



T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER HASTALIĞI TRANSGENİK FARE MODELİNDE
NANO-LC-MS/MS METAPROTEOMİK ANALİZ YÖNTEMİ İLE
BAĞIRSAK FLORASINDAKİ DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI**

ESRA AYAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr Ahmet Tarık Baykal

İkinci Tez Danışmanı

Dr. Betül Şahin

İSTANBUL-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

07/07/2020

Esra Ayan

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu iki senelik muazzam süreç sadece iki kapak arasında tez yazmaktan ibaret değildi. Aldığım her bir ders, okuduğum her bir makale ve yaptığım her bir deney altın madeni hükmünde hayatıma büyük zenginlikler kattı. Mikro evreni müşahede ettikçe makro evrene iştियakım arttı. Her canlıya bakış açım daha da değişti daha da anlamlaştı. Her bir biyolojik mekanizmanın künhüne vakıf olma isteği anlatılamaz bir hal aldı. Bir cüz dahi olsam da kainatın her zerresine hizmet etmek isteğim ısrarlı bir niyet halini aldı. Hocalarımla tedrisatında hazırladığım bu tez de hizmetimin nacizane bir parçasıdır. Bu ilme olan tutkuma kelimeler kâfi gelemese de bana sunulan bu birkaç paragraflık özgürlüğümü, bu yolun imkanlarını açanları zikretmekle tüketmek istiyorum.

Bu güzel yolda beni hür kılan bu ilmin merakını kalbime nakşeden Allah'a ne kadar hamdetsem de yeteri kadar hamd etmekten acizim, O'nun sanatı O'nun zâtını methedecek kadar muhteşem.

Bu tez çalışması Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Acıbadem Labmed'in sağladığı ileri teknoloji araç ekipman ve kimyasal malzemelerle yapılmıştır. Danışmanlarıma, hocalarıma ve ekip arkadaşlarıma,

Ayrıca her daim koşulsuz sevgisini yanımda hissettiğim en büyük destekçim eşim Muhammed Taha Ayan'a her türlü yardımları için, teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	2
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	4
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Alzheimer Hastalığı	6
4.1.1. Tarihçe	6
4.1.2. Epidemiyoloji.....	7
4.1.3. Patofizyoloji.....	8
4.1.4. Alzheimer Hastalığı ilerleyişi	14
4.2. Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modeli	14
4.3. Bağırsak Mikrobiyotası ve Beyin ilişkisi	15
4.3.1. Mikrobiyota	15
4.3.2. Bağırsak-Beyin Aksı.....	16
4.4. Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modelinde bağırsak mikrobiyomu	27
4.5. Proteomiks.....	29
4.5.1. Metaproteomiks	30
5. GEREÇ VE YÖNTEM	32
5.1. Gereçler	32
5.1.1. Alet ve Gereçler	32
5.1.2. Kimyasallar	34
5.2. Yöntem	34
5.2.1. Deney gruplarının oluşturulması	34
5.2.2. Fare dışkılarından bakterilerin eldesi	35

5.2.3. Protein ekstraksiyonu.....	36
5.2.4. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi.....	36
5.2.5. Mikrodializ ve protein konsantrasyon tayini	36
5.2.6. FASP (Filter Aided Sample Preparation)	37
5.2.7. Nano sıvı kromografi – ardışık kütle spektrometresi analizi (nLC-MS/MS)	38
5.2.8. Biyoinformatik analiz	39
6. BULGULAR.....	40
6.1. Normal Yaşlanma Sürecinin Metaproteom Değişimi	43
6.2. Transgenik Yaşlanmanın Metaproteom Değişimi.....	47
6.3. İleri evre (12 aylık) Hasta ve Kontrol Kıyasının Metaproteom Değişimi.....	51
6.4. Erken evre (3-aylık) Hasta ve Kontrol Kıyasının Metaproteom Değişimi.....	59
6.5. Homolog Hasta ve Kontrol Organizmaların Kıyasının Metaproteom Değişimi	67
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	84
8. KAYNAKLAR	104
9. EKLER.....	128
EK 1 ETİK KURUL ONAYI.....	128
EK 2 ÖZGEÇMİŞ	130

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AH	Alzheimer Hastalığı
5-HT	Serotonin
5XFAD	5 mutasyonlu ailesel Alzheimer hastalığı
ABC	Amonyum Bikarbonat
ACN	Asetonitril
AH	Alzheimer Hastalığı
ALM	Kontrol Grup
ALZ	Tg grup
APOE	Alipoprotein
APOEϵ4	Alipoprotein E ϵ 4 aleli
APP	Amiloid Prekürsör Protein
Aβ	Amiloid beta
BOS	Beyin-Omurilik Sıvısı
CD14	cluster of differentiation 14
DIGE	jel tabanlı Diferansiyel Elektroforez
DTT	Dithiothreitol
ESS	Enterik Sinir Sistemi
FA	Formik Asit
FASP	Filtre Yardımı İle Örnek Hazırlama
GF	Germ-Free
HCl	Hidroklorik Asit
IAA	Iodoacetamide
IBD	İltihabi Bağırsak Hastalığı
IL-6	İnterlökin-6
iNOS	inducible NO synthase
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
LOAD	Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
LPR1	düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein 1
LPS	Lipopolisakkarit
MCI	Mild Cognitive Impairment
MD-2	myeloid differentiation 2
MS	Kütle spektrometrisi

MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
LC-MS/MS	Likit Kromatografi Ardışık Kütle Spektrometresi
NF-κB	nuclear factor kappa B
OSS	Otonom Sinir Sistemi
PBS	Fosfat-Tampon Saline
PH	Parkinson Hastalığı
PSEN1	Presenilin-1
PTM	Translasyon Sonrası Değişim
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliagrilamit Jel Elektroforezi
SIBO	Small Intestinal Bacterial Overgrowth
Tg	Transgenik
TLR2	Toll Like Receptor 2
TNF-α	Tümör Nekrozis Alfa
UPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
α-syn	alfa-sinüklein

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Soldan sağa doğru alzheimerlı sinir hücresinde fibriler değişimler.....	9
Şekil 2: Sınırlı senil atrofi durumunda sinir hücrelerinin fibriler değişimi.....	10
Şekil 3: Fibriler oluşum sergileyen glial hücrelerin senil demans sorumlusu plaklar ile ilişkisi.....	10
Şekil 4: A β plak oluşumu.....	12
Şekil 5: Proteomiks genel şeması.....	30
Şekil 6: Her biyolojik (A, B, C ve D) örneğin üçerli tekrarının nanoLC-MS/MS kromotogramı hali.....	42
Şekil 7: Normal yaşlanma analiz akışı.....	45
Şekil 8: Tg model yaşlanma analiz akışı.....	49
Şekil 9: İleri-evre modellerin analiz akışı.....	54
Şekil 10: İleri-evre unique modellerin analiz akışı.....	57
Şekil 11: Erken-evre modelin total analiz akışı.....	62
Şekil 12: Erken-evre modelin unique analiz akışı.....	65
Şekil 13: Homolog ALM ve ALZ kıyası analiz akışı.....	70
Şekil 14: Tüm örneklerden filtrelenerek elde edilen ileri-evre tg ve kontrol model analiz akışı.....	79
Şekil 15: Tezin oluşum aşamasında izlenen genel yolak.....	85
Şekil 16: Verilerimizin izinde, AH durumunda bağırsak-beyin eksenini disbiyozisinin genel şeması.....	102

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: AH patogeneğine mikrobiyotanın rolü üzerine yapılan hayvan deneyi çalışmaları	27
Tablo 2: Deneyde kullanılan alet ve gereçler	32
Tablo 3: Deneyde kullanılan kitler ve kimyasal maddeler	34
Tablo 4: Dört biyolojik örnekten elde edilen peptit, protein, organizma ve filumların miktarları ile peptit ve organizmaların venn şeması	40
Tablo 5: Normal yaşlanma sürecinde anlamlı çıkan proteinler ve organizmaları	46
Tablo 6: Tg yaşlanma sürecinde anlamlı çıkan proteinler ve organizmaları	50
Tablo 7: İleri evreyi temsil eden 12 aylık hasta ve normal fare total floralarında ortak ifade edilen anlamlı proteinler	57
Tablo 8: İleri evreyi temsil eden 12 aylık hasta ve normal fare unique floralarında ortak ifade edilen anlamlı proteinler	59
Tablo 9: Erken evre toplam ALM ve ALZ flora kıyası neticesinde ortak çıkan organizmaların ortak ifade olan proteinlerinin T-testine göre anlamlı olanları	65
Tablo 10: Erken evre toplam ALM ve ALZ flora kıyası neticesinde ortak çıkan organizmaların ortak ifade olan proteinlerinin T-testine göre anlamlı olanları	66
Tablo 11: Homolog 95 organizma analizi	71
Tablo 12: Homolog 12 organizma analiz tablosu	72
Tablo 13: Homolog 39 organizma analiz tablosu	73
Tablo 14: Homolog 22 organizma analiz tablosu	75
Tablo 15: Homolog 30 organizma analiz tablosu	76
Tablo 16: Toplam örneklerden sadece 12-aylık ALZ florasında bulunan mikroorganizmanın peptit sekansı ve protein bazında elde edilen verileri	80
Tablo 17: Toplam örneklerden sadece 12-aylık ALM florasında bulunan mikroorganizmanın protein bazında elde edilen verileri	82

1. ÖZET

Demansın en yaygın formu olarak görülen Alzheimer Hastalığı (AH); bilindiği üzere dejeneratif, kronik seyirli progresif bir hastalıktır. Bağırsak mikroorganizmalarının bilişsel kabiliyete olan etkisi gibi, AH patogenezindeki rolü üzerine de bir çok çalışma yapılmıştır Ancak literatürde insan ve transgenik hayvan modeli çalışmalarında gut mikrobiyotanın nörodejenerasyonla ilişkisi hakkında çalışmalar ve kritikler mevcut olsa da, metaproteomiks yöntemlerle mikrobiyotanın AH patogenezi üzerine etkisi çalışılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada, erken evreyi temsilen 3 aylık ve geç evreyi temsilen 12 aylık 5 mutasyonlu ailesel Alzheimer hastalığı (5XFAD) transgenik ve transgenik olmayan kontrol fare modellerinin, birbirleri ve kendi içlerindeki kıyasından neşet eden bağırsak mikrobiyota farklılıkları ve bu farklılıkların beraberinde getirdiği proteom profil devinimleri nano sıvı kromatografi ve ardışık kütle spektrometrisi kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar, mikrobiyotanın AH patogenezinde aktif rol oynadığına işaret etmektedir. Biyoinformatik analizler, bağırsak florasında domine yada eşsiz bazı kilit filumların, transkripsiyon, translasyon, enerji ve glukoz ilişkili proteinlerinin ve bilhassa transkripsiyon ve enerji mekanizması yollarının, AH patogenezi ile ilişkisi olduğunu göstermiştir. Her yönden erken-evre ve ileri-evre fare modeli floralar kıyaslanarak derinlemesine analiz edilmiştir. Veriler göstermektedir ki, bağırsakta gerçekleşen mikrobiyota, proteom ve dolayısıyla moleküler devinimler, hastalık semptomları kendini belli etmeden çok önceki dönemlerde ortaya çıktığı gibi ileri-evrelerde de normal yaşlı florasından bariz farklılıklar da ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda ilerletilen çalışmamız ile elde edilen ileri-evre ve erken-evre kilit filum, protein ve yolların markör olarak değerlendirilmeye kuvvetli bir aday olduğu, bu ve buna benzer çalışmalar için literatüre öncü bir çalışma olarak katkıda bulunacağı belirtilmiştir.

Anahtar Sözcükler: 5xFAD, Alzheimer Hastalığı, Metaproteomiks, nLC-MS/MS, Proteomiks

2. SUMMARY

Investigation of Change in In Flora in Alzheimer's Disease Transgenic Mouse Model by Nano-LC-MS/MS Metaproteomics Method

Alzheimer's Disease (AD), seen as the most common form of dementia, is a degenerative, chronic progressive disease. Just as the effect of intestinal microorganisms on cognitive ability, many studies have been conducted on the role of AD in pathogenesis. However, although there are studies and criticisms about the relationship between gut microbiota and neurodegeneration in human and transgenic animal model studies, the effect of microbiota on AD pathogenesis by metaproteomics methods has not been studied. Therefore, in this study, the differences of 3-month transgenic and control mice representing the early stage and 12-month transgenic and control mice representing the late-stage were investigated. Also, proteome profile change was investigated using nano Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. The results indicate that the microbiota plays an active role in the pathogenesis of AD. Bioinformatic analysis has demonstrated that dominated or some of the unique key phyla, transcription, translation, energy, and glucose-related proteins, and especially transcription and energy mechanism pathways, are associated with the pathogenesis of AD. In all aspects, early-stage and late-stage mouse models were analyzed in-depth by comparing flora. The data show that microbiota, proteome, and molecular movements in the intestine emerge long before the symptoms of the disease manifest themselves, as well as obvious differences from the normal aged flora in the late-stage. In this context, it is expressed that the late-stage and early-stage key phylum, protein, and pathways obtained with our advanced study are a strong candidate to be appreciated as markers and will contribute to the literature as a descriptive study for this and similar studies.

Keywords: 5xFAD, Alzheimer's Disease, Metaproteomics, nLC-MS/MS, Proteomics

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda kendini gösteren ‘Beyin-Bağırsak Aksı’ terimi, merkezi sinir sistemi (MSS) ve gastrointestinal sistem (enterik sinir-ESS- sistemi de dahil) arasındaki her türlü iletişimi iki yönlü olarak kapsayan bir terim olarak literatürde yerini almıştır. Bu çift yönlü etkileşimin farklı zaman noktalarında (erken yaşamdan nörodejenerasyona kadar) ve farklı yerlerde (bağırsak lümeninden MSS’e kadar) farklı seviyelerde etkinlik gösterdiğine dair güçlü kanıtlar mevcuttur. Bu zamana kadar bağırsaktaki mikrobiyotanın beyne etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar, ‘Beyin-Bağırsak Aksı’ terimini daha da genişletmeye ihtiyaç verecek seviyeye gelmiştir. Bu nedenle araştırmalarda ilk soru bağlantının hangi yollarla meydana geldiğine dair olmuş ve genel olarak bu iletişimin mekanizmaları, sinirsel, bağışıklık, endokrin ve metabolik sinyalleşme olarak kategorize edilmiştir (1,2). Gastrointestinal sistemle ilişkisi olan ESS, sinirsel yolakta prevertebral gangliyonları kapsayan sempatik ya da vagus siniri ile karakterize olan parasempatik sinyaller ile MSS’den etkilenme kabiliyetine sahiptir. Bu bağlamda steril fareler ile (germ-free) yürütülen çalışmalar, erken beyin gelişimi ve yetişkin nöronal gelişiminde, bağırsak florasının anahtar rolü bulunduğuna işaret etmektedir (2,3).

Yaşlılarda bağışıklık sisteminin aşırı uyarılması kronik inflamasyonu meydana getirirken aynı zamanda inflamasyonun yavaş ve dereceli bir şekilde dağılmasına da neden olur (4). Belki de bu durum, yaşlanmanın birlikte getirdiği mikrobiyal değişim ve çeşitliliğin azalmasının da etkisiyle immün sistemin başa çıkamayacağı bir hale gelmesiyle ilişkili olabilir. Böyle bir durumda da bağırsak bariyeri bozulup mikrobiyal ürünler ve pro-inflamatuar sitokinler dolaşıma karışabilir ve bu şekilde kan-beyin bariyerini aşarak nöroinflamasyona sebep olabilir (1,5). Bağışıklık sistemi, vücudu enfeksiyona karşı korumasının yanı sıra sinir fonksiyonunu ve gelişimini de etkiler. Bu bağlamda germ-free farelerde yapılmış bir çalışmada, mikrobiyotanın mikroglia olgunlaşması üzerine de etkisi olduğu belirtilmiştir. Buna, bakteri metabolizması ürünlerinden olan kısa zincirli yağ asitlerinin (İng. SCFA’s) aracılık ettiği; aynı şekilde mikrobiyal triptofan mekanizması sonucu oluşan spesifik ürünlerin de, aril (*aryl*)

hidrokarbon reseptörleri yoluyla astrosit aktivitesini modüle ettiği örnek olarak gösterilebilir. Mikrobiyota bu ve benzeri yolları kullanarak sistemik ve MSS inflamasyonunu etkileyen periferik immün hücre aktivasyonunu, sitokin profilini etkilediği gibi; yakın zamanda tanımlanmış meningeal boşluklardaki lenfatik damar ağının periferik lenfatik dokularının iki yönlü MSS ile etkileşmesi yoluyla nörogenezi de etkiler (1,3,6).

Gut florasının MSS'ye etkilerinden biri ve belki de en önemlisi serotonin, dopamin gibi çeşitli nörotransmitter ve nöromodülatörleri doğrudan sentezleyebilmesidir (7,8). En önemlisi de, gut mikrobiyota sinyallerinin, tıpkı bir ESS nöron transmitteri gibi davranarak; bağırsak epitelinin enterositleri arasında bulunan bir alt tip enteroendokrin hücreleri olarak bilinen ve vücuttaki en büyük serotonin (5-HT) havuzunun üretiminden ve depolanmasından sorumlu intestinal enterokromafin hücrelerinin fonksiyonuna etkide bulunabiliyor olmasıdır (7). ESS'de ki bu tarz etkileri göz önüne alındığı zaman beyin-gut-mikrobiyota aksının bozulmasının başta Alzheimer's olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde çok önemli bir rol oynayabileceği düşünülebilir (1,8). Literatürde insan ve transgenik hayvan modeli çalışmalarında gut mikrobiyotanın nörodejenerasyonla ilişkisi hakkında çalışmalar ve kritikler mevcut olsa da, bu zamana kadar metaproteomiks yöntemlerle hem transgenik ve kontrol modelin kendi içlerinde erken-geç kıyasının mikrobiyota ve proteom profil değişimlerine hem de hasta (ALZ; 5xFAD; transgenik; Tg) ve kontrolün birbirleriyle erken-erken/geç-geç kıyasının mikrobiyota ve proteom profil değişimlerine ışık tutulmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada amaç erken evreyi temsilen 3 aylık ve geç evreyi temsilen 12 aylık 5 mutasyonlu ailesel Alzheimer hastalığı transgenik ve transgenik olmayan kontrol fare modellerinin, birbirleri ve kendi içlerindeki kıyasından neşet eden bağırsak mikrobiyota farklılıkları ve bu farklılıkların beraberinde getirdiği proteom profil devinimleri nano sıvı kromatografi ve ardışık kütle spektrometrisi kullanılarak araştırılacaktır. Böylece hastalık semptomları kendini belli etmeden çok önceki dönemlerde ve ileri-evrelerde anlamlı değişimi bariz gözlenen mikrobiyota, proteom ve dolayısıyla moleküler devinimler tespit edilerek hem hastalığın oluşum mekanizmasına ışık tutmak ve hem de potansiyel biyobelirteç adaylarını tespit edilebilmek mümkün olacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Alzheimer Hastalığı

AH bilişsel fonksiyonlara ciddi zararlı etkileri bulunan ilerleyici ve bilinen en yaygın demans türüdür. Bilinen en önemli özelliği hücre dışı amiloid beta (A β) birikimi ile kendini gösteren senil plaklar ve hiperfosforilasyona uğramış tau proteini birikimi ile oluşan hücre içi nörofibriler yumaklardır (9,10). Bu birikimler nöroinflamasyonu tetikleyerek öncesinde sinaps kaybına ve akabinde hücre ölümüne sebep olur (5). Temelinde yatan net bir cevabı olmasa da bu birikimlerin oluşmasında gut mikrobiyomunun etkisinin büyük olduğu düşünülmektedir.

4.1.1. Tarihçe

Alzheimer demansı serüveni 51 yaşında bir kadında 4 senelik sürecek olan bir hastalığın postmortem tanımlanmasıyla başlamıştır. Her ne kadar böyle biliniyor olsa da aslında tarihsel açıdan demans temelli tanımlama ‘post-apolektik demans’ olarak 1672 yılında Thomas Willis tarafından yapılmıştır (11).

Demansın modern tarihi ise 1800’lerde Otto Binswanger, Alois Alzheimer ve 12 vaka kullanarak patogenezin beyin bağırsak ilişkisi temelli olduğunu belirten Oskar Fischer’in yaptıkları çalışmaları ile gün yüzüne çıkmıştır (12,13). Alois Alzheimer, nörosifiliz kokenli parolitik demansı vasküler demanstan ayıran kişidir ki sonraları bu başarısı bulduğu hastalığa Kraepelin tarafından ismi verilmiştir (14). Aslında orta yaş bireylerde nadir gözlenen presenil demans olarak keşfedilen bu hastalığın, 1964 yılında epidemiyolog Sir Martin Roth ve ark. yayınladıkları çalışmalarıyla yaşlılarda yaygın olduğu gösterilmiş oldu (15).

O dönemlerde ise bağırsak-beyin ilişkisinin AH'da en büyük etken olduğu da bu hipotezimizin yeni olmadığını göstermektedir (13,16). 1977'li yıllara gelindiğinde ise AH hakkında verilen bir konferans ile hastalığın tanımlanma seyri değişmiş, yaştan bağımsız bir terim haline gelmiştir (17).

4.1.2. Epidemiyoloji

AH'ı iki kısma ayırmak mümkündür. 65 yaşın altında erken-evre (early-onset Alzheimer's Disease, EOAD) olarak sınıflandırılırken; üstü, geç-evre (late-onset Alzheimer's Disease, LOAD) olarak sınıflandırılır. Bütün vakaların 1-5%'ini erken-evre oluşturur ve *APP*, *PSEN1* ve *PSEN2* genlerinde meydana gelen mutasyonla otozomal dominant karakter sergiler (9,18). Mutasyonun tipine bağlı olarak; total A β üretiminin artışı, A β ₄₂ üretiminin toplanma eğiliminde olması ya da aminoasit sekansında oluşan hasarlara bağlı olarak, hasarlı birikim özelliği kendini gösterir. Bu hasar ışığında meydana gelen A β 'nin toplanma eğilimi, AH oluşturmak için yeterli görülmüş, birikimi ise patogenezi için temel basamak sayılmıştır (18). AH vakalarının 99-95% gibi büyük bir kısmını geç-evre AH oluşturmaktadır. Geç-evre AH durumuna ise hem farklı genler katkıda bulunmaktadır; ki bu genler, amyloid prekürsör protein (APP) metabolizması, immün cevap, inflamasyon, hücre-içi trafik ya da lipid metabolizması gibi görevlerde yer alır, hem de kalp hastalıkları, beyin hasarı, hipertansiyon, tip II diyabet ve obesite gibi genetik olmayan faktörler katkıda bulunur (9,18).

4.1.3. Patofizyoloji

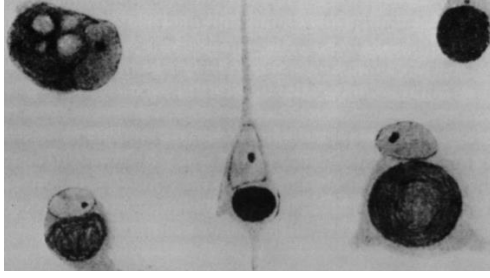
4.1.3.1. Nöropatoloji

A.Alzheimer ilk hastasını inceleyerek anektodlar belirleyip (19), ikinci hastası Johann F. ölümünden sonra makroskopik ve mikroskopik analizlerinde bir çok bulguya rastlamıştır. Makroskopik olarak beyin damarlarında değişim gözlemediğini anatomik olarak sadece orta kalınlıkta opaklık ve pia kalınlaşması gözlemediğini vurgulamış; frontal, parietal ve temporal lobların gyruslarında daralma, sulcuslarında genişlik görürken, merkezi gyrusta atrofi gözlemediğini ama genel olarak bir atrofik süreç bulunduğunu belirtmiştir. Mikroskopik analizlerinde ise korteksteki plakların atrofik olan bölgelerde, bu bölgelerin de frontal, parietal ve kısmen de temporalde bulunduğunu belirtmiştir. Beynin derin kısımlarına inildikçe striatumda, lentiform nuclei ve thalamus'da plak miktarında artış gözlemiştir, beyincik ve etrafı bölgesinde ise belirli beyincik bölgelerinde çok miktarda gözlerken, pons gri maddesinde ve medulla oblongata'da tek tek plaklar halinde görmüştür. Serebral korteks plaklarının bazılarının birbirleriyle kaynaşması neticesinde devasa büyüklükte oluşu, bu plakların birinci katmanda nadir sayıda ama ikinci ve üçüncü katmanda ve beyaz maddede daha fazla olması ve derinlere indikçe yoğunluğun azalması dikkat çektiği noktalardan biri olmuştur. Plakların ince analizi için farklı boyama tekniklerini kullanarak farklı şekillerde inceleme yapmıştır. Weigert'in glial emdirmesi ve Mann boyama tekniğinin birleşimi ile inceleme neticesinde plakların düzensiz, globoid ve yumurta şekilli olduklarını; merkezi bölgelerinin çoğunlukla homojen yapılarda ve içlerinde hiçbir hücre kalıntısı görülmediğini belirlemiştir. Serebral korteks plaklarında diğer bölgelerdeki plaklara göre merkezinden daha parlak ve koyu belirgin bir hale varlığına dikkat çekmiştir.



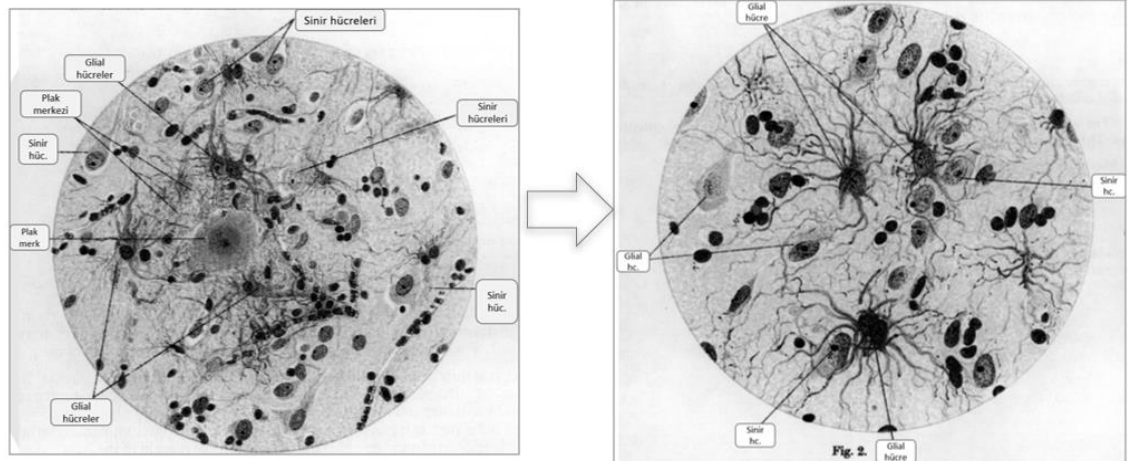
Şekil 1: Soldan sağa doğru alzheimerlı sinir hücresinde fibriler değişimler. Soldaki resim hastalığın erken evresi, ortadaki resim hastalayan ilerleyen süreci ve sağdaki evre hastalığın son evresi. (Alois Alzheimer'ın 1911 yılındaki *Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alter* adlı makalesinden uyarlanmıştır.)

Bu tarz incelemeleri sonucunda bu plaklar için senil demans tabiri kullanmıştır. Bu plaklar ilk etapta birçok araştırmacı tarafından psikoz neticesinde glial proliferasyon, nekroz, bakteri kolonisi, kümelenmiş detritus, örümcek hücreler yada iplik şeklinde tortular olduğu sanılsa da o yıllarda kesin sonuca varamamışlardır (16). Alois tarafından önceleri menşei serebral korteksteki Corpora amilacea gibi metabolik ürünlerin oluşturduğunu iddia ettiği senil plağın özel bir özelliği, plağın çekirdeğinin kırmızı ile boyanabilen ve Bielschowsky'nin yöntemiyle siyaha dönüşen lipoid granüllerle ve nadiren de sinir dokuları ile kaplanmış olmasıdır, ancak çeşitli hücrelerdeki lipoit maddelerden farklı olarak kararsız olmaları ve plak oluşumu için elzem olup olmamaları da diğer kayda değer özelliklerindedir. Alois, belirlediği senil tipi demansta plaklara ve fibril oluşumuna dikkat çekerek, fibril oluşumunun 3 aşama sonunda tamamen atrofiye sebep olduğunu ve son aşamada da hücre çekirdeği kaybolurken bariz glial kaymaların ciddi şekilde kendini gösterdiğini vurgulamıştır (Şekil-1). Son olarak hastalıkla karakterize edilmiş atrofiye sebep olan fibriler oluşumun senil demans tanısı konulabilecek formu meydana gelmektedir (Şekil-2).



Şekil 2: Sınırlı senil atrofi durumunda sinir hücrelerinin fibriler değişimi
(Alois Alzheimer'ın 1911 yılındaki *Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alter* adlı makalesinden uyarlanmıştır.)

Bu yavaş ve tuhaf görünümli fibrillerin gliada oluşması ardından kesitsel araştırmasına plaklarla olan ilişkisine bakmak için devam eden Alois, fibriler deforme olmuş gliaların senil demansın belirleyici olan plakların etrafında ciddi kümelenmelerine şahit olduğunu belirtmiştir (20) (Şekil-3) .



Şekil 3: Fibriler oluşum sergileyen glial hücrelerin senil demans sorumlusu plaklar ile ilişkisi.
Kesit sağ üst parietal lob korteksinden alınmışken sağdaki resim ise sağ üst parietal lob korteksinin daha derin tabakasından elde edilmiştir. (Alois Alzheimer'ın 1911 yılındaki *Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alter* adlı makalesinden uyarlanmıştır.)

4.1.3.2. Genetik altyapı

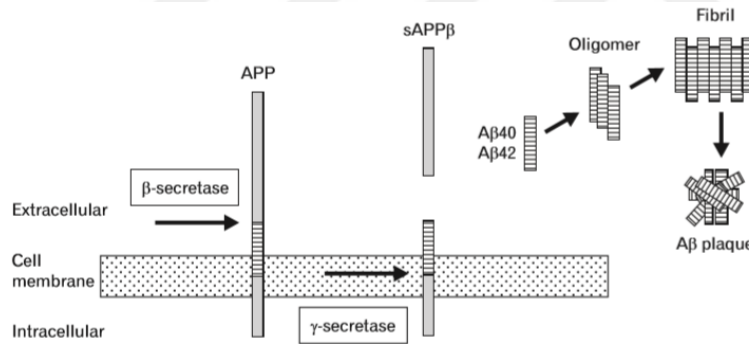
Başta alipoprotein (APOE) olmak üzere birçok genin de etkisiyle birlikte %1-5 arasında AH vakalarında genetik bir köken saptanmıştır (9). İkizler üzerinde yürütülmüş çalışmalarda hastalığın genetik riski %49-79 oranında seyrettiği gözlenmiştir (21,22). %0,01 oranında otozomal dominant kalıtım gözlenen verilerde ise hastalığın 65 yaş öncesinde çıkması beklenen bir durum olarak gözlenmiştir ki hastalığın bu formu literatürde erken başlangıçlı ailesel AH olarak yerini almıştır (21). Hastalığın genetiksel hikayesinde başlıca üç gendeki mutasyon göze çarpmaktadır: Presenilin 1, Presenilin 2 ve APP (23). Bu üç gende meydana gelen mutasyonlar ya A β ₄₂ miktarını yada bunun başka A β peptidlerine oranını değiştirmekte ve neticede geri dönüşümsüz SP oluşumuna sebebiyet vermektedir (24–26). Sporadik vakalarda ise otozomal dominant kalıtım gözlenmemekle birlikte çevresel ve genetik farklılıklar da risk faktörünü oluşturmaktadır ki en iyi bilinen genetik risk faktörü APOE'nin ϵ 4 allelidir (27,28). %1-5 arasına girmeyen AH'li bireylerin bile %40-80'inde APOE ϵ 4 alleli saptanmıştır (28). İncelemelerle sabittir ki, bu allel hastalık riskini heterozigot formatta üç kat, homozigot formatta ise 15 kat arttırmaktadır (21). Bununla birlikte ileri evre sporadik formatla ilişkili 400'e yakın ispatlanamayan gen görüntülenmiş, daha başka çalışmalarda ise 19 gen bölgesinde risklilik keşfedilmiştir (21,23,29).

4.1.3.3. Kolinerjik hipotezi

AH'nin asetilkolin nörotransmitter sentezinin azalmasıyla ilişkilendirilen ve en eski hipotez olmasına rağmen günümüzdeki ilaçların temellendiği hipotez olan kolinerjik hipotezi tedavi yöntemlerinin başarısızlığı ile bir nevi çürütülmüştür (30).

4.1.3.4. Amiloid hipotezi

AH'nin ana sebebinin hücre-dışı A β birikimleri olduğu savunulan görüştür (31). Amyloid plaklar, APP'nin kesilerek oluşturulan A β peptitlerinden meydana gelmektedir (32). APP bir transmembran proteindir ve nöronal gelişim, sinyal yolları, hücre-içi taşıma gibi çeşitli biyolojik proseslerde görev alır (33,34). APP, ya α - ve γ -sekretazlar ile amyloidejenik olmayan bir yolla ya da β - ve γ -sekretazlar ile amyloidojenik bir yolla kesilerek işlenir (32,33). Amyloidojenik yolak kullanılarak oluşturulan farklı uzunluktaki A β peptitleri arasında en sık karşılaşılan A β_{40} ama sık olmamasına rağmen en toksik olanı da A β_{42} peptitidir ki; plak özü bu peptitten oluşur (5). Bu peptitler toplanarak oligomer, protofibril ve fibriller oluşturur, bu şekilde senil plak oluşumuna katkıda bulunurlar (Şekil-4) (5,33,35). Monomerik ve oligomerik yapılar yerlerinden kesildikten sonra nükleasyon fazı denilen termodinamik olarak elverişsiz olduğu için normal fizyolojik koşullarda meydana pek gelmeyen bir olayla, kendi kendine çoğalan yeni amyloid kökleri oluşacaktır (35,36).



Şekil 4: A β plak oluşumu.

A β , APP'nin kesilmesiyle oluşur. Amyloidojenik yol kullanılarak β -ve γ -sekretazlar ile, sırasıyla, hücre membranının dışından ve membranın içinden kesilir. A β_{40} ve A β_{42} toplanarak sırasıyla oligomerler, fibriller ve amyloid plakları oluştururlar. Fibril aşamasında, daha sonra sürecin kendiliğinden ilerlemesini sağlayan yeni tohumlar oluşur. [Kowalski ve ark.'den uyarlanmıştır (1)]

21. kromozomda *APP* geninin bulunması ile Down Sendromlu hastalarda 40 yaşlarında AH semptomlarının gözlenmesi (37,38), *APOE* geninin ifadesi sonucunda oluşan proteinin AH riskini kanıtlanmış bir şekilde AH riskini artırıyor olması ve APP ifade eden transgenik farelerin de öğrenmede güçlük çekmesi sonucu farelerde A β plaklarının gözlenmesi ile karakterize bir şekilde farelerin AH benzeri patoloji sergilemesi gibi önemli noktalar hipotezi destekler niteliktedir (39–42). İlginç bir

şekilde, amiloid hipotezi ile ilgili olarak son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte A β , bir antimikrobiyal peptit (AMP) olarak kategorize edilmeye başlanmıştır (43,44). Monomerik A β yapısının bile antimikrobiyal kapasiteye sahip olması, kümelenmiş haldeki A β formunun potansiyel etkisine dikkat çekmektedir (44). Gözlemlere göre, amyloid oluşumu, bağışıklık sisteminde aktif rol alan, bakteriyel, viral ve fungal herhangi bir endojenik maddeyi tanıyan hücrelerin reseptörlerinden toll benzeri reseptör 2'nin (45), immün hücrelerde sinyallemede adaptör rolü üstlenen ve bütün TLR'ler tarafından kullanılan MyD88 proteininin (myeloid differentiation primary response 88), hücre dışından sinyal alan proteinleri hücre içindeki sinyalleri ileten proteinlere bağlayarak NF- κ B (nuclear factor kappa B) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlaması için uyardığı bir yolak vasıtasıyla meydana gelir (46,47). Yapılan hayvan deneyleri göstermiştir ki, MyD88 yetersizliği halinde β -amiloidosis durumu azalmakta yani iyileşme gözlenmektedir (48). İnflamasyon yolları harekete geçmeye başladığı için bir diğer yandan TNF- α dönüştürücü enzim ile birlikte üretilen TNF- α , APP'yi bölen α -sekretaz haline gelir. Daha önce üretilmiş olan NF- κ B ile A β dönüştürücü enzim de β -ve γ -sekretaz enzimlerini aktif ederler. Böylece daha önce belirtilen şekilde A β oluşumu meydana gelir (46). Normal durumlarda oldukça yararlı olan bu yolların cevabı netleşmemiş bir nedenden ötürü nörodejeneratif hastalıkları bile tetikleyecek kadar zararlı olduğu, gözlemlerle de tutarlıdır (43).

4.1.3.5. Tau hipotezi

Bu hipoteze göre, aksonal mikrotübüllerin stabilitesini düzenleyen, suda çözünebilir özelliğine sahip olan tau proteininin değişerek özelliğini kaybetmesi, işlevini gerçekleştirmemesi ve birikmesi neticesinde nörodejenerasyona sebebiyet verecek toksik bir hale gelmesinin hastalığı başlattığı savunulur (10,49).

4.1.4. Alzheimer Hastalığı ilerleyişi

AH, demansın en yaygın biçimi olarak kendini gösteren, MSS'nin dejenerasyonu ile karakterize, kronik seyreden progresif bir hastalıktır (50). Alois Alzheimer'ın hastalık seyrini kendi gözlemleriyle belirtmek gerekirse; kıskançlıkla ilk işaretini veren bu hastalık ilk etapta beliren patolojik izler ışığında hafif seyirde hafıza kaybı, okuma, nesne algılama, yön kavrama güçlüğü gibi semptomlarla kendini gösterirken; kısa dikkat, dürtüsellik ve zayıf muhakemenin belirttiği orta şiddette semptomlar ise parafazik terimlerin kullanılması (yani fincan yerine süt dökücü gibi...), zamanla dil yetisi kaybı ve temel motor beceri problemleri ile şiddetli bir hal alarak en son seviyeye kadar gelir ve hastalar her tedaviye rağmen dekübitüs geliştirmektedir. Ancak, patogenez sürecinde fiziksel ve refleksel cevaplar sıkıntılı değildir. Post-mortem beyin analizi yapan Alois Alzheimer'a göre, fokal dejenerasyon olmamasına rağmen kesitte eşit bir atrofi söz konusuydu ve büyük beyin damarlarında aterosklerotik değişiklikler mevcuttur. Anatomik yaklaşımında Alois, tek başına korteksin yaygın bir hastalığı ile uğraşmış olsalar bile, parietal ve temporal lobların iki taraflı olarak açıkça etkilendiğini ve frontalın, beyinden çok daha fazla etkilendiğini belirtmiştir(17). Moleküler seviyede ise, aşırı glial üretim neticesinde yoğun demetler halinde birikerek hücre yüzeyine doğru hareket eden ve sonunda hücreyi parçalayan nörofibrillerde kimyasal bir dönüşüm mevcuttu, öyle ki bu nörofibriller hem normal fibrillerin cevapsız kaldığı başka boyalarla reaksiyona girebilmekte hem de hücre ölümünden sonra bile kalıcılığını devam ettirebilmekteydi (19). Patogenez ilk olarak medial temporal lopta etorhinal korteks ve hipokampus gibi sınırlı bir yerde kendini gösteriyor olsa da, sırasıyla lateral, pariyetal ve frontal loplara yavaşça yayılarak başta tüm kortekse dağılmakla birlikte zamanla tüm beyni kaplar ve dolayısıyla beyin atrofisi meydana gelir (51,52)

4.2. Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modeli

AH klinik düzeyde incelenebilen ve müdahale edilebilen bir hastalık değildir. Yıllardır hastalığın künhüne vakıf olabilmek adına çeşitli teknikler geliştirilmeye çalışılmışsa

da hayatta olan bireyin beynine moleküler yada klinik bazda müdahalede bulunulamamıştır. Her ne kadar kan, BOS, idrar gibi örnekler hastadan sağlansa da tam olarak hastalığın menşei olmadığı için çalışmalardan verimli sonuç alınamamıştır. Öte yandan postmortem incelemeler hastalık patogenezinin erken müdahale edilmesi açısından değerlendirildiğinde bu problemlerin üstesinden gelmek için başvurulacak yöntem değildir. O yüzden *in-vivo* anlamda transgenik hayvan modelleri ile çalışmak bir çok problemi tabir caizse *real-time* izleyebilmek ve periyodik müdahalelerde bulunabilmek açısından önemli bir yöntem olagelmiştir. Transgenik modellerin keşfi ile AH vb. nörodejeneratif hastalıkların moleküler ve patolojik yönü birçok çalışmayla başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (53,54) İnsanlarda genetik yatkınlığın en gözde formları olan APP, PSEN1, tau gibi genlere müdahale edilerek ekspresyonları artırılmış, ab birikimi, senil plak, nörofibril yumak gibi hastalığın patogenezinde birinci dereceden rol oynayan yolaklar insanları mimik eden bu canlıların sayesinde daha anlaşılır hale gelmiştir (55–57). Bu bağlamda çalışmamızda tercih ettiğimiz beş mutasyonlu ailesel AH (5XFAD) transgenik model, hızlı A β birikimi ile en çok tercih edilen Alzheimer modelidir (56). Mutasyonlar, Florida (I716V), İsveç (K670N, M671L) ve Londra (V717I) insan APP genlerinin yanında L286V ve M146L insan PSEN1 mutasyonlarını da barındırmaktadır. *Thy1* promotörlüğü ile 2-4 ay içerisinde korteks ve hipokampus bölgelerinde öğrenme-bellek kaybı ile karakterize değişimler, intraselüler A β birikimleri gözlenmeye başlar (58). Artık dördüncü aydan sonra amiloid plaklarla beraber korteks-ilişkili bilişsel bozukluklar baş gösterir (59) 5XFAD modelde tau patolojisi gözlenmese de ileri A β birikimi atrofiyle karakterize şekilde AH modeli oluşturmak için gerekli ve yeterlidir (60).

4.3. Bağırsak Mikrobiyotası ve Beyin ilişkisi

4.3.1. Mikrobiyota

İnsan bağırsağı; içinde temel olarak Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinomycetes, Verrucomicrobia ve Fusobacteria filumlarını barındıran bakteriler, mantarlar, parazitler ve virüsler gibi çeşitli domainleri içerir (61,62). Sıklıkla

alıntılanan rakamlar, insan vücudunda ve üzerinde yaşayan mikropların insan hücrelerine 10: 1 oranında daha fazla olduğunu gösterirken, daha yakın tarihli bir tahmin, hücre sayısı açısından insanın bir parçasının mikrop olduğu ironisini göstermektedir. Bu bin küsür fazlalık türleri ve yaklaşık 160 küsür tür çeşitliliğin tamamı mikrobiyota olarak isimlendirilirken genomiks temelli mikrobiyom terimi ise bu organizmaların taşıdıkları tüm genleri ifade etmektedir (63–65). Bu ortak mikroorganizmalar insan sağlığında sindirilemeyen besinlerin yıkılması, vitamin üretimi, bağışıklık sisteminin güçlenmesi ve patojenik bakteri türlerinin bağırsağı kolonize etmesi gibi hayati rolleri vardır (65). Her ne kadar bireyden bireye mikrobiyota çeşitliliği değişiklik gösterse de genel işlevselliğin korunması temelinden bakıldığı zaman her bireyde çekirdek hükmünde bir bağırsak florasının gerekli olduğu düşünülmektedir (66). Bu floranın kendine ait bir yaşam süreci olduğu için her ne kadar simbiyotik de olsalar, bu popülasyonun miktarı ve kalitesindeki değişiklikler dengeyi bozabilir ve bu karmaşık mikro-ekolojik sistemi etkileyerek hastalıklara yol açabilir (61). Öyle ki; masumane bir probiyotik takviyesinde bile, bağırsakta bulunan trilyonlarca mikroorganizma arasından kendileri için bir niş açmak zorunda oldukları için, yeni bakteri girdisinin sonuçları kısmen ilgili konağın mevcut mikrobiyotasına bağlı olacaktır ve dolayısıyla, sadece bir suş girdisi bile çok büyük etkilerle ekolojik değişimi tetikleyebilecektir (65). Bunun dışında, enflamatuar bağırsak hastalığı, ateroskleroz, metabolik sendrom, otizm, diyabetes mellitus, yağlı karaciğer hastalığı, ve immünyetmezlik gibi bir çok hastalıkta yapılan incelemeler sonucunda da, hastaların bağırsak mikro-çevresinde değişiklik olduğu tespit edilmiştir. (67,68). Ayrıca böyle mikrobiyal disbiyozislerin mental aktivitelere olan etkisi açısından da depresyon, anksiyete ve içinde Alzheimer Hastalığı (AH)'nın da bulunduğu nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok nörolojik hastalığın patolojisine katkıda bulunduğu da ileri sürülmektedir (69).

4.3.2. Bağırsak-Beyin Aksı

Bağırsak ve beynin iki yönlü karmaşık ilişkisine araştırmacılar, Bağırsak-Beyin Aksı (Gut-Brain Axis) terimini önermişlerdir. Nörotransmitter salgısı gibi nöral, bağırsak

hormonları açısından endokrin ve bağırsak duvarındaki T hücrelerini ve B hücrelerini aktive edilebilmesi ile pro-inflamatuar sitokinlerin salınmasını tetiklemesi (70) gibi bağışıklık sistemi aracılığıyla, bağırsak ve beyin arasındaki iki yönlü bu iletişimin mümkün kılındığı gastrointestinal yapıda MSS, otonom sinir sistemi (OSS) ve ESS sistemleri büyük rollere sahiptir. ESS yönetimi, bu iki yönlü iletişimi ve akabinde getirilerini anlamak açısından çok önemlidir. Dört seviyeli sinir düzenlemeleri ile yönetilen ESS'de, lokal düzenleme olarak adlandırılan birinci seviyede, sindirim sistemi kas tabakası içine dağılan OSS orijinli miyenterik ve bağırsak submukozal sinir hücreleri ile ESS'nin duyu nöronları bağlantıya geçerek bağımsız şekilde bir takım işlevler yerine getirebilmekteyken; ESS'nin yanısıra MSS'nin de dahil olduğu prevertebral düğümlerle regülasyon ikinci seviyeyi oluşturur. Sadece MSS'nin yer aldığı üçüncü seviyede, beyin ve omurilik kökenli iletilerin ya doğrudan yada OSS veya nöroendokrin sistemlerle dolaylı şekilde regülasyonu söz konusudur. Dördüncü ve gelişmiş beyin merkezlerinin rol aldığı son seviyede ise korteks ve subkortikal bölgeler regülasyona katılmaktadır. Bu iletişim şekilleriyle kan-beyin bariyerinin geçirgenliği arttırılabildiği gibi, bariyer hattı boyunca sıralanmış hücreler, dolayısıyla reseptörler, bariyerin kan tarafında olduğu için beyne girmeden de etki meydana getirilebilir (71). Bağırsaktan beyne yol sadece bu iletişimlerle sınırlı değildir, bağırsağın vagus siniri vasıtasıyla direkt beyinle iletişime geçebilme kabiliyetini de dikkate almak gerekir ki (72,73), bağırsak kökenli bir vagus sinyali floral kökenli bir anti-inflamatuar yanıtı tetikleyebilir (70), mikrobiyal disfonksiyon meydana getirebilir (74), beyin fonksiyonlarına müdahale edebilir hatta erişkin hipokampal nörojenez e etkisiyle davranış değişikliklerine bile yol açabilir (66). Bununla ilgili yapılan bir çalışmada Bravo ve ekibi (2011) vagus sinirini keserek *Lactobacillus rhamnosus* JB-1'in farelerde anksiyete ve depresyonla ilişkili davranışları azaltmasını engellediğini göstermişlerdir (70). Başka bir çalışmada ise Holmqvist ve ekibi (2014) α -synükleinin bağırsak duvarından vagus siniri ile beyin sapına göç edebileceği ve vagus sinir kesimi olan bireylerde de Parkinson hastalığı riskinin düşebileceği gösterilmiştir (75).

4.3.2.1. Bağırsak mikrobiyotası ve nörolojik hastalıklar

Bağırsak mikrobiyotasının beyin fonksiyonu üzerindeki etkisi sürekli araştırılmaktadır ve stresle ilişkili durumların veya işlevsel bozuklukların patogeneze, beyin-bağırsak-mikrobiyota ekseninin mekanizmaları keşfedilmektedir (76). Öyle ki, bu eksen sayesinde mikrobiyotanın, hastalığın oluşum sürecindeki başlatıcı basamakları tetiklediği düşünülmektedir. Normal yaşlanma sürecinde mikrobiyotada ki çeşitliliğin azalması içinde nörodejenerasyonunda bulunduğu bir çok hastalığın patofizyolojisinde önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmasının yanı sıra (77,78), devinim sergileyen mikrobiyotanın da hastalığın temel patofizyolojik faktörlerinden biri olduğu; irritabl bağırsak sendromunda elde edilen bazı ön sonuçlar vasıtasıyla (79), AD veya AD'siz demans gelişimi için de ciddi bir risk olduğunu göstermektedir (80). Bağırsak mikrobiyotasının, depresyon, otizm, şizofreni, Parkinson hastalığı ve multiple skleröz gibi bir dizi nörolojik ve psikiyatrik bozukluğu olan hastalarda, sağlıklı kontrollere göre, dysbiosizinin etkisinin çok büyük olduğu çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (2,3,76,81,82).

4.3.2.1.1. Bağırsak mikrobiyotası ve Alzheimer Hastalığı

Demansın en yaygın formu olarak görülen AH; bilindiği üzere dejeneratif, kronik seyirli progresif bir hastalıktır. Progresyonu hafıza kaybı, düşünce değişiklikleri ve diğer beyin işlevlerindeki bozulmalar ile karakterizedir. Yavaş ilerleyerek, beynin farklı bölgelerinde kolinerjik sürecin kaybedilerek en son atrofi ile karakterize olan beyin hasarı ve ölümüne neden olur (51,52,83). Bağırsak mikroorganizmalarının bilişsel kabiliyete olan etkisi gibi, AH patogenezindeki rolü üzerine de bir çok çalışma yapılmıştır. Bruce-Keller ve ekibi, kontrol olarak tercih edilen C57BL/7 farelerini normal ve yüksek yağlı besinlerle beslemiş, neticede yüksek yağlı besinlerle beslenen farelerin bilişsel gerilemelerine şahit olmuşlardır. Bu farelerin mikrobiyotası, germ free (GF) farelere transfer edildiğinde bu farelerde bilişsel bozukluk ile sistemik ve merkezi inflamatuvar yanıtlar gözlenmiştir (84). Araştırmalar neticesinde mikrobiyota disbiyozisinin neden olduğu inflamasyonun KBB değişikliğine neden olduğu ve beyni

etkilediği gerçeği kaçınılmaz bir hal almıştır. Buna en büyük örnek, bağırsak epitellerindeki sıkı bağlantısı nedeniyle normal koşullarda dolaşıma geçmeyen bakteriyel LPS endotoksininin, bağırsak geçirgenliğinin bozulmasıyla dolaşıma geçtiği ve inflamatuvar yanıtları tetiklediği gerçeği verilebilir. Zira yapılan klinik çalışmalar AH olanlarda plazma LPS oranının AH olmayanlara nazaran en az üç kat fazla olduğunu göstermektedir (85,86) Mikrobiyota disbiyozisi hem bağırsak geçirgenliğini hem de Kan-Beyin Bariyeri (KBB) bütünlüğünü bozarak özellikle yaşlılarda kronik inflamasyonun tetiklenmesini ve bakteriyel amiloid ve lipopolisakkaritlerle (LPS) tetiklenen inflamatuvar yanıtların mikroglia vb. bağışıklık hücreleriyle olan kısır döngüsüne sebebiyet verir (51). A β plakların menşei olan APP, normalde ESS tarafından ifade olunan, bağırsak bakterileri tarafından salgılanan bir proteindir. Normal şartlarda önemli işlevleri olan bu proteinin aşırı ifadesi MSS işlevine hanel getirmektedir. Özellikle *E.coli* ve *S.enterica* APP ifadesinde ölçüyü kaçırabilen ve böylece AH patogenezinde rol oynayan bir çok bakteriden bir kaçıdır (87). ESS ve MSS-A β interaksiyonunda bakteri yada mantar menşeili amiloidlerin ölçüsüz salgısı MSS A β dinamiğinin dengesine zarar vermekte ve MSS'de de A β düzeyini arttırarak AH riskine sebep olmaktadır. İlginçtir ki, %95'i bağırsaklardan salgılanan serotonin varlığı da A β plaklarının oluşumunu azaltabilecek potansiyelde kanıtları olan başka bir bağırsak menşeili ürün olarak litertaürde yer etmiştir (86,88). Son yapılan çalışmalarda da bağırsak mikrobiyotasının mikroglial olgunlaşma ve aktifleşmesinde gerekli olduğu ve iNOS salgısında kaynak görevi gördüğu belirtilmiştir (87).

4.3.2.1.2. Enterik Sinir Sistemi, Bakteriye Ürünler ve Alzheimer Hastalığı

İlişkisi

ESS sindirim sisteminde, iki yönlü olarak MSS ile bağlantıda olan, birbirini etkileyen ama MSS'den bağımsız fonksiyonlar da gösterebilen içsel sinir sistemidir. Bu tanımdan da anlaşılacağı üzere iki yönlü iletişim durumu, hasıl olan bir hastalığın da yayılabileceğine imkan tanımaktadır (89). Bu konuda farklı hastalıkların çalışmaları mevcutsa da nörodejeneratif vakalarda sindirim sistemi hasarı yeni yeni çalışılmaya başlanan bir konudur. Örnek olarak, Parkinson Hastalığı'nda (PH) gastrointestinal disfonksiyon, hastalıkla karakterize olan motor disfonksiyondan önce, hastaların neredeyse %80'inde mevcuttur ki bu durum α -sinükleopatinin erken bir göstergesi olarak öne sürülmüştür (90). Aynı şekilde AH'ye bakılacak olursa, ESS'deki düzenli APP ifadesinin, AH'de de ESS tutulumu teorisini desteklediği görülür. Enterik nöronlarında A β birikimi geliştiren APP transgenik farelerin enterik nöronlarında azalma meydana gelmiş, iltihaplanmaya hassas oldukları gözlenmiştir (89). Bu verilerden yola çıkılarak yorumlanan diğer ön datalardan anlaşılan odur ki, APP transgenik farelerin sahip olduğu enterik hasar, hastalığın gelişmesiyle doğrudan orantılıdır (91).

4.3.2.1.3. Bakteriye Amiloid Üretimi

Bağırsak mikrobiyomu, *Escherichia coli*'nin ürettiği curli başta olmak üzere, çok sayıda amiloid molekülüne kaynaklık etmektedir (92). ESS haricinde üretilen bu molekül mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarına ve fiziksel/bağışksal hasara karşı direnç oluşturmalarını sağlar (92,93). Proteinin birincil yapısı bakımından bakteriyel kökenli amiloid, MSS amiloidinden farklı olsa da üçüncül yapıları birbirlerine oldukça benzerdir (69,94). Bu sebeple, bağırsak, bakteriyel amiloid maruz kaldığında immün sistemi harekete geçirebilir ve neticede artan immün cevapla beraber beyinde de anti-mikrobiyal fonksiyonu yerine getirmek üzere endojen amiloid üretimi artar (93). Bir çalışmada curli üreten E.coli'ye maruz kalan sıçan beyinde ve

bağırsağında nöronal α -sinüklein birikimi ve aynı zamanda bağışıklıkla ilişkili olan mikroglia ve astrogliya seviyesinin kontrol grubuna göre daha fazla arttığı gözlenmiştir. Dahası beyinde inflamasyonla ilişkili TLR-2, Il-6 ve TNF ifadelerinde artış bulmuşlardır (95). Bakteriyel amiloidler üçüncül yapılarının insan amiloidine benzemesinden dolayı moleküler mimikri yeteneğine sahip olabilirler ve bu moleküler mimikri yoluyla tıpkı bir prion protein gibi davranarak çapraz tohumlama (cross-seeding) meydana getirip, amiloidojenik bir molekülü konakçıya kendi molekülü gibi benimseterek aslında patojenik bir β -katlanma durumuna sebebiyet verebilirler. Dolayısıyla akabinde meydana gelecek olan inflamasyon vakası kaçınılmaz olan bu *cross-seeding* mekanizası hem *in-vivo* hem *in-vitro* olarak çalışılmıştır (96,97). Öyle ki, bu ve benzeri çalışmalar neticesinde Friedland ve Chapman, mikrobiyota ile ilişkili proteopati ve nöroinflamasyonu ifade edebilmek için ‘mapranosis’ terimini bile önermişlerdir (93).

4.3.2.1.4. Lipopolisakkaritler

Beynin dördüncü ventrikülüne LPS enjeksiyonu yapılan bir hayvan deneyinde, denekte AH’de görülen inflamator ve patolojik özelliklerin ortaya çıktığı gözlenmiştir (98). Dahası peritoneal boşluğuna LPS enjeksiyonu yapılan başka bir hayvanda ise hipokampal bölgede A β seviyesinin arttığını sonrasında bilişsel bozukluğa neden olduğunu gözlemlemişlerdir (99). LPS’nin prion amiloidlerinin patojenik β -tabakalı konformasyonunu daha da güçlendirdiği bilgisi de göz önüne alınınca bu ve benzeri çalışmalar bakteriyel LPS’nin amiloid fibrillogenезini güçlendirdiğini doğrulamaktadır (100,101). AH hastalarında LPS’nin beyin-bölgesel analizi yapıldığında, A β ’nin görüldüğü yerler olan hipokampus ile neokorteks bölgelerinde yerleştiğini, hücre analizi yapıldığında da perinükleer bölgede birikerek DNA transkriptlerinin çekirdek dışına çıkışını ciddi derecede azalttığını tespit etmişlerdir (102–104). Dahası, LPS’nin kan damarları çevresinde ve amiloid plaklarda A β 1-40/42 ile birlikte olduğu dikkate alınınca, AH hastalarındaki plazma LPS konsantrasyonunun hasta olmayan insanlara göre ciddi bir şekilde artması, LPS ile AH arasındaki ilişkiyi teyit eder niteliktedir (85,105). Bununla beraber insan beyinde bulunabilen *E. Coli*

pili protein ya da nükleik asit gibi diğer bakteriyel ürünlerinin AH hastalarında çok yaygın olduğu da belirtilmiştir (105,106). LPS'nin etki mekanizması araştırıldığında, bağışıklık cevabını tetikleyen yollarda etki gösterdiği ortaya çıkmaktadır. LPS, CD14 (cluster of differentiation 14) ve MD-2 (myeloid differentiation 2) proteinleri ile etkileşimler yoluyla, doğal hasar veya patojen ile ilişkili moleküler izleri tanıyıp, doğal bağışıklık sisteminin parçası mikrogial hücrelerde ifade edilen TLR sınıfına ait TLR4 reseptörünü aktive eder (107,108). Bu aktivasyon sonucunda TLR4, nötrofil ve monositlerden bir Ca^{+2} sensörü olarak ifade edilen S100A8/A9 heterodimerinin, immün cevap için lökosit alımını ve sitokin salınımını uyarmasını teşvik eder (109,110). Diğer yandan, TLR ailesine ait başka bir reseptör olan TLR2 de A β ve bakteriyel amiloidler tarafından tetiklenerek de aktive edilebilmektedir ki, bu durum, az önce bahsedilen bakteriyel ürünlerin moleküler *mimikri* kavramını desteklemektedir (69,94).

4.3.2.1.5. Bağırsak inflamasyonu ve bağırsak bariyeri fonksiyon bozukluğu

Çeşitli sebeplerle bağırsakta bir kez kronik inflamasyona yol açan etmenler meydana gelmişse mukozal yapının bozulmasını, polimorfonükleer olarak adlandırılan bağışıklıkla ilgili hücrelerin sirkülasyondan bağırsak mukozasına hatta bağırsak lümenine migrasyonu takip eder. Böyle bir durumda küçük kalsiyum-bağlayan ve S100A8/9 heterodimeri olan kalprotektin ölçümü biyomarker mesabesinde olup bize bağırsak inflamasyonu hakkında bilgi verebilir. Nötrofil sitozolünün %60'ını oluşturan bu protein antimikrobiyal özelliğe sahiptir (111). İlginç bir şekilde son yıllarda yapılan çalışmalar, kalprotektinin heterodimeri olan bu S100A8 ve S100A9 proteinlerinin protein birincil yapısının A β ile α -syn gibi amiloidojenik aminoasit sekanslarına çok benzediğini, amiloid oligomer ve fibril oluşturabildiğini hatta monomerik/dimerik S100A9'un A β fibrilizasyonunu indüklediğini göstermiştir (112,113). Ayrıca, makrofaj ve mikrogia gibi bağışıklıkla ilişkili hücrelerden amiloid plak oluşumu esnasında salgılanan bu S100A9 heterodimeri nöronal hücrelerde kendisinin sentezini tetikleyerek RAGE (advanced glycation end products) yolağının oluşumu için TLR4 ve reseptörleri yoluyla daha da fazla mikrogia aktivasyonunu

tetikleyebilmektedir1-44. Ayrıca amiloid birikimi ve A β ile birlikte birikimi tetikleyen bu kalprotektin proteinin seviyesi sadece dışkıda gözlenmediği aynı zamanda AH hastalarının beyinlerinde ve beyin-omurilik sıvısında da anlamlı şekilde de arttığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (112). Başka bir çalışmada ise AH hastalarının %70'inin beyin ve Beyin-Omurilik Sıvısı'ndan (BOS) ziyade dışkısında anlamlı şekilde kalprotektin saptandığı belirtilmiş, ve bu proteinin sirkülasyonla nöroinflamasyona katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (114). Buna benzer bir mekanizma ile proteinin hareketleri PH hastalarında da rapor edilmiştir (115). Bu ve benzer çalışmalar göstermektedir ki; bu bağırsak orijinli kalsiyum-bağlayan protein dolaylı olarak bağırsakta yada doğrudan beyinde amiloid fibril oluşumundan sorumlu olabilmekte bunun neticesinde bağırsak inflamasyonu ve floral bozulumu doğrudan bağırsak bariyer fonksiyon bozukluğu ve akabinde artan intestinal geçirgenliğe, “leaky gut”, bu da nörodejeneratif işlevlere katkıda bulunabilmektedir (81,116). Bilindiği üzere bağırsak bariyeri, mukus tabakası, bağırsak epitel katmanı, lamina propria olarak adlandırılan üç katmandan oluşmaktadır. Bu katmanlara yukarıda da belirtildiği şekilde zarar gelmesi ve bütünlüğünün bozulması halinde *atopobiosis* yani mikrobiyomdaki yararlı mikroorganizmaların yanısıra zararlı mikroorganizmalar ve zararlı maddelerinin sirkülasyona karışması meydana gelir (117,118). Kalın bağırsağın mukus tabakası geçirgen değilken ince bağırsağın mukus tabakası bakteri büyüklüğündeki parçaları geçirebilmektedir. Yapılan bir çalışmada bu mukus tabakasının geçirgenlik özelliklerinin mikrobiyom kompozisyonu tarafından belirlendiği rapor edilmişti (119). Örneğin, *Akkermansia muciniphila*'nın bağırsak bariyerini güçlendirdiği obezite ve sistematik inflamasyonu azalttığı (83,120), *Lactobacillus plantarum*, *E. coli* Nissle ve *Bifidobacterium infantis* gibi bazı probiyotikler bağırsak bariyerini sıkı bağlantıları (*tight junction*) oluşturan proteinlerin sentezini artırarak güçlendirdiği (118) rapor edilirken, *E. Coli* suşları, *Salmonella*, *Shigella*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio* yada *Clostridium* kökenli bazı bakterilerin ve *Bacteroides fragilis* eksotoksinin *adherence junctions*'ları E-cadherin gibi hücre adhezyon molekülleri vasıtasıyla bozması örneğindeki gibi bazı bakteriyel ürünlerin de epitel tabakadaki epitel bütünlüğü bozduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır (121,122). Bu ve keşfedilmeyen bir çok yöntemle mikrobiyom profili deviniminin sebep olduğu harap edilmiş hücre bağlantı yapıları ve buna bağlı olarak artan intestinal geçirgenlik

çalışmaları transgenik fare modelleri vasıtasıyla amiloid birikimi ile karakterize diğer bir nörodejeneratif bozukluk olan amiyotrofik lateral skleröz üzerinde de gözlenmiştir (123). Son olarak eklemek de fayda var ki; kalın bağırsak mikrobiyom değişikliklerinin sebep olduğu bariyer bütünlüğünün bozulmasına ek olarak ince bağırsakta da bakteriyel aşırı büyüme, (*small intestinal bacterial overgrowth, SIBO*), durumları da geçirgenliğin artmasına etkiye bulunabilir ki; AH hastalarında yapılan analizlerde SIBO prevalansını gösteren bazı ön veriler mevcuttur (1,124).

4.3.2.1.6. Nöroinflamasyon

AH'nin en bilinen özelliklerinden birisi amiloid plak, mikrogliya ve astrosit aktivasyonunun neticesi olan nöroinflamasyon seviyesi, AH hastalarının kanında ve beyin-omurilik sıvısında artmış enflamatuar cevap olarak tespit edilebilmektedir (125). İşte bu noktada A β 'nin fizyolojik klerensisi çok önemli bir basamaktır, çünkü hastalığın erken evresinde düşük miktarda A β konsantrasyonu, daha önce de değinildiği gibi CD14 ve TLR yoluyla mikrogliayı aktif edip fagositozla temizlenir, fakat oligomerizasyonun A β tutulumunu arttırmak gibi bir özelliği olduğu için hastalık evresinde mekanizma döngüye girerek ciddi miktarda mikrogliyal artışa ve dolayısıyla bir yandan NF- κ B, proenflamatuar sitokinler ve oksidatif stres gibi nöroenflamatuarla ilişkili moleküllerin seviyesini yükselterek nöronal ve glial hücre ölümüne sebep olurken, diğer yandan myeloid hücreler²'de ifade edilen bir reseptörün baskılanması neticesinde A β 42 akümülyasyonunu bertaraf edecek fagositik mekanizmanın bozulmasına da katkıda bulunur (126–128). Nörodejenerasyonda şahit olunan mikrogliyanın doğal olmayan yola yani döngüye girerek devamlı aktif olması ve aktif olacağı molekülleri tetiklemesi inflamasyonun akut değil kronik olmasından kaynaklı olabilir¹⁻⁶⁴. Bu durumda bağırsak kökenli LPS maruziyeti sitokinler aracılığıyla mikrogliyal artışın tetikleyici bir sebebi gibi durmaktadır. Bu konuyla ilgili bir çalışmada LPS'ye maruz kalan fare serebellumunda enflamatuar yanıtın kendini şiddetle gösterdiği gözlenmiştir (129). Kuvvetle muhtemeldir ki; bakteriyel amiloid tarafından kısmen aktif edilmiş mikrogliya (*primed*) bu haliyle beyinde meydana gelecek olan A β oluşumuna olağandışı tepki vermekte, tabir-i caizse ateşlenmekte ve

akut olacak inflamasyon, yaşın da getirdiği dezavantaj doğrultusunda kronik bir hal almaktadır (69,130).

4.3.2.1.7. Amiloid yayılımı

A β 'nin oluşum ve yayılımı hayvan deneylerinde iyi çalışılmıştır. Örneğin, AH hastasından özütlenen A β 'nin beyne infüzyonunda, beyinde amiloid oluşumu gözlenmiş (131), hatta amiloidin bir bölgeye yerleşmesi, beraberinde nöroanatomik olarak bağlantılı olduğu diğer beyin bölgelerine yayılımını da getirmiştir (36,132). Suda çözünmeyen, toplanma eğilimi yüksek A β 42'nin bir yere bir kez yerleşmesi, suda çözünen, miktarı nispeten daha fazla olan ve en önemlisi de beyinde toksik türlerin oluşumuna kapı aralayan A β 40 oligomerizasyonunu ve akabinde onun yayılmasını tetikleyecektir (133). Yayılma sadece beyinde nörondan nörona sınırlı kalmayıp astrositleri, mikrogliaıyı hatta kan-beyin bariyerini geçerek fibroblastları ve immun sistem hücrelerini de kapsamaktadır (134). Örneğin, bir çalışmada A β özüütünün intraperitoneal enjeksiyonunun, beyinde amiloid birikimine neden olduğu gözlenmiştir (135).

4.3.2.1.8. Nöron hücrelerinde taşımın

PH'nin belirteci olan α -sinüklein (α -syn) bağırsak duvarındaki miyenterik nöronlarda bulunduğu gözlemlenen bir çalışmayı nirengi noktası olarak belirlersek, bu proteinin nasıl yol aldığını anlamak için bağırsaktaki Peyer plaklarının dentritik hücreleri bu konuda aydınlatıcı olacaktır). Öyle ki; bu dentritik hücreler, bağırsak epitel mikrofoid hücreleri (M hücreleri) ve vagus siniri vasıtasıyla bağırsak lümeninden nöron hücrelerine ulaşmak çok olası bir durumdur. Yapılan bir çalışmada vagus sinirinin dorsal motor nükleusu, PH durumunda, α -sinüklein birikimi için ilk etkilenen bölge olarak bulunmuştur, dolayısıyla bu ve benzeri çalışmalar nöronlarda bu tarz yanlış katlanan proteinlerin bağırsak-beyin aksı boyunca yayılma potansiyeline sahip olduğunu desteklemektedir (69,124). Orijini nereden kaynaklanırsa kaynaklansın yanlış

katlanan proteinler birkez nöron hücrelerinde birikmeye başlayınca ya hücre-içi boşluğa yayılarak hücrenin ölmesine sebep olur yada hücre yaşamaya devam etse bile bu zararlı proteinleri ekzositozla atabilir. Diğer nöronlar tarafından, lokal bir aktarım sonucu absorbe edilmiş olan bu proteinler, hücre-içi hassas proteinlerin konformasyonel değişimini tetikleyebilir. Bu süreç böylece sinapslar vasıtasıyla nöral ağa yayılabilir (136). Bu proteinler sadece amiloid ve türevleri olmak zorunda değildir, işlevini kaybeden tau'nun durumu da tıpkı hasarlı amiloid'in durumuna benzer ve in-vitro olarak gözlemlenmiştir (137). Neticede hastalık seyri, AH patolojisinin klasik ikilisi olan hücre-dışı A β birikimi yoluyla senil plak oluşumu ve tau proteininin oluşturduğu hücre-içi nörofibril yumak oluşumu ile kendini çoktan belli eder (138).

4.3.2.1.9. Kan-Beyin Bariyeri

Normal şartlarda, KBB MSS'den, sirkülasyondaki kan-türevi moleküller, patojen ve hücrelerden, perisitler ve beyin endotel hücreleri vasıtasıyla ayrılır ve normal koşullarda suda çözünen A β , RAGE ve LPR1 (düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein 1) vasıtasıyla kandan beyine geçebilir (139,140). Fakat, post-mortem AH hastaların beyinlerinde yapılan çalışmalarda KBB'nin hasarlandığı ve kan türevi ürünlerin birikim sergilendiği gözlenmiş (44), ayrıca bu süreç, öğrenme ve hafıza merkezi olan hipokampusteki yaşa bağlı KBB hasarı, canlı insan beyinlerinde de MRI tekniği ile de doğrulanmıştır. Normal yaşlanmada KBB hasarının meydana geliyor oluşu, devam edegelen çalışmalarda, bu hasarın orta şiddette bilişsel bozukluk (MCI) sergileyen hastalarda daha da kötü olduğunu ve BOS vasıtasıyla tespit edilen perisit hasarı ile doğru orantılı olduğunu araştırmaya itmiş ve bu savı doğrulamıştır (141). Dahası, yapılan başka bir çalışmada da perisit hasarının LOAD için major genetik risk faktörü olan apolipoprotein E'nin ϵ 4 alleli varlığında arttığını rapor etmişlerdir (142).

4.4. Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modelinde bağırsak mikrobiyomu

Gut mikrobiyomun Alzheimer patolojisine etkisinin çalışıldığı hayvan modeli çalışmaları literatürde mevcuttur (Tablo-1).

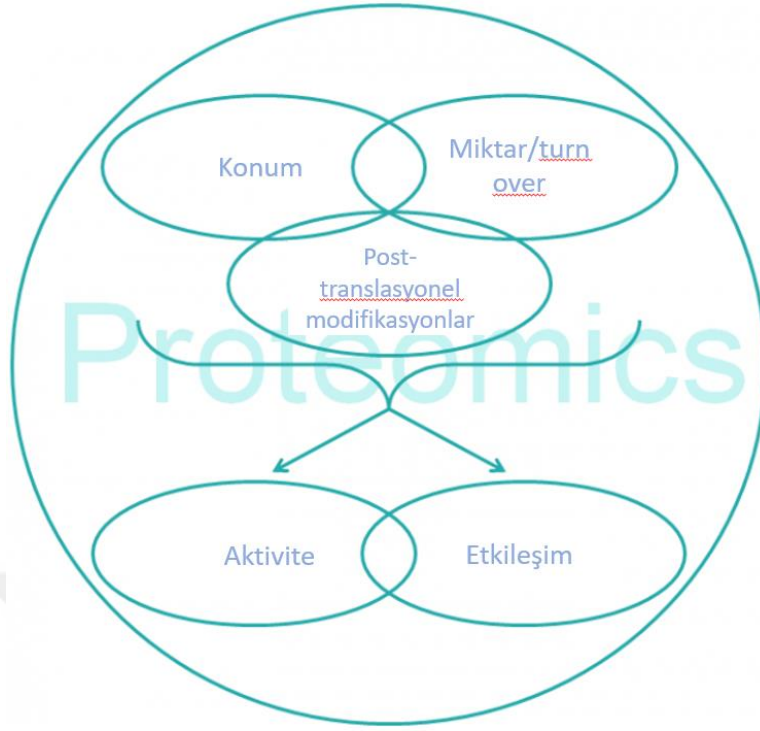
Tablo 1: AH patogenezine mikrobiyotanın rolü üzerine yapılan hayvan deneyi çalışmaları

AH model	Bulgular	Referans
5xFAD fare	Fekal mikrobiyota bileşiminde yaşla birlikte değişiklikler fekal proteinlerde tripsin miktarında azalma insan APP (amiloid prekürsör protein)nin sadece beyinde değil bağırsak dokusunda da ifadesi	Brandscheid ve ark, 2017 (143)
3×Tg-AD fare	Probiyotik tedavi, enflamatuar sitokinlerin ve bağırsak hormonlarının plazma konsantrasyonunu etkiledi Beyin hasarında ve Aβ birikiminde bir azalmaya neden oldu	Bonfili ve ark, 2017 (144)
APP/PS1 fare	Antibiyotikle tedavi edilen Tg farelerde, gastrointestinal mikrobiyom kompozisyonunda ve dolaşımdaki enflamatuar araçılarda değişiklikler,antibiyotikle tedavi edilen erkek Tg farelerde azalmış Ap birikimi,çözünür Aβ seviyeleri artış,Ap plaklarını çevreleyen reaktif gliosisde azalma önemli ölçüde değişmiş mikroglial morfoloji	Minter ve ark,2016 (145)
	Erken doğum sonrası antibiyotik tedavisi sonucu, bağırsak mikrobiyal cinsin uzun süreli değişimi,yaşlı Tg farelerde beyin Ap birikiminde azalma,antibiyotiğe maruz kalan farelerde plaselokalize mikroglia ve astrositler azalma	Minter ve ark,2017 (146)
	Tg farelerde bağırsak mikrobiyota profilinde kontrol farelerine kıyasla dikkate değer bir kayma, germ-free tg farelerde kontrol farelerine kıyasla serebral Ap patolojisinde büyük ölçüde azalma, Tg fareler ile germ-free farelerin mikrobiyom kompozisyonu sonucu serebral ab patolojisinde artma, Tg fareler ile kontrol farelerin mikrobiyom kompozisyonu sonucu serebral ab nispeten az etkili	Harach ve ark,2017 (147)

	Famulya düzeyinde Helicobacteraceae ve Desulfovibrionaceae miktarda önemli bir artış, Cins seviyesinde Odoribacter ve Helicobacter miktarda artış, Tg farelerde kontrol farelere kıyasla daha düşük ve Prevotella miktarı	Shen ve ark, 2017 (148)
	AH'de değişen gut mikrobiyom kompozisyonu, otizm ve enflamatuar hastalıklarla aynı özellikleri taşır	Buerl et al, 2018 (149)
	Morinda officinalis oligosakkaritlerinden (OMO) yapılan prebiyotik takviyesi; mikrobiyal topluluğun çeşitliliğinin ve stabilitesinin korunması, beyin ödemi ve nöronal apoptozda iyileşme Aβ ekspresyonunda azalma	Xin ve ark, 2018 (150)
ApoE-/- fare	ApoE - / - fare beyinlerine Porphyromonas gingivalis'in aktif istilası ve buna bağlı enfeksiyon kaynaklı kompleman aktivasyonu	Poole ve ark, 2015 (151)
AH fare modeli (Aβ'nin ICV enj)	Bifidobacterium breve suşu A1'in oral verilmesi sonuçları: Aβ ile tetiklenmiş biliş bozukluğa engel, hipokampusta Aβ indüklü gen ifadelerini baskılama, bağırsak mikrobiyomu stabil, plazma asetat seviyesinde anlamlı artış, gözlenemeyen B.breve ve asetat varlığının davranışsal eksikliklere yapıcı katkısı	Kobayashi ve ark, 2017 (152)
AH rat model (D-galaktozun IP enj)	Lactobacillus plantarum MTCC 1325'in etkisi: asetilkolin seviyesinde düzelme, Aβ plak oluşumu seviyesinde azalma, bilişsel fonksiyonlarıda artış	Nimgampalle et al, 2017, (153)
AH rat model (Aβ'nin introhipokampal enj)	Lactobacillus ve Bifidobacterium filumlarının hafıza, rneme zorluğu ve oksidatif strese olumlu etkisi	Athari et al, 2018 (154)

4.5. Proteomiks

Proteomların geniş çapta çalışımı proteomiks kavramını ortaya çıkarmıştır, proteom ise bir organizma, sistem yada organizmadan hücreye kadar herhangi bir biyolojik olgunun ürettiği proteinlerin tamamını ifade etmektedir. Bir biyolojik kavramın tüm RNA dünyasını temsil eden transkriptomun yansıması olan proteom, onun aksine stabil bir durumu ifade etmeyip hücreden hücreye devinim sergileyen dinamik bir yapıyı temsil etmektedir (155–157). Proteom çalışmaları kütle spektrometrisini (MS) içeren ardışık kütle spektrometrisi ve jel tabanlı diferansiyel elektroforez (DIGE) gibi yüksek verimli tekniklerle derinlemesine araştırılarak bize devasa veriler sunar. AH gibi proteopati orijinli nörodejeneratif hastalıklarda yüksek verimli sonuçlar sunan proteomiks kavramı; beyin dokusu, beyin-omurilik sıvısı, kan ve idrarda kontrole kıyasla farklılık sergileyen proteinlerin tanımlanması, fonksiyon ve boyutsal yapısı, ifade sonrası değişimleri (PTM) hakkında veriler sunarak hastalığın mekanizmasına dair bir şablon sunar (158–162). Dolayısıyla etken madde geliştirme ve potansiyel biyomarker tespiti mümkün hale gelir (163).



Şekil 5: Proteomiks genel şeması

Proteomik bir takım teknikler neticesinde bilgisine erişilmek istenen proteinlerin lokalizasyonu, miktar ve PTM'si hakkında veri elde edilir. Deneyin amacı kapsamında bu veriler ya doğrudan kullanılır yada ek bilgiler çıkarmak için işlenirler. Bir proteinin etkileştiği diğer spesifik proteini bulabilmek yada PTM'sinin aktivasyon seviyesini belirlemek örneklerinde olduğu gibi.

4.5.1. Metaproteomiks

'Metaproteomik' terimi ilk kez Francisco Rodríguez-Valera tarafından, çevresel örneklerde en fazla ifade edilen genleri dolayısıyla proteinleri tanımlamak için önerilmişse de bu terim 'metagenom' ifadesinden türetilmiştir (164). Daha sonraları Wilmes ve Bond, Rodríguez-Valera'nın teriminde ki *en fazla* ifadesini değiştirerek bu terimi *belirli bir zaman noktasında* çevresel mikrobiyotanın, tüm protein komponentleri ile beraber geniş ölçekli karakterizasyonunu betimlemek adına önermişlerdir ki; aynı zamanda *microbial community proteomics* ve *microbial community proteogenomics* olarak da deneyin amacına bağlı olarak birbirlerinin yerine de kullanılmaktadır (165). Bu topluluk protein bileşenleri ayrıca bir mikrobiyal topluluk içinde ve arasında etkileşen proteinleri içerir ki; böylece çevresel

metaproteomun fonksiyonel analizini sağlamak için, mikrobiyal protein havuzu ekstrakte edilir, gerekli bilgiye ve istenen çözünürlük seviyesine bağlı olarak çeşitli biyokimyasal yöntemler kullanılarak analiz edilir (166). Kütle spektrometresi kullanılarak özofagus mikrobiyomunun sahip olduğu protein ve çeşitliliği hakkında verilere ulaşılabilme örneğinde de olduğu gibi, mikrobiyal protein ekspresyon seviyelerine doğrudan ulaşılabilmesi bu tekniğin en büyük avantajlarından (167). Metaproteomiks teknolojik olarak zor olsa da, metagenomik ve metatranskriptomik yaklaşımlarla birlikte yeni enzim keşiflerinde (168); metabolom yaklaşımlarla da bağırsak mikrobiyom ve konakçı etkileşimlerinde gösterdiği ilerlemeler cesaret vericidir (169,170). Pre-diyabet, tipII diyabet (171), tip I diyabet (172), İltihabi bağırsak hastalığı (IBD) (173) ve obezite (174) gibi inflamasyonel hastalıklarda yüksek verimli sonuçlar sunan metaproteomiks yaklaşımında; ilgili dokularda, BOS, kan ve idrarda kontrole kıyasla farklılık sergileyen proteinler, bu kez bağırsak mikrobiyom bazında tanımlanarak, fonksiyon ve yapısı, post-translasyonel modifikasyonları ile hastalığın mekanizmasına dair bir şablon sunar. Dolayısıyla, bu teknik, etken madde yada biyobelirteç tespitlerinin yanı sıra patogenezi tam aydınlatılamayan bu tür hastalıkların moleküler yollarına ışık tutacaktır. Şimdiye kadar literatürde, Alzheimer Hastalığı'nın klinik yada hayvan modelleri üzerine metaproteomiks yaklaşımlarına rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu çalışma, AH'nin moleküler mekanizmasına metaproteomiks bir yaklaşım ile hastalığın patogenezi aydınlatmak yönünden bir plot-çalışma mesabesindedir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Alet ve Gereçler

Tablo 2: Deneyde kullanılan alet ve gereçler

Aletler ve gereçler	Marka	Ürün kodu
Mikropipet Seti	Ependorf	
Laminar Flow Kabin Airstream Gen 3	ESCO	
Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube (1.5 mL)	Sigma-Aldrich	Z666505
Soğutucu (-80°C)	Arctiko	
Scientific Blot Boy Fixed Speed 3D laboratory shaker	Benchmark	
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark	H400HSB
Heatblock Isıtıcı	Benchmark	H5000-HC
ChemiDoc™ MP System, BioRad	BioRAD	1708280
Mini-PROTEON Tetra Cell	BioRAD	1658000EDU
PowerPac™ Universal Power Supply	BioRAD	1645070
Thermo-Shaker	Biosan	TS-100C
Boeco Tube Rotator RS-24	BOECO	BOE 8073000
Vacufuge Vacuum Concentrators	Ependorf	5490 030.001
Hassas Terazi	Explorer	EX124
Hettich ROTINA 380R Refrigerated Tabletop Centrifuge	GMI	
VialTweeter	Hielscher	UP200St
Etüv (37 °C - Proteomiks)	Memmert	8419 8998
Benchtop Ultrasonic Bath Cleaner	Shanti	Rs 7,000
LC-Vial	Supelco	29413-U
Lam	Thermo Scientific	10143352
Maxisafe 2020 Class II Biyolojik Güvenlik Kabini	Thermo Scientific	51026653
Soğutucu (-20 °C)	Thermo Scientific	
Soğutucu (+4 °C)	Ugur	
nanoEase MZ HSS T3 Column, 100Å, 1.8 µm, 75 µm x 250 mm, 1/pkg	Waters	186008818
nanoEase MZ Symmetry C18 Trap Column, 100A, 5 um 180 um x 20mm, 1/pkg	Waters	186008821

Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek	Fischer Scientific	
30kDa cut-off spin column	Millipore	MRCF0R030
Xevo G2-XS QToF Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry	Waters	
Cryotube box 'cardboard' for 2mL	İsolab	1.092.22.101.0 01
tüp - santrifüj - P.P - vidalı kapaklı - 50 ml - aseptik - steril	İsolab	S.078.02.008
tüp - santrifüj - P.P - vidalı kapaklı - 15 ml - aseptik - steril	İsolab	S.078.02.007
E® LoBind microcentrifuge tubes 0,5 mL	Eppendorf	22431081
E® epT.I.P.S. Reloads volume range 0.1-10 µL	Eppendorf	Z640387
E® epT.I.P.S. Reloads volume range 2-200 µL	Eppendorf	Z640417
E® epT.I.P.S. Reloads volume range 50-1000 µL	Eppendorf	Z640433
E® LoBind microcentrifuge tubes 1,5 mL	Eppendorf	9409329



5.1.2. Kimyasallar

Tablo 3: Deneyde kullanılan kitler ve kimyasal maddeler

Kitler ve kimyasallar	Marka	Ürün k
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions	BioRAD	161018
Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay	Thermo	23275
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Thermo	23235
Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device, 2K MWCO	Thermo	69553
Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye	Thermo Fischer	20278
Acetonitrile hypergrade	Merck	100029
Ammonium bicarbonate BioUltra, ≥99.5% (T) - 500g	Sigma	9830
Bovine Serum Albumin (lyophilized powder, ≥96%)	Sigma	A2153
DTT (Dithiothreitol) no-weigh format	Pierce	20291
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (100X)	Thermo	87785
Iodoacetamide BioUltra, 1149	Sigma	1149-50
Metanol	Merck Millipore	106009
MS Grade Glu-1-Fibrinopeptide	Waters	700004
Peptide Digest Assay Standard (1 mg/mL)	Thermo	23295
Pierce™ 96-Well Polystyrene Plates	Pierce	15041
Pierce™ Trypsin Protease, MS Grade	Thermo	90057
Pierce™ Water, LC-MS Grade - 4 x 1L	Thermo	85189
SDS-Sodium dodecyl sulfate	Sigma	L3771
TEMED	Sigma-Aldrich	T9281
Tris HCl	Sigma	T3253
Trypsin, mass spectrometry grade, 100ug	Pierce	90057
Urea ReagentPlus®, ≥99.5%, pellets - 1kg	Sigma	U1250

5.2. Yöntem

5.2.1. Deney gruplarının oluşturulması

Deneyde, Jackson Laboratuvarlarından temin edilmiş 3 ailesel AH ve 2 insan presenilin mutasyonları ile normalden fazla insan APP geni ifade eden 5 mutasyonlu ailesel AH (5xFAD) fareler, Tg model olarak, aynı batından doğan mutasyon taşımayan

kardeşleri de (*Littermate*) kontrol olarak kullanılmıştır. İlgili fare bağırsakları, ACU-HADYEK 2015/28 sayılı başvuru ile etik kurul onayından geçen HDK-2015/52 sayılı projeden temin edilmiştir. Toplam 12 fare modelinden hasta ve kontrol olarak iki biyolojik grup şeklinde temin edilen dışkı örnekleri, kendi grupları arasında da erken ve geç evreyi temsilen, üç ve on iki aylık dört biyolojik örnek olarak ayrılmıştır. Her biyolojik örneğin üçer biyolojik tekrarı oluşturularak deney yürütülmüştür.

		2 Grup		
		Transgenik	Kontrol	
4 Biyolojik Örnek	3-aylık	1	1	3 Biyolojik Tekrar
		2	2	
		3	3	
	12-aylık	4	4	3 Biyolojik Tekrar
		5	5	
		6	6	

5.2.2. Fare dışkısından bakterilerin eldesi

Farelerden diseksiyonla elde edilen bağırsaklar deneyde kullanılana kadar -80'de muhafaza edilmiştir. Oda sıcaklığında çözülen bağırsaklardan dışkı örnekleri Apajalahti ve ark (175) ile Tanca ve ark (176), uyarladığı basamaklar göz önüne alınarak bir seri santrifügasyon işlemine tabi tutulmuş ve mikrobiyal hücreler olabildiğince dışkıdan izole edilmiştir. Kısaca; örnekler 10 mL PBS ile vorteksenerek tüp rotatör (Boeco Tube Rotator RS-24) ile 45 dakika (dk) karıştırılmıştır. 500 x g'de santrifüj edilerek büyük partiküllerden uzaklaştırılan örnek yani süpernatanı dikkatlice alınarak temiz bir tüpe (Isolab, P.P, 50 mL Centrifuge Tube) ayrılmış ve bu prosedür 3 kez tekrarlanarak aralarda toplanan süpernatant 20,000 x g'de 15 dk santrifüje tabi tutulana kadar +4°C'de beklemeye alınmıştır. 15 dk bu santrifüj sonrasında ise pelletlerden yaklaşık 25 mg tartılıp alınarak aşağıda özetlendiği gibi protein ekstraksiyonu yapılmıştır.

5.2.3. Protein ekstraksiyonu

Yaklaşık 25 mg olan pelletlere ekstraksiyon buffer (2% SDS, 100 mM DTT, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8) eklenerek örnekler 20 dk boyunca 95°C'de ısıtılıp 500 rpm'de karıştırılmıştır (TS-100, Thermo-Shaker). -80°C'de 10 dk ve tekrar 95°C'de 10 dk bekletilip 10 kez 5'er saniye (s) sonikasyon yapıp (UP200St VialTweeter), her döngüden önce 10 s buzda bekletilmiştir. Bunun ardından 10 dk daha su banyosunda ultrasonikasyona tabi tutularak (Benchtop Ultrasonic Bath Cleaner, Rs 7,000) +4°C'de biraz bekletildikten sonra 20,000 x g'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant olabildiğince pelletten uzaklaştırılıp yeni *LoBind*® tüplere koyulmuştur bu sayede elde edilen protein ekstraktı, -80°C'ye kaldırılmıştır.

5.2.4. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

Ngo ve ark. (177) uyarladığı basamaklar göz önüne alınarak, TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions kitinin bazı yerleri değiştirilerek SDS-PAGE yapılmıştır. Kısaca; 0,75 mm'lik camlar kullanılarak Resolver A ve B 2'şer mL Stacker A ve B ise 1'er mL olacak şekilde jel protokole göre hazırlanıp kasete dökülmüş yarım saat beklenmiştir. Tank kitin tampon solüsyonu ile hazırlanıp kaset tanka yerleştirilerek ilk 15 dk 70 V sonra 120 ve 150 V'larda yürütülmüştür. Jeller ultra saf su (Milli Q) ile 3'er dk shake (Benchmark Scientific Blot Boy Fixed Speed 3D laboratory shaker) üzerinde 3 kez yıkayıp, boya (Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye, 20278) ile 30 dk boyunca shake edilmiş; %20 Metanol ve %5 Asetik asitten oluşan solüsyonla 35 s mikrodalga fırın kullanılarak (450W) boya uzaklaştırıldıktan sonra görüntülenmiştir (ChemiDoc™ MP System, BioRad).

5.2.5. Mikrodializ ve protein konsantrasyon tayini

SDS-PAGE yöntemi ile protein varlığından emin olunduktan sonra, mikrodializ (Thermo Scientific™ Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Unit) yöntemi ile proteinler

tuzdan arındırılmış ve protein miktarı konsantre hale getirilmiştir. Mikrodiyaliz tüplerine 500 µL su (LC-MS saflığında LiChrosolv®, Merck Millipore, 15333) konarak tüpler manyetik karıştırıcıda (Manyetik Karıştırıcı, Benchmark) su dolu behere yerleştirilmiş, 15 dk boyunca membranların dengelenmesi için bırakılmıştır. Tüplerin içi, 400 µL protein ekstraktı ile değiştirilerek bu kez 100 mM Amonyum Bikarbonat (ABC) dolu behere yerleştirilerek, manyetik karıştırıcıda gece-boyu bırakılmış, diyaliz sonrası örnekler *LoBind*® tüplere alınmıştır. Protein konsantrasyonlarının tayin edilmesi için micro BCA (Micro BCA™ Protein Assay Kit) ve Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay) yapılmıştır. Her birinin protokolu kitin prosedürü takip edilerek yapılmış ve ölçülmüştür (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek).

5.2.6. FASP (Filter Aided Spample Preparation)

Ekstrakte edilen ve konsantrasyonu bilinen protein örneklerinden 100 µg dilüe edilerek peptit eldesi için, kitin yayınlanan protokolü Wisniewski ve ark (178) ile Mazi ve ark (179) uyarladığı hali göz önüne alınıp bazı basamaklar modifiye edilerek FASP işlemine başlanmıştır. Kısaca; filtreler (30kDa cut-off spin column) son hacim 230µL olacak şekilde alınan örnekler 8M ABC ile çözünmüş üre ile 14,000 x g'de 15 dk santrifüj edilmiştir ki, üre soğukta kristalleşerek filtreleri tıkama ihtimalini bertaraf etmek için bu işlemin soğukta yapılmamasına dikkat edilmiştir. 200 µL üre ile tekrar 14,000 x g'de 15 dk santrifügasyonla iyice yıkanan örnekler, 10 mM DTT (Pierce™ DDT, Dithiothreitol, 20290) ile muamele edilerek 50°C ısıda 500 rpm'de 30 dk boyunca inkübasyon ile indirgenmiştir. Hemen ardından üre ile çözünen 50 mM IAA (Iodoacetamide BioUltra, 1149), örnekler ile karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonla alkilelendikten sonra bu haliyle 14,000 x g'de 10 dk santrifüj edilip 100 µL üre ile 15 dk ve üç tekrarlı şekilde 14,000 x g'de santrifüj edilmiştir. Filtreler, süzülüp tüpte biriken sıvıların atılması neticesinde, bu kez de 100 µL'lik 50 mM ABC ilavesiyle birlikte 14,000 x g'de 10 dk santrifüjle üreden yıkanmış, bu basamak da üç kere tekrarlanmıştır. Filtrelere 3,3 µg/75µL tripsin enzimi eklenerek 1 dk çalkalandıktan sonra parafilmlelenerek 37°C'de 18 saati aşmamak kaydıyla gece boyu

inkübe edilmiştir. Ertesi gün filtrelerin tüpleri değiştirilerek her bir tüpe, 700 µL Asetonitril (ACN), 10 µL formik asit (FA) ve 290 µL LC saflığında ki dH₂O'dan oluşan karışımdan 50 µL eklenerek 10 dk santrifüj edilmiş ve bu basamak iki kez tekrarlanmıştır. ACN'den kurtulmak için tüpler 20 dk boyunca oda sıcaklığında vakuma maruz bırakılmıştır (Vacufuge Vacuum Concentrators, Eppendorf). Yeni *LoBind*® tüplere alınan peptitlerin konsantrasyonu kolorimetrik (Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay) olarak belirlendikten sonra her örnek 200 ng/µL olacak şekilde nanoLC-MS/MS (Xevo G2-XS QToF Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry) cihazında ölçüm için LC viallerine 30µL olarak hazırlanmış, geri kalan örnekler -80°C'e kaldırılmıştır.

5.2.7. Nano sıvı kromografi – ardışık kütle spektrometresi analizi (nLC-MS/MS)

LC-MS/MS analizleri, Beker ve ark (180) ile Demircan ve ark (181)'nin yayınladıkları çalışmalara uygun yapılmıştır. LC viallerine konmuş örnekten 5 µL yüksek basınçla sıvı kromatografisine [Acquity nanoUPLC (nano ultra performance liquid chromatography) MS sınıf, Waters] akabinde elektrosprey iyonizasyon (ESI) vasıtasıyla hem quadropol hem de uçuş zamanlı ölçüm kaynağı [QToF (quadrupole time of flight)] içeren kütle spektrometresi [Mass spectrometry (MS), Synapt G2-Si HDMS, Waters] sistemine gönderilerek deteksiyon işlemi başlatılmıştır. Kütle kalibrantı olarak 300nL/dk hızında 1570,6 m/z değerine sahip glu-fibrinopeptit (MS Grade Glu-1-Fibrinopeptide B, Waters) enjekte edilmiştir. Kolonlar %97 hareketli faz A (%0,1 FA içerikli LC-dH₂O) ile dengelenerek kolon sıcaklığı 55°C'ye ayarlanmıştır. Örnekler *trap* kolonunda (Symmetry C18 5µm, 180 µm.i.d.×20 mm, Waters, Milford, MA) alıkonulduktan sonra nano pompa ile oluşturulan, %5'den %40'a kendini ayarlayan hareketli faz B (%0,1 FA'li ultra saf ACN) gradienti vasıtasıyla, ayırıştırma gücü daha yüksek olan analitik kolon (1,7µm BEH C18 75 m x 250 mm) üzerinde, 300 nL/dk akış hızında 120 dk'lık bir ters faz kromatografisi ile ayırıştırılmıştır. 4 farklı biyolojik örnekten triplike biyolojik tekrar için on iki enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Veriler, *data independent acquisition* yöntemi (MSE), pozitif iyon V modu ve 1,5 s aralıklı 6V düşük, 15-40V yüksek enerji fonksiyonu kullanılarak MS ve ardışık MS

(MS/MS) vasıtasıyla peptitlerin kütle/yük (mass/charge; m/z) değerleri ve dolayısıyla iyon bilgileri şeklinde elde edilmiştir.

5.2.8. Biyoinformatik analiz

İşlenmemiş nLC-MS/MS peptit verilerinin tanımlanması ve kantitasyonunda, proteomik analizler için kullanılan Progenesis-QI for Proteomics (Nonlinear Dynamics, Waters) yazılımı kullanılmıştır. Örneklerden elde edilecek m/z değerleri, 50-1950 aralıklarında analiz edilmiş, fixed Carbamidomethyl-cysteine, Acetyl N-TERM, Asparagine deaminasyonu ve methionine oksidasyon modifikasyonları barındırabilecek proteinler, Uniprotta review edilmiş mouse protein database'i referans alınarak belirlenmiştir. 3 fragman kullanılarak 1 peptit tanımlaması, 3 peptit ve 7 fragman kullanılarak da 1 protein tanımlaması şartı ayarlanmıştır.

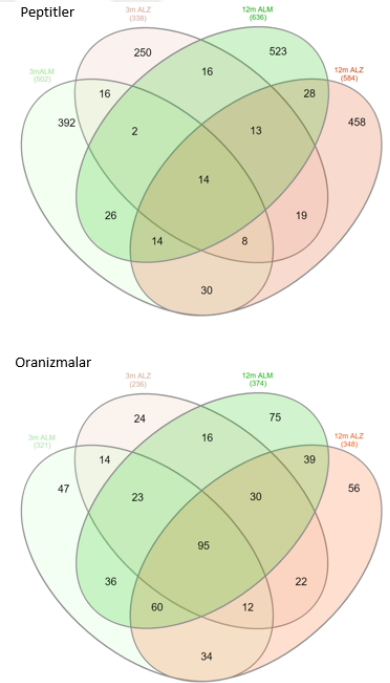
Analiz sonrası belirlenen proteinlerin peptit sekansları, farklı organizmalar tarafından ifade edilen proteinlerin içerdiği aynı peptit sekansları elenerek unique sekans haline getirilip, tek bir organizmanın ifade ettiği farklı sekanslara ait aynı proteinlerin intensity'leri birleştirilmiştir. Unique peptit sekansların ait olduğu proteinleri ifade eden tüm organizmalar belirlenmiş, erken ve geç evrede ki hasta ve sağlıklı biyolojik gruplarda ortak olan organizmalar ile bu organizmaların ifade ettikleri ortak proteinlerin intensiteleri ile unique peptit sekansları belirlenmiştir. Organizmaların taksonomik bilgileri ve ifade olan proteinler ile; ortak organizmaların ortak anlamlı proteinlerinin biyolojik işlevleri, moleküler fonksiyonları ve hücresel bileşenleri Unipept 4.3 yazılımı kullanılarak peptit sekansları vasıtasıyla belirlenmiştir.

6. BULGULAR

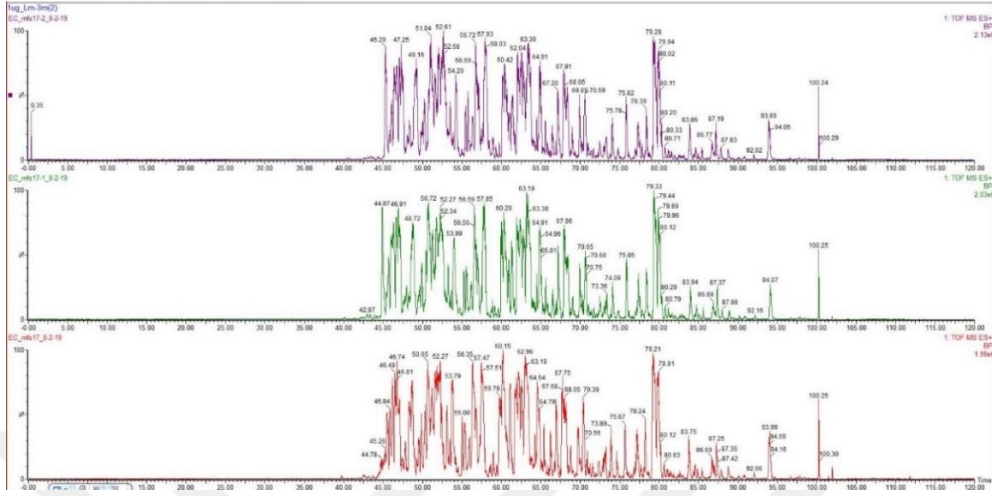
Deneysel çalışmada kullanılan fare bağırsakları başka bir çalışmamızın neticesinde toplanmıştır. Deney, -80 C°'de saklanmış bağırsakların oda ısısında çözündürülmesiyle başlamıştır. Örneklerin analizi neticesinde; 3 aylık kontrollerden işlenmemiş, 3 aylık hastalardan 1540, 12 aylık kontrollerden 2832, 12 aylık hastalardan 2675 işlenmemiş peptit sekansı ve üçer tekrarlı intensitesi elde edilmiştir (Şekil-6) Sekansların temsil ettiği organizmalar üç süperkingdom (Archea, Bacteria, Eucaryota) dışındaki domainlerden filtrelenmiş, eşsiz sekanslar, her canlıda yaygın bulunan tüm sekanslardan seçilerek filtreleme yapılmış, eşsiz sekansların refer ettiği proteinler ve organizmalar belirlenerek her seçilmiş biyolojik örneğin listesi Tablo-4 izinde organizma, peptit ve protein bazında hazırlanmıştır.

Tablo 4: Dört biyolojik örnekten elde edilen peptit, protein, organizma ve filumların miktarları ile peptit ve organizmaların venn şeması

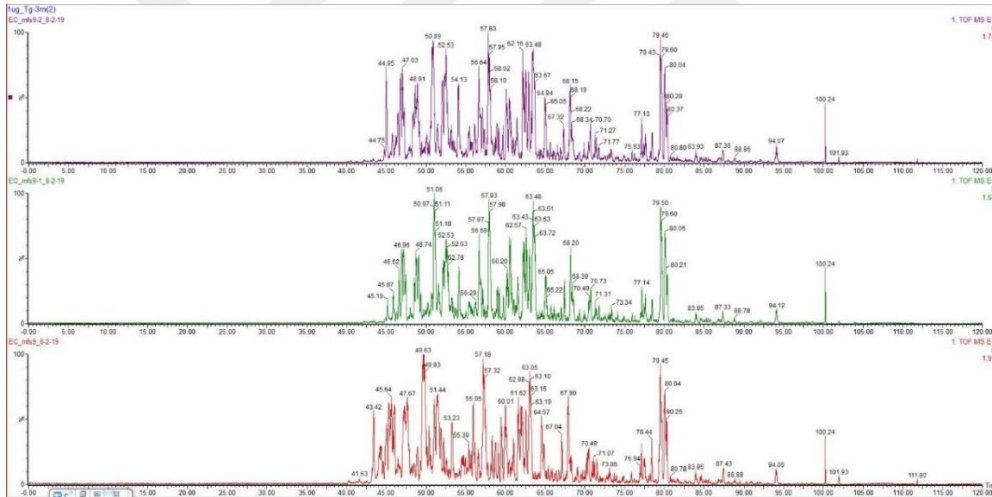
	3m ALM	12m ALM	3m ALZ	12m ALZ
Peptit	502	636	338	584
Protein	484	636	338	584
Organizma	321	374	236	348
Unq.Filumlar	1*	5*	1*	1*
Filumlar	15	19	16	16
		Acidobacteria		
		Actinobacteria		
		Aquificae		
		Bacteroidetes	Actinobacteria	Actinobacteria
Acidobacteria		Chlamydiae	Aquificae	Aquificae
Actinobacteria		Chlorobi	Bacteroidetes	Bacteroidetes
Aquificae		Chloroflexi	Chlamydiae	Chlamydiae
Bacteroidetes		Cyanobacteria	Chlorobi	Chlorobi
Chlamydiae		Deinococcus-Thermus	Chloroflexi	Chloroflexi
Chlorobi		*Dictyoglomi	Cyanobacteria	*Coprothermobacterota
Chloroflexi		Firmicutes	Deinococcus-Thermus	Cyanobacteria
Cyanobacteria		Fusobacteria	*Dictyoglomi	Deinococcus-Thermus
Deinococcus-Thermus		*Nitrospirae	Firmicutes	Firmicutes
*Elusimicrobia		*Planctomycetes	Fusobacteria	Fusobacteria
Firmicutes		Proteobacteria	Proteobacteria	Proteobacteria
Fusobacteria		Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetes
Proteobacteria		Tenericutes	Tenericutes	Tenericutes
Spirochaetes		*Thermotogae	Thermotogae	Thermotogae
Tenericutes		*Verrucomicrobia	Verrucomicrobia	Verrucomicrobia



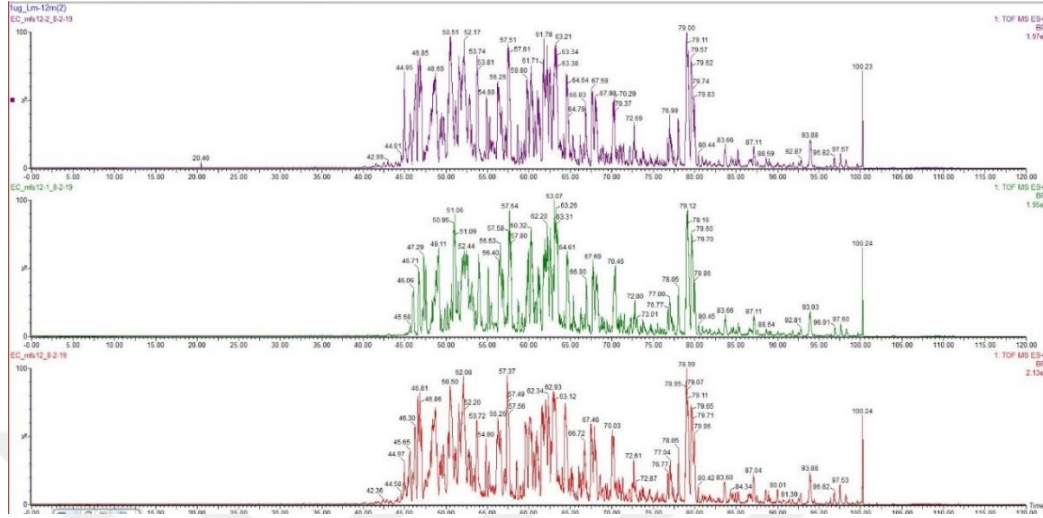
A. 3 aylık kontrollerin kromatogramı



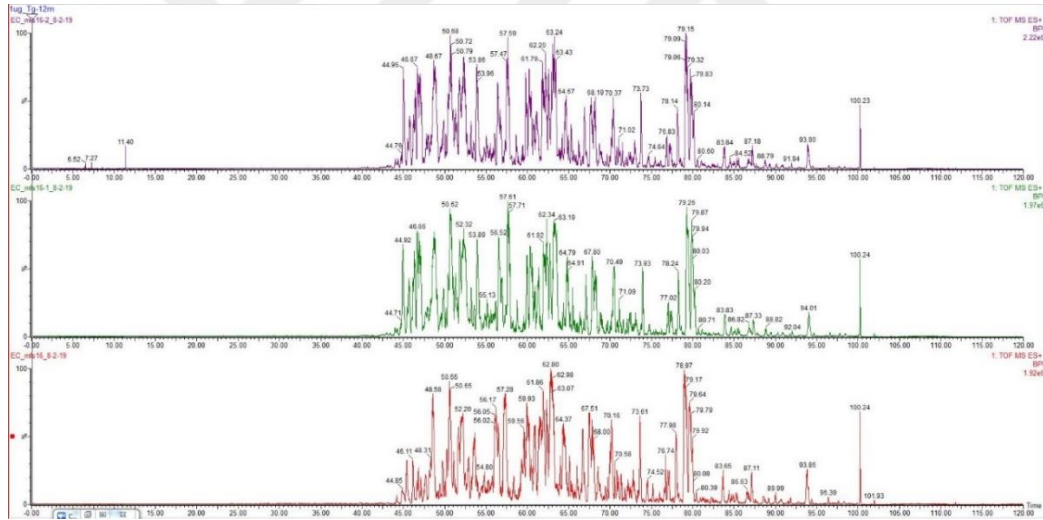
B. 3 aylık hastaların kromatogramı



C. 12 aylık kontrollerin kromotogramı



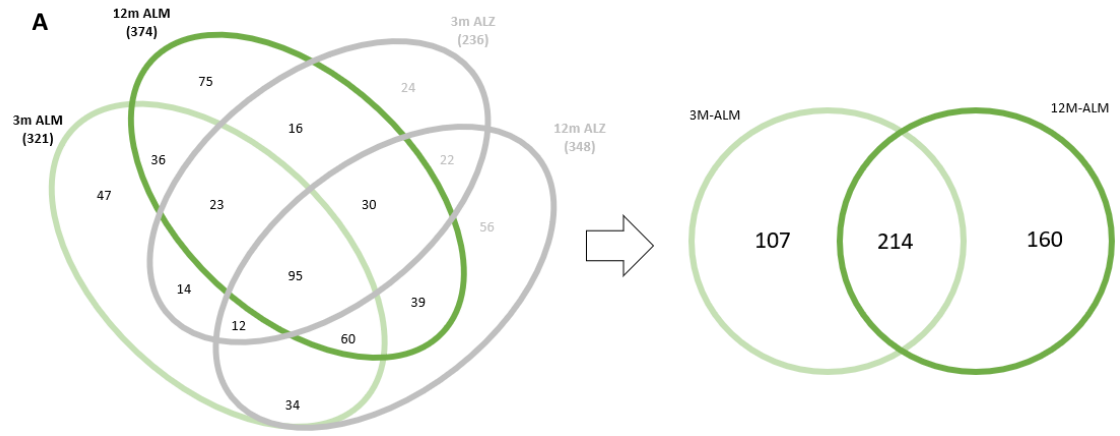
D. 12 aylık hastaların kromotogramı



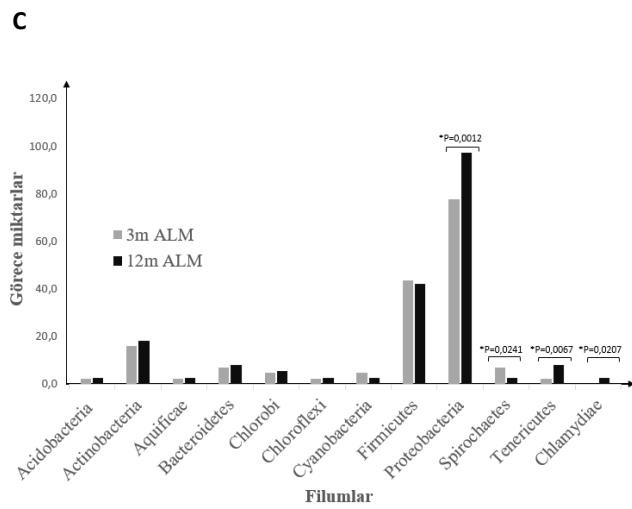
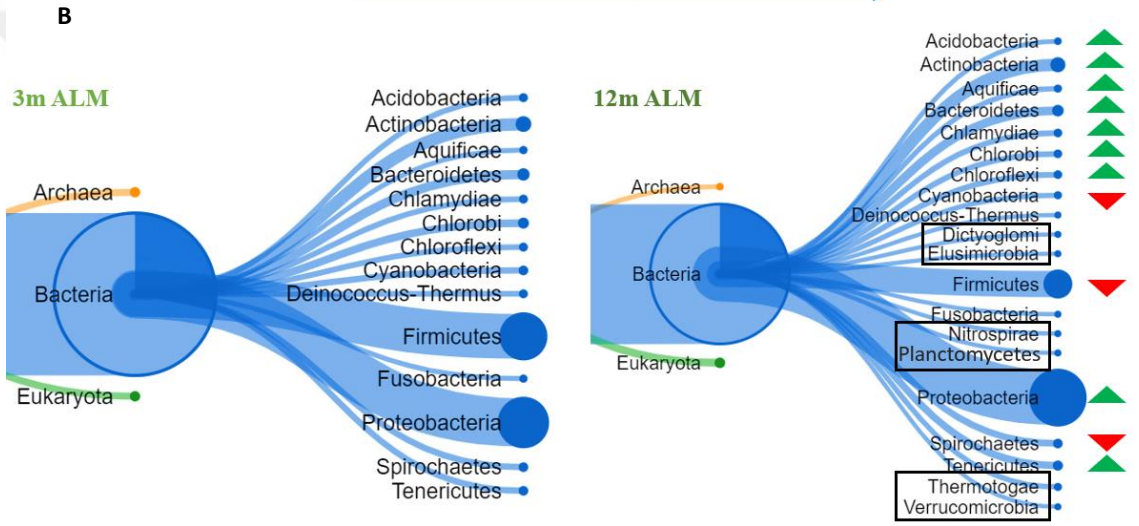
Şekil 6: Her biyolojik (A, B, C ve D) örneğin üçerli tekrarının nanoLC-MS/MS kromotogramı hali.

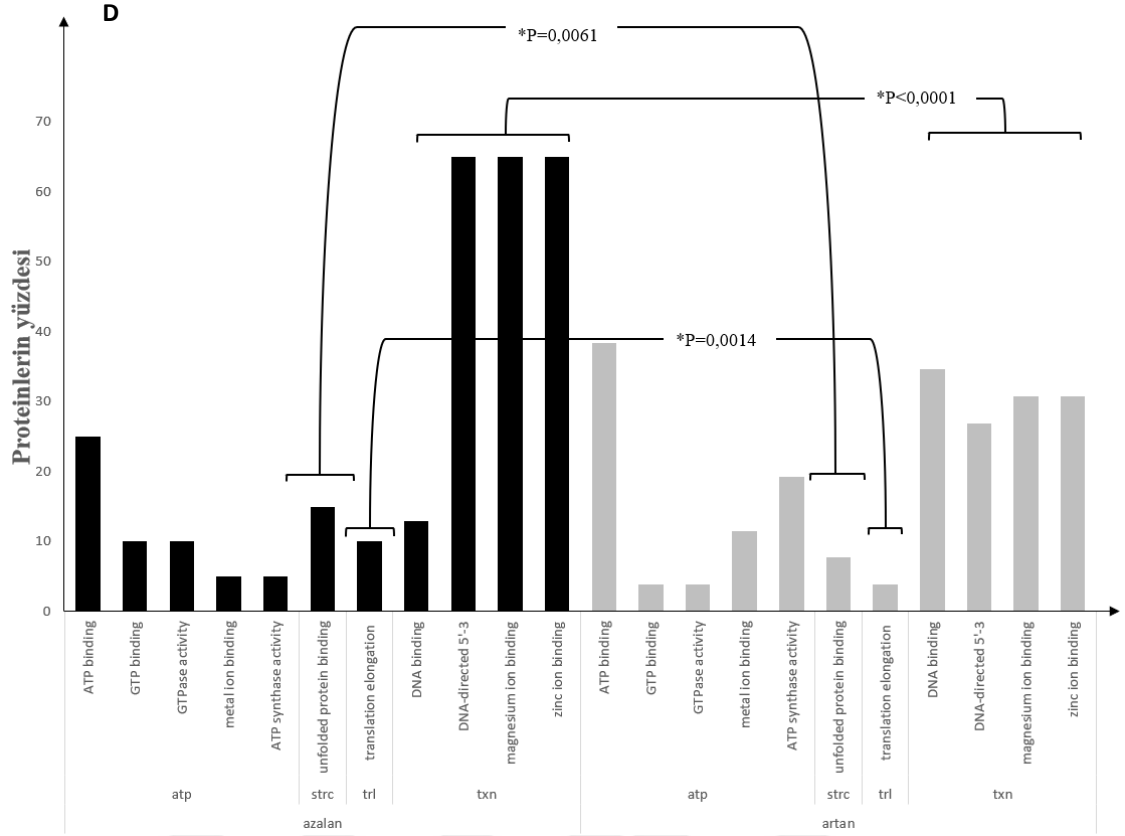
6.1. Normal Yaşlanma Sürecinin Metaproteom Değişimi

Filtreleme sonucu liste işlenerek, üç aylık kontrollerde 321, üç aylık hastalarda 236, on iki aylık kontrollerde 374 ve on iki aylık hastalarda 348 organizma veya protein sekansları ve intensiteleri belirlenmiştir. Çalışmanın amacı hasta ve kontrolleri kıyaslamak olduğu için, dört biyolojik örneğin hepsi hem organizma bazında hem de peptit sayısı bazında venn şeması şeklinde kümelendirilmiştir (Tablo-4). Kümelendirme sonrasında bir algoritma belirlenerek veriler analiz edilmeye başlanmıştır. Algoritmada öncelikle, normal yaşlanma sürecinde deneklerin mikrobiyotasında ve ortak ifade olunan protein profillerinde nasıl bir değişim meydana geldiği belirlenmiştir. Buna göre ilk olarak, her iki biyolojik örneğin tamamı Unipept 4.3 programı aracılığıyla filum bazında belirlenerek normal yaşlanma süreci yüzdelik olarak kıyaslanmıştır (Şekil-7B). Normal yaşlanma sürecinde erken evreyi temsil eden 3 aylık farelerden elde edilen unique organizmalar 107 iken geç evreyi temsil eden 12 aylık farelerden ise unique 160 organizma elde edilmiştir. Bu normal yaşlanma sürecinde geç evrenin florasının erken evreye göre mikrobiyota çeşitliliği artarken, dokuz filumun (*Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Tenericutes* ve *Proteobacteria*) erken döneme göre görece arttığı, üç filumun ise (*Cyanobacteria*, *Firmicutes* ve *Spirochaetes*) görece azaldığı gözlenmiştir. 3 aylık kontrollerde unique filum gözlenmez iken, *Dictyoglomi*, *Elusimicrobia Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Thermotogae* ve *Verrucomicrobia* ise geç evrede unique olarak görülmüştür.



Kontrol Yaşlanma süreci





Şekil 7:Normal yaşlanma analiz akışı

A. Organizmaların sayısına göre normal yaşlanma sürecinin Venn diyagramı. B. Filum diyagramının normal yaşlanma sürecindeki yüzdelik karşılaştırması. Yeşil oklar 3-aylık ALM'ye göre 12-aylık ALM'de artışı gösterirken, kırmızı oklar azalışı gösterir. Dikdörtgen içine alınan filumlar ise o biyolojik örneğin unique filumlarını göstermektedir. C. Yüzdelik filum diyagramının çubuk grafik versiyonu, MedCalc for proportion testine göre anlamlı değişim ($p < 0,05$) sergileyen filumlar: Proteobacteria: $p = 0.0012$, Spirochaetes: $p = 0.0241$, Tenericutes: $p = 0.067$, Chlamydiae: $p = 0.0207$. D. Çubuk grafik, yaşlanma sürecindeki proteom deviniminin moleküler fonksiyonel analizini göstermektedir. Transkripsiyon ($p < 0,0001$), translasyon ($p = 0,0014$) ve protein 3D yapısı ($p = 0,0061$) ile ilişkili yollarındaki proteinlerde anlamlı bir değişiklik gözlenmiştir. txn: transkripsiyon yolları, atp: enerji yolları, aa: amino asit metabolizması, strc: protein konformasyon yolları, trl: translasyon yolları.

Çalışma, *descriptive* bir çalışma olduğu için artma ve azalmanın anlamlı olup olmadığına dair refer edilebilecek ön bir çalışma yoktur, ancak MedCalc programında 'Test for proportion' testi kullanılmış, null hipotez için 3-aylık kontrol değerleri referans alınarak göreceli anlamlılık gösterilmiştir. Buna göre yüzdelik filum diyagramındaki filumların sadece dört tanesi (*Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* ve *Chlamydiae*) organizma miktarı bazında 3-aylık ALM'ye göre anlamlı bulunmuştur (Şekil-7C).

Normal yaşlanma sürecinde mikrobiyal değişim analiz edildikten sonra protein bazındaki değişikliklere bakmak için erken ve ileri evre floradan ortak olan organizmaların ortak ifade edilen proteinleri bulunarak intensitiler üzerinden T-testi uygulanmıştır. Ortak organizmalar 214 iken bu organizmaların eksprese ettiği ortak proteinler 79'dur ve T-testi sonrası anlamlı ($p < 0,05$) eksprese olmuş protein miktarı ise 46'dır. Anlamlı bulunan değerlerin *fold change*'i alınıp değerlere 0,25 üzeri ve -0,20 altı cut off uygulanmış, 20 azalan ve 26 artan anlamlı değerler elde edilmiştir. Ortak olan mikrobiyal sekanslar Unipept 4.3 programında moleküler fonksiyon analizine tabi tutulmuş ve değişen proteinlerin ne kadar yüzdeliklerde hangi moleküler fonksiyonu ifâ ettiği belirlenerek çubuk grafikte seviyeleri gösterilmiştir. Bu bağlamda, transkripsiyon ve enerji yolları ile ilgili moleküler fonksiyonların değişiminin birbirlerine göre anlamlı farklılığı gözlenmiştir (Şekil-7D). 3 ve 12-aylık ALM ortak organizmalardan ortak ifade olan proteinler Tablo-5'de gösterilmiştir.

Tablo 5: Normal yaşlanma sürecinde anlamlı çıkan proteinler ve organizmaları

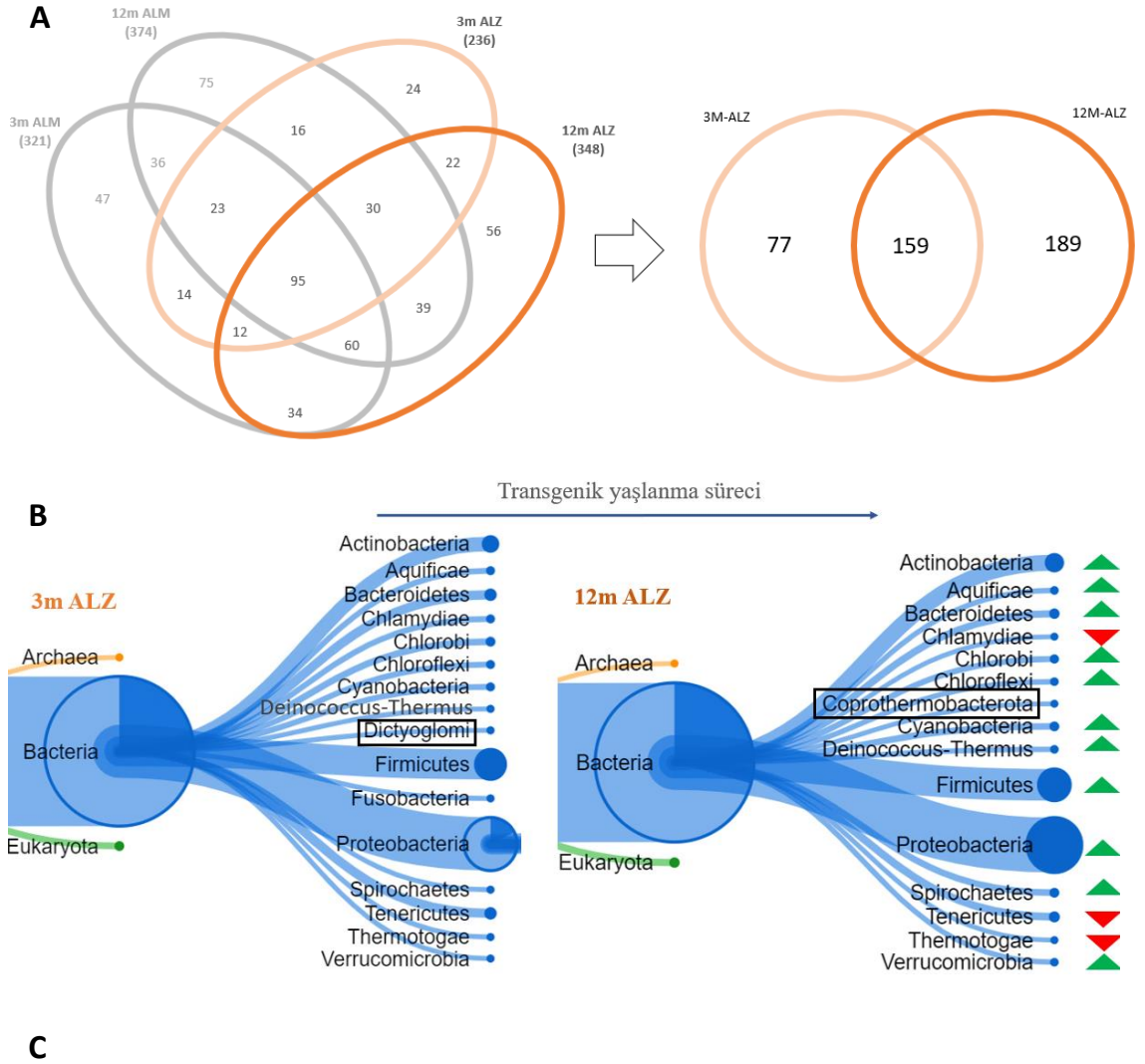
UniProt ID	Fold Change	Organizma
A9WH11	-0,9606236	Chloroflexus aurantiacus (strain ATCC 29366 / DSM 635 / J-10-fl)
A3PGI1	-0,9426636	Rhodobacter sphaeroides (strain ATCC 17029 / ATH 2.4.9)
B3EER3	-0,9385713	Chlorobium limicola (strain DSM 245 / NBRC 103803 / 6330)
Q1Q8Q0	-0,9358872	Psychrobacter cryohalolentis (strain K5)
A0Q866	-0,9333082	Francisella tularensis subsp. novicida (strain U112)
Q2L2L3	-0,9217938	Bordetella avium (strain 197N)
Q2II78	-0,8809794	Anaeromyxobacter dehalogenans (strain 2CP-C)
A4QBG3	-0,8809248	Corynebacterium glutamicum (strain R)
Q4FLL3	-0,8485681	Pelagibacter ubique (strain HTCC1062)
P42854	-0,8382071	Rattus norvegicus (Rat)
A1TYJ1	-0,8317196	Marinobacter hydrocarbonoclasticus (strain ATCC 70049)
Q3SLQ5	-0,8055125	Thiobacillus denitrificans (strain ATCC 25259)
Q1J0P7	-0,717381	Deinococcus geothermalis (strain DSM 11300)
B0S2E5	-0,7011457	Fingoldia magna (strain ATCC 29328)
C1A4J3	-0,6361924	Gemmatimonas aurantiaca (strain T-27 / DSM 14586)
B8J123	-0,5936559	Desulfovibrio desulfuricans (strain ATCC 27774 / DSM 6949)
Q8CXL3	-0,5158374	Oceanobacillus ihyensensis (strain DSM 14371 / CIP 107618)
Q67KB8	-0,3827546	Symbiobacterium thermophilum (strain T / IAM 14863)
A5FRK6	-0,2693223	Dehalococcoides mccartyi (strain ATCC BAA-2100 / JCM 16839)
A8AZE1	0,6603672	Streptococcus gordonii (strain Challis / ATCC 35105)
Q5LNV0	0,7104342	Ruegeria pomeroyi (strain ATCC 700808 / DSM 15171 / DSS-3)
P03833	0,7773454	Klebsiella pneumoniae

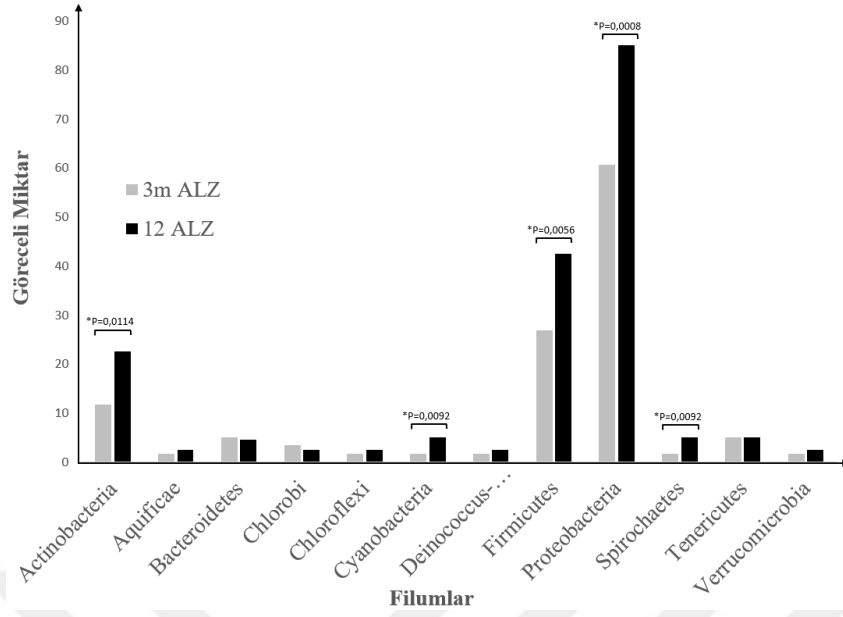
A9KD37	0,8769626	Coxiella burnetii (strain Dugway 5J108-111)
A1CJ09	0,8813506	Aspergillus clavatus (strain ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816)
A9KHD9	0,9362243	Lachnoclostridium phytofermentans (strain ATCC 700394)
Q255E5	0,985577	Chlamydia felis (strain Fe/C-56)
P22983	1,0856462	Clostridium symbiosum (Bacteroides symbiosus)
Q0SQC8	1,155961	Clostridium perfringens (strain SM101 / Type A)
G3XD24	1,2918585	Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692)
B2UYT8	1,7811736	Clostridium botulinum (strain Alaska E43 / Type E3)
Q9X6Y2	1,8599855	Aquifex pyrophilus
C1F3N8	2,1583445	Acidobacterium capsulatum (strain ATCC 51196)
P42467	2,4570268	Peptococcus niger
P24931	2,4706218	Desulfovibrio vulgaris (strain Hildenborough / ATCC 29579)
B0SXR2	3,0287809	Caulobacter sp. (strain K31)
P42470	3,3308439	Wolinella succinogenes (strain ATCC 29543)
Q5FRC5	3,3925567	Gluconobacter oxydans (strain 621H)
Q9KW13	3,699533	Shewanella violacea
Q6ACX6	5,074064	Leifsonia xyli subsp. xyli (strain CTCB07)
B3QYL5	5,7303278	Chloroherpeton thalassium (strain ATCC 35110 / GB-78)
Q73JJ8	6,4761212	Treponema denticola (strain ATCC 35405 / CIP 103919)
P71153	7,4305283	T. thermosaccharolyticum (strain ATCC 7956)
Q24ZZ8	10,201411	Desulfitobacterium hafniense (strain Y51)
A1KRG7	75,423182	Neisseria meningitidis serogroup C (strain ATCC 700532)
A6QB61	794,91703	Sulfurovum sp. (strain NBC37-1)

6.2. Transgenik Yaşlanmanın Metaproteom Değişimi

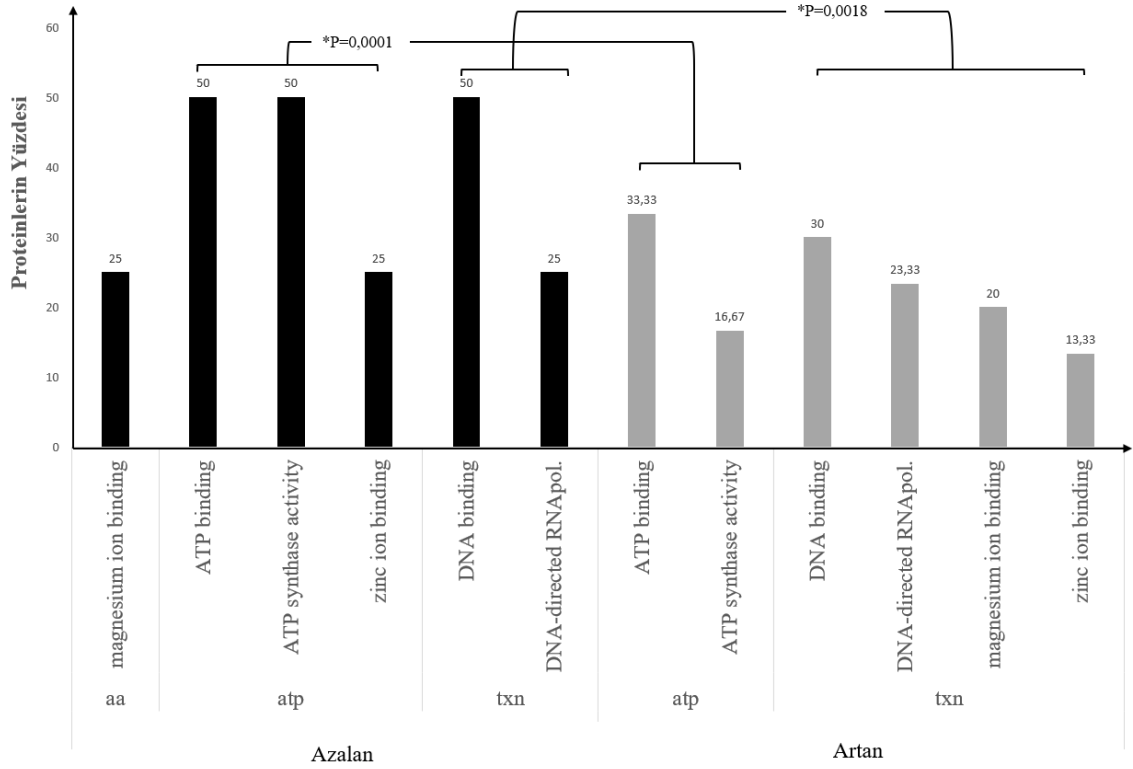
Normal yaşlanma sürecindeki değişimler incelendikten sonra, sağlıklı bir ileri evre ve erken evre kıyaslamaları yapmak için bu kez Tg farelerin tabir caizse hastada yaşlanma sürecindeki değişimleri incelenmiştir. Yine burada da, Tg farelerde üç aylıktan on iki aya doğru giderken bağırsak florasında ve ortak ifade olunan proteom profillerinde nasıl bir değişim meydana geldiği belirlenmiştir. Unipept 4.3 programı kullanılarak sekanslar filum bazında belirlenmiş ve bu filumların üç aylık hastalığı temsil eden Tg fare modellerinden on iki aylık Tg fare modellerine göre hasta yaşlanma süreci yüzdelik olarak kıyaslanmıştır. Hastalığın yaşla birlikte mikrobiyal seyrinde erken evrede unique 77 organizma gözlenirken geç evrede bu sayı 189 olarak gözlenmiştir. Ortak olan mikrobiyal miktar ise 159 olarak gözlenmiştir (Şekil-8A). Hastalığı temsil eden erken evreden geç evreye olan Tg süreçte mikrobiyota çeşitliliğinde ciddi bir

değişim olmamasına rağmen, birbirlerine göre filum bazında anlamlı artış ve azalışlar vardır. Bu bağlamda 11 filum (*Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* ve *Verrucomicrobia*) artarken, 3 filumda da (*Chlamydiae*, *Tenericutes* ve *Thermotogae*) azalma gözlenmiştir. *Dictyoglomi* filumu 3-aylık ALZ'ye has görülürken *Coprothermobacterota* filumu ise 12-aylık ALZ'ye spesifik gözlenmiştir (Şekil-8B). MedCalc programında 'Test for propotion' testi kullanılarak, null hipotez için 3-aylık Tg değerleri referans alınmış ve göreceli anlamlılık gösterilmiştir. Buna göre yüzdelik filum diyagramındaki filumların sadece beş tanesi (*Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Spirochaetes*) organizma miktarı bazında 3-aylık ALZ'ye göre anlamlı bulunmuştur (Şekil-8C).





D



Şekil 8: Tg model yaşlanma analiz akışı

A. Organizmaların sayısına göre transgenik yaşlanma sürecinin Venn diyagramı. B. Filum diyagramının Tg yaşlanma sürecindeki yüzdelik karşılaştırması. Yeşil oklar 3-aylık ALZ'ye göre 12-aylık ALZ'de artışı gösterirken, kırmızı oklar azalışı gösterir. Dikdörtgen içine alınan filumlar ise o biyolojik örneğin unique filumlarını göstermektedir. C. Yüzdelik filum diyagramının çubuk grafik versiyonu, MedCalc for proportion testine göre anlamlı değişim ($p < 0,05$) sergileyen filumlar: Actinobacteria: $p = 0.0114$, Cyanobacteria: $p = 0.0092$, Firmicutes: $p = 0.0056$, Proteobacteria: $p = 0,0008$, Spirochaetes: $p = 0,0092$. D. Çubuk grafik, yaşlanma sürecindeki proteom deviminin moleküler fonksiyonel analizini

göstermektedir. Tıpkı normal yaşlanma yollarında olduğu gibi Tg yaşlanmada da transkripsiyon ($p = 0,0018$) ve enerji metabolizması ($p = 0,0001$) fonksiyonlarındaki proteinlerde anlamlı bir değişiklik gözlenmiştir. txn: transkripsiyon yolları, atp: enerji yolları, aa: amino asit metabolizması.

Hasta yaşlanma sürecinde mikrobiyal değişim gözlendikten sonra ortak olan filumlardan ifade olmuş proteinlerin proteom profillerine bakılmış, intensiteler üzerinden T-testi uygulanmıştır. Anlamlı değerler için intensitelerin ortalamaları üzerinden *fold change* hesaplanarak anlamlı artış ve azalışın yüzdelik değerleri belirlenmiştir. Buna göre, ortak organizmalar 159 iken bu organizmaların eksprese ettiği ortak proteinler 54'tür ve T-testi sonrası anlamlı ($p < 0,05$) ifade edilen protein miktarı ise 32'ye düşmüştür. Bu 32 proteinin *fold change*'i alınarak cut off uygulanmış 4 azalan ve 28 artan değerler elde edilmiştir. Bu artan ve azalan değerlerin peptit sekansları üzerinden bu proteinlerin hangi moleküler fonksiyonu ifâ ettiği belirlenerek, birbirlerine göre anlamlı değişen moleküllerin sebep olduğu yolak devinimi grafikte gösterilmiştir (Şekil-8D). Bu grafikte normal yaşlanma sürecinde de karşımıza çıkan transkripsiyon yolları ile enerji metabolizması yollarında görev alan moleküllerin birbirlerine göre yüzdelik oranları orantı testine göre anlamlı çıkmıştır. 3 ve 12-aylık ALZ ortak organizmalardan ortak ifade olan proteinler Tablo-6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Tg yaşlanma sürecinde anlamlı çıkan proteinler ve organizmaları

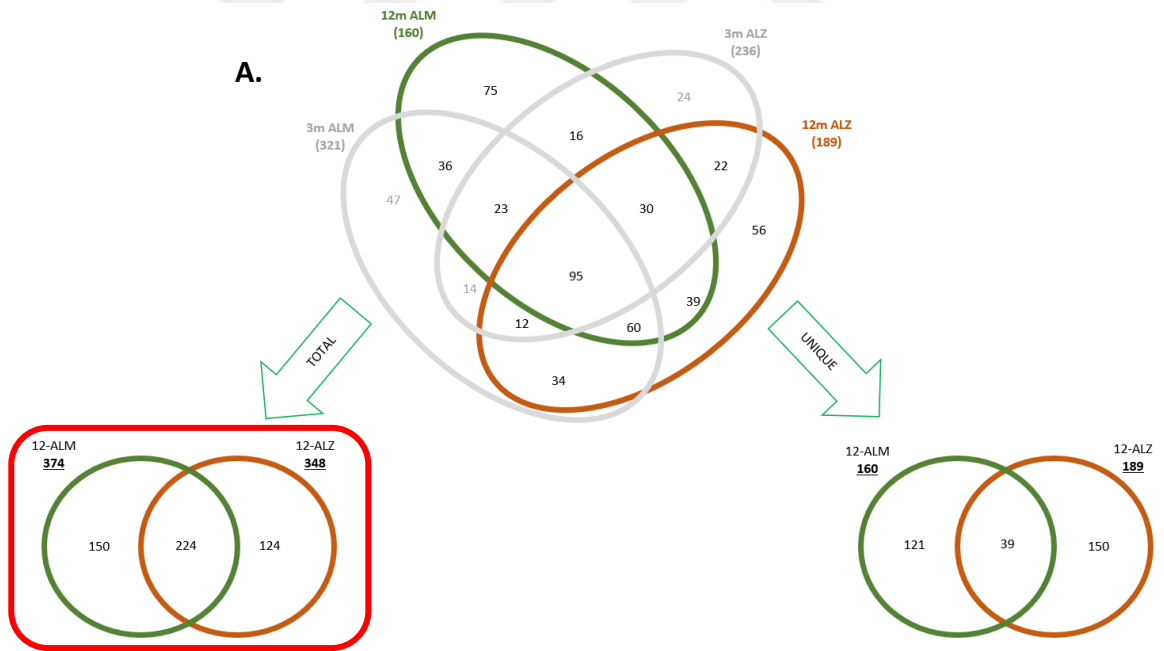
UniProt ID	T-testi	Organizma
B2KEX0	0,033486152	Elusimicrobium minutum (strain Pei191)
P13357	0,009626638	Cellulophaga lytica (Cytophaga lytica)
Q30X04	0,023879989	Desulfovibrio alaskensis (strain G20)
Q9XXK1	0,006470015	Caenorhabditis elegans
Q5FRC5	0,013218755	Gluconobacter oxydans (strain 621H)
Q0C100	0,025444983	Hyphomonas neptunium (strain ATCC 15444)
Q7VJ21	0,017660375	Helicobacter hepaticus (strain ATCC 51449 / 3B1)
P31026	0,041135062	Corynebacterium glutamicum (strain ATCC 13032)
A1BCJ2	0,008367656	Chlorobium phaeobacteroides (strain DSM 266)
B2UYT8	0,005425467	Clostridium botulinum (strain Alaska E43 / Type E3)
A1JS27	0,0441664	Yersinia enterocolitica serotype O:8 (strain NCTC 13174)
B4U738	0,009493774	Hydrogenobaculum sp. (strain Y04AAS1)
Q5FAG1	0,013718415	Neisseria gonorrhoeae (strain ATCC 700825 / FA 1090)
A7GUR9	0,013538936	Bacillus cytotoxicus (strain DSM 22905 / CIP 110041)
B9KCG6	0,019181839	Campylobacter lari (strain RM2100 / D67 / ATCC BAA-1060)
Q0VSK3	0,010052644	Alcanivorax borkumensis (strain ATCC 700651 / DSM 11573)
P42480	0,028963885	Parahymenobacter ocellatus (Hymenobacter ocellatus)
P24931	0,004290005	Desulfovibrio vulgaris (strain Hildenborough / ATCC 29579)
C0QVC8	0,009554875	Brachyspira hyodysenteriae (strain ATCC 49526 / WA1)

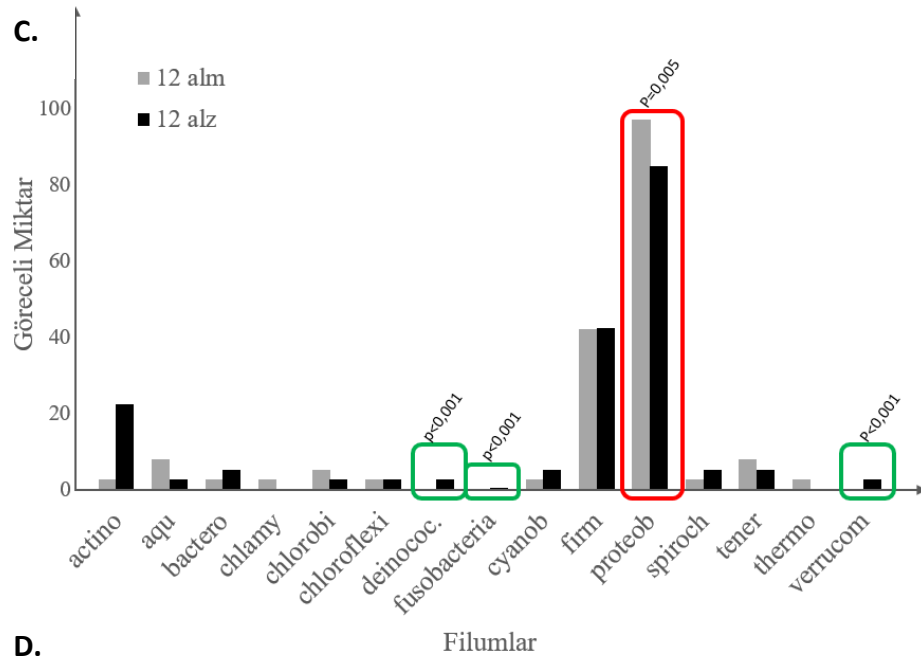
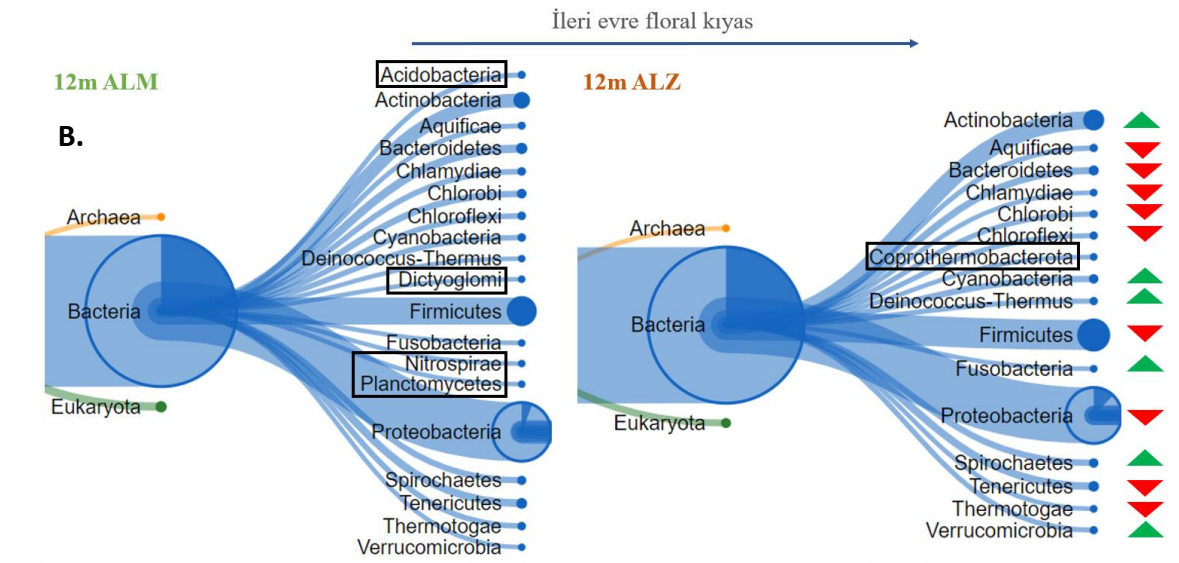
A1V8A5	0,010546381	Burkholderia mallei (strain SAVP1)
Q9PHE7	0,014722555	Xylella fastidiosa (strain 9a5c)
A7Z0N3	0,03174887	Bacillus velezensis (strain DSM 23117 / BGSC 10A6 / FZB42)
Q1Q8Q0	0,011831645	Psychrobacter cryohalolentis (strain K5)
B0SAG0	0,008845359	Leptospira biflexa serovar Patoc (strain Patoc 1 / Ames)
A9B423	0,017461173	Herpetosiphon aurantiacus (strain ATCC 23779 / DSM 785)
A5DQL2	0,02276758	Meyerozyma guilliermondii (strain ATCC 6260)
P75264	0,002925619	Mycoplasma pneumoniae (strain ATCC 29342 / M129)
B4U081	0,002780783	Streptococcus equi subsp. zooepidemicus (strain MGCS10565)
A0K2Y1	0,005255565	Burkholderia cenocepacia (strain HI2424)
A8GV24	0,003332791	Rickettsia bellii (strain OSU 85-389)
A5CUC7	0,002029469	C. michiganensis subsp. michiganensis (strain NCPPB 382)
Q9AAU1	0,006053244	Caulobacter vibrioides (strain ATCC 19089 / CB15)

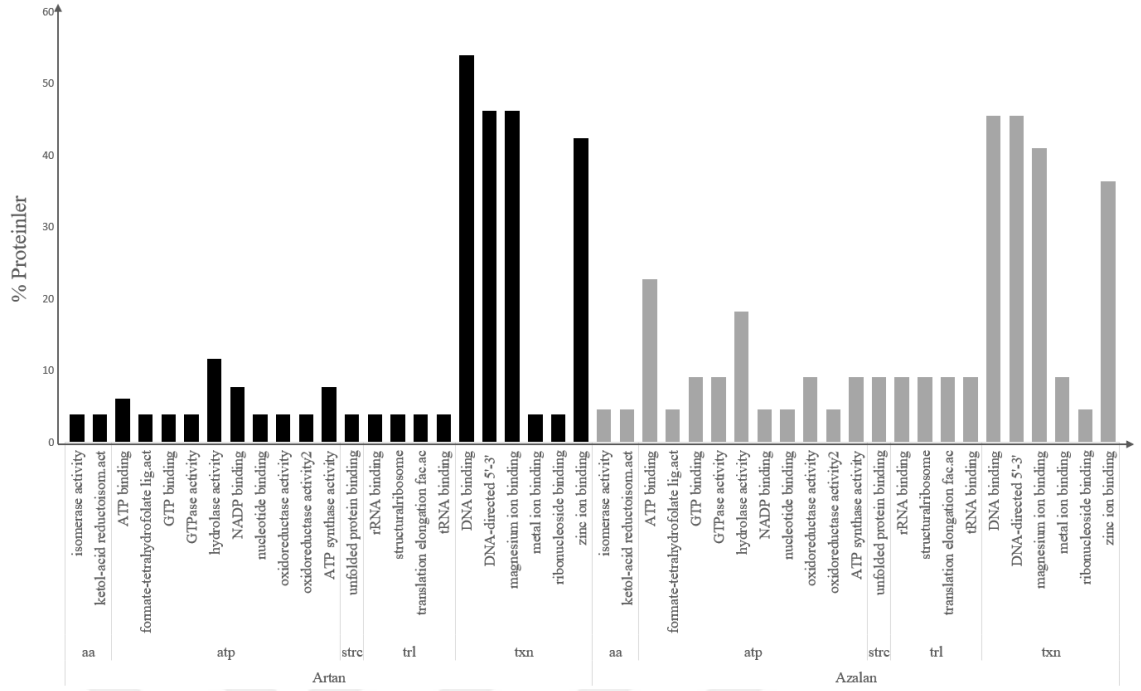
6.3. İleri evre (12 aylık) Hasta ve Kontrol Kıyasının Metaproteom Değişimi

Eldeki verilerin dörtlü venn şeması neticesinde birbirleriyle olan ilişkisi göz önüne alınıp, normal ve hasta yaşlanma sürecinde elde edilen 12 aylık kontrol ve Tg farelerin organizmaları filum bazında kıyaslanmış, 12-aylık farelerde hasta ve kontrol arasındaki takson ve proteom profilleri farkı, unique ve ortak şeklinde Unipept 4.3 yazılımı kullanılarak belirlenmiş, ortak olan protein profillerinin devinimleri de filumları ile birlikte istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Öncelikle 374 ve 348 organizmalı sırasıyla normal ve hastayı temsil eden 12 aylık fare modellerinin toplam mikrobiyal miktarları venn şeması, yüzdelik filum diyagramı ve filum ve moleküler fonksiyon çubuk grafikleri çizilerek birbirleri ile kıyaslanmış, daha sonra 160 ve 189 organizmalı sırasıyla normal ve hasta fare modellerinin 3-aylık biyolojik örnekleri ile kendi içlerinde evrilen yaşam süreci neticesinde elde edilen floradan neşet eden unique organizmalarının diyagramı ve grafikleri çizilerek birbirleriyle kıyaslanmıştır. Hem totalde hem de sadece ileri evre bazında yüzdeleri temel alınarak filum ve moleküler fonksiyonel analizlerde tercihen anlamlılıklar belirlenmiş ve tüm bu istatistiksel analiz neticesinde sadece ileri evrelere has olan bu filumların da venn şeması alınarak 150 Tg modelin ve 121 kontrol farelerin florasına unique ve her ikisinin 39 tane ortak olan mikroorganizmalarına ait filumlar belirlenmiştir (Şekil-9A). Öncelikle total geç evre kıyaslamalarında kontrole ve hastaya unique değerler sırasıyla 150 ve 124 olarak kendini gösterirken, ortak değerler 224 olarak belirlenmiştir (Şekil-9A). Geç evrenin kendi aralarındaki kıyaslamalarında 9 filum (*Aquifca*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*,

Chlorobi, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Thermotogae*) 2 süperkingdom (*Bacteria* and *Eukaryota*) kontrole göre azalma gösterirken, 3 filum (*Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Spirochaetes* ve *Verrucomicrobia*) ve 1 süperkingdom (*Archaea*) ise kontrole göre artış sergilemiştir (Şekil-9B). MedCalc programında ‘Test for propotion’ testi kullanılarak, null hipotez için 12-aylık ALM değerleri referans alınmış ve göreceli anlamlılık gösterilmiştir. Buna göre yüzdeler filum diyagramındaki 12-aylık ALZ filumlarının sadece beş tanesi (*Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* ve *Verrucomicrobia*) organizma miktarı bazında 12-aylık ALM’ye göre anlamlı bulunmuştur (Şekil-9C). Toplam gec evre hasta ve kontrol flora kıyasının venn şemasında ortak bulunan 224 organizmanın ortak anlamlı değişen 47 tane proteini ile Unipept 4.3 yazılımı kullanılarak moleküler fonksiyonları grafiklenmiştir. Tercihen yapılan orantı testine göre anlamlı değişim gözlenmemiştir (Şekil-9D). İleri evre toplam ortak organizmalardan ortak ifade olan proteinler Tablo-7’de gösterilmiştir.





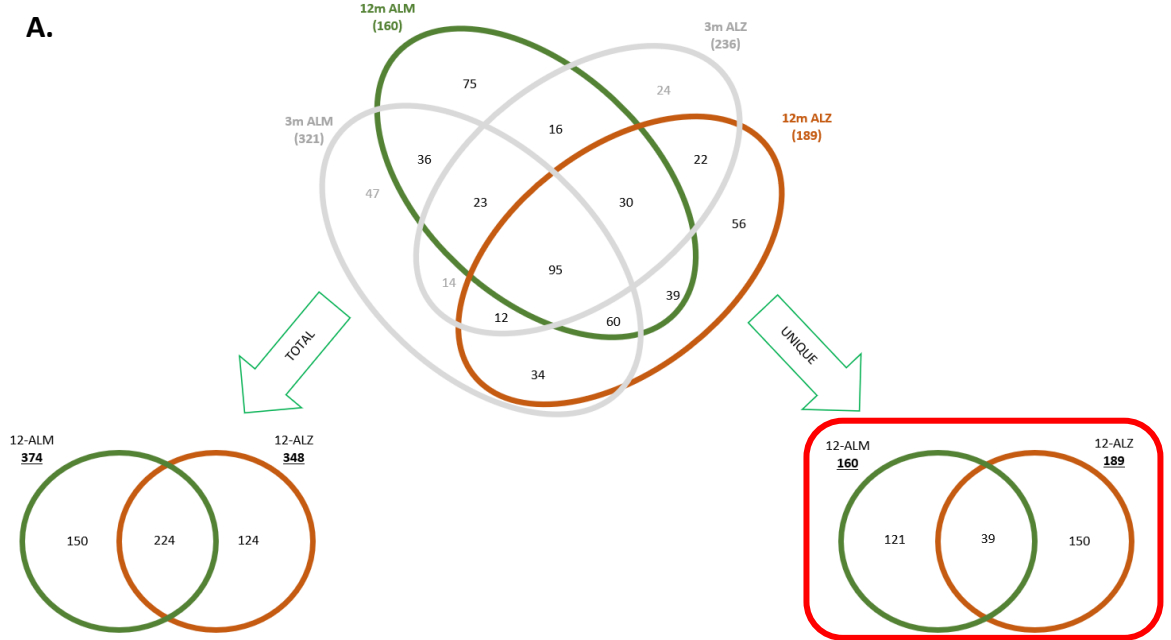


Şekil 9: İleri-evre modellerin analiz akışı

A. Organizmaların sayısına göre ileri evre kontrol ve Tg floral organizma miktarının Venn diyagramı. Kırmızı vurgu sonraki görsellerin total üzerinden yapılacağını belirtmektedir. B. Filum diyagramının, ileri evre kontrol ve Tg floral filum bazında yüzdeler karşılaştırması. Yeşil oklar 12-aylık ALM'ye göre 12-aylık ALZ'de artışı gösterirken, kırmızı oklar azalışı gösterir. Dikdörtgen içine alınan filumlar ise o biyolojik örneğin unique filumlarını göstermektedir. C. Yüzdeler filum diyagramının çubuk grafik versiyonu, MedCalc for proportion testine göre anlamlı değişim ($p < 0,05$) sergileyen filumlar: *Deinococcus-Thermus*: $p < 0,0001$, *Fusobacteria*: $p < 0,0001$, *Proteobacteria*: $p = 0,005$, *Verrucomicrobia*: $p < 0,0001$. D. Çubuk grafik, ileri evre ortak kontrol ve Tg floral organizmaların ortak proteinlerinin proteom deviniminin moleküler fonksiyonel analizini göstermektedir. Tercihen yapılan orantı testine göre anlamlılık gözlenmemiştir. txn: transkripsiyon yolları, atp: enerji yolları, aa: amino asit metabolizması, strc: protein 3D konformasyonel yapısı, trl: translasyon yolları.

Toplam ileri evre floral verilerin kıyaslanmasının yanısıra, hasta ve normal yaşlanmaya giderken elde edilen unique ileri evre floraları da birbirleri ile kıyaslanmış ileri evredeki hasta bir floranın normal bir floradan net farkı anlaşılacak amaçlanmıştır. Bu aşamada da erken evreye kıyaslanınca unique olarak ileri evreye has olan hasta ve normal floral organizmaların birbirine kıyasını belirten venn şeması ve filum diyagramı çizilmiş, yüzdeler olarak artış azalışlar belirlenmiş, çubuk grafiklerle değerler gösterilmiştir. Her iki biyolojik grubun venn şeması çizilmiş ortak olan 39 tane organizmanın anlamlı değişen 8 protein intensitesi ile moleküler fonksiyonları grafiklenmiştir.

Öncelikle sadece geç evreye has olan organizmaların venn şeması çizilerek hasta ve kontrol floralarına ait olan ve ortak olan organizmalar belirlenmiş (Şekil-10A), akabinde ileri evre kontrol ve Tg model birbirleriyle filum bazında yüzdelik olarak kıyaslanmış (Şekil-10B) ve tercihen yapılan orantı testinde anlamlı görülenlerle birlikte filumlar çubuk grafikte gösterilmiştir (Şekil-10C). Bu bağlamda normal yaşlı florasına kıyasla yaşlı hastanın florasında 6 filum artmış (*Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* ve *Verrucomicrobia*), 5 filum (*Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes* ve *Thermotogae*) azalmıştır. Tercihen yapılan orantı testine göre *Firmicutes* hasta florasında normale göre anlamlı ($p=0,0036$) artış sergilemiştir. Unique ileri evre hasta ve kontrol flora kıyasının venn şemasında ortak bulunan 39 organizmanın ortak 13 proteinin anlamlı değişen 8 tane proteini ile Unipept 4.3 yazılımı kullanılarak moleküler fonksiyonları grafiklenmiştir. Tercihen yapılan orantı testine göre anlamlı değişim gözlenmemiştir (Şekil-10D). İleri evre unique ortak organizmalardan ortak ifade olan proteinler Tablo-8 ve 9’da gösterilmiştir.

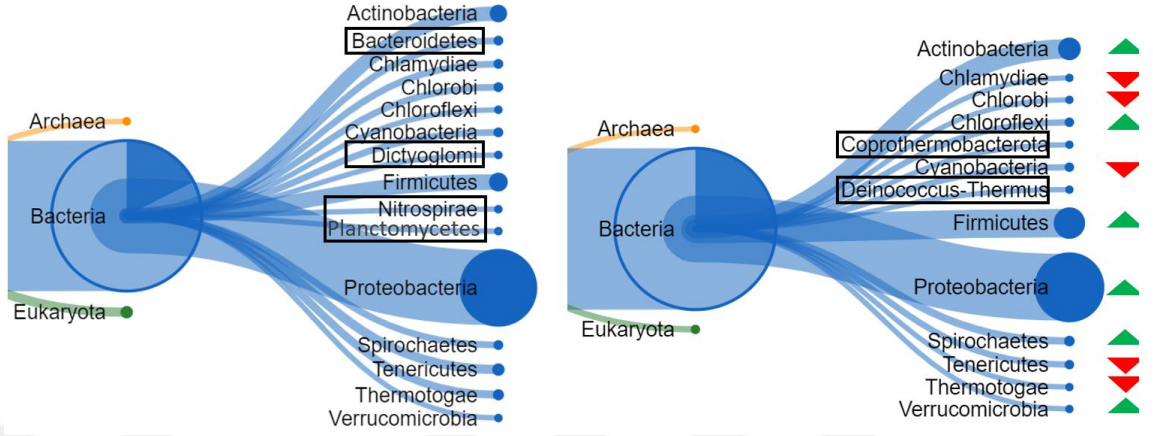


B.

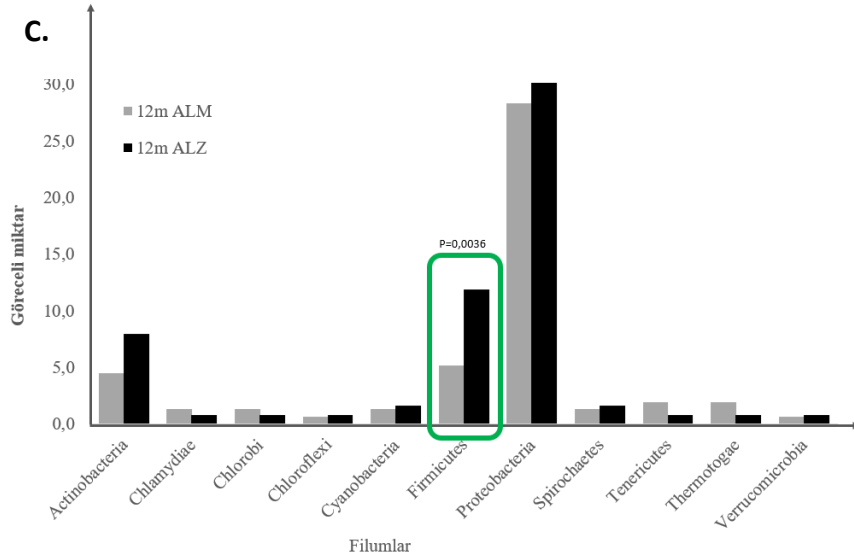
İleri evre unique floral kıyas

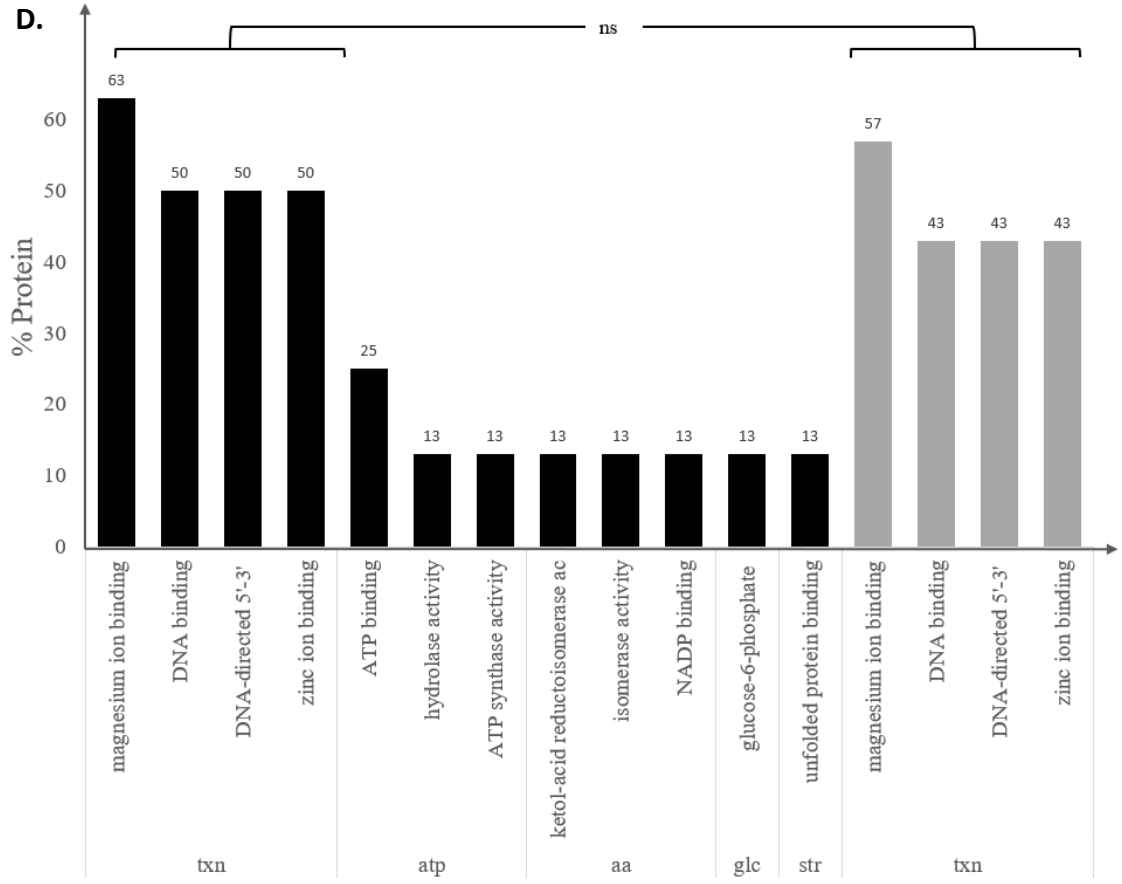
12m ALM

12m ALZ



C.





Şekil 10: İleri-evre unique modellerin analiz akışı

A. Organizmaların sayısına göre ileri evre kontrol ve Tg floral unique organizma miktarının Venn diyagramı. Kırmızı vurgu sonraki görsellerin unique mikroorganizmalar üzerinden yapılacağını belirtmektedir. B. Filum diyagramının, ileri evre kontrol ve Tg floral filum bazında yüzdelik karşılaştırmasının unique versiyonu. Yeşil oklar unique 12-aylık ALM'ye göre unique 12-aylık ALZ'de artışı gösterirken, kırmızı oklar azalışı gösterir. Dikdörtgen içine alınan filumlar ise o biyolojik örneğin unique filumlarını göstermektedir. C. Yüzdelik filum diyagramının çubuk grafik versiyonu, MedCalc for proportion testine göre anlamlı değişim ($p < 0,05$) sergileyen filumlar: Firmicutes: $p = 0,0036$. D. Çubuk grafik, ileri evre ortak kontrol ve Tg floral organizmaların ortak proteinlerinin proteom deviniminin moleküler fonksiyonel analizini göstermektedir. Tercihen yapılan orantı testine göre anlamlılık gözlenmemiştir. txn: transkripsiyon yolları, atp: enerji yolları, aa: amino asit metabolizması, glc: glukoz-ilişkili yollar, str: protein 3D konformasyonel yapısı.

Tablo 7: İleri evreyi temsil eden 12 aylık hasta ve normal fare total floralarında ortak ifade edilen anlamlı proteinler.

UniProt ID	T-Testi	Oranzima
B0JRP2	0,0390822	Microcystis aeruginosa (strain NIES-843)
P31026	0,002738	Corynebacterium glutamicum (strain ATCC 13032)
A5DQL2	0,0097583	Meyerozyma guilliermondii (strain ATCC 6260)
A0QL48	0,0127009	Mycobacterium avium (strain 104)
Q8KTS0	0,0368164	Tremblaya princeps
Q6ACX6	0,0016078	Leifsonia xyli subsp. xyli (strain CTCB07)

Q6CFT7	0,0160803	<i>Yarrowia lipolytica</i> (strain CLIB 122 / E 150)
A7HBL7	0,0147381	<i>Anaeromyxobacter</i> sp. (strain Fw109-5)
A2REC4	0,0019169	<i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M5 (strain Manfredo)
A7GUR9	0,0104123	<i>Bacillus cytotoxicus</i> (strain DSM 22905)
B7J1W0	0,0009154	<i>Borrelia burgdorferi</i> (strain ZS7)
A5CUC7	0,0004922	<i>leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (strain CTCB07)
A7Z0N3	0,0343291	<i>Bacillus velezensis</i> (strain DSM 23117)
P64195	0,0078936	<i>Streptococcus agalactiae</i> serotype III (strain NEM316)
B3ETY9	0,0001502	<i>Amoebophilus asiaticus</i> (strain 5a2)
Q1J0P7	0,0144153	<i>Deinococcus geothermalis</i> (strain DSM 11300)
P0C0G6	0,0061671	<i>Streptococcus pyogenes</i>
A4QBG3	0,0031469	<i>Corynebacterium glutamicum</i> (strain R)
Q1Q8Q0	0,0074948	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> (strain K5)
B3EER3	0,0111104	<i>Chlorobium limicola</i> (strain DSM 245)
A1BCJ2	0,0047061	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i> (strain DSM 266)
A4G9U4	0,0479802	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>
Q2L2L3	0,0032212	<i>Bordetella avium</i> (strain 197N)
Q47UW0	0,0023528	<i>Colwellia psychrerythraea</i> (strain 34H / ATCC BAA-681)
A1KRG7	0,0123226	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup C (strain ATCC 700532)
Q605B0	0,0005389	<i>Methylococcus capsulatus</i> (strain ATCC 33009)
Q30X04	0,0289078	<i>Desulfovibrio alaskensis</i> (strain G20)
Q1LSX6	0,0047608	<i>Baumannia cicadellinicola</i> subsp. <i>Homalodisca coagulata</i>
Q65PB4	0,031418	<i>Bacillus licheniformis</i> (strain ATCC 14580)
C1A4J3	0,016048	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (strain T-27)
B3QYL5	0,0341833	<i>Chloroherpeton thalassium</i> (strain ATCC 35110)
A7HLZ4	0,0029285	<i>Fervidobacterium nodosum</i> (strain ATCC 35602)
O27491	0,009047	<i>M. thermotrophicus</i> (strain ATCC 29096)
A9KD37	0,0089368	<i>Coxiella burnetii</i> (strain Dugway 5J108-111)
P42467	0,0193281	<i>Peptococcus niger</i>
B8J123	0,0079191	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (strain ATCC 27774)
A8ZV52	0,0388655	<i>Desulfococcus oleovorans</i> (strain DSM 6200 / Hxd3)
P00370	0,0012797	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)
Q4JT32	0,0238461	<i>Corynebacterium jeikeium</i> (strain K411)
B0SXR2	0,0160392	<i>Caulobacter</i> sp. (strain K31)
O66944	0,046044	<i>Aquifex aeolicus</i> (strain VF5)
Q5FRC5	0,0341632	<i>Gluconobacter oxydans</i> (strain 621H)
Q2W2I2	0,0225852	<i>Magnetospirillum magneticum</i> (strain AMB-1)
Q85FR6	0,0455515	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> (strain 10D)
P24931	0,0122363	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> (strain Hildenborough)
B9KCG6	0,0445406	<i>Campylobacter lari</i> (strain RM2100)
Q9PHE7	0,015652	<i>Xylella fastidiosa</i> (strain 9a5c)

Tablo 8: İleri evreyi temsil eden 12 aylık hasta ve normal fare unique floralarında ortak ifade edilen anlamlı proteinler.

UniProt	T-testi	Organizma
Q1LSX6	0,004761	Baumannia cicadellinicola subsp. Homalodisca coagulata
B0JRP2	0,039082	Microcystis aeruginosa (strain NIES-843)
A0QL48	0,012701	Mycobacterium avium (strain 104)
Q8KTS0	0,036816	Tremblaya princeps
Q6CFT7	0,01608	Yarrowia lipolytica (strain CLIB 122 / E 150)
B7J1W0	0,000915	Borrelia burgdorferi (strain ZS7)
P64195	0,007894	Streptococcus agalactiae serotype III (strain NEM316)
A4G9U4	0,04798	Herminiimonas arsenicoxydans

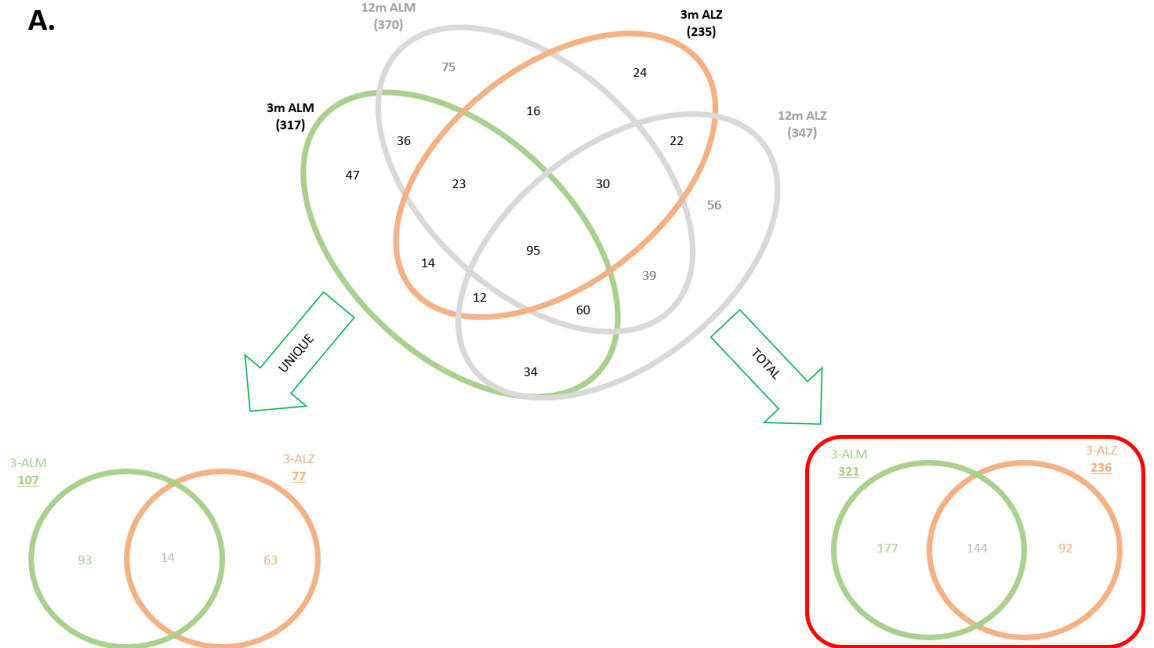
6.4. Erken evre (3-aylık) Hasta ve Kontrol Kıyasının Metaproteom Değişimi

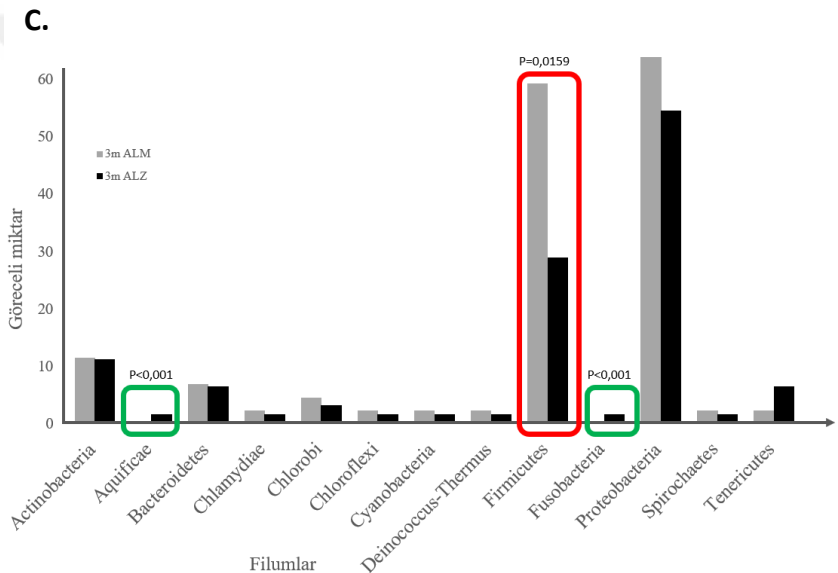
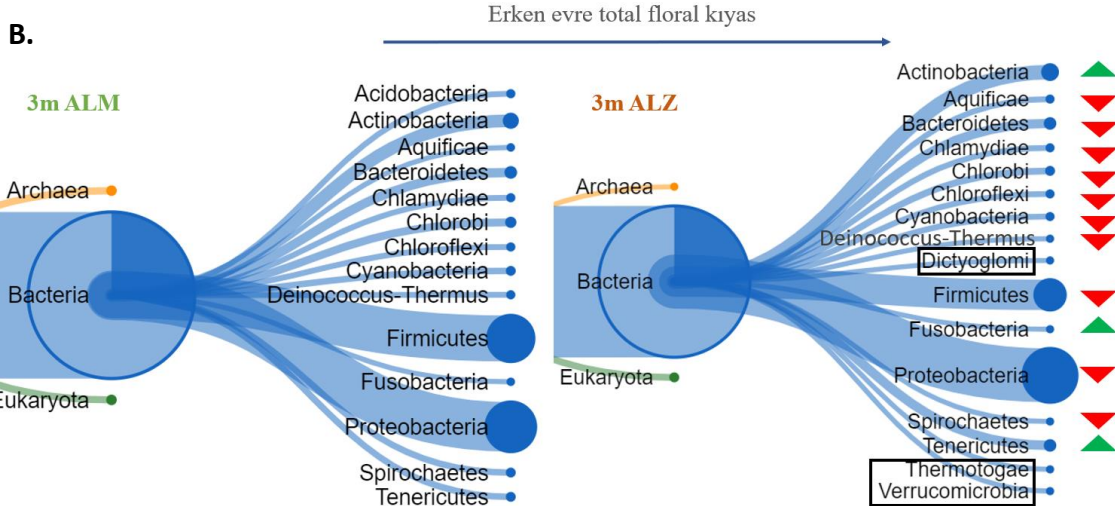
Bu kez de hasta ile kontrollerin ileri evreler ile kıyası sonucu elde edilen, ileri evreye karşı unique olan erken evre organizmalar ayrılmış ve bu unique olan erken evre hasta ile kontrol mikrobiyotası kıyaslanmıştır. Öncelikle toplam erken evreler (3 aylık hasta ve kontrollerdeki sırasıyla 236 ve 321 organizma) birbirleriyle kıyaslanmış ve eldeki veriler ileri evre ile kıyas olmaksızın değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede venn şeması, filum diyagram kıyası ve tercihen orantı testi kullanılarak çizilen çubuk grafik analizleri kullanılmış olup bu süreçlerin aynısı ileri evre ile kıyaslanarak elde edilen 3 aylık hasta ve kontrol unique mikroorganizmalar üzerinde de uygulanmıştır.

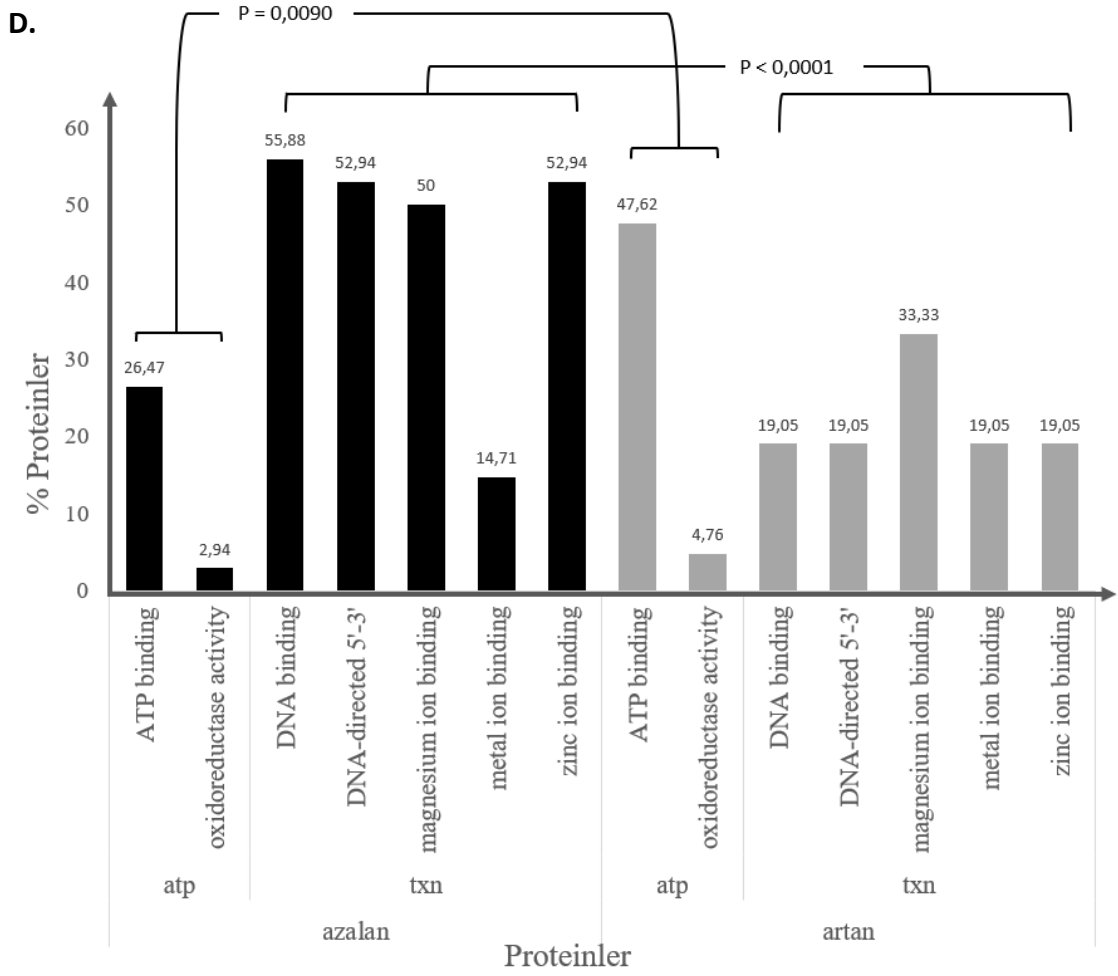
Öncelikle toplam erken evre kıyaslamalarda venn şeması alınarak toplam erken evre organizma sayıları sadece hastada 92, sadece kontrolde 177 ve hem hasta hem de kontrolde 144 olarak belirlenmiş (Şekil-11A), tercihen uygulanan orantı testi ile birlikte çubuk grafik olarak gösterilmiştir, yüzdeler filum kıyaslamasında ise birbirleriyle kıyaslanmış, kontrol grubuna göre iki süperkingdomda (*Bacteria* ve *Eukaryota*) ve on filumda kontrol yaşlılarına göre azalma gözlenirken (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydia*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-thermus*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Spirochaetes*), üç filumda (*Aquificae*, *Fusobacteria* ve *Tenericutes*) artma gözlenmiştir (Şekil-11B), çubuk grafik ve tercihen

yapılan orantı testi ile de bir anlamlı azalan filum (*Firmicutes*) ve iki anlamlı artan filum (*Fusobacteria*, *Aquificae*) ile bir anlamlı azalan süperkingdom (*Bacteria*) gözlenmiştir (Şekil-11C).

Toplam erken evrede ortak ifade eden 144 organizmanın proteinlerinden ortak olanlar (50 tane) bulunmuş ve intensitelerine T-testi uygulanmıştır, cut off uygulanarak elde edilen fold change neticesinde anlamlı değişen 31 proteinin peptit sekansı, Unipept 4.3 yazılımı ile moleküler fonksiyonel olarak analiz edilmiş, 13 protein artışı ve 18 protein azalışı belirlenerek grafiklenmiştir. Ortak olan moleküller belirlenerek yüzdeler kıyaslanmış tercihen yapılan orantı testinde birbirlerine göre kıyası anlamlı bulunmuştur. Buna göre artan ve azalan skladaki enerji ($p=0,0090$) ve transkripsiyon ($p<0,0001$) metabolizmasında görev alan proteinler birbirlerine göre anlamlı ($p<0,05$) değişmiştir (Şekil-11D). Bu yapılan analizlerin hepsi yaşlı floraya göre unique olan 3 aylık hasta ve normal fare florasında da tekrar edilmiştir. Erken evre ortak ve unique organizmalardan ortak ifade olan proteinler Tablo-9’de gösterilmiştir.







Şekil 11: Erken-evre modelin total analiz akışı

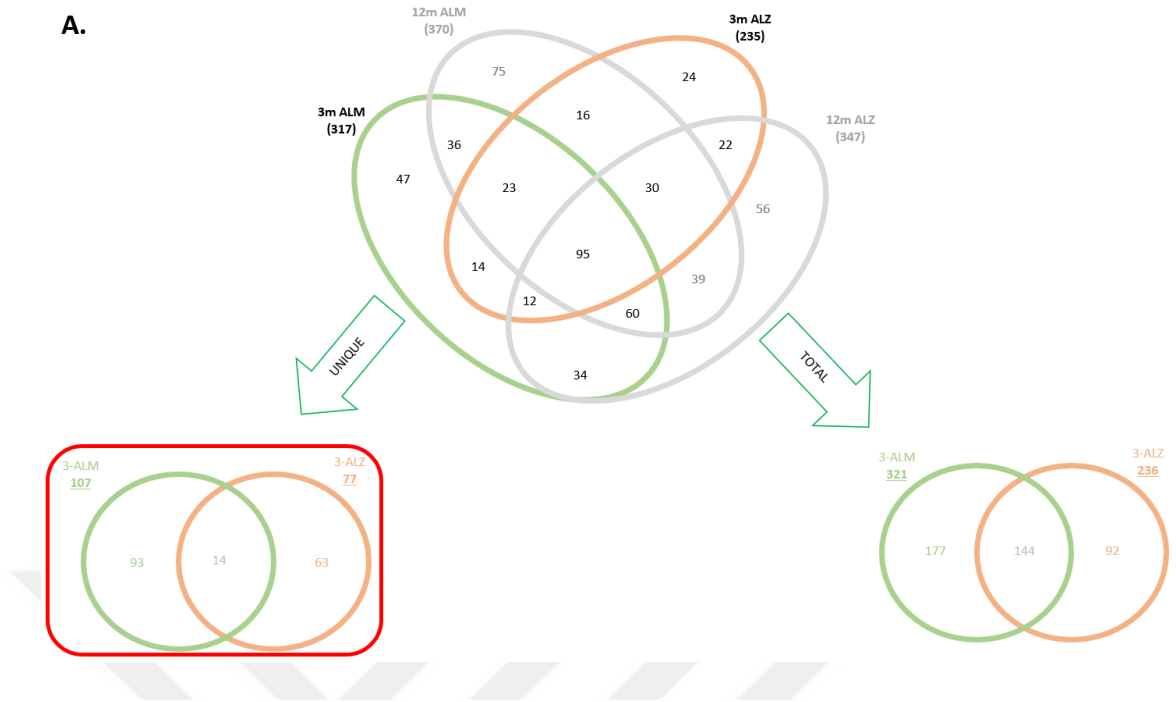
A. Organizmaların sayısına göre erken evre kontrol ve Tg floral unique organizma miktarının Venn diyagramı. Kırmızı vurgu sonraki görsellerin toplam erken evre mikroorganizmalar üzerinden yapılacağını belirtmektedir. B. Filum diyagramının, ileri evre kontrol ve Tg floral filum bazında yüzdelerle karşılaştırmasının unique versiyonu. Yeşil oklar unique 3-aylık ALM'ye göre unique 3-aylık ALZ'de artışı gösterirken, kırmızı oklar azalışı gösterir. Dikdörtgen içine alınan filumlar ise o biyolojik örneğin unique filumlarını göstermektedir. C. Yüzdelerle filum diyagramının çubuk grafik versiyonu, MedCalc for proportion testine göre anlamlı değişim ($p < 0,05$) sergileyen filumlar: Firmicutes: $p = 0,0159$, Aquificae: $p < 0,0001$, Fusobacteria: $p < 0,0001$. D. Çubuk grafik, erken evre ortak kontrol ve Tg floral organizmaların ortak proteinlerinin proteom deviniminin moleküler fonksiyonel analizini göstermektedir. Tercihen yapılan orantı testine göre enerji ($p = 0,009$) ve transkripsiyonel ($p < 0,0001$) mekanizmalarda anlamlılık gözlenmiştir. txn: transkripsiyon yolları, atp: enerji yolları, aa: amino asit metabolizması.

Toplam erken evre floral verilerin kıyaslanması yanı sıra, hasta ve normal yaşlanmaya giderken elde edilen unique erken evre floraları da birbirleri ile kıyaslanmış erken evredeki hasta bir floranın normal bir floradan net farkı anlaşılacak amaçlanmıştır. Bu aşamada da ileri evreye kıyaslanınca unique olarak erken evreye has olan hasta ve normal floral organizmaların birbirine kıyasını belirten venn şeması

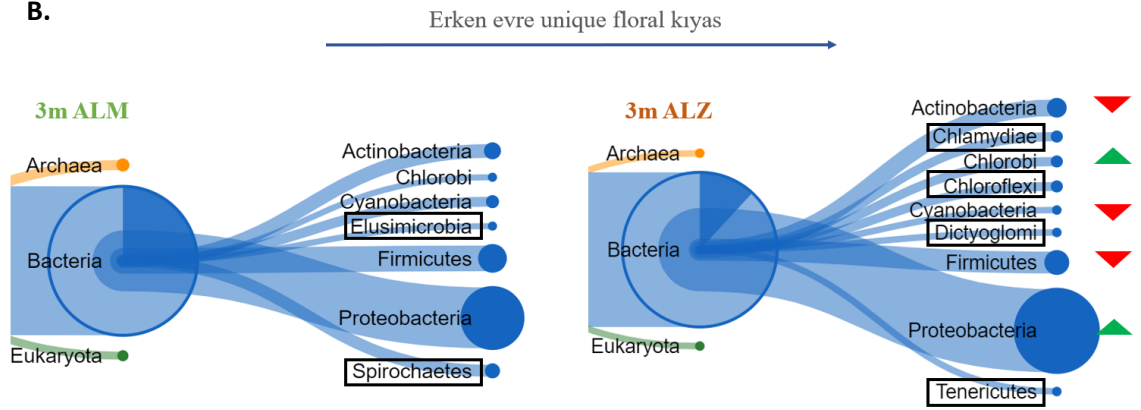
ve filum diyagramı çizilmiş, yüzdeler olarak artış azalışlar belirlenmiş, çubuk grafiklerle anlamlı/değerler gösterilmiştir. Her iki biyolojik grubun venn şeması çizilmiş ortak olan organizmaların anlamlı değişen protein intensiteleri ile moleküler fonksiyonları grafiklenmiştir.

Öncelikle sadece erken evreye has olan organizmaların venn şeması çizilerek hasta ve kontrol floralarına ait olan ve ortak olan organizmalar belirlenmiş (Şekil-12A), akabinde erken evre kontrol ve Tg model birbirleriyle filum bazında yüzdeler olarak kıyaslanmış (Şekil-12B) ve tercihen yapılan orantı testinde anlamlı görülenlerle birlikte filumlar çubuk grafiklerle gösterilmiştir (Şekil-12C). Bu bağlamda normal yaşlı florasına kıyasla yaşlı hastanın florasında iki filum artmış (*Chlorobi*, *Proteobacteria*), üç filum (*Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*) azalmıştır. Tercihen yapılan orantı testine anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Unique erken evre hasta ve kontrol flora kıyasının venn şemasında ortak bulunan 14 organizmanın ortak 7 proteinin anlamlı değişen 6 tane proteini ile Unipept 4.3 yazılımı kullanılarak moleküler fonksiyonları grafiklenmiştir. Tercihen yapılan orantı testine göre anlamlı değişim gözlenmemiştir (Şekil-12D). Erken evre unique ve ortak organizmalardan ortak ifade olan proteinler Tablo-9 ve 10'da gösterilmiştir

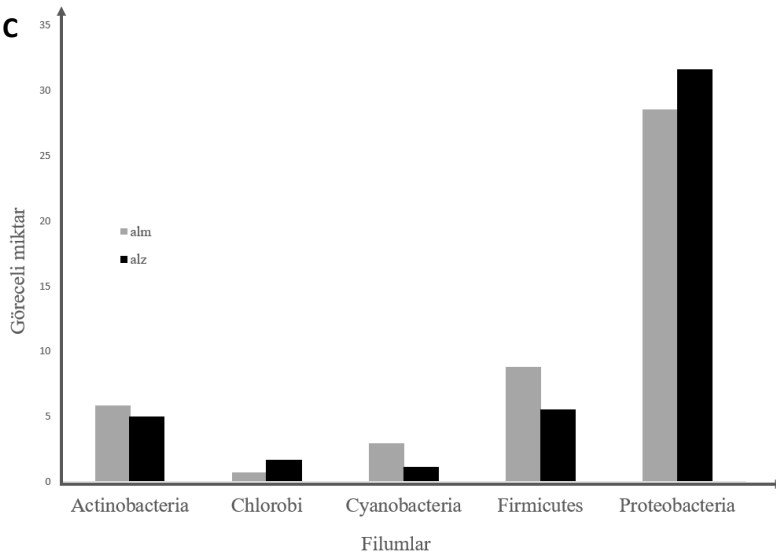
A.

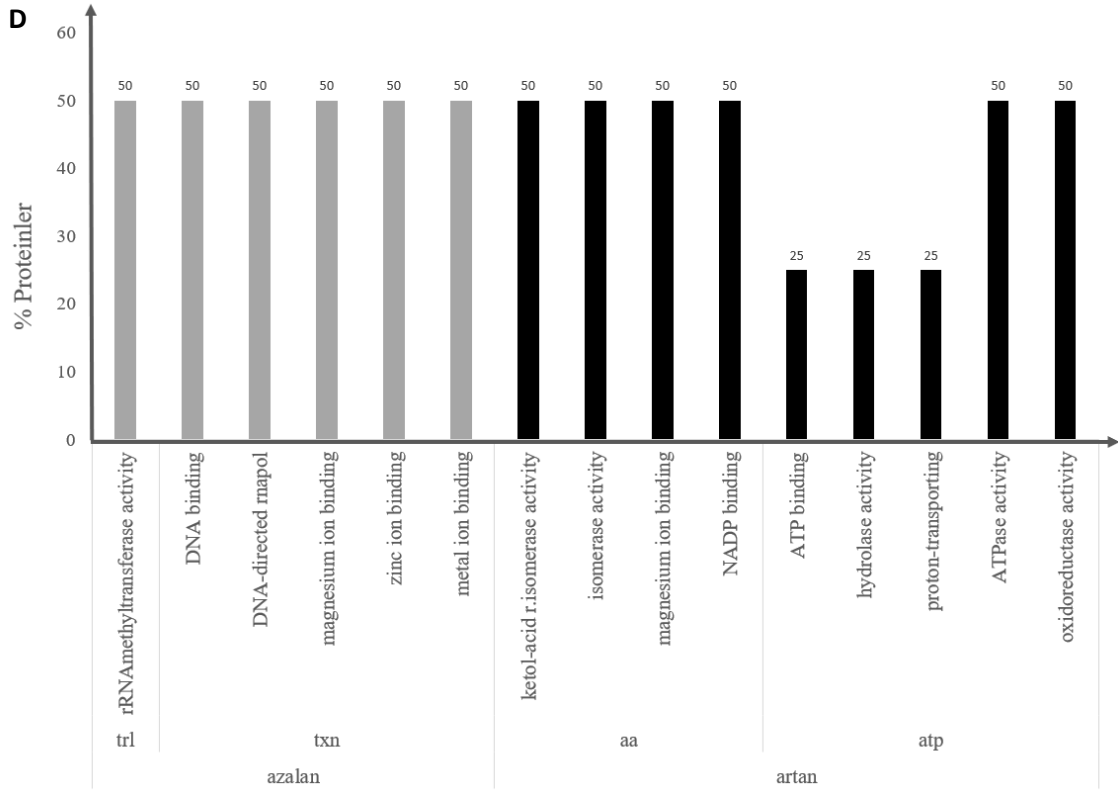


B.



C.





Şekil 12: Erken-evre modelin unique analiz akışı

A. Organizmaların sayısına göre erken evre kontrol ve Tg floral unique organizma miktarının Venn diyagramı. Kırmızı vurgu sonraki görsellerin toplam erken evre mikroorganizmalar üzerinden yapılacağını belirtmektedir. B. Filum diyagramının, ileri evre kontrol ve Tg floral filum bazında yüzdeler karşılaştırmasının unique versiyonu. Yeşil oklar unique 3-aylık ALM'ye göre unique 3-aylık ALZ'de artışı gösterirken, kırmızı oklar azalışı gösterir. Dikdörtgen içine alınan filumlar ise o biyolojik örneğin unique filumlarını göstermektedir. C. Yüzdeler filum diyagramının çubuk grafik versiyonu, MedCalc for proportion testine göre anlamlı değişim ($p < 0,05$) sergileyen filumlar: Firmicutes: $p = 0,0159$, Aquificae: $p < 0,0001$, Fusobacteria: $p < 0,0001$. D. Çubuk grafik, erken evre ortak kontrol ve Tg floral organizmaların ortak proteinlerinin proteom deviniminin moleküler fonksiyonel analizini göstermektedir. Tercihen yapılan orantı testine göre enerji ($p = 0,009$) ve transkripsiyonel ($p < 0,0001$) mekanizmalarda anlamlılık gözlenmiştir. txn: transkripsiyon yolları, atp: enerji yolları, aa: amino asit metabolizması.

Tablo 9: Erken evre toplam ALM ve ALZ flora kıyası neticesinde ortak çıkan organizmaların ortak ifade olan proteinlerinin T-testine göre anlamlı olanları

UniProtID	T-Testi	Organizma
A5FRK6	0,001503174	Dehalococcoides mccartyi (strain ATCC BAA-2100)
Q72HM6	0,00291934	Thermus thermophilus (strain HB27)
Q21M92	0,001936626	Saccharophagus degradans (strain 2-40)
Q4FLL3	2,02666E-06	Pelagibacter ubique (strain HTCC1062))
Q30X04	0,011525824	Desulfovibrio alaskensis (strain G20))

A1QZH6	0,010708953	Borrelia turicatae (strain 91E135))
Q1Q8Q0	0,002185843	Psychrobacter cryohalolentis (strain K5))
B4U081	0,007100538	Streptococcus equi subsp. zooepidemicus (strain MGCS10565))
G3XD24	0,019962798	Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692)
Q9PHE7	0,000455288	Xylella fastidiosa (strain 9a5c))
B9KCG6	0,008206055	Campylobacter lari (strain RM2100)
Q3A9K2	0,002328084	Carboxydotherrnus hydrogenoformans (strain ATCC BAA-161)
Q7NAV2	0,020371614	Mycoplasma gallisepticum (strain R(low)
Q0ANP4	0,041485973	Maricaulis maris (strain MCS10))
Q5FAG1	0,003093269	Neisseria gonorrhoeae (strain ATCC 700825)
B4U738	0,02935885	Hydrogenobaculum sp. (strain Y04AAS1))
A9B423	0,007973979	Herpetosiphon aurantiacus (strain ATCC 23779)
A9FQE4	0,018236141	Sorangium cellulosum (strain So ce56))
Q5L7N5	0,01607363	Bacteroides fragilis (strain ATCC 25285)
Q5FRC5	0,049307251	Gluconobacter oxydans (strain 621H))
B2UYT8	0,004366732	Clostridium botulinum (strain Alaska E43)
Q255E5	0,021142356	Chlamydia felis (strain Fe)
B3DTE1	0,034630127	Bifidobacterium longum (strain DJO10A))
A5IJM5	0,043269717	Thermotoga petrophila (strain RKU-1)
C0ZBS0	0,003214039	Brevibacillus brevis (strain 47)
A6UT35	0,048959564	Methanococcus aeolicus (strain ATCC BAA-1280)
A9KHD9	0,030349201	Lachnoclostridium phytofermentans (strain ATCC 700394)
A7I175	0,018767168	Campylobacter hominis (strain ATCC BAA-381)
P0C0G6	0,03463261	Streptococcus pyogenes)
A1URR2	0,00431396	Bartonella bacilliformis (strain ATCC 35685)
O32755	0,017398448	Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus)

Tablo 10: Erken evre toplam ALM ve ALZ flora kıyası neticesinde ortak çıkan organizmaların ortak ifade olan proteinlerinin T-testine göre anlamlı olanları

UniProtID	T-testi	Organizma
A1QZH6	0,010708953	Borrelia turicatae (strain 91E135)
A9FQE4	0,018236141	Sorangium cellulosum (strain So ce56)
A5IJM5	0,043269717	Thermotoga petrophila (strain RKU-1)
A6UT35	0,048959564	Methanococcus aeolicus (strain ATCC BAA-1280)
A7I175	0,018767168	Campylobacter hominis (strain ATCC BAA-381)
O32755	0,017398448	Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus

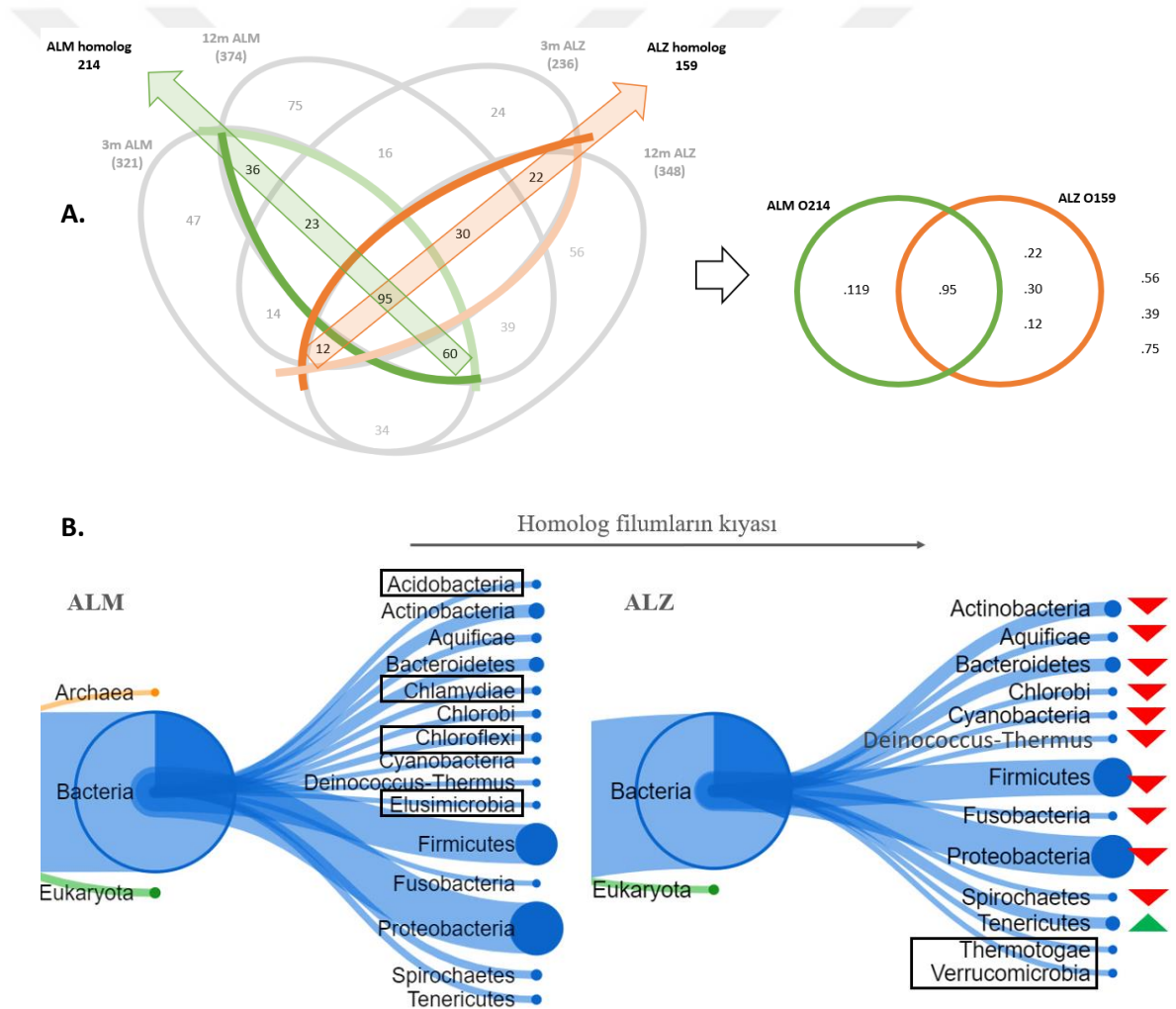
6.5. Homolog Hasta ve Kontrol Organizmaların Kıyasının Metaproteom

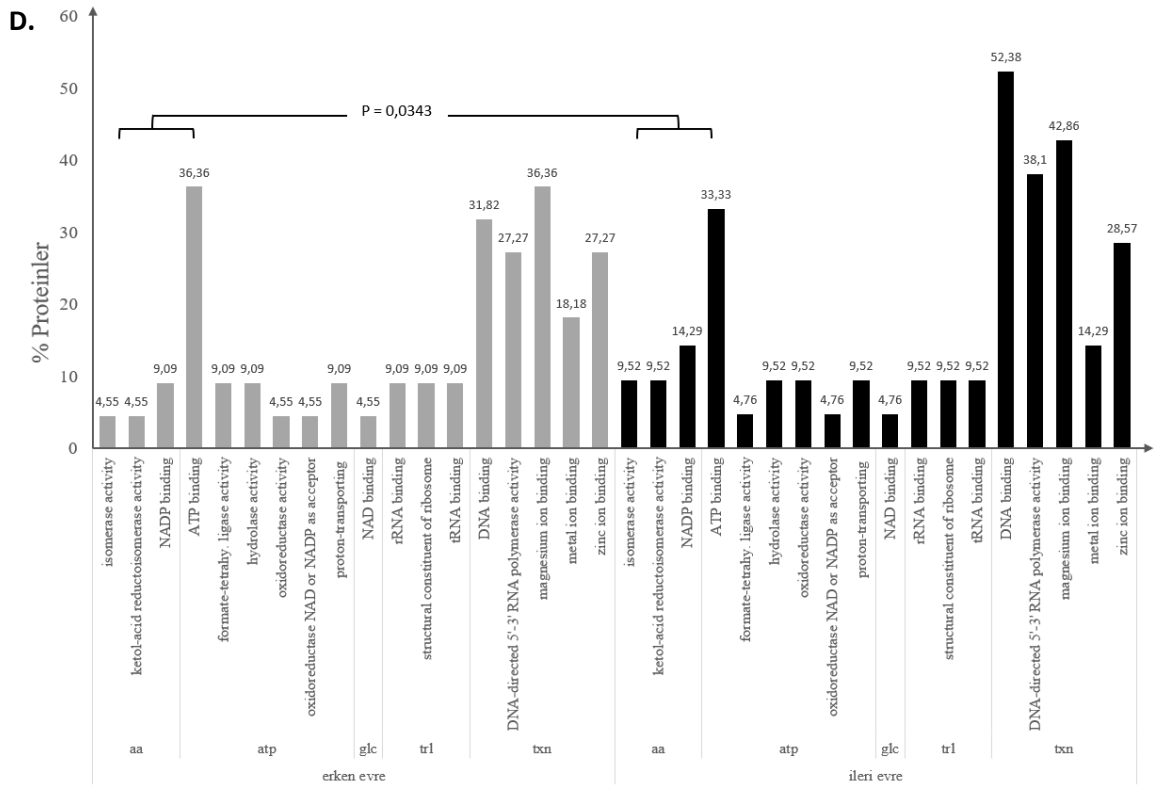
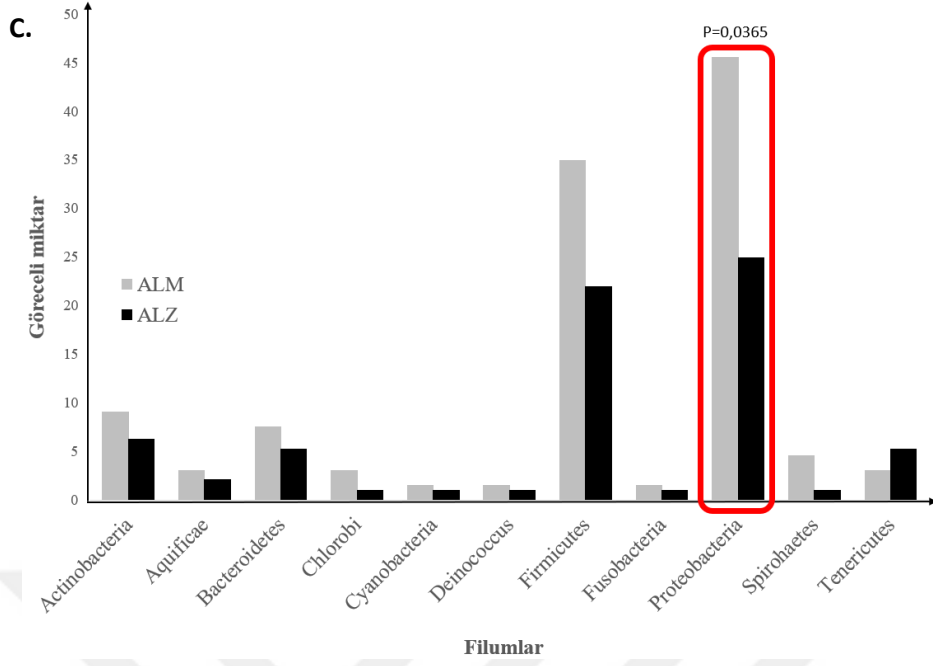
Değişimi

Yaştan bağımsız kıyaslama yaparak çekirdek hükmündeki ALM ve ALZ floralarına vakıf olmak için bu kez de 3 ve 12-aylık ALM ortak organizmaları (214 taxa) ile 3 ve 12-aylık ALZ ortak organizmaları (159 taxa) kıyaslanmıştır. Daha önceki uygulanan; venn şeması ile organizma miktarını belirleme, filum diyagramı ile organizmaların birbirlerine göre yüzdelerini kıyaslama, bar grafik ile anlamlı değişen filumları belirleme ve fonksiyonel analizler ile moleküler yolların değişimini kıyaslama basamakları araştırmamızın bu homolog kıyas kısmında da gösterilecektir. Daha sonra sırasıyla ileri evre ALZ flora ile ilişkili tüm floral dağılımlar teker teker ele alınarak işlenecek, ileri-evre ALZ ile olan ve anlamlı görülen ilişkisi gözler önüne serilecektir.

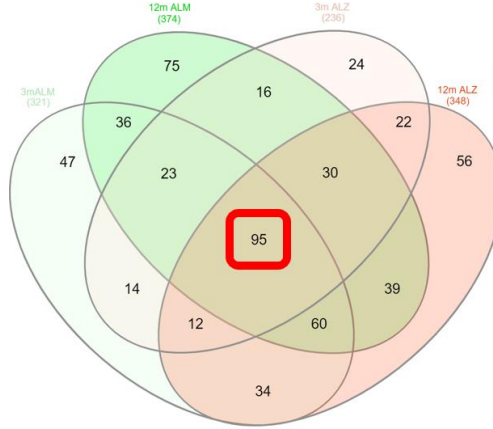
Öncelikle homolog organizmaların venn şeması çizilerek hasta ve kontrol floralarına ait olan organizmalar belirlenmiş (Şekil-13A), akabinde, belirlenen bu organizmalar birbirleriyle filum bazında yüzdeler olarak kıyaslanmış (Şekil-13B) ve tercihen yapılan orantı testinde anlamlı görülenlerle birlikte filum/lar çubuk grafikte gösterilmiştir. (Şekil-13C). Bu bağlamda ALM florasına kıyasla ALZ florasında on filum azalmış (*Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*), bir filum (*Tenericutes*) artmıştır. Tercihen yapılan orantı testine göre sadece *Proteobacteria* filumunda anlamlı bir değişim gözlenmiştir. Moleküler fonksiyonel analiz için iki yaklaşım sergilenmiş olup birisinde 3-aylık ALM ve ALZ kıyası sonucu elde edilen anlamlı değişen proteinlerle, 12-aylık ALM ve ALZ kıyası sonucu elde edilen anlamlı değişen proteinler analize tabi tutularak ileri evreye doğru, kendi aralarında anlamlı değişim sergileyen proteinlerin nasıl değişim sergilediği gözlenmek istenmiştir. Bu bağlamda daha önce yapılan kıyas ile paralel yollar gözlenmiş, ilginç bir şekilde sadece aminoasit yolağında görevli proteinlerin devinimi, tercihen yapılan orantı testine göre anlamlı bulunmuştur (Şekil-13D). Diğerinde ise kıyaslamamızın daha dengeli bir hal alması için venn şemasının kalbi mesabesinde olan dört biyolojik

örnekteki homolog organizmalar ele alınarak değerlendirilmiştir. Bu dört biyolojik örnekte çekirdek hükmünde var olan 95 organizmaların (Şekil-13E) ortak olan proteinlerine t-test üzerinden fold change uygulanarak anlamlı değişim olup olmadığı gözlenmiştir. Buna göre 95 homolog organizmadan 13 ortak protein tespit edilmiş ve bunun iki ayrı filumdan (*Proteobacteri*, *Firmicutes*) oluşan dört tanesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bunlar üzerinden yapılan Moleküler Fonksiyonel analizlerde ise bu anlamlı proteinlerin tekrar daha önceki kıyaslarımıza paralel olarak aminoasit, enerji ve transkripsiyonel yollarla ilişkisi tespit edilmiştir (Tablo-11). (Yeterli protein olmadığı için grafik çizilememiştir.)





E.



Şekil 13: Homolog ALM ve ALZ kıyası analiz akışı.

A. Organizmaların sayısına göre ALM ve ALZ homolog organizma miktarının Venn diyagramı. 2'li küme dışı sayılar ileri evre ALZ ile ilişkili olup ilerleyen bölümlerde teker teker değerlendirilecek organizmalardır. B. Filum diyagramının, ALM ve ALZ homolog organizmalarının filum bazında yüzdelerle karşılaştırması. Yeşil ok ALM'ye göre ALZ'de artışı gösterirken, kırmızı oklar azalışı gösterir. Dikdörtgen içine alınan filumlar ise o biyolojik örneğin unique filumlarını göstermektedir. C. Yüzdelerle filum diyagramının çubuk grafik versiyonu, MedCalc for proportion testine göre anlamlı değişim ($p < 0,05$) sergileyen filum: Proteobacteria: $p = 0,0365$. D. Çubuk grafik, 3 ALM-ALZ ve 12 ALM-ALZ homolog proteinlerinin birbirlerine göre proteom devriminin moleküler fonksiyonel analizini göstermektedir. Tercihen yapılan orantı testine göre aminoasit mekanizmasında ($p = 0,0343$) anlamlılık gözlemlenmiştir. aa: amino asit metabolizması, atp: enerji yolları, glc: glukoz homeostaz mekanizması, trl: translasyon yolları, txn: transkripsiyon yolları. E. Dört biyolojik örneğin (3 ve 12 aylık ALM, 3 ve 12 aylık ALZ) venn şeması, kırmızı vurgu her örnekte görülen homolog organizmaları göstermektedir.

UniProtID	Protein adı	T-testi	FChange	Organizma	Filum
Q30X04	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	0,00	-0,90	Desulfovibrio alaskensis (strain G20)	Proteobacteria
P24931	Rubrythrin	0,03	-0,28	Desulfovibrio vulgaris (strain Hildenborough)	Proteobacteria
B2UYT8	Keto-acid reductoisomerase	0,02	0,27	Clostridium botulinum (strain Alaska E43)	Firmicutes
P0COG6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,00	7,98	Streptococcus pyogenes	Firmicutes

Yolaklar	Moleküler Fonksiyon	% Peptit
Aminoasit metabolizması	metal ion binding	25
	keto-acid reductoisomerase activity	25
	isomerase activity	25
	NAD binding	25
Enerji metabolizması	oxidoreductase activity	25
	iron ion binding	25
	oxidoreductase activity,NAD or NADP as acceptor	25
Glukoz metabolik proses	NADP binding	50
Transkripsiyon	magnesium ion binding	50
	cytokine activity	25
	DNA binding	25
	DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity	25
	zinc ion binding	25

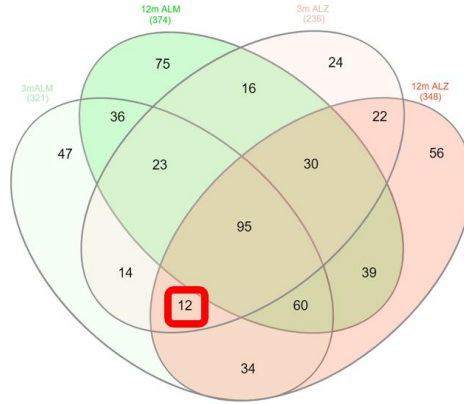
Tablo 11: Homolog 95 organizma analizi

Dört biyolojik örnekten neşet eden 95 organizmanın anlamlı değişen dört ortak proteini ve anlamlı değişen bu dört proteinin, peptit sekansı bazında Moleküler Fonksiyonel analizi.

Çekirdek hükmünde olan kolonilerin değerlendirilmesi akabinde, total venn şemasında 3-aylık ALM ve ALZ , ve 12-aylık ALZ floralarının çakıştığı homolog 12 organizma, ileri evre hasta sürecine doğru olan genç kontrol- ileri evre hasta ve genç hasta-ileri evre hasta şeklindeki devinimin anlamlılığı için değerlendirilmiştir. 3 vs 12-aylık ALZ kıyasında 12 homolog mikroorganizma ve 6 homolog proteinden 4, ve 3-aylık ALM vs 12-aylık ALZ kıyasında da 12 homolog mikroorganizma ve 3 homolog proteinden 1 anlamlı protein tespit edilmiş olup bu proteinlerin AH ile olan ilişkisi literatürle desteklenmiştir. Anlamlı devinim sergileyen bu proteinlere Moleküler Fonksiyonel analiz uygulanmış ve etkilenen yolaklar, enerji mekanizması, transkripsiyon ve yoğun şekilde translasyon yolakları şeklinde tespit edilmiştir (Tablo-12).

Tablo 12: Homolog 12 organizma analiz tablosu.

Venn şemasında 3-aylık ALZ, ALM ve 12-aylık ALZ florasından oluşan 12 organizma gösterilmektedir. Bu organizmaların anlamlı değişen dört ortak proteini ve anlamlı değişen bu dört proteinin, peptit sekansı bazında Moleküler Fonksiyonel analizi.



UniProtID	Protein adı	T-test	F.Change	Organizma	Filum
B2KEX0	ATP synthase subunit alpha	0,03	-0,92	Elusimicrobium minutum (strain Pei191)	Elusimicrobia
A1JS27	50S ribosomal protein L16	0,04	0,81	Yersinia enterocolitica serotype O:8 (strain NCTC 13174)	Proteobacteria
P42480	Elongation factor Tu	0,03	1,81	Parahymenobacter ocellatus	Bacteroidetes
Q9AAU1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	0,01	303,75	Caulobacter vibrioides (strain ATCC 19089)	Proteobacteria

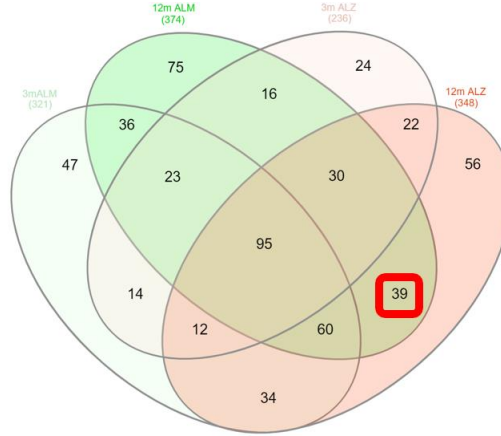
Yolaklar	Moleküler Fonksiyon	Peptitler %
Enerji metabolizması	proton-transporting ATP synthase activity	25
	ATP binding	25
Transkripsiyon	DNA binding	50
	DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity	25
	magnesium ion binding	25
	zinc ion binding	25
Translasyon	rRNA binding	25
	tRNA binding	25
	structural constituent of ribosome	25
	GTP binding	25
	GTPase activity	25
	translation elongation factor activity	25

Bu kez de, total venn şemasında sadece 12-aylık ALM ve ALZ florasında homolog bulunan 39 organizma ele alınmıştır. Bu homolog 39 organizma ile, verilerimizde sadece yaşlılıkta görülen florasının değerlendirilmesiyle ileri-evre hasta florasının normal bir yaşlı florasından ne gibi bir farka sahip olduğu hem filum hem de proteom bazında değerlendirilmiştir. Bu kıyaslamada 39 homolog organizma ve 13 homolog proteinden 8 anlamlı değişen homolog protein tespit edilmiş olup bu proteinlerin AH ile olan ilişkisi literatürle desteklenmiştir. Anlamlı devinim sergileyen bu proteinlere Moleküler Fonksiyonel analiz uygulanmış ve etkilenen yolaklar, transkripsiyon, enerji mekanizması, aminoasit metabolizması, proteinin 3-boyutlu konformasyonel yapısı ve

glukoz metabolizması ile ilişkili proteinler olarak bulunmuştur (Tablo-13).

Tablo 13: Homolog 39 organizma analiz tablosu

Venn şemasında sadece 12-aylık ALM ve ALZ florasından oluşan 39 organizma gösterilmektedir. Bu organizmaların anlamlı değişen sekiz homolog proteinini ve anlamlı değişen bu sekiz proteinin, peptit sekansı bazında Moleküler Fonksiyonel analizi.



UniProtID	Protein adı	T-test	Fchange	Organizma	Filumlar
Q1LSX6	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	0,00	-0,94	Baumannia cicadellinicola subsp. Homalodisca coagulata	Proteobacteria
B0JRP2	Ketol-acid reductoisomerase	0,04	0,39	Microcystis aeruginosa (strain NIES-S43)	Cyanobacteria
A0QL48	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	0,01	1,17	Mycobacterium avium (strain 104)	Actinobacteria
Q8KTS0	60 kDa chaperonin	0,04	1,28	Tremblaya princeps	Proteobacteria
Q6CFT7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	0,02	2,10	Yarrowia lipolytica (strain CLIB 122 / E 150)	Fungi
B7J1W0	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	0,00	2,72	Borrelia burgdorferi (strain ZS7)	Spirochaetes
P64195	Glucose-6-phosphate isomerase	0,01	5,33	Streptococcus agalactiae serotype III (strain NEM316)	Firmicutes
A4G9U4	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	0,05	52,11	Herminiimonas arsenicoxydans	Proteobacteria

Yolak	Moleküler Fonksiyon	Peptitler %
Transkripsiyon	magnesium ion binding	62,5
Transkripsiyon	DNA binding	50
Transkripsiyon	DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity	50
Transkripsiyon	zinc ion binding	50
Transkripsiyon	metal ion binding	25
Enerji Met.	ATP binding	25
Aminoasit Met.	ketol-acid reductoisomerase activity	12,5
Aminoasit Met.	isomerase activity	12,5
Aminoasit Met.	NADP binding	12,5
Protein yapısı	unfolded protein binding	12,5
Enerji Met.	proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	12,5
Glukoz Met.	glucose-6-phosphate isomerase activity	12,5

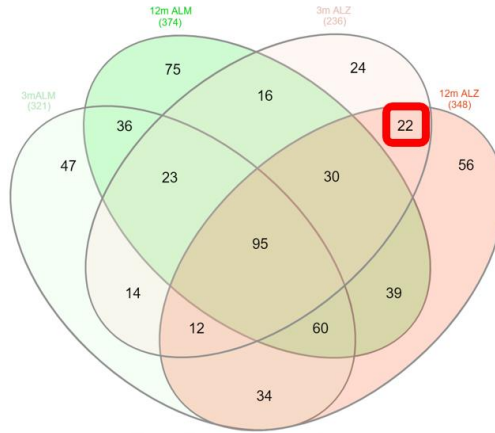
Total venn şemasında sadece 3 ve 12-aylık ALZ mikrobiyotasına spesifik olan homolog 22 organizma ele alınmıştır. Bu homolog 22 organizma ile, verilerimizde ne yaşlı ne genç ayrımı yapmaksızın sadece ALZ florasının değerlendirilmesiyle, ALZ

durumunda çekirdek hükmünde bulunan spesifik flora diğer biyolojik örneklerin floralarından ayrılmış, hem filum hem de proteom bazında bu organizmalar değerlendirilmiştir. Bu kıyaslamada 22 homolog organizma ve 6 homolog proteinin altısı da anlamlı değişen homolog protein tespit edilmiş olup bu proteinlerin AH ile olan ilişkisi literatürle desteklenmiştir. Anlamlı devinim sergileyen bu proteinlere Moleküler Fonksiyonel analiz uygulanmış ve etkilenen yollar, diğerlerine benzer şekilde transkripsiyon ve enerji mekanizması ile ilişkili proteinler olarak bulunurken şimdiye kadar ki kıyaslamalarda gözlenmeyen, çalışmalarda (182) da artışı oksidatif stresle ilişkilendirilen pentoz-fosfat yolağı ile ilişkili proteinler de tespit edilmiştir. (Tablo-14).



Tablo 14: Homolog 22 organizma analiz tablosu

Venn şemasında sadece 3 ve 12-aylık ALZ florasından oluşan 22 organizma gösterilmektedir. Bu organizmaların anlamlı değişen altı homolog proteini ve anlamlı değişen bu proteinlerin, peptit sekansı bazında Moleküler Fonksiyonel analizi.



UniProtID	Protein adı	T-test	Fchange	Organizma	Filum
P13357	ATP synthase subunit beta	0,01	-0,88	Cellulophaga lytica	Bacteroidetes
Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	0,01	-0,08	Caenorhabditis elegans	Metazoa
P37282	60 kDa chaperonin	0,08	0,49	Lactococcus lactis subsp. lactis (strain IL1403)	Firmicutes
COQVC8	Probable transaldolase	0,01	1,91	Brachyspira hyodysenteriae (strain ATCC 49526 / WA1)	Spirochaetes
A0K2Y1	ATP synthase subunit alpha	0,01	9,31	Burkholderia cenocepacia (strain HI2424)	Proteobacteria
A8GV24	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	0,00	11,62	Rickettsia bellii (strain OSU 85-389)	Proteobacteria

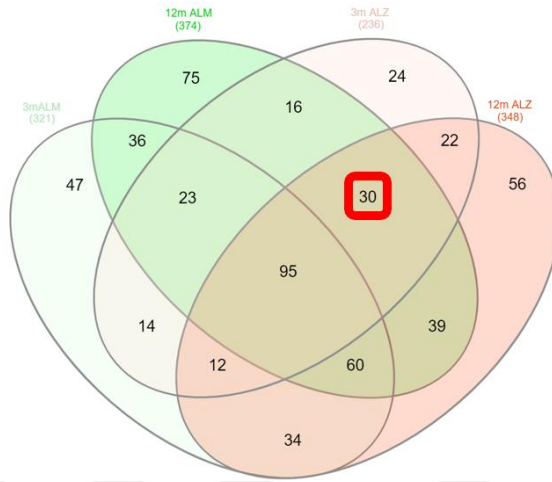
Yolak	Moleküler Fonksiyon	Peptit %
Enerji Metabolizması	ATP binding	66,67
Enerji Metabolizması	proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	50
Enerji Metabolizması	hydrolase activity	16,67
Pentoz-Fosfat	sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glycerontransferase activity	16,67
Pentoz-Fosfat	aldehyde-lyase activity	16,67
Protein yapısı	unfolded protein binding	16,67
Transkripsiyon	DNA binding	16,67
Transkripsiyon	DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity	16,67
Transkripsiyon	ribonucleoside binding	16,67

Son olarak, total venn şemasında bu kez de sadece 12-aylık ALM, ALZ ve 3-aylık ALZ mikrobiyotasına spesifik olan homolog 30 organizma ele alınmıştır. Bu homolog organizmalar ile ileri evre hasta süreci, erken evre Tg ve normal yaşlı floradan ayırt edici özellikleri hem organizma hem de proteom bazında ele alınıp incelenmiştir. Bu kıyaslamada 30 homolog organizma ve 6 homolog proteinden 4 anlamlı değişen homolog protein tespit edilmiş olup bu proteinlerin AH ile olan ilişkisi literatürle desteklenmiştir. Anlamlı devinim sergileyen bu proteinlere Moleküler Fonksiyonel analiz uygulanmış ve etkilenen yollar, diğerlerine benzer olarak transkripsiyon ve

enerji mekanizması ile ilişkili proteinler barındırdığı gibi şimdiye kadar gözlemediğimiz glutamat metabolizması ve kromatin yapısı gibi yolları tetikleyen proteinleri de barındırmıştır (Tablo-15).

Tablo 15: Homolog 30 organizma analiz tablosu

Venn şemasında sadece 12-aylık ALM, ALZ ve 3-aylık ALZ florasından oluşan 30 organizma gösterilmektedir. Bu organizmaların anlamlı değişen dört homolog proteini ve anlamlı değişen bu proteinlerin, peptid sekansı bazında Moleküler Fonksiyonel analizi.



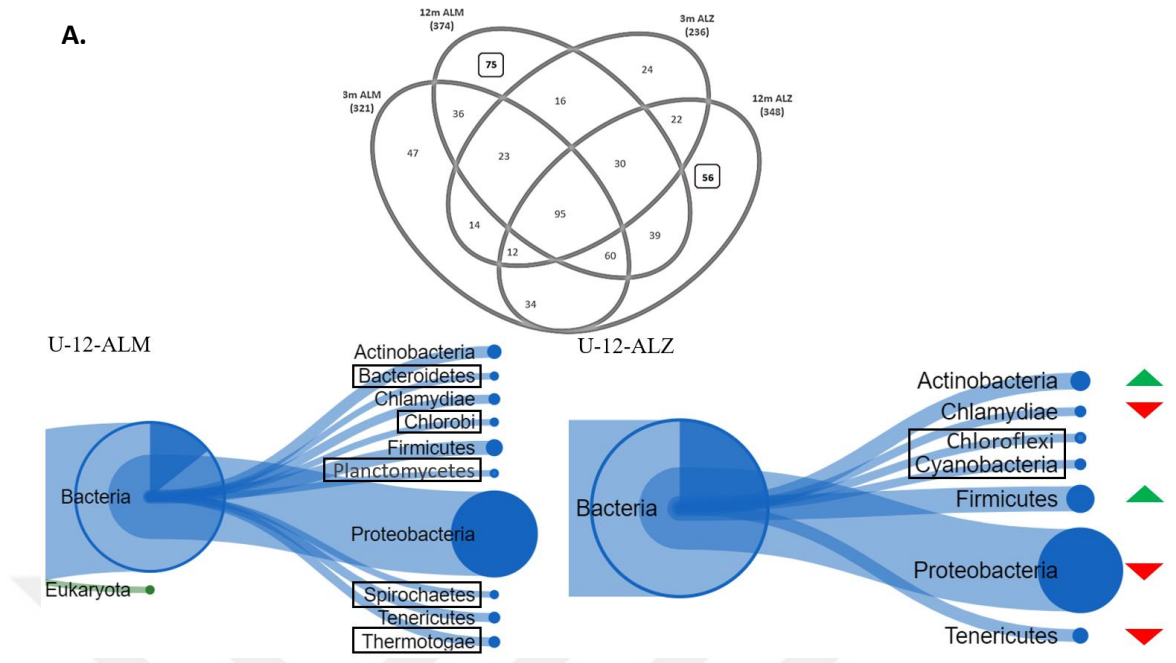
UniProtID	Protein adı	T-test	Fchange	Organizma	Filum
P00370	NADP-specific glutamate dehydrogenase	0,001	-0,56	Escherichia coli (strain K12)	Proteobacteria
Q85FR6	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'-beta'	0,046	-0,37	Cyanidioschyzon merolae (strain 10D)	Rhodophyta
A5DQL2	Histone H2A Z	0,010	1,06	Meyerozyma guilliermondii (strain ATCC 6260)	Fungi
P75264	Putative ABC transporter ATP-binding protein MG187 homolog	0,003	6,41	Mycoplasma pneumoniae (strain ATCC 29342)	Tenericutes
A5DQL2	Histone H2A Z	0,023	4,49	Meyerozyma guilliermondii (strain ATCC 6260)	Fungi

Yolaklar	Moleküler Fonksiyon	Peptit %
Enerji Met.	ATP binding	33,33
Enerji Met.	transmembrane signaling receptor activity	16,67
Enerji Met.	hydrolase activity, acting on ester bonds	16,67
Enerji Met.	excinuclease ABC activity	16,67
Enerji Met.	ATPase activity	16,67
Enerji Met.	ATPase-coupled polyamine transmembrane transporter activity	16,67
Enerji Met.	transmembrane transporter activity	16,67
Glutamat Met.	oxidoreductase activity	16,67
Glutamat Met.	glutamate dehydrogenase	16,67
Glutamat Met.	oxidoreductase activity,NAD or NADP as acceptor	16,67
Glutamat Met.	nucleotide binding	16,67
Kromatin Yapısı	protein heterodimerization activity	16,67
Kromatin Yapısı	structural constituent of ribosome	16,67
Transkripsiyon	DNA binding	50
Transkripsiyon	metal ion binding	33,33
Transkripsiyon	DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity	16,67

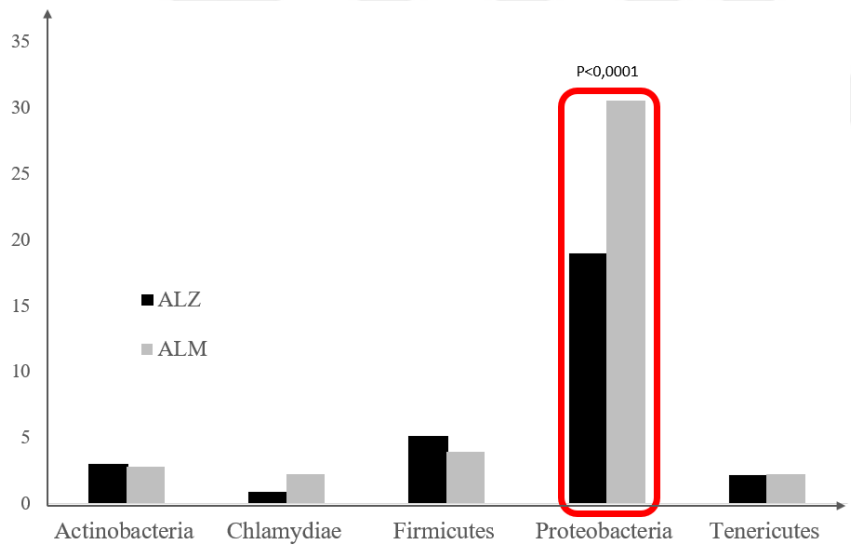
Şimdiye kadar, elimizdeki verileri 4'lü venn şemasına tabii tutarak hepsinden ileri-evre ALZ florasıyla ilgili olan homologlar alınıp, projemizin amacı olan ileri-evre

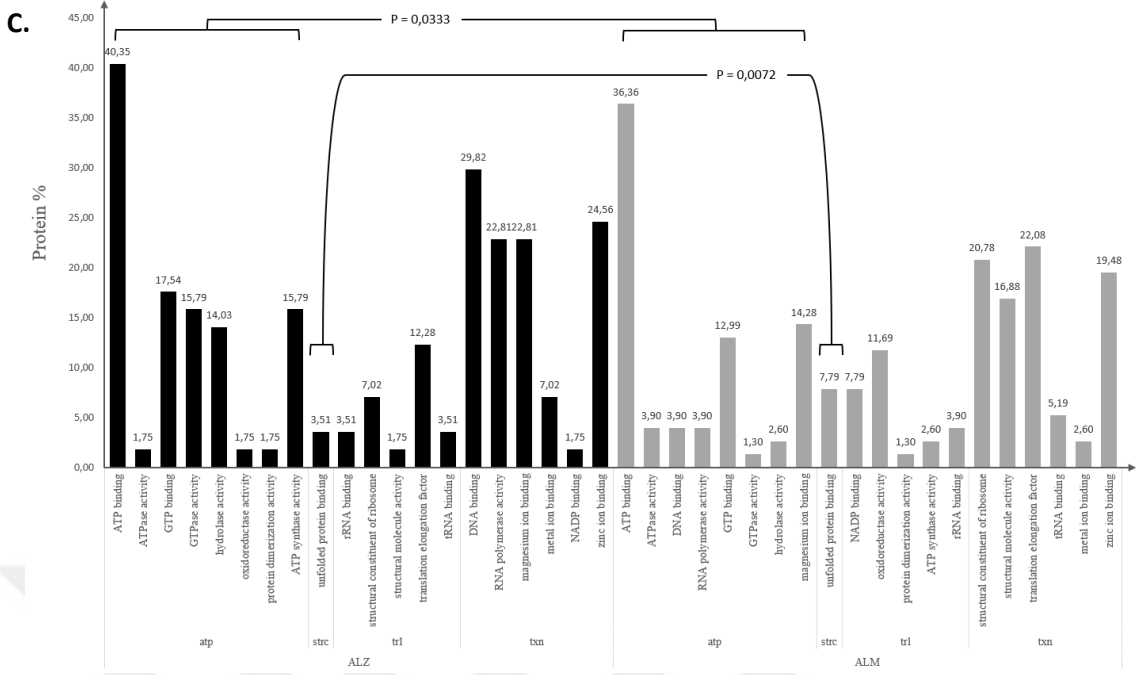
ALZ modelinde hem proteinler moleküler fonksiyonel bazda, hem de organizmalar filum bazında değerlendirilerek biyobelirteç olabilecek moleküler fonksiyon, protein, organizma yada filumlara kapı aralamış olduk. Bir sonraki basamağımızda hiçbir örnekle ilişkisi olmadan sadece 12-aylık ALM ve sadece 12-aylık ALZ florasında bulunan organizmalar ele alınarak keskin farklılıklara değinilmiştir. Bu bağlamda öncelikle bu floraların filum diyagramı çıkarılmış ve yüzdeleri kıyaslanmıştır. Bu kıyas neticesinde iki filum (*Actinobacteria*, *Firmicutes*) 12-aylık ALM florasına göre artış gösterirken üç filum (*Chlamydiae*, *Proteobacteria*, *Tenericutes*) azalış göstermiştir (Şekil-14A). Bu bağlamda tercihen yapılan orantı testine göre anlamlı filum/lar (*Proteobacteria*: $p < 0,0001$) belirlenmiş olup bar grafikte gösterilmiştir (Şekil-14B). Tamamen unique değerler oldukları ve dolayısıyla homolog organizma barındırmadıkları için ortak proteinlerden moleküler analiz yapılamasa da unique değerler üzerinden total bir moleküler analiz gerçekleştirilmiş, homolog fonksiyonlar belirlenerek bunlardan bir analiz grafiği oluşturulup takribi bir fonksiyonel bakış sergilenmiş, enerji mekanizması ($p=0,0333$) ve protein 3-boyutlu konformasyonel yapısı ile ilgili yolaklarda ($p=0,0072$) ALM florasına nazaran ALZ florasında anlamlı bir değişim gözlenmiştir. (Şekil-14C). Elde edilen markör konumundaki ileri-evre ALZ ve ALM floral organizma ve peptit sekansı, protein bilgileriyle Tablo 16 ve 17’de gösterilmiştir.

A.



B.





Şekil 14: Tüm örneklerden filtrelenerek elde edilen ileri-evre Tg ve kontrol model analiz akışı.

A. Organizmaların sayısına göre 12-aylık ALM ve ALZ unique organizma miktarının Venn diyagramı ve filum diyagramının, bu organizmaların filum bazında yüzdelerle karşılaştırması. Yeşil ok ALM'ye göre ALZ'de artışı gösterirken, kırmızı oklar azalışı gösterir. Dikdörtgen içine alınan filumlar ise o biyolojik örneğin unique filumlarını göstermektedir. B. Yüzdelerle filum diyagramının çubuk grafik versiyonu, MedCalc for proportion testine göre anlamlı değişim ($p < 0,05$) sergileyen filum: Proteobacteria: $p < 0,0001$. C. Çubuk grafik, 3 ALM-ALZ ve 12 ALM-ALZ unique proteinlerinin birbirlerine göre proteom deviniminin peptit bazında moleküler fonksiyonel analizini göstermektedir. Tercihen yapılan orantı testine göre enerji mekanizmasında ($p = 0,0333$) ve protein 3-boyutlu konformasyonel yapısı ile ilgili yollarda ($p = 0,0072$) anlamlılık gözlenmiştir. atp: enerji yolları, trl: translyasyon yolları, txn: transkripsiyon yolları, strc: proteinin 3D konformasyonel yapısı.

Tablo 16: Toplam örneklerden sadece 12-aylık ALZ florasında bulunan mikroorganizmanın protein bazında elde edilen verileri

Oranizma	UniProtID
<i>Agrobacterium fabrum</i> (strain C58)	P30779
<i>Gloeobacter violaceus</i> (strain ATCC 29082)	Q7NK76
<i>Macrococcus caseolyticus</i> (strain JCSC5402)	B9E8Q1
<i>Methylobacterium extorquens</i> (strain PA1)	A9W2R3
<i>Mycobacterium leprae</i> (strain TN)	Q9CD72
<i>Vibrio vulnificus</i> (strain YJ016)	Q7MGR5
<i>Acidovorax</i> sp. (strain JS42)	A1WCM9
<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	Q81B21
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (strain ATCC 29148)	Q8A463
<i>Burkholderia thailandensis</i> (strain ATCC 700388)	Q2SU20
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> (strain 82-40)	A0RR26
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> serotype O:6 (strain 81116)	A8FL53
<i>Chlamydia muridarum</i> (strain MoPn)	Q9PKA7
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> (strain ATCC 29364)	B9LL90
<i>Dechloromonas aromatica</i> (strain RCB)	Q47JA5
<i>Deinonema</i> sp.	P33168
<i>Dictyostelium discoideum</i> (Slime mold)	P20790
<i>Frankia casuarinae</i> (strain DSM 45818)	Q2JFI4
<i>Haemophilus ducreyi</i> (strain 35000HP)	Q7VLW2
<i>Halothermothrix orenii</i> (strain H 168)	B8CW72
<i>Helicobacter pylori</i> (strain G27)	B5Z8D0
<i>Janthinobacterium</i> sp. (strain Marseille)	A6T472
<i>Leifsonia aquatica</i> (<i>Corynebacterium aquaticum</i>)	Q9LBG2
<i>Mycolicibacterium gilvum</i> (strain PYR-GCK)	A4T1R2
<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> (strain Californiakid)	Q2SSW8
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup C (strain 053442)	A9M1J1
<i>Neosartorya fumigata</i> (strain ATCC MYA-4609)	Q4W944
<i>Nitrosomonas eutropha</i> (strain DSM 101675)	Q0AF54
<i>Oleispira antarctica</i>	Q8KM30
<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i> (strain DSM 5477)	B4SGC7
<i>Prochlorococcus marinus</i> (strain MIT 9215)	A8G4K8
<i>Prochlorococcus marinus</i> (strain MIT 9312)	Q318Q8
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> (strain T6c)	Q15YB0
<i>Pseudomonas putida</i> (strain W619)	B1JDX3
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (strain A1501)	A4VPN8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (strain ATCC BAA-871)	Q884Q3
<i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2)	P0A1V6
<i>Shewanella amazonensis</i> (strain ATCC BAA-1098)	A1S212
<i>Shewanella halifaxensis</i> (strain HAW-EB4)	B0TM18
<i>Shewanella</i> sp. (strain ANA-3)	A0KRN9
<i>Sphingobium</i> sp. (strain NBRC 103272)	O66164

Staphylococcus epidermidis (strain ATCC 35984)	Q5HMB9
Stenotrophomonas maltophilia (strain K279a)	B2FHZ0
Streptococcus sanguinis (strain SK36)	A3CK90
Streptococcus suis (strain 05ZYH33)	A4VU67
Streptomyces lividans	P50001
Thermoanaerobacter pseudethanolicus (strain ATCC 33223)	B0KCJ3
Thermomicrobium roseum (strain ATCC 27502)	B9L1H1
Thermosiphon melanesiensis (strain DSM 12029)	A6LLL1
Thermus thermophilus (strain HB8)	Q5SKE6
Thioalkalivibrio sulfidiphilus (strain HL-EbGR7)	B8GRC0
Treponema pallidum (strain Nichols)	O83668
Ureaplasma parvum serovar 3 (strain ATCC 700970)	Q9PPZ7
Ureaplasma urealyticum serovar 10 (strain ATCC 33699)	B5ZAZ4
Vibrio cholerae serotype O1 (strain ATCC 39541)	A5F389
Vibrio parahaemolyticus serotype O3:K6 (strain RIMD 2210633)	Q87LT4

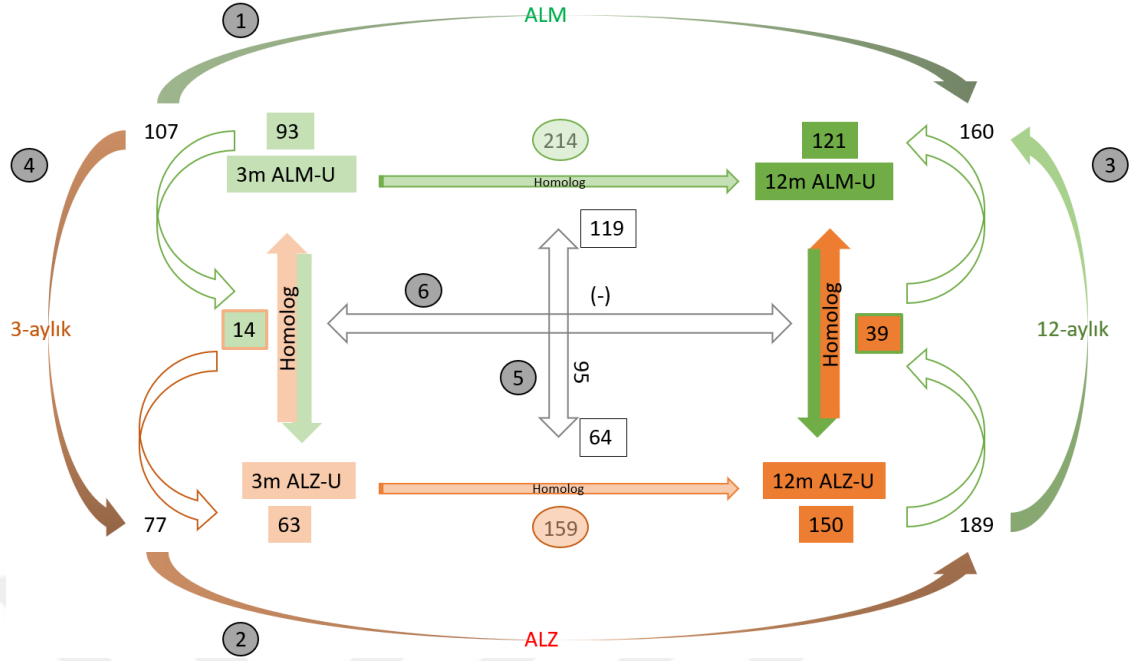
Tablo 17: Toplam örneklerden sadece 12-aylık ALM florasında bulunan mikroorganizmanın protein bazında elde edilen verileri

Oranizma	UniProtID
<i>Actinobacillus succinogenes</i> (strain ATCC 55618)	A6VKC4
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (strain HZ)	Q2GIG1
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	Q9FZE1
Aster yellows witches'-broom phytoplasma (strain AYWB)	Q2NJZ2
<i>Bifidobacterium longum</i> (strain NCC 2705)	Q8G5R1
<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar L2 (strain 434)	B0B7N0
<i>Cyanothece</i> sp. (strain PCC 7425)	B8HMR4
<i>Desulforudis audaxviator</i> (strain MP104C)	B111J8
<i>Photorhabdus laumondii</i> subsp. <i>laumondii</i> (strain DSM 15139)	P60054
<i>Polynucleobacter asymbioticus</i> (strain DSM 18221)	A4SUT2
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>necessarius</i> (strain STIR1)	B1XRX1
<i>Pseudomonas mendocina</i> (strain ymp)	A4XYM0
<i>Pseudothermotoga lettingae</i> (strain ATCC BAA-301)	A8F4Q8
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (strain BisA53)	Q07KK8
<i>Vesicomysocius okutanii</i> subsp. <i>Calyptogena okutanii</i> (strain HA)	A5CVI8
<i>Wigglesworthia glossinidia brevipalpis</i>	Q8D202
<i>Acaryochloris marina</i> (strain MBIC 11017)	A8ZNS4
<i>Acidaminococcus fermentans</i> (strain ATCC 25085)	Q59112
<i>Acidovorax citrulli</i> (strain AAC00-1)	A1TVT1
<i>Agrobacterium vitis</i> (strain S4)	B9JVN8
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. (strain K)	B4UDT1
<i>Anaplasma marginale</i> (strain Florida)	B9KH09
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (<i>Ehrlichia phagocytophila</i>)	O34191
<i>Ashbya gossypii</i> (strain ATCC 10895)	Q753I0
<i>Azotobacter vinelandii</i>	P40591
<i>Bacillus cereus</i> (strain B4264)	B7HED2
<i>Borrelia duttonii</i> (strain Ly)	B5RM75
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (strain ANU 289)	P06120
<i>Buchnera aphidicola</i> subsp. <i>Cinara cedri</i> (strain Cc)	Q058E6
<i>Cellvibrio japonicus</i> (strain Ueda107)	B3PK37
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (<i>Chlamydophila pneumoniae</i>)	Q9Z760
<i>Citrobacter koseri</i> (strain ATCC BAA-895)	A8ACY2
<i>Clostridium perfringens</i> (strain ATCC 13124)	Q0TRT2
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	P80583
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> serotype A (strain H99)	P48465

<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> (strain JMP 134)	Q46WD5
<i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364)	T2G6Z9
<i>Edwardsiella ictaluri</i> (strain 93-146)	C5BGV9
<i>Erythrobacter litoralis</i> (strain HTCC2594)	Q2N5Q5
<i>Escherichia fergusonii</i> (strain ATCC 35469)	B7LQ20
<i>Fervidobacterium islandicum</i>	O50341
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> (strain FTNF002-00)	A7NEH6
<i>Geobacter sulfurreducens</i> (strain ATCC 51573)	Q74BW1
<i>Lawsonia intracellularis</i>	O87887
<i>Leptolyngbya boryana</i> (<i>Plectonema boryanum</i>)	Q00239
<i>Methanobrevibacter smithii</i> (strain ATCC 35061)	A5UKB2
<i>Methanosarcina acetivorans</i> (strain ATCC 35395)	Q8TMI6
<i>Methylobacterium nodulans</i> (strain LMG 21967)	B8IS79
<i>Mycobacterium</i> sp. (strain KMS)	A1UBJ4
<i>Mycolicibacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251)	A1TBP9
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> (strain ATCC 49405)	B6JES1
Onion yellows phytoplasma (strain OY-M)	Q6YPX7
<i>Pelodictyon luteolum</i> (strain DSM 273)	Q3B622
<i>Petrogona mobilis</i> (strain DSM 10674)	A9BHA8
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (strain ATCC BAA-308)	Q9S3R9
<i>Prevotella ruminicola</i> (<i>Bacteroides ruminicola</i>)	P95544
<i>Proteus mirabilis</i> (strain HI4320)	B4F0E5
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (strain Pf0-1)	Q3K600
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (strain SBW25)	C3K1E8
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Q9R9U8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (strain B728a)	Q4ZZG9
<i>Rhizobium meliloti</i> (strain 1021)	Q92N13
<i>Rhodopirellula baltica</i> (strain DSM 10527)	Q7UF84
<i>Rickettsia conorii</i> (strain ATCC VR-613)	Q92GB2
<i>Serratia proteamaculans</i> (strain 568)	A8G8Y2
<i>Shewanella frigidimarina</i> (strain NCIMB 400)	Q07VU2
<i>Shewanella loihica</i> (strain ATCC BAA-1088)	A3Q976
<i>Shewanella</i> sp. (strain MR-7)	Q0I074
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain COL)	Q5HHP5
<i>Streptomyces avermitilis</i> (strain ATCC 31267)	Q82DQ4
<i>Vibrio tasmaniensis</i> (strain LGP32)	B7VKY2
<i>Yersinia pestis</i> (strain Pestoides F)	A4TMK8
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> serotype I (strain IP32953)	Q663K1

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

AH, geç başlangıçlı, progresif ilerleyen ve yaşla karakterize demans türlerinin en yaygın formudur (183). Bilindiği üzere hastalık her ne kadar yaşlanma ile kendini gösteriyorsa da semptomlar onlarca hatta belki daha fazla yıllar öncesinden başlamaktadır (183,184). Tüm beyinde görünmesinden ziyade hipokampus ve korkteks gibi belli bölgelerden başlayarak atrofi ile sonuçlanacak bir yayılım sergiler (184). Beyinde ortaya çıkmasından evvel de iç dengenin şaşıtığı kronik inflamasyonla karakterize bazı semptomların bağırsaktan kökenlenerek beyne hükmetmesi ile ilgili araştırmaları giderek büyümektedir (185,186). Bilindiği gibi Hipokrat'tan beri süregelen "her hastalık bağırsakta başlar" mottosu (65) günümüzde modern tekniklerle de bir çok hastalığın intestinal floral perpektifinden değerlendirilmesine zemin hazırlamıştır. Bunlardan en yaygın çalışılan alan ise kuşkusuz nörodejenerasyondur (187). Bu bağlamda literatüde transgenik fare modelleri ile bağırsak-beyin aksını hedef alan birçok genomik ve transkriptomik çalışmalar bulunmasına rağmen (188,189), sadece AH ile ilişkisi değil nörodejenerasyonun bile etraflı metaproteom çalışmalarına rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada amaç, nörodejenerasyonun en yaygın kolu olan AH durumunda erken evrede ve ileri evrede, hem organizma-filum bazında hem de proteom devinimi-moleküler fonksiyon bazında tam olarak neler olduğunu anlayabilmek ve olabildiğince detaylı bir analiz sergilemek olmuştur. Bu bağlamda çalışma konseptimiz, erken evreyi temsilen 3 aylık ve geç evreyi temsilen 12 aylık 5 mutasyonlu ailesel Alzheimer hastalığı (5XFAD) transgenik ve transgenik olmayan kontrol fare modellerinin, birbirleri ve kendi içlerindeki kıyasından neşet eden bağırsak mikrobiyota farklılıkları ve bu farklılıkların beraberinde getirdiği proteom profil devinimlerinin nano sıvı kromatografi ve ardışık kütle spektrometrisi kullanılarak araştırılması şeklinde dizayn edilmiştir (Şekil-15). Böylece hastalık semptomları kendini belli etmeden çok önceki dönemlerde bağırsakta gerçekleşen mikrobiyota, proteom ve dolayısıyla moleküler devinimler tespit edilerek hem hastalığın oluşum mekanizmasına ışık tutmak ve hem de potansiyel biyobelirteç adaylarını tespit edilebilmek mümkün olacaktır.



Şekil 15: Tezin oluşum aşamasında izlenen genel yolak.

Eldeki dört biyolojik örneğin yayın akışı numaralarla belirlenmiştir. 1 numarada, 3-aylık normal flora 12-aylık normal flora ile kıyaslanmış, bu kıyaslanma neticesinde sadece 3-aylıkta 107, sadece 12-aylıkta 160 ve hem 3 hem de 12-aylıkta 214 organizma peptid bazında belirlenmiştir. 2 numarada, 3-aylık Tg flora 12-aylık Tg flora ile kıyaslanmış, bu kıyaslanma neticesinde sadece 3-aylıkta 77, sadece 12-aylıkta 189 ve hem 3 hem de 12-aylıkta 159 organizma peptid bazında belirlenmiştir. Böylece, 1 ve 2 numarada kontrol ve Tg floranın yaşlanma süreci analiz edilmiştir. 3 numarada ileri-evre hastalık durumuna ait olası markör ve terapötik ajan belirleme maksatlı sadece 12-aylık kontrole ait olan 160 organizma ile sadece 12-aylık Tg ait olan 189 organizma kıyaslanmış; 121 tane sadece 12-aylık kontrole, 150 tane sadece 12-aylık Tg'e ait ve 39 tane hem ALM hem ALZ floraya ait organizma bulunmuştur. Aynı şekilde 4 numarada da erken-evre hastalık durumuna ait olası markör ve terapötik ajan belirleme maksatlı sadece 3-aylık kontrole ait olan 107 organizma ile sadece 3-aylık Tg ait olan 77 organizma kıyaslanmış; 93 tane sadece 3-aylık kontrole, 63 tane sadece 3-aylık Tg'e ait ve 14 tane hem ALM hem ALZ floraya ait organizma bulunmuştur. 5 numara da ise yaşlanma proseslerinde ortak çıkan kontrol ve Tg organizmaları da birbirleriyle kıyaslanmış ve 95 tane ortak, 119 tane ortak kontrol florası ve 64 ortak Tg florası belirlenmiştir. 6 numara ise ortak erken-evreler ile ortak ileri-evrelerin kıyaslamasını içermekle birlikte neticede ortak organizma tespit edilememiştir. ALM: kontrol, ALZ: Tg, U: unique.

Birinci basamakta, yaşlanma süreçlerini ön plana alarak erken evre ortaklıklardan kurtulup sadece yaşlılık sürecinde meydana gelen mikrobiyal durumun elde edilmesine dair geliştirdiğimiz algoritmayı baz alarak ileri evre ALM florasından, erken evre ALM florasında bulunan her tür ortak organizma ayıklanmış ve neticede sadece ileri evre ALM florasına ait organizmalar elde edilerek yaşlanma sürecinde meydana gelen değişiklikler değerlendirilmiştir. Bu süreçte erken evre floraya kıyaslandığında anlamlı filum ve proteom profilleri devinim göstermiştir. Öncelikle ileri evre florada *Chlamydiae* (P=0,0207) ve *Tenericutes* (P=0,0067) filumlarının anlamlı artışı (Şekil-7C) yaşlılık sürecinde bağışıklığın azaldığına dikkat çekmektedir

öyle ki; bu florada *Chlamydiae pneumonia* varlığı literatürde Alzheimer'lı florada en sık rastlanan bir organizma olmasına rağmen çalışmalarımızda sık sık normal yaşlı florada görülmesi buna karşılık hasta yaşlılıkta *Chlamydia muridarum* varlığı bu organizmanın literatürün aksine normal yaşlılıkta da görülebileceğini ve belki de hasta olmayıp senile plak barındıran yaşlıların sebebiyetine delil getirebileceğini düşündürmektedir (190,191). Normal yaşlanma sürecinde *Chlamydiae* filum artışı, literatür desteği de birlikte olmakla beraber, normal yaşlanmanın aleyhine bir durum olarak değerlendirilmiştir. AH verilerimizdeki varlığı ve normal olmasına rağmen yaşlı bireylerde ki varlığı 12 aylık normal intestinal floranın ortamını değiştirerek inflamatuvar cevabı tetiklediğini, dolaşıma bizzat ve ürünleriyle katılarak cevabı tetiklemeyi sürdürdüğünü ve beyne geçerek inflamasyonun meydana gelmesine aracılık ettiğini düşündürmektedir. Keza, yapılan çalışmalarda *Chlamydia pneumonia*'nın monositleri enfekte ederek inflamasyonu tetiklediği ve normal farelere enjekte edildiğinde beyinde amiloid birikimine sebebiyet verdiği gözlenmiştir (13,51,190,192). Öte yandan normal florada (193,194) düşük miktarda var olduğu bilinen *Tenericutes* filumunun artış (51,195–197) ve azalışının (198) floraya zararı/yararı hakkında ihtilaflar varid olsa da literatür eşliğinde ve normal yaşlanma sürecindeki verilerimize göre bu filumun ve özellikle *M. gallicepticum* türünün yaşlanma sürecinde normal seviyesine kıyasen artışı, mRNA-Ribozom kompleksi için gerekli olan gen ifadesinin promotor etkinliğini azaltarak (199) intestinal proteom profilinin devinimi ile disbiyozu katkıda bulunduğunu bize düşündürmektedir. Diğer taraftan, ileri evre normal florada *Proteobacteria* filumunun artışı (Şekil-7C) ve özellikle *Helicobacter*, *epsilon* (*Campylobacter*), *Enterobacter* ve *Oligoflexia* (*Bdellovibria*) taxalarının varlığı, yaşlılığın getirisi olan dezavantajları destekler niteliktedir. Literatürde artış (83,149,194,200–202) ve azalışının (51) floraya olan etkisinin nispî münakaşası şöyle dursun, normal florada domine halde zaten bulunan (193) ama çeşitli hastalıkların tetikleyicilerini de (*Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter* gibi) barındıran böylesi kritik bir filumun; çeşitliliğin ve immün sistemin azaldığı yaşlılık sürecinde florada artması beklenen bir durum olsa gerektir. Filumda artışların inflamasyonla ilişkilendirilmesi, *Bifidobacterium* takviyesiyle LPS oranı baskılanan 5XFAD farelerinde yapılan bir çalışmayla (194) gösterilmiş olup, yine aynı farelerle yapılan fecal çalışmalarda LPS oranının yüksek olarak gözlemlendiği

çalışmalarla (149) pekiştirilmiştir. Dahası, *Proteobacteria* filumunun IL-8/10 (interlökin-8/10) ve A β 40-42 ile yakın ilişkide olduğu belirtilen çalışmaların (83) süzgecinde bu filumun sadece florada değil sirkülasyonla beyine giderek beyinde de kolonileştiği, hatta post-mortem AH hastalarında normal yaşlıların beyinlerine kıyasen anlamlı şekilde artış sergilediği (203), *Proteobacteria* filumunun artışının yaşlanmada özellikle kronik inflamasyona hem bağırsaktan hem de beyinden etki ettiğini gözler önüne sermektedir. Özellikle bu geniş filumu, subfilum seviyesinde değerlendirdiğimizde ortaya fikirlerimizi destekler nitelikte başka bulgular da çıkmaktadır. Örneğin, *Proteobacteria* filumuna ait *epsilon* subdivision kategorisinde erken evre normal florada bulunmayan ve gıda patojeni olarak karşımıza çok çıkan gram-negatif *Campylobacter* (204) bakteri cinsi belirlemektedir. Ancak diğer yandan literatürde sadece normal ve sağlıklı insan/hayvan florasında bulunduğu iddia edilen, bizim çalışmalarımızda da ileri evre floraya has olan *Oligoflexia* subfilumuna ait *Bdellovibrio bacteriovorus* varlığı, hayatta kalmak için diğer gram-negatifleri avlayan ve popülasyon dengeleyici olarak görev yapan bir bakterinin (205), yaşlanma sürecinde florayı dengede tutmaya çalışan az sayıda faydalı bakterilerden biri olarak karşımıza çıktığını da düşündürmektedir. Diğer bir deyişle, avcı bakteri statüsündeki bu organizmanın çoğalması zararlı organizmaları yiyerek mikrobiyotanın en azından normal sınırlardaki yaşlılık sürecinde optimum koşulları sağlayan kronik inflamasyon döngüsüne girmeyi engelleyen iyi türler olduğunu kanıtlar niteliktedir. Normal yaşlanma sürecinde elde ettiğimiz floral verilerde dikkat çeken başka bir nokta ise *neurospirochetosis*'e sebep olan (206–208) ve beyinde atrofi ve mikrogliosis vasıtasıyla AH ile ilişkisi kanıtlanan *Spirochaetes* filumunun, demansa birincil sebep olan yaşlanma sürecinde anlamlı şekilde düşüş sergilemesidir (Şekil-7C). Bu durum bize, kronik inflamasyon döngüsüne sebep olan bakteriyel filumların yetersizliğinin normal yaşlanma florasını AH florasından ayırt edici bir durum olarak düşündürmektedir. Bunun yanısıra AH gibi semptomları, metabolitlerle mikrogliya aracılı inflamasyonu azaltarak düşürdüğü çalışmaları ile bilinen *Acidobacteria* (209,210) artışının, çekirdek mikrobiyota da eser miktarda varlığı bilinen artması durumunda BMAA (β -N-methylamino-L-alanine), saxitoxin ve anatoxin- α gibi nörotoksin üreterek nörolojik hastalıklara ve özellikle AH riskine sebep olan *Cyanobacteria* (83,144,203,211,212) düşüşünün, bütirat gibi faydalı bir molekülün

oluşumundan sorumlu olarak AH florasına bile pozitif etkisi olmakla birlikte, literatürde flora üzerine faydası ve zararı tartışmalı olan 12 aylık normal fare florasına unique olarak gözlemlendiğimiz sırasıyla *Thermotogae* (213) ve *Verrucomicrobia* (51,147,194,195,202,214–217) filumlarının normal yaşlanmada kronik enfeksiyona karşı dirençte rol alan dengeleyici filumlar olduğunu da düşündürmektedir (Şekil-7C). Ayrıca Alois Alzheimer ile aynı zamanda hastalığı keşfeden ve bunu bir vaka değil on iki vaka ile yapan Dr. Fischer’inde içinde olduğu bir çok çalışmada belirtildiği gibi, beyinde bakteriyel koloni oluşturduğu, inflamasyona birinci dereceden sebep olan ve AH flora ile beyinde anlamlı artış gösteren *Actinobacteria* (147,174,202,203,215,216,218) filumunun ALM florada artışı, çekirdek mikrobiyotada var olan ancak artışının LPS ve inflamasyonla yakından ilişkisi olan gram negatif *Bacteroidetes* (51,83,216,217,219,220,149,193–195,200,201,214,215) filumunun artışı, ve bakteriyel amyloid üretimi yapan, AH ile de yakından ilişkili olan *Chloroflexi* (217,221–225) filumunun artışı, şimdiye kadar yaşlılık ve demans arasındaki ince dengenin floranın gelişigüzel değil bilinçli, yeterli ve gerekli bir dağılım sergilediği şeklinde hipotez ettiklerimizi doğrular niteliktedir (Şekil-7C). Son olarak literatürde varlığına rastlamayıp verilerimizde ileri evre florada görülen ve erken evre AH flora için anlamlı gözlenen *Chlorobi* filumunun artışı, yine verilerimizde sadece erken evre AH ve normal yaşlı floralara ait *Dictyoglomi* filumunun varlığı ve ayrıca 3 aya göre 12 aylık normal verilerimize has, kronik dış iltihaplanmalarında yükselerek bilişsel bozulmada önemli görevi olduğu belirlenen *Nitrospirae* (226) filumunun varlığı hipotezimizi destekleyerek bu filumların normal yaşlanma ve demans arasındaki ince dengeyi sağlayan markör filumlar olabileceğini düşündürmektedir (Şekil-7C). Öyleki; AH ile yakından ilişkili ama oranı yüksek olmayan ve bilişsel bozuklukta da görev alan bu bakteriler yaşlılıkta kritik olmayan demans benzeri vakaların ve AH’ye sebep olmayan ama varlığı bilinen plakların açıklayıcısı niteliğindedir adeta... Yaşlılıkta domine olan AH ve benzeri bilişsel gerilemede rol alan filumlar yaşlılığın kaçınılmaz kaderi gibi görünmektedir. Ancak dengeleyici filumlarla kronik inflamasyon döngüsüne girmeyen sistemin, bu kronik inflamasyon meydana gelmediği için normal yaşlanma prosesini gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz. Tüm bu bakteriyel değerlendirmelerin ışığında normal yaşlanma prosesinde meydana gelen moleküler fonksiyonel değişiklikler de hipotezimizi

literatür ışığında doğrulamaktadır. Zira moleküler fonksiyonel değişimlere bakıldığında zararlı bakteriyel devinimin en hasar yarattığı yollar olan transkripsiyon, translasyon ve proteinin konformasyonel yapısı ile ilişkili yollarındaki artış ve azalışlar birbirlerine göre anlamlılık sergilerken enerji ve aminoasit mekanizmasındaki yollarında birbirlerine göre var olan değişimleri gözden kaçırmamıştır (Şekil-7D).

Algoritmamızın ikinci kısmı normal sürecin değişkenliklerini gözlemlerken aynı şekilde hastanın yaşlanma sürecini de gözlemlememize kapı açmıştır. Normal yaşlanma sürecinde anlamlı değişimler nispeten az ve stabilizasyon domine durumdayken hastanın yaşlanma sürecini temsil eden modellemede bu durum değişken ve dengesiz bir hal almış, normal yaşlanmada gözlenen çeşitlilik ve ileri evreye has olan yeni organizmaların varlığı meselesi hasta yaşlanmada gözlenmemiştir. Diğer bir deyişle filum bazında floral çeşitlilik varyansı hemen hemen hiç olmamasına rağmen bazı filumların miktarları erken evrede ki Tg hasta modeline göre anlamlı artış sergilemiştir. Öncelikle tercihen uygulanan orantı testine göre anlamlı çıkan filumlar kritik edildiği zaman literatürde artışı zararlı gözükten filumların verilerimizde anlamlı artışına şahit olunmaktadır. Çekirdek florada domine olan (147,218), ancak dengesiz artışı, Fischer'in deyişiyle, hastalığın en önemli sebeplerinden olan, bakteriyel A β üretip tüketen bakteriler arasında ünlenen, inflamasyonla ilişkili *Actinobacteria* (13,216,217,221,224,227,228), eser miktarda artışının nörotoksositeye sebep olduğu bilinen *Cyanobacteria* (83,144,227,229,230), ihtilaflar olmakla birlikte (195,219,231) başta 5XFAD olmak üzere fare deneylerinde Tg farelerin mikrobiyotasında inflamasyonla karakterize yükseliş gösteren ve AH florasında domine bulunan ancak hastalığın orta evrelerinde düşüşle karakterize olan *Firmicutes* (69,83,220,225,232–235,106,108,147,149,194,201,214,216), fırsatçı patojen gram-negatif bakterilerin çoğunlukta olduğu ve IL'ler LPS'ler ve $\alpha\beta$ 1-40/42'ler ile bile artışı korele olan *Proteobacteria* (83,147,149,194,195,200–202,217,218) ve artışı nörospiroket adı ile literatüre kazanmış *Spirochaetes* (206–208) filumlarının verilerimizdeki artışı hastalığın yaşlanma sürecini temsil eden 3-aylıktan 12-aylığa doğru kıyaslamalarında yani ileri-evrede anlamlı artış göstermesi şimdiye kadar yapılmış çalışmalarla verilerimizin doğruluğunu kanıtlar niteliktedir (Şekil-8C).

Bunun dışında yine artışı inflamasyonla ilişkili *Bacteroidetes* (83,147,149,194,195,200,216,217,219), mikrobiyal amiloid üretmek Tg farelerde domine halde bulunan aerobik termofillerden *Chloroflexi* (217,221–225) ve bizce etkisi florada dengeyi sağlamak olan *Verrucomicrobia* (51,147,194,195,202,214–217) filumlarının artışı ile verilerimizde sırasıyla normal yaşlı ve genç florasında varlığı aşına olunan *Fusobacteria*,ki ayrıca ağız florasında baskın bulunan bir filumdur (236), ve *Tenericutes* (51,195–197) filumları ile flora için faydalı olan bütirat kaynağı *Thermotogae* (213) filumlarının azalışı ileri-evre hastalık durumunda florada inflamasyonu hem ESS hem MSS olarak birçok mekanizmayı tetikleyecek deliller şeklinde karşımıza çıkmaktadır (Şekil-8C). Öte yandan literatürde karşılaşmadığımız *Aquificae* ve *Chlorobi* artışı diğer verilerimizle karşılaştırmalarımız neticesinde sadece normal yaşlanmada meydana gelen muhtemel inflamasyonlar sonucu mutedil bir artışa sebebiyet gösteren bir markör olarak düşünülebilir (Şekil-8C). Bunun yanı sıra ekstremofiller adıyla bilinen çevresel tehlikelere karşı direnç gösteren gram negatif *Deinococcus-Thermus* (237) filumunun literatür zemini olmaksızın eldeki verilerimizde ALZ modele yatkınlığı nedeniyle daha fazla araştırılması sonucuna varılmaktadır (Şekil-8C). Son olarak literatür desteği olmayan ancak veriler içerisindeki 3-aylık Tg vs. 12-aylık Tg ile 12-aylık kontrol vs. 12-aylık Tg modellerindeki kıyaslamalarımızda, ileri-evre Tg modeline unique şekilde bulunması, *Coprothermobacterota* filumunun ileri-evre hasta florada markör olabileceğini düşündürmektedir (Şekil-8C). Filum bazındaki incelememiz yerini moleküler fonksiyonel perspektife bırakmış, normal yaşlanma prosesinde gözlenen anlamlı artış ve azalış devinimleri enerji mekanizması ve transkripsiyon yolları şeklinde hasta yaşlanma modelinde de gözlenmiştir. Artış gösteren yolak proteinleri azalan skalaya nispeten ciddi bir floral devinim sergilemiştir (Şekil-8D). Aminoasit metabolizmasının da azalma sergilediği bu incelemede, gözden kaçmamıştır. Anlaşılan o dur ki, yaşlanmayla beraber filum bazında bakteriyel değişim floranın inflamasyonu tetikleyecek bakterilerin domine olmasıyla karakterize bir haldedir. Normal yaşlanma prosesinin moleküler analizinde hakim olan transkripsiyon mekanizmasına etkileyen proteinlerin anlamlı değişimi Tg yaşlanma modelinde de gözlenmiş, bu durum bize moleküler perspektifte transkripsiyon yollarının demansa kayan yaşlanma ve hastalık durumları için dikkat edilmesi gereken markör mesabesinde bir mekanizma

olduğunu düşündürmüştür. Bu bağlamda genel bir özetleme yapmak gerekirse hasta modelde yaşlanmaya doğru bakteriyel artış ile karakterize şekilde hastalığın şiddetlenme biçimi ortaya çıkmakta olup, bu eksefif artışın zararlı filumlarla kendini gösterdiğini; tercihen anlamlı yada anlamlı olmayan artışlara, inflamasyonu tetikleyen ve genelde gram negatif bakterileri bulunduran filumların sebep olduğu, azalan filumların ise yararlı filumlar olduğu gözlemlenmiş olup, bu Tg yaşlanma prosesi modelinde bu filumların ve özellikle *Aquificae*, *Chlorobi*, *Deinococcus-Thermus* ve *Coprothermobacterota* filumlarının markör olabileceği bazında ileri çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir. Moleküler açıdan hasta yaşlanma modelinde transkripsiyon ve enerji mekanizmasının ciddi şekilde etkilendiği anlamlı artış ve azalış devinimlerine farklı taksonların da etki göstermesi, yolaklarda markör yada terapötik ajan mesabesindeki olası proteinlerin keşfi açısından, moleküler floral analiz bazında daha defaatli ve derinlemesine araştırmayı zorunlu kılmaktadır.

Belirlediğimiz algoritmanın üçüncü, basamağı yaşlanma süreçlerinde erken-evrelerden filtrelenmiş olan sadece ileri-evreye has olan Tg ve kontrol floraların kıyaslanarak bir nevi yaşlanmada hastalığı tespit edebilecek markör mesabesindeki mikroorganizmaları bulmaktır. Bu doğrultuda ilk iki basamak neticesinde erken evrelerden filtrelenerek elde edilen 12-aylık Tg ve kontrol floralar birbirleriyle kıyaslanınca filtrelenmemiş total ileri-evre floradan nispeten farklılıklar gözlenmekle birlikte hemen hemen aynı sonucu verecek bulgular elde edilmiştir. Bu bağlamda nispeten markör tespiti amaçladığımız kıyaslamada ileri-evre Tg florada tercihen uygulanan orantı testine göre *Actinobacteria* ve *Firmicutes* anlamlı artışı ile yüzleşmekteyiz. Daha önceki basamaklarda da defaatli vurgulanan bu iki filumun artışı kronik inflamasyonu tetikleyecek olan bakterileri barındırmakta, kontrol florada gözlenirse bile makul seviyenin üzerine çıktıkları zaman floral disbiyozisi tetikleyerek olası inflamatuvar cevabı tetiklemektedir. Bunun yanında bakteriyel amiloid üretimiyle ilişkili ve Tg faredelerde dominant halde bulunan, bizim verilerimizde de yaşlılık, hasta yaşlılık, ileri-evre hastalık modellerinde sırasıyla artış ve erken-evre hastalık modeli ile tüm biyolojik örneklerden filtrelenerek oluşturulan 12-aylık saf ALZ modelinde unique gözlemlediğimiz ve bu sebeple markör olabileceğini kritik ettiğimiz *Chloroflexi*, içerisinde enterobakterler gibi fırsatçı patojenleri barındıran, literatürle ve

verilerimizde hastalık ile yaşlılık modellerinde artışını, homolog kıyas ve saf 12-aylık ALZ florasında azalış gözlemlediğimiz, miktarını kritik addettiğimiz *Proteobacteria*, Fischer'in de tespit etmesiyle artışı nörospiroket deyimi ile karakterize olan *Spirochaetes* ve yararlı yada zararlı olduğunda ihtilaf gözlenen, verilerimizde ise yaşlılık ve hastalık modellerinde defaatli artış yada unique şekilde gözlemlediğimiz *Verrumicrobia* artışları da hipotezimiz doğrulamakta ve inflamasyonla bu denli ilişkili olan filumların Tg modellerde miktarının nispeten fazla olduğunu gözler önüne sermektedir. Soru işareti olarak değerlendirilebilecek olan, Alzheimer'a sebebiyette etken olarak görülen *Chlamydiae* filumunun erken-evre Tg modelde unique olarak görülmesi dışında genel bir azalış sergilemesi düşündürmekle birlikte daha dar taxonda değerlendirildiği zaman verilerimizde, literatürde hastalığa asıl etken olarak görülen *Chlamydia pneumonia* türünün değil *C.muridarum* türünün yer aldığını görmekteyiz, bu durumda azalışının anlamsız olduğunu söylemek abesle iştilgal olmaktadır. Bunun haricinde literatür desteğinden yoksun olan *Chlorobi* filumunu diğer verilerimizle kıyasladığımızda kontrol yaşlanma ve Tg yaşlanma ile nispi artış gösterip ileri-evre ve toplam Tg-kontrol kıyaslarında azalırken, erken-evre kıyasta nirengi noktamızı katlayacak şekilde artış göstermesi bu anaerobik fotoototrofik yaşayan yeşil kükürt bakterilerinin erken-evre Alzheimer florası için markör olabileceğini düşündürmektedir. Bunlarla birlikte ileri-evre modellerde azalış ama genel Tg tablosunda çekirdek florada artış gösteren *Tenericutes* filumununun erken-evre ALZ modelde unique bulunması, bu filumun markör olarak baz alınabileceğini düşündürmektedir. Son olarak bütirat üreten bakterilerden olan, floraya bütiratın pozitif etkisi olduğunu belirleyen literatür ile verilerimizde normal yaşlanmada da dengeleyici olarak unique karakter sergilediğini düşündüğümüz *Thermotogae* filumunun hastalık modellerinde azalışla karakterize olması, bu filumun hem terapötik ajan hem de marker olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir. Son olarak ileri-evre ALZ modelde hastalık yaşlılığında gözlendiği gibi *Coprothermobacterota* ve sadece ileri-evre ALZ ile ilişkili durumlarda görülen *Deinococcus-Thermus* filumlarının unique varlığı bu filumların daha fazla araştırılmasının yanında ileri-evre markör niteliğinde filumlar olduğunu sergilemektedir. Moleküler fonksiyonel analizlerle beraber özetlemek gerekirse; genel olarak bakteriyel anlamlı artış ile karakterize olan ileri-evre ALZ modelde tercihen anlamlı yada anlamlı olmayan artışlara, inflamasyonu

tetikleyen ve genelde gram negatif bakterileri bulunduran filumların sebep olduğu, azalan filumların ise yararlı filumlar olduğu tespit edilmiş olup ileri-evre hasta ve kontrol kıyası yapılan modellerde bu filumlar ve özellikle *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* ve *Coprothermobacterota* filumlarının markör olabileceği bazında ileri çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir. Moleküler açıdan değerlendirildiğinde ileri-evre kıyaslamada tıpkı bir önceki detaylı analizlerimizde olduğu gibi transkripsiyonun etkilendiği ve bu devinime farklı taksonların da katkı sağlaması, transkripsiyon mekanizmasının markör yada terapötik ajan mesabesindeki olası proteinlerin keşfi açısından, moleküler floral analiz bazında daha defaatli ve derinlemesine araştırmayı zorunlu kılmaktadır.

Hikayemizin dördüncü basamağında sırasıyla 12-aylık ALM ve ALZ florasından filtrelenen ve bu floralara göre elde edilen unique 3-aylık ALM ve ALZ florası birbirleri ile kıyaslanmıştır. Yani erken-evre hasta ve kontrol mikrobiyota kıyaslaması gerçekleştirilmiştir. Netice itibariyle literatür desteği görmediğimiz ama bizim verilerimizde Tg modellerde sıkça karşılaştığımız *Chlorobi*, ve verilerimizin desteği ile dengede olması gerektiğini düşündüğümüz, artış ve azalışının disbiyozla ilişkili olduğunu kritik ettiğimiz literatür destekli *Proteobacteria* artışları erken-evre kıyaslamalarımızda tezimizin amacını daha da aydınlatmıştır. Bununla birlikte, ileri-evre ALZ modelleri içeren her kıyasta anlamlı artışına yada unique bulunmasına şahit olduğumuz, ancak yaşla ilişkilendirilmeyen yada erken-evre kıyaslamalarda bulunan *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* ve *Firmicutes* filumlarının azalmaları, bize bu disbiyozda etkin rol alan filumların, sadece hastalığın en şiddetli dönemi olan yaşlılık evresinde artış göstermesi hasebiyle bu artışının ileri-evre markör olarak değerlendirilmeye şiddetle aday olarak gösterilmesi gerektiği inancını doğurmuştur. Zira bu filumlar her dört biyolojik örnekte bulunabilen filumlardır, esas kritik nokta sadece ileri-evrelerde eksef artışına denk gelmemizdir. İlginç olan başka bir nokta ise verilerimizde normal yaşlılık ve ileri-evre ALZ durumlarında had safhaya ulaşan, literatürde ALZ ile ilişkilendirilen ve eksef A β üretimi yapabilen *Chloroflexi* filumunun erken-evreler kıyasında ALZ florasında unique karakter sergilemesi, tüm biyolojik örneklerden filtrelenmiş saf 12-aylık ALZ filumlarında unique karakter sergilemesi ile korelasyon göstermekte ve hastalığın emaresinin klinik olarak tespit

edilemediği evrelerde bu filumun markör mesabesinde değerlendirilmeye aday olduğunu şiddetle vurgular niteliktedir. Aynı şekilde ileri evreler harici genel ALZ florasında artış ile karakterize olan, literatür destekli *Tenericutes* filumunun da erken evreler kıyasında ALZ florasında unique karakter sergilemesi klinik tabloda erken evrede markör olarak aranabilecek filumlardan olduğunu kanıtlar niteliktedir. Moleküler fonksiyonel analizlerle beraber özetlemek gerekirse, erken-evredeki bakteriyel azalma ile floral çeşitlilikteki artış tıpkı ileri-evre kıyastaki gibi ters korelasyon göstermektedir. Bu kıyaslamayla beraber, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* ve *Firmicute* filumlarının artışlarının ileri-evre ALZ model için markör olabileceği hipotezimiz pekişmiş, *Chloroflexi* ve *Tenericutes* filumlarının erken-evre için markör olacağı ihtiyaç duyulan ileri çalışmalar olmak kaydıyla nispeten doğrulanmıştır. Moleküler açıdan değerlendirilecek olursa artan ve azalan sklalarda aynı yollara rastgelinmemiştir. Bunun sebebini floranın tam olarak disbiyoz olmadığı düşüncesiyle harmanlamayı doğru bulmaktayız. Zira ileri evrelerde şaşmaz şekilde bazı aynı yollarda dengesiz artma ve azalma gözlenirken erken-evrede bu durum gözlenmemiştir. Bununla birlikte artan skala aminoasit ve enerji mekanizmaları ile karakterizeyken azalan skalada bu durum transkripsiyon ve trasnlasyon gibi santral mekanizmalara yerini bırakmıştır.

Beşinci basamakta yaştan bağımsız şekilde bir değerlendirme yapmış bulunmaktayız. Bunun akabinde de 12-aylık ALZ ile ilişkisi olan her küme ayrı ayrı hem filum hem de proteom bazında ele alınarak incelenmiştir. Bu bağlamda öncelikle ALM ve ALZ yaşlanmalarına doğru homolog ALM ve ALZ organizmaları kıyaslamaya tabi tutulmuştur. Amaç yaştan bağımsız bir şekilde çekirdek hükmünde bulunan ALM ve ALZ floralarının nasıl değişim sergilediğini anlamaktır. Bakteriyel düşüşü bu kıyastada görmemizle birlikte bu zamana kadar ya erken evrede yada ileri-evrede ne tür değişimler olduğunu gördük ve takribi bir hipotezde bulduk ancak homolog kıyas bize genel anlamda farklı bir konsept sunmuştur. Diğer kıyaslamalarda artışına literatür desteği ile de aşına olduğumuz filumların bu kıyaslama ile azalmasına şahit olduk, bu azalmalar minimum %31'lere varacak şekilde sabit bir ilerleme kaydetmektedir. Tercihen yapılan orantı testine göre *Proteobacteria* azalışı anlamlı bulunmuştur. Bunun yanında azalış/artışı literatürde ihtilafli filumlardan bazılarının bu

kıyasımızda azaldığı ancak yaşla karakterize kıyaslarda artış sergiledikleri, ayrıca *Tenericutes* gibi ileri-evrede tekrarlı azalışları ancak erken-evrede unique bulunup genel kıyasta artış göstermesi bu belirsizliği destekler niteliktedir. Bununla birlikte muhtelif kıyaslamalarımızda *Firmicutes* gibi çok yönlü bir filumun değişiklik göstermesi, bu filumla ilgili ileri analizler yapılmasını gerektirmektedir. Hasılı, bu kıyas ile hipotezimiz o dur ki, daha önce de vurgulandığı gibi dengeleyici miktarda bulunan filumların dengesiz artış ve azalışları disbiyosizi etkilemektedir. Bu bağlamda klinik olarak nasıl ki kan ve vitamin değerlerinin makul bir aralığı vardır, defaatli araştırmalar neticesinde gut filumları için böyle bir aralık belirlemek ve dengesiz aralıklara sahip bireylerde markör niteliğindeki filumları gözlemek başta AH olmak üzere bir çok olası hastalık için tedbir niteliğinde makul bir yaklaşım olacaktır. Toplam venn şemamızda kıyaslamaların kalbi niteliğinde değerlendirdiğimiz 95 organizma ile 12-ALZ floral model ile ilişkili çıkarımlara başladık. Daha önce vurgulandığı gibi, 95 organizma bize 4 biyolojik örnekte ortak bulunan organizmaları vermekte bunun 13'ü ortak UniProt ID'ye sahip olup ancak 4 tanesi anlamlı değişim sergilemekteydi. Bu proteinlerin (*DNA-directed RNA polymerase subunit beta'*, *Rubrerythrin*, *Ketol-acid reductoisomerase*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) hem filum hem moleküler analizi ile şu sonuçlara varılmıştır: ilk iki protein *Proteobacteria* filumuna ait olup anlamlı azalmış, son iki protein *Firmicutes* filumuna ait olup anlamlı artmıştır, Q30X04 (*DNA-directed RNA polymerase subunit beta'*) proteininin doğrudan AH ile ilişkisine dair detay bulamamış olsak da yapılan bazı hasarlardan yola çıkarak ALM'ye göre anlamlı azalmasını DNA kompozisyonuna negatif etki etmekte olduğunu (238,239), P24931 (*Rubrerythrin*) proteininin anlamlı azalması oksidatif strese karşı koruma özelliği azaldığından dolayı, ortamın bakteriyel istilaya daha erişilebilir hale geldiğini (240) göstermektedir. Öte yandan B2UYT8 (*Ketol-acid reductoisomerase*) proteinin ALZ'de ALM'ye göre anlamlı artması, antiparazitik özelliği olan diaminlerin ketolasit gibi non-parazitik enzimlere müdahale ettiğini gösteren bir çalışmadan da anlaşıldığına göre ALZ florasında da beklenen bir durumdur (241–244). Aynı şekilde P0C0G6 (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) proteininin ALM'ye göre ALZ'de katlarca artış göstermesi; bu proteinin A β amyloidogenesis'i hızlandırdığını, LOAD riski ile ilişkili olduğunu, β -APP ile ilişkisinin GAPDH yapısını değiştirdiğini ve apoptotik yolları tetiklediğini

belirten literatür çalışmalarınca desteklenmiş ve verilerimizi doğrulamıştır (245–250). Moleküler analizler de bize en baştan beri tekerrür şekilde gözlediğimiz transkripsiyon ve enerji yollarının çıktısını ve verilerimizde yer yer karşılaştığımız glukoz ve aminoasit yollarının çıktısını vermiştir.

3-12-aylık ALZ ve 3-aylık ALM kombinasyonunda ortak görülen 12 organizma ve anlamlı çıkan 4 proteini (*ATP synthase subunit alpha*, *50S ribosomal protein L16*, *Elongation factor Tu*, *DNA-directed RNA polymerase subunit beta*) 12-aylık ALZ florasının erken-evre hasta ve kontrole kıyasla nasıl bir değişim sergilediğini, bu değişimin birbirleriyle örtüşüp örtüşmediğini göstermek açısından değerlendirilmiştir. Anlamlı değişen proteinlerin filumlarında göze çarpan literatürde karşılaşmadığımız ancak verilerimizde ALM ile karakterize olan *Elusimicrobia* olmuştur. Bu filuma ait olan B2KEX0 (*ATP synthase subunit alpha*), Alzheimer vakalarında yalnız yada tau ile kümülasyon göstermesinin yanısıra, serebral glikoz metabolizması ile mitokondrial oksidatif fosforilasyonu bozmakta ve yaşla eş kontrollerinden daha az lipoksidize olmakla birlikte bu proteinin aktivitesinin yaşla eş kontrollerinden daha düşük olduğu ve oksidatif stresi tetikleyerek enerji üretimine neredeyse ket vurarak biyoenerjetik müdahalelerde bulunduğu bizim verilerimizle de korelasyon göstermiştir (251–254). A1JS27 (*50S ribosomal protein L16*) protein yapısının literatürde erken AH ile ilişkisinde oksidatif stresin poliribozom kompleksine ket vurduğu belirtilmekle birlikte bizim verilerimizde erken ve ileri evrede anlamlı değişimi, büyük ve küçük ribozom birimlerini sıklıkla gözlemlememiz ve farklı alt ünitelerinin farklı hastalık seviyelerde anlamlı şekilde azalıp artması bu ifadeyi doğrulamaktadır (255,256). Dahası ribozom kompleksi içindeki ribozomal RNA miktarında büyük bir düşüş olduğunu gösteren bir çalışma, hem MCI (Mild Cognitive Impairment) hem de AH'de azalmış protein sentezinin bir aracısı olarak ribozom içindeki RNA değişikliklerinin güçlü bir rol oynadığını belirterek tezimize adeta destek olmaktadır. Diğer yandan P42480 (*Elongation Factor Ef-Tu*) proteininin bizim verilerimizde artış gösteriyor olması, yakın zamanda yapılan çalışmalarda Ef-Tu proteininin protein karbonilasyon ve oksidasyonuna neden olması, ve bu durumun AH beyinde oksitlenmiş proteinleri tanımlayan çalışmalarla uyumlu olmasıyla korelasyon göstermektedir (242,257–260). Moleküler analizlerde bu kombinasyonun en çok yine transkripsiyon ve enerji

mekanizması başta olmak üzere translasyon yollarının da etkilendiği görülmektedir.

Sadece 12-aylık ALM ve ALZ'nin örtüştüğü 39 organizma ve anlamlı 8 proteini de aynı şekilde değerlendirilmiştir. 4 tanesi, yollarda çok rastgeldiğimiz transkripsiyon proteinlerinden olan ve yukarıda nasıl etki gösterdiğini belirttiğimiz *DNA-directed RNA polymerase subunit beta'* proteini ve ayrıca 2 tanesi yine bahsettiğimiz *Ketol-acid reductoisomerase* ile bu kez *ATP synthase subunit beta* formu olan proteinden oluşmakla birlikte *Proteobacteri* ve *Firmicutes* filumlarına ait *60 kDa chaperonin* ile *Glucose-6-phosphat isomerase* proteinleri 39 organizmalı ileri-evreler kıyasında anlamlı şekilde karşımıza çıkmıştır. Bu bağlamda Q8KTS0 (*60 kDa chaperonin*) proteininin stres karşıtı olarak ve özellikle amiloid toksisitesi nedeniyle nöronların dejenere olmasını önleyebileceğine dair çalışmalar; verilerimizde bu proteinin saf 12-aylık ALZ ve ALM kıyasımızda, 12-aylık ALM'ye göre anlamlı şekilde artması neticesinde disbiyosizin tetiklediği kronik inflamasyon ve oksidatif stres ile karakterize olan floral bir ortamda şaperonların aktif şekilde artması ile paralellik göstermektedir (261–264). P64195 (*Glucose-6-phosphat isomerase – G6PI*) proteininin, oksidatif durumların baş gösterdiği AH'da, *glucose-6-phosphate* vasıtasıyla *pentose shunt*'ının oluşması bu duruma ket vurmak üzere aktive olan bir sistem olarak yapılan çalışmalarla karşımıza çıkmaktadır. Bu durumda verilerimizle kıyaslama yapıldığı zaman G6PI artışı bu ve benzeri çalışmalarla paralellik göstererek desteklenmektedir (265–268). Ayrıca yapılan moleküler analizlerde de başta yine transkripsiyon ve enerji metabolizması olmak üzere bu kez de glukoz ve aminoasit metabolizmalarının etkilendiği gözlenmiş, bu durum bize kümenin kalbi olan 95 organizmanın moleküler analizine paralel seyirde gittiğini gözleme fırsatı vermiştir.

Sadece 3 ve 12-aylık ALZ florasının örtüştüğü başka bir kıyasta 22 organizma ve 6 anlamlı proteini gözlenmiş ve kritik edilmiştir. Bunlardan *ATP synthase subunit beta*, *ATP synthase subunit alpha-mitochondrial*, *60 kDa chaperonin (GroEL protein)*, *ATP synthase subunit alpha*, *DNA-directed RNA polymerase subunit beta* proteinleri genel anlamda diğer kıyaslarda da gözlemlenmiş ve literatürle bağlantısal şekilde

açıklanmıştı. Bu kıyasta farklı olarak *Probable transaldolase* proteini tespit ve kritik edilmiştir. Bu bağlamda C0QVC8 (*Probable transaldolase*) proteini pentoz-fosfat yolunda metabolitlerin dengesi için oldukça önemlidir. Oksidatif stres durumunda indüklendiğini gösteren çalışmalar, bilişsel bozukluk gösteren drosophila model organizmalarında fonksiyonel kategoride de yer alan böylesi etken bir proteinin verilerimizde anlamlı artış göstermesiyle uyumaktadır. Öyle ki, oksijen-treated edilen deneklerin kognisyonu güçlenmiş, ve içinde transaldolazın da bulunduğu bir grup proteinin bu durumla ters korelasyon gösterdiği saptanmıştır (269–271). Fonksiyonel analizimiz transkripsiyon ve enerji metabolizması ekseninde bu kez de pentoz-fosfat yollarının etkilendiğini göstermiştir.

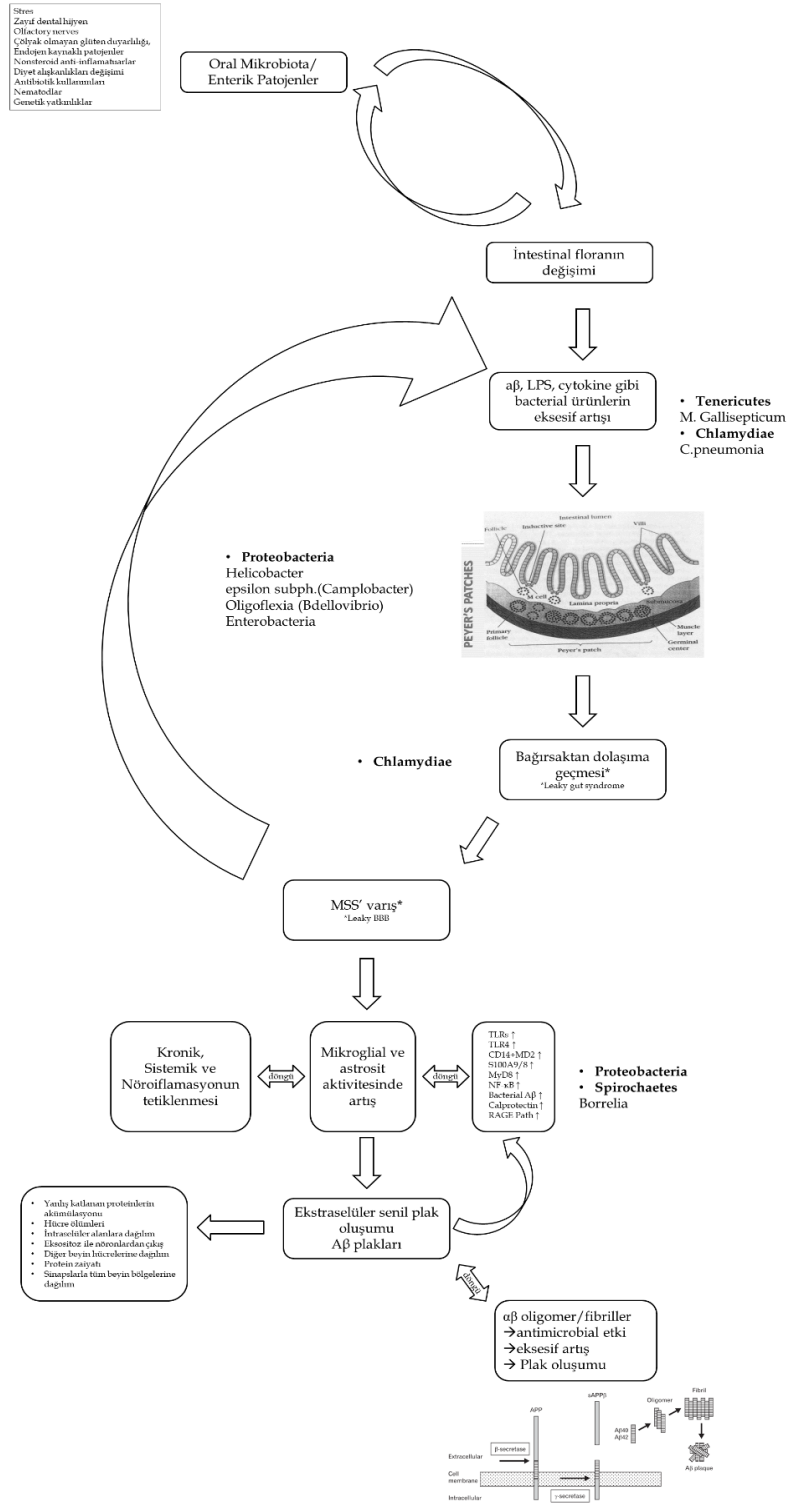
Son homolog gezintimiz 30 ortak organizma ve 4 anlamlı protein bazında 12-aylık ALZ ve ALM ile 3-aylık ALZ örneklerinin kıyaslaması ile neticelenmiştir. Bunlardan *DNA-directed RNA polymerase subunit beta'-beta''* proteini kıyaslamalarda genel anlamda tespit ve kritik edilmiştir. Bu bağlamda her ne kadar literatürdeki P00370 (*NADP-specific glutamate dehydrogenase*) içerikli glutamat dehidrojenaz enzimi çalışmaları bizim verilerimizle ters korelasyon gösterse de anlaşılana o dur ki bu protein üzerine daha fazla araştırma yapmak hem bu ve benzer çalışmaları aydınlatacak hem de olaya farklı bir perspektiften yaklaşmamızı sağlayacaktır (272–274). Diğer yandan, histon modifikasyonları ve AH ile ilgili yapılan çalışmalardan da anlaşıldığına göre anlamlı azalış ve özellikle artışları kognisyona negatif etki göstermekte ve öğrenme melekelerine ket vurmaktadır (275,276). A5DQL2 (*Histone H2A.Z*) bir histon varyantı olarak, genlerin promotorunda zenginleşip onları baskılar (277). Bu da, bu ve benzeri histonların artışı ile bellek konsolidasyonu için gerekli gen ifadesinin baskılanmasına neden olacaktır (278). Yapılan bir çalışmada H2A.Z varyantının hipokampala spesifik translasyon sonrası modifikasyon değişimlerinin histon dinamiklerinde AH patogenezi ile ilişkili anormal transkripsiyon ve downstream kognisyon eksikliklerini arttıracak değişikliklere sebep olduğu gözlenmiştir (279). 4'lü venn kıyasımızda 12-aylık ALM, 12-aylık ALZ ve 3-aylık ALZ homologlarında, nirengi noktası olarak aldığımız 12-aylık ALZ florasında diğer ikisine kıyasla bu histon varyantının anlamlı artış gösteriyor olması durumun kritik tablosunu alenen gözler önüne sermektedir. P75264 (*Putative ABC transporter ATP-binding protein MG187 homolog*) odaklı

incelememizde, endotel nöronlar ve glia hücrelerde ekspresyonuna çok denk geldiğimiz ABC transporterların anormal ekspresyonunun KBB integritisine negatif etkide bulunarak disfonksiyonuna sebep olduğu, başta AH olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisini gösteren çalışmalarla desteklenmiş olup bu durumun verilerimizle de uyumlu olduğu tespit edilmiştir (280–284). Transporter çalışmalarında her ne kadar spesifik olarak yoğunlukla ABCB1, ABCC5 and ABCG2 aktivitesi çalışılmış olsa da hem bütüncül olarak enerji mekanizmasını AH ile değerlendirmek açısından hem de literatüre ABC transporter ATP-binding protein MG187 homolog protein ve AH ile ilişkisinin farklı bir bakış açısı sunması açısından verilerimizin bu yöndeki çıktısı önemlidir. Moleküler analizler neticesinde de yine transkripsiyon ve yoğunluk olarak enerji mekanizması fonksiyonları ekseninde bu kez glutamat metabolizması ve kromatin yapısı ile ilişkili yollarda etiketlenme görüldüğü tespit edilmiştir. Yönümüzü bu kez tamamen daraltıp tüm biyolojik örneklerden filtrelenmiş vaziyetteki saf 12-aylık ALZ organizması ve proteinlerine çevirerek, bu verileri baştan beri amacımız olan normal yaşlıdan ayırt edebilmek amacıyla 12-aylık saf ALM ile kıyaslamaya odaklandık. Çarpıcı bir şekilde daha önceki verilerimizle de uyumlu olarak literatür destekli olarak *Actinobacteria* ve *Firmicutes* filumlarında artış gözlemlendi. Hipotezimizi revize etmemize sebep olan ve tekrar değerlendirdiğimizde farklı bir noktaya kapı aralayan *Proteobacteria* filumunun azalan skalada anlamlı şekilde gözlenmesi, florada domine halde bulunan kritik filumların dengeleyici pozisyonda oldukları ve belli aralıkları aşan artış ve azalışlarının disbiyozis ve infalamasyon vasıtasıyla nörodejenerasyona sebebiyet vereceğini düşünmemizi sağlamıştır. Literatür destekli şekilde eksestif artışının zararları kesinleşen *Cyanobacteria* filumunun ALM modelinde değil ALZ modelinde unique görünmesi, bu filumun ileri-evre ALZ modeli için markör olabileceği yönündeki düşüncelerimizi kuvvetlendirmektedir. Son olarak literatür desteği olmayan ancak tekrarlı ve istikrarlı şekilde tüm kıyaslarımızda hastalığı sembolize eden modelde yer alıyor olması ve son olarak saf 12-aylık ALZ florasında unique olarak saptanması, *Chloroflexi* filumunun markör olacağı hipotezini doğrulamıştır adeta... Ortak proteinleri olmamasına rağmen kendi peptid sekanslarından yapılan moleküler analizlerinde baştan itibaren tespit ettiğimiz enerji metabolizması başta olmak üzere protein konformasyonel yapısıyla beraber anlamlı değişimi tespit edilmiş, ekstra olarak transkripsiyon ve translasyon

yolaklarının etkilendiği de gözlenmiştir.

Sonuç olarak, tüm bu süreçte hikayeye genel bakışımız enfeksiyon bazında olmaktadır. Tüm bu verilerden elde edilen sonuçlar bize hasta yada normal yaşlanma süreci boyunca oluşan organizma ve proteom bazındaki devinimlerin başta senelerce dikkat edilmeyen oral mikrobiyom, stres, yada antibiyotik kullanımı, çölyak olmayan gluten duyarlılığı, sağlıksız beslenme ve nematod proliferasyonuna neden olan enterik patojenler gibi dış etkenler nedeniyle mikrobiyotayı yavaş yavaş değiştirmesi ile meydana geldiğini ancak genetik eğilimin bunda da büyük rol aldığını düşündürmektedir. Böyle bir mikrobiyota değişimi intestinal ađ, LPS, sitokinler gibi ürünlerin eksefif artışına sebebiyet verebilir. Bunun akabinde özellikle Peyer patches ve başta da vurgulandığı gibi bir çok yol vasıtasıyla bu intestinal ürünler kendilerinden kaynaklı kronik inflamasyon neticesinde penetre olmuş (leaky gut) bağırsak epitellerinden dolaşıma geçerek, intestinal değişimin başından beri iki yönlü iletişimin sürdürüldüğü beyinde yaşlılık ve dahi inflamatuvar sebeplerden dolayı zayıflamış kan-beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemine varabilir. Böyle bir durumda beyinde de microglia ve astrosit gibi savunma hücrelerinin intestinal ürünlerle tetiklenmesi neticesinde akut inflamasyon meydana gelmesi beklenir. Böylece TNF- α ve dönüştürücü enzimi vasıtasıyla antimikrobiyal görevi olan APP uzatısı ađ oligomerleri, γ -sekretazlarla kesilerek oligomerizasyon neticesinde fibril halde ortamda aktif görev almaya başlayabilir bu yaşlılıkta beklenen ve AH ile ilişkisi olmayan plakların oluşumunu açıklayan doğal bir süreçtir. Ancak kronik inflamasyona hassas olan yaşlılık ve dahi genetik yatkınlık da, ki bebeklik döneminde AH aktif olduğuna dair daha önceden yapılan çalışmalarımız mevcuttur, bu işleri içinden çıkılmaz bir hale sürükleyerek intestinal ürünlerin ve sinyallerin yoğunluğu ile beyindeki savunma hücreleri arasındaki dinamik kısır döngü kronik inflamasyona sebebiyet verebilir. Böyle bir durumda ađ kaynaklı aşırı antimikrobiyal tepkinin plak oluşturması beklenen bir durum olacaktır. Proteinler homeostazinin temel taşları oldukları için vücudun dengesinin bozulması, ilk olarak anahtar rollerde bulunan protein yolaklarında kendini gösterecektir. Öyle ki, farklı kombinasyonlarla denediğimiz analizlerimizde ısrarla aynı moleküler fonksiyonların devinim sergiliyor oluşu, florada mikrobiyal devinimin en çok transkripsiyon ve enerji metabolizması

yolaklarını etkilediği bunun kanıtı mesabesinde dir. Belki de, hem hastalığın talihsiz moleküler sonuçları hem de hasta organizmanın kendini kurtarma çabaları, bakteriyel devinim neticesinde değişim gösteren gut mikrobiyotasında, yeni domine olan bakteriyel floranın organizma ile mutual yaş amının bir gereği sonucu, eski florada anlamlı azalan görevleri devralmak için, aynı görevleri ifa eden yolakların protein ifadelerini arttırmış olsun ki, böyle bir devinim sırasında homeostazı sağlayacak sözkonusu yolaklar aktive edilmiş olsun. Çünkü normal yaş lanma sürecinde belli filumların, bazı moleküler fonksiyonları ifâ eden proteinlerin ifadelerini azalan skalada görüp aynı fonksiyonlardan sorumlu proteinlerin florada yeni yerleş im göstermeye başlayan filumlar tarafından artan skaladada görülmesi floranın değişirken stabil kalıp dengeyi bozmamaya çalışıyor olabileceğini kanıtlar niteliktedir (Şekil-16).



Şekil 16: Verilerimizin izinde, AH durumunda bağırsak-beyin eksenini disbiyozisinin genel şeması. Sonuç olarak, tüm bunlar göz önüne alındığında erken-evre markör mesabesinde *Chlorobi*, *Tenericutes* ve *Cyanobacteria* filumları, ileri-evre markör olarak başta

Chloroflexi, *Coprothermobacterota* filumlarının varlığı ve artışı ile terapötik değer olan *Thermotogae* filumunun azalışı olmak üzere özellikle *Actinobacteria* daha sonra *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Firmicutes* ve *Verrucomicrobia* filumlarının eşik değerini aşan artış ve azalışlarının da markör olarak değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz. Bununla beraber Fonksiyonel analiz neticesinde istikrarlı değişim gösteren Transkripsiyon ve Enerji metabolik yollarının AH model için kritik bir markör mekanizma olduğunu düşünmekteyiz. Ve son olarak *DNA-directed RNA polymerase subunit beta'*, *Rubryerythrin*, *Ketol-acid reductoisomerase*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *ATP synthase subunit alpha ve beta*, *50S ribosomal protein*, *Elongation Factor Ef-Tu*, *60 kda chaperonin*, *Glucose-6-phosphat isomerase*, *Probable transaldolase*, *Histone H2A.Z*, *Putative ABC transporter ATP-binding* proteinlerinin ve son konusu filumlar ile fonksiyonel mekanizmaların AH ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunmuş olup daha ileri analizler için teker teker metaproteom analizinin yapılmasını öngörmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Kowalski K, Mulak A. Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease. *J Neurogastroenterol Motil.* 2019;25(1):48–60.
2. Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol [Internet].* 2017 Jan 15 [cited 2020 Feb 22];595(2):489–503. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27641441>
3. Quigley EMM. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases [Internet]. Vol. 17, *Current Neurology and Neuroscience Reports.* Current Medicine Group LLC 1; 2017 [cited 2020 Feb 22]. p. 94. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11910-017-0802-6>
4. Frasca D, Blomberg BB. Inflammaging decreases adaptive and innate immune responses in mice and humans [Internet]. Vol. 17, *Biogerontology.* Springer Netherlands; 2016 [cited 2020 Feb 22]. p. 7–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25921609>
5. Köhler C, Maes M, Slyepchenko A, Berk M, Solmi M, Lanctôt K, et al. The Gut-Brain Axis, Including the Microbiome, Leaky Gut and Bacterial Translocation: Mechanisms and Pathophysiological Role in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des.* 2016 Sep 23;22(40):6152–66.
6. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature [Internet].* 2015 Jul 16 [cited 2020 Feb 22];523(7560):337–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26030524>
7. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell.* 2015 Apr 9;161(2):264–76.
8. Bhattacharjee S, Lukiw WJ. Alzheimer's disease and the microbiome. *Front Cell Neurosci [Internet].* 2013 Sep 17 [cited 2020 Feb 22];7(SEP):153. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24062644>
9. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology.* 2014.
10. Jouanne M, Rault S, Voisin-Chiret AS. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2017.
11. Román G. Vascular Dementia: A Historical Background. *Int Psychogeriatrics.* 2003 Jul;15(S1):11–3.

12. Mast H, Tatemichi TK, Mohr JP. Chronic brain ischemia: the contributions of Otto Binswanger and Alois Alzheimer to the mechanisms of vascular dementia. Vol. 132, *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier; 1995. p. 4–10.
13. Dr. Lawrence Broxmeyer MD. Dr. Oskar Fischer's Curious Little Alzheimer's Germ. *Curr Opin Neurol Sci* [Internet]. 2017;1(3):160–78. Available from: <https://scientiaricerca.com/srcons/SRCONS-01-00026.php>
14. Alzheimer A. Arteriosclerotic brain atrophy. *Int J Geriatr Psychiatry*. 1991;6(3):129–30.
15. KAY DW, ROTH M, BEAMISH P. OLD AGE MENTAL DISORDERS IN NEWCASTLE UPON TYNE. II. A STUDY OF POSSIBLE SOCIAL AND MEDICAL CAUSES. *Br J Psychiatry*. 1964;110(468):668–82.
16. Oskar Fischer and the study of dementia [Internet]. [cited 2020 Mar 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2668940/>
17. Boller F, Forbes MM. History of dementia and dementia in history: An overview. Vol. 158, *Journal of the Neurological Sciences*. *J Neurol Sci*; 1998. p. 125–33.
18. Schellenberg GD, Montine TJ. The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 2012.
19. Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F. An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clin Anat*. 1995;8(6):429–31.
20. Alzheimer A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters: (On certain peculiar diseases of old age. *Hist Psychiatry*. 1991;2(5):74–101.
21. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2015;1:1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
22. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Feb 1;63(2):168–74.
23. Waring SC, Rosenberg RN. Genome-wide association studies in Alzheimer disease. Vol. 65, *Archives of Neurology*. *Arch Neurol*; 2008. p. 329–34.
24. Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. Vol. 399, *Nature*. Macmillan Magazines Ltd; 1999.
25. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin I variants elevate β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. 1996;17(5):1005–13.

26. Shioi J, Georgakopoulos A, Mehta P, Kouchi Z, Litterst CM, Baki L, et al. FAD mutants unable to increase neurotoxic A β 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on A β . *J Neurochem.* 2007 May;101(3):674–81.
27. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: High-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar 1;90(5):1977–81.
28. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. Vol. 103, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Proc Natl Acad Sci U S A; 2006. p. 5644–51.
29. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2013 Dec 1;45(12):1452–8.
30. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. Vol. 66, *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry.* BMJ Publishing Group; 1999. p. 137–47.
31. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences.* 1991.
32. De Strooper B. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: A multifactorial view on the disease process. *Physiological Reviews.* 2010.
33. Zhang L, Wang Y, Xiayu X, Shi C, Chen W, Song N, et al. Altered Gut Microbiota in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 2017;60(4):1241–57.
34. Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 2006;
35. Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2013.
36. Eisele YS. From soluble A β to progressive A β aggregation: Could prion-like templated misfolding play a role? In: *Brain Pathology.* 2013.
37. Nistor M, Don M, Parekh M, Sarsoza F, Goodus M, Lopez GE, et al. Alpha- and beta-secretase activity as a function of age and beta-amyloid in Down syndrome and normal brain. *Neurobiol Aging.* 2007;
38. Lott IT, Head E. Alzheimer disease and Down syndrome: Factors in pathogenesis. In:

- Neurobiology of Aging. 2005.
39. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Borthette P, Blackwell C, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature*. 1995;
 40. Masliah E, Sisk A, Mallory M, Mucke L, Schenk D, Games D. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F/ β -amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 1996;
 41. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* (80-). 1996;
 42. Dumont M, Strazielle C, Staufenbiel M, Lalonde R. Spatial learning and exploration of environmental stimuli in 24-month-old female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res*. 2004;
 43. Kumar DKV, Choi HS, Washicosky KJ, Eimer WA, Tucker S, Ghofrani J, et al. Amyloid- β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Sci Transl Med*. 2016;
 44. Welling MM, Nabuurs RJA, Van Der Weerd L. Potential role of antimicrobial peptides in the early onset of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2015;
 45. Borrello S, Nicolò C, Delogu G, Pandolfi F, Ria F. TLR2: A crossroads between infections and autoimmunity? *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(3):549–56.
 46. Allen HB. Alzheimer's Disease: Assessing the Role of Spirochetes, Biofilms, the Immune System, and Amyloid- β with Regard to Potential Treatment and Prevention. *J Alzheimer's Dis*. 2016;53(4):1271–6.
 47. Von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* (80-). 2008;
 48. Lim JE, Kou J, Song M, Pattanayak A, Jin J, Lalonde R, et al. MyD88 deficiency ameliorates β -amyloidosis in an animal model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2011;
 49. Mudher A, Lovestone S. Alzheimer's disease - Do tauists and baptists finally shake hands? *Trends in Neurosciences*. 2002.
 50. Alagöz AN. Mikrobiyota ve Nörodejenerasyon. *J Biotechnol Strateg Heal Res* [Internet]. 2017;1:115–22. Available from: <http://dergipark.gov.tr/bshr/issue/32641/363349>
 51. Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2017;58(1):1–15.

52. Knopman DS. Alzheimer disease: Preclinical Alzheimer disease - The new frontier. *Nature Reviews Neurology*. 2016.
53. Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: Similarities and differences. Vol. 115, *Acta Neuropathologica*. *Acta Neuropathol*; 2008. p. 5–38.
54. Bryan KJ, Lee H, Perry G, Smith MA, Casadesus G. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations [Internet]. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis; 2009 [cited 2020 Jun 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204338>
55. Ashe KH. Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. Vol. 8, *Learning and Memory*. *Learn Mem*; 2001. p. 301–8.
56. Götz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. Vol. 9, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2008. p. 532–44.
57. Eriksen JL, Janus CG. Plaques, tangles, and memory loss in mouse models of neurodegeneration. Vol. 37, *Behavior Genetics*. *Behav Genet*; 2007. p. 79–100.
58. Girard SD, Jacquet M, Baranger K, Migliorati M, Escoffier G, Bernard A, et al. Onset of hippocampus-dependent memory impairments in 5XFAD transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus*. 2014;24(7):762–72.
59. Girard SD, Baranger K, Gauthier C, Jacquet M, Bernard A, Escoffier G, et al. Evidence for early cognitive impairment related to frontal cortex in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2013;33(3):781–96.
60. Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33(1):196.e29-196.e40.
61. Zhu X, Han Y, Du J, Liu R, Jin K, Yi W. Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Aug 8 [cited 2020 Feb 22];8(32):53829–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28881854>
62. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* (80-). 2005 Jun 10;308(5728):1635–8.
63. Yılmaz K, Altındış M. Sindirim sistemi mikrobiyotasi ve fekal transplantasyon. *Nobel Medicus*. 2017.
64. Knight R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. *The British journal of nutrition*.

2015.

65. Lyon L. “All disease begins in the gut”: Was Hippocrates right? *Brain*. 2018;141(3):e20.
66. Mandal RS, Saha S, Das S. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. Vol. 13, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. Beijing Genomics Institute; 2015. p. 148–58.
67. Yalçın SS, Kanatlı MÇ. Fecal microbiota transplantation: why, who, how? *Pamukkale Med J*. 2015;8(2):148–54.
68. Smits LP, Bouter KEC, De Vos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation [Internet]. Vol. 145, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2013 [cited 2020 Feb 22]. p. 946–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24018052>
69. Friedland RP. Mechanisms of Molecular Mimicry Involving the Microbiota in Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2015.
70. Bravo JA, Forsythe P, Chew M V., Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;
71. A.T. T, J.P. C, J.J. K, Y. Y, C.C. H, N. H, et al. Endothelial TLR4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations. *Nature*. 2017;
72. Mulak A, Bonaz B. Irritable bowel syndrome: A model of the brain-gut interactions. *Medical Science Monitor*. 2004.
73. Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv Exp Med Biol*. 2014;
74. Barrett E, Ross RP, O’Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J Appl Microbiol*. 2012;
75. Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Björklund T, et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol*. 2014;
76. Tremlett H, Bauer KC, Appel-Cresswell S, Finlay BB, Waubant E. The gut microbiome in human neurological disease: A review. *Annals of Neurology*. 2017.
77. Westfall S, Lomis N, Kahouli I, Dia SY, Singh SP, Prakash S. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017.
78. Catanzaro R, Anzalone M, Calabrese F, Milazzo M, Capuana M, Italia A, et al. The gut microbiota and its correlations with the central nervous system disorders. Vol. 57, *Panminerva*

- medica. 2015. p. 127–43.
79. Lacy BE, Mearin F, Chang L, Chey WD, Lembo AJ, Simren M, et al. Bowel disorders. *Gastroenterology*. 2016 May 1;150(6):1393-1407.e5.
 80. Chen CH, Lin CL, Kao CH. Irritable bowel syndrome is associated with an increased risk of dementia: A nationwide population-based study. *PLoS One*. 2016;
 81. Marizzoni M, Provasi S, Cattaneo A, Frisoni GB. Microbiota and neurodegenerative diseases [Internet]. Vol. 30, *Current Opinion in Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017 [cited 2020 Feb 23]. p. 630–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28906270>
 82. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;
 83. Alkasir R, Li J, Li X, Jin M, Zhu B. Human gut microbiota: the links with dementia development. Vol. 8, *Protein and Cell*. Higher Education Press; 2017. p. 90–102.
 84. Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, Blanchard E, Taylor CM, Welsh DA, et al. Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry*. 2015 Apr 1;77(7):607–15.
 85. Zhang R, Miller RG, Gascon R, Champion S, Katz J, Lancero M, et al. Circulating endotoxin and systemic immune activation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J Neuroimmunol*. 2009;
 86. Zhu X, Han Y, Du J, Liu R, Jin K, Yi W. Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Aug 8 [cited 2020 Mar 23];8(32):53829–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28881854>
 87. Tse JKY. Gut Microbiota, Nitric Oxide, and Microglia as Prerequisites for Neurodegenerative Disorders. Vol. 8, *ACS Chemical Neuroscience*. American Chemical Society; 2017. p. 1438–47.
 88. Cirrito JR, Disabato BM, Restivo JL, Verges DK, Goebel WD, Sathyan A, et al. Serotonin signaling is associated with lower amyloid- β levels and plaques in transgenic mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 6;108(36):14968–73.
 89. Chalazonitis A, Rao M. Enteric nervous system manifestations of neurodegenerative disease. *Brain Res* [Internet]. 2018;1693(January):207–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.01.011>
 90. Nair AT, Ramachandran V, Joghee NM, Antony S, Ramalingam G. Gut microbiota dysfunction as reliable non-invasive early diagnostic biomarkers in the pathophysiology of Parkinson's

- disease: A critical review. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2018.
91. Semar S, Klotz M, Letiembre M, Van Ginneken C, Braun A, Jost V, et al. Changes of the enteric nervous system in amyloid- β protein precursor transgenic mice correlate with disease progression. *J Alzheimer's Dis*. 2013;
 92. Cherny I, Rockah L, Levy-Nissenbaum O, Gophna U, Ron EZ, Gazit E. The formation of *Escherichia coli* curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. *J Mol Biol*. 2005;
 93. Friedland RP, Chapman MR. The role of microbial amyloid in neurodegeneration. *PLoS Pathog*. 2017;13(12):1–12.
 94. Dua P ZY. Microbial Sources of Amyloid and Relevance to Amyloidogenesis and Alzheimer's Disease (AD). *J Alzheimer's Dis Park*. 2015;
 95. Chen SG, Stribinskis V, Rane MJ, Demuth DR, Gozal E, Roberts AM, et al. Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep*. 2016;
 96. Zhou Y, Smith D, Leong BJ, Brännström K, Almqvist F, Chapman MR. Promiscuous cross-seeding between bacterial amyloids promotes interspecies biofilms. *J Biol Chem*. 2012;
 97. Lundmark K, Westermark GT, Olsén A, Westermark P. Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;
 98. Hauss-Wegrzyniak B, Vraniak PD, Wenk GL. LPS-induced neuroinflammatory effects do not recover with time. *Neuroreport*. 2000;
 99. Kahn MS, Kranjac D, Alonzo CA, Haase JH, Cedillos RO, McLinden KA, et al. Prolonged elevation in hippocampal A β and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse. *Behav Brain Res*. 2012;
 100. Asti A, Gioglio L. Can a bacterial endotoxin be a key factor in the kinetics of amyloid fibril formation? *J Alzheimer's Dis*. 2014;
 101. Saleem F, Bjorndahl TC, Ladner CL, Perez-Pineiro R, Ametaj BN, Wishart DS. Lipopolysaccharide induced conversion of recombinant prion protein. *Prion*. 2014;
 102. Zhao Y, Jaber V, Lukiw WJ. Secretory products of the human GI tract microbiome and their potential impact on Alzheimer's disease (AD): Detection of lipopolysaccharide (LPS) in AD hippocampus. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Jul 11;7(JUL).
 103. Zhao Y, Cong L, Jaber V, Lukiw WJ. Microbiome-derived lipopolysaccharide enriched in the perinuclear region of Alzheimer's disease brain. *Front Immunol*. 2017;

104. Zhao Y, Cong L, Lukiw WJ. Lipopolysaccharide (LPS) accumulates in neocortical neurons of Alzheimer's disease (AD) brain and impairs transcription in human neuronal-glia primary co-cultures. *Front Aging Neurosci.* 2017;
105. Zhan X, Stamova B, Jin LW, Decarli C, Phinney B, Sharp FR. Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology.* 2016;
106. Emery DC, Shoemark DK, Batstone TE, Waterfall CM, Coghill JA, Cerajewska TL, et al. 16S rRNA next generation sequencing analysis shows bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. *Front Aging Neurosci.* 2017;9(JUN):1–13.
107. Lukiw WJ, Cong L, Jaber V, Zhao Y. Microbiome-Derived Lipopolysaccharide (LPS) Selectively Inhibits Neurofilament Light Chain (NF-L) Gene Expression in Human Neuronal-Glial (HNG) Cells in Primary Culture. *Front Neurosci.* 2018;
108. Lukiw WJ. *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharide and inflammatory signaling in alzheimer's disease. *Front Microbiol.* 2016;
109. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in inflammation. *Front Immunol.* 2018;9(JUN).
110. He Z, Riva M, Björk P, Swärd K, Mörgelin M, Leanderson T, et al. CD14 is a co-receptor for TLR4 in the S100A9-induced pro-inflammatory response in monocytes. *PLoS One.* 2016;
111. Walsham NE, Sherwood RA. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology.* 2016.
112. Wang C, Klechikov AG, Gharibyan AL, Wärmländer SKTS, Jarvet J, Zhao L, et al. The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade. *Acta Neuropathol.* 2014;127(4):507–22.
113. Zhang C, Liu Y, Gilthorpe J, van der Maarel JRC. MRP14 (S100A9) protein interacts with Alzheimer beta-amyloid peptide and induces its fibrillization. *PLoS One.* 2012;
114. Leblhuber F, Geisler S, Steiner K, Fuchs D, Schütz B. Elevated fecal calprotectin in patients with Alzheimer's dementia indicates leaky gut. *J Neural Transm.* 2015;
115. Mulak A, Budrewicz S, Panek-Jeziorna M, Koszewicz M, Jasinska M, Marczak-Karpina B, et al. Fecal Biomarkers of Gut Inflammation and Intestinal Barrier Dysfunction in Parkinson's Disease. *Gastroenterology.* 2017;
116. Sochocka M, Donskow-Lysoniewska K, Diniz BS, Kurpas D, Brzozowska E, Leszek J. The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease—a Critical Review. *Mol Neurobiol.* 2019;56(3):1841–51.
117. Potgieter M, Bester J, Kell DB, Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic,

- inflammatory diseases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015.
118. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*. 2014.
 119. Jakobsson HE, Rodríguez-Piñeiro AM, Schütte A, Ermund A, Boysen P, Bemark M, et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep*. 2015;
 120. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;
 121. König J, Wells J, Cani PD, García-Ródenas CL, MacDonald T, Mercenier A, et al. Human intestinal barrier function in health and disease. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016;
 122. Choi VM, Herrou J, Hecht AL, Teoh WP, Turner JR, Crosson S, et al. Activation of *Bacteroides fragilis* toxin by a novel bacterial protease contributes to anaerobic sepsis in mice. *Nat Med*. 2016;
 123. Wu S, Yi J, Zhang YG, Zhou J, Sun J. Leaky intestine and impaired microbiome in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiol Rep*. 2015;
 124. Mulak A, Bonaz B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. Vol. 21, *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press; 2015. p. 10609–20.
 125. Cattaneo A, Cattane N, Galluzzi S, Provasi S, Lopizzo N, Festari C, et al. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2017;49:60–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019>
 126. McIntee FL, Giannoni P, Blais S, Sommer G, Neubert TA, Rostagno A, et al. In vivo differential brain clearance and catabolism of monomeric and oligomeric alzheimer's $\text{A}\beta$ protein. *Front Aging Neurosci*. 2016;
 127. Li CQ, Zheng Q, Wang Q, Zeng QP, D'Angelo E, Blandini F, et al. Biotic/abiotic stress-driven Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2016 Nov 23 [cited 2020 Feb 24];10(NOV2016):269. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27932953>
 128. Pistollato F, Cano SS, Elio I, Vergara MM, Giampieri F, Battino M. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutr Rev*. 2016;74(10):624–34.
 129. Püntener U, Booth SG, Perry VH, Teeling JL. Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. *J Neuroinflammation*. 2012;
 130. Butchart J, Birch B, Bassily R, Wolfe L, Holmes C. Male Sex Hormones and Systemic

Inflammation in Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* [Internet]. 2013 Apr [cited 2020 Feb 24];27(2):153–6. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002093-201304000-00009>

131. Kane MD, Lipinski WJ, Callahan MJ, Bian F, Durham RA, Schwarz RD, et al. Evidence for seeding of β -amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in β -amyloid precursor protein-transgenic mice. *J Neurosci*. 2000;
132. Hamaguchi T, Eisele YS, Varvel NH, Lamb BT, Walker LC, Jucker M. The presence of A β seeds, and not age per se, is critical to the initiation of A β deposition in the brain. *Acta Neuropathol*. 2012;
133. Sowade RF, Jahn TR. Seed-induced acceleration of amyloid - β Mediated neurotoxicity in vivo. *Nat Commun*. 2017;
134. Espargaró A, Busquets MA, Estelrich J, Sabate R. Key points concerning amyloid infectivity and prion-like neuronal invasion. *Front Mol Neurosci*. 2016;
135. Eisele YS, Obermüller U, Heilbronner G, Baumann F, Kaeser SA, Wolburg H, et al. Peripherally applied A β -containing inoculates induce cerebral β -amyloidosis. *Science* (80-). 2010;
136. Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases [Internet]. Vol. 11, *Nature Reviews Neuroscience*. 2010 [cited 2020 Feb 24]. p. 155–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029438>
137. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem*. 2009;
138. Bayer TA, Wirths O. Intracellular accumulation of amyloid-beta - A predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2010;
139. Deane R, Yan S Du, Subramanyam RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, et al. RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med*. 2003;
140. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2017.
141. Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, et al. Blood-Brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*. 2015;
142. Halliday MR, Rege S V., Ma Q, Zhao Z, Miller CA, Winkler EA, et al. Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer's

- disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;
143. Brandscheid C, Schuck F, Reinhardt S, Schäfer KH, Pietrzik CU, Grimm M, et al. Altered Gut Microbiome Composition and Tryptic Activity of the 5xFAD Alzheimer's Mouse Model. *J Alzheimer's Dis.* 2017;56(2):775–88.
 144. Bonfili L, Cecarini V, Berardi S, Scarpona S, Suchodolski JS, Nasuti C, et al. Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–21.
 145. Minter MR, Zhang C, Leone V, Ringus DL, Zhang X, Oyler-Castrillo P, et al. Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2016;
 146. Minter MR, Hinterleitner R, Meisel M, Zhang C, Leone V, Zhang X, et al. Antibiotic-induced perturbations in microbial diversity during post-natal development alters amyloid pathology in an aged APPSWE/PS1ΔE9 murine model of Alzheimer's disease. *Sci Rep [Internet].* 2017 Dec 1 [cited 2020 Feb 24];7(1):10411. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28874832>
 147. Harach T, Marungruang N, Duthilleul N, Cheatham V, Mc Coy KD, Frisoni G, et al. Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci Rep.* 2017 Feb 8;7(1):1–15.
 148. Shen L, Liu L, Ji HF. Alzheimer's disease histological and behavioral manifestations in transgenic mice correlate with specific gut microbiome state. *J Alzheimer's Dis.* 2017;
 149. Bäuerl C, Collado MC, Diaz Cuevas A, Viña J, Pérez Martínez G. Shifts in gut microbiota composition in an APP/PSS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease during lifespan. *Lett Appl Microbiol [Internet].* 2018 Jun 1 [cited 2020 Feb 24];66(6):464–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29575030>
 150. Xin Y, Diling C, Jian Y, Ting L, Guoyan H, Hualun L, et al. Effects of oligosaccharides from morinda officinalis on gut microbiota and metabolome of APP/PS1 transgenic mice. *Front Neurol.* 2018 Jun 15;9(JUN).
 151. Poole S, Singhrao SK, Chukkapalli S, Rivera M, Velsko I, Kesavalu L, et al. Active invasion of Porphyromonas gingivalis and infection-induced complement activation in ApoE^{-/-} mice brains. *J Alzheimer's Dis.* 2014;43(1):67–80.
 152. Kobayashi Y, Sugahara H, Shimada K, Mitsuyama E, Kuhara T, Yasuoka A, et al. Therapeutic potential of Bifidobacterium breve strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2017;
 153. Nimgampalle M, Yellamma K. Anti-Alzheimer properties of probiotic, Lactobacillus plantarum

- MTCC 1325 in Alzheimer's disease induced albino rats. *J Clin Diagnostic Res.* 2017;
154. Azm SAN, Djazayeri A, Safa M, Azami K, Ahmadvand B, Sabbaghziarani F, et al. Lactobacilli and bifidobacteria ameliorate memory and learning deficits and oxidative stress in β -amyloid (1–42) injected rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2018;
 155. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. In: *Electrophoresis.* 1998.
 156. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology.* 1999.
 157. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/Technology.* 1996;
 158. Apweiler R, Martin MJ, O'Donovan C, Magrane M, Alam-Faruque Y, Antunes R, et al. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(SUPPL. 1):214–9.
 159. Aranda B, Achuthan P, Alam-Faruque Y, Armean I, Bridge A, Derow C, et al. The IntAct molecular interaction database in 2010. *Nucleic Acids Res.* 2009;
 160. Vastrik I, D'Eustachio P, Schmidt E, Joshi-Tope G, Gopinath G, Croft D, et al. Reactome: A knowledge base of biologic pathways and processes. *Genome Biol.* 2007;
 161. Vizcaíno JA, Côté R, Reisinger F, Foster JM, Mueller M, Rameseder J, et al. A guide to the Proteomics Identifications Database proteomics data repository. *Proteomics.* 2009;9(18):4276–83.
 162. Kohl M, Wiese S, Warscheid B. Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks. *Methods Mol Biol.* 2011;
 163. Barnouin K. Guidelines for experimental design and data analysis of proteomic mass spectrometry-based experiments. *Amino Acids.* 2011;40(2):259–60.
 164. Rodríguez-Valera F. Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiology Letters.* 2004.
 165. Wilmes P, Bond PL. Metaproteomics: Studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in Microbiology.* 2006.
 166. Singh RP, Reddy CRK. Unraveling the functions of the macroalgal microbiome. *Front Microbiol.* 2016 Jan 5;6(JAN):1488.
 167. Petriz BA, Franco OL. Metaproteomics as a complementary approach to gut microbiota in

- health and disease. *Front Chem.* 2017;5(JAN):1–7.
168. Kong Y, Xia Y, Seviour R, He M, McAllister T, Forster R. *In situ* identification of carboxymethyl cellulose-digesting bacteria in the rumen of cattle fed alfalfa or triticale. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2020 Feb 24];80(1):159–67. Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2011.01295.x>
169. Ashman S, Krishnamurthy H. The Gut Microbiome. In: *Effects of Lifestyle on Men's Health* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2020 Feb 24]. p. 61–98. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128166659000044>
170. Lee PY, Chin SF, Neoh HM, Jamal R. Metaproteomic analysis of human gut microbiota: Where are we heading? *J Biomed Sci.* 2017;24(1):1–8.
171. Zhong H, Ren H, Lu Y, Fang C, Hou G, Yang Z, et al. Distinct gut metagenomics and metaproteomics signatures in prediabetics and treatment-naïve type 2 diabetics. *EBioMedicine.* 2019 Sep 1;47:373–83.
172. Gavin PG, Mullaney JA, Loo D, Cao KAL, Gottlieb PA, Hill MM, et al. Intestinal metaproteomics reveals host-microbiota interactions in subjects at risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2018;41(10):2178–86.
173. Zhang X, Deeke SA, Ning Z, Starr AE, Butcher J, Li J, et al. Metaproteomics reveals associations between microbiome and intestinal extracellular vesicle proteins in pediatric inflammatory bowel disease. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05357-4>
174. Kolmeder CA, Ritari J, Verdam FJ, Muth T, Keskitalo S, Varjosalo M, et al. Colonic metaproteomic signatures of active bacteria and the host in obesity. *Proteomics.* 2015;15(20):3544–52.
175. Apajalahti JHA, Särkilahti LK, Mäki BRE, Pekka Heikkinen J, Nurminen PH, Holben WE. Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanine-plus-cytosine- based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 1998;
176. Tanca A, Palomba A, Pisanu S, Deligios M, Fraumene C, Manghina V, et al. A straightforward and efficient analytical pipeline for metaproteome characterization. *Microbiome.* 2014;
177. Ngo S, Guo Z. Key residues for the oligomerization of A β 42 protein in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;
178. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009;

179. Gurel B, Sahin BB, Group AH. Neonatal Neurodegeneration in Alzheimer ' s Disease Transgenic Mouse Model. 2018;(March).
180. Beker MC, Caglayan B, Yalcin E, Caglayan AB, Turkseven S, Gurel B, et al. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. Mol Neurobiol. 2018;
181. Demircan T, Keskin I, Dumlu SN, Aytürk N, Avşaroğlu ME, Akgün E, et al. Detailed tail proteomic analysis of axolotl (*Ambystoma mexicanum*) using an mRNA-seq reference database. Proteomics. 2017;
182. Palmer AM. The activity of the pentose phosphate pathway is increased in response to oxidative stress in Alzheimer's disease. J Neural Transm. 1999;106(3–4):317–28.
183. Zhang L, Chen C, Mak MS, Lu J, Wu Z, Chen Q, et al. Advance of sporadic Alzheimer's disease animal models. Med Res Rev [Internet]. 2020 Jan 22 [cited 2020 Jun 17];40(1):431–58. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/med.21624>
184. Libon D, Lamar M, Swenson RA, Heilman KM. Vascular disease, Alzheimer's disease, and mild cognitive impairment : advancing an integrated approach. 482 p.
185. Xu R, Wang QQ. Towards understanding brain-gut-microbiome connections in Alzheimer's disease. BMC Syst Biol. 2016 Aug 26;10.
186. Cerovic M, Forloni G, Balducci C. Neuroinflammation and the Gut Microbiota: Possible Alternative Therapeutic Targets to Counteract Alzheimer's Disease? Vol. 11, Frontiers in Aging Neuroscience. Frontiers Media S.A.; 2019.
187. Raimondi MT, Albani D, Giordano C. An Organ-On-A-Chip Engineered Platform to Study the Microbiota–Gut–Brain Axis in Neurodegeneration. Vol. 25, Trends in Molecular Medicine. 2019.
188. Abraham D, Feher J, Scuderi GL, Szabo D, Dobolyi A, Cservenak M, et al. Exercise and probiotics attenuate the development of Alzheimer's disease in transgenic mice: Role of microbiome. Exp Gerontol. 2019 Jan 1;115:122–31.
189. Rezaei Asl Z, Sepehri G, Salami M. Probiotic treatment improves the impaired spatial cognitive performance and restores synaptic plasticity in an animal model of Alzheimer's disease. Behav Brain Res. 2019;376.
190. GÃ©rard HC, Dreses-Werringloer U, Wildt KS, Deka S, Oszust C, Balin BJ, et al. *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* in the Alzheimer's brain. FEMS Immunol Med Microbiol [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2020 Mar 20];48(3):355–66. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2006.00154.x>

191. Lee SG, Lei C, Melough M, Sakaki J, Maas K, Koo S, et al. Impacts of Aging and Blackcurrant Supplementation on the Gut Microbiome Profile of Female Mice (P20-031-19). *Curr Dev Nutr.* 2019;3(Supplement_1):67018.
192. Zhang X, Li L, Mayne J, Ning Z, Stintzi A, Figeys D, et al. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Proteomics* [Internet]. 2017;1(1):1–13. Available from: http://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/3435
193. Wang J, Lang T, Shen J, Dai J, Tian L, Wang X. Core gut bacteria analysis of healthy mice. *Front Microbiol.* 2019;10(APR):1–14.
194. Lee HJ, Lee KE, Kim JK, Kim DH. Suppression of gut dysbiosis by *Bifidobacterium longum* alleviates cognitive decline in 5XFAD transgenic and aged mice. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1):1–12.
195. Li Z, Zhu H, Zhang L, Qin C. The intestinal microbiome and Alzheimer's disease: A review. *Anim Model Exp Med.* 2018;1(3):180–8.
196. Van Giau V, Wu SY, Jamerlan A, An SSA, Kim SY, Hulme J. Gut microbiota and their neuroinflammatory implications in alzheimer's disease [Internet]. Vol. 10, *Nutrients*. MDPI AG; 2018 [cited 2020 Mar 30]. p. 1765. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1765>
197. Boon Wong C, Kobayashi Y, Xiao J. Probiotics for Preventing Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. In: *Gut Microbiota - Brain Axis*. IntechOpen; 2018.
198. Wang S, Jiang W, Ouyang T, Shen XY, Wang F, Qu Y hua, et al. Jatrorrhizine Balances the Gut Microbiota and Reverses Learning and Memory Deficits in APP/PS1 transgenic mice. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1):1–15.
199. Fisunov GY, Evsyutina D V., Garanina IA, Arzamasov AA, Butenko IO, Altukhov IA, et al. Ribosome profiling reveals an adaptation strategy of reduced bacterium to acute stress. *Biochimie.* 2017 Jan 1;132:66–74.
200. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1):1–11.
201. Nagpal R, Neth BJ, Wang S, Craft S, Yadav H. Modified Mediterranean-ketogenic diet modulates gut microbiome and short-chain fatty acids in association with Alzheimer's disease markers in subjects with mild cognitive impairment. *EBioMedicine* [Internet]. 2019;47:529–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.032>
202. Cryan JF, O'riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu K V., Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The microbiota-gut-brain axis. *Physiol Rev.* 2019;99(4):1877–2013.

203. Emery DC, Shoemark DK, Batstone TE, Waterfall CM, Coghill JA, Cerajewska TL, et al. 16S rRNA next generation sequencing analysis shows bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2017 Jun 20 [cited 2020 Mar 19];9(JUN):195. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28676754>
204. Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. *Campylobacter* spp. As a foodborne pathogen: A review. Vol. 2, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation; 2011.
205. Harini K, Ajila V, Hegde S. *Bdellovibrio bacteriovorus*: A future antimicrobial agent? Vol. 17, *Journal of Indian Society of Periodontology*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2013. p. 823–5.
206. Miklossy J. Historic evidence to support a causal relationship between spirochetal infections and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2015;7(MAR).
207. Miklossy J. Alzheimer's disease - a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria. Vol. 8, *Journal of Neuroinflammation*. BioMed Central; 2011. p. 90.
208. Miklossy J. ALZHEIMER'S DISEASE, SPIROCHETES—A CAUSAL RELATIONSHIP. *Innov Aging*. 2017 Jul 1;1(suppl_1):274–274.
209. Sun J, Xu J, Ling Y, Wang F, Gong T, Yang C, et al. Fecal microbiota transplantation alleviated Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP/PS1 transgenic mice. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2019 Dec 5 [cited 2020 Mar 27];9(1):189. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41398-019-0525-3>
210. Sun J, Xu J, Yang B, Chen K, Kong Y, Fang N, et al. Effect of *Clostridium butyricum* against Microglia-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease via Regulating Gut Microbiota and Metabolites Butyrate. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2020 Jan 23 [cited 2020 Mar 27];64(2):1900636. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.201900636>
211. Zhang L, Wang Y, Xiayu X, Shi C, Chen W, Song N, et al. SUMO1-conjugation is altered during normal aging but not by increased amyloid burden. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2016;56(4):321–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-016-0196-8>
212. Hu X, Wang T, Jin F. Alzheimer's disease and gut microbiota. *Sci China Life Sci*. 2016;59(10):1006–23.
213. Nguyen TTT, Fujimura Y, Mimura I, Fujii Y, Nguyen NL, Arakawa K, et al. Cultivable butyrate-producing bacteria of elderly Japanese diagnosed with Alzheimer's disease. *J Microbiol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2020 Mar 27];56(10):760–71. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12275-018-8297-7>

214. Wang X, Sun G, Feng T, Zhang J, Huang X, Wang T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. *Cell Res* [Internet]. 2019;29(10):787–803. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-019-0216-x>
215. Franssen F, van Beek AA, Borghuis T, El Aidy S, Hugenholtz F, van der Gaast - de Jongh C, et al. Aged gut microbiota contributes to systemical inflammaging after transfer to germ-free mice. *Front Immunol*. 2017;8(NOV):1–12.
216. Zhuang ZQ, Shen LL, Li WW, Fu X, Zeng F, Gui L, et al. Gut Microbiota is Altered in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2018;63(4):1337–46.
217. La Rosa F, Clerici M, Ratto D, Occhinegro A, Licito A, Romeo M, et al. The gut-brain axis in Alzheimer's disease and omega-3. A critical overview of clinical trials. *Nutrients*. 2018;10(9):1–17.
218. Wang J, Lang T, Shen J, Dai J, Tian L. Core Gut microbiota analysis of feces in healthy mouse model Supplementary figures.
219. Harach T, Marungruang N, Dutilleul N, Cheatham V, Coy KDM, Neher JJ, et al. Reduction of Alzheimer's disease beta-amyloid pathology in the absence of gut microbiota. 2015 Sep 8 [cited 2020 Mar 19]; Available from: <http://arxiv.org/abs/1509.02273>
220. Stebeegg M, Silva-Cayetano A, Innocentin S, Jenkins TP, Cantacessi C, Gilbert C, et al. Heterochronic faecal transplantation boosts gut germinal centres in aged mice. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10430-7>
221. Wang J, Ye F, Cheng X, Zhang X, Liu F, Liu G, et al. The Effects of LW-AFC on Intestinal Microbiome in Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 Strain, a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2016;53(3):907–19.
222. Cui B, Su D, Li W, She X, Zhang M, Wang R, et al. Effects of chronic noise exposure on the microbiome-gut-brain axis in senescence-accelerated prone mice: Implications for Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2018 Jun 22 [cited 2020 Mar 27];15(1):190. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-018-1223-4>
223. Fox M, Knorr DA, Haptonstall KM. Alzheimer's disease and symbiotic microbiota: an evolutionary medicine perspective. *Ann NY Acad Sci*. 2019;
224. Blanco LP, Evans ML, Smith DR, Badtke MP, Chapman MR. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids [Internet]. Vol. 20, *Trends in Microbiology*. 2012 [cited 2020 Mar 27]. p. 66–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X11002083>
225. Schwartz K, Boles BR. Microbial amyloids - functions and interactions within the host

- [Internet]. Vol. 16, *Current Opinion in Microbiology*. 2013 [cited 2020 Mar 27]. p. 93–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527412001762>
226. Xue L, Zou X, Yang XQ, Peng F, Yu DK, Du JR. Chronic periodontitis induces microbiota-gut-brain axis disorders and cognitive impairment in mice. *Exp Neurol* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2020 Apr 4];326:113176. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31926167>
227. Emery DC, Shoemark DK, Batstone TE, Waterfall CM, Coghill JA, Cerajewska TL, et al. 16S rRNA next generation sequencing analysis shows bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. *Front Aging Neurosci*. 2017 Jun 20;9(JUN).
228. Larsen P, Nielsen JL, Dueholm MS, Wetzel R, Otzen D, Nielsen PH. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ Microbiol*. 2007 Dec;9(12):3077–90.
229. Brenner SR. Blue-green algae or cyanobacteria in the intestinal micro-flora may produce neurotoxins such as Beta-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) which may be related to development of amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease and Parkinson-Dementia-Complex in humans and Equine Motor Neuron Disease in Horses. Vol. 80, *Medical Hypotheses*. *Med Hypotheses*; 2013. p. 103.
230. Bradley WG, Mash DC. Beyond Guam: The cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. In: *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009. p. 7–20.
231. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
232. Branton WG, Ellestad KK, Maingat F, Wheatley BM, Rud E, Warren RL, et al. Brain Microbial Populations in HIV/AIDS: α -Proteobacteria Predominate Independent of Host Immune Status. *PLoS One*. 2013 Jan 29;8(1).
233. Païssé S, Valle C, Servant F, Courtney M, Burcelin R, Amar J, et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2020 May 4];56(5):1138–47. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/trf.13477>
234. Lee HJ, Hwang YH, Kim DH. *Lactobacillus plantarum* C29-Fermented Soybean (DW2009) Alleviates Memory Impairment in 5XFAD Transgenic Mice by Regulating Microglia Activation and Gut Microbiota Composition. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2020 Mar 19];62(20):e1800359. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30152045>
235. Hufnagel DA, Tükel Ç, Chapman MR. Disease to Dirt: The Biology of Microbial Amyloids. True HL, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 Nov 21 [cited 2020 May 4];9(11):e1003740.

Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003740>

236. Sureda A, Daglia M, Argüelles Castilla S, Sanadgol N, Fazel Nabavi S, Khan H, et al. Oral microbiota and Alzheimer's disease: Do all roads lead to Rome? Vol. 151, *Pharmacological Research*. Academic Press; 2020. p. 104582.
237. Identification of Signature Proteins That Are Distinctive of the Deinococcus-Thermus Phylum - PubMed [Internet]. [cited 2020 Jun 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18076002/>
238. Lukiw WJ, Cho HJ, Kaufmann JCE, McLachlan DRC. The Molecular Mechanisms of Scrapie Encephalopathy and Relevance to Human Neurodegenerative Disease.
239. Lukiw WJ, Kruck TPA, McLachlan DR. Linker histone-DNA complexes: enhanced stability in the presence of aluminum lactate and implications for Alzheimer's disease. *FEBS Lett*. 1989 Aug 14;253(1-2):59-62.
240. Mydel P, Takahashi Y, Yumoto H, Sztukowska M, Kubica M, Gibson Iii FC, et al. Roles of the Host Oxidative Immune Response and Bacterial Antioxidant Rubrerythrin during *Porphyromonas gingivalis* Infection. [cited 2020 May 31]; Available from: www.plospathogens.org
241. Drechsel DA, Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. Vol. 44, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2008. p. 1873-86.
242. Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: Dihydropyrimidinase-related protein 2, α -enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem*. 2002 Sep;82(6):1524-32.
243. Huang TL, Mayence A, Vanden Eynde JJ. Some non-conventional biomolecular targets for diamidines. A short survey [Internet]. Vol. 22, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd; 2014 [cited 2020 Jun 1]. p. 1983-92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089614001552>
244. Wang BL, Li YH, Wang JG, Ma Y, Li ZM. Molecular design, synthesis and biological activities of amidines as new ketol-acid reductoisomerase inhibitors. *Chinese Chem Lett*. 2008 Jun 1;19(6):651-4.
245. Itakura M, Nakajima H, Kubo T, Semi Y, Kume S, Higashida S, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregates accelerate amyloid- β amyloidogenesis in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2015 Oct 23;290(43):26072-87.
246. Lin PI, Martin ER, Bronson PG, Browning-Large C, Small GW, Schmechel DE, et al. Exploring

- the association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and Alzheimer disease. *Neurology*. 2006 Jul 11;67(1):64–8.
247. Mazzola JL, Sirover MA. Subcellular alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in Alzheimer's disease fibroblasts. *J Neurosci Res* [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2020 Jun 1];71(2):279–85. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.10484>
 248. Mazzola JL, Sirover MA. Alteration of intracellular structure and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: A common phenotype of neurodegenerative disorders? In: *NeuroToxicology*. Elsevier; 2002. p. 603–9.
 249. Butterfield DA, Hardas SS, Lange MLB. Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and alzheimer's disease: Many pathways to neurodegeneration. Vol. 20, *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press; 2010. p. 369–93.
 250. Tatton WG, Chalmers-Redman RME, Elstner M, Leesch W, Jagodzinski FB, Stupak DP, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling. *J Neural Transm Suppl*. 2000;60:77–100.
 251. Sergeant N, Wattez A, Galván-Valencia M, Ghestem A, David JP, Lemoine J, et al. Association of ATP synthase α -chain with neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroscience* [Internet]. 2003 Mar 21 [cited 2020 Jun 14];117(2):293–303. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645222007479>
 252. Terni B, Boada J, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I. Mitochondrial ATP-Synthase in the Entorhinal Cortex Is a Target of Oxidative Stress at Stages I/II of Alzheimer's Disease Pathology. *Brain Pathol* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2020 Jun 14];20(1):222–33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3639.2009.00266.x>
 253. Beck SJ, Guo L, Phensy A, Tian J, Wang L, Tandon N, et al. Deregulation of mitochondrial FIFO-ATP synthase via OSCP in Alzheimer's disease. *Nat Commun*. 2016 May 6;7(1):1–16.
 254. Mi Y, Qi G, Brinton RD, Yin F. Mitochondria-Targeted Therapeutics for Alzheimer's Disease: The Good, the Bad, the Potential. *Antioxid Redox Signal*. 2020 Apr 21;
 255. Ding Q, Markesbery WR, Chen Q, Li F, Keller JN. Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2005 Oct 5;25(40):9171–5.
 256. Ding Q, Markesbery WR, Cekarini V, Keller JN. Decreased RNA, and increased RNA oxidation, in ribosomes from early Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2006 May 23;31(5):705–10.
 257. Boyd-Kimball D, Castegna A, Sultana R, Poon HF, Petroze R, Lynn BC, et al. Proteomic identification of proteins oxidized by A β (1-42) in synaptosomes: Implications for Alzheimer's disease. *Brain Res* [Internet]. 2005 May 24 [cited 2020 Jun 14];1044(2):206–15. Available

from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899305004853>

258. Reed T, Perluigi M, Sultana R, Pierce WM, Klein JB, Turner DM, et al. Redox proteomic identification of 4-Hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: Insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2008 Apr 1;30(1):107–20.
259. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Redox proteomics identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain and in vivo and in vitro models of AD centered around A β (1-42). In: *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; 2006. p. 3–11.
260. Swomley AM, Butterfield DA. Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics [Internet]. Vol. 89, *Archives of Toxicology.* Springer Verlag; 2015 [cited 2020 Jun 14]. p. 1669–80. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-015-1556-z>
261. D Bio SS, Marino Giovanni Zummo C, Felicia Farina Giulio Tagliatela Pier Luigi San Biagio P. DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL BIOMEDICINE AND CLINICAL NEUROSCIENCES THE ROLE OF HSP60 IN AMYLOID BETA PATHWAY: RELEVANCE TO ALZHEIMER'S DISEASE. 2017.
262. Singh NK, Rao P, Asea A. Heat Shock Proteins and the Brain: Implications for Neurodegenerative Diseases and Neuroprotection. In: *Heat Shock Proteins and the Brain: Implications for Neurodegenerative Diseases and Neuroprotection.* Springer Netherlands; 2008. p. 371–371.
263. Veereshwarayya V, Kumar P, Rosen KM, Mestrlil R, Querfurth HW. Differential effects of mitochondrial heat shock protein 60 and related molecular chaperones to prevent intracellular β -amyloid-induced inhibition of complex IV and limit apoptosis. *J Biol Chem.* 2006 Oct 6;281(40):29468–78.
264. Walls KC, Coskun P, Gallegos-Perez JL, Zadourian N, Freude K, Rasool S, et al. Swedish Alzheimer mutation induces mitochondrial dysfunction mediated by HSP60 mislocalization of Amyloid Precursor Protein (APP) and beta-amyloid. *J Biol Chem.* 2012 Aug 31;287(36):30317–27.
265. Schubert D. Glucose metabolism and Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 4, *Ageing Research Reviews.* Elsevier Ireland Ltd; 2005 [cited 2020 Jun 14]. p. 240–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568163705000073>
266. Kim HT, Russell RL, Raina AK, Harris PLR, Siedlak SL, Zhu X, et al. Protein disulfide isomerase in Alzheimer disease. *Antioxidants Redox Signal* [Internet]. 2000 Sep [cited 2020 Jun 14];2(3):485–9. Available from:

<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/15230860050192260>

267. Dias WB, Hart GW. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst* [Internet]. 2007 [cited 2020 Jun 14];3(11):766–72. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b704905f>
268. Montine TJ, Woltjer RL, Pan C, Montine KS, Zhang J. Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Discovery in Aging and Alzheimer's Disease.
269. Mamelak M. Alzheimer's disease, oxidative stress and gammahydroxybutyrate [Internet]. Vol. 28, *Neurobiology of Aging*. 2007 [cited 2020 Jun 15]. p. 1340–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019745800600220X>
270. Wang Y, Wang H, Wang Y, Hong X, Li S. Quantitative proteomics reveals the mechanism of oxygen treatment on lenses of Alzheimer's disease model mice. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2016 Aug 23 [cited 2020 Jun 15];54(1):275–86. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-160263>
271. Lee TR, Lee HY, Huang SH, Chan HT, Lyu PC, Chan HL. Comparative proteomics analysis of normal and memory-deficient drosophila melanogaster heads. *Zool Stud* [Internet]. 2013 [cited 2020 Jun 15];52(1):10. Available from: <http://zoologicalstudies.springeropen.com/articles/10.1186/1810-522X-52-10>
272. Butterworth RF, Besnard AM. Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* [Internet]. 1990 Dec [cited 2020 Jun 15];5(4):179–84. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00997071>
273. Burbaeva GS, Boksha IS, Tereshkina EB, Savushkina OK, Starodubtseva LI, Turishcheva MS. Glutamate metabolizing enzymes in prefrontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurochem Res* [Internet]. 2005 Nov [cited 2020 Jun 15];30(11):1443–51. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-005-8654-x>
274. Bao X, Pal R, Hascup KN, Wang Y, Wang WT, Xu W, et al. Transgenic expression of Glud1 (glutamate dehydrogenase 1) in neurons: In vivo model of enhanced glutamate release, altered synaptic plasticity, and selective neuronal vulnerability. *J Neurosci*. 2009 Nov 4;29(44):13929–44.
275. Francis Y, Fa M, Ashraf H, ... HZ-J of, 2009 undefined. Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *content.iospress.com* [Internet]. [cited 2020 Jun 15]; Available from: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad01134>
276. Lithner C, Lacor P, Zhao W, ... TM-N of, 2013 undefined. Disruption of neocortical histone H3 homeostasis by soluble A β : Implications for Alzheimer's disease. *Elsevier* [Internet]. [cited

- 2020 Jun 15]; Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458012006616>
277. Landgrave-Gómez J, Mercado-Gómez O, Guevara-Guzmán R. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*. 2015 Feb 27;9(FEB):58.
278. Zovkic IB, Paulukaitis BS, Day JJ, Etikala DM, Sweatt JD. Histone H2A.Z subunit exchange controls consolidation of recent and remote memory. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):582–6.
279. Aberrant histone turnover in Alzheimer’s disease | The FASEB Journal [Internet]. [cited 2020 Jun 15]. Available from:
https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.31.1_supplement.659.10
280. Calatuzzolo C, Gelati M, Ciusani E, Sciacca FL, Pollo B, Cajola L, et al. Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 AND GST- π in human glioma. *J Neurooncol*. 2005 Sep;74(2):113–21.
281. Müller T. ABCB1: is there a role in the drug treatment of Parkinson’s disease? Vol. 14, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 127–9.
282. Jia Y, Wang N, Zhang Y, Xue D, Lou H, Liu X. Alteration in the function and expression of SLC and ABC transporters in the neurovascular unit in alzheimer’s disease and the clinical significance. Vol. 11, *Aging and Disease*. International Society on Aging and Disease; 2020. p. 390–404.
283. Pereira CD, Martins F, Wiltfang J, Da Cruz E Silva OAB, Rebelo S. ABC Transporters Are Key Players in Alzheimer’s Disease. Vol. 61, *Journal of Alzheimer’s Disease*. IOS Press; 2017. p. 463–85.
284. Shubbar MH, Penny JI. Therapeutic drugs modulate ATP-Binding cassette transporter-mediated transport of amyloid beta(1–42) in brain microvascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2020 May 5;874:173009.

9. EKLER

EK 1 ETİK KURUL ONAYI



SAYI: HDK-2016/13
KONU: ACU-HADYEK 2016/13 sayılı başvurunuz

25.04.2016

Sn. Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal

ACU-HADYEK 2016/13 sayılı “**Nörodejeneratif Beyin Dokusundaki Protein Değişikliklerin MALDI-MS Görüntüleme Tekniği ile Belirlenmesi**” isimli projeniz Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun **11.04.2016** tarihli **22.** toplantısında incelenmiş ve etik olarak uygun bulunmuştur.

ACU-HADYEK 2016/13 sayılı karar ektedir.


Prof. Dr. Güldal SÜYEN

Acıbadem Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı



**ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR FORMU**

BAŞVURU TARİHİ: 31.03.2016	KARAR TARİHİ: 11.04.2016																																								
BAŞVURU SAYISI: 2016/13	KARAR SAYISI: 2016/13																																								
<p>Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal'ın yürütücüsü olduğu "Nörodejeneratif Beyin Dokusundaki Protein Değişikliklerin MALDI-MS Görüntüleme Tekniği ile Belirlenmesi" isimli proje başvurusu Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun "11.04.2016" tarih ve "22" sayılı toplantısında görüşülmüş ve etik açıdan</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Uygun <input type="checkbox"/> Düzeltilmesi Gerekir <input type="checkbox"/> Koşullu Olarak Uygun <input type="checkbox"/> Uygun Değil</p> <p>olarak değerlendirilmiştir.</p>																																									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><thead><tr><th style="width: 40%;">Kurul Üyesi</th><th style="width: 15%;">İmza</th><th style="width: 20%;">Karara Katılıyorum</th><th style="width: 25%;">Karara Katılmıyorum</th></tr></thead><tbody><tr><td>Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan)</td><td></td><td style="text-align: center;">(X)</td><td style="text-align: center;">()</td></tr><tr><td>Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan Vekili)</td><td></td><td style="text-align: center;">()</td><td style="text-align: center;">()</td></tr><tr><td>Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus</td><td></td><td style="text-align: center;">(X)</td><td style="text-align: center;">()</td></tr><tr><td>Prof. Dr. Alp Bayramoğlu</td><td></td><td style="text-align: center;">()</td><td style="text-align: center;">()</td></tr><tr><td>Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman</td><td></td><td style="text-align: center;">(X)</td><td style="text-align: center;">()</td></tr><tr><td>Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz Arslan</td><td></td><td style="text-align: center;">(X)</td><td style="text-align: center;">()</td></tr><tr><td>Yrd. Doç. Dr. Figen Demir</td><td></td><td style="text-align: center;">(X)</td><td style="text-align: center;">()</td></tr><tr><td>Sabiha Turgut Genç</td><td></td><td style="text-align: center;">()</td><td style="text-align: center;">()</td></tr><tr><td>Vet. Hek. Samed Özer (Sekreter)</td><td></td><td style="text-align: center;">(X)</td><td style="text-align: center;">()</td></tr></tbody></table>		Kurul Üyesi	İmza	Karara Katılıyorum	Karara Katılmıyorum	Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan)		(X)	()	Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan Vekili)		()	()	Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus		(X)	()	Prof. Dr. Alp Bayramoğlu		()	()	Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman		(X)	()	Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz Arslan		(X)	()	Yrd. Doç. Dr. Figen Demir		(X)	()	Sabiha Turgut Genç		()	()	Vet. Hek. Samed Özer (Sekreter)		(X)	()
Kurul Üyesi	İmza	Karara Katılıyorum	Karara Katılmıyorum																																						
Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan)		(X)	()																																						
Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan Vekili)		()	()																																						
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus		(X)	()																																						
Prof. Dr. Alp Bayramoğlu		()	()																																						
Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman		(X)	()																																						
Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz Arslan		(X)	()																																						
Yrd. Doç. Dr. Figen Demir		(X)	()																																						
Sabiha Turgut Genç		()	()																																						
Vet. Hek. Samed Özer (Sekreter)		(X)	()																																						

EK 2 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esra	Soyadı	Ayan
Doğum Yeri	Karaman	Doğum Tarihi	15/09/1991
Uyruğu	T.C.	Telefon	05445615256
E-mail	esrayan91@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	2020
Lisans	Selçuk Üniversitesi	2014
Lise	Zeki Özdemir Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Bursiyer	Acıbadem Üniversitesi	- 2018-2019
2.	Bursiyer	Gebze Teknik Üniversitesi	- 2017-2018
3.	Bursiyer	Selçuk İL-TEK	- 2014-2016

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Zayıf	İyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu □									
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE	DİĞER YÖKDİL
									76

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı (ALES)	72,77750	73,40379	67,66297
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Python Programlama Dili	Orta
Unipept	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin



