

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROTEOMİK YAKLAŞIMLARLA NÖRODEJENERATİF
MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI VE TEDAVİYE YÖNELİK
POTANSİYEL HEDEFLERİN BELİRLENMESİ**

Çiğdem ACIOĞLU

**Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Yönetmeliğinin Tıbbi Genetik ve
Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü DOKTORA TEZİ Olarak
Hazırlanmıştır**

KOCAELİ
2016

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROTEOMİK YAKLAŞIMLARLA NÖRODEJENERATİF
MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI VE TEDAVİYE YÖNELİK
POTANSİYEL HEDEFLERİN BELİRLENMESİ**

Çiğdem ACIOĞLU

**Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Yönetmeliğinin Tıbbi Genetik ve Moleküler
Biyoloji Programı için Öngördüğü DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır**

DANIŞMAN: Doç. Dr. Hakan SAVLI
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL

**The Reynolds Family Spine Laboratory,
New Jersey Commission on Spinal Cord Research (NJCSCR)
Proje No: CSCR12IRG007
Rutgers Institutional Animal Care and Use Committee
Protokol No:14071**

KOCAELİ
2016

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

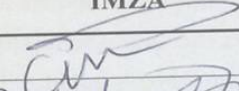
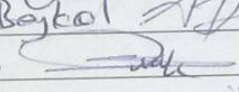
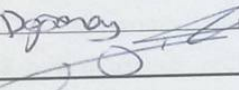
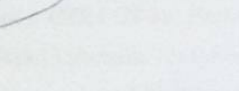
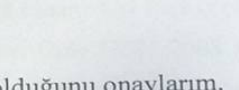
Tez Adı: Proteomik Yaklaşımlarla Nörodejeneratif Mekanizmaların Araştırılması ve Tedaviye Yönelik Potansiyel Hedeflerin Belirlenmesi

Tez Yazarı: Çiğdem ACIOĞLU

Tez Savunma Tarihi:

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hakan SAVLI, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	Doç. Dr. Hakan Savlı	
ÜYE (DANIŞMAN)	Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal	
ÜYE	Prof. Dr. Murat Kasap	
ÜYE	Doç. Dr. Gizem Dink Döğenay	
ÜYE	Doç. Dr. Xlaci Güne	

Onay

Yukarıdaki imzaların imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../20..

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Proteomik Yaklaşımlarla Nörodejeneratif Mekanizmaların Araştırılması ve Tedaviye Yönelik Potansiyel Hedeflerin Belirlenmesi

AMAÇ: *Toll-like* reseptör (TLR9) antagonizminin omurilik nöronlarında direkt ve astrosit aracılı etkisinin araştırılması ve TLR9 antagonizminin omurilik nöronlarında meydana getirdiği etkilerin altında yatan moleküler mekanizmaların belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Nöronal kültürler on üç günlük fare embriyolarının, astroglial kültürler ise üç günlük farelerin omuriliklerinden elde edilmiştir. Etiketsiz karşılaştırmalı proteom analizi nLC-MS/MS kullanılarak yapılmıştır. Nöronal canlılık β -III tubulin pozitif hücreler sayılarak belirlenmiştir. Sitokin/kemokin konsantrasyonları ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Yetişkin farelere T8 kontüzyon hasarı uygulanmıştır.

BULGULAR: nLC-MS/MS analizi ile omurilik nöronlarında TLR9 antagonisti *cytidine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide* (CpG ODN) 2088 uygulamasının ardından ekspresyonu değişen ($2\text{-kat} \leq$) 201 protein tanımlanmıştır. CpG ODN 2088 Parkin ve *gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1* (GABA(B)R1) protein seviyelerinde artışa neden olmuştur. Omurilik hasarlı farelere CpG ODN 2088 muamelesi Parkin protein seviyesinde hasara bağlı meydana gelen azalmayı baskılamıştır. CpG ODN 2088 ayrıca omurilik nöronlarını kainik asidin (KA) indüklediği eksitotoksik ölümden *in vitro* korumuş ve KA'nın yol açtığı endoplazmik retikulum (ER) stresini azaltmıştır. CpG ODN 2088 astrositlerden interlökin 6 (IL-6), *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (CXCL1) ve *monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) salgısını *in vitro* azaltmıştır. CpG ODN 2088 uygulanan astroglial besiyeri nöronal canlılığı ve nöronal TrkB protein miktarını azaltmıştır. Astrosit-nöron ko-kültürlerinin CpG ODN 2088 ile muamelesi de nöronal canlılığı azaltmıştır.

SONUÇ: TLR9, omurilik nöronlarının ve astrositlerinin işlevlerinin düzenlenmesinde rol oynayabilir. Direkt TLR9 antagonizmi omurilik nöronlarında ER stres cevabını kısmen baskılayarak nöronları eksitotoksiteden korur. Buna karşın, astroglial TLR9'un inhibisyonu nöronal hayatta kalımı azaltır.

ANAHTAR KELİMELER: Omurilik yaralanmaları, *Toll-like* reseptörler, proteomiks, nörodejenerasyon, nöronal koruma, eksitotoksiste, endoplazmik retikulum stresi

SUMMARY

The Investigation of Neurodegenerative Mechanisms by Using Proteomic Approaches and Determining Potential Therapeutic Targets

OBJECTIVE: The aim of the current study is to investigate the effect of toll-like receptor (TLR9) antagonism on spinal cord (SC) neurons through direct and astrocyte-mediated actions and to elucidate the underlying mechanisms.

METHODS: Neuronal cultures were established from the SC of 13-day-old mouse embryos. Astroglial cultures were obtained from the SC of 3-day-old pups. Label-free differential proteome analysis were performed by nLC-MS/MS. Neuronal viability was assessed by counting β -III tubulin positive cells. Chemokine/Cytokine concentrations were measured by ELISA. A SC contusion injury was induced in adult mice at the T8 level.

RESULTS: nLC-MS/MS analysis identified 201 differentially modulated proteins in SC neurons (2-fold \leq) in response to the TLR9 antagonist cytidine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide (CpG ODN) 2088, *in vitro*. Parkin and gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1 (GABA(B)R1) were among proteins which were up regulated by CpG ODN 2088. Intrathecal administration of CpG ODN 2088 to mice sustaining spinal cord injury prevented the injury-induced decrease in Parkin at the epicenter. CpG ODN 2088 protected SC neurons from kainic acid (KA)-induced excitotoxic death *in vitro* and attenuated the KA-elicited endoplasmic reticulum (ER) stress response via direct effects. CpG ODN 2088 reduced interleukin 6 (IL-6), chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) release by astrocytes, *in vitro*. Conditioned medium of CpG ODN 2088-treated astrocytes also reduced the viability of neurons and decreased neuronal Trk receptor B (TrkB) protein levels. Treatment of astrocyte-neuron co-cultures with CpG ODN 2088 reduced neuronal viability.

CONCLUSIONS: TLR9 plays role in the regulation of SC neuronal and astroglial function. Direct TLR9 antagonism protects neurons against excitotoxicity partly through the attenuation of the ER stress response. In contrast, astroglia adversely affect neuronal survival following blockade of TLR9.

KEYWORDS: Spinal cord injury, Toll-like receptors, proteomics, neurodegeneration, neuroprotection, excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgisiyle beni yönlendiren, ufkumu açan, anlayışı ve hoşgörüsü sayesinde bu tez çalışmasının oluşmasına öncülük eden değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a,

Tez çalışmamda başından sonuna kadar en az benim kadar emeği olan, çalışmalarımı yönlendiren, bana evinde ve laboratuvarlarında yer açan; tanıştığım günden itibaren bana hocadan çok aile olan ve her zaman arkamda duran çok kıymetli hocam Doç. Dr. Stella Elkabes'e,

The Reynolds Family Spine laboratuvarında çalışmama olanak sağlayan, bana inanarak maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Robert F. Heary'e,

Doktora eğitimim süresince beni destekleyen ve bu doktora programına girmeme imkan sağlayan arkadaşım ve hocam Doç. Dr. Naci Çine'ye,

Tez çalışmama sunduğu katkılarından dolayı Doç. Dr. Hakan Savlı'ya,

Doktora çalışmalarım sırasında laboratuvar olanaklarını paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Murat Kasap ve Yrd. Doç. Dr. Gürler Akpınar'a,

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmada kullandığım yöntemleri geliştirmemi sağlayan ve laboratuvar çalışmalarına katkılarını sunan güzel insan Dr. Li Ni'ye,

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, özellikle yazım aşamasındayken deneylerime sağladığı katkılarla yükümü hafifleten güler yüzlü arkadaşım Ersilla Mirabelli'ye,

Çalışmalarım sırasında sundukları yardımlar ve arkadaşlıkları için Lorelei Pratt'a, Ayomi Ratnayake'ye, Veronika Khariv'e, Alexandra Pallottie'ye ve Lun Li'ye,

Amerika'da bulunduğum süreyi huzurlu ve mutlu geçirmemi sağlayan değerli arkadaşım Montserrat Vargas Hernandez'e; varlıklarıyla güven veren ve bize aile olan Debora Ballardini'ye, Duke York'a ve minik arkadaşım Gustavo'ya,

Doktora eğitimimim başından beri beraber yol aldığım ve sıkıntıları beraber göğüs gerdiğim sevgili arkadaşım Tuğba Tarhan Demircioğlu'na,

Doktora eğitimim süresindeki yardımlarından dolayı Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji ABD çalışanlarına,

Doktora eğitimim süresince gösterdikleri hoşgörüden dolayı Kilis 7 Aralık Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine,

Çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm TÜBİTAK MAM'da geçirdiğim sürede yardımları ve dostluğu için şeker kardeşim Ömer Kaçar'a,

TÜBİTAK MAM'da laboratuvar çalışmalarına sundukları katkılarından ve yardımlarından dolayı Dr. Ceyda Açılan Ayhan'a, Dr. Müge Serhatlı'ya ve Zelal Adıgüzel'e,

Proteomik analizleri yapan ve yardımlarıyla yanımda olan sevgili arkadaşlarım Emel Akgün ve Şeyma Türkseven'e,

Tez yazımına görüşleri ile sağladığı katkılardan dolayı acı tatlı her anımızı paylaştığımız ömürlük dostum Dr. Sibel Karahan Arslan'a,

Bu meşakkatli süreçte beni en iyi anlayan, önüme çıkan her engeli tek tek aşmamda büyük emeği olan, çok uzaklarda bile olsam hep yanımda hissettiğim, değerli yoldaşlarım, dostlarım Dr. Kıvılcım Çaktü Güler'e ve Yrd. Doç. Dr. H. Aysun Mercimek Takçı'ya,

Doktora eğitimimin en zorlu süreçlerinde yanımda olan; dolu dolu, mutlu ve eğlenceli bir yıl geçirmemi sağlayan, yıllar sonra New York'ta bulduğum şansım Justin B. Mingo'ya,

Desteklerinden ve anlayışlarından dolayı sevgili kardeşlerim Neşe, Serpil ve Önder'e,

Gözümün nuru, canımın içi, gülen yüzüm yeğenlerim Anıl ve Eren'e,

Bu günlere gelmemde ve eğitim hayatımda büyük emeği olan, hep kalbimde yaşayacak dedem Ömer Acıoğlu'na,

Hayatım boyunca aldığım her karara saygı gösteren ve yanımda duran, çok uzaklara düşmemize neden olmasına rağmen ruhumu özgür bırakan, mücadele etmenin ve dik duruşun ne demek olduğunu öğrendiğim Canım Annem'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tezi, bu günümde yanımda olabilmesini her şeyden çok istediğim Canım Babam'a ithaf ediyorum.

TEZİN AŞRIMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırımı olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

Çiğdem ACIOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
TEZİN AŞRIMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ÇİZİMLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1 <i>Toll-like</i> Reseptörler	4
1.2 TLR Sinyal Yolağı	6
1.3 Omuriliğin Yapısı	8
1.4 Omurilik Yaralanmaları	10
1.4.1 Omurilik Yaralanmalarının Epidemiyolojisi	10
1.4.2 Omurilik Yaralanmalarının Patafizyolojisi	11
1.5 Astrositler	12
1.6 Merkezi Sinir Sistemi Yaralanmalarında Astrositlerin Rolü	13
1.7 Nörotrofinler ve Nörotrofin Reseptörleri	15
1.8 Endoplazmik Retikulum Stresi ve Katlanmamış Protein Cevabı	16
2. AMAÇ	20
3. YÖNTEM	22
3.1 Materyal	22
3.1.1 CpG ODN 1826	22
3.1.2 CpG ODN 2088	22
3.2 Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri	22
3.3 Hayvanların Bakımı	23
3.4 Omurilik Nöron Kültürü	24
3.5 Karışık Glial Kültür	25
3.6 Karışık Glial Kültürlerden Astrositlerin Saflaştırılması ve Pasajlanması	25
3.7 Astroglial Şartlandırılmış Besiyeri Üretimi	26
3.8 Mikroglial Kültürlerin Saflaştırılması	26

3.9 Astrosit-Nöron Ko-Kültürleri	27
3.10 Nöronların CM, CpG ODN 2088 veya KA ile Muamelesi	27
3.11 ELISA	28
3.12 Sitokin Array	29
3.13 Proliferasyon Analizi	30
3.14 RNA İzolasyonu	31
3.15 cDNA Sentezi ve qRT-PCR	31
3.16 DNA İzolasyonu ve Genotiplendirme	32
3.17 İmmünohistokimya	33
3.17.1 3,3'-diaminobenzidin (DAB) Boyama	33
3.17.2 Floresan Boyama	34
3.18 Protein Özütleme	34
3.19 Bio-RAD DC Assay ile Protein Miktar Tayini	35
3.20 LC-MS/MS Analizi ve Veri Bankası Taraması	35
3.21 Western Blot Analizi	36
3.22 Omurilik Kontüzyon Hasarı	38
3.23 Farelere CpG ODN 2088 Uygulaması	39
3.24 Dokudan Protein Özütleme	39
3.25 BCA Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	40
3.26 İstatiksel Analizler ve Grafik Çizimleri	40
4. BULGULAR	41
4.1 Omurilik Nöronları ve Astrositlerinde TLR9 Ekspresyonu	41
4.2 CpG ODN 2088, TLR9 Agonisti CpG ODN 1826'nın Uyarıcı Etkisini Baskılar	41
4.3 Etiketsiz Karşılaştırmalı Proteom Analizi ve IPA Yolak Analizi	42
4.4 CpG ODN 2088 Omurilik Nöronlarında <i>in vitro</i> Parkin ve GABA(B)R1 Ekspresyonunu Azaltır	47
4.5 TLR9 Antagonizmi Omurilik Nöronlarını Eksitotoksik Ölümden Kurtarır	48
4.6 CpG ODN 2088 Omurilik Nöronlarında KA'nın Yol Açtığı Endoplazmik Retikulum Stresini Azaltır	50
4.7 Astroglial TLR9'un CpG ODN 2088 ile İnhibisyonu Omurilik Astrositlerinden CXCL1, MCP1 ve IL-6 Salgısını Azaltır	53
4.8 TLR9 Antagonizmi Omurilik Astrositlerinin Proliferasyonunu Etkilemez	56
4.9 TLR9 Antagonizmi Omurilik Mikrogliasında CXCL1 ve IL-6 Salgısını Etkilemez	57
4.10 CpG ODN 2088 Uygulanan Astroglial CM <i>in vitro</i> Nöronal Canlılığı Azaltır	58

4.11 Astroglial CM ile İnkübe Edilen Nöronların Proteom Analizi	59
4.12 CpG ODN 2088 Uygulanan Astrosit CM Omurilik Nöronlarında TrkB Protein Seviyesini Azaltır	64
4.13 CpG ODN 2088 Astrosit-Nöron Kültürlerinde Astrositlerin Nöronal Canlılığı Destekleyici Etkisini Baskılar	65
4.14 CpG ODN 2088 Omurilik Hasarına Bağlı Olarak Parkin Protein Seviyesinde Meydana Gelen Azalmayı Baskılar	66
4.15 Farelerde Omurilik Yaralanmaları Hasar Merkezinde Endoplazmik Retikulum Stresine Yol Açar	67
4.16 CpG ODN 2088 Omurilik Yaralamalarında Hasar Merkezinde TrkB ve TrkC Protein Seviyeleri Etkilemez	68
5. TARTIŞMA	70
5.1 Sınırlılıklar	81
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	93

SİMGELER ve KISALTMALAR

- Akt: *Alpha and serin/treonin kinase*
- ALS: Amiyotrofik lateral sklerozda
- AMPA: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izooksazolpropionik asit
- ANOVA: Değişken analizi
- AP-1: *Activator protein 1*
- AraC: *Cytosine-1- β -D-arabibofuranoside*
- ATF: *Activating transcription factor*
- ATP: Adenozin trifosfat
- BBB: *Blood-brain barrier*; Kan-beyin bariyeri
- BCA: *Bicinchoninic acid*
- BDNF: *Brain derived neurotrophic factor*
- BiP: *Immunoglobulin-heavy-chain binding protein*
- BMS: *Basso mouse scale*
- BOS: Beyin omurilik sıvısı
- BSA: *Bovine serum albumin*
- BSB: *Brain-spinal cord barrier*; kan-omurilik bariyeri
- Casp: Kaspaz
- cDNA: *complementary DNA*
- CM: Şartlandırılmış besi yeri (Conditioned medium)
- CO₂: Karbondioksit
- CpG ODN: *Cytidine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide*
- CSPG: Kondriotin sülfat fosfoglukan
- CuSO₄: Bakır sülfat
- CXCL1: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1*
- DAB: 3,3'-diaminobenzidin
- DAMP: *Damage associated molecular patterns*
- DNA: *Deoksiribo nükleik asit*
- dNTP: Deoksinükleozid trifosfat
- DTT: Ditiotreitol
- ECL: Enhanced chemiluminescent
- ECM: Ekstrasellular matriks

EdU: 5-etinil-2'-deoksiüridin
ELISA: *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*
ER: Endoplazmik retikulum
ERAD: *Endoplasmic-reticulum associated-protein degradation*
ERK: *Extracellular signal regulated kinase*
FBS: *Fetal bovine serum*
GABA_BR: *Gamma-aminobutyric acid type B receptor*
GABA(B)R1: *Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1*
HMGB: *High mobility group box-1*
HRP: *Horse raddish peroxidase*
HSP: *Heat shock protein*
H₂O₂: Hidrojen peroksit
IAA: Iodoasetamit
IFN: İnterferon
IL: İnterlökin
IPA: Ingeunity Pathway Analysis
IRAK: *Interleukin-1 receptor-associated kinase*
IRF: *Interferon regulatory factor*
K: Potasyum
KCC: Potasyum-klorür ko-transporter
LC-MS: Sıvı kromatografili kütle spektroskopisi
LP: Lomber ponksiyon
LRR: *Leucine-rich repeat*
MAPK: *Mitogen-activated kinases*
MCP-1: *Monocyte chemotactic protein 1*
MEM: Minimum essential medium
miRNA: mikro RNA
MS: Multiple Skleroz
MyD88: *Myeloid differentiation 88*
Na: Sodyum
NaCl: Sodyum Klorür
NaF: Sodyum Florid
NaN₃: Sodyum Azid
NBM: Neurobasal medium

NF- κ B: *Nuclear factor- κ B*
NGF: *Neuronal growth factor*
NMDA: N-metil-D-aspartat
NO: Nitrik oksit
NT: Nörotrofin
N-21: Neurobrew 21
PAMP: *Pathogen-associated molecular patterns*
PBS: *Phosphate-buffered saline*
PFA: Paraformaldehit
PI-3: Phosphatidylinositol-3 kinase
PLC/IP-3 : *Phospholipase-C/inositol-3-phosphate*
PVDF: Polivinilidin florid
qRT-PCR: *Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction*
RNA: Ribonükleik asit
ROS: Reaktif oksijen türleri
SC: *Spinal cord*
SDS: Sodyum dodesil sülfat
SEMA-3: *Semaphorin 3*
siRNA: *small interfering RNA*
sTNFR1: *soluble TNF- α receptor 1*
TAB: *TAK1-binding protein*
TAE: Tris-asetat-EDTA
TAK: *Transforming growth factor- β (TGF- β) activated kinase*
TBS: *Tris-buffered saline*
TFA: Trifloroasetik asit
TGF- β : *Transforming growth factor- β*
TIR: Toll/IL-1 receptor
TOF: *Time of flight*
TRAF: *tumor necrosis factor (TNF)-associated factor*
TIRAP/Mal: *TIR-domain-containing adaptor/MyD88 adaptor-like*
TRAM: *TRIF-related adaptor molecule*
TNF- α : *Tumor necrosis factor α*
UHPLC: Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
UPR: Katlanmamış protein cevabı

UPX: Universal protein extraction kit

VEGF-A: *Vascular endothelial growth factor*

XBP1: *x-box-protein binding 1*

WT: Yabani tip



ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. TLR'lerin sinyal iletim yolağı.....	8
Çizim 1.2. Omuriliğin yapısı.....	9
Çizim 1.3. BDNF/TrkB sinyal iletimi.....	16
Çizim 1.4. ER stresi ve UPR sinyal yolağı	19
Çizim 3.1. Omurilik nöronları, <i>in vitro</i>	24
Çizim 3.2. Omurilik astrositleri, <i>in vitro</i>	25
Çizim 3.2. Astrosit-nöron ko-kültürünün şematik gösterimi	26
Çizim 4.1. Omurilik astrosit (A) ve nöron (N) kültürlerinde TLR9 transkripsiyonu	40
Çizim 4.2. TLR9 agonisti CpG ODN 1826'nın ve TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in omurilik astrositlerinde CXCL1 salgısı üzerine etkisi	41
Çizim 4.3. CpG ODN 2088 ile muamele edilen omurilik nöronlarında ekspresyon seviyesi 2-kat ≤ değişen proteinlerin yolak analizi sonucunda belirlenen protein ağı haritaları.....	45
Çizim 4.4. CpG ODN 2088 muamelesinin nöronal GABA(B)R1 ve Parkin protein ekspresyonları üzerine etkisi	47
Çizim 4.5. CpG ODN 2088'in KA'nın yol açtığı nöronal ölüm üzerine etkisi	48
Çizim 4.6. TLR9 ^{+/+} veya TLR ^{-/-} astrosit ve nöron kültürlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel görüntüsü.....	49
Çizim 4.7. CpG ODN 2088'in ve KA'nın omurilik nöronlarında BiP ve PDI proteinleri üzerine etkisi.....	51
Çizim 4.8. CpG ODN 2088'in astrositlerde sitokin salgısı üzerine etkisi	52
Çizim 4.9. CpG ODN 2088'in astrositlerden kemokin ve sitokin salgısı üzerine etkisi	54
Çizim 4.10. CpG ODN 2088'in astroglial proliferasyon üzerine etkisi.....	55
Çizim 4.11. CpG ODN 2088'in TLR9 ^{+/+} ve TLR9 ^{-/-} mikroglia da CXCL1 ve IL-6 salgısı üzerine etkisi.....	56
Çizim 4.12. <i>Vehicle</i> veya CpG ODN 2088 ile muamele edilmiş astroglial CM'nin <i>in vitro</i> nöronal canlılık üzerine etkisi.....	57
Çizim 4.13. Astroglial CM'nin ve CpG ODN 2088'in nöronal canlılık üzerine etkisi	58
Çizim 4.14. CpG ODN 2088 uygulanmış astroglial CM ile inkübe edilen omurilik nöronlarında protein seviyesi 1,5-kat ≤ değişen proteinlerin yolak analizi sonucunda belirlenen protein ağı haritası.	63

Çizim 4.15. <i>Vehicle</i> veya CpG ODN 2088 ile muamele edilmiş astroglial CM'nin omurilik nöronlarında <i>in vitro</i> TrkB ve TrkC protein seviyeleri üzerine etkisi	64
Çizim 4.16. CpG ODN 2088'nin astrosit-nöron ko-kültürleri üzerinde etkisi	65
Çizim 4.17. Omurilik kontüzyon hasarı uygulanan yetişkin farelerde CpG ODN 2088'in hasar merkezinde Parkin proteini üzerine etkisi.....	66
Çizim 4.18. Omurilik kontüzyon hasarı uygulanan farelerde CpG ODN 2088'in hasar merkezinde BiP ve PDI protein seviyeleri üzerine etkisi.....	67
Çizim 4.19. Omurilik kontüzyon hasarı uygulanan farelerde CpG ODN 2088'in hasar merkezinde TrkB ve TrkC protein seviyeleri üzerine etkisi.....	68



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Endojen ve Ekzojen TLR ligandları.....	6
Çizelge 3.1 cDNA sentezi reaksiyonu bileşenleri	31
Çizelge 3.2 Western blot ve immünohistokimya analizlerinde kullanılan antikorlar	37
Çizelge 4.1. CpG ODN 2088 ile muamele edilen omurilik nöronlarında ekspresyon seviyesi 2-kat≤ değişen proteinler	42
Çizelge 4.2. CpG ODN 2088 uygulanmış astroglial CM ile inkübe edilen omurilik nöronlarında nLC-MS/MS analizi sonucu ekspresyonu 1,5-kat≤ değişen proteinler.	59



1.GİRİŞ

Toll-like reseptörler (TLR) çeşitli patojen kökenli moleküler motifleri tanıyan (PAMP; *pathogen-associated molecular patterns*) ve doğal bağışıklık cevabını başlatan transmembran reseptörlerdir (Bsibsi ve diğ. 2002, Kaisho ve Akira 2006, Okun ve diğ. 2009). Herbir TLR dimeri lipid, lipoprotein, nükleik asit veya protein olabilen farklı bir PAMP'ı tanır. Birçok ekzojen ligandın yanı sıra, hasarlı veya ölen hücrelerden salınan *Damage associated molecular patterns* (DAMPs) olarak adlandırılan endojen ligandlar da TLR'lere bağlanarak hücre içi sinyal yolağını aktive ederler (Heiman ve diğ. 2014, Okun ve diğ. 2009). TLR'ler memeli bağışıklık sistemi hücrelerinin yanı sıra merkezi sinir sisteminin nöronal ve glial hücrelerinde de eksprese edilirler (Bsibsi ve diğ. 2002). TLR'lerin aktive edeceği sinyal yolağı TLR'lerin çeşidine, aktivasyon durumuna ve bulunduğu hücreye bağlı olarak değişir (Heiman ve diğ. 2014). Örneğin mikroglia da TLR2, TLR3 ve TLR4 uyarımı sitokin ve kemokin cevabı başlatırken, astrositlerde TLR3 uyarımı sadece IL-6 ekspresyonunu başlatır (Jack et. al. 2005). TLR'lerin hücre sel lokalizasyonu da *downstream* sinyal basamaklarını etkiler. Bu yüzden, farklı hücrelerin TLR'lerin uyarılmasına karşı verdiği yanıt da farklılık kazanır (Bsibsi ve diğ. 2002, Hanisch ve diğ. 2008, Heiman ve diğ. 2014, Van Noort ve Bsibsi 2009).

TLR'lerin bağışıklık sistemindeki rolü iyi tanımlanmış ve bu konuda birçok ilerleme kaydedilmiştir. Son yıllarda, TLR'lerin merkezi sinir sistemindeki işlevlerine dikkat çekilmiş ve bu alanda yapılan çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır. TLR'ler nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde rol alırken aynı zamanda merkezi sinir sisteminde koruyucu etki de yaratabilirler (Okun ve diğ. 2009). TLR'lerin merkezi sinir sistemi hastalıklarında veya yaralanma durumunda steril inflamasyonun düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir (Heiman ve diğ. 2014, Kaisho ve Akira 2006, Okun ve diğ. 2009). DAMP aracılı TLR aktivasyonu vücudu olası tehlikeye karşı uyararak savunma veya onarım mekanizmasını indükleyebilir veya inflamatuvar hastalıkların patogenezinde yer alabilir. TLR'ler; aktive olan TLR'ye, bulunduğu hücreye ve duruma bağlı olarak hastalığın veya yaralanmanın alevlenmesine veya iyileşmesine yol açabilir (Bsibsi ve diğ. 2002, Heiman ve diğ. 2014, Van Noort ve Bsibsi 2009). Örneğin doğumsal bir nörodejeneratif hastalık olan ve omurilikte motor nöronlarının kaybı ile karakterize amiyotrofik lateral sklerozda (ALS) TLR'lerin steril inflamasyona aracılık ettiği belirlenmiştir. *Post-mortem* yapılan bir çalışmada ALS hastalarının omuriliklerinde TLR2

ve TLR4 mRNA seviyelerinin kontrol gruplarına göre yüksek olduğu belirlenmiştir (Casula ve diğ. 2011). ALSSOD1-G93A fare modelinde yapılan bir çalışmada TLR4 agonisti lipopolisakkaritin (LPS) sistemik uygulaması hastalığın şiddetini artırmış ve ventral lomber (L5) omurilikte nöronal ve astroglial kaybın meydana geldiği bölgelerde mikroglia da TLR2 ekspresyonunun ve pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonlarında artış tespit edilmiştir (Nguyen 2004). Bu çalışmalar TLR2 ve TLR4'ün ALS'de rolü olduğunu işaret etmelerine rağmen bu TLR'lerin hastalıkla ilişkisinin altında yatan moleküler mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Kronik inflamasyon ve demiyelinizasyon ile karakterize edilen Multiple Skleroz (MS) hastalığında da MS lezyonlarında TLR'lerin ekspresyonlarında çarpıcı bir artış olduğu gösterilmiştir. MS hastalarında sağlıklı beyaz cevherde TLR ekspresyonu bulunmamasına rağmen aktif lezyon bölgelerinde mikroglia da TLR3 ve TLR4'ün yüksek miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (Bsibsi ve diğ. 2002). TLR sinyal yolağında bir adaptör protein olan MyD88'in eksprese edilmediği MyD88^{-/-} farelerde MS'in deneysel bir modeli olan deneysel otoimmün ensefalitinin (EAE; *experimental autoimmune encephalomyelitis*) gelişiminin baskılandığı gösterilmiştir (Marta ve diğ. 2008). Öte yandan TLR4^{-/-} ve TLR9^{-/-} farelerle yapılan çalışmalarda TLR4 ve TLR9 aktivasyonunun hastalığın şiddetinin düzenlenmesinde rol oynadığı ifade edilmiştir (Marta ve diğ. 2008). Buna karşın, MS'de TLR'lerin koruyucu etkilerine de dikkat çekilmiştir. Poli I:C ile TLR3 aktivasyonunun endojen IFN-β'yı indükleyerek EAE'yi baskıladığı gösterilmiştir (Touil ve diğ. 2006).

Çeşitli TLR'lerin omurilik yaralanmalarında ikincil hasar mekanizmalarının düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Heiman ve diğ. 2014). Omurilik yaralanmalarında yapılan çalışmalar genellikle TLR2 ve TLR4 üzerine yoğunlaşmıştır (Kigerl ve diğ. 2014). Farelerde omurilik hasarının ardından omurilikte TLR2 ve TLR4 ekspresyonunda artış tespit edilmiş ve *knockout* farelerle yapılan çalışmalarda da TLR2'nin ve TLR4'ün nöronları koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Kigerl ve diğ. 2007). Ancak bu koruyucu etkinin altında yatan moleküler mekanizma henüz aydınlatılamamıştır. Bunun yanı sıra TLR aktivasyonunun merkezi sinir sistemi yaralanmalarındaki etkisini araştırmak için TLR agonistleri veya antagonistleri çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Hanisch ve diğ. 2008). Farelerde Pam2csk4 ile mikroglial TLR2'nin uyarılmasının mikroglial profili değiştirdiği (M1-M2 karışık) ve miyelinli aksonların ikincil kaybını azalttığı gösterilmiştir (Stirling ve diğ. 2014). Ancak bir başka TLR2 agonisti zimosan kullanıldığında aksonlar üzerindeki bu koruyucu etki gözlenmemiştir (Stirling ve diğ. 2014). Bir başka çalışmada ise *hemisection*

hasarı uygulanan farelere günlük LPS enjeksiyonunun Wallerian degradasyonu görülen bölgelerde mikroglia/makrofaj sayısını arttırdığı ve hasarlı miyelinlerin fagositozunu güçlendirdiği gösterilmiştir (Vallières ve diğ. 2006). TLR4 agonisti ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda omurilik yaralanmalarının ardından meydana gelen işlevsel kayıpların geri kazanımında TLR4 aktivasyonunun etkili olduğu gösterilmiştir. Omurilik hasarlı sıçanlara sistemik LPS uygulamasının aksonal korunmayı güçlendirdiği belirtilmiştir (Guth ve diğ. 1994).

Omurilikte TLR3,7,8 ve 9 aktivasyonunun, inhibisyonunun veya delesyonunun omurilikte meydana getirdiği etkiler hakkında daha az bilgi bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, ağır omurilik kontüzyon hasarı uygulanan farelerde beyin omurilik sıvısına (BOS) TLR9 antagonisti *cytidine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide 2088* (CpG ODN 2088) verilmesinin omurilik hasarının yarattığı pro-inflamatuar sitokin ve kemokin ekspresyonunu azalttığı, bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonunu indirgediği ve nöropatik ağrı gelişimini sınırladığı gösterilmiştir (David ve diğ. 2013). Buna paralel bir başka çalışmada da CpG ODN 2088'in "white matter sparing"i arttırdığı ve mesane işlevlerini geliştirdiği gösterilmiştir (David ve diğ. 2014). Bununla beraber TLR9 agonisti CpG 1826'nın ise inflammatuar reaksiyonu ve mesane disfonksiyonunu arttırdığı belirtilmiştir (David ve diğ. 2013). Omurilik astrositlerinde ve nöronlarında *in vivo* TLR9 ekspresyonu gösterilmiştir (David ve diğ. 2013). Bu bakımdan, CpG ODN 2088 bağışıklık hücrelerinin yanı sıra nöronal ve glial hücreler üzerinde direkt etki ederek omurilik yaralanmalarının ardından meydana gelen olumsuz durumların iyileşmesine katkı sağlayabilir. Bu nedenle, tez çalışmasının birinci kısmında TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in omurilik nöronları üzerine direkt etkisi *in vitro* incelenmiştir.

Astrositler merkezi sinir sisteminin başlıca glial hücreleridir ve nöronal canlılık ve nöronal işlevlerin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Astrositler nöronlara yapısal destek sağlamanın yanı sıra, nöronların beslenmesi, kan-beyin ve kan-omurilik bariyerlerinin korunması, sinaptik iletimin düzenlenmesi, glutamat taşınması gibi birçok fizyolojik işlevin düzenlenmesine katkı sağlar (Sofroniew ve Vinters 2010). Ayrıca merkezi sinir sistemi yaralanmalarında reaktif astrositler glial skar oluşumuna öncülük ederek rejenerasyonun önündeki en büyük engeli oluştururlar (Pekny ve Pekna 2014). Bununla beraber reaktif astrositler hücre dışı glutamat dengesini düzenleyerek ve nörotrofin sentezleyerek nöronlar üzerinde koruyucu etki de sağlarlar (Karimi-Abdolrezaee ve Billakanti 2012, Sofroniew 2005) Merkezi sinir sistemi yaralanmalarında reaktif astrositlerin pro-inflamatuar ve büyüme baskılayıcı etkisi astrositlerin nöronal

korunmadaki önemli rolü ve aksonal gelişimi destekleme potansiyeli ile dengelenir. Astrositler aksonal büyümei inhibe edici molekül olan kondriotin sülfat proteoglikanları (CSPG) sentezlerken (Cafferty ve diğ. 2010) aynı zamanda laminin gibi adhesiv ekstrasellular matriks (ECM) moleküllerini sentezleyerek büyümei destekleyici etki yaratır (McKeon ve diğ. 1991). Bu yüzden, merkezi sinir sistemi yaralanmalarında astrositlerin oluşturduğu cevap başarılı homeostaz ve doku onarımı için önem teşkil eder (Pekny ve Pekna 2014). Bu bağlamda çalışmanın ikinci kısmında CpG ODN 2088'in omurilik astrositlerinin bazal işlevleri üzerine etkisi ve aynı zamanda astrositlerde TLR9 inhibisyonunun omurilik nöronları üzerine etkisi *in vitro* araştırılmıştır.

David ve diğ. (2013, 2014) omurilik yaralanmalarının ardından TLR9 antagonizminin duyu ve otonomik işlevlerin iyileşmesine katkı sağlayarak olumlu etkiler yaratabileceğini ileri sürmüş ve CpG ODN 2088'in tedavi amaçlı kullanımına dikkat çekmiştir (David ve diğ. 2013, 2014). Ancak TLR9 inhibisyonunun bazı hücre popülasyonlarında olumsuz etkiler de doğurabileceği göz ardı edilmemiştir. Bu sebeple, çalışmanın son aşamasında omurilik hasarlı farelerde CpG ODN 2088 uygulamasının hasar merkezinde moleküler ve hücrenel düzeyde meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir.

1.1 Toll-like Reseptörler

Toll reseptörleri ilk defa *Drosophila Melanogaster*'de tanımlanmış ve bu reseptörlerin embriyonik dönemde dorsal-ventral eksen gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Anderson ve diğ. 1985, Hashimoto ve diğ. 1988). Daha sonra *Toll* reseptörlerinin *Drosophila*'da mantar enfeksiyonuna karşı konak savunmasında rol oynadığı gösterilmiş ve doğal bağışıklıktaki rolüne dikkat çekilmiştir (Lemaitre ve diğ. 1996). Memelilerde doğal bağışıklığı uyaran ve ardından kazanılmış bağışıklık cevabını başlatan *Toll* homoloğu belirlenmiştir (Medzhitov ve diğ. 1997). Daha sonra, *Drosophila* *Toll* proteini ile yapısal olarak akraba protein ailesi tanımlanmış ve bu proteinler *Toll-like* reseptörler olarak adlandırılmıştır (Rock ve diğ. 1998).

İnsanlarda dokuz işlevsel TLR (TLR1-9) ve bir işlevsel olmayan TLR (TLR11) olmak toplam on bir TLR tanımlanmıştır. Farelerde ise on iki işlevsel TLR (TLR1-9 ve TLR11-13) ve bir işlevsiz TLR (TLR10) olmak üzere toplam on üç TLR belirlenmiştir (Heiman ve diğ. 2014, Thompson ve diğ. 2011). Herbir TLR, homodimer veya başka bir TLR ile heterodimer oluşturarak farklı bir PAMP'ı tanır (Okun ve diğ. 2009). TLR'yi aktive eden PAMP protein, nükleik asit veya lipid yapısında olabilir. TLR4 gram negatif

bakterilerdeki LPS yapısını tanır; TLR1,2 ve 6 ise mikoplazma zarındaki birçok lipoproteini tanır. Protein yapılı PAMP'lardan bakteriyel flagellin TLR5'e bağlanır; murin TLR11'i ise protozoan kökenli profilin benzeri proteini tanır. Bakteriyel ve viral DNA çok miktarda metillenmemiş CpG dizisi içerir ve bu dizi konak hücrede TLR9 tarafından tanınarak bağışıklık cevabını tetikler. Virüs kökenli tek zincirli RNA (ssRNA) TLR7 ve TLR8'i, çift zincirli RNA (dsRNA) ise TLR3'ü aktive ederek bağışıklık cevabını başlatır. Lipid ve protein yapısındaki ligandlar hücre zarında, nükleik asit yapısındaki ligandlar ise endozomlardaki TLR'ler tarafından tanınır (Kaisho ve Akira 2006). TLR1,2,4-6,10-12 hücre yüzeyinde bulunurken TLR3,7,9 ve 13 bağışıklık sistemi hücrelerinde; lökositler, monositler, dendritik hücreler, T ve B lenfositlerinde; endozom ve endoplazmik retikulum (ER) zarına yerleşmiştir. Bunun yanı sıra, yakın zamanda yapılan çalışmalarda insanlarda ve hayvanlarda merkezi sinir sistemi hücreleri olan mikroglia (Bsibsi ve diğ. 2002, Kigerl ve diğ. 2007, Lafon ve diğ. 2006), astrositlerde (Bsibsi ve diğ. 2002, Kigerl ve diğ. 2007), oligodendrositlerde (Bsibsi ve diğ. 2002, Kigerl ve diğ. 2007) ve nöronlarda (David ve diğ. 2013, Lafon ve diğ. 2006, Y. Ma ve diğ. 2006) çeşitli TLR'lerin ekspresyonu gösterilmiş ve TLR'lerin bağışıklık cevabı dışındaki rolüne de dikkat çekilmiştir.

TLR'lerin enfeksiyon cevabının yanı sıra, doku hasarı ve onarımıyla ilişkili enfeksiyöz olmayan durumlarda da önemli rol oynadığı bilinmektedir. DAMP olarak adlandırılan endojen ligandlar da TLR'lerin aktivasyonuna neden olabilir (Heiman ve diğ. 2014). Bu ligandlar genellikle hücre stres, hücre hasarı ya da hücre ölümü gibi durumlarda salınabilir. DAMP'lar TLR'lere bağlanarak TLR'lerin aktivasyonuna yol açar ve steril inflamasyonda rol alır. *High mobility group box-1* (HMGB-1) (Park ve diğ. 2004), *heat shock protein* (HSP)'ler (Asea ve diğ. 2002, Ohashi ve diğ. 2000), miRNA (Lehmann ve diğ. 2012), mitokondriyal RNA ve DNA (Karikó ve diğ. 2005, Q. Zhang ve diğ. 2010) ve histon (Huang ve diğ. 2011) moleküllerinin TLR aktivasyonuna neden oldukları gösterilmiştir. Ayrıca strese veya hasara maruz kalan hücrelerden aktif proteazların salgılanması, hücre dışı matriks bileşenlerinin bozunmasına ve sonuçta fibrinojen (Smiley ve diğ. 2001), fibronektin (Gondokaryono ve diğ. 2007), hiyaluronik asit (Termeer ve diğ. 2002) ve biglikan (Schaefer ve diğ. 2005) gibi TLR'lerin aktivasyonuna neden olan DAMP'ların oluşumuna sebep olur (Heiman ve diğ. 2014). TLR'ler ve ligandları çizelge 1.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Endojen ve Ekzojen TLR ligandları Kigerl ve diğ (2014)'den uyarlanmıştır.

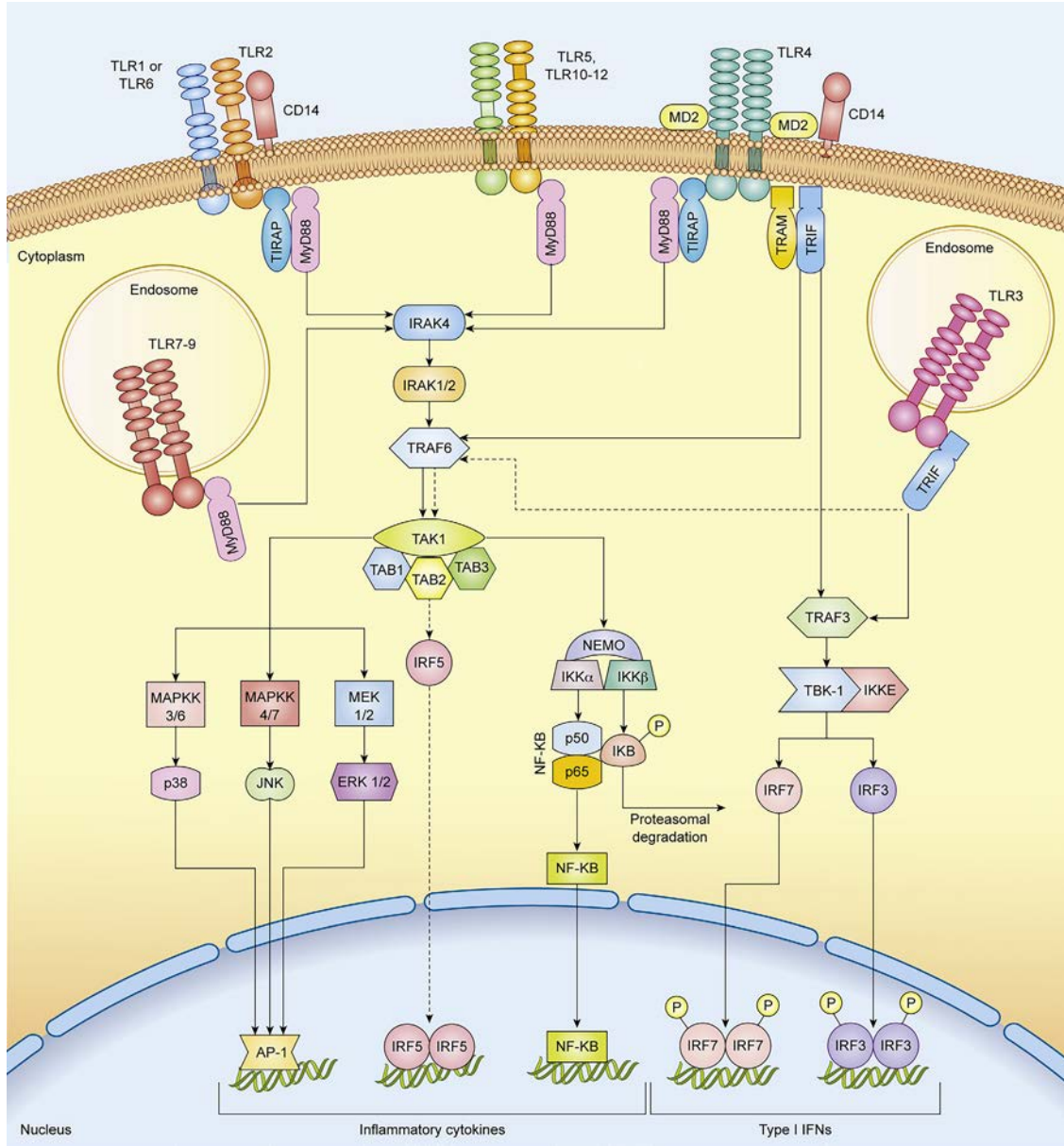
Reseptör	Ekzojen Ligandlar	Endojen Ligandlar	Kaynaklar
TLR1	Peptidoglikan, triaçil	HSP60, HSP70, HMGB1,	(Asea ve diğ. 2002)
TLR2	lipoprotein, zimosan, lipoteikoik asit	verscican, nekrotik hücreler	
TLR3	Viral dsRNA	mRNA	(Karikó ve diğ. 2005)
TLR4	LPS	HMGB1, HSP60, HSP70, hiyoluronik asit, fibronektin fibronojen, Tenasin C	(Ohashi ve diğ. 2000) (Smiley ve diğ. 2001) (Termeer ve diğ. 2002)
TLR5	Bakteriyel filagellin		
TLR6	Peptidoglikan, diaçil lipoprotein		
TLR7	ssRNA	miRNA, RNA	(Lehmann ve diğ. 2012)
TLR8	ssRNA	siRNA	
TLR9	Metillenmemiş CpG DNA	mtDNA; n-formil peptid	(L. Zhang ve diğ. 2010)
TLR11	Üropatojenik E. Coli	ATP, ürik asit kristalleri Ca, K amiloid-	

1.2 TLR Sinyal Yolağı

TLR'ler, hücre dışında "*leucine-rich repeat (LRR) domain*"i ve hücre içinde "Toll/IL-1 receptor (TIR) domain" i bulunduran tip I transmembran reseptörlerindedir (Rock ve diğ. 1998). Ligandın bağlanması ardından TLR'ler homodimer veya heterodimer oluşturarak hücre içi sinyal iletimini başlatır. TLR sinyal yolağı *Myeloid differentiation-88 (MyD88)*-bağımlı veya *MyD88*-bağımsız olmak üzere iki sınıfa ayrılır. *MyD88*, TLR3 dışındaki diğer bütün TLR'yi toplayan ortak bir adaptör proteindir. TLR aktivasyonunun ardından *MyD88*; *TIR-domain-containing adaptor/MyD88 adaptor-like (TIRAP/Mal)*, *TIR-domain-containing adaptor molecule 1/ TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-γ (TICAM/TRIF)* veya *TRIF-related adaptor molecule (TRAM)* ile birlikte TLR'lerin TIR domain'ine toplanır. *MyD88* bir serin tirozin kinaz olan *IL-1R-associated kinase (IRAK-4)* proteinini aktive ederek *IRAK-1* veya *IRAK2* proteinlerinin fosforilasyonuna yol açar. *IRAK*'lar fosforile olduktan sonra *MyD88*'den ayrılır ve tumor necrosis factor (*TNF*)-associated factor 6 (*TRAF-6*) ile etkileşirler. *TRAF6* proteinini *transforming growth factor-β (TGF-β) activated kinase 1 (TAK1)-TAK1-binding protein (TAB) 1-TAB2-TAB3* protein kompleksi ile etkileşerek *TAK1* proteinin

aktivasyonunu sağlar. TAK1; *mitogen-activated kinases* (MAPK) ailesi ve *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) sinyal yolağını aktive ederek interlekin (IL)-6, IL-1 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu tetikler. TLR3 ve TLR4 dışındaki TLR'lerin hücre içi sinyal yolağı aktivasyonu MyD88-bağımlıdır (Heiman ve diğ. 2014).

TLR3 aktivasyonu MyD88-bağımsız hücre içi sinyal yolağını tetikler. TLR3'ün ligand ile aktivasyonunun ardından TRIF, TLR3'ün TIR *domain*'ine bağlanır. TRIF, TRAF3 aracılığıyla *interferon regulatory factor* (IRF) 3'ün IRF7'nin aktivasyonuna ve dimerlerin sitozolden nukleusa geçişine yol açar. IRF3 ve IRF7 transkripsiyon faktörleri nukleusta tip 1 interferon (IFN) genlerinin transkripsiyonunu tetikler. Bunun yanı sıra TLR3, TRAF6 aracılığıyla IRF5, *activator protein* (AP-1) ve NF- κ B transkripsiyon faktörlerini aktive ederek inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu da sağlar. TLR4 ise her iki sinyal yolağını aktive eden tek TLR'dir. Çizim 1.1'de TLR sinyal yolağı şematik olarak gösterilmiştir.



Çizim 1.1. TLR'lerin sinyal iletim yolağı. Heiman ve diğ (2014)'den alınmıştır. Çizim metin içinde açıklanmış ve moleküllerin açık adlarına yer verilmiştir.

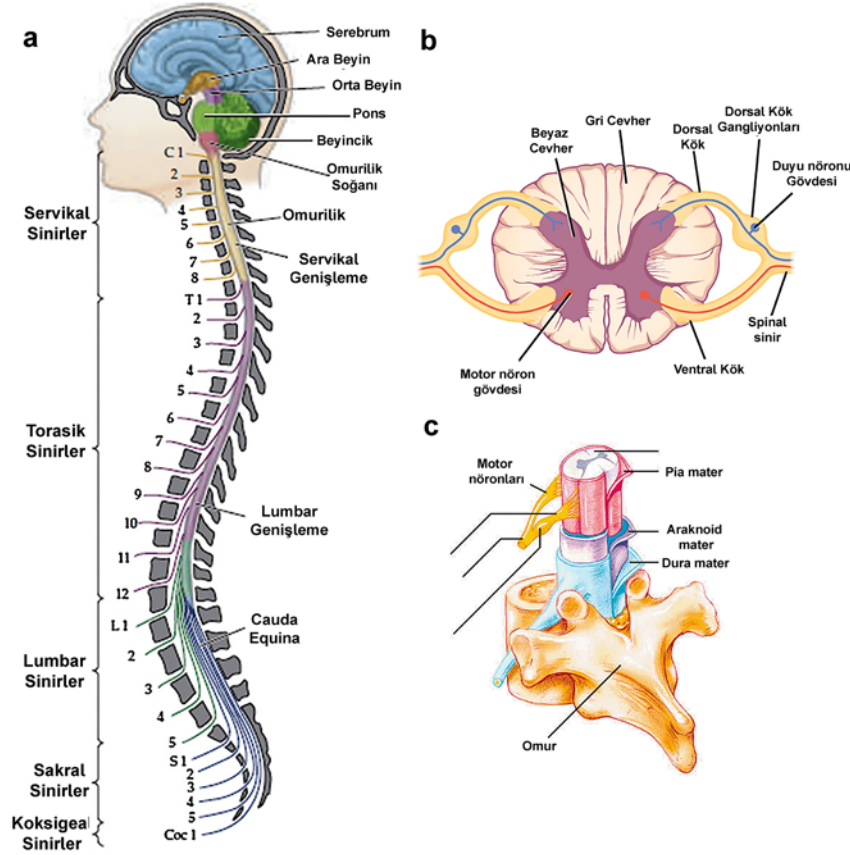
1.3 Omuriliğin Yapısı

Omurilik beyin ile periferel sinirler arasında iletişimi sağlayan, omurga içerisinde boyundan kuyruk sokumuna kadar uzanan merkezi sinir sisteminin bir parçasıdır. Bunun yanı sıra omurilik spinal refleks adı verilen reflekslerin oluşum yeridir. Omurilik, omurilik soğanından (*medulla oblongata*) ilk lomber omurga kadar *foramen magnum* boyuna uzanır. Omurilik insanlarda ilk lomber omurga (L1) kadar sıçanlarda L3'e kadar uzanır. Servikal seviyenin altında omurilik sinirleri omurgaya paralel uzanır. İnsanlarda omurga otuz üç omurdan oluşur ve omuriliğin sağından ve solundan düzenli sıralanmış otuz bir çift duyu ve motor siniri çıkar. İnsanlarda omurilik sekiz servikal (C1-C8), on iki torasik (T1-T12),

beş lomber (L1-5L), beş sakral (S1-S5) ve bir koksigeal (Co1) kısımdan oluşur (Çizim 1.2) (Silva ve diğ. 2014).

Üç tabakalı bir zar olan meninks omuriliği çevreleyerek omuriliğin korunmasını sağlar. Meninks dura, araknoid ve piamater olmak üzere üç bağ dokusu tabakasından oluşur (Çizim 1.2) Araknoid ve piamater arası beyin omurilik sıvısı; epidural boşluk (dura ve periosteum arası) ise fibröz ve adipöz bağ dokusuyla doludur ve omuriliğin korunmasına katkı sağlarlar.

Gri cevher omuriliğin merkezinde konumlanır ve etrafı beyaz cevher ile çevrilidir. Gri cevherde hücre gövdesi, dendritler, ara nöronlar ve glial hücreler yer alır. Beyaz cevher ise çoğunlukla miyelinli aksonlardan oluşur (Silva ve diğ. 2014).



Çizim 1.2. Omuriliğin yapısı (a) İnsan omurilik sinirleri; Silva ve diğ (2014)'den uyarlanmıştır (b) Omuriliğin yatay kesiti <http://www.newhealthadvisor.com/Spinal-Cord-Cross-Section.html> adresinden erişilmiş ve uyarlanmıştır (c) Omuriliği çevreleyen katmanlar http://faculty.southwest.tn.edu/rburkett/A&P1_nervous_syst_organization.htm adresinden erişilmiş ve uyarlanmıştır.

1.4 Omurilik Yaralanmaları

1.4.1 Omurilik Yaralanmalarının Epidemiyolojisi

Akut travmatik omurilik yaralanmaları bireyi fiziksel, fizyolojik ve sosyal olarak etkileyen en önemli travmatik yaralanmalardan biridir. Omurilik hasarı nöronların ve aksonların zarar görmesine ya da ölümüne yol açarak bireyde duyu, motor ve otonomik işlevlerin kaybına yol açar (Jain ve diğ. 2011). Bununla beraber omurilik yaralanmaları bireyin yaşamını olumsuz etkileyen hatta hayati tehlike oluşturabilen ikincil durumların oluşumuna da neden olabilir. Solunum bozuklukları, derin ven trombozu, üriner sistem işlev bozukluğu, idrar yolları enfeksiyonu, bası yarası, osteoporoz, kas kasılmaları ve kronik ağrı omurilik yaralanmalı hastalarda gözlenen sağlık sorunlarındanır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2013 yılındaki verilerine göre dünya genelinde her yıl 250.000-500.000 kişide omurilik yaralanmaları meydana gelmektedir. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs384/en/>). Omurilik yaralanmaları prevalansının (906/1 000 000) en yüksek olduğu ülke Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'dir (Singh ve diğ. 2014). Ülkemizde ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada omurilik yaralanmalarını prevalansı 16,9/ 1 000 000 olarak belirlenmiştir (Karacan ve diğ. 2000).

Omurilik yaralanmalarının %90'ı trafik kazaları, şiddet, düşme vb. gibi travmatik olaylara bağlı olarak meydana gelir. Omurilik yaralanmalarının nedenleri farklı coğrafi bölgelere göre değişkenlik gösterebilir. ABD'de omurilik yaralanmalarına sebep olan olayların başında araçlı kazalar (%40) gelmektedir. Bunu yüksekten düşme (%29,54), şiddet (%14,41), spor kazaları (%8,39) ve tıbbi komplikasyonlar, hayvan yaralanmaları vb (%8,5) faktörler takip etmektedir (The National SCI Statistical Center 2014).

Erkeklerde 20-29 yaş arası ve 70 yaş üstü riskin en yüksek olduğu dönemlerdir. Kadınlarda ise 15-19 yaş arasında ve 60 yaş üstünde omurilik yaralanmalarının meydana gelme riski en yüksektir (<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/spinal-cord-injury-20131202/en/>). Omurilik yaralanmalarının görülme sıklığı cinsiyete göre de farklılık gösterir. Genel olarak erkeklerde omurilik yaralanmalarının daha fazla meydana geldiği bilinmektedir. Erkeklerde ve kadınlarda görülme oranı yaklaşık 4:1 olarak belirlenmiştir (The National SCI Statistical Center 2014).

1.4.2 Omurilik Yaralanmalarının Patofizyolojisi

Akut omurilik yaralanmalarının ardından omurilik hasarına yol açan patolojik süreç iki aşamadan oluşur. Birincil hasar doğrudan hücre ölümüne ve kanamaya yol açan mekanik hasarı belirtir. Hasarın meydana geldiği omurilik bölgesinde hem nekrotik hem de apoptotik nöronal ve glial hücreler yoğun olarak bulunur. Nekrotik merkezin çevresindeki dokuların bozulduğu süreç ise ikincil hasar olarak adlandırılır. (Tator ve Fehlings 1991). Akut yaralanmanın ardından omurilikte hemoraji, ödem, aksonal ve nöronal nekroz, demiyelinizasyon, kist oluşumu ve damar tıkanması gibi bir dizi patolojik değişiklik meydana gelir (Tator ve Fehlings 1991).

Akut omurilik travmaları omurilik mikro dolaşımında birçok vasküler değişikliğe neden olur. Omurilik travmalarının ardından kan-omurilik bariyeri (BSB; *Blood-Spinal Cord Barrier*) bozulur ve ödem oluşmaya başlar. BSB'nin bozulması nötrofillerin ve makrofajların infiltrasyonuna yol açarak travma sonrası bağışıklık cevabının oluşumunu tetikler. Buna ek olarak, travma sonucu aktive olan endotelial ve glial hücreler omurilik perfüzyonunu etkileyen reaktif oksijen türleri (ROS), bradikininler, histaminler ve nitrik oksit (NO) gibi vazoaaktif maddeleri salgılayarak plazma kökenli moleküllerin omuriliğe geçişini kolaylaştırır. Bariyer bozulması sadece hasarlı bölge ile sınırlı kalmaz ve omurilik boyunca ilerler. Omurilik yaralanmalarının ardından meydana gelen bütün bu vasküler olaylar omurilik boyunca iskemi oluşumuna yol açar. (Hausmann 2003). İskemik dokularda enerji ihtiyacı artar ve yoğun ATP tüketimi gerçekleşir. Reoksijenizasyon sırasında bazı hücreler zarar görür ve apoptoz meydana gelir (Saikumar ve diğ. 1998).

Omurilik yaralanması ve iskeminin ardından hücre dışı alanda eksitatör aminoasitlerin yoğunluğunda artış meydana gelir (Mills ve diğ. 2001). Merkezi sinir sisteminde en önemli eksitatör nörotransmitter glutamattır. Normal şartlarda belirli transporter proteinler sinaptik çukurdan glutamata uzaklaştırarak fazla glutamatın sinaptik çukurda birikmesini engeller (Hausmann 2003). Omurilik yaralanmalarında ise hücre dışı alandaki glutamat yoğunluğu nörotoksik seviyeye ulaşır ve eksitotoksisiteye neden olur (Hausmann 2003, Mills ve diğ. 2001). Omurilik yaralanmalarının hemen ardından glial ve nöronal glutamat transporter proteinlerinin ekspresyonunda artış meydana gelir ve altıncı saatte en yüksek seviyeye ulaşır. Daha sonra ekspresyon yirmi dördüncü saate kadar azalarak devam eder (Vera-Portocarrero ve diğ. 2002). Glutamat, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini aktive ederek hücre içine Ca^{+2} akışımının artışına neden olur (Hausmann 2003). Hücre içi Ca^{+2} seviyesinin artışı serbest radikal ve NO oluşumuna,

proteazların ve endonükleazlarının aktivasyonuna, mitokondriyal hasara ve ER stresine ve sonuçta hücre ölümüne yol açar (X. Zhang ve Zhu 2011).

Omurilik yaralanmalarının ardından ikincil hasar sürecinde bir dizi hücrel değişiklik meydana gelir (Hausmann 2003). Omurilik yaralanmalarının ardından hasarın olduğu dokuya biriken ilk inflamatuvar hücreler nötrofillerdir. Yaralanmanın ilk gününde mikroglial aktivasyon da başlar ve 2-4 haftaya kadar mikroglial aktivasyon devam eder (Carlson ve diğ. 1998). Nötrofiller, mikroglia ve makrofajlar fagositik özellikleri sayesinde doku parçalarını temizleyerek bozulan homeostazın onarılmasına katkı sağlarlar. Mikroglia/makrofaj ayrıca sitokin ve kemokin salgılayarak hasar çevresinde inflamatuvar cevabın düzenlenmesinde rol oynarlar (Hausmann 2003, Taoka ve Okajima 1998). Merkezi sinir sistemi yaralanmalarında mikroglia proinflamatuvar sitokinler salgılayarak tahribatın artmasına neden olurken aynı zamanda bazı büyüme faktörlerini salgılayarak da nöronal hayatta kalımı ve doku onarımı desteklerler (Hausmann 2003). Mikroglia aktivasyonu ve periferal makrofajların infiltrasyonuna paralel olarak hasar merkezinde T-lenfositlerinin sayısında da artış meydana gelir. Omurilik yaralanmalarının ardından glial skar oluşumuna öncülük eden reaktif astrogliazis meydana gelir (Sofroniew 2005, 2015). Travmanın ardından hasar merkezinin çevresinde apoptotik hücreler gözlenir. Merkezi sinir sisteminde apoptoz çoğunlukla oligodendrositlerde meydana gelir (Crowe ve diğ. 1997, X. Z. Liu ve diğ. 1997). Oligodendrositlerin apoptozu nörodejenerasyona yol açan kronik demiyelinizasyona (Wallerian dejenerasyonu) neden olur. Ayrıca omurilik hasarı birçok miyelin proteininin seviyesinde azalmaya neden olarak anormal miyelinizasyona da yol açar (Hausmann 2003).

1.5 Astrositler

Astrositler, gliayı oluşturan temel hücrelerdir ve merkezi sinir sisteminde birçok yapısal ve fizyolojik işlevde hayati rol oynarlar (Chen ve Swanson 2003). Astrositler ilk olarak, sadece nöronlara yapısal destek sağlayan hücreler olarak tanımlanmıştır. Ancak yapılan çalışmalar astrositlerin, nöronların normal işlev görebilmesi için gerekli olduğunu ve merkezi sinir sistemi homeostazını düzenleyen temel hücreler olduğunu ortaya koymuştur (Sofroniew ve Vinters 2010, Volterra ve Meldolesi 2005).

Astrositler pre- ve post-sinaptik nöronlarla birlikte üçlü sinapslar oluşturarak sinaptik iletimi düzenlerler (Perea ve diğ. 2009). Nöronlarda bulunan birçok nörotransmitter reseptör astrositlerde de sentezlendiğinden astrositler nöronlardan gelen sinyallere cevap oluşturabilirler. Böylece astrosit ve nöronlar arasında karşılıklı iletişim

sağlanır (Perea ve diğ. 2009, Volterra ve Meldolesi 2005). Astrositler sinaptik aktiviteyi iyonotropik ve metabotropik reseptörler aracılığıyla algırlar. Bu reseptörlerin aktivasyonu hücre içi Ca^{+2} seviyesini değiştirerek astrositlerden glutamat, adenozin trifosfat (ATP), gamma aminobutirik asit (GABA) ve D-serin gibi gliotransmitterlerin salgılanmasını tetikler (Araque ve diğ. 2014). Gliotransmitterler nöronal reseptörleri aktive ederek sinaptik iletimin ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde rol oynar (Araque ve diğ. 2014). Ayrıca astrositler, birçok nörotransmitter alıcıları aracılığı ile ise sinaptik çukurlarda GABA, glisin ve glutamatın temizlenmesini sağlayarak normal sinaptik iletimi kolaylaştırır ve nöronları eksitotoksisteden korurlar (Sofroniew ve Vinters 2010).

Astrositler büyüme faktörleri ve ilişkili molekülleri salgılayarak sinaptik işlev üzerinde güçlü ve uzun süreli etkiler meydana getirebilirler (Sofroniew ve Vinters 2010). Bununla beraber, östradiol ve progesteron gibi nöroaktif steroidleri ve metabolitleri sentezleyerek de sinaptik aktivitenin düzenlenmesine katkı sağlarlar (Garcia-Segura ve Melcangi 2006).

Astrositler kan-beyin bariyeri (BBB; *blood-brain barrier*) ve BSB'nin oluşumunda ve korunmasında esas rol oynarlar. "End-feet" yapılarıyla kan damarlarına tutunarak nöron ve damarlar arasında fiziksel bariyer oluştururlar (Karimi-Abdolrezaee ve Billakanti 2012). Kapiller endotelyal hücreler arasında "intercellular tight-junctions" oluşumu ve birçok endotelyal transporter'in ekspresyonunu ve işlevini düzenleyerek de BBB veya BSB'nin korunmasına katkı sağlarlar (Abbott ve diğ. 2006, Sofroniew ve Vinters 2010).

Astrositler, merkezi sinir sisteminde normal ve patolojik durumlarda pH dengesinin düzenlenmesinde görev alırlar (Obara ve diğ. 2008). Ayrıca astrositlerde bol miktarda bulunan *aquaporin*'ler sayesinde de sıvı ve iyon homeostazı korunur (Nasic ve diğ. 2006).

Astrositler, merkezi sinir sisteminde ECM'nin sentezlenmesinde ve korunmasında aktif rol oynarlar. Fibronektin ve laminin gibi ECM bileşenlerini sentezleyerek aksonal büyüme ve onarımına katkı sağlarlar (Karimi-Abdolrezaee ve Billakanti 2012). Bunun yanı sıra tenasin C gibi aksonal rejenerasyonu baskılayan proteinleri sentezlerler (Burda ve diğ. 2015, Cafferty ve diğ. 2010).

1. 6 Merkezi Sinir Sistemi Yaralanmalarında Astrositlerin Rolü

Astrositler merkezi sinir sisteminde normal yapısal ve işlevsel görevlerinin yanı sıra beyin ve omurilik patolojisinde önemli rol oynar. Merkezi sinir sistemi yaralanmalarının ardından astrositlerde bir dizi yapısal, moleküler ve işlevsel değişiklikler meydana gelir ve bu süreç astrogliozis olarak adlandırılır (Karimi-Abdolrezaee ve

Billakanti 2012). Astrogliazisın ilk aşamalarında astrositlerde hipertrofi oluşur ve GFAP ekspresyonunda artış başlar. Bu aşamada astrositler buldukları alanda genişlemesine rağmen komşu astrositlerin uzantılarıyla çakışmazlar. Ağır reaktif astrogliazis durumunda ise hipertrofinin yanı sıra hücrede yoğun GFAP ekspresyonu ve hücre proliferasyonunda artış meydana gelir. Böylece astrositik uzantılar birbirleriyle temas ederek dallanmış bir yapı meydana getirirler ve glial skar oluşumuna öncülük ederler. Astrositler özellikle fibromenişyal hücreler ve diğer glial hücrelerle etkileşerek kompleks glial skar oluştururlar. Beyin ve omurilik yaralanmalarının ardından reaktif astrositlerde kollagen, CSPG'ler ve tenasinler gibi aksonal büyümeyi baskılayan ECM bileşenlerinin ekspresyonunda dramatik bir artış meydana gelir (Silver ve Miller 2004). Reaktif astrositler ECM bileşenleri ile birlikte hasarın çevresinde yoğun bir glial skar meydana getirerek aksonal büyümeye karşı hem fiziksel hem de kimyasal engel oluşturur (Karimi-Abdolrezaee ve Billakanti 2012). ECM bileşenlerinin yanı sıra, reaktif astrositler; *semaphorin 3* (SEMA 3), ephrin-B2 ve slit proteinleri gibi proteinler aracılığıyla aksonal rejenerasyonu baskılar (Silver ve Miller 2004).

Astrogliazis ve glial skar oluşumunun aksonal rejenerasyonu engelleyici etkisi genel kabul gören görüş olmasına rağmen, *in vivo* ve *in vitro* yapılan birçok çalışma merkezi sinir sistemi yaralanmalarında astrogliazisin ve glial skar oluşumunun yararlı etkilerini de ortaya koymuştur (Sofroniew 2005, 2015). Reaktif astrositler beyin veya omurilik yaralanmalarında inflamasyonun düzenlenmesinde kritik öneme sahiptirler. Reaktif astrositlerin varlığında glial skar hasarın meydana geldiği dokuyu çevreleyerek komşu canlı doku ile hasarlı doku arasında sınır oluşturur. Bu sınırlandırılmış alan içinde güçlü bir inflamasyon cevap meydana gelir ve yaralanmaların ardından inflamasyon hızlıca giderilir (Sofroniew 2005). Merkezi sinir sistemi yaralanmalarının ilk aşamalarında reaktif astrositler yara çevresinde pro-inflamatuar etki gösterirken daha sonraki aşamalarda hasarlı doku ve sağlıklı doku arasında anti-inflamatuar etki gösterir (Sofroniew ve Vinters 2010).

Reaktif astrositler BBB ve BSB onarımını ve korunmasını sağlayarak periferik lökositlerin infiltrasyonunu ve mikroglial aktivasyonunu azaltır (Bush ve diğ. 1999). Ayrıca doku sıvı dengesini düzenleyerek hasar sonrası ödem oluşumunu azaltırlar. (Mulligan ve MacVicar 2004).

Beyin veya omurilik yaralanmalarının ardından hücre dışı çevreye glutamat salgısında artış meydana gelir. Astrositler fazla glutamata hücre içine alarak nöronları ve oligodendrositleri glutamat eksitotoksitesine karşı korur (Rothstein ve diğ. 1996).

Bununla beraber, astrositler glutasyon gibi antioksidanları salgılayarak nöronları oksidatif strese (Vargas ve diğ. 2008) ve amonyak toksisitesine karşı korur (Rao ve diğ. 2005); adenozin salgılayarak hücrel aktiviteyi azaltır ve enerji metabolizmasını korur (Lin ve diğ. 2008).

Klinik ve deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular astrositlerin ve reaktif astrositlerin belirli durumlarda zararlı etki kazanma potansiyelleri olduğunu ortaya koymuştur. Belirli sinyal yollarının uyarılmasıyla astrositler nitrik oksit radikalleri, ROS (Hamby ve diğ. 2006) veya glutamat salgılayarak (Takano ve diğ. 2005) nörotoksik özellik gösterebilirler. Bunun yanı sıra, astrositler salgıladıkları bazı sitokinler aracılığıyla inflamasyonun şiddetini arttırabilirler (Brambilla ve diğ. 2005). Reaktif astrositler BBB ve BSB'nin korunmasında önemli rol oynamasına (Bush ve diğ. 1999) rağmen yapılan bir çalışmada astrositlerden salgılanan *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A)'nın BBB'nin bozulmasına yol açtığı da gösterilmiştir (Tadesse ve diğ. 2009). Ayrıca reaktif astrositlerin kronik inflamasyon ve nöropatik ağrı oluşumunda önemli rol oynadığı da bilinmektedir (Hansen ve Malcangio 2013).

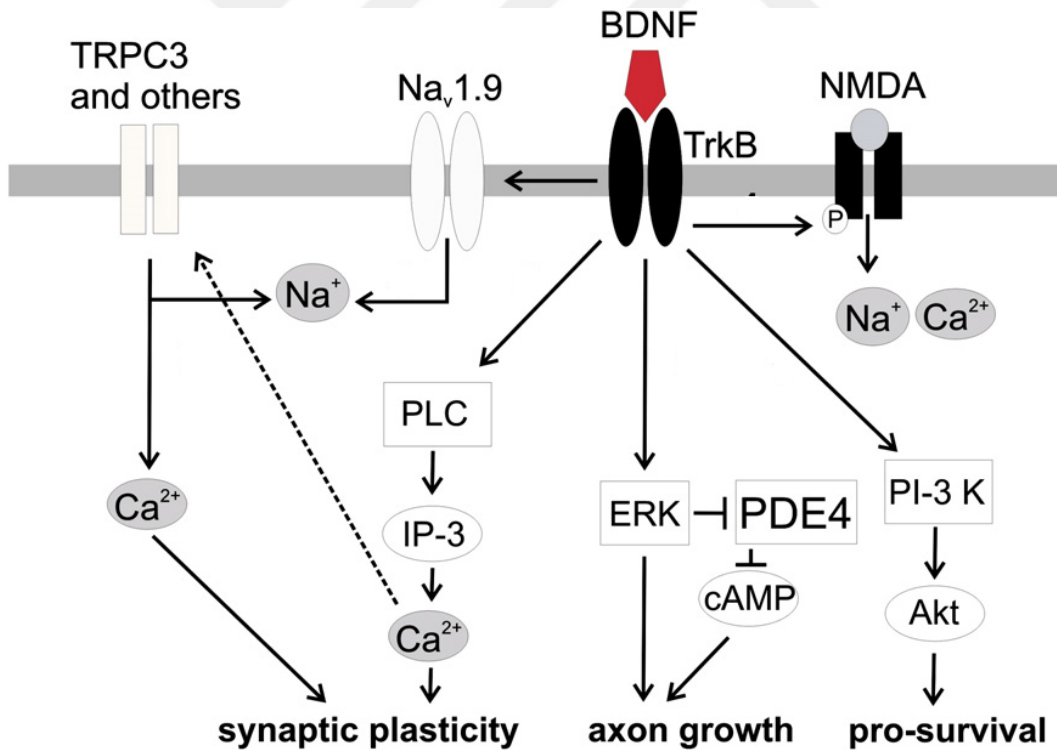
Özetle, reaktif astrositler merkezi sinir sistemi yaralanmalarında inflamasyonu düzenleyerek ve sınırlandırarak veya hücre dışı boşlukta moleküllerin yoğunluğunu düzenleyerek nöronları yapısal ve işlevsel olarak korur. Bunun yanı sıra, aksonal rejenerasyonu baskılayarak veya ikincil hasarı tetikleyen sitotoksik mekanizmalarla zararlı etkiler ortaya koyar (Sofroniew 2005).

1.7 Nörotrofinler ve Nörotrofin Reseptörleri

Nörotrofinler omurgalılarda sinir sisteminin gelişimi ve devamlılığı için oldukça önemli bir protein ailesidir (Chao 2003). Nörotrofinler ve nörotrofin reseptörleri nöronal gelişim ve hayatta kalım üzerine bilinen klasik etkisinin yanı sıra birçok nöronal işlevin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Schinder 2000). Nörotrofinler aksonal ve dendritik büyüme, miyelin kılıf oluşumu, sinaps oluşumu ve sinaptik iletim, nörotransmitter salgılanması, sinaptik plastisite gibi birçok nöronal işlevin düzenlenmesinde görev alırlar (Schinder 2000). Nörotrofinler Trk reseptör tirozin kinazları ve p75 nörotrofin reseptörleri tarafından tanınırlar (Chao 2003). Nörotrofinler özgün reseptör tirozin kinazlara bağlanarak sinyal iletimini başlatırlar (Friedman ve diğ. 1998). Nerve growth factor (NGF) TrkA'ya; *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) ve nörotrofin 4 (NT4) TrkB'ye; nörotrofin-3 (NT-3) ise TrkC'ye bağlanır. p75 ise bu dört nörotrofini de bağlayabilir (Chao

2003). Merkezi sinir sisteminde TrkB ve TrkC en çok eksprese edilen Trk reseptörleridir (Frisén ve diğ. 1993, Liebl ve diğ. 2001).

BDNF'nin TrkB'ye bağlanması reseptör dimerizasyonunu otofosforilasyonunu indükler. TrkB'nin aktivasyonu hücre içi üç ana sinyal yolağını; *phospholipase-C/inositol-3-phosphate* (PLC/IP-3), *extracellular signal regulated kinase* (ERK), *phosphatidylinositol-3 kinase alpha and serin/treonin kinase* (PI-3/Akt) sinyal yolağı; aktive ederek hayatta kalımı, aksonal büyümeyi, sinaptik plastisiteyi ve iletimini düzenler (Çizim 1.3). Bunların yanı sıra, BDNF/TrkB sinyal yolağı NMDA reseptör alt birimlerini fosforile ederek hücre içi Na^+ ve K^+ seviyesinin artışına neden olabilir (Blum ve Konnerth 2005). Benzer şekilde TrkB/PLC sinyal yolağının aktivasyonu Ca^{2+} -aracılı kanalların açılmasına ve sonuçta zar potansiyelinin artışına neden olabilir (Carvalho ve diğ. 2008). BDNF'in eksitator etkisinin yanı sıra, TrkB sinyal iletimi potasyum-klorür ko-transporter KCC2'in protein seviyesinin azalmasına neden olarak klorid kanallarının inhibitör etkisini azaltabilir (Rivera 2004). BDNF/TrkB sinyal iletiminin etkisi hücre tipine, reseptör ekspresyonuna ve lokalizasyonuna bağlı olarak değişir (Weishaupt ve diğ. 2012).



Çizim 1.3. BDNF/TrkB sinyal iletimi. Weishaupt ve diğ (2012)'den alınmıştır.

1.8 Endoplazmik Retikulum Stresi ve Katlanmamış Protein Cevabı

ER hücrenin hayatta kalımı ve normal işlevi için temel birçok hücresel süreçte önemli rol oynayan bir organeldir (Kim ve diğ. 2008). ER glukoneogenez ve lipid

biyosentezi gibi metabolik süreçlerde yer alır, otofagozomların ve peroksizomların biyogenezine katkı sağlar ve Ca^{+2} homeostazında önemli rol oynar (Hetz 2012). Bunların yanı sıra, salgı proteinleri ve transmembran proteinlerinin katlanma ve olgunlaşma süreci ER lümeninde gerçekleşir (Janssens ve diğ. 2014). ER doğru protein katlanması ve sonuçta normal hücre işlevi için kritik öneme sahiptir (Hetz 2012). ER’de hatalı katlanmış proteinlerin veya katlanmamış proteinlerin birikimi ER stresine yol açar (Todd ve diğ. 2008). Ökaryotik hücreler doğru protein katlanmasını sağlamak ve katlanmamış proteinlerin ER’de birikimini önlemek amacıyla evrimsel süreçte, normal hücre işlevi için oldukça önemli bir mekanizma olan katlanmamış protein cevabını (UPR; *unfolded protein response*) geliştirmişlerdir (K. Zhang ve Kaufman 2008). Hipoksi, glikoz eksikliği, hücre içi Ca^{+2} dengesinin bozulması, salgı proteinlerinin sentezinin artışı gerektiren patolojik ve fizyolojik durumlar ve viral enfeksiyon gibi etkenler ER stresini tetikler (Kim ve diğ. 2008). ER stresi koşullarında UPR’nin aktivasyonu birçok hayatta kalım mekanizmasını uyararak katlanmamış proteinlerin birikimini engeller. Ancak ER stresinin ağır olduğu ve homeostazın geri sağlanamadığı durumlarda UPR hücre ölümünü tetikler (Todd ve diğ. 2008).

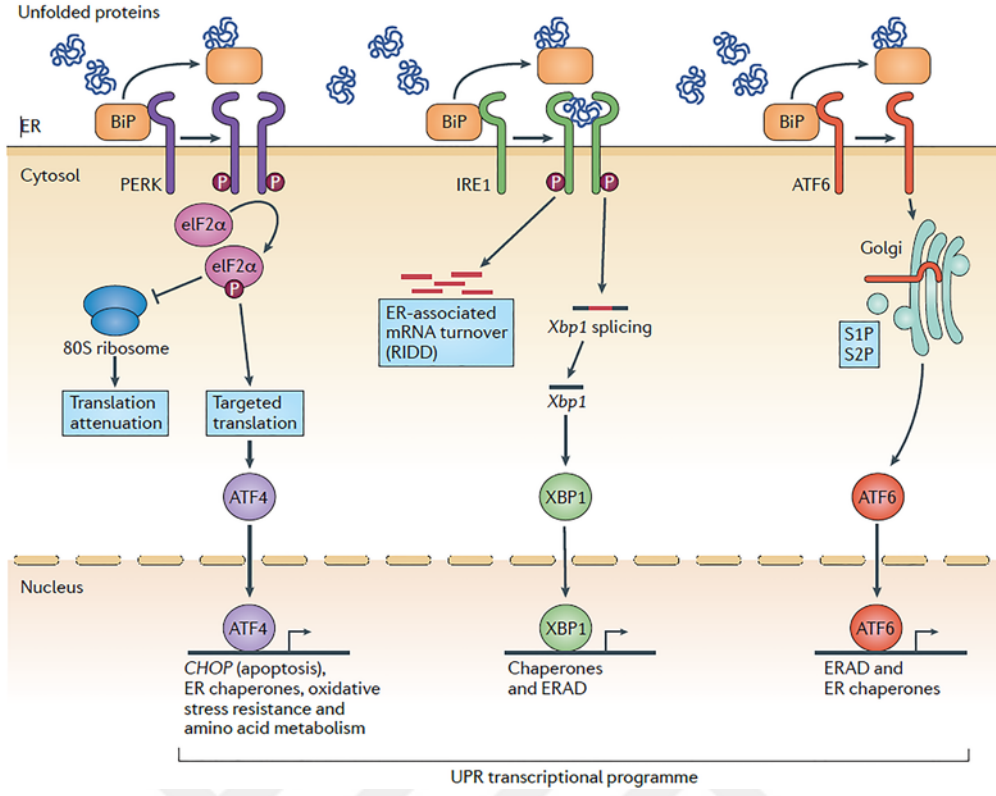
Memelilerde ER’ye yerleşmiş üç sensör protein; *inositol-requiring 1 α* (IRE1 α), *activating transcription factor 6* (ATF6) ve *double-stranded RNA-dependent protein kinase* (PERK); UPR sinyal iletimini başlatır (Bertolotti ve diğ. 2000, Kimata ve diğ. 2003, Shen ve diğ. 2002). Her üç transmembran proteinin de ER lümeninde katlanmamış proteinleri algılayan *ER-luminal domain*’i, transmembran *domain*’i ve sinyalleri transkripsiyonel veya translasyonel aygıtlara ileten sitoplazmik *domain*’i bulunur. Normal koşullarda ER şaperon proteini *immunoglobulin-heavy-chain binding protein* (BiP) bu sensör proteinlerine bağlanarak inaktif halde kalmalarını sağlar (Bertolotti ve diğ. 2000). ER stresi durumunda BiP, ER lümeninde katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlere bağlanarak sensör proteinlerinin serbest kalmasına ve aktivasyonuna neden olur (Bertolotti ve diğ. 2000, Kim ve diğ. 2008, Todd ve diğ. 2008).

ER stresine karşı ilk cevap BiP’ten ayrılarak aktive olan PERK’in eIF2 α (*eukaryotic translation-initiation factor 2 α*)’yı fosforile etmesidir (Hetz 2012). Fosforillenmiş eIF2 α 80S ribozomun oluşumunu engelleyerek hücrede protein sentezini durdurur. Bununla beraber, bazı mRNA’ların translasyonu için ise eIF2 α ’nın fosforilasyonu gerekmektedir (Harding ve diğ. 2000). ATF4 bir transkripsiyon faktörüdür ve UPR’de yer alan birçok genin promotörünü düzenler. eIF2 α ’nın fosforilasyonu, ATF4 mRNA’sının translasyonunu tetikler ve aminoasit biyosentezi ve taşınmasında, glutatyon

biyosentezinde ve oksidatif stres direncinde görev alan genlerin ekspresyonunu sağlar (Ameri ve Harris 2008). Böylece hücrenin redoks homeostazı onarılarak proteinlerin katlanması ya da yıkımı için ER'ye yardımcı olur. Ancak hücrede protein sentezinin uzun süre baskılanması hücrenin hayatta kalımı ile bağdaşmaz. Bu bakımdan ER stresinin uzun sürdüğü koşullarda ATF4 otofaji ya da apoptozda yer alan bazı genlerin ekspresyonunu tetikler (Çizim 1.4) (Kim ve diğ. 2008, Ogata ve diğ. 2006).

ER stresi cevabında yer alan bir diğer protein Ser/Thr kinaz ve RNaz aktivitelerine sahip IRE1 α 'dır. ER stresi varlığında BiP IRE1 α 'dan ayrılarak IRE1 α 'nın dimerizasyonuna ve otosoforilasyonuna yol açar. Aktive olan sitosolik RNaz *domain*'i *x-box-protein binding 1* (XBP1) mRNA'sında translasyonunu engelleyen bir intron bölgesinin kesilip atılmasını ve sonuçta XBP1 proteinin ekspresyonunu sağlar (Calton ve diğ. 2002, Yoshida ve diğ. 2001). XBP-1; UPR ve *endoplasmic-reticulum associated-protein degradation* (ERAD)'da yer alan birçok genin promotörüne bağlanarak transkripsiyonlarını düzenler (A. H. Lee ve diğ. 2003). XBP1 fosfolipid sentezini düzenleyerek stres altında ER zarının genişlemesinde önemli rol oynar (Hetz 2012). IRE-1 α 'nın RNaz domaini XBP1'in yanı sıra, ER'ye yerleşecek olan proteinlerin mRNA'larının yıkımını katalizleyerek ER'ye polipeptid akışını azaltır (Çizim 1.4). IRE1 α 'in kinaz *domain*'i ise *Apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) proteini fosforile ederek *downstream* kinazları p38 ve *c-Jun N-terminal protein kinases* (JNK)'nin aktivasyonuna yol açar. JNK ve p38 pro-apoptotik genlerin ekspresyonu düzenleyerek hücre ölümünü tetikler (Todd ve diğ. 2008).

ER stresinde üçüncü sensör protein ATF6 (ATF6 α ve ATF6 β) ise stres durumunda BiP'ten ayrılarak Golgi cisimciğine yerleşir. Golgi cisimciğinde ATF6'nın hidrofobik kısmı proteazlar tarafından kesilir ve sitolose geçişi sağlanır (Haze ve diğ. 1999). ATF6 homodimer veya diğer transkripsiyon faktörleriyle heterodimer oluşturarak *protein disulfide isomerase* (PDI), BiP, ve *ER degradation-enhancing α mannosidase-like protein 1* (EDEMI) gibi ER stres genlerinin ekspresyonunu düzenler (Çizim 1.4) (Haze ve diğ. 1999, Todd ve diğ. 2008).



Çizim 1. 3,4. ER stresi ve UPR sinyal yolağı. Celli ve Tsolis (2014)'den alınmıştır.

2. AMAÇ

Bu tez çalışmasında TLR9 antagonizminin omurilik nöronları üzerine direkt ve astrosit aracılı etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Öncelikle *in vitro* modeller oluşturularak proteomik yöntemlerle CpG ODN 2088'in omurilik nöronları üzerine olumlu veya olumsuz etkilerinin altında yatan moleküler ve hüresel mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla omurilik nöron kültürleri oluşturulmuş ve TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in omurilik nöronlarının protein ekspresyonu üzerine etkisi etiketsiz karşılaştırmalı proteom analizi ile belirlenmiştir. nLC-MS/MS analizi ile TLR9 antagonizmine cevap olarak omurilik nöronlarında ekspresyonu değişen proteinlerin tanımlanması ve bu proteomik bulguların kaynak taramasıyla güçlendirilmesi ile hedef sinyal yollarının belirlenmesi planlanmıştır. Tez çalışmasından elde edilen bulgular, omurilik nöronlarında TLR9 antagonizminin etkileyebileceği sinyal yollarının belirlenmesi ile temel bilimlere katkı sağlayacaktır.

Omurilik yaralanmalarında glutamat eksitotoksitesisi nöronal ölüm veya işlev kaybına yol açan ikincil hasar mekanizmalarındandır (D. Liu ve diğ. 1999). Bununla beraber, MS, ALS gibi omuriliğin etkilendiği hastalıklarda eksitotoksitesinin nöronal dejenerasyona yol açtığı bilinmektedir (Kawahara ve Kwak 2005, Pitt ve diğ. 2000). Daha önce yapılan çalışmalarda kainik asidin (KA) omurilik nöronlarında eksitotoksik hasar yaratarak ölüme yol açtığı gösterilmiştir (Kurnellas ve diğ. 2010). Bu çalışmada, omurilik nöronlarında TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in KA'nın yol açtığı nörotoksiste üzerine etkisi *in vitro* araştırılmıştır.

Merkezi sinir sisteminde nöronal ve glial hücrelerde TLR'lerin ekspresyonu birçok çalışmada gösterilmiştir (Bsibsi ve diğ. 2002). Astrositlerin nörodejeneratif hastalıklarda ve merkezi sinir sistemi yaralanmalarında önemli rol oynadığı bilinmesine rağmen, astrositlerde TLR9 ligandlarının meydana getirdiği değişimler hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca TLR9 sinyal yolağının astrositler ile nöronlar arasındaki ilişki üzerine etkisini gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu tez çalışmada, TLR9 antagonisti ile uyarılan omurilik astrositlerinin omurilik nöronları üzerine etkisinin araştırılması ve TLR9 antagonizminin omurilik nöronlarında etkilediği sinyal yollarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Böylece hem omurilik astrositleri hem de omurilik nöronlarıyla *in vitro* yapılan deneylerden elde edilecek bulgular TLR9 antagonistinin omurilik yaralanmalarında tedavi amaçlı kullanımının merkezi sinir sistemi hücrelerinde

meydana getirebileceği işlevsel ve hayatta kalımla ilgili süreçler üzerine etkilerine dikkat çekilmesini sağlayabilecektir.

Çalışmanın üçüncü kısmında ise *in vitro* elde edilen bulguların *in vivo* deneylerle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, C57BL/6 farelerinde omurilik hasarı meydana getirilerek TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in hasar merkezinde protein seviyeleri üzerine etkisinin belirlenmesi planlanmıştır. Böylece elde edilen bulgular TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in tedavi amaçlı kullanımına yönelik çalışmalara katkı sağlayabilecektir.



3. YÖNTEM

3.1 Materyal

Minimum essential medium (MEM), *fetal bovine serum* (FBS), *neurobasal medium* (NBM), penisilin/streptomisin, tripsin-EDTA ve 50X Tris-asetat-EDTA (TAE) Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, ABD) şirketinden; HEPES, sodyum klorür (NaCl), sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum azid (NaN₃), sodyum klorür (NaCl), sodyum florid (NaF), %35 *bovine serum albumin* (BSA), *phosphate-buffered saline* (PBS), poli-D-lizin, poli-L-ornitin, KA, IGEPAL CA-630, Dithiothreitol (DTT), Iodoacetamide (IAA), Trifluoroacetic acid (TFA), *Cytosine-1-β-D-arabibofuranoside* (AraC), Tween-20, paraformaldehit (PFA), Triton-X100, proteaz ve fosfataz inhibitör karışımları Sigma-Aldrich (St Louis, MA, ABD) şirketinden; CpG ODN 1826 ve CpG ODN 1826 InvivoGen (San Diego, CA, ABD) şirketinden; Neurobrew 21 (N-21) Miltenyl Biotech (San Diego, CA, ABD) temin edilmiştir.

3.1.1 CpG ODN 1826

CpG ODN'ler metillenmemiş CpG dinükleotidleri içeren sentetik oligonükleotidlerdir. CpG ODN'ler, TLR9'a bağlanır ve güçlü bir bağışıklık cevabını başlatılmasına öncülük ederler. CpG ODN 1826 (5'-tccatgacgttctgacgtt-3') B sınıfı CpG ODN'dir ve fare TLR9'unu aktive eder. B sınıfı CpG ODN'ler fosforotioat omurgası ve bir veya daha fazla CpG dinükleotidi içerir.

http://www.invivogen.com/PDF/ODN1826_TDS.pdf)

3.1.2 CpG ODN 2088

TLR9 antagonisti CpG ODN 2088 (5'-tcctggcggggaagt-3) CpG ODN'lerin uyarıcı etkisini nötralize eden inhibitör ODN'dir. İnhibitör ODN'ler CpG ODN'lerin ve TLR9'un endozomal vesiküllere ko-lokalizasyonunu engelleyerek TLR9 sinyal yolağını inhibe ederler. (http://www.invivogen.com/PDF/ODN_2088_TDS.pdf)

3.2 Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri

1. NM-15: % 15 FBS ve 10 ünite/ml penisilin/streptomisin MEM içinde hazırlanmıştır.

0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

2. **NBM+**: %2 N-21, %0,06 NaCl, 10 ünite/ml pen/strep içeren Neurobasal Medium 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.
3. **%4 BSA**: %35 BSA çözeltisi steril PBS içinde seyreltilerek hazırlanmıştır.
4. **%9 NaCl**: NaCl distile suda çözülerek hazırlanmıştır. NaCl çözeltisi 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.
5. **Phosphate Buffered Saline (PBS)**: Ticari olarak satılan toz PBS karışımı distile suda çözülerek hazırlanmıştır.
6. **T-PBS** : % 0.05 (v/v) Triton X-100 içeren PBS hazırlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.
7. **10X Poly-d-Lizin Çözeltisi**: 1mg/ml Poly-d-lizin çözeltisi distile su ile hazırlanmış ve 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek -20°C'de saklanmıştır.
8. **500 µM CpG ODN 2088 çözeltisi**: 1 mg CpG ODN 2088 endotoksin içermeyen steril suda çözülerek hazırlanmıştır. 1 ml'lik tüplerde -20°C'de saklanmıştır.
9. **500 µM CpG ODN 1826 çözeltisi**: 1 mg CpG ODN 2088 endotoksin içermeyen steril suda çözülerek hazırlanmıştır. 1 ml'lik tüplerde -20°C'de saklanmıştır.
10. **40 mM Kainik asit**: Endotoksin içermeyen steril suda çözülerek hazırlanmıştır. 1,5 ml'lik tüplerde -80°C'de saklanmıştır.
11. **10X Tris Buffered Saline (TBS)**: 200 mM Tris, 1,37 M NaCl distile suda çözülerek hazırlanmıştır ve pH: 7.6'ya ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
12. **Protein Lizis Tamponu**: 10mM HEPES, 150 mM NaCl, %0,02 NaN₃, %0,1 SDS, %0,1 IGEPAL CA-630, 50 mM NaF toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su içinde hazırlanmıştır ve pH:8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon +4°C'de bir ay muhafaza edilmiştir.

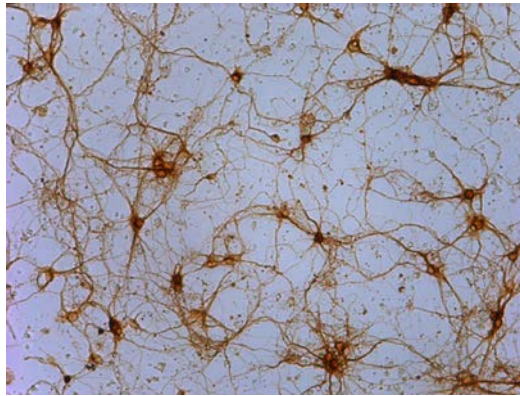
3.3 Hayvanların Bakımı

Çalışmada kullanılan yabani tip (WT) C57BL/6 fareler Charles River (Wilmington, MA, ABD) Laboratuvarları'ndan temin edilmiştir. TLR9^{-/-} fareler ise Dr. Shizuo Akira ve diğ. (Osaka University, Osaka, JAPAN) tarafından üretilmiştir ve üreme çiftleri Dr. Padmini Salgame (Rutgers University, Newark, NJ, ABD) tarafından sağlanmıştır. Fareler Rutgers, The State University of New Jersey Comperative Medicine Resources deney hayvanları biriminde 12 sa karanlık-12 sa aydınlık döngüsü uygulanarak muhafaza edilmiş ve günlük bakımları sağlanmıştır. Hayvanlara yeterli miktarda su ve yem sağlanmıştır. Kontrol hayvanları aynı odada muhafaza edilmiş ve patojen kontrolü düzenli olarak

yapılmıştır. Bütün hayvan deneyleri protokolleri Rutgers Institutional Animal Care and Use Committee tarafından onaylanmıştır.

3.4 Omurilik Nöron Kültürü

Omurilik nöron kültürleri on üç günlük C57BL/6 fare embriyolarından elde edilmiştir. On üç günlük hamile C57BL/6 farelere %50 CO₂ ile ötenazi uygulandıktan sonra fareler %70 etil alkol+sporocidin içinde 5 dk ardından %70 etil alkol içinde 2x5 dk bekletilerek steril edilmiştir. Steril makas ve pens ile embriyolar çıkarılıp soğuk PBS'ye konulmuştur. Disseksiyon işlemi biyogüvenlik kabini içerisinde stereo mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Disseksiyon işlemi sırasında embriyolar ve omurilikler soğuk ortamda PBS veya NBM+ içinde tutulmuştur. Amniyon kesesi açılarak embriyolar çıkarıldıktan sonra embriyolardan omurilikler çıkarılmıştır. Daha sonra omuriliklerden menengeal membranlar temizlenmiştir. Temizlenen omurilikler bisturi ile küçük parçalara bölündükten sonra 1ml BSA (%4)+ 3 ml NBM+ içinde 5 ml'lik cam pipet ile pipetaj yapılarak dokular homojenize edilmiştir. Doku parçalarını uzaklaştırmak amacıyla %4 BSA gradienti uygulandıktan sonra 1500 rpm'de 1,5 dk santrifüj edilmiştir. Pellet 5 ml NBM+ ile yeniden süspanse edildikten sonra tekrar santrifüj edilmiştir. Pellet NBM+ ile süspanse edildikten sonra hücre sayımı yapılmış ve poli-L-ornitin ile kaplanmış 35 mm'lik kültür kaplarına 5×10^5 hücre ekilmiştir. Hücreler 37°C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren ortamda büyütüldü. Her üç günde bir besiyerinin yarısı atılıp kültürler aynı miktarda taze yeri besi ilave edilmiştir. Onuncu gün sonunda omurilik nöron kültürleri deneylerde kullanılmıştır (Çizim 3.1).



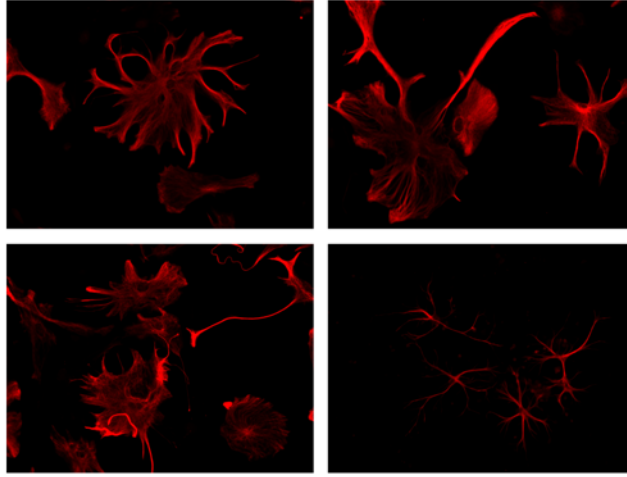
Çizim 3.1. Omurilik nöronları, *in vitro*. 10 günlük nöronal kültürler β -III ile işaretlenmiş ve Leica (Wetzlar, Almany) DMIL mikroskopta görüntülenmiştir. 20X

3.5 Karışık Glial Kültür

Üç günlük C57BL/6 farelerden omurilik glial kültürleri hazırlanmıştır. Fareler % 50 CO₂ içeren hava ortamında 15-20 dk bekletilerek ötenazi uygulanmıştır. Fareler %70 etil alkol+sporocidin içinde 5 dk ve ardından etil alkolde 2x5 dk bekletilerek steril edilmiştir. Disseksiyon biyogüvenlik kabininde stereo mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Disseksiyon işlemi sırasında omurilikler soğuk ortamda PBS veya NM-15 içinde tutulmuştur. Omuriliklerden meningeal membranlar ve kan damarları temizlendikten sonra bistüri ile küçük parçalara bölünmüştür. Daha sonra dokular 50 ml tüplere alınmış ve NM-15 içinde 5 ml cam pipet ile pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir. Daha sonra hücre süspansiyonu poli-D-lizin ile kaplanmış 75 cm² kültür kaplarına ekilmiştir. Her bir kültür kabına üç fareden elde edilen omurilik hücre süspansiyonu ekilmiştir. Hücreler 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve %95 hava içeren ortamda büyütülmüştür. Hücre ekiminden üç gün sonra kültür kapları NM-15 ile yıkanarak yüzeye tutunmayan doku ve hücre parçaları uzaklaştırılmıştır ve besiyeri taze NM-15 ile değiştirilmiştir. Bir hafta sonunda omurilik karışık glial kültürler elde edilmiştir.

3.6 Karışık Glial Kültürlerden Astrositlerin Saflaştırılması ve Pasajlanması

Omurilik glial kültürleri elde edildikten sonra astrositlerin saflaştırılması işlemine geçilmiştir. Glial kültürlerden mikroglia ve oligodendrositleri uzaklaştırmak için glial kültürler 280 rpm'de 37°C'de orbital çalkalayıcıda gece boyu çalkalanmıştır. Daha sonra besiyeri uzaklaştırılarak 10 µM AraC içeren besiyerinde 37°C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren ortamda üç gün inkübe edilmiştir. AraC içeren besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır. Hücreler yapıştıkları yüzeyden %0,05 tripsin-EDTA muamelesi ile kaldırılmış ve NM-15 içinde 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra hücreler NM-15 ile süspanse edilmiş ve santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Santrifüjün ardından hücreler yeniden süspanse edilerek poli-D-lizin kaplı 75 cm²lik kültür kaplarına ekilmiştir. Pasajlama işlemi 4-5 günde bir 1:2 oranında yapılmıştır. Her pasaj öncesi kültürde kalan mikroglia'yı uzaklaştırmak amacıyla kültürler 280 rpm'de 37°C'de orbital çalkalayıcıda gece boyu çalkalanmıştır. Astrosit kültürlerinin saflığı mikroglial belirteç olan Iba-1 ile işaretlenerek immünohistokimya yöntemi ile belirlenmiştir. Deneylede kullanılan astrositler (p:3) %99 ≤ saflıktadır.



Çizim 3.2. Omurilik astrositleri, *in vitro*. Saf astrosit kültürleri GFAP ile işaretlenmiş ve Leica DMI3000 floresan mikroskopta 594 nm dalga boyunda görüntülenmiştir. 10x40 büyültme.

3.7 Astroglial Şartlandırılmış Besiyeri Üretimi

Astrositler (p:2) 3.6'da anlatıldığı gibi pasajlanmak için kaldırılıp süspansiyon edildikten sonra hemositometre ile süspansiyondaki hücre sayısı belirlenmiştir. Daha sonra hücre süspansiyonundan poli-D-lizin kaplı 35 mm² kültür kaplarına $7,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Astrositler NM-15 besiyerinde 37°C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren ortamda gece boyu inkübe edildikten sonra besiyeri NM-15/NBM+ (1:1) besiyeri ile değiştirilmiştir. Sekiz saat inkübasyondan sonra NM-15/NBM+ besiyeri uzaklaştırılarak hücreler NBM+ besiyerinde gece boyu inkübe edilmiştir. Böylece astrositlerin serum içeren NM-15 besiyerinden serumsuz NBM+ besiyerine aşamalı olarak geçişi sağlanarak hücrelerin ortama alışması kolaylaştırılmıştır. NBM+ besiyerindeki astrositler 1 µM CpG ODN 2088, 1µM CpG ODN 1826, 1µM CpG ODN 1826+CpG ODN 2088 veya *vehicle* (endotoksin içermeyen su) ile muamele edilmiş ve 37°C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren ortamda 24 veya 48 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 24 ve 48 saat sonra şartlandırılmış besiyerleri (CM; Conditioned Medium) 1,5 ml tüplere alınmış ve hızlıca -80°C'ye kaldırılmıştır.

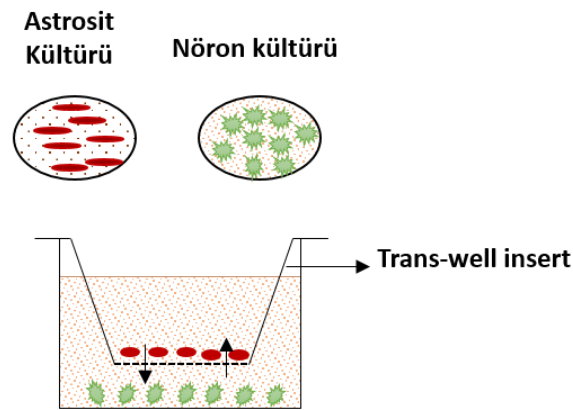
3.8 Mikroglial Kültürlerin Saflaştırılması

Mikroglial kültürler karışık glial kültürlerinden saflaştırılarak oluşturulmuştur. Glial kültürler 180 rpm'de 37°C'de iki saat orbital inkübatörde çalkalanarak mikroglial ve oligodendrositlerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. İki saat sonunda kültür kaplarından besiyeri toplanarak süspansiyon 2000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Pellet

serumsuz MEM ile süspansiyon edildikten sonra santrifüj işlemi tekrar edilmiştir. Pellet serumsuz MEM’de süspansiyon edildikten sonra 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu kültür plakalarına ekim yapılmıştır. Hücreler 37°C sıcaklıkta, % 5 CO_2 ve % 95 hava içeren ortamda 10 dk inkübe edilerek mikroglialın yüzeye yapışması sağlanmıştır. Daha sonra besiyeri NM-15 ile değiştirilerek mikroglial kültürler 37°C sıcaklıkta, % 5 CO_2 ve % 95 hava içeren ortamda gece boyu inkübe edilmiştir. Mikroglial kültürler astrosit kültürlerinde olduğu gibi aşamalı olarak NBM+ besiyerine alınmıştır. Daha sonra *vehicle* veya $1 \mu\text{M}$ CpG ODN 2088 ile muamele edilerek mikroglial CM elde edilmiştir.

3.9 Astrosit-Nöron Ko-Kültürleri

Omurilik nöronları bölüm 3.4 te anlatılan şekilde elde edilmiş ve poli-L-ornitin ile kaplanmış 6 kuyulu plakalarda büyütülmüştür. Astrositler ise poli-D-lizin ile kaplanmış “Trans-well insert” lere 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. “Trans-well insert” ler porlu membran yapısındadır ve hücreler membrana tutunarak çoğalır. Membrandaki porlar küçük moleküllerin geçine olanak sağlayacak boyutta olduğundan hücre-hücre etkileşimi olmadan hücreler arasında karşılıklı iletişim sağlanabilir (Şekil 3.3). Astrositler bölüm 3.7’de anlatıldığı gibi aşamalı olarak NBM+ besiyerine alınmıştır. 10 günlük nöron kültürlerinden NBM+ besiyeri uzaklaştırılmış ve astrositler besiyeri ile beraber nöron kültürlerinin bulunduğu kuyulara yerleştirilmiştir. Astrosit-nöron ko-kültürleri $1 \mu\text{M}$ CpG ODN 2088 veya *vehicle* ile muamele edildikten sonra 24 sa % 5 CO_2 , % 95 hava ortamında 37°C ’de 24 saat inkübe edilmiştir.



Çizim 3.3. Astrosit-nöron ko-kültürünün şematik gösterimi

3.10 Nöronların CM, CpG ODN 2088 veya KA ile Muamelesi

Omurilik nöron kültürleri bölüm 3.4’te anlatıldığı gibi elde edilmiş ve on gün % 5 CO_2 , % 95 hava ortamında 37°C ’de büyütülmüştür. Onuncu günde besiyerine *vehicle*, son

konsantrasyonu 1 µM olacak şekilde CpG ODN 2088, son konsantrasyonu 20 µM olacak şekilde KA veya CpG ODN 2088 (1 µM) + KA (20µM) ilave edilmiş ve 24 sa inkübe edilmiştir.

Nöron kültürleri CM ile muamele edilmeden önce astroglial CM'ler % 5 CO₂ , % 95 hava ortamında 37°C'de 10-15 dk inkübe edilerek CM'lerin uygun sıcaklık ve pH'ye gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra CM'ler kısa süre santrifüj edilerek hücre parçalarının çökmesi sağlanmıştır. Nöron kültürlerinden NBM+ uzaklaştırılarak nöronlar astroglial CM ile 24 sa inkübe edilmiştir.

3.11 ELISA

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) özel bir antijen proteininin örnekteki miktarını ölçmek için kullanılan, antijen-antikor ilişkisi temeline dayanan nicel bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında sandviç tipi ELISA kitleri kullanılmıştır. Bu ELISA tipinde özgün antikorlar 96 kuyulu plakalara sabitlenmiştir. Örnekler antikor bağlı kuyulara eklenir ve örneklerdeki özgün proteinler antikorlar tarafından tanınır ve bağlanır. Enzim bağlı özgün ikinci antikor ortama eklenir ve birinci antikordan farklı bir epitopa bağlanır. Ardından ortama ilave edilen substrat ikinci antikora bağlı enzim ile reaksiyon verir. Reaksiyonda oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Böylece ortamdaki rengin yoğunluğu ölçülerek her örnekteki antijen miktarı saptanır.

Bu çalışmada astroglial ve mikroglial CM'lerdeki *monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) ve *chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (CXCL 1) konsantrasyonları sırasıyla Mouse/Rat CCL2/JE/MCP-1 Immunoassay Quantikine ELISA Kit ve Mouse CXCL1/KC Quantikine ELISA Kit (R&D Biosystems) kullanılarak ölçülmüştür. Bu kitler katı fazlı ELISA'lardır. Bu kitler kullanılırken izlenen protokol kısaca şu şekildedir:

Astroglial veya mikroglial CM'ler oda sıcaklığına getirildikten sonra 1:4-1:10 oranında seyreltilmiştir. 15,6-1000 pg/ml aralığında farklı konsantrasyonlarda CXCL1 veya MCP-1 standartları hazırlanmıştır. Herbir kuyuya 50 µl "assay diluent" eklendikten sonra 50 µl de standartlardan veya CM'lerden ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyular yıkama tamponu ile beş defa yıkanmıştır. Ardından kuyulara 100 µl *horse raddish peroxidase* (HRP)-bağlı özgün ikincil antikor (anti-mouse KC veya anti-mouse MCP-1) ilave edilip oda sıcaklığından 2 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve kromojen (tetrametilbenzidin) eşit hacimlerde karıştırıldıktan sonra her bir kuyuya 100 µl karışımdan ilave edilmiş ve reaksiyon için 30 dk karanlıkta inkübe edilmiştir.

Reaksiyon 100 µl hidroklorik asit çözeltisi ile durdurulduktan sonra optik yoğunluk 450 nm (540 nm referans) dalga boyunda ölçülmüştür. Microsoft Excel programında standart grafikler çizilmiş ve örneklerdeki CXCL1 veya MCP-1 konsantrasyonları hesaplanmıştır

Mikroglial veya astroglial CM'lerdeki IL-6 ve *soluble TNF-α receptor 1* (sTNFR1) konsantrasyonları ise sırasıyla RayBio Mouse IL-6 ELISA Kit ve RayBio Mouse sTNFR1 ELISA kit (Raybiotech, Norcross, GA, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Bu kitler kullanılırken izlenen protokol şu şekildedir:

Kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildikten sonra örnekler yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır ve analiz boyunca bütün işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. 0,82-600 pg/ml veya 1,23-300 pg/ml konsantrasyon aralığında sırasıyla IL-6 veya sTNFR1 standartları hazırlanmıştır. Mikroplaka kuyularına 100 µl örnek veya standartlardan ilave edilerek 100 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 2,5 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyular yıkama çözeltisi ile dört defa yıkanmıştır. Ardından özgün ikinci antikor (*biotinylated anti-mouse IL-6* veya *biotinylated anti-mouse sTNFR1*) kuyulara ilave edilip 100 rpm'de 1 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yıkama işlemi tekrar edilmiş ve ardından kuyulara 100 µl HRP-bağlı streptavidin çözeltisi ilave edilerek 100 rpm'de 45 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra streptavidin çözeltisi uzaklaştırılıp yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Ardından 100 µl tetrametilbenzidin çözeltisi ilave edilip 100 rpm'de 30 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyulara 50 µl 0,2 M sülfirik asit eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Optik yoğunluk 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Microsoft Excel programında standart grafikler çizilmiş ve örneklerdeki IL-6 veya sTNFR1 konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.12 Sitokin Array

Astrositlerde TLR9'un CpG ODN 2088 ile inhibisyonunun sitokin salgısı üzerine etkisini araştırmak amacıyla "Mouse Cytokine Antibody Array (RaybioTech)" kullanılmıştır. Bu *array* aynı anda 22 farklı fare sitokininin görüntülenmesine olanak sağlayan membran bazlı antikor *array*' i dir. Sandviç tipi immüno analiz prensibine dayalı bir yöntemdir. Antikorlar 2,5x3 cm nitroselüloz membran üzerine immobilize edilmiştir ve western blot yöntemine benzer işlemler uygulanır. Çalışmada izlenen protokol şu şekildedir:

Bütün kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildikten sonra membranlar inkübasyon kuyularına alınmıştır. Her bir kuyuya 2 ml bloklama tamponu ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Ardından bloklama tamponu uzaklaştırılıp kuyulara

vehicle veya CpG ODN 2088 ile muamele edilen astroglial CM'ler ilave edilmiş ve +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda CM'ler uzaklaştırılıp membranlar önce yıkama tamponu I ile 3x5 dk daha sonra yıkama tamponu II ile 2x5 dk yıkanmıştır. Ardından membranlar 1 ml biotinlenmiş antikor karışımı ile oda sıcaklığında 2 sa inkübe edilmiştir. Antikor karışımı inkübasyon sonunda uzaklaştırılıp membranlar daha önce belirtilen şekilde yıkama tamponları ile yıkanmıştır. Daha sonra membranlar 1 ml HRP-streptavidin çözeltisi ile oda sıcaklığında 2 sa inkübe edilmiştir. Ardından membranlar yıkama tamponlarıyla belirtilen şekilde yıkanmıştır. Membranlar H₂O₂ ve luminol karışımı (1:1) ile muamele edilip Chemidoc MP Imager (Bio-RAD Hercules, CA, ABD) ile görüntülenmiştir.

3.13 Proliferasyon Analizi

CpG ODN 2088'nin astrosit proliferasyonu üzerine etkisi "Click-iT EdU Staining Kit (Thermo Fisher Scientific)" kullanılarak belirlenmiştir. Kit EdU (5-etinil-2'-deoksiüridin), Alexa flour azit, reaksiyon tamponu, bakır sülfat ve Hoechst boyasından oluşmaktadır. Bir timidin analogu olan EdU, DNA sentezi sırasında DNA'nın yapısına katılır. Hücre bölünmesi sırasında DNA replikasyonu meydana geldiği için EdU bölünen hücrelerdeki DNA'nın yapısına katılır. Ortama ilave edilen bakır EdU 'daki alkin uç ile Alexa Fluor boyasındaki azid arasında kovalent bağ oluşumunu katalizler ve böylece EdU pozitif hücrelerin flouresan mikroskopta 488 nm dalga boyunda görüntülenmesi sağlanır.

Astrositlere CpG ODN 2088 ve *vehicle* uygulaması bölüm 3.7'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Proliferasyon analizi için astrositler CpG ODN 2088 ve *vehicle* ile muamele edilirken besiyerine son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde EdU ilave edilmiş ve % 5 CO₂, % 95 hava ortamında 37°C'de 24 veya 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanmış ve %4 PFA ile oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilerek fikse edilmiştir. Fiksasyon çözeltisi uzaklaştırılıp hücreler %3 BSA çözeltisi ile yıkanmıştır. Ardından hücreler % 0,5 Triton-X 100 ile oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilerek permabilize edilmiştir. Permabilizasyonun ardından hücreler %3 BSA çözeltisi ile yıkandıktan sonra Alexa Flour 488 ve bakır sülfat (CuSO₄) içeren reaksiyon karışımı ile karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon karışımı uzaklaştırılıp hücreler %3 BSA çözeltisiyle yıkandıktan sonra 5µg/ml Hoechst ile boyanmış ve lamel ile kapatılmıştır. 30 dakika inkübasyondan sonra hücreler floresan mikroskopta (Leica DMI3000) 488 nm dalga boyunda görüntülenmiştir.

3.14 RNA İzolasyonu

Astrosit ve nöron kültürlerinden RNA izolasyonu trizol kullanılarak yapılmıştır. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 200 µl trizol ile muamele edilmiştir. Hücreler “cell scraper” ile kaldırılıp RNaz içermeyen tüplere alınmıştır. Hücreler oda sıcaklığında trizol içinde 5 dk inkübe edildikten sonra tüplere 200 µl kloroform ilave edilmiş ve tüpler 15 sn kuvvetlice çalkalanmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında 3 dk inkübe edilip ardından 12000 xg’de +4°C’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan üç fazdan nükleik asitlerin bulunduğu üst sıvı alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. RNA presipitasyonunu sağlamak için örnekler 0,5 µl glikojen ve 500 µl izopropanol eklenerek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildikten sonra örnekler 12000 xg’de +4°C’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından pellet 1 ml %75 etanol ile yeniden süspanse edilmiştir. Tüpler vorteksle kısa süre karıştırıldıktan sonra 7500 xg’de +4°C 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda sıvı faz uzaklaştırılarak RNA pelleti oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra pellet 20 µl RNaz içermeyen su ile tekrar çözüldü. Ardından saflaştırma amacıyla DNaz ile muamele edilmiştir. 37°C’de 30 dk DNaz ile inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için DNaz inaktivasyon çözeltisi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildikten sonra 10000 xg’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Sıvı faz yeni bir tüpe aktararak 1:0,1 (v/v) oranında 5M amonyum asetat, 1:0,02 (v/v) oranında linear akrilamid ve 1:2,5 (v/v) oranında %100 etanol ilave edildikten sonra -20°C’de gece boyu presipitasyona bırakılmıştır. Etanol presipitasyonunun ardından örnekler +4°C’de 125000 rpm’de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda sıvı faz uzaklaştırılarak RNA oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Alkol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra pellet RNaz içermeyen su ile çözülmüştür. RNA konsantrasyonları nanodrop spektrofotometrede (Thermo Fischer Scientific) ölçüm yapılarak belirlenmiştir.

3.15 cDNA Sentezi ve qRT-PCR

cDNA sentezi toplam 1µg RNA ile “Superscript III reverse transcriptase (Thermo Scientific)” kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon karışımı aşağıdaki çizelgede verilmiştir. cDNA sentezi sırasında uygulanan protokol ise şu şekildedir.

Kalıp RNA, dNTP ve random heksamerler RNase-free tüplerde belirtilen hacimlerde karıştırılarak 65°C’de 5 dk inkübe edilmiştir. Ardından 1 dk buzda bekletilerek örnekler spin edilmiştir. Her bir tüpe reaksiyon tamponu, DTT, RNaz inhibitörü ve revers transkriptaz tabloda belirtilen hacimlerde karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dk inkübe

edilmiştir. Daha sonra sentez için örnekler 50°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından 70°C’de 15 dk inkübe edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

Çizelge 3.1. cDNA sentezi reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Hacim
RNA (1µg)	9 µl
dNTP (10mM)	1 µl
Random Heksamerler (50µM)	1 µl
Reaksiyon Tamponu (5X)	4 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
RNaz İnhibitörü (40 U/µl)	1 µl
Revers Transcriptaz (200 U/µl)	1 µl
Toplam	20 µl

cDNA sentezinin ardından astrosit ve nöron kültürlerinde TLR9 mRNA ekspresyonu qRT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Primerler Thermo Fischer Scientific firması tarafından sentezlenmiştir. Forward primer 5-GCGGCAGCATCCTGCTCCAA-3, reverse primer 5-GGGGGCTAAGGCCAGTGGGT-3. qRT-PCR 300 nM primer, 5µl cDNA ve Clontech SYBR reaksiyon karışımı kullanılarak ABI4000 (Applied Biosystems; Thermo Fischer Scientific) cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon döngüsü şu şekildedir: 95°C’de 15 dk ardından 40 döngü 95°C’de 15 sn denatürasyon, 58°C’de 1 dk bağlanma ve 72°C’de 1 dk sentez. Reaksiyon sonunda qRT-PCR ürünleri %2,5 agaroz jel elektroforezinde 140 V’de 40 dk yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir. Elektroforez Bio-RAD yatay elektroforez sistemi kullanılarak 1X TAE içinde yapılmıştır.

3.16 DNA İzolasyonu ve Genotiplendirme

TLR9^{-/-} farelerden elde edilen astrosit ve nöron kültürlerinin genotipleri PCR analizi ile doğrulanmıştır. Astrosit ve nöron kültürlerinden DNA izolasyonu “DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Almanya)” kullanılarak yapılmıştır. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra “cell scraper” yardımıyla buldukları yüzeyden kaldırılmış ve PBS içinde tüplere aktarılmıştır. Hücreler 300 xg’de 5 dk santrifüj edildikten sonra pellet

Proteinaz K ve RNaz A içerene PBS ile süspansiyon edilmiş ve oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir. Ardından 1:1 oranında lizis çözeltisi (AL buffer) ilave edilerek 56°C’de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda çözelti etanolle karıştırıldıktan sonra DNeasy mini spin kolonlara aktarılmış ve 6000 xg’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kit içindeki yıkama tamponları ile 6000 xg’de 1dk ve 16000 xg’de 3 dk santrifüj edilerek kolonlar yıkanmıştır. Ardından kolonlara elüsyon tamponu eklenerek 6000xg’de 1 dk santrifüj edilmiştir. DNA konsantrasyonları nanodrop spektrofotometride 260 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlenmiştir.

Mutant TLR9 alleli genin *downstream* bölgesine bağlanan primer (5’-GCAA TGGAAAGGACTGTCCACTTTGTG-3’) ve neomisin direnç genine özgü primer (5’-ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG-3’) çifti kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. WT TLR9 alleli ise 5’-GCAATGGAAAGGACTGTCCACTTTGTG-3’ ve 5’-GAAGTTCTGGGCTCAATGGTCATGTG-3’ primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Primerler Babiuk ve diğ. (2004) tarafından tasarlanmış ve Thermo Fischer Scientific firması tarafından sentezlenmiştir. PCR, “Advantage 2 DNA polymerase mix (Clontech, Palo Alto, CA, ABD)” kullanılarak Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 25 pmol primer, 0,2 mM dNTP karışımı ve 100 ng DNA kullanılarak 25 µl hacim içinde hazırlanmıştır. PCR 94°C’de 1 dk başlangıç inkübasyonunun ardından, 94°C’de 30 sn, 67°C’de 45 sn 72°C’de 1 dk olacak biçimde 35 döngü olarak gerçekleştirilmiş ve 72°C’de 10 dk inkübasyonun ardından PCR tamamlanmıştır. Reaksiyon ürünleri %2 agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve UV ışığında altında görüntülenmiştir.

3.17 İmmünohistokimya

3.17.1 3,3'-diaminobenzidin (DAB) Boyama

CpG ODN 2088’in nöronal canlılık üzerine direkt ve astrosit aracılı etkisi immünohistokimya yöntemiyle belirlenmiştir. Omurilik nöronları; *Vehicle*, KA, KA+CpG ODN 2088, CpG ODN 2088 ile uyarılmış CM veya *vehicle* ile uyarılmış CM ile muamele edildikten 24 sa sonra nöronal canlılığı belirlemek amacıyla hücreler β-III tubulin ile işaretlenmiş ve hücreler DAB boyama yöntemi ile görüntülenmiştir. Yöntem sırasında uygulanan protokol şu şekildedir:

Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile 3x10 dk yıkanmış ve %4 PFA ile oda sıcaklığında 30 dk fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından PFA uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile 3x10 dk yıkanmıştır. Hücreler %10 normal *goat serum*/%0,1 triton X-100/PBS ile oda sıcaklığında 1 sa bloklanmıştır. Daha sonra hücreler birincil antikor β -III tubulin (1:1000) ile +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Birincil antikor uzaklaştırılıp hücreler 3x10 dk PBS ile yıkandıktan sonra biotinlenmiş ikincil antikor anti-rabbit (1:500) ile oda sıcaklığında 1 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 3x10 dk PBS ile yıkanmış ve avidin-biotin kompleksi (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, ABD) ile oda sıcaklığında 1 sa inkübe edilmiştir. Hücreler 3x10 dk PBS ile yıkandıktan sonra β -III pozitif hücreler DAB (Sigma Aldrich) ile belirlenmiştir. Leica DMIL mikroskopta 10x40 objektif altında otuz farklı bölgede β -III pozitif hücreler sayılmıştır.

3.17.2 Floresan Boyama

Astrosit kültürlerinde GFAP ekspresyonu floresan boyama yapılarak belirlenmiştir. Hücreler bölüm 3.16.1'de belirtilen koşullarda fiksasyon ve bloklama işlemlerinin ardından GFAP (1:1000) ile inkübe edilmiştir. Daha sonra ikincil antikor *anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594* (1:1000) ile oda sıcaklığında 1 sa inkübe edilmiştir. Hücreler 3x10 dk PBS ile yıkandıktan sonra nuklear boyama için "Prolong Gold Antifade mountant with DAPI (Thermo Fischer Scientific)" solüsyonu damlatılıp lamel ile kapatılmıştır. Hücreler floresan mikroskopta (Leica DMI3000) 594 nm dalga boyunda görüntülenmiştir

3.18 Protein Özütleme

Proteomik uygulamalar için hücrelerden protein özütleri "Universal Protein Extraction Kit (UPX; Expedeon, San Diego, CA, ABD) " kullanılarak elde edilmiştir. Hücreler üç kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra petrilere UPX lizis tamponu eklenerek hücreler yapışık oldukları yüzeyden "cell scraper" yardımıyla kaldırılmış ve 1,5 ml'lik tüplere alınmıştır. Örnekler hızlı dondurma-çözme işlemi uygulandıktan sonra örnekler ultrasonik banyoda düşük frekansta 30 sn inkübe edilmiştir. Ardından örnekler 100°C'de 10 dk kaynatılmış ve +4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Soğutma işleminin ardından örnekler 15000xg'de 10 dk sanrifüj edildikten sonra sıvı faz yeni bir tüpe alınmıştır. Protein konsantrasyonu Bio-RAD DC Assay ile belirlendikten sonra örnekler küçük hacimlere bölünerek protein LoBind (Eppendorf) tüplerde -80°C'de saklanmıştır.

3.19 Bio-RAD DC Assay ile Protein Miktar Tayini

DC assay protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan Lowry yöntemine dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. Lowry yöntemi proteinin alkalın bakır tartarat çözeltisi ve folin bileşeni ile reaksiyona girmesini temel alır. Proteinin alkali ortamda bakır ile reaksiyona girmesi folinin indirgenmesine sebep olur. Renk oluşumu tirozin (Try) ve Triptofan (Trp) aminoasitlerinden kaynaklanır. Protein 1,2 veya 3 O atomu kaybederek folinin indirgenmesine neden olur ve maksimum absorbanı 750 nm’de görülen mavi renk oluşumu gözlenir. Çalışmada protein konsantrasyonlarını belirlemek için izlenen protokol şu şekildedir:

1ml Reagent A üzerine 20 µl Reagent S eklenerek Reagent A’ hazırlanmıştır. 0,2 mg/ml’den 1,5 mg/ml aralığında farklı konsantrasyonlarda BSA standartları hazırlanmıştır. Hazırlanan BSA standartlarından ve hücre lizatlarında 5 µl/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plaklara üçer kopya halinde eklenmiştir. Her bir kuyuya 25 µl Reagent A’ eklenmiştir. Her bir kuyuya 200 µl Reagent B eklenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. 750 nm’de absorbanları ölçülmüştür. Değerler Microsoft Excel programında hesaplanmıştır.

3.20 LC-MS/MS Analizi ve Veri Bankası Taraması

nLC-MS/MS analizi ve protein tanımlama daha önce belirtilen protokol izlenerek yapılmıştır (Serhatli ve diğ. 2014). 2µl hacim içinde 200 ng triptik peptid karışımı nano LC-MS/MS (Acquity UPLC M-Class and SYNAPT G2-si HDMS; Waters, Milford, MA, ABD) sisteminde analiz edilmiştir. Trap ve analitik kolonlar %97 hareketli faz A UHPLC-grade su ve %0,1 formik asit (Merck, Kenilworth, NJ, ABD) ile dengelenmiştir. Kolon sıcaklığı 55°C’ye ayarlanmıştır. Peptidlerin trap kolonundan (Symetry C18 5 µm, 180µm i.d x 20 mm, Waters) analitik kolona geçişi gradiyent elüsyonu ile sağlanmıştır. %5-40 hareketli faz B (%0,1 formik asit içeren hypergrade asetonyitril) gradienti 400 nl/min akış hızıyla 90 dk boyunca uygulanmıştır.

Analizler *mobility time of flight* (TOF) modunda 0,7 s MS ve MS/MS fonksiyonları uygulanarak pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. Sürüklenme zamanına özgü çarpışma enerjisi peptid türlerinin fragmentasyonu için kullanılmıştır. Glu-fibrinopeptid internal kontrol olarak kullanılmıştır. Glu-fibrinopeptid 0,5 µl/dk akış hızıyla her 30 saniyede bir enjekte edilmiş ve m/z değer 50-1900 arası peptidler kaydedilmiştir. “Tandem mass data extraction”, “charge state deconvolution” ve “deisotoping” Progenesis QI for proteomics (v.2.0, Waters) kullanılarak yapılmıştır ve Uniprot’ta tanımlanmış protein veri bankasında taranmıştır. Veri bankası taraması peptid ve protein başına sırasıyla en az üç ve

yedi fragment iyon eşleşmesi sağlanacak şekilde yapılmıştır. Proteinler en az bir peptid ile tanımlanmıştır ve bir hatalı kesim göz ardı edilmiştir. Analizler sırasında karbamidometil-sistein modifikasyonları ve asetil N-TERM, asparagin ve glutamin deaminasyonu, metionin oksidasyonları göz önünde bulundurulmuştur.

Örnek setleri arasındaki normalizasyon toplam iyon yoğunluğuna göre yapılmıştır. Kromatografik gruplama, peptid miktarının hesaplanması ve normalizasyonu ve ekspresyon değişiklikleri Progenesis Q1 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlanan bütün proteinlerin normalize edilmiş miktarları Microsoft Excel dosyası halinde rapor edilmiştir.

3.21 Western Blot Analizi

Elektroforez %4-15, %10 veya %12 Criterion *stain-free* TGX *precast* jeller kullanılarak Bio-RAD Criterion elektroforez sisteminde yapılmıştır. 10 µg protein örnekleri Laemli yükleme tamponu ve %2,5 β-merkaptoetanol ile karıştırıldıktan sonra 100°C'de 5 dk denatüre edilmiştir. Ardından örnekler kuyulara yüklenerek 200 V'de 45 dk yürütülmüştür.

Elektroforezin ardından jel görüntüleri ChemiDoc Touch (Bio-RAD) görüntüleme sistemi kullanılarak elde edilmiştir. Ardından proteinler Bio-RAD Trans-Blot Turbo sistemi kullanılarak polivinilidin florid (PVDF) membranlara transfer edilmiştir. Transfer için öncelikle membranlar metanolde 1dk inkübe edilerek aktive edilmiştir. Membranlar dH₂O ile yıkandıktan sonra %20 etanol içeren transfer tamponunda (Bio-RAD) 10 dk inkübe edilmiştir. Trans-Blot Turbo cihazında 15 dk 2,5 A (25V) akım uygulanarak transfer gerçekleştirilmiştir. Transfer sonunda membranlar ve jeller ChemiDoc Touch görüntüleme sisteminde görüntülenerek transferin etkinliği kontrol edilmiştir.

Görüntüleme işleminin ardından özgün olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla membranlar bloklama çözeltisinde (%5 süt tozu, %0,1 Tween 20, TBS) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek bloklanmıştır. Birincil antikorlar %5 BSA/T-TBS içinde çizelge 3.2'de belirtilen oranlarda seyreltilmiş ve membranlar birincil antikor çözeltisi ile +4°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Birincil antikor çözeltisi uzaklaştırılıp membranlar T-TBS ile 3x10 dk ile yıkanmıştır. İkincil antikor anti-rabbit IgG bloklama çözeltisinde seyreltilmiş (1:5000) ve membranlar ikincil antikor ile oda sıcaklığında 1 sa inkübe edilmiştir. İkincil antikor ile inkübasyonu takiben membranlar T-TBS ile 3x10 dk yıkanmıştır. Kemilüminesans reaksiyon Clarity Enhanced Chemiluminescent Western Blotting Substrate (ECL; Bio-RAD) kullanılarak başlatılmıştır. T-TBS uzaklaştırılıp

membranlar luminol/peroksidaz (1:1) çözeltisiyle 5 dk inkübe edilmiştir. Protein bantları ChemiDoc Touch (Bio-RAD) sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. Western blot sonuçları ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, ABD) programı kullanılarak analiz edilmiştir.



Çizelge 3.2 Western blot ve immünohistokimya analizlerinde kullanılan antikorlar
 CST: Cell Signaling, Ab: Abcam, NB: Novus Biologicals, Jackson: Jackson Immuno
 Research Laboratories, VL: Vector Laboratories, Thermo: Thermo Fischer Scientific

Antikor Adı	Seyreltme Oranı	Katalog No
<i>anti-BiP (C50B12) rabbit mAb</i>	1:5 000	CST-3177
<i>anti-PDI (C81H6) rabbit mAb</i>	1:5000	CST-3501
<i>anti-TrkB rabbit pAb</i>	1:2 000	NB100-92063
<i>anti-TrkC (C44H5) rabbit mAb</i>	1:20 000	CST-3376
<i>anti-Parkin rabbit pAb</i>	1:10000	Ab-15954
<i>anti-GABA(B)R1 rabbit mAb</i>	1:10 000	CST-3835
<i>anti-β-III tubulin rabbit mAb</i>	1:1000	Ab-52901
<i>anti-Iba1 rabbit pAb</i>	1:1000	Wako 019-19741
<i>anti-GFAP rabbit pAb</i>	1:1000	Dako IS524
<i>Donkey anti-rabbit IgG</i>	1:5000	Jackson 711-036-152
<i>Biotinylated anti-rabbit IgG</i>	1:500	BA-1000 (VL)
<i>anti- rabbit IgG Alexa Fluor® 594</i>	1:1000	Thermo A-11008

3.22 Omurilik Kontüzyon Hasarı

On haftalık dişi C57Bl/6 farelere David ve diğ.(2013)'nin belirttiği şekilde kontüzyon hasarı uygulanmıştır. Fareler ameliyattan önce ortama alışmalarını sağlamak amacıyla bir hafta deney hayvanları biriminde muhafaza edilmiştir. Farelere Ketamine (80 mg/kg; Vedco, St. Joseph, MO, ABD) ve Xylazine (10 mg/kg; Akorn Inc, Decatur, IL, ABD) intraperitoneal verilerek anestezi yapılmıştır. Anestezinin ardından farelerin sırt kısmındaki tüyler omurga boyunca tıraş edilmiştir. Aseptik koşullarda T7-T9 omurları seviyesinde kesik oluşturulmuştur. T8 seviyesinde laminektomi yapılmış ve Infinite Horizon Impactor Device (Precision Systems and Instrumentation, Lexington, KY, ABD) ile 70 kdyn kuvvet uygulanarak ağır kontüzyon hasarı oluşturulmuştur. Hasarın ardından kesik dikişlerle ve yara zımbalarıyla birleştirilmiştir. Omurilik hasarı oluşturulan bütün farelerde eşit uzunlukta kesik oluşturulmuş ve eşit sayıda dikiş ve zımba kullanılmıştır. Kontrol grubundaki farelerde ise kesik oluşturulmamış ancak aynı şekilde anestezi uygulanmış, sırt kısmı eşit şekilde tıraş edilmiş ve eşit sayıda zımbalar kullanılmıştır. Ameliyatın hemen ardından bütün fareler kafeslere alınmış ve ısı pedi kullanılarak ortam sıcaklığı 29°C'ye sabitlenmiştir. Ameliyat sonrası bakım için farelere 1 ml "Lactated Ringers Solution (Baxter, Deerfield, IL, ABD), 0,02 ml Baytril (Bayer, Kansas City, Kansas, ABD) ve 0,05 ml Buprenorphine (Hospira, Lake Forest, IL, ABD)" enjekte

edilmiştir. Ameliyatın hemen ardından antibiyotik, ağrı kesici ve serum belirtilen miktarlarda enjekte edilmiş ve yedi gün boyunca günde iki defa uygulamaya devam edilmiştir. Ameliyatın ardından dehidrasyonu önlemek amacıyla fareler Hydrogel (ClearH2O, Portland, ME, ABD) ile beslenmiştir. Deney süresi boyunca günde iki defa farelerin idrar torbasına elle baskı uygulanarak idrarları boşaltılmıştır.

Ameliyattan 24 sa sonra “open-field locomotor function” testi Basso mouse scale (BMS) ile değerlendirilmiştir (Basso ve diğ. 2006). BMS değeri ≤ 2 olan fareler deneylere dahil edilmiştir.

3.23 Farelere CpG ODN 2088 Uygulaması

CpG ODN 2088 (1mg/ml) endotoksin içermeyen suda çözünerek hazırlanmış ve küçük hacimlerde bölünerek -20°C 'de saklanmıştır. Fareler rastgele gruplara ayrılmış ve %3 oksijen içeren ortamda izofloren (1,0 l/dk) verilerek anestezi uygulanmıştır. Hamilton şırıngasına bağlı 27-gauge iğnesi L5 ve L6 arasındaki interlaminar boşluğa batırılmıştır. Omurilik hasarından kaçınmak için intratekal boşluğa enjeksiyon caudal'den conus medullarisine doğru yapılmıştır. Omurilik hasarlı farelere 3 μl CpG ODN 2088 (1mg/ml) veya *vehicle* (endotoksin içermeyen su) enjekte edilmiştir. Omurilik hasarı yaratılmamış kontrol farelerine de *vehicle* enjekte edilmiştir. Enjeksiyon altı gün boyunca 48 saatte bir tekrar edilmiştir.

3.24 Dokudan Protein Özütleme

Ameliyattan altı gün sonra farelerden hasarın uygulandığı dokular izole edilmiştir. Farelere %50 CO_2 ile öztenazi uygulandıktan sonra omurga dikkatlice açılmış ve hasarın uygulandığı doku (T8) çıkarılmıştır. Dokular kuru buzda hızlıca dondurulmuş ve -80°C 'de muhafaza edilmiştir. 20-30 mg doku 300 μl lizis tamponu içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra örnekler üç kez hızlı dondurma ve çözme işlemi uygulanmıştır. Ardından tüpler 5x15sn vorteks ile karıştırılmıştır. Örneklerin ısınmasını önlemek amacıyla her vorteks işleminin ardından örnekler 30 sn buzda bekletilmiştir. Vorteks işlemi tamamlandıktan sonra örnekler ultrasonik su banyosunda düşük frekansta 30 sn inkübe edilmiştir. Örnekler buzda 30 dk bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım yeni bir tüpe alınıp bicinchoninic acid (BCA) yöntemi ile protein miktar tayini yapılmıştır. Protein konsantrasyonları belirlendikten sonra örnekler küçük hacimlere bölünerek -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.25 BCA Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Dokulardan elde edilen proteinlerin konsantrasyonları BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific) kullanılarak belirlenmiştir. BCA yöntemi alkali ortamda proteinin Cu^{+2} katyonlarının Cu^{+1} katyonlarına indirgenmesine dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. BCA çözeltisinde iki molekülün bakır katyonları (Cu^{+1}) ile şelatlanması çözeltide renk değişimine neden olur ve oluşan kompleksin 652 nm dalga boyunda ölçülen absorbansı protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Kit BCA Reagent A (sodyum karbonat/sodyum bikarbonat/BCA/sodyum tartarat/sodyum hidroksit), BCA Reagent B (%4 kuprik asit) ve BSA (2mg/ml) standardından oluşmaktadır. Çalışmada protein konsantrasyonları belirlenirken izlenen protokol şu şekildedir:

2mg/ml BSA çözeltisi lizis tamponu ile seyreltilerek 0,025-2 mg/ml aralığında farklı konsantrasyonlarda BSA standartları hazırlanmıştır. Hazırlanan BSA standartlarından ve örneklerden 25 µl/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plaklara üçer kopya halinde eklenmiştir. Reagent A ve Reagent B 50:1 oranında karıştırılarak her bir kuyuya karışımdan 200 µl eklenmiş ve 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Oluşan rengin yoğunluğu ELISA okuyucusunda 652 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Microsoft Excel programını kullanarak standart eğri oluşturulmuş ve örneklerdeki protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.26 İstatiksel Analizler ve Grafik Çizimleri

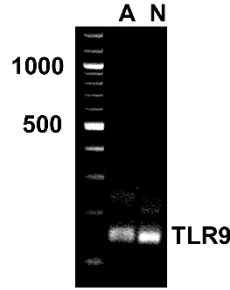
İstatiksel analizler SPSS 19.1 programı kullanılarak yapılmıştır. Western blot ve nöronal canlılık analizleri için Student's t-test veya tek yönlü ANOVA uygulanmıştır. ELISA sonuçları ise Student's t-test veya iki yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir. Proliferasyon analizi için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır.

Bütün grafikler GraphPad Prism 6 programında çizilmiştir ve çizimler Adobe Photoshop CC programında düzenlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Omurilik Nöronları ve Astrositlerinde TLR9 Ekspresyonu

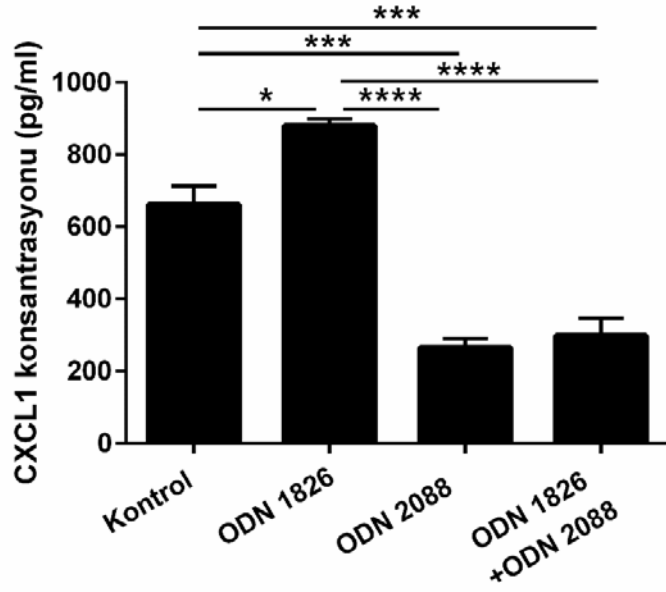
Omurilik nöronlarında *in vivo* TLR9 ekspresyonu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (David ve diğ. 2013). Bu çalışmada öncelikle *in vitro* TLR9 ekspresyonunu göstermek amacıyla on günlük omurilik nöron kültürleri ve astrosit (p:2) kültürlerinden mRNA izolasyonu yapılmıştır. cDNA sentezinin ardından qRT-PCR analizi yapılmıştır. qRT-PCR ürünü %2 poliakrilamid jelde yürütülmüş ve jel UV transilüminatöründe görüntülenmiştir. Hem omurilik nöron kültürlerinde hem de astrosit kültürlerinde TLR9 mRNA ekspresyonu belirlenmiştir (Şekil 4.1)



Çizim 4.1. Omurilik astrosit (A) ve nöron (N) kültürlerinde TLR9 transkripsiyonu

4.2 CpG ODN 2088, TLR9 Agonisti CpG ODN 1826'nın Uyarıcı Etkisini Baskılar

Bu çalışmada TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in omurilik nöronları, astrositleri ve astrosit-nöron etkileşimi üzerine etkileri araştırılmıştır. CpG ODN 2088 murin TLR9' unu hedef alan özgün bir antagonistidir ve CpG ODN 2088 ile yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. CpG ODN 2088'in özgünlüğü murin bağışıklık hücrelerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Lenert 2010). Bu tez çalışmasında, CpG ODN 2088'in özgünlüğünü doğrulamak amacıyla iki deneysel yaklaşım kullanılmıştır. Öncelikle CpG ODN 2088'in, astrositlerde TLR9 agonisti CpG ODN 1826 ile indüklenen CXCL1 salgısını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca CpG ODN 2088'in astrositlerde bazal CXCL1 salgısını da azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bunun yanı sıra, astrosit veya nöron kültürleriyle yapılan deneyler TLR9^{-/-} astrosit veya nöron kültürlerinde tekrar edilmiş ve CpG ODN 2088'in TLR9^{+/+} kültürlerindeki etkisi TLR9^{-/-} kültürlerde gözlenmemiştir.



Çizim 4.2. TLR9 agonisti CpG ODN 1826'nın ve TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in omurilik astrositlerinde CXCL1 salgısı üzerine etkisi. Astrosit kültürleri *vehicle* (**Kontrol**), 1 μ M CpG ODN 1826 (**ODN 1826**), 1 μ M CpG ODN 2088 (**ODN 2088**) veya CpG ODN 1826+CpG ODN 2088 (**ODN 1826+ODN 2088**) ile 24 sa muamele edilmiş ve CM'deki CXCL1 konsantrasyonu ELISA ile ölçülmüştür. İki bağımsız deney yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Grafikler örnek bir deneyden elde edilen verileri göstermektedir. Hata barları ortalama \pm SEM'i belirtmektedir. İstatiksel analizler tek yönlü değişken analizinin (ANOVA) ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yapılmıştır. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.3 Etiketsiz Karşılaştırmalı Proteom Analizi ve IPA Yolak Analizi

Omurilik nöron kültürlerinde TLR9 ekspresyonu gösterildikten sonra TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in nöronlar üzerindeki etkisini araştırmak etiketsiz karşılaştırmalı proteom analizi yapılmıştır. Omurilik nöronları 1 μ M CpG ODN 2088 veya *vehicle* ile 24 saat inkübe edilmiş ve proteom profilleri karşılaştırılmıştır. nLC-MS/MS sonucundan 4333 protein en az bir özgün peptid ile tanımlanmıştır. Bu proteinlerin arasından 2977 proteinin miktarı ölçülmüştür ve 201 proteinin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik ($\%50 \leq$) olduğu belirlenmiştir. CpG ODN 2088 uygulamasına bağlı olarak ekspresyonu en az iki kat değişen 71 protein tanımlanmış ve bu proteinler biyolojik işlevlerine göre gruplandırılmıştır (Çizelge 4.1). Belirlenen bu proteinlerin birbirleriyle ve diğer sinyal yollarıyla ilişkisinin belirlenmesi ve böylece karmaşık omik verilerinden hedef proteinlerin belirlenmesini kolaylaştırmak amacıyla IPA (Fall Release 2014; Qiagen) analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda yedi protein ağı haritalanmıştır ve en yüksek puanı alan iki ağ haritası ve çizim 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. CpG ODN 2088 ile muamele edilen omurilik nöronlarında ekspresyon seviyesi 2-kat≤ değişen proteinler. ↓: Artış ↑: Azalış ***Diğer:** Transkripsiyon faktörleri, eksositoz, nuklear taşıma

<i>Uniprot No</i>	<i>Protein Adı</i>	<i>Değişim Oranı</i>	<i>Regülasyon</i>	<i>p değeri</i>
Nöronal Gelişim				
<i>P35803</i>	Neuronal membrane glycoprotein M6-b	2,10	↑	1,6x10 ⁻²
<i>Q6ZPU9</i>	KIF1-binding protein	2,05	↑	1,6x10 ⁻³
<i>Q99MR0</i>	Actin-like protein 6B	2,10	↑	1,5x10 ⁻⁶
<i>Q80ZD8</i>	Amphoterin-induced protein 1	10,5	↑	1x10 ⁻⁶
<i>A1A535</i>	Ventricular zone-expressed PH domain-containing protein 1	2,15	↑	4,6x10 ⁻²
Sinaptik İletim				
<i>O35409</i>	Glutamate carboxypeptidase 2	3,87	↓	1,2x10 ⁻²
<i>P70232</i>	Neural cell adhesion molecule L1-like protein	7,57	↓	1,6x10 ⁻⁴
<i>Q9WV18</i>	Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1	2,10	↑	2,6x10 ⁻²
<i>Q2TV84</i>	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 1	2,34	↑	1x10 ⁻⁷
<i>O35887</i>	Calumenin	2,21	↓	3,2x10 ⁻³
Hücre Yapısı ve Organizasyonu				
<i>Q8R5H6</i>	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1	2,08	↓	1,1x10 ⁻⁵
<i>P70208</i>	Plexin-A3	2,26	↓	1,9x10 ⁻⁵
<i>Q0II04</i>	Nebulette	6,65	↓	6,1x10 ⁻⁴
<i>Q6AW69</i>	Isoform 4 of Cingulin-like protein 1	2,94	↑	1x10 ⁻⁵
<i>Q8R2U0</i>	Nucleoporin SEH1	2,88	↓	4,6x10 ⁻³
<i>Q07797</i>	Galectin-3-binding protein	4,70	↓	1,5x10 ⁻⁴
Mitokondriyal İşlev/ Oksidatif Stres				
<i>Q99LX0</i>	Protein DJ-1	2,09	↓	2,7x10 ⁻³
<i>Q9JLV5</i>	Cullin-3	2,00	↓	9,2x10 ⁻³
<i>Q9CQC7</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	4,41	↓	1,3x10 ⁻³
<i>P48774</i>	Glutathione S-transferase Mu 5	11,4	↓	8,4x10 ⁻⁵
<i>Q4KMM3</i>	Isoform 3 of Oxidation resistance protein 1	2,34	↑	6,8x10 ⁻⁵
<i>Q9CR68</i>	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	2,30	↑	4,6x10 ⁻⁷
<i>Q8R164</i>	Valacyclovir hydrolase	2,53	↓	2,3x10 ⁻³
<i>Q8CIW5</i>	Twinkle protein, mitochondrial	5,30	↑	7,7x10 ⁻⁵
Ca⁺² Homeostazı				
<i>Q9R0N5</i>	Synaptotagmin-5	4,30	↓	4,6x10 ⁻⁷
<i>Q9R0K7</i>	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	5,04	↓	8,5x10 ⁻⁵
<i>Q9WUX5</i>	Protein MRVII	2,91	↓	3,5x10 ⁻²

Sinyal İletimi

<i>P97950</i>	Ras-related protein Rab-33A	2,17	↓	4,2x10 ⁻⁶
<i>Q8BWR8</i>	Rhopilin-2	3,89	↓	2,1x10 ⁻⁷
<i>P62881-2</i>	Isoform 2 of Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5	15,7	↓	1,8x10 ⁻²
<i>O70161</i>	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma	3,18	↑	7,1x10 ⁻³
<i>Q6PAJ1</i>	Breakpoint cluster region protein	2,14	↑	1x10 ⁻⁵
<i>O70291</i>	G protein-coupled receptor kinase 4	4,27	↑	3,6x10 ⁻⁴
<i>Q9EP69</i>	Phosphatidylinositide phosphatase SAC1	5,40	↑	1,2x10 ⁻⁴
<i>Q8CFW1</i>	Anoctamin-2	2,05	↓	3,4x10 ⁻³

Hücre Döngüsü/Apoptoz

<i>Q9EQU5</i>	Protein SET	3,34	↑	3x10 ⁻⁶
<i>P61982</i>	14-3-3 protein gamma	2,27	↑	2x10 ⁻³
<i>Q91YM4</i>	Protein TBRG4	3,95	↑	3,6x10 ⁻⁴
<i>Q9D6U8</i>	Protein FAM162A	5,06	↓	1,6x10 ⁻³
<i>Q3TXU5</i>	Deoxyhypusine synthase	3,12	↑	1x10 ⁻³
<i>P05480</i>	Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	2,31	↓	1x10 ⁻³

Protein Sentezi ve Katlanması

<i>Q9D7N3</i>	28S ribosomal protein S9, mitochondrial	3,01	↑	9x10 ⁻⁸
<i>Q9QYI3</i>	DnaJ homolog subfamily C member 7	2,05	↑	2,9x10 ⁻³
<i>P14576</i>	Signal recognition particle 54 kDa protein	4,55	↓	1,4x10 ⁻²
<i>Q9CQE7</i>	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3	2,14	↑	1x10 ⁻²
<i>Q149F3</i>	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B	2,47	↑	1x10 ⁻⁵
<i>Q9CQ79</i>	Thioredoxin domain-containing protein 9	4,81	↓	6,7x10 ⁻³

Protein Degradasyonu

<i>O35730</i>	E3 ubiquitin-protein ligase RING1	2,02	↑	1,3x10 ⁻⁵
<i>P62984</i>	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	2,57	↑	1,3x10 ⁻⁷
<i>Q9WVS6</i>	Isoform 3 of E3 ubiquitin-protein ligase parkin	8,48	↑	1x10 ⁻⁵

Kromozomal Organizasyon

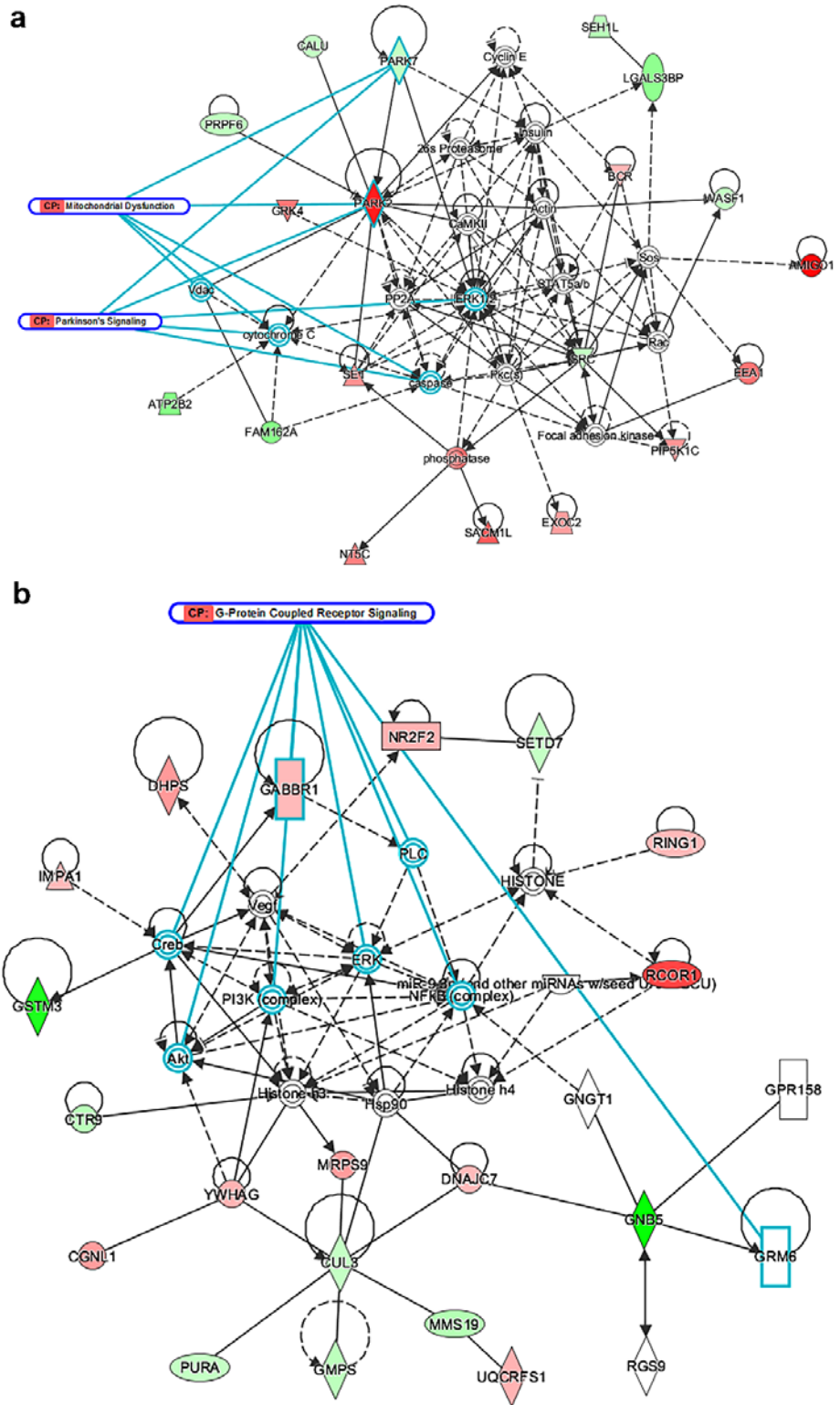
<i>P43276</i>	Histone H1,5	2,57	↓	4,8x10 ⁻²
<i>Q8VHL1</i>	Histone-lysine N-methyltransferase SETD7	2,01	↓	6,5x10 ⁻⁴
<i>Q62018</i>	RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog	2,78	↓	2x10 ⁻⁴

Nükleik Asit Metabolizması

<i>Q3THK7</i>	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	2,71	↓	4,6x10 ⁻³
<i>P42669</i>	Transcriptional activator protein Pur-alpha	2,20	↓	1,9x10 ⁻²
<i>Q9D071</i>	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	3,03	↓	2,1x10 ⁻³
<i>O35114</i>	Lysosome membrane protein 2	3,72	↓	4,3x10 ⁻²

<i>Q9JM14</i>	5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytosolic type	3,92	↑	$6,3 \times 10^{-3}$
<i>Q91YR7</i>	Pre-mRNA-processing factor 6	2,56	↓	$7,7 \times 10^{-3}$
<i>O55055</i>	tRNA (cytosine(38)-C(5))-methyltransferase	2,09	↓	$2,9 \times 10^{-2}$
<i>Diger</i>				
<i>O55023</i>	Inositol monophosphatase 1	2,10	↑	$8,2 \times 10^{-3}$
<i>Q8BT60</i>	Copine-3	2,30	↑	$3,8 \times 10^{-4}$
<i>Q9CQH7</i>	Transcription factor BTF3 homolog 4	2,16	↑	$3,3 \times 10^{-5}$
<i>P43135</i>	COUP transcription factor 2	2,30	↑	$1,3 \times 10^{-3}$
<i>Q9JHQ5</i>	Leucine zipper transcription factor-like protein 1	7,78	↓	$1,4 \times 10^{-2}$
<i>Q9D4H1</i>	Exocyst complex component 2	2,97	↑	$4,2 \times 10^{-3}$
<i>Q9CRT8</i>	Exportin-T	4,24	↑	$1,9 \times 10^{-5}$



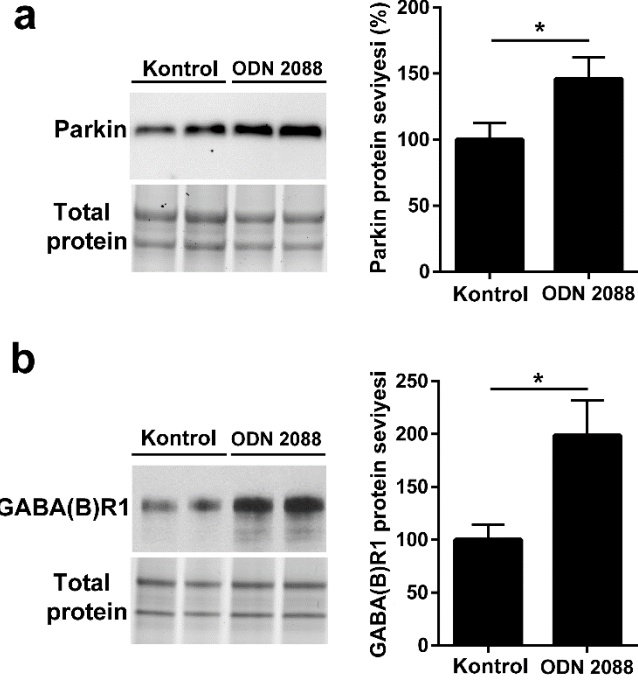


Çizim 4.3. CpG ODN 2088 ile muamele edilen omurilik nöronlarında ekspresyon seviyesi 2-kat \leq değişen proteinlerin yolak analizi sonucunda belirlenen protein ağı haritaları. Yeşil renk protein seviyesindeki azalmayı kırmızı renk ise artışı belirtir. Oklar proteinler arasında direkt ilişki olduğunu gösterir, kesikli oklar ise proteinler arasındaki indirekt ilişkiyi belirtir.

4.4 CpG ODN 2088 Omurilik Nöronlarında *in vitro* Parkin ve GABA(B)R1 Ekspresyonunu Azaltır

CpG ODN 2088 uygulamasına bağlı olarak omurilik nöronlarında ekspresyonu en az iki kat değişen proteinler arasında dikkat çeken proteinlerden biri ekspresyonu 8-kat değişen *E3 ubiquitin-protein ligase parkin* (Parkin) proteinidir. Bununla beraber yolak analizi de bu proteinlerle ilişkili olabilecek en olası sinyal yollarının başında Parkinson Hastalığı sinyal iletimi olduğuna işaret etmiştir. Parkin proteinin nöronal hayatta kalımı destekleyici etkisi uzun yıllardır bilinmektedir (Staropoli ve diğ. 2003, C. Wang ve diğ. 2005). Bunun yanı sıra Parkin'in ER-stres cevabının düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir (Bouman ve diğ. 2011). Bu bakımdan, nöronlarda CpG ODN 2088'in Parkin proteinin ekspresyonu üzerine etkisi western blot analizi ile de gösterilmiştir. Western blot analizi sonucunda CpG ODN 2088 ile muamele edilen nöronlarda Parkin protein seviyesinde kontrole kıyasla $46,1 \pm 16,5$ ($p < 0.05$) oranında artış belirlenmiştir.

Western blot analizi ile ekspresyon değişimi doğrulanan bir diğer protein *Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1* (GABA(B)R1)'dir. Merkezi sinir sisteminde temel inhibitör nörotransmitter olan GABA'nın reseptörüdür. GABA(B)R1 merkezi sinir sisteminde hemen hemen bütün nöronal ve glial hücrelerde sentezlenir ve nöropatik ağrı da dahil olmak üzere nörolojik durumlarda yer aldığı gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmada CpG ODN 2088'in nöropatik ağrı üzerine olumlu etkisi göz önünde bulundurulduğunda CpG ODN 2088'in GABA(B)R1 ekspresyonu üzerine etkisini doğrulamak için western blot analizi yapılmıştır. CpG ODN 2088 uygulanan nöronlarda GABA(B)R1 protein seviyesinin yaklaşık iki kat arttığı western blot yöntemi sonucunda gösterilmiştir. Bu sonuçlar, TLR9'un CpG ODN 2088 ile baskılanmasının omurilik nöronlarının bazal fizyolojik işlevlerini değiştirebildiğini düşündürmektedir.



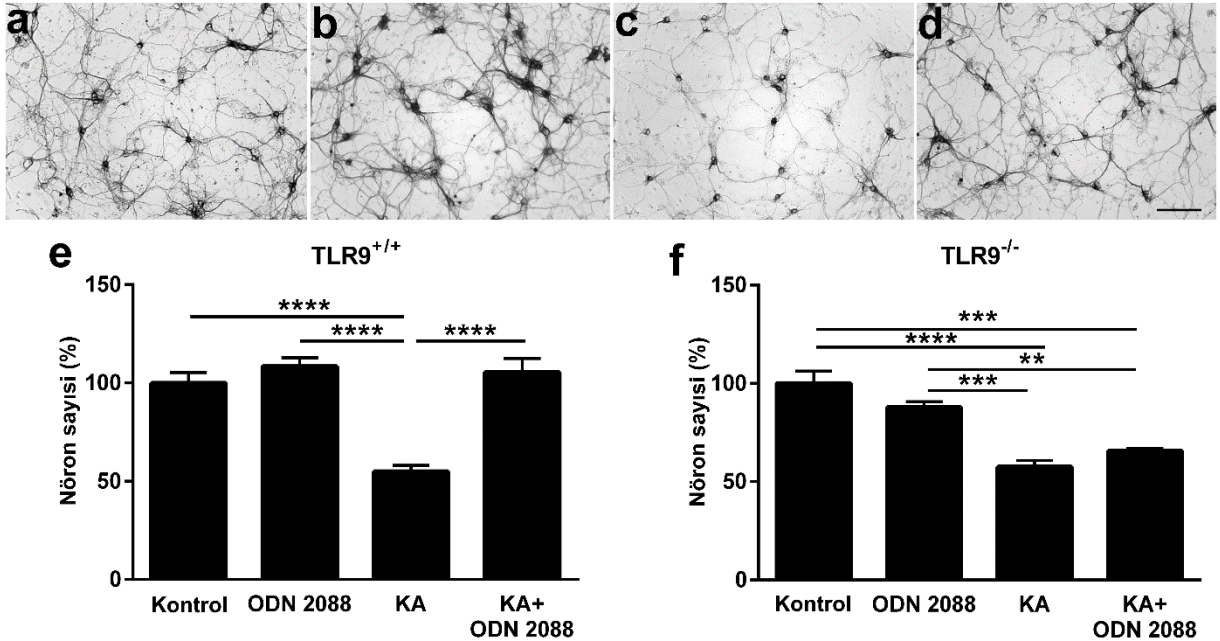
Çizim 4.4. CpG ODN 2088 muamelesinin nöronal GABA(B)R1 ve Parkin protein ekspresyonları üzerine etkisi. *Vehicle* (**kontrol**) veya CpG ODN 2088 (**OND 2088**) ile muamele edilmiş omurilik nöron kültürlerinde (**a**) Parkin (~51 kDa) ekspresyonunu gösteren örnek western blot analizi (sol panel) ve western blot analizlerinden elde edilen verilerin grafiksel gösterimi (Sağ panel). (**b**) GABA(B)R1(~130 kDa) ekspresyonunu gösteren örnek western blot analizi ve western blot analizinden elde edilen verilerin grafiksel gösterimi (sol panel). Total protein miktarları deneysel varyasyonların normalizasyonu için kullanılmıştır. İki bağımsız deneyden elde edilen veriler birleştirilmiştir. Hata barları ortalama \pm SEM değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizler Student's t-test'ine göre yapılmıştır. * $p < 0,05$; $n=7$.

4.5 TLR9 Antagonizmi Omurilik Nöronlarını Eksitotoksik Ölümden Kurtarır

Eksitotoksisite oluşturmak amacıyla omurilik nöron kültürleri 20 μ M kainik asit (KA) ile muamele edilmiş ve 24 sa % 5 CO₂, % 95 hava içeren ortamda, 37°C'de inkübe edilmiştir. Kainik asit (2-karboksi-4-izopropenil-prolidin-3-ylasedik asit) bir glutamat analogudur ve glutamattan 30 kat daha fazla bir nörotoksik potansiyele sahiptir. (Q. Wang ve diğ. 2005) KA, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izooksazolpropionik asit (AMPA)/KA reseptörlerine bağlanarak hücre içi Ca⁺² seviyesinin artışı, ROS üretimi gibi sonuçta nöronal ölüme yol açacak birçok biyokimyasal olayı tetikler. Daha önce yapılan bir çalışmada 20 μ M KA'nın omurilik nöron kültürlerinde orta derecede ölüme sebep olduğu (Kurnellas ve diğ. 2010) gösterildiğinden çalışmamızda bu deneysel yaklaşım kullanılmıştır. Omurilik nöron kültürleri *vehicle*, 1 μ M CpG ODN 2088, 20 μ M KA veya 1 μ M CpG ODN 2088+20 μ M KA ile 24 sa inkübe edildikten sonra hücreler fikse edilmiş

ve β -III tubulin antikoru ile işaretlemiştir. Nöronal canlılık β -III tubulin pozitif hücreler sayılarak belirlenmiştir. Kontrol grubundaki β -III tubulin pozitif hücre sayısı %100 olarak kabul edilmiştir. 24 sa sonunda KA ile muamele edilen kültürlerde canlılığın $45,1 \pm 3,1$ oranında azaldığı gözlenmiştir. Buna karşın, KA ve CpG ODN 2088 ile birlikte muamele edilen kültürlerde nöronal canlılık üzerinde bu zararlı etki gözlenmemiştir. Ayrıca, omurilik nöronlarının CpG ODN 2088 ile muamele edilmesi nöronal canlılığı etkilememiştir (Şekil 4.5.a-e).

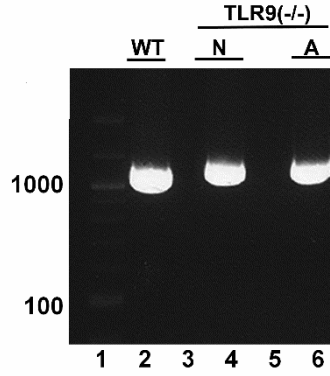
CpG ODN 2088'in omurilik nöronlarında eksitotoksisteden koruyucu etkisinin TLR9 aracılı olup olmadığını test etmek amacıyla aynı deneyler TLR9^{-/-} omurilik nöron kültürleriyle de yapılmıştır. Benzer şekilde, TLR9^{-/-} omurilik nöron kültürlerinde de KA'nın canlı nöron sayısını anlamlı bir şekilde azalttığı ($43 \pm 3,2$) belirlenmiştir. Ancak yabancı tipten farklı olarak, KA ve CpG ODN 2088'in birlikte muamele edilmesi omurilik nöronlarını eksitotoksik hasarın yol açtığı ölümden kurtaramamıştır (Şekil 4.5.f). Bu bulgular, CpG ODN 2088'in omurilik nöronlarını KA'nın yol açtığı ölümden direkt etkileşimle koruduğunu ve bu etkinin sağlanması için TLR9 ekspresyonunun gerekli olduğunu göstermektedir.



Çizim 4.5. CpG ODN 2088'in KA'nın yol açtığı nöronal ölüm üzerine etkisi. (a) *Vehicle* ile muamele edilen nöronlar (b) 1 μ M CpG ODN 2088 ile muamele edilen nöronlar (c) 20 μ M KA ile muamele edilen nöronlar (d) 20 μ M KA + 1 μ M CpG ODN 2088 ile muamele edilen nöronlar. (e) 24 sa boyunca *vehicle* (**Kontrol**), CpG ODN 2088 (**ODN 2088**), kainik asit (**KA**) veya KA+CpG ODN 2088 (**KA+ODN 2088**) inkübe edilmiş TLR9^{+/+} nöron kültürlerindeki β -III tubulin pozitif nöron sayısı. Kontrol grubundaki nöron sayısı

%100 olarak kabul edilmiş ve diğer gruplar kontrole göre oranlanmıştır. (f) Yukarıda belirtildiği gibi CpG ODN 2088 ve/veya KA ile muamele edilmiş TLR9^{-/-} nöron kültürlerindeki β-III tubulin pozitif nöron sayısı. İki bağımsız deneylerden elde edilen veriler birleştirilmiştir. Hata barları ortalama ±SEM’i belirtmektedir. İstatiksel analizler tek yönlü ANOVA’nın ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yapılmıştır. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; n=10. Ölçek çizgisi 350 μm’yi ifade eder.

Çalışmada TLR9^{-/-} fareler, TLR9^{-/-} farelerin çaprazlanmasıyla üretilmiştir. Ancak çalışmada kullanılan nöron ve astrosit kültürlerinin genotipleri PCR analizi ile doğrulanmıştır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV-transtimulatöründe görüntülenmiştir (Çizim 4.6)



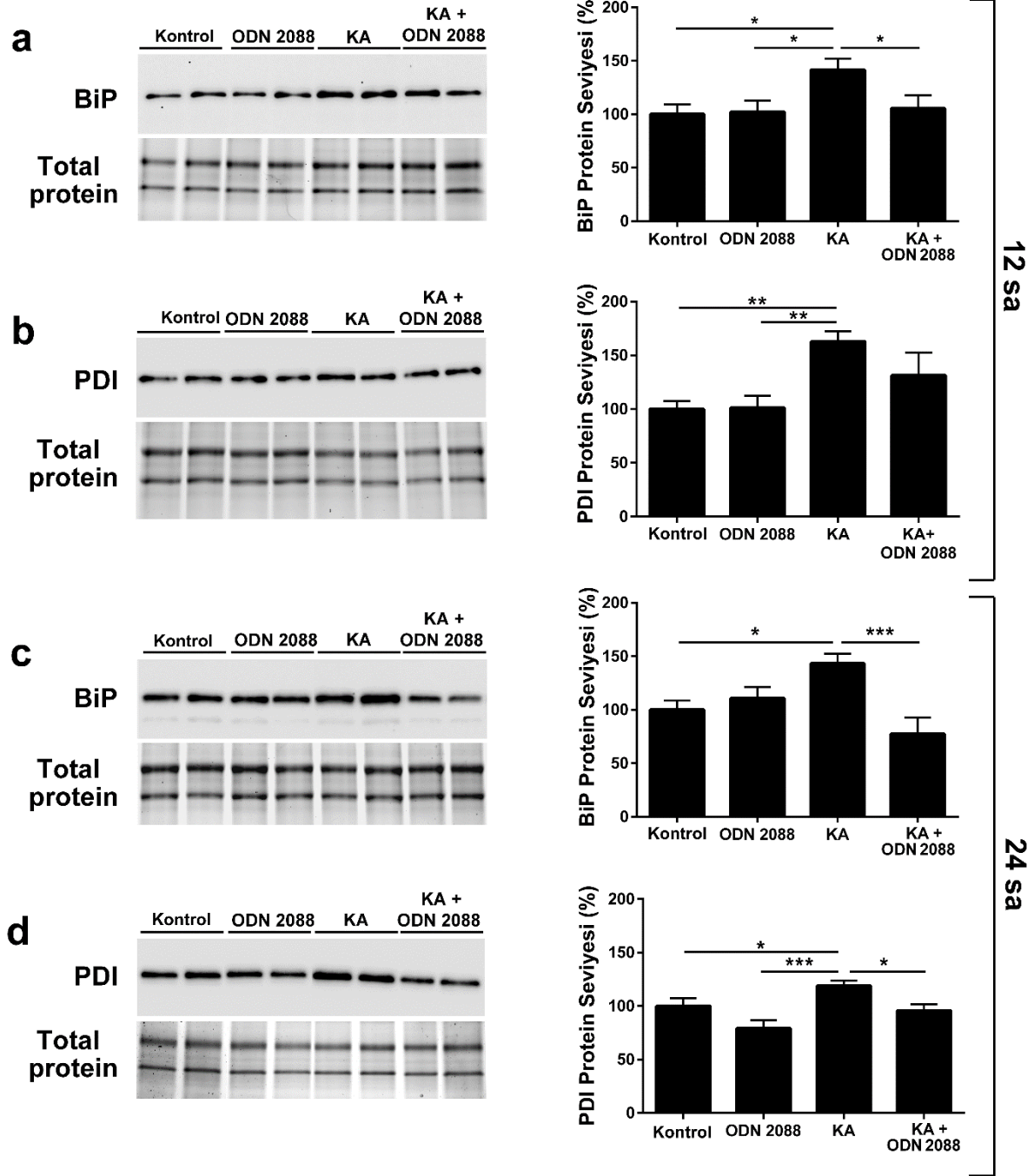
Çizim 4.6. TLR9^{+/+} veya TLR9^{-/-} astrosit ve nöron kültürlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel görüntüsü. TLR9^{-/-} astrosit (A) ve nöron (N) kültürlerinden DNA izolasyonu yapılmış ve WT TLR9 veya mutant TLR9 allelerine özgü primerler kullanılarak hedef gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. TLR9^{+/+} nöron kültürleri (WT) kontrol olarak kullanılmıştır. TLR9^{-/-} nöron veya astrosit DNA’sı ve TLR9^{+/+} alleleine özgü primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda herhangi bir ürün elde edilmemiştir (3-5). TLR9^{-/-} nöron veya astrosit DNA’sı mutant allele özgü primerlerle çoğaltılmıştır (4-6).

4.6 CpG ODN 2088 Omurilik Nöronlarında KA’nın Yol Açtığı Endoplazmik Retikulum Stresini Azaltır

Nöronlarda KA ile indüklenen hücre ölümünün altında yatan mekanizmalardan biri ER stresi ve katlanmamış protein cevabının aktivasyonudur (Q. Wang ve diğ. 2005). Omurilik yaralanmalarının ER stres yolağını tetiklediği daha öce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Ohri ve diğ. 2011, Penas ve diğ. 2007). Bu bilgiler ışığında çalışmada TLR9 antagonizminin omurilik nöronlarını ER stresinden koruyup korumadığı araştırılmıştır. Omurilik nöronları *vehicle*, CpG ODN 2088 (1 μM), KA (20 μM) veya KA + CpG ODN 2088 ile muamele edilmiş ve 24 sa % 5 CO₂, % 95 hava içeren ortamda, 37°C’de inkübe edilmiştir. 12 ve 24 sa sonunda hücreler lizis edilmiş ve protein özütleri elde edilmiştir. BiP ve PDI protein seviyeleri western blot analizi ile belirlenmiştir. Western blot analizi KA’nın omurilik nöronlarında BiP protein seviyesini 12. saatte ve 24. saatlerde sırasıyla ~

%41 ve ~%43 oranında arttırdığını göstermiştir. KA ve CpG ODN 2088 birlikte uygulandığında 12 ve 24 saat sonunda BiP protein seviyesindeki bu artışı anlamlı olarak azaltmıştır. Benzer şekilde KA omurilik nöronlarında PDI protein seviyesinde 12 ve 24 sa sonra anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Ayrıca 24. saatte CpG ODN 2088'in KA'nın sebep olduğu PDI protein seviyesindeki artış, nöronlar KA ve CpG ODN 2088 ile birlikte muamele edildiğinde gözlenmemiştir. Ancak 12. saatte CpG ODN 2088 KA'nın yol açtığı PDI protein seviyesindeki artışı engelleyememiştir. CpG ODN 2088'in tek başına uygulanması omurilik nöronlarında BiP ve PDI protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki yaratmamıştır (Çizim 4.7).

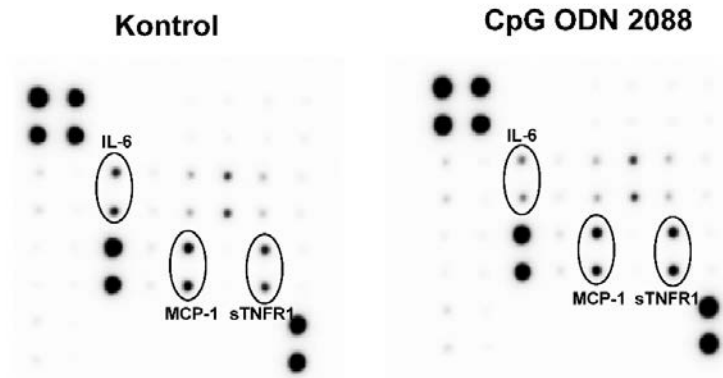




Çizim 4.7. CpG ODN 2088'in ve KA'nın omurilik nöronlarında BiP ve PDI proteinleri üzerine etkisi. (a-b) Nöron kültürleri *vehicle* (**Kontrol**), CpG ODN 2088 (**ODN 2088**), kainik asit (**KA**) veya KA + CpG ODN 2088 (**KA+ODN 2088**) ile muamele edilmiş ve 12 sa sonunda BiP (~78 kDa) ve PDI (~57 kDa) protein seviyeleri western blot analizi ile belirlenmiştir. Sol panelde örnek western blot analizleri ve sağ panelde ise bu analizlerden elde edilen veriler grafiksel olarak gösterilmiştir. Total protein miktarı deneysel varyasyonların normalizasyonu için kullanılmıştır. (c-d) *Vehicle*, CpG ODN 2088, KA veya KA + CpG ODN 2088 ile muamele edilen nöronlarda 24 sa sonunda BiP ve PDI protein seviyeleri. İki bağımsız deneyden elde edilen veriler birleştirilmiştir. Hata barları ortalama \pm SEM'i belirtmektedir. İstatistiksel analizler tek yönlü ANOVA'nın ardından LSD çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yapılmıştır. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n=6-7.

4.7 Astroglial TLR9'un CpG ODN 2088 ile İnhibisyonu Omurilik Astrositlerinden CXCL1, MCP1 ve IL-6 Salgısını Azaltır

Çalışmada, TLR9 antagonizminin omurilik astrositlerinin işlevleri üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu bağlamda, CpG ODN 2088'in astrositlerden sitokin salgısı üzerine etkisi incelenmiştir. Astrositler 1 µM CpG ODN 2088 veya taşıyıcı ile muamele edilmiş ve 24 sa sonunda CM'deki sitokin seviyeleri, aynı anda 22 fare sitokinin taranmasına olanak sağlayan membran bazlı sitokin "array" kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.8). Yarı nicel analiz sonucuna dayanarak astrosit CM'lerindeki IL-6, MCP-1 ve sTNFR1 miktarlarının ELISA yöntemi kullanılarak niceliksel analizleri yapılmıştır. Omurilik astrositleri *vehicle* veya 1 µM CpG ODN 2088 ile muamele edildikten sonra 24. ve 48. saatlerde CM toplanmış ve ELISA analizi ile MCP-1, IL-6 ve sTNFR1 miktarları ölçülmüştür.

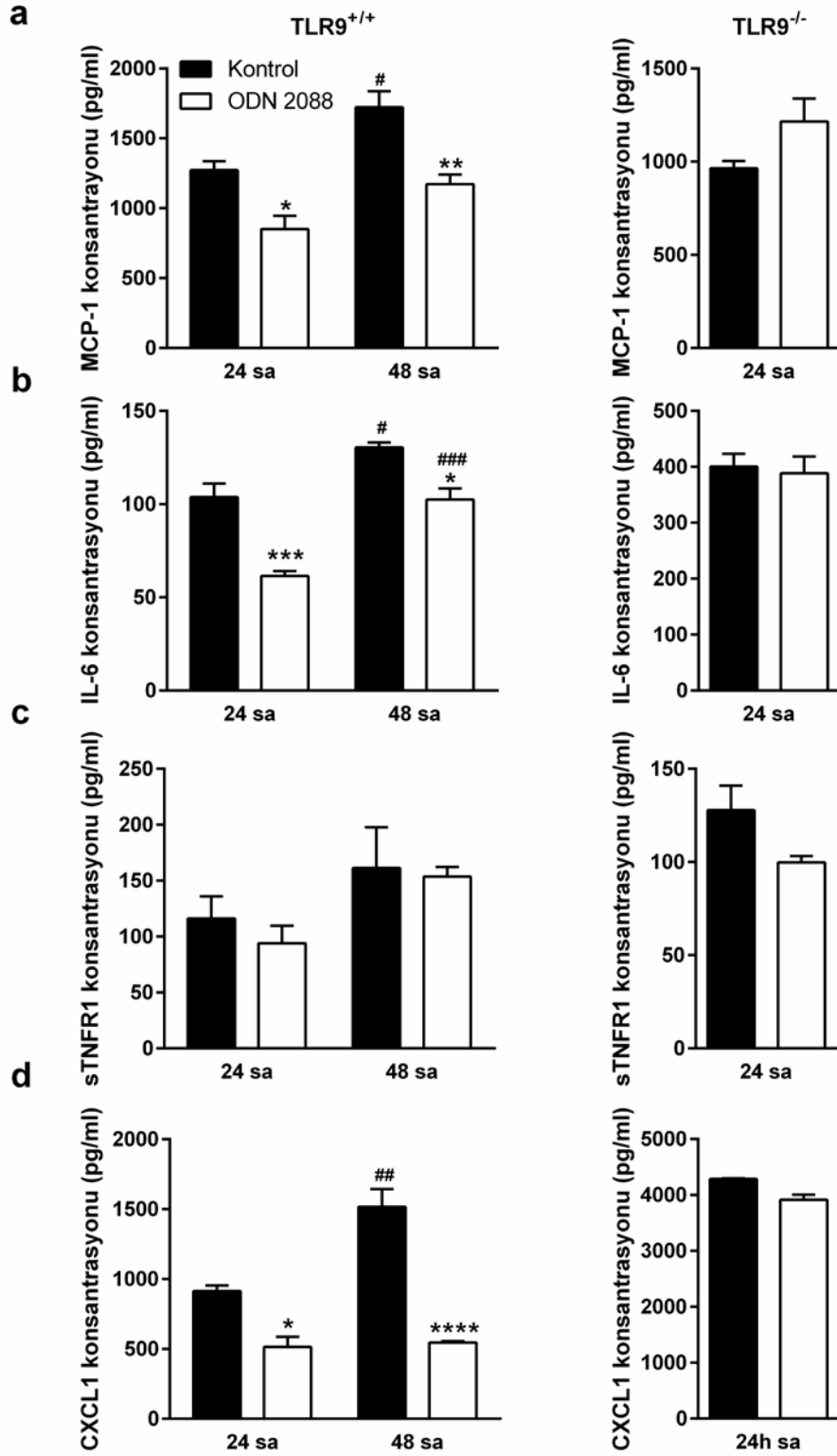


Çizim 4.8. CpG ODN 2088'in astrositlerde sitokin salgısı üzerine etkisi. Astrositler *vehicle* veya CpG ODN 2088 ile 24 sa muamele edilmiş ve CM'deki sitokin miktarları fare sitokin array kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Kontrol gruplarında bazal MCP-1 salgısının zamana bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. CpG ODN 2088 astrosit CM'lerinde MCP-1 miktarını 24 ve 48 saat sonunda sırasıyla ~%33 ve ~%31 oranında azaltmıştır. Ayrıca CpG ODN 2088 MCP-1 salgısının zamana bağlı artışını azaltmıştır (4.9.a). Benzer şekilde, astrositlerden bazal IL-6 salgısı kontrol gruplarında zamanla artış göstermiştir. CpG ODN 2088 uygulanan astrositlerde ise IL-6 salgısının 24. ve 48. saatlerde sırasıyla ~%40 ve ~%25 oranında azaldığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, CpG ODN 2088 her iki zaman diliminde kontrole göre CM'deki IL-6 miktarını azaltmasına rağmen 24. saatten 48. saate IL-6 salgısındaki artışı engelleyememiştir (4.9.b). sTNFR1 salgısında herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (4.9.c).

CXCL1 merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında ve yaralanmalarında bağışıklık cevabında önemli rol oynayan bir sitokindir. Daha önceki bir çalışmada, omurilik astrositlerinde CXCL1 ekspresyonunun nöron hasarından sonra arttığı ve glia-nöron etkileşimini düzenleyerek nöropatik ağrı gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (Z. J. Zhang ve diğ. 2013). Bu sebeple, CpG ODN 2088'in astrositlerden CXCL1 salgısı üzerine etkisi araştırılmıştır. Kontrol grubunda CXCL1 salgısının 48 saat sonunda arttığı belirlenmiştir. CpG ODN 2088 uygulamasının 24 saat sonunda astrositlerden salınan CXCL1 miktarını azaltmış ve 48 saat sonuna kadar herhangi bir artışa sebep olmamıştır (4.9.d).

CpG ODN 2088'in sitokin ve kemokin salgısı üzerine etkisinin TLR9 aracılı olup olmadığını belirlemek amacıyla TLR9^{-/-} omurilik astrositleri 1 µM CpG ODN 2088 veya taşıyıcı ile muamele edilmiş ve 24 saat sonunda CM'deki MCP-1, IL-6, CXCL1 ve sTNFR1 miktarları ölçülmüştür. CpG ODN 2088 TLR9^{-/-} astrositlerinde analiz edilen bu sitokin/kemokinlerin salgısında bir değişikliğe neden olmamıştır.

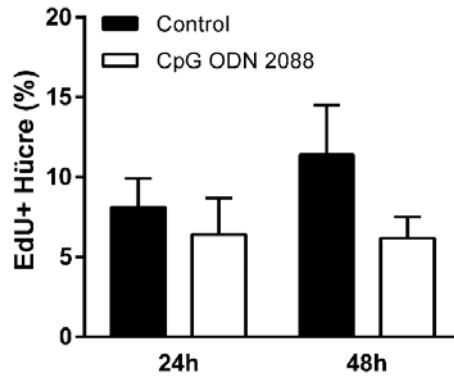


Çizim 4.9. CpG ODN 2088'in astrositlerden kemokin ve sitokin salgısı üzerine etkisi. TLR9^{+/+} (sol panel) veya TLR9^{-/-} (sağ panel) astrosit kültürleri *vehicle* (**Kontrol**) veya 1 μ M CpG ODN 2088 (**ODN 2088**) ile muamele edilmiş ve 24 ve 48 saat sonunda CM'deki (a) MCP-1, (b) IL-6, (c) sTNFR1 ve (d) CXCL1 miktarları ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Grafikler örnek bir deneyden elde edilen verileri göstermektedir. İki

bağımsız deney yapılmıştır ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hata barları ortalama \pm SEM'i belirtmektedir. İstatiksel analizler Student's t-test (TLR9^{-/-}) veya iki yönlü ANOVA'nın ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi (TLR9^{+/+}) uygulanarak yapılmıştır. İki yönlü ANOVA analizine göre CpG ODN 2088 astrositlerden MCP-1 ($F_{1,8}=81,17$; $p<0,0001$), IL-6 ($F_{1,11}=48,9$; $p<0,0001$) ve CXCL1 ($F_{1,11}=80,97$; $p<0,0001$) salgısı üzerine anlamlı bir fark yaratmıştır. Ayrıca kültürde geçirilen zamanın astrositlerden MCP-1 ($F_{1,8}=17,35$; $p<0,01$), IL-6 ($F_{1,11}=44,96$; $p<0,0001$), CXCL1 ($F_{1,8}=17,31$; $p<0,01$) ve sTNF α ($F_{1,8}=5,1$; $p<0,05$) salgısını anlamlı olarak etkilediği belirlenmiştir. MCP1 ($F_{1,8}=14,07$; $p<0,01$) ve CXCL1 ($F_{1,8}=14,04$; $p<0,01$) için CpG ODN 2088 muamelesi ve zaman arasındaki etkileşim istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. *Herbir zaman diliminde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. #Herbir deney grubunda 24. saate göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder. # $p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$.

4.8 TLR9 Antagonizmi Omurilik Astrositlerinin Proliferasyonunu Etkilemez

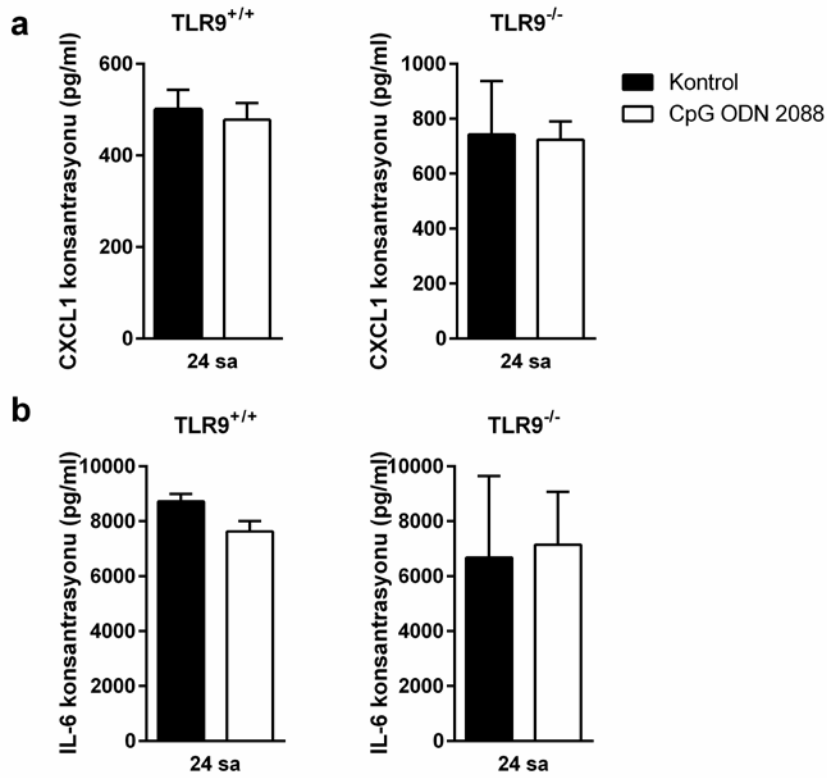
TLR'lerin hücre proliferasyonunu etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle, CpG ODN 2088'in astrosit proliferasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Omurilik astrositleri EdU varlığında 1 μ M CpG ODN 2088 veya *vehicle* ile muamele edilmiş, hücreler 24 ve 48 sonunda fikse edilmiştir. Hücreler fluoresan mikroskop altında sayılarak EdU pozitif hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanmıştır. Kontrol ve deney gruplarında astrosit proliferasyon oranında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgular, CpG ODN 2088 uygulanan omurilik astrosit CM'lerindeki MCP-1, IL-6 ve CXCL1 seviyesindeki azalmanın TLR9'un CpG ODN 2088 ile baskılanmasından kaynaklandığını göstermektedir.



Çizim 4.10. CpG ODN 2088'in astroglial proliferasyon üzerine etkisi. Omurilik astrositleri *vehicle* (**Kontrol**) veya CpG ODN 2088 (**ODN 2088**) ile muamele edilmiş ve EdU içeren besiyerinde 24. ve 48. saat inkübe edilmiştir. Hücre proliferasyonu EdU pozitif hücre sayısının toplam hücre sayısına oranlanmasıyla belirlenmiştir. İki bağımsız deney yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Grafikler örnek bir deneyden elde edilen verileri göstermektedir. Hata barları ortalama \pm SEM'i belirtmektedir. İstatiksel analizler iki yönlü ANOVA'nın ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yapılmıştır. Deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. n=4

4.9 TLR9 Antagonizmi Omurilik Mikrogliasında CXCL1 ve IL-6 Salgısını Etkilemez

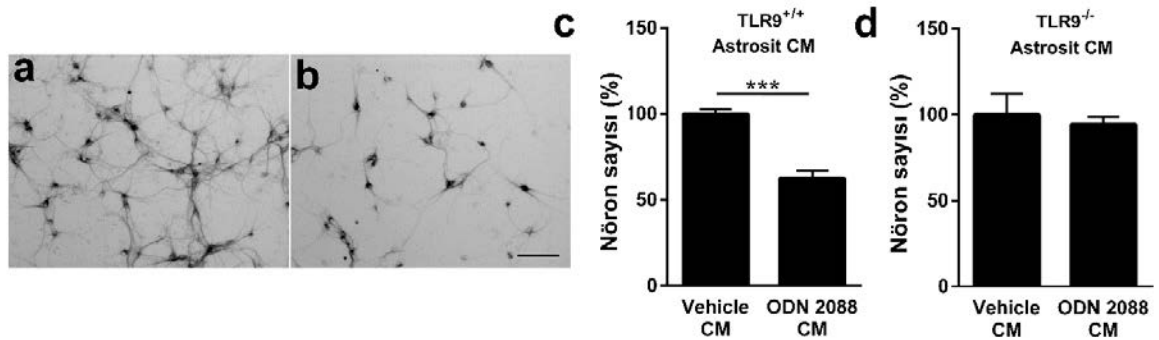
CpG ODN 2088'in sitokin/kemokin salgısı üzerine etkisinin astrositleri özgü olup olmadığını belirlemek amacıyla CpG ODN 2088'in mikroglial CXCL1 ve IL-6 salgısı üzerine etkisi incelenmiştir. Mikroglia kültürleri *vehicle* veya 1 μ M CpG ODN 2088 ile muamele edilmiş ve 24 saat sonunda CM'deki IL-6 ve CXCL1 yoğunluğu ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. CpG ODN 2088'in mikroglialdan salgılan CXCL1 ve IL-6 miktarını etkilemediği belirlenmiştir (Çizim 4.11). Bu bulgular, CpG ODN 2088'nin astroglial CXCL1 ve IL-6 salgısını düzenlediğini göstermektedir.



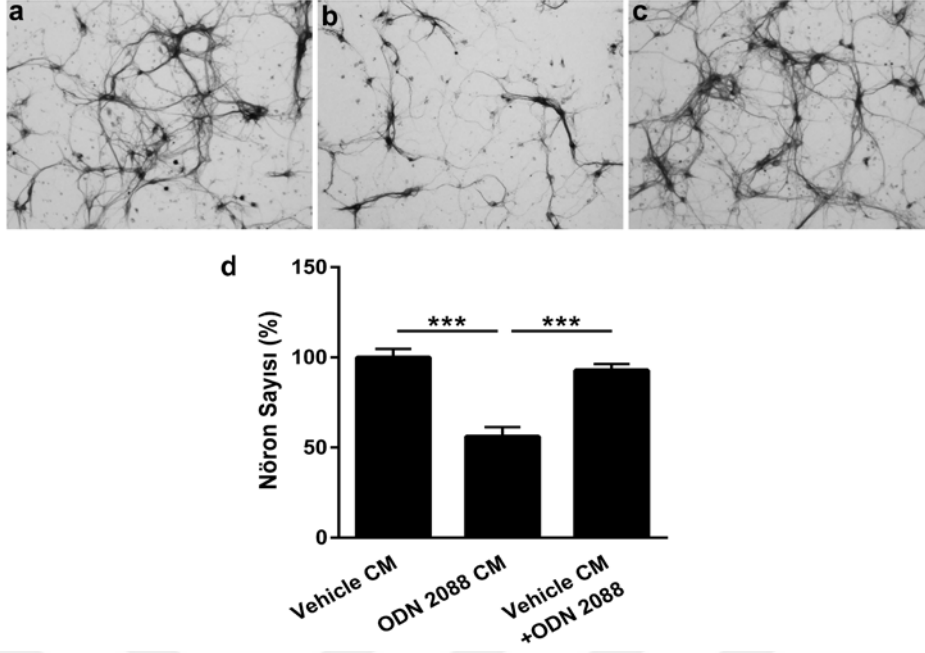
Çizim 4.11. CpG ODN 2088'in TLR9^{+/+} (sol panel) ve TLR9^{-/-} (sağ panel) mikroglialda CXCL1 ve IL-6 salgısı üzerine etkisi. *Vehicle* (Kontrol) veya CpG ODN 2088 (ODN 2088) ile muamele edilmiş mikroglial CM'deki (a) CXCL1 ve (b) MCP-1 konsantrasyonları ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. İki bağımsız deney yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Grafikler örnek bir deneyden elde edilen verileri göstermektedir. Hata barları ortalama \pm SEM'i belirtmektedir. İstatistiksel analizler Student's t testi uygulanarak yapılmıştır. n=3-4

4.10 CpG ODN 2088 Uygulanan Astroglial CM *in vitro* Nöronal Canlılığı Azaltır

Astroglial TLR9'un baskılanmasının nöronal canlılık üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla omurilik astrosit kültürleri 1 μ M CpG ODN 2088 veya taşıyıcı ile muamele edilmiştir 24 sa inkübasyon sonunda her iki gruptan CM'ler toplanmıştır. Omurilik nöronları astrositlerden elde edilen CM'lerle muamele edilmiş ve 24 sa sonunda nöronal canlılık bölüm β -III tubulin pozitif hücreler sayılarak belirlenmiştir. *Vehicle* ile muamele edilen astrositlerden elde edilen CM ile inkübe edilen kültürlerdeki nöron sayısı %100 olarak kabul edilmiştir. CpG ODN 2088 uygulanan astrositlerden elde edilen CM'lerin kültürdeki omurilik nöron sayısını $45,1 \pm 3,1$ oranında azalttığı belirlenmiştir. TLR9^{-/-} astrositlerden elde edilen CM'lerle yapılan deneylerde CpG ODN 2088 uygulanan astrosit CM'lerinin nöronal canlılık üzerinde böyle bir etkisi gözlenmemiştir (Çizim 4.12). Bununla beraber, CpG ODN 2088 uygulanmış astroglial CM'lerde arta kalan CpG ODN 2088'in nöronal canlılık üzerine etkili olabileceği göz önünde bulundurulmuş ve üçüncü bir deney grubu oluşturulmuştur. *Vehicle* uygulanmış astroglial CM, 1 μ M CpG ODN 2088 ile karıştırılmış ve nöronlar bu besiyeri ile 24 sa inkübe edilmiştir. *Vehicle* uygulanmış astroglial CM ile inkübe edilen nöronlar kontrol olarak kullanılmıştır. CpG ODN 2088 uygulanmış astroglial CM'nin kültürdeki nöron sayısını $44 \pm 6,6$ oranında azalttığı belirlenmiştir. Ancak nöronlar *vehicle* uygulanmış astroglial CM ve CpG ODN 2088 ile inkübe edildiğinde kültürdeki canlı nöron sayısında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Çizim 4.13). Bu bulgular, CpG ODN 2088'in astroglial TLR9'u baskılayarak nöronal canlılığı azalttığını göstermektedir.



Çizim 4.12. *Vehicle* veya CpG ODN 2088 ile muamele edilmiş astroglial CM'nin *in vitro* nöronal canlılık üzerine etkisi. (a) *Vehicle* uygulanmış CM (*Vehicle* CM) ile inkübe edilen nöronlar (b) CpG ODN 2088 uygulanmış astroglial CM (*ODN 2088* CM) ile inkübe edilen nöronlar. *Vehicle* veya CpG ODN 2088 uygulanmış (c) TLR9^{+/+} ve (d) TLR9^{-/-} astroglial CM'ler ile inkübe edilen nöronal kültürlerdeki canlı hücre sayısı. Grafikler üç bağımsız deneyden elde edilen veriler birleştirilerek oluşturulmuştur Hata barları ortalama \pm SEM'i belirtmektedir. İstatistiksel analizler için Student's t test uygulanmıştır. ***p<0,001; n=11. Ölçek çizgisi 300 μ m'yi ifade eder.



Çizim 4.13. Astroglial CM'nin ve CpG ODN 2088'in nöronal canlılık üzerine etkisi. Omurilik nöron kültürleri (a) *vehicle* uygulanmış astroglial CM (**Vehicle CM**), (b) CpG ODN 2088 uygulanmış astroglial CM (**ODN 2088 CM**) veya (c) *vehicle* uygulanmış astroglial CM + 1μM CpG ODN 2088 (*Vehicle CM* + ODN 2088) ile 24 sa inkübe edilmiş ve (d) nöronal canlılık β-III pozitif hücreler sayılarak belirlenmiştir. *Vehicle* uygulanmış astroglial CM ile muamele edilen kültürdeki nöron sayısına %100 olarak alınmıştır. İstatiksel analizler tek yönlü ANOVA'nın ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yapılmıştır. ***p<0,001; n=5

4.11 Astroglial CM ile İnkübe Edilen Nöronların Proteom Analizi

CpG ODN 2088 uygulanan astrosit CM'nin omurilik nöronlarının üzerine toksik etkisinin altında yatan moleküler mekanizmaları araştırmak amacıyla etiketsiz karşılaştırılmalı proteom analizi yapılmıştır. nLC-MS/MS analizi sonucunda en az bir özgün peptid ile 4377 protein tanımlanmış ve 2065 proteinin miktarı belirlenmiştir. Bu proteinler arasında 92 proteinin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik ($\leq 50\%$) olduğu belirlenmiştir. Bu proteinler biyolojik işlevlerine göre gruplandırılmıştır (Çizelge 4.2). Ekspresyonu değişen bu proteinlerle IPA yolak analizi yapılmış ve BDNF/TrkB sinyal yolağıyla ilişkili protein ağ haritası çizim 4.14'te gösterilmiştir. Yolak analizinin işaret ettiği önemli yolaklardan biri dorsal horn nöronlarında nöropatik ağrı sinyal iletim yolağı olmuştur. Daha önce yapılan çalışmada CpG ODN 2088'in omurilik hasarlı farelerde hasara bağlı ağrıyı azalttığı belirtilmiştir (David ve diğ. 2013). Bu bakımdan, IPA'nın işaret ettiği bu sinyal yolağında yer alan protein TrkB (NTRK2) üzerine odaklanılmıştır.

Çizelge 4.2. CpG ODN 2088 uygulanmış astroglial CM ile inkübe edilen omurilik nöronlarında nLC-MS/MS analizi sonucu ekspresyonu 1,5-kat≤ değişen proteinler. ↑: Artış↓: Azalış ***Diğer:** Transkripsiyon faktörü, steroid metabolizması, glikolipid sentesi, vesiküler taşıma, karbonhidrat metabolizması, amino asit biyosentezi, endositoz, DNA replikasyonu

<i>UniProt No</i>	<i>Protein Adı</i>	<i>Değişim Oranı</i>	<i>Regülasyon</i>	<i>p-değeri</i>
Nöronal İşlev / Nöronal Hayatta Kalım				
<i>P15209</i>	Isoform L1 of BDNF/NT-3 growth factors receptor	1,5	↓	4,4x10 ⁻³
<i>Q8BPN8</i>	Isoform 3 of DmX-like protein 2	1,5	↓	2,9x10 ⁻²
<i>Q8BZB3</i>	Transmembrane protein C15orf27 homolog	2,7	↓	2,3x10 ⁻⁸
<i>Q91ZD4</i>	Vang-like protein 2	1,6	↑	8,8x10 ⁻³
<i>Q9JK48</i>	Endophilin-B1	1,6	↑	9,5x10 ⁻³
Nöronal Gelişim				
<i>Q3UVD5</i>	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6	1,7	↑	4,1x10 ⁻²
<i>A2ALU4</i>	Protein Shroom2	2,2	↓	3x10 ⁻²
<i>Q8K5C0</i>	Grainyhead-like protein 2 homolog	1,9	↓	1,1x10 ⁻²
Sinaptik İletim				
<i>Q8BYR5</i>	Calcium-dependent secretion activator 2	2,9	↑	8,6x10 ⁻³
<i>Q68EF6</i>	Brain-enriched guanylate kinase-associated protein	1,7	↑	7,7x10 ⁻⁵
<i>P05132</i>	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	1,6	↓	3,7x10 ⁻²
Hücre İskeleti ve Organizasyonu				
<i>P97326</i>	Cadherin-6	7,3	↓	3,9x10 ⁻²
<i>P33175</i>	Kinesin heavy chain isoform 5A	4,0	↓	3,7x10 ⁻²
<i>Q08EC4</i>	Cas scaffolding protein family member 4	2,4	↓	1x10 ⁻²
<i>P15116</i>	Cadherin-2	5,2	↓	3x10 ⁻³
<i>Q9ET54</i>	Isoform 6 of Palladin	1,6	↓	4x10 ⁻³
<i>P21107</i>	Tropomyosin alpha-3 chain	1,8	↓	3,4x10 ⁻³
<i>Q70IV5</i>	Synemin	3,7	↑	3x10 ⁻²
<i>Q61239</i>	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	1,6	↑	5,8x10 ⁻³
<i>Q3UA16</i>	Isoform 2 of Kinetochores protein Spc25	1,6	↑	1,7x10 ⁻²
<i>Q7TSJ2</i>	Microtubule-associated protein 6	1,6	↑	4,9x10 ⁻²
Mitochondriyal İşlev / Oksidatif Solunum / Oksidatif Stress				
<i>Q91W90</i>	Thioredoxin domain-containing protein 5	2,3	↓	2,4x10 ⁻²
<i>Q99MN9</i>	Propionyl-CoA carboxylase beta chain	2,0	↓	1,2x10 ⁻²
<i>Q91VD9</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	4,2	↓	9x10 ⁻³

P48036	Annexin A5	1,5	↓	2x10 ⁻²
P47856	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	1,8	↓	4,9x10 ⁻²
Q9CZS1	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	1,5	↓	2,6x10 ⁻²
P24270	Catalase	2,1	↑	2,8x10 ⁻²
P45376	Aldose reductase	1,5	↑	1,3x10 ⁻²
Q791V5	Mitochondrial carrier homolog 2	1,5	↑	2,1x10 ⁻²
Q05920	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	1,9	↑	2,3x10 ⁻²
Q9DCT1	1,5-anhydro-D-fructose reductase	1,5	↑	1x10 ⁻²
Q9CQZ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	1,5	↑	7x10 ⁻³

Sinyal İletimi

Q6P9R2	Serine/threonine-protein kinase OSR1	2,7	↓	3x10 ⁻²
Q3UDK1	Isoform 2 of TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1	2,9	↓	4,1x10 ⁻²
P62137	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	2,3	↓	2,7x10 ⁻²
P63330	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	2,3	↓	4,2x10 ⁻²
Q9ES52	Isoform 3 of Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1	2,9	↓	3,4x10 ⁻²
P12367	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	1,6	↓	3,4x10 ⁻²
P68404	Protein kinase C beta type	1,7	↓	2,5x10 ⁻²
Q3U1V8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9	2,2	↑	8x10 ⁻³
Q9CSN1	SNW domain-containing protein 1	1,7	↑	1,1x10 ⁻²
Q9DC28	Casein kinase I isoform delta	2,4	↑	3,4x10 ⁻²

Hücre Döngüsü/Apoptoz/Hücre Proliferasyonu

Q9EQU5	Protein SET	1,5	↓	1x10 ⁻²
P35288	Ras-related protein Rab-23	1,8	↓	4,8x10 ⁻²
Q810T2	G2/mitotic-specific cyclin-B3	1,7	↓	6x10 ⁻³
Q07813	Apoptosis regulator BAX	1,7	↓	3,6x10 ⁻²
Q64701	Retinoblastoma-like protein 1	2,2	↓	2,4x10 ⁻²

Protein Sentezi ve Ribozomal Yapı

P62918	60S ribosomal protein L8	1,7	↑	2,2x10 ⁻²
P41105	60S ribosomal protein L28	1,5	↑	3,4x10 ⁻²
P47964	60S ribosomal protein L36	1,5	↓	3x10 ⁻²
P97461	40S ribosomal protein S5	1,5	↓	6,3x10 ⁻⁴

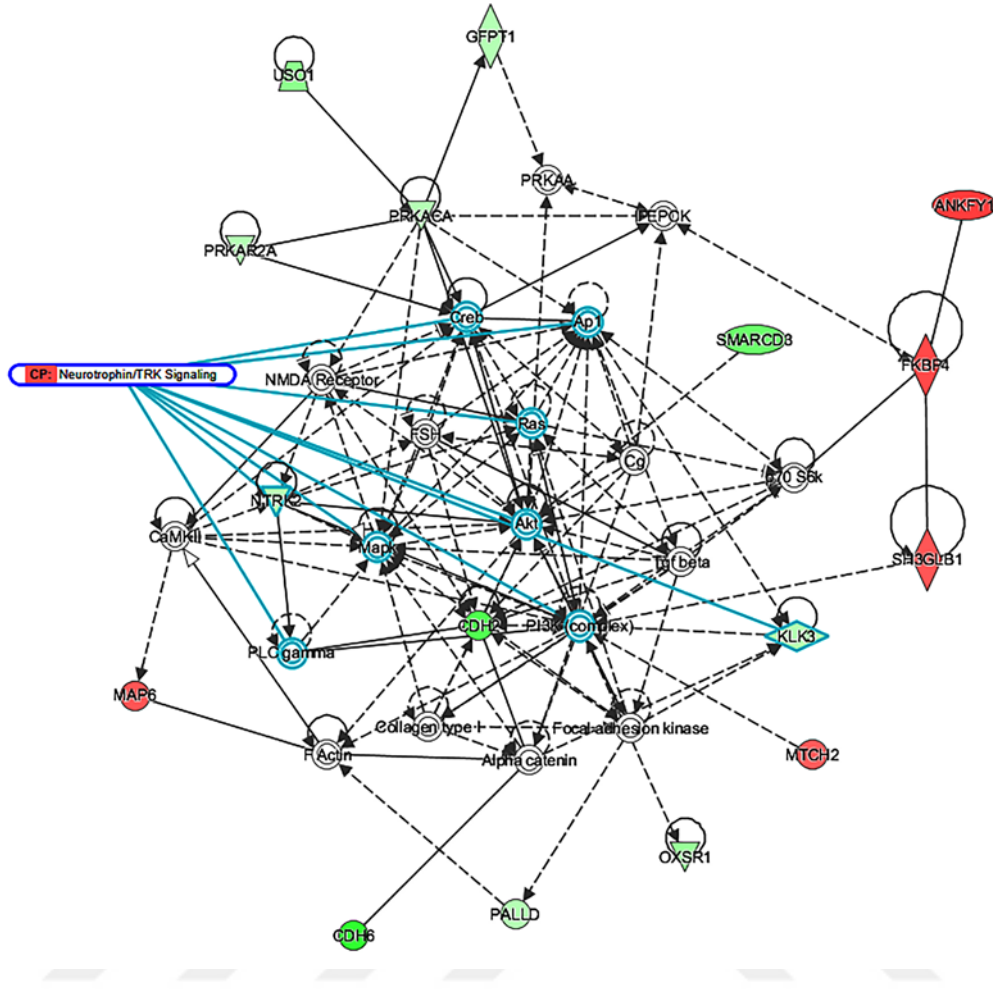
Protein Katlanması ve İşlenmesi

Q76K27	Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 2	2,1	↑	4,8x10 ⁻²
O70311	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 2	1,6	↑	1,7x10 ⁻²

<i>P30416</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	1,8	↑	$5,4 \times 10^{-3}$
<i>P15947</i>	Kallikrein-1	1,9	↓	$4,2 \times 10^{-2}$
<i>P17156</i>	Heat shock-related 70 kDa protein 2	2,2	↓	$2,2 \times 10^{-2}$
<i>P47867</i>	Secretogranin-3	1,6	↓	$3,5 \times 10^{-2}$
Protein Degradasyonu				
<i>O35226</i>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	1,5	↓	$1,4 \times 10^{-3}$
<i>P0CG49</i>	Polyubiquitin-B	1,5	↓	$2,7 \times 10^{-2}$
<i>Q6P1B1</i>	Xaa-Pro aminopeptidase 1	1,5	↑	$1,2 \times 10^{-2}$
Kromozomal Organizasyon				
<i>Q6P9Z1</i>	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 3	4,2	↑	9×10^{-3}
<i>P70696</i>	Histone H2B type 1-A	1,5	↓	$1,3 \times 10^{-2}$
<i>P70288</i>	Histone deacetylase 2	1,7	↓	$3,1 \times 10^{-2}$
<i>P23198</i>	Chromobox protein homolog 3	1,8	↓	$2,5 \times 10^{-2}$
Nükleik asit Metabolizması				
<i>Q8R574</i>	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	1,7	↓	$4,5 \times 10^{-2}$
<i>Q9CWJ9</i>	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	3,1	↓	$4,3 \times 10^{-2}$
RNA Biyosentezi ve İşlenmesi				
<i>Q8BL97</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 7	1,6	↓	$8,63 \times 10^{-8}$
<i>Q91W50</i>	Cold shock domain-containing protein E1	1,5	↓	$3,2 \times 10^{-2}$
<i>Q61035</i>	Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	1,5	↓	$1,2 \times 10^{-2}$
<i>Q8K2Z2</i>	Pre-mRNA-processing factor 39	6,5	↓	$1,3 \times 10^{-3}$
<i>Q6DFW4</i>	Nucleolar protein 58	1,9	↓	$9,5 \times 10^{-3}$
<i>Q3UEB3</i>	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	1,9	↑	$1,9 \times 10^{-2}$
<i>Q8R010</i>	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	1,5	↑	$2,5 \times 10^{-2}$
<i>Q99NB9</i>	Splicing factor 3B subunit 1	2,0	↑	$3,1 \times 10^{-2}$
<i>Q8R326</i>	Paraspeckle component 1	1,5	↓	$4,4 \times 10^{-2}$
Diğer				
<i>Q9DCC4</i>	Pyrroline-5-carboxylate reductase 3	12,8	↓	2×10^{-3}
<i>O08795</i>	Glucosidase 2 subunit beta O	3,4	↓	$2,4 \times 10^{-2}$
<i>Q9Z1Z0</i>	General vesicular transport factor p115	3,0	↓	$1,6 \times 10^{-2}$
<i>Q8BIII</i>	Prospero homeobox protein 2	2,6	↓	$4,7 \times 10^{-2}$
<i>E9PUL5</i>	Proline-rich transmembrane protein 2	1,9	↓	$4,6 \times 10^{-2}$
<i>Q00915</i>	Retinol-binding protein 1	1,9	↓	$4,2 \times 10^{-3}$
<i>Q6PD26</i>	GPI transamidase component PIG-S	1,8	↓	1×10^{-3}
<i>Q9CQI3</i>	Glia maturation factor beta	1,8	↓	$3,7 \times 10^{-2}$
<i>Q01320</i>	DNA topoisomerase 2-alpha	1,6	↓	2×10^{-3}

<i>Q9R1J0</i>	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	1,5	↓	$3,5 \times 10^{-2}$
<i>Q3TRM8</i>	Hexokinase-3	1,5	↓	$3,3 \times 10^{-2}$
<i>Q9WV34</i>	MAGUK p55 subfamily member 2	1,5	↑	5×10^{-3}
<i>Q9JLB0</i>	MAGUK p55 subfamily member 6	1,8	↑	$1,4 \times 10^{-2}$
<i>P07742</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	1,9	↑	$3,9 \times 10^{-2}$
<i>Q810B6</i>	Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1	2,0	↑	$4,2 \times 10^{-3}$





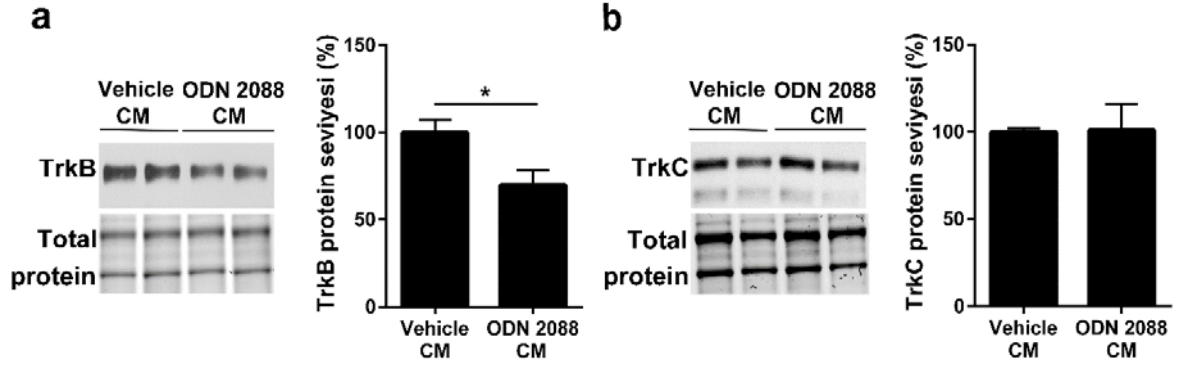
Çizim 4.14. CpG ODN 2088 uygulanmış astroglial CM ile inkübe edilen omurilik nöronlarında protein seviyesi 1,5-kat \leq değişen proteinlerin yolak analizi sonucunda belirlenen protein ağ haritası. Yeşil renk protein seviyesindeki azalmayı kırmızı renk ise artışı belirtir. Oklar proteinler arasında direkt ilişki olduğunu kesikli oklar ise proteinler arasındaki indirekt ilişkiyi belirtir.

4.12 CpG ODN 2088 Uygulanan Astrosit CM Omurilik Nöronlarında TrkB Protein Seviyesini Azaltır

nLC-MS/MS analizi sonucunda protein ekspresyon seviyelerinde anlamlı değişim meydana geldiği belirlen önemli proteinlerinden biri TrkB'dir. TrkB ve ligandı BDNF'nin nöronal hayatta kalımda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu bakımdan TrkB proteinin seviyesindeki değişimi doğrulamak amacıyla western blot analizi yapılmıştır. CpG ODN 2088 uygulanan astroglial CM ile inkübe edilen nöronlarda TrkB protein seviyesinin 30 ± 10 oranında azaldığı belirlenmiştir (Çizim 14.15.a).

Merkezi sinir sisteminde en çok bulunan diğer nörotrofin reseptörü TrkC'dir. Bu bakımdan karşılaştırmalı proteom analizinde belirlenmemesine rağmen CpG ODN 2088 ile muamele edilen astroglial CM'nin omurilik nöronlarında TrkC protein seviyeleri

üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Ancak deney gruplarının nöronal TrkC protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Çizim 14.15.b). Bu bulgular, CpG ODN 2088 uygulanan astroglial CM'nin nöronlarda TrkB protein seviyesini azaltarak BDNF'ye cevap kapasitesini indirgeyebileceğini düşündürmektedir.

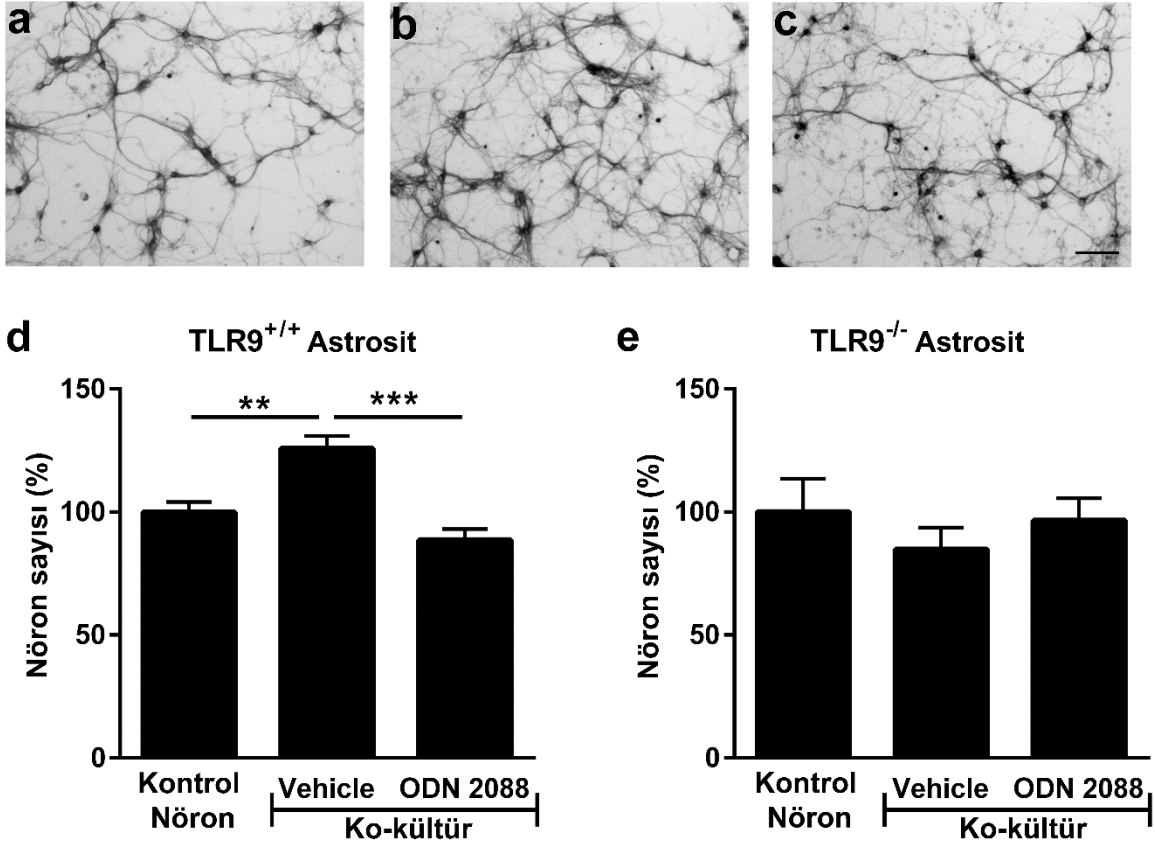


Çizim 4.15. *Vehicle* veya CpG ODN 2088 ile muamele edilmiş astroglial CM'nin omurilik nöronlarında *in vitro* TrkB ve TrkC protein seviyeleri üzerine etkisi. (a) *Vehicle* veya CpG ODN 2088 uygulanmış CM'ler ile 24 sa inkübe edilen nöron kültürlerinde TrkB (~132 kDa) protein seviyelerini gösteren örnek western blot analizi (sol panel) ve western blot analizinden elde edilen verilerin grafiksel gösterimi (sağ panel). (b) *Vehicle* veya CpG ODN 2088 uygulanmış CM'ler ile 24 sa inkübe edilen nöron kültürlerinde TrkC (~145 kDa) protein ekspresyonunu gösteren örnek western blot analizi (sol panel) ve western blot analizinden elde edilen verilerin grafiksel gösterimi (sağ panel). Total protein miktarı deneysel varyasyonların normalizasyonu için kullanılmıştır. Her iki western blot analizinde iki farklı deneyden elde edilen veriler birleştirilmiş ve hata barları ortalama \pm SEM'i belirtmektedir. İstatistiksel analizler için Student's t test uygulanmıştır. * $p<0,05$; n=6.

4.13 CpG ODN 2088 Astrosit-Nöron Kültürlerinde Astrositlerin Nöronal Canlılığı Destekleyici Etkisini Baskılar

Astrositler ve nöronlar arasında karşılıklı iletişimin olduğu astrosit-nöron ko-kültürleri oluşturmuş ve 1 μ M CpG ODN 2088 ile muamele edilmiştir. 24 sa inkübasyon sonunda nöronlar fikse edilmiş ve β -III tubulin ile işaretlenmiştir. Nöronların tek başına büyütüldüğü kültürdeki β -III tubulin pozitif hücre sayısı %100 olarak kabul edilmiş ve ko-kültürlerdeki nöronal canlılık oranları hesaplanmıştır. Astrositlerin nöronların hayatta kalım oranını 25 ± 5 oranında arttırdığı belirlenmiştir (Çizim 14.16.a-d). Astrosit-nöron ko-kültürleri CpG ODN 2088 muamele edildiğinde astrositlerin nöronal canlılığı destekleyici etkisinin baskılandığı gözlenmiştir. Ancak CpG ODN 2088 uygulanmış astroglial CM'lerin nöronlar üzerinde oluşturduğu toksik etki CpG ODN 2088 uygulanan ko-kültürlerde gözlenmemiştir. CpG ODN 2088'in ko-kültürlerdeki bu etkisinin astroglial TLR9'un mu yoksa nöronal TLR9'un mu baskılanmasından kaynaklandığını belirlemek

amacıyla TLR9^{+/+} nöronlar TLR9^{-/-} astrositler ile birlikte kültüre edilmiş ve 1 μ M CpG ODN 2088 muamele edilmiştir. TLR^{+/+} astrositlerin aksine TLR9^{-/-} astrositlerin nöronal canlılığı destekleyici etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca ko-kültürlerin CpG ODN 2088 ile muamelesi nöronal canlılığı etkilememiştir (Çizim 14.16.e). Bu bulgular, CpG ODN 2088'in astrosit-nöron ko-kültürlerinde astrositlerin nöronal canlılığı destekleyici etkisinin azaltmasının astroglial TLR9'nin baskılanmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

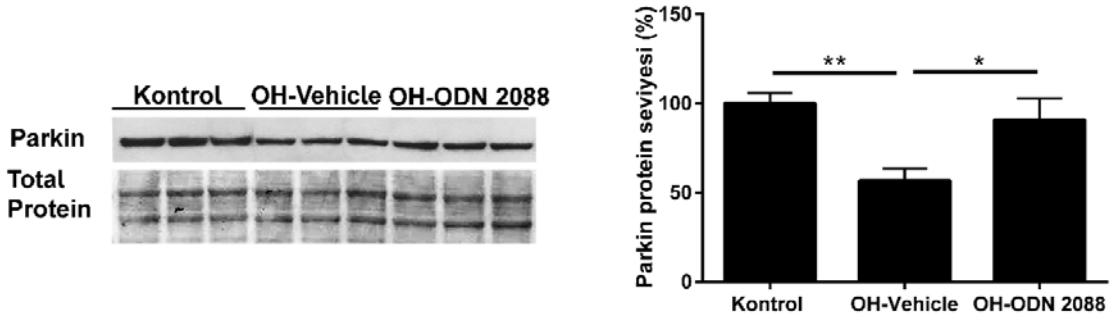


Çizim 4.16. CpG ODN 2088'nin astrosit-nöron ko-kültürleri üzerinde etkisi. (a) Kontrol nöron kültürü, (b) *Vehicle* ile muamele edilen ko-kültürlerdeki nöronlar (c) CpG ODN 2088 (ODN 2088) ile muamele edilen ko-kültürlerdeki nöronlar. *Vehicle* veya CpG ODN 2088 uygulanan (d) TLR9^{+/+} astrosit- TLR9^{+/+} nöron veya (e) TLR9^{-/-} astrosit- TLR9^{+/+} nöron ko-kültürlerinde 24 sa sonunda β -III tubulin pozitif nöron sayısının grafiksel gösterimi. Grafikler iki bağımsız deneyden elde edilen verilerin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Hata barları ortalama \pm SEM'i belirtmektedir. İstatistiksel analizler tek yönlü ANOVA'nın ardından Tukey çoklu karşılaştırma uygulanarak yapılmıştır. **p<0,01; ***p<0,001; n=7. Ölçek çizgisi 300 μ m'yi ifade eder.

4.14 CpG ODN 2088 Omurilik Hasarına Bağlı Olarak Parkin Protein Seviyesinde Meydana Gelen Azalmayı Baskılar

CpG ODN 2088'nin Parkin proteini üzerine *in vivo* etkisini araştırmak amacıyla yetişkin farelere T8 seviyesinde ağır kontüzyon hasarı uygulanmış ve CpG ODN 2088

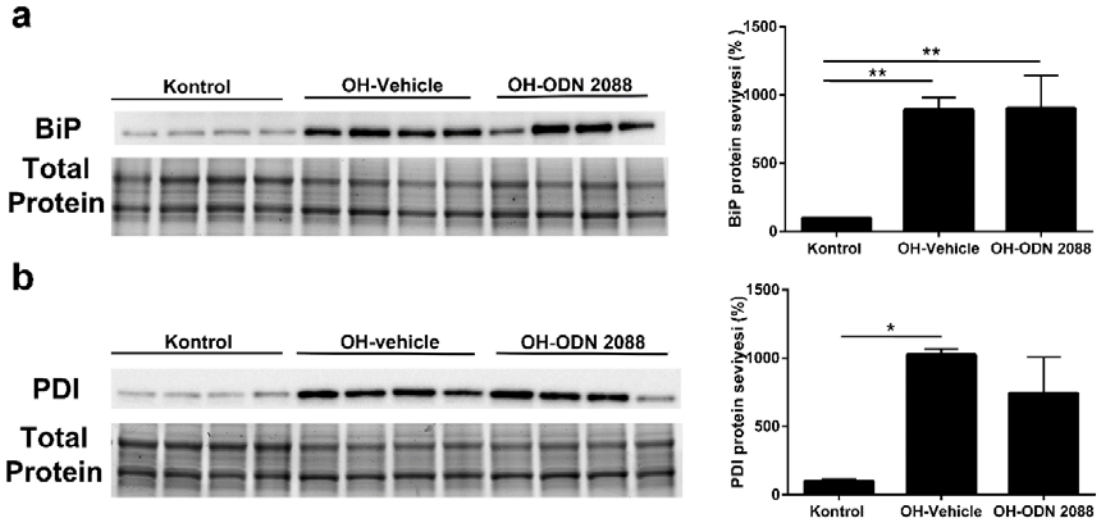
uygulamasının hasar bölgesinde Parkin protein seviyeleri üzerindeki etkisi western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Ameliyattan 24 saat sonra 3µg CpG ODN 2088 veya *vehicle* (endotoksin içermeyen su) lomber ponksiyon (LP) yöntemi ile beyin omurilik sıvısına (BOS) enjekte edilmiştir. Kontrol gruplarına ise aynı hacimde *vehicle* enjekte edilmiştir. Altıncı gün sonunda farelere ötenazi uygulanmış ve hasarın oluşturulduğu doku izole edilmiştir. Farelerde kontüzyon hasarı, hasar bölgesinde Parkin protein seviyesinde artışa sebep olmuştur. Omurilik hasarlı farelere CpG ODN 2088 muamelesi ise Parkin protein seviyesinde hasara bağlı meydana gelen azalmayı baskılamıştır (Çizim 4.17).



Çizim 4.17. Omurilik kontüzyon hasarı uygulanan yetişkin farelerde CpG ODN 2088'in hasar merkezinde Parkin proteini üzerine etkisi. 70 kd'ye kuvvet uygulanarak omurilik hasarı yaratılmış farelerde altıncı gün sonra Parkin protein seviyeleri western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Sağ panelde western blot analizlerinden elde edilen veriler grafiksel olarak gösterilmiştir. Total protein miktarı deneysel varyasyonların normalizasyonu için kullanılmıştır. Sağlıklı fareler **kontrol** olarak kullanılmıştır. **OH-Vehicle:** Omurilik hasarlı ve *vehicle* uygulanmış **OH-CpG ODN 2088:** Omurilik hasarlı ve CpG ODN 2088 uygulanmış. İstatistiksel analizler tek yönlü ANOVA'nın ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yapılmıştır. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 8$

4.15 Farelerde Omurilik Yaralanmaları Hasar Merkezinde Endoplazmik Retikulum Stresine Yol Açar

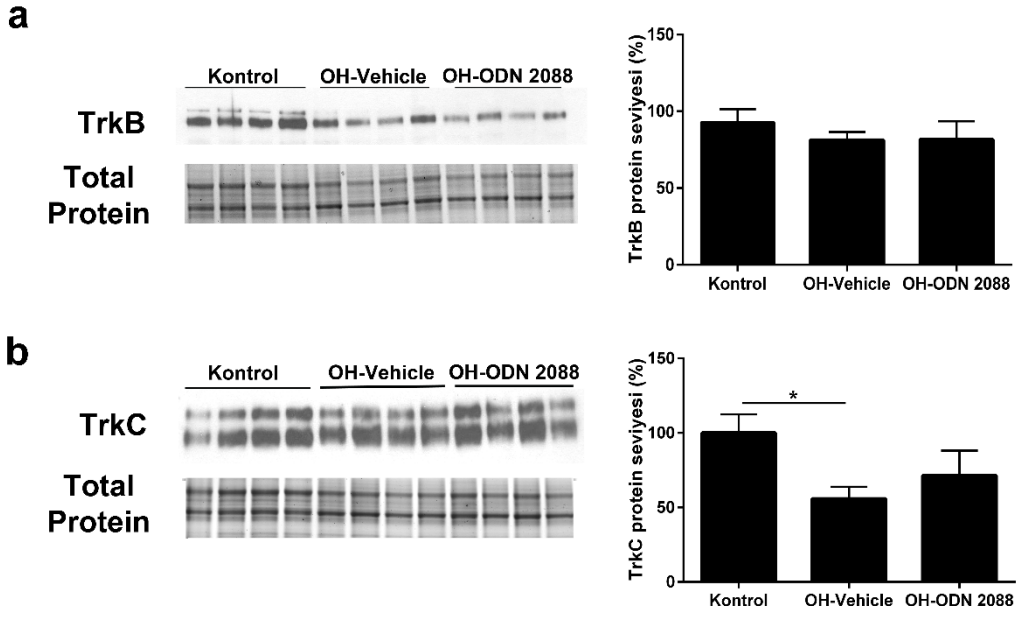
Yetişkin farelere bölüm 4.14'te belirtildiği gibi omurilik kontüzyon hasarı uygulanmış ve CpG ODN 2088 uygulamasının hasar bölgesinde PDI ve BiP protein seviyeleri üzerindeki etkisi western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Farelerde kontüzyon hasarı hasar bölgesinde BiP ve PDI proteinlerinin ekspresyonunda artışa sebep olmuştur. Ancak CpG ODN 2088 uygulamasının BiP ve PDI protein ekspresyonlarındaki bu artışı önleyemediği gözlenmiştir (Çizim 4.18).



Çizim 4.18. Omurilik kontüzyon hasarı uygulanan farelerde CpG ODN 2088'in hasar merkezinde BiP ve PDI protein seviyeleri üzerine etkisi. 10 haftalık dişi farelere 70 kdyn kuvvet uygulanarak omurilik hasarı yaratılmış ve altıncı gün sonunda hasar merkezinde **(a)** BiP ve **(b)** PDI proteinlerinin ekspresyonları western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Sol panelde western blot analizlerinden elde edilen veriler grafiksel olarak gösterilmiştir. Total protein miktarı deneysel varyasyonların normalizasyonu için kullanılmıştır. Sağlıklı fareler **kontrol** olarak kullanılmıştır. **OH-Vehicle:** Omurilik hasarlı ve *vehicle* uygulanmış, **OH-CpG ODN 2088:** Omurilik hasarlı ve CpG ODN 2088 uygulanmış. İstatiksel analizler tek yönlü ANOVA'nın ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yapılmıştır. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n=4$.

4.16 CpG ODN 2088 Omurilik Yaralamalarında Hasar Merkezinde TrkB ve TrkC Protein Seviyeleri Etkilemez

Yukarıdaki bulgularda bahsedildiği gibi CpG ODN 2088'in *in vitro* nöronal TrkB protein seviyesini azalttığı belirlenmiştir. Çalışmanın bu safhasında CpG ODN 2088'in omurilik hasarı uygulanan farelerde CpG ODN 2088'in hasar merkezinde TrkB ve TrkC proteinleri üzerine etkisi araştırılmıştır. *In vitro* bulguların aksine CpG ODN 2088 *in vivo* TrkB ve TrkC protein seviyeleri üzerine istatiksel olarak anlamlı bir etki yaratmamıştır (Çizim 14.19). Ancak omurilik yaralanmasının hasar merkezinde TrkC protein seviyesini azalttığı gözlenmiştir (Çizim 4.19.b).



Çizim 4.19. Omurilik kontüzyon hasarı uygulanan farelerde CpG ODN 2088'in hasar merkezinde TrkB ve TrkC protein seviyeleri üzerine etkisi. 10 haftalık dişi farelere 70 kdyn kuvvet uygulanarak omurilik hasarı yaratılmış ve altı gün sonunda hasar merkezinde **(a)** TrkB (~132 kDa) ve **(b)** TrkC (~100 kDa, ~145 kDa) protein seviyeleri western blot yöntemi ile belirlenmiştir. *Full-length* TrkB (~132 kDa) ve TrkC (~145 kDa) izoformlarını belirten bantların yoğunluğu ölçülmüş ve elde edilen veriler grafiksel olarak gösterilmiştir (Sol panel). Total protein miktarı deneysel varyasyonların normalizasyonu için kullanılmıştır. Sağlıklı fareler **kontrol** olarak kullanılmıştır. **OH-Vehicle:** Omurilik hasarlı ve *vehicle* uygulanmış, **OH-CpG ODN 2088:** Omurilik hasarlı ve CpG ODN 2088 uygulanmış. İstatiksel analizler tek yönlü ANOVA'nın ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yapılmıştır. * $p < 0,05$; $n = 4-8$

5. TARTIŞMA

Nöronal hasar veya kayıp birçok nörodejeneratif bozuklukların altında yatan önemli patolojik durumlardan biridir (Mukherjee ve diğ. 2015). Nöronal hasarın veya ölümün altında yatan mekanizmaların anlaşılması potansiyel tedavilerin geliştirilmesi için önem teşkil etmektedir. Hastalıkların veya biyolojik süreçlerin araştırılmasında kullanılan geleneksel yaklaşımlar bir çalışmada genellikle seçilmiş bir yolağın incelenmesine olanak sağlar. Buna karşın LC-MS/MS gibi yüksek işlem kapasiteli teknolojiler aynı anda birçok proteinin analizine olanak sağlamaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri tüm proteom analizi ile bütün biyolojik yolların aynı anda incelenmesine imkan sağlamasıdır. Bununla beraber proteomik analizlerin bir diğer önemli avantajı çalışma öncesinde belirli bir biyolojik süreçte yer alan moleküler mekanizmanın bilinmesini gerektirmemesidir (Sethi ve diğ. 2015). Böylece karşılaştırmalı proteom analizi grupların protein profillerindeki değişimlere genel bir bakış kazandırarak hedef sinyal yollarının belirlenmesini kolaylaştırır. Bu çalışmada TLR9 antagonizminin omurilik nöronları üzerinde direkt veya astrosit aracılı etkisi araştırılmış ve bu etkilerin (nöronları koruyucu veya hasar verici) altında yatan moleküler mekanizmayı aydınlatmak için etiketsiz karşılaştırmalı proteom analizi araç olarak kullanılmıştır. nLC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen bulgular CpG ODN 2088'in omurilik nöronlarının protein ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler ve bu değişimlerin ilişkili olduğu biyolojik yollar hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Bu bilgiler ışığında çalışma geliştirilerek TLR9 antagonizminin omurilik nöronlarında TLR9'un bilinen sinyal yolları dışında ilişkili olabileceği farklı sinyal yollarına işaret edilmiştir. Omurilik nöronlarında TLR9 antagonizminin *in vitro* Parkin protein ekspresyonunu arttırdığı ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, T8 kontüzyon hasarı uygulanan farelerde Parkin protein seviyesinin azaldığı buna karşın farelere CpG ODN 2088 uygulamasının hasar merkezinde Parkin protein seviyesinin korunmasını sağladığı gösterilmiştir. Parkin proteininin çeşitli zarar verici etkenlere karşı nöronları koruyucu etkisi farklı model sistemlerde gösterilmiştir (Henn ve diğ. 2007). Nöronlarda endojen veya ekzojen stres uyaranlarına karşı Parkin ekspresyonunun arttığı birçok çalışmada ortaya konulmuştur (Henn ve diğ. 2007) Bununla beraber ağır stres koşullarının Parkin inaktivasyonuna sebep olabileceği de belirtilmiştir (Henn ve diğ. 2007). Bu bilgiler Parkin proteininin nöronal işlevin ve canlılığın korunmasında önemli rol oynadığına işaret etmektedir. Bu bağlamda, Parkin

protein seviyesindeki azalmanın omurilik yaralanmalarında nöronal hasara yol açan mekanizmalardan biri olabileceği düşünülebilir. CpG ODN 2088'in de Parkin protein seviyesindeki düşüşü azaltarak Parkin'in nöronal hayatta kalımı destekleyici etkisinin artmasına neden olabilir. Ancak bu hipotezin desteklenmesi için daha kapsamlı analizler yapılması gerekmektedir.

Proteomik verilerden elde edilen bir diğer dikkat çekici bulgu CpG ODN 2088'in omurilik nöronlarında bazal GABA(B)R1 protein seviyesini arttırmasıdır. GABA_BR, G-protein ile eşleşmiş metabotropik reseptördür. GABA_BR'ler merkezi sinir sisteminde hemen hemen nöronların hepsinde eksprese edilir ve GABA_BR aktivitesi birçok nöronal sistemi etkiler. Bu sebeple GABA_BR'ler epilepsi, anksiyete, şizofreni, nöropatik ağrı gibi birçok farklı nörolojik ve psikiyatrik durumlarda rol oynar (Gassmann ve Bettler 2012). GABA_BR omurilikte dorsal hornda nöronal ve glial hücrelerde yoğun bulunur ve GABA_BR'lerin aktivasyonu omurilikte birincil duyu nöronlarında sinaptik iletimi baskılar (Alford ve Grillner 1991). Omurilik yaralanmalarının ardından GABAerjik işlevde azalmanın merkezi nöropatik ağrı gelişiminde rol oynadığı yapılan birçok çalışmada ortaya konulmuştur (Gwak ve Hulsebosch 2011, J. H. Hwang ve Yaksh 1997). Daha önceki çalışmada farelere CpG ODN 2088 uygulamasının omurilik yaralanmalarına bağlı ağrı gelişimini azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada CpG ODN 2088'in GABA(B)R1 protein ekspresyonunu değiştirmesi CpG ODN 2088'in *in vivo* GABAerjik aktiviteyi değiştirerek ağrı oluşumunu etkileyebileceğini düşündürmüştür. Ancak bu konu ile ilgili araştırmalar daha sonraki çalışmalarda yapılacaktır.

Parkin ve GABA(B)R1 proteinlerinin TLR9 sinyal iletimi ve omurilik yaralanmalarındaki rolü aydınlatılamamasına rağmen bu çalışma ile ilk defa CpG ODN 2088'in omurilik nöronlarının *in vitro* bazal işlevlerini etkilediği gösterilmiştir. Proteomik analizler sonucunda CpG ODN 2088 muamelesinin omurilik nöronlarının proteom profilini değiştirdiği belirlenmiştir. Nöronal işlevde rol alan bir grup proteinin regülasyonu TLR9 antagonistinin herhangi bir hasar uygulanmadığında dahi nöronal işlevi değiştirdiğine işaret etmektedir. Bu bağlamda TLR9'un omurilik nöronlarının *in vitro* bazal işlevlerinde rol alabildiği düşünülebilir.

TLR aktivasyonunun glial hücrelerde ve bağışıklık sistemi hücrelerinde genellikle sitokin/kemokin salgısını düzenlediği ve hücre bölünmesini indüklediği bilinmektedir. Buna karşın nöronlarda TLR uyarılmasının nöronal morfoloji ve fizyoloji üzerinde genellikle olumsuz etki yarattığı ve nöronal dejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir. Özellikle endozomal TLR'lerin (TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9) nöronal hücre ölümünü

indüklediği farklı çalışmalarda gösterilmiş ancak TLR aktivasyonunun nöronal ölüme nasıl yol açtığı henüz tam anlamıyla anlaşılammıştır (Mukherjee ve diğ. 2015). Yapılan bir çalışmada TLR7 ve TLR8 agonisti R-848'in kortikal nöron kültürlerinde nöronal apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Y. Ma ve diğ. 2006). Bir başka çalışmada ise kortikal nöron kültürleri TLR7 ve TLR9 agonistleri ile birlikte muamele edildiğinde nöronal apoptozu yol açmıştır (Mukherjee ve diğ. 2015). Bunların yanı sıra, TLR agonistlerinin nöronal canlılık üzerine herhangi bir etkisi olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (D. Ma ve diğ. 2013). Tez çalışmasında, ilk defa nöronal TLR9 antagonizminin eksitotoksiste ile indüklenen nöronal ölümleri azalttığı gösterilmiştir. Bu bakımdan TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in omurilik nöronları üzerine direkt koruyucu etkisi olabileceği düşünülebilir. Bu bulgu, CpG ODN 2088'in omurilik hasarının ardından farelerde yararlı etkisini gösteren *in vivo* çalışmayı desteklemesi açısından özellikle önem taşımaktadır (David ve diğ. 2013, 2014). Bu çalışmalarda CpG ODN 2088'in farelerde omurilik yaralanmasının ardından bağışıklık sistemi ile ilişkili hücrelerin infiltrasyonunu azalttığı ve hasar merkezinde inflamatuvar reaksiyonu indirgediği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular CpG ODN 2088'in sadece bağışıklık cevabı düzenleyerek değil, aynı zamanda nöronlarla direkt etkileşimde bulunarak omurilik nöronlarının hayatta kalımını ve işlevini etkileyebileceği savını desteklemiştir.

Eksitotoksiste omurilik yaralanmalarının ardından meydana gelen ikincil hasar mekanizmalarından biridir. Birçok bulgu AMPA/KA reseptör aktivasyonunun omurilik yaralanmalarında önemli rol oynadığına işaret etmiştir (Won ve diğ. 2007). Bununla beraber, omuriliği etkileyen ALS, MS gibi hastalıkların hayvan modellerinde eksitotoksistenin nöronal hasara yol açan etkenlerden biri olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kawahara ve Kwak 2005, Pitt ve diğ. 2000). Yapılan *in vitro* çalışmalarda AMPA/KA reseptör aktivasyonunun omurilik nöron kültürlerinde nöronal dejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir (Yin ve diğ. 1995). Bu nedenle, çalışmada nöronal hasar uygulamak amacıyla eksitotoksiste yöntemi seçilmiştir. Daha önce yapılan çalışmada omurilik nöron kültürlerinde düşük konsantrasyonlarda devamlı KA muamelesinin nöronal ölüme yol açtığı belirtildiğinden (Kurnellas ve diğ. 2010) tez çalışmasında aynı deney koşulları kullanılmış ve saf omurilik nöron kültürlerinde CpG ODN 2088'in KA'nın indüklediği nöronal ölümleri azalttığı gösterilmiştir. AMPA-reseptör aracılı eksitotoksistenin yol açtığı nöronal ölüm esas olarak reseptörlerin kanal özelliği ile ilişkilendirilir. AMPA reseptörleri ile eşleşmiş kanalların aktivasyonu Ca^{+2} iyonlarının hücre içine akışına ve sonuç olarak hücre içi Ca^{+2} seviyesinde anormal bir artışa sebep

olarak nöronal ölümdede anahtar rol oynar (Kawahara ve Kwak 2005). Hücre içi Ca^{+2} iyonlarının artışı serbest radikal oluşumuna öncülük ederek mitokondriyal hasara ve sonuçta apoptoza veya nekroza yol açar. Bunun yanı sıra, KA nöronlarda ER zarının bozunmasına ve ER stres proteinlerinin aktivasyonuna yol açarak nöronal apoptozu tetikler (X. Zhang ve Zhu 2011).

Merkezi sinir sistemi yaralanmalarında ER stresinin inhibisyonunun nöronları koruyucu etkisi olduğu birkaç çalışmada gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada KA'nın sıçan beyin nöronlarında ER stres sensör proteinlerinin aktivasyonuna yol açarak nöronal hasarı tetiklediği ve ER stresinin farmakolojik ajanla inhibisyonunun nöronları KA'nın yol açtığı hasardan koruduğu gösterilmiştir (Sokka ve diğ. 2007). Bir başka çalışmada farelerde genel iskeminin beyin nöronlarında BiP ve CHOP ekspresyonunu indüklediği böylece ER stresinin iskemiden kaynaklanan nöronal apoptoza aracılık ettiği belirtilmiştir (Tajiri ve diğ. 2004). Omurilik yaralanmalarında ise ER stresinin nöronal hasara neden olan mekanizmalardan biri olduğuna çok az sayıda çalışmada dikkat çekilmiştir. Bu bakımdan CpG ODN 2088'in omurilik nöronlarını KA'nın indüklediği hücre ölümünden koruyan mekanizmaları belirlemek amacıyla CpG ODN 2088'in nöronlarda ER stres cevabı sinyali yolağı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Hipoksi, glikoz eksikliği, eksitotoksisite gibi hücre homeostazını bozan etkenler proteinlerin yanlış veya hatalı katlanmasına yol açar. Bu proteinlerin birikiminin ER stres cevabı ve UPR'yi tetiklediği bilinmektedir (Kim ve diğ. 2008). ER'de bulunan BiP gibi şaperon proteinler ER stresi cevabının başlatılmasında kritik rol oynarlar (Dufey ve diğ. 2014). ER şaperon proteinlerinden BiP normal koşullarda ER'de IRE1 α , PERK ve ATF6 proteinlerine bağlanarak inaktif halde kalmalarını sağlarlar (Bertolotti ve diğ. 2000, Shen ve diğ. 2002). ER'de katlanmamış proteinlerin birikimi BiP'in bu proteinlerden ayrılmasına ve UPR'ı tetiklenmesine yol açar (Shen ve diğ. 2002, Todd ve diğ. 2008). ER stres cevabında önemli bir diğer protein PDI, ER lümeninde yer alır ve hem di-sülfid bağlarının oksidasyonunu hem de izomerizasyonunu katalizler (Robert Noiva 1999). Ayrıca PDI şaperon aktivitesiyle de protein katlanmasında görev alır. PDI, ER'de redoks homeostazının korunmasına da katkı sağlar (Benham ve diğ. 2013, Puig ve Gilbert 1994). ER lümeninde oksidatif stres PDI protein miktarının artışına neden olarak hücrenin ER stresi ile baş edebilmesine katkı sağlar (C. Hwang ve diğ. 1992). Hafif stres koşullarında UPR'nin aktivasyonu hayatta kalım mekanizmalarını tetikleyerek hücreyi ER stresine karşı korur (Hetz 2012, Ron ve Walter 2007). Ancak eksitotoksisite (Sokka ve diğ. 2007) gibi ağır stres koşullarında UPR hücre hasarını onaramaz ve apoptozu tetikler (Hetz 2012).

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, T7-T9 seviyesinde laminektomi yapılmış ve kontüzyon hasarı uygulanmış sıçanlarda UPR hedef genlerinin ekspresyonları ölçülmüş ve hasar merkezinde altıncı saatte XBP1, BiP ve CHOP genlerinin ekspresyonlarında artış belirlenmiş (Penas ve diğ. 2007). Bir başka çalışmada ER stres yolağının farmakolojik ajanla baskılanmasının oligodendrosit öncül hücrelerinde ER ile tetiklenen apoptozu azalttığı *in vitro* gösterilmiş ve travmatik omurilik yaralanmasının ardından işlevsel kayıpların iyileştirilmesine katkı sağladığı rapor edilmiştir (Ohri ve diğ. 2013). CHOP^{-/-} farelerle yapılan başka bir çalışma ER stresi cevabının baskılanmasının travmatik omurilik yaralanmalarının ardından işlevsel kayıpların iyileştirilmesine katkı sağladığı görüşünü desteklemektedir. T9 seviyesinde orta derecede kontüzyon hasarı yaratılmış CHOP^{-/-} farelerde UPR cevabının yabancı tipe göre daha az seviyede olduğu gösterilmiştir. Ayrıca CHOP^{-/-} farelerde omurilik hasarına bağlı işlev kayıplarının geri kazanımının yabancı tiplere göre daha belirgin ve beyaz madde kaybının CHOP^{-/-} farelerde daha az olduğu gösterilmiştir (Ohri ve diğ. 2011). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular, omurilik yaralanmalarında ER stresinin ve UPR cevabının önemli rol oynadığını ve UPR sinyal yolağının hedeflenmesi omurilik yaralanmalarında işlevsel kazanımlar için etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, CpG ODN 2088'in nöronlarda *in vitro* ER stresini azaltması omurilik yaralanmalarının ardından nöronal hasarın azaltılmasında rol oynayabileceğini düşündürülebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, UPR yolağı ve TLR sinyal iletimi arasında karşılıklı etkileşim olduğuna dair bulgular ortaya koymuştur (Brinkmann ve diğ. 2007, Lawless ve Greene 2012, Martinon ve diğ. 2010, Shimasaki ve diğ. 2010). Yapılan bir çalışmada, bakteriyel TLR1-2 veya TLR4 ligandlarıyla uyarılan fare makrofajlarında UPR sinyal yolağının aktive olduğu gösterilmiştir (Martinon ve diğ. 2010). Bir başka çalışmada, B hücreleri TLR ligandlarıyla uyarıldığında UPR sinyal yolağının *downstream* moleküllerinin ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Genestier ve diğ. 2007). TLR ligandlarının ER stres yolağına etkisinin yanı sıra, ER stresinin de TLR'lerin ekspresyonunu ve işlevini etkilediğini belirten çalışmalar bulunmaktadır. İnsan epitelyal hücrelerinde ve fare karaciğer dokusunda ER stresinin TLR2 ekspresyonunun artışına ve TLR2-bağımlı pro-inflamatuar sitokin sentezinin artışına neden olduğu gösterilmiştir (Shimasaki ve diğ. 2010). Hasara uğramış nöronlarda ve omurilik yaralanmalarında UPR ile TLR sinyal yolları arasındaki etkileşime dair bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, omurilik nöronlarında TLR9 sinyal yolağı ve ER-stres cevabı arasındaki bağlantı ilk defa ortaya konulmuştur. Omurilik nöron kültürlerinde CpG ODN 2088'in nöronları KA ile

indüklenen hücre ölümünden koruduğu gösterilmiştir. Bununla beraber, KA'nın omurilik nöronlarında ER stres proteinlerinin ekspresyonunu arttırdığı ve CpG ODN 2088'in KA'nın bu etkisini azalttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda, omurilik nöronlarında KA'nın ER stresine yol açtığı ve UPR'yi tetiklediği söylenebilir. Ayrıca TLR9 aktivasyonunun ER stresi ve UPR sinyal yolağı ile ilişkili olabileceği, TLR9 ve UPR aktivasyonunun omurilik nöronlarında eksitotoksisteden kaynaklanan ölümün altında yatan mekanizmalardan biri olabileceği söylenebilir. Bu bulgular TLR9'un omurilik nöronlarında eksitotoksisteden kaynaklanan hücre ölümüne aracılık ettiğini düşündürülebilir. TLR9 aktivasyonu ve KA'nın yol açtığı eksitotoksistite arasındaki mekanik ilişki bilinmemesine rağmen, ölen hücrelerden salınan DAMP'lerin nöronlarda TLR9'un aktivasyonuna yol açabileceği ve böylece TLR9 aktivasyonunun nöronal ölümü uyarıcı etki yaratabileceği söylenebilir. Dolayısıyla bu süreç boyunca TLR9'un CpG ODN 2088 ile baskılanması endojen ligandlar tarafından TLR9 aktivasyonunu azaltacağı için TLR9'un nöronal ölümü uyarıcı etkisi indirgenebilir. Bununla beraber TLR9 aktivasyonunun sağlıklı nöronlarda ölüme yol açmadığı göz ardı edilmemelidir. Nitekim yapılan bir çalışmada fare kortikal nöron kültürleri TLR9 agonisti CpG ODN 1826 ile uyarıldığında nöronal canlılık üzerine herhangi bir etki gözlenmemiştir (D. Ma ve diğ. 2013). Bir başka çalışmada ise TLR9 agonisti CpG ODN 1826'nın kortikal nöron kültürlerinde tek başına apoptozu indükleyemediği ancak nöron kültürleri CpG ODN 1826 ve TLR7 agonisti *imiquimod* ile birlikte uyarıldığında nöronlarda apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (Mukherjee ve diğ. 2015). Bu çalışmalar da TLR9 aktivasyonunun belirli koşullarda nöronal ölüme aracılık edebileceği ve TLR9 antagonizminin nöronlarda koruyucu etki yaratabileceği görüşünü desteklemektedir.

CpG ODN 2088'in ER stresi ve UPR üzerine etkisini *in vivo* araştırmak için farelere T8 seviyesinde kontüzyon hasarı uygulanmış ve altı gün sonunda hasar merkezinde BiP ve PDI protein seviyeleri analiz edilmiştir. Omurilik hasarının farelerde hasar merkezinde BiP ve PDI protein ekspresyonlarını çarpıcı bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda omurilik hasarının UPR aktivasyonuna yol açtığı ve BiP, XBP1 ve CHOP mRNA ekspresyonlarını 6-24 saatlerde arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda hasarının erken aşamalarında UPR genlerinin ekspresyonunda artış meydana geldiği ve üçüncü gün sonunda mRNA seviyelerinin bazal seviyeye döndüğü belirtilmiştir (Ohri ve diğ. 2011, Penas ve diğ. 2007). Bununla beraber Penas ve diğ. (2007) omurilik yaralanmasının, hasar merkezinde BiP protein ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını western blot analizi ile göstermiş;

Ohri ve diğ. (2011) ise immünohistokimya analizi ile BiP, CHOP ve ATF4 protein ekspresyonunun nöronlarda altıncı saatten itibaren artmaya başladığını göstermiştir. Astrositlerde ise BiP ekspresyonu 3-7. günlerde belirlenmiştir (Ohri ve diğ. 2011). Bu tez çalışmasında elde edilen *in vivo* bulgular omurilik hasarının ER stresine ve UPR yolağının aktivasyonuna yol açtığına işaret etmesi açısından daha önce yapılan çalışmalarla uyumludur. Bununla beraber elde edilen bulgular ER stresinin omurilik yaralanmalarının sadece erken aşamalarında değil inflamasyonun ileri aşamalarında da devam ettiğine işaret etmektedir. Diğer çalışmalardan farklı olarak omurilik hasarının ardından ER stresinin altıncı güne kadar devam ediyor olması hasarın şiddetinden kaynaklanabilir. Bahsedilen her iki çalışmada da orta derecede omurilik hasarı uygulanmış ancak tez çalışmasında farelere ağır omurilik hasarı uygulanmıştır. Dolayısıyla ER stresine yol açan fizyolojik koşulların hala devam ettiği ya da omurilik hasarının ardından tetiklenen UPR yolağının hücre homeostazını henüz sağlayamadığı; böylece ER stres cevabının uzun süre korunduğu düşünülebilir.

Astrositler merkezi sinir sisteminde gliayı oluşturan temel hücrelerdir ve nöronal canlılığın ve işlevin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Dong ve Benveniste 2001, Ullian ve diğ. 2001). Omurilik yaralanmalarında astrositler yararlı (Faulkner ve diğ. 2004) ya da zararlı etkiler gösterebilirler (Bardoni ve diğ. 2010, Menet ve diğ. 2003). Reaktif astrositler hasar merkezinde glial skarı oluşturan ve aksonal rejenerasyonu engelleyen esas hücrelerdir (Cafferty ve diğ. 2010, McKeon ve diğ. 1991, Menet ve diğ. 2003, Okada ve diğ. 2004). Buna karşın astrositler nörotrofik faktörleri salgılayarak nöronları koruyucu etki de yaratabilirler. Ayrıca yapılan çalışmalar astrositlerin omurilik yaralanmalarının ardından nöropatik ağrı oluşumu ve merkezi hassaslaşmada önemli rol oynadığını göstermiştir (T. Liu ve diğ. 2012). TLR'lerin astrosit aktivasyonundaki rolü beyinde ve omurilikte yapılan çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. TLR aktivasyonunun yol açtığı durumların aktive olan TLR'ye ve bulunduğu hücreye göre değiştiği bilinmektedir (Heiman ve diğ. 2014). Örneğin yapılan bir çalışmada, TLR4 agonisti LPS'nin karışık glia-nöron kültürlerinde aksonların, oligodendrositlerin ve mikroglialının kaybına yol açtığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra aynı çalışmada saf kortikal nöron kültürlerinde LPS'nin nöronal hayatta kalımı etkilemediği ve LPS'nin bu toksik etkisinin mikroglial TLR4 aktivasyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir (Lehnardt ve diğ. 2003). Bir başka çalışmada ise, TLR 1-9 ligandlarıyla uyarılan saf kortikal nöron kültürlerinde *in vitro* canlı hücre sayısında anlamlı bir değişiklik meydana gelmezken TLR2, 4, 5 ve 6 ligandları ile uyarılan kortikal nöron-astrosit kültürlerinde astrositlerin bu TLR'lerin aktivasyonu ile nörotoksik

özellik kazandığı gösterilmiştir (D. Ma ve diğ. 2013). Bununla beraber, TLR9 agonisti ile indüklenen astrositlerin kortikal nöronların hayatta kalımı üzerine herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (D. Ma ve diğ. 2013). Aynı zamanda TLR9 aktivasyonunun kortikal astrositlerde astroglial işlevlerin düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (Butchi ve diğ. 2010). Ancak TLR9 antagonizminin omurilik astrositleri ve astrosit-nöron etkileşimleri üzerine etkisi henüz bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında TLR9 antagonizminin omurilik astrositlerinin bazal işlevleri ve astrosit-nöron etkileşimleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Daha önce yapılan *ex-vivo* çalışmalarda (David ve diğ. 2013) omurilik astrositlerinde TLR9 ekspresyonu gösterilmiştir. Bu bakımdan, tez çalışmasında TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in saf astrosit kültürlerine direkt etkisi araştırılmıştır ve CpG ODN 2088'in astrositlerden IL-6, MCP-1 ve CXCL1 kemokin ve sitokinlerinin salgısını azalttığı *in vitro* gösterilmiştir. Ayrıca, TLR9^{-/-} astrositlerle yapılan çalışmalarla da CpG ODN 2088'nin TLR9 aracılığı ile kemokin ve sitokin salgısını etkilediği doğrulanmıştır. Bu bulgular TLR9'un bazal astroglial işlevlerin düzenlenmesinde rol oynadığına işaret etmektedir. Sitokinler, kemokinler ve reseptörleri hem nöronal hem de glial hücrelerde sentezlenir ve glial aktivasyon aracılığıyla bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonunu kolaylaştırarak merkezi sinir sisteminin inflamatuvar cevabında önemli rol oynarlar (Y. L. Lee ve diğ. 2000). Bunun yanı sıra kemokinler ve reseptörleri, glia ve nöronlar arasında iletişime aracılık ederler (Z. J. Zhang ve diğ. 2013). Bu çalışmada analiz edilen sitokin ve kemokinlerin omurilik yaralanmalarıyla ilişkileri daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Omurilik yaralanmalarının ardından IL-6, MCP-1 ve CXCL-1 ekspresyonlarında artış meydana geldiği gösterilmiştir. Birkaç çalışmada IL-6, MCP1 ve CXCL1 moleküllerinin nöropatik ağrının gelişiminde görev aldığı gösterilmiştir (Guptarak ve diğ. 2013, Kiguchi ve diğ. 2012, Z. J. Zhang ve diğ. 2013) Örneğin, omurilik hasarı uygulanan ve kronik ağrı belirtisi gösteren sıçanların omuriliklerinde IL-6 ekspresyonunda ciddi bir artış olduğu belirlenmiştir (Guptarak ve diğ. 2013). Özellikle astrositlerden salgılanan CXCL-1 ve MCP-1'in merkezi hassasiyetin ve nöropatik ağrının korunmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (Gao ve diğ. 2009, Z. J. Zhang ve diğ. 2013). Bu nedenle *in vitro* elde edilen bulgular, CpG ODN 2088'in omurilik yaralanmalarının ardından tedavi amaçlı kullanımının ağrı seviyesini azaltması yönünde etki yaratabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada CpG ODN 2088'in astrositlerde bazal sitokin ve kemokin salgısını etkilediğinin belirlenmesi CpG ODN 2088 uygulanan astroglial CM'nin nöronal canlılık üzerine etkisini araştırmaya yöneltmiştir. CpG ODN 2088 ile muamele edilen

astrozitlerden elde edilen CM'lerin omurilik nöron kültürlerinde canlı nöron sayısını beklenmedik bir şekilde azalttığı belirlenmiştir. Astroglial TLR9 inhibisyonunun nöronal canlılık üzerine olumsuz etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmayı aydınlatmak amacıyla proteomik analiz yapılmıştır. Bu amaçla omurilik nöronları *vehicle* veya CpG ODN 2088 ile muamele edilen astrozitlerden elde edilen CM'lere maruz bırakılmış ve 24 sa inkübasyonun sonunda nöronlardan protein özütleri elde edilmiştir. Etiketsiz karşılaştırmalı proteom analizi CpG ODN 2088 ile muamele edilen astroglial CM'nin omurilik nöronlarında TrkB protein seviyesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir ve bulgu western blot analizi ile doğrulanmıştır. BDNF/TrkB sinyal iletimi hücre içinde farklı sinyal yollarını aktive ederek nöronal hayatta kalım, aksonal büyüme, sinaptik iletim gibi birçok nöronal işlevin düzenlenmesinde görev alır (Weishaupt ve diğ. 2012). TrkB'nin nöronal hayatta kalımı destekleyici etkisi göz önünde bulundurulduğunda omurilik nöronlarında TrkB'nin protein seviyesinin azalması, CpG ODN 2088'e maruz bırakılmış astrozitlerden elde edilen CM'nin omurilik nöron kültürlerinde canlı nöron sayısının azalmasına yol açan mekanizmalardan biri olabileceği düşünülebilir. Birçok çalışmada omurilik yaralanmalarında BDNF/TrkB ekspresyonunun ve sinyal iletiminin önemine dikkat çekilmiştir. Omurilik yaralanmalarının ardından torasik ve lomber omurilik dokusunda nörotrofin ve nörotrofin reseptörlerinin ekspresyonunda değişim meydana geldiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Qiao ve Vizzard 2005). Leibl ve diğ. (2001) kontüzyon hasarı uygulanan sıçanlarda hasarlı dokuda bir gün sonra bütün Trk reseptörlerinin transkripsiyonun azaldığını göstermiş ve bunun omurilik yaralanmalarının ardından hücre kaybına yol açan mekanizmalarından biri olabileceğine dikkat çekmiştir. Aynı çalışmada hasar çevresinde astrozitlerde ve ependimal hücrelerde *truncated* TrkB izoformunun ekspresyonun arttığı gösterilmiş ve bunun kronik omurilik yaralanmalarında BDNF'nin aksonal rejenerasyonu ve nöronal hayatta kalımı destekleyici etkisinin azalmasına neden olabileceği ileri sürülmüştür (Leibl ve diğ. 2001). Bir başka çalışmada C2 *hemisection* uygulanan sıçanlarda diyafram motor nöronlarında TrkB mRNA ve protein ekspresyonlarında artış meydana geldiği gösterilmiş ve BDNF/TrkB sinyal iletiminin yaralanmanın ardından diyafram işlevlerinin geri kazanımında önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Sieck ve Mantilla 2009). Bunların yanı sıra omurilik yaralanmalarının ardından BDNF uygulamasının nöronları koruyucu etkisi farklı çalışmalarda gösterilmiştir. T11 *hemisection* bölgesine BDNF enjeksiyonunun L1'de Clarke's Nucleus nöronlarının hayatta kalım oranını arttırdığı gösterilmiştir (Yick ve diğ. 1999). Buna karşın, servikal omurilik hasarının ardından BDNF'nin Clarke's Nucleus

nöronlarının kaybını azaltmadığı belirtilmiştir (Novikov ve diğ. 1997). Kısacası, BDNF/TrkB sinyal yolağının aktivasyonu hasar sonrası nöronların korunmasını ve hayatta kalımını uyarıcı etki oluşturmasına rağmen bu etki nöronal popülasyona ve hedef hücredeki reseptör ekspresyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir (Weishaupt ve diğ. 2012). Bu bilgiler ışığında, TLR9 inhibisyonu astrositlerden salınan BDNF miktarının azalmasına dolayısıyla bu astrositlerden elde edilen CM'lerle muamele edilen nöronlarda TrkB ekspresyonunun azalmasına neden olabileceği düşünülebilir. Ancak, hem astrositlerin hem de nöronların BDNF sentezlediği gerçeği göz ardı edilmemelidir. Bu bakımdan, nöron kültürlerinin astroglial CM ile muamelesinin nöronlardan BDNF salgısını ve dolayısıyla nöronal canlılığı etkileyebileceği de söylenebilir. Bu iki hipotezi test etmek amacıyla ELISA ile CM'deki BDNF konsantrasyonları ölçülmüştür. Ancak hem astrosit kültürlerindeki hem de nöron kültürlerindeki BDNF miktarları ELISA lineer aralığının altında olduğu için ölçüm yapılamamıştır. Bunun yanı sıra, CpG ODN 2088 ile muamele edilen astroglial CM omurilik nöronlarında TrkB ekspresyonunun azalmasına sebep olabileceği gibi TrkB seviyesindeki değişimin nedeni bu kültürlerde TrkB eksprese eden nöron sayısının azalması da olabilir. Bu çalışmada ilk defa astroglial TLR9 sinyal iletiminin omurilik nöronlarında TrkB sinyal yolağının düzenlenmesinde rol oynayabileceğine dikkat çekilmiş ancak TLR9 ile nörotrofin sinyal yolağı arasındaki ilişkinin aydınlatılması için birçok soruyu da beraberinde getirmiştir.

Astrositlerle yapılan bu deneylerden elde edilen sonuçların, TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in omurilik yaralanmaları üzerine olumlu etkileri [termal hassasiyetin, hasara bağlı inflamasyonun azalması (David ve diğ. 2013) ve mesane işlev kayıplarının iyileştirilmesi (David ve diğ. 2014)] ile çelişkili olduğu düşünülebilir. Ancak BDNF/TrkB sinyal iletiminin kronik ağrının oluşumunda ve devamlılığında önemli rol oynadığı göz ardı edilmemelidir. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada omuriliğe ekzojen BDNF enjeksiyonunun ağrı oluşumunu tetiklediği ve kronik ağrının devamlılığında görev aldığı gösterilmiştir (Constandil ve diğ. 2011). Bir başka çalışmada sıçanlarda sinir yaralanmalarına bağlı olarak spinal *dorsal horn*'da BDNF miktarının arttığı ve BDNF/TrkB sinyal yolağının nöropatik ağrı oluşumunu indüklediği belirtilmiştir (Geng ve diğ. 2010). Bu bağlamda CpG ODN 2088'in, farelerde omurilik yaralanmasına bağlı olarak gelişen ağrı hassasiyetini nöronal TrkB seviyesini astrosit aracılı etkenlerle düşürerek düzenleyebileceği düşünülebilir. Ancak bu olası mekanizmanın aydınlatılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, CpG ODN 2088'in kontüzyon hasarı uygulanan dişi farelerde hasar merkezinde *in vivo* TrkB ve TrkC protein seviyeleri

üzerine etkileri western blot yöntemi ile belirlenmiştir. *In vitro* bulgulardan farklı olarak TrkB ve TrkC protein seviyelerinde, hasara ya da CpG ODN 2088 muamelesine bağlı olarak herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Ancak bu bulgular dokudaki tüm hücrelerde TrkB ve TrkC seviyelerindeki değişimi yansıtmaktadır. Bu reseptörler merkezi sinir sisteminde sadece nöronlarda değil aynı zamanda glial hücrelerde de sentezlenmektedir (Liebl ve diğ. 2001). Western blot yöntemi protein ekspresyonlarındaki değişimin belirlenmesi için kullanılan güvenilir ve etkin bir yöntem olmasına rağmen proteinlerin hücre özgü değişimlerinin görüntülenmesi için immünohistokimya gibi farklı deneysel yaklaşımlar da kullanılmalıdır. Bu nedenle CpG ODN 2088'in omurilik yaralanmalarında *in vivo* TrkB ve TrkC sinyal yolağı üzerine etkisi daha sonra yapılacak olan çalışmalara bırakılmıştır.

Nöronların astroglial CM ile inkübasyonu astrositlerden salınan moleküllere karşı nöronların oluşturacağı cevabı araştırmak amacıyla kullanılan etkin bir yöntemdir. Ancak nöronlarda bulunan birçok reseptörün astrositlerde de eksprese edildiği bilinmektedir. Astrositlerin bu özelliği üçlü sinapslarda nöronlardan salınan sinyalleri algılamasını ve bu astrositlerin bu sinyallere cevap oluşturmasını sağlayarak nöronal işlevin düzenlenmesinde önem teşkil eder (Perea ve diğ. 2009). Dolayısıyla nöronlar ve astrositler arasındaki karşılıklı iletişim nöronal homeostazda önemli rol oynar. Bu bilgiler ışığında, çalışmada hücreler arasında dinamik iletişimin sağlandığı astrosit-nöron ko-kültürleri oluşturulmuş ve TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in nöronal canlılık üzerine etkisi araştırılmıştır. Ko-kültürler *vehicle* veya CpG ODN 2088 ile muamele edilmiş ve 24 saat sonunda nöronal canlılık ölçülmüştür. CpG ODN 2088 uygulanan ko-kültürlerde nöron sayısından anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Ancak CpG ODN 2088 uygulanan ko-kültürler ile nöron kültürleri kıyaslandığında kültürdeki canlı nöron sayısında bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bu bulgular CpG ODN 2088'in ko-kültürlerde astrositlerin nöronal hayatta kalımı destekleyici etkisini baskıladığını ancak nöronal sinyallerin varlığında CpG ODN 2088'in astroglial toksisiteye neden olmadığını düşündürmektedir. Bununla beraber TLR9^{-/-} astrosit-TLR^{+/+} nöron ko-kültürlerinde CpG ODN 2088 nöronal canlılığı etkilemediği gösterilmiştir. Böylece, astrosit-nöron ko-kültürlerinde CpG ODN 2088 muamelesinin ardından canlı nöron sayısındaki azalmanın astroglial TLR9'un baskılanmasından kaynaklandığı söylenebilir.

Özetle, bu çalışmada CpG ODN 2088'in omurilik nöronları üzerine direkt etkisi hayatta kalımı desteklemesi yönünde olmasına rağmen, astroglial TLR9'un baskılanmasının nöronal canlılığı olumsuz etkilediği ortaya konulmuştur.

5.1 Sınırlılıklar

Bu çalışmada omurilik nöron kültürlerinde CpG ODN 2088'in nöronları KA'nın yol açtığı hücre ölümünden koruduğu gösterilmiştir. Bunun tersine CpG ODN 2088'in astrosit aracılı etkisinin nöronal canlılığı azaltan yönde olduğu astroglial CM veya astrosit-nöron kültürlerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu kültürlerde ise nöronlara herhangi bir eksitotoksik hasar uygulanmamıştır. Dolayısıyla TLR9'un astrosit-aracılı etkisi omurilik nöronlarının bazal işlevleri üzerinedir. Bu sebeple, eksitotoksik hasar uygulanan omurilik nöronlarında TLR9'un astrosit aracılı etkisinin araştırılması da planlanmıştır. Ancak KA'nın astrositlerde de eksitotoksik hasar yarattığı bilindiğinden, astrosit-nöron ko-kültürlerinde yeniden bir doz optimizasyonu çalışması gerekmektedir. Benzer şekilde astrosit-nöron kültürlerinde CpG ODN 2088'in nöronal TrkB ve TrkC protein seviyeleri üzerine etkisinin araştırılması düşünülmüştür. Ancak ko-kültürlerle ilgili çalışmalar zaman kısıtlaması sebebiyle yapılamamış ve bu çalışmalar daha sonraki araştırmalara bırakılmıştır. Ayrıca TLR'lerin nöronlar üzerine direkt etkisini gösteren çok fazla çalışma olmadığı için tez çalışmasında daha çok bu alana odaklanılmıştır.

Tez çalışmasında *in vitro* bulguların yanı sıra CpG ODN 2088'in omurilik hasarı uygulanan farelerde hasar merkezindeki protein ekspresyonlarına etkisini gösteren bulgulara yer verilmiştir. Ancak *in vivo* elde edilen bu bulgular CpG ODN 2088'in hücre kültüründe yarattığı etkileri desteklememiştir. *In vitro* bulgular sadece nöronlarda protein ekspresyonundaki değişimi yansıtmaktadır, buna karşın *in vivo* çalışmalar tüm dokudaki protein miktarındaki değişimi ifade etmektedir. Omurilik hasarının hücrelerde yarattığı etki ve hücrelerin TLR ligandlarına cevabı farklı olduğu için proteomik yaklaşımların yanı sıra immünohistokimya gibi yöntemler kullanılarak hedef proteinlerin farklı hücrelerdeki değişimleri görüntülenebilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, elde edilen bulgulara dayanarak CpG ODN 2088'in omurilikte aynı anda birçok hücre tipinde etkili olabileceği ve bununla beraber CpG ODN 2088'in birçok farklı mekanizmayı düzenleyebileceği söylenebilir.

Bu çalışmada, omurilik yaralanması sırasında TLR9 antagonisti CpG ODN 2088'in nöronları ikincil hasardan ER stresi cevabını düzenleyerek direkt olarak veya hasar merkezinde pro-inflamatuar hücrel ve moleküler reaksiyonları azaltarak indirekt olarak koruyabileceği ileri sürülmüştür. Bunun yanı sıra CpG ODN 2088'in astrositlerin nöronları destekleyici etkisini kısıtlamasına rağmen IL-6, MCP-1 ve CXCL1 gibi kronik ağrı gelişiminde ve devamlılığının korunmasında yer aldığı bilinen bu sitokin ve kemokinlerin salgısını azaltarak astrositler aracılığıyla olumlu etki yaratabileceği de olasılık dahilindedir. Benzer şekilde astroglial TLR9 antagonizminin omurilik nöronlarında TrkB protein seviyesini azaltması CpG ODN 2088'in omurilik yaralanmalarının ardından TrkB'nin aracılık ettiği nöropatik ağrı oluşumunu etkileyebileceği düşünülebilir. Özetle, CpG ODN 2088'in nöronlarda direkt veya astrosit aracılı etkisi tamamen birbirinin karşıtı olmasına rağmen TLR9 antagonizminin omurilikte net etkisi yararlı yönde olabilir. Nitekim daha önceki çalışmada CpG ODN 2088'in nöropatik ağrı oluşumunu kısıtladığı ve omurilik yaralanmasına bağlı gelişen mesane işlev kaybını iyileştirdiği rapor edilmiştir (David ve diğ. 2013, 2014).

Tez çalışmasında TLR9'un omurilik nöronlarında eksitotoksisite ile uyarılan ER stresi cevabı ve UPR ile ilişkisine dikkat çekilmiştir ancak TLR9 ile UPR sinyal yolağı arasındaki mekanik ilişki ortaya konulamamıştır. UPR sinyal iletimi endojen veya ekzojen strese karşı hücre homeostazının korunmasında önemli bir mekanizma olduğundan ileriki çalışmalarda TLR9 ile UPR arasındaki etkileşimin aydınlatılması TLR9 ligandlarının tedavi amaçlı kullanımına yönelik çalışmalar için önem arz etmektedir.

Çalışmada dikkat çeken bir diğer bulgu omurilik nöronlarında CpG ODN 2088'in Parkin proteininin ekspresyonunu değiştirmesidir. Parkin proteini nöronlarda birçok proteinin proteazomal degradasyonuna öncülük ederek nöronal işlev ve hayatta kalımının düzenlenmesinde görev alır (Henn ve diğ. 2007). Parkin proteinin işlevleri özellikle Parkinson Hastalığı ile ilgili yapılan çalışmalarda tanımlanmış ve Parkin genindeki mutasyonların nörodejeneratif süreçlerle ilişkisi birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Bu bakımdan omurilik yaralanmalarında Parkin proteininin rolünün ve TLR9 ile ilişkisinin

ortaya konulması gerek omurilik yaralanmalarında nörodejeneratif mekanizmaların aydınlatılmasına gerekse tedaviye yönelik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayabilir.



KAYNAKLAR

- Abbott NJ, Römbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7(1):41–53, doi:10.1038/nrn1824.
- Alford S, Grillner S. The involvement of GABAB receptors and coupled G-proteins in spinal GABAergic presynaptic inhibition. *J. Neurosci.* 1991; 11(12):3718–3726
- Ameri K, Harris AL. Activating transcription factor 4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008; 40(1):14–21, doi:10.1016/j.biocel.2007.01.020.
- Anderson K V, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the Toll gene product. *Cell.* 1985; 42(3):791–798, doi:10.1016/0092-8674(85)90275-2.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG ve diğ. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron.* 2014; 81(4):728–739, doi:10.1016/j.neuron.2014.02.007.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E ve diğ. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. Role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(17):15028–15034, doi:10.1074/jbc.M200497200.
- Babiuk S, Mookherjee N, Pontarollo R ve diğ. TLR9^{-/-} and TLR9^{+/+} mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology.* 2004; 113(1):114–120, doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01938.x.
- Bardoni R, Ghirri A, Zonta M ve diğ. Glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signalling in the rat dorsal horn. *J. Physiol.* 2010; 588(Pt 5):831–846, doi:10.1113/jphysiol.2009.180570.
- Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ ve diğ. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J. Neurotrauma.* 2006; 23(5):635–659, doi:10.1089/neu.2006.23.635.
- Benham AM, van Lith M, Sitia R ve diğ. Ero1-PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2013; 368, doi:10.1098/rstb.2011.0403.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM ve diğ. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2(6):326–332, doi:10.1038/35014014.
- Blum R, Konnerth A. Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda).* 2005; 20:70–78, doi:10.1152/physiol.00042.2004.
- Bouman L, Schlierf A, Lutz AK ve diğ. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ.* 2011; 18(5):769–782, doi:10.1038/cdd.2010.142.
- Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu W-H ve diğ. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J. Exp. Med.* 2005; 202(1):145–156, doi:10.1084/jem.20041918.
- Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K ve diğ. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* 2007; 177(2):265–275, doi:10.1083/jcb.200612056.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D ve diğ. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002; 61(11):1013–1021,
- Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew M V. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 2015;, doi:10.1016/j.expneurol.2015.03.020.

- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH ve diğ. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*. 1999; 23(2):297–308, doi:10.1016/S0896-6273(00)80781-3.
- Butchi NB, Du M, Peterson KE. Interactions between TLR7 and TLR9 agonists and receptors regulate innate immune responses by astrocytes and microglia. *Glia*. 2010; 58(6):650–664, doi:10.1002/glia.20952.
- Cafferty WBJ, Yang S, Duffy PJ ve diğ. Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans. *J. Neurosci*. 2010; 27(9):2176–2185, doi:10.1523/JNEUROSCI.5176-06.2007.
- Calfon M, Zeng H, Urano F ve diğ. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002; 415(6867):92–96, doi:10.1038/nature01193.
- Carlson SL, Parrish ME, Springer JE ve diğ. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol*. 1998; 151(1):77–88, doi:10.1006/exnr.1998.6785.
- Carvalho AL, Calderia M V, Santos SD ve diğ. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br. J. Pharmacol*. 2008; 153(2007):S310–S324, doi:10.1038/sj.bjp.0707509.
- Casula M, Iyer AM, Splet WGM ve diğ. Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Neuroscience*. 2011; 179:233–243, doi:10.1016/j.neuroscience.2011.02.001.
- Celli J, Tsolis RM. Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: friends or foes? *Nat. Rev. Microbiol*. 2014; 13(2):71–82, doi:10.1038/nrmicro3393.
- Chao M V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci*. 2003; 4(4):299–309, doi:10.1038/nrn1078.
- Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2003; 23(2):137–149, doi:10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C.
- Constandil L, Aguilera R, Goich M ve diğ. Involvement of spinal cord BDNF in the generation and maintenance of chronic neuropathic pain in rats. *Brain Res. Bull*. 2011; 86(5-6):454–459, doi:10.1016/j.brainresbull.2011.08.008.
- Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL ve diğ. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med*. 1997; 3(1):73–76, doi:10.1038/nm0197-73.
- David BT, Ratnayake A, Amarante MA ve diğ. A toll-like receptor 9 antagonist reduces pain hypersensitivity and the inflammatory response in spinal cord injury. *Neurobiol. Dis*. 2013; 54:194–205, doi:10.1016/j.nbd.2012.12.012.
- David BT, Sampath S, Dong W ve diğ. A Toll-Like Receptor 9 antagonist improves bladder function and white matter sparing in spinal cord injury. *J. Neurotrauma*. 2014; 31(21):1800–1806, doi:10.1089/neu.2014.3357.
- Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia*. 2001; 36(2):180–190, doi:10.1002/glia.1107.
- Dufey E, Sepulveda D, Rojas-Rivera D ve diğ. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2014; 307:582–594, doi:10.1152/ajpcell.00258.2014.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ ve diğ. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci*. 2004; 24(9):2143–2155, doi:10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004.
- Friedman WJ, Black IB, Kaplan DR. Distribution of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the postnatal rat brain: An immunocytochemical study. *Neuroscience*. 1998; 84(1):101–114, doi:10.1016/S0306-4522(97)00526-5.
- Frisén J, Verge VM, Fried K ve diğ. Characterization of glial trkB receptors: differential response to injury in the central and peripheral nervous systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1993; 90(11):4971–5, doi:10.1073/pnas.90.11.4971.

- Gao Y-J, Zhang L, Samad OA ve diğ. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J. Neurosci.* 2009; 29(13):4096–4108, doi:10.1523/JNEUROSCI.3623-08.2009.
- Garcia-Segura LM, Melcangi RC. Steroids and Glial Cell Function. *Glia.* 2006; 54(14):485–498, doi:10.1002/glia.20404.
- Gassmann M, Bettler B. Regulation of neuronal GABAB receptor functions by subunit composition. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012; 13(6):380–394, doi:10.1038/nrn3249.
- Genestier L, Taillardet M, Mondiere P ve diğ. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol.* 2007; 178:7779–7786, doi:10.4049/jimmunol.178.12.7779.
- Geng SJ, Liao FF, Dang WH ve diğ. Contribution of the spinal cord BDNF to the development of neuropathic pain by activation of the NR2B-containing NMDA receptors in rats with spinal nerve ligation. *Exp. Neurol.* 2010; 222(2):256–266, doi:10.1016/j.expneurol.2010.01.003.
- Gondokaryono SP, Ushio H, Niyonsaba F ve diğ. The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 82(3):657–665, doi:10.1189/jlb.1206730.
- Guptarak J, Wanchoo S, Durham-Lee J ve diğ. Inhibition of IL-6 signaling: A novel therapeutic approach to treating spinal cord injury pain. *Pain.* 2013; 154(7):1115–1128, doi:10.1016/j.pain.2013.03.026.
- Guth L, Zhang Z, DiProsperos NA ve diğ. Spinal Cord Injury in the Rat: Treatment with Bacterial Lipopolysaccharide and Indomethacin Enhances Cellular Repair and Locomotor Function. *Exp. Neurol.* 1994; 126:76–87
- Gwak YS, Hulsebosch CE. GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology.* 2011; 60(5):799–808, doi:10.1016/j.neuropharm.2010.12.030.
- Hamby ME, Hewett JA, Hewett SJ. TGF- β 1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. *Glia.* 2006; 54(6):566–577, doi:10.1002/glia.20411.
- Hanisch UK, Johnson T V, Kipnis J. Toll-like receptors: roles in neuroprotection? *Trends Neurosci.* 2008; 31(4):176–182, doi:10.1016/j.tins.2008.01.005.
- Hansen RR, Malcangio M. Astrocytes—Multitaskers in chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 2013; 716(1-3):120–128, doi:10.1016/j.ejphar.2013.03.023.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y ve diğ. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell.* 2000; 6(5):1099–1108, doi:10.1016/S1097-2765(00)00108-8.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson K V. The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 1988; 52(2):269–279, doi:10.1016/0092-8674(88)90516-8.
- Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2003; 41(7):369–378, doi:10.1038/sj.sc.3101483.
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H ve diğ. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell.* 1999; 10(11):3787–99, doi:10.1091/mbc.10.11.3787.
- Heiman A, Pallottie A, Heary RF ve diğ. Toll-like receptors in central nervous system injury and disease: A focus on the spinal cord. *Brain. Behav. Immun.* 2014; 42:232–245, doi:10.1016/j.bbi.2014.06.203.
- Henn IH, Bouman L, Schlehe JS ve diğ. Parkin Mediates Neuroprotection through Activation of I κ B Kinase/Nuclear Factor- κ B Signaling. *J. Neurosci.* 2007; 27 (8):1868–1878, doi:10.1523/JNEUROSCI.5537-06.2007.
- Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;(January), doi:10.1038/nrm3270.

http://faculty.southwest.tn.edu/rburkett/A&P1_nervous_syst_organization.htm

http://www.invivogen.com/PDF/ODN1826_TDS.pdf

http://www.invivogen.com/PDF/ODN_2088_TDS.pdf

<http://www.newhealthadvisor.com/Spinal-Cord-Cross-Section.html>

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs384/en/>

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/spinal-cord-injury-20131202/en/>

Huang H, Evankovich J, Yan W ve diğ. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology*. 2011; 54(3):999–1008, doi:10.1002/hep.24501.

Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*. 1992; 257(5076):1496–1502, doi:10.1126/science.1523409.

Hwang JH, Yaksh TL. The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain*. 1997; 70(1):15–22

Jain A, McKeon RJ, Brady-Kalnay SM ve diğ. Sustained delivery of activated rho GTPases and BDNF promotes axon growth in CSPG-rich regions following spinal cord injury. *PLoS One*. 2011; 6(1), doi:10.1371/journal.pone.0016135.

Janssens S, Pulendran B, Lambrecht BN. Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. *Nat. Immunol*. 2014; 15(10):910–919, doi:10.1038/ni.2991.

Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2006; 117(5):979–987, doi:10.1016/j.jaci.2006.02.023.

Karacan I, Koyuncu H, Pekel O ve diğ. Traumatic spinal cord injuries in Turkey: a nation-wide epidemiological study. *Spinal Cord*. 2000; 38(11):697–701, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114778> adresinden erişildi.

Karikó K, Buckstein M, Ni H ve diğ. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. 2005; 23(2):165–175, doi:10.1016/j.immuni.2005.06.008.

Karimi-Abdolrezaee S, Billakanti R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury-beneficial and detrimental effects. *Mol. Neurobiol*. 2012; 46(2):251–264, doi:10.1007/s12035-012-8287-4.

Kawahara Y, Kwak S. Excitotoxicity and ALS: what is unique about the AMPA receptors expressed on spinal motor neurons? *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord*. 2005; 6(3):131–144, doi:10.1080/14660820510037872.

Kigerl KA, de Rivereo Vaccari JP, Dietrich DW ve diğ. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp. Neurol*. 2014; 258:5–16, doi:10.1016/j.expneurol.2014.01.001.

Kigerl KA, Lai W, Rivest S ve diğ. Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. *J. Neurochem*. 2007; 102(1):37–50, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04524.x.

Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr. Opin. Pharmacol*. 2012; 12(1):55–61, doi:10.1016/j.coph.2011.10.007.

Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2008; 7(12):1013–1030, doi:10.1038/nrd2755.

Kimata Y, Kimata YI, Shimizu Y ve diğ. Genetic Evidence for a Role of BiP / Kar2 That Regulates Ire1 in Response to Accumulation of Unfolded Proteins. *Mol. Biol. Cell*. 2003; 14(6):2559–2569, doi:10.1091/mbc.E02.

- Kurnellas MP, Li H, Jain MR ve diğ. Reduced expression of plasma membrane calcium ATPase 2 and collapsin response mediator protein 1 promotes death of spinal cord neurons. *Cell Death Differ.* 2010; 17(9):1501–1510, doi:10.1038/cdd.2010.54.
- Lafon M, Françoise M, Mireille L ve diğ. The Innate Immune Facet of Brain Human Neurons Express TLR-3 and Sense Viral dsRNA. *J. Mol. Neurosci.* 2006; 29(3):257–267, doi:10.1385/JMN/29.
- Lawless MW, Greene CM. Toll-like receptor signalling in liver disease: ER stress the missing link? *Cytokine.* 2012; 59(2):195–202, doi:10.1016/j.cyto.2012.04.003.
- Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol. Rev.* 2003; 23(21):7448–7459, doi:10.1128/MCB.23.21.7448.
- Lee YL, Shih K, Bao P ve diğ. Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord. *Neurochem. Int.* 2000; 36(4-5):417–425, doi:10.1016/S0197-0186(99)00133-3.
- Lehmann SM, Krüger C, Park B ve diğ. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 2012; 15(6):827–835, doi:10.1038/nn.3113.
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P ve diğ. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100(14):8514–8519, doi:10.1073/pnas.1432609100.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L ve diğ. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle* / Toll / cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996; 86(6):973–983
- Lenert PS. Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for Toll-like receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:986596, doi:10.1155/2010/986596.
- Liebl DJ, Huang W, Young W ve diğ. Regulation of Trk receptors following contusion of the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 2001; 167(1):15–26, doi:10.1006/exnr.2000.7548.
- Lin JH-C, Lou N, Kang N ve diğ. A central role of connexin 43 in hypoxic preconditioning. *J. Neurosci.* 2008; 28(3):681–695, doi:10.1523/JNEUROSCI.3827-07.2008.
- Liu D, Xu GY, Pan E ve diğ. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience.* 1999; 93(4):1383–1389, doi:10.1016/S0306-4522(99)00278-X.
- Liu T, Gao Y-J, Ji R-R. Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neurosci. Bull.* 2012; 28(2):131–144, doi:10.1007/s12264-012-1219-5.
- Liu XZ, Xu XM, Hu R ve diğ. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 1997; 17(14):5395–5406
- Ma D, Jin S, Li E ve diğ. The neurotoxic effect of astrocytes activated with toll-like receptor ligands. *J. Neuroimmunol.* 2013; 254(1-2):10–18, doi:10.1016/j.jneuroim.2012.08.010.
- Ma Y, Li J, Chiu I ve diğ. Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *J. Cell Biol.* 2006; 175(2):209–215, doi:10.1083/jcb.200606016.
- Marta M, Andersson Å, Isaksson M ve diğ. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38(2):565–575, doi:10.1002/eji.200737187.
- Martinon F, Chen X, Lee A ve diğ. Toll-like receptor activation of XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* 2010; 11(5):411–418, doi:10.1038/ni.1857.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS ve diğ. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 1991; 11(11):3398–3411
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997; 388(6640):394–397, doi:10.1038/41131.

- Menet V, Prieto M, Privat A ve diğ. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100(15):8999–9004, doi:10.1073/pnas.1533187100.
- Mills CD, Fullwood SD, Hulsebosch CE. Changes in metabotropic glutamate receptor expression following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 2001; 170(2):244–257, doi:10.1006/exnr.2001.7721.
- Mukherjee P, Winkler CW, Taylor KG ve diğ. SARM1, Not MyD88, mediates TLR7/TLR9-induced apoptosis in neurons. *J. Immunol.* 2015; 195(10):4913–4921, doi:10.4049/jimmunol.1500953.
- Mulligan SJ, MacVicar BA. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature.* 2004; 431(7005):195–199, doi:10.1038/nature02827.
- Nasic O, Lee J, Ye Z ve diğ. Acute and chronic changes in aquaporin 4 expression after spinal cord injury 2006; 143(3):779–792, doi:10.1016/j.neuroscience.2006.08.079.
- Nguyen MD. Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 2004; 24(6):1340–1349, doi:10.1523/JNEUROSCI.4786-03.2004.
- Novikov L, Novikova L, Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience.* 1997; 79(3):765–774, doi:10.1016/S0306-4522(96)00665-3.
- Obara M, Szeliga M, Albrecht J. Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: Facts and hypotheses. *Neurochem. Int.* 2008; 52(6):905–919, doi:10.1016/j.neuint.2007.10.015.
- Ogata M, Hino S, Saito A ve diğ. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress autophagy Is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 2006; 26(24):9220–9231, doi:10.1128/MCB.01453-06.
- Ohashi K, Burkart V, Flohe S ve diğ. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* 2000; 164(2):558–561, doi:10.4049/jimmunol.164.2.558.
- Ohri SS, Hetman M, Whittemore SR. Restoring endoplasmic reticulum homeostasis improves functional recovery after spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 2013; 58:29–37, doi:10.1016/j.nbd.2013.04.021.
- Ohri SS, Maddie MA, Zhao Y ve diğ. Attenuating the endoplasmic reticulum stress response improves functional recovery after spinal cord injury. *Glia.* 2011; 59(10):1489–1502, doi:10.1002/glia.21191.
- Okada S, Nakamura M, Mikami Y ve diğ. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.* 2004; 76(2):265–276, doi:10.1002/jnr.20044.
- Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD ve diğ. Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2009; 59(1):278–292, doi:10.1007/978-3-642-00549-7-6.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q ve diğ. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(9):7370–7377, doi:10.1074/jbc.M306793200.
- Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol. Rev.* 2014; 94(4):1077–1098, doi:10.1152/physrev.00041.2013.
- Penas C, Guzmán MS, Verdú E ve diğ. Spinal cord injury induces endoplasmic reticulum stress with different cell-type dependent response. *J. Neurochem.* 2007; 102(4):1242–1255, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04671.x.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 2009; 32(8):421–431, doi:10.1016/j.tins.2009.05.001.
- Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 2000; 6(1):67–70, doi:10.1038/71555.

- Puig A, Gilbert HF. Anti-chaperone behavior of BiP during the protein disulfide isomerase- catalyzed refolding of reduced denatured lysozyme. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(41):25889–25896,
- Qiao LY, Vizzard MA. Spinal cord injury-induced expression of TrkA, TrkB, phosphorylated CREB, and c-Jun in rat lumbosacral dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* 2005; 482(2):142–154, doi:10.1002/cne.20394.
- Rao KVR, Panickar KS, Jayakumar AR ve diğ. Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem. Res.* 2005; 30(10):1311–1318, doi:10.1007/s11064-005-8803-2.
- Rivera C. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J. Neurosci.* 2004; 24(19):4683–4691, doi:10.1523/JNEUROSCI.5265-03.2004.
- Robert Noiva. Protein disulfide isomerase: a multifunctional redox protein of the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1999; 10(5):481–493
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC ve diğ. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95(2):588–593, doi:10.1073/pnas.95.2.588.
- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8(7):519–529, doi:10.1038/nrm2199.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA ve diğ. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 1996; 16(3):675–686, doi:10.1016/S0896-6273(00)80086-0.
- Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM ve diğ. Mechanisms of cell death in hypoxia / reoxygenation injury. *Oncogene.* 1998; 17(25):3341–3349
- Schaefer L, Babelova A, Kiss E ve diğ. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(8):2223–2233, doi:10.1172/JCI23755.
- Schinder A. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 2000; 23(12):639–645, doi:10.1016/S0166-2236(00)01672-6.
- Serhatli M, Baysal K, Acilan C ve diğ. Proteomic study of the microdissected aortic media in human thoracic aortic aneurysms. *J. Proteome Res.* 2014; 13:5071–5080, <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/pr5006586> adresinden erişildi.
- Sethi S, Chourasia D, Parhar IS. Approaches for targeted proteomics and its potential applications in neuroscience. *J. Biosci.* 2015; 40(3):607–627, doi:10.1007/s12038-015-9537-1.
- Shen J, Chen X, Hendershot L ve diğ. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Dev. Cell.* 2002; 3(1):99–111, doi:doi:10.1016/S1534-5807(02)00203-4.
- Shimasaki S, Koga T, Shuto T ve diğ. Endoplasmic reticulum stress increases the expression and function of toll-like receptor-2 in epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 402(2):235–240, doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.132.
- Sieck GC, Mantilla CB. Role of neurotrophins in recovery of phrenic motor function following spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2009; 169(2):218–25, doi:10.1016/j.resp.2009.08.008.
- Silva NA, Sousa N, Reis RL. Progress in neurobiology from basics to clinical : A comprehensive review on spinal cord injury 2014; 114(3):25–57, doi:10.1016/j.pneurobio.2013.11.002.
- Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5(2):146–156, doi:10.1038/nrn1326.
- Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S ve diğ. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin. Epidemiol.* 2014; 6(9):309–31, doi:10.2147/CLEP.S68889.

- Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 2001; 167(5):2887–2894, doi:10.4049/jimmunol.167.5.2887.
- Sofroniew M V. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 2005; 11(5):400–407, doi:10.1177/1073858405278321.
- Sofroniew M V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015; 16(5):249–263, doi:10.1038/nrn3898.
- Sofroniew M V, Vinters H V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1):7–35, doi:10.1007/s00401-009-0619-8.
- Sokka AL, Putkonen N, Mudo G ve diğ. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *J. Neurosci.* 2007; 27(4):901–908, doi:10.1523/JNEUROSCI.4289-06.2007.
- Staropoli JF, McDermott C, Martinat C ve diğ. Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron.* 2003; 37(5):735–749, doi:10.1016/S0896-6273(03)00084-9.
- Stirling DP, Cummins K, Mishra M ve diğ. Toll-like receptor 2-mediated alternative activation of microglia is protective after spinal cord injury. *Brain.* 2014; 137(3):707–723, doi:10.1093/brain/awt341.
- Tadesse A, Gurfein BT, Zhang Y ve diğ. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; 106(6):1977–1982, doi:10.1073/pnas.0808698106.
- Tajiri S, Oyadomari S, Yano S ve diğ. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ.* 2004; 11(4):403–15, doi:10.1038/sj.cdd.4401365.
- Takano T, Kang J, Jaiswal JK ve diğ. Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102(45):16466–16471, doi:10.1073/pnas.0506382102.
- Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog. Neurobiol.* 1998; 56(3):341–358, doi:10.1016/S0301-0082(98)00049-5.
- Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.* 1991; doi:10.3171/jns.1991.75.1.0015.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J ve diğ. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 2002; 195(1):99–111, doi:10.1084/jem.20001858.
- The National SCI Statistical Center. Spinal cord injury facts and figures at a glance. 2014;(February):479–80, doi:10.1179/1079026814Z.000000000322.
- Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA ve diğ. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses.* 2011; 3(6):920–940, doi:10.3390/v3060920.
- Todd DJ, Lee A-H, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(9):663–674, doi:10.1038/nri2359.
- Touil T, Fitzgerald D, Zhang GX ve diğ. Cutting edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN- β . *J. Immunol.* 2006; 177(11):7505–7509, doi:10.4049/jimmunol.177.11.7505.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS ve diğ. Control of synapse number by glia. *Science.* 2001; 291(5504):657–661, doi:10.1126/science.291.5504.657.
- Vallières N, Berard JL, David S ve diğ. Systemic injections of lipopolysaccharide accelerates myelin phagocytosis during wallerian degeneration in the injured mouse spinal cord. *Glia.* 2006; 53(1):103–113, doi:10.1002/glia.20266.

- Van Noort JM, Bsibsi M. Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair. *Prog. Brain Res.* 2009; 175:139–48, doi:10.1016/S0079-6123(09)17509-X.
- Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW ve diğ. Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 2008; 28(50):13574–13581, doi:10.1523/JNEUROSCI.4099-08.2008.
- Vera-Portocarrero LP, Mills CD, Ye Z ve diğ. Rapid changes in expression of glutamate transporters after spinal cord injury. *Brain Res.* 2002; 927(1):104–10, doi:10.1016/S0006-8993(01)03329-7.
- Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005; 6(8):626–640, doi:10.1038/nrn1722.
- Wang C, Ko HS, Thomas B ve diğ. Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function. *Hum. Mol. Genet.* 2005; 14(24):3885–3897, doi:10.1093/hmg/ddi413.
- Wang Q, Yu S, Simonyi A ve diğ. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 2005; 31(1-3):3–16, doi:10.1385/MN:31:1-3:003.
- Weishaupt N, Blesch A, Fouad K. BDNF: The career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 2012; 238(2):254–264, doi:10.1016/j.expneurol.2012.09.001.
- Won YJ, Yoo JY, Lee JH ve diğ. Erythropoietin is neuroprotective on GABAergic neurons against kainic acid-excitotoxicity in the rat spinal cell cultures. *Brain Res.* 2007; 1154(1):31–39, doi:10.1016/j.brainres.2007.04.010.
- Yick LW, Wu WT, So KF ve diğ. Peripheral nerve graft and neurotrophic factors enhance neuronal survival and expression of nitric oxide synthase in Clarke's nucleus after hemisection of the spinal cord in adult rat. *Exp. Neurol.* 1999; 159(1):131–138, doi:10.1006/exnr.1999.7134.
- Yin HZ, Park DD, Lindsay AD ve diğ. Spinal cord neurons are vulnerable to rapidly triggered kainate neurotoxicity in vitro. *Brain Res.* 1995; 689(2):265–270, doi:10.1016/0006-8993(95)00532-U.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A ve diğ. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell.* 2001; 107(7):881–891, doi:10.1016/S0092-8674(01)00611-0.
- Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 2008; 454(7203):455–462, doi:10.1038/nature07203.
- Zhang L, Yu H, Zhao X ve diğ. Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* 2010; 57(5):547–55, doi:10.1016/j.neuint.2010.06.021.
- Zhang Q, Raoof M, Chen Y ve diğ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010; 464(7285):104–107, doi:10.1038/nature08780.
- Zhang X, Zhu J. Kainic acid-induced neurotoxicity: Targeting glial responses and glia-derived cytokines. *Curr. Neuropharmacol.* 2011; 9:388–398
- Zhang ZJ, Cao DL, Zhang X ve diğ. Chemokine contribution to neuropathic pain: Respective induction of CXCL1 and CXCR2 in spinal cord astrocytes and neurons. *Pain.* 2013; 154(10):2185–2197, doi:10.1016/j.pain.2013.07.002.

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı : Çiğdem ACIOĞLU
- Doğum Yeri ve Tarihi : Gaziantep, 22/05/1984
- Uyuşu : T.C
- Çalıştığı Kurum : Kilis 7 Aralık Üniversitesi
- İletişim Adresi : Şahintepe Mh. 133386 nolu Cd. Didemevler B1 blok no 16 Şahinbey/GAZİANTEP

2. Eğitimi

- 2013-2015 : Rutgers University New Jersey Medical School, Department of Neurological Surgery, Misafir Araştırmacı
- 2010-2016 : Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji ABD (Doktora)
- 2007-2010 : Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Moleküler Hücre Biyolojisi (Yüksek Lisans)
- 2008-2009 : University of Vigo, Faculty of Science, Department of Biology, Biochemistry and Molecular Biology Group, (Sokrates/Erasmus Programı Değişö Öğrencisi)
- 2003-2007 : İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (Lisans)
- Yabancı Dili : İngilizce, İspanyolca

3. Ünvanları

- 2010 : Uzman

4. Bilimsel Etkinlikler

• Seçilmiş Yayınlar

Evaluation of Serum and Ascitic Fluid Proteomes in Dogs with Dilated Cardiomyopathy Kocaturk M, Baykal AT , Turkseven S, **Acioğlu C**, Agudelo CF, Yılmaz Z, Kafkas Univ Vet Fak Derg (x): 2015 DOI: 10.9775/kvfd.2015.14429 (In-press)

C. Acioğlu, A.T. Baykal, R.F. Heary, S. Elkabes. Opposing. Effects of a Toll-Like Receptor 9 Antagonist on Spinal Cord Neuronal Viability Through Direct Versus

Astrocyte-Mediated Actions. 12. European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (2015) Bilbao, SPAIN.

Cigdem Acioglu, Robert F. Heary, Stella Elkabes. A Toll-Like Receptor 9 (TLR9) Antagonist Modulates the Constitutive Astrocyte Function and Astrocyte-Neuron Interactions. 83rd AANS Annual Scientific Meeting (2015) Washington, DC, USA

Cigdem Acioglu, Li Ni, Robert F. Heary, Stella Elkabes. A TLR9 antagonist modulates spinal cord astroglial function and the effects of astrocytes on neurons, in vitro. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Neuroscience 2014 Washington, DC, USA

Tang Z, Baykal AT, Gao H, Quezada HC, Zhang H, Bereczki E, Serhatli M, Baykal B, **Acioglu C**, Wang S, Ioja E, Ji X, Zhang Y, Guan Z, Winblad B, Pei JJ. mTor Is a Signaling Hub in Cell Survival: A Mass-Spectrometry-Based Proteomics Investigation. J Proteome Res. 2014 DOI: 10.1021/pr500192g

Cigdem Acioglu, Muge Serhatli, Ibrahim Hatipoglu, Emel Akgun, Ahmet Tarık Baykal Complex Specific inhibition of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells with Antimycin A Increases Ubiquitination, XXIV. National Biochemistry Congress/ Turkey 2012

Demiroglu-Zergeroglu A, **Acioglu C**. Effect of Quercetin on phosphorylation of mitogen activated protein kinases in malignant mesothelioma cells. 35th Congress of the Federation-of-European Biochemical-Societies, Gothenburg, SWEDEN Source: FEBS JOURNAL Volume: 277 PP: 145 Supplement: Suppl. 1 JUN 26-JUL 01, 2010

- **Aldığı Burslar**

Research Scholar; Department of Neurological Surgery, Rutgers University New Jersey Medical School, NJ, USA (2014-2015)

YÖK Yurt Dışı Doktora Araştırma Bursu (2013-2014)

TÜBİTAK-BİDEB Yurt İçi Lisans Eğitimi Destekleme Bursu (2007-2009)

- **Projeler**

Proteomik Yaklaşımlarla Nörodejeneratif Mekanizmaların Araştırılması ve Tedaviye Yönelik Potansiyel Hedeflerin Belirlenmesi (Doktora Tezi)

Kersetin ve Cisplatin Kombinasyonunun Malignant Mesotelioma Hücre Sinyallerine Etkisinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi)

**Institutional Animal Care and Use Committee
 Animal Use Form (version 2012-B)**

Table of Contents			
Section:	Page:	Section:	Page:
Section 1. Protocol Information	1	Section 10. Terminal Surgery	23
Section 2. Research Overview & Significance	2	Section 11. Animal Health, Pain, & Distress	24
Section 3. Experimental Design	4	Section 12. Post-Procedure Monitoring	24
Section 4. Animal Numbers	20	Section 13. Humane Endpoints & Euthanasia	24
Section 5. Antibody Production	22	Section 14. Rationale for Animal Use	26
Section 6. Genetic Modification of Animals	22	Section 15. Protocol Personnel	28
Section 7. Test Drugs, Chemicals, Materials, or Other Substances	22	Section 16. Principal Investigator Assurances	30
Section 8. Non-Surgical Procedures	23	Section 17. Signatures & Submission	31
Section 9. Survival Surgery	23	Section 18. Approvals	32

Section 1. Protocol Information

1A. Title & Species

Title:

Species: USDA Category: Is this a continuation of a previous protocol? No: Yes: Previous Protocol #:

1B. Principal Investigator

Last Name: First Name: Middle Name: Degrees: Academic Rank:

School: Department: email address:

Campus Mailing Address: PI Laboratory Address(es) where procedures are performed:

Office Telephone: Laboratory Telephone: Fax Number: Mobile Telephone:

1C. IACUC Use Only:

Overview

**Institutional Animal Care and Use Committee
 Animal Use Form (version 2012-B)**

15. Protocol Personnel						
1.	Name: Last: Elkabes	First: Stella	Middle:	Highest Degree: Ph.D.	Position Title: Associate Professor	Role in Project: Principal Investigator
Email Address: stella.elkabes@rutgers.edu		CMR Orientation Date: 1999-09-30		UMDNJ I.D. Number: A00115537		
Telephone (Work): (973) 972-5163		Emergency Contact (must provide mobile telephone number): <input checked="" type="checkbox"/>		Laboratory Safety Training Date: 2014-05-09		
Telephone (Mobile): (201) 349-8666		Records Keeper for USDA Regulated Species: <input type="checkbox"/>		Blood Borne Pathogens Training Date: 1999-10-20		
Describe animal research experience and plan for additional training if necessary: The PI has over 30 years experience with rodents and with cultures.						
2.	Name: Last: Acioglu	First: Cigdem	Middle:	Highest Degree: MS	Position Title: Other (Research Schola	Role in Project: Investigator
Email Address: acioglucigdem@gmail.com		CMR Orientation Date: 2013-08-14		UMDNJ I.D. Number: 00637777		
Telephone (Work): (973) 972-2870		Emergency Contact (must provide mobile telephone number): <input type="checkbox"/>		Laboratory Safety Training Date: 2014-10-10		
Telephone (Mobile):		Records Keeper for USDA Regulated Species: <input checked="" type="checkbox"/>		Blood Borne Pathogens Training Date: 2013-08-21		
Describe animal research experience and plan for additional training if necessary: Cigdem has been trained by the PI in culture methods and handling of rodents. She has one year experience with the approaches.						
Add another person to the protocol: <input type="button" value="ADD"/> Remove above person from protocol: <input type="button" value="REMOVE"/>						
3.	Name: Last: Pallottie	First: Alexandra	Middle:	Highest Degree: BS	Position Title: Graduate Student	Role in Project: Investigator
Email Address: pallotal@njms.rutgers.edu		CMR Orientation Date: 2011-08-17		UMDNJ I.D. Number: A00557742		
Telephone (Work): (973) 972-2870		Emergency Contact (must provide mobile telephone number): <input type="checkbox"/>		Laboratory Safety Training Date: 2014-06-13		
Telephone (Mobile):		Records Keeper for USDA Regulated Species: <input checked="" type="checkbox"/>		Blood Borne Pathogens Training Date: 2011-08-08		
Describe animal research experience and plan for additional training if necessary: Alex has three years experience with rodents.						
Add another person to the protocol: <input type="button" value="ADD"/> Remove above person from protocol: <input type="button" value="REMOVE"/>						
4.	Name: Last: Li	First: Lun	Middle:	Highest Degree: MS	Position Title: Graduate Student	Role in Project: Investigator

Personnel, Assurances, Signature & Submission

**Institutional Animal Care and Use Committee
 Animal Use Form (version 2012-B)**

17. Signatures & Submission

17A. SIGNATURES: The protocol must be signed & dated by the PI and Chair before it will be considered by the IACUC.

Principal Investigator Electronic Signature: **Stella Elkabes** Digitally signed by Stella Elkabes
 DN: cn=Stella Elkabes, o=ou, email=stella.elkabes@rutgers.edu, c=US
 Date: 2014.10.07 18:38:42 -04'00'

Department Chair or Supervisor of Principal Investigator Electronic Signature: **Charles J. Prestigiacomo, MD, FACS** Digitally signed by Charles J. Prestigiacomo, MD, FACS
 DN: cn=Charles J. Prestigiacomo, MD, FACS, ou=Department of Neurological Surgery, Rutgers New Jersey Medical School, ou=Professor and Chair, email=prestigiac@umdnj.edu, c=US
 Date: 2014.10.14 15:50:31 -04'00'

17B. SUBMISSION

Save the completed form on your computer.

Save As

Print the completed IACUC Protocol.

Print Form

Notes:
 The "Save" button will perform a "save as" function to save the form as a "fillable" pdf form.
 Always keep a "fillable" pdf version of your application for revisions, amendments, and renewals.
 The "Print Form" can be used to print a paper copy of the form or convert the form into "locked" pdf form by choosing either a paper printer or pdf printer, respectively.
 IACUC; ADMC Bldg. 14, room 1422; Newark

Personnel, Assurances, Signature & Submission

**Institutional Animal Care and Use Committee
 Animal Use Form (version 2011-B)**

18. Approvals			
P.I.	Elkabes, Stella null	Species:	Mouse
Title:	Astrocyte-neuron interactions: role of toll-like receptor 7 and 9		Protocol Number:
USDA Category:	C	Total Animals:	382
Facility:	Cancer Center RAF	Approval Date:	2014-11-04
		ExpirationDate:	2017-11-04

Electronic Signature and Date:

Chair, UMDNJ-NJMS IACUC

Director, Comparative Medicine Resources

Approvals