

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKROGLİAL AKTİVASYONDA
LİPOPOLİSAKKARİT UYARIMIYLA
EKSPRESYONU DEĞİŞEN MİKRORNA'LARIN
BELİRLENMESİ**

KEMAL UĞUR TÜFEKÇİ

TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2011

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2009970145

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKROGLİAL AKTİVASYONDA
LİPOPOLİSAKKARİT UYARIMIYLA
EKSPRESYONU DEĞİŞEN MİKRORNA'LARIN
BELİRLENMESİ**

**TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

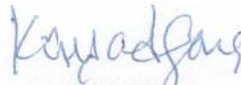
KEMAL UĞUR TÜFEKCİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Kemal Kürşad Genç

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 109S421 proje numarasıyla desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2009970145

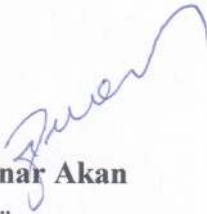
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Yüksek Lisans programı öğrencisi Kemal Uğur Tüfekçi “**MİKROGLİAL AKTİVASYONDA LİPOPOLİSAKKARİT UYARIMIYLA EKSPRESYONU DEĞİŞEN MİKRORNA’LARIN BELİRLENMESİ**” konulu Yüksek Lisans tezini 08/08/2011 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


BAŞKAN

Prof. Dr. Kemal Kürşad Genç

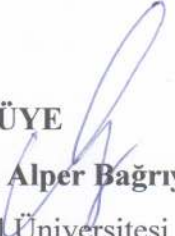
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÜYE


Doç. Dr. Pınar Akan

Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÜYE


Doç. Dr. H. Alper Bağrıyanık

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ÜYE (Yedek)

Doç. Dr. İbrahim Öztura

Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÜYE (Yedek)

Doç. Dr. Ahmet Koç

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Mikroglial Hücreler.....	7
2.1.1. Tarihçe ve Hücrelerin Kökeni.....	7
2.1.2. Mikroglia Fonksiyonları ve Mikroglial Aktivasyon.....	8
2.1.3. Mikroglial Hücreler ve Hastalıklarda Rollerini.....	11
2.1.4. Mikroglia Çalışma Yöntemleri.....	15
2.2. MikroRNA.....	18
2.2.1. miRNA Biyogenezini.....	18
2.2.2. miRNA'ların Regülasyonu.....	22
2.2.3. miRNA Deteksiyon Yöntemleri.....	22
2.2.4. miRNA Hedef Belirleme Çalışmaları.....	25
2.2.5. Doğal Bağışıklık Sisteminde miRNA'lar.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Araştırmanın Tipi.....	28
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	28
3.3. Çalışma Materyali.....	28
3.4. Çalışmanın Değişkenleri.....	28
3.5. Veri toplama Araçları.....	28
3.5.1. Hücre Kültürü.....	28
3.5.2. Mikroarray ve Real-time PCR İçin <i>in vitro</i> Deney.....	29
3.5.3. RNA izolasyonu.....	30
3.5.4. Mikroarray Analizi.....	30

3.5.5. Kantitatif PCR Analizi.....	31
3.5.6. miRNA Hedef Genleri Analizi.....	32
3.5.7. Lusiferaz Testi.....	32
3.6. Araştırma Planı.....	36
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi.....	36
3.8. Araştırmanın sınırlılıkları.....	36
3.9. Etik Kurul Onayı.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. LPS Uyarımıyla Ekspresyonu Değişen miRNA'ların Mikroarray Yöntemiyle Belirlenmesi.....	38
4.2. LPS Uyarımıyla Ekspresyonu Değişen miRNA'ların qPCR Yöntemiyle Belirlenmesi.....	39
4.3. Ekspresyon Değişimi Saptanan miRNA'ların Biyoinformatik Araçlarla Hedef Analizleri.....	40
4.4. Lusiferaz Testi ile Hedef Genlerin Doğrulanması.....	41
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
7. KAYNAKLAR.....	50
8. EKLER.....	68
EK-1 Etik Kurul Onayı.....	68

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Mikroglial aktivasyona sebep olan sinyaller ve aracı moleküller.....	9
Tablo 2: cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri.....	31
Tablo 3: qPCR analizi için reaksiyon bileşenleri.....	32
Tablo 4: Mikroarray sonucuna göre ekspresyonu değişen miRNA'lar.....	38
Tablo 5: 10 ng/ml LPS dozunda miRNA'ların ekspresyon değişimleri.....	39
Tablo 6: 100 ng/ml LPS dozunda miRNA'ların ekspresyon değişimleri.....	39
Tablo 7: 1000 ng/ml LPS dozunda miRNA'ların ekspresyon değişimleri.....	39
Tablo 8: Hedef genler.....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1: LPS hücre içi sinyalleme mekanizması.....	10
Şekil 2: miRNA Biyogenezi.....	20
Şekil 3. miRNA ekspresyon plazmiti.....	33
Şekil 4: miRNA hedef gen plazmiti.....	34
Şekil 5: qPCR analizleri.....	40
Şekil 6: miR-125b Hedef gen analizi.....	41
Şekil 7: miR-132 Hedef gen analizi.....	41
Şekil 8: miR-146a Hedef gen analizi.....	42
Şekil 9: miR-155 Hedef gen analizi.....	42
Şekil 10: LPS sinyallesinde miRNA'lar.....	44

KISALTMALAR

A β : Amiloid- β

AchE: Asetilkolinesteraz

Ago2: Argonaute-2

AH: Alzheimer hastalığı

AIDS: Edinilmiş immün yetmezlik sendromu (Acquired immune deficiency syndrome)

ALS: Amyotrofik lateral skleroz

APC: Antijen sunucu hücreler (Antigen presenting cells)

cDNA: Komplementer DNA (Complementary DNA)

C/EBP- α : CCAAT/enhancer-bağlanan protein- α (CCAAT/enhancer-binding protein- α)

C/EBP- β : CCAAT/enhancer-bağlanan protein- β (CCAAT/enhancer-binding protein- β)

CREB: cAMP yanıt elemanı bağlanma proteini (cAMP response element binding)

CSF-1: Koloni uyarıcı faktör 1 (Colony stimulating factor 1)

DC-SIGN: DH'ye özgü intersellüler adhezyon molekülü-3 tutan non-integrin (Dendritic Cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin)

DGCR8: DiGeorge sendrom kritik bölge gen 8

DH: Dendritik hücre

EAE: Deneysel otoimmün ensefalomyelit (Experimental autoimmune encephalomyelitis)

Exp-5: Ekspartin-5 (Exportin-5)

FADD: Fas-ilişkili ölüm domaini proteini (Fas-associated death domain protein)

FBS: Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)

FDG: [^{18}F] 2-floro-2-deoksi-D-glukoz

FMRP: Frajil X mental retardasyon proteini

Gfi1: Growth factor independent 1

GFP: Yeşil floresan protein (Green fluorescent protein)

GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte macrophage colony stimulating factor)

HAND: HIV ile ilişkili nörokognitif bozulmalar (HIV associated neurocognitive disorders)

HIV: İnsan immün yetmezliği virüsü (Human immunodeficiency virus)

İHK: İmmünohistokimya

İSH: *In situ* hibridizasyon

IFN γ R: İnterferon-gamma reseptörü
IKK ϵ : I κ B kinaz epsilon (I κ B kinase epsilon)
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
MAF: Makrofaj/mikroglia aktive edici faktör
MAPK: Mitojen aktive eden protein kinaz (Mitogen activated protein kinase)
MCP-1: Monosit kemoatraktant protein-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)
MHC: Büyük doku uygunluk kompleksi (Major histocompatibility complex)
MHV68: Mürin γ -herpes virüsü 68
miRNA: MikroRNA
mRNA: Messenger RNA
MS: Multiple Skleroz
mSOD: Mutant süperoksit dismutaz
MSS: Merkezi sinir sistemi
MyD88: Myeloid diferansiyasyonu primer yanıt proteini 88
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
PBBS: Periferik benzodiazepin bağlanma bölgesi (Peripheral benzodiazepine binding site)
PBS: Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon (Phosphate buffered saline)
PET: Pozitron emisyon tomografisi
PH: Parkinson hastalığı
pre-miRNA: Prekürsör miRNA
pri-miRNA: Primer-miRNA
PRR: Patern tanıma reseptörü (Pattern recognition receptor)
qPCR: Kantitatif PCR
RIG-I: Retinoik asit ile indüklenen gen I (Retinoic acid-inducible gene I)

Ripk1: Reseptör (TNFR süperaillesi)-ile etkileşen serin-treonin kinaz 1 [Receptor (TNFR superfamily)-interacting serine-threonine kinase 1]

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)

SHIP1: SH2-domain içeren inositol-5-fosfataz 1 (SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase 1)

SN: Substantia nigra

snoRNA: Küçük nükleolar RNA'lar (Small nucleolar RNA)

snoRNP: Küçük nükleolar ribonükleoprotein (small nucleolar ribonucleoprotein)

SOCS1: Sitokin sinyallemeinin baskılayıcısı 1 (Suppressor of cytokine signaling 1)

TGF- β : Transforming growth factor- β

TLR: Toll-like reseptör

TNF- α : Tümör nekrozis faktör α

TRBP: Transaktivasyon-responsive RNA-binding protein

TRAF6: Tümör nekrozis faktör reseptörü ilişkili faktör 6 (TNF-receptor associated factor 6)

TREM-2: Myeloid hücrelerde eksprese olan reseptör-2 (the receptor expressed on myeloid cells-2)

TTM: Trikotillomani

UTR: Translasyon olmayan bölge (Untranslated region)

VSV: Veziküler somatit virüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, tezin projelendirme, uygulama ve yazım aşamalarında yardımcı olan, her gün yeni bir fikirle ufkumu açan danışmanım Prof. Dr. Kemal Kürşad GENÇ’e,

Lisans eğitiminin son yılından bu yana “Neuroscience” alanına her geçen gün daha da ilgili olmamı sağlayan, laboratuvar çalışmalarının tümünde yol gösterici olan ve her konuda kendisinden yardım isteyebildiğim ikinci danışmanım Doç. Dr. Şermin GENÇ’e,

Transformasyon denemelerimiz için laboratuvarını ve malzemelerini kullanmamızı sağlayan Doç. Dr. Ahmet KOÇ’a,

Çalışmada birbirimize yardımcı olduğumuz ekip arkadaşım Serpen DURNAOĞLU’na ve manevi olarak destekleyen ekip arkadaşlarım Banu ÇİDİK, Zeynep Filiz ZADEOĞLULARI, Ufuk VURGUN ve Meryem Gülfem ÖNER ve arkadaşlarım Aslı ÇELİK ve Duygu HARMANCI’ya,

Doğduğum günden bugüne sahip olduğum her şey için annem Remziye TÜFEKÇİ ve babam Hasan Tahsin TÜFEKÇİ’ye,

Projeyi maddi yönden destekleyen TÜBİTAK’a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Kemal Uğur TÜFEKÇİ

MİKROGLİAL AKTİVASYONDA LİPOLİSAKKARİT UYARIMIYLA EKSPRESYONU DEĞİŞEN MİKRORNA'LARIN BELİRLENMESİ

Kemal Uğur Tüfekci, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Sinirbilimler Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Mikroglial hücreler, merkezi sinir sisteminin (MSS) hematopoetik kökenli yerel makrofajları olarak görev yapmaktadırlar. MSS'nde, pek çok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde mikroglial aktivasyonla indüklenen inflamasyon yer almaktadır. MikroRNAlar (miRNA) post-transkripsiyonel regülasyon mekanizmalarında rol alan kodlanmayan küçük RNA'lardır. Bu çalışmamızda, MSS'nde inflamasyon ile ilişkili miRNA'ların ve hedeflerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada N9 fare mikroglia ve 293T insan embriyonik böbrek hücre hatları kullanılmıştır. Deneylerde 10-1000 ng/ml Lipopolisakkarid (LPS) dozlarında N9 hücreleri inkübe edildi. Ön çalışmada 100 ng/ml LPS dozu kullanılarak miRNA ekspresyon değişimleri mikroarray yöntemiyle belirlendi. Mikroarray analizinde ekspresyonu değişen miRNA'lardan miR-125b-3p, miR-132, miR-146a ve miR-155'in ekspresyon değişiklikleri kantitatif PCR (qPCR) yöntemiyle incelendi. Ekspresyon değişikliği doğrulanan miRNA'ların hedef genleri biyoinformatik analizle belirlendi. Lusiferaz testi ile hedef genler için validasyon deneyleri yapıldı.

Yapılan mikroarray analizinde en fazla ekspresyon değişimi gösteren 30 tane miRNA belirlendi. qPCR analizinde miR-125b-3p ekspresyonunun azaldığı, miR-146a ve miR-155'in ekspresyonunun arttığı gösterildi. Hedef validasyonu deneyleri ile biyoinformatik araçlarla belirlenen hedef genler (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IRAK1, TRAF6 ve MyD88) doğrulandı.

Bu çalışmanın sonucunda mikrogliyal aktivasyonla ilişkili miRNA'lar karakterize edilmiştir. Bu miRNA'lerden miR-125b'nin TNF- α ve IL-1 β 'y1, miR-132'nin IL-6'y1, miR-146a'nın IRAK1 ve TRAF6'y1 ve miR-155'in MyD88'i hedeflediğı gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Mikrogliyal aktivasyon, Lipopolisakkarit, mikroRNA

CHARACTERIZATION OF DEREGULATED MICRORNAS IN MICROGLIAL ACTIVATION BY ENDOTOXIN STIMULATION

Kemal Uğur Tüfekci, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience, 35340, Inciraltı, İzmir

ABSTRACT

Microglial cells are the hematopoietic originated immune cells of the central nervous system (CNS). They are resident macrophages of CNS. In CNS, they play a role in inflammation mechanism of most neurodegenerative diseases. MicroRNAs (miRNAs) are the non-coding small regulatory RNAs playing role in post-transcriptional regulation. In this study, neuro-inflammation related miRNAs and their targets were aimed to be determined.

In this study, N9 murine microglial and 293T human embryonic kidney cell lines were used. In the experiment, N9 cells were treated with 10-1000ng/ml doses of Lipopolysaccharide (LPS). In preliminary study, by using 100 ng/ml LPS, miRNA expression changes were determined by microarray. Of microarray-characterized miRNAs, miR-125b-3p, miR-132, miR-146a and miR-155 were further analyzed by quantitative PCR (qPCR). Of verified miRNAs, miRNA target genes were determined by bioinformatic analysis and targetes were validated by luciferase assay.

According to miRNA array analysis, 30 mostly changed miRNAs are detected. As a result of qPCR analyses, miR-125-3p expression was reduced while miR-146a and miR-155 expressions were increased. Target validation experiments verified the bioinformatically determined miRNA target genes (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IRAK1, TRAF6 and MyD88).

This study helped the characterization of the miRNAs related to microglial activation. Of these microRNAs, it was shown that miR-125b targets TNF- α and IL-1 β mRNAs, miR-132 targets IL-6 mRNA, miR-146a targets IRAK1 and TRAF6 mRNAs and miR-155 targets MyD88 mRNA.

Key Words: Microglial activation, Lipopolysaccharide, microRNA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikroglial hücreler merkezi sinir sisteminde (MSS) bulunan immün hücrelerdir. Mikroglia prekürsör hücreleri fetal dönemde kemik iliğinde oluşup beyine göç etmektedir. MSS’nde mikroglial hücreler gelişim sırasında görülen apoptotik hücre ölümü sonucunda oluşan artıkları sindirmekle görevlidir. Yetişkin dönemde ise enfeksiyon ve hastalık durumları dışında inaktif halde bulunmaktadır. Mikroglial hücreler; Parkinson, Alzheimer gibi nörodejeneratif, Multiple Skleroz gibi otoimmün nöroinflamatuvar, Stroke gibi akut vasküler nöroinflamatuvar, nöro-AIDS (Edinilmiş immün yetmezlik sendromu) ve şizofreni gibi hastalıklarda aktifleşerek nöroprotektif veya nörotoksik olmak üzere iki fenotipe yönelmektedir. Nörotoksik fenotipe dönüşüm sürecinde hücrelerin yüzeyinde bulunan Toll-like reseptörler (TLR) ve interferon-gamma reseptörü (IFN γ R) gibi çeşitli reseptörler uyarılarak veya CD200 ve CD47 gibi inhibitör reseptörler baskılanarak mitojen aktive eden protein kinaz (Mitogen activated protein kinase; MAPK), Jun Kinaz sinyal yolları üzerinden Nükleer Faktör Kappa-B (NF- κ B) gibi transkripsiyon faktörleri aktive olmaktadır. Sonuçta hücrede pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu sağlanır. Aktivasyon sırasında fenotipler arasındaki dönüşüm post-transkripsiyonel ve post-translasyonel regülatör mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir.

Kodlanmayan RNA’lar ailesinden olan mikroRNA’lar (miRNA) gen regülasyonunda rol alırlar. miRNA’lar genomda RNA polimeraz II tarafından transkribe edilip çeşitli işlemlerden geçerek matür forma dönüşürler. Matür miRNA’lar çeşitli proteinlerle kompleks oluşturarak hedef gen messenger RNA’sına (mRNA) bağlanırlar. Hedef mRNA’yı parçalayarak ya da translasyonunu inhibe ederek fonksiyon görürler. miRNA’lar fizyolojik ve patolojik tüm mekanizmalarda rol almaktadır. Periferik immün hücrelerde inflamasyonu düzenledikleri gösterilmiştir.

Bu çalışmadaki amaç MSS’de mikroglial hücrelerde aktivasyon mekanizmalarında rol alan miRNA’ların belirlenmesidir. Bu amaçla, çalışmamızda mikroglial hücreler, bakteri hücre duvarının ana bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS) ile inkübe edildi. miRNA ekspresyonlarındaki değişiklikler mikroarray ve kantitatif PCR (qPCR) yöntemleriyle belirlendi. Ekspresyon değişimi saptanan miRNA’ların hedeflediği olası genler

biyoinformatik analizle belirlendi. Lusiferaz testi kullanılarak hedef genlerin deneysel doğrulaması yapıldı.

H1: LPS ile uyarılan N9 fare mikroglia hücrelerinde miRNA ekspresyonlarında değişiklik olur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroglial Hücreler

MSS’nde nöronal, glial ve vasküler olmak üzere 3 ana türde hücre bulunmaktadır. Mikroglial hücreler glial hücre tipindedir. Mikroglial hücreler yaklaşık olarak 80 yıl önce bulunmasına rağmen hücrelerin kökeniyle ilgili kesin bir bilgi bulunmamaktadır.

2.1.1. Tarihçe ve Hücrelerin Kökeni

Mikroglial hücreler ilk kez 1932 yılında del Rio-Hortega tarafından sinir sisteminin üçüncü elemanı olarak tanımlanmıştır. Rio-Hortega’nın ışık mikroskobu ve gümüş boyama teknikleri kullanılarak yaptığı ilk araştırmalar sonucunda mikroglial hücrelerin mezodermal pial elementlerin MSS’ne invazyonu ile oluştuğu ortaya atıldı. Bununla birlikte kandaki mononükleer hücreler de potansiyel kaynak olarak öne sürüldü [1].

MSS’nde bol miktarda bulunan dallanmış mikroglia fetal makrofajlardan köken almaktadır. Fetal makrofajlar ise erken embriyonik gelişim sırasında gelişen mezoderminden köken almaktadır. Rodentlerde fetal makrofajların nöroepitelyuma girişi gestasyonun orta veya daha önceki dönemlerinde; insanlarda ise gebeliğin ilk trimesterinde başlamaktadır [2-4]. Fetal makrofajların ise yolk kesesindeki kan adacıklarında bulunan primitif makrofajlardan oluştuğu düşünülmektedir [5-7]. Fetal makrofajların embriyonik beyine girişi, türe, incelenen bölgeye ve embriyonik yaşa bağlı olarak değişik yollardan olmaktadır [3, 8, 9]. Fetal makrofajlar, rodentlerde perinatal dönem boyunca 2. postnatal haftaya kadar kalır, sonrasında ameboid mikroglial hücre olarak anılırlar [9, 10]. Bu dönemdeki mikroglial hücreler henüz dallanmamış bir morfolojiye sahip, kolay prolifer olup, mobil ve fagositik karakteristiktir [5, 7, 11, 12]. Ameboid mikroglia göze çarpan şekilde beyaz cevher bölgesinde çoğalmakta, supraventriküler korpus kallozum bölgesinde belirgin kümeler oluşturmaktadır [9, 13, 14]. Bu kümeler farklılaşmayı tamamlamış ve dallanmış hale geçerek mikrogliojenik kümelerden yakın bölgedeki gri cevhere göç eder. Ameboid ve dallanmış mikroglial hücreler antijenleriyle birbirinden ayrılmaktadır. Ameboid mikroglia ED1 antijeni eksprese ederken dallanmış mikroglia ED1 eksprese etmemektedir [15]. Makrofaj markeri ED1 intrasitoplazmik lizozomal bir antijendir, ekspresyonu fagositoz sırasında artmaktadır [16]. Doğum sırasında ED1-pozitif hücreler MSS’nde yaygın iken, postnatal 3. haftadan sonra

tamamen ortadan kaybolmaktadır [15]. Bu durum postnatal 3. haftanın sonunda ameboid mikrogliyal hücrelerin tümünün dallanmış mikrogliyal hücrelere dönüştüğünün göstergesidir. Ancak, MSS travmatik hasarının ardından ve yaşlanma sürecinde dallanmış mikrogliyal hücreler ED1 eksprese ederek, tekrar fagositik faza geçerler [17, 18]. Travma ve yaşlılık durumlarında mikrogliya aktivitesi farklı sebep ve farklı zaman skalalarından dolayı artmaktadır. Yaşlılık döneminde dallanmış mikrogliyal hücrelerde ED1 ekspresyonu zaman zaman olmakta ve hücre içinde hücre senesensine bağlı olarak miktarı azalmaktadır [19].

Mikrogliyal hücrelerin kökenini inceleyen yakın zamanda yapılan çalışmada yetişkin beyinlerinde hematopoetik progenitör hücrelerin mikrogliya homeostazına katkılarının olmadığı gösterildi [20]. Çalışmada koloni uyarıcı faktör 1 (colony stimulating factor 1; CSF-1) eksprese etmeyen farelerde mikrogliya gelişimi olurken CSF-1 reseptörü eksprese edilmeyen organizmada ise mikrogliya gelişimi olmadı. Gelişim sürecinde oluşan hücrelerin hangi hücre neslinden geldiğini belirlemek amacıyla nesil izleme (lineage tracing) analizi yapılmaktadır [21]. Bu yöntemde *in situ* olarak canlı progenitör hücreye floresan boya enjekte edilip en son oluşan hücreler karakterize edilmektedir. Ginhoux ve ark. tarafından gerçekleştirilen nesil izleme çalışmalarının sonuçları mikrogliyal hücrelerin embriyonik 8.gün'den önce oluşan primitif myeloid progenitör hücrelerden olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara göre mikrogliyal hücrelerin ontojenik olarak periferik fagositik hücrelerden farklı bir popülasyondan oluştuğunu düşündürmektedir.

2.1.2. Mikrogliya Fonksiyonları ve Mikrogliyal Aktivasyon

Mikrogliyal hücreler yukarıda da belirtildiği gibi makrofaj benzeri fagositik hücrelerdir ve Apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında görev almaktadır [4, 22]. Bu fonksiyonlarından dolayı beyin dokusunun gelişim sırasında şekillenmesinde, özellikle beyaz cevher aksonlarının oluşumunda ve bazı hücre projeksiyonlarının eliminasyonunda görevli olduğu düşünülmektedir [15, 23, 24]. Mikrogliyanın nörogenez sırasında yönlendirici ve destekleyici rolleri olduğu da öne sürülmektedir [25, 26]. Bu süreç yetişkin dönemde de devam ettiği için sadece gelişim dönemiyle kısıtlanmamalıdır. Mikrogliyal hücrelerin nörogenezin yanında gelişim ve yetişkin dönemde sinaptogenezde de rol oynadıkları öne sürülmektedir [22]. Bu rollerinin aksine, uzun yıllardır mikrogliyal hücrelerin sinaps eliminasyonunda da rol aldığı düşünülmektedir. Bunu destekleyen bir bulgu olarak

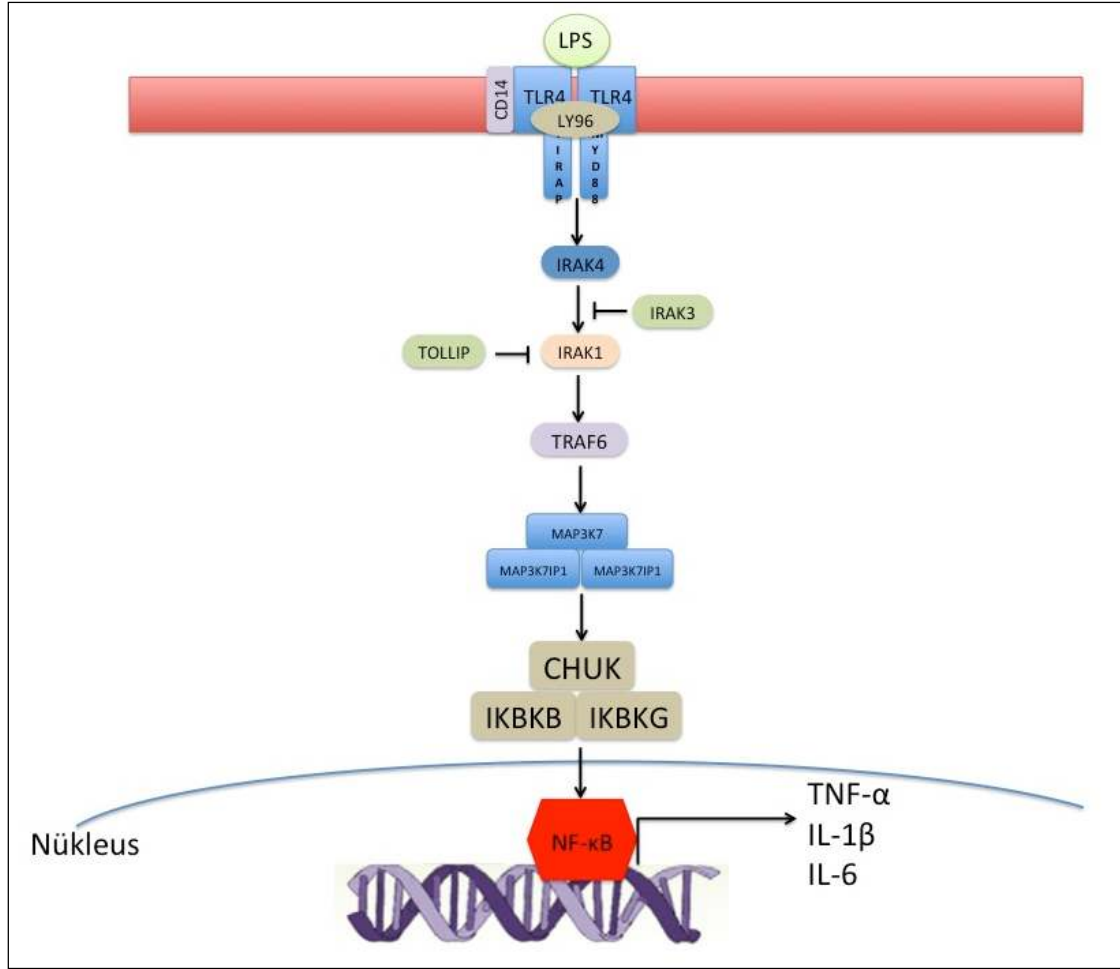
aksotomize fasiyel motor nöronların sinapslarının mikroglial hücreler tarafından ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir [27]. Bu konuyla ilgili son zamanlarda yapılan çalışmada gösterilen ise mikroglial hücrelerin iki-foton mikroskopi [28] tekniğiyle yapılan analizde uzun süre mikroglia ile temas halinde kalan sinapsların ortadan kaybolduğudur [29]. Bu verilere dayanarak mikroglial hücreler sinaptik plastisiteye dolaylı olarak katkı sağlamaktadır [30].

Tablo 1: Mikroglial aktivasyona sebep olan sinyaller ve aracı moleküller

Molekül Sınıfı	Örnekler
Yüzey yapıları, virüs, bakteri ve fungal kökenli DNA/RNA	TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR6/2 ve TLR9 agonistleri: LPS, hücre duvarı peptidoglikanları, lipoteikoik asit, gp41, gp120
Anormal endojen proteinler	β -Amiloid agregatları, A β 25-35, A β 40, A β 42, Prion protein (PrP)
Kompleman sistem	Kompleman faktör C1q ve C5a
Antikorlar	Değişik sınıf ve izotipteki immunoglobulinler (IgA, IgG, IgM)
Sitokinler	Koloni uyarıcı faktörler (M-CSF, GM-CSF), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ , TGF- β , TNF- α
Kemokinler	CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR, CXCR4, CX3CR1, IL-8R reseptörlerine bağlanan ligantlar
Nörotrofik faktörler	BDNF, GDNF, Sinir büyüme faktörü (NGF), Nörotrofin-3 (NT-3), NT-4
Plazma bileşenleri	Albumin, Fibronektin, Fibrinojen, Trombin
Diğer protein ve peptitler	Apolipoprotein E (ApoE), Isı şoku proteinleri hsp60 ve hsp70, CD40L, melanosit uyarıcı hormon (MSH), endotelin, S100 proteinleri, vazoaaktif intestinal peptid
Nörotransmisyon ilişkili peptitler	ATP (ve ilgili pürinler), β -adrenerjik agonistler, glutamat, kainat, NMDA
İyonlar	K ⁺ , Mn ⁺²
Diğer moleküller	Kannabinoid, Seramid, gangliositler, lizofosfatidik asit, melatonin, opioidler, platelet aktive edici factor (PAF), prostaglandin E ₂ (PGE ₂), steroid hormonlar, D ₃ vitamini

İki-foton mikroskopi yöntemiyle mikroglial hücreler canlı beyinlerde doğrudan incelenebilmektedir [28]. Elde edilen sonuçlar histolojik, ex vivo ve in vitro çalışmaların görsel doğrulaması niteliğindedir. İki-foton mikroskopi yöntemiyle yapılan çalışmalar mikroglialın istirahat halinde de dinamik olduğunu ve palpasyon benzeri hareketler yaptığını

göstermektedir [11, 31-34]. Bu dinamik hareketler ile sürekli olarak MSS mikroçevresini kontrol etmektedir. Periferik immün sistemle kıyaslama yapıldığında mikroglial hücreler sadece inflamatuvar hücreler olarak değil glial hücre olarak görev yapmaktadır. Glial hücre olarak mikroglial hücrelerin büyüme faktörü, sitokin ve nörotrofik faktör salgısı, glutamat alımı, debris fagositozu ve demir uzaklaştırılması gibi görevleri de bulunmaktadır [35-40].



Şekil 1: LPS hücre içi sinyalleme mekanizması

Mikroglial hücreler beyinde bir hasar sonucu oluşan moleküllere (Tablo 1) karşı aktive olarak inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır. Bu süreçte mikroglia değişik aktivasyon durumlarına yönelerek MSS homeostazını sağlamaktadır [40-43]. Mikroglial aktivasyon süreci istirahat halinden adım adım aktif forma dönüşüyormuş gibi algılanmakta, aktivasyon öncesi mikroglia inaktif olarak öngörülmektedir. Ancak, in vivo görüntüleme çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre mikroglia istirahat halinde dinamiktir, bu yüzden aktivasyon

süreci fonksiyonel fenotipteki değişiklik olarak algılanmalıdır. Bu sürecin başında değişen homeostazi dengelemek amacıyla denetleme modundan reaktif profile geçiş olmaktadır. Bu geçiş olayında kemotaktik düzenlenme gibi ayarlamalar saniyeler içerisinde gerçekleşir ve daha geç sürelerde ise kompleks gen kümeleri aktive olmaktadır [44]. Tablo 1 de gösterilen uyarıcı moleküller spesifik olarak kendi bağlanabilecekleri reseptöre bağlanır [45-47]. Örneğin patern tanıma reseptörlerinden olan TLR'ler viral, bakteriyel ve fungal yapıları tanıyarak hücre içi sinyalleme mekanizmasını aktive eder (Şekil 1) [48, 49]. Bunun yanında CD200-CD200R, CX3CL1- CX3CR1 ve SIRP α -CD47 gibi ligant-reseptör çiftleri aktivasyonu düzenler [22, 50-52]. Bu düzenleme mekanizmasında ligant reseptöre bağlı ise aktivasyon engellenir. Ancak MSS içinde herhangi bir hasar durumunda ligant-reseptör dengesi bozulur ve aktivasyon olur. Bu inhibitor mekanizma İnterlökin-10 (IL-10), Transforming growth factor- β (TGF- β), glukokortikoidler veya myeloid hücrelerde eksprese olan reseptör-2 (the receptor expressed on myeloid cells-2, TREM-2)-DAP12 reseptör-adaptör çifti ile olan inhibitor mekanizmaya benzemektedir [46, 53]. Mikroglial aktivasyon mekanizması üzerinde nörotransmitterlerin de yatıştırıcı etkisi bulunmaktadır. Mikroglial hücreler çeşitli nörotransmitter reseptörlerini eksprese etmektedir. Bu reseptörlerin aktivasyonu anti-inflamatuar yanıtlara sebep olabilmektedir [54, 55].

2.1.3. Mikroglial Hücreler ve Hastalıklarda Roller

Mikroglia, MSS'nde görülen bazı hastalıkların patolojisine katılmaktadır. Mikroglial hücreler; Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif, Multiple skleroz gibi otoimmün-demyelizan, travmatik beyin hasarı ve Stroke gibi akut vasküler nöroinflamatuvar, nöro-AIDS ve şizofreni gibi hastalıkların patolojisine direkt veya dolaylı olarak katılmaktadır.

Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH) en yaygın görülen demans tipidir. Kognitif fonksiyonlarda kayıp hastalığın en önemli bulgusudur. AH patolojisinde Amiloid- β (A β) plakları ve nörofibriler yumakların oluşması sonucu nöronal hücre kaybı görülmektedir. AH patolojisinde oluşan A β plakları mikroglial hücreler tarafından fagositozla yok edilmektedir. Bu yüzden mikroglia AH patolojisinde nöroprotektif rol oynamaktadır. Mikroglialların

koruyucu rolü AH'nın erken dönemlerinde görülmektedir [56]. Bunun yanında, mikrogial hücreler patolojik bölgede inflamatuvar yanıt oluşturarak doku rejenerasyonunda görev alırlar.

Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) hareket ve yürüme bozukluklarıyla baş gösteren dejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın patolojisinde beyin substantia nigra bölümündeki dopaminerjik nöronlar dejenere olmaktadır. Mikrogial hücrelerin PH patolojisine katıldığı konusunda tartışmalar sürmektedir. Şu ana kadar elde edilen veriler de mikrogial inflamasyonun PH patolojisinin ana mekanizmalarından biri olduğunu göstermemektedir. Öncelikle, aktive mikroglianın spesifik olarak substantia nigra (SN)'da bulunan dopaminerjik nöronları hedeflediği ile ilgili bir mekanizma bulunmamaktadır [57]. Bunun ötesinde LPS enjeksiyonuyla oluşturulan PH modelinde oluşturulan inflamasyon modeli yanıltıcı olabilmektedir [58]. Son olarak ise PH etiyolojisini araştırmaya yönelik çalışmalar mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, oksidatif ve nitrosatif stres ve ubiquitin-proteazom sisteminin PH patogenezinde sebep olduğunu göstermiştir [59].

Mikrogial hücrelerin PH patogenezinde rol aldığı SN'da büyük doku uygunluk kompleksi (Major histocompatibility complex; MHC) sınıf II moleküllerinin ekspresyonu sebebiyle öne sürülmektedir [60]. Ancak MHC sınıf II ekspresyonu nörodejeneratif hastalıkların çoğunda görülmektedir ve antijen sunumu kapasitesini azaltmakta ve immünolojik saldırılara karşı bir tür güvenlik duvarı rolü üstlenmektedir. PH patogenezindeki ortak yolağın çok az bir kısmı inflamatuvar mekanizma ile ilgilidir [61]. PH patogenezindeki α -synuclein proteini mikrogliayı aktive etmektedir [62].

Amyotrofik Lateral Skleroz

Amyotrofik lateral skleroz (ALS) patolojisinde mikrogial hücrelerin motor nöron ölümüne katkısı olduğu düşünülmektedir [63]. Mutant süperoksit dismutaz (mSOD) over-eksprese eden fare mikrogial hücre hattında, kontrolsüz oluşan reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species, ROS), TLR2 aracılığıyla nörotoksik inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır [64]. ALS patolojisinde monosit kemoatraktant protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) artmaktadır. Artan MCP-1'in kaynağının mikroglia olduğu düşünülmektedir [65]. ALS'de yapılan çalışmaların sonuçlarına göre mikrogial

hücrelerin nöroprotektif oldukları ancak mSOD ekspresyonu mikrogial hücreleri, nörotoksik fenotipe yönlendirdiği gösterilmiştir [66]. Buna göre ALS patolojisinde görülen motor nöron dejenerasyonu mikroglianın hatalı çalışmasından kaynaklanmaktadır.

MSS Travmaları

Mikroglia, MSS travmalarında ikincil doku hasarının aracısı olarak görev yapmaktadır. Travmatik beyin hasarında CD8+ makrofaj ve mikroglia bölgeye gelir ve endotelial monosit-aktif edici polipeptid II ve P2X4 reseptörlerini eksprese ederek lezyon oluşmasını sağlar [67]. Bunun yanında Lünemann ve ark. yeni bir faktör olan Makrofaj/mikroglia aktif edici faktör (MAF)'ın ekspresyonunun mikrogliayı fagositik fenotipe yönlendirildiğini öne sürdü [68].

Sıçanlarda oluşturulan fasiyel sinir kesisi modelinde gerçekleştirilen aksotomide mikroglia hücrelerinin artışı gözlenmektedir. Prolifere olan mikroglia nörotoksik maddeler üretmemektedir. Bunun yerine makrofaj koloni uyarıcı faktör-1 (M-CSF), granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte macrophage colony stimulating factor; GM-CSF) ve bunların özgül reseptör proteinleri olan c-FMS ve GM-CSFR α eksprese edilmektedir [69]. Ayrıca, lezyon etrafında proliferen olan mikrogial hücreler Notch ve Sox9 sinyal yolları üzerinden Stat3'ü aktif ederek astrogliogenezi ve nöral kök hücrelerin idamesini indüklemektedir.

MSS travmalarında, mikroglia dual rol oynamaktadır. Mikroglia koruyucu rolünün yanında inflamatuvar hücre görevi yapmaktadır. Hasarlı bölgeye gelen mikroglia pro-inflamatuvar sitokin, kemokin, nitrik oksit, prostaglandin ve süperoksit türlerini salgılayarak doku hasarını ilerletmektedir [70].

Stroke

Stroke (inme) beyin damarlarında meydana gelen olaylar sonucu oluşan iskemik serebrovasküler olaydır. Damarlarda oluşan akut hipoksik durumlar beyin fonksiyonlarında azalmaya sebep olur. Dünyada ölüm sebepleri sıralamasında 3. sıradadır. İskemik stroke halinde post iskemik olaylarda ilk olarak penumbra bulunan mikroglia aktif olmaktadır.

Daha sonrada periferik fagositik hücreler ve lenfositler aktivasyon sürecine katılır [71]. Akut iskemik dönemde hasarlı doku tarafından ROS, sitokin ve kemokin salınımı yapar. Bu salınım serebral endotel hücreler ve lökositler tarafından salgılanan adhezyon molekülleri periferik lenfositlerin hasarlı bölgeye infiltrasyonunu sağlar. Subakut fazda ise dokuya periferden gelen lökositler, sitokin, kemokin ve özellikle ROS salınımı yaparak beyin inflamasyonunu arttırıp yerel mikroglial hücrelerin daha fazla aktive olmasını sağlar [71].

Multiple Skleroz

Multiple Skleroz (MS), beyin ve spinal kordda bulunan nöronların aksonlarının etrafını saran myelin kılıfın zarar gördüğü inflamatuvar bir hastalıktır. MS patolojisinde mikroglia rol almaktadır. Histopatolojik incelemelerde MS plakları veya lezyonları görülmektedir. Aktif MS lezyonları, MSS aksonlarını akut veya kronik demyelinizasyonu ve buna eşlik eden oligodendrosit apoptozu, mikroglial aktivasyon, reaktif astrogliazis periferik lenfositlerin infiltrasyonu ile karakterizedir [72]. Oligodendrosit, myelin veya aksonal hasar sonucu oluşan mikroglial aktivasyon MSS’nde sitotoksik inflamatuvar çevre oluşturarak MS lezyonu oluşumu gerçekleştirir. Histopatolojik incelemede, MHC sınıf II molekülleri eksprese eden mikroglial hücrelerin myelin boğumlarıyla etkileştiği görülmektedir.

HIV nörodejenerasyonu

İnsan immün yetmezliği virüsü (Human immunodeficiency virüs; HIV), immün sistemin tamamen çökmesine sebep olan edinilmiş immün yetmezlik sendromuna (acquired immune deficiency syndrome; AIDS) sebep olan bir lentivirüstür. HIV ile enfekte insanların %15-50’sinde HIV ile ilişkili nörokognitif bozulmalar (HIV associated neurocognitive disorders; HAND) görülmektedir. HAND patolojisi kesin olarak bilinmemekte ancak şu ana kadar yapılan incelemeler A β plaklarının varlığını göstermektedir. HIV-enfekte bireylerde A β birikimi en çok temporal lob, hipokampus ve piramidal nöronlarda olmaktadır. Oluşan A β plakları ise mikroglial aktivasyona sebep olarak fagositozu arttırmaktadır [73].

Trikotillomani

Trikotillomani (TTM) insanlarda görülen saç yolma gibi semptomlar gösteren bir impuls kontrol bozukluğu tipidir. Hastalığın patolojisini inceleyen Capecchi ve ekibi kemik iliği kökenli mikroglia farklılaşmasını sağlayan Hoxb8 geninin knock-out ederek TTM

benzeri belirtileri farelerde oluşturdular [74]. Hoxb8'in knock-out edilmesiyle fare beyinlerinde mikroglia sayısı azaldı ve başka farelerden kemik iliği transplantasyonu ile hastalık belirtilerinin kaybolduğu gösterildi.

2.1.4. Mikroglia çalışma yöntemleri

In vitro Mikroglial Kültür

Mikroglial hücrelerin *in vitro* sistemlerde incelenmesi mikroglia biyolojisinin bir çok açıdan analizi için önemli bir araçtır. Bu hücrelerin fenotipleri üzerinde önemli etkilere sahip olan mikroçevrelerinden uzaklaştırılması hücrelerin normal metabolizmasını etkilemektedir. Bu yüzden hücreler izole edilme işleminin hemen ardından çalışılmalıdır. Çalışma sırasında MSS mikroçevresi mümkün olduğunca taklit edilmelidir. En önemli problem ise *in vitro* koşullarda mikroglial fenotipin belirlenmesidir. Çünkü, tek bir mikroglia markeri bulunmamakta, *in vivo* koşullarda fenotip ve makrofaj antijenlerinin ekspresyon düzeyleri ile belirlenmektedir. Bu sebeplerden ötürü *in vitro* koşullarda “hücre uzantıları” terimi mikroglial hücre karakterizasyonu için yeterli değildir, bunları makrofajlardan ayırmak çok güçtür. Bütün bu olumsuzluklara rağmen mikroglia fonksiyonlarını araştırmaya yönelik çalışmalarda neonatal beyinden elde edilen mikroglial hücreler kullanılmıştır. Neonatal mikroglia ile çalışmanın diğer bir kısıtlaması ise hücrelerin henüz beyin mikroçevresiyle tam anlamıyla karşılaşmamış olmasıdır. Ponomarev ve ark. bir çalışmada yetişkin rodent mikroglial prosedürünü yayınlamıştır [75].

Çevresel regülasyonun mikroglia-astrosit etkileşimleri açısından önemi Rosentiel ve ark. tarafından yapılan çalışmada ortaya kondu [76]. Yapılan çalışmada astrosit monolayer'ı üzerinde çoğaltılan mikroglia ve makrofaj popülasyonlarında NF-κB baskılanması sonucu oluşan çok dallı morfoloji görüldü. Ancak, hücre yüzey antijenlerinin ekspresyonlarının baskılanıp baskılanmadığı incelenmedi. Yetişkin ve neonatal mikroglia izolasyonu bu hücrelerin çok düşük düzeyde antijen sunduğunu göstermektedir. Ancak, bu hücrelerin granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte macrophage colony stimulating factor; GM-CSF) ile muamelesi sonucunda dendritik hücre (DH) benzeri bir fenotipe farklılaşmaları gözlemlendi [77]. Yetişkin mikroglial hücrelerin izolasyonunun ardından düşük miktarda makrofaj koloni uyarıcı faktör-1 (M-CSF) içeren ortamda kültür yapıldığında hayatta kalan hücrelerin dallanmış morfolojide olduğu, bu morfolojinin haftalar boyunca

korunduğu gözlendi [75]. Bu sonuç, M-CSF'in makrofaj sağkalımı ve fenotipinde önemli role sahiptir düşüncesini desteklemektedir. Ancak, M-CSF knock-out farelerde yapılan başka bir çalışma ise mikrogliyal morfoloji ve fonksiyonda bir değışiklik göstermedi [78].

Mikrogliyal hücre hatları

Primer kültürün dışında N9 ve BV2 olmak üzere 2 adet mikrogliya hücre hattı bulunmaktadır. N9 ve BV2 hücre hatları primer fare mikrogliyal hücrelerinin c-myc ve v-myc ile immortalize edilmesiyle oluşturulmuştur [79]. N9 ve BV2 hücreleri çoğunlukla mikrogliyal hücrelerin hücre içi mekanizmalarını anlamak ve diğere hücrelerle etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla kullanılmaktadır [80]. Bu çalışmada da kullanılan N9 hücre hattı ilk kez Paola Ricciardi-Castagnoli tarafından c-myc overekspresyonu ile üretilmiştir [79]. Yapılan incelemede hücre hattının proinflatuar sitokinlerden IL-1, IL-6 ve Tümör Nekrozis Faktör α (TNF- α) ürettiğı gösterilmiştir. Ancak bu hücre hattı ticari olarak satılmamaktadır.

Mikrogliya ve makrofajların değışik amaçlarla yapılan çalışmaları kolaylıkla *in vitro* ortamda gerçekleştirilebilmektedir, ancak elde edilen verilerin değere kazanması için *in vivo* olarak doğrulanması gerekmektedir. Çoğu *in vitro* çalışmada da MSS mikroçevresini benzetmeye yönelik girişimlerde bulunulmamakta ve doku kültür kabında hücreler mikrogliadan ziyade inflammatuar hücreler gibi çoğalmaktadır.

Beyin Slice Kültürü

Mikrogliyal hücrelerin mikroçevresinin bozulmadan *in vitro* çalışma yöntemlerinden birisi de beyin slice ve organotipik kültürdür. Slice kültürlerde doku, kesim işlemi sırasında zarar görebilir ve dokuda bulunan mikrogliyal hücreler kolayca aktif hale geçebilmektedir. Ancak, izole edilen mikrogliyal hücrelerin aksine bu hücrelerde iyon kanalı ekspresyonları daha az olduğı için elde edilen hücreler istirahat durumundaki mikrogliadır [81]. Organotipik kültürler istirahat durumundaki mikrogliyal hücrelerin çalışılmasına izin vermektedir ve daha sonraki zamanlarda kültürde verilen hasar *in vivo* durumundaki gibi ve makrofajlardaki gibi gerçekleştiğinden dolayı sonuç öngörülebilmektedir [82]. Bu yöntemden elde edilebilecek veriler *in vivo* elde edilen verilere çok yakın olduğı için slice kültür yaklaşımı *in vitro* yaklaşıma göre daha güvenilirdir.

İn vivo Çalışmalar :Immunohistokimya ve İn situ Hibridizasyon

Mikroglial hücrelerin *in vitro* çalışmalarının kısıtlamalarından dolayı MSS dokusunun bütün olduğu *in vivo* çalışmalar daha fazla yapılmaktadır. Deney hayvanları ve insan dokularında yapılan mikrogliya araştırmalarında immünohistokimya (İHK) yöntemiyle analiz yapılmaktadır. Bu teknikte mikrogliya ait oldukça değerli veriler elde edilmektedir. İHK'nın ELISA ve Western blot gibi yöntemlere göre en önemli avantajı incelenen proteinin lokalizasyonunun da incelenmesidir. Bunun ötesinde konfokal mikroskop gibi daha iyi çözünürlüklü sistemler kullanılarak proteinin hücre içindeki konumu dahi belirlenebilmektedir. Bu sebepten dolayı fizyolojik ve patolojik süreç incelemelerinde İHK analizi geçerli ve güvenilir sonuçlar vermektedir.

İHK'nın güçlü yanlarına karşın zayıflıkları da bulunmaktadır. Bu zayıflıklar boyama tekniği ile ilişkili yalancı pozitif sonuçlardır [83, 84]. Bu zayıflıktan dolayı sonuçların Western blot gibi farklı bir yöntemle veya aynı proteini tanıyan farklı antikor ile doğrulanması gerekmektedir. Bunun da ötesinde, incelenen proteinin knock-out edilmesiyle elde edilen dokular da negatif kontrol olarak kullanılabilir [85].

İn vivo analiz için kullanılan diğer bir yöntem ise incelenen mRNA'yı ilgili problemler ile işaretleyen *in situ* hibridizasyon (İSH) yöntemidir. İSH, İHK yöntemiyle paralel olarak kullanılabilen ve konfirmasyon amacıyla kullanımı önerilmektedir. Bu yöntem hem deneysel hem de biyoinformatik olarak gerçekleştirilebilmektedir. *İn silico* olarak Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/welcome.do>) üzerinden fare beyinde anatomik olarak mRNA ekspresyonları incelenebilmektedir [86].

Pozitron Emisyon Tomografisi İncelemesi

Pozitron emisyon tomografisi (PET), canlı vücudunda meydana gelen metabolik olayların 3 boyutlu olarak radyoaktif izotoplarla incelenmesine olanak veren nükleer görüntüleme yöntemidir. PET taramalarında çoğunlukla glukoz analogu olan [¹⁸F] 2-floro-2-deoksi-D-glukoz (FDG) kullanılarak metabolik aktivite analizi yapılmaktadır. FDG'nin dışında, İzokinolon'un işaretli R-enantiyomeri olan [¹¹C] (R) PK11195 de aktive olan mikroglial hücrelerin görüntülenmesinde kullanılmaktadır [86]. [¹¹C] (R) PK11195, myeloid

hücrelerde eksprese olan periferik benzodiazepin bağlanma bölgesinin (peripheral benzodiazepine binding site; PBBS) bir kısmı olan mitokondriyel membran taşıyıcı protein-18'e (TP-18) bağlanmaktadır. PK11195, mikrogial aktivasyon sürecinin erken safhasında da görüntüleme yapabilmektedir. Sonuç olarak bu teknik nörolojik hastalıklarda mikrogial aktivasyonun rolünü araştırma amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.

2.2. MikroRNA

miRNA'lar ilk kez *Caenorhabditis elegans*'ta hücrelerin gelişiminin araştırıldığı çalışmalarda keşfedildi. Ambros ve ark tarafından *C. elegans*'ta gelişimsel süreçte zamanlamayı kontrol eden heterokronik genler olan *lin-4* ve *lin-14*'ten *lin-4*'ün *lin-14*'ü baskıladığı gösterilmiştir [87-89]. Ambros ve ark. *lin-4* genini klonlarken bu genin 22 nükleotidlik kodlanmayan bir dizi olduğunu gösterdiler [89]. Daha sonra Ruvkun ve ark. *lin-14* geninin 3'-UTR (Untranslated region: translasyon olmayan bölge) bölgesinde korunmuş dizilerin bulunduğunu, bu dizilerin *lin-4* dizisine komplementer olduğunu bildirdiler [90]. Bunun yanında *lin-4*'ün, *lin-28*'i de regüle ettiği Ambros ekibi tarafından gösterildi [91].

2000 yılında yine *C. elegans*'ta Ruvkun ve ekibi tarafından gelişimsel zamanlamayı kontrol eden, 21 nükleotid uzunluğundaki *let-7* isimli RNA molekülü keşfedildi. *Let-7*'nin gelişimsel zamanlamayı kontrol eden diğer bir gen olan *lin-41*'i regüle ettiği gösterildi [92, 93]. Aynı yıl içinde yine Ruvkun ve grubu *let-7* genlerinin bir çok hayvanda korunduğunu gösterdi [94]. Günümüze kadar farklı türlerde toplam yaklaşık 19000 adet miRNA keşfedilerek miRNA veritabanı olan miRBase'e kaydedilmiştir (miRBase Release 17, Nisan 2011) [95].

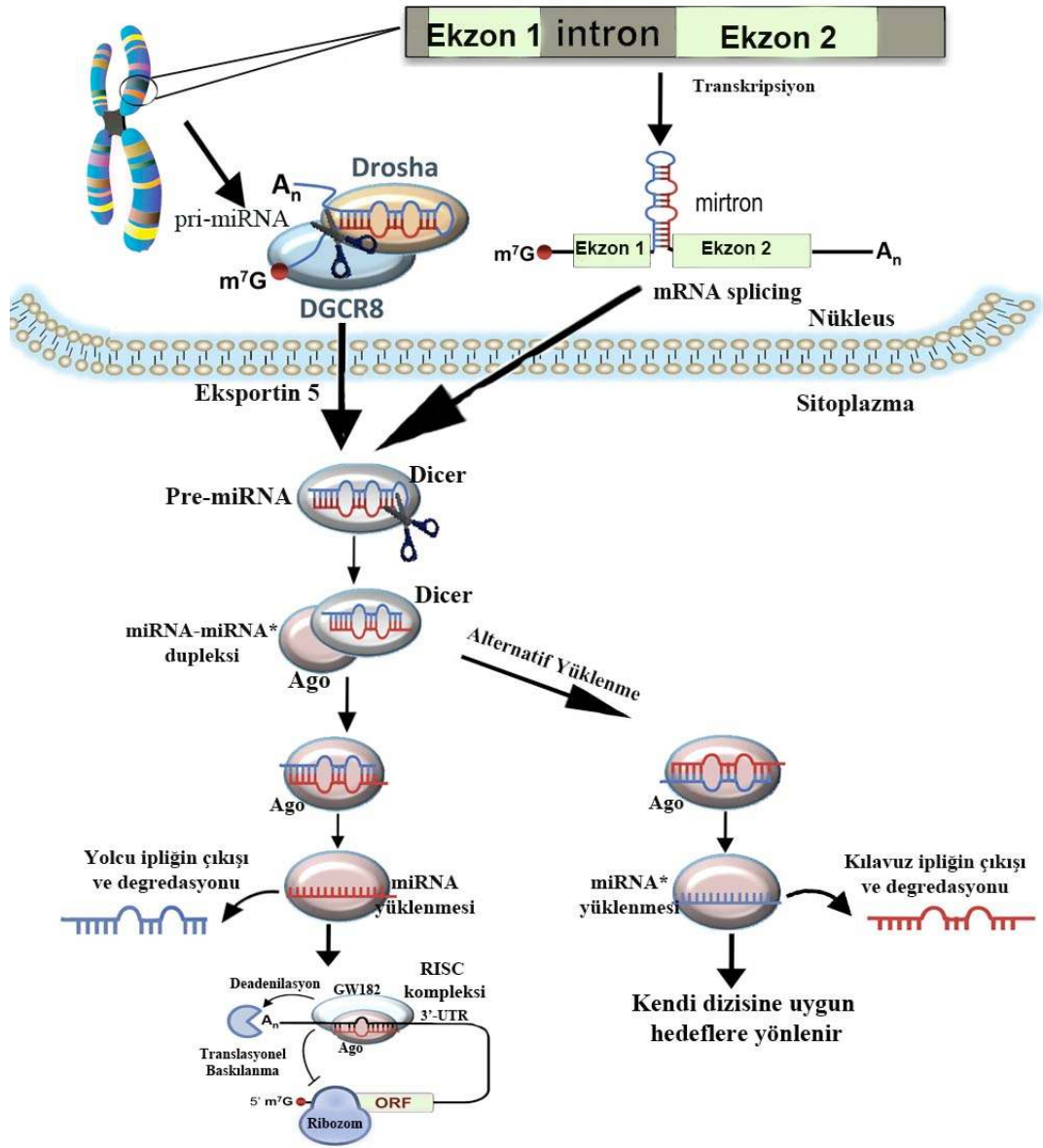
2.2.1. miRNA Biyogenezi

miRNA'lar nükleer genomda tek tek ya da polisistronik olarak yerleşmişlerdir. RNA polimeraz II enzimi tarafından transkribe edilirler. Transkripsiyon sonucunda öncü miRNA molekülü elde edilir. Bir dizi enzimatik olay sonucunda matür formuna geçerek fonksiyonel hale gelir. Fonksiyonel hale gelen miRNA, RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RNA induced silencing complex; RISC) kompleksine katılarak hedef genlerinin ekspresyonlarını baskılayarak veya degrade ederek regüle eder.

Klasik Yol

Nükleer genomda kodlanan miRNA genlerinden RNA polimeraz II enzimi aracılığıyla primer mikroRNA (pri-miRNA) formunda ilk molekül sentezlenmektedir [96]. Sentezlenen pri-miRNA 3-4 kilobaz boyutta ve 5' cap ve poli(A) içeren karmaşık sekonder yapıya sahiptir [96-99]. Elde edilen pri-miRNA bir sonraki basamakta yaklaşık 70 nükleotid boyutunda olan pre-miRNA (prekürsör miRNA) formuna mikroişlemci kompleks tarafından dönüştürülür. Bu kompleksin yapısında insanda Drosha ve DiGeorge sendrom kritik bölge gen 8 (DGCR8) proteinleri sineklerde ise Drosha ve Pasha (Partner of Drosha) proteinleri bulunmaktadır [99-105]. RNaz III ailesinin bir üyesi olan Drosha proteini mikroişlemci kompleksinde katalitik birim olarak iş görürken, DGCR RNA yapısını tanımaktadır. Pri-miRNA'nın mikroişlemci kompleksi tarafından kesilimi sırasında DGCR8'in tek ve çift iplikli RNA molekülünü tanımasının ardından Drosha çift iplikli hairpin yapıdaki molekülü keser ve 5' ucunda monofosfat, 3' ucunda 2 nükleotid hidroksil uzantısı bulunan pre-miRNA oluşur [106]. Oluşan pre-miRNA RAN-GTPaz ilişkili exportin-5 (Exp-5) aracılığıyla sitoplazmaya taşınır [107-110]. Exp-5'in pre-miRNA'ları taşıma görevinin yanında bağlandığı pre-miRNA'yı yıkımdan koruyucu etki gösterdiği öne sürüldü [108].

Sitoplazmaya gelen pre-miRNA diğer bir RNaz III enzimi olan Dicer ile işlem görerek 22 nükleotidlik matür miRNA'ya dönüşür [111, 112]. Bu işlem sonrasında miRNA duplesi açılır ve RNA baskılanmasında görev alan kılavuz iplik ile miRNA* veya yolcu iplik olarak adlandırılan komplementer zincir açığa çıkar. Burada hangi ipliğin RISC kompleksine katılarak fonksiyonel olarak iş göreceği moleküllerin termodinamik özelliklerine bağlı olarak belirlenmektedir [113]. RISC kompleksi bir Ribonükleoprotein (RNP) kompleksidir, yapısında miRNA'nın yanında transactivation-responsive RNA-binding protein (TRBP), PKR aktive edici protein (PACT) ve Argonaute-2 (Ago2) proteinleri bulunmaktadır. Bu kompleks; mRNA kesimi, translasyonel baskılama ve kromatin yapısının düzenlenmesi gibi fonksiyonları yönlendirmektedir [114-117]. Ago2 mutant organizmalarda yapılan çalışmalar RISC kesim aktivitesinde Ago2'nin doğrudan etkisinin olduğunu göstermiştir [118]. Ago proteinleri PAZ, mid ve PIWI gibi karakteristik bölgeler içermektedir ve bu bölgelerden PAZ bölgesi RNA'nın 3' ucunu tanıırken, Mid bölgesi 5' fosfata bağlanır.



Şekil 2: miRNA Biyogenezi

miRNA/Ago RNP kompleksleri miRNA fonksiyonlarını yönlendiren efektör kompleksin ana bileşenidir [119]. Katalitik miRNA oluşumu sırasında kılavuz miRNA ipliğinin 5' ucunun Ago2 proteini ile bağlanması gerekmektedir [120]. Oluşan miRISC kompleksi hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanarak genellikle ekspresyonu baskılar, ancak bazı durumlarda hedef genin aktivasyonunu sağladığı da görülmüştür [121].

miRNA-RISC kompleksi oluşumunun ardından bu komplekslerin P- veya GW-cisimcikleri gibi yapılarda post-transkripsiyonel regülasyon fonksiyonlarını gösterdiği yönünde kanıtlar bulunmaktadır. P- cisimciklerinde hem mRNA yıkım olayı gerçekleşmekte hem de baskılanmış mRNA'lar depolanmaktadır [122-125]. P cisimciklerinin yapısında motor ve duyu polinöropati hastasının serumunda bulunan otoimmün antijen GW182 bulunmaktadır. Bu protein, P-cisimciklerine yerleşen Ago1 içeren susturucu komplekslerde bulunur [126, 127]. Bununla birlikte, P-cisimciklerinin sinapslarda keşfedilmesi ve nöronal farklılaşmada meydana gelen uyartılara verdikleri yanıtlar dolayısı ile nöronal farklılaşma, öğrenme ve bellek gibi mekanizmalarda rol alabilecekleri öne sürülmüştür [128, 129].

Drosha Bağımsız Yollar

Klasik miRNA biyogenez yoluna ek olarak Drosha bağımsız ve Dicer bağımsız yolların da miRNA biyogenezinde rol aldığı yapılan çalışmalarca gösterilmiştir.

Mirtronlar pre-miRNA'ların bir alt sınıfıdır ve biyogenezleri için RNA kesim işlemlerine bağımlı oldukları gösterilmiştir [130-132]. Mirtronlar hairpin yapısı oluşturma potansiyeline sahip kısa intronik dizilerdir. Bu diziler mRNA'ların splicing aşamasında ortaya çıkarak pre-miRNA yapısını taklit eder. Bu yapısından dolayı Drosha ile işleme zorunluluğu ortadan kalkar, Exp-5 aracılığıyla sitoplazmaya taşınarak klasik miRNA biyogenez yolağına girer. Sonunda RISC kompleksine yüklenir [133]. Mirtronların keşfi pre-miRNA'ların özelliklerini taşıyan herhangi bir RNA'nın miRNA işleme mekanizması tarafından kullanılabileceği ve işlevsel bir miRNA oluşabileceği konusunda fikir vermektedir [130-132].

Küçük nükleolar RNA'lar (Small nucleolar RNA; snoRNA) mikroişlemci kompleksten bağımsız olarak işlenebilen pre-miRNA'ların diğer bir kaynağıdır [134, 135]. Yaklaşık 70-200 nükleotid uzunlukta olan snoRNA'lar seçilmiş rRNA moleküllerinin enzimatik modifikasyonlarına rehberlik ederek küçük nükleolar ribonükleoprotein (small nucleolar ribonucleoprotein; snoRNP) kompleksleri olarak fonksiyon gösterir [136]. Ago1 ve Ago2 ile ilişkili küçük RNA'ların incelendiği çalışmada pre-miRNA'ya benzeyen yapılarda snoRNA'lar bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucuna göre bu RNA'ların işlenmesi süreci Dicer'a bağımlı ancak Drosha'dan bağımsız gerçekleşmektedir. Özetlemek gerekirse bazı snoRNA'lar kendi fonksiyonlarının dışında miRNA'lara kaynak olmaktadır [137].

Mürin γ -herpes virüsü 68 (MHV68) tarafından kodlanan miRNA'lar pol III tarafından transkribe edilerek tRNA ile bağılı bir pre-miRNA yapısı oluştururlar [138-140]. Bu pre-miRNA'lar Drosha tarafından işlenmek yerine tRNA'yı 3' ucundan kesip, pre-miRNA hairpin yapısını serbest hale getiren tRNaz ile işlenirler. Daha sonra Dicer tarafından işlenip olgun viral miRNA'ları oluştururlar. Özetlemek gerekirse MHV68'in miRNA'ları Drosha bağımsız olup tRNaz ve Dicer'a bağımlıdır.

Dicer Bağımsız Yolaklar

miRNA biyogenezinin klasik yolunda rol alan Ago2 proteininin katalitik olarak görevi etkilenecek oluşturulan mutant farelerde küçük RNA bağlanması engellenerek RNA kesimi önlenmiştir [141]. Bu çalışmada, ayrıca, pre-miR-451'in Drosha tarafından üretildiği ve Dicer basamağı atlanarak doğrudan Ago2'ye yüklendiği bulunmuştur.

2.2.2. miRNA'ların Regülasyonu

Kodlanmayan RNA'lar genomda çok sayıda bulunmaktadır ve bu RNA'ların ekspresyonları internal ve eksternal olaylara bağılı olarak sinyal yolakları tarafından iyi kontrol edilmektedir [142]. Ökaryotik miRNA'lar genomda intergenik, intronik ve polisistronik olmak üzere 3 farklı şekilde kodlanmaktadır. miRNA'ların büyük bir kısmı kümelenmiş halde transkribe olmaktadır [143]. Kümelenmemiş miRNA'lar ise genomda ekzonik veya intronik olarak kodlanmaktadır [144].

Çoğu miRNA, sinyal yolaklarının en son aşamasında rol alan transkripsiyon faktörleri tarafından dokuya veya gelişimsel döneme özgü olarak eksprese edilir. Yapılan son çalışmalar miRNA'lar ve transkripsiyon faktörlerinin arasında regülatör bir bağ olduğunu göstermektedir. [142]. Bazı araştırmalar da miRNA ekspresyonlarının post-transkripsiyonel düzeyde de regüle edildiğini göstermektedir [145].

2.2.3. miRNA Deteksiyon Yöntemleri

miRNA ekspresyonları hücrelerin bulunduğu fizyolojik veya patolojik duruma göre değişiklikler sergilemektedir. Patolojik durumlar dolayısıyla, miRNA'ların biyomarker olarak kullanımına yönelik çalışmalar günümüzde devam etmektedir. Bu sebeple hastalık

patogenezinde rol alan miRNA'ların kesin olarak bilinmesi gerekmektedir. Ancak, miRNA deteksiyonu boyutlarının çok kısa oluşu ve GC içeriğinin çok değişken olması dolayısıyla teknik açıdan zorluklar yaratmaktadır.

miRNA ekspresyon düzeylerini belirlemeye yönelik çalışmalarda genellikle 200 nükleotitten küçük RNA'larca zenginleşmiş total RNA'lar kullanılmaktadır. Eğer belirli bir RNA ekspresyonu analiz edilecekse northern blot veya RNaz koruma testi (RNase protection assay; RPA) yöntemleri tercih edilir [146]. *In situ* hibridizasyon yöntemi de miRNA deteksiyonu amacıyla kullanılmaktadır [147]. Ancak, kullanılacak probun fazla olması ve elde edilen verinin az olması sebebiyle mikroarray ve qPCR yöntemleri daha sık kullanılmaktadır [148]. Bunların yanında gen ekspresyonunun seri analizi (Serial analysis of gene expression; SAGE) ve derin sekanslama teknikleri de global miRNA profillemeye çalışmaları sıklıkla kullanılmaktadır.

Mikroarray

Mikroarray yöntemi genom çapında yapılan ekspresyon, mutasyon ve kromatin immün presipitasyonu gibi amaçlarla ortaya çıkan ucuz, hızlı ve güvenilir bir teknolojidir [149]. Yöntemdeki temel prensip analiz edilecek örnekte bulunan nükleik asitlerin çip üzerinde bulunan komplementer problarla hibridizasyonudur. Hibridizasyon öncesinde analiz edilecek moleküller işaretlenir ve hibridizasyon sonrası işaretlenmiş moleküller mikroarray tarayıcı tarafından okunarak kantitasyon yapılır. Çip üzerinde binlerce dizi bulunduğu için aynı anda büyük bir miktarda transkript veya DNA molekülü analiz edilebilmektedir.

miRNA-mikroarray uygulamalarında izole edilen total RNA'da çoğunluk rRNA'lardan oluştuğundan dolayı 200 nükleotitten küçük RNA'larca zenginleştirme işlemi yapılmalıdır. Yapılan analizde yüksek kaliteli RNA kullanılması gerektiği için değişik yöntemlerle kalitenin belirlenmesi gerekmektedir [150]. Hibridizasyon aşamasının öncesinde biyokimyasal reaksiyonlar yer almaktadır. Bu safhada analiz edilecek örnekler floresan işaretlenmiş nükleotidlerle çoğaltılır. Bu aşamada işaretleme 1-renk ve 2-renk olacak şekilde 2 yöntemle yapılmaktadır. 1-renk yönteminde tüm örnekler aynı renk ile işaretlenir ve her örnek ayrı çipe hibridize edilerek analiz gerçekleştirilir. Diğer yöntem olan 2-renk yönteminde ise kontrol ve kıyaslanacak örnek (ör: hasta, ilaç uygulanan vb.) farklı renklerle

işaretlenir ve 2 örnek aynı çipe hibridize edilerek analiz yapılır. Hibridizasyon sonrası yıkama işlemleri gerçekleştirilir ve okumalar yapılır. Okuma işlemi lazer tarayıcılarla yapılarak analiz kısmında veri normalizasyonu, analizi ve istatistiksel analizler yapılmaktadır. Normalizasyon aşamasında çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunların en sık kullanılanları Quantile [151], LOESS (Locally weighted regression and smoothing scatterplot) [152], varyans stabilizasyonu [153] ve medyan normalizasyonlarıdır.

Kantitatif PCR

qPCR yöntemi miRNA ekspresyon analizlerinde genellikle doğrulama amacıyla yapılmaktadır. qPCR analizinde sırasıyla cDNA sentezi, PCR yöntemiyle işaretli ürünlerin sentezi ve veri analizi olmak üzere 3 basamak vardır. İlk olarak cDNA sentezi aşamasında miRNA tamamen cDNA'ya çevrilmelidir. Ancak, miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotidden oluştuğu için PCR ile amplifikasyonu çok zordur. Bu sebeple poli(A) polimeraz enzimi kullanılarak mRNA'nın 3' ucuna Poli(A) kuyruğu eklenmektedir. Bu basamaktan sonra universal primer bağlanma noktası içeren oligo d(T) sekanslarıyla cDNA sentezlenmektedir. cDNA sentez basamağının ardından PCR ile miRNA'ların çoğaltılması işlemi yapılır. Bu işlemde miRNA'nın 5' ucuna eşleşen primer ve universal primer kullanılır. İşaretleyerek çoğaltmak amacıyla da floresan ışımaya yapan SYBR green I veya reaksiyon özgüllüğünü arttıran Taqman Probları içeren PCR karışımları kullanılmaktadır [154]. Reaksiyon sırasında her örneğin amplifikasyon eğrisi çizilmektedir. Bu eğride reaksiyonda oluşan ışımaya miktarı gösterilmektedir. Oluşan ışımaya miktarı PCR cihazında detekte edildiği eşik değerin okunduğu sıklıkla Ct denmektedir. Gruplar arası ekspresyon miktarı kıyaslanırken reaksiyonda elde edilen Ct değerleri kullanılarak $\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle analiz yapılmaktadır [155]. Analizde normalizasyon amacıyla bir housekeeping gen kullanılmaktadır. Bu sebeple, miRNA qPCR analizlerinde U6 gibi küçük RNA'lar kullanılmaktadır. Ancak birden fazla housekeeping genin kullanılması analizin özgüllüğünü arttırmaktadır [156, 157].

In situ miRNA Deteksiyon Yöntemleri

miRNA ekspresyon analizleri *in situ* olarak yapılabilmektedir. Normal koşullarda yapılan *in situ* hibridizasyon çalışmalarında 20 nükleotid boyutunda kullanılan problemlerin özgüllüğü azdır ve elde edilen sinyal güçlü değildir [158]. miRNA deteksiyonu için modifiye edilmiş kilitli nükleik asit (Locked nucleic acid; LNA) problemleri kullanılmaktadır. LNA

modifikasyonlarında ribozun 2' ve 4' oksijen atomlarını birbirine bağlayan metilen köprüsü oluşturulmaktadır. Bu sayede LNA hedef bölgeye daha güçlü bağlanarak denatürasyon engellenmekte ve erime sıcaklığı artmaktadır. Artmış erime sıcaklığından dolayı hibridizasyon sonrası yapılan inkübasyon sonucunda özgül olarak bağlanan LNA problemleri bağlı kalmaktadır. Ayrıca, bu şekilde yapılan modifikasyon sayesinde arka plan oluşumu da azalmaktadır. In situ hibridizasyon ile miRNA analizi yönteminde İHK da kullanılabilir. Bu sayede hem miRNA ekspresyonu hem de hedef gen ekspresyonu incelenebilmektedir [158, 159].

2.2.4. miRNA Hedef Belirleme Çalışmaları

miRNA'lar hedef genlerinin 3'-UTR bölgesine bağlanarak ortalama 300 genin regülasyonuna katkıda bulunur. Bu regülasyon mekanizmasında miRNA'lar bağlandığı hedef gene tam olarak eşleşmediği için biyoinformatik yöntemlerde kullanılan algoritmalar oldukça karışıktır. Bu sebepten ötürü, kullanılan algoritmalarda eşleme bölgeleri, serbest bağlanma enerjisi, hedef bölgenin ikincil yapısı gibi bazı kriterler göz önüne alınmaktadır [160, 161]. En sık kullanılan hedef belirleme veritabanları ise TargetScanS [160], TargetScan [162], PicTar [163] ve miRanda [164]'dür.

Biyoinformatik yöntemlerle belirlenen miRNA hedef genleri öngörülen hedeflerdir. Bu yüzden belirlenen hedef bölgelerin deneysel olarak doğrulanması gerekmektedir. Doğrulama deneyleri Lusiferaz veya yeşil floresan protein (green fluorescent protein; GFP) kullanılarak yapılmaktadır [165]. Analiz için öngörülen hedef genin 3'-UTR'ı Lusiferaz veya GFP geninin aşağısına klonlanmaktadır. Öte yandan miRNA genini içeren plazmit de hazırlanarak miRNA geninin sürekli ekspresyonu sağlanmaktadır. Hazırlanan miRNA ve hedef plazmitleri transfeksiyon yöntemiyle host hücreye verilir. Transfeksiyondan 24 veya 48 saat sonra luminometrik veya florometrik ölçüm yöntemiyle okuma yapılır. Sonuç olarak, okumaya göre 3'-UTR klonlanmamış negatif kontrole kıyasla yapılarak luminesans veya floresan miktarında azalma görülürse hedef gen doğrulanması gerçekleştirilmektedir.

2.2.5. Doğal Bağışıklık Sisteminde miRNA'lar

Doğal bağışıklık sistemi dışarıdan gelen patojenlere karşı ilk savunma mekanizmasıdır. Bu mekanizmaya makrofajlar, DH, monositler, nötrofiller ve doğal öldürücü

hücreler (Natural killer cells, NK) aracılık etmektedir. Patojenin varlığı genelde antijen sunucu hücreler (Antigen presenting cells, APC) tarafından belirlenir. Makrofajlar ve dendritik hücreler antijen sunucu hücrelerdir. Mikrobiyal ürünler gibi kendine yabancı olan molekülleri tanıyan patern tanıma reseptörlerini (Pattern recognition receptor; PRR) bulundururlar. PRR'lerinin çok sayıda çeşidi vardır ve 11 türü olan TLR ve 10 türü bulunan IL-1 reseptörleri en iyi karakterize edilenleridir. Son zamanlarda yapılan araştırma sonuçlarına göre miRNA'ların doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin gelişimini ve fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca granülosit, monosit, makrofaj, DH, NK hücreler ve NK T hücrelerin fonksiyonlarının regülasyonuna katılan miRNA'lar tanımlanmıştır [166, 167].

Yapılan çalışmaların bazılarında monositopoezde rol alan transkripsiyon faktörlerinin bazılarının spesifik miRNA'lar tarafından regüle edildiği gösterilmiştir [166, 167]. İnsan kordon kanında bulunan CD34+ hematopoetik progenitör hücreler M-CSF ile uyarıldığında monositopoezin miRNA'lar tarafından kontrol edildiği gösterildi [168]. Monosit ve makrofaj diferansiyasyonunda önemli rolü olan PU.1 transkripsiyon faktörü miR-424 transkripsiyonunu aktive eder ve Nükleer Faktör I/A (NFI-A)'nın translasyonunu baskılar [169]. Azalan NFI-A düzeyleri M-CSF gibi diferansiyasyona özgü genlerin aktivasyonunu sağlar. miR-424'ün dışında miR-233'ün de myeloid hücre diferansiyasyonunda rolü bulunmaktadır [170].

Nötrofiller granülosit-monosit progenitörlerinden köken almaktadır. Growth factor independent 1 (Gfi1) tarafından farklılaşmaktadır [166]. Yakın zamanda Gfi1'in pri-miR-21 ve pri-miR-196b promoterlarına bağlanarak ekspresyonlarını baskıladığı gösterildi [171]. Bunun yanında, miR-155'in sürekli ekspresyonu immatür granülositlerin in vitro ortamda artmasını sağlamakta ve bunun SH2-domain içeren inositol-5-fosfataz 1 (SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase 1, SHIP1)'in katılımıyla gerçekleştiği düşünülmektedir [172, 173]. Nötrofil gelişiminin yanında, miRNA'lar granülosit fonksiyonunu da regüle eder. miR-223'ün genetik olarak delesyonunun in vitro koşullarda myeloid hücre gelişimi ve fonksiyonunu pozitif yönde etkilemektedir [174]. miR-223 ekspresyonu PU.1 ve CCAAT/enhancer-binding protein- β (C/EBP β) tarafından indüklenmekte nötrofillerin proliferasyonunu ve aktivasyonunu baskılamaktadır. TLR4 üzerinden aktive olan NF- κ B,

miR-9 ekspresyonunu arttırmakta ve NF- κ B bağımlı immün yanıtları regüle eden bir feed back döngüsü oluşturmaktadır [175].

miRNA'ların inflammatuar uyarana yanıt olarak indüksiyonu ve baskılanması birçok biyolojik süreci etkilemekte ve pro-inflammatuar veya anti-inflammatuar etkiye sebep olmaktadır [176]. Mikrobial ürünler önemli pro-inflammatuar uyarılardır. TLR ligandı olarak uyarım yaptığında miR-9, miR-125b, miR-146a ve miR-155 ekspresyonlarında değişiklik yaratmaktadır [167]. Bu miRNA'lardan miR-146a ve miR-155 değişik hücre tiplerinde indüklenebilmektedir. Makrofaj ve DH'lerde TLR ligantları NF- κ B ve c-Jun-N-Terminal Kinaz (JNK) yolları üzerinden miR-155 ekspresyonunu indükler [177, 178]. Ayrıca, *in vivo* LPS uyarımıyla miR-155 ekspresyonunda artış ve miR-125 ekspresyonunda azalma gözlenmektedir [178].

miR-125b ekspresyonunun inflammatuar yanıt sırasında azalması TNF α baskılanmasının önlenmesi nedeniyle gerekli bir olaydır. Fare makrofajlarının sentetik triaçil lipopeptid Pam3CSK4, sentetik çift zincirli RNA analogu poli(I:C), LPS ve CpG oligonükleotidleri ile uyarım yapıldığında miR-155 ekspresyonunda artış gözlenmektedir. miR-155 ekspresyonlarındaki bu artış hem bakteriyel hem de viral immün yanıtlarda rol aldığına göstergesidir [177]. miR-155'in bunların yanında APC'lerde de rol aldığı gösterilmiştir. miR-155 knock-out DH'lerde yapılan çalışmada hatalı antijen sunumu dolayısıyla T-hücre aktivasyonu görülmemektedir [179]. miR-155 dışında, polimorfonükleer nötrofillerde ve monositlerde TLR4 uyarımının ardından miR-9 ekspresyonunda da artış gözlenmektedir. miR-9'un ekspresyonu TLR2 ve TLR7/8 agonistleri ve pro-inflammatuar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 β ile indüklenmektedir [175]. miR-9 dışında, miR-146, miR-147 ve miR-21'in ekspresyonu da LPS ile TLR4'ün uyarımıyla artmaktadır [180-182]. Ancak, bu miRNA'lar miR-155'in aksine patern tanıma yanıtında negatif regülatördür. miR-146a, TLR sinyal yolağının ana bileşenleri olan İnterlökin-1 Reseptörü İlişkili Kinaz 1 (IL-1R associated kinase 1; IRAK1) ve Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü İlişkili Faktör 6 (TNF-receptor associated factor 6; TRAF6) mRNA'larının translasyonlarını azaltmaktadır [180]. Yapılan tüm çalışmalar miRNA'ların inflamasyonda önemli birer regülatör molekül olduklarını ve çok önemli rollere sahip olduklarını göstermektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Çalışma deneysel (in vitro) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

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

3.3. Çalışma Materyali:

Araştırmada N9 fare mikrogliya ve 293T insan embriyonik böbrek hücre hatları ve *Escherichia coli* DH5α 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

Bu çalışmada kullanılan N9 fare mikrogliyal hücre hattı Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli'den sağlandı (Cellular Pharmacology Center, Milan, İtalya). C-myc transkripsiyon faktörünün over-ekspresyonu ile immortalize duruma getirilmiş bu hücrelerin primer fare mikrogliyal kültürünü temsil ettiği gösterilmiştir [79]. N9 Hücre kültürü için %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS) (Biochrom AG, Almanya) ile desteklenen RPMI 1640 kültür ortamı (Biochrom AG, Almanya) kullanıldı. Hücreler 75 cm²'lik kültür flaklarına (Greiner, Almanya) ekildi ve haftada 3 kez % 0.05 konsantrasyonda Tripsin/EDTA (Biochrom AG, Almanya) ile kültür kabından kaldırılarak pasajlandı. Hücre kültürü işlemleri Laminar akımlı kabinet (Heraeus, Almanya) içinde gerçekleştirildi ve hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) 37°C'de kültüre edildi.

Hedef gen validasyonu amacıyla kullanılan 293T hücre hattı DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) şirketinden alındı. Bu hücre hattı HEK293 insan embriyonik böbrek hücre hattının transfeksiyon yapılabilen alt tipidir. 293T hücrelerinin kültürü için %10 FBS (Biochrom AG, Almanya) ile desteklenen Dulbecco's MEM (Biochrom AG, Almanya) kültür ortamı kullanıldı. Hücreler 75 cm²'lik kültür flasklarına (Greiner, Almanya) ekildi ve haftada 2 kez % 0.05 konsantrasyonda tripsin ile pasajlandı.

Hücreler pasajlanmadan önce hücreler inverted ışık mikroskopunda (Olympus, Japonya) gözlendi ve pasajlama işlemine başlandı. Öncelikle hücrelerin içinde bulunduğu ortam pipetle uzaklaştırıldı ve flaska 10 ml Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon (Phosphate buffered saline; PBS) eklendi. PBS ile hücreler yıkandı ve PBS pipetle uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelere 5 ml Tripsin/EDTA (%0,05/%0,02) solüsyonu eklendi ve hücreler inkübatörde 2 dk bekletilerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Flasklara 5 ml hacimde kültür ortamı eklenerek flask yıkandı ve flask içeriği santrifüj tüpüne alındı. Hücreler 1500 rpm hızda 5 dk santrifüj edildi (Hettich, Almanya) ve hücrelerin çökmesi sağlandı. Çöken hücrelerin üzerindeki ortam çekildi ve hücreler 1 ml ortam ile süspanse edildi. Oluşan süspansiyondaki hücre yoğunluğu Thoma lamı (Marienfeld, Almanya) kullanılarak sayıldı ve flask başına 2x10⁶ hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Son olarak, ekilen hücrelerin üzerine 10 ml ortam eklendi ve hücreler inkübatöre kaldırıldı.

3.5.2. Mikroarray ve Real-time PCR İçin *in vitro* Deney

N9 hücreleri pasajlama işleminden sonra sayıldı ve 75 cm²'lik flask başına 5x10⁶ hücre olacak şekilde ekildi ve gece boyunca hücreler yüzeye yapışmaları için inkübatöre kaldırıldı. Deneyin 2. günü deneyde kullanılacak olan %1 FBS içeren RPMI 1640 ortamı hazırlandı. Daha sonra 10, 100 ve 1000 ng/ml LPS (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma-Aldrich, Almanya) içeren dozlarda ortam hazırlandı.

Deney amacıyla flask içindeki ortam hazırlanan dozlardaki ortamla değiştirildi ve hücreler 6 saat boyunca %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonunda hücreler toplandı ve RNA izolasyonu yapıldı.

3.5.3. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu öncesinde LPS ile inkübasyonu biten hücreler hücre kazıyıcı (Greiner, Almanya) ile kazındı ve 15 ml'lik tüpte toplandı. Toplanan hücreler 1500 rpm'de 5 dk santifüj edilerek çöktürüldü ve ortam uzaklaştırıldı. Hücreler 1 ml PBS ile tekrar süspansiyon edilerek yıkandı ve 2000 rpm'de tekrar çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırılarak miRNeasy RNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) protokolüne göre total RNA izolasyonu yapıldı. Protokole göre, ilk olarak hücreler 700 µl Qiazol ile parçalandı ve 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek nükleoprotein komplekslerinin ayrılması sağlandı. Sonrasında, lizat üzerine 140 µl Klorofom eklendi ve tüp içeriği sertçe çalkalanarak karıştırıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra tüpler 12000xg'de 4°C sıcaklıkta 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst organik faz yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve üzerine 1,5 kat hacimde Etanol (%100) eklendi. Elde edilen karışım RNeasy mini spin kolona aktarıldı ve oda sıcaklığında 10000rpm hızda santrifüj edilerek RNA'ların silika membrana bağlanması sağlandı. İlk yıkama basamağında kolona 700 µl RWT solüsyonu eklendi ve 10000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. İkinci ve üçüncü yıkama basamaklarında ise kolona 500 µl RPE solüsyonu eklendi ve sırasıyla 15 sn ve 2 dk boyunca 10000 rpm hızda santrifüj edildi. Son olarak kolon temiz bir toplama tüpüne aktarıldı ve kit elemanlarından biri olan RNaz-free sudan 30 µl eklendi. Tüp 10000 rpm'de santrifüj edilerek RNA'lar elde edildi.

Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve kalite ölçümleri spektrofotometre (Agilent, ABD) ile yapıldı. Kalite kontrolü A_{260}/A_{280} oranına göre yapıldı. Oranın 1,8 ile 2,0 arasında olan örnekler kaliteli kabul edildi.

3.5.4. Mikroarray Analizi

Mikroarray analizi Febit (Almanya) firması tarafından yapılmıştır. Mikroarray analizinde Febit firmasının geliştirdiği "Microfluidic primer extension assay" prensibine göre 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* dizilerin komplementer dizilerine göre dizayn edilmiştir. Mikroarray analizine göre öncelikle RNA örnekleri çipe hibridize edildi ve problemlerin 5' uçlarında bulunan uzatma bölgeleri, hibridize olan RNA'ları primer olarak kullanarak, Klenow fragmanları ve biotinlenmiş nükleotidler

kullanarak uzatıldı. Biotin görüntüleme işlemi ise Streptavidin-Phycoerythrin kullanılarak gerçekleştirildi.

3.5.5. Kantitatif PCR Analizi

Kantitatif PCR (Quantitative PCR; qPCR) analizinde öncelikle RNA moleküllerinden komplementer DNA (Complementary DNA; cDNA) sentezi RT² miRNA First Strand Synthesis Kit (SABiosciences, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu reaksiyonda öncelikle Poli-A polimeraz kullanılarak miRNA'ların ucuna Poli-A dizisi eklendi ve universal primerlerle cDNA sentezi gerçekleştirildi. Steril PCR tüpüne her bir örnek için Tablo 2'deki malzemelerden sırasıyla eklendi.

Tablo 2: cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri	
Reaksiyon Bileşeni	Miktar
Total RNA	0,5-2 µg
miRNA RT Primer & ERC Mix (M1)	1 µl
5X miRNA RT Buffer 2 (M5)	2 µl
miRNA RT Enzyme Mix (M3)	1 µl
Nucleotide Mix (M4)	1 µl
Nuclease free H ₂ O	10 µl'ye tamamlayacak kadar
Toplam	10 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı, PCR cihazında (BioRad, ABD) 37°C'de 2 saat, 95°C'de 5 dk programında inkübe edildi. Reaksiyon sonrası tüpe 90µl H₂O eklendi ve -20°C'de qPCR analizine kadar saklandı.

qPCR analizinde RT² SYBR Green Mastermix (SABiosciences, ABD) kullanıldı. Reaksiyonda kullanılan primerler de SABiosciences firmasından alınmıştır. Bu primerler cDNA sentezinde kullanılan universal primerlerle çoğalan bölge ile miRNA'ya spesifik primer bağlanma bölgesi arasını çoğaltmaktadır. qPCR reaksiyonu için Tablo 3'teki maddelerden kullanarak reaksiyon karışımı hazırlandı ve Roche Lightcycler 480 cihazında analiz gerçekleştirildi. Normalizasyon amacıyla housekeeping gen olarak snRNA'lerden U6 kullanıldı.

Tablo 3: qPCR analizi için reaksiyon bileşenleri

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

qPCR analizinde 95°C 10 dk, (95°C’de 15 sn, 60°C’de 30 sn ve 72°C’de 30 sn) 40 siklus programı kullanıldı. Erime eğrisi analiziyle de ürünlerin kalite kontrolü gerçekleştirildi. Her bir reaksiyondan elde edilen Ct değerleri $\Delta\Delta Ct$ yöntemine göre analiz edildi. Bu yöntemde öncelikle $Ct_{miRNA}-Ct_{U6}$ formülüne göre ΔCt değerleri Excel yardımıyla hesaplandı. Gruplar arası istatistiksel analiz için ΔCt değerleri arasında t-testi yapıldı. Ekspresyon değişimini belirlemek amacıyla da $\Delta Ct_{LPS}-\Delta Ct_{kontrol}$ formülüne göre $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplandı ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle de ekspresyon değişim miktarları hesaplandı.

3.5.6. miRNA Hedef Genleri Analizi

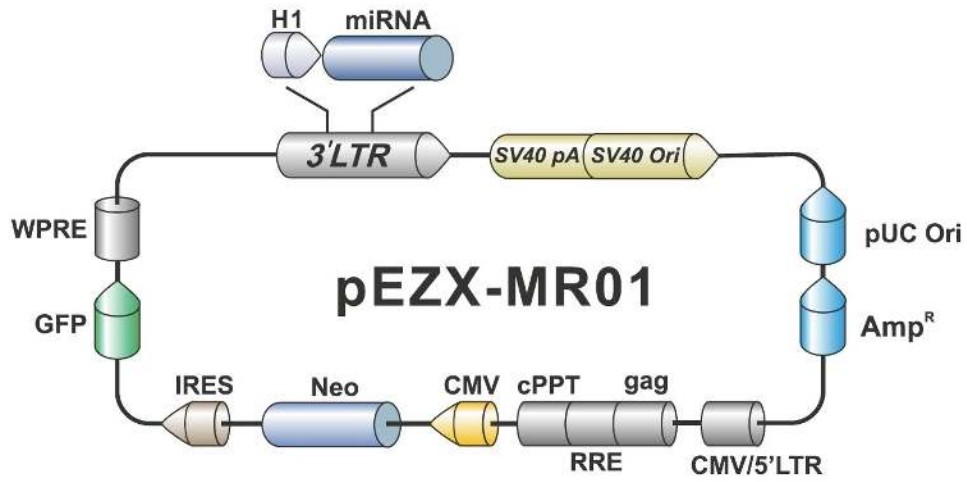
miRNA hedef genleri miRGen target veritabanı kullanılarak belirlenmiştir (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>). Yapılan analizde inflamasyonla ilişkili hedefler belirlenmiştir. Ancak bu hedefler öngörülen (Predicted) hedef olduğundan dolayı Lusiferaz testiyle doğrulamaları yapıldı.

3.5.7. Lusiferaz Testi

miRNA hedef genlerinin doğrulanması amacıyla Lusiferaz testi yapıldı. Bu testte transfeksiyon kolaylığı dolayısıyla 293T hücre hattı kullanıldı. Lusiferaz testi amacıyla miRNA genini içeren plazmitler, hedef geni içeren plazmitler ve negatif kontrol hedef plazmidi (GeneCopoeia, ABD) kullanıldı.

miRNA genini içeren ilk vektörde (pEZX-MR01, Şekil 3) H1 promotoru ve ardında miRNA geni bulunmaktadır. İkinci plazmit (pEZX-MT01) miRNA hedef geni 3’-UTR dizisini içermektedir. Bu dizi hedef analizinde belirlenen her bir hedef gen mRNA’sına göre

değişiklik göstermektedir. Üçüncü tip plazmit olan negatif kontrol hedef plazmitinde de pEZX-MT01 (Şekil 4) plazmiti kullanılmakta ancak hedef bölgesi bulunmamaktadır. pEZX-MT01 plazmitinde hem Firefly hem de *Renilla* lusiferaz geni bulunmakta, Firefly lusiferaz aktivitesi *Renilla* lusiferaz aktivitesine göre normalize edilmektedir. Bu plazmitler, Firefly lusiferaz geninin 3'-UTR bölgesine istenen hedef genin 3'-UTR bölgesi hazır klonlanmış olarak satın alındı. Negatif kontrol olarak kullanılan vektör ise 3'-UTR bölgesi içermeyen pEZX-MT01 plazmitidir.

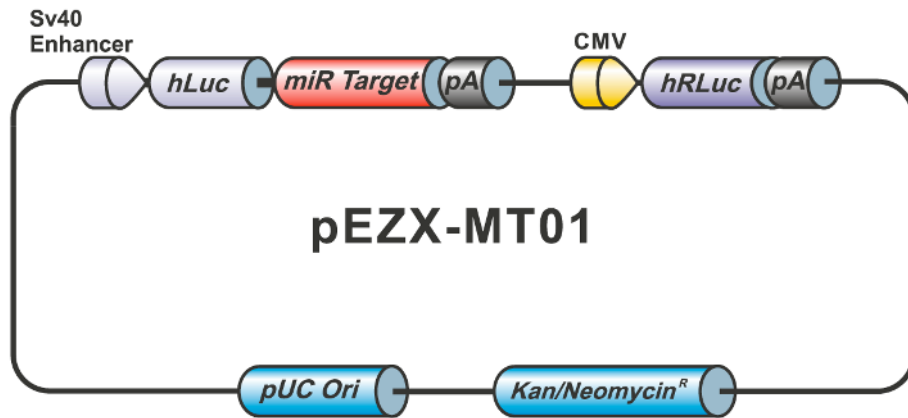


Şekil 3: miRNA ekspresyon plazmiti

miRNA Hedefini İçeren Plazmitin Çoğaltılması

Hedef gen klonlanan pEZX-MT01 plazmiti bakteriye transforme halde satın alındı. Bu yüzden kullanım öncesi çoğaltılarak kullanılması gerekmektedir. Bu sebeple bakteriler 100 µg/ml Kanamisin (Sigma-Aldrich, Almanya) içeren LB sıvı besiyerine ekildi. Bakteriler gece boyu 37°C'de çalkalanarak inkübe edildi. Çoğalmış bakterilerden Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Almanya) kitinin protokolüne göre plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon işleminde öncelikle bakteriler 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çökmeleri sağlandı. Sonrasında bakteri pelleti 250 µl A1 resüspanسیون solüsyonunda çözüldü. 250 µl A2 lizis solüsyonu eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 300 µl A3 nötralizasyon solüsyonu eklenerek 5 dk 11000xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen supernatant kolona aktararak 11000xg'de 1 dk santrifüjlenerek plazmit DNA'sının kolona yapışması sağlandı. Daha sonra yıkama işlemi için 600 µl A4

yıkama solüsyonundan eklenerek 11000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Elüsyon basamağı öncesi kalan yıkama solüsyonunun uzaklaştırılması için kolon boş olarak 11000xg'de 2 dk santrifüj edildi. Son olarak kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Kolona 50 µl AE elüsyon solüsyonu eklendi. Kolon 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 11000xg'de 1 dk santrifüj edilerek plazmit DNA'sı elde edildi. Plazmit DNA'sının kalite kontrolü ve konsantrasyon ölçümü spektrofotometrede yapıldı.



Şekil 4: miRNA hedef gen plazmiti

Negatif Kontrol Plazmitinin Çoğaltılması

Negatif kontrol plazmitini çoğaltmak amacıyla kompetent *E. coli* DH5α kullanılarak bakteriyel transformasyon yapıldı. Bu işlemde öncelikle -80°C'de bulunan kompetent hücreler çıkarılarak buz üzerinde çözümleri sağlandı. Çözünen kompetent hücrelerden 100 µl alınıp üzerine 100 ng plazmitten eklendi. Buz üzerinde 45 dk inkübe edildi. Daha sonra 2 dk 42°C'lik su banyosunda bekletildi ve hemen buza alındı. Sonrasında bakterilerin antibiyotik dayanıklılık genini eksprese edebilmeleri için bakterilere 250 µl SOC besi yeri eklendi. 1 saat boyunca 37°C'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bakteriler 100 µg/ml Kanamisin içeren katı LB besi yerine ekildi. Gece boyu 37°C'de inkübe edilerek transformasyon olan bakterilerin üreyip koloni oluşturması sağlandı. İkinci gün ise oluşan kolonilerden pipet yardımıyla örnek alınarak 100 µg/ml Kanamisin içeren sıvı LB besiyerine ekildi. Gece boyu 37°C'de inkübe edilerek bakterilerin çoğalması sağlandı. Çoğalan bakterilerden Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Almanya) izolasyon kitinin protokolüne göre plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Transfeksiyon

Plazmit çoğaltma aşamalarından sonra 293T hücreleri lusiferaz testi için kuyucuk başına 10000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Hücrelerin plaklara tutunması için 48 saat beklendi. 48 saat sonunda transfeksiyon için ortam hazırlandı. Transfeksiyon için Endofectin (GeneCopoeia, ABD) kullanıldı. Her deneyde her grupta 5 kuyucuk olacak şekilde 4 grup oluşturuldu:

- Sadece hücre
- Sadece Endofectin
- miRNA plazmiti (0,14 µg/ml) + Hedef gen plazmiti (0,10 µg/ml)
- miRNA plazmiti (0,14 µg/ml) + Negatif kontrol hedef plazmiti(0,10 µg/ml).

Her grup için 5 kat konsantre (5X) transfeksiyon ortamı hazırlandı. Yukarıda belirtilen miktarlar en son konsantrasyon (1X) olacak şekilde plazmitler karıştırıldı. 4.32 µl Endofectin eklendi. Daha sonra transfeksiyon karışımına Optimem (Invitrogen, ABD) eklenerek hacim 110 µl'ye tamamlandı. Lipozom yapılarının oluşması için transfeksiyon karışımı 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sırasında hücrelerin içinde bulunduğu ortam çekilerek kuyucuklar Optimem ile yıkandı. Yıkanan hücrelerden sadece hücre grubunda olanlara 100 µl, diğer kuyucuklara ise 80 µl optimem eklendi. Lipozomlar oluşunca üzerilerine 5X transfeksiyon ortamından eklendi. Transfeksiyon ortamı hücrelerle 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde hücrelerin üzerine %30 FBS içeren Dulbecco's MEM ortamından 50 µl eklendi. Böylece son hacimde hücrelerin normal yaşaması için gerekli olan FBS miktarına ulaşıldı. Hücreler plazmitlerin ekspresyonu için 24 saat %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

Luminometrik Analiz

İnkübasyon bitiminde hücrelerin ortamı çekildi Luc-Pair miR Luciferase Assay Kit (GeneCopoeia, ABD) protokolüne göre Firefly ve *Renilla* lusiferaz aktiviteleri luminometrik olarak ölçüldü. Bu protokole öncelikle Firefly lusiferaz aktivitesi ölçüldü. Bunun için Substrat I ve Solüsyon I 1:200 oranında karıştırıldı ve kuyucuk başına 100 µl eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun sonrasında Plak okuyucunun luminesans modunda luminometrik aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Sonrasında ise *Renilla* lusiferaz aktivitesi ölçümü için Substrat II ve Solüsyon II yine 1:200 oranında karıştırıldı ve oluşan

karışımdan 100 µl her kuyucuğa eklendi. Plak 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek luminometrik aktivite ölçümü yapıldı. Firefly lusiferaz aktivitesi *Renilla* lusiferaz aktivitesine oranlanarak normalize lusiferaz aktivitesi hesaplandı ve negatif kontrol plazmiti eklenen grupta hedef gen plazmiti eklenen grup karşılaştırılarak analiz yapıldı.

3.6. Araştırma Planı

Projelendirme	Aralık 2010-Şubat 2011
Mikroarray Analizleri	Mart 2011
qPCR analizleri	Mart 2011-Nisan 2011
Biyoinformatik Analizler	Mayıs 2011
Lusiferaz Testi	Mayıs 2011- Haziran 2011
Tez yazımı	Mayıs 2011-Haziran 2011

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS for Windows istatistik programının 16.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata biçiminde verilmektedir. Gruplararası karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanıldı. Ancak, miRNA PCR analizlerinde (3.5.5 Kantitatif PCR Analizi bölümü) daha önce yöntem bölümünde bahsedilen yazılım programları kullanıldı. Tüm değerlendirmelerde $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi olarak belirlenmiştir.

3.8. Araştırmanın sınırlılıkları

Araştırmamızda kullandığımız N9 hücre hattı transforme bir hücre hattıdır ve bazı çalışmalarda primer mikroglia kültürlerine göre farklı sonuçların elde edildiği görülmektedir [80]. Ancak primer kültürün teknik güçlüğünden ve çok az ve saf olmayan hücre elde edilmesinden dolayı bu hücre hattı tercih edilmiştir. Ayrıca, değişimi saptanan miRNA'ların *in vivo* deneylerle doğrulanması da çalışmanın değerini arttırmaktadır. Çalışmada kullanılan mikroarray analizinde tek dozda LPS ile uyarım yapılan hücrelerde inceleme yapıldı; ancak, farklı dozlarla da inceleme yapılması gerekmektedir. Çalışmamızda sadece miRNA ekspresyonlarında doza bağlı ekspresyon değişimleri incelenmiştir. Ancak dozun yanında zamana bağlı ekspresyon değişimleri de incelenmelidir.

3.9. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi 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. LPS Uyarımıyla Ekspresyonu Değişen miRNA'ların Mikroarray Yöntemiyle Belirlenmesi

100 ng/ml LPS konsantrasyonunda 6 saatte ekspresyonu en çok değişen 30 miRNA tablo 4'te verilmiştir. 30 adet miRNA'nın, LPS (100ng/ml) uyarımı ile ekspresyonunun değiştiği görüldü. Değişen miRNA'ların 12 tanesinin ekspresyonu azalmış, 18 tanesinin ise artmış olduğu belirlendi. Ancak istatistiksel analize göre değişimlerde anlamlılık saptanmadı.

Tablo 4: Mikroarray sonucuna göre ekspresyonu değişen miRNA'lar

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

4.2. LPS Uyarımıyla Ekspresyonu Değişen miRNA'ların qPCR Yöntemiyle Belirlenmesi

Ekspresyonu değişen miRNA'lar içinden miR-125b-3p ve periferik inflamasyonda rol aldığı gösterilen miR-132, miR-146a ve miR-155 için qPCR analizleri gerçekleştirildi. qPCR analizi için 10 ng/ml, 100 ng/ml ve 1000ng/ml dozlarında 6 saat boyunca LPS uygulandı. Analizlerde kontrol grubuna göre kıyaslama yapıldı ve sonuçlar kontrole göre kat değişim olarak verilmektedir.

Tablo 5: 10 ng/ml LPS dozunda miRNA'ların ekspresyon değişimleri

miRNA	Kat Değişim	p-Değeri
miR-125b	0,312	0,004
miR-132	1,010	0,937
miR-146a	1,822	0,002
miR-155	8,267	0,000

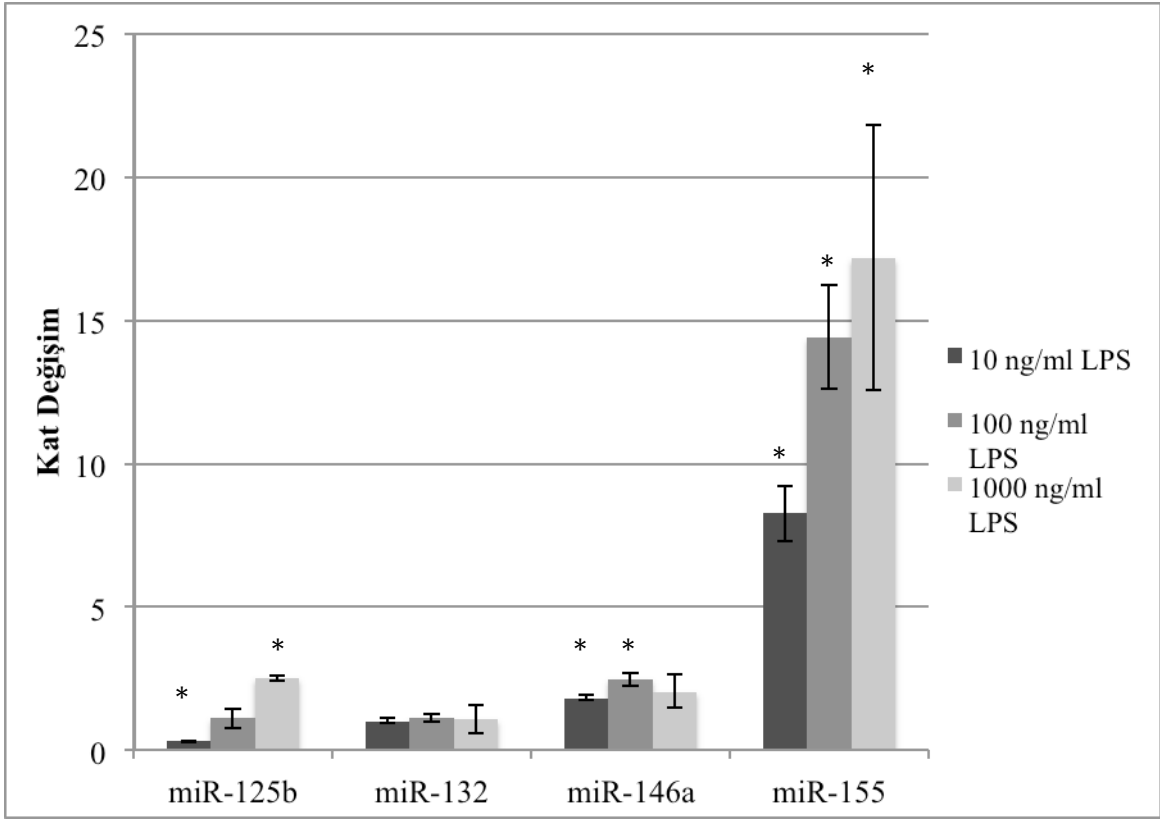
Tablo 6: 100 ng/ml LPS dozunda miRNA'ların ekspresyon değişimleri

miRNA	Kat Değişim	p-Değeri
miR-125b	1,123	0,999
miR-132	1,115	0,373
miR-146a	2,481	0,000
miR-155	14,406	0,000

Tablo 7: 1000 ng/ml LPS dozunda miRNA'ların ekspresyon değişimleri

miRNA	Kat Değişim	p-Değeri
miR-125b	2,527	0,028
miR-132	1,088	0,948
miR-146a	2,042	0,059
miR-155	17,189	0,000

qPCR analizi sonucuna göre miR-125b'de anlamlı düzeyde azalış ve miR-146a ve miR-155'te anlamlı düzeyde artış saptandı. Saptanan değişimlerin doza bağlı oldukları şekil 5'te görülmektedir. miR-132'nin ise her 3 dozda da ekspresyonunda anlamlı değişiklik saptanmadı.



Şekil 5: qPCR analizleri

p<0,05 düzeyinde anlamlı olan sonuçlar * ile işaretlenmiştir (n=5).

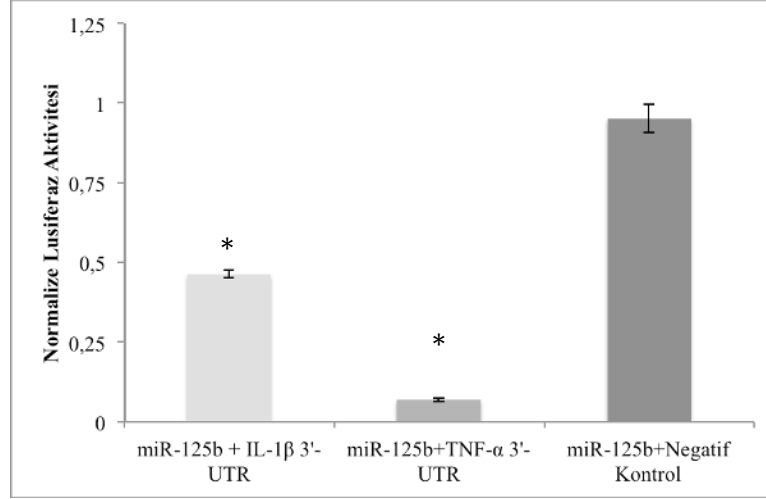
4.3. Ekspresyon Değişimi Saptanan miRNA'ların Biyoinformatik Araçlarla Hedef Analizleri

Ekspresyonu değişen miRNA'ların hedef genleri tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8: Hedef genler	
miRNA	Hedef Gen
miR-125b	TNF- α (Tümör Nekrozis Faktör α) IL-1 β (İnterlökin-1 β)
miR-132	IL-6 (İnterlökin-6)
miR-146a	IRAK1 (İnterlökin-1 Reseptörü İlişkili Kinaz 1) TRAF6 (Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü İlişkili Faktör 6)
miR-155	MyD88 (Myeloid Diferansiyasyonu Primer Yanıt Proteini 88)

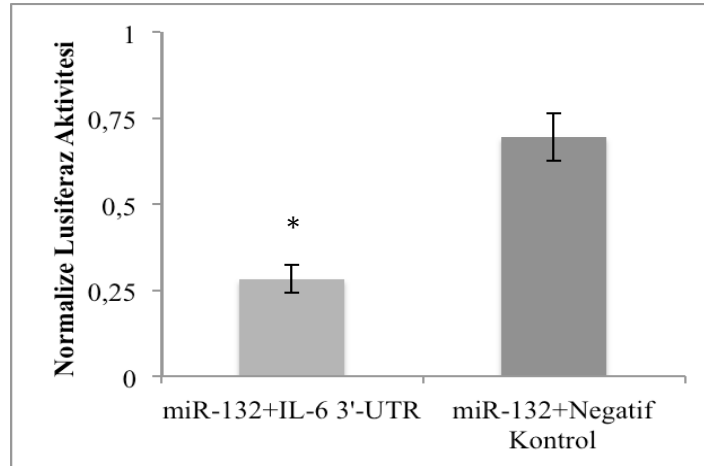
4.4. Lusiferaz Testi ile Hedef Genlerin Doğrulanması

Lusiferaz testi ile hedef genler deneysel olarak doğrulandı. Şekil 6, 7, 8 ve 9’da doğrulanan hedef genler görülmektedir.



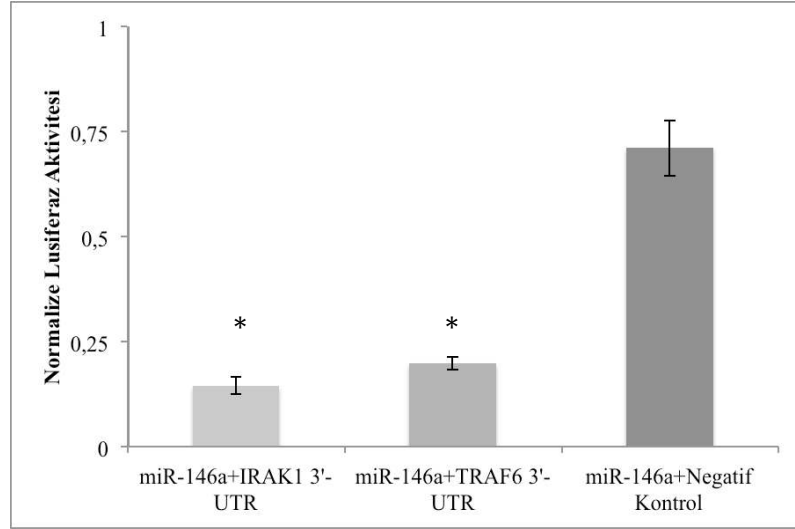
Şekil 6: miR-125b Hedef gen analizi

TNF- α ve IL-1 β 3'-UTR bölgeleri kullanılarak yapılan Lusiferaz testinde negatif kontrole göre lusiferaz aktivitelerinde anlamlı düzeyde azalma görüldü.



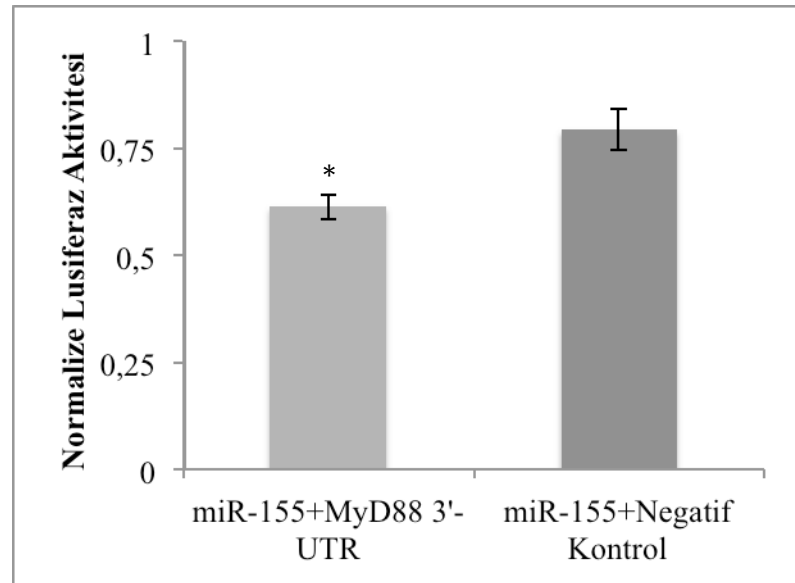
Şekil 7: miR-132 Hedef gen analizi

IL-6 3'-UTR bölgesi kullanılarak yapılan Lusiferaz testinde negatif kontrole göre lusiferaz aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma görüldü.



Şekil 8: miR-146a Hedef gen analizi

IRAK1 ve TRAF6 3'-UTR bölgeleri kullanılarak yapılan Lusiferaz testinde negatif kontrole göre lusiferaz aktivitelerinde anlamlı düzeyde azalma görüldü.



Şekil 9: miR-155 Hedef gen analizi

MyD88 3'-UTR bölgesi kullanılarak yapılan Lusiferaz testinde negatif kontrole göre lusiferaz aktivitesinde anlamlı düzeyde azalma görüldü.

5. TARTIŞMA

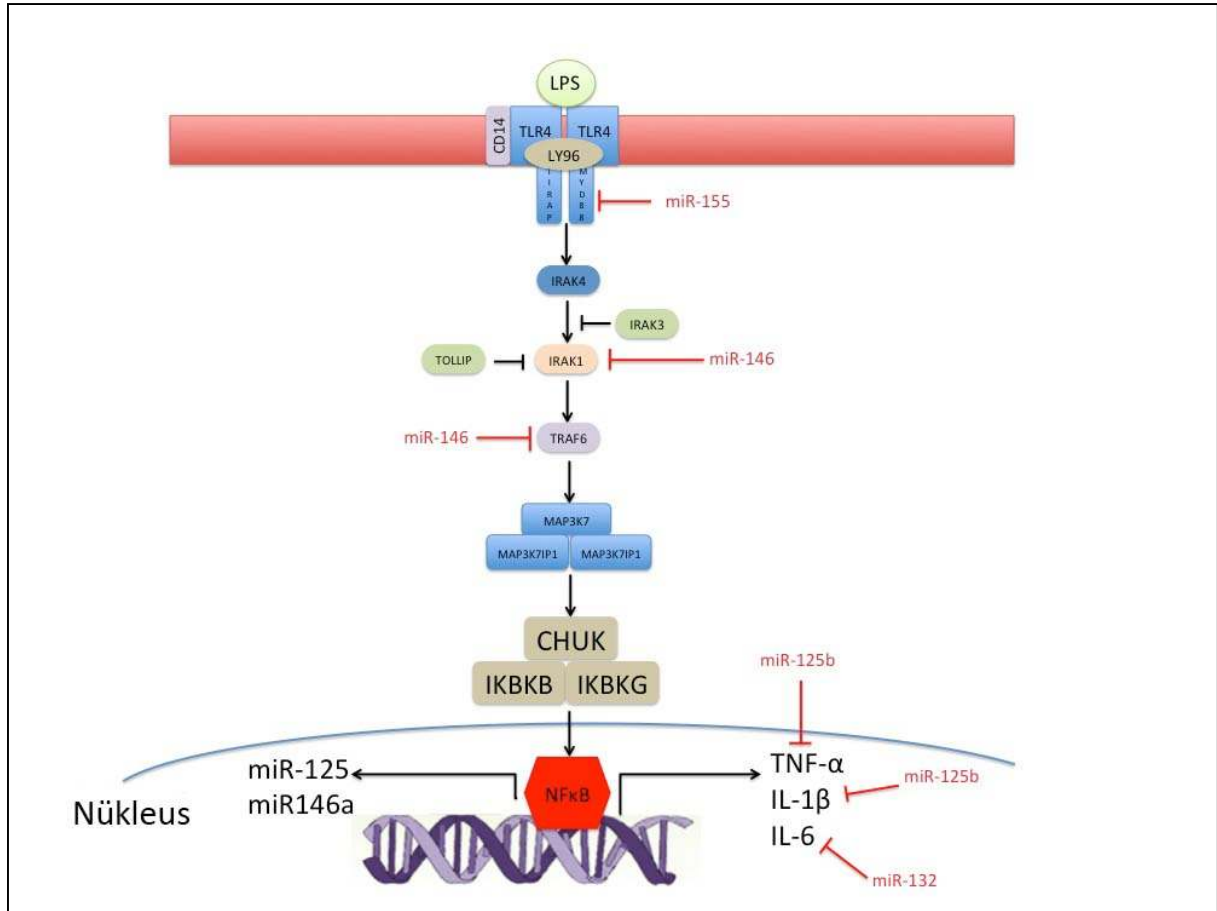
Çalışmamızda fare mikrogliya hücre hattı olan N9'da değişik dozlarda LPS uyarımıyla ekspresyonu değişen miRNA'lar mikroarray analizi ve qPCR yöntemleri ile ilk kez incelendi. Ekspresyonu değişen miRNA'ların hedefleri biyoinformatik analizle belirlendi ve belirlenen hedef genlerin doğrulama deneyleri Lusiferaz testiyle gerçekleştirildi.

Mikroarray sonuçlarına göre 30 tane miRNA'nın ekspresyonunda değişiklik saptandı. Ancak, saptanan miRNA ekspresyon değişimi istatistiksel olarak anlamlı değildi. Mikroarray analizinde ekspresyonu değişen miRNA'lar literatürde tarandı. İnflamasyonla ilgili olduğu gösterilen miR-125b miR-132, miR-146a ve miR-155 [180] seçilerek qPCR ile ekspresyon analizi gerçekleştirildi. qPCR analizinde miR-146a ve miR-155'in ekspresyonlarında doza bağlı anlamlı düzeyde artış saptandı; ancak, miR-125b ekspresyonunda 10 ng/ml dozunda anlamlı düzeyde azalma, 1000 ng/ml dozunda ise anlamlı düzeyde artış belirlendi. 100 ng/ml dozunda anlamlı düzeyde değişiklik saptanmadı.

miR-125b'nin periferik immün yanıtta rolü ilk kez Tili ve ark. tarafından makrofaj hücrelerinde gösterilmiştir [178]. Yapılan çalışmada Raw 264.7 fare makrofaj hücreleri LPS (100 ng/ml) ile uyarılarak miR-125b ekspresyonunda azalma belirlenmiştir. Yapılan *in vitro* deneyin *in vivo* doğrulaması amacıyla C57BL/6 farelerinin intra peritoneal yoldan LPS enjeksiyonuyla uyarılmasıyla oluşturulan modelde de miR-125b seviyelerindeki azalma doğrulanmıştır. Yapılan hedef doğrulama deneylerinde miR-125b'nin TNF- α mRNA'sının 3'-UTR bölgesini hedeflediği gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmaya ek olarak, bizim çalışmamız miR-125b'nin IL-1 β mRNA'sının hedeflendiğini göstermektedir.

Çalışmamızda, miR-125b ekspresyonunun 10 ng/ml LPS dozunda azalması Tili ve ark.'nın çalışmasının sonucuna göre uyumludur. miR-125b ekspresyonunun azalmasıyla TNF- α mRNA'sının translasyonu baskılanmadığı için TNF- α ekspresyonu artmaktadır. TNF- α pro-inflamatuar bir sitokin olduğu için LPS uyarımıyla normal koşullarda artması beklenmektedir. Ancak, miR-125b'nin 1000 ng/ml LPS dozunda artması günümüze kadar yapılmış çalışmalarda rastlanan bir durum değildir. miR-125b ekspresyonu NF- κ B aktivasyonu ile sağlanmaktadır [178]. Yüksek LPS dozunda (1000 ng/ml) miR-125b'nin

ekspresyonunun artmasının TLR4 (Şekil 10) yolağının çalışması sonucu olduğu düşünülmelidir.



Şekil 10: LPS sinyallemede miRNA'lar

miR-132 ekspresyonunun LPS uyarımıyla değiştiği ilk kez Taganov ve ark. tarafından gösterilmiştir [180]. Yapılan çalışmada THP-1 insan monosit hücre hattının 1000 ng/ml LPS dozunda 8 saat uyarılması sonrasında mikroarray analizi ile miRNA ekspresyon değişiklikleri incelenmiştir. Yapılan mikroarray analizi sonucunda miR-132 ekspresyon düzeyinde artış belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, PH patolojisinde rol alan α -synuclein proteinini over-eksprese eden transgenik farelerde yapılan mikroarray analizi miR-132 ekspresyonunda artış göstermiştir [183]. miR-132 ekspresyonu cAMP yanıt elemanı bağlanma proteini (cAMP response element binding; CREB) tarafından sağlanmaktadır. Yapılan çalışmada farelerde Pilokarpin kullanılarak nöbet oluşumu sonucu nöronal aktivite artışı sağlanmıştır [184]. Elde edilen beyin örneklerinde miR-132 ekspresyonunun arttığı

saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda miR-132'nin hipokampus, olfaktör bulb ve striatum nöronlarında eksprese olduğu ve korku koşullanması, kokuya maruz kalma ve kokain enjeksiyonu gibi durumlarda artarak sinaptik plastisitede etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Asetilkolin'in vagal sekresyonu sitokin salınımını önleyerek periferik inflamasyonu baskılamaktadır. Shaked ve ark. tarafından yapılan çalışmada Asetilkolinsteraz (AChE)'i hedefleyen miRNA'ların inflamasyonu azaltacağı öne sürülmektedir [185]. Bu çalışmada AChE mRNA'sını hedefleyen miR-132'nin antagonist LNA enjeksiyonu ile baskılanmasıyla dolaşımdaki ve dokulardaki AChE miktarında artma gözlenmiştir. Bu çalışma sayesinde beyin ve diğer vücut kısımları arasındaki iletişimde miR-132'nin rolü belirlenmiş oldu. Translasyonel represör protein olarak görev yapan Frajil X mental retardasyon proteini (FMRP) miRNP kompleksiyle etkileşmektedir. Edbauer ve ark. yaptıkları çalışmada fare beyinlerinde miR-132 ile FMRP'nin etkileşime girdiğini gösterilmiştir [186]. Yapılan çalışmaya göre miR-132'nin, hipokampal nöronlarının dendrit dikenli morfolojisi ve sinaptik fizyolojisine negatif etkileri bulunmaktadır. Son olarak, miR-132'nin Huntington hastalığı patolojisinde rol aldığı gösterilmiştir [187]. Yapılan çalışmada YAC128 ve R6/2 transgenik fare modelleri oluşturulmuş ve fare beyinlerinde ekspresyonu değişen miRNA'lar belirlenmiştir. Analiz sonucuna göre miR-132 ekspresyonu her iki modelde de azalmaktadır. miR-132'yi inceleyen tüm çalışmalara göre hedef olarak AChE doğrulanmıştır. Bizim çalışmamızda ise yeni bir hedef olan pro-inflamatuar sitokinlerden IL-6 belirlendi.

miR-132 ile ilgili tüm çalışmaların sonucuna göre, miR-132 beyinde eksprese olmakta ve patolojik süreçlerde ekspresyon düzeylerinde değişiklik olmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda LPS'le uygulanan inkübasyon süresinde miR-132 ekspresyonlarında değişiklik saptanamadı. Belirlediğimiz hedef IL-6 olduğundan miR-132 ekspresyonunda inflamasyon sürecinde değişiklik olabileceği düşünülmektedir. Başka zaman noktalarında ekspresyon değişiminin incelenmesi olası ekspresyon değişimini yakalamamızı sağlayabilir. Ayrıca miR-132 over-ekspresyonu veya inhibisyonu ile inflamatuvar yanıtlar ile IL-6 ekspresyonundaki değişikliklerin incelenmesi gerekmektedir.

miR-146a ekspresyonunun inflamatuvar süreçte değiştiği ilk kez Taganov ve ark. tarafından bildirilmiştir [180]. Çalışmada insan monosit hücre hattı THP-1'de, 1000 ng/ml

dozda LPS ile uyarımı ile miR-146a ekspresyon düzeyindeki azalma mikroarray analizi yöntemiyle belirlenmiştir. miR-146a promotor bölgesi analiz edildiğinde ise NF-κB aktivasyonuna bağlı transkribe olduğu gösterilmiştir. Hedef analizi çalışması ise TRAF6 ve IRAK1'i miR-146a hedefi olarak doğrulamıştır. Viral enfeksiyon sürecinde hücreler TLR ve Retinoik asit ile indüklenen gen I (Retinoic acid-inducible gene I; RIG-I) yolları üzerinden aktive olarak tip I interferon ve pro-inflamatuar sitokin üretmektedir. Hou ve ark. viral enfeksiyon mekanizmasında miRNA'ların rolünü incelediler [188]. Fare makrofaj hücreleri kullanılan bu çalışmada veziküler stomatit virüsü (VSV) enfeksiyonuyla miR-146a ekspresyonunda artış saptanmıştır. Bununla birlikte, IRAK2'nin de miR-146a hedefi olduğu bu çalışmada gösterilmiştir.

Endotoksin toleransı ikincil bir endotoksin uyarımına cevapsız kalınması olayıdır. Endotoksin uyarımı sürecinde uzun süreli maruziyet halinde proinflamatuar sitokin düzeyleri artmakta ve sistemik inflamasyona sebep olmaktadır. Nahid ve ark tarafından monositik hücrelerde LPS ön uyarımıyla endotoksin toleransında miR-146a'nın rolü incelenmiştir [189]. Yapılan çalışmada monositler 24 saat boyunca ön uyarım amacıyla LPS ile inkübe edilmiştir. Ön uyarım sonrasında hücreler ikinci kez LPS ile uyarılarak miR-146 ekspresyonları incelenmiştir. Çalışmaya göre ilk uyarım sonunda miR-146 a ekspresyonları 35 kata kadar artarken ikinci uyarım sonucunda miR-146a ekspresyonunda azalma gösterilmiştir. Bu çalışmayla sadece miR-146a'nın LPS toleransında rolü olduğu gösterildi.

miR-146a ekspresyonunun mikrogial hücrelerde viral enfeksiyon sürecinde değiştiği Rom ve ark tarafından belirlenmiştir [190]. Çalışmada insan primer fetal mikrogial hücreleri, HIV-1 ile enfekte edilerek miR-146a ekspresyonunda artış gözlenmiştir. HIV-1'in hücre içine girişi CD4/CCR5 kemokin reseptörü sayesinde olmaktadır ve bu reseptörün ligantı miR-146a hedefi olan CCL8/MCP-2'dir. Çalışmanın doğrulanması amacıyla incelenen HIV-ensefalitli beyinlerde de miR-146a ekspresyonunda artış, MCP-2 ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda miR-146a'nın HIV aracılıklı MSS inflamasyonunda önemli rolü olduğu gösterilmiş oldu. Bu çalışma mikrogial inflamasyonda miRNA ekspresyonunun incelendiği ilk çalışmadır.

Bizim çalışmamızda 10 ve 100 ng/ml LPS dozunda anlamlı artış saptandı. Ancak 1000 ng/ml LPS dozunda anlamlı değişiklik saptanamadı. Hedef belirleme çalışmalarımızda daha önce doğrulanmış hedefler olan TRAF6 ve IRAK1 yine bizim çalışmamızda incelenerek tekrar doğrulanmış oldu. Bu çalışmanın devamında miR-146a ekspresyonlarının zamana bağlı değişimlerinin de belirlenmesi gerekmektedir. Bunun da ötesinde miR-146a antagonist dizileri kullanılarak fonksiyonel deneylerin yapılması gerekmektedir.

miR-155'in doğal bağışıklık sistemi yanıtına katıldığını gösteren ilk çalışma Tili ve ark tarafından gerçekleştirildi. Çalışmada makrofajlar LPS ile uyarılarak miR-155 düzeylerinde artış gözlenmiştir [178]. *In vivo* olarak farelere LPS enjeksiyonu ile oluşturulan inflamasyon modeli *in vitro* sonucu doğrulamıştır. Çalışmada miR-155'in LPS sinyallemede rol alan proteinler olan Fas-ilişkili ölüm domaini proteini (Fas-associated death domain protein; FADD), IκB kinaz epsilon (IκB kinase epsilon; IKKepsilon) ve reseptör (TNFR süperaillesi)-ile etkileşen serin-treonin kinaz 1 [receptor (TNFR superfamily)-interacting serine-threonine kinase 1; Ripk1] ile etkileştiği öne sürülmektedir. Son olarak mutant miR-155 taşıyan transgenik farelerde LPS enjeksiyonunda daha fazla TNF-α üretilerek sistemik inflamasyona karşı hassasiyet yaratmaktadır.

miR-155, DH olgunlaşması ve patojen bağlanma süreçlerinde DH'ye özgü intersellüler adhezyon molekülü-3 tutan non-integrin (Dendritic Cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin; DC-SIGN) ve PU.1 transkripsiyon faktörünü baskılamaktadır [191]. Monosit ve tümör ilişkili makrofajlarda LPS ile oluşturulan diğer modellerde miR-155'in c/ebp Beta transkripsiyon faktörünü baskıladığı gösterilmiştir [192, 193].

miR-155'in viral enfeksiyonlarda da rol aldığı gösterilmiştir. Makrofajların VSV ile enfeksiyonunda TLR/MyD88'den bağımsız bir şekilde RIG-I/JNK/NF-κB bağımlı yoldan aktivasyon gerçekleşerek miR-155 ekspresyonunda artış belirlenmiştir [194]. Artan miR-155 sayesinde Sitokin sinyallemesinin baskılayıcısı 1'i (Suppressor of cytokine signaling 1; SOCS1) hedef alarak tip 1 interferon sinyallemesini başlatmaktadır. Tip 1 interferon sinyallemesinin başlamasıyla makrofajlar VSV'nin replikasyonunu baskılayıcı etki

göstermektedir. Bu çalışma sonucunda miR-155'in anti-viral koruma mekanizmasındaki rolü gösterilmiştir.

Çalışmamızda LPS uyarımıyla miR-155 ekspresyonunda LPS dozuna bağlı anlamlı artış saptandı. LPS uyarımı sonucunda elde edilen artış daha önce monositer hücrelerde yapılan çalışmalarla uyumludur. TLR4 yolunda en fazla hedefi olan miRNA miR-155'dir. Ayrıca, bizim çalışmamızda TLR4 yolağında rol alan MyD88 yeni bir hedef olarak bulundu. Bu çalışmanın devamında miR-155 için antagonist diziler kullanarak fonksiyonel deneylerin yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada inflammatuar uyaran olarak kullanılan LPS, TLR4 yolağı üzerinden aktivasyon sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar TLR yolağını etkileyen diğer miRNA'ların varlığını göstermiştir. Bu miRNA'lardan miR-9, miR-147 ve miR-346'nın ekspresyonu inflammatuar uyaran ile artarken, let-7b ekspresyonu azalmaktadır [195].

MS hastalığının fare modeli olan deneysel otoimmün ensefalomyelitte (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) mikrogial hücrelerde eksprese olan miR-124 ekspresyonu incelenmiştir. Makrofajlarda miR-124 over-ekspresyonu yapıldığında CCAAT/enhancer-bağlanan protein- α (CCAAT/enhancer-binding protein- α ; C/EBP- α) transkripsiyon faktörü ve bunun hedefi olan PU.1 inhibe edilerek istirahat hali fenotipine dönüştürmektedir [196]. Deneysel MS modeli EAE'de ise mikrogia'da miR-124 ekspresyonunda azalma gösterilmiştir. Bu çalışma sonucuna göre miR-124'ün de mikrogial aktivasyonda rol aldığı görülmektedir. Sonuç olarak, mikrogial hücrelerin LPS ile uyarılması sonucu miR-124 ekspresyonunda oluşabilecek değişikliklerin incelenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız kapsamında mikroglial aktivasyonda rol alan ve ekspresyonunda değişiklik saptanan miRNA'ların 3 tanesi (miR-125b, miR-146a ve miR-155) qPCR yöntemiyle belirlendi. Belirlenen miRNA'ların hedefleri biyoinformatik yöntemlerle incelenerek deneysel olarak Lusiferaz testiyle doğrulaması yapıldı. Analiz edilen hedef genlerin bir kısmı ilk kez bu çalışma ile gösterilmiş oldu. İlk kez gösterilen hedefler IL-1 β , IL-6 ve MyD88'dir.

Bu çalışmada, mikroglial hücrelerde sadece LPS dozuna bağımlı miRNA ekspresyon değişimleri incelendi. İncelenen miRNA'ların zamana bağılı değişimleri de endotoksine karşı yanıtın tam olarak belirlenmesi için gereklidir. Bu yüzden mikroglial hücreler değişik doz ve sürelerde LPS ile uyarılarak miRNA ekspresyon düzeyleri analiz edilmelidir.

miRNA'ların hedeflerinin belirlenmesinin dışında, miRNA ekspresyonlarının agonist dizilerle arttırılması veya antagonist dizilerle azaltılmasıyla fonksiyonel etkileri belirlenmelidir. Fonksiyonel deneylerde hem hedef gen ekspresyonları hem de inflamatuvar yanıt belirteci olarak proinflamatuvar sitokinlerden biri veya birkaçı qPCR, ELISA veya Western blot gibi yöntemlerle incelenmelidir.

Bu çalışmanın ötesinde, TLR yolağını etkileyen diğer miRNA'lar olan let-7b, miR-9, miR-147 ve miR-346'nın ekspresyonlarının LPS ile oluşturulan mikroglial aktivasyondaki değişimleri belirlenmelidir.

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. Monier A, Adle-Biasette H, Delezoide AL, Evrard P ve ark. Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66(5):372-82.
4. Streit WJ. Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology*. 2001;22(5):619-24.
5. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999;117(2):145-52.
6. Cuadros MA, García-Martín M, Martín C, Ríos A. Haemopoietic phagocytes in the early differentiating avian retina. *J Anat*. 1991;177:145-58.
7. Takahashi K, Yamamura F, Naito M. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol*. 1989;45(2):87-96.
8. Cuadros MA, Navascués J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol*. 1998;56(2):173-89.
9. Ling EA, Wong WC. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*. 1993;7(1):9-18.
10. Kaur C, Dheen ST, Ling EA. From blood to brain: amoeboid microglial cell, a nascent macrophage and its functions in developing brain. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(8):1087-96.
11. Brockhaus J, Möller T, Kettenmann H. Phagocytosing amoeboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia*. 1996;16(1):81-90.
12. Giulian D, Ingeman JE. Colony-stimulating factors as promoters of amoeboid microglia. *J Neurosci*. 1988;8(12):4707-17.

13. Hurley SD, Walter SA, Semple-Rowland SL, Streit WJ. Cytokine transcripts expressed by microglia in vitro are not expressed by amoeboid microglia of the developing rat central nervous system. *Glia*. 1999;25(3):304-9.
14. Kaur C, You Y. Ultrastructure and function of the amoeboid microglial cells in the periventricular white matter in postnatal rat brain following a hypoxic exposure. *Neurosci Lett*. 2000;290(1):17-20
15. 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.
16. Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*. 1985;54(3):589-99.
17. Milligan CE, Levitt P, Cunningham TJ. Brain macrophages and microglia respond differently to lesions of the developing and adult visual system. *J Comp Neurol*. 1991 Dec 1;314(1):136-46.
18. Kullberg S, Aldskogius H, Ulfhake B. Microglial activation, emergence of ED1-expressing cells and clusterin upregulation in the aging rat CNS, with special reference to the spinal cord. *Brain Res*. 2001;899(1-2):169-86.
19. Stolzing A, Grune T. Impairment of protein homeostasis and decline of proteasome activity in microglial cells from adult Wistar rats. *J Neurosci Res*. 2003;71(2):264-71.
20. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841-5.
21. Bildsoe H, Franklin V, Tam PPL. Fate-Mapping Technique: Using Carbocyanine Dyes for Vital Labeling of Cells in Gastrula-Stage Mouse Embryos Cultured In Vitro. *Cold Spring Harb Protoc*; 2007; doi:10.1101/pdb.prot4915.
22. Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*. 2007;55(3):233-8.

23. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(4):259-70.
24. 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.
25. 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.
26. Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH ve ark. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia.* 2006;54(8):815-25.
27. Blinzinger K, Kreutzberg G. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1968;85(2):145-57.
28. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005;308(5726):1314-8.
29. 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.
30. 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.
31. Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R. Fluorescent dye prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice cultures and ramify. *Eur J Neurosci.* 1997;9(4):863-6.
32. Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D ve ark. Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci.* 1998;10(10):3284-90.
33. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):312-8.
34. Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia.* 2001;33(3):256-66.

35. 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.
36. Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R ve ark. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J Neurosci.* 2009;29(5):1319-30.
37. Lopes KO, Sparks DL, Streit WJ. Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia.* 2008;56(10):1048-60.
38. López-Redondo F, Nakajima K, Honda S, Kohsaka S. Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;76(2):429-35.
39. Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain.* 2009;132(Pt 2):288-95.
40. Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* 2002;40(2):133-9.
41. Streit WJ. Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48(2):234-9.
42. Streit WJ. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci.* 2006;29(9):506-10.
43. Streit WJ, Miller KR, Lopes KO, Njie E. Microglial degeneration in the aging brain-bad news for neurons? *Front Biosci.* 2008;13:3423-38.
44. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1387-94.
45. Nakamura Y. Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(8):945-53.
46. van Rossum D, Hanisch UK. Microglia. *Metab Brain Dis.* 2004;19(3-4):393-411.
47. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(1):57-69.

48. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 2004;173(6):3916-24.
49. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):179-90.
50. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ ve ark. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science.* 2000;290(5497):1768-71.
51. Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC, Hoek RM ve ark. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity.* 2000;13(2):233-42.
52. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V ve ark. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci.* 2006;9(7):917-24.
53. Hamerman JA, Jarjoura JR, Humphrey MB, Nakamura MC ve ark. Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J Immunol.* 2006;177(4):2051-5.
54. Färber K, Kettenmann H. Purinergic signaling and microglia. *Pflugers Arch.* 2006;452(5):615-21.
55. Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 2007;30(10):527-35.
56. 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.
57. 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.
58. Hunter RL, Cheng B, Choi DY, Liu M ve ark. Intrastriatal lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice. *J Neurosci Res.* 2009;87(8):1913-21.
59. Graeber MB. Biomarkers for Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2009;216:249–253.

60. McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG. Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol.* 1988;76(6):550-7.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Liu Y, Hao W, Dawson A, Liu S ve ark. Expression of amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutant increases the neurotoxic potential of microglia via TLR2. *J Biol Chem.* 2009;284(6):3691-9.
65. 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.
66. 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.
67. Zhang Z, Artelt M, Burnet M, Trautmann K ve ark. Early infiltration of CD8+ macrophages/microglia to lesions of rat traumatic brain injury. *Neuroscience.* 2006;141(2):637-44.
68. Lünemann A, Ullrich O, Diestel A, Jöns T ve ark. Macrophage/microglia activation factor expression is restricted to lesion-associated microglial cells after brain trauma. *Glia.* 2006;53(4):412-9.
69. Nakajima K, Graeber MB, Sonoda M, Tohyama Y ve ark. In vitro proliferation of axotomized rat facial nucleus-derived activated microglia in an autocrine fashion. *J Neurosci Res.* 2006;84(2):348-59.

70. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):366-77.
71. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87(5):779-89.
72. 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.
73. Giunta B, Ehrhart J, Obregon DF, Lam L ve ark. Antiretroviral medications disrupt microglial phagocytosis of beta-amyloid and increase its production by neurons: Implications for HIV associated neurocognitive disorders. *Mol Brain*. 2011;4(1):23.
74. Chen SK, Tvrdik P, Peden E, Cho S ve ark. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell*. 2010;141(5):775-85.
75. Ponomarev ED, Novikova M, Maresz K, Shriver LP ve ark. Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. *J. Immunol Methods*. 2005;300:32–46.
76. Rosenstiel P, Lucius R, Deuschl G, Sievers J ve ark. From theory to therapy: implications from an in vitro model of ramified microglia. *Microsc Res Tech*. 2001;54(1):18-25.
77. Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia* 2001;36:165–79.
78. Wegiel J, Wiśniewski HM, Dziwiatkowski J, Tarnawski M ve ark. Reduced number and altered morphology of microglial cells in colony stimulating factor-1-deficient osteopetrotic op/op mice. *Brain Res*. 1998;804(1):135-9.
79. Righi M, Mori L, De Libero G, Sironi ve ark. Monokine production by microglial cell clones. *Eur J Immunol* 1989;19:1443-8.
80. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):89-105.
81. Boucsein C, Zacharias R, Färber K, Pavlovic S ve ark. Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur J Neurosci*. 2003;17(11):2267-76.

82. Hailer NP, Vogt C, Korf HW, Dehghani F. Interleukin-1 β exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci.* 2005;21(9):2347-60.
83. Saper CB, Sawchenko PE. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 2003;465(2):161-3.
84. Rhodes KJ, Trimmer JS. Antibodies as valuable neuroscience research tools versus reagents of mass distraction. *J. Neurosci.* 2006;26:8017–20.
85. Kantarci OH, Morales Y, Ziemer PA, Hebrink DD ve ark. CCR5Delta32 polymorphism effects on CCR5 expression, patterns of immunopathology and disease course in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005;169(1-2):137-43.
86. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:119-45.
87. Ambros V. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell.* 1989;57(1):49-57.
88. Ruvkun G, Giusto J. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. *Nature.* 1989;338(6213):313-9.
89. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
90. Wightman B, Bürglin TR, Gatto J, Arasu P ve ark. Negative regulatory sequences in the *lin-14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev.* 1991;5(10):1813-24.
91. Moss EG, Lee RC, Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell.* 1997;88(5):637-46.
92. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE ve ark. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901-6.

93. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V ve ark. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*. 2000;5(4):659-69.
94. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ ve ark. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.
95. 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.
96. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH ve ark. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23:4051-60.
97. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S ve ark. MicroRNA and maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21:4663-70.
98. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;10:1957-1966.
99. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:17719-24.
100. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H ve ark. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425:415-9.
101. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF ve ark. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432:231-5.
102. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T ve ark. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004;432:235-40.
103. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK ve ark. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18:3016-27.
104. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*. 2004;14:2162-2167.
105. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J*. 2005;24:138-148.

106. 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.
107. 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.
108. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17:3011-6.
109. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10:185-1.
110. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE ve ark. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303:95-8.
111. Hutvagner 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.
112. 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.
113. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115:209-16.
114. 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.
115. Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*. 2007;131:1097-108.
116. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404:293-6.
117. 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.

118. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG ve ark. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004;305:1437-41.
119. Kirino Y, Mourelatos Z. Site-specific crosslinking of human microRNPs to RNA targets. *RNA*. 2008;14:2254-9.
120. Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y ve ark. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*. 2005;434(7033):666-70.
121. Cordes KR, Srivastava D. MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circ Res*. 2009;104(6):724-32.
122. Chan SP, Slack FJ. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA Biol*. 2006;3:97-100.
123. Ding L, Han M. GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing. *Trends Cell Biol*. 2007;17:411-6.
124. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. 2005;7:719-723.
125. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd ve ark. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*. 2005;7:1261-1266.
126. Bhanji RA, Eystathiou T, Chan EK, Bloch DB, ve ark. Clinical and serological features of patients with autoantibodies to GW/P bodies. *Clin Immunol*. 2007;125:247-56.
127. Eystathiou T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD ve ark. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell*. 2002;13:1338-51.
128. Cougot N, Bhattacharyya SN, Tapia-Arancibia L, Bordonné R ve ark. Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation. *J Neurosci*. 2008;28(51):13793-804.
129. Hillebrand J, Barbee SA, Ramaswami M. P-body components, microRNA regulation, and synaptic plasticity. *Scientific World Journal*. 2007;7:178-90.
130. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E ve ark. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*. 2007;28:328-36.

131. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM ve ark. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007;130:89-100.
132. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448:83-6.
133. Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*. 2010;284(2):95-103.
134. Ender C, Krek A, Friedländer MR, Beitzinger M ve ark. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell*. 2008;32:519-28.
135. Saraiya AA, Wang CC. snoRNA, novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog*. 2008; 4:e1000224.
136. Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:209–220.
137. Taft RJ, Glazov EA, Lassmann T, Hayashizaki Y ve ark. Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA*. 2009;15:1233–1240.
138. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M ve ark. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004; 304:734–736.
139. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R ve ark. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*. 2005; 2:269–276.
140. Bogerd HP, Karnowski HW, Cai X, Shin J ve ark. A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral microRNAs. *Mol Cell*. 2010; 37:135–142.
141. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*. 2010; 465:584–589.
142. Saj A, Lai EC. Control of microRNA biogenesis and transcription by cell signaling pathways, *Curr Opin Genet Dev*. 2011, doi:[10.1016/j.gde.2011.04.01](https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.04.01).
143. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.

144. Aboobaker AA, Tomancak P, Patel N, Rubin GM ve ark. Drosophila microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18017–18022.
145. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R ve ark. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(13):5078-83.
146. 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.
147. Gupta A, Mo YY. Detection of microRNAs in cultured cells and paraffin-embedded tissue specimens by in situ hybridizaion. *Methods in Molecular Biology*. 2010;676:73-83.
148. 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.
149. Shena M, Shalon D, Davis R, Brown PA. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270:467-470.
150. Ranade AR, Weiss GJ. Methods for microRNA microarray profiling. *Methods Mol Biol*. 2011;700:145-52.
151. 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.
152. Steinhoff C, Vingron M. Normalization and quantification of differential expression in gene expression microarrays. *Brief Bioinformatics*. 2006;7:166-177.
153. 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.
154. 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.

155. 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.
156. 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.
157. 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.
158. 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.
159. Schneider M, Andersen DC, Silahatoglu 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.
160. 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.
161. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215-233.
162. Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP ve ark. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115:787-798.
163. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R ve ark. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*. 2005;37:495-500.
164. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T ve ark. Human MicroRNA targets. *PLoS Biology*. 2004;2:e363.
165. Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, Terry AV Jr ve ark. Experimental validation of miRNA targets. *Methods*. 2008;44(1):47-54.
166. 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.

167. Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):514-20.
168. Fontana L, Pelosi E, Greco P, Racanicchi S ve ark. MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol.* 2007;9(7):775-87.
169. 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.
170. 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.
171. Velu CS, Baktula AM, Grimes HL. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. *Blood.* 2009;113(19):4720-8.
172. 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.
173. 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.
174. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S ve ark. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature.* 2008;451(7182):1125-9.
175. 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.
176. 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.

177. 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.
178. 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.
179. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV ve ark. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;316(5824):608-11.
180. 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.
181. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park YJ ve ark. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(37):15819-24.
182. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C ve 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.
183. Gillardon F, Mack M, Rist W, Schnack C ve ark. MicroRNA and proteome expression profiling in early-symptomatic α -synuclein(A30P)-transgenic mice. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2(5):697-705.
184. Nudelman AS, DiRocco DP, Lambert TJ, Garelick MG ve ark. Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. *Hippocampus*. 2010;20(4):492-8.
185. Shaked I, Meerson A, Wolf Y, Avni R ve ark. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity*. 2009;31(6):965-73.
186. Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF ve ark. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*. 2010;65(3):373-84.

187. Lee ST, Chu K, Im WS, Yoon HJ ve ark. Altered microRNA regulation in Huntington's disease models. *Exp Neurol*. 2011;227(1):172-9.
188. Hou J, Wang P, Lin L, Liu X ve ark. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol*. 2009;183(3):2150-8.
189. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34590-9.
190. Rom S, Rom I, Passiatore G, Pacifici M ve ark. CCL8/MCP-2 is a target for mir-146a in HIV-1-infected human microglial cells. *FASEB J*. 2010;24(7):2292-300.
191. Martinez-Nunez RT, Louafi F, Friedmann PS, Sanchez-Elsner T. MicroRNA-155 modulates the pathogen binding ability of dendritic cells (DCs) by down-regulation of DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN). *J Biol Chem*. 2009;284(24):16334-42.
192. Worm J, Stenvang J, Petri A, Frederiksen KS ve ark. Silencing of microRNA-155 in mice during acute inflammatory response leads to derepression of c/ebp Beta and down-regulation of G-CSF. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(17):5784-92.
193. He M, Xu Z, Ding T, Kuang DM ve ark. MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta. *Cell Mol Immunol*. 2009;6(5):343-52.
194. Wang P, Hou J, Lin L, Wang C ve ark. Inducible microRNA-155 feedback promotes type I IFN signaling in antiviral innate immunity by targeting suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol*. 2010;185(10):6226-33.
195. Quinn SR, O'Neill LA. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *Int Immunol*. 2011 Jun 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21652514.
196. Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM ve ark. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. *Nat Med*. 2011;17(1):64-70.

8. EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	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 ☒	Beşir
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. S.
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.PhD.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Meltem
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yılı Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	İhsan



ÖZGEÇMİŞ

Araştırma Görevlisi KEMAL UĞUR TÜFEKÇİ

TC Kimlik No / Pasaport No:	15637590466
Doğum Yılı:	1987
Yazışma Adresi :	DEU Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sınır Bilimler ABD. İnciraltı 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-4124676
e-posta :	ugur.tufekci@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	SINIRBİLİM	Yüksek Lisans	2011
Türkiye	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	FEN FAKÜLTESİ	MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK	Lisans	2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Araştırma Görevlisi	2010-

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Moleküler Biyoloji ve Genetik , Genetik Bozuklukları (Hastalıklar) , İnsan Genetiği
Nöroimmünoloji, Nörobiyoloji, Moleküler Biyoloji

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
-----------	-------	-------	-------	-------	------------

MİKROGLİAL AKTİVASYONDA MİKRORNALARIN ROLÜ	Dokuz Eylül Üniversitesi	69000	15.04.2010-15.10.2011	Bursiyer	Ulusal
---	-----------------------------	-------	-----------------------	----------	--------

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. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi Poster Ödülü (3.lük)	Yeditepe Üniversitesi	2010

YAYINLARI**SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler**

Tufekci KU, Genc K. Neurovascular Protection by Erythropoietin: From the Bedside Back to the Bench. Stroke. 2010 Jul;41(7):e462. Epub 2010 May 13.

Kemal Ugur Tufekci, Kursad Genc. Lack of extra-erythropoietic activity of erythropoietin: Unexpected results, new perspectives. Blood E-letter (<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/eletters/blood-2009-10-248666v1>), 1/4/2010

Diğer dergilerde yayımlanan makaleler

Tufekci KU, Civi Bayin E, Genc S, Genc K. The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. Parkinsons Dis. 2011 Feb 22;2011:314082.

Tufekci KU, Genc S, Genc K. The endotoxin-induced neuroinflammation model of Parkinson's disease. Parkinsons Dis. 2011 Jan 18;2011:487450.

Tufekci KU, Oner MG, Genc S, Genc K. MicroRNAs and Multiple Sclerosis. Autoimmune Dis. 2010 Nov 11;2011:807426.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Ufuk Vurgun, Özlem Şahin, Kemal Uğur Tufekci, Görsev G. Yener, Kemal Kürşad Genç, Şermin Genç. Alzheimer Hastalığına yatkınlıkta Visfatin -948 G-T polimorfizminin etkisi. 10. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 9-12 Nisan, İstanbul.

Kemal Uğur Tufekci, Serpen Durnaoglu, Şermin Genç, Kemal Kürşad Genç. Mikroglial aktivasyonda endotoksin uyarımıyla ekspresyonu değişen mikroRNA'ların belirlenmesi ve fonksiyonel analizi. 10. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 9-12 Nisan, İstanbul.

Kemal Uğur Tufekci, Şermin Genç Aktive protein C'nin Nuclear factor E-2 related factor-2 nükleer translokasyonuna ve ekspresyonuna etkisi. Turk Norol Derg 201016(Ek 1):157-158

Kemal Uğur Tufekci, Serpen Durnaoglu, Şermin Genç, Kemal Kürşad Genç. Mikroglial hücrelerin endotoksine karşı mikroRNA yanıtı. Turk Norol Derg 201016(Ek 1):158-159

Diğer yayınlar

Düzenleme Tarihi :26/08/2011