



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Tıbbi Biyokimya

Doktora Tezi

**BV2 MİKROGLİAL HÜCRELERİNDE LPS İLE İNDÜKLENEN  
İNFLAMASYONDA OLUŞAN SİTOKİN DEĞİŞİMLERİNİN TESPİT EDİLİP,  
CRP VE KİNİNOGEN-1'İN DEİMİNASYONUNUN WESTERN BLOT İLE  
ARAŞTIRILMASI**

Gamze DEMİREL  
ORCID: 0000-0001-6037-378X

Danışman  
Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK  
ORCID: 0000-0002-6281-8807

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri  
(BAP) tarafından 211418005 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2023



## ÖNSÖZ (TEŞEKKÜR)

Bu tez çalışmasının her aşamasında yardım, öneri, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgmeden büyük bir özveri ile beni her konuda yönlendiren, bu süreçte zengin bir akademik bakış açısı kazandıran çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK'e çok teşekkür ederim.

Tez izleme sürecinden gerek tecrübe gerekse bilgileri ve katkıları ile beni aydınlatan Doç.Dr. Nadir KOÇAK'a, Tez İzleme Komitesi Üyelerim Prof. Dr. Ali ÜNLÜ ve Dr. Öğretim Üyesi İbrahim KILINÇ'a; doktora sürecinde desteğini sürekli hissettiğim, çalıştığım kurumda huzurlu ve verimli bir ortam oluşmasında büyük çaba sarf eden Selçuk Üniversitesi Tıbbi Genetik Bölüm Başkanı Prof.Dr. Tülin ÇORA'ya; Tıbbi Genetik öğretim elemanlarından Dr.Öğr.Üyesi Ebru MARZİOĞLU ÖZDEMİR'e; okul müdürüm Prof. Dr. Uğur ARSLAN'a, tezin tüm aşamalarında bilgi ve deneyimiyle destek veren Doç. Dr. Çiğdem Damla DENİZ'e ve Muhammed Emin SARI'ya teşekkür ederim. Aynı zamanda birçok fedakârlık, özveri ve sabır ile sürekli olarak yanımda hissettiğim sevgili eşim Oğuzhan, kızım Hande ve oğlum Mete Koray'a, ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi bu doktora süresince benden desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürün çok ötesinde, varlıklarına derin bir minnetle.

Gamze DEMİREL

Aralık 2023

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ (TEŞEKKÜR)</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEZ ONAY SAYFASI</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU</b> .....	<b>vii</b>
<b>BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>ix</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Nörodejenerasyon.....	3
2.2. Nörodejeneratif Hastalıklar .....	4
2.2.1. Alzheimer hastalığı (AH) .....	4
2.2.2. Parkinson hastalığı (PH).....	5
2.2.3. Huntington hastalığı (HH).....	6
2.2.4. Motor nöron hastalığı (MNH) .....	7
2.2.5. Prion hastalığı.....	7
2.2.6. Lewy cisimcikli demans (LCD) .....	8
2.2.7. Multipl skleroz (MS) .....	9
2.2.8. Travmatik beyin hasarı (TBH) .....	9
2.3. Mikroglia .....	10
2.3.1. Mikroglianın fonksiyonları .....	10
2.3.2. Mikroglia ve nörodejeneratif hastalıklar .....	11
2.3.3. Mikroglia ve sitokinler .....	12
2.4. Posttranslasyonel Modifikasyonlar (PTM) .....	12
2.4.1 Deiminasyon.....	13
2.5. Kompleman Sistemi .....	15
2.5.1. C-reaktif protein (CRP).....	16
2.5.2. Kallikreinler .....	17
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>19</b>
3.1. Araştırmanın Türü .....	19

3.2. Etik Kurul Onayı .....	19
3.3. Araştırmanın Evreni Ve Örneklemi .....	19
3.4. Veri Toplama Araçları ve Teknikleri .....	19
3.4.1. Hücre kültürü.....	20
3.4.2. ELISA testi .....	22
3.4.3. RNA izolasyonu .....	23
3.4.5. Genomik DNA'nın uzaklaştırılması.....	24
3.4.6. cDNA eldesi .....	24
3.4.7. Primerlerin seçimi .....	24
3.4.8. Referans gen seçimi .....	25
3.4.9. Primer dilüsyonları ile primer etkinliğinin belirlenmesi .....	25
3.4.10. Real time kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR).....	26
3.4.11. Western blot analizi.....	27
3.5. Sınırlılıklar .....	28
3.6. Verilerin Analizi.....	29
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>31</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>35</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>41</b>
6.1. Sonuç.....	41
6.2. Öneriler.....	41
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>43</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>59</b>

## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **Gamze DEMİREL**'in “**BV2 Mikroglial Hücrelerinde LPS ile İndüklenen İnflamasyonda Oluşan Sitokin Değişimlerinin Tespit Edilip, CRP ve Kininogen-1'in Deiminasyonunun Western Blot ile Araştırılması**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 21.12.2023

Tez Danışmanı Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK  
Necmettin Erbakan Üniversitesi

Jüri Üyesi Doç.Dr. Filiz ALKAN BAYLAN  
Necmettin Erbakan Üniversitesi

Jüri Üyesi Dr.Öğr.Üyesi İbrahim KILINÇ  
Necmettin Erbakan Üniversitesi

Jüri Üyesi Doç.Dr. Nadir KOÇAK  
Selçuk Üniversitesi

Jüri Üyesi Doç.Dr. Çiğdem Damla DENİZ  
Konya Şehir Hastanesi

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 27/12/2023 tarih ve 32/13 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL  
Enstitü Müdürü

## TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

*BV2 mikroglial hücrelerinde LPS ile indüklenen inflamasyonda oluşan sitokin değişimlerinin tespit edilip, CRP ve Kininogen-1'in deiminasyonunun western blot ile araştırılması* başlıklı tez çalışmamın toplam 54 sayfalık kısmına ilişkin, 04.12.2023 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%17** olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

04.12.2023

Gamze DEMİREL

Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

## BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

21.12.2023

Gamze DEMİREL

## SİMGELER VE KISALTMALAR

- A $\beta$** :  $\beta$ -amiloid  
**AH**: Alzheimer hastalığı  
**ALS**: Amyotrofik lateral skleroz  
**APOE**: Apolipoprotein E  
**APP**: Amiloid öncü protein  
**BOS**: Beyin omurilik sıvısı  
**CJD**: Creutzfeldt-Jakob hastalığı  
**CRP**: C-reaktif protein  
**DMSO**: Dimetilsülfoksit  
**EBV**: Epstein-Barr virüs  
**ELISA**: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay  
**EV**: hücre dışı vezikül  
**FBS**: Fetal buzağı serumu  
**FTD**: Frontotemporal demans  
**GAPDH**: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz  
**gDNA**: Genomik DNA  
**GO**: Gen Ontolojisi  
**HK**: Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen  
**HTT**: Huntington proteini  
**IL1- $\beta$** : İnterlökin-1 beta  
**KBB**: Kan-beyin bariyeri  
**KEGG**: Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi  
**KKS**: Kallikrein-kinin sistemi  
**KNG-1**: Kininogen-1  
**LCD**: Lewy cisimcikli demans  
**LK**: Düşük moleküler ağırlıklı kininojen  
**LPS**: Lipopolisakkarit  
**mCRP**: monomerik CRP  
**MNH**: Motor nöron hastalığı  
**MPTP**: 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridin  
**MS**: Multipl skleroz  
**MSS**: Merkezi Sinir Sistemi  
**MTT**: 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür  
**NFT**: Nörofibriler yumak  
**OD**: Okunan değer (absorbans)  
**PAD**: Peptidil arjinin deiminaz  
**pCRP**: pentamerik CRP  
**PH**: Parkinson hastalığı  
**PrPsc**: Scrapie prion proteini  
**PrPc**: Hüresel prion proteini  
**PTM**: Posttranslasyonel modifikasyon  
**RT-PCR**: Real time polimeraz zincir reaksiyonu  
**SDS-PAGE**: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi  
**TBH**: Travmatik beyin hasarı  
**TNF**: Tümör nekroz faktö  
**VKİ**: Vücut kitle indeksi  
 **$\mu$** : Mikro

## TABLULAR LİSTESİ

**Tablo No**

**Sayfa No**

Tablo 3.1. BV2 Microglia hücre hattının özellikleri ..... 19



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 3.1. Dondurulmadan önce hücrelerin mikroskopik görünümü .....	21
Şekil 3.2. ELISA testi standart eğri.....	22
Şekil 3.3. RNA miktarı ve kalitesini belirlemek için RNA bant görünümü .....	23
Şekil 3.4. İdeal bir primer etkinliği grafiği ve denklemi.....	25
Şekil 3.5. RT-PCR'de optik analiz sonucu .....	26
Şekil 4.1. LPS uygulamasından sonra hücre canlılığı.....	31
Şekil 4.2. LPS kaynaklı IL-1 $\beta$ seviyesinde kontrole kıyasla olan değişim. Sunulan değerler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'sidir.....	31
Şekil 4.3. CRP, PADI ve KNG1'in ekspresyon grafiği.....	29
Şekil 4.4. RT-PCR verilerine göre genlerdeki ekspresyon seviyelerindeki değişimler.....	32
Şekil 4.5. F95 ile Western blotlama ile tespit edilen sitrulinlenmiş proteinler. Std: protein standart, 1: LPS uygulanmayan kontrol, 2: LPS uygulanan hücre grubundaki deiminasyona uğramış proteinler. ....	33

## ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Tıbbi Biyokimya  
Doktora Tezi

### **BV2 MİKROGLİAL HÜCRELERİNDE LPS İLE İNDÜKLENEN İNFLAMASYONDA OLUŞAN SİTOKİN DEĞİŞİMLERİNİN TESPİT EDİLİP, CRP VE KİNİNOJEN-1'İN DEİMİNASYONUNUN WESTERN BLOT İLE ARAŞTIRILMASI**

Gamze DEMİREL

Konya-2023

Nörodejenerasyon; prevalansı hızla artan ve tedavide güçlükler yaşanan birçok nörodejeneratif hastalığın ortak özelliğidir. Posttranslasyonel modifikasyonlardan biri olan deiminasyon (sitrülinasyon) inflamasyona bağlı olarak meydana gelebilir ve bu modifikasyondan Peptidil arjinin deiminaz (PAD) enzimleri sorumludur. Bu çalışmada BV2 mikroglial hücre hattına nöroinflamasyon oluşturmak için LPS uygulaması yapıldı ve sitokinlerden IL-1 $\beta$ 'da anlamlı artış gözlemlendi. PAD2, hedeflediğimiz proteinler olan CRP ve Kininojen'deki değişimi belirlemek için RT-PCR yapıldı. PAD2 ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Fakat Kininojen ve CRP ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmadı. Deimine proteinlerin tanımlanabilmesi için F95 antikoruna ile Western blotlama yapıldı. CRP için beklediğimiz bölgede bant saptandı ve CRP'nin deiminasyon adaylarından biri olabileceği görüldü. PAD ekspresyon seviyesindeki düşüşe rağmen çeşitli protein gruplarında deiminasyon tanımlandı. Bu durum daha çok enzimin aktivitesi ile bağlantılı olarak görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** CRP, Deiminasyon, Kininojen, Nörodejenerasyon, Western blot.

## ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences  
Department of Medical Biochemistry  
Medical Biochemistry  
Doctoral Thesis

### DETECTING THE CYTOKINE CHANGES THAT OCCUR IN LPS-INDUCED INFLAMMATION IN BV2 MICROGLIAL CELLS AND INVESTIGATING THE DEIMINATION OF CRP AND KININOGEN-1 BY WESTERN BLOT

Gamze DEMİREL

Konya-2023

Neurodegeneration; It is a common feature of many neurodegenerative diseases, the prevalence of which is rapidly increasing and the treatment of which is difficult. Deimination (citrullination), one of the posttranslational modifications, may occur due to inflammation, and Peptidyl arginine deiminase (PAD) enzymes are responsible for this modification. In this study, LPS was applied to the BV2 microglial cell line to create neuroinflammation and a significant increase in IL-1 $\beta$ , one of the cytokines, was observed. RT-PCR was performed to determine the change in PAD2, the proteins we targeted, CRP and Kininogen. A statistically significant decrease in PAD2 expression level was observed. However, there was no significant change in kininogen and CRP expression. Western blotting was performed with F95 antibody to identify deiminated proteins. A band was detected in the region where we expected CRP, and it was seen that CRP could be one of the deimination candidates. Despite the decrease in PAD expression level, deimination was identified in several protein groups. This situation is mostly seen in connection with the activity of the enzyme.

**Keywords:** CRP, Deimination, Kininogen, Neurodegeneration, Western blot.



# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1. Problemin Tanımı

Nörodejeneratif hastalıklar günümüzde en çok karşılaşılan sağlık sorunlarından biridir. Mikrogliaların neden olduğu nöroinflamasyon, Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Amyotrofik lateral skleroz (ALS) felç ve travmatik beyin hasarı ve benzeri dahil olmak üzere nörodejeneratif bozuklukların başlaması ve gelişmesinde kritik bir rol oynar (Vries ve Schwaninger 2016). Nörodejeneratif hastalıkların erken evrede teşhis seçenekleri azdır. Yeni biyobelirteçlerin keşfi nöroinflamasyon ile meydana gelen bilişsel bozukluk sürecini izlemek için hastalıkta klinik müdahale yaklaşımlarının iyileştirilmesi için çok önemlidir.

## 1.2. Araştırmanın Amacı

Enflamasyonda; iltihaplanma sırasında hücreler tarafından salınan maddelerdeki değişiklikler hastalıkların seyri hakkında bilgi verebilir. Sitokin seviyesindeki artışın nörodejeneratif hastalık patojenezi ile ilgili olduğu tespit edilmiştir (Oeckl ve ark. 2014). Aynı zamanda patogenez sürecinde bazı protein gruplarında posttranslasyonel değişim olan deiminasyonun gözlemlendiği görülmüştür. Bizim amacımız; BV2 mikroglial hücre hattına lipopolisakkarit (LPS) uygulayarak inflamatuvar yanıt oluşturmak, sitokinlerden IL1-β'nın inflamasyondan sonraki değişimini Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile gösterdikten sonra, kompleman sisteminin üyeleri olan C-reaktif protein (CRP) ve Kininogen (KNG)'de olması muhtemel deiminasyonun tespitini ve doğrulanmasını yapmaktır.

## 1.3. Araştırmanın Önemi

Daha önce hiçbir çalışmada BV2 mikroglial hücre hattında CRP ve KNG-1 proteinlerinin deiminasyona uğrayıp uğramadığı gösterilmemiştir. Çalışmamız nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesini izlemek için yeni biyobelirteçlerin keşfini sağlayıp, klinik deneylerin süresini azaltabilir ve tedavi için gereken maliyetleri ve zamanı azaltmaya yardımcı olabilir.

## 1.4. Araştırma Soruları

BV2 mikroglial hücreleri LPS ile indüklenerek nöroinflamasyon oluşturulduğunda; sitokinlerden interlökin-1 beta (IL1-β) üzerinde bir değişim gözlenir mi? Mikroglial hücreler nöroinflamasyon sonucunda post-translasyonel değişiklik olan ve birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkilendirilen protein deiminasyonunun CRP ve KNG-1 proteini üzerinde bir etkisi var mıdır?



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nörodejenerasyon

Nörodejeneratif hastalıklar; nöron ve glial hücrelerde geri dönüşü olmayan kayıplarla ilerleyen periferik ve merkezi sinir sisteminde (MSS) gerçekleşen harabiyetten kaynaklanır (Neumann ve ark., 2009). Harabiyetin sonucu olarak MSS’de iskemi, bağışıklık aktivasyonu, bağışıklık aracılı bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıklar örnek gösterilebilir (Amor ve ark., 2010). Hastalıkların başlangıcı ve ilerleme süreci epigenetik, genetik yapı ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca insanlarda ortalama yaşam süresinin uzamasıyla doğru orantılı olarak nörodejeneratif hastalıkların prevalansında da artış görülmektedir (Kovacs, 2018).

İmmun sistem aktivasyonu nöronal hasara neden olabildiği gibi, savunma amacı ile MSS'deki bağışıklık tepkileri yanıtı ile onarım ve rejenerasyona yardımcı da olur (Neumann ve ark., 2009). Aynı zamanda nekrotik hücreleri uzaklaştırmak ve nörotropik viral enfeksiyonları sınırlamak için de etkin olarak çalışan bir sistemdir. Bu nedenle, mikroglialın etkin rol oynadığı durumlar içerisinde beyin homeostazının koruyucusu ve nörodejenerasyonda hasarın başlatıcısı olmak gösterilebilir (Amor ve ark., 2010).

MSS'de hem adaptif hem de doğal inflamatuvar yanıtların meydana geldiği görülmektedir. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, ilk savunma hattı olarak bilinir ve apoptotik hücreleri temizlemek için çok önemlidir. Ek olarak doğuştan gelen bağışıklık tepkileri, mikroglia üzerinde çeşitli kemokinleri ve sitokinleri salgılar ve bu sayede iki yapı arasında ortak olarak bulunan uyarıcı molekülleri uyararak adaptif bağışıklık sisteminin hücrelerini toplama görevini de üstlenir (Bsibsi ve ark., 2002; Schwartz ve ark., 2009). İnflamatuvar yanıt oluşturarak nörodejenerasyonu hızlandıran faktörler arasında mikroglialar ve astrositlerde meydana gelen değişimler dikkat çekmektedir (Gelders ve ark., 2018). Bu değişimler; sitoplazmik organellerin yapısında değişiklikler (özellikle mitokondri ve lizozom üzerinde meydana gelen değişimler), hastalıkta hedef olan hücrelerde parçalanma, membranların bütünlüğünün bozulması, hastalıklara özgü inklüzyon cisimciklerinin belirmesi (Lewy inklüzyon cisimcikleri, TDP-43 proteini,  $\beta$ -amiloid birikimi) gibi yapısal değişiklikler ile seyreden farklı değişiklikler gözlemlenir (Mamura, 2000). Ek olarak; hücrelerde yer alan nöron ve glial bağlantılarda kesintiler, sinapslarda yıkılma ve nörofibriler yumak gibi işlenememiş

hücrel atıkların, hücrel arası alanda çoğaldığı görülebilmektedir. Bu değişikler zaman içerisinde hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (DeTure ve Dickson, 2019).

Nörodejenerasyon; prevalansı hızla artan ve tedavide güçlükler yaşanan birçok hastalığın ortak özelliğidir ve insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojileri çeşitlilik gösterir. Bazıları hafıza ve bilişsel bozukluklara neden olurken, diğerleri kişinin motor yeteneklerini etkileyebilir. Nörodejeneratif hastalıkların her biri çok farklı klinik tablolarla kendini göstermektedir (Abeliovich ve Gitler, 2016).

## **2.2. Nörodejeneratif Hastalıklar**

### **2.2.1. Alzheimer hastalığı (AH)**

Bunamanın önde gelen nedenlerinden birisi AH'dir. Hastalığın klinik olarak incelenmesinde ilk olarak bilişsel ve davranış olarak bozulma görülür (Maiti ve ark., 2017).

Hastalığın prevalansı 84 yaşın üzerindeki bireylerde yaklaşık %47, 65-74 yaş arası bireylerde ise bu oran %3'tür. Yani, genetik yatkınlığın önemine rağmen, yaşa bağlı mekanizmalar hastalığın ilerlemesinde en önemli risk faktörüdür (Vigasova ve ark., 2021). Buna ek olarak diyabet, hipertansiyon, serebrovasküler hastalıklar, hiperlipidemi, cinsiyet, eğitim düzeyinin düşük olması, toksik metaller, böcek ilaçları, endüstriyel atıklar da risk faktörleri olarak gösterilmektedir (Castellani ve ark., 2010; Maiti ve ark., 2017).

Günümüzde AH patogenezi açıklamak için en çok Amiloid Kaskadı hipotezi kullanılır (Ju ve Tam, 2022). Hipotezde; beyin bölgelerinde,  $\beta$ -amiloid ( $A\beta$ ), hiperfosforile edilmiş tau proteini, katlanmamış proteinler, ubikitinlenmiş proteinler gibi nörotoksiteyi artıran hücrel yapılar belirtilir (Selkoe, 2001). Hücre içerisinde fosforile edilmiş tau proteininin yumaklar halinde birikimi ve  $A\beta$  peptidinin senil plakta amiloid öncü proteinden (APP) ayrılarak damar duvarlarında ve plaklarda birikimi hastalıkla ilişkilidir (Duyckaerts ve ark., 2008; Mineur ve ark., 2005).  $A\beta$  'den oluşan amiloid plaklar ve tau proteini tarafından oluşan intranöronal nörofibriler yumaklar (NFT) hastalığın patolojik işaretleri olarak kabul edilmektedir (Audrain ve ark., 2016; Y. W. Zhang ve ark., 2011). Özetle; AH patogenezinde  $A\beta$  ve tau' nun üretimi ve birikimindeki fazlalığın birincil etki olabileceği düşünülmektedir (Popugaeva ve ark., 2015).

AH iki farklı yapıda görülebilir: Sporadik AH ve ailesel AH. Ailesel AH'na genellikle üç farklı gende meydana gelen mutasyonlar neden olmaktadır. Bunlar; APP ve presenilinleri kodlayan genlerdeki mutasyonları içerir (PS1 ve PS2). Bu tip hastalar, toplam AH hasta oranının %5-10'unu oluşturmaktadır (Goate ve ark., 1991; Levy-Lahad ve ark., 1995). Sporadik AH'de; Apolipoprotein E (APOE) genindeki polimorfizmin oluşmasında öncül olan epsilon dört alelinin AH oluşumunda genetik bir risk faktörü olabileceği belirtilmiştir (Bu, 2009; Fu ve ark., 2016). Nörolojik araştırmalara verilen öneme rağmen, AH patogenezinin moleküler mekanizmasının detayları hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Uwishema ve ark., 2022).

Günümüze kadar, AH iyileştirebilecek etkili bir ilaç bulunamamıştır (Ju ve Tam, 2022). Hastalığın karmaşık mekanizmaları ve birden çok faktör arasındaki etkileşiminin anlaşılabilmesi için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

### **2.2.2. Parkinson hastalığı (PH)**

İkinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır (More ve Choi, 2015). PH'ye yol açan mekanizmalara bakıldığında hem genetik ve hem de çevresel faktörlerin aralarındaki etkileşimin önemli olduğu görülür. PH'de ilerlemiş yaş başlıca risk faktörü olarak belirtilmiştir. Bunun haricinde cinsiyet, sigara kullanımı, metaller maruziyeti, eğitim, pestisitler, toksinler, solventler, komorbiditeler, vücut kitle indeksi (VKİ), travmatik beyin hasarı, enfeksiyon, kafa travması gibi birçok farklı bileşen risk faktörü olarak görülmektedir (Periñán ve ark., 2022).

PH, beyin hücresinde özellikle substantia nigra'dan çıkan dopaminerjik nöronların dejenere olması ile karakterize edilir. Nigrostriatal dejenerasyon, motor kontroldeki düşüş ile birlikte titreme, bradikinezi, katılık gibi durumlar ile sonuçlanır (Stykel ve Ryan, 2022).

Kümelenmiş  $\alpha$ -sinüklein, PH'nin patogenezinde önemli bir rol oynar.  $\alpha$ -sinüklein kümelerinin Lewy cisimciklerinde birikmesiyle birlikte, substantia nigra'da dopaminerjik nöronlarda kayıplar tespit edilir. Bu yüzden PH'da Lewy cisimciklerinin ( $\alpha$ -sinüklein, parkin ve ubiquitinlenmiş protein birikimi gibi) ve distrofik nöritlerin (Lewy nöritleri) intranöronal birikimi karakterizedir (Rajput, 1993).

PH'da  $\alpha$ -sinüklein birikimine ek olarak; striatumdaki dopamin tükenmesi, orta beyin dopaminerjik nöronlarının ilerleyici ölümü ve klinik olarak belirti ve semptomların görülmesi de patolojik özellikler arasında gösterilir (Alexander, 2022). Dopamin kaybı; motor semptomlar

olan, bradikinezi, istirahat tremoru, rijidite ve postural instabilitenin yanı sıra motor olmayan semptomlar olarak bilinen; uyku bozuklukları, depresyon ve bilişsel eksikliklerin ortaya çıkmasına yol açar (Rodriguez-Oroz ve ark., 2009).

Ailesel PH olgularının yaklaşık %10'u monogenik mutasyonlardan kaynaklanır. Sporadik PH vakaları ise; PH görülen kişilerin yaklaşık %90'ını oluşturur (Benitez ve ark., 2016).

PH'nın ailesel formlarında yapılan çalışmalarda  $\alpha$ -sinüklein, LRRK2, DJ-1, Parkin, PINK, UCH-L1 genleri hedeflenir. UCHL1, DJ-1, PINK1 ve LRRK2 genlerinde olan mutasyonlar otozomal resesif ailesel PH'ye neden olur (Bonifati ve Kishore, 2007; Maraganore ve ark., 1999; Saha ve ark., 2015; Valente ve ark., 2004). Hem ailesel hem de sporadik PH'da; oksidatif stresin, hücre işlevinin bozulmasına ve hücre ölümüne kadar giden sürece neden olan mekanizma olduğu düşünülmektedir (Brieger ve ark., 2012). Hastalığın tanımlama ve tedavisindeki eksiklikleri giderebilmek için moleküler anlamda daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

### **2.2.3. Huntington hastalığı (HH)**

Psikiyatrik semptomlar ve davranışsal sorunlar ile karakterize edilen otozomal dominant nörodejeneratif bozukluklardan biridir (Kremer ve Group, 1996). Hastalığın başlangıcından itibaren yaklaşık 15 yıl içerisinde, psikiyatrik bozukluk, bilişsel işlev bozukluğu ve kontrol kaybı gibi yetilerde azalma görülür (Rook ve Southwell, 2022).

Hastalığı etkileyen faktörler içerisinde; hücre işlev bozukluğu ve hücre kaybına katkıda bulunan faktörler, mitokondriyal işlev bozukluğu, Huntington proteini (HTT) protein işlevinde artış, transkripsiyonel düzensizlik, eksitotoksisiteyi ve iltihaplanma gösterilir (Bakels ve ark., 2022). HTT, hücrenin fonksiyonlarını düzenlemek için çalışan bir yapı proteindir ve yaklaşık olarak 400 proteinle etkileşime girebilir (Saudou ve Humbert, 2016). HTT geninde oluşan mutasyon ile değişken uzunlukta CAG nükleotid tekrarlarının oluşmasına neden olur ve oluşan mutasyon ile fazla sayıda uzun poliglutamin dizileri oluşur. Bu ise; nöron hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna hatta ölüme kadar gidebilir (Bates ve ark., 2015).

HH için hastalığı modifiye edici tedaviler ve belirlenmiş kesin bir tedavi seçeneği yoktur (Rook ve Southwell, 2022). Beyin omurilik sıvısı (BOS) ve plazma biyobelirteçleri, hastalığın erken saptanmasında yol gösterici olarak kullanılmaktadır (Tabrizi ve ark., 2020). Günümüzde mutasyona uğramış HTT geninin seviyesini düşürmek amacı ile denenmiş ilaçlar üzerine çalışmalar yapılmaktadır fakat hastalığın seyri üzerinde net bir fayda sağladığı kanıtlanamıştır (Virlogeux ve ark., 2021). Hastalığın moleküler açıdan detaylı araştırılması ve HH'li bireylerin vücut işlevlerini ve yaşam kalitelerini iyileştirmek için risk faktörlerinin belirlenmesi hastalığın süreci bakımından faydalı olabilir.

#### **2.2.4. Motor nöron hastalığı (MNH)**

MNH veya ALS; motor nöronlarda oluşan hasar ile kasların güçsüzleşmesine neden olup, hızlı ilerleyip ölüme kadar giden nörodejeneratif hastalıklardandır. Görülme çeşidine bağlı olarak hem sporadik hem de ailesel olarak ayırmak mümkündür (Verber ve ark., 2019).

Hastalığın oluşum sürecine ilişkin; aksonal iletimde yer alan yanlış katlanmış proteinler olduğu, RNA'nın anormal olarak işlem görmesi, hastalığın prion benzeri yapılarla yayılım göstermesi söylenebilir Nörolojik olarak karşılaşılan hastalıkların miktarının fazla olması, bu hücrelerin zayıflamasına yol açacak birçok faktörün varlığını akla getirmektedir. MNH üzerinde yapılan genetik çalışmalara bakılarak, özellikle; eksitotoksisite, RNA'nın eklenmesi ve taşınması olayları, mitokondrial fonksiyon sırasında ve sonrasında ayrıca posttranslasyonel değişiklikler gibi birçok faktörden etkilenecek oluşabileceği gösterilmektedir (Talbot, 2009).

Hastalığın tanısında farklı biyobelirteçlerden; vücut ağırlığı değişimi, solunum fonksiyonu, miRNA tespiti, oksidatif stres belirteçleri, BOS'ta oluşan protein miktarlarındaki değişim, nöroinflamasyon biyobelirteçleri gibi birçok faktör kullanılmaktadır. Erken tanıya yardımcı olacak çalışmalara ihtiyaç vardır (Verber ve ark., 2019).

#### **2.2.5. Prion hastalığı**

Prionlar, insanlarda Creutzfeldt-Jakob hastalığı adı altında nörodejeneratif hastalıklara neden olabilir. Prion hastalığı olan kişilerde beyin ve sinir dokularında dejeneratif değişiklikler ve sonunda ölüm gözlenir (Babelhadj ve ark., 2018).

Prionlar, scrapie prion proteininden (PrPsc) oluşur. Bu protein hücrel prion proteininin (PrPc) bir konformeri olarak bilinir. PrPsc, PrPc'nin kümelenmesine neden olur, bu da yanlış katlama ile PrPc'nin PrPsc'ye konformasyonel değişikliğine neden olur. Patolojik görünüm sinir dokularında süngerimsi oluşumlar şeklindedir. Proteinler, MSS dokularını enfekte eder. Daha sonra PrPc'nin konformasyonel dönüşümü indüklenir böylece MSS dokusu içinde proteinlerin geçişi gerçekleşir. PrPc'yi içeren enfekte beyin dokusunda görünüm süngerimsi değişikliklerle karakterize edilen nörotoksisite ile sonuçlanır (Belay, 1999).

Prion hastalığı, sporadik, genetik veya bulaşıcı bozukluklar olarak görülebilir. Sporadik Creutzfeldt-Jakob Hastalığında vakaların yaklaşık üçte biri baş ağrısı, halsizlik, vertigo, uyku veya yeme düzeninde bozukluklar ve kilo kaybı gibi şikayetler ile hastaneye başvurur (Rabinovici ve ark., 2006). Ailesel Jakob-Creutzfeldt bozukluğunda motor anormalliklere ek olarak hızlı ilerleyen demans görülür (Kovacs ve ark., 2005).

Hastalığın tedavisi mümkün değildir. Fakat farklı yöntemlerle PrP seviyelerinin düşürülmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca konakçı bağışıklık tepkisini başlatarak farklı tedavi seçenekleri oluşturulmaya çalışılmaktadır (Minikel ve ark., 2020; Tsou ve ark., 2022).

#### **2.2.6. Lewy cisimcikli demans (LCD)**

PH'nın demansı ile karışabilen, zihinsel ve davranışsal sorunlarla beraber hareketlerde bozuklukların görüldüğü nörodejeneratif hastalık çeşididir (I.McKeith, 2007). PH patolojisinde yer alan a-sinükleinin Lewy cisimcikleri şeklinde birikimi LCD patolojisinde de görülmektedir (I.G.McKeith ve ark., 2017; Fatima ve ark., 2015; Westergard ve ark., 2016). AH'den daha erken ölüm ve daha fazla morbiditeye neden olur. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda LCD'nin tüm demanslar arasında görülme sıklığının %7,5 olduğu gösterilmiştir (Jones ve O'brien, 2014).

LCD prevalansı yaşla birlikte artar, ayrıca epidemiyolojik özellikler ve etnik köken de hastalığın prevalansında değişikliklerin görülmesine neden olur (Goldman ve ark., 2020).

Hastaların EEG'sinde yapılan ölçümler ile bilişsel dalgalanma şiddetleri arasında bağlantılar bulunmuştur (Firbank ve ark., 2018). Bilişsel dalgalanmalar bilgiyi işleme sürecinde oldukça yavaşlama olmasına neden olduğu görülür (van Venrooij ve Pruijn, 2000a; Vlagsma ve ark., 2016).

Geliştirilen farklı belirteçler hastalık tanı ve şiddetine yardımcı olmaktadır (D. R. Lee ve ark., 2012). Vücut sıvısı ve doku temelli biyobelirteçlerin geliştirilmesinde hızlı ilerleme kaydedilmiştir, bireylerde olan faydalarını gözlemek için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır (Scott ve ark., 2021). Aynı zamanda; LCD'nin karmaşık genetik yapısını araştırmak, yeni terapötik hedefleri belirlemek için çoklu omik çalışmalar önerilmektedir (Watts ve ark., 2023).

### **2.2.7. Multipl skleroz (MS)**

MSS'nin otoimmün aracılı nörodejeneratif bir hastalıktır ve inflamatuvar demiyelinizasyon ile karakterizedir (McGinley ve ark., 2021). Genetik geçmiş dışında çevresel faktörlerin de hastalık üzerine etkisi vardır. Örneğin; D vitamini, sigara, güneş ışığı, Epstein–Barr virus (EBV), obezite bunlardan birkaçıdır (Ascherio, 2013).

Son 7 yılda MS'li kişi sayısına %30 oranında artış tespit edilmiştir. Artışın önlenmesinde erken teşhis ve tespit edilme yöntemlerindeki güvenilirliğin artırılmasının yaşam süresinin uzamasına yardımcı olabileceği belirtilmektedir (Walton ve ark., 2020). Yeni biyobelirteçlerin ve terapötik hedeflerin geliştirilmesi için glial hücrelerin kullanılması yeni yaklaşımlardan biri olarak görülmektedir (Schirmer ve ark., 2021).

### **2.2.8. Travmatik beyin hasarı (TBH)**

Beyin dokusunun fiziksel olarak yaralanmasıdır. İnsanları etkileyen en yaygın hastalıklar arasındadır ve beyin işlevini geçici veya kalıcı olarak bozulmasına neden olabilir (Parikh ve ark., 2007a). Hastalığın nedenleri arasında araç kazaları ve ulaşımda oluşabilecek kazalar, özellikle yaşlı ve küçük çocuklarda düşmeler, saldırılar ve spor faaliyetleri yer alır (Nortje ve Menon, 2004). Beyin dokusunun hasar görmesi sonucu beyin fonksiyonları hızlı bir şekilde bozulabilir.

TBH, klinik özelliklere bakılarak hafif, orta ve şiddetli olarak sınıflandırılmıştır (Silverberg ve ark., 2021). TBH modelleri incelendiğinde her zaman mikrogial hücrelerin aktivasyonu göze çarpar. Ancak aktivasyonun nöronal hasarı şiddetlendirip şiddetlendirmedeği veya nöronal sağkalımı teşvik edip etmediği net değildir. Ek olarak, adaptif bağışıklık tepkilerinin de rol oynadığı belirlenmiştir (Hailer, 2008). Mikroglia; TBH'na bağışıklık tepkisi olarak transkripsiyonel ve yapısal değişikliklere uğrar (Witcher ve ark., 2018). Oluşan hasarların değerlendirilmesi çeşitli görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır, mikroglia

oluşan hasarların belirlenmesinde de biyobelirteçler yol gösterici olabilir (Parikh ve ark., 2007b).

### **2.3. Mikroglia**

Mikroglia, bağışıklık yanıtında rol oynayan, hem MSS'de bulunan immun sistem hücreleri hem de nörovasküler birimin önemli bir bileşenidir. İmmün uyaranlar ve beyin hasarı oluşturan sebepler ile aktif hale gelir ve aktive olurken çeşitli değişiklikler geçirdiği görülmüştür (Spindler ve Hsu, 2012). Aktivasyon sonucu ve değişiklikler ile nöroinflamasyon oluşur, nöroinflamasyon ise kan-beyin bariyerinin (KBB) bozulmasında ve birçok nörodejeneratif hastalığın ilerlemesinde önemlidir (Lassmann ve ark., 2012).

Mikroglia'nın, toplam glial hücrelerin %10-15'ini oluşturduğu görülmüştür. MSS'nin dokuya yerleşik makrofajları olarak isimlendirilir, fakat diğer makrofajlardan farklı olarak; yolk sak kesesinden köken alır ve MSS'nin büyük çoğunluğunu doldurur (Ginhoux ve ark., 2010).

Erişkin beyninde makrofajlardan ve dendritik hücrelerden farklı olarak parçalanmış yapıda ve küçük bir hücre gövdesine sahiptir ve homeostazis, MSS gelişimi ve sinir sistemi hastalıklarının birçoğunda fonksiyon göstermektedir (Nayak ve ark., 2014).

#### **2.3.1. Mikroglia'nın fonksiyonları**

Mikroglia, beyin makrofajları görevini üstlenir ve nöron ağların bakımı, beyin gelişimi, yaralanma sonrası onarımı düzenleyen hücre grubu olarak görev yapar. MSS için tehlikeye oluşturabilecek protein agregalarının, mikropların, ölü hücrelerin, yabancı partiküllerin ortadan kaldırılmasından sorumludurlar. Ek olarak, nöroinflamasyonun önemli araçları olarak görev yapma, hücre sel yanıtı indükleme ve proinflamatuvar sitokinlerin birincil kaynağını oluşturma gibi fonksiyonları vardır (Colonna ve Butovsky, 2017).

Mikroglia'da; beyin gelişimi sırasında nörogenез ve mikrogliajenез gibi mekanizmaların birbirleri ile bağlantılı olması muhtemeldir. MSS'de etkileşimlerin bozulması üzerinde ciddi bir olumsuz etkiye sahip olabilmektedir (Nayak ve ark., 2014). Homeostatik fonksiyon düzenlenmesinde doğrudan nöronlar, kan damarları ve astrositler ile iletişim kurar. Mikroglia çeşitli hasarlara cevap olarak aktif duruma geçerek inflamatuvar fonksiyon hasarında ve enfeksiyona hızlı yanıt vermesinde görev alır. Mikroglia; dejenerasyon veya enfeksiyona

neden olan faktörlerin belirmesi ile morfolojik dönüşümlere uğrar ve MSS’de oluşan hasarları onarmak için hızlı bir şekilde yanıt verir (Goldmann ve ark., 2013).

Nörodejeneratif hastalıklar, inme, infeksiyon, beyin hasarı, tümörler gibi nöropatolojik durumlarda mikroglia morfoloji ve fonksiyon dönüşümleri gözlemlenir. Bu hücrelerin çalışmalarında, MSS’nin sağlığının korunmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Goldmann ve ark., 2013; Nayak ve ark., 2014).

### **2.3.2. Mikroglia ve nörodejeneratif hastalıklar**

Nörodejeneratif hastalıklarda, mikroglia hücre morfolojisinde değişiklikler gözlemlenir. Bu süreç 'reaktif mikrogliaz' olarak adlandırılır. Gen ekspresyonu profillemesi, mikroglia ontogenisinin incelenmesi, hücrelerin birbirleri ile olan bağlantısının tespiti gibi birçok araştırma mikroglianın gelişimi, hastalıklar sırasında sürecin incelenmesi ve hemostazın sağlanması gibi konularda bilgi edinilmesine yardımcı olmuştur (Colonna ve Butovsky, 2017).

Mikroglia aktif hale geldiğinde başlangıçtaki rolü nöroprotektif olmasına rağmen, sonraki dönemlerde MSS’de kronik bir nöroinflamatuvar duruma dönüşebilir. Mikroglia ve nöron arasındaki ilişkiden dolayı; mikroglia disfonksiyon ve hasarlı nöronların etken olmaları nedeniyle nörodejeneratif hastalığa yanıt verebilir, hatta bazı durumlarda da hastalığı şiddetlendirebilir.

Nörodejeneratif hastalıklar herbirinde spesifik protein agregatları ile karakterize edilir (Nayak ve ark., 2014). AH’nda mikroglia bol miktarda patolojik A $\beta$  plakları tespit edilmiş ve insan beyni üzerinde yapılan -omik çalışmalarında, AH’de fonksiyonel ve transkripsiyonel olarak birçok farklı değişikliğin meydana geldiği belirlenmiştir. Aynı şekilde PH ve HH’de de reaktif mikroglia ve hücre farklılıkları tespit edilmiştir (B. Zhang ve ark., 2013). Nörodejeneratif hastalıklarda meydana gelen mutasyonların, ALS ve frontotemporal demans (FTD) gibi farklı hastalık gruplarında da görüldüğü ve bu durumun mikroglia ile bağlantılı olduğu vurgulanmıştır (Bruijn ve ark., 1998). Son yıllarda mikroglia biyolojisinin anlaşılmasının hücredeki gelişim ve mikroglianın patolojik durumlarda verdiği tepkinin anlaşılmasına yardımcı olmuştur.

### 2.3.3. Mikroglia ve sitokinler

Sitokinler 8-30 kDa ağırlığında bir grup küçük polipeptitten oluşan ve farklı görevlerde kullanılan birçok çeşidi bulunmaktadır. Genellikle düşük konsantrasyonlarda etkinlik gösteren sitokinler çeşitli hücrel aktiviteyi düzenlemek için otokrin veya parakrin olarak haberleşme yapar (Swardfager ve ark. , 2010). Sitokin seviyeleri hastalık, yaralanma, inflamasyona yanıt olarak artış gösterir ve özellikle patolojik durumlarda hücre yenilenmesi, doku onarımında aktif rol üstlenirler. Periferik dokulardaki etkilerine göre proinflamatuvar veya antiinflamatuvar olarak sınıflandırılırlar (X. Y. Qin ve ark., 2016a).MSS patolojisi incelendiğinde mikroglial yanıtla birlikte bağışıklık fonksiyonu başlatılır. Bu aşamada sitokinler, fagositoz, antijen sunumu, sitotoksik faktörlerin üretimi de aktif olarak çalışır. Proinflamatuvar sitokinlerden interlökinler (IL-1 ve IL-6), tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mikroglia ile yakından ilişkilidir (X. Y. Qin ve ark. , 2016a). Proinflamatuvar sitokinlerin (özellikle IL-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$ ) mikroglial salınımı ve bunların nöronal dejenerasyondaki rolleri tanımlanmaktadır (Walter ve Neumann, n.d.; Zhou ve ark. , 2006).

### 2.4. Posttranslasyonel Modifikasyonlar (PTM)

PTM'lar; sentezden sonra proteinin belirli kısımlarında değişikliğe neden olan bir süreçtir. Bilinen proteinlerin birçoğu çeviri sonrası modifikasyonlara uğrar ve amino asitlerin de birçoğu bu değişikliğe uğrayarak değiştirilebilir (van Venrooij ve Pruijn, 2000b). PTM'lar; protein-protein etkileşimleri, enzimatik aktivite, hücre ve hücre yapılarının lokalizasyonu, protein stabilitesi gibi protein ile ilgili birçok konuyu kontrol etmekten sorumludur (Garavelli, 2004).

Protein modifikasyonu; nöroinflamasyon, bağışıklık fonksiyonu gibi birçok fizyolojik süreci her açıdan kontrol eder. 450'den fazla farklı PTM tanımlanmıştır. Ayrıca bir proteinin birden fazla PTM'ye uğradığı da gözlenmektedir (Beltrao ve ark., 2013). PTM türleri arasında fosforilasyon, metilasyon, asetilasyon, glikosilasyon, deiminasyon, ubiquitination gibi çeşitleri yer alır (Martin ve Zhang, 2005a).

En çok çalışılan protein modifikasyonlarından biri fosforilasyondur. Enzim aktivitesi, proteinlerin stabilitesi, birbirleri ile olan etkileşimleri, hücrel lokalizasyon, farklı substratlara ve fosforilasyon bölgelerine göre belirlenir (Johnson, 2009).

Protein metilasyonu; çoğunlukla proteinin arginin veya lizin kalıntılarında görülen translasyon sonrası modifikasyonlardan biridir. Arginin metilasyonu; RNA işleme, DNA onarımında ve sinyal iletiminde bazı kanser türlerinde tespit edilmiştir (D. Y. Lee ve ark., 2005). Lizin metilasyonun ise; kromozom inaktivasyonu, heterokromatinin yapısal değişikliği, protein süreçlerinde susturma veya aktivasyon gibi hayati süreçlerde rol oynadığı görülmüştür (Martin ve Zhang, 2005b).

Asetilasyon; genellikle lizinde meydana gelir ve histon asetilasyonu ve histon olmayan protein asetilasyonu olarak iki şekilde görülür. Bu tip PTM'nin gen transkripsiyonu; nükleazların enzim aktivitesi, protein yıkımı, çeşitli sinyal yollarının düzenlenmesi ve hücre döngüsü gibi birçok hücreyel süreç üzerine etkilidir (Ruhlmann ve ark., 2019).

SUMOlaşım; ökaryotlarda yaygın olarak görülen gen ekspresyonu, genomik bütünlük, hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesi gibi birçok alanda etkili olan translasyon sonrası protein modifikasyonu olarak çalışılmaktadır. Ayrıca; fosforilasyon, metilasyon, ubiquitination gibi diğer posttranslasyonel değişiklikleri ile de bağlantısı bulunmaktadır (Biggar ve Li, 2015).

Ubiquitinasyon; tersine çevrilebilir en önemli PTM'lerden biridir. Protein yıkımı, inflamatuvar yanıt, immün yanıt, hücreyel transformasyon ve diğer hücreyel işlevlerde ile de ilişkilidir (Goldstein ve ark., 1975).

Özellikle nöroinflamasyon gibi süreçlerde rol oynayan posttranslasyonel değişiklik olan deiminasyon son yıllarda ilgi gören değişikliklerden biridir.

#### **2.4.1 Deiminasyon**

Deiminasyon; Peptidil arjinin deiminaz (PAD) enzimleri aracılığı ile meydana gelir. Bu enzim, otoimmün ve enflamatuvar olaylarda anahtar rol oynayan proteinlerin epigenetik düzenlenmesi ve modülasyonu dahil çeşitli fonksiyonlara sahip olan bir grup kalsiyum bağımlı enzimdir (Mohan ve ark., 2012). Protein yapılarının içerisindeki peptid bağı olarak bulunan arginin kalıntıları modifikasyona uğradığı zaman proteinin bir parçası olarak kalır. Bu kalıntılarda sitrülün, peptidil sitrülün olarak görülmüş olur (van Venrooij ve Pruijn, 2000a). PAD tarafından katalizlenen deiminasyon ile argininin sitrülüne dönüştürülür. Bu değişim iyonik etkileşimleri ve proteinlerin net pozitif yükünü azaltarak etki gösterir (Vossenaar ve ark., 2003).

PAD mekanizması; enzimin Arg'nin guanidino grubuna saldırması, ortama amonyak salınırken oluşan eklenti bir su molekülünün nükleofilik saldırısı ile parçalanması şeklindedir. Bu parçalanma ile Cys kalıntısı üretilir, keto grubuna ek olarak yeni bir amin oluşumuyla sonuçlanır. Oluşan reaksiyon deaminasyon olarak kabul edilir çünkü amino grubu başlangıçta saldırıya uğramıştır. Tüm reaksiyon boyunca bir amino asitten arındırılmış bir amino asit oluşumu görüldüğü için reaksiyonun tamamı deaminasyon olarak adlandırılır (Arita ve ark., 2004).

İnsanlarda tanımlanan beş PAD izotipi; tüm omurgalılarda ve çoğu organ, doku ve hücrede tespit edilmiştir ayrıca %59 -71 homoloji ile yüksek oranda korunmaktadır (Senshu ve ark., 1995). İnsanlarda görülen 1p35-36'da tek bir lokusta bulunan beş gen, birbirinin izotipi olan PAD1-4 ve PAD6 olarak adlandırılan farklı PAD'ları kodlamaktan sorumludur (Chavanas ve ark., 2004).

PAD izotiplerinin ağırlıklı olarak bulunduğu bölgeler değişiklik göstermektedir. PAD1 epidermis ve uterusda değişikliklere neden olduğu görülmüş ve meme kanseri metastazında ve epitelyal-mezenkimal geçişte yeni rolleri tanımlanmıştır; kas tipi PAD olan PAD2 iskelet kaslarında, beyinde, dalakta, salgı bezlerinde tanımlanmış ve hem PAD2 hem de PAD4 otoimmün hastalıklar, kanser ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir; folikül tipi olarak bilinen PAD3 kıl foliküllerinde tanımlanmış ve cilt fizyolojisi ile ilişkili olduğu kadar CNS rejenerasyonu ve nöronal hücre ile de ilişkili bulunmuştur, PAD4 eozinofiller ve nötrofillerden insan miyeloid lösemi hücre dizisi, PAD6; PAD6 periferik kan lökositleri, yumurtalık, oosit ve erken bölünme evresinde bulunan embriyolarda yer almaktadır (Inal ve ark., 2022; Vossenaar ve ark., 2003).

Deaminasyon sonucunda proteinlerin birincil, ikincil ve üçüncül yapılarını değiştirdiği görülmüştür. Yüksek derecede deaminasyonun ise proteinleri denatüre edebildiği belirtilmektedir (Tarcza ve ark., 1996).

Protein yapısında sitrülün, doğal bir amino asit olmadığı için bağışıklık yanıtını artırabilir. Nörodejeneratif ve otoimmün inflamatuvar hastalıklarda deaminasyonun etkisinden söz etmek mümkündür (van Venrooij ve Pruijn, 2000a). Deaminasyon; gen regülasyonu ve hücrel farklılaşma olarak fizyolojik işlevlerde, patolojik süreçlerle ve multipl skleroz, romatoid artrit, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, sedef hastalığı gibi birçok önemli hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Chavanas ve ark., 2004).

## 2.5. Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi; alexin adı altında, plazmada ve serumda bulunan moleküller olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Paul Ehrlich antikorların antimikrobiyal etkisini arttırdığı veya tamamladığı için günümüzde de geçerli olan kompleman ismi adını almıştır (Paul, 2012).

Kompleman sistemi doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık tepkileri arasında bir geçiş bölgesi kabul edilir. Başlarda konakta bulunan enfekte bakterileri yok etmeyi amaçlayan litik bir kaskad olarak düşünülmüştür. Doğuştan gelen bağışıklıkta çözünür proteinler ve reseptörler ve düzenleyicilerden oluşan bir basamaktır. Bu sistem hücre yüzeyinde, plazmada, dokularda ve hücre içinde çalışır. 40'tan fazla proteinden oluştuğu bilinmektedir. Sistem proteinleri karaciğer tarafından üretilir (Merle ve ark., 2015).

Günümüzde ise kompleman sisteminin, inflamasyonda ve patojenlere karşı savunmada homeostazda rol oynayan immün sürveyans sistemi olduğu kabul görmüş görüşler arasındadır ve sistemin akut ve kronik olabilen patolojik durumlara da dahil olduğunu göstermiştir (Orsini ve ark., 2014). Sistemin tepkisel yanıtının oluşmasında; astrositler, mikroglia ve nöronlar tarafından gerçekleştirilir. Mikrogliaların, nöronların, astrositlerin, ve oligodendrosit gibi yapıların da kompleman proteinleri için çeşitli faktörleri, reseptörleri ve düzenleyicileri sentezleyebildiğini görülmektedir (Veerhuis ve ark., 2011). Örneğin; mikroglia, nöronlar ve astrositler kompleman sisteminden üyeler beyinin farklı hücreleri tarafından özelleşmiş olarak üretilebilir. Normal koşullarda, kompleman sistemi homeostaz ve beyin gelişimi sırasında aktiftir. Fakat beyin hücrelerinde hücresel hasar ve oluşan bu hasarın devamında kompleman sistem elemanlarında belirgin artışlar görülebilir ve oluşan bu tepkinin doku hasarına katkıda bulunabildiği gösterilmiştir (Woodruff ve ark., 2010).

Nörodejeneratif hastalıklarda kompleman sisteminin prensibi; hücresel bağışıklık yanıtlar ve MSS'de yer alan spesifik antijenlere karşı T-hücre miktarında artış gözlenmesi veya MSS'ye ek olarak çevre yapılarında da CD4 + ve CD8 + hücre sayısında değişiklikler görülmesi ile kanıtlanmıştır (Huizinga ve ark., 2009). MSS'de; antijen sunan hücrelere örnek olarak astrositler, mikroglia ve endotelial hücreler verilebilir. kemokinler, kompleman faktörleri, çeşitli sitokinlerin salgılanması bu hücre gruplarının immün aktivasyonunu tetikleyebilir (Ankeny ve Popovich, 2009).

Çeşitli dokulardaki kompleman sistem elemanlarının sentezi ve kontrolsüz kompleman aktivasyonu; hastalıkların kronik evrelerinin göstergesi olarak ortaya çıkan KBB’nde hasarları, lokal inflamasyona ve nöron kaybına neden olduğu kanıtlandığı için önemlidir (Gasque ve ark., 2000). Sistemin çalışma mekanizmasının bilinmeyen yönlerinin anlaşılması nörodejeneratif bozukluk belirmeye başladığı zaman kümelenmiş proteinlerin erken evrede ortadan kaldırılması için yararlı olabilir (Bonifati ve Kishore, 2007).

### **2.5.1. C-reaktif protein (CRP)**

Pentraxinler, kompleman sistemiyle birlikte gelişen ve omurgasız canlılardan memelilere kadar filogeni boyunca korunan molekülleridir (Martinez de la Torre ve ark., 2010). CRP; pentraxinlerden biridir ve yaklaşık 206 amino asit içeren iki anti paralel yapı şeklinde katlanmış, küresel protomerlerdir (Gill ve ark., 2004).

Daha çok karaciğer hücreleri tarafından, az oranda da makrofajlar ve vasküler düz kas hücreleri gibi farklı hücreler tarafından da üretilen, inflamatuvar ve enfeksiyöz süreçlerde proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak ortaya çıkan akut faz proteini olarak görev yaparlar (Luan ve Yao, 2018; Salazar ve ark., 2014).

CRP; yapısal olarak farklı formlarda bulunabilir. Bunlar; doğal pentamerik CRP (pCRP) ve monomerik CRP (mCRP) farklı reseptör ve lipid yapılarına bağlanabilirler ayrıca birbirinden farklı fonksiyonel özellikler gösterebilirler. Konformasyonel değişiklik ile fosfokolin lipid baş grupları açıkta kalır ve bunlar aracılığıyla pCRP'nin hasarlı hücre zarlarına bağlanması sağlanır (Zeller ve ark., 2023). pCRP, neoepitop oluşumuna yol açan konformasyonel değişikliklere (mCRP'ye dönüşmek gibi) uğrayarak yaralı dokuya yerleşir ve böylece aktive olmuş olur. Neoepitop oluşumunda rol oynayan CRP kümelenmeleri, iltihaplanma ile bağlantılı bulunmuştur. Bu CRP formlarını saptamak için proteine özgü antikolar kullanılır, fakat pCRP ve mCRP arasında ayırım yapamaz (Mihlan ve ark., 2011).

CRP'nin de içerisinde bulunduğu bağışıklık sisteminin aktivasyonunun nöroinflamasyonda kan-beyin bariyerinin bozulması gibi çeşitli süreçlerde aktive olduğu görülmüştür (Gill ve ark., 2004). Ayrıca yaralanma gibi olaylarda hepatik sentezde artış olur ve miyokard enfarktüsü ve iskemik beyin hasarı gibi mevcut doku hasarı kompleman aracılı olarak şiddetlendirilebilir (Luan ve Yao, 2018). Buna bağlı olarak nörodegeneratif hastalıklarda mikroglia da CRP'nin kümelenmesi, kompleman aktivasyonu gibi süreçlerin, protein yapı

değişikliklerinin ve moleküller arasındaki bağlantının daha detaylı araştırılması gerekmektedir (Braig ve ark., 2017).

### **2.5.2. Kallikreinler**

Kallikreinler, substratlarına yüksek oranda afinite gösteren enzimlerdir ve insanlarda bulunan serin proteaz enzim grubunun %32'sini oluşturmaktadır. Proteinleri serin rezidülerinden kestikleri için serin proteaz enzim grubuna dahil edilirler. Düzenlenmeleri ise steroid hormonlar ile olmaktadır (Stavropoulou ve ark., 2005).

Kallikreine ait olan üyeler tükürük bezleri, hipofiz bezi, pankreas, prostat gibi vücutta birçok dokuda ifade edilmekte olup; 15 farklı üyeden oluşmaktadır (Duffy 1996; Scarisbrick ve ark., 2008a). Aile üyelerinin ortak yapısal özellikleri olmasına rağmen dokulardaki ifade düzeyleri farklılık göstermektedir. Aynı gen bölgelerinde yer alan kallikreinlerin beraber fonksiyon gösterdiği durumlar; hücre büyümesi ve farklılaşması, koagülasyon, inflamasyon, fibrinozis, sindirim ve apoptoz olarak bilinmektedir (Pignataro ve ark., 2005).

Kallikrein-kinin sistemi (KKS), prekallikrein ve kininojen arasındaki karmaşık bir etkileşimden oluşur. KNG'ler, insanlarda KNG1 geni tarafından kodlanır. Karaciğerde sentezlenen glikoprotein yapısında bileşiklerdir. Çoğunlukla kan dolaşımında tespit edildiği ancak diğer vücut sıvılarında, böbrekler gibi organlarda ve nötrofiller gibi hücrelerde de görülebilen çok işlevli yapılardır (Markaki ve ark., 2020a).

#### ***Kallikreinlerin biyolojik rolü***

Kallikrein ailesinin 15 üyesinin 3 tanesinin spesifik biyolojik fonksiyonlar gösterdiği belirtilmiştir. İnsanlarda tespit edilen kallikreinler ilk olarak kallikrein 11'in (tripsin benzeri serin proteaz olarak da bilinir) beyinden elde edilen doku cDNA'sından üretildiği bilinmektedir. Bu ilk keşiften sonra diğer üyelerin de bulunması için çalışmalar yoğunlaşmıştır (Yoshida ve ark., 1998).

Kallikrein 1, düşük molekül ağırlığı olan kininogenden lisilbradikinin salınımını gerçekleştirir. Gen düzeyinde eksprese edilmesinde farklılıklar olduğu için, hücre tiplerine göre farklı görevleri olduğu gözlenmektedir. Örneğin; pankreas, hipofiz bezi ve diğer dokularda, enzim aktivitesine ek olarak growth faktör ile peptid hormonları ile etkileşimde olduğu görülmektedir (Scarisbrick ve ark., 2008b).

Kallikrein 2 proteininin fizyolojik rolü incelenirken substrata yönelik spesifisite ölçümü yapılmış, Kallikrein 1 ve 2 arasındaki önemli farklılıklar bulunmuştur. İki proteinin farklı substratlara sahip olduğu ayrıca insan kallikrein 2'nin kallikrein 1'e göre kininogenaz aktivitesi bakımından daha düşük etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Charlesworth ve ark., 1999). Kallikreinlerin enzimatik aktivasyonunun, dokulardaki bazı fonksiyonları sonlandırma bazılarını ise başlatma etkisi yaptığı belirtilmiştir. Farklı etkilerin görülmesinin growth faktörler, hormonlar ve sitokinlerle beraber yürütülmektedir. Farklı kallikreinlerin aynı doku üzerinde artarda ekspresyonunun gözlenmesi, kaskad ile etkileşim olduğunu ve bu etkileşimlerin koagülasyon, apoptoz, enzim yıkımı, fibrinoliziz gibi hücrel olaylarda beraber rol aldıklarını göstermektedir (Chambers ve Matrisian, 1997).

KNG'den iki farklı protein üretilir bunlar; Düşük moleküler ağırlıklı kininojen (LK) ve yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HK)'dir. Plazmada bulunan kininojenlerin çoğunu LK (~1,3 µmol/L) oluştururken, HK daha düşük bir konsantrasyonda (~0,67 µmol/L) olduğu bilinir (Yen ve ark., 2016a).

Plazma bağlantılı kinin sisteminin en önemli parçalarından biri olan HK'nın temel görevi kallikrein-kinin sisteminin düzenlenmesi, kanın pıhtılaşmasıdır aynı zamanda proteinlere, yabancı yüzeylere ve patojenlere karşı uyarılan inflamatuvar yanıtta sorumlu sistemin kofaktörü olarak da görev yapmaktadır. Serin proteazlardan oluşan FXII, kinin bağlantılı sistemi aktive eder, bunu takiben plazma kallikrein tarafından KNG parçalanır ve ardından proinflamatuvar peptid hormonu olan bradikinin salınımı tetiklenir (Maas ve ark., 2011). Bradikinin, proinflamatuvar ve vazoaaktif bir nonapeptittir ve miktarı artışına bağlı olarak prostaglandin ve nitrik oksit üretimini artırır, hipotansiyon, vasküler geçirgenliğin artması, düz kas kasılması ve ateş gibi birçok fizyolojik etkisi bulunmaktadır (Colman ve ark., 1989). HK bölünmesinin miyokard enfarktüsü, iskemik inme gibi tromboenflamatuvar hastalıklarda, otoimmün hastalıklarda ve hiperlipidemi, sistemik lupus eritematozus, kanserler ve sepsis gibi hastalıklarda meydana geldiği görülmüştür (Lalmanach ve ark., 2010). LK da, HK'ye benzer şekilde trombosit agregasyonunu inhibe etmektен sorumludur. HK ve LK parçalanması; bakteriyel proteazlar da dahil olmak üzere nötrofil türevli proteazlar ve doku kallikreininin ayrıca bradikinin ile ilgili kininleri serbest bırakır (Kahn ve ark., 2009; Mandle ve ark., 1976). Serbest kalan kininlerin alveolar makrofajları uyardığı, nötrofilleri topladığı ve bu etkiler ile de patojenlere karşı konak tepkisini güçlendirdiği görülmüştür (Paegelow ve ark., 2002).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmanın Türü

Çalışma deneysel (in vitro) bir çalışmadır.

#### 3.2. Etik Kurul Onayı

E-12866609-300-35056 numaralı 07.04.2021 tarih ve 09/05 sayılı karar ile kabul edilmiştir.

#### 3.3. Araştırmanın Evreni Ve Örneklemi

BV2 mikroglia hücre hattında LPS uygulanan ve LPS uygulanmayan (kontrol) olmak üzere iki grup oluşturuldu. Sitokin değişimi, PAD, CRP ve KNG-1 gen ekspresyon değişimleri PCR ile belirlendi, F95 antikoruna ile deiminasyon olup olmadığı gruplar arasında karşılaştırma yapılarak değerlendirildi.

#### 3.4. Veri Toplama Araçları ve Teknikleri

Araştırmada BV2 fare mikroglial hücre hattı kullanıldı. BV2 mikroglial hücre hattı Doç. Dr. Fatma Nihan CANKARA aracılığı ile İzmir Genome Enstitüsünde Prof. Dr. Hatice Güneş Özhan Baykan hocamızdan sağlanmıştır.

Hücre hattı nörobilim araştırmalarına uygun olması nedeniyle tercih edilmiştir, özellikleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** BV2 Microglia hücre hattının özellikleri

Hücre hattı	BV2 Microglia
Organizma	Mus Musculus
Doku	Beyin
Hücre tipi	Microglia
Kültür özelliği	Aderent halinde agregatlar oluşturarak
Subkültür oranı	1:2 – 1:4

### 3.4.1. Hücre kültürü

Hücre kültürü aşamalarında kullanılan kimyasallar Life Technologies/Gibco 'dan temin edilmiştir. BV2 Microglia hücreleri Eagle'ın %10 FCS ile desteklenmiş temel kültür ortamında, %5 CO<sub>2</sub>'ye dengelenmiş nemli atmosferde 37°C'de büyütüldü.

#### *Hücre dondurma ve çözme prosedürü*

BV2 hücreleri, kontaminasyondan kaynaklanan kayıpları önlemek, genetik değişimi en aza indirmek ve hücre stoğu elde etmek için dondurularak saklandı. Hücre dondurma işlemi için şu adımlar izlendi;

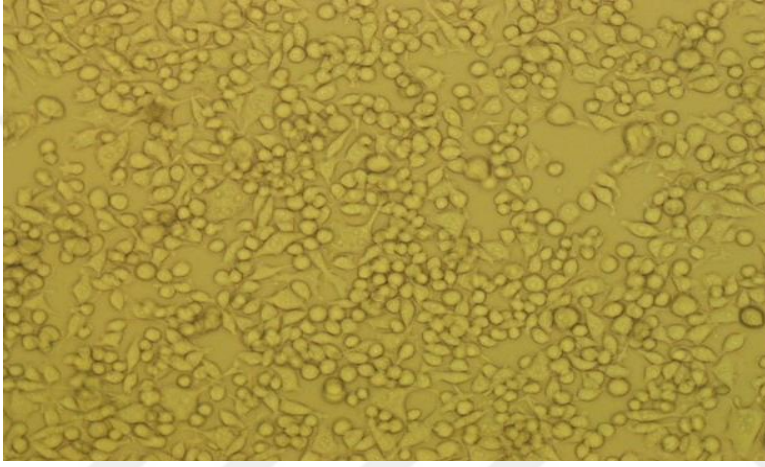
- Hücreler öncelikle kontaminasyon açısından kontrol edildi.
- Hücreleri dondurmak için %10 DMSO (dimetilsülfoksit) içeren complete medya ile dondurma ortamı hazırlandı.
- Hücreler tripsinize edilerek flask tabanından ayrılması sağlandı. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Hücre yoğunluğuna göre, pellet uygun miktarda dondurma ortamı ile yeniden süspansiyon edildi ve 2 ml'lik kryo tüplere bölüştürüldü.
- Tüpler önce -20 °C'de 2 saat bekletildikten sonra -80 °C veya sıvı azot tanklarına alınarak muhafaza edildi.

Hücre çözme işlemi için ise şu adımlar izlendi;

- Sıvı azot ya da -80 °C dondurucudan çıkarılan hücreler 37 °C su banyosunda hızlıca çözülürdü.
- Hücreler complete medya ile karıştırılarak 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı ve pellet besiyeri ile yeniden süspansiyon edilerek T25 flask'a ekildi.

Dondurulmuş hücreler öncelikle 37 °C'lik su banyosunda hızla eritildi. On dört ml'lik falkon tüpe 10 ml medyum ilave edildikten sonra üzerine, hücre solüsyonu damla damla eklenerek 200 x g de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürüldü. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelleti steril 1x Phosphate Buffered Saline (PBS; Gibco®-Invitrogen, ABD) ile bir kez yıkandı ve tekrar aynı santrifüj koşullarında çöktürüldü. BV2 hücreleri %10 fetal bovine serum (FBS; Gibco®-Invitrogen, ABD), %1 L-glutamine ve %1 antibiyotikli (Penicillin-Streptomycin 1:1; Gibco®-Invitrogen, ABD) DMEM (Gibco®-Invitrogen, ABD) kültür vasatında, T25 kültür flaskında 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde yeterli doluluk oranına ulaşincaya kadar inkübasyona bırakılarak kültüre edildi.

Yeterli doluluk oranına ulaşan hücreler yeni kültür flasklarına aktarıldı. Hücreler flaskın %80'ini kapladıktan sonra hücre süspansiyonu 14 ml'lik tüplere aktarıldı ve ardından  $200 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 1 ml kültür medyumunda içinde çözündürüldü ve hemositometri lamında (Thermo, ABD) hücre yoğunluğu sayısal olarak incelendi. Dondurulmadan önce mikroskopta hücre görüntüsü Şekil 3.1. 'da verilmiştir. Çalışmaya devam edilmeyen hücreler ise 1 ml dondurma medyumunu (%5 DMSO (Appllichem, Almanya), %95 komplet medyum) içeren kriyo tüplere alınarak  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  derin dondurucuda stoklandı.



Şekil 3.1. Dondurulmadan önce hücrelerin mikroskopik görünümü

### ***LPS uygulama***

Bir hücre grubuna 24 saat boyunca LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) (Lee ve ark., 2012) uygulandı, bir grup kontrol grubu olarak tutuldu.

### ***Hücre canlılığı deneyi***

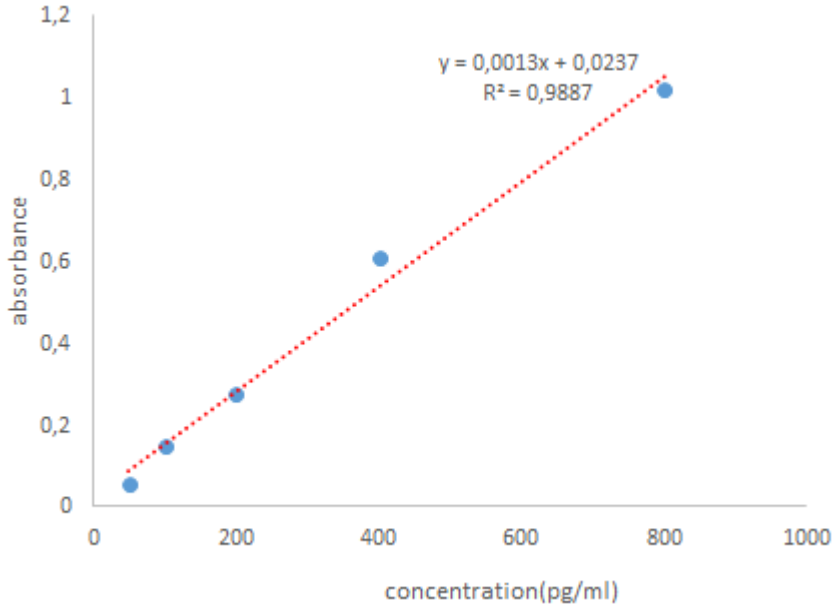
Hücre canlılığı, MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) deneyi ile değerlendirildi (S. M. Lee ve ark., 2012). MTT çalışmasında, çözülmüş MTT'nin mitokondriyal dehidrojenazın formazan kristallerine dönüştürme özelliğinden faydalanılarak hücre canlılığı değerlendirilir. BV2 hücreleri 96'luk plakaların herbirine  $2 \times 10^4$  olacak şekilde yerleştirildi. Üzerine  $0.5 \text{ mg/ml}$  konsantrasyonda MTT ilave edildi ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat inkübe edildi. Plakalara DMSO eklendikten sonra 10 dakika çalkalandı. Mikroplak okuyucu (Bio-rad, xMark) kullanılarak  $570 \text{ nm}$ 'de absorbans ölçümü yapıldı. Hücre canlılığı ortalama olarak belirlendi.

### 3.4.2. ELISA testi

Shangai Coon Koon Biotect firmasının çift antikorlu sandviç teknolojisi ilkesine dayanan Mouse Interleukin 1 Beta ELISA kiti kullanılmıştır. Hücre kültüründen elde edilen eluatlar kantitatif olarak tespit edildi.

Test prosedürüne göre; hücre kültürü süpernatanı steril tüplerle toplandı. 2000-3000 RPM'de yaklaşık 20 dakika santrifüjlendi ve süpernatant dikkatlice toplandı. Sırası ile aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

- Oda ısısına getirilen standartlar ve örnekler totalde 50 µl olacak şekilde kuyucuklara aktarıldı.
- Her kuyucuğa 100µl HRP-konjugat reaktifi eklendi, ardından sızdırmaz plak membranı ile örtüldü, hafifçe çalkalandı ve 37 °C 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıldı.
- Daha sonra her bir kuyucuğa 50µl kromojen solüsyon A, 50µl kromojen solüsyon B eklendi. Renk gelişimi için ışıktan uzakta 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi.
- Her kuyucuğun absorbansını (OD) tek tek 450nm dalga boyunda ölçüldü.
- Grafik kağıdı ile standart eğriyi oluşturuldu. Şekil 1.2. 'da verilmiştir.



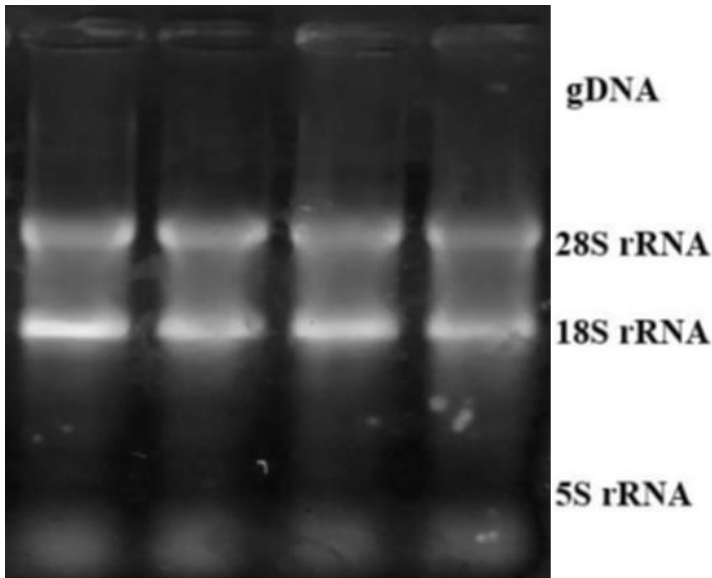
Şekil 3.2. ELISA testi standart eğri

### 3.4.3. RNA izolasyonu

Hücre-Trizol süspansiyonu 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı ve pipetaj yapıldı. Üzerine 200 µl kloroform eklendi ve vortekslendi. 15 dk buzda inkübe edildi. Daha sonra karışım +4 °C'de 12000×g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi ve oluşan karışımın üst kısmı alındı. Karışım 1,5 ml'lik bir diğer tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µl isopropanol eklendi. Karışım vorteklendikten sonra 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Sürenin sonunda, +4 °C'de 12000×g devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellete %70'lik etanolden 1 ml eklendi ve +4 °C'de 7500 ×g devirde 10 dakika boyunca tekrar santrifüj edildi. Sürenin sonunda süpernatant tamamen alındı aynı zamanda RNA pelleti kurumaya bırakıldı. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra RNA pelleti 50 µl Dietil pirokarbonat'lı distile su (DEPC-dH<sub>2</sub>O)'da çözdürüldü.

#### *RNA miktarı ve kalitesinin belirlenmesi*

Her bir örnek için U.V. Spektrofotometre ile 260 ve 280 nm'de (ACT Gene, ABD) RNA miktarı ve kalitesi ölçüldü. Miktar tayini yapılan RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi amacıyla 1 µg/5µl RNA üzerine 6x yükleme boyasından 2 µl eklenerek %1'lik agaroz jelde elektroforez sonrası ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak U.V. translüminatör görüntüleme sisteminde (Bio-Rad, ABD) gözlemlendi. Jelde 28S ve 18S rRNA (ribozomal ribonükleik asit) moleküler ağırlığa sahip RNA bantları gözlemlendi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. RNA miktarı ve kalitesini belirlemek için RNA bant görünümü

### 3.4.5. Genomik DNA'nın uzaklaştırılması

DEPC-ddH<sub>2</sub>O kullanılarak, elde edilen RNA'ların konsantrasyonları 2 µg/10µl olacak şekilde eşitlendi. Olası genomik DNA (gDNA) kontaminasyonlarının ortadan kaldırılması amacıyla 1 µg/20 µl total RNA üzerine 1 µl DNase-I reaksiyon karışımı ve 1 µl DNase-I enzimi konularak +37°C'de 15 dakika bekletildi. Enzimatik reaksiyon durdurulması için 2 µl 50mM EDTA ilavesi ile 10 dakika +65°C'de inkübe edildi (EURx, DNase I, RNase-Free, Polonya protokolü uygulandı).

### 3.4.6. cDNA eldesi

cDNA üretimi için, iki basamaklı RT-PCR kiti (Vivantis, Malezya/Pr No: PL8881) kullanarak 2 µg/10 µl total RNA'dan tek zincir kullanarak gerçekleştirildi. Bir tüp içerisine oda ısısında 2 ng RNA, 40 µM'den 1 µl oligo (dT) 18 primer, 50 ng/µl random heksamerden 1 µl, 10 mM'lik dNTP karışımından 1 µl ve 10 µl'ye tamamlayacak şekilde nükleaz içermeyen su eklendi. Denatürasyon için Thermal Cycler cihazında (Bio-Rad-T100, ABD) 10 dakika 65 °C'de inkübe edildi. Sürenin sonunda karışıma sıra ile 2 µl 10x buffer M-MulV'den, 0,5µl 100 ünite Reverse Transkriptaz enziminden eklendi ve karışım toplam hacim 20 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen suyla tamamlandı ve tüp yavaşça karıştırıldı. cDNA sentezi için karışım 60 dakika 42 °C inkübe edildi, ardından random heksamer kullanıldığı için 10 dakika 25 °C inkübasyon yapıldı. Süre sonunda karışım, enzim inaktivasyonu için 85 °C 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA, 1:6 ve 1:9 oranında sulandırılarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

### 3.4.7. Primerlerin seçimi

KNG1, CRP, PAD2 ve GAPDH genleri için ticari primerler Roche RT Ready Assay (Roche-Almanya / Katalog No: 06720455001)'den temin edildi. Primerlerin ve ampikon uzunluklarının özgüllüğü. %2 agaroz jel elektroforezi kullanılarak fragmentlerin çoğaltılması; primerlerin amplifikasyon ürünlerinin beklenen boyutta olduğunu ve primer dimerlerinin olmadığını göstermiştir.

### **Primerlerin sulandırılması**

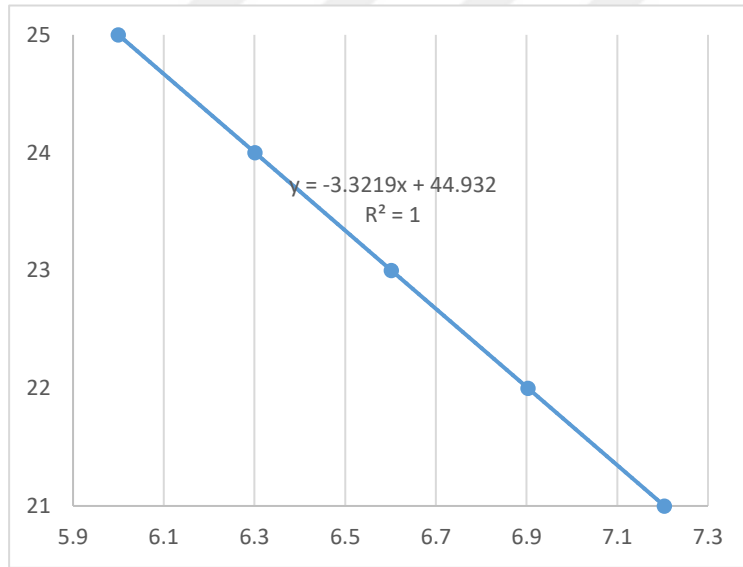
Liyofilize primerler 3 dakika 3000 g hızında santrifüj edildi ve nükleaz içermeyen su içerisinde 10 pMol/µl konsantrasyon olacak şekilde çözdürüldü. Her bir genin forward ve reverz primerinden alt stoklar hazırlanarak -20 °C’de muhafaza edildi.

### **3.4.8. Referans gen seçimi**

Sinyal yolağıyla ilgili literatürde geçen ve sıklıkla kullanılan referans genlerden olan Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) seçilmiştir. Bu, bir dizi gen arasından farklı biyolojik şartlar altında en minimum değişkenlik gösteren; nispeten en stabil olan referans gen olarak seçilmiştir.

### **3.4.9. Primer dilüsyonları ile primer etkinliğinin belirlenmesi**

cDNA havuzu 5’er µl örneklerin cDNA’larından alarak oluşturuldu. Daha sonra elde edilen bu cDNA 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 oranlarında sulandırıldı. Her primer için RT-PCR (ROCHE, Modeli: Light Cycle 480 II, Almanya) yapıldı. Dilüsyonların Döngü-Logaritmik konsantrasyon grafiği çizilerek gözlenen noktalardan lineer bir doğru oluşturmaya en çok yaklaştığı bölgedeki beşerli noktalardan grup oluşturuldu Eğimin kabul edilen değeri -3,0 ve -3,6 arasında ve  $R^2 > 0,990$  olmalıdır.

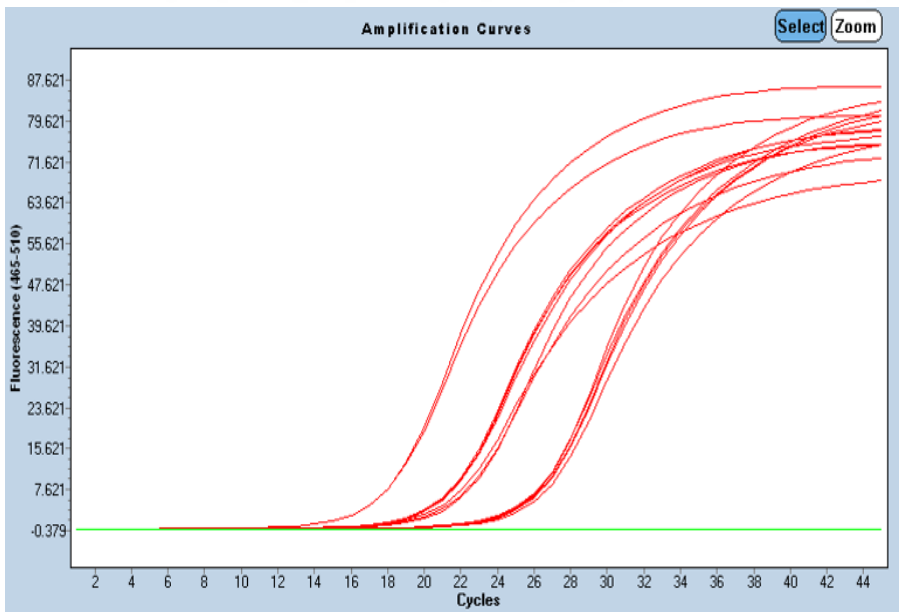


**Şekil 3.4.** Primer etkinliği grafiği ve denklemi

Grafikteki noktalara eşit uzaklıkta bulunan doğru denklemlerinden eğimleri bulundu ve  $10 \cdot (1/\text{Eğim})$  formülü ile primer etkinliği değerleri hesaplandı (Şekil 3.4.).

### 3.4.10. Real time kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

Gen ifadesi farklılıklarının belirlenmesi amacıyla seçilen genlerin primerleri, cDNA'lar kullanarak RT-PCR'da çoğaltıldı. İnterkalasyon ajan olarak çift iplikçikli DNA'ya bağlanabilen ve Roche ProbeMaster (Katalog No: 04707494001 / Roche-Almanya) kullanıldı. Roche RT Ready Assay primer 1ul, ProbeMaster Mix (Roche, Almanya)'den 10ul, sulandırılmış cDNA'dan 5 µl eklendi ve toplam hacim 15µl olacak şekilde steril duble distile su (ddH<sub>2</sub>O) ile tamamlandı. Yarı hacimde (7,5ul) hazırlanan reaksiyon da başarılı bir şekilde çalışmıştır; bu sebeple analizlerin bir kısmı yarı hacimde yapılmıştır. Reaksiyon steril 8'li RT-PCR stripleri (Axygen, ABD / Katalog No: PCR-2CP-RT-C) içinde gerçekleştirildi. Reaksiyonun ısı profili +95 °C'de 10 saniye, 45 döngü (95 °C'de 15 saniye, 58 °C'de 30 saniye) olacak şekilde ayarlandı. Optik ölçümler, her siklusun 58 °C'deki bağlanma ısısının hemen bitiminde, uzama safhasında cihaz tarafından otomatik olarak yapıldı. Daha sonra 63 °C'den 95 °C'ye kadar saniyede 0,1 °C olacak şekilde kademeli olarak ısıtıldı ve analizi gerçekleştirildi. RT-PCR'de optik analiz sonucu elde edilen veriler C<sub>q</sub> olarak kaydedildi (Şekil 3.5.). Negatif kontrol olarak non template control (NTC) olarak cDNA yerine aynı miktarda ddH<sub>2</sub>O içeren karışım kullanıldı. Elde edilen veriler uygun housekeeping gen seçimine bağlı şekilde, normalizasyonları yapılarak 2-ΔΔC<sub>t</sub> metodu kullanılarak analiz edildi.



Şekil 3.5. RT-PCR'de optik analiz sonucu

### **3.4.11 Western blot analizi**

#### ***Protein izolasyonu***

Western blot çalışması için kullanılacak proteinler, BV2 hücrelerinden lizis tamponu ticari kit (Fermentas, ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent, #K0301, ABD) kullanılarak izole edildi. Protein izolasyonları yapılacak olan BV2 hücre örnekleri 2 ml soğuk PBS solüsyonu eklenerek yıkandı. Daha sonra, hücreler mekanik olarak lizis çözeltisi ile birlikte. 4000 x g'de 15 dakika +4°C santrifüj işlemleri gerçekleştirilip süpernatant yeni bir eppendorf içine aktarıldı. Daha sonra tekrar 4000 x g'de 15 dakika +4°C santrifüj işlemleri gerçekleştirilip, süpernatant ayrı bir tüpe aktararak -80°C'de muhafaza edildi.

#### ***Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)***

SDS-PAGE analizlerinde kullanılacak olan jeller 10x10 cm'lik cam kalıpları kullanılarak hazırlanmıştır. Separating (ayırma) ve stacking (yükleme) olmak üzere iki ayrı jel karışımı hazırlandı. Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre yüzdeleri ayarlanan ayırma jeli için protokoller aşağıdaki gibidir.

SDS-PAGE Elektroforezi Yükleme tamponu olan 2x lammeli tamponu hazırlandı ve her bir örnek ile birlikte eşit hacimde kullanıldı. Karışım vortekslendi ve -20°C'de muhafaza edildi. Her gruptan izole edilen proteinler sepektrofometre (Eppendorf BioPhotometer Spectrophotometer, Almanya) cihazında konsantrasyonları ölçüldü. Daha sonra BSA dilüsyonları kullanılarak hazırlanan standarda göre örneklerin konsantrasyon miktarları eşitlendi. Her protein örneğine eşit miktarda laemmlı buffer eklendi ve vorteks yapıldıktan sonra 5 dakika 65°C'de inkübe edildi.

BV2 örneğinden 30 µg total protein % 4-12 gradiyant SDS-PAGE mini jeline yüklendi ve 80 V'de 30 dakika ve 120 V' de 2 saat yürütüldü.

#### ***SDS-PAGE jel boyaması***

SDS-PAGE cam kalıplarından çıkarılarak dH<sub>2</sub>O içinde 10 dk süre ile yıkandı ve 1x Coomassie Brilliant Blue (%50 metanol, %10 glasiyal asetik asit, % 0.1 Coomassie Brilliant Blue R-250) solüsyonunda 2 saat boyunca boyanmaya bırakıldı. Jel dH<sub>2</sub>O'da 10 dakika yıkandı ve ardından yıkama solüsyonunda (metanol-glasiyal asetik asit-dH<sub>2</sub>O 4:1:5) boya uzaklaşmaya kadar yıkama yapıldı.

### ***Protein transferi ve bloklama***

Cam kalıplar arasından çıkarılan jel Trans-BlotR Turbo™ Transfer sistemi (BioRad Laboratories, Inc., #170-4155, ABD) kullanılarak 1,0 A elektrik akımı, 25 volt'da 30 dk süresince transfer tamponunda (3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 4 ml %10'luk SDS 1 litre içinde) PVDF membrana (BioRad, Immun-Blot®, #1620177, ABD) protein transferi gerçekleştirildi (Şekil 2.9.). PVDF membranı 1x TBS-T (10xTBS: 30 g Tris, 88 gr NaCl, 49 1 ml Tween-20, 950 ml dH<sub>2</sub>O, PH 7,6) solüsyonunda 3 kez 10'er dakika yıkandıktan sonra %5'lik yağsız süt (BioRad, Non Fat Dry Milk, ABD) solüsyonunda (5 gr yağsız süt tozu, 50 ml TBS-T) solüsyonu içinde 55 rpm ajitasyonda yaklaşık 2 saat boyunca bloklandı.

### ***Protein immünoiblottlama***

Birincil antikorlar Anti-KNG1 [Affinity, DF: 6544], Anti-CRP [Affinity, DF: 6027], F95 [Merc-MABN328] ve housekeeping antikorları ( $\beta$ -Actin, [Santacruz, 1615] son konsantrasyonu 1:1000 (1 ug/ml) ve ikincil antikorlar donkey anti-mouse IgG (Abcam-6802) 1:10000 (0,1 ug/ml) oranında bloklama solüsyonunda sulandırıldı. PVDF membranı 1x TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika yıkandı ve 1 ug/ml birincil antikor solüsyonunda 50 rpm ajitasyonda gece boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Diğer gün birincil antikor solüsyonu uzaklaştırılarak membran 3 kez 10'ar dakika TBS-T ile yıkandı. 0,1 ug/ml konsantrasyonlu ikincil antikor solüsyonu içinde 2 saat boyunca 50 rpm ajitasyonda ve oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

### ***İmmünotekstiyon***

Hedef proteinin saptanması için BioRad Clarity Western Blot Substrat kemilüminesans (Peroksidaz, Luminol ensahnsır #170-5060, ABD) solüsyonu kullanıldı. İkincil antikor solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez 10'ar dakika 1x TBS-T solüsyonu içinde yıkandı ve ardından substrat solüsyonu (1.8 ml : 1.8 ml) ile ajitasyonda oda ısısında 5 dakika boyunca muamele edilerek tarama (Licor C-DiGit® Blot Scanner, ABD) cihazında görüntüsü alındı.

### **3.5. Sınırlılıklar**

Çalışmamızda BV2 mikroglial hücre hattı üzerinde inflamasyonda oluşabilecek değişimlere baktık. Özellikle Western blotlama ile çeşitli bantlar tespit ettik ancak bütçe yetersizliği sebebi ile detaylı protein tanımlanması yapamadık. Bunun için LC-MS/MS yapılması gerekmektedir. Bu sayede bantlarda yer alan proteinler ile daha fazla veri alımı sağlanabilir. İleri protein tanımlamalarını gelecek çalışmalarımız için planlamaktayız.

### 3.6. Verilerin Analizi

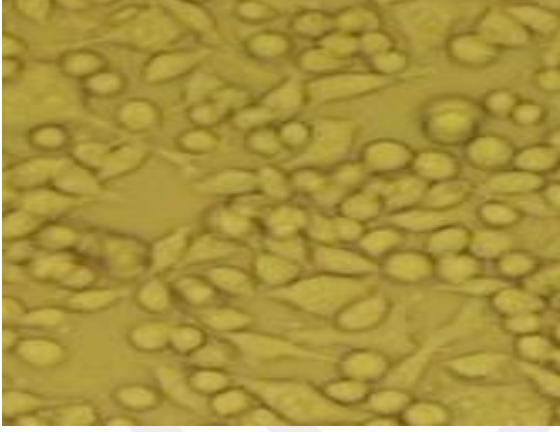
Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  SD'si olarak sunuldu. Verilerin ortalama değerleri arasındaki farklar tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak analiz edildi.  $P < 0,05$  veya  $p < 0,01$  olduğunda farklar anlamlı olarak değerlendirildi.





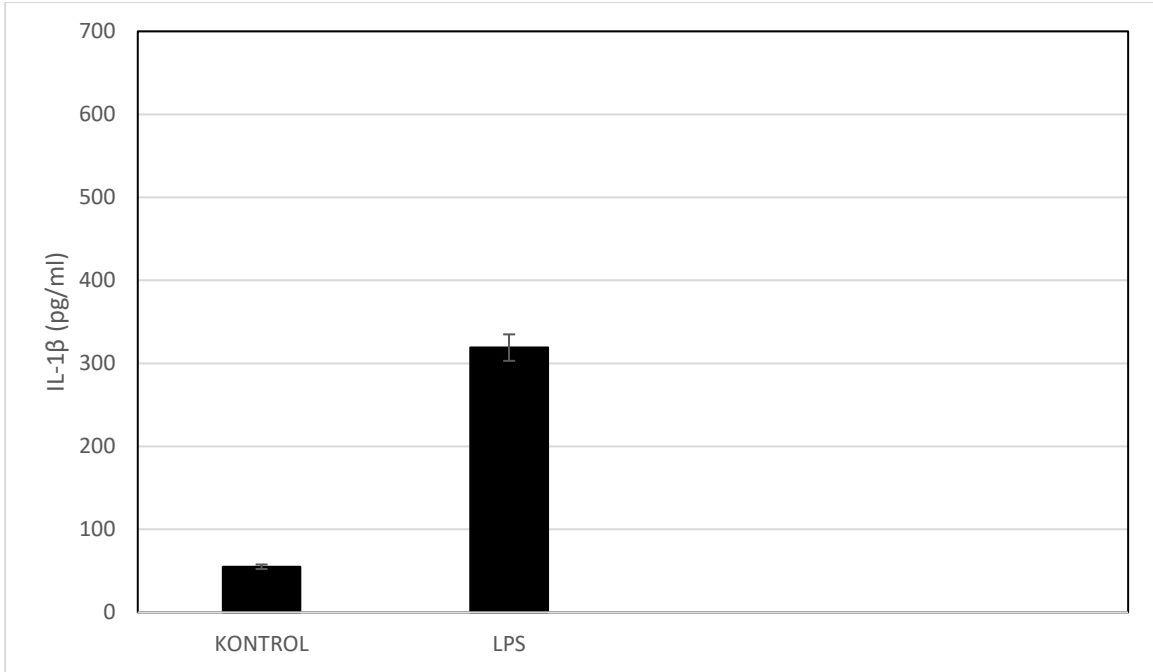
#### 4. BULGULAR

BV2 mikroglial hücre hatında LPS uygulanıp nöroinflamasyon oluşturduktan sonra MTT deneyi yapıldı ve hücrelerin canlılığı mikroskop altında değerlendirildi (Şekil 4.1.)



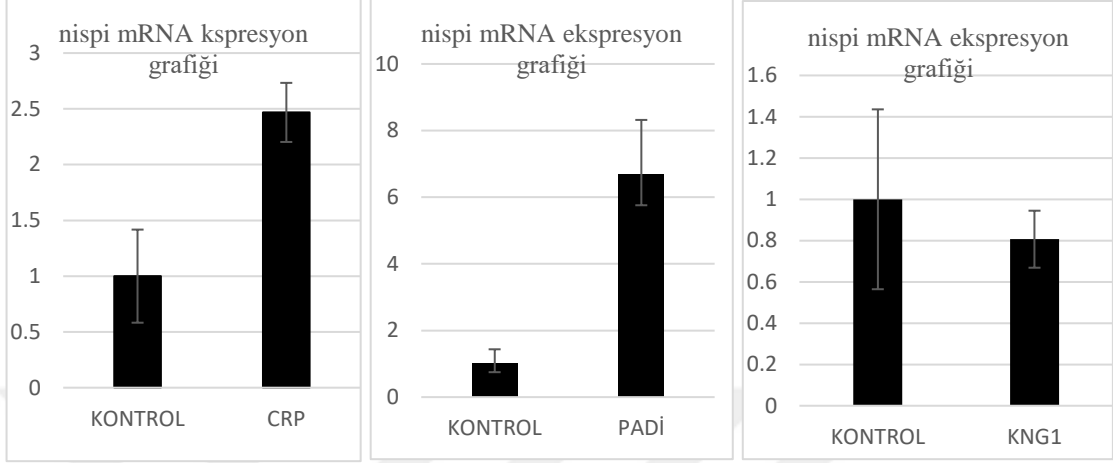
Şekil 4.1. LPS uygulamasından sonra hücre canlılığı.

Sitokinlerden IL-1 $\beta$  seviyesindeki değişimin kıyaslanabilmesi için hücre kültüründen elde edilen proteinlere ELISA testi uygulandı. Kontrole kıyasla LPS uygulanan hücre grubunda IL-1 $\beta$  seviyesi 5,8 kat artış gösterdi (şekil 4.2.)

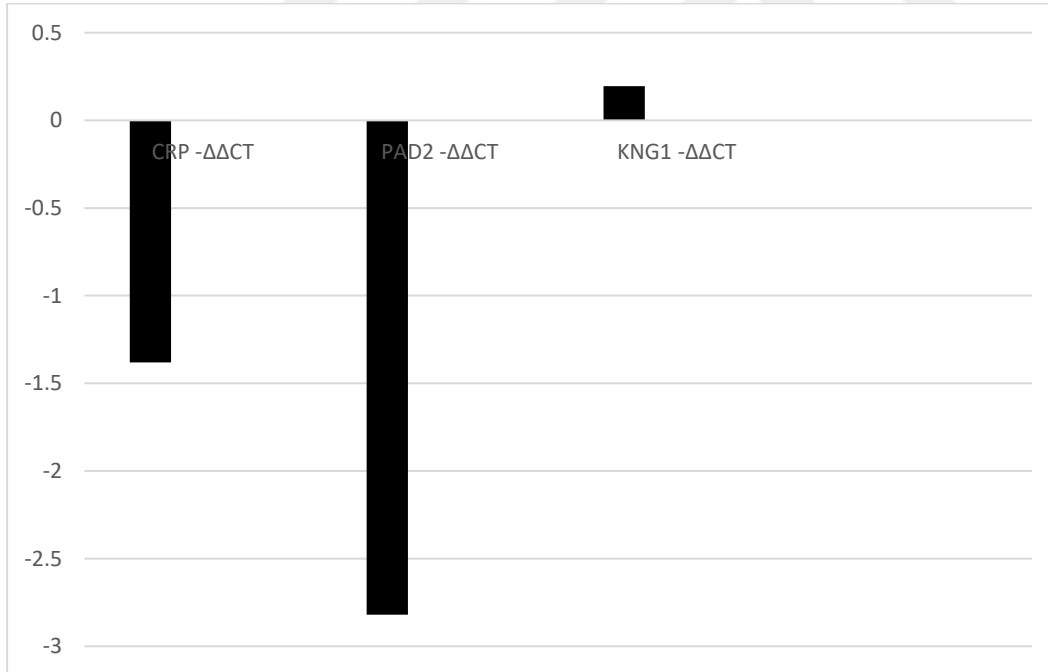


Şekil 4.2. LPS kaynaklı IL-1 $\beta$  seviyesinde kontrole kıyasla olan değişim. Sunulan değerler, üç bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  SD'sidir.

Mikroglial hücre hattındaki PAD, CRP ve KNG ekspresyon seviyesindeki değişimleri inceleyebilmek için RT-PCR yöntemi kullanıldı. 3 kere tekrarı yapılan verilerin analizleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. CRP, PADI ve KNG1'in ekspresyon grafiği



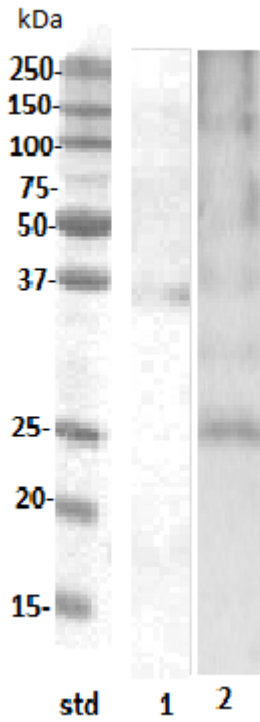
Şekil 4.4. RT-PCR verilerine göre genlerdeki ekspresyon seviyelerindeki değişim analizleri.

PCR etkinlik derecesi,  $E = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$  formülü ile belirlendi. Daha sonra nispi gen ekspresyon analizi  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodu kullanılarak hesaplandı. Önce her bir grup için hedef gen ve housekeeping gen'den alınan  $C_t$  değerleri alındı.  $\Delta C_t$  aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$\Delta\text{ct}$  = hedef genlerin Ct değerleri - housekeeping gen Ct. Değerleri. Bunların ayrı ayrı  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  'si hesaplandı. Her bir grubun verileri elde edildi ve istatistik analizine geçilerek gruplar arasındaki ilişki araŐtırıldı. Verilerin dağılımına göre parametrik veya nonparametrik testler uygulanarak gruplar arasındaki fark karŐılaŐtırıldı. Gruplar arası farklılıklar ANOVA ve Brown Forsythe testi ile değerlendirildi. P değerinin 0,05' den küçük olması istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi. Bütün istatistiksel işlemler GraphPad Prism® V.6.00 (GraphPad software Inc. / ABD) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

PAD ekspresyon seviyesindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş, fakat KNG-1 ve CRP'deki değişim anlamlı olarak kabul edilmemiŐtir.

Deiminasyona uğramış proteinleri tanımlayabilmek için izolasyondan sonra F95 antikoru kullanılarak Western blotlama yapıldı. Kontrole kıyasla 25-250 kDa aralığında farklı bantlar gözlemlendi (Şekil 4.4.).



**Şekil 4.4.** F95 ile Western blotlama ile tespit edilen sitrulinlenmiş proteinler. Std: protein standart, 1: LPS uygulanmayan kontrol, 2: LPS uygulanan hücre grubundaki deiminasyona uğramış proteinler.

Özellikle 25 kdal 'da gözlemediğimiz bant CRP ile uyumlu tespit edildi, fakat KNG deiminasyonuna dair bir veri bulunamadı. Proteinleri tam olarak tanımlayabilmek için LC-MS/MS analizini gelecek çalışmalarımız için planlamaktayız.



## 5. TARTIŞMA

Beyindeki kronik inflamasyon; AH, PH ve MS gibi nörodejeneratif hastalıklarda kritik bir rol oynar. Beyinde glial hücrelerin arasında yer alan mikroglia ise patolojik sürece bakıldığında ana efektör olarak karşımıza çıkmaktadır (Tai ve ark., 2018). Mikroglialar; MSS makrofajları olarak da adlandırılan hücre grubudur ve beyin hücrelerinden nöronlar, oligodendrositler, astrositler gibi yapılarla etkileşim halindedir. Bu etkileşim özellikle patolojik koşullarda değişiklik göstermektedir. Normal mikroglia besin desteği sağlarken, aktive edilmiş mikroglia ise nöronları onarma sürecinden nöronal işlev bozukluğuna geçer. Bu durum birçok patolojik süreç ile bağlantılıdır (H. Wang ve ark., 2022).

Nörodejenerasyonda hücrel değişiklikleri belirlemek amacı ile birçok çalışmada BV2 mikroglial hücre hattı kullanılmıştır (Nguyen ve ark., 2021; Y. Qin ve ark., 2021; Y. Sun ve ark., 2020; Tai ve ark., 2018).

Çalışmamızda önceki çalışmalarda gösterildiği gibi (Jin ve ark., 2023; Li ve ark., 2023; M. Xu ve ark., 2023). BV2 mikroglial hücre hattının indüklenmesinde sıklıkla kullanılan LPS ile inflamatuvar yanıtı gözlemlemeyi amaçladık.

Bakteriyel endotoksin LPS'nin gen ekspresyonunda değişikliklere yol açtığı belirlenmiştir. Mikroglial hücrelerde LPS kaynaklı inflamasyon oluşturabilmek için araştırmalarda kullanılmış ve deney hayvanları üzerinde birçok çalışmada LPS aracılığı ile sitokin değişimleri, iskemik beyin hasarı ve doku iltihabı oluşumu gösterilmiştir (Gill ve ark., 2004; Lane ve ark., 2014; Dresselhaus ve Meffert, 2019). LPS'nin dopaminerjik nöronlar üzerindeki nörotoksik etkisinin hücreler üzerindeki inflamatuvar yanıtta kaynaklandığı bildirilmiştir (Dutta ve ark., 2008). Mikroglialda LPS etkisi ile meydana gelen hücrel inflamatuvar yanıt, endojen ve eksojen uyarılarla oluşan beyin hasarının ayrıntılı mekanizmasını tanımlamak, nörodejeneratif hastalıklar için yeni terapötik hedefler verebilir.

Nörodejeneratif hastalık patojenezi incelendiğinde sitokin seviyesinde artış olduğu tespit edilmiştir. Nöronların yüzeyindeki reseptörler, inflamatuvar hücrelerin uyarılması ile aktive olup ve proinflamatuvar sitokinlerin salındığı bilinir. Nörojenezin; sitokinler ve inflamasyon nedeni ile doğrudan baskılandığı gösterilmiştir (Kaneko ve ark., 2006).

Reseptörlerin uyarılması ile farklı sinyal yollarında da aktivasyon görüldüğü ve bu durumun nöronal hasara neden olduğu belirtilmiştir (Almolda ve ark., 2015).

AH, PH ve ALS'li hastaların BOS'unda anormal sitokin seviyeleri bulunmuştur (Oeckl ve ark., 2014). Özellikle sitokinlerden IL-1 $\beta$  seviyelerinde önemli seviyede artış görülmüştür. (X. Y. Qin ve ark., 2016). Hücre hatlarında ve deney hayvanlarında da nöroinflamasyon oluşturarak sitokin değişiklikleri incelediğinde hasta üzerindeki yapılan incelemeler doğrultusunda IL-1 $\beta$  seviyelerinde artış belirlenmiştir (Lu ve ark., 2009; Nam ve ark., 2018; Norden & Godbout, 2013; Przanowski ve ark., 2014; Skelly ve ark., 2013).

Yaşam sürecinde metilasyon, asetilasyon, glikosilasyon, fosforilasyon ve deiminasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar proteinlerin işlevi bakımından çok önemli rol oynar (Fuster ve Esko, 2005). Protein deiminasyonu; nörodegeneratif hastalıklar, kanser, otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere birçok alanda çalışılmıştır (Witalison ve ark., 2015). Deiminasyon nörodejeneratif hastalıklardan PH, AH ve Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD) dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Ishigami ve ark., 2005, 2014; Jang ve ark., 2010, 2013; Nicholas, 2013; Nicholas ve ark., 2014).

Translasyon sonrası modifikasyon olarak bilinen deiminasyonun, Ca<sup>2+</sup> bağımlı PAD enzimleri tarafından katalize edildiği ve proteine bağlı arginin'in sitriline dönüştüğü tanımlanmıştır. Bu modifikasyonun birçok fizyolojik süreçte rol aldığı belirtilmiştir (gen ekspresyonu regülasyonu, apoptoz ve merkezi sinir sisteminin plastisitesi gibi) (Yang ve ark., 1920).

Nörodejeneratif hastalıklarda artan protein deiminasyonu ve düzensiz PAD aktivitesi gözlemlenmiştir (Vossenaar ve ark., 2003b). Deiminasyon incelemek için yapılan araştırmalarda, nörodejeneratif hastalıklarda PAD2'nin beynin farklı hücre gruplarında yoğunlaştığı gösterilmiştir. PAD2 mRNA'sının monositlerde ifade edildiği, fakat genin daha çok makrofajlarda işlevsel aktivite yürüttüğü tespit edilmiştir (Vossenaar ve ark., 2003c). Parisy ve ark. (2007) mikroglia üzerinde yaptıkları morfolojik çalışmalarda PAD2 immünoaktivitesinin hem astrositlerde hem de mikroglia'da etkili olduğunu bulmuşlar, fakat PAD2'nin esas olarak MSS'de yer alan astrositlerde yoğunlaştığını belirtmişlerdir.

Asaga ve ark., (2001) farklı beyin hücre gruplarında nöroinflamasyonu takiben çok sayıda deimine protein tespitinde bulunmuşlar, fakat bu bölgelerde PAD2'nin makroskobik olarak artışını gözlelemediklerini belirtmişlerdir. Bu durumu enzim aktivitesi ile ilişkilendirmiştir. Aynı araştırmacı daha sonraki yıllarda özellikle mikroglia da inflamasyon süreci incelemiş ve farklı günlerde PAD2 seviyesini ölçmüş; 1. günde PAD miktarının azaldığı daha sonra 7. Güne kadar artış gösterdiği belirtilmiştir. Burada, 1. günde immünoreaktif PAD2'nin azalmasının nörodejeneratif süreci yansıttığını tespit etmişlerdir (Asaga ve ark., 2002).

Çalışmamızda LPS ile uyarılan hücre gruplarında PAD2 ekspresyon seviyelerinde anlamlı derecede azalma tespit ettik. Bu durum diğer çalışmalarla uyumlu olarak nöroinflamasyonun PAD2 seviyelerinde değişikliğe yol açtığını doğrulamaktadır.

Deiminasyonun hastalık grupları ile bağlantısını kurmak için birçok çalışma yapılmıştır. Ve daha önceki çalışmalarda F95 antikoru deimine proteinlerin tespitinde kullanılmıştır (Criscitiello ve ark., 2019; Nicholas, 2013b). Örneğin; Parkinson hastalarında, PH deney hayvan modelleri ve hücre kültürü çalışmalarında F95 antikor seviyesindeki yükselme ile deimine protein grupları arasında yakın ilişki bulunmuştur (Nicholas, 2013b; Sancandi ve ark., 2020a).

Bütün çalışmalarda deiminasyona uğrayan proteinlerin proinflamatuvar yanıtı artırıp nörodejenerasyona neden olabileceği için bu proteinlerin tanımlanmasının erken müdahalede önemli bir yol gösterici olabileceği belirtilmiştir. Biz de çalışmamızda mikroglia da F95 varlığında deimine olan protein gruplarını Western blot ile belirlemeyi amaçladık.

Kompleman sistemi hem doğuştan gelen bağışıklıkta hem de hümorale yanıtta rol alır, bunun yanında kronik enflamasyonda da rol oynamaktadır. PH'da özellikle kompleman sistemi elemanları üzerinde yapılan çalışmalar önemli çalışmalar yapılmıştır (Carpanini ve ark., 2019; Chao ve ark., 2014; Depboylu ve ark., 2011). Sun ve ark. (2019) PH'un erken dönemleri ile kompleman sistemi arasındaki bağlantıyı tespit etmişlerdir.

Çeşitli protein gruplarının deiminasyona uğraması hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi) (Ansar ve Ghosh, 2013; Inal ve ark., 2022b). CRP; iltihaplanma ve doku hasarına yanıt olarak sentez edilen bir proteindir.

Birçok çalışmada AH, PH ve Hemorajik inme gibi birçok kronik inflamatuvar ve nörodejeneratif hastalıkta CRP seviyesinde yükselme görülmüştür (Taheri ve ark., 2017; Weinstein ve ark., 2017). Akut inflamatuvar yanıtta CRP seviyesindeki yükselmenin; kronik inflamasyon ve inflamatuvar yanıtta kaynaklanan doku hasarını ölçmek için serumdan ölçülebilen biyobelirteç olarak kabul edilebileceği tespit edilmiştir (Sheriff ve ark., 2021). Morgan ve ark. (2019) AH'da CRP'nin plazma miktarını nöroinflamasyon ile ilişkilendirmiştir.

Braig ve ark. (2017) hasarlı olan dokularda lokalize olan CRP'nin yapısında değişiklikler olduğunu ve CRP'nin hasarlı dokuda miktarının artmasının CRP'de deiminasyon ile bağlantılı olduğunu belirlemiştir.

Vossenaar ve ark. (2003) translasyon sonrası deiminasyon ile protein yapısı ve fonksiyonunda farklılıklar görülebildiğini, örneğin; CRP'nin yapısında bulunan argininin, PAD'lar ile geri dönüşümsüz olarak sitriline dönüştürülebileceğini bildirmişlerdir.

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise; CRP-I ve CRP-II formlarının her ikisinde de arjinin mevcut olduğu, bu yüzden CRP'nin farklı formlarında da deiminasyon görüldüğünü tespit edilmiştir (Magnadottir ve ark., 2018). Dolaşımda bulunan pCRP'nin sağlıklı kişilerde proinflamatuvar özellik göstermemesine rağmen, oluşabilecek doku hasarına bağlı olarak kompleman sistemi tarafından uyarılabileceği gösterilmiştir (Braig ve ark., 2017).

Bizim çalışmamızda CRP ekspresyon seviyelerinde değişiklik olmamış fakat yapılan western blot ile CRP'nin deiminasyona uğradığı belirlenmiştir.

Kallikrein-kinin sistemi MSS'de bulunur ve nöroendokrin fonksiyonları düzenlediği bilinmektedir (Scicli ve ark., 1984). Daha önceki çalışmalarda farklı hastalık gruplarında KNG'nin ekspresyon seviyesindeki değişimler gösterilmiştir (J. Xu ve ark., 2018).

Y. Zhang ve ark. (2014) KNG protein sentezinin inhibe edilmesi ile nörodejenerasyonun önlendiğini belirtmişlerdir. Bu durumu inflamasyonda KNG protein seviyesinde artış ile ilişkili bulmuşlardır. Langhauser ve ark. (2012) yapılan çalışmalarında; KNG'nin nörodejenerasyondaki yeri tanımlanmıştır ve KNG'nin kinin sisteminin aktivasyonu ile özellikle iltihaplanma, tromboz, kan-beyin bariyeri sızıntısı gibi yolları kullanarak nöronlarda

hasara yol açtığını gösterilmiştir. KNG seviyelerindeki yükselme sepsis, inflamasyon ve oksidatif stres yolları ile bağlantılı bulunmuştur (al Hariri ve ark., 2017; Hofman ve ark., 2018).

Suganya ve ark. (2015) otistik çocuklarda yapılan bir çalışmada, normal çocuklar ile karşılaştırıldığında KNG-1 düzeyinde oldukça önemli bir artış tespit edildiğini ve bunun biyobelirteç olarak yararlı olabileceği belirtmiştir. Sancandi ve ark. (2020) bağışıklık hücrelerinin uyarılması ile KNG-1'in deiminasyona uğradığını göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda KNG gen ekspresyon seviyelerinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir, ayrıca Western blotlama aşamasında deimine olduğuna dair bir veri alınmamıştır. Bu durum KNG'nin mikroglialda inflamasyon durumlarında herhangi bir değişikliğe uğramadığını göstermektedir. Tam fonksiyonunun anlaşılabilmesi için hem diğer glial hücrelerde hem de farklı hücre gruplarında çalışılması gerekmektedir.

Biz çalışmamızda BV2 mikroglial hücre hattında PAD2 ekspresyon seviyesinde anlamlı derecede düşüş tespit ettik. Fakat Western blot ile kontrole kıyasla deimine proteinlerde artış gözlemledik. Bu durum diğer yayınlarla uyumlu olarak PAD enziminin inflamasyon durumlarında astrositlerde yoğunlaştığını ancak var olan PAD enziminin aktivitesi ile deimine proteinlerin oluşabileceği gösterilmiştir. Ayrıca diğer yayınlarla uyumlu olarak immunblotlamada özellikle bant görmeyi beklediğimiz aralıkta CRP protein deiminasyonunun varlığını gördük. Bağışıklık sisteminde CRP'nin rolü, CRP işleyişinin deiminasyon gibi modifikasyonlar ile düzenlenmesinin anlaşılması patolojik şartlar altında rolünün anlaşılmasına imkan tanıyabilir. Diğer aralıklarda yer alan deiminasyona uğramış protein tanımlamasını yapabilmek için LC-MS/MS analizi yapılması gerekmektedir. Proteinlerin PTM ile yapısal ve fonksiyonel olarak geçirdiği değişimler araştırılıp, proteinlerin aralarındaki etkileşimin ortaya konması nörodejeneratif hastalıklar bakımından umut verici olabilir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuç

Alzheimer, parkinson, diyabet gibi birçok hastalığın tanısında proteinler kullanılmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda da etkili olabilecek spesifik proteinlerin çalışılıp tanıya yardımcı olunması amacı ile bu çalışmayı planladık.

BV2 mikroglial hücre hattına nöroinflamasyon oluşturmak için LPS uygulaması yaptık. Nöroinflamasyon oluştuğunu sitokinlerden IL-1 $\beta$ 'daki anlamlı artışla gözlemledik.

PTM'lerden biri olan deiminasyonda PAD enzimleri çalışmaktadır. Özellikle PAD2 beyindeki aktiviteden sorumludur. Çalışmamızda PAD2, hedeflediğimiz proteinler olan CRP ve KNG-1'deki değişimi gözlemlemek için RT-PCR yaptık. PAD2 ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemledik. Fakat KNG ve CRP ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik yoktur.

F95 antikoruna deimine proteinlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Western blotlama ile CRP deiminasyonu için bant beklediğimiz bölgede F95 antikorunu saptadık. Bu durum CRP'nin nöroinflamasyon ile deimine olabileceğini göstermektedir. PAD seviyesindeki düşüşe rağmen çeşitli protein gruplarında deiminasyon tanımladık. Bu durum daha çok enzimin aktivitesi ile bağlantılı olarak görülmektedir.

### 6.2. Öneriler

Çalışmamızda posttransyonel değişiklik olan deiminasyonun mikroglialarda proteinler üzerindeki etkisine baktık. Western blotlama ile çeşitli bantlar tespit ettik ancak detaylı protein tanımlanması için LC-MS/MS yapılması gerekmektedir. Detaylı araştırmayı gelecek çalışmalarımız için planlamaktayız.



## 7. KAYNAKLAR

- Abeliovich, A., & Gitler, A. D. (2016). Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. *Nature*, 539(7628), 207–216. <https://doi.org/10.1038/nature20414>
- Al Hariri, M., Elmedawar, M., Zhu, R., Jaffa, M. A., Zhao, J., et al. (2017). Proteome profiling in the aorta and kidney of type 1 diabetic rats. *PLoS One*, 12(11), e0187752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187752>
- Alexander, G. E. (2022). Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues in Clinical Neuroscience*.
- Almolda, B., de Labra, C., Barrera, I., Gruart, A., Delgado-Garcia, J. M., et al. (2015). Alterations in microglial phenotype and hippocampal neuronal function in transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-10. *Brain Behav Immun*, 45, 80–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.015>
- Amor, S., Puentes, F., Baker, D., & van der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, 129(2), 154–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x>
- Ankeny, D. P., & Popovich, P. G. (2009). Mechanisms and implications of adaptive immune responses after traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 158(3), 1112–1121. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.001>
- Ansar, W., & Ghosh, S. (2013). C-reactive protein and the biology of disease. *Immunol Res*, 56(1), 131–142. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8384-0>
- Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M., et al. (2004). Structural basis for Ca<sup>2+</sup>-induced activation of human PAD4. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(8), 777–783.
- Asaga, H., Akiyama, K., Ohsawa, T., & Ishigami, A. (2002). Increased and type II-specific expression of peptidylarginine deiminase in activated microglia but not hyperplastic astrocytes following kainic acid-evoked neurodegeneration in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 326(2). [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00334-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00334-8)
- Asaga, H., Nakashima, K., Senshu, T., Ishigami, A., & Yamada, M. (2001). Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(1). <https://doi.org/10.1189/jlb.70.1.46>
- Ascherio, A. (2013). Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*, 13(12 Suppl), 3–9. <https://doi.org/10.1586/14737175.2013.865866>
- Audrain, M., Fol, R., Dutar, P., Potier, B., Billard, J.-M., et al. (2016). Alzheimer's disease-like APP processing in wild-type mice identifies synaptic defects as initial steps of disease progression. *Molecular Neurodegeneration*, 11, 1–17.

- Babelhadj, B., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., Chiappini, B., Gaouar, S. B. S., et al. (2018). Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerg Infect Dis*, 24(6), 1029–1036. <https://doi.org/10.3201/eid2406.172007>
- Bakels, H. S., Roos, R. A. C., van Roon-Mom, W. M. C., & de Bot, S. T. (2022). Juvenile-Onset Huntington Disease Pathophysiology and Neurodevelopment: A Review. *Mov Disord*, 37(1), 16–24. <https://doi.org/10.1002/mds.28823>
- Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., et al. (2015). Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers*, 1(1), 15005. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>
- Belay, E. D. (1999). Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu Rev Microbiol*, 53(1), 283–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.283>
- Beltrao, P., Bork, P., Krogan, N. J., & van Noort, V. (2013). Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Mol Syst Biol*, 9(1), 714. <https://doi.org/10.1002/msb.201304521>
- Benitez, B. A., Davis, A. A., Jin, S. C., Ibanez, L., Ortega-Cubero, S., et al. (2016). Resequencing analysis of five Mendelian genes and the top genes from genome-wide association studies in Parkinson's Disease. *Mol Neurodegener*, 11(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0097-0>
- Biggar, K. K., & Li, S. S.-C. (2015). Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(1), 5–17.
- Bonifati, D. M., & Kishore, U. (2007). Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol*, 44(5), 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.03.007>
- Braig, D., Nero, T. L., Koch, H. G., Kaiser, B., Wang, X., et al. (2017). Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites. *Nat Commun*, 8(1), 14188. <https://doi.org/10.1038/ncomms14188>
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr., F. J., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142, w13659. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & van Noort, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(11), 1013–1021. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.11.1013>
- Bu, G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*, 10(5), 333–344. <https://doi.org/10.1038/nrn2620>
- Carpanini, S. M., Torvell, M., & Morgan, B. P. (2019). Therapeutic Inhibition of the Complement System in Diseases of the Central Nervous System. *Front Immunol*, 10, 362. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00362>

- Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Dis Mon*, 56(9), 484–546. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001>
- Chambers, A. F., & Matrisian, L. M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 89(17), 1260–1270. <https://doi.org/10.1093/jnci/89.17.1260>
- Chao, Y., Wong, S. C., & Tan, E. K. (2014). Evidence of inflammatory system involvement in Parkinson's disease. *Biomed Res Int*, 2014, 308654. <https://doi.org/10.1155/2014/308654>
- Charlesworth, M. C., Young, C. Y., Miller, V. M., & Tindall, D. J. (1999). Kininogenase activity of prostate-derived human glandular kallikrein (hK2) purified from seminal fluid. *J Androl*, 20(2), 220–229. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10232657>
- Chavanas, S., Mechin, M. C., Takahara, H., Kawada, A., Nachat, R., et al. (2004). Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene*, 330, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.12.038>
- Criscitello, M. F., Kraev, I., & Lange, S. (2019). Deiminated proteins in extracellular vesicles and plasma of nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) - Novel insights into shark immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 92. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.012>
- Depboylu, C., Schafer, M. K., Arias-Carrion, O., Oertel, W. H., Weihe, E., et al. (2011). Possible involvement of complement factor C1q in the clearance of extracellular neuromelanin from the substantia nigra in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70(2), 125–132. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31820805b9>
- DeTure, M. A., & Dickson, D. W. (2019). *The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease*. *Mol Neurodegeneration* 14: 32.
- Dresselhaus, E. C., & Meffert, M. K. (2019). Cellular Specificity of NF-kappaB Function in the Nervous System. *Front Immunol*, 10, 1043. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01043>
- Duffy, M. J. (1996). Proteases as prognostic markers in cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2(4), 613–618.
- Dutta, G., Zhang, P., & Liu, B. (2008). The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol*, 22(5), 453–464. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00616.x>
- Duyckaerts, C., Potier, M. C., & Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*, 115(1), 5–38. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0312-8>
- Firbank, M. J., O'Brien, J. T., & Taylor, J. P. (2018). Long reaction times are associated with delayed brain activity in lewy body dementia. *Hum Brain Mapp*, 39(2), 633–643. <https://doi.org/10.1002/hbm.23866>

- Fu, Y., Zhao, J., Atagi, Y., Nielsen, H. M., Liu, C.-C., et al. (2016). Apolipoprotein E lipoprotein particles inhibit amyloid- $\beta$  uptake through cell surface heparan sulphate proteoglycan. *Molecular Neurodegeneration*, *11*(1), 1–11.
- Fuster, M. M., & Esko, J. D. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, *5*(7), 526–542.
- Garavelli, J. S. (2004). The RESID Database of Protein Modifications as a resource and annotation tool. *Proteomics*, *4*(6), 1527–1533.
- Gasque, P., Dean, Y. D., McGreal, E. P., VanBeek, J., & Morgan, B. P. (2000). Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology*, *49*(1–2), 171–186. [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(00\)80302-1](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(00)80302-1)
- Gelders, G., Baekelandt, V., & Van der Perren, A. (2018). Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *J Immunol Res*, *2018*, 4784268. <https://doi.org/10.1155/2018/4784268>
- Gill, R., Kemp, J. A., Sabin, C., & Pepys, M. B. (2004). Human C-reactive protein increases cerebral infarct size after middle cerebral artery occlusion in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, *24*(11), 1214–1218. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000136517.61642.99>
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, *349*(6311), 704–706. <https://doi.org/10.1038/349704a0>
- Goldman, J. G., Forsberg, L. K., Boeve, B. F., Armstrong, M. J., Irwin, D. J., et al. (2020). Challenges and opportunities for improving the landscape for Lewy body dementia clinical trials. *Alzheimers Res Ther*, *12*(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00703-5>
- Goldmann, T., Tay, T. L., & Prinz, M. (2013). Love and death: microglia, NLRP3 and the Alzheimer's brain. *Cell Res*, *23*(5), 595–596. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.24>.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D., et al. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *72*(1), 11–15.
- Hailer, N. P. (2008). Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Progress in Neurobiology*, *84*(3), 211–233.
- Hofman, Z. L. M., De Maat, S., & Maas, C. (2018). High-molecular-weight kininogen: breaking bad in lethal endotoxemia. *J Thromb Haemost*, *16*(2), 193–195. <https://doi.org/10.1111/jth.13924>
- Huizinga, R., Hintzen, R. Q., Assink, K., van Meurs, M., & Amor, S. (2009). T-cell responses to neurofilament light protein are part of the normal immune repertoire. *Int Immunol*, *21*(4), 433–441. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp011>

- Inal, J. M., Hristova, M., & Lange, S. (2022a). A Pilot Study on Peptidylarginine Deiminases and Protein Deimination in Animal Cancers across Vertebrate Species. *Int J Mol Sci*, 23(15), 8697. <https://doi.org/10.3390/ijms23158697>
- Inal, J. M., Hristova, M., & Lange, S. (2022b). A Pilot Study on Peptidylarginine Deiminases and Protein Deimination in Animal Cancers across Vertebrate Species. *Int J Mol Sci*, 23(15), 8697. <https://doi.org/10.3390/ijms23158697>
- Ishigami, A., Choi, E.-K., Kim, Y.-S., & Maruyama, N. (2014). Deimination in Alzheimer's disease. *Protein Deimination in Human Health and Disease*, 237–255.
- Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., et al. (2005). Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 80(1), 120–128. <https://doi.org/10.1002/jnr.20431>
- Janelidze, S., Lindqvist, D., Francardo, V., Hall, S., Zetterberg, H., et al. (2015). Increased CSF biomarkers of angiogenesis in Parkinson disease. *Neurology*, 85(21), 1834–1842. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002151>
- Jang, B., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R. I., Kim, Y. S., et al. (2013). Peptidylarginine deiminase and protein citrullination in prion diseases: strong evidence of neurodegeneration. *Prion*, 7(1), 42–46. <https://doi.org/10.4161/pri.22380>
- Jang, B., Jin, J. K., Jeon, Y. C., Cho, H. J., Ishigami, A., et al. (2010). Involvement of peptidylarginine deiminase-mediated post-translational citrullination in pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol*, 119(2), 199–210. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0625-x>
- Jin, C., Chen, L., Kuang, Z., Sun, Y., & Meng, D. (2023). Two New Compounds Isolated from the Leaves of *Ohwia Caudata* and Their Neuroprotective Effect Against LPS-Induced BV2 Cells. *Chemistry & Biodiversity*.
- Johnson, L. N. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 4), 627–641. <https://doi.org/10.1042/BST0370627>
- Jones, S. A. V., & O'Brien, J. T. (2014). The prevalence and incidence of dementia with Lewy bodies: a systematic review of population and clinical studies. *Psychological Medicine*, 44(4), 673–683.
- Ju, Y., & Tam, K. Y. (2022). Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*, 17(3), 543–549. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320970>
- Kahn, R., Hellmark, T., Leeb-Lundberg, L. M., Akbari, N., Todiras, M., et al. (2009). Neutrophil-derived proteinase 3 induces kallikrein-independent release of a novel vasoactive kinin. *J Immunol*, 182(12), 7906–7915. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803624>

- Kaneko, N., Kudo, K., Mabuchi, T., Takemoto, K., Fujimaki, K., et al. (2006). Suppression of cell proliferation by interferon-alpha through interleukin-1 production in adult rat dentate gyrus. *Neuropsychopharmacology*, *31*(12), 2619–2626.
- Kovacs, G. G. (2018). Concepts and classification of neurodegenerative diseases. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 145, pp. 301–307). Elsevier.
- Kovacs, G. G., Puopolo, M., Ladogana, A., Pocchiari, M., Budka, H., et al. (2005). Genetic prion disease: the EUROCD experience. *Hum Genet*, *118*(2), 166–174. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-0020-1>
- Kremer, H. P. H., & Group, H. S. (1996). Unified Huntington's disease rating scale: reliability and consistency. *Movement Disorders*, *11*, 136–142.
- Lalmanach, G., Naudin, C., Lecaille, F., & Fritz, H. (2010). Kininogens: more than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochimie*, *92*(11), 1568–1579.
- Langhauser, F., Gob, E., Kraft, P., Geis, C., Schmitt, J., et al. (2012). Kininogen deficiency protects from ischemic neurodegeneration in mice by reducing thrombosis, blood-brain barrier damage, and inflammation. *Blood*, *120*(19), 4082–4092. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-440057>
- Lee, D. R., Taylor, J. P., & Thomas, A. J. (2012). Assessment of cognitive fluctuation in dementia: a systematic review of the literature. *Int J Geriatr Psychiatry*, *27*(10), 989–998. <https://doi.org/10.1002/gps.2823>
- Lee, D. Y., Teyssier, C., Strahl, B. D., & Stallcup, M. R. (2005). Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev*, *26*(2), 147–170. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0008>
- Lee, K.-W., Young Jung, S., Choi, S.-M., & Jin Yang, E. (2012). Effects of ginsenoside Re on LPS-induced inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*, 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-196>
- Lee, S. M., Yang, E. J., Choi, S.-M., Kim, S. H., Baek, M. G., et al. (2012). Effects of Bee Venom on Glutamate-Induced Toxicity in Neuronal and Glial Cells. *Article ID*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/368196>
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, *269*(5226), 973–977. <https://doi.org/10.1126/science.7638622>
- Li, X., Zhou, J. X., Qu, Y. D., & Kuang, X. (2023). Cyclooxygenase-2 Inhibitor Parecoxib Reduces LPS-Induced Activation of BV2 Microglia Cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1–6.
- Lu, W. Q., Qiu, Y., Li, T. J., Tao, X., Sun, L. N., et al. (2009). Timosaponin B-II inhibits pro-inflammatory cytokine induction by lipopolysaccharide in BV2 cells. *Arch Pharm Res*, *32*(9), 1301–1308. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1916-4>

- Luan, Y. Y., & Yao, Y. M. (2018). The Clinical Significance and Potential Role of C-Reactive Protein in Chronic Inflammatory and Neurodegenerative Diseases. *Front Immunol*, 9, 1302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01302>
- Magnadottir, B., Hayes, P., Gisladottir, B., Bragason, Bt., Hristova, M., et al. (2018). Pentraxins CRP-I and CRP-II are post-translationally deiminated and differ in tissue specificity in cod (*Gadus morhua* L.) ontogeny. *Dev Comp Immunol*, 87, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.05.014>
- Maiti, P., Manna, J., & Dunbar, G. L. (2017). Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Transl Neurodegener*, 6, 28. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0099-z>
- Mandle, R. J., Colman, R. W., & Kaplan, A. P. (1976). Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), 4179–4183.
- Maraganore, D. M., Farrer, M. J., Hardy, J. A., Lincoln, S. J., McDonnell, S. K., et al. (1999). Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease. *Neurology*, 53(8), 1858–1860. <https://doi.org/10.1212/wnl.53.8.1858>
- Markaki, I., Bergstrom, S., Tsitsi, P., Remnestal, J., Manberg, A., et al. (2020). Cerebrospinal Fluid Levels of Kininogen-1 Indicate Early Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. *Mov Disord*, 35(11), 2101–2106. <https://doi.org/10.1002/mds.28192>
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005a). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11), 838–849. <https://doi.org/10.1038/nrm1761>
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005b). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11), 838–849. <https://doi.org/10.1038/nrm1761>
- Martinez de la Torre, Y., Fabbri, M., Jaillon, S., Bastone, A., Nebuloni, M., et al. (2010). Evolution of the pentraxin family: the new entry PTX4. *J Immunol*, 184(9), 5055–5064. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901672>
- McGinley, M. P., Goldschmidt, C. H., & Rae-Grant, A. D. (2021). Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Jama*, 325(8), 765–779. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.26858>
- McKeith, I. (2007). Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia: where two worlds collide. *Pract Neurol*, 7(6), 374–382. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.134163>
- McKeith, I. G., Boeve, B. F., Dickson, D. W., Halliday, G., Taylor, J. P., et al. (2017). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology*, 89(1), 88–100. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004058>

- McMurray, C. T. (2000). Neurodegeneration: diseases of the cytoskeleton? *Cell Death Differ*, 7(10), 861–865. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400764>
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwegs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol*, 6, 257. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>
- Mihlan, M., Blom, A. M., Kupreishvili, K., Lauer, N., Stelzner, K., et al. (2011). Monomeric C-reactive protein modulates classic complement activation on necrotic cells. *FASEB J*, 25(12), 4198–4210. <https://doi.org/10.1096/fj.11-186460>
- Mineur, Y. S., McLoughlin, D., Crusio, W. E., & Sluyter, F. (2005). Genetic mouse models of Alzheimer's disease. *Neural Plast*, 12(4), 299–310. <https://doi.org/10.1155/NP.2005.299>
- Minikel, E. V., Zhao, H. T., Le, J., O'Moore, J., Pitstick, R., et al. (2020). Prion protein lowering is a disease-modifying therapy across prion disease stages, strains and endpoints. *Nucleic Acids Research*, 48(19), 10615–10631.
- Mohanan, S., Cherrington, B. D., Horibata, S., McElwee, J. L., Thompson, P. R., et al. (2012). Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. *Biochem Res Int*, 2012, 895343. <https://doi.org/10.1155/2012/895343>
- More, S. V., & Choi, D. K. (2015). Promising cannabinoid-based therapies for Parkinson's disease: motor symptoms to neuroprotection. *Mol Neurodegener*, 10(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0012-0>
- Morgan, A. R., Touchard, S., Leckey, C., O'Hagan, C., Nevado-Holgado, A. J., et al. (2019). Inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease plasma. *Alzheimers Dement*, 15(6), 776–787. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.03.007>
- Nam, H. Y., Nam, J. H., Yoon, G., Lee, J. Y., Nam, Y., et al. (2018). Ibrutinib suppresses LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 microglial cells and wild-type mice. *J Neuroinflammation*, 15(1), 271. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1308-0>
- Neumann, H., Kotter, M. R., & Franklin, R. J. M. (2009). Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, 132(2), 288–295.
- Nguyen, P. L., Bui, B. P., Duong, M. T. H., Lee, K., Ahn, H.-C., et al. (2021). Suppression of LPS-induced inflammation and cell migration by azelastine through inhibition of JNK/NF- $\kappa$ B pathway in BV2 microglial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9061.
- Nicholas, A. P. (2013a). Dual immunofluorescence study of citrullinated proteins in Alzheimer diseased frontal cortex. *Neurosci Lett*, 545, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.04.028>
- Nicholas, A. P. (2013b). Dual immunofluorescence study of citrullinated proteins in Alzheimer diseased frontal cortex. *Neurosci Lett*, 545, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.04.028>

- Nicholas, A. P., Lu, L., Heaven, M., Kadish, I., van Groen, T., et al. (2014). Ongoing studies of deimination in neurodegenerative diseases using the F95 antibody. *Protein Deimination in Human Health and Disease*, 257–280.
- Norden, D. M., & Godbout, J. (2013). Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(1), 19–34.
- Nortje, J., & Menon, D. K. (2004). Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. *Curr Opin Neurol*, 17(6), 711–718. <https://doi.org/10.1097/00019052-200412000-00011>
- Oeckl, P., Steinacker, P., von Arnim, C. A., Straub, S., Nagl, M., et al. (2014). Intact protein analysis of ubiquitin in cerebrospinal fluid by multiple reaction monitoring reveals differences in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *J Proteome Res*, 13(11), 4518–4525. <https://doi.org/10.1021/pr5006058>
- Orsini, F., De Blasio, D., Zangari, R., Zanier, E. R., & De Simoni, M. G. (2014). Versatility of the complement system in neuroinflammation, neurodegeneration and brain homeostasis. *Front Cell Neurosci*, 8, 380. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00380>
- Paegelow, I., Trzeczak, S., Bockmann, S., & Vietinghoff, G. (2002). Migratory responses of polymorphonuclear leukocytes to kinin peptides. *Pharmacology*, 66(3), 153–161. <https://doi.org/10.1159/000063797>
- Parikh, S., Koch, M., & Narayan, R. K. (2007a). Traumatic brain injury. *Int Anesthesiol Clin*, 45(3), 119–135. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318078cfe7>
- Parikh, S., Koch, M., & Narayan, R. K. (2007b). Traumatic brain injury. *Int Anesthesiol Clin*, 45(3), 119–135. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318078cfe7>
- Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J., et al. (2007). Identification of PAD2 as a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. *Plant Journal*, 49(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02938.x>
- Paul, W. E. (2012). *Fundamental immunology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Periñán, M. T., Brolin, K., Bandres-Ciga, S., Blauwendraat, C., Klein, C., et al. (2022). Effect Modification between Genes and Environment and Parkinson's Disease Risk. *Annals of Neurology*, 92(5), 715–724.
- Pignataro, L., Sambataro, G., Pagani, D., & Pruneri, G. (2005). Clinico-prognostic value of D-type cyclins and p27 in laryngeal cancer patients: a review. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 25(2), 75–85. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116829>
- Popugaeva, E., Pchitskaya, E., Speshilova, A., Alexandrov, S., Zhang, H., et al. (2015). STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity. *Mol Neurodegener*, 10(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0034-7>

- Przanowski, P., Dabrowski, M., Ellert-Miklaszewska, A., Kloss, M., Mieczkowski, J., et al. (2014). The signal transducers Stat1 and Stat3 and their novel target Jmjd3 drive the expression of inflammatory genes in microglia. *Journal of Molecular Medicine*, *92*, 239–254.
- Qin, X. Y., Zhang, S. P., Cao, C., Loh, Y. P., & Cheng, Y. (2016). Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol*, *73*(11), 1316–1324. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.2742>
- Qin, Y., Qiu, J., Wang, P., Liu, J., Zhao, Y., et al. (2021). Impaired autophagy in microglia aggravates dopaminergic neurodegeneration by regulating NLRP3 inflammasome activation in experimental models of Parkinson's disease. *Brain Behav Immun*, *91*, 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.010>
- Rabinovici, G. D., Wang, P. N., Levin, J., Cook, L., Pravdin, M., et al. (2006). First symptom in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, *66*(2), 286–287. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000196440.00297.67>
- Rajput, D. R. (1993). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *56*(8), 938–939. <https://doi.org/10.1136/jnnp.56.8.938>
- Rodriguez-Oroz, M. C., Jahanshahi, M., Krack, P., Litvan, I., Macias, R., et al. (2009). Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol*, *8*(12), 1128–1139. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70293-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70293-5)
- Rook, M. E., & Southwell, A. L. (2022). Antisense Oligonucleotide Therapy: From Design to the Huntington Disease Clinic. *BioDrugs*, *36*(2), 105–119. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00519-9>
- Ruhlmann, F., Windhof-Jaidhauser, I. M., Menze, C., Beissbarth, T., Bohnenberger, H., et al. (2019). The prognostic capacities of CBP and p300 in locally advanced rectal cancer. *World J Surg Oncol*, *17*(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s12957-019-1764-8>
- Saha, S., Ash, P. E., Gowda, V., Liu, L., Shirihai, O., et al. (2015). Mutations in LRRK2 potentiate age-related impairment of autophagic flux. *Mol Neurodegener*, *10*, 26. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0022-y>
- Salazar, J., Martinez, M. S., Chavez, M., Toledo, A., Anez, R., et al. (2014). C-reactive protein: clinical and epidemiological perspectives. *Cardiol Res Pract*, *2014*, 605810. <https://doi.org/10.1155/2014/605810>
- Sancandi, M., Uysal-Onganer, P., Kraev, I., Mercer, A., & Lange, S. (2020a). Protein Deimination Signatures in Plasma and Plasma-EVs and Protein Deimination in the Brain Vasculature in a Rat Model of Pre-Motor Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*, *21*(8), 2743. <https://doi.org/10.3390/ijms21082743>
- Sancandi, M., Uysal-Onganer, P., Kraev, I., Mercer, A., & Lange, S. (2020b). Protein Deimination Signatures in Plasma and Plasma-EVs and Protein Deimination in the Brain Vasculature in a Rat Model of Pre-Motor Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*, *21*(8), 2743. <https://doi.org/10.3390/ijms21082743>

- Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron*, 89(5), 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>
- Scarlsbrick, I. A., Linbo, R., Vandell, A. G., Keegan, M., Blaber, S. I., et al. (2008a). Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegeneration. *Biol Chem*, 389(6), 739–745. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.085>
- Scarlsbrick, I. A., Linbo, R., Vandell, A. G., Keegan, M., Blaber, S. I., et al. (2008b). Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegeneration. *Biol Chem*, 389(6), 739–745. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.085>
- Schirmer, L., Schafer, D. P., Bartels, T., Rowitch, D. H., & Calabresi, P. A. (2021). Diversity and Function of Glial Cell Types in Multiple Sclerosis. *Trends Immunol*, 42(3), 228–247. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.01.005>
- Schwartz, M., London, A., & Shechter, R. (2009). Boosting T-cell immunity as a therapeutic approach for neurodegenerative conditions: the role of innate immunity. *Neuroscience*, 158(3), 1133–1142.
- Scicli, A. G., Forbes, G., Nolly, H., Dujovny, M., & Carretero, O. A. (1984). Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin Exp Hypertens A*, 6(10–11), 1731–1738. <https://doi.org/10.3109/10641968409046068>
- Scott, G. D., Arnold, M. R., Beach, T. G., Gibbons, C. H., Kanthasamy, A. G., et al. (2021). Fluid and Tissue Biomarkers of Lewy Body Dementia: Report of an LBDA Symposium. *Front Neurol*, 12, 805135. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.805135>
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 81(2), 741–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.741>
- Senshu, T., Akiyama, K., Kan, S., Asaga, H., Ishigami, A., et al. (1995). Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues. *J Invest Dermatol*, 105(2), 163–169. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12317070>
- Sheriff, A., Kayser, S., Brunner, P., & Vogt, B. (2021). C-Reactive Protein Triggers Cell Death in Ischemic Cells. *Front Immunol*, 12, 630430. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630430>
- Silverberg, N. D., Iverson, G. L., Arciniegas, D. B., Bayley, M. T., Bazarian, J. J., et al. (2021). Expert panel survey to update the American Congress of Rehabilitation Medicine definition of mild traumatic brain injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 102(1), 76–86.
- Skelly, D. T., Hennessy, E., Dansereau, M. A., & Cunningham, C. (2013). A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1beta, [corrected] TNF-alpha and IL-6 challenges in C57BL/6 mice. *PloS One*, 8(7), e69123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069123>

- Stavropoulou, P., Gregorakis, A. K., Plebani, M., & Scorilas, A. (2005). Expression analysis and prognostic significance of human kallikrein 11 in prostate cancer. *Clin Chim Acta*, 357(2), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.03.026>
- Stykel, M. G., & Ryan, S. D. (2022). Nitrosative stress in Parkinson's disease. *Npj Parkinson's Disease*, 8(1), 104.
- Suganya, V., Geetha, A., & Sujatha, S. (2015). Urine proteome analysis to evaluate protein biomarkers in children with autism. *Clin Chim Acta*, 450, 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.08.015>
- Sun, C., Yu, W., Zhao, Z., Song, C., Liu, Y., et al. (2019). Peripheral humoral immune response is associated with the non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1057.
- Sun, Y., Gao, L., Hou, W., & Wu, J. (2020). beta-Sitosterol Alleviates Inflammatory Response via Inhibiting the Activation of ERK/p38 and NF-kappaB Pathways in LPS-Exposed BV2 Cells. *Biomed Res Int*, 2020, 7532306. <https://doi.org/10.1155/2020/7532306>
- Swardfager, W., Lanctot, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., et al. (2010). A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 68(10), 930–941. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.012>
- Tabrizi, S. J., Flower, M. D., Ross, C. A., & Wild, E. J. (2020). Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Neurology*, 16(10), 529–546.
- Taheri, S., Baradaran, A., Aliakbarian, M., & Mortazavi, M. (2017). Level of inflammatory factors in chronic hemodialysis patients with and without cardiovascular disease. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 22.
- Tai, Y., Qiu, Y., & Bao, Z. (2018). Magnesium Lithospermate B Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation in BV2 Microglial Cells and Attenuates Neurodegeneration in Lipopolysaccharide-Injected Mice. *J Mol Neurosci*, 64(1), 80–92. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-1007-9>
- Talbot, K. (2009). Motor neuron disease: the bare essentials. *Pract Neurol*, 9(5), 303–309. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.188151>
- Tarcsa, E., Marekov, L. N., Mei, G., Melino, G., Lee, S. C., et al. (1996). Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem*, 271(48), 30709–30716. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30709>
- Tsou, A., Chen, P.-J., Tsai, K.-W., Hu, W.-C., & Lu, K.-C. (2022). TH $\alpha$ 1 Immunological Pathway as Protective Immune Response against Prion Diseases: An Insight for Prion Infection Therapy. *Viruses*, 14(2), 408.
- Uwishema, O., Mahmoud, A., Sun, J., Correia, I. F. S., Bejjani, N., et al. (2022). Is Alzheimer's disease an infectious neurological disease? A review of the literature. *Brain and Behavior*, 12(8), e2728.

- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., et al. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304(5674), 1158–1160. <https://doi.org/10.1126/science.1096284>
- van Venrooij, W. J., & Pruijn, G. J. (2000a). Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2(4), 249–251. <https://doi.org/10.1186/ar95>
- van Venrooij, W. J., & Pruijn, G. J. (2000b). Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2(4), 249–251. <https://doi.org/10.1186/ar95>
- Veerhuis, R., Nielsen, H. M., & Tenner, A. J. (2011). Complement in the brain. *Mol Immunol*, 48(14), 1592–1603. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.04.003>
- Verber, N. S., Shephard, S. R., Sassani, M., McDonough, H. E., Moore, S. A., et al. (2019). Biomarkers in Motor Neuron Disease: A State of the Art Review. *Front Neurol*, 10, 291. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00291>
- Vigasova, D., Nemergut, M., Liskova, B., & Damborsky, J. (2021). Multi-pathogen infections and Alzheimer's disease. *Microb Cell Fact*, 20(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01520-7>
- Virlogeux, A., Scaramuzzino, C., Lenoir, S., Carpentier, R., Louessard, M., et al. (2021). Increasing brain palmitoylation rescues behavior and neuropathology in Huntington disease mice. *Sci Adv*, 7(14), eabb0799. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb0799>
- Vlagma, T. T., Koerts, J., Tucha, O., Dijkstra, H. T., Duits, A. A., et al. (2016). Mental slowness in patients with Parkinson's disease: Associations with cognitive functions? *J Clin Exp Neuropsychol*, 38(8), 844–852. <https://doi.org/10.1080/13803395.2016.1167840>
- Vossenaar, E. R., Zendman, A. J., van Venrooij, W. J., & Pruijn, G. J. (2003a). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*, 25(11), 1106–1118. <https://doi.org/10.1002/bies.10357>
- Vossenaar, E. R., Zendman, A. J., van Venrooij, W. J., & Pruijn, G. J. (2003b). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*, 25(11), 1106–1118. <https://doi.org/10.1002/bies.10357>
- Vossenaar, E. R., Zendman, A. J., van Venrooij, W. J., & Pruijn, G. J. (2003c). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*, 25(11), 1106–1118. <https://doi.org/10.1002/bies.10357>
- Walter, L., & Neumann, H. (n.d.). *Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration*. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0180-5>
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., et al. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*, 26(14), 1816–1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>

- Wang, H., He, Y., Sun, Z., Ren, S., Liu, M., et al. (2022). Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 19, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02492-0>
- Watts, K. E., Storr, N. J., Barr, P. G., & Rajkumar, A. P. (2023). Systematic review of pharmacological interventions for people with Lewy body dementia. *Aging Ment Health*, 27(2), 203–216. <https://doi.org/10.1080/13607863.2022.2032601>
- Weinstein, G., Lutski, M., Goldbourt, U., & Tanne, D. (2017). C-reactive protein is related to future cognitive impairment and decline in elderly individuals with cardiovascular disease. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 69, 31–37.
- Witalison, E. E., Thompson, P. R., & Hofseth, L. J. (2015). Protein Arginine Deiminases and Associated Citrullination: Physiological Functions and Diseases Associated with Dysregulation. *Curr Drug Targets*, 16(7), 700–710. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150202160954>
- Witcher, K. G., Bray, C. E., Dziabis, J. E., McKim, D. B., Benner, B. N., et al. (2018). Traumatic brain injury-induced neuronal damage in the somatosensory cortex causes formation of rod-shaped microglia that promote astrogliosis and persistent neuroinflammation. *Glia*, 66(12), 2719–2736.
- Woodruff, T. M., Ager, R. R., Tenner, A. J., Noakes, P. G., & Taylor, S. M. (2010). The role of the complement system and the activation fragment C5a in the central nervous system. *Neuromolecular Med*, 12(2), 179–192. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8085-y>
- Xu, J., Fang, J., Cheng, Z., Fan, L., Hu, W., et al. (2018). Overexpression of the Kininogen-1 inhibits proliferation and induces apoptosis of glioma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0833-0>
- Xu, M., Yang, Y., Peng, J., Zhang, Y., Wu, B., et al. (2023). Effects of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* on microglial polarization in a LPS-induced BV2 cells model of neuroinflammation via TREM2. *J Ethnopharmacol*, 302(Pt A), 115914. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115914>
- Yang, L., Tan, D., & Piao, H. (2020). *Myelin Basic Protein Citrullination in Multiple Sclerosis: A Potential Therapeutic Target for the Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1920-2>
- Yen, C.-Y., Jiang, S.-S., Hsiao, J.-R., Chen, C.-H., & Liu, K.-J. (2016). Identification of kininogen-1 as a potential prognostic biomarker for oral cancer. *European Journal of Cancer*, 60, e10.
- Yoshida, S., Taniguchi, M., Suemoto, T., Oka, T., He, X., et al. (1998). cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP. *Biochim Biophys Acta*, 1399(2–3), 225–228. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(98\)00116-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(98)00116-x)

- Zeller, J., Cheung Tung Shing, K. S., Nero, T. L., McFadyen, J. D., Krippner, G., et al. (2023). A novel phosphocholine-mimetic inhibits a pro-inflammatory conformational change in C-reactive protein. *EMBO Mol Med*, *15*(1), e16236. <https://doi.org/10.15252/emmm.202216236>
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., et al. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*, *34*(36), 11929–11947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>
- Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*, *4*, 3. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>
- Zhou, C., Ye, H.-H., Wang, S.-Q., & Chai, Z. (2006). Interleukin-1 regulation of N-type Ca<sup>2+</sup> channels in cortical neurons. *Neuroscience Letters*, *403*, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.04.043>





## 8. EKLER

Ek1: Etik Kurul Kararı

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

<b>Toplantı Sayısı:136</b>	<b>Toplantı Tarihi: 30 Temmuz 2021</b>
----------------------------	--

**Karar Sayısı:2021/3354;(6523)**N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK'in "BV2 Mikroglial Hücrelerinde LPS ile İndüklenen İnflamasyonda Oluşan Sitokin Değişimlerinin Tespit Edilip, CRP ve Kininogen-1'in Deiminasyonunun Western Blot ile Araştırılması" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 05.07.2021 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Öğr. Gör. Gamze DEMİREL'in doktora tez çalışmasının N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK'in sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

Yardımcı Araştırmacılar: Öğr. Gör. Gamze DEMİREL, Doç. Dr. Nadir KOÇAK, Doç. Dr. Çiğdem Damla DENİZ

**ASLI GİBİDİR**  
**30.07.2021**

**Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU**  
**İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı**