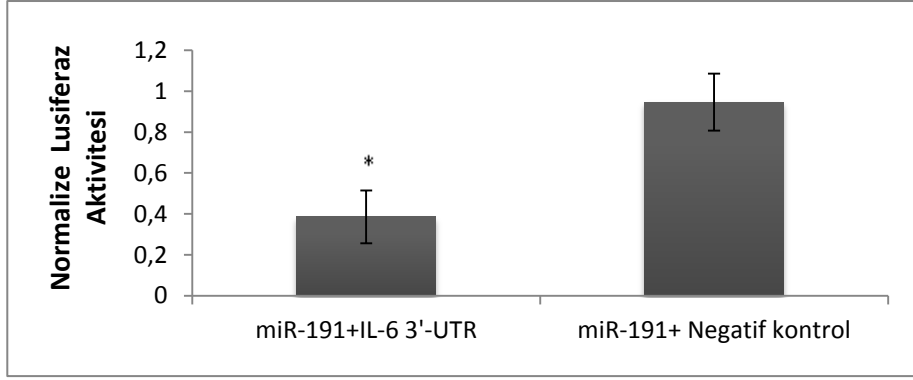
4.3. Ekspresyon Değişikliği Gözlenen miRNA’larda Hedef Analizi

Ekspresyonu değişen miRNA’lar hedef genleri ile beraber Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7: Hedef Genler	
miRNA	Hedef Gen
miR-191	IL-6 (İnterlökin-6)
miR-193	IL-10 (İnterlökin-10)
miR-431	IRAK-1 (İnterlökin-1 Rseptörü İlişkili Kinaz 1)

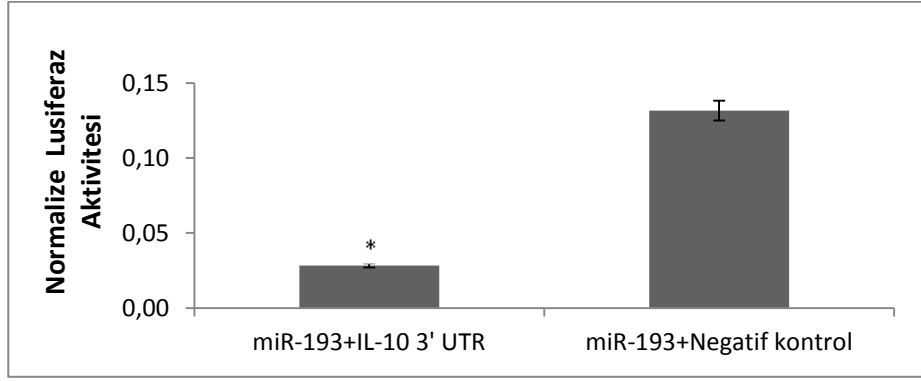
4.4. Lusiferaz Testi ile Hedef Genlerin Validasyonu

Hedef genler Lusiferaz testi ile deneysel olarak doğrulandı. Şekil 6, 7 ve 8’de doğrula hedef genler gösterilmektedir.



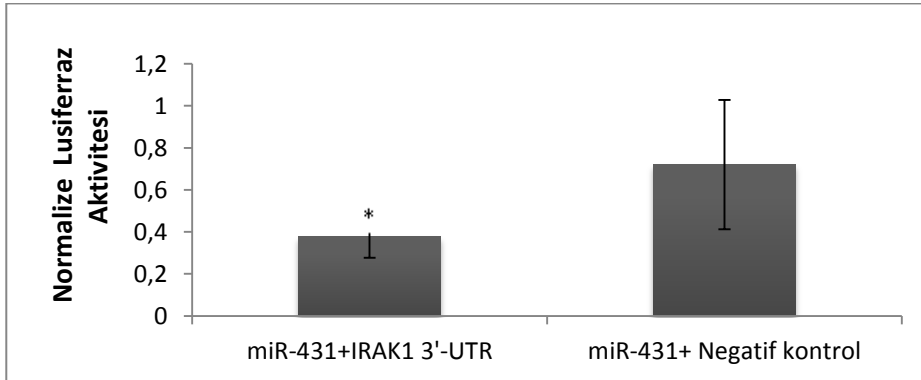
Şekil 6: miR-191 Hedef gen analizi

IL-6 3'-UTR bölgesi kullanılarak yapılan Lusiferaz testinde negatif kontrole göre lusiferaz aktivitesi anlamlı düzeyde azaldı.



Şekil 7 : miR-193 Hedef gen analizi

IL-10 3'-UTR bölgesi kullanılarak yapılan Lusiferaz testinde negatif kontrole göre lusiferaz aktivitesi anlamlı düzeyde azaldı.



Şekil 8 : miR- 431 Hedef gen analizi

IRAK1 3'-UTR bölgesi kullanılarak yapılan Lusiferaz testinde negatif kontrole göre lusiferaz aktivitesi anlamlı düzeyde azaldı.

5. TARTIŞMA

Fare mikrogial hücre hattı olan N9'u kullanarak LPS'in farklı dozlarında uyarımı ile ekspresyonu değişen miRNA'lar, ilk kez bizim çalışmamızda incelenmiştir. Bunun için öncelikle mikroarray analizi ve qPCR analizleri yapılarak, inflamasyonla ilişkili olup ekspresyonu değişen miRNA'lar belirlendi. Belirlenen bu miRNA'ların hedefleri biyoinformatik yöntemlerle saptandı. Daha sonra saptanan hedef genlerin validasyonu Lusiferaz testi ile gerçekleştirildi.

Mikroarray sonuçlarına göre ekspresyonu en fazla değişen 30 adet miRNA tespit edildi. Fakat tespit edilen hiçbir miRNA ekspresyon değişiminde istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. Mikroarray analizi sonunda, ekspresyonu değişen miRNA'lar ile ilgili literatür taranarak ve olası hedef biyoinformatik yöntemlerle incelenerek inflamasyonla ilgili olabileceği düşünülen miR-191, miR-193 ve miR-431 seçildi.

miR-191, hepatosellüler karsinomlarda (HSK) oldukça fazla eksprese edilmektedir. Yeni yapılan bir çalışmaya göre, miR-191 locusunun hipometilasyonu HSK klinik örneklerinde hsa-miR-191'in ekspresyon artışına neden olmaktadır. Bu ekspresyon artışı HSK hücrelerinin mesenkimal benzeri hücrelere geçişi indüklemektedir [96].

Kanserli doku ve normal doku arasında miRNA'ların sayıca farklı olduğu mikroarray yöntemi ile gösterilmiştir. Bu bilgi doğrultusunda yapılan bir çalışmada, miR-191'in fonksiyonel açıdan önemi incelenmiştir. Over-eksprese edilen miR-191'in akciğer kanser hücre hattında (A549) ve normal akciğer hücre hattında (BEAS-2B) herhangi bir fenotip değişikliğine neden olduğu bulunmamıştır [97]. Henüz, miR-191'in inflamasyonda rolüne dair bir çalışma yapılmamıştır. Fakat, en son yapılan bir çalışmada inflamatuvar Crohn's hastalığına sahip hasta kan örneklerinden yapılan analizlere göre miR-191 ekspresyonunda artış bulunmuştur [98].

Bizim çalışmamızda, mikroarray sonuçlarına göre 100 ng/ml LPS dozunda miR-191 ekspresyonunda artış görüldü. Fakat bu artışta herhangi bir anlamlılık saptanamadı. qPCR analizlerine göre, LPS'in uygulanan tüm dozlarında ekspresyon artışı belirlendi. Fakat sadece 10 ng/ml LPS dozunda miR-191 ekspresyonunda anlamlı bir artış saptandı. Yapılan biyoinformatik analizle miR-191'in hedef geninin proinflamatuvar sitokinlerden IL-6 olduğu

belirlendi. Bu açıdan, bizim çalışmamız miR-191'ün inflamasyona katıldığını gösteren ilk çalışma olmuştur.

siRNA ve miRNA'larla yapılan TRAIL yolağı inceleme çalışmasında, miR-193'ün kaspaz aktivitesini etkilediği gösterilmiştir [99]. Yapılan yeni bir çalışmaya göre ise, miR-193'ün kardiyak telosit hücrelerine spesifik olduğu, diğer telositlerde ile farklı eksprese edildiği gösterilmiştir [100]. Henüz, miR-193'ün inflamasyonda rolüne dair bir çalışma yapılmamıştır. Bu açıdan, bizim çalışmamız miR-193'ün inflamasyona katıldığını gösteren ilk çalışma olmuştur.

Bizim çalışmamızda, mikroarray sonuçlarına göre 100 ng/ml LPS dozunda miR-193 ekspresyonunda azalış görüldü. Fakat bu artışta herhangi bir anlamlılık saptanamadı. qPCR analizlerinde ise mikroarrayden farklı olarak, LPS'in uygulanan tüm dozlarında ekspresyon artışı belirlendi. 100 ng/ml ve 1000 ng/ml LPS dozunda miR-193 ekspresyonunda anlamlılık saptandı. Yapılan biyoinformatik analizle miR-193'ün hedef geninin anti-inflamatuar sitokinlerden IL-10 olduğu belirlendi.

miRNA'ların sayısının en yüksek olduğu doku, merkezi sinir sistemidi [101,102]. Fare beyinleri kullanılarak, yapılan bir in situ hibridizasyon çalışmasında, miR-431'in beyin ve omurilikte spesifik olarak eksprese edildiği gösterilmiştir. Özellikle ponsa oldukça fazla eksprese edildiği ortaya çıkarılmıştır [103]. Yapılan başka bir çalışmada ise, meme bezlerinin her gelişim sürecinde kendine özel miRNA ekspresyon paterni olduğu ortaya çıkarılmıştır. Hamilelik ve emzirme dönemlerinde miR-431'in down-regüle olduğu gösterilmiştir [104].

Bizim çalışmamızda, mikroarray sonuçlarına göre 100 ng/ml LPS dozunda miR-431 ekspresyonunda artış görüldü. Fakat bu artışta herhangi bir anlamlılık saptanamadı. qPCR analizlerinde ise, LPS'in uygulanan tüm dozlarında ekspresyon artışı belirlendi. 10 ng/ml ve 1000 ng/ml LPS dozunda miR-193 ekspresyonunda anlamlılık saptandı. Yapılan biyoinformatik analizle miR-431'in hedef geninin TLR-4 yolağında rol oynayan IRAK1 geni olduğu belirlendi.

miR-431'in inflamasyondaki rolüne dair bugüne kadar herhangi bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bizim çalışmamızda ise, LPS uyarımıyla miR-431 ekspresyonunda LPS dozuna bağlı anlamlı artış saptandı. Böylelikle miR-431'in inflamasyonda rolü olabileceği ilk kez gösterilmiş oldu.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda mikrogial aktivasyonda daha önceden rol aldığı gösterilmeyen ve ekspresyonunda değişiklik saptanan 3 yeni miRNA (miR-191, miR-193 ve miR-431) qPCR yöntemiyle belirlendi. Belirlenmiş olan bu miRNA'ların hedefleri biyoinformatik yöntemler kullanılarak tespit edildi ve yapılan deneysel çalışmayla bu hedeflerin validasyonu yapıldı.

Hedef validasyon deneyleri insan embriyonik böbrek hücre hattı olan, 293T hücre hattı transfekte edilerek yapılmıştır. Bunun dışında hedef validasyon deneyleri çalışmamızda kullanmış olduğumuz N9 fare mikrogial hücre hattını transfekte ederek tekrarlanmalıdır.

Yaptığımız çalışmada sadece doza bağlı miRNA ekspresyon değişimleri incelenmiştir. Buna ek olarak zamana bağlı miRNA ekspresyon değişimleri de incelenmelidir. Bu inceleme endotoksine karşı yanıtın daha iyi anlaşılması açısından gerekmektedir.

miRNA'ların biyoinformatik yöntemlerle belirlenip, daha sonra doğrulaması yapılan hedef genlerinin fonksiyonel etkileri incelenmelidir. Bunun için qPCR, ELISA veya Western-blot gibi yöntemler kullanılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Prinz M, Mildner A. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia*. 2011;59(2):177-87.
2. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*. 2007;53(2):344-54.
3. Streit WJ. Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology*. 2001;22(5):619-24.
4. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:119-45.
5. Streit WJ, Xue QS, Life and Death of Microglia, *J Neuroimmune Pharmacol*, 2009; 4 (4):371-9 .
6. Streit WJ. Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology*. 2001;22(5):619-24.
7. Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A., Microglial control of neuronal death and synaptic properties, *Glia*, 2007;55(3):233-8.
8. Milligan CE, Cunningham TJ, Levitt P. Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol*. 1991;314(1):125-35.
9. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(4):259-70.
10. Berbel P, Innocenti GM. The development of the corpus callosum in cats: a light- and electron-microscopic study. *J Comp Neurol*. 1988;276(1):132-56.
11. Thored P, Heldmann U, Gomes-Leal W, Gisler R ve ark. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia*. 2009;57(8):835-49.
12. Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH ve ark. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia*. 2006;54(8):815-25.
13. Blinzinger K, Kreutzberg G. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1968;85(2):145-57.
14. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005;308(5726):1314-8.

15. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S ve ark. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci.* 2009;29(13):3974-80.
16. Cullheim S, Thams S. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res Rev.* 2007;55(1):89-96.
17. Combs CK. Inflammation and Microglia Actions in Alzheimer's Disease. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2009;4(4):380-388.
18. D'Aversa TG, Eugenin EA, Berman JW, NeuroAIDS: contributions of the human immunodeficiency virus-1 proteins Tat and gp120 as well as CD40 to microglial activation, *J Neurosci Res*,2005; 81:436-46.
19. Kaur C, Ling EA., Periventricular white matter damage in the hypoxic neonatal brain: role of microglial cells, *Prog Neurobiol*, 2009;87:264-80.
20. Sawada M, Neuroprotective and toxic changes in microglia in neurodegenerative disease, *Parkinsonism Relat Disord*,2009; 15(1):39-41.
21. Van Berckel BN, Bossong MG, Boellaard R, Kloet R, Schuitemaker A, Caspers E, Luurtsema G, Windhorst AD, Cahn W, Lammertsma AA, Kahn RS, Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C]PK11195 positron emission tomography study, *Biol Psychiatry*,2008; 64:820-2.
22. Benarroch EE., Oligodendrocytes: Susceptibility to injury and involvement in neurologic disease, *Neurology*, 2009; 72:1779-85.
23. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci.* 1996;16(8):2508-21.
24. Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* 2002;40(2):133-9.
25. Streit WJ, Miller KR, Lopes KO, Njie E. Microglial degeneration in the aging brain- bad news for neurons? *Front Biosci.* 2008;13:3423-38.
26. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1387-94.
27. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 2004;173(6):3916-24.
28. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):179-90.

29. Färber K, Kettenmann H. Purinergic signaling and microglia. *Pflügers Arch.* 2006;452(5):615-21.
30. Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 2007;30(10):527-35.
31. Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ ve ark. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2006;113(11):1685-95.
32. Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, Joyce J ve ark. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol.* 2007;82:235-46.
33. McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG. Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol.* 1988;76(6):550-7.
34. Moran LB, Graeber MB. Towards a pathway definition of Parkinson's disease: a complex disorder with links to cancer, diabetes and inflammation. *Neurogenetics.* 2008;9(1):1-13.
35. Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L ve ark. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2008;29(11):1690-701.
36. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol.* 2010;87(5):779-89.
37. Merson TD, Binder MD, Kilpatrick TJ. Role of cytokines as mediators and regulators of microglial activity in inflammatory demyelination of the CNS. *Neuromolecular Med.* 2010;12(2):99-132.
38. Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG ve ark. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science.* 2006;312:1389–1392.
39. Sargsyan SA, Blackburn DJ, Barber SC, Monk PN ve ark. Mutant SOD1 G93A microglia have an inflammatory phenotype and elevated production of MCP-1. *Neuroreport.* 2009;20(16):1450-5.
40. Gowing G, Philips T, Van Wijmeersch B, Audet JN ve ark. Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *J Neurosci.* 2008;28(41):10234-44.
41. Carson MJ, Crane J, Xie AX, Silva GA, Modeling CNS microglia: the quest to identify predictive models, *Drug Discov Today Dis Models.* 2008 ; 5(1): 19–25.

42. Saper CB, Sawchenko PE. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 2003;465(2):161-3.
43. Rhodes KJ, Trimmer JS. Antibodies as valuable neuroscience research tools versus reagents of mass distraction. *J. Neurosci.* 2006;26:8017–20.
44. Bushati N, Cohen SM., MicroRNA functions, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007;23:175-205.
45. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D140-4.
46. Barbato C, Giorgi C, Catalanotto C, Cogoni C. , Thinking about RNA? MicroRNAs in the brain, *Mamm Genome*, 2008;19:541-51.
47. Fiore R, Siegel G, Schratt G. , MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease, *Biochim Biophys Acta* , 2008;1779: 471-8.
48. Gao FB., Posttranscriptional control of neuronal development by microRNA networks. *Trends Neurosci* , 2008;31: 20-6.
49. Kocerha J, Kauppinen S, Wahlestedt C, MicroRNAs in CNS disorders, *Neuromolecular Med*,2009; 11(3):162-72.
50. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
51. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH ve ark. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23:4051-60.
52. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:17719-24.
53. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW ve ark. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* 2006;125:887-901.
54. Brownawell AM, Macara IG. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol.* 2002;156:53-64.
55. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE ve ark. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 2004;303:95-8.
56. Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E ve ark. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 2001;293(5531):834-8.

57. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T ve ark. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2001;15(20):2654-9.
58. Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM et al. A mikrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature.* 2003 Sep 25;425(6956):411-4.
59. Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F et al. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 2003;301: 1921–1925.
60. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous mikroRNAs. *Genes Dev.* 2002;16(6):720-8.
61. Tomari Y, Du T, Haley B, Schwarz DS et al. RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell.* 2004 Mar 19;116(6):831-41.
62. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J ve ark. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005;436:740-4.
63. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK ve ark. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 2006;25:522-32.
64. Valoczi A, Hornyik C, Varga N, Burgyan J ve ark. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research.* 2004;32:e175.
65. Gupta A, Mo YY. Detection of microRNAs in cultured cells and parafin-embedded tissue specimens by in situ hybridizaion. *Methods in Molecular Biology.* 2010;676:73-83.
66. Krichesky AM, King KS, Donaheu CP, Khrapko K ve ark. A microarray reveals extensive regulation of microRNA during brain development. *RNA.* 2003;9:1274-1281.
67. Shena M, Shalon D, Davis R, Brown PA. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995;270:467-470.
68. Ranade AR, Weiss GJ. Methods for microRNA microarray profiling. *Methods Mol Biol.* 2011;700:145-52.

69. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19:185-193.
70. Steinhoff C, Vingron M. Normalization and quantification of differential expression in gene expression microarrays. *Brief Bioinformatics*. 2006;7:166-177.
71. Sarkar D, Parkin R, Wyman S, Bendoraite A ve ark. Quality assessment and data analysis for microRNA expression arrays. *Nucleic Acids Research*. 2009;37:e17.
72. Kutuyavin IV, Afonina IA, Hown W, Lukhtanoc EA ve ark. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*. 2000;28:655-661.
73. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25:402-408.
74. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B ve ark. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0034.
75. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004;64(15):5245-50.
76. Nuovo GJ. In situ detection of microRNAs in paraffin embedded, formalin fixed tissues and the co-localization of their putative targets. *Methods*. 2010;52(4):307-15.
77. Schneider M, Andersen DC, Silahdaroglu A, Lyngbæk S ve ark. Cell-specific detection of microRNA expression during cardiomyogenesis by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Mol Histol*. 2011 Jun 5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21643937.
78. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R ve ark. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*. 2005;37:495-500.
79. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T ve ark. Human MicroRNA targets. *PLoS Biology*. 2004;2:e363.
80. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
81. Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP ve ark. Prediction of mammalian

- microRNA targets. *Cell*. 2003;115:787-798.
82. Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, Terry AV Jr ve ark. Experimental validation of miRNA targets. *Methods*. 2008;44(1):47-54.
 83. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):111-22.
 84. Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(4):514-20.
 85. Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, Sthandier O ve ark. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):19849-54.
 86. Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V ve ark. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*. 2005;123(5):819-31.
 87. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP ve ark. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med*. 2008;205(3):585-94.
 88. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(17):7113-8.
 89. Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D ve ark. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(13):5282-7.
 90. Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: Crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev*. 2010 Jul 11. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20627134.
 91. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G ve ark. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(5):1604-9.
 92. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S ve ark. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*. 2007;179(8):5082-9.

93. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-6.
94. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin Cve ark. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol*. 2010;11(2):141-7.
95. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):89-105.
96. He Y, Cui Y, Wang W, Guo S, Ma K, Luo X, Hypomethylation of the hsa-miR-191 locus causes high expression of hsa-miR-191 and promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma, 2011;13(9): 841–853.
97. Patnaik SK, Kannisto E, Yendamuri S, Overexpression of MicroRNA miR-30a or miR-191 in A549 lung cancer or BEAS-2B normal lung cell lines does not alter phenotype, *PLoS ONE*, 2010;5 (2) 9219.
- 98.
99. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G ve ark. Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease, *J Crohns Colitis*, 2012 Feb 28 [Epub ahead of print].
100. Ovcharenko D, Kelnar K, Johnson C, Identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis genome-scale microRNA and small interfering RNA screens, *Cancer Res*, 2007;67:10782-10788.
101. Cismasiu VB, Radu E, Popescu LM, MiR-193 expression differentiates telocytes from other stromal cells, *J. Cell. Mol. Med*, 2011;15(5): 1071-1074.
102. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V, Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation, *Genome Biol*.2004; 5: R13.
103. Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH, MicroRNA expression in zebrafish embryonic Development, *Science*,2005; 309: 310–311.
104. Wheeler G, Dalmay T, Ntounia-Fousara S, Granda B, Rathjen T, Identification of new central nervous system specific mouse microRNAs, *FEBS Letters*,2006; 580:2195–2200.

105. Li Q, Wang C, Identification, of differentially expressed micornas during the development of chinese murine mammary gland, *Journal of Genetics and Genomics*, 2007;34(11): 966-973.

8. EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
AÇIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43
	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	125-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mikroglial Aktivasyonda mikroRNA'ların Rolü
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Kürşad GENÇ Doç.Dr.Şermin GENÇ Araş.Gör.Kemal Uğur Tüfekçi YL.Öğr.Serpen DURNAOĞLU D.E.Ü.Sağlık Bilimleri Sinir Bilimleri A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/08-07	Tarih:17.03.2011
	Doç.Dr.Kürşad GENÇ'in sorumlusu olduğu "Mikroglial Aktivasyonda mikroRNA'ların Rolü" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	Beati
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Osman
Prof.Ph.D..Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	İzmir
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	N.Ş.
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Ömer
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ece
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Hüseyin
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Toplantıda
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	M. Güneli
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Toplantıda
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	İşıl
Prof.Ph.D.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Meltem
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	İhsan

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI Serpen DURNAOĞLU

TC Kimlik No / Pasaport No:	
Doğum Yılı:	02.04.1985
Yazışma Adresi :	263/1 sok. No:5 D:40 Bornova-Özkanlar 35040 İzmir
Telefon :	05359861088
Faks :	
e-posta :	serp_durna@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	Fen Fakültesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Lisans	2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		

Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	
---	--

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐	9. USBK poster ödülü	9. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi	2010

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

“Patient-Specific Pluripotent Stem Cells in Neurological Diseases”, Durnaoglu S, Genc S,Genc K ,Stem Cells International,2011

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

“Mikroglial Aktivasyonda Endotoksin Uyarımıyla Ekspresyonu Değişen miRNA’ların Belirlenmesi ve Fonksiyonel Analizleri”, Kemal Uğur Tüfekci, Serpen Durnaoglu, Şermin Genç, Kemal Kürşad Genç, 10. Ulusal Sinir Bilimleri Kongresi, 2011, İstanbul
“Mikroglial Hücrelerin Endotoksine Karşı mikroRNA Yanıtı ”, Kemal Uğur Tüfekci, Serpen Durnaoglu, Şermin Genç, Kemal Kürşad Genç, 9. Ulusal Sinir Bilimleri Kongresi,2010, İstanbul
“Aktive Protein C’ nin SH-SY5Y Hücre Hatlarında Oksidatif Strese Karşı Koruyucu Etkisi”, Serpen Durnaoglu, Şermin Genç, 9. Ulusal Sinir Bilimleri Kongresi,2010, İstanbul