



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALZHEİMER HASTALIĞI'NDA PERİFERAL MİTOKONDRIYAL DİSFONKSİYON

SEBİLE KOCA
DOKTORA TEZİ

BIYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Dr. Betül Şahin

İSTANBUL-2025



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER HASTALIĞI'NDA PERİFERAL MİTOKONDRIYAL
DİSFONKSİYON**

SEBİLE KOCA
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Dr. Betül Şahin

İSTANBUL-2025

Ana Bilim Dalı: Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Program: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Doktora Programı

Tez Başlığı: Alzheimer Hastalığı'nda Periferik Mitokondriyal Disfonksiyon

Öğrencinin Adı-Soyadı: Sebile Koca

Savunma Sınavı Tarihi: 17/06/2025

Bu belge ile doktora tezinin incelendiğini ve ilgili mevzuatlara uygun olarak belirlenen gereksinimleri karşıladığını onaylarım. Tez, aşağıda imzaları bulunan nihai sınav komitesi önünde sunulmuştur.

Üye
(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar
Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya

İmza

Üye

Prof. Dr. Mustafa Serteser
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar
Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya

İmza

Üye

Prof. Dr. Fehime Benli Aksungar
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar
Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya

İmza

Üye

Prof. Dr. Murat Kasap
Kocaeli Üniversitesi,
Tıbbi Biyoloji

İmza

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Çimen
Gebze Teknik Üniversitesi,
Biyoteknoloji Enstitüsü

İmza

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 olmadığı beyan ederim.

17.06.2025

Sebile Koca

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hayata geçmesine vesile olan tez danışmanım Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal’a ve doktora eğitimimde emeği geçen Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nın tüm öğretim üyelerine,

Maddi manevi destekleri ile her zaman yanımda olan ekip arkadaşlarım Dr. İrem Kırış, Dr. Merve Karayel Başar, Dr. İrep Uras ve Dr. Betül Şahin’e,

Eğitim hayatım boyunca beni desteklemek için her zaman ellerinden gelenin en iyisini yapan ve her koşulda arkamda olan başta sevgili babam Ertuğrul Arabacı, sevgili annem Cemile Arabacı ve kardeşlerime,

Eğitim hayatımı annem ve babam kadar destekleyen, kızım “araştırma doktoru” olacak diye gözlerinin içi gülerek her zaman benimle gurur duyan rahmetli dedem Mehmet Arabacı’ya

Doktora eğitimim boyunca beni her koşulda maddi manevi destekleyip motive eden, çalışmalarımı tamamlayabilmem için gece gündüz yaptığı fedakarlıklarla hem bana hem kızımıza büyük emekler veren, mükemmel bir yol arkadaşı olan canım eşim Behram Koca’ya ve bir yıldır minicik haliyle bana kocaman bir güç verip içimi ısıtan canım kızım Beren’e,

BİDEB 2211-A Genel Yurt içi Doktora Burs Programı kapsamında çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından desteklenen 216S605 numaralı “Alzheimer Hastalığı’nda Periferik Mitokondriyal Disfonksiyon” başlıklı TÜBİTAK 2515 COST projesi ve kapsamında yapılmıştır. TÜBİTAK’a proje desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Alzheimer Hastalığı	6
2.1.1 Tarihçe ve epidemiyoloji.....	6
2.1.2 Tanı kriterleri	6
2.1.3 Alzheimer hastalığı evreleri.....	7
2.1.4 Türleri.....	8
2.1.5 Hipotezler	8
2.1.5.1 Amiloid hipotezi.....	8
2.1.5.2 Tau hipotezi.....	9
2.1.5.3 Kalsiyum hipotezi	10
2.1.5.4 Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres	11
2.1.5.5 İnflamasyonun AH patogeneziindeki rolü.....	13
2.1.5.5.1 Nöroinflamasyon.....	13
2.1.5.5.2 Periferik ve merkezi inflamasyonun etkileşimi.....	13
2.1.6 Tedavi	15
2.2 Periferik Kan ve Bileşenleri.....	17
2.2.1 Plazma ve sitokin seviyeleri	18
2.2.2 T lenfositleri	19
2.2.3 B lenfositleri	20
2.2.4 Monositler	20
2.2.5 Nötrofiller	21
2.3 AH ve Proteomik Çalışmalar.....	22
2.3.1 Kütle spektrometresi (MS)	22
2.3.1.1 LC-MS/MS	23
2.4 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ve Akış Sitometrisi.....	23

3 GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1 Gereçler	25
3.2 Yöntem	27
3.2.1 Örneklerin toplanması	27
3.2.2 Periferik Kandan mononükleer hücre izalasyonu ve plazma izalasyonu	28
3.2.2.1 FACS analizi	29
3.2.2.1.1 FACS analizi örnek hazırlığı	29
3.2.2.1.2 FACS analizi ve örneklerin saklanması.....	30
3.2.2.2 Sitokin tarama testi	33
3.2.2.2.1 Sitokin tarama testi örnek hazırlığı	34
3.2.2.2.2 Sitokin tarama testi analizi	36
3.2.2.3 LC-MS/MS analizi	36
3.2.2.3.1 FASP protolü ile triptik peptitlerin hazırlanması.....	36
3.2.2.3.2 LC-MS/MS analizi	37
3.2.2.3.3 Biyoinformatik analizler	38
3.2.2.4 Akış sitometrisi analizleri	39
3.2.2.4.1 Reaktif oksijen türleri (ROS) taraması	39
3.2.2.4.2 Mitokondriyal depolarizasyon testi	40
3.2.2.4.3 İstatistiksel analizler	40
4 BULGULAR	42
4.1 Periferik Kandan Mononükleer Hücre Ayrımı	42
4.2 FACS Analizi	43
4.2.1 AH grubu FACS analizi sonuçları	43
4.2.2 Kontrol grubu FACS analizi sonuçları.....	44
4.3 Dört Periferik Hücre Alt Grubunda Protein Ekspresyon Farklılıklarının LC-MS/MS Analizi ile Tespiti	46
4.4 Biyoinformatik Analizler	46
4.4.1 CD4+ T hücreleri	47
4.4.2 CD8+ T hücreleri.....	53
4.4.3 CD4+ ve CD8+ ortak proteinleri.....	59
4.5 Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Analizi Sonuçları	62
4.6 Mitokondriyal Depolarizasyon Testi Sonuçları	63
4.7 Sitokin Tarama Testi Sonuçları	69
5 TARTIŞMA.....	73
5.1 CD4+ T Hücreleri	75
5.2 CD8+ T Hücreleri	78
5.3 Plazma Sitokin Testi.....	81
6 SONUÇ	85
7 KAYNAKLAR.....	87

8 EKLER.....	100
EK 1.....	100
Etik Kurul İzni.....	100
EK 2.....	101
CD4+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin PPI analizi.	101
EK 3.....	102
CD8+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin PPI analizi.	102
EK 4.....	103
CD4+ T hücrelerinde AH ve kontrol grupları karşılaştırmasında LC-MS/MS analizi ile anlamlı ekspresyon farklılıkları tespit edilen protein listeleri.....	103
EK 5.....	116
CD8+ T hücrelerinde AH ve kontrol grupları karşılaştırmasında LC-MS/MS analizi ile anlamlı ekspresyon farklılıkları tespit edilen protein listeleri.....	116
9 ÖZGEÇMİŞ	120

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

Aβ	Amiloid Beta
AH	Alzheimer Hastalığı
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
APP	Amiloid Öncül Proteini
BOS	Beyin Omirilik Sıvısı
DO	Değişim Oranı
FA	Formik Asit
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FASP	Filter Aided Sample Preparation
FDR	False Discovery Rate/Yanlış Keşif Oranı
Glu-Fib	Glu-1-fibrinopeptit B
HD	Huntington Hastalığı
KEGG	Kyoto Genler ve Genler Ansiklopedisi
KBB	Kan Beyin Bariyeri
LeuEnk	Leucine Enkephalin
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
MCI	Hafif Bilişsel Bozukluk
MS	Kütle Spektrometresi
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NFY	Nörofibriler Yumak
ÖPS	Özgül Peptit Sayısı
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCA	Principle Component Analysis
PD	Parkinson Hastalığı
PPI	Protein-Protein Etkileşimi
PrD	Prion Hastalığı
PSEN1	Presenilin-1
PSEN2	Presenilin-2
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
UPX	Universal Protein Extraction Kit

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Mitokondriyal disfonksiyon ve AH (33).....	12
Şekil 2. T hücreleri ile mikrogliya arasındaki nöroinflamasyon döngüsü (7).....	14
Şekil 3. AH patogenezinde immün faktörlerin düzensizliği (7).....	15
Şekil 4. Periferik kan ve bileşenleri (84).....	17
Şekil 5. Tez akış planı	27
Şekil 6. SepMate ile periferik kan monnonükleer hücre izolasyonu.....	29
Şekil 7. Tam kanın ölü hücrelerden eliminasyonu	31
Şekil 8. CD3 ve CD14 işaretlemesi ile monosit ve lenfosit ayrımı.....	31
Şekil 9. CD3 kapısı altında CD4 ve CD8 hücreleri ayrımı	32
Şekil 10. CD19 işaretlemesi ile B lenfosit ayrımı	32
Şekil 11. Sitokin tarama testi çalışma mekanizması.....	34
Şekil 12. Standart sitokin hazırlığı	35
Şekil 13. CD4+ T hücrelerinin PCA ve volkan grafiği analizi.....	47
Şekil 14. CD4+ T hücrelerinde anlamlı değişiklik gösteren proteinlerin zenginleştiği yolaklar.	49
Şekil 15. CD4+ T hücrelerinde hub protein analizi.....	51
Şekil 16. CD8+ T hücrelerinin PCA ve volkan grafiği analizi.....	54
Şekil 17. CD8+ T hücrelerinde anlamlı değişiklik gösteren proteinlerin zenginleştiği yolaklar.	56
Şekil 18. CD8+ T hücrelerinde hub protein analizi.....	58
Şekil 19. Mitokondriyal ROS seviyelerinin hücre alt grupları arasında ve her bir hücre grubu içinde karşılaştırılması.....	63
Şekil 20. Mitokondriyal membran potansiyelinin hücre alt grupları arasında ve her bir hücre grubu içinde karşılaştırılması.	65
Şekil 21. Hücre alt gruplarında valinomisin yanıtı.....	67

Şekil 22. Hücre alt gruplarında JC-1 ve valinomisin sonuçları.....	68
Şekil 23. Anlamli değişiklik gösteren sitokinler.	70
Şekil 24. Anlamli farklılık gösteren altı sitokin protein protein etkileşim görüntüsü... ..	71
Şekil 25. AH plazmalarında anlamli düzeyde değişim gösteren altı sitokin zengileştęiğ i yolakların baloncuk grafiğ i ile gösterimi.	72
Şekil 26. CD4+ T hücrelerinde anlamli değişim gösteren proteinlerin PPI analizi. (379 nodes, 4203 edges)	101
Şekil 27. CD8+ T hücrelerinde anlamli değişim gösteren proteinlerin PPI analizi. (119 nodes, 488 edges)	102



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihaz, alet ve laboratuvar malzemelerinin listesi	25
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi.....	26
Tablo 3. AH ve kontrol örneklerinin demografik ve klinik özellikleri	28
Tablo 4. Hücre ayrımı için kullanılan antikor ve antijenler	30
Tablo 5. Sitokin tarama testi ile analizi yapılan sitokinler	33
Tablo 6. Sitokin analizinde kullanılan AH ve kontrol örneklerinin demografik ve klinik özellikleri	33
Tablo 7. AH örnekleri ile ayrılan PBMC sayıları.....	42
Tablo 8. Kontrol örnekleri ile ayrılan PBMC sayıları.....	43
Tablo 9. AH PBMC örneklerinden FACS sonrası elde edilen hücre sayıları.	44
Tablo 10. Kontrol PBMC örneklerinden FACS sonrası elde edilen hücre sayıları....	45
Tablo 11. LC-MS/MS analizi ile 4 hücre alt grubunda tanımlanan protein sayıları. 46	
Tablo 12. CD4+ hub protein listesi.	52
Tablo 13. CD8+ hub protein listesi.	59
Tablo 14. CD4+ ve CD8+ grubunda tanımlanan ortak protein listesi.....	60
Tablo 15. CD4+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi.	103
Tablo 16. CD8+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi	116

ÖZET

Alzheimer Hastalığı'nda Periferik Mitokondriyal Disfonksiyon

Alzheimer Hastalığı (AH), nöronal hasar, demans ve bilişsel gerileme ile seyredip ölüme götüren ve yaşla birlikte en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. AH, beyinde amiloid- β (A β) ve hiperfosforile tau birikimi ile karakterize edilir. Mevcut tedaviler yalnızca semptomatik iyileşme sağlayıp, nöropatolojik durumu değiştirmede eksik kalmaktadır. Bunun temel nedeni AH mekanizmasının tam olarak anlaşılamamış olmasıdır. Son çalışmalar, AH patogenezinde periferik bağışıklık sistemi düzensizliği ve mitokondriyal disfonksiyonun önemini vurgulamaktadır. Bu çalışmanın amacı, proteom profili ve mitokondriyal değişiklikler temelinde periferik bağışıklık hücresi alt gruplarının AH'ye özgü etkilerini araştırmak ve plazmadaki inflamatuvar yanıt sitokin taraması ile değerlendirmektir. Bu doğrultuda, AH ve yaş uyumlu sağlıklı kontrol gruplarından alınan periferik kan örneklerinden FACS yöntemiyle CD4+ ve CD8+ T hücreleri, CD14+ monositler ve CD19+ B hücreleri izole edilmiş; ayrıca plazmaları da ayrıştırılmıştır. LC-MS/MS analizi sonucunda, CD4+ T hücrelerinde 387, CD8+ T hücrelerinde ise 121 proteinin ekspresyonu anlamlı değişim göstermiştir. Yapılan biyoinformatik analizler, CD4+ T hücrelerinde değişen proteinlerin RNA bağlanması ve nörodejeneratif süreçlerle; CD8+ T hücrelerinde değişen proteinlerin ise glikoliz metabolizması ve protein katlanmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. JC-1 ve MitoSOX Red boyamaları da T hücreleri arasında farklı mitokondriyal değişimleri desteklemiştir. Ayrıca, plazma örneklerinde 20 sitokin/kemokin düzeyi incelenmiş ve MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, MMP-9, RANTES ve VEGF düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur. Bu bulgular, AH patolojisinde periferik T hücrelerinin kendilerine özgü proteomik ve mitokondriyal özelliklere sahip olduğunu ortaya koyarken, plazmadaki inflamatuvar yanıtın da azaldığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer hastalığı, CD4+ ve CD8+ T hücreleri, LC-MS/MS, Mitokondriyal disfonksiyon, Sitokin

ABSTRACT

Peripheral Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease

Alzheimer's Disease (AD) is the most common age-related neurodegenerative disease that progresses with neuronal damage, dementia and cognitive decline leading to death. AD is characterized by the accumulation of amyloid- β and hyperphosphorylated tau in the brain. However, current treatments only provide symptomatic improvement and fail to change the neuropathology. The main reason for this is that the mechanism of AD is not fully understood. Recent studies emphasize the importance of peripheral immune dysregulation and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of AD. The aim of this study is to investigate the AD-specific effects of peripheral immune cell subtypes based on their proteomic profiles and mitochondrial alterations and to evaluate the inflammatory response in plasma by cytokine screening. In this context, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, CD14⁺ monocytes and CD19⁺ B cells were isolated from peripheral blood samples obtained from AD and age-matched healthy control groups by FACS method and plasma was also separated. LC-MS/MS-based proteomic analysis revealed significant differential expression of 387 proteins in CD4⁺ T cells and 121 proteins in CD8⁺ T cells. Bioinformatics analyses indicated that the altered proteins in CD4⁺ T cells were primarily involved in RNA binding and neurodegenerative processes, whereas those in CD8⁺ T cells were associated with glycolytic metabolism and protein folding. Furthermore, mitochondrial assays JC-1 and MitoSOX Red, supported the idea of differential mitochondrial activity of different T cells. In addition, plasma cytokine profiling revealed a significant reduction in the levels of MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MMP-9, RANTES, and VEGF. These findings suggest that peripheral T cells have different proteomic and mitochondrial properties in the pathology of AD and that the inflammatory response in plasma is also reduced.

Keywords: Alzheimer's disease, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, LC-MS/MS, Mitochondrial dysfunction, Cytokines

1 GİRİŞ VE AMAÇ

AH demansın en yaygın formudur ve ilerleyen bilişsel gerileme ile karakterizedir (1). AH üzerine yoğun araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, hastalığın patolojik mekanizmaları hâlâ tam olarak anlaşılamamıştır. AH, nöropatolojik olarak yanlış katlanmış ve agregat hâle gelmiş A β peptidlerinin ve fosforile tau proteinlerinin birikimi ile tanımlanır (2). AH bir beyin hastalığıdır; ancak kan ve kök hücre nakli yoluyla bulaşabildiği gösterilmiştir (3,4). Ayrıca, sağlıklı kan transfüzyonunun patolojik AH belirtiçlerini azalttığı da bildirilmiştir (5,6). Bu nedenle, AH'nin mekanizmasını ve patogenezi anlamak için, beyinle birlikte periferik sistemler de araştırılmalıdır.

Son çalışmalar AH patogenezi periferik bağışıklık sisteminin önemini vurgulamaktadır (7–11). Merkezi bağışıklık ve periferik bağışıklık sistemlerinin birbirleri arasındaki etkileşimler ile KBB'nin bütünlüğünün bozulması ve periferik bağışıklık hücrelerinin MSS'ye sızarak nöroinflamasyonu ve bilişsel gerilemeyi hızlandırması AH patogenezi çok önemli bir faktördür (7,8).

Proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler nöroinflamasyonda önemli rol oynarlar ve astrositler, T lenfositleri ile mikroglialar tarafından üretilirler (12). AH'de rol oynayan birçok pro- ve anti-inflamatuvar sitokin tanımlanmış; anti-inflamatuvar sitokinler, proinflamatuvarların neden olduğu nöronal hasarı önlemeye çalışır. Çalışmalar, AH ve hafif bilişsel bozukluk (MCI) bulunan hastalarda sitokin seviyelerinin değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur (13,14). Periferik inflamasyonun demans riskini artırdığı ve klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce gelişebileceği düşünülmektedir (15). Kemokinler, inflamasyon bölgesine bağışıklık hücrelerinin göçünü düzenleyen moleküller olup, periferik ve MSS arasında bağışıklık iletişimini sağlar (16–18). AH'li hastaların plazmasında, BOS'ta ve beyin dokusunda kemokinlerinin ve reseptörlerinin seviyeleri değişmektedir (17) Kemokinler, periferik monositlerin beyne göçünü ve glial hücre aktivasyonunu tetikleyerek ve KBB'nin geçirgenliğini etkileyerek nöroinflamasyona katkıda bulunurlar (17,19,20).

Son bulgular, bağışıklık sistemi düzensizliğinin ve mitokondriyal disfonksiyonun önemini vurgulamaktadır (21–24). Periferik bağışıklık sistemi, hastalığın ilerleyişini farklı mekanizmalarla etkileyen çeşitli bağışıklık hücre tipleriyle karmaşık ve dinamik bir rol üstlenmektedir (21,25). AH'de periferik bağışıklık hücrelerindeki değişikliklerin kapsamlı biçimde anlaşılabilmesi için hücreye özgü çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (26). Proteomik yaklaşımlar, hastalığa özgü moleküler işaretlerin belirlenmesinde etkili bir yöntem olsa da, çoğu çalışmada plazma, serum, BOS ya da PBMC'ler kullanılmış; farklı periferik bağışıklık hücrelerinde hücreye özgü proteomik değişiklikleri araştıran sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır (27–30).

Mitokondriyal disfonksiyon, AH'nin ilerlemesiyle yakından ilişkilidir (23). Dağılım, hareketlilik, oksidatif stres, enzim bozuklukları, metabolik bozukluklar ve azalmış biyogenez gibi yapısal ve fonksiyonel mitokondriyal değişiklikler, bu bozukluğun AH'deki kritik rolünü daha da desteklemektedir (31). Ayrıca, son çalışmalar periferik mitokondriyal disfonksiyonun AH'deki rolünü de ortaya koymaktadır (32,33). 2020 yılında yapılan bir çalışmada, AH korteksi, BOS ve serumda birçok mitokondriyal proteinde değişiklikler tespit edilmiştir (27). CD4+ ve CD19+ lenfositleriyle yapılan bir çalışmada, erken evre AH grubunda mitokondriyal DNA'nın azaldığı bulunmuştur (34). Başka bir çalışmada ise yaşlı bireylerde CD4+ T hücrelerinde otofajinin bozulduğu, bunun da işlevsiz mitokondri birikimine ve bağışıklık sisteminin zayıflamasına yol açabileceği belirtilmiştir (35). Parkinson hastalarından elde edilen PBMC'ler üzerinde yapılan bir çalışmada ise, monositlerde artmış mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres seviyesi bulunmuştur ve diğer nörodejeneratif hasta gruplarında yapılacak araştırmaların PBMC patolojisinin tanımlanmasına katkı sağlayacağı da belirtilmiştir (36).

Bu çalışmanın amacı, proteom profili ve mitokondriyal değişikliklere odaklanarak periferik bağışıklık hücresi alt gruplarının AH mekanizması üzerindeki spesifik etkilerini detaylı bir şekilde incelemektir. LC-MS/MS kullanılarak, AH ve yaş uyumlu kontrol gruplarından alınan periferik kandan FACS analizi ile izole edilen CD4+ ve CD8+ T hücreleri, CD14+ monositler ve CD19+ B hücrelerinde protein ekspresyon değişiklikleri incelendi ve biyoinformatik analizler gerçekleştirildi. Proteomik deneyler dışında dört hücre alt grubunda mitokondriyal zar potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) ve

oksidatif stres seviyeleri akış sitometrisi ile ölçüldü. Ayrıca, inflamatuvar yanıtı daha ayrıntılı ele almak için plazmada genel sitokin taraması yapılmıştır.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı

AH, demans vakalarının %60-80'ini oluşturmaktadır (37). Erken klinik belirtileri arasında ilgisizlik ve ruh hali değişiklikleri yer alırken, hastalık ilerledikçe iletişim kurma, mekânsal yönelim, hafıza, konuşma yetisi ve motor becerilerde bozulmalara yol açan nörodejeneratif bir hastalık haline gelir (38).

2.1.1 Tarihçe ve epidemiyoloji

AH keşfinden çok daha önce Latince kökenli bir kelime olan ve “zihinsel yetilerin eksikliği” anlamı taşıyan *demens*, hastaların psikolojik ve sosyal yönlerini etkileyen bütün bilişsel bozukluklar için kullanılan yaygın bir terimdir (39,40). Dr. Alois Alzheimer 1901 yılında başladığı çalışması ile 51 yaşında kötüleşen hafıza kaybı, davranışsal bozukluklar ve oryantasyon sorunları gösteren Auguste Deter adlı hastayı 5 yıl boyunca takip etmiştir. Hastanın hayatını kaybetmesinin ardından yapılan otopside Dr. Alois Alzheimer beyinde küçülmenin yanı sıra bugün Aβ plakları ve nörofibriler yumaklar (NFY) olarak bilinen anormal yapıları gözlemlenmiştir. Bu bulgular hastalığın nöropatolojik temeli olarak kabul edilmiş ve 1910 yılında psikiyatrist Emil Kraepelin tarafından AH ismiyle literatüre geçmiştir (39,40).

Daha önce de belirtildiği gibi AH demans vakalarının yaklaşık %60-80'ini oluşturmaktadır ve araştırmalar hastalığın prevelansında önemli bir artış öngörmekte ve 2050 yılına kadar 139 milyon bireyin hastalıktan etkileneceği ve bunların üçte ikisinden fazlasının kadın olacağını tahmin etmektedir (41). Bu durum bireysel etkinin yanında toplumsal düzeyde ekonomik ve sosyal yükü de artırmaktadır.

2.1.2 Tanı kriterleri

AH'nin ilk tanı kriterleri 1984 yılında NINCDS-ADRDA (*The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke ve Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) tarafından oluşturulan komite tarafından üç farklı

kategoride tanımlanmıştır. Tüm kategorilerde, belirtiler 40-90 yaş aralığında başlayabilir. Olası AH tanısı hafıza kaybı, günlük yaşamda bozulmalar ve dil, motor becer kayıpları ile ve nöropsikolojik testlerle doğrulanır. Mümkün AH tanısı ise, demansa eşlik eden sistemik veya beyinle ilişkili bir hastalık olsa da, bu durumun demansın temel nedeni olmadığı durumlarda konulur. Kesin AH tanısı ise olası bulgulara ek olarak biyopsi veya otopsi ile doğrulanan histopatolojik kanıtlar ile belirlenir (42).

2011 yılında *The National Institute on Aging-Alzheimer's Association*, AH'nin daha erken ve hassas bir şekilde teşhis edilmesini amaçlayarak 1984 kriterlerini güncellemiştir. Yeni kriterler hastalığın üç aşamada ilerlediğini kabul etmektedir. Ancak yeni kriterler sadece hafıza kaybı değil, kelime bulma, dil ve muhakeme gibi diğer bilişsel alanlardaki bozulmaları da tanı sürecine dahil eder. Ayrıca biyobelirteçlerin de kullanılması önerilmiştir (43).

2.1.3 Alzheimer hastalığı evreleri

AH klinik evreleri 4 kategoride sınıflandırılmaktadır (44).

1. Klinik öncesi dönem (*pre-clinical/pre-symptomatic*): Yıllarca sürebilen bir dönemdir. Bu evrede henüz günlük yaşamı etkileyecek işlevsel bir bozulma görülmez; hastalık sessiz bir şekilde ilerler. Korteks ve hipokampusta erken patolojik değişiklikler başlasa da, klinik belirti ya da semptomlar henüz ortaya çıkmamıştır. Hafif düzeyde unutkanlık gözlenebilir.
2. Hafif/erken dönem (*mild or early*): İlk semptomların görülmeye başladığı dönemdir. Kişinin dikkatini toplamada ve hafızasını kullanmada zorlanması, zaman ve mekân algısında karışıklık yaşaması, ruh halinde dalgalanmalar ve depresyon gelişimi bu evrede tipiktir. Günlük yaşam aktivitelerinde zorluklar da ortaya çıkabilir.
3. Orta dönem (*moderate*): Hastalığın serebral kortekse yayılmasıyla karakterizedir. Bu dönemde unutkanlık derinleşir; hasta yakınlarını tanımakta

güçlük çekebilir. Dil becerilerinde (okuma, yazma, konuşma) belirgin bozulmalar görülür ve dürtü kontrolü azalabilir.

4. Şiddetli dönem (*severe or late*): Hastalığın tüm kortikal alanlara yayılmasıyla tanımlanır. Bu aşamada nöritik plaklar ve NFY'ler yoğun şekilde birikir. Bilişsel ve işlevsel bozulma ileri düzeye ulaşır; hasta artık yakınlarını tanıyamaz hale gelir, yatalak olabilir, yutma ve idrar kontrolünde zorluklar yaşar. Bu komplikasyonlar genellikle ölümle sonuçlanır.

2.1.4 Türleri

AH sporadik ve ailesel olmak üzere iki ana tipe ayrılır. Vakaların büyük çoğunluğu geç başlangıçlı sporadik formdur. Daha nadir olan ailesel formu 65 yaş öncesinde görülür ve amiloid prekürsör protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) genlerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Sporadik AH formu ise birçok genetik ve çevresel faktörün rol oynadığı çok etkenli bir hastalıktır (45).

2.1.5 Hipotezler

Karmaşık ve çok faktörlü bir hastalık olan AH patogenezinin potansiyel nedenleri ve mekanizmasıyla ilgili çeşitli hipotezler öne sürülmektedir (44).

2.1.5.1 Amiloid hipotezi

Uzun yıllardır MSS'de β -tabakalı protein birikimi ile demans arasında güçlü bir ilişki olduğu bilinmekte ve bu durum "amiloid hipotezi" kavramının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Ancak amiloid plaklarının (AP) yaşlanmayla birlikte sağlıklı beyinlerde de tespit edilmesi, AP birikiminin hastalığın nedeni mi sonucu mu sorusunu gündeme getirmiş ve alternatif hipotezler üretilmiştir. Yine de, kalıtsal AH için amiloid hipotezi, en çok kabul gören patolojik mekanizmadır (44).

Amiloid hipotezine göre; APP'den β - ve γ -sekrataz ile türetilen $A\beta$ 'nin yaş veya patolojik koşullar sebebiyle parçalanamaması sebebiyle $A\beta$ peptitleri ($A\beta_{40}$ ve $A\beta_{42}$) birikmektedir. $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ oranındaki artış, $A\beta$ fibril oluşumu ile nörotoksisite ve tau patolojisini tetikleyerek nöronal hücre ölümüne ve nörodejenerasyona neden olur (46).

APP, PSEN1 ve PSEN2 gibi genlerdeki mutasyonlar $A\beta$ metabolizmasını bozarak $A\beta$ birikimini hızlandırır (47). Hücre dışı amiloid plaklar, nöronlar üzerinde toksik etki göstererek hücresel işlevleri bozar, inflamasyonu tetikler ve beyinde mitokondriyal disfonksiyona yol açar (48). Ayrıca mitokondriyal bozuklukların, $A\beta$ birikiminden önce geldiği ve hastalığın başlangıcında tetikleyici bir rol alarak $A\beta$ plaklarının oluşumuna önemli ölçüde katkıda bulunduğu bildirilmektedir (49). Hem ROS üretimi hem de mitokondri ile endoplazmik retikulum (ER) arasındaki etkileşiminin bozulması, $A\beta$ birikimini artırırken; $A\beta$ da çift yönlü etkileşimle mitokondriyal zar bütünlüğünü bozarak ROS üretimini daha da artırır (49).

2.1.5.2 Tau hipotezi

Tau proteini sitoskeletal organizasyon ve nöronal polarite için önemli olan mikrotübül birleşmesinde ve stabilizasyonunda yer alan bir proteindir (50). Patolojik koşullar altında tau, hiperpolarizasyon ve kaspaz-3 tarafından parçalanma gibi post-translasyonel modifikasyonların bir sonucu olarak çözünmez filamentler halinde toplanır (50,51). Bu agregatlar, sinaptik disfonksiyon ve nörodejenerasyona mikrotübüllerin yapısal bütünlüğünü bozarak ve mitokondri taşınması gibi aksonal taşıma süreçlerini aksatarak sebep olur (49).

AH'nin preklinik evresinde, beyinde bazı bölgelerde glikoz hipometabolizmasıyla tau birikiminin artması sebebiyle, mitokondriyal disfonksiyon ile tau hiperfosforilasyonu güçlü bir biçimde ilişkilendirilmiştir (52,53). Mitokondriyal disfonksiyonun tau patolojisinden önce mi yoksa sonra mı ortaya çıktığı tartışılmakta olup, birçok çalışma bu disfonksiyonun AH patogenezinde erken ve tetikleyici bir durum olduğunu belirtilmektedir (23). Mitokondriyal disfonksiyonun sonucu olarak aşırı miktarda üretilen ROS, tau proteinini defosforile eden protein fosfotaz 2A (PP2A)'yı inhibe ederken, fosforile eden glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β)'yı aktive

ederek tau'nun hiperfosforilasyonuna ve AH'nin patolojik işareti olan NFY'lerin oluşumuna neden olur (23,54). Patolojik tau, mitokondri içindeki füzyon-fisyon dengesinin bozulmasına sebep olurken; A β peptitleri ile birlikte mitokondriyal taşınmayı da bozarak fonksiyonel bozuklukları arttırır ve apoptoz sürecini hızlandırır (53,55,56). Mitokondriyal disfonksiyon ve hiperfosforile tau arasındaki bu çift yönlü ilişkinin nörodejenerasyonu hızlandırarak AH'nin ilerlemesine yol açtığı vurgulanmaktadır (49).

2.1.5.3 Kalsiyum hipotezi

“Kalsiyum hipotezi”, hücre içi kalsiyum iyonu konsantrasyonundaki artışın, özellikle nörotoksik olan glutamat gibi nörotransmitter salımını düzensizleştirerek, AH gelişimine katkıda bulunduğunu öne sürmektedir (57). Bu hipotezin altında mitokondriler yer almaktadır. Mitokondriler hücre içi kalsiyum seviyelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (58). Bozulmuş mitokondriyal fonksiyonlar, kalsiyum kanallarındaki yetersizlik nedeniyle, hücre içinde kalsiyum birikimine neden olarak iyon homeostazını bozar (59). Kalsiyum birikimi, mitokondriyal apoptozu tetikleyerek AH beyinlerinde nöronal ölüme sebep olabilmektedir (59). Yaşlanmayla birlikte mitokondriler, kalsiyum homeostazını sağlama yetisini kaybeder; bu durumda serbest radikal üretimi artar ve mitokondriyal disfonksiyona sebep olur (49).

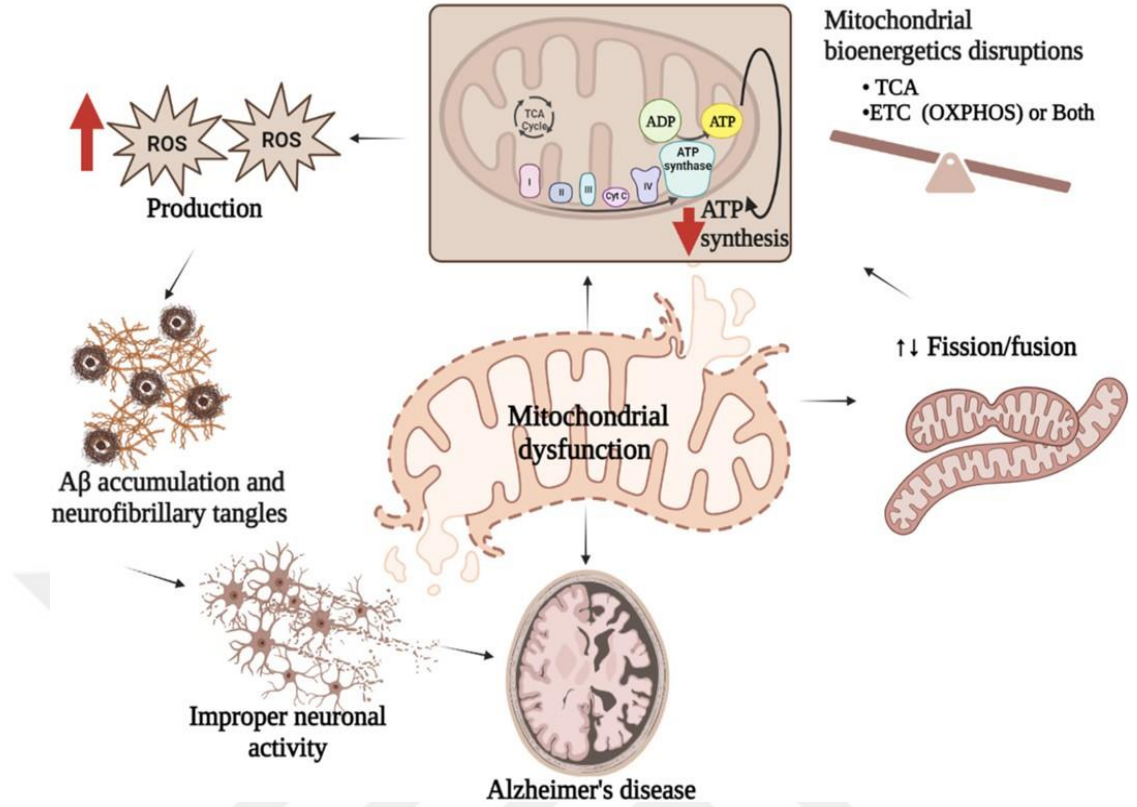
Yaşlı fareler ile genç fareler karşılaştırıldığında, sitozolik kalsiyum seviyelerinde belirgin bir artış ve mitokondrilerin kalsiyumu geri kazanma kapasitesinde azalma olduğu ortaya koyulmuştur (60). Hücre içi kalsiyum dengesini sağlayan sistemdeki bozulmalar ise, protein birikimlerinin anormal şekilde artmasıyla ilişkilendirilmekte ve bu durum mitokondri işlevleri için hayati önem taşımaktadır (61). Tüm bu bozukluklar bir araya geldiğinde, AH patolojisini daha da derinleştiren zararlı bir geri besleme döngüsü oluşmakta ve kalsiyum dengesizliğini hedefleyen tedavi yaklaşımları AH için umut vermektedir (62). Kalsiyum kanallarına ve mitokondriyal kalsiyum taşıyıcılarına yönelik geliştirilen ilaçlar, klinik öncesi çalışmalarda kalsiyum birikimini azaltmış AP ve NFY oluşumunu da hafifletmiştir (49).

2.1.5.4 Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres

Mitokondriyal bozukluklar Şekil 1’de özetlendiği gibi doğrudan veya dolaylı bir şekilde AH patogeneze katkıda bulunmaktadır (33). Bu bozukluklar; mitokondriyal biyoenerji kusuru, oksidatif stres, mtDNA hasarı, mitokondriyal dinamiklerde bozulma, membran geçirgenliğinin artması ve kalsiyum dengesizliği gibi farklı mekanizmaları içermektedir (63). AH beyin dokularında çeşitli mitokondriyal disfonksiyonların tespit edilmesi, bu sorunun hastalığın sebebi mi yoksa sonucu mu sorusunu tartışmaya açmıştır. A β ’nin mitokondrilere erişebildiği ve burada bazı proteinlerle etkileşerek mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açtığı gösterilmiş; bu A β ’nin kaynağının ise Golgi/ER gibi organellerde üretilen formlar ya da mitokondriyle ilişkili APP olabileceği öne sürülmüştür (64).

Mitokondriyal ROS, A β ve mitokondriyal disfonksiyon arasındaki kısır döngü AH’nin ilerlemesine neden olmaktadır (65). Daha önce kalsiyum hipotezi başlığı altında bahsedildiği gibi; mitokondriyal aksaklık kalsiyum seviyesini etkileyerek ve nörotransmitter düzenlenmesini bozarak nöronların düzgün çalışmasını da engellemektedir.

Oksidatif stres, ROS birikmesi sonucu hücre hasarına ve ölümüne yol açan bir süreçtir (66). Sistemik inflamatuvar yanıt ve oksidatif stres, AH biyobelirteçleri olarak tanımlanan iki etmendir (67). Oksidatif stres ve inflamasyon, beyin ve periferdeki mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkilendirilmekte ve bu da enerji metabolizmasının bozulmasına ve nöronal hasar ile nörolojik hastalıklara sebep olmaktadır (33). Mitokondriyal bozulmalar ile tetiklenen inflamasyon ve oksidatif stres süreçleri her ne kadar AH’ye özgü olmasa da AH’de A β birikimden önce gerçekleştiği ve hastalığın mekanizması ile büyük ölçüde örtüşüp ilerlemesinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (67). Ayrıca, A β ’nin mitokondriyal ROS üretimini ve buna bağlı inflamasyonu tetikleyebildiği ve bunun mitokondrinin yapı ve fonksiyonlarını bozarak nörodejenerasyonu hızlandığı, ve böylece AH gelişimini ilerlettiği gösterilmiştir (67).



Şekil 1. Mitokondriyal disfonksiyon ve AH (33).

Mitokondriyal disfonksiyon ve AH ilişkisinde mitokondriyal biyoenerji kusuru, ROS birikimi ve oksidatif stres, mitokondriyal dinamiklerin bozulması ile A β ve NFY oluşumu nöronal aktivitenin bozulmasına ve sonunda AH'ye neden olur.

Araştırmalar, AH'nin gelişimi ve ilerlemesinde mitokondriyal disfonksiyonun beyin ile kısıtlı olmadığını ve periferik mitokondriyal disfonksiyonun da rol oynadığını vurgulamaktadır (33,49,68). AH hastalarından alınan lenfositlerde; mitokondriyal zar potansiyelinde azalma ve solunum zincirinin çeşitli inhibitörlerine karşı artmış hassasiyet gibi mitokondriyal kusurların, AH hücre ve hayvan modelleri ile uyumlu olduğu bulunmuştur (68). Çalışmalarda; cilt fibroblastları, PBMC'ler ve kırmızı kan hücresi gibi periferik dokuların, AH'de gerçekleşebilecek mitokondriyal değişikliklerin tespit edilmesinde potansiyel taşıdığı belirtilmekte olup, PBMC'lerde bazı mitokondriyal genlerin ekspresyonunun AH'nin erken evresinde tespit edildiği bulunmuştur (49,69).

2.1.5.5 İnflamasyonun AH patogenezindeki rolü

2.1.5.5.1 Nöroinflamasyon

Çalışmalar, doğuştan gelen ve adaptif immün aktivasyonun AH patogenezinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (70). Genetik çalışmalar, AH için risk olan genlerin mikrogliyalarda yoğun bir şekilde ifade edildiğini ortaya koymuştur (71). Mikroglialar, A β plakları ve NFY ile etkileşim halinde olup AH beyinde reaktif olarak sayıları artmaktadır (70). Ayrıca sitokinler, kemokinler, inflamazomlar ve ROS üreterek hastalığın hem asemptomatik hem de semptomatik evrelerinde rol oynamaktadır (70).

Bir astrosit aktivasyon belirteci olan glial fibriller asidik protein (GFAP) seviyelerinin yüksekliği, hem amiloid patolojisiyle hem de bilişsel gerilemeyle ilişkili bulunmuştur (72,73). Nöroinflamasyon, IL-1 β , TNF ve IL-6 gibi sinaptik işlev ve plastisiteyi etkileyen sitokinlerle ilişkilidir (8,74,75). Bu durum, nöroinflamasyonun proinflamatuvar yollar aracılığıyla nörodejenerasyonu daha da kötüleştirebileceğini ve bilişsel işlevle ilişkili süreçleri bozabileceğini göstermektedir.

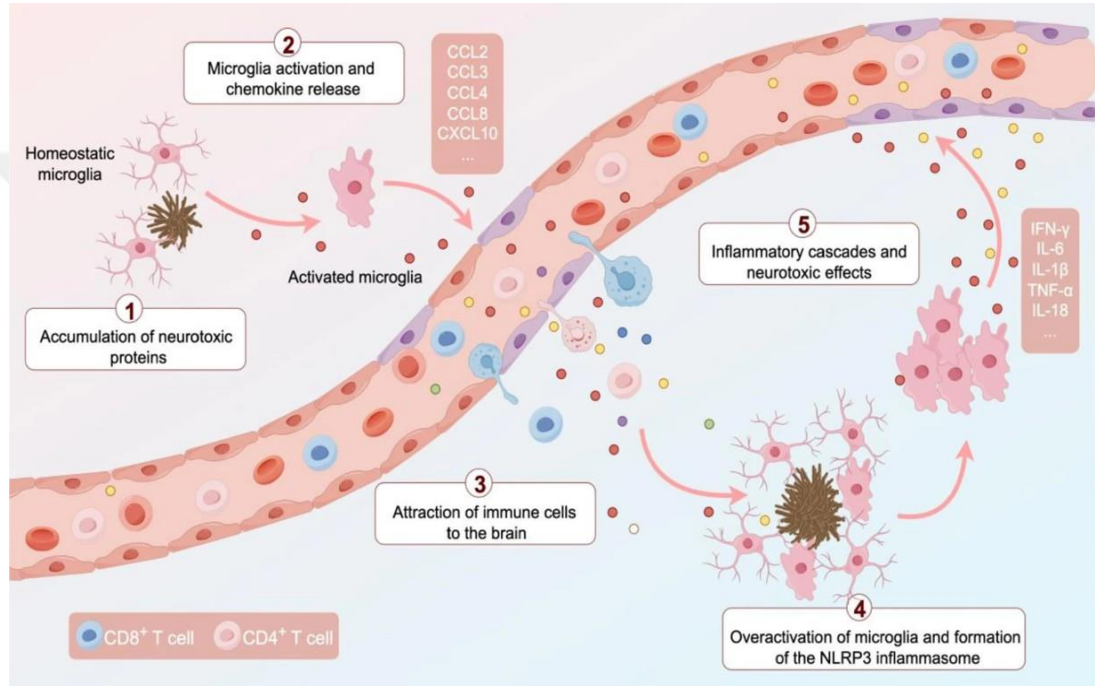
Nöroinflamasyon ile nöronal sağlık arasındaki ilişki, inflamasyonun nöronal hasara yol açtığı ve bu hasarın da daha fazla inflamatuvar yanıtı tetiklediği kısır bir döngüyü işaret etmektedir. Aşırı mikrogliyal aktivasyonun, sağlıklı nöronların veya sinapsların anormal fagositozuna yol açabileceği ve bunun bilişsel sağlık açısından zararlı olabileceğine dair kanıtlar mevcuttur (76,77).

2.1.5.5.2 Periferik ve merkezi inflamasyonun etkileşimi

Merkezi ve periferik bağışıklık sistemleri birbirlerinden bağımsız hareket etmeyerek, AH patogenezinin ilerlemesinde karşılıklı iletişim içerisindeyler (7,8,78). KBB'nin AH'de bütünlüğü bozulur ve bu bozulma ile periferik bağışıklık hücreleri (T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller gibi) MSS'ye geçer (8,79,80). Bu hücreler, mikroglialar ile etkileşime girerek kronik inflamasyon döngüsü oluşturur. Bu

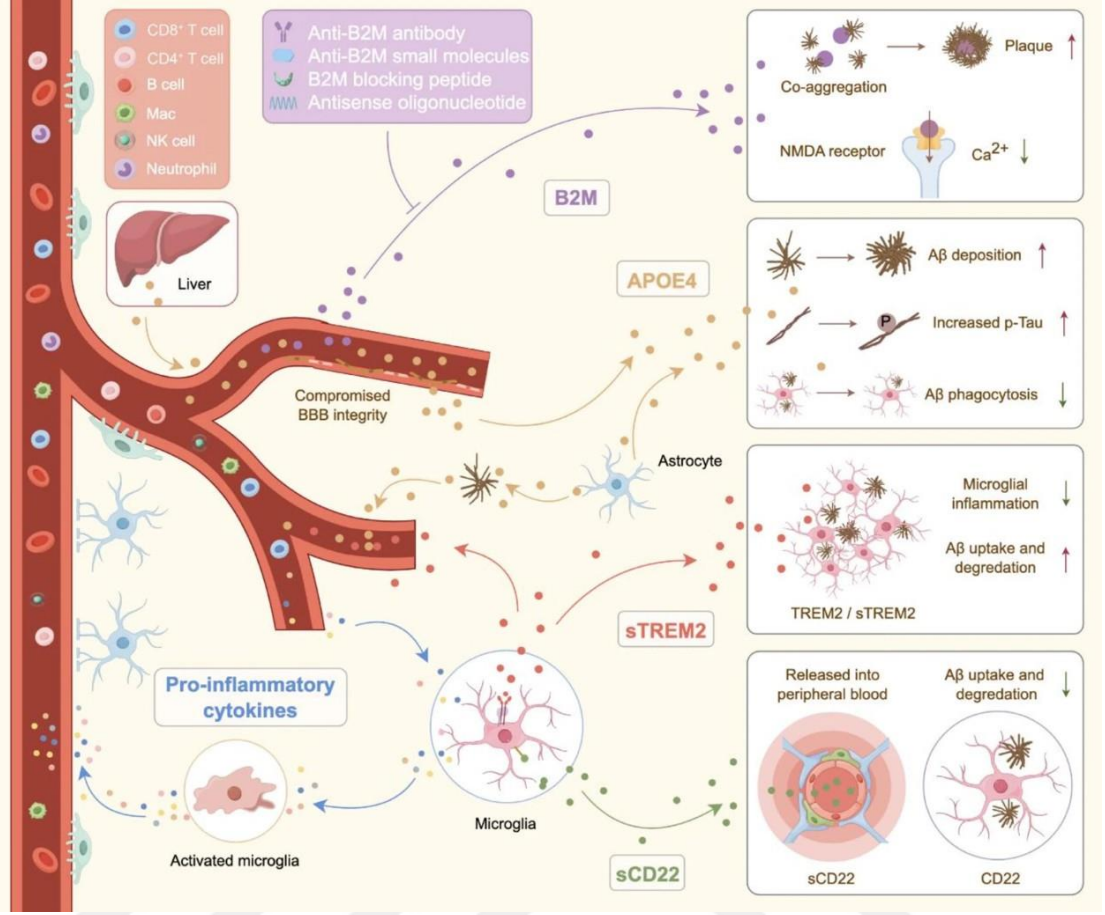
durum, nöroinflamasyona yol açarak nöroinflamatuvar yanıtları ve hastalığın ilerlemesini şiddetlendirir (10).

Bu etkileşimin önemli bileşeni hem periferik hem de merkezi bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan sitokinlerdir (8,10). Örneğin, NLRP3 üzerinden üretilen IL-1 β ve TNF gibi sitokinlerin periferde artışı, nöronlara doğrudan zarar vererek sinir hücrelerinin işlevini ve sinaptik iletişimi bozar (8).



Şekil 2. T hücreleri ile mikroglia arasındaki nöroinflamasyon döngüsü (7).

Şekil 2’de gösterildiği gibi T hücreleri ile mikroglia arasındaki etkileşim, AH’de kendi kendini besleyen bir nöroinflamasyon geri bildirim döngüsünü tetikler. Aβ ve tau gibi nörotoksik proteinlerin birikimi, mikroglial hücrelerin aktifleşmesine neden olur ve bu durum bir dizi patolojik süreci başlatır. Aktive mikroglialar, T hücrelerini beyin parankimine çeken kemokinler salgılar; bölgeye ulaşan T hücreleri ise Aβ üretimini ve agregasyonunu artıran sitotoksik maddeler salgılar. Bu durum mikroglial aktivasyonu artırır ve çeşitli sitokinler salgılanır. Ortaya çıkan bu döngü, T hücresi geçişini ve nöroinflamatuvar yanıtı daha da artırarak nörodejeneratif sürecin hızlanmasına neden olur (7).



Şekil 3. AH patogenezinde immün faktörlerin düzensizliği (7).

Şekil 3’de ayrıntılı gösterildiği gibi özetle; anormal nöroimmün yanıtlar, KBB’yi bozarak periferik bağışıklık hücrelerinin MSS’ye geçişini kolaylaştırır. Bu süreçte rol oynayan başlıca nöroimmünolojik araçlar arasında proinflamatuvar sitokinler, APOE4, B2M, TREM2 ve CD22 bulunmaktadır. Bu faktörler, nöroinflamatuvar tepkilerin düzenlenmesinde ve MSS ile perifer arasındaki bağışıklık dengesinin korunmasında kritik öneme sahiptir (7).

2.1.6 Tedavi

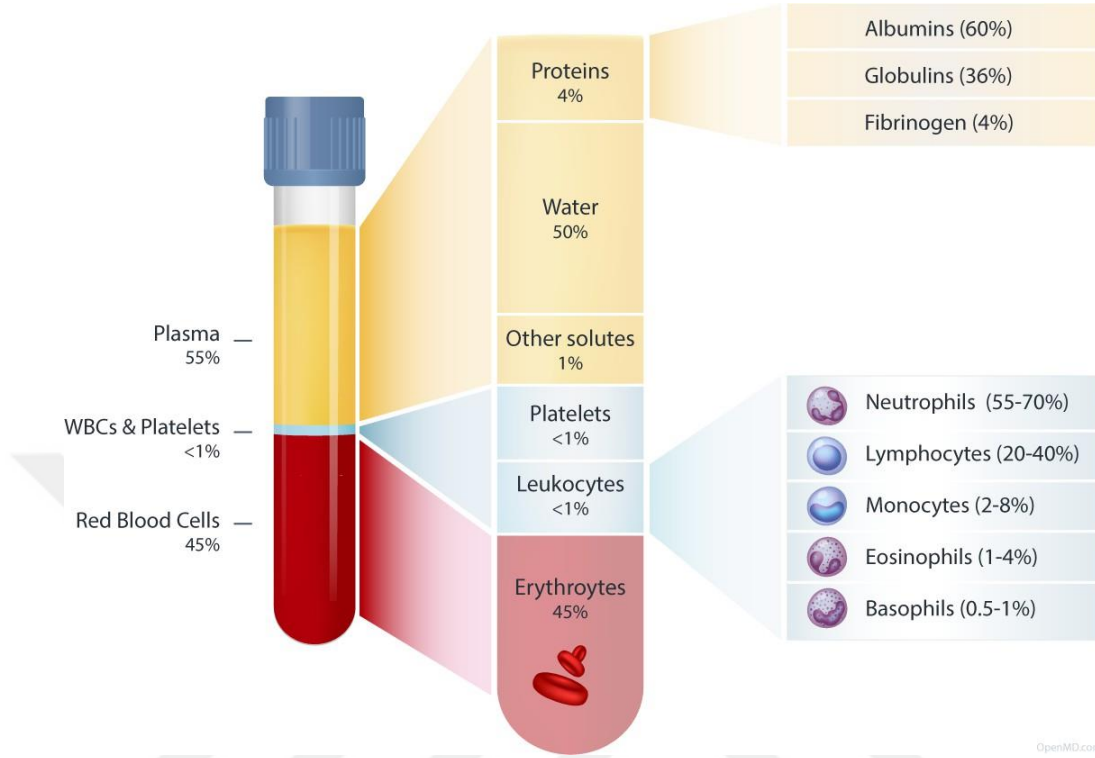
AH için mevcut ilaç tedavileri, demansın bilişsel, davranışsal ve psikolojik semptomlarının ilerlemesini sınırlamak amacıyla tedavi edici değil semptomatik temellidir. Piyasada onaylanmış dört ilaç (donepezil, memantin, galantamin, rivastigmin) bulunmaktadır ve bu ilaçlar iki gruba ayrılır: kolinesteraz enzimi inhibitörleri ve glutamatın NMDA reseptörlerine bağlanmasını engelleyen N-metil D-

aspartat (NMDA) reseptör antagonistleridir. Antikolinesteraz inhibitörleri, nöronlar arasında bilgi aktarımını sağlayan ve hafızada rol oynayan bir molekül olan asetilkolinin beyindeki seviyelerini artırmak için tasarlanmış moleküllerdir. Bu tedaviler, AH'de MSS'inde gözlemlenen asetilkolin eksikliğini düzeltmeyi amaçlamaktadır. Donepezil, Galantamine ve Rivastigmine FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) tarafından kullanımı onaylanmış asetilkolinesteraz inhibitörleridir (81).

Anti-glutaminerjik ilaçlar NMDA reseptörlerinin rekabetçi olmayan antagonist etkisi aracılığıyla glutamat seviyelerini düzenlemek için kullanılır. Glutamat öğrenme ve hafızada rol oynayan bir nörotransmitterdir. Yüksek glutamat seviyeleri, nöronların ölümüne neden olabilecek patolojik etkilere yol açabilir. FDA onaylı olan memantin NMDA reseptör antagonistidir ve fazla glutamatın oluşturabileceği olumsuz sonuçları engellemek için geliştirilmiştir (81).

Bu ilaç tedavileri, hastalığın seyrini yavaşlatmak, bilişsel işlevleri geçici de olsa stabilize etmek veya iyileştirmek ve davranış bozukluklarını kontrol altına almak amacıyla kullanılır. 2021 yılında FDA, A β plakları ve oligomerlerine karşı geliştirilen aducanumab'a koşullu; 2023 Ocak'ta ise Lecanemab'a hızlandırılmış onay vermiştir. Klinik araştırmalar, bu iki tedavinin AH hastalarında bilişsel gerileme hızını yavaşlattığını göstermiştir (82,83).

2.2 Periferik Kan ve Bileşenleri



Şekil 4. Periferik kan ve bileşenleri (84)

Periferik kan insanlarda temelde plazma, kırmızı (eritrositler) ve beyaz (lökositler) kan hücreleri ve trombositlerden oluşur. Kanın %55 gibi büyük bir kısmını oluşturan plazma büyük oranda sudan oluşurken albumin, globulin ve fibrinojen gibi proteinleri ve başka mineralleri de içerir. Eritrositler, kanda en yoğun bulunan hücrelerdir. Hemoglobince zengin sitoplazmalarıyla kanda oksijen taşımakla görevlidirler. Hücre çekirdekleri ve mitokondri de dâhil olmak üzere birçok organeli bulundurmazlar. Lökositler, bağışıklık sisteminde görev alan hücrelerdir. En önemli grupları granülositler, lenfositler ve monositlerdir. Granülositler kendi aralarında nötrofil, bazofil ve eozinofil alt hücre gruplarına ayrılır. Nötrofiller bu hücrelerin büyük çoğunluğunu oluştururlar ve patojenleri fagosite ederler. Eozinofiller ve bazofiller ise parazitlerle savaşmada ve alerjik reaksiyonlarda görevlidirler. Lenfositler temel olarak B ve T hücrelerinden oluşur. B hücreleri antikor üreterek immun cevap oluşumunu tetiklerken, T hücreleri diğer bağışıklık hücrelerini toparlayacak kimyasallar salgılar ve hücrelerin davranışlarını koordine ederler.

Monositler, kemik iliğinde üretildikten sonra kan dolaşımına geçen ve birkaç saat içerisinde dokulara girip makrofajlara dönüşen hücrelerdir. Trombositler, pıhtılaşmayı sağlayarak yaraların kapanması ve kanamanın durdurulmasında görevlidirler (84).

2.2.1 Plazma ve sitokin seviyeleri

Kanın büyük bir kısmını oluşturan plazma sıvısı; pıhtılaşma, asit-baz dengesinin korunması, ozmotik basıncın korunması, besin maddeleri ve hormonların taşınması ve savunma gibi birçok görevde yer alır (85). Plazmadaki fosforile tau seviyeleri ile beyindeki amiloid seviyeleri birbirleri ile yüksek uyum göstermektedir (86). Nöroinflamasyonun bir belirteci olan GFAP'ın plazmadaki seviyesi, amiloid birikimi ile korelasyon göstererek prelinik AH patolojisi olan bireylerde daha yüksek bulunmuştur (86,87). Bu biyobelirteçlerin plazmada taranması, BOS veya PET taramalarına göre daha doğru ve daha uygun alternatif sunarak hastalığın izlenmesine katkıda bulunabilir (86).

Sitokinler, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler olmak üzere nöroinflamasyonun önemli katılımcılarından (12). Plazmadaki sitokin seviyelerini inceleyen birçok çalışma, inflamasyon ve nörodejenerasyon arasındaki ilişkiyi ve AH patolojisindeki yerini ortaya koymaktadır (88–92). 2025 yılında yayınlanmış bir çalışmada, plazma sitokin seviyeleri beyin amiloid yükü ile ilişkilendirilmiş ve erken evre AH patofizyolojisindeki rolleri vurgulanmıştır (93). Transgenik farelerde yapılan bir çalışmada, A β artmış proinflamatuvar sitokinlerle ilişkilendirilmiştir (94). PBMC ile yapılan bazı çalışmalarda MCI hastalarında sitokin seviyeleri AH'lere göre daha yüksek bulunurken (13), ileri evre AH'de daha düşük seviyeler bildirilmiştir (14).

Kemokinler, inflamasyon bölgelerine bağışıklık hücresi göçünü düzenleyen kemotaktik sitokinlerdir (16). Kemokinler, periferik sistem ile MSS arasında çift yönlü immünolojik iletişimde önemli rol oynayabilir ve burada inflamatuvar yanıtlar ile bağışıklık hücresi taşınımını düzenlerler (18). Kemokinler, periferik kandan monositlerin beyne geçişini artırarak ve glial hücre aktivasyonunu tetikleyerek AH'deki nöroinflamasyona katkıda bulunurlar (17). Ayrıca KBB'nin geçirgenliğini de etkilerler (19).

Literatürde sitokin ve kemokin seviyeleri zaman zaman tutarsız sonuçlar göstererek genellikle erken evre AH ve MCI hastalarının plazma ve BOS örneklerinde ölçülmüştür ve yüksek biyobelirteç potansiyelleri vurgulanmıştır (92,95–98).

2.2.2 T lenfositleri

T hücreleri; enfekte somatik hücrelerin ortadan kaldırılmasından sorumlu CD8+ sitotoksik T lenfositleri, diğer bağışıklık hücrelerine yardımcı olan ve rehberlik eden CD4+ yardımcı T lenfositleri ve inflamasyonun hafifletilmesi ve çözülmesiyle ilişkili düzenleyici T (Treg) lenfositleri olmak üzere temelde üç sınıfa ayrılır (9).

Çalışmalar, periferik T hücresi bağışıklığı homeostazının AH'de bozulduğunu ve bu durumun periferaldeki lenfositlerin alt kümelerinin dağılımı ile aktivasyon durumlarının değişmesine sebep olarak, hastalık patogeneze karmaşık etkileri olabileceğini düşündürmektedir (8,68,99). Hafif evre AH grubunda, CD4+ T hücrelerinin naif ve hafıza alt kümelerinde sağlıklı yaşlı yetişkinlere kıyasla naif hücrelerin oranı azalmıştır (100). AH grubunda, periferik CD4+ T hücrelerinde dolaşımda olan IFN γ salgılayan TH1 hücrelerinin oranının yüksek olduğu ve bu hücrelerin TH17 ve TH9 fenotiplerine yöneldiği gösterilmiştir (8). Bazı klinik veriler, aşırı bağışıklık yanıtlarını baskılayan CD4+ T hücreleri olan düzenleyici T (Treg) hücreleri aracılığıyla gerçekleşen immün modülasyonun da AH'de değiştiğini göstermektedir (8).

Periferik bölgede T hücresi aktivasyonunun yanı sıra, AH grubunun BOS'unda sağlıklı yaşlı bireylere göre yüksek oranda CD8+ T hücreleri bulunmuş ve bu anormallik AH ile ilişkili bilişsel ve nöroanatomik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (8). CD8+ T hücreleri ayrıca A β plaklarının yanında gözlemlenmiştir ve T hücresi infiltrasyonu ile AH beyinlerinde fosforile tau yükü arasında bir korelasyon bulunmuştur (8).

CD4+ T hücreleri ve mitokondri üzerine yapılan bir çalışmada erken evre AH grubunda mitokondriyal DNA azalmıştır (34). Yaşlı bireyler ile genç bireylerin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada ise ileri yaşta CD4+ T hücrelerinde otofajiye

mitokondri yıkımının bozulduğu ve bunun fonksiyonel olmayan mitokondrilerin birikimine sebep olarak kronik inflamasyona ve bağışıklık savunmasının zayıflamasına yol açabileceği bildirilmiştir (35).

2.2.3 B lenfositleri

B lenfositler antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşabilir, ayrıca antijen sunumu, T hücreleri ve doğuştan bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesi, sitokin üretimi gibi fonksiyonlara sahiptir (101). B lenfosit biyobelirteci CD19+'dur.

B hücreleri, AH'de aktif hale gelerek beyinde ve periferde birikir ve A β 'yi hedefleyen immünoglobulinler üretir (102). İmmunoglobulinler plak oluşumunu ve hastalığın ilerlemesini engelleyebilirken ayrıca mikrogial işlevi bozarak AH patolojisini kötüleştirebilmektedir (102). 5xFAD ve APP/PS1 farelerinde B hücresi deplesyonu ile hastalık ilerlemesinin yavaşlaması, bilişsel ve motor bozuklukların iyileşmesi ve amiloid yükünün azalması ilişkilendirilmiştir (103). Ancak hastalığın erken evrelerinde B hücrelerinin deplesyonu, AH fare modellerinde bilişsel gerilemenin hızlanmasına ve amiloid yükünün artmasına neden olur; bu da B hücrelerinin AH patogenezindeki karmaşık ve evreye bağlı rolünü ortaya koymaktadır (7).

Mitokondriyal çalışmalara bakıldığında ise erken evre AH grubunda CD19+ B hücrelerinde mitokondriyal DNA'nın azaldığını gösteren bir çalışma bulunmaktadır (34).

2.2.4 Monositler

Monositler periferik kanda bulunan en büyük beyaz kan hücreleridir. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir bileşeni olan monositler makrofajlara ve dendritik hücrelere dönüşebilirler. Bağışıklık tepkisi sırasında hem inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar süreçlerde rol oynarlar (104). Nötrofillerle benzer şekilde, monositler fizyolojik koşullar altında MSS neredeyse hiç bulunmazlar (10). Ancak beyin homeostazı bozulduğunda, makrofajlar KBB'den geçebilirler (10). Kandan

gelen ve beyne sızan monositler, skar dokusunun parçalanması, anti-inflamatuar ve nörotrofik faktörlerin üretimi gibi MSS'deki nöropatik olayların kontrolünde önemli rol oynarlar. Makrofajlar ile mikroglialar arasında iletişim bulunup birbirlerinin fonksiyonlarını düzenlerler (10)

Fagositik ve antijen sunma fonksiyonlarına sahip monositler genellikle olgunlaşmamış makrofajlar olarak kabul edilir. AH çalışmalarında, kan dolaşımında monosit sayısının ve aktivasyonunun arttığı bulunmuştur (105). Monosit aktivasyonu, inflammatuar araçların ve sitokinlerin salınmasıyla tanımlanan nöroinflammatuar tepkileri tetikleyerek nöronal apoptoz, sinaptik hasar ve glial inflamasyona sebep olabilir (105). Ayrıca, araştırmalar vasküler enflamasyonun, KBB'nin bozulmasının ve immün yanıt düzensizliğinin monositleri aktive ederek nöroinflammatuar yanıtları şiddetlendirebileceğini ve AH başlangıcını ve ilerlemesini tetikleyebileceğini vurgulamaktadır (105). Tam tersi olarak bazı çalışmalar ise monositlerin nöronal gelişim, onarım ve nöroproteksiyonu kolaylaştıran nörotrofik ve anti-inflamatuar faktörler salgılayarak AH'de koruyucu bir rol oynayabileceğini öne sürmektedir (8,9,105).

2.2.5 Nötrofiller

Nötrofiller, patolojik koşullar sırasında doku homeostazının korunmasında rol oynayan beyaz kan hücreleridir (9). Uyarılara yanıt olarak fenotiplerini ve işlevlerini düzenleyip akut inflammatuar yanıtları tetikleyebilirler (9). AH'de, dolaşımdaki nötrofillerin homeostazisi bozulmuş ve bu durum proinflammatuar fenotiplere kayma ve artmış ROS üretimiyle ilişkilendirilmiştir (106). Bu değişiklikler hem hastalığın evresi ile hem de bilişsel gerilemenin hızı ile de ilişkilendirilmiştir (8,106).

AH üzerine yapılan bir hayvan çalışmasında, nötrofillerin KBB yıkımıyla ilişkisi vurgulanmıştır (107). 2015 yılında AH'li farelerle yapılan bir çalışmada integrin LFA-1'in nötrofillerin MSS'ye geçişini kontrol ettiği ve Aβ bulunan alanlarda nötrofillerin nöronlara ve KBB'ye toksik etkiler gösterdiği gözlemlenmiştir (108). Nötrofil deplesyonu veya LFA-1 blokajı, AH'nin şiddetini azaltmış ve nötrofil hedefli tedavilerin faydalı olabileceğini düşündürmüştür (108).

2.3 AH ve Proteomik Çalışmalar

AH patolojisine ait hipotezleri test etmek, hastalığın moleküler mekanizmasını anlamak ve potansiyel biyobelirteçler ile erken teşhis koyabilmek için proteomik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. AH'nin karmaşık bir patogeneze sahip olması sebebiyle doğrudan hücre ve dokulardaki proteinlerin miktarını, modifikasyonlarını ve etkileşimlerini proteomik yöntemler ile incelemek hastalığın patolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Proteinlerin yanlış katlanması, agregasyon ve translasyon sonrası modifikasyonların her zaman mRNA düzeyindeki değişimlerle gözlemlenememesi proteomik çalışmaların önemini arttırmaktadır. Ayrıca biyolojide temel önemi olan protein- protein etkileşiminin anlaşılmasında kullanılır (109,110).

Kütle spektrometresi (MS) peptit kütleleri veya amino asit dizileri gibi proteinlerin yapısal bilgilerinin elde edilmesinde kullanılır. MS tabanlı proteomik analiz üç adımdan oluşur : (i) örnek hazırlığı, (ii) veri elde etme ve (iii) biyoinformatik analizler (110,111).

2.3.1 Kütle spektrometresi (MS)

MS'nin temel prensibi; örnek moleküllerin iyonize edilerek yüklü parçacıklara dönüştürülmesi, bu iyonların elektromanyetik alanlar kullanılarak m/z oranlarına göre ayrılması, iyonların tespit edilmesi ve elde edilen verilerin analiz edilerek örneğin bileşimini temsil eden bir kütle spektrumu oluşturmaktır. Bir MS cihazı genellikle üç ana bileşenden oluşur: iyonları ayıran iyonizasyon kaynağı (MALDI, ESI), iyonları elektromanyetik alanlar uygulayarak kütlelerine göre sıralayan bir kütle analizörü (TOF, kuadrupol, ion trap, FT-ICR) ve ayrılmış iyonları tespit edip intensitelerini kaydederek kütle spektrumu üreten iyon dedektörü ile veri sistemi (112).

Proteomikte en yaygın kullanılan kütle analizörleri kuadrupol, uçuş süresi (time of flight, TOF) ve Orbitrap analizörleridir. Kuadrupoller, salınımlı elektrik alanlarla iyonları seçici olarak iletirken, TOF analizörleri iyonları hız ve dedektöre varış zamanlarına göre ayırır; çok hassas zaman ölçümleriyle yüksek çözünürlük sağlar. Orbitrap ise iyonları salınım frekanslarına göre ayırır ve oldukça yüksek çözünürlük

ve kütle doğruluğu sunar. Kuadropollerden sonra genellikle iyonların parçalandığı bir çarpışma hücresi (collision cell) gelir ve bu da MS1 veya MS2 spektrumlarının oluşmasını sağlar. TOF analizörleri MCP dedektörlerle çalışırken, Orbitrap'ta iyonların oluşturduğu görüntü akımı Fourier dönüşümüyle analiz edilir. Orbitrap'lar çok hassas olsa da TOF analizörlerine kıyasla daha yavaştır (113).

Analizlerde top-down (tam proteinler) ve etiketsiz (label -free), stabil izotop etiketli yöntemler ile daha yaygın ve kapsamlı olan bottom-up (peptitler) yaklaşımları kullanılır (111).

2.3.1.1 LC-MS/MS

LC-MS/MS, yani Sıvı Kromatografi–Tandem Kütle Spektrometrisi, sıvı kromatografinin (LC) ayırma gücünü, tandem kütle spektrometrisinin (MS/MS) yüksek hassasiyet ve seçicilik özellikleriyle birleştiren gelişmiş bir analitik tekniktir. Çoğu LC-MS/MS yöntemi, ya atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyonu ya da genellikle ESI kaynaklarını, tekli veya üçlü kuadropol kütle spektrometreleriyle birleştirerek kullanır. LC aşamasında örneğin bileşenleri, sabit ve hareketli fazlarla olan kimyasal etkileşimlerine göre kromatografik kolonda ayrıştırılırken; MS/MS aşamasında bu bileşenler iyonlaştırılarak kütle/yük oranlarına göre analiz edilir, seçilen öncül iyonlar çarpışma hücresinde parçalanır ve ortaya çıkan parçalar ikinci bir analizörle değerlendirilir. Karmaşık protein karışımların yapı ve miktar tayininde yüksek hassasiyet ile analiz yapar. Steroid, amino asit, vitamin, peptit, protein, nörotransmitter, kanser biyobelirteci, terapötik ilaç izleme ve toksikolojik testler dahil olmak üzere çok sayıda tanısal testi kolaylaştırmaktadır (114–116).

2.4 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ve Akış Sitometrisi

Hücrelerin heterojen yapısı, insan klinik örneklerinin özellikle de proteomik analizlerde, tanımlanmamış hücre popülasyonlarının analizinden elde edilen toplu sonuçların yanıltıcı ve sorunlu olmasına neden olabilmektedir. Birçok proteomik deneyde tüm doku veya doku kesitleri ile çalışılmakta ve bu da 'ortalama' bir hücresel yanıt sonucu vermektedir. Bu yaklaşımlar faydalı bilgiler sunsa da hücre

popölasyonlarına ait spesifik moleköler verileri ortaya koyamamakta ve bu sebeple araştırmalarda belirli hücre tiplerinin ayrılması tercih edilmektedir (117).

FACS ve akış sitometrisi, hücreleri belirli flüoresan işaretleyicilere göre analiz etmek ve ayırmak için kullanılan tekniklerdir. Bu yöntemlerde, bir doku ya da sıvı biyopsisinden elde edilen heterojen hücre popölasyonu süspansiyon haline getirilir; tüm parçacıklar (canlı hücreler dahil) bir sıvı akışına yerleştirilir, bir nozölünden geçerek hücre hücre ilerler ve lazerlerin önünden geçerken her bir parçacığın ışık saçılımı ve flüoresan sinyalleri tespit edilir. Tanımlanan ayarlara göre, hücreler homojen olarak ayrılarak toplanabilir. Bu şekilde FACS, her hücre tipine özgü, kullanıcının belirlediği ışık saçılımı ve flüoresan özelliklerine göre hücreleri sıralayabilir ve yüksek saflıkla, düşük intensitede bulunan alt popölasyonların bile zenginleştirilmesini sağlayabilir (117).

Akış sitometrisi ve FACS yöntemleri AH araştırmalarında ayrıntılı hücresel ve moleköler analiz sağlamaktadır. Kan bazlı biyobelirteçlerin tanımlanması ve bağışıklık hücrelerinin katılımının karakterizasyonunu kolaylaştırarak AH'nin hem tanısai hem de patolojisinin mekanizmasının anlaşılmasını kolaylaştırır (26,118–120).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri, malzemeler ve kimyasallar Tablo 1 ve Tablo 2’de listelenmiştir.

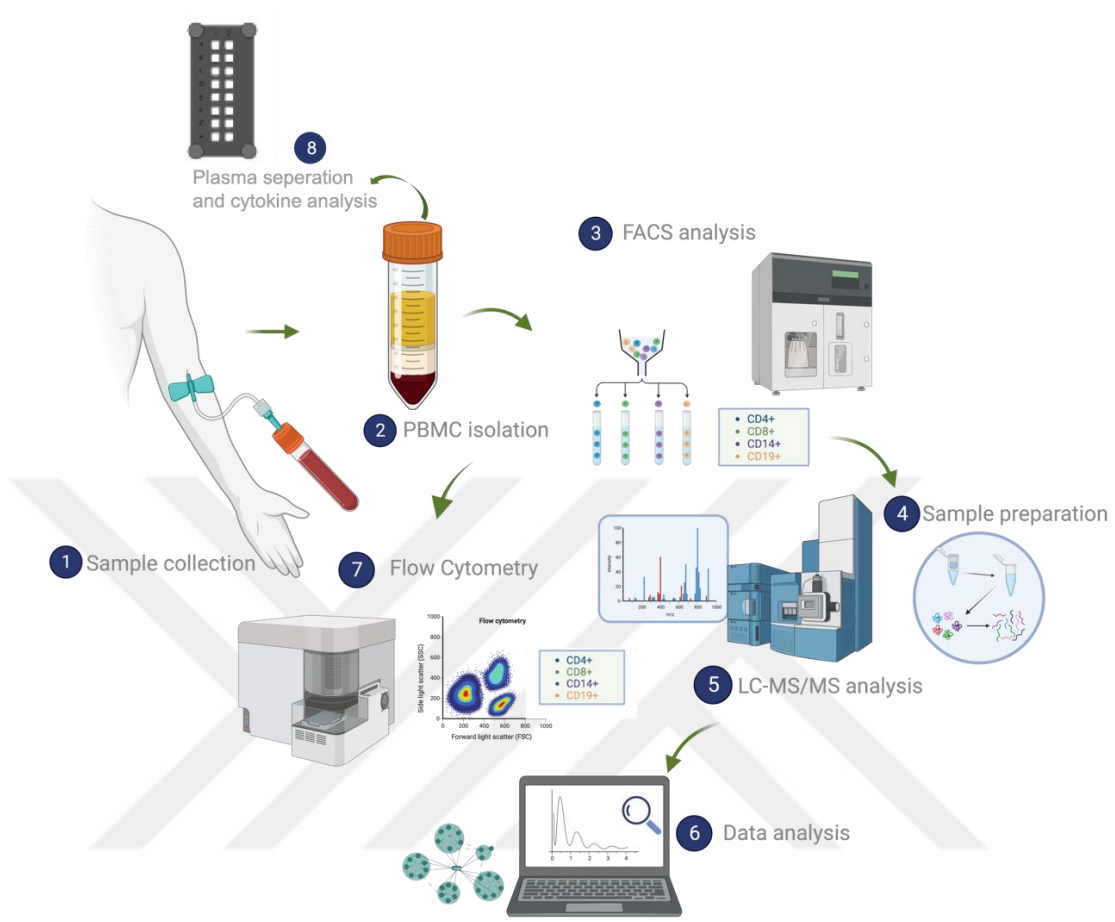
Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihaz, alet ve laboratuvar malzemelerinin listesi

Kullanılan Cihaz, Alet, Malzeme	Marka, Model
0,5, 1,5 ve 5 mL Hacimli Kapaklı Tüpler	Eppendorf
5, 10 ve 25 mL hacimli Steril Serolojik Pipetler	Isolab
Azot Tankı	Thermo 30, Thermo Scientific
Akış Sitometresi	Cytec Biosciences
Çalkalayıcı Isı Bloğu	Witeg Wisd Laboratory Instruments
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Çeşitli Hacimlerde Pipet Uçları (0,1-1000 µL)	Eppendorf
Derin dondurucu (-80C)	Haier Biomedical
Derin Donduruculu Buzdolabı (+4C ve - 20C)	Kirsch Medical
Etüv (37°C - Proteomiks)	Hera Term Oven, Thermo Scientific
LC-Vial	Waters
LoBind Microcentrifuge Tube (1,5 mL)	Eppendorf
MA900 Multi-Application Cell Sorter	Sony Biotechnology
Mikroskop	Axio Vert. A1, Carl Zeiss
nanoACQUITY UPLC BEH C18 Column	Waters
nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column	Waters
nLC-MS/MS Kütle Spektrometresi	nanoACQUITY UPLC M Class ile bağlı SYNAPT Xevo G2-XS, Waters
Sepmate PBMC İzolasyon Falkonu	Stemcell Technologies
Speedvac	Thermo Scientific
Thermo-çalkalayıcı	Biosan
Ultrasonik işleyici	VialTweeter, HielScher

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Marka/Kodu
Aseton (LC-MS saflığında)	Merck, 100020
Asetonitril (LC-MS saflığında)	Merck, 100030
Amonyum bikarbonat	Merck
A700 (CD14+)	Biolegend, 325614
BSA	Bruker, 8217498
BV510 (CD4+)	Biolegend, 317444
BV605 (CD3+)	Biolegend, 317322
DPBS	Thermo Scientific,14190144
FBS	Thermo Scientific,10270106
Formik Asit	Fluka, 94318
Glu1-Fibrinopeptide B Standart	Waters, 700004729
Glutamax	Thermo Scientific, 35050061
Histopaque 1077	Merck, H8889
İyodoasetamit (IAA)	Merck, I1149
JC-1	Thermo Scientific, T3168
Leucine-Enkephalin	Waters, 186006013
MEM Sodium Pyruvate Solution	Thermo Scientific, 11360070
MitosoxRed	Thermo Scientific, M36008
NaCl	Sigma, S7653
Non-Essential Amino acids	Thermo Scientific, 1140035
Pacific Blue (CD8+)	Biolegend, 301033
Peptit Standardı	Bruker, 8222570
PeCy7 (CD19+)	Biolegend, 302216
Penisilin/Streptomisin	Thermo Scientific, 15140122
Proteaz inhibitör Kokteyli	Thermo Scientific, 78440
RPMI Medium 1640	Thermo Secientific, 11875093
Sitokin Kiti	Raybiotech, QAH-CYT-1-4
Su (LC-MS Grade)	Waters,85189
Trypsin	Thermo Scientific, 90057
Trypsin Gold	Promega, V5280
Tris/HCl	Sigma, T5941
UPX Universal Protein Extraction Kit	Expedeon
Üre	Merck, 818710
Valinomycin	Thermo Scientific, V1644

3.2 Yöntem



Şekil 5. Tez akış planı

3.2.1 Örneklerin toplanması

Bu çalışma Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (ATADEK) 12 Mayıs 2016 tarihli ve 2016/8–34 sayılı etik kurul izni çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya, "Ulusal Nörolojik, İletişimsel Bozukluklar ve İnme-AD ve İlgili Bozukluklar Derneği (NINCDS-ADRDA)" kriterlerini karşılayan AH vakaları dahil edilmiştir (121). Orta evre AH vakaları Klinik Demans Derecelendirme (CDR) ölçeğine göre seçilmiştir (122). Ayrıca bilişsel durum Mini Mental State Examination (MMSE) kullanılarak ölçülmüştür. AH ve yaşça uyumlu sağlıklı kontrol gruplarından alınan kan örnekleri Maltepe Üniversitesi Hastanesi, Bezmialem Üniversitesi Hastanesi ve İstanbul Çapa Üniversitesi Hastanesi

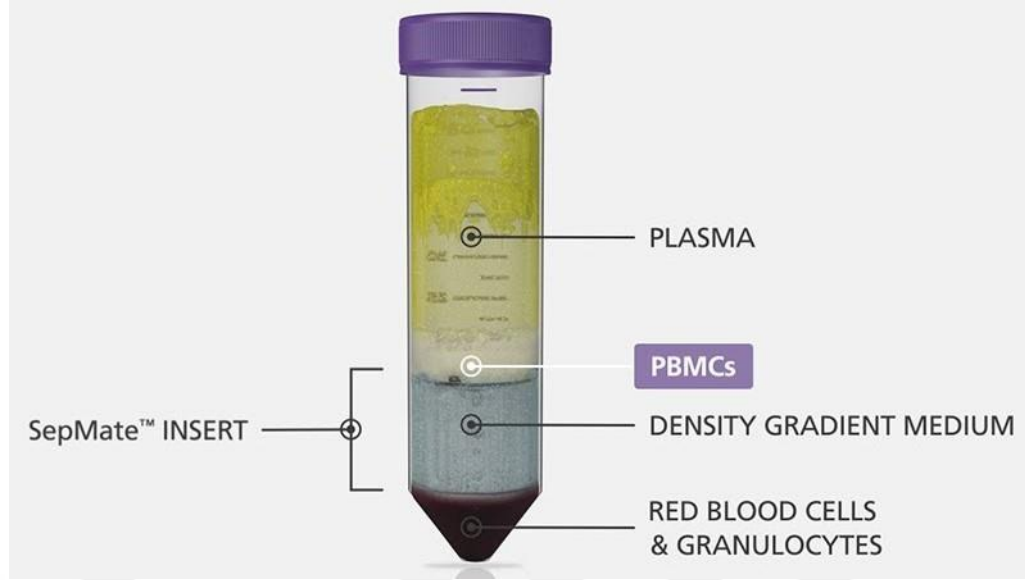
tarafından temin edilmiştir. Yaşça uyumlu kontrol grubu için dışlama kriterleri arasında nörolojik, psikiyatrik ve ciddi fiziksel hastalıklar yer almaktadır. Kontrol grubu deneklerinden kan örnekleri toplandığında, hiçbirinde bilişsel veya zihinsel sağlık sorunları bulunmamaktadır. Ayrıca, AH veya diğer demans türlerini tedavi etmek için ilaç kullanmıyorlardı. Tüm kontrol grubu denekleri ve hasta grubu ve/veya bakıcıları tarafından yazılı bilgilendirilmiş onam formu imzalanmıştır ve periferik kan örnekleri bağışlanmıştır. Onam formlarını imzalamış olan 20 AH ve 23 kontrol grubu deneklerinden sodium-heparinli tüpler içerisinde 40 ml periferik kan alınmıştır (Tablo 3). LC-MS/MS analizinden sonra iki aykırı AH örneği CD4⁺ alt grubundan çıkarılmıştır. CD8⁺ alt grubunda, örnek hazırlığı sırasındaki deneysel bir sorun nedeniyle, LC-MS/MS analizi bir örnek seti üzerinde gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle, CD8⁺ grup analizi 17 AH ve 17 kontrol örneği ile gerçekleştirilmiştir (AH: Yaş = 74,4 ± 4,4, E/K = 9/8, CDR = 1,6 ± 0,6, MMSE = 18,1 ± 3,4; Kontrol: Yaş = 67,5 ± 7,8, E/K = 8/9).

Tablo 3. AH ve kontrol örneklerinin demografik ve klinik özellikleri

	Kontrol	AH
Örnek sayısı	23	20
Erkek/Kadın	15/8	10/10
Yaş	66.1 ± 7.2	74.3 ± 4.7
CDR	/	1.9 ± 0.6
MMSE	/	16.9 ± 3.1

3.2.2 Periferik Kandan mononükleer hücre izolasyonu ve plazma izolasyonu

Sodyum-Heparin’li tüplerde toplanmış olan 40 ml kanın PBMC izolasyonu, Ficoll-paque solüsyonu ile SepMate falkonları yardımıyla ayrılmıştır. 40 ml kan 1-1 oranında DPBS ile dilüe edilmiştir. Öncelikle falkonun alt bölümüne ficoll solüsyonu eklenmiş daha sonra yavaş yavaş dilüe edilmiş kan eklenmiştir. 2000 rpm’de 20°C’de 25 dakika santrifüj edilmiştir.



Şekil 6. SepMate ile periferik kan monnonükleer hücre izolasyonu

Üst kısımda kalan plazma daha sonra sitokin testlerinde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı. Ara bölümden toplanan beyaz kan hücreleri 12 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet RPMI ile çözülüp 1400 g'de santrifüj edilmiştir. Hücre sayımı yapıldıktan sonra %50 FBS, %40 RPMI ve %10 DMSO içeren 'freezing media' ile hücreler, daha sonra FACS analizi ile alt gruplarına ayrılması ve akış sitometrisi analizlerinde kullanılabilmesi için -80'e kaldırılmıştır.

3.2.2.1 FACS analizi

FACS tekniği ile hücre ayırıştırma işlemi, Acıbadem Üniversitesi kampüsünde kurulmuş olan SZA Sağlık Araştırmaları A.Ş.'ye ait olan İnsan İmmünolojisi Araştırma Merkezinde bulunan Sony Cell Sorter cihazı ile yapılmıştır.

3.2.2.1.1 FACS analizi örnek hazırlığı

Daha önce ficoll solüsyonu ile ayrılıp -80'e kaldırılmış olan hücreler 10 ml RPMI ile çözülüp 1500 rpm'de 20°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra pellet yine 10 ml RPMI ile çözülüp hücre sayımı yapılmıştır. FACS analizi için 20 milyon hücre ayrılmıştır.

Ayrılan PBMC hücreleri RPMI içerisindeyken Tablo 4’te yer alan antikorlar ile yarım saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler, 5 dakika santrifüj edildikten sonra hücre pelleti RPMI ile FACS tüplerine alındı ve cihaza verilmeye hazır hale getirildi.

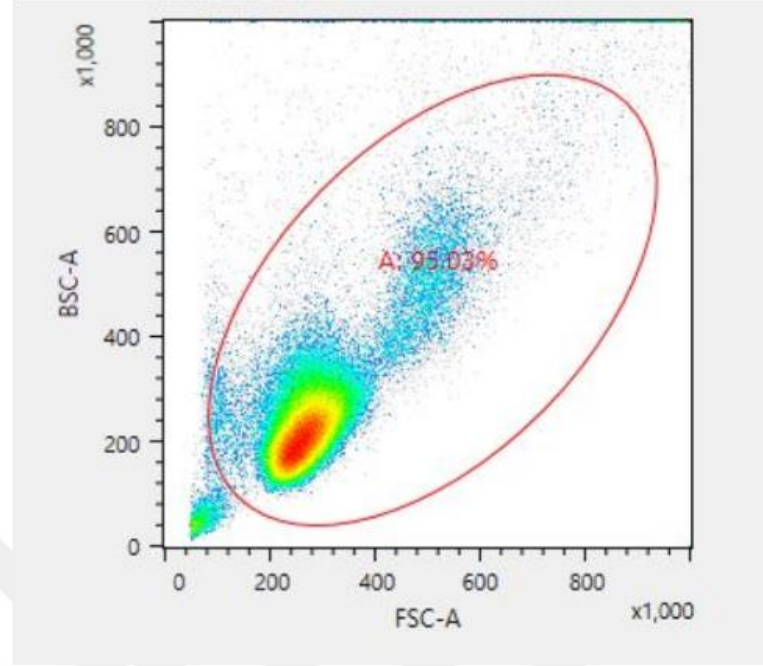
Tablo 4. Hücre ayırımı için kullanılan antikor ve antijenler

Antijen	Antikor
CD3	BV605
CD14	A700
CD19	PeCy7
CD4	BV510
CD8	PB

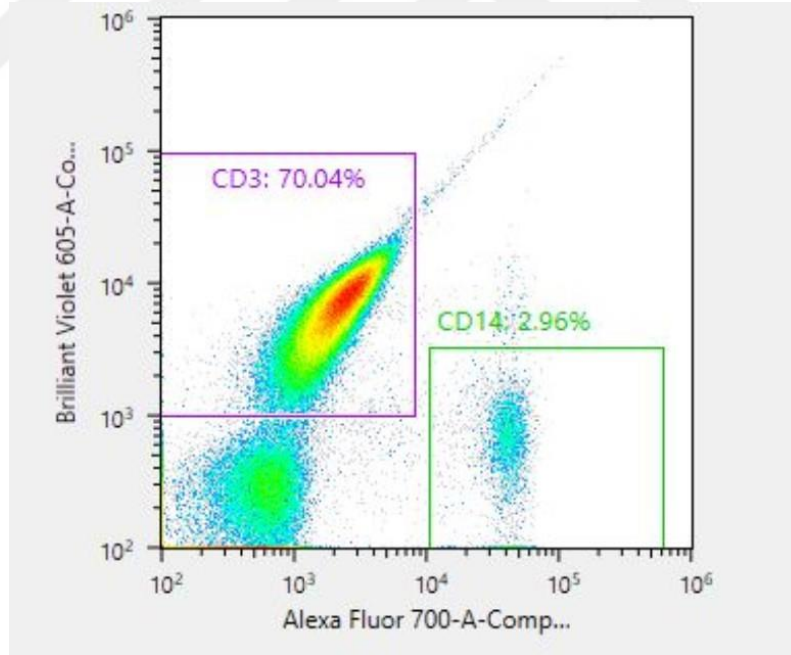
3.2.2.1.2 FACS analizi ve örneklerin saklanması

Antikor boyaması yapılmış olan RPMI içerisindeki PBMC hücreleri; B lenfositleri, CD4+ ve CD8+ olmak üzere T lenfositleri ve monositler, belirlenmiş olup, FACS tekniği kullanılarak ayrı toplama tüplerine alınmıştır. Analiz öncesinde, tam kan örneğindeki çiftli hücreler, ölü hücreler ve debrisler elimine edilerek analize başlanmıştır. Monosit ve lenfosit popülasyonları kapılandırılmıştır. Lenfosit kapısında CD3+ ile işaretlenen hücreler T lenfositler olarak belirlenmiş, bu popülasyonun alt grupları ise CD4+ ve CD8+ hücreleri işaretlenerek ayrılmıştır. Lenfosit kapısında CD19+ ile işaretlenen hücreler B lenfositler, monosit kapısında CD14+ ile işaretlenen hücreler ise monosit olarak tanımlanmıştır. Ayrım sonucunda purity modunda dört farklı hücre grubu (CD4+, CD8+, CD14+ ve CD19+) ayrıştırılmıştır. Hücre ayırımına ait görüntüler Şekil 7-10’da gösterilmektedir.

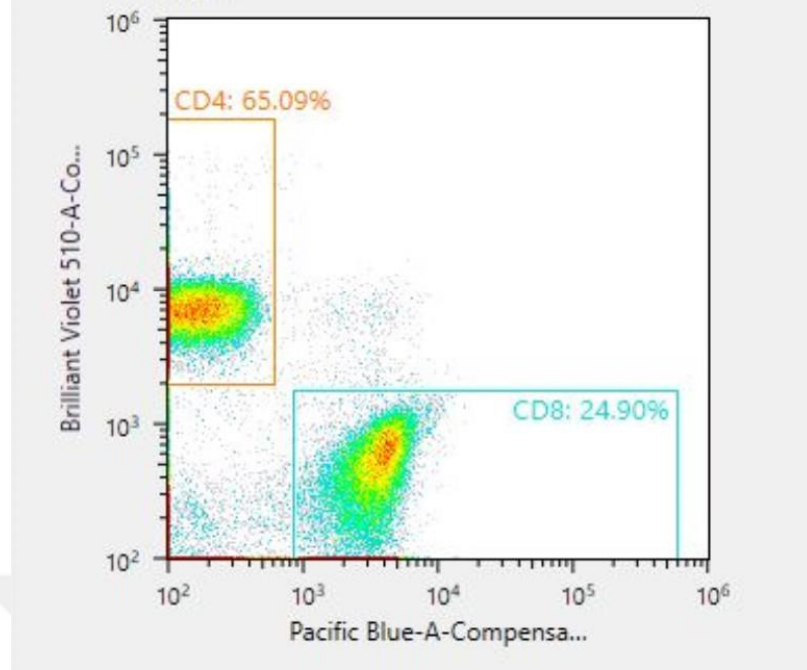
Tam kan



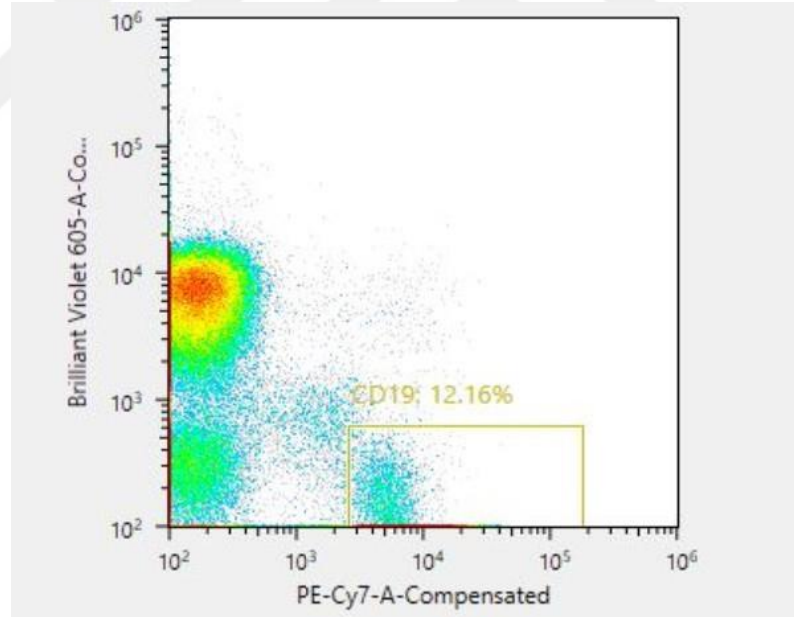
Şekil 7. Tam kanın ölü hücrelerden eliminasyonu



Şekil 8. CD3 ve CD14 işaretlemesi ile monosit ve lenfosit ayrımı



Şekil 9. CD3 kapısı altında CD4 ve CD8 hücreleri ayrımı



Şekil 10. CD19 işaretlemesi ile B lenfosit ayrımı

Ayrıştırılan dört hücre grubu, RPMI içinde 20°C’de 1400 rpm’de 8 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Hücre pelletleri, serumu uzaklaştırmak amacıyla 1 ml PBS ile yıkanarak 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelletleri, LC-MS/MS analizinde kullanılmak üzere sıvı nitrojen ile dondurulup -80°C’de saklanmıştır.

3.2.2.2 Sitokin tarama testi

Sitokin taraması için Raybiotech firmasına ait Quantibody Human Cytokine Array 1 adlı ticari kit kullanıldı. Bu kit ile plazma sitokin taramasında kantitatif analizi yapılan 20 sitokin Tablo 5’de sunulmuştur.

Tablo 5. Sitokin tarama testi ile analizi yapılan sitokinler

GM-CSF	GRO- $\alpha/\beta/\gamma$	IFN- γ	IL-1 α
IL-1 β	IL-10	IL-12p70	IL-13
IL-2	IL-4	IL-5	IL6
IL-8(CXCL8)	MCP-1 (CCL2)	MIP-1 α (CCL3)	MIP-1 β (CCL4)
MMP-9	RANTES (CCL5)	TNF- α	VEGF-A

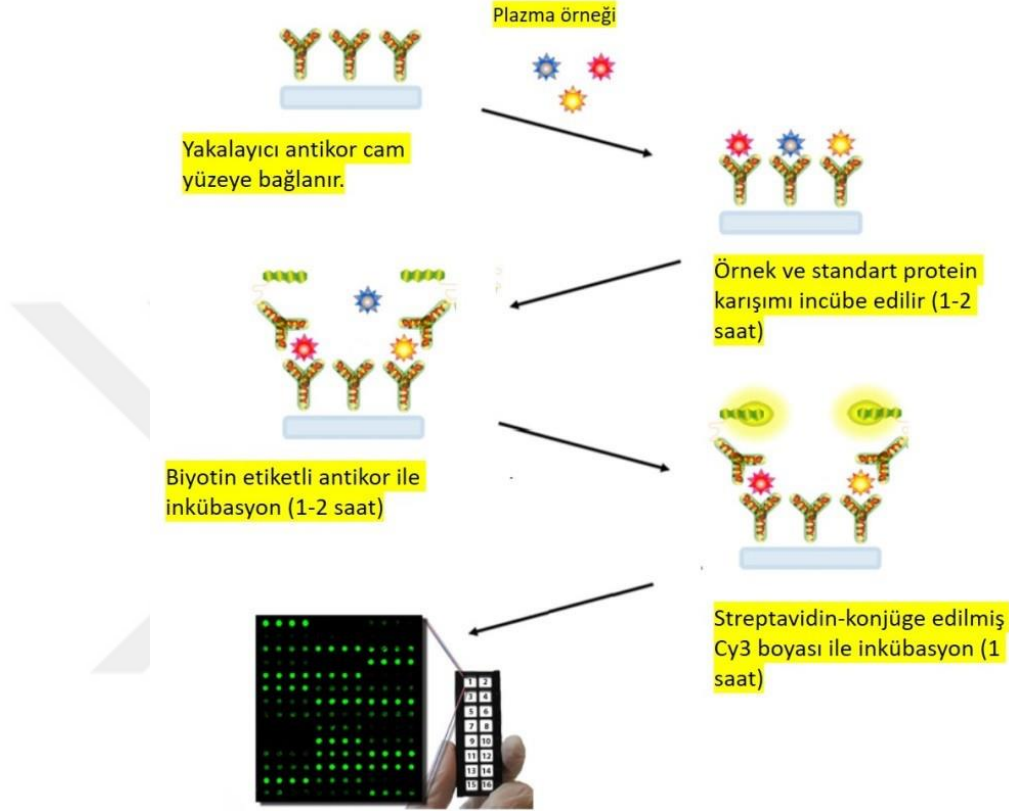
Sitokin tarama testi için 25 AH ve 25 yaş uyumlu kontrol grubu üyelerinden alınan plazma örnekleri kullanıldı. Bu örneklerin demografik ve klinik özellikleri Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Sitokin analizinde kullanılan AH ve kontrol örneklerinin demografik ve klinik özellikleri.

	Kontrol	AH
Örnek sayısı	25	25
Erkek/Kadın	14/11	14/11
Yaş	65.8 $\pm$ 7.02	73.2 $\pm$ 5.0
CDR	/	1.8 $\pm$ 0.7
MMSE	/	16.6 $\pm$ 3.3

Kullanılan kitte, standart ELISA yönteminden farklı olarak array formatı kullanıldı. Array formatı, cam slayt üzerine çoklu sitokin yakalayıcı spesifik antikorların dizilmesine dayanarak, tek bir deneyde birden fazla sitokinin tespit edilmesine olanak sağladı. Kit protokolüne göre, yakalayıcı antikor cam yüzeye bağlandı. Örnekle inkübasyon sonrasında, hedef sitokin katı yüzeye tutundu. Daha

sonra, hedef sitokinin farklı bir epitopunu tanıyan biyotin etiketli tespit antikorunu eklendi. Oluşan sitokin-antikor-biyotin kompleksi, lazer tarayıcı kullanılarak streptavidin-konjüge Cy3 boyası ile görüntülendi. Kitin çalışma mekanizmasının özeti Şekil 11'de gösterilmektedir.

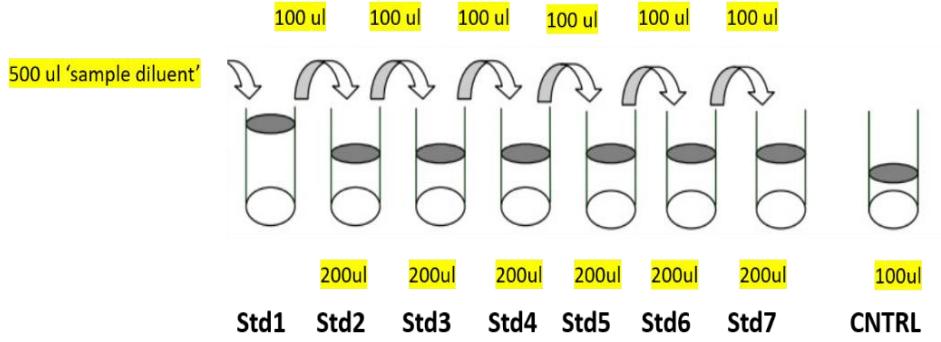


Şekil 11. Sitokin tarama testi çalışma mekanizması

3.2.2.2.1 Sitokin tarama testi örnek hazırlığı

Plazma örnekleri, daha önce Ficoll solüsyonu ile PBMC ayrımı sırasında alınarak dondurulmuştur. Her bir array için gerekli örnek hacmi 100 µl'dir. İlk olarak, cam slayt plastik kutu içerisinde 20-30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üzerindeki koruyucu film çıkarıldıktan sonra, slayt 1-2 saat kuruması için bırakılmıştır. Kuruyan slaytın kuyucuklarına 100 µl 'sample diluent' eklenmiş ve +4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, Şekil 12'de gösterildiği gibi, standart sitokinleri hazırlamak amacıyla liyofilize halde bulunan sitokin standart karışımına 500 µl 'sample diluent' eklenmiştir. 6 adet mikrosantrifüj tüpüne ise 200 µl 'sample diluent'

eklenmiştir. Ardından, 100 µl kullanılarak seri dilüsyonlar yapılmıştır. Kontrol tüpüne yalnızca 100 µl 'sample diluent' eklenmiş olup, negatif kontrol tüpüne standart sitokin ya da örnek eklenmemiştir.



Şekil 12. Standart sitokin hazırlığı

Her bir kuyucuktaki 'sample diluent' temizlenmiş ve kuyucuklara 100 µl standart sitokinler ile plazma örnekleri eklenmiştir. Array, 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, yıkama aşamasına geçilmiş; önce her bir kuyucuktaki örnekler ve standart sitokinler boşaltılmış, ardından 5 defa 5 dakika boyunca her kuyucuğa 150 µl 1X Wash Buffer 1 eklenerek oda sıcaklığında yıkanmıştır. 1X Wash Buffer 1 temizlendikten sonra, 2 defa 5 dakika boyunca 150 µl 1X Wash Buffer 2 ile yıkama işlemi tekrarlanmış ve ardından bu solüsyon da temizlenmiştir. Yıkama aşamasından sonra, biyotin etiketli tespit antikorunu sulandırmak amacıyla antikor 1.4 ml 'sample diluent' ile çözülmüş, ardından karışımdan her bir kuyucuğa 80 µl eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler kuyucuklardan boşaltılmış ve 5 defa 5 dakika boyunca 150 µl 1X Wash Buffer 1 ile, ardından 2 defa 150 µl 1X Wash Buffer 2 ile yıkanmıştır. Streptavidin-konjüge Cy3 boyası 1.4 ml 'sample diluent' ile sulandırılmış ve yıkanmış her bir kuyucuğa 80 µl eklenerek karanlıkta +4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, kuyucuklardaki antikor dökülüp, 5 defa 5 dakika boyunca 150 µl 1X Wash Buffer 1 ile oda sıcaklığında yıkanmıştır. Cam slayt aparatından çıkarıldıktan sonra slayt, yıkayıcı Falcon tüpüne yerleştirilmiş ve üzerini kaplayacak şekilde yaklaşık 30 ml 1X Wash Buffer 1 eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında çalkalanmıştır. 1X Wash Buffer 1 boşaltıldıktan

sonra, üzerine yine kaplayacak miktarda 1X Wash Buffer 2 eklenip 5 dakika boyunca hafifçe çalkalanmıştır. Yıkama solüsyonu dökülüp, cam slayt azot gazı ile kurutulmuş ve slayt analiz edilmek üzere ilgili firmaya gönderilmiştir.

3.2.2.2.2 Sitokin tarama testi analizi

Hazırlanan slayt, firmanın sunduğu hizmet kapsamında analiz edilmek üzere ilgili firmaya gönderilmiştir. Elde edilen sonuçlar, "İstatistiksel Analizler" başlığı altında belirtildiği şekilde değerlendirilmiş ve analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3 LC-MS/MS analizi

AH ve yaş uyumlu kontrol gruplarında, CD4+ ve CD8+ T lenfositleri, CD14+ monositleri ve CD19+ B lenfositleri hücre gruplarındaki protein farklılıklarını araştırmak amacıyla protein ekspresyon analizleri gerçekleştirildi.

3.2.2.3.1 FASP protokolü ile triptik peptitlerin hazırlanması

Hastalığın, dört periferik hücre alt grubunda protein profilleri üzerindeki etkisini araştırmak için LC-MS/MS analizi yapıldı. FACS analizi ile ayrıştırılan CD4+, CD8+, CD14+ ve CD19+ hücre pelletleri içerisinde proteaz inhibitörü bulunan 100 µl UPX ile çözülüp sonikatör yardımıyla lizisi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücreler 10 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra toplam hacmin 5 katı kadar aseton kullanılarak aseton presipitasyonu yapıldı. Örnek aseton içerisinde bir saat -20°C'de bekletildi. Beklemenin ardından 5 dakika 18000 g'de santrifüjü takiben aspire edildi ve aseton uçuruldu. Triptik peptit eldesi için FASP (Filter Aided Sample Preparation) kiti kullanıldı. Proteinler filtreli tüplere konuldu ve üzerine 200 µl 8 M üre eklendi. 14000 g'de 15 dk santrifüj edildi. İşlem 2 kere daha tekrar edildi. Toplama tüpünde biriken tüm sıvılar atıldı. İyodoasetamit (IAA, 10X) solüsyonu hazırlandı. Her 1X tüpte 50 mM IAA bulunmaktadır. 10 µl IAA (50 µM) ve 90 µl üre filtre üzerine eklendi ve kısa süreli vortex ardından örnek 40°C'de 1 dk bekletildi. Ardından 20 dk karanlık bir yerde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 14000 g'de 10 dk santrifüj edildi. 100 µl üre eklendi ve 14000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez daha tekrar edildi.

Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı. 100 µl 50 mM amonyum bikarbonat (ABC) filtre üzerine eklendi. 14000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrar edildi. Triptik peptit eldesi için örneğin üzerine 1 µg/75 µl tripsin solüsyonu eklendi ve gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Filtreler yeni tüplere alındı. 40 µl 50 mM ABC eklenip, 14000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Filtrelere 50 µl 0,5 M sodyum klorit eklendi ve yine 14000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Filtrat bu aşamadan sonra *digest* edilmiş proteinleri içermektedir. Örnekler LC-MS/MS analizi gerçekleştirilmek üzere cihaza verildi.

3.2.2.3.2 LC-MS/MS analizi

Protein ekspresyon analizlerinde nanoACQUITY UPLC M Class sistemi ile entegre çalışan SYNAPT Xevo G2-XS (Waters) cihazı kullanılmıştır. Analize başlamadan önce kolon sıcaklığı 45°C'ye ayarlanıp, %97 mobil faz A ile dengelenmiştir. MassLynx yazılımı ile LeuEnk (200 pg/µl) ve Glu-1-fibrinopeptid B (Glu-fib, 100 fmol/µl) standartları kullanılarak dedektör ve kalibrasyon ayarları yapılmıştır.

Triptik peptit örnekleri öncelikle Symmetry C18 trap kolonuna (5 µm, 180 µm i.d. x 20 mm, Waters) yüklendi, ardından analitik kolonda (CSH C18, 1,7 µm, 75 µm i.d. x 250 mm, Waters) %1 FA içeren ACN konsantrasyonu %4'ten %40'a kadar artırılarak peptitler hidrofobik özelliklerine göre ayrıştırılmıştır. Kalibrasyon amacıyla 100 fmol/µl konsantrasyondaki Glu-fib, 0,5 µl/dk akışla 60 saniye aralıklarla sisteme verilmiştir. Fraksiyonlara ayrılan peptitler ESI yöntemiyle iyonize edilmiş ve kütle spektrometrisinde pozitif modda analiz edilmiştir.

Kuadrupol, veri bağımsız toplama modu (data independent acquisition, DIA) SONAR'da sürekli olarak m/z 400 ila 900 aralığında, 24 Da geçiş genişliği ile tarandı. Ardışık MS ve MS/MS taramaları, düşük ve yüksek çarpışma enerjileri için sırasıyla 10 V (düşük çarpışma enerjisi (collision energy, CE)) ve 40 V (yüksek CE)'da gerçekleştirildi. Duyarlılık (sensitivity) modunda, 50 - 1950 m/z aralığındaki tüm iyonlar, öncül iyon seçimi yapılmaksızın birlikte parçalandı. Parçalanmış iyon

verilerinin alıkonma zamanları (retention time, AZ), ilgili öncüllerle hizalamak için kullanıldı.

Peptit özelliklerinin kantitatif analizi ve protein tanımlaması için Progenesis-QI (V.2.0 Water) yazılımı kullanıldı. Kalibrant olarak m/z 785,8426 değerine sahip Glu-fib peptidi kullanıldı ve örnek setleri toplam iyon yoğunluğuna göre normalize edildi. Yüksek ve düşük enerji eşikleri için işlem parametreleri sırasıyla 60 ve 10 olarak belirlendi. Veriler şu parametreler kullanılarak analiz edildi: peptit başına minimum parçalanmış iyon eşleşmesi sayısı = 2, protein başına minimum fragman iyon eşleşmesi sayısı = 5, protein başına minimum benzersiz peptit sayısı = 1, triptik sindirim için kaçırılan maksimum bölünme sayısı = 1, sabit modifikasyon = karbamidometil C, değişken modifikasyonlar = oksidasyon M ve deamidasyon N ve Q, yanlış keşif oranı (false discovery rate, FDR) $\leq$ %1. Sadece 2+ ve 3+ iyon yükleri seçildi. Örnekler arası normalizasyon için toplam iyon yoğunluğu kullanıldı. İfade değişiklikleri ile p ve q değerleri Progenesis QI for proteomics yazılımına dahil olan istatistik paketi ile hesaplandı. Ortaya çıkan veri seti, ANOVA p değeri $\leq$ 0,05, q değeri $\leq$ 0,05, benzersiz peptit sayısı $\geq$ 2 ve en az 1,5 kat fark gösteren proteinleri içerecek şekilde filtrelendi.

3.2.2.3.3 Biyoformatik analizler

Biyoformatik analizler için çeşitli yazılımlar kullanıldı. Öncelikle grup içlerinde AH ve kontrol arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla temel bileşenler analizi (PCA), Clustvis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) çevrimiçi yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Gen Ontoloji (GO) analizi; biyolojik süreçler (BP), hücresel bileşenler (CC), ve moleküler fonksiyonlar (MF) açısından anlamlı değişen proteinlerin işlevsel olarak açıklanmasını sağlamaktadır. GO analizleri ve Kyoto Genler ve Genler Ansiklopedisi (KEGG) yolak analizi DAVID (DAVID Bioinformatics Resources 2021) çevrimiçi yazılımında gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Benjamini- Hochberg p değeri < 0.05 filtresi ile sıralanarak “ggplot2” ve “Goplot” R paketleri kullanılarak görselleştirilmiştir (123,124). Anlamlı değişiklik gösteren proteinlerin protein-protein etkileşim (PPI)

analizleri STRING (125) veritabanı ile oluşturulmuştur ve Cytoscape (V 3.9.1) (126) yazılımı ile görselleştirilmiştir. Ağdaki hub proteinleri belirlemek amacıyla Cytoscape eklentisi olan “cytohubba” (127) kullanılmış ve Maksimum Komşuluk Bileşeni (MNC), Maksimal Klik Merkeziliği (MCC) ve Kenar Geçirgenliği Bileşeni (EPC) algoritmalarıyla değerlendirilmiştir. Belirlenen hub proteinlerin etkileşimleri ve ekspresyon seviyeleri “Omics Visualizer” (128) eklentisi ile görselleştirilmiştir. Daha sonra, merkez proteinlerin fonksiyonel karakterizasyonunu anlamak amacıyla ‘ClueGO’ (129) eklentisi kullanılmıştır. Bu eklenti, anlamlı değişen proteinlerin BP ve KEGG terimlerini Benjamini–Hochberg $p \leq 0.01$ filtresi ile analiz ederek, hub proteinlerin bu fonksiyonlar içindeki yerini belirlemeye yardımcı olmuştur.

3.2.2.4 Akış sitometrisi analizleri

CD4+, CD8+, CD14+ ve CD19+ hücre gruplarında ROS taraması ve mitokondriyal depolarizasyon testleri, Acıbadem Üniversitesi kampüsünde yer alan SZA Sağlık Araştırmaları A.Ş.’ye ait İnsan İmmünolojisi Araştırma Merkezi’nde bulunan Cytek cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.4.1 Reaktif oksijen türleri (ROS) taraması

ROS taraması için mitokondri izolasyonu gerektirmeyen Invitrogen markasına ait Mitosox Red (Thermo Fisher Scientific, No. M36008, Waltham, MA) ticari kiti kullanılmıştır. Sayımı yapılarak saklanan ve dondurulan PBMC’ler, 1 milyon canlı hücre olacak şekilde; CD3 (BV605; Biolegend; Cat#317322), CD14 (A700; Biolegend; Cat#325614), CD19 (PeCy7; Biolegend; Cat#302216), CD4 (BV510; Biolegend; Cat#317444) ve CD8 (Pacific Blue; Biolegend; Cat#301033) antikorları ile inkübe edilerek RPMI ile yıkanmıştır. Her bir vial içinde 50 µg bulunan Mitosox Red, 13 µL DMSO ile çözülüp 5 mM stok solüsyonu hazırlanmıştır. 1 mL %5 FBS’li PBS içerisinde bulunan 1 milyon PBMC içeren eppendorf tüplerine, final konsantrasyonu 4 µM olacak şekilde Mitosox Red eklenmiş ve hücreler 37°C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler, 300g’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve hücre pelletleri %5 FBS’li PBS ile iki kez yıkanmıştır. Analiz, Cytek

markalı akış sitometrisi ile gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar FlowJo yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.4.2 Mitokondriyal depolarizasyon testi

Mitokondriyal disfonksiyon testi için Invitrogen'e ait katyonik bir boya olan JC-1 (Thermo Fisher Scientific, No. T3168, Waltham, MA) kullanılmıştır. Mitokondriyal depolarizasyon, kırmızı floresan azalması (agregat formu, 585/590 nm'de absorpsiyon/emisyon) ve yeşil floresan artması (monomerik form, 510/527 nm'de absorpsiyon/emisyon) ile tanımlanmıştır. Antikor boyamaları ile yapılan örnek hazırlığı ROS taraması başlığı altında açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

5 mg JC-1 boyası, 1 mL DMSO ile çözülerek stok solüsyonu hazırlanmıştır. 1 mL %5 FBS'li PBS içindeki canlı PBMC hücrelerine 0.3 µg/mL konsantrasyonunda JC-1 boyası eklenmiş ve hücreler 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler, 4°C'de 300g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre pelletleri, %5 FBS'li PBS ile iki kez yıkanmış ve Cytex markalı akış sitometrisi ile analiz gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, aynı örnek grubu ile mitokondriyal fonksiyonu daha detaylı değerlendirmek için, mitokondriyal membran boyunca K⁺ iyon taşınmasını kolaylaştıran valinomisin (Thermo Fisher Scientific, V1644, Waltham, MA) kullanılmıştır. Valinomisin, mitokondriyal elektrokimyasal gradyanı bozmak amacıyla JC-1 boyaması öncesinde uygulanmış ve ardından akış sitometrisi ile analiz edilmiştir.

3.2.2.4.3 İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler ve grafikler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin dağılımı Shapiro-Wilk normalite testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerin anlamlılığı Bağımsız T-testi ile normal dağılım göstermeyen verilerin ise Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Üç veya daha fazla grup arasındaki karşılaştırmalar için Tek Yönlü ANOVA ve Dunnett's post hoc testi veya Kruskal-Wallis testi ve Dunn'un çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. İki bağımsız değişken içeren çoklu karşılaştırmalar için İki Yönlü

ANOVA ve Tukey's post hoc testi uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiş olup, istatistiksel anlamlılık seviyeleri şu şekilde belirlenmiştir: $p < 0.05$ (* or #), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ ***), $p < 0.0001$ (****).



4 BULGULAR

4.1 Periferik Kandan Mononükleer Hücre Ayrımı

Kriterlere uygun bireylerden 20 AH ve 23 kontrol olmak üzere kan örnekleri toplandı. Toplanan kanlardan bölüm 3.2.2 başlığı altında anlatıldığı gibi PBMC izolasyonu gerçekleştirildi. Toplanmış olan örneklerden elde edilen hücre sayıları Tablo 7 ve Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 7. AH örnekleri ile ayrılan PBMC sayıları.

AH Örnekleri	PBMC Sayıları	AH örnekleri	PBMC Sayıları
H1	27M	H11	25M
H2	27M	H12	35M
H3	20M	H13	35M
H4	26M	H14	26M
H5	28M	H15	45M
H6	21M	H16	25M
H7	23M	H17	20M
H8	30M	H18	50M
H9	35M	H19	30M
H10	27M	H20	30M

Tablo 8. Kontrol örnekleri ile ayrılan PBMC sayıları

Kontrol Örnekleri	PBMC Sayıları	Kontrol Örnekleri	PBMC Sayıları
K1	63M	K13	25M
K2	75M	K14	20M
K3	30M	K15	20M
K4	54M	K16	20M
K5	40M	K17	25M
K6	46M	K18	25M
K7	69M	K19	20M
K8	52M	K20	15M
K9	20M	K21	40M
K10	30M	K22	20M
K11	30M	K23	21M
K12	30M		

4.2 FACS Analizi

Dondurulmuş olan PBMC hücrelerinden 3.2.2.1 başlığı altında açıklandığı gibi 4 hücre alt grubu için FACS analizi yapılarak hücre ayrımı yapılmıştır. AH ve kontrol örneklerinden FACS analizi sonucunda elde edilen hücre sayıları Tablo 9 ve Tablo 10'da gösterilmektedir.

4.2.1 AH grubu FACS analizi sonuçları

AH örneklerinden elde edilen PBMC ile gerçekleştirilen hücre ayrımı analizi sonucunda toplanan 4 hücre alt grubu sayıları Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. AH PBMC örneklerinden FACS sonrası elde edilen hücre sayıları.

AH Örnekleri	CD4+	CD8+	CD14+	CD19+
H1	1.1M	200K	150K	2M
H2	1.9M	350K	450K	160K
H3	1M	200K	200K	225K
H4	2M	300K	75K	620K
H5	2.1M	800K	50K	750K
H6	2M	660K	250K	75K
H7	1.1M	300K	50K	1.1M
H8	1M	350K	100K	400K
H9	800K	250K	75K	225K
H10	1.4M	225K	75K	125K
H11	8500K	360K	60K	185K
H12	1M	800K	50K	150K
H13	1.3M	250K	50K	660K
H14	1.2M	310K	325K	260K
H15	1.7M	650K	75K	600K
H16	1.1M	400K	125K	300K
H17	900K	300K	180K	50K
H18	1M	300K	70K	250K
H19	1.4M	400K	500K	420K
H20	2.9M	375K	200K	2M

4.2.2 Kontrol grubu FACS analizi sonuçları

Kontrol örneklerinden elde edilen PBMC ile gerçekleştirilen hücre ayırımı analizi sonucunda toplanan 4 hücre alt grubu sayıları Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 10. Kontrol PBMC örneklerinden FACS sonrası elde edilen hücre sayıları.

Kontrol Örnekleri	CD4+	CD8+	CD14+	CD19+
K1	2M	250K	50K	400K
K2	2.4M	500K	90K	400K
K3	1.3M	500K	50K	200K
K4	3.3M	840K	50K	325K
K5	2.8M	300K	160K	450K
K6	2M	900K	130K	450K
K7	1.4M	675K	50K	715K
K8	2M	300K	50K	500K
K9	2M	350K	100K	150K
K10	2.4M	350K	50K	700K
K11	1.7M	400K	50K	400K
K12	1.2M	300K	100K	150K
K13	1.4M	400K	50K	200K
K14	1.5M	300K	150K	600K
K15	800K	300K	200K	600K
K16	1M	275K	125K	275K
K17	950K	350K	200K	250K
K18	900K	300K	100K	150K
K19	1.8M	200K	150K	800K
K20	1.4M	425K	50K	660K
K21	800K	300K	60K	180K
K22	1.4M	260K	50K	1.1M
K23	1.2M	380K	75K	225K

4.3 Dört Periferik Hücre Alt Grubunda Protein Ekspresyon Farklılıklarının LC-MS/MS Analizi ile Tespiti

AH ve kontrol örneklerinden elde edilen 4 hücre alt grubu ile gerçekleştirilen nano LC-MS/MS analizinde tanımlanan proteinlerin sayıları Tablo 11’de gösterilmiştir. Protein ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılık 4 kritere göre belirlenmiş olup biyoinformatik analizler bu protein listeleri ile yapılmıştır: özgül peptit sayısı (öps, unique peptide) ≥ 2 , $p \leq 0.05$, $q \leq 0.05$, değişim oranı (DO, fold change) ≥ 1.5 .

Tablo 11. LC-MS/MS analizi ile 4 hücre alt grubunda tanımlanan protein sayıları.

Hücre tipi	Tanımlanan toplam protein sayısı	$p < 0.05$	$DO \geq 1.5$; $\text{öps} \geq 2$; $q \leq 0.05$ ve $p \leq 0.05$
CD4+	1352	608	387
CD8+	570	183	121
CD14+	532	3	0
CD19+	443	0	0

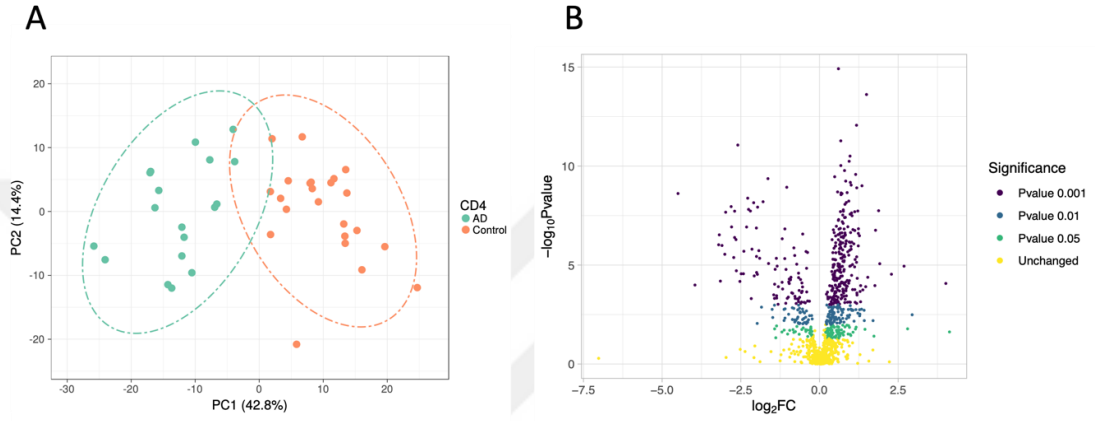
Tablo 11’de gösterilen CD14+ ve CD19+ hücrelerine ait sonuçlar, yapılan ön çalışmanın bulgularıdır. AH ve kontrol grupları arasında bu iki hücre alt grubunda anlamlı bir fark bulunmaması nedeniyle, CD14+ ve CD19+ hücreleri için analizler tüm örnekler üzerinde gerçekleştirilmemiş ve biyoinformatik analizler yapılmamıştır.

4.4 Biyoinformatik Analizler

Yapılan ön çalışma sonucunda, tüm AH ve kontrol örneklerinin CD4+ ve CD8+ T hücreleri ile LC-MS/MS analizleri tamamlanmış ve daha önce belirtilen dört kriter ($DO \geq 1.5$; $\text{öps} \geq 2$; $q \leq 0.05$ ve $p \leq 0.05$) doğrultusunda anlamlı proteinler tanımlanarak biyoinformatik analizler yürütülmüştür. 3.2.2.3.3 başlığı altında belirtildiği gibi, analizler temel olarak anlamlı proteinlerin GO ve KEGG yolak analizlerinin ardından PPI ağındaki hub proteinlerin tanımlanması, bu proteinlerin fonksiyonlarının ve katıldıkları yolların incelenmesine dayanmaktadır.

4.4.1 CD4+ T hücreleri

CD4+ T hücrelerinde AH ve kontrol gruplarına ait proteomun, PCA analizi sonucunda, PC1 (%42,8) ve PC2 (%14,4) bileşenleri belirgin bir şekilde ayrılmıştır (Şekil 13A). CD4+ T hücrelerinde tanımlanan tüm proteinlerin anlamlılık ve ekspresyonel farklılıkları volkan grafiği ile Şekil 13B’de gösterilmektedir.



Şekil 13. CD4+ T hücrelerinin PCA ve volkan grafiği analizi.

(A) CD4+ T hücrelerinin anlamlı farklılık gösteren proteinlere göre PCA grafiği. (B) CD4+ T hücrelerinde tanımlanan proteinlerin volkan grafiği. X eksenini $\log_2$ DO ($\log_2$ FC) göstermektedir. Y eksenini ise $-\log_{10}$ p değerini temsil etmektedir. Renkli noktalar anlamlı düzeyde değişen proteinleri ($p < 0.001$, < 0.01 , < 0.05) gösterirken, sarı noktalar anlamlı değişim göstermeyen proteinleri temsil etmektedir.

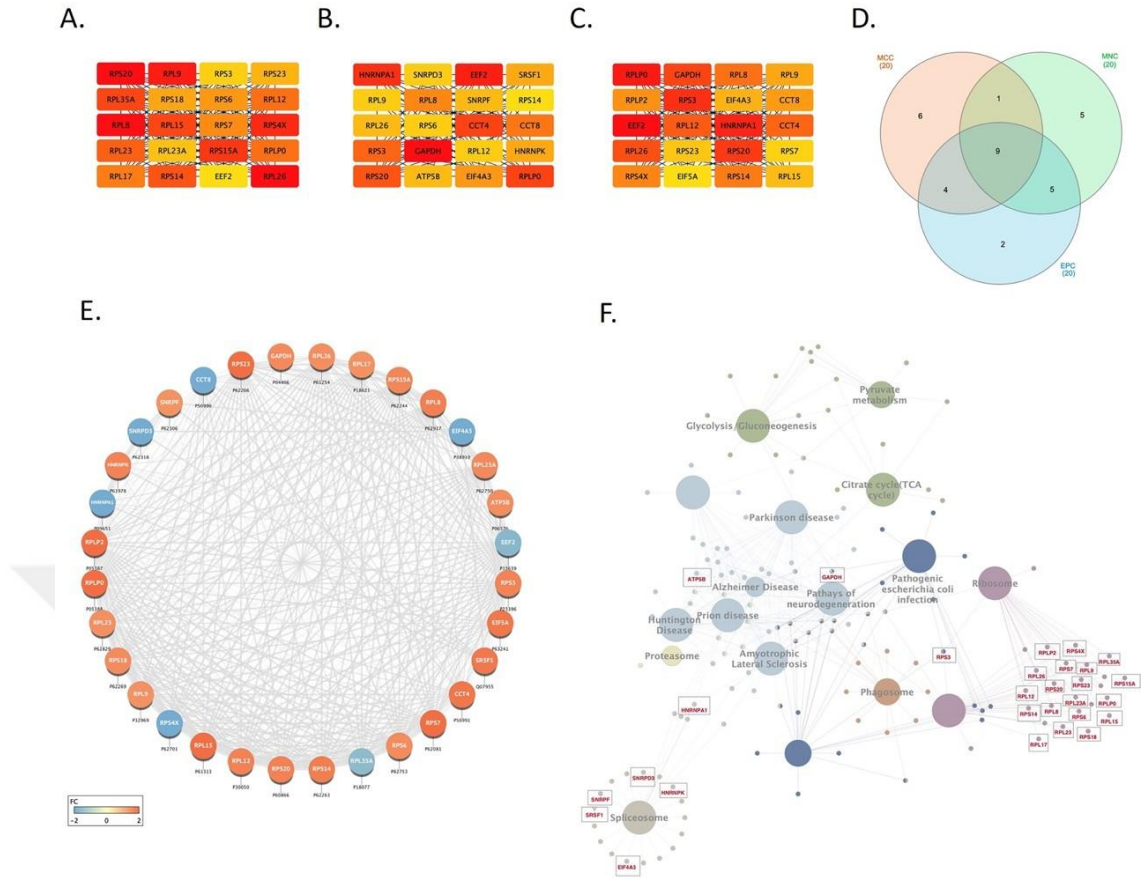
CD4+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren 387 proteinin fonksiyonlarını anlamak ve AH ile ilişkisini incelemek amacıyla GO ve KEGG yolları analizleri gerçekleştirildi (Şekil 14). GO zenginleştirme analizine göre, CD4+ grubunda tanımlanan anlamlı proteinlerin nükleozom paketlenmesi, sitoplazmik translasyon, translasyon, telomer organizasyonu ve splisozom aracılı mRNA uçbirleştirme BP terimlerinde önemli ölçüde zenginleştiği görülmüştür (Şekil 14A). CC terimleri sitozol, hücre dışı eksozom, çekirdek, nükleoplazma ve mitokondri bileşenlerini içermektedir (Şekil 14A). Ayrıca protein, RNA, DNA, kaderin ve GTP bağlanması MF terimlerinde de zenginleşme gözlenmiştir (Şekil 14A). Proteinlerin en anlamlı zenginleştiği GO terimleri ve bu terimlerle ilişkili proteinler, chord diyagramında gösterilmektedir (Şekil 14B).

KEGG analiz sonuçlarına göre proteinlerin en çok Amyotrofik lateral skleroz (ALS), Parkinson hastalığı (PD), Prion hastalığı (PrD), Huntington hastalığı (HD) ve AH gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili yollarda, ayrıca nötrofil hücre dışı tuzakları ve ribozom ile ilişkili yollarda zenginleştiği görülmektedir (Şekil 14C). Ek olarak, CD4+ T hücrelerinde AH ile enerji metabolizmasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla, ilgili GO ve KEGG terimlerinde zenginleşen proteinlerin ekspresyon seviyeleri incelendi (Şekil 14D). Bu terimler, nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili yollar arasında yer alan nörodejenerasyon-multiple hastalıklar, ALS, Parkinson hastalığı (PD), Prion hastalığı (PrD), Huntington hastalığı (HD) ve AH'nin yanı sıra karbon metabolizması, glikoliz/glukoneogenez, sitrat döngüsü (TCA), piruvat metabolizması ve oksidatif fosforilasyon gibi metabolik yolları içermektedir. Analiz sonuçları, 76 proteinin CD4+ T hücrelerinde hem AH ile hem de enerji metabolizmasıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Anlamalı değişen proteinlerin arasındaki etkileşimi ortaya koymak ve aę içerisindeki önemli rolleri ve bağlantıları gösteren daha yüksek dereceli proteinleri tanımlamak amacıyla önce PPI analizi yapılıp sonra cytoHubba eklentisi ile MNC, MCC ve EPC algoritmaları ile hub proteinler belirlenmiştir. MNC, MCC ve EPC algoritmalarıyla hesaplanan ilk 20 hub proteinini şekil 15A-C’de gösterilmektedir.  algoritmanın kesişiminde yer alan hub proteinler EEF2, RPL26, RPL9, RPS20, RPS3, RPLP0, RPL12, RPS14 ve RPL8’dir (şekil 15D). Toplamda elde edilen hub protein sayısı 32 olup, bunlar şu şekildedir: RPL17, RPS18, RPL23A, RPS15A, RPL35A, RPL23, ATP5B, SNRPD3, SNRPF, HNRNPK, SRSF1, RPLP2, EIF5A, RPS23, RPS7, RPL15, RPS4X, CCT4, CCT8, EIF4A3, GAPDH, HNRNPA1, EEF2, RPL26, RPL9, RPS20, RPS3, RPLP0, RPL12, RPS14, RPL8, RPS6, ve bu proteinlerin kısa açıklamaları Tablo 12’de sunulmuştur.

Hub proteinlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve ekspresyon düzeyleri şekil 15E’de gösterilmektedir. Sonuçlar bu proteinlerin yüksek oranda birbirleriyle etkileşim halinde olduğunu, 25 proteinin AH grubunda ekspresyonlarını arttığını 7 proteinin ise azaldığını göstermektedir.

CD4+ T hücrelerinde anlamalı değişim gösteren proteinlerin ilişkili olduğu yolaklar ile hub proteinlerin bu yolaklardaki yerini gösteren ClueGO analiz sonuçları şekil 15F’de gösterilmektedir. ATP5B, HNRNPA1 ve GAPDH proteinleri ALS, PD, PrD, HD ve AH gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili yolaklarda yer almaktadır. GAPDH proteini, glikoliz/glukoneogenez, TCA, pirüvat metabolizması ve patojenik Escherichia coli (E.coli) enfeksiyon yolaklarında da yer almaktadır. Ayrıca, EIF4A3, HNRNPK, HNRNPA1, SNRPD3, SRSF1 ve SNRPF proteinleri ise splisozom kompleksi içinde önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, ribozomal hub proteinler, ribozom yolaklarıyla ilişkilidir.



Şekil 15. CD4+ T hücrelerinde hub protein analizi.

(A, B, C) Cytoscape yazılımındaki cytoHubba eklentisi, MNC, MCC ve EPC algoritmalarıyla 20 hub proteini tanımlamak için kullanılmıştır. (D) EPC, MCC ve MNC algoritmaları tarafından tanımlanan ortak hub proteinleri gösteren Venn diyagramı. (E) Hub proteinlerinin etkileşim ağı ve ekspresyon düzeyleri. (F) CD4+ T hücrelerinde anlamlı değişiklik gösteren proteinlerin KEGG analizinde hub proteinlerin önemli derecede yer aldığı yollar.

Tablo 12. CD4+ hub protein listesi.

Uniprot ID	Gen ismi	Protein ismi	DO
P18621	RPL17	60S ribosomal protein L17	1.5
P62269	RPS18	40S ribosomal protein S18	1.6
P62750	RPL23A	60S ribosomal protein L23a	1.6
P62244	RPS15A	Small ribosomal subunit protein uS8	1.6
P18077	RPL35A	60S ribosomal protein L35a	-1.6
P62829	RPL23	60S ribosomal protein L23	1.5
P06576	ATP5B	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	1.6
P62318	SNRPD3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	-3.6
P62306	SNRPF	Small nuclear ribonucleoprotein F	1.5
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	1.7
Q07955	SRSF1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	1.8
P05387	RPLP2	Large ribosomal subunit protein P2	2.4
P63241	EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	1.9
P62266	RPS23	Small ribosomal subunit protein uS12	2.1
P62081	RPS7	Small ribosomal subunit protein eS7	2.1
P61313	RPL15	Large ribosomal subunit protein eL15	1.9
P62701	RPS4X	Small ribosomal subunit protein eS4, X isoform	-2.5
P50991	CCT4	T-complex protein 1 subunit delta	1.8
P50990	CCT8	T-complex protein 1 subunit theta	-4.6
P38919	EIF4A3	Eukaryotic initiation factor 4A-III	-2.7
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.6

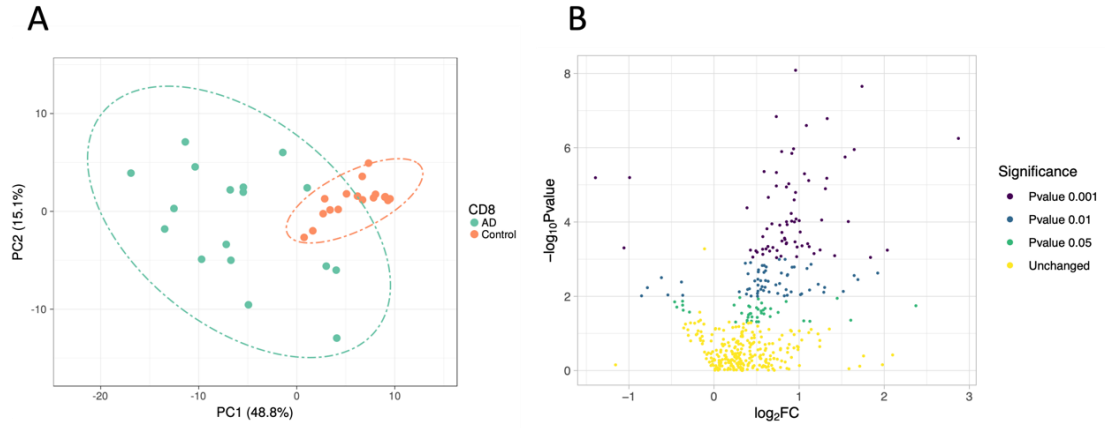
Tablo 12. CD4+ hub protein listesi (devam).

P09651	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	-4.9
P13639	EEF2	Elongation factor 2	-1.7
P61254	RPL26	Large ribosomal subunit protein uL24	1.5
P32969	RPL9	Large ribosomal subunit protein uL6	1.5
P60866	RPS20	Small ribosomal subunit protein uS10	1.7
P23396	RPS3	Small ribosomal subunit protein uS3	1.7
P05388	RPLP0	Large ribosomal subunit protein uL10	2.0
P30050	RPL12	Large ribosomal subunit protein uL11	1.7
P62263	RPS14	Small ribosomal subunit protein uS11	1.7
P62917	RPL8	Large ribosomal subunit protein uL2	1.7
P62753	RPS6	Small ribosomal subunit protein eS6	1.5

4.4.2 CD8+ T hücreleri

CD8+ hücre alt grubunda gerçekleştirilen biyoinformatik analizler, CD4+ gurubundaki analizlerle benzer şekildedir.

CD8+ T hücrelerinde AH ve kontrol gruplarına ait proteomun, PCA analizi sonucunda PC1 (%48,8) ve PC2 (%15,1) bileşenleri ile belirgin bir şekilde ayrılmıştır (Şekil 16A). CD8+ T hücrelerinde tanımlanan tüm proteinlerin anlamlılık ve ekspresyon farklılıkları volkan grafiği ile Şekil 16B’de gösterilmektedir.



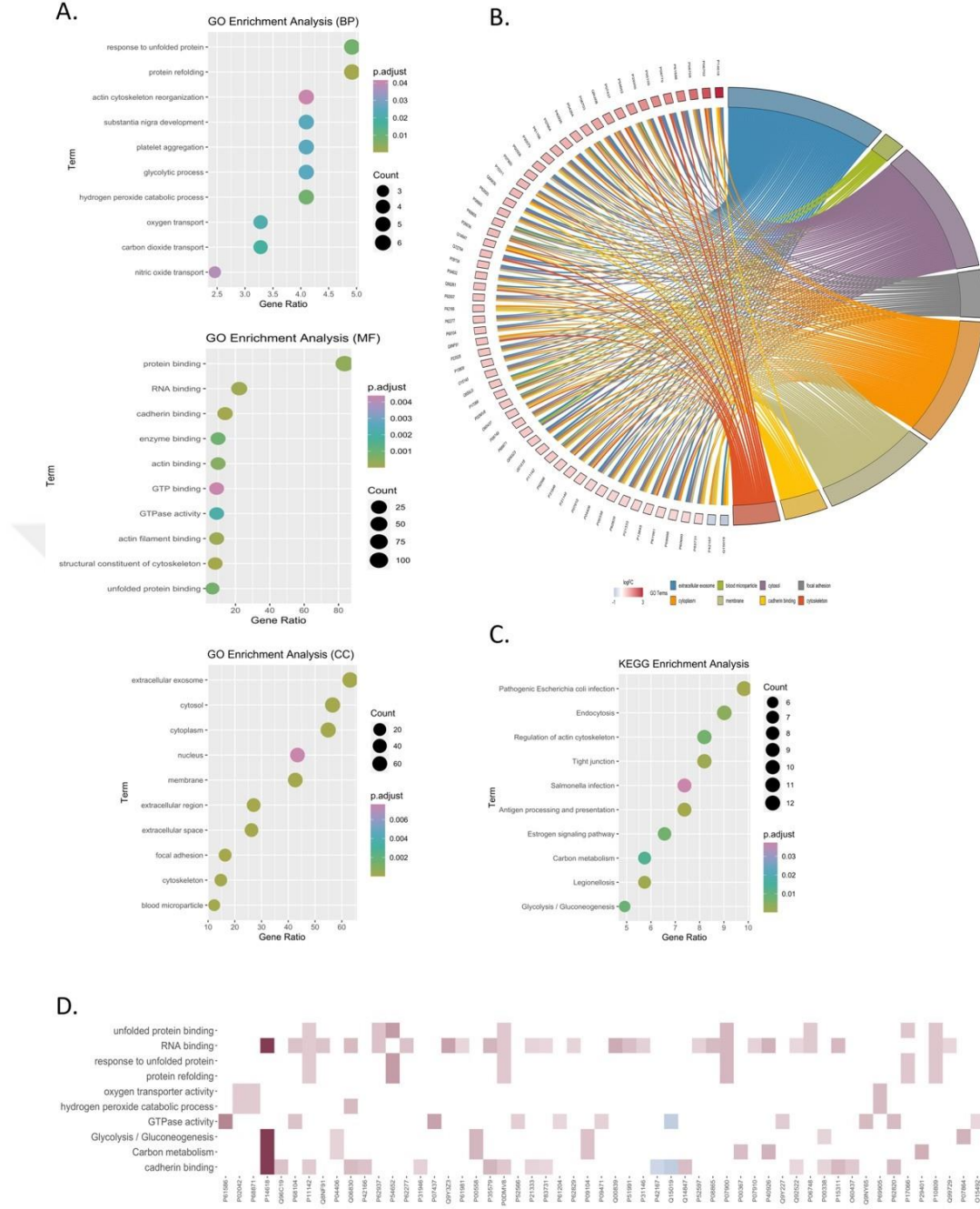
Şekil 16. CD8+ T hücrelerinin PCA ve volkan grafiği analizi.

(A) CD8+ T hücrelerinin anlamlı farklılık gösteren proteinlere göre PCA grafiği. (B) CD8+ T hücrelerinde tanımlanan proteinlerin volkan grafiği. X eksenini $\log_2$ DO ($\log_2$ FC) göstermektedir. Y eksenini ise $-\log_{10}$ p değerini temsil etmektedir. Renkli noktalar anlamlı düzeyde değişen proteinleri ($p < 0.001$, < 0.01 , < 0.05) gösterirken, sarı noktalar anlamlı değişim göstermeyen proteinleri temsil etmektedir.

CD8+ grubunda anlamlı olarak tanımlanan 121 proteinin GO zenginleştirme analizi sonuçları bu proteinlerin en çok katlanmamış proteine yanıt, protein katlanması, aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesi, substantia nigra gelişimi, trombosit agregasyonu ve glikolitik süreç BP terimlerinde zenginleştiğini göstermektedir (Şekil 17A). MF terimlerinde; protein, RNA, kaderin, enzim, aktin ve GTP bağlanması ön plana çıkarken, CC terimleri hücre dışı ekzozom, sitozol, sitoplazma, çekirdek bileşenlerini içermektedir (Şekil 17A). Proteinlerin en çok zenginleştiği GO terimleri ve bu terimlerle ilişkili proteinler, chord diyagramında gösterilmektedir (Şekil 17B).

KEGG analizinde ise patojenik *E. coli* enfeksiyonu, endositoz, sıkı bağlantılar (*tight junctions*), aktin iskeletinin düzenlenmesi, karbon metabolizması ve glikoliz/glukoneogenez ile ilişkili terimler belirlenmiştir (Şekil 17C). CD8+ hücre grubunda nörodejenerasyon ve enerji metabolizması ile ilişkili GO ve KEGG terimlerine karşılık gelen proteinler ve bunların ekspresyon seviyeleri Şekil 17D’de sunulmuştur. Bu terimler arasında katlanmamış protein bağlanması, RNA bağlanması, katlanmamış proteine yanıt, protein yeniden katlanması, oksijen taşıma aktivitesi, hidrojen peroksit yıkım süreci, GTPaz aktivitesi, glikoliz/glukoneogenez, karbon metabolizması ve kaderin bağlanması yer almaktadır. Bu terimler, CD8+ hücre grubunda anlamlı düzeyde değişim gösteren 61 proteinle ilişkilidir.





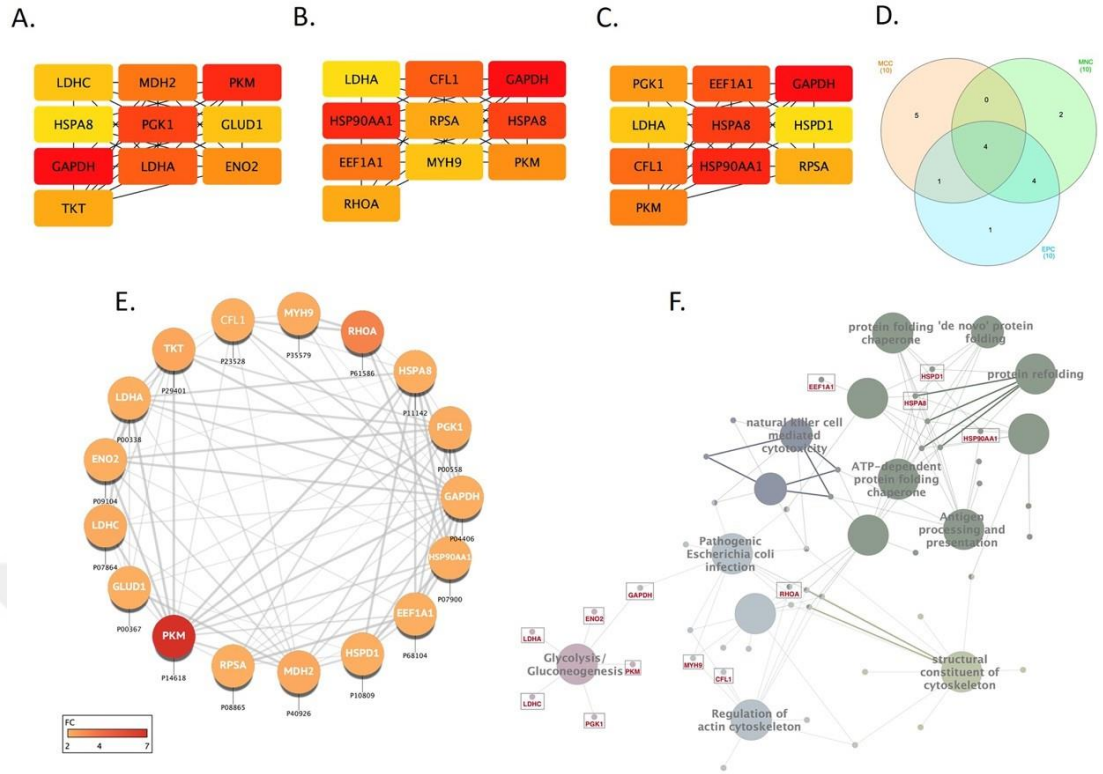
Şekil 17. CD8+ T hücrelerinde anlamlı değişiklik gösteren proteinlerin zenginleştiği yollar.

(A) Grafikler, GO analizi sonuçlarını göstermektedir. (B) Proteinlerin en anlamlı zenginleştiği GO terimlerinin chord diyagramı. (C) KEGG zenginleşme analizi. (D) Nörodejenerasyon ve enerji metabolizmasıyla ilişkili GO ve KEGG terimlerini içeren proteinlerin ısı haritası.

CD8+ grubunda önce PPI analizi yapılmıştır. Daha sonra, MNC, MCC ve EPC algoritmaları kullanılarak, ilk 10 hub proteini belirlenmiş ve HSPA8, PKM, GAPDH ve LDHA'nın tüm algoritmalarda ortak hub proteinler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 18A-D). Tanımlanan 17 hub protein şunlardır: CFL1, EEF1A1, ENO2, GAPDH, GLUD1, HSP90AA1, HSPA8, HSPD1, LDHA, LDHC, MDH2, MYH9, PGK1, PKM, RHOA, RPSA ve TKT (Tablo 13).

Şekil 18E, hub proteinlerin bağlantılarını ve ekspresyon seviyelerini göstermektedir. Dikkat çekici bir şekilde, tüm hub proteinlerin yüksek derecede birbirleriyle ilişkili olduğu ve AH grubunda artmış ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir.

CD8+ grubundaki anlamlı değişen proteinlerin dahil olduğu yollar ve biyolojik süreçlerde hub proteinlerin önemini değerlendirmek amacıyla, CD4+ grubunda gerçekleştirilen analize benzer şekilde bir ClueGO analizi yapılmıştır (Şekil 18F). Hub proteinlerden EEF1A1, HSP90AA1, HSPA8 ve HSPD1'in protein katlanması süreçlerinde görev aldığı, protein katlanma şaperonları, *de novo* protein katlanması, protein yeniden katlanması ve ATP bağımlı protein katlanma şaperonları olarak işlev gördüğü ve ayrıca antijen işleme ve sunum süreçlerinde rol oynadığı belirlenmiştir. MYH9, CFL1 ve RHOA'nın ise patojenik *E. coli* enfeksiyonu ve aktin iskeletinin düzenlenmesi süreçlerinde yer aldığı tespit edilmiştir. MYH9 ayrıca hücre iskeleti yapısının korunmasıyla ilişkilidir. Bunun yanı sıra, ENO2, GAPDH, LDHA, LDHC, PGK1 ve PKM'nin glikoliz/glukoneogenez yollarıyla bağlantılı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 18. CD8+ T hücrelerinde hub protein analizi.

(A, B, C) Cytoscape yazılımındaki cytoHubba eklentisi, MNC, MCC ve EPC algoritmalarıyla ilk 10 hub proteini tanımlamak için kullanılmıştır. (D) EPC, MCC ve MNC algoritmaları tarafından tanımlanan ortak hub proteinlerini gösteren Venn diyagramı. (E) Hub proteinlerinin etkileşim ağı ve ekspresyon düzeyleri. (F) CD8+ T hücrelerinde anlamlı değişiklik gösteren proteinlerin yolak analizinde hub proteinlerin önemli derecede yer aldığı KEGG ve BP terimleri.

Tablo 13. CD8+ hub protein listesi.

Uniprot ID	Gen ismi	Protein ismi	DO
P00367	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	1.9
P07864	LDHC	L-lactate dehydrogenase C chain	2.1
P29401	TKT	Transketolase	2.2
P09104	ENO2	Gamma-enolase	1.8
P40926	MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	2.1
P61586	RHOA	Transforming protein RhoA	3.3
P35579	MYH9	Myosin-9	2.0
P10809	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	1.7
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	2.0
P68104	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	1.7
P07900	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	2.0
P23528	CFL1	Cofilin-1	1.7
P08865	RPSA	Small ribosomal subunit protein uS2	1.9
P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	1.6
P14618	PKM	Pyruvate kinase PKM	7.3
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.5
P00338	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	1.5

4.4.3 CD4+ ve CD8+ ortak proteinleri

CD4+ ve CD8+ grubunda tanımlanan anlamlı ve AH-kontrol arasında en az 1.5 kat değişim gösteren 39 tane ortak protein bulunmaktadır (Tablo 14). Bu proteinlerden RPL23 CD4+ grubunda hub olarak tanımlanmış ve hem CD4+ hem CD8+'de artmıştır. RHOA, GLUD1, MDH2, LDHA ve CFL1 CD8+ grubunda hub olarak tanımlanmıştır ve iki hücre alt grubunda da artış göstermiştir. GAPDH proteini ise hem CD4+ hem CD8+ grubunda hub olarak tanımlanmış ve iki grupta da artış göstermiştir. Bu proteinlerden ENO2 (CD8+ hub), TMPO, TAP1, TUBA8, HSPA2, HSP6 ve KRT16 CD4+ grubunda azalırken CD8+ grubunda artmıştır.

Tablo 14. CD4+ ve CD8+ grubunda tanımlanan ortak protein listesi.

Uniprot ID	Gen ismi	Protein ismi	DO (CD4+)	DO (CD8+)
P31146	CORO1A	Coronin-1A	1.46	1.57
P06748	NPM1	Nucleophosmin	1.46	1.69
P33241	LSP1	Lymphocyte-specific protein 1	1.49	2.91
P61204	ARF3	ADP-ribosylation factor 3	1.50	1.49
P08758	ANXA5	Annexin A5	1.52	4.10
P62829	RPL23	60S ribosomal protein L23	1.52	1.52
P61586	RHOA	Transforming protein RhoA	1.54	3.34
P13645	KRT10	Keratin_ type I cytoskeletal 10	1.54	1.50
P83731	RPL24	60S ribosomal protein L24	1.55	1.47
P00367	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1_ mitochondrial	1.55	1.91
P07437	TUBB	Tubulin beta chain	1.55	2.51
P40926	MDH2	Malate dehydrogenase_ mitochondrial	1.59	2.13
O15145	ARPC3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	1.59	1.74
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.59	1.53
P00338	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	1.60	1.52
P31946	YWHAB	14-3-3 protein beta/alpha	1.60	1.59
P60660	MYL6	Myosin light polypeptide 6	1.60	1.48
Q9NWB7	IFT57	Intraflagellar transport protein 57 homolog	-1.72	-1.80
P04632	CAPNS1	Calpain small subunit 1	1.74	1.82

Tablo 14. CD4+ ve CD8+ grubunda tanımlanan ortak protein listesi (devam).

P26038	MSN	Moesin	1.75	1.93
P04264	KRT1	Keratin_ type II cytoskeletal 1	1.77	2.17
P06703	S100A6	Protein S100-A6	1.86	2.40
P02775	PPBP	Platelet basic protein	1.88	2.44
P05109	S100A8	Protein S100-A8	1.91	3.13
P59998	ARPC4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	1.92	1.49
P49755	TMED10	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	1.97	1.52
P09104	ENO2	Gamma-enolase	-2.02	1.84
P23528	CFL1	Cofilin-1	2.03	1.77
Q8NG31	KNL1	Kinetochore scaffold 1	2.06	2.18
P42166	TMPO	Lamina-associated polypeptide 2_ isoform alpha	-2.14	1.81
Q03518	TAP1	Antigen peptide transporter 1	-2.18	2.34
Q9Y536	PPIAL4A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A	2.26	1.92
P20718	GZMH	Granzyme H	2.35	2.73
Q99729	HNRNPAB	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	2.55	1.50
Q9NY65	TUBA8	Tubulin alpha-8 chain	-2.62	1.96
P54652	HSPA2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	-2.80	2.67
P06702	S100A9	Protein S100-A9	3.25	5.18
P08779	KRT16	Keratin_ type I cytoskeletal 16	-5.29	3.13
P17066	HSPA6	Heat shock 70 kDa protein 6	-7.90	1.73

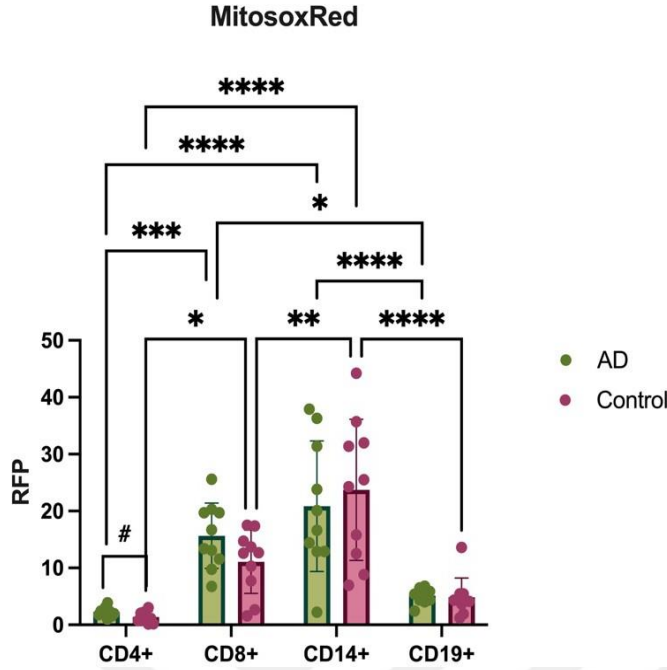
4.5 Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Analizi Sonuçları

CD4+, CD8+, CD14+ ve CD19+ hücre alt gruplarındaki mitokondriyal ROS seviyeleri MitoSOX Red kullanılarak 10 AH ve 10 kontrol örneklerinde değerlendirildi. ROS seviyeleri, RFP floresans şiddeti ile temsil edilmekte olup Şekil 19A'da gösterilmektedir. AH ve kontrol gruplarında, hem hücre alt kümeleri arasında hem de her bir hücre alt grubu içinde mitokondriyal ROS seviyelerindeki farklılıkları değerlendirmek için iki yönlü ANOVA ve eşleştirilmemiş t-testi uygulanmıştır.

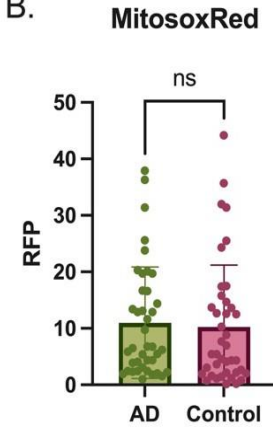
Mitokondriyal ROS seviyeleri hem hücre alt grupları arasında hem de her bir hücre alt grubu içinde anlamlı farklılıklar göstermiştir. Hücreler arası çoklu karşılaştırmalarda, AH grubunda, CD4+ hücrelerinin mitokondriyal ROS seviyeleri, CD8+ ($p < 0.001$) ve CD14+ ($p < 0.0001$) hücrelerine kıyasla anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, CD8+ hücreleri CD19+ hücrelerine göre daha yüksek ROS seviyeleri sergilemiştir ($p < 0.05$), benzer şekilde CD14+ hücrelerinin de CD19+ hücrelerine kıyasla belirgin şekilde daha yüksek ROS seviyelerine sahip olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$). Kontrol grubunda ise CD4+ hücreleri, CD8+ ($p < 0.05$) ve CD14+ ($p < 0.0001$) hücrelerine göre daha düşük mitokondriyal ROS seviyeleri sergilemiştir. Ayrıca, CD8+ hücrelerinin CD14+ hücrelerine kıyasla ROS seviyeleri daha düşük bulunmuştur ($p < 0.01$). Son olarak, CD14+ hücreleri, CD19+ hücrelerine göre anlamlı derecede daha yüksek ROS seviyeleri göstermiştir ($p < 0.0001$).

Hücre alt grupları içinde AH ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, yalnızca CD4+ T hücrelerinde AH grubunda anlamlı derecede daha yüksek ROS seviyesi gözlenmiş ($p < 0.05$), diğer alt gruplarda ise anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca, hücre tipinden bağımsız olarak ROS seviyeleri karşılaştırıldığında, AH ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 19B). Bu durum, oksidatif stres değişikliklerinin hücre tipine özgü olduğunu vurgulamaktadır.

A.



B.



Şekil 19. Mitokondiyal ROS seviyelerinin hücre alt grupları arasında ve her bir hücre grubu içinde karşılaştırılması.

(A) ROS seviyelerinin çoklu karşılaştırılması. (B) Tüm hücre alt grupları ile AH ve kontrol arasındaki ROS seviyelerinin karşılaştırılması. Veriler, iki yönlü ANOVA ve Tukey'nin post hoc çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiş; her bir hücre grubu içindeki karşılaştırmalar için eşleştirilmemiş t-testi uygulanmıştır. Grafikler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. $p < 0.05$ (* or #), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****).

4.6 Mitokondriyal Depolarizasyon Testi Sonuçları

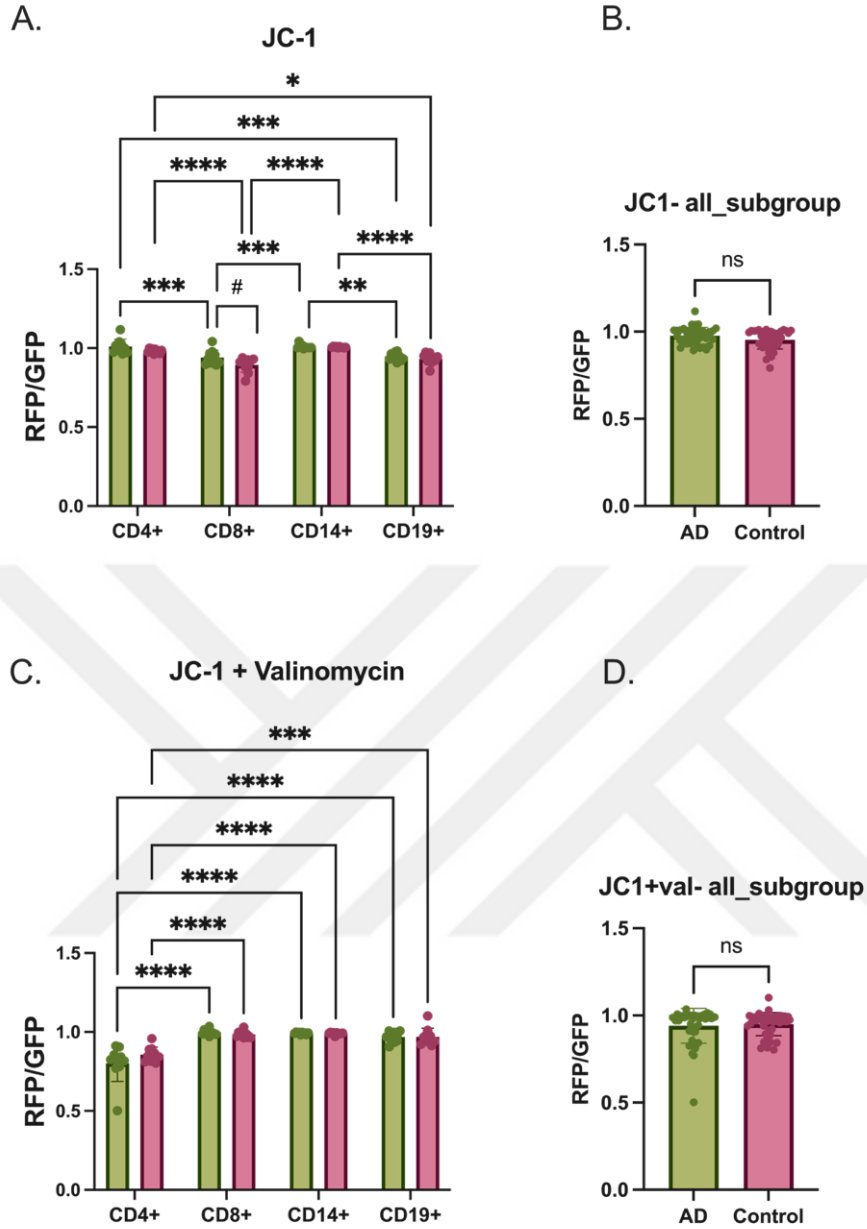
Mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikleri kırmızı / yeşil floresan oranını ölçerek yansıtan JC-1 testi dört hücre alt grubunda hasta ve kontrol örneklerinde kullanılmıştır (AH= 10, kontrol = 10). Mitokondriyal depolarizasyon, kırmızı/yeşil floresan yoğunluk oranında bir azalma ile gösterilirken, artış hiperpolarizasyonu yansıtmaktadır. Ayrıca, mitokondriyal depolarizasyonu indükleyen bir potasyum iyonoforu olan valinomisin ile dört hücre alt grubunun yanıtları ölçülmüştür.

Dört hücre alt grubundaki mitokondriyal aktiviteyi karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA ile Tukey testi uygulanmıştır. Her hücre tipi içindeki analizlerde, verilerin normalliğine bağlı olarak ya tek yönlü ANOVA ya da Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. AH ve kontrol grupları arasındaki mitokondriyal aktivite

karşılaştırıldığında, tüm hücre tipleri bir arada analiz edildiğinde önemli bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 20B). Ancak, bireysel hücre tiplerinin daha ayrıntılı analizi, AH ve kontrol grupları karşılaştırıldığında hem hücre tipleri arasında hem de her hücre tipi içinde dikkate değer farklar ortaya koymuştur (Şekil 20A).

JC-1 testi sonucunda, AH'de CD4+ T hücreleri, CD8+ ($p < 0.001$) ve CD19+ hücrelere ($p < 0.001$) kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek $\Delta\Psi_m$ göstermiştir. Benzer şekilde, CD14+ hücreler, hem CD19+ ($p < 0.01$) hem de CD8+ hücrelere ($p < 0.001$) kıyasla artmış $\Delta\Psi_m$ göstermiştir. Kontrol grubunda ise CD4+ hücreleri, CD8+ hücrelerine kıyasla anlamlı derecede daha yüksek $\Delta\Psi_m$ sergilemiştir ($p < 0.0001$). Ayrıca, CD8+ hücreleri, hem CD14+ ($p < 0.0001$) hem de CD19+ ($p < 0.05$) hücrelerine kıyasla düşük $\Delta\Psi_m$ göstermiştir. CD14+ ve CD19+ hücreleri arasında da anlamlı farklar bulunmuş olup, CD14+ hücreleri, CD19+ hücrelerine kıyasla daha yüksek $\Delta\Psi_m$ değerleri sergilemiştir ($p < 0.0001$).

Her bir hücre tipi içerisindeki AH ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, JC-1 testi yalnızca CD8+ hücrelerinde önemli bir fark ortaya koymuştur; AH, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek $\Delta\Psi_m$ sergilemiştir ($p = 0.02$) (Şekil 20A ve Şekil 22B). CD4+, CD14+ veya CD19+ hücrelerinde AH ve kontrol grubu arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir.

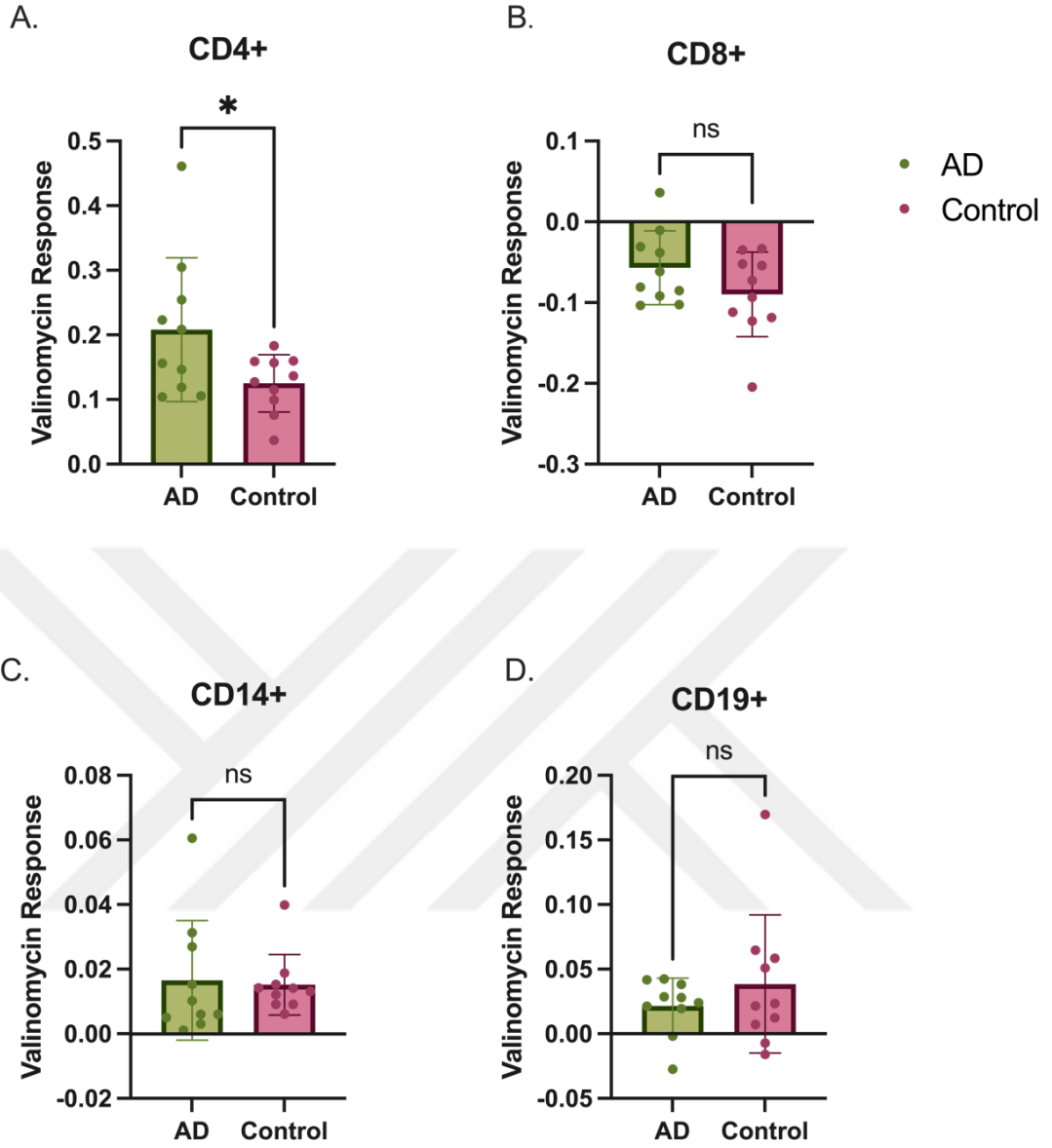


Şekil 20. Mitokondriyal membran potansiyelinin hücre alt grupları arasında ve her bir hücre grubu içinde karşılaştırılması.

(A) CD4+, CD8+, CD14+ ve CD19+ hücre alt gruplarında JC-1 testi ile $\Delta\Psi_m$ (RFP/GFP) ölçümü. (B) AH ve kontrol gruplarına ait tüm hücre alt gruplarının ortalama RFP/GFP oranları karşılaştırılması. (C) Valinomisin uygulaması sonrası yapılan JC-1 testi ile hücre alt gruplarında $\Delta\Psi_m$ ölçümü. (D) AH ve kontrol gruplarına ait tüm hücre alt gruplarının valinomisin uygulaması sonrası ortalama RFP/GFP oranları karşılaştırılması. Veriler, iki yönlü ANOVA ve Tukey'nin post hoc çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiş; her bir hücre grubu içindeki karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA ya da Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. Grafikler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. $p < 0.05$ (* or #), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****).

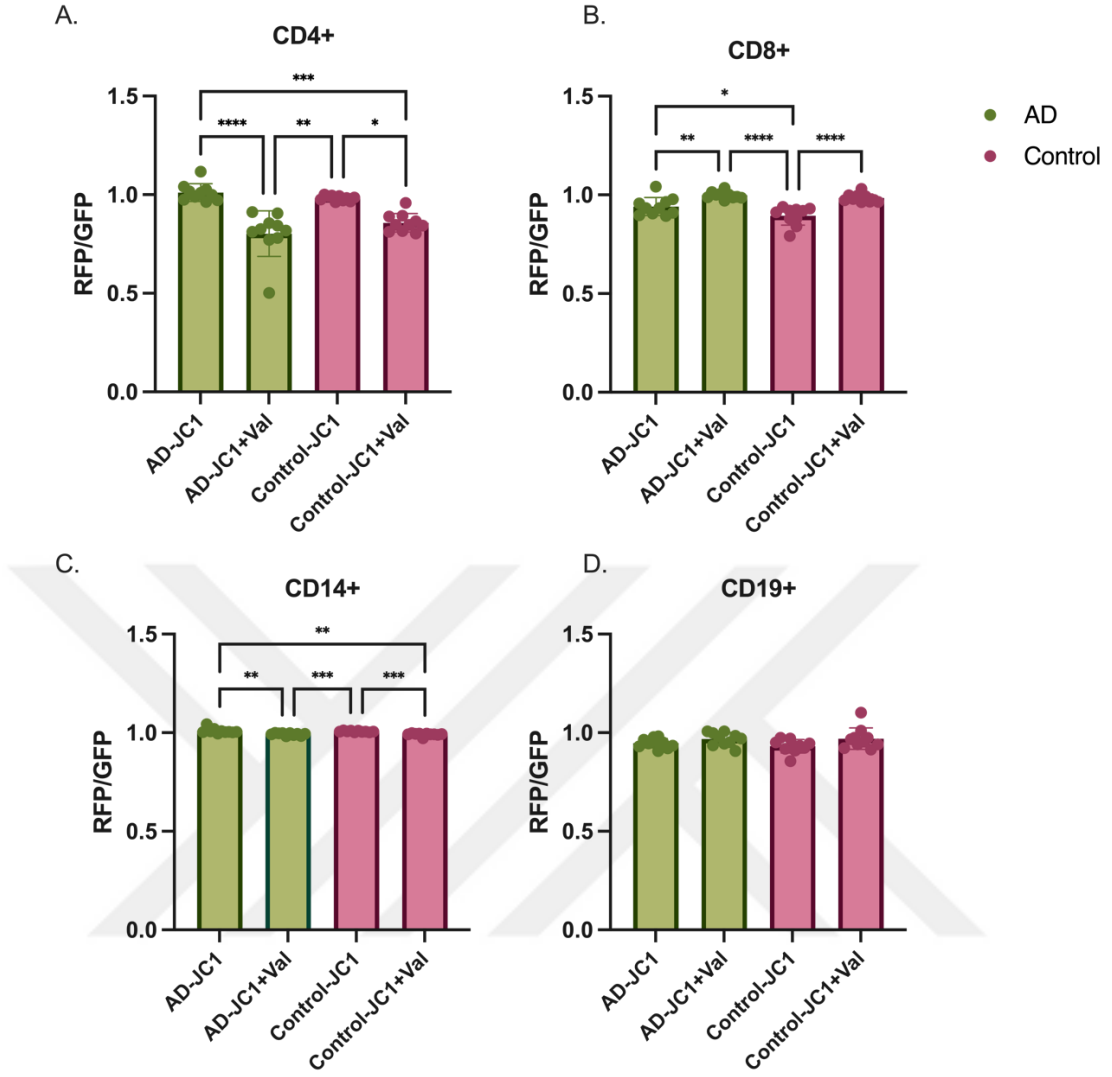
JC-1+valinomisin sonuçları, valinomisinin tüm hücre gruplarında mitokondriyal depolarizasyonu indüklediğini, ancak CD8+ hücrelerinde beklenmeyen bir hiperpolarizasyona neden olduğunu göstermiştir (Şekil 20C ve Şekil 22B). Ayrıca, kırmızı/yeşil oranındaki farklar kullanılarak her hücre tipinin valinomisine verdiği yanıtlar hesaplanmıştır (Şekil 21). Özellikle, her hücre tipi içinde AH ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, yalnızca CD4+ hücrelerinde önemli bir fark gözlemlenmiştir; AH örnekleri, kontrol örneklerine kıyasla valinomisine daha yüksek derecede depolarizasyon göstermiştir (Şekil 21A, $p < 0.05$).





Şekil 21. Hücre alt gruplarında valinomisin yanıtı.

Valinomisin yanıtı, valinomisin uygulanan ve uygulanmayan koşullar arasındaki RFP/GFP oranı farkı olarak hesaplanmıştır. Verilerin normalliğine bağlı olarak analizler iki yönlü t-testi veya Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Grafikler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde belirtilmiştir: ns (anlamlı değil), $p < 0.05$ (*).



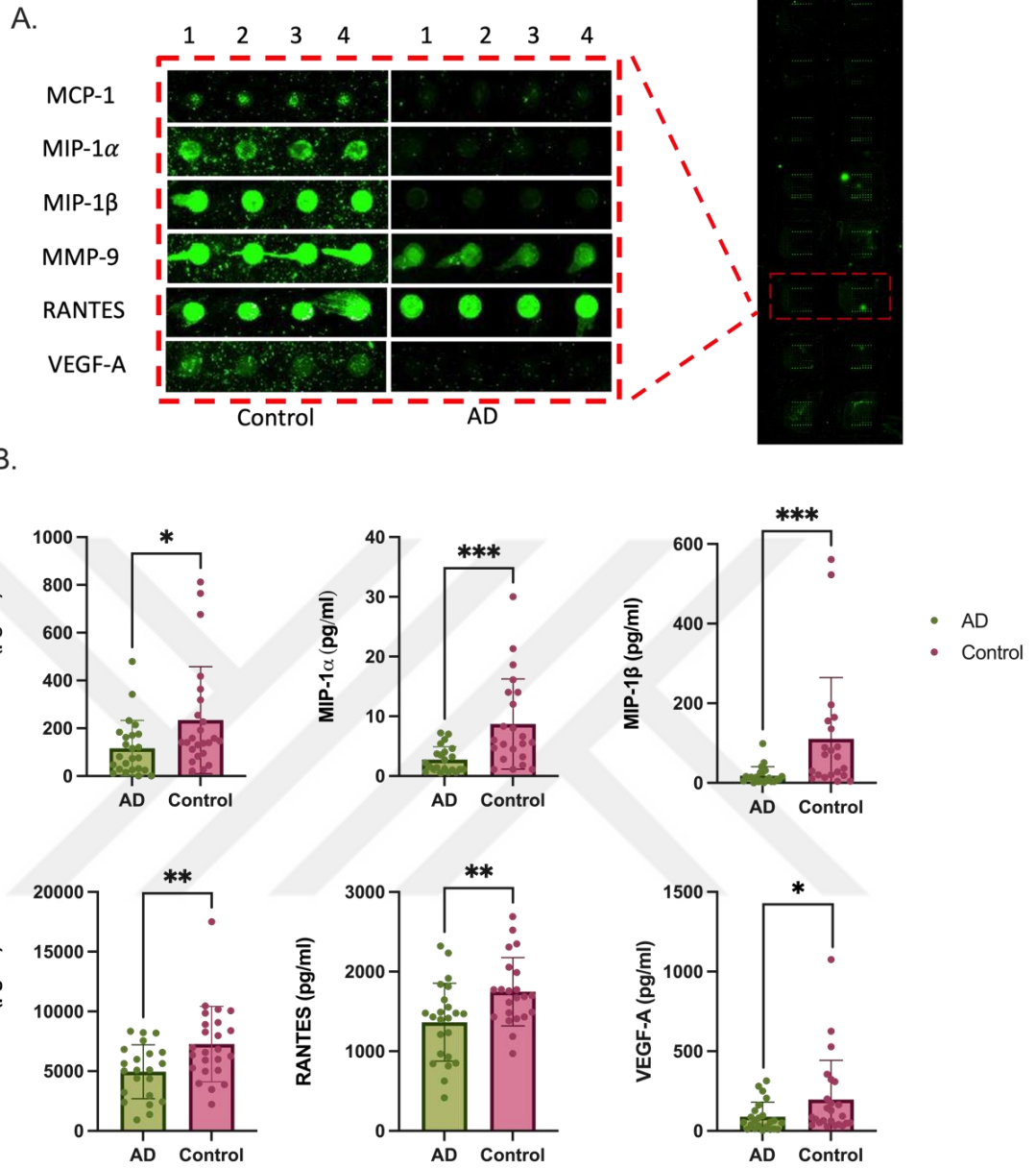
Şekil 22. Hücre alt gruplarında JC-1 ve valinomisin sonuçları.

A, B, C, D JC-1 testi sonuçları her bir hücre alt grubu ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$ ve $CD19^+$) için, AD ve kontrol gruplarının JC-1 ve valinomisin tedavisi sonrasında karşılaştırmasını göstermektedir. Veriler Kruskal-Wallis testi ve Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi ya da klasik tek yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir. Grafikler ortalama $\pm$ SD (standart sapma) şeklinde sunulmuştur, $p < 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****).

4.7 Sitokin Tarama Testi Sonuçları

Yirmi farklı sitokinin AH ve kontrol plazmalarında taranması sonucunda altı sitokinin anlamlı farklılık gösterdiği on dört sitokinin ise belirgin bir değişiklik göstermediği tespit edilmiştir. GM-CSF, GRO- $\alpha/\beta/\gamma$, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 ve TNF- α seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermedi. MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MMP-9, RANTES ve VEGF-A seviyelerinin ise AH grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Anlamlı düzeyde azalan bu altı sitokinin taranmış görüntüsü ve grafikleri Şekil 23'te sunulmuştur.



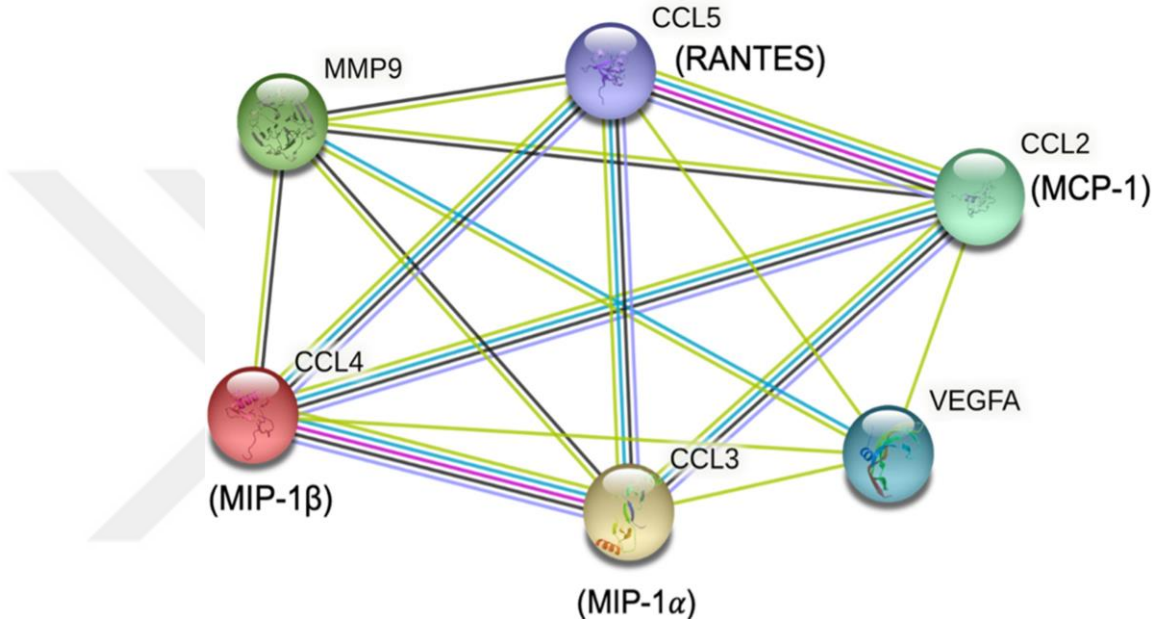


Şekil 23. Anlamlı değişiklik gösteren sitokinler.

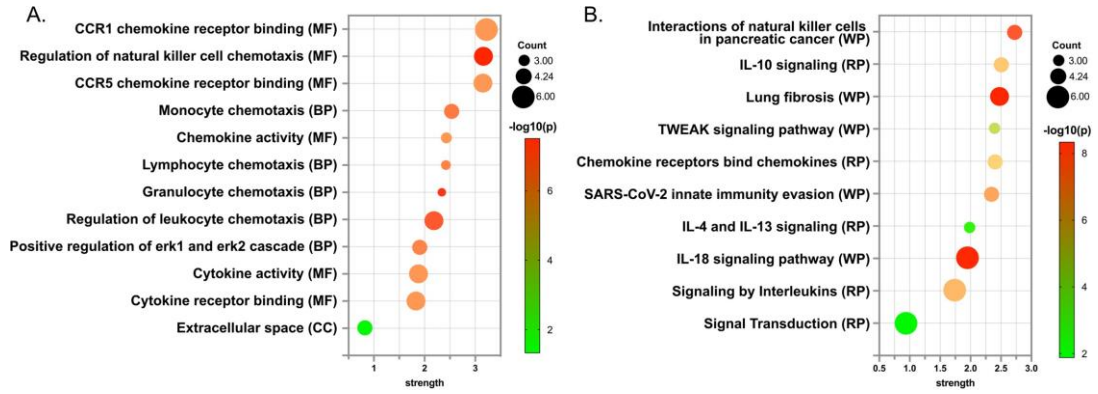
(A) Anlamlı farklılık gösteren altı sitokin için lazer tarayıcıdan alınan hasta ve kontrol floresans yoğunluğu görüntüsü örneği. (B) MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MMP-9, RANTES ve VEGF-A seviyeleri. $p < 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****).

Anlamlı düzeyde değişiklik gösteren altı sitokin biyolojik işlevlerini ve ilişkilerini belirlemek amacıyla STRING çevrimiçi aracı kullanılmıştır (Şekil 24). STRING analizinden elde edilen Gen Ontolojisi (GO), REACTOME (RP) ve WikiPathways (WP) sonuçları Şekil 25'de gösterilmektedir. Analiz sonuçları, bu sitokinlerin birbirleriyle yüksek etkileşimli proteinler olduğunu ortaya koymuştur. Altı sitokin en çok monosit kemotaksisi, lenfosit kemotaksisi, granülosit kemotaksisi,

lökosit kemotaksisinin düzenlenmesi, Erk1 ve Erk2 kaskadının pozitif düzenlenmesi BP terimlerinde önemli ölçüde zenginleştiği görülmüştür (Şekil 25A). MF terimlerinde CCR1 kemokin reseptör bağlanması, CCR5 kemokin reseptör bağlanması, kemokin aktivitesi, sitokin aktivitesi ve sitokin reseptör bağlanması ön plana çıkmaktadır (Şekil 25A). Ayrıca sitokinler başlıca olarak IL-18 sinyal yolağı (WP), interlökinlerle sinyal (RP) ve sinyal iletimi (RP) yollarlarında zenginleşmişlerdir (Şekil 25B).



Şekil 24. Anlamlı farklılık gösteren altı sitokin protein-protein etkileşim görüntüsü.



Şekil 25. AH plazmalarında anlamlı düzeyde değişim gösteren altı sitokinin zenginleştiği yolların baloncuk grafiği ile gösterimi.

(A) GO (MF, BP, CC) ve (B) WP/RP (WikiPathways/Reactome Pathways) yolak analizleri. Y-ekseni terimleri, X-ekseni ise bu terimlerin etkinlik gücünü (strength) göstermektedir. Baloncuk büyüklüğü ilgili terimle eşleşen protein sayısını (count), renk skalası ise düzeltilmiş p-değerinin $-\log_{10}(p)$ karşılığını ifade etmektedir. (Analizler STRING veritabanı ile gerçekleştirilmiş, görselleştirme için GraphPad Prism (v9.2) ve Inkscape (v1.0.1) yazılımları kullanılmıştır.)

5 TARTIŞMA

AH, demansın en yaygın formu olup, ilerleyici çoklu bilişsel gerilemeye yol açan ve nöropatolojik olarak A β plakları ile hiperfosforile tau birikimiyle tanımlanan nörodejeneratif hastalıktır (1,2). Yapılan son çalışmalar bağışıklık sistemi düzensizliği ve mitokondriyal disfonksiyonun AH patolojisinde önemini vurgulamaktadır (21–24). AH riski ile yaşlılık arasındaki pozitif ilişkiyle tutarlı olarak sistematik inflamasyon arttığında, hastalığın ilerlemesi periferik inflamasyona ve doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna da bağlıdır (103). Hayvan modelleri ile sağlıklı kan transfüzyonu yapılan çalışmalarda, patolojik AH belirteçlerinin azaldığı ortaya koyulmuştur (5,6). Bu nedenle AH'nin altında yatan mekanizmayı ve patogenezi anlamak için periferik sistemlerle yapılan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Periferik bağışıklık sistemi, farklı bağışıklık hücre tiplerinin çeşitli mekanizmalar aracılığıyla hastalığın ilerleyişini etkilediği karmaşık ve dinamik bir yapıya sahiptir (21,25). Literatürde, PBMC'ler ile nörodejeneratif hastalıklar üzerine yapılan çalışmaların genellikle küçük birey gruplarından toplanılan PBMC ile gerçekleştirildiği ve az sayıda çalışmada PBMC'nin belirli alt kümelerinin izole edilerek çalışıldığı belirtilmiştir (130) AH'de periferik bağışıklık hücrelerindeki değişikliklerin kapsamlı bir şekilde anlaşılabilmesi için hücreye özgü araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (26). Proteomik yaklaşımlar, hastalığa özgü moleküler imzaların belirlenmesi açısından etkili bir yöntem sunmasına rağmen, çoğu çalışma plazma, serum, BOS veya PBMC üzerine yoğunlaşmış olup, farklı periferik bağışıklık hücrelerinde hücreye özgü proteomik değişiklikleri inceleyen araştırmalar sınırlıdır (27,29,30,131).

Mitokondriyal disfonksiyon, AH'nin ilerleyişi ile yakından ilişkilidir (23). Mitokondriyal dağılım, hareketlilik, oksidatif stres, enzim bozuklukları, metabolik yetersizlikler ve biyogeneze azalma gibi yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, mitokondrinin AH patogeneziindeki kritik rolünü desteklemektedir (31). Ayrıca, son çalışmalar periferik mitokondriyal disfonksiyonun AH'deki önemine dikkat çekmektedir (32,33). Wang et al., 2020 çalışmasında, AH korteksi, BOS ve serumda birçok mitokondriyal proteindeki değişiklikler ortaya konmuştur. Parkinson hastalarından elde edilen PBMC'ler üzerinde yapılan başka bir çalışmada, özellikle

monositlerde artan mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres belirlenmiş olup, diğer nörodejeneratif hasta gruplarında yapılacak ek çalışmaların PBMC patolojisini daha iyi tanımlamaya yardımcı olabileceği öne sürülmüştür (132).

Bu çalışmada, AH hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen CD4+ ve CD8+ T hücreleri, CD14+ monositler ve CD19+ B hücreleri üzerinde LC-MS/MS analizi gerçekleştirilmiştir. Bu hücre alt gruplarının hastalık mekanizması üzerindeki spesifik etkilerini detaylı bir şekilde incelemek amacıyla JC-1 ve MitoSOX Red analizleri kullanılarak mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) ve oksidatif stres seviyeleri ölçülmüştür. Ayrıca, mitokondriyal disfonksiyon inflamatuvar cevabı tetiklediğinden, plazmada genel sitokin taraması yapılmıştır.

FACS analizi ile ayrıştırılan dört hücre alt grubunda gerçekleştirilecek LC-MS/MS analizleri için yapılan ön çalışmada, CD14+ ve CD19+ hücre alt gruplarında anlamlı bir farklılık görülmezken, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde anlamlı değişimler gözlemlenmiştir. Bu nedenle CD4+ ve CD8+ T hücreleri ile LC-MS/MS analizleri tüm AH ve kontrol örnekleri ile gerçekleştirilmiş ve ileri analizler yapılmıştır. CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde anlamlı değişen proteinler, AH ile ilişkili çeşitli yollar ve fonksiyonlarla bağlantılı olup, hücrel yanıtın karmaşık yapısını ortaya koymaktadır. Her iki hücre alt grubunda tanımlanan hub proteinler, mitokondriyal fonksiyonlarla yakından ilişkili olup, mitokondriyal disfonksiyonun hastalığın gelişimine katkıda bulunan hücrel süreçlerdeki kritik rolünü vurgulamaktadır. Bu bulgu, literatürde AH'nin ilerleyişinde mitokondriyal disfonksiyonun önemini giderek daha fazla öne çıkardığı kanıtlarla da örtüşmektedir (23,24,33).

Anlamlı değişen yüksek sayıda proteine rağmen, tartışmamız, CD4+ ve CD8+ T hücrelerindeki protein ağında 1,5 kat veya daha büyük değişiklikler gösteren hub proteinlere odaklanacaktır. Tartışma bölümü, CD4+ ve CD8+ gruplarında yapılan biyoinformatik analizlerin yanı sıra, tüm hücre alt gruplarında gerçekleştirilen mitokondriyal testler ve ardından uygulanan sitokin tarama testi ile devam edecektir.

5.1 CD4+ T Hücreleri

CD4+ grubunda anlamlı değişen proteinlerin GO ve KEGG analizlerinde başlıca olarak içerisinde AH'nin de bulunduğu çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkili yollar, protein ve RNA bağlanması, nükleozom paketlenmesi terimleri ön plana çıkmaktadır. Anlamlı değişen 387 protein ile yapılan hub analizinde, 32 hub protein tanımlanmış ve bu proteinler nörodejenerasyon, enerji metabolizması, ribozomal ve spliceozom ile ilişkili yollarda belirgin şekilde zenginleşmiştir.

Tanımlanan hub proteinlerin yirmisi ribozomal proteinler olarak sınıflandırılmıştır. Ribozomal proteinler, CD4+ T hücreleri için hedefler olarak bilinmektedir (133) ve bu proteinlerin sunumu, bağışıklık yanıtlarını modüle etmede kritik bir rol oynamaktadır (134). AH modellerinde ve hastalarında gözlemlenen mTOR/p70S6k sinyalindeki değişiklikler ribozomal protein sentezini ve hücrel aktiviteyi etkilemektedir (135). Ribozomal fonksiyonun düzensizleşmesi, AH dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (136). AH'de KBB'de artan ribozomal kompleksler, ribozomal protein ekspresyonu ile hasarlı beyin kılcal damarlarında protein işlenmesi arasındaki bir bağlantıya işaret etmektedir (137). Bulgularımız, ribozomal proteinlerin AH'de kritik rolünü vurgulamakta; RPL35A ve RPS4X hariç 20 hub ribozomal proteinin CD4+ T hücrelerinde AH grubunda arttığını göstermektedir.

Spliceozomun düzensizliği, tau aracılı bozulma ile ilişkili olup, kriptik RNA birleştirilmesine ve A β peptitlerinin toksik etkilerine katkıda bulunabilir (138,139). Son çalışmalar, belirli spliceozom genlerindeki mutasyonların, bağışıklık sistemi ile ilişkili genlerin hatalı birleştirilmesine neden olarak immünolojik düzensizliğe ve farklı fenotiplere yol açabileceğini göstermektedir (140). Ayrıca, spliceozomun bazı temel bileşenleri, birleştirme işlemiyle ilgili olmayan immünolojik özellikler sergileyerek bu proteinlerin fonksiyonlarını çeşitlendirmektedir (140).

Spliceozom ile ilişkili hub proteinler incelendiğinde, HNRNPA1, HNRNPK, SNRPD3, SNRPF, SRSF1 ve EIF4A3 RNA bağlayıcı proteinlerin hub proteinler arasında olup CD4+ T hücrelerinde anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca

FUS ve TDP-43 RNA bağlayıcı proteinlerinin de CD4+ T hücrelerinde anlamlı değişim göstermiştir. Bu proteinlerden özellikle HNRNPA1, HNRNPK, FUS ve TDP-43, yapılan çalışmalarda nörodejenerasyon ile ilişkilendirilmiş ve oksidatif stres yanıtlarındaki rolleri araştırılmıştır (66,141–143). Heterojen nükleer ribonükleoproteinler (HNRNP'ler) RNA metabolizmasında kapsamlı olarak özellikle RNA uçbirleştirmesinde rol alan ve nörodejeneratif hastalık çalışmalarında ilgi çekici bir konu olan memeli hücrelerinde en çok ifade edilen RNA bağlayıcı proteinlerdir (141,144–146). HNRNPA1, TDP-43 ve FUS gibi RNA bağlayıcı proteinlerdeki fonksiyonel bozukluklar; çekirdekten sitoplazmaya yanlış yerleşim, stres granülleri oluşumu ve RNA metabolizmasında bozulma gibi üç temel değişikliğe yol açar ve bu süreçler nörodejenerasyona katkıda bulunur (147). MS hastalarında PBMC ve T hücreleri ile yapılan çalışmalarda, TDP-43'ün de bulunduğu RNA bağlayıcı proteinlerde ekspresyon farklılıkları tespit edilmiş ve bu proteinler ile yapılan çalışmalarda bağışıklık hücrelerinin göz önünde bulunması gerektiği bildirilmiştir (147–149).

RNA bağlayıcı proteinler ile oksidatif stres arasındaki ilişki, nörodejeneratif hastalık araştırmalarında önemli bir konu haline gelmiştir (66). Oksidatif stres, bu RNA bağlayıcı proteinlerin çekirdekten sitoplazmaya yanlış yönlendirilmesine neden olarak, post-translasyonel modifikasyonlara uğramalarına ve stres granülleri içinde birikmelerine yol açarak nörodejeneratif hastalıklara katkıda bulunabilir (66,141–143,150). Stres granülü oluşumunun inhibe edilmesinin, RNA bağlayıcı proteinlerin yanlış yerleşimini önleyerek ALS ve FTLD modellerinde nörodejenerasyonu baskılayabileceği gösterilmiştir (151). İnsan kan örnekleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, proteomik ve transkriptomik analizler aracılığıyla dinlenme ve aktive olma koşullarında T hücrelerindeki stres granülleri ve P-cisimcikleri araştırılmıştır (152). Aktive T hücreleri, antijen stimülasyonuna yanıt olarak stres granülleri ve P-cisimciklerini içeren düzenleyici mekanizmalar aracılığıyla immünolojik fonksiyonlarını yerine getirir (152). Aktivasyon sonrası stres granülleri grubunda yapılan proteomik analizlerin sonuçları, CD4+ grubunda tanımlanan RNA bağlayıcı proteinlerle büyük ölçüde örtüşmektedir. Bu araştırma, stres granülleri ve P-

cisimciklerinin nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel terapötik hedefler olabileceğini ortaya koymuştur (152).

RNA bağlayıcı proteinler ayrıca mitokondriyal proteinlerle etkileşime girerek mitokondriyal fonksiyonlarda önemli roller üstlenirler (153). HNRNPA1'in Drp1 ekspresyonunu artırarak mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu bildirilmiştir (154). Ayrıca, aşırı eksprese edilen TDP-43, mitokondri ve endoplazmik retikulum arasındaki temas noktalarını bozarak oksidatif hasar ve ROS seviyelerinin artmasına yol açan mitokondriyal bozukluklara neden olmaktadır (155–157). Ek olarak, oksidatif stresin bir sonucu olarak post-translasyonel olarak modifiye edilen TDP-43 ve FUS mitokondrilere lokalize olarak toksik etkiler gösterir (66). Özellikle TDP-43, mitokondriyal kompleksleri inhibe eder ve bağışıklık yanıtlarını uyararak mitokondriyal DNA salınımı yoluyla nöronal ölüme neden olur (66). RNA bağlayıcı proteinlerin mitokondrilere yanlış yerleşiminin önlenmesi, mitokondriyal fonksiyon üzerindeki olumsuz etkilerini azaltarak nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesini yavaşlatma potansiyeline sahip olabilir (158).

CD4+ T hücrelerinde hub protein olarak anlamlı ekspresyon değişimi gösteren, glikolitik ve mitokondriyal fonksiyonlar ile ilişkili ayrıca GAPDH ve ATP5B proteinleri tanımlanmıştır. GAPDH hem CD4+ hem CD8+ T hücrelerinde hub protein olarak bulunmuştur ve iki grupta da AH'de ekspresyonu artmıştır. GAPDH glikolizdeki rolünün yanında oksidatif stres altında hücre ölümüne aracılık eden çok işlevli bir proteindir (159). GAPDH mitokondride de bulunan oksidatif stres hasarına karşı hassas ve ROS'un ana hücresel hedeflerinden biridir ve agregasyonu mitokondriyal disfonksiyona sebep olur (159,160). Yapılan bir trombosit çalışmasında, MS grubunda GAPDH artmıştır (160). AH ve PD hastalarında ise GAPDH agregasyonunun patogeneizde rol oynadığı ve agregatların BOS'ta AH'nin ilerlemesiyle doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiş ve AH için umut verici bir farmakolojik hedef olduğu bildirilmiştir (161,162). ATP5B ise mitokondriyal ATP sentaz enzimidir ve CD4+ hücrelerinde anlamlı değişim gösteren RNA bağlayıcı proteinlerden biri olan FUS ile etkileşerek ATP üretimini engellediği, mitokondriyal katlanmamış protein yanıtını tetiklediği ve bu mitokondriyal bozulmanın nörodejenerasyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir (163).

Tez çalışmasının bulguları RNA bağlayıcı ve mitokondri ve enerji metabolizması ile ilişkili proteinlerdeki ekspresyon değişimi, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi AH üzerinde desteklemektedir. CD4+ T hücrelerinde AH grubunda mitokondriyal ROS seviyesi anlamlı olarak artmıştır. Ayrıca CD4+ T hücrelerinde valinomisin AH grubunda anlamlı bir şekilde daha yüksek mitokondriyal depolarizasyona sebep olmuştur. CD4+ grubunda bulunan proteomik farklılıklar ile mitokondriyal disfonksiyon arasındaki ilişki, oksidatif stresin ve periferik bağışıklık hücrelerine özgü işlevlerin AH'deki nörodejenerasyona katkısını vurgulamaktadır.

5.2 CD8+ T Hücreleri

CD8+ grubunda anlamlı değişim gösteren proteinler CD4+ grubundan büyük ölçüde farklı olarak; katlanmamış proteine yanıt, protein katlanması, RNA ve GTP bağlanması, karbon metabolizması ve glikoliz/glukoneogenez ile ilişkili süreçlerde zenginleşmiştir. Anlamlı değişen 121 protein ile yapılan hub analizinde 17 hub protein tanımlanmıştır ve bu hub proteinlerin çoğu glikoliz/glukoneogenez metabolizması ve protein katlanma süreçlerinde yer almaktadır. Mitokondriyal şaperonin fonksiyonu ve protein katlanma süreçlerinde rol oynayan bir hub protein olarak HSPD1 proteini (HSP60 olarak da bilinir) tanımlanmıştır (164). HSPD1'in, nörodejenerasyonla ilişkili çeşitli proteinlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir, bunlar arasında yukarıda tartışılan ve mitokondriyal hasarla bağlantılı olan FUS proteini de bulunmaktadır (165). Yapılan çalışmalarda HSPD1 seviyeleri, AH ve MS hastalarının plazma ve lenfositlerinde kontrol grubuna kıyasla artmıştır (166,167). Önceki çalışmalarla tutarlı olarak, AH grubundaki CD8+ T hücrelerinde HSPD1 seviyesi artış göstermiştir. Ek olarak, CD8+ T hücrelerinde seviyesi artmış olan HSP90AA1 ve HSPA8 (HSP70) gibi ısı şok proteinleri de hub proteinler arasında yer almaktadır.

HSP'ler, protein katlanması, proteotoksik strese karşı koruma ve hücresel homeostazın düzenlenmesi gibi süreçlerde görev alan moleküler şaperonlardır (168). Protein agregasyonu, nöroinflamasyon ve bağışıklık düzenlenmesi gibi süreçlerde yer almaları sebebiyle nörodejeneratif hastalıklarda özellikle AH'de önemli bir yere sahiptirler (168). PD'de, HSP90AA1 mikrogliaların aktivasyon belirteci olarak tanımlanmış ve sitokin uyarısına hücresel yanıt, katlanmamış proteine yanıt ve sitokin

aracılı sinyal iletim yollarında yer almaktadır (169). AH' de immünolojik değişimleri ortaya çıkarmak amacıyla, beyin ve periferik kan üzerine yapılan bir transkriptomik çalışmada; HSP90AA1 proteini hem beyinde hem de periferik kanda immün hub gen olarak tanımlanmıştır (99). HSP90AA1'in ekspresyon seviyesi, α ve β sekretaz aktivitesi ile negatif korelasyon göstererek AH patolojisine dahil olduğunu düşündürmüştür (99).

AH patogenezinde önemli ve çeşitli rol oynayan, A β plaklarıyla birlikte bulunduğu tespit edilen HSP70 ailesi üyelerinden HSPA8, tez çalışmada CD8+ T hücrelerinde hub protein olarak tanımlanmış ve ekspresyonu AH grubunda artmıştır (170). Yine HSP70 ailesinden olan HSPA2 ve HSPA6 proteinleri hem CD4+ hem CD8+ T hücrelerinde tespit edilmiştir; ancak ekspresyonları iki hücre alt grubunda farklı bulunmuştur. AH grubunda HSPA2 ve HSPA6 ekspresyonu, CD4+ T hücrelerinde azalmış, CD8+ T hücrelerinde artmıştır. HSP70 ailesindeki immün ilişkili genleri tespit etmek amacıyla yapılan bir AH çalışmada, HSPA2, HSPA8 ve HSPA1A immün ilişkili hub genler olarak tanımlanmıştır (170). HSPA2 ekspresyon seviyesinin AH'de arttığını, HSPA8'in ise azaldığını bulmuşlardır (170). HSPA8 ve HSPA2'nin, immün hücrelerin beyne infiltrasyonunda etkili oldukları ve immün yanıtta rol oynadıkları vurgulanmıştır (170). Ayrıca, HSPA8 ve HSPA2 genleri, HSPA1A ile birlikte AH için tanı ve prognoz açısından potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilmiştir (170). Periferik kan ile yapılan bir çalışmada ise, AH grubu ile kontrol arasında HSP8 ekspresyonunda anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (171). Ayrıca, ileri yaşta BOS'da HSPA8 seviyesinin ölçüldüğü bir başka çalışmada, oksidatif stres biyobelirteçleri ile HSPA8 arasında negatif bir ilişki bulunmuştur (172). Literatürde, immün hücreler ve oksidatif stres ile ilişkili olup AH patogenezinin dahil olan HSP'lerin, tez çalışmada CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde anlamlı ve birbirinden farklı ekspresyonal değişim göstermesi; bu proteinlerin hücre tipine özgü immün yanıtlar ve protein katlanma süreçleri aracılığıyla AH patogenezinin farklı şekillerde katkıda bulunabileceğini ortaya koymakta ve literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır.

HSP proteinlerine ek olarak, GLUD1 ve MDH2 proteinleri de CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde ortak değişim göstermiş; bu proteinler, CD8+'da hub olarak tanımlanan

ve AH grubunda ekspresyonları anlamlı şekilde artmış mitokondriyal proteinlerdir. CD8+ T hücrelerindeki diğer hub proteinler incelendiğinde bu proteinlerin glikolizde doğrudan rol oynayan GAPDH, PGK-1, PKM ve ENO2 proteinleri olduğu ve AH'de ekspresyonlarının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, birden fazla mitokondriyal proteinle etkileşime girdiği bilinen bir glikolitik enzim olan GAPDH, hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerinde hub protein olarak tanımlanmış ve AH grubunda artmıştır. AH'de enerji metabolizması ve mitokondriyal fonksiyonlar ile ilişkili bu proteinler, hastalıkla bağlantılı çeşitli mekanizmaları yansıtmaktadır. BOS örnekleri kullanılarak AH üzerine yapılan yeni bir çalışmada, MDH1 ve ENO2 dahil olmak üzere ATP metabolizmasıyla ilgili birkaç proteinin ekspresyonunda artış bulunmuştur (173). Bu çalışma, hastalığın patofizyolojisinde enerji metabolizmasındaki işlev bozukluğunun ve glikolitik değişikliklerin önemini vurgulamıştır (173). GLUD1'in transgenik modellerde nöron kaybıyla ilişkilendirilmesi (174) ve MDH2'nin oksidatif strese karşı artış göstermesi (175,176) , bu proteinlerin nörodejeneratif süreçlere katkı sağladığını göstermektedir. Literatürde bu proteinlerin AH'de bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi üzerine yeterli bilgiler bulunmamakta ancak glutamat metabolizması üzerinden GLUD1'in bağışıklık sistemini etkileyebileceği düşünülmektedir (177,178).

JC-1 test sonuçları, CD8+ T hücrelerinde $\Delta\Psi_m$ 'de anlamlı bir fark olduğunu ortaya koymuştur. AH grubunda, $\Delta\Psi_m$ kontrol grubuna kıyasla hiperpolarize olmuştur. İlginç bir şekilde, bu hiperpolarizasyonun CD8+ T hücrelerinde valinomisin varlığına rağmen devam ettiği ve diğer hücre alt kümelerinden ayrıldığı gözlemlendi. Literatür, mitokondriyal membran hiperpolarizasyonunun artan ROS seviyeleri ve oksidatif bir ortamda glikolitik enzimlerin yukarı regülasyonu ile yönlendirilen glikolize doğru metabolik bir kayma ile ilişkili olduğunu göstermektedir (179–181). CD8+ T hücrelerinde ROS seviyeleri açısından AH ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmezken, bu seviyelerin CD4+ ve CD19+ hücrelerine kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi. Hiperpolarizasyon ve glikoliz arasındaki ilişkiyle tutarlı olarak, proteomik analiz sonuçları CD8+ T hücrelerinde glikoliz/glukoneogenez yollarıyla ilişkili hub proteinlerinin artan ekspresyon seviyesini ortaya koymuştur. Bu bulgular literatürle uyumludur ve daha da önemlisi, bu ilişkiyi özellikle AH grubundaki CD8+ T hücrelerinde göstererek, artmış glikolitik

proteinler ile mitokondriyal membran hiperpolarizasyonu arasında hücreye özgü bir ilişki vurgulanmaktadır. AH grubu CD8+ hücrelerinde bu artmış glikolitik proteinler ve mitokondriyal hiperpolarizasyon arasındaki ilişki, glikolize yönelik bir metabolik yeniden programlamayı desteklemektedir.

5.3 Plazma Sitokin Testi

İmmün kaskadın düzensizliği yaşlanmanın önemli bir bileşeni olarak öne sürülmektedir ve olumsuz patolojik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (18). AH karmaşık bir sendrom olarak değerlendirilmekte ve son yıllarda nöroinflamasyonun hastalığın ilerleyişindeki rolü üzerine tartışmalar yapılmaktadır (22). Erken dönemden ileri evreye kadar inflamasyonun, AH patogeneze önemli ölçüde katkı sağladığı bildirilmektedir ve inflamatuvar patogeneze, aktive olmuş bağışıklık hücrelerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin varlığına dayanır (90,182). Periferik doğuştan gelen bağışıklık yanıtları ile MSS içindeki sitokinler, nöroinflamasyonun önemli düzenleyicileridir (22). Kronik bir inflamatuvar durumun glial hücrelerin aktivasyonundan sorumlu olduğu, bunun da daha kalıcı bir inflamatuvar durum ve nörodejenerasyonla sonuçlandığı görülmektedir (183). Nöroinflamasyonun AH'deki önemi göz önüne alındığında, periferik inflamasyonun hastalık ilerleyişine etkisinin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır (22).

Proinflamatuvar sitokinler, AH'de hem sinir sistemi hem de periferik sistemlerde rol oynar (184,185). Bağışıklık sistemi hücreleri, kimyasal uyarılara karşı diğer hücrelerin hareketini düzenleyen küçük sinyal proteinleri olan kemokinleri, yani kemotaktik sitokinleri salgılar (186). Kemokinler monosit, T hücresi ve B hücresi gibi bağışıklık hücrelerinden salgılanır; ancak, periferden KBB'yi aşarak MSS'ye geçebildikleri için AH beyinde de tespit edilmektedir (187). Kemokinlerin, perifer ile MSS arasında çift yönlü immünolojik iletişimde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (18). Beyin, plazma, BOS, PBMC ve KBB modellerinde kemokin düzeylerinin kontrol gruplarına kıyasla AH'de farklılık gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (188–192).

Tez çalışmasında, AH grubunda anlamlı düzeyde azalmış bulunan MCP-1 kemokini çeşitli hastalıklarda monositlerin, mikroglianın ve bellek T hücrelerinin hasar ya da enfeksiyon bölgesine göçünü ve infiltrasyonunu yönlendirir (193). Erken evre AH ve MCI tanısı almış bireylerle yapılan çalışmalarda, plazmada yüksek MCP-1 düzeylerinin bilişsel bozulma ile ilişkili olduğu ve hastalık ilerledikçe plazma MCP-1 düzeylerinin azaldığı da ortaya konmuştur (194,195). MCP-1 eksikliğin, beyinde amyloid- β seviyesinin artmasına ve mikrogliyal birikiminin bozulmasına neden olduğu için AH patolojisini hızlandırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır (196,197). MCP-1'in olası nöroprotektif rolü göz önüne alındığında, hastalığın erken evresinde MCP-1 artışı, glial hücreler aracılığıyla A β plak oluşumunun ve nöron ölümünün önlenmesiyle ilişkili olabilirken, hastalık ilerledikçe bağışıklık yanıtının yetersiz hale gelmesi nöron ölümüne yol açabilir ve buna bağlı olarak sitokin ile kemokin üretimi azalabilir (194). MCP-1'in diğer nörodejeneratif hastalıklardaki düzey farklılıklarını gösteren çalışmalar vardır. Örneğin, bir çalışma BOS'taki MCP-1 seviyelerinin PH ilerlemesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini öne sürmüştür (198). Ayrıca MCP-1 seviyelerinin MS hastalarında azaldığı, ALS hastalarında ise arttığı saptanmıştır (199,200). Asemptomatik yaşlanan yetişkinler üzerinde yapılan bir çalışmada ise, plazma MCP-1 seviyelerindeki artış hafızadaki düşüşle ilişkilendirilmiştir (18).

CCL3 ve CCL4 olarak da bilinen MIP-1 α ve MIP-1 β kemokinleri inflamatuvar hücrelerin toplanması, yara iyileşmesi, kök hücrelerin baskılanması ve etkili bağışıklık yanıtının sürdürülmesi gibi çeşitli biyolojik işlevleri yerine getirir (201). Nöronlar ve mikrogliya tarafından eksprese edilen CCL3 geninin, AH'de ölüm sonrası beyin dokularında ve hem A β hem de tau birikimiyle ilişkili deneysel modellerde yukarı regüle olduğu gösterilmiştir (202). Ayrıca, AH grubunda T hücrelerinde MIP-1 α ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir ve bu artış, T hücrelerinin KBB'den transendotelial geçişini artırmaktadır (203). Yapılan bir çalışmada, BOS'taki amiloid nanoplâk düzeyleri ile MIP-1 α ve MIP-1 β arasında negatif bir ilişki olduğu gösterilmiş; sitokinlerin koruyucu rolü göz önüne alındığında, bu sitokin düzeylerinin AH'nin ilerleyişiyle negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (204). Diğer nörodejeneratif hastalıklarda ise, BOS'taki MIP-1 α düzeyleri ALS hastalarında artmış, MIP-1 β düzeyleri ise MS hastalarında azalmıştır (199,205). Ayrıca, MIP-1 α seviyesi

yaşlanan grupta genç yetişkin kontrollere kıyasla önemli ölçüde azalmıştır (206). Tez çalışmasında orta evre AH plazmalarında hem MIP-1 α hem de MIP-1 β seviyelerinin azaldığını bulunmuştur. Literatür ile tutarlı olarak bu azalma AH patogenezinin karşı azalmış korumayı işaret etmektedir.

RANTES, T hücreleri, monositler, bazofiller, eozinofiller, doğal öldürücü hücreler, dendritik hücreler ve mast hücreleri gibi klasik lenfoid hücrelerin dolaşımı ve göçünü düzenleyen bir kemokindir (207). RANTES'in amiloide bağlı hücre ölümünü önleyici etkisi olduğu bildirilmiş olup, amiloid maruziyetinin erken döneminde RANTES düzeyleri artarken, uzun süreli maruziyette azalmaktadır (208,209). RANTES seviyesinin AH beyinlerinde arttığını ve serumda azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (210,211). Çelişkili olarak bir başka çalışma, erken evre AH grubunda plazma RANTES düzeylerinin yüksek olduğunu ve bu artışın hastalık süresi ve yaş ile negatif korelasyon gösterdiğini bildirmiştir (212). Bu çalışma, erken evre AH'de gözlemlenen plazma RANTES artışının, A β oligomerik peptitlere karşı gelişen erken ve koruyucu bir inflamatuvar tepki ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedir (212). PBMC ile oluşturulan insan KBB modeli çalışmasında, RANTES seviyesinin hafif evre AH grubuna kıyasla orta evre hastalarda azaldığı ve bu azalmanın, RANTES'in nöroprotektif rolüyle ilişkili olarak hastalığın ilerlemesi sırasında meydana geldiği belirtilmiştir (191). Tez çalışmasında, orta evre AH plazmalarında RANTES seviyesinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı bulunmuştur. Bu durum, azalmanın bildirildiği diğer çalışmalarla tutarlı olarak, artan amiloid düzeylerine ve uzun süreli amiloid maruziyetine karşı RANTES aracılı bağışıklık yanıtının zayıfladığını göstermektedir.

MMP'ler, embriyonik gelişim, inflamatuvar hastalıklar, kanser ve AH gibi nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere, patolojik ve normal koşullarda çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar (213). Beyindeki inflamatuvar hücreler A β oligomerleriyle aktive olduktan sonra, mikrogialar şekil değiştirerek plaklara yaklaşır ve proinflamatuvar sitokinler ile MMP'ler salgılar; bu süreçte MMP'ler, A β 'yı parçalamanın yanı sıra inflamasyonu ve nöron ölümünü de artırır (214). Yapılan çalışmalar, MMP'lerin AH'ye özgü inflamatuvar süreçlerde rol aldığını ve özellikle MMP-9'un A β plaklarını çevreleyen astrositlerde artmış olmasının

beyindeki A β yıkımı ve temizliğindeki rolüne işaret ettiğini göstermektedir (215). Beyin dokusuna ek olarak, AH plazmasında da MMP-9 düzeyleri artmıştır (28,95,216). MMP-9'un mRNA seviyeleri ile bilişsel görevler arasında pozitif bir korelasyon ve A β patolojisinin ilerlemesini yavaşlatabileceğini öne süren, MMP-9'un faydalı etkilerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (217–220). Literatüre dayanarak tez çalışmasında AH grubunda azalmış MMP-9 plazma düzeyinin, A β 'ya karşı olası koruyucu etkisinin zayıflamış olabileceğini düşündürmektedir.

VEGF-A, kan damarları büyümesi, oksijen ve glikoz taşınımı ile KBB'nin bütünlüğünü düzenleyen bir sinyal proteini olup, vasküler ve nöronal fonksiyonları destekler (221). Preklinik AH modellerinde yüksek VEGF-A seviyeleri, nöroprotektif bir etki ile ilişkilendirilmiştir (222,223). Ancak, AH'deki VEGF-A seviyeleri ile ilgili yapılan çalışmalarda tutarsız sonuçlar bulunmaktadır (221). Nöroprotektif etkisine odaklanan çalışmalarda AH serumlarında VEGF-A seviyesinin azaldığı bulunmuştur (224,225). Ayrıca, APP transgenik farelerin VEGF-A ile tedavi edilmesi sonucunda hafıza bozukluğunun ve A β birikiminin azaldığı bulunmuştur (226). Yüksek VEGF-A düzeylerinin, daha az bilişsel gerileme ve hipokampal atrofiyle ilişkili olduğu ve VEGF-A'nın nöroprotektif etkisinin, AH biyomarkerlerinin varlığında daha belirgin olduğu, ayrıca anjiyojenik faktörlerin AH'nin erken belirtilerini gösteren kişilerde önemli olabileceği düşünülmektedir (227). Tez çalışmasında AH plazmasında VEGF-A seviyesi azalmıştır. Bu azalma AH patogenezine karşı VEGF-A'nın koruyucu etkisinin kaybını göstermektedir.

Altı anlamlı değişiklik gösteren sitokinler arasındaki ilişki incelendiğinde hepsinin IL-18 sinyal yolağı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (228). Doğuştan ve adaptif bağışıklık yanıtlarına dahil olan çeşitli inflamatuvar faktörlerin indüksiyonu, IL-18 sinyalizasyonu tarafından sağlanır (229). Birçok çalışma, IL-18 ve reseptör alt biriminin nöronlarda varlığını göstermiştir, bu da KBB'yi geçme yeteneğini ve nörofizyolojik ve nöropatolojik hastalardaki rolünü doğrulamaktadır (230). AH'li bireylerde plazma ve beyinde IL-18 seviyesinin ölçüldüğü ve anlamlı farklar bulunduğu çalışmalar mevcuttur (90,231,232). Ayrıca, IL-18'in hiperfosforile tau ve A β ile ilişkili olarak doğrudan veya dolaylı şekilde nöronlarda mitokondriyal ve oksidatif stresle ilişkisi üzerinde durulmaktadır (233).

6 SONUÇ

Bu çalışmada, CD4+, CD8+, CD14+ ve CD19+ hücreleri ile gerçekleştirilen LC-MS/MS ve mitokondriyal testler sonucunda, AH'de periferik bağışıklık hücresi düzensizliğinin rolü vurgulanmaktadır. CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde mitokondriyal ve proteomik değişiklikler tespit edilmiştir. Bu değişiklikler, hastalık patolojisine katkıda bulunan farklı bağışıklık mekanizmalarını anlamada hücreye özgü çalışmaların önemini ortaya koymaktadır. CD4+ T hücrelerinde, ribozomal ve RNA bağlanma proteinlerinde gözlemlenen ekspresyonel değişiklikler RNA metabolizmasındaki bozulmayı işaret etmekte ve artan ROS düzeylerini açıklamaktadır. Buna karşılık, CD8+ T hücrelerindeki tespit edilen mitokondriyal hiperpolarizasyon ve glikolizle ilişkili proteinlerdeki artan ekspresyon seviyesi glikolize doğru metabolik bir kayma olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular, AH patogenezi ile bağışıklık sistemi değişiklikleri, enerji metabolizması, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon arasındaki etkileşimi ortaya koymaktadır. Çalışma, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde belirlenen hub proteinler ve ilişkili yollar aracılığıyla, periferik bağışıklık sisteminin nörodejenerasyona katkıları hakkında önemli içgörüler sunmakta ve gelecekteki terapötik yaklaşımlar ile immün yanıtların modülasyonu için potansiyel hedefler önermektedir.

Buna ek olarak, çalışmada MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MMP-9, RANTES ve VEGF-A olmak üzere altı sitokin düzeyinin, orta evre AH hastalarının plazmalarında yaş uyumlu sağlıklı bireylere göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Literatür ile kıyaslandığında hastalığın şiddeti arttıkça, bu sitokin düzeylerindeki azalma birçok uyarana karşı azalmış bir immün yanıt ile ilişkilidir.. Özetle, anlamlı düzeyde azalan bu altı sitokin, T hücre aktivasyonunun azalması, bağışıklık tepkisinin zayıflaması, koruyucu etkilerin azalması ve A β temizliğinin bozulması ile ilişkilidir. Ayrıca, bu düşüş fagositik aktivitenin bozulmasına ve dolayısıyla amiloid protein birikimine neden olabilir.

Bu bulgular birlikte ele alındığında, Alzheimer hastalığında bağışıklık sisteminin hem hücresel hem de moleküler düzeyde çok yönlü şekilde etkilendiğini ve bu

değişikliklerin hastalık patogenezinde belirleyici roller oynayabileceğini göstermektedir.

Gelecekteki çalışmalar için, bu bulguların özellikle CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde tanımlanan hücreye özgü hub proteinlerin ve mitokondriyal değişimlerin, daha geniş hasta gruplarıyla, farklı hastalık evrelerini içerecek şekilde ve tek hücreli multi-omik yaklaşımlar kullanılarak detaylı biçimde araştırılması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, ileri düzey metabolik analizler ile hücrelerin mitokondriyal solunum, glikoliz ve enerji metabolizması profilleri derinlemesine incelenebilir. Bu çalışma, periferik bağışıklık hücrelerinden elde edilen proteomik ve mitokondriyal verilerin, gelecekte geliştirilecek kan temelli yeni nesil AH biyobelirteçlerine katkı sağlayabileceğini ortaya koymakta ve literatüre güçlü bir temel sunmaktadır.

7 KAYNAKLAR

1. Chen M, Lee HK, Moo L, Hanlon E, Stein T, Xia W. Common proteomic profiles of induced pluripotent stem cell-derived three-dimensional neurons and brain tissue from Alzheimer patients. *J Proteomics* [Internet]. 2018;182(April):21–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.032>
2. Tsai CW, Tsai CF, Lin KH, Chen WJ, Lin MS, Hsieh CC, et al. An investigation of the correlation between the S-glutathionylated GAPDH levels in blood and Alzheimer's disease progression. *PLoS One* [Internet]. 2020 [cited 2024 Dec 24];15(5 May). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233289>
3. Singh CSB, Johns KM, Kari S, Munro L, Mathews A, Fenninger F, et al. Conclusive demonstration of iatrogenic Alzheimer's disease transmission in a model of stem cell transplantation. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2024;19(4):456–68. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2024.02.012>
4. Bu XL, Xiang Y, Jin WS, Wang J, Shen LL, Huang ZL, et al. Blood-derived amyloid- β protein induces Alzheimer's disease pathologies. *Mol Psychiatry*. 2018;23(9):1948–56.
5. Hernandez CM, Barkey RE, Craven KM, Pedemonte KA, Alisantosa B, Sanchez JO, et al. Transfusion with Blood Plasma from Young Mice Affects rTg4510 Transgenic Tau Mice Modeling of Alzheimer's Disease. *Brain Sci*. 2023;13(6).
6. Zhao Y, Qian R, Zhang J, Liu F, Iqbal K, Dai CL, et al. Young blood plasma reduces Alzheimer's disease-like brain pathologies and ameliorates cognitive impairment in 3 $\times$ Tg-AD mice. *Alzheimers Res Ther*. 2020;12(1):1–13.
7. Zhang S, Gao Y, Zhao Y, Huang TY, Zheng Q, Wang X. Peripheral and central neuroimmune mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *Molecular Neurodegeneration*. 2025;20(1):1–15.
8. Bettcher BM, Tansey MG, Dorothée G, Heneka MT. Peripheral and central immune system crosstalk in Alzheimer disease — a research prospectus. *Nature Reviews Neurology* 2021 17:11 [Internet]. 2021 Sep 14 [cited 2022 Jan 6];17(11):689–701. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-021-00549-x>
9. Rossi B, Santos-Lima B, Terrabuio E, Zenaro E, Constantin G. Common Peripheral Immunity Mechanisms in Multiple Sclerosis and Alzheimer's Disease. *Front Immunol*. 2021 Feb 19;12:404.
10. Zang X, Chen S, Zhu JY, Ma J, Zhai Y. The Emerging Role of Central and Peripheral Immune Systems in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2022;14(April):1–19.
11. Le Page A, Dupuis G, Frost EH, Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, et al. Role of the peripheral innate immune system in the development of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jan 8];107:59–66. Available from: www.elsevier.com/locate/expgero
12. Rather MA, Khan A, Alshahrani S, Rashid H, Qadri M, Rashid S, et al. Inflammation and Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications by Natural Products. *Mediators Inflamm*. 2021;2021.
13. Magaki S, Mueller C, Dickson C, Kirsch W. Increased production of inflammatory cytokines in mild cognitive impairment. *Exp Gerontol*. 2007 Mar 1;42(3):233–40.
14. Sala G, Galimberti G, Canevari C, Raggi ME, Isella V, Facheris M, et al. Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: correlation with disease severity. *Neurobiol Aging*. 2003 Nov 1;24(7):909–14.
15. Koyama A, O'Brien J, Weuve J, Blacker D, Metti AL, Yaffe K. The Role of Peripheral Inflammatory Markers in Dementia and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *The Journals of Gerontology: Series A* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2022 May 26];68(4):433–40. Available from: <https://academic.oup.com/biomedgerontology/article/68/4/433/535522>
16. Luster AD. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 1998 Feb 12 [cited 2021 Sep 28];338(7):436–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9459648/>
17. Zuena AR, Casolini P, Lattanzi R, Maftai D. Chemokines in Alzheimer's Disease: New Insights Into Prokineticins, Chemokine-Like Proteins. *Front Pharmacol*. 2019;0(MAY):622.
18. Bettcher BM, Neuhaus J, Wynn MJ, Elahi FM, Casaletto KB, Saloner R, et al. Increases in a Pro-inflammatory Chemokine, MCP-1, Are Related to Decreases in Memory over Time. *Front*

- Aging Neurosci [Internet]. 2019 [cited 2021 Sep 2];10(FEB). Available from: www.frontiersin.org
19. Thompson WL, Karpus WJ, Van Eldik LJ. MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *Journal of Neuroinflammation* 2008 5:1 [Internet]. 2008 Aug 15 [cited 2021 Sep 2];5(1):1–13. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-5-35>
 20. Angiulli F, Conti E, Zoia CP, Da Re F, Appollonio I, Ferrarese C, et al. Blood-Based Biomarkers of Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: A Central Role for Periphery? *Diagnostics* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 May 31];11(9). Available from: [/pmc/articles/PMC8464786/](https://pmc/articles/PMC8464786/)
 21. Heneka MT, van der Flier WM, Jessen F, Hoozemanns J, Thal DR, Boche D, et al. Neuroinflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2024; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39653749>
 22. Webers A, Heneka MT, Gleeson PA. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Jul 7];98(1):28–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imcb.12301>
 23. Misrani A, Tabassum S, Yang L. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2021;13(February):1–20.
 24. Song T, Song X, Zhu C, Patrick R, Skurla M, Santangelo I, et al. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, neuroinflammation, and metabolic alterations in the progression of Alzheimer's disease: A meta-analysis of in vivo magnetic resonance spectroscopy studies. *Ageing Res Rev*. 2021;72:1–33.
 25. Li C, Stebbins RC, Noppert GA, Carney CX, Liu C, Sapp ARM, et al. Peripheral immune function and Alzheimer's disease: a living systematic review and critical appraisal. *Mol Psychiatry*. 2024;29(6):1895–905.
 26. Xiong LL, Xue LL, Du RL, Niu RZ, Chen L, Chen J, et al. Single-cell RNA sequencing reveals B cell-related molecular biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Mol Med* [Internet]. 2021;53:1888–901. Available from: <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00714-8>
 27. Wang H, Dey KK, Chen PC, Li Y, Niu M, Cho JH, et al. Integrated analysis of ultra-deep proteomes in cortex, cerebrospinal fluid and serum reveals a mitochondrial signature in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2020;15(1):1–20.
 28. Whelan CD, Mattsson N, Nagle MW, Vijayaraghavan S, Hyde C, Janelidze S, et al. Multiplex proteomics identifies novel CSF and plasma biomarkers of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7(1):1–14.
 29. Thambisetty M, Tripaldi R, Riddoch-Contreras J, Hye A, An Y, Campbell J, et al. Proteome-based plasma markers of brain amyloid- β deposition in non-demented older individuals. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010;22(4):1099–109.
 30. Yu H, Liu Y, He B, He T, Chen C, He J, et al. Platelet biomarkers for a descending cognitive function: A proteomic approach. *Aging Cell* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Jan 4];20(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33942972/>
 31. Bhatia S, Rawal R, Sharma P, Singh T, Singh M, Singh V. Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease: Opportunities for Drug Development. *Curr Neuropharmacol*. 2021;20(4):675–92.
 32. Apaijai N, Sriwichaiin S, Phrommintikul A, Jaiwongkam T, Kerdphoo S, Chansirikarnjana S, et al. Cognitive impairment is associated with mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells of elderly population. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78551-4>
 33. Sultana MA, Hia RA, Akinsiku O, Hegde V. Peripheral Mitochondrial Dysfunction: A Potential Contributor to the Development of Metabolic Disorders and Alzheimer's Disease. *Biology (Basel)*. 2023;12(7).
 34. Terzioğlu G, Örmeci B, Türksoy Ö, Sayman C, Çınar N, Öztürk GA, et al. Mitochondrial depletion in CD4+ and CD19+ peripheral lymphocytes in early stage Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 4];167:24–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2017.09.003>
 35. Bektas A, Schurman SH, Gonzalez-Freire M, Dunn CA, Singh AK, Macian F, et al. Age-associated changes in human CD4+ T cells point to mitochondrial dysfunction consequent to

- impaired autophagy. *Aging* (Albany NY) [Internet]. 2019 Nov 11 [cited 2023 Jan 24];11(21):9234. Available from: /pmc/articles/PMC6874450/
36. Smith AM, Depp C, Ryan BJ, Johnston GI, Alegre-Abarrategui J, Evetts S, et al. Mitochondrial dysfunction and increased glycolysis in prodromal and early Parkinson's blood cells. *Movement Disorders*. 2018;33(10):1580–90.
37. 2024 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2024 May;20(5):3708–821.
38. Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America* [Internet]. 2019;103(2):263–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>
39. Ciurea VA, Covache-Busuioac RA, Mohan AG, Costin HP, Voicu V. Alzheimer's disease: 120 years of research and progress. Vol. 16, *Journal of medicine and life*. Romania; 2023. p. 173–7.
40. Cipriani G, Dolciotti C, Picchi L, Bonuccelli U. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci*. 2011 Apr;32(2):275–9.
41. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* [Internet]. 2019;179(2):312–39. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
42. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984 Jul;34(7):939–44.
43. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. 2011 May;7(3):263–9.
44. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020;25(24).
45. Piaceri I, Nacmias B, Sorbi S. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jan;5(1):167–77.
46. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2018;Volume 12. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2018.00025>
47. Paroni G, Bisceglia P, Seripa D. Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* [Internet]. 2019;68(2):493–510. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3233/JAD-180802>
48. Picone P, Nuzzo D, Caruana L, Scafidi V, Di Carlo M. Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:780179.
49. D'Alessandro MCB, Kanaan S, Geller M, Praticò D, Daher JPL. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2025;107(November 2024).
50. Avila J, Jiménez JS, Sayas CL, Bolós M, Zabala JC, Rivas G, et al. Tau Structures. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2016;Volume 8-. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/aging-neuroscience/articles/10.3389/fnagi.2016.00262>
51. Olesen MA, Pradenas E, Villavicencio-Tejo F, Porter GA, Johnson GVW, Quintanilla RA. Mitochondria-tau association promotes cognitive decline and hippocampal bioenergetic deficits during the aging. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2024;217:141–56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584924001424>
52. Vlassenko AG, Gordon BA, Goyal MS, Su Y, Blazey TM, Durbin TJ, et al. Aerobic glycolysis and tau deposition in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2018;67:95–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458018300927>
53. Pérez MJ, Jara C, Quintanilla RA. Contribution of Tau Pathology to Mitochondrial Impairment in Neurodegeneration. *Front Neurosci* [Internet]. 2018;Volume 12. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2018.00441>
54. Lauretti E, Dincer O, Praticò D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [Internet]. 2020;1867(5):118664. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488920300227>

55. Shoshan-Barmatz V, Nahon-Crystal E, Shteinifer-Kuzmine A, Gupta R. VDAC1, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease. *Pharmacol Res* [Internet]. 2018;131:87–101. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661818300768>
56. Pérez MJ, Ponce DP, Aranguiz A, Behrens MI, Quintanilla RA. Mitochondrial permeability transition pore contributes to mitochondrial dysfunction in fibroblasts of patients with sporadic Alzheimer's disease. *Redox Biol* [Internet]. 2018;19:290–300. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221323171830627X>
57. Cascella R, Cecchi C. Calcium Dyshomeostasis in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(9). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/9/4914>
58. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells* [Internet]. 2019;8(7). Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/680>
59. Ryan KC, Ashkavand Z, Norman KR. The Role of Mitochondrial Calcium Homeostasis in Alzheimer's and Related Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020;21(23). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/9153>
60. Tong BCK, Wu AJ, Li M, Cheung KH. Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [Internet]. 2018;1865(11, Part B):1745–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488918302088>
61. Jadiya P, Garbincius JF, Elrod JW. Reappraisal of metabolic dysfunction in neurodegeneration: Focus on mitochondrial function and calcium signaling. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2021;9(1):124. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01224-4>
62. Webber EK, Fivaz M, Stutzmann GE, Griffioen G. Cytosolic calcium: Judge, jury and executioner of neurodegeneration in Alzheimer's disease and beyond. *Alzheimers Dement*. 2023 Aug;19(8):3701–17.
63. Wong KY, Roy J, Fung ML, Heng BC, Zhang C, Lim LW. Relationships between Mitochondrial Dysfunction and Neurotransmission Failure in Alzheimer's Disease. *Aging Dis*. 2020 Oct;11(5):1291–316.
64. Pagani L, Eckert A. Amyloid-Beta interaction with mitochondria. *Int J Alzheimers Dis*. 2011 Mar;2011:925050.
65. Leuner K, Schütt T, Kurz C, Eckert SH, Schiller C, Occhipinti A, et al. Mitochondrion-Derived Reactive Oxygen Species Lead to Enhanced Amyloid Beta Formation. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2012;16(12):1421–33. Available from: <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4173>
66. Harley J, Clarke BE, Patani R. The interplay of rna binding proteins, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in als. *Antioxidants*. 2021;10(4).
67. Peng Y, Gao P, Shi L, Chen L, Liu J, Long J. Central and Peripheral Metabolic Defects Contribute to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Targeting Mitochondria for Diagnosis and Prevention. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2020;32(16):1188–236. Available from: <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7763>
68. Leuner K, Schulz K, Schütt T, Pantel J, Prvulovic D, Rhein V, et al. Peripheral mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Focus on lymphocytes. *Mol Neurobiol*. 2012;46(1):194–204.
69. Wang X, Wang D, Su F, Li C, Chen M. Immune abnormalities and differential gene expression in the hippocampus and peripheral blood of patients with Alzheimer's disease. *Ann Transl Med*. 2022 Jan;10(2):29.
70. Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2021 Dec 2];14(4):388. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5909703/>
71. Gerring ZF, Gamazon ER, White A, Derks EM. Integrative Network-Based Analysis Reveals Gene Networks and Novel Drug Repositioning Candidates for Alzheimer Disease. *Neurol Genet*. 2021 Oct;7(5):e622.
72. Pereira JB, Janelidze S, Smith R, Mattsson N, Palmqvist S, Teunissen CE, et al. Plasma GFAP Is an Early Marker of Amyloid-B but Not Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *Brain*. 2021.
73. Peretti DE, Boccalini C, Ribaldi F, Scheffler M, Marizzoni M, Ashton NJ, et al. Association of Glial Fibrillary Acid Protein, Alzheimer's Disease Pathology and Cognitive Decline. *Brain*. 2024.
74. Bassi MS, Iezzi E, Mori F, Simonelli I, Gilio L, Buttari F, et al. Interleukin-6 Disrupts Synaptic Plasticity and Impairs Tissue Damage Compensation in Multiple Sclerosis. *Neurorehabil Neural*

- Repair [Internet]. 2019;33(10):825–35. Available from: <https://doi.org/10.1177/1545968319868713>
75. Rizzo FR, Musella A, De Vito F, Freseigna D, Bullitta S, Vanni V, et al. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 β Modulate Synaptic Plasticity during Neuroinflammation. *Neural Plast.* 2018;2018:8430123.
 76. Rivers-Auty J, Hoyle C, Pointer A, Lawrence C, Pickering-Brown S, Brough D, et al. C9orf72 dipeptides activate the NLRP3 inflammasome. *Brain Commun* [Internet]. 2024;6(5):fcae282. Available from: <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcae282>
 77. Bradburn S, Murgatroyd C, Ray N. Neuroinflammation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2019;50:1–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163718303064>
 78. Yang H, Qin Q, Wang M, Yin Y, Li R, Tang Y. Crosstalk between peripheral immunity and central nervous system in Alzheimer's disease. *Cell Immunol.* 2023;391–392:104743.
 79. Hu D, Chen M, Li X, Morin P, Daley S, Han Y, et al. ApoE ϵ 4-dependent alteration of CXCR3 (+) CD127 (+) CD4 (+) T cells is associated with elevated plasma neurofilament light chain in Alzheimer's disease. *bioRxiv.* 2024 Jul;
 80. Guo Z, Peng X, Li HY, Wang Y, Qian Y, Wang Z, et al. Evaluation of Peripheral Immune Dysregulation in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *J Alzheimers Dis.* 2019;71(4):1175–86.
 81. Passeri E, Elkhoury K, Morsink M, Broersen K, Linder M, Tamayol A, et al. Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov;23(22).
 82. Buccellato FR, D'Anca M, Tartaglia GM, Del Fabbro M, Scarpini E, Galimberti D. Treatment of Alzheimer's Disease: Beyond Symptomatic Therapies. *Int J Mol Sci.* 2023 Sep;24(18).
 83. Madnani RS. Alzheimer's disease: a mini-review for the clinician. *Front Neurol.* 2023;14:1178588.
 84. Roberts T, Rodseth R. *Openmd.com.* 2023. Blood Components.
 85. Mathew J, Sankar P, Varacallo MA. Physiology, Blood Plasma. In *Treasure Island (FL)*; 2025.
 86. Zheng HT, Wu Z, Mielke MM, Murray AM, Ryan J. Plasma Biomarkers of Alzheimer's Disease and Neurodegeneration According to Sociodemographic Characteristics and Chronic Health Conditions. *J Prev Alzheimers Dis.* 2024;11(5):1189–97.
 87. Chatterjee P, Pedrini S, Ashton NJ, Tegg M, Goozee K, Singh AK, et al. Diagnostic and prognostic plasma biomarkers for preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2022 Jun;18(6):1141–54.
 88. Yang SH, Kim J, Lee MJ, Kim Y. Abnormalities of plasma cytokines and spleen in senile APP/PS1/Tau transgenic mouse model. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(1):15703. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep15703>
 89. Zeng X, Lafferty TK, Sehrawat A, Chen Y, Ferreira PCL, Bellaver B, et al. Multi-analyte proteomic analysis identifies blood-based neuroinflammation, cerebrovascular and synaptic biomarkers in preclinical Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2024;19(1):68. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13024-024-00753-5>
 90. Motta M, Imbesi R, Di Rosa M, Stivala F, Malaguamera L. Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: Correlation with the disease progression. *Immunol Lett* [Internet]. 2007 [cited 2021 Oct 19];114(1):46–51. Available from: www.sciencedirect.com
 91. Mahdavi M, Karima S, Rajaei S, Aghamolaii V, Ghahremani H, Ataeia R, et al. Plasma Cytokines Profile in Subjects with Alzheimer's Disease: Interleukin 1 Alpha as a Candidate for Target Therapy. *Galen medical journal* [Internet]. 2021 Sep 28 [cited 2022 May 20];10:e1974. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35434157/>
 92. Abe K, Chiba Y, Hattori S, Tamazawa A, Yoshimi A, Katsuse O, et al. Influence of plasma cytokine levels on the conversion risk from MCI to dementia in the Alzheimer's disease neuroimaging initiative database. *J Neurol Sci* [Internet]. 2020;414(April):116829. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116829>
 93. Nakamichi A, Kimura N, Hanaoka T, Masuda T, Ataka T, Matsubara E. Association between plasma cytokine levels and multiple neuroimaging modalities in mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis.* 2025 Mar;104(1):129–37.
 94. Patel NS, Paris D, Mathura V, Quadros AN, Crawford FC, Mullan MJ. Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. 2005 [cited 2021 Sep 28]; Available from: <http://cran.r-project.org/>.

95. Gu D, Liu F, Meng M, Zhang L, Gordon ML, Wang Y, et al. Elevated matrix metalloproteinase-9 levels in neuronal extracellular vesicles in Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Nov 9];7(9):1681. Available from: [/pmc/articles/PMC7480907/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3480907/)
96. Tuna G, Yener GG, Oktay G, İşlekel GH, Kirkali FG. Evaluation of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and-9 (MMP-9) and Their Tissue Inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in Plasma from Patients with Neurodegenerative Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018;66(3):1265–73.
97. Park JC, Han SH, Mook-Jung I. Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease: A brief review. *BMB Rep*. 2020;53(1):10–9.
98. Koca S, Kiris I, Sahin S, Cinar N, Karsidag S, Hanagasi HA, et al. Decreased levels of cytokines implicate altered immune response in plasma of moderate-stage Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*. 2022 Aug;786:136799.
99. Qian XH, Liu XL, Chen S Di, Tang HD. Integrating peripheral blood and brain transcriptomics to identify immunological features associated with Alzheimer's disease in mild cognitive impairment patients. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Sep 9 [cited 2023 Jan 25];13. Available from: [/pmc/articles/PMC9501700/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39501700/)
100. Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, Schipper HM, Derhovanessian E, Goldeck D, et al. Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2009;17(1):91–103.
101. Scott KM. B Lymphocytes in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* [Internet]. 2022;12(s1):S75–81. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3233/JPD-223418>
102. Park JC, Noh J, Jang S, Kim KH, Choi H, Lee D, et al. Association of B cell profile and receptor repertoire with the progression of Alzheimer's disease. *Cell Rep*. 2022 Sep;40(12):111391.
103. Kim K, Wang X, Ragonnaud E, Bodogai M, Illouz T, DeLuca M, et al. Therapeutic B-cell depletion reverses progression of Alzheimer's disease. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12(1):2185. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22479-4>
104. Espinoza VE, Emmady PD. Histology, Monocytes. In *Treasure Island (FL)*; 2025.
105. Zhao S, Ye B, Chi H, Cheng C, Liu J. Identification of peripheral blood immune infiltration signatures and construction of monocyte-associated signatures in ovarian cancer and Alzheimer's disease using single-cell sequencing. *Heliyon* [Internet]. 2023 Jul 1;9(7). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17454>
106. Dong Y, Lagarde J, Xicota L, Corne H, Chantran Y, Chaigneau T, et al. Neutrophil hyperactivation correlates with Alzheimer's disease progression. *Ann Neurol*. 2018 Feb;83(2):387–405.
107. Baik SH, Cha MY, Hyun YM, Cho H, Hamza B, Kim DK, et al. Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging*. 2014 Jun;35(6):1286–92.
108. Zenaro E, Pietronigro E, Della Bianca V, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, et al. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med*. 2015 Aug;21(8):880–6.
109. Jain AP, Sathe G. Proteomics Landscape of Alzheimer's Disease. *Proteomes*. 2021 Mar;9(1).
110. Graves PR, Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Mar;66(1):39–63; table of contents.
111. Bai B, Vanderwall D, Li Y, Wang X, Poudel S, Wang H, et al. Proteomic landscape of Alzheimer's Disease: novel insights into pathogenesis and biomarker discovery. *Molecular Neurodegeneration* 2021 16:1 [Internet]. 2021 Aug 12 [cited 2022 Jan 9];16(1):1–16. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13024-021-00474-z>
112. Murayama C, Kimura Y, Setou M. Imaging mass spectrometry: principle and application. *Biophys Rev*. 2009 Sep;1(3):131.
113. Sinha A, Planck M, Max MM. A beginners guide to mass spectrometry based prot. *Biochem (Lond)*. 2020;0(August):1–6.
114. Weaver AC, Adams N, Yiannikouris A. Invited Review: Use of technology to assess and monitor multimycotoxin and emerging mycotoxin challenges in feedstuffs*. *Applied Animal Science* [Internet]. 2020;36(1):19–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590286520300033>

115. Ma Y, Wang D, Li H, Ma X, Zou Y, Mu D, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical laboratory protein measurement. *Clinica Chimica Acta* [Internet]. 2024;562:119846. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898124020989>
116. Shuken SR. An Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *J Proteome Res* [Internet]. 2023;22(7):2151–71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535390723002615>
117. Maes E, Cools N, Willems H, Baggerman G. FACS-based proteomics enables profiling of proteins in rare cell populations. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jan 17];21(18):1–12. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
118. Dayarathna T, Roseborough AD, Gomes J, Khazaee R, Silveira CRA, Borron K, et al. Nanoscale flow cytometry-based quantification of blood-based extracellular vesicle biomarkers distinguishes MCI and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2024 Sep;20(9):6094–106.
119. Mous K, Jennes W, De Roo A, Pintelon I, Kestens L, Van Ostade X. Intracellular detection of differential APOBEC3G, TRIM5alpha, and LEDGF/p75 protein expression in peripheral blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* [Internet]. 2011;372(1–2):52–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2011.06.028>
120. Huang X, Fowler C, Li Y, Li QX, Sun J, Pan Y, et al. Clearance and transport of amyloid β by peripheral monocytes correlate with Alzheimer's disease progression. *Nat Commun*. 2024 Sep;15(1):7998.
121. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* [Internet]. 1984 [cited 2022 Jun 9];34(7):939–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6610841/>
122. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 1993 Nov;43(11):2412–4.
123. Valero-Mora PM. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis . In: Wickham H, editor. *Journal of Statistical Software* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2010. p. 189–201. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_9
124. Walter W, Sánchez-Cabo F, Ricote M. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics*. 2015 Sep;31(17):2912–4.
125. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017 Jan 4;45(D1):D362–8. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
126. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003 Nov;13(11):2498–504.
127. Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Ko MT, Lin CY. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol* [Internet]. 2014;8(4):S11. Available from: <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-S4-S11>
128. Legeay M, Doncheva NT, Morris JH, Jensen LJ. Visualize omics data on networks with Omics Visualizer, a Cytoscape App. *F1000Res*. 2020;9:157.
129. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* [Internet]. 2009 Apr 15;25(8):1091–3. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
130. Phongpreecha T, Fernandez R, Mrdjen D, Culos A, Gajera CR, Wawro AM, et al. Single-cell peripheral immunoprofiling of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Sci Adv* [Internet]. 2020 Nov 25 [cited 2022 Jan 9];6(48). Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sciadv.abd5575>
131. Whelan CD, Mattsson N, Nagle MW, Vijayaraghavan S, Hyde C, Janelidze S, et al. Multiplex proteomics identifies novel CSF and plasma biomarkers of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2019 Nov 6 [cited 2022 Jun 1];7(1):1–14. Available from: <https://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-019-0795-2>

132. Smith AM, Depp C, Ryan BJ, Johnston GI, Alegre-Abarrategui J, Evetts S, et al. Mitochondrial dysfunction and increased glycolysis in prodromal and early Parkinson's blood cells. *Movement Disorders*. 2018;33(10):1580–90.
133. Kennedy SC, Johnson AJ, Bharrhan S, Arlehamn CSL, Xu J, Garforth SJ, et al. Identification of Mycobacterial Ribosomal Proteins as Targets for CD4⁺T Cells That Enhance Protective Immunity in Tuberculosis. *Infect Immun* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 Jul 13];86(9). Available from: <https://doi.org/10.1128/iai.00009-18>
134. Philip M, Schietinger A, Schreiber H. Ribosomal versus non- ribosomal cellular antigens: factors determining efficiency of indirect presentation to CD4⁺T cells. *Immunology* [Internet]. 2010 Aug [cited 2024 Jul 13];130(4):494–503. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03258.x>
135. Lafay-Chebassier C, Paccalin M, Page G, Barc-Pain S, Perault-Pochat MC, Gil R, et al. mTOR/p70S6k signalling alteration by A β exposure as well as in APP- PS1 transgenic models and in patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* [Internet]. 2005 [cited 2024 Jul 13];94(1):215–25. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03187.x>
136. Jiao L, Liu Y, Yu XY, Pan X, Zhang Y, Tu J, et al. Ribosome biogenesis in disease: new players and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 8:1 [Internet]. 2023 Jan 9 [cited 2024 Jun 14];8(1):1–22. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-01285-4>
137. Suzuki M, Tezuka K, Handa T, Sato R, Takeuchi H, Takao M, et al. Upregulation of ribosome complexes at the blood-brain barrier in Alzheimer's disease patients. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2022;42(11):2134–50.
138. Hsieh YC, Guo C, Yalamanchili HK, Abreha M, Al-Ouran R, Li Y, et al. Tau-Mediated Disruption of the Spliceosome Triggers Cryptic RNA Splicing and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Cell Rep* [Internet]. 2019;29(2):301-316.e10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.104>
139. Nuzzo D, Inguglia L, Walters J, Picone P, Di Carlo M. A Shotgun Proteomics Approach Reveals a New Toxic Role for Alzheimer's Disease A β Peptide: Spliceosome Impairment. *J Proteome Res*. 2017;16(4):1526–41.
140. Yang H, Beutler B, Zhang D. Emerging roles of spliceosome in cancer and immunity. *Protein Cell* [Internet]. 2022 [cited 2024 Jul 29];13(8):559–79. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00856-5>
141. Clarke JP, Thibault PA, Salapa HE, Levin MC. A Comprehensive Analysis of the Role of hnRNP A1 Function and Dysfunction in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disease. *Front Mol Biosci*. 2021;8(April):1–19.
142. Salapa HE, Thibault PA, Libner CD, Ding Y, Clarke JPWE, Denomy C, et al. hnRNP A1 dysfunction alters RNA splicing and drives neurodegeneration in multiple sclerosis (MS). *Nat Commun*. 2024;15(1):1–19.
143. Bampton A, Gatt A, Humphrey J, Cappelli S, Bhattacharya D, Foti S, et al. HnRNP K mislocalisation is a novel protein pathology of frontotemporal lobar degeneration and ageing and leads to cryptic splicing. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2021;142(4):609–27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02340-0>
144. Ansari A, Thibault PA, Salapa HE, Clarke JPWE, Levin MC. Mutations in hnRNP A1 drive neurodegeneration and alternative RNA splicing of neuronal gene targets. *Neurobiol Dis*. 2025 Mar;206:106814.
145. Borreca A, Gironi K, Amadoro G, Ammassari-Teule M. Opposite Dysregulation of Fragile-X Mental Retardation Protein and Heteronuclear Ribonucleoprotein C Protein Associates with Enhanced APP Translation in Alzheimer Disease. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2016;53(5):3227–34. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9229-8>
146. Salapa HE, Thibault PA, Libner CD, Ding Y, Clarke JPWE, Denomy C, et al. hnRNP A1 dysfunction alters RNA splicing and drives neurodegeneration in multiple sclerosis (MS). *Nature Communications* 2024 15:1 [Internet]. 2024 Jan 8 [cited 2024 Sep 25];15(1):1–19. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-44658-1>
147. Libner CD, Salapa HE, Levin MC. The potential contribution of dysfunctional RNA-binding proteins to the pathogenesis of neurodegeneration in multiple sclerosis and relevant models. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13):1–16.
148. Pistono C, Monti MC, Marchesi N, Boiocchi C, Campagnoli LIM, Morlotti D, et al. Unraveling a new player in multiple sclerosis pathogenesis: The RNA-binding protein HuR. *Mult Scler*

- Relat Disord [Internet]. 2020 Jun 1;41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102048>
149. Berge T, Eriksson A, Brorson IS, Høgestøl EA, Berg-Hansen P, Døskeland A, et al. Quantitative proteomic analyses of CD4+ and CD8+ T cells reveal differentially expressed proteins in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Clin Proteomics* [Internet]. 2019;16(1):19. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12014-019-9241-5>
 150. Salapa HE, Libner CD, Levin MC. Dysfunctional RNA-binding protein biology and neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis in female mice. *J Neurosci Res*. 2020;98(4):704–17.
 151. Zhang K, Daigle JG, Cunningham KM, Coyne AN, Ruan K, Grima JC, et al. Stress Granule Assembly Disrupts Nucleocytoplasmic Transport. *Cell* [Internet]. 2018;173(4):958–971.e17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.025>
 152. Curdy N, Lanvin O, Cerapio JP, Pont F, Tosolini M, Sarot E, et al. The proteome and transcriptome of stress granules and P bodies during human T lymphocyte activation. *Cell Rep*. 2023;42(3).
 153. Zuo X, Zhou J, Li Y, Wu K, Chen Z, Luo Z, et al. TDP-43 aggregation induced by oxidative stress causes global mitochondrial imbalance in ALS. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2021;28(2):132–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-020-00537-7>
 154. Park SJ, Lee H, Jo DS, Jo YK, Shin JH, Kim HB, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 post-transcriptionally regulates Drp1 expression in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* [Internet]. 2015;1849(12):1423–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaggm.2015.10.017>
 155. Briese M, Saal-Bauernschubert L, Lüningschrör P, Moradi M, Dombert B, Surrey V, et al. Loss of Tdp-43 disrupts the axonal transcriptome of motoneurons accompanied by impaired axonal translation and mitochondria function. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):1–16.
 156. Gautam M, Jara JH, Kocak N, Rylaarsdam LE, Kim KD, Bigio EH, et al. Mitochondria, ER, and nuclear membrane defects reveal early mechanisms for upper motor neuron vulnerability with respect to TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2019;137(1):47–69. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1934-8>
 157. Wang P, Deng J, Dong J, Liu J, Bigio EH, Mesulam M, et al. TDP-43 induces mitochondrial damage and activates the mitochondrial unfolded protein response. Vol. 15, *PLoS Genetics*. 2019. 1–32 p.
 158. Wang W, Wang L, Lu J, Siedlak SL, Fujioka H, Liang J, et al. The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nat Med*. 2016;22(8):869–78.
 159. Nakajima H, Itakura M, Kubo T, Kaneshige A, Harada N, Izawa T, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) aggregation causes mitochondrial dysfunction during oxidative stress-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(11):4727–42.
 160. Dziedzic A, Morel A, Miller E, Bijak M, Sliwinski T, Synowiec E, et al. Oxidative Damage of Blood Platelets Correlates with the Degree of Psychophysical Disability in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
 161. Lazarev VF, Tsolaki M, Mikhaylova ER, Benken KA, Shevtsov MA, Nikotina AD, et al. Extracellular GAPDH Promotes Alzheimer Disease Progression by Enhancing Amyloid- β Aggregation and Cytotoxicity. *Aging Dis*. 2021 Aug;12(5):1223–37.
 162. Ma S, Xia T, Wang X, Wang H. Identification and validation of biomarkers based on cellular senescence in mild cognitive impairment. *Front Aging Neurosci*. 2023;15:1139789.
 163. Deng J, Wang P, Chen X, Cheng H, Liu J, Fushimi K, et al. FUS interacts with ATP synthase beta subunit and induces mitochondrial unfolded protein response in cellular and animal models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(41):E9678–86.
 164. Morgenstern M, Peikert CD, Lübbert P, Suppanz I, Klemm C, Alka O, et al. Quantitative high-confidence human mitochondrial proteome and its dynamics in cellular context. *Cell Metab*. 2021 Dec 7;33(12):2464–2483.e18.
 165. Deng J, Yang M, Chen Y, Chen X, Liu J, Sun S, et al. FUS Interacts with HSP60 to Promote Mitochondrial Damage. *PLoS Genet* [Internet]. 2015 [cited 2024 Dec 26];11(9):e1005357. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1005357>
 166. Marino Gammazza A, Restivo V, Baschi R, Caruso Bavisotto C, Cefalù AB, Accardi G, et al. Circulating Molecular Chaperones in Subjects with Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Data from the Zabùt Aging Project. *Journal of Alzheimer's Disease*

- [Internet]. 2022 Dec 20 [cited 2024 Dec 26];87(1):161–72. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.3233/JAD-180825>
167. Pennisi G, Cornelius C, Cavallaro MM, Salinaro AT, Cambria MT, Pennisi M, et al. Redox regulation of cellular stress response in multiple sclerosis. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2011;82(10):1490–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.092>
 168. Leak RK. Heat shock proteins in neurodegenerative disorders and aging. *J Cell Commun Signal*. 2014;8(4):293–310.
 169. Smajić S, Prada-Medina CA, Landoulsi Z, Ghelfi J, Delcambre S, Dietrich C, et al. Single-cell sequencing of human midbrain reveals glial activation and a Parkinson-specific neuronal state. *Brain*. 2022 Apr;145(3):964–78.
 170. Dong Y, Li T, Ma Z, Zhou C, Wang X, Li J. HSPA1A, HSPA2, and HSPA8 Are Potential Molecular Biomarkers for Prognosis among HSP70 Family in Alzheimer's Disease. *Dis Markers*. 2022;2022.
 171. Silva PN, Furuya TK, Braga IL, Rasmussen LT, Labio RW, Bertolucci PH, et al. Analysis of HSPA8 and HSPA9 mRNA expression and promoter methylation in the brain and blood of Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2014;38(1):165–70.
 172. Loeffler DA, Klaver AC, Coffey MP, Aasly JO, LeWitt PA. Age-Related Decrease in Heat Shock 70-kDa Protein 8 in Cerebrospinal Fluid Is Associated with Increased Oxidative Stress. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2016;Volume 8-. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/agingneuroscience/articles/10.3389/fnagi.2016.00178>
 173. Pichet Binette A, Gaiteri C, Wennström M, Kumar A, Hristovska I, Spotorno N, et al. Proteomic changes in Alzheimer disease associated with progressive A β plaque and tau tangle pathologies. *Nat Neurosci* [Internet]. 2024;27(October). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-024-01737-w>
 174. Bao X, Pal R, Hascup KN, Wang Y, Wang WT, Xu W, et al. Transgenic expression of Glut1 (glutamate dehydrogenase 1) in neurons: in vivo model of enhanced glutamate release, altered synaptic plasticity, and selective neuronal vulnerability. *J Neurosci*. 2009 Nov;29(44):13929–44.
 175. Ho Kim J, Franck J, Kang T, Heinsen H, Ravid R, Ferrer I, et al. Proteome-wide characterization of signalling interactions in the hippocampal CA4/DG subfield of patients with Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2015 Jun;5:11138.
 176. Shi Q, Gibson GE. Up-regulation of the mitochondrial malate dehydrogenase by oxidative stress is mediated by miR-743a. *J Neurochem*. 2011 Aug;118(3):440–8.
 177. Fan LY, Yang J, Li ML, Liu RY, Kong Y, Duan SY, et al. Single-nucleus transcriptional profiling uncovers the reprogrammed metabolism of astrocytes in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci*. 2023;16:1136398.
 178. Wu Z, Liu P, Huang B, Deng S, Song Z, Huang X, et al. A novel Alzheimer's disease prognostic signature: identification and analysis of glutamine metabolism genes in immunogenicity and immunotherapy efficacy. *Sci Rep* [Internet]. 2023;13(1):6895. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33277-x>
 179. Sánchez-Villanueva JA, Rodríguez-Jorge O, Ramírez-Pliego O, Salgado GR, Abou-Jaoudé W, Hernandez C, et al. Contribution of ROS and metabolic status to neonatal and adult CD8+ T cell activation. *PLoS One* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2025 Jan 4];14(12):e0226388. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0226388>
 180. Henson SM, Lanna A, Riddell NE, Franzese O, Macaulay R, Griffiths SJ, et al. p38 signaling inhibits mTORC1-independent autophagy in senescent human CD8+ T cells. *J Clin Invest*. 2014 Sep 2;124(9):4004–16.
 181. Akkaya B, Roesler AS, Miozzo P, Theall BP, Al Souz J, Smelkinson MG, et al. Increased Mitochondrial Biogenesis and Reactive Oxygen Species Production Accompany Prolonged CD4+ T Cell Activation. *J Immunol* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2025 Jan 4];201(11):3294–306. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30373851/>
 182. Group NW, Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. 2000;
 183. Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's and Dementia* [Internet]. 2016;12(6):719–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>

184. Schwab C, McGeer PL. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Journal of Alzheimer's Disease* [Internet]. 2008 [cited 2021 Nov 3];13(4):359–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18487845/>
185. Swardfager W, Lanctt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2010 Nov 15 [cited 2021 Nov 3];68(10):930–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20692646/>
186. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* [Internet]. 2000 [cited 2021 Nov 3];12(2):121–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10714678/>
187. Azizi G, Khannazer N, Mirshafiey A. The potential role of chemokines in alzheimer's disease pathogenesis. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*. 2014;29(5):415–25.
188. V  rit   J, Janet T, Chassaing D, Fauconneau B, Rabeony H, Page G. Longitudinal chemokine profile expression in a blood-brain barrier model from Alzheimer transgenic versus wild-type mice. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2018 Jun 13 [cited 2022 May 31];15(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6001165/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3001165/)
189. Ott BR, Jones RN, Daiello LA, de la Monte SM, Stopa EG, Johanson CE, et al. Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Gradients in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Relationship to Inflammatory Cytokines and Chemokines. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2018 Aug 21 [cited 2022 May 26];10(AUG):245. Available from: [/pmc/articles/PMC6110816/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3001165/)
190. Boccardi V, Paolacci L, Remondini D, Giampieri E, Poli G, Curti N, et al. Cognitive Decline and Alzheimer's Disease in Old Age: A Sex-Specific Cytokine Signature. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019;72(3):911–8.
191. V  rit   J, Page G, Paccalin M, Julian A, Janet T. Differential chemokine expression under the control of peripheral blood mononuclear cells issued from Alzheimer's patients in a human blood brain barrier model. *PLoS One*. 2018;13(8):1–23.
192. Lourenco M V., Ribeiro FC, Santos LE, Beckman D, Melo HM, Sudo FK, et al. Cerebrospinal fluid neurotransmitters, cytokines, and chemokines in alzheimer's and lewy body diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2021;82(3):1067–74.
193. Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 2]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>
194. Galimberti D, Fenoglio C, Lovati C, Venturelli E, Guidi I, Corr   B, et al. Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2006;27:1763–8.
195. Lee WJ, Liao YC, Wang YF, Lin IF, Wang SJ, Fuh JL. Plasma MCP-1 and cognitive decline in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A two-year follow-up study. *Sci Rep* [Internet]. 2018 [cited 2021 Sep 2];8(1). Available from: www.nature.com/scientificreports/
196. Westin K, Buchhave P, Nielsen H, Minthon L, Janciauskiene S, Hansson O. CCL2 is associated with a faster rate of cognitive decline during early stages of Alzheimer's disease. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2021 Sep 29];7(1). Available from: www.plosone.org
197. El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, et al. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med*. 2007;13(4):432–8.
198. Santaella A, Kuiperij HB, van Rumund A, Esselink RAJ, van Gool AJ, Bloem BR, et al. Cerebrospinal fluid monocyte chemoattractant protein 1 correlates with progression of Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease* 2020 6:1 [Internet]. 2020 Sep 3 [cited 2021 Sep 2];6(1):1–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41531-020-00124-z>
199. Chen X, Hu Y, Cao Z, Liu Q, Cheng Y. Cerebrospinal fluid inflammatory cytokine aberrations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Sep 19 [cited 2022 Jul 4];9(SEP):2122. Available from: [/pmc/articles/PMC6156158/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3001165/)
200. Scarpini E, Galimberti D, Baron P, Clerici R, Ronzoni M, Conti G, et al. IP-10 and MCP-1 levels in CSF and serum from multiple sclerosis patients with different clinical subtypes of the disease. *J Neurol Sci* [Internet]. 2002 Mar 15 [cited 2022 Jul 3];195(1):41–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11867072/>

201. Bhavsar I, Miller CS, Al-Sabbagh M. Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1 alpha)/CCL3: As a Biomarker. General Methods in Biomarker Research and their Applications [Internet]. 2015 Sep 2 [cited 2021 Sep 8];1–2:223. Available from: /pmc/articles/PMC7124056/
202. Li K, Dai D, Yao L, Gu X, Luan K, Tian W, et al. Association between the macrophage inflammatory protein-1 alpha gene polymorphism and Alzheimer's disease in the Chinese population. *Neurosci Lett*. 2008;433(2):125–8.
203. Tripathy D, Thirumangalakudi L, Grammas P. Expression of macrophage inflammatory protein 1- α is elevated in Alzheimer's vessels and is regulated by oxidative stress. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2007;11(4):447–55.
204. Aksnes M, Aass HCD, Tiiman A, Edwin TH, Terenius L, Bogdanović N, et al. Associations of cerebrospinal fluid amyloidogenic nanoplques with cytokines in Alzheimer's disease. *Transl Neurodegener* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Jun 1];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34099032/>
205. Tejera-Alhambra M, Casrouge A, Andrés C de, Seyffert A, Ramos-Medina R, Alonso B, et al. Plasma Biomarkers Discriminate Clinical Forms of Multiple Sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jun 3 [cited 2021 Sep 2];10(6):e0128952. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128952>
206. Tennakoon A, Katharesan V, Musgrave IF, Koblar SA, Faull RLM, Curtis MA, et al. Normal aging, motor neurone disease, and Alzheimer's disease are characterized by cortical changes in inflammatory cytokines. *J Neurosci Res*. 2022 Feb 1;100(2):653–69.
207. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: A versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol*. 2001;22(2):83–7.
208. Teixeira AL, Reis HJ, Coelho FM, Carneiro DS, Teixeira MM, Vieira LB, et al. All-or-Nothing Type Biphasic Cytokine Production of Human Lymphocytes After Exposure to Alzheimer's β -Amyloid Peptide. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2008 [cited 2021 Sep 8];64(10):891–5. Available from: www.sobp.org/journal
209. Johnstone M, Gearing AJH, Miller KM. A central role for astrocytes in the inflammatory response to β - amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol*. 1999;93(1–2):182–93.
210. Kester MI, Van Der Flier WM, Visser A, Blankenstein MA, Scheltens P, Oudejans CB. Decreased mRNA expression of CCL5 wRANTESx in Alzheimer's disease blood samples. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(1):61–5.
211. Tripathy D, Thirumangalakudi L, Grammas P. RANTES upregulation in the Alzheimer's disease brain: A possible neuroprotective role. *Neurobiol Aging*. 2010;31(1):8–16.
212. Vacinova G, Vejražková D, Rusina R, Holmerová I, Vaňková H, Jarolímová E, et al. Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) levels in the peripheral blood of patients with Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 9];16(4):796–800. Available from: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.295340>
213. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* [Internet]. 2009;8(2):205–16. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70016-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70016-X)
214. Brkic M, Balusu S, Libert C, Vandenbroucke RE. Friends or Foes: Matrix Metalloproteinases and Their Multifaceted Roles in Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015 [cited 2021 Sep 8];2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/620581>
215. Li W, Poteet E, Xie L, Liu R, Wen Y, Yang SH. REGULATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE 2 BY OLIGOMERIC AMYLOID β PROTEIN. *Brain Res*. 2011;1387:141–8.
216. Lorenzl S, Albers DS, Relkin N, Ngyuen T, Hilgenberg SL, Chirichigno J, et al. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2003;43:191–6.
217. Beroun A, Mitra S, Michaluk P, Pijet B, Stefaniuk M, Kaczmarek L. MMPs in learning and memory and neuropsychiatric disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2019 76:16 [Internet]. 2019 Jun 6 [cited 2022 Jun 1];76(16):3207–28. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-019-03180-8>
218. Bobińska K, Szemraj J, Gałecki P, Talarowska M. The role of MMP genes in recurrent depressive disorders and cognitive functions. *Acta Neuropsychiatr* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2022 Jun 1];28(4):221–31. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/acta->

- neuropsychiatrica/article/abs/role-of-mmp-genes-in-recurrent-depressive-disorders-and-cognitive-functions/0C4C9DF6DA6D3A23924656EF408A19AA
219. Yan P, Hu X, Song H, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, et al. Matrix Metalloproteinase-9 Degrades Amyloid- β Fibrils in Vitro and Compact Plaques in Situ. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Aug 25;281(34):24566–74.
 220. Guo S, Wang S, Kim WJ, Lee SR, Frosch MP, Bacsai BJ, et al. Effects of apoE isoforms on beta-amyloid-induced matrix metalloproteinase-9 in rat astrocytes. *Brain Res*. 2006 Sep 21;1111(1):222–6.
 221. Tubi MA, Kothapalli D, Hapenny M, Feingold FW, Mack WJ, King KS, et al. Regional relationships between CSF VEGF levels and Alzheimer's disease brain biomarkers and cognition. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2021;105:241–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.04.025>
 222. Religa P, Cao R, Religa D, Xue Y, Bogdanovic N, Westaway D, et al. VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival. *Sci Rep* [Internet]. 2013 Jun 24 [cited 2021 Sep 19];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23792494/>
 223. Spuch C, Antequera D, Portero A, Orive G, Hernández RM, Molina JA, et al. The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials* [Internet]. 2010 Jul [cited 2021 Sep 19];31(21):5608–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20430437/>
 224. Huang L, Jia J, Liu R. Decreased serum levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β 1 in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Neurosci Lett* [Internet]. 2013 [cited 2021 Sep 17];550:60–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.06.031>
 225. Mateo I, Llorca J, Infante J, Rodríguez-Rodríguez E, Fernández-Viadero C, Peña N, et al. Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 2007;116(1):56–8.
 226. Wang P, Xie ZH, Guo YJ, Zhao CP, Jiang H, Song Y, et al. VEGF-induced angiogenesis ameliorates the memory impairment in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2011 Aug 5 [cited 2021 Sep 19];411(3):620–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21771586/>
 227. Hohman TJ, Bell SP, Jefferson AL, Initiative for the ADN. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Neurodegeneration and Cognitive Decline: Exploring Interactions With Biomarkers of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2021 Sep 18];72(5):520–9. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/2190749>
 228. IL-18 signaling pathway (Homo sapiens) - WikiPathways [Internet]. [cited 2021 Nov 3]. Available from: <https://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP4754>
 229. Rex DAB, Agarwal N, Prasad TSK, Kandasamy RK, Subbannayya Y, Pinto SM. A comprehensive pathway map of IL-18-mediated signalling. *J Cell Commun Signal* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 8];14(2):257–66. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12079-019-00544-4>
 230. Alboni S, Cervia D, Sugama S, Conti B. Interleukin 18 in the CNS. 2010 [cited 2021 Oct 25]; Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/7/1/9>
 231. Scarabino D, Peconi M, Broggio E, Gambina G, Maggi E, Armeli F, et al. Relationship between proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-18) and leukocyte telomere length in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* [Internet]. 2020;136(April):110945. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110945>
 232. Ojala J, Alafuzoff I, Herukka SK, van Groen T, Tanila H, Pirttilä T. Expression of interleukin-18 is increased in the brains of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*. 2009;30(2):198–209.
 233. Ojala JO, Sutinen EM. The Role of Interleukin-18, Oxidative Stress and Metabolic Syndrome in Alzheimer's Disease. *Journal of Clinical Medicine* 2017, Vol 6, Page 55 [Internet]. 2017 May 21 [cited 2021 Oct 23];6(5):55. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/6/5/55/htm>

8 EKLER

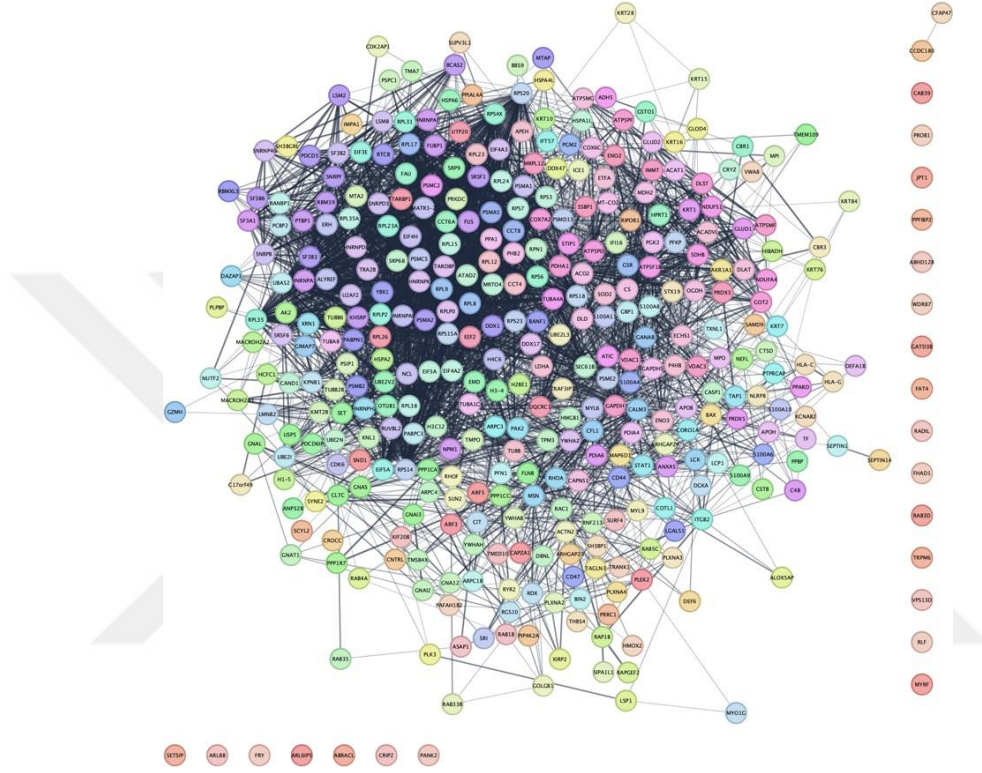
EK 1

Etik Kurul İzni



EK 2

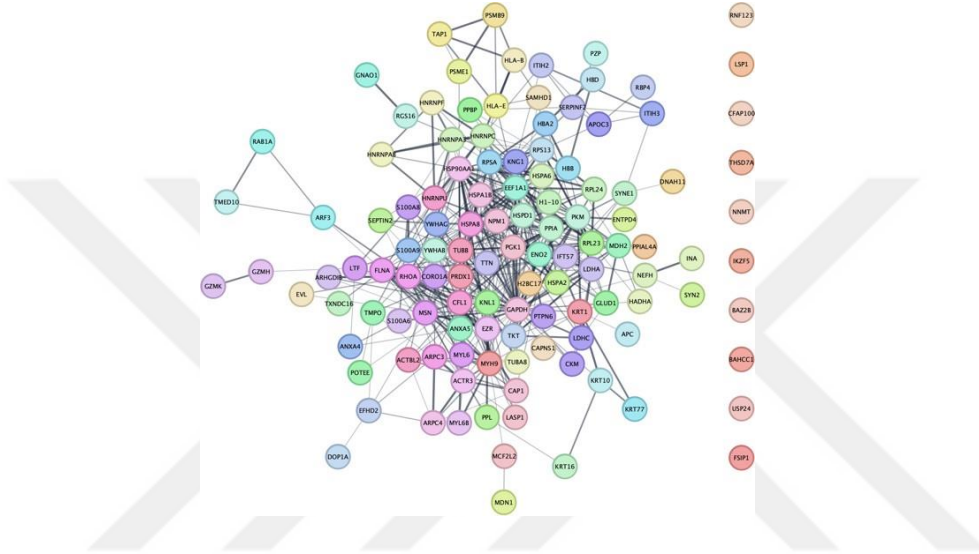
CD4+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin PPI analizi.



Şekil 26. CD4+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin PPI analizi.
(379 nodes, 4203 edges)

EK 3

CD8+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin PPI analizi.



Şekil 27. CD8+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin PPI analizi.
(119 nodes, 488 edges)

EK 4

CD4+ T hücrelerinde AH ve kontrol grupları karşılaştırmasında LC-MS/MS analizi ile anlamlı ekspresyon farklılıkları tespit edilen protein listeleri.

Tablo 15. CD4+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi.

Uniprot ID	Protein ismi	ÖPS	p	q	DO
P20292	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	2	0.024	0.017	17.53
P11766	Alcohol dehydrogenase class-3	4	0.000	0.000	16.17
P05164	Myeloperoxidase	3	0.003	0.003	7.70
Q08722	Leukocyte surface antigen CD47	2	0.017	0.013	6.96
Q13126	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	2	0.000	0.000	6.44
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2	6	0.000	0.000	4.88
P23743	Diacylglycerol kinase alpha	9	0.000	0.000	3.77
Q9Y376	Calcium-binding protein 39	4	0.000	0.000	3.68
O43665	Regulator of G-protein signaling 10	2	0.000	0.000	3.44
Q9NYT0	Pleckstrin-2	2	0.000	0.000	3.39
Q9NVJ2	ADP-ribosylation factor-like protein 8B	2	0.039	0.026	3.32
P06702	Protein S100-A9	4	0.006	0.006	3.25
P17693	HLA class I histocompatibility antigen_ alpha chain G	4	0.000	0.000	2.90
O15260	Surfeit locus protein 4	3	0.000	0.000	2.82
P34949	Mannose-6-phosphate isomerase	2	0.000	0.000	2.77
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase_ mitochondrial	10	0.018	0.013	2.73
Q5CZ79	Ankyrin repeat domain-containing protein 20B	3	0.006	0.006	2.68
P0C7T7	Putative uncharacterized protein FRMD6-AS1	2	0.002	0.002	2.67
Q15819	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	2	0.000	0.000	2.60
Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	5	0.000	0.000	2.55
O95777	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm8	3	0.002	0.002	2.53
P62995	Transformer-2 protein homolog beta	9	0.000	0.000	2.48
P30519	Heme oxygenase 2	2	0.001	0.001	2.47
Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein	7	0.000	0.000	2.45

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

P31937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase_ mitochondrial	2	0.003	0.003	2.43
Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain	2	0.004	0.003	2.42
P16070	CD44 antigen	6	0.002	0.002	2.42
Q96EP5	DAZ-associated protein 1	4	0.000	0.000	2.41
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	6	0.000	0.000	2.36
P51610	Host cell factor 1	5	0.000	0.000	2.35
P20718	Granzyme H	3	0.000	0.000	2.35
P38405	Guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha	3	0.003	0.003	2.33
Q16666	Gamma-interferon-inducible protein 16	5	0.000	0.000	2.33
Q9P0M6	Core histone macro-H2A.2	2	0.000	0.000	2.30
Q9P1F3	Costars family protein ABRACL	3	0.000	0.000	2.29
P51805	Plexin-A3	7	0.000	0.000	2.28
P84090	Enhancer of rudimentary homolog	6	0.000	0.000	2.27
P21912	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_ mitochondrial	3	0.001	0.001	2.27
Q9Y2S6	Translation machinery-associated protein 7	2	0.000	0.000	2.27
O75964	ATP synthase subunit g_ mitochondrial	3	0.000	0.000	2.26
Q9Y536	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A	3	0.000	0.000	2.26
Q96DI7	U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein	2	0.014	0.011	2.24
P59665	Neutrophil defensin 1	2	0.002	0.002	2.23
Q15435	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	5	0.000	0.000	2.22
Q9H4B4	Serine/threonine-protein kinase PLK3	2	0.017	0.013	2.21
P29466	Caspase-1	2	0.001	0.001	2.19
Q15286	Ras-related protein Rab-35	2	0.000	0.000	2.19
P62328	Thymosin beta-4	2	0.000	0.000	2.18
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	7	0.000	0.000	2.18
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha_ somatic form_ mitochondrial	2	0.000	0.000	2.17
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	4	0.000	0.000	2.17
P62081	40S ribosomal protein S7	12	0.007	0.006	2.14
P62266	40S ribosomal protein S23	3	0.000	0.000	2.13
P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	2	0.025	0.017	2.09
Q7Z5M8	Protein ABHD12B	2	0.002	0.002	2.09

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

P32455	Guanylate-binding protein 1	2	0.000	0.000	2.09
P63173	60S ribosomal protein L38	2	0.000	0.000	2.07
P60903	Protein S100-A10	3	0.000	0.000	2.07
Q8NG31	Kinetochore scaffold 1	3	0.002	0.002	2.06
P05388	60S acidic ribosomal protein P0	8	0.000	0.000	2.05
Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	3	0.002	0.002	2.04
Q8IYB8	ATP-dependent RNA helicase SUPV3L1_ mitochondrial	2	0.002	0.002	2.04
P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein	3	0.000	0.000	2.04
P68036	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	4	0.000	0.000	2.03
P23528	Cofilin-1	13	0.000	0.000	2.03
P09622	Dihydrolipoyl dehydrogenase_ mitochondrial	2	0.000	0.000	2.01
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	5	0.000	0.000	2.01
O43396	Thioredoxin-like protein 1	4	0.000	0.000	2.00
O95716	Ras-related protein Rab-3D	2	0.002	0.002	2.00
O14737	Programmed cell death protein 5	2	0.036	0.024	1.99
P16401	Histone H1.5	12	0.000	0.000	1.99
P61313	60S ribosomal protein L15	5	0.000	0.000	1.98
P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	3	0.001	0.001	1.97
P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1_ mitochondrial	7	0.000	0.000	1.97
O15050	TPR and ankyrin repeat-containing protein 1	2	0.001	0.001	1.97
Q9Y230	RuvB-like 2	6	0.032	0.021	1.97
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	8	0.000	0.000	1.97
Q9H4E7	Differentially expressed in FDCP 6 homolog	8	0.000	0.000	1.96
Q00610	Clathrin heavy chain 1	29	0.000	0.000	1.96
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	9	0.000	0.000	1.95
P0DP23	Calmodulin-1	13	0.000	0.000	1.94
P62195	26S proteasome regulatory subunit 8	3	0.003	0.003	1.94
Q9H082	Ras-related protein Rab-33B	2	0.014	0.011	1.94
P60468	Protein transport protein Sec61 subunit beta	2	0.000	0.000	1.93
P61224	Ras-related protein Rap-1b	3	0.001	0.001	1.93
P61970	Nuclear transport factor 2	4	0.000	0.000	1.93
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	14	0.000	0.000	1.92
P07237	Protein disulfide-isomerase	17	0.000	0.000	1.91

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

Q9HBH0	Rho-related GTP-binding protein RhoF	2	0.000	0.000	1.91
P05109	Protein S100-A8	2	0.004	0.004	1.91
Q13148	TAR DNA-binding protein 43	5	0.000	0.000	1.90
P10515	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex_ mitochondrial	4	0.011	0.009	1.90
P63279	SUMO-conjugating enzyme UBC9	3	0.000	0.000	1.90
Q9UHB9	Signal recognition particle subunit SRP68	2	0.002	0.002	1.89
P02775	Platelet basic protein	2	0.030	0.021	1.88
P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	8	0.000	0.000	1.87
P06703	Protein S100-A6	5	0.000	0.000	1.86
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	18	0.004	0.003	1.85
Q3SYG4	Protein PTHB1	3	0.001	0.001	1.85
Q9Y333	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2	3	0.000	0.000	1.84
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	7	0.000	0.000	1.84
Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	10	0.000	0.000	1.84
Q9Y3L3	SH3 domain-binding protein 1	3	0.011	0.009	1.83
P35609	Alpha-actinin-2	3	0.005	0.005	1.81
P50402	Emerin	2	0.000	0.001	1.81
P56134	ATP synthase subunit f_ mitochondrial	3	0.000	0.000	1.81
P14406	Cytochrome c oxidase subunit 7A2_ mitochondrial	3	0.000	0.000	1.81
P61088	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	6	0.000	0.000	1.80
P84085	ADP-ribosylation factor 5	5	0.000	0.000	1.80
P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	8	0.000	0.000	1.79
Q9BVC6	Transmembrane protein 109	2	0.000	0.000	1.79
Q14019	Coactosin-like protein	13	0.000	0.000	1.79
P68366	Tubulin alpha-4A chain	7	0.000	0.000	1.78
P04264	Keratin_ type II cytoskeletal 1	25	0.000	0.000	1.77
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	14	0.000	0.000	1.77
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	7	0.000	0.000	1.77
P42766	60S ribosomal protein L35	5	0.001	0.001	1.76
P62263	40S ribosomal protein S14	5	0.000	0.000	1.76
P31949	Protein S100-A11	6	0.000	0.000	1.76
P13929	Beta-enolase	11	0.013	0.010	1.75

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

P62917	60S ribosomal protein L8	7	0.000	0.000	1.75
P26038	Moesin	39	0.000	0.000	1.75
P48426	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha	3	0.001	0.001	1.75
Q9UH99	SUN domain-containing protein 2	11	0.000	0.000	1.74
P30044	Peroxisredoxin-5_ mitochondrial	7	0.000	0.000	1.74
P04632	Calpain small subunit 1	11	0.000	0.000	1.74
Q92688	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	3	0.000	0.000	1.73
P18859	ATP synthase-coupling factor 6_ mitochondrial	6	0.000	0.000	1.72
P09669	Cytochrome c oxidase subunit 6C	3	0.000	0.000	1.72
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	7	0.000	0.000	1.72
Q6V0I7	Protocadherin Fat 4	3	0.000	0.000	1.72
P49748	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial	2	0.000	0.000	1.72
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase_ platelet type	2	0.000	0.001	1.72
Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	3	0.008	0.006	1.72
P60866	40S ribosomal protein S20	3	0.000	0.000	1.71
O75369	Filamin-B	7	0.024	0.017	1.71
P62899	60S ribosomal protein L31	4	0.000	0.000	1.71
P30050	60S ribosomal protein L12	6	0.000	0.000	1.70
P04899	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	12	0.000	0.000	1.70
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	25	0.002	0.002	1.70
P68402	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha2	2	0.035	0.023	1.70
P43243	Matrin-3	13	0.000	0.000	1.69
P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	16	0.000	0.000	1.69
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	29	0.000	0.000	1.69
P26447	Protein S100-A4	9	0.000	0.000	1.69
P23396	40S ribosomal protein S3	17	0.000	0.000	1.69
Q96FW1	Ubiquitin thioesterase OTUB1	7	0.000	0.000	1.68
P49721	Proteasome subunit beta type-2	5	0.000	0.000	1.68
P35637	RNA-binding protein FUS	7	0.000	0.000	1.68
O75475	PC4 and SFRS1-interacting protein	11	0.000	0.000	1.68

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

P13798	Acylamino-acid-releasing enzyme	3	0.000	0.000	1.67
P25787	Proteasome subunit alpha type-2	2	0.000	0.000	1.67
O75947	ATP synthase subunit d_ mitochondrial	6	0.005	0.005	1.67
P07737	Profilin-1	30	0.000	0.000	1.67
P42224	Signal transducer and activator of transcription 1- alpha/beta	18	0.011	0.009	1.67
P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase_ mitochondrial	6	0.000	0.000	1.67
Q9HCM2	Plexin-A4	4	0.002	0.002	1.67
P04080	Cystatin-B	5	0.002	0.002	1.67
O75915	PRA1 family protein 3	5	0.000	0.000	1.66
P13667	Protein disulfide-isomerase A4	4	0.000	0.000	1.66
P62244	40S ribosomal protein S15a	6	0.000	0.000	1.65
O00483	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4	4	0.000	0.000	1.65
O43166	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1	2	0.027	0.019	1.65
Q8NHV1	GTPase IMAP family member 7	3	0.028	0.019	1.65
Q8WYJ6	Septin-1	10	0.000	0.000	1.64
Q86V81	THO complex subunit 4	6	0.000	0.000	1.64
Q5K651	Sterile alpha motif domain-containing protein 9	6	0.000	0.001	1.64
P08729	Keratin_ type II cytoskeletal 7	3	0.000	0.000	1.64
Q14498	RNA-binding protein 39	2	0.002	0.002	1.64
P36957	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex_ mitochondrial	6	0.000	0.000	1.63
O75390	Citrate synthase_ mitochondrial	12	0.000	0.000	1.62
Q9Y3B4	Splicing factor 3B subunit 6	2	0.019	0.014	1.62
P62805	Histone H4	36	0.000	0.000	1.62
Q14761	Protein tyrosine phosphatase receptor type C-associated protein	5	0.003	0.003	1.62
P62750	60S ribosomal protein L23a	6	0.000	0.000	1.61
P51148	Ras-related protein Rab-5C	3	0.000	0.000	1.61
B0I1T2	Unconventional myosin-Ig	13	0.000	0.000	1.61
O94776	Metastasis-associated protein MTA2	2	0.002	0.002	1.61

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

Q6ZU15	Septin-14	5	0.001	0.001	1.61
Q13303	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	8	0.000	0.000	1.61
P60660	Myosin light polypeptide 6	12	0.000	0.000	1.60
P31946	14-3-3 protein beta/alpha	16	0.000	0.000	1.60
Q99798	Aconitate hydratase_ mitochondrial	21	0.007	0.006	1.60
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	25	0.000	0.000	1.60
Q16891	MICOS complex subunit MIC60	8	0.000	0.000	1.60
P54819	Adenylate kinase 2_ mitochondrial	10	0.000	0.000	1.60
O95757	Heat shock 70 kDa protein 4L	8	0.000	0.000	1.60
P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	2	0.000	0.000	1.60
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	44	0.000	0.000	1.59
O15145	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	3	0.000	0.000	1.59
P13796	Plastin-2	49	0.000	0.000	1.59
P40926	Malate dehydrogenase_ mitochondrial	18	0.000	0.000	1.59
Q8WUM4	Programmed cell death 6-interacting protein	8	0.006	0.005	1.58
P62753	40S ribosomal protein S6	3	0.000	0.000	1.58
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein_ mitochondrial	8	0.000	0.000	1.58
Q01105	Protein SET	2	0.032	0.021	1.58
P62136	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	4	0.000	0.000	1.58
P62269	40S ribosomal protein S18	9	0.000	0.000	1.58
A3KMH1	von Willebrand factor A domain-containing protein 8	5	0.038	0.025	1.57
Q9UBW5	Bridging integrator 2	5	0.000	0.000	1.57
P78417	Glutathione S-transferase omega-1	8	0.008	0.007	1.56
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	6	0.001	0.002	1.56
Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1	2	0.027	0.019	1.56
Q7Z3Y7	Keratin_ type I cytoskeletal 28	9	0.000	0.000	1.56
Q96G03	Phosphoglucomutase-2	9	0.000	0.000	1.56
P06576	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	34	0.000	0.000	1.56
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	25	0.000	0.000	1.56
E7EW31	Proline-rich basic protein 1	3	0.037	0.024	1.56
Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2	16	0.000	0.000	1.55
O75367	Core histone macro-H2A.1	16	0.000	0.000	1.55

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

P09429	High mobility group protein B1	8	0.001	0.001	1.55
Q99623	Prohibitin-2	18	0.000	0.000	1.55
P07437	Tubulin beta chain	7	0.000	0.000	1.55
P00367	Glutamate dehydrogenase 1_ mitochondrial	17	0.000	0.000	1.55
P83731	60S ribosomal protein L24	11	0.000	0.000	1.55
P08754	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-3	3	0.019	0.014	1.54
P61254	60S ribosomal protein L26	4	0.005	0.004	1.54
P13645	Keratin_ type I cytoskeletal 10	20	0.000	0.000	1.54
A4UGR9	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	10	0.001	0.001	1.54
P61586	Transforming protein RhoA	9	0.000	0.000	1.54
Q86U42	Polyadenylate-binding protein 2	4	0.000	0.000	1.54
Q9HC38	Glyoxalase domain-containing protein 4	8	0.000	0.000	1.54
Q01546	Keratin_ type II cytoskeletal 2 oral	3	0.027	0.018	1.53
P68431	Histone H3.1	3	0.033	0.022	1.53
O15143	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	22	0.048	0.030	1.53
P10321	HLA class I histocompatibility antigen_ C alpha chain	7	0.014	0.011	1.53
Q9NSB2	Keratin_ type II cuticular Hb4	3	0.046	0.029	1.52
P04179	Superoxide dismutase [Mn]_ mitochondrial	8	0.000	0.000	1.52
O75531	Barrier-to-autointegration factor	3	0.022	0.016	1.52
Q04917	14-3-3 protein eta	3	0.053	0.033	1.52
P62829	60S ribosomal protein L23	5	0.001	0.001	1.52
P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1	14	0.000	0.000	1.52
P07339	Cathepsin D	7	0.000	0.000	1.52
P19338	Nucleolin	30	0.000	0.000	1.52
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	8	0.000	0.000	1.52
P08758	Annexin A5	16	0.001	0.001	1.52
Q14240	Eukaryotic initiation factor 4A-II	14	0.001	0.001	1.51
Q6PL18	ATPase family AAA domain-containing protein 2	2	0.001	0.001	1.51
Q9BX84	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 6	2	0.002	0.002	1.51
O75368	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	7	0.000	0.000	1.51
Q16695	Histone H3.1t	3	0.000	0.001	1.51
P19012	Keratin_ type I cytoskeletal 15	5	0.013	0.010	1.51

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

Q14974	Importin subunit beta-1	4	0.000	0.000	1.51
P18621	60S ribosomal protein L17	9	0.000	0.000	1.51
P32969	60S ribosomal protein L9	6	0.002	0.002	1.50
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	8	0.028	0.019	1.50
P61204	ADP-ribosylation factor 3	8	0.000	0.000	1.50
P33241	Lymphocyte-specific protein 1	22	0.001	0.001	1.49
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein ATIC	16	0.000	0.000	1.49
P14678	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	4	0.000	0.000	1.49
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	13	0.019	0.014	1.48
P04114	Apolipoprotein B-100	6	0.052	0.032	1.48
P30084	Enoyl-CoA hydratase_ mitochondrial	7	0.013	0.010	1.48
P62306	Small nuclear ribonucleoprotein F	2	0.001	0.001	1.48
Q92945	Far upstream element-binding protein 2	8	0.006	0.005	1.47
P00505	Aspartate aminotransferase_ mitochondrial	20	0.009	0.007	1.47
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	30	0.000	0.000	1.47
Q08257	Quinone oxidoreductase	5	0.024	0.017	1.47
P02787	Serotransferrin	13	0.000	0.000	1.46
O75051	Plexin-A2	7	0.050	0.031	1.46
P06748	Nucleophosmin	23	0.000	0.000	1.46
P31146	Coronin-1A	28	0.000	0.000	1.46
P28066	Proteasome subunit alpha type-5	10	0.000	0.000	-1.46
Q14789	Golgin subfamily B member 1	5	0.000	0.000	-1.47
A0A0A6YYC5	T cell receptor alpha variable 14/delta variable 4	3	0.018	0.013	-1.48
Q5THJ4	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D	2	0.001	0.001	-1.48
Q96Q89	Kinesin-like protein KIF20B	12	0.000	0.000	-1.49
P11488	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1	9	0.001	0.001	-1.51
Q03181	Peroxisome proliferator-activated receptor delta	2	0.000	0.000	-1.52
P67809	Y-box-binding protein 1	7	0.003	0.003	-1.52

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

Q8IZH2	5'-3' exoribonuclease 1	6	0.002	0.002	-1.53
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	2	0.009	0.007	-1.54
Q8N7X1	RNA-binding motif protein_ X-linked-like-3	17	0.003	0.003	-1.54
Q9UJU6	Drebrin-like protein	19	0.000	0.001	-1.55
P35998	26S proteasome regulatory subunit 7	2	0.002	0.002	-1.55
P07205	Phosphoglycerate kinase 2	5	0.009	0.007	-1.56
P06239	Tyrosine-protein kinase Lck	7	0.031	0.021	-1.56
O14556	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific	9	0.000	0.000	-1.56
P25786	Proteasome subunit alpha type-1	11	0.000	0.000	-1.58
Q9UMN6	Histone-lysine N-methyltransferase 2B	3	0.001	0.001	-1.59
P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1	10	0.000	0.000	-1.59
B1AJZ9	Forkhead-associated domain-containing protein 1	2	0.009	0.007	-1.59
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	2	0.001	0.001	-1.59
Q9BZ23	Pantothenate kinase 2_ mitochondrial	2	0.001	0.001	-1.59
P29218	Inositol monophosphatase 1	4	0.008	0.007	-1.59
P24844	Myosin regulatory light polypeptide 9	3	0.004	0.004	-1.61
P18077	60S ribosomal protein L35a	4	0.002	0.002	-1.61
O14519	Cyclin-dependent kinase 2-associated protein 1	2	0.001	0.001	-1.62
P45974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	11	0.005	0.005	-1.63
Q8ND30	Liprin-beta-2	3	0.013	0.010	-1.64
Q9UKD2	mRNA turnover protein 4 homolog	9	0.000	0.000	-1.65
A0A2R8Y619	Histone H2B type 2-K1	3	0.001	0.001	-1.67
P07196	Neurofilament light polypeptide	9	0.006	0.005	-1.68
P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha_ mitochondrial	14	0.023	0.016	-1.70
P30626	Sorcin	4	0.000	0.001	-1.71
Q9NWB7	Intraflagellar transport protein 57 homolog	2	0.000	0.001	-1.72
P63000	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	2	0.006	0.005	-1.72
Q8WXH0	Nesprin-2	14	0.008	0.006	-1.72
P13639	Elongation factor 2	42	0.000	0.000	-1.72
Q9H0S4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47	2	0.000	0.000	-1.76
P0C0L5	Complement C4-B	3	0.002	0.002	-1.76

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	2	0.025	0.018	-1.76
P20338	Ras-related protein Rab-4A	3	0.018	0.014	-1.79
Q13395	Probable methyltransferase TARBP1	2	0.000	0.000	-1.80
Q15181	Inorganic pyrophosphatase	7	0.006	0.005	-1.81
Q03113	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12	3	0.001	0.002	-1.82
P0DME0	Protein SETSIP	3	0.000	0.000	-1.84
A0A0B4J2D5	Putative glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3B_ mitochondrial	2	0.000	0.000	-1.87
P14550	Aldo-keto reductase family 1 member A1	8	0.000	0.000	-1.89
Q92736	Ryanodine receptor 2	22	0.020	0.015	-1.93
P05107	Integrin beta-2	5	0.000	0.000	-1.95
Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain	2	0.000	0.000	-1.95
Q58FG0	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A5	3	0.000	0.000	-1.97
Q13247	Serine/arginine-rich splicing factor 6	2	0.003	0.003	-1.97
Q9UI15	Transgelin-3	3	0.000	0.001	-1.99
P09104	Gamma-enolase	9	0.031	0.021	-2.02
Q6P3W7	SCY1-like protein 2	2	0.000	0.001	-2.03
P00390	Glutathione reductase_ mitochondrial	5	0.000	0.000	-2.06
P55795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	5	0.000	0.000	-2.09
Q03252	Lamin-B2	30	0.001	0.001	-2.10
P52943	Cysteine-rich protein 2	3	0.002	0.002	-2.13
P42166	Lamina-associated polypeptide 2_ isoform alpha	9	0.005	0.004	-2.14
Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1	16	0.000	0.000	-2.14
Q5JWF2	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	10	0.000	0.000	-2.15
Q6ZTR5	Cilia- and flagella-associated protein 47	3	0.019	0.014	-2.18
Q03518	Antigen peptide transporter 1	7	0.002	0.002	-2.18
Q96JH8	Ras-associating and dilute domain-containing protein	2	0.006	0.006	-2.18
Q9Y228	TRAF3-interacting JNK-activating modulator	12	0.000	0.000	-2.25

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

Q9ULH1	Arf-GAP with SH3 domain_ ANK repeat and PH domain-containing protein 1	2	0.000	0.000	-2.27
Q6ZQQ6	WD repeat-containing protein 87	5	0.000	0.000	-2.28
Q9P1Z9	Coiled-coil domain-containing protein 180	3	0.024	0.017	-2.29
Q00534	Cyclin-dependent kinase 6	3	0.000	0.000	-2.47
P62701	40S ribosomal protein S4_ X isoform	19	0.001	0.001	-2.49
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-- protein glycosyltransferase subunit 1	10	0.000	0.000	-2.54
P09382	Galectin-1	9	0.000	0.001	-2.57
Q9Y3I0	RNA-splicing ligase RtcB homolog	7	0.000	0.001	-2.57
P63126	Endogenous retrovirus group K member 9 Gag polyprotein	2	0.012	0.009	-2.57
O14578	Citron Rho-interacting kinase	2	0.000	0.000	-2.59
Q9NY65	Tubulin alpha-8 chain	4	0.047	0.030	-2.62
O75828	Carbonyl reductase [NADPH] 3	3	0.000	0.000	-2.65
Q13177	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	3	0.000	0.000	-2.69
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	4	0.017	0.013	-2.69
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III	14	0.000	0.001	-2.69
Q6ZS17	Rho family-interacting cell polarization regulator 1	2	0.001	0.001	-2.69
O94903	Pyridoxal phosphate homeostasis protein	2	0.000	0.000	-2.74
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	20	0.004	0.004	-2.80
Q9UK76	Jupiter microtubule associated homolog 1	2	0.002	0.002	-2.84
Q7Z7A1	Centriolin	3	0.000	0.000	-3.07
Q86W28	NACHT_ LRR and PYD domains- containing protein 8	2	0.000	0.000	-3.11
Q9Y2G1	Myelin regulatory factor	4	0.000	0.000	-3.46
P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	4	0.001	0.002	-3.59
Q07812	Apoptosis regulator BAX	2	0.000	0.000	-3.73
Q9Y4G8	Rap guanine nucleotide exchange factor 2	5	0.000	0.000	-3.80
Q5TBA9	Protein furry homolog	3	0.000	0.000	-3.91
Q9Y2F5	Little elongation complex subunit 1	2	0.000	0.000	-3.93
O75934	Pre-mRNA-splicing factor SPF27	3	0.009	0.007	-3.94

EK 4 (Devam)

Tablo 15. CD4+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam).

P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	2	0.000	0.000	-3.99
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	2	0.000	0.000	-4.00
Q63HN8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	7	0.000	0.000	-4.01
Q52LW3	Rho GTPase-activating protein 29	4	0.000	0.000	-4.21
P52815	39S ribosomal protein L12_ mitochondrial	4	0.000	0.000	-4.26
O14979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	12	0.000	0.000	-4.42
Q96M27	Protein PRRC1	2	0.000	0.001	-4.49
P50990	T-complex protein 1 subunit theta	19	0.000	0.000	-4.58
P35443	Thrombospondin-4	3	0.000	0.000	-4.77
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	15	0.000	0.000	-4.86
P35241	Radixin	3	0.000	0.000	-4.98
P08779	Keratin_ type I cytoskeletal 16	9	0.000	0.000	-5.29
Q5TZA2	Rootletin	2	0.000	0.000	-5.34
Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB	24	0.000	0.000	-5.61
P42331	Rho GTPase-activating protein 25	5	0.000	0.000	-5.77
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	3	0.000	0.000	-6.04
Q9BYX7	Putative beta-actin-like protein 3	2	0.000	0.000	-6.24
O75691	Small subunit processome component 20 homolog	7	0.000	0.000	-6.29
Q15459	Splicing factor 3A subunit 1	2	0.000	0.000	-6.48
Q8N4C7	Syntaxin-19	2	0.000	0.000	-6.48
Q9H9H5	MAP6 domain-containing protein 1	2	0.000	0.000	-6.61
Q9H361	Polyadenylate-binding protein 3	2	0.000	0.000	-6.93
Q02218	2-oxoglutarate dehydrogenase_ mitochondrial	7	0.000	0.000	-6.99
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6	8	0.000	0.000	-7.90
P34931	Heat shock 70 kDa protein 1-like	4	0.000	0.000	-8.05
P49448	Glutamate dehydrogenase 2_ mitochondrial	5	0.000	0.000	-8.56
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit_ mitochondrial	8	0.000	0.000	-8.87
Q8WXF1	Paraspeckle component 1	2	0.000	0.000	-9.09
Q8IXM2	Chromatin complexes subunit BAP18	2	0.000	0.000	-9.21
Q13129	Zinc finger protein Rlf	2	0.000	0.000	-15.53
P62861	FAU ubiquitin-like and ribosomal protein S30	2	0.000	0.000	-22.55

EK 5

CD8+ T hücrelerinde AH ve kontrol grupları karşılaştırmasında LC-MS/MS analizi ile anlamlı ekspresyon farklılıkları tespit edilen protein listeleri.

Tablo 16. CD8+ T hücrelerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi

Uniprot ID	Protein ismi	ÖPS	p	q	DO
P14618	Pyruvate kinase PKM	18	0.000	0.000	7.32
P06702	Protein S100-A9	5	0.018	0.026	5.18
P08758	Annexin A5	7	0.001	0.002	4.10
P02753	Retinol-binding protein 4	2	0.002	0.006	3.79
P28065	Proteasome subunit beta type-9	3	0.001	0.003	3.58
P61586	Transforming protein RhoA	4	0.000	0.000	3.34
P01889	HLA class I histocompatibility antigen_ B-7 alpha chain	6	0.004	0.008	3.23
P08779	Keratin_ type I cytoskeletal 16	3	0.000	0.000	3.13
P05109	Protein S100-A8	3	0.003	0.006	3.13
Q86YR7	Probable guanine nucleotide exchange factor MCF2L2	2	0.044	0.054	3.05
P29350	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	7	0.000	0.001	2.99
P33241	Lymphocyte-specific protein 1	14	0.000	0.000	2.91
Q92777	Synapsin-2	3	0.007	0.014	2.87
P20718	Granzyme H	4	0.011	0.018	2.73
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	10	0.001	0.003	2.67
Q9Y3Z3	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	25	0.000	0.000	2.51
P07437	Tubulin beta chain	5	0.000	0.000	2.51
Q9UI08	Ena/VASP-like protein	4	0.000	0.000	2.48
P20742	Pregnancy zone protein	2	0.006	0.011	2.46
P02775	Platelet basic protein	4	0.008	0.014	2.44
P06703	Protein S100-A6	3	0.000	0.001	2.40
Q8NA03	Fibrous sheath-interacting protein 1	10	0.001	0.002	2.37
Q03518	Antigen peptide transporter 1	2	0.005	0.010	2.34
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	30	0.001	0.002	2.26
P29401	Transketolase	9	0.001	0.004	2.20

EK 5 (Devam)

Tablo 16. CD8+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam)

P23527	Histone H2B type 1-O	8	0.047	0.057	2.18
Q8NG31	Kinetochore scaffold 1	4	0.007	0.013	2.18
P04264	Keratin_ type II cytoskeletal 1	26	0.000	0.002	2.17
P12036	Neurofilament heavy polypeptide	4	0.000	0.000	2.16
P01042	Kininogen-1	3	0.000	0.002	2.14
P40926	Malate dehydrogenase_ mitochondrial	9	0.002	0.005	2.13
P07864	L-lactate dehydrogenase C chain	2	0.000	0.000	2.12
P61158	Actin-related protein 3	12	0.000	0.000	2.09
P35579	Myosin-9	117	0.046	0.056	2.08
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	24	0.000	0.002	2.05
P25054	Adenomatous polyposis coli protein	4	0.009	0.015	2.04
Q494V2	Cilia- and flagella-associated protein 100	2	0.009	0.015	2.02
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	20	0.000	0.001	2.02
P15311	Ezrin	10	0.000	0.001	2.00
Q06830	Peroxiredoxin-1	13	0.000	0.002	1.97
Q9NY65	Tubulin alpha-8 chain	4	0.001	0.003	1.96
P62820	Ras-related protein Rab-1A	4	0.000	0.001	1.95
P08865	40S ribosomal protein SA	7	0.000	0.000	1.94
P69905	Hemoglobin subunit alpha	12	0.000	0.000	1.94
P26038	Moesin	35	0.000	0.002	1.93
P09525	Annexin A4	6	0.000	0.001	1.93
Q9Y536	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A	4	0.002	0.004	1.92
Q9UIF8	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B	3	0.000	0.000	1.92
P00367	Glutamate dehydrogenase 1_ mitochondrial	8	0.000	0.000	1.91
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	21	0.002	0.004	1.89
Q14847	LIM and SH3 domain protein 1	13	0.000	0.000	1.88
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	12	0.000	0.001	1.88
P02788	Lactotransferrin	34	0.000	0.000	1.88
Q7Z794	Keratin_ type II cytoskeletal 1b	4	0.008	0.014	1.87
P09104	Gamma-enolase	3	0.000	0.000	1.84
P04632	Calpain small subunit 1	6	0.003	0.006	1.82
Q9H5V7	Zinc finger protein Pegasus	3	0.003	0.006	1.82

EK 5 (Devam)

Tablo 16. CD8+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam)

Q562R1	Beta-actin-like protein 2	11	0.009	0.015	1.82
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	12	0.000	0.001	1.81
P42166	Lamina-associated polypeptide 2_ isoform alpha	4	0.000	0.002	1.81
Q96DT5	Dynein heavy chain 11_ axonemal	5	0.000	0.001	1.80
P62277	40S ribosomal protein S13	5	0.000	0.000	1.80
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	21	0.000	0.002	1.80
Q9NU22	Midasin	12	0.014	0.021	1.80
Q96C19	EF-hand domain-containing protein D2	10	0.007	0.013	1.80
Q9P281	BAH and coiled-coil domain-containing protein 1	4	0.001	0.003	1.78
Q8NF91	Nesprin-1	8	0.000	0.001	1.78
Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	5	0.000	0.001	1.78
P23528	Cofilin-1	11	0.010	0.016	1.77
P10809	60 kDa heat shock protein_ mitochondrial	18	0.000	0.001	1.74
O15145	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	5	0.000	0.001	1.74
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	9	0.000	0.000	1.73
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6	6	0.002	0.006	1.73
Q5JWR5	Protein dopey-1	3	0.001	0.003	1.73
Q16352	Alpha-internexin	2	0.000	0.001	1.71
P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A	8	0.005	0.009	1.71
O60437	Periplakin	2	0.001	0.003	1.70
P06748	Nucleophosmin	12	0.027	0.037	1.69
P68871	Hemoglobin subunit beta	7	0.008	0.015	1.68
Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	16	0.001	0.002	1.67
P02042	Hemoglobin subunit delta	8	0.001	0.003	1.66
P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha_ mitochondrial	6	0.000	0.000	1.66
Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1	23	0.000	0.000	1.66
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	23	0.000	0.000	1.66
Q9Y227	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	2	0.005	0.010	1.65
P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	16	0.000	0.002	1.62
P14649	Myosin light chain 6B	7	0.000	0.001	1.60
P31946	14-3-3 protein beta/alpha	11	0.022	0.030	1.59
P40261	Nicotinamide N-methyltransferase	4	0.035	0.044	1.58
Q5XPI4	E3 ubiquitin-protein ligase RNF123	2	0.001	0.002	1.57

EK 5 (Devam)

Tablo 16. CD8+ T hüclerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi (devam)

P31146	Coronin-1A	23	0.008	0.014	1.57
P09471	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	2	0.000	0.000	1.56
Q9UPZ6	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A	5	0.004	0.008	1.55
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	7	0.000	0.002	1.55
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	12	0.000	0.001	1.54
P08697	Alpha-2-antiplasmin	4	0.002	0.004	1.53
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	33	0.001	0.002	1.53
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	12	0.002	0.005	1.52
P62829	60S ribosomal protein L23	3	0.004	0.008	1.52
P21333	Filamin-A	104	0.006	0.011	1.52
P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	2	0.021	0.030	1.52
Q8WZ42	Titin	42	0.001	0.004	1.50
P13645	Keratin_ type I cytoskeletal 10	19	0.000	0.000	1.50
P61981	14-3-3 protein gamma	6	0.002	0.006	1.50
P02656	Apolipoprotein C-III	4	0.030	0.038	1.50
Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	2	0.007	0.013	1.50
P06732	Creatine kinase M-type	3	0.023	0.033	1.49
A6NMY6	Putative annexin A2-like protein	5	0.001	0.002	1.49
P61204	ADP-ribosylation factor 3	6	0.000	0.001	1.49
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	9	0.001	0.002	1.49
P49863	Granzyme K	3	0.001	0.004	1.48
P60660	Myosin light polypeptide 6	12	0.005	0.011	1.48
Q92522	Histone H1x	7	0.015	0.023	1.47
P83731	60S ribosomal protein L24	4	0.028	0.038	1.47
O15492	Regulator of G-protein signaling 16	2	0.025	0.034	1.47
P13747	HLA class I histocompatibility antigen_ alpha chain E	3	0.003	0.007	-1.53
P42167	Lamina-associated polypeptide 2_ isoforms beta/gamma	7	0.006	0.011	-1.72
Q9NWB7	Intraflagellar transport protein 57 homolog	2	0.010	0.016	-1.80
Q15019	Septin-2	2	0.000	0.000	-1.99
Q9P2K2	Thioredoxin domain-containing protein 16	2	0.000	0.002	-2.08
Q9UPU5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24	5	0.000	0.000	-2.63

9 ÖZGEÇMİŞ



