

**FARHAD
KOHANSAL**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL.
ENST.**

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2025



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

Alzheimer Hastalarında NK Hücre Enflamatuvar Yanıtlarının İncelenmesi

FARHAD KOHANSAL KOSHK SARAY

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜNNUR DENİZ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2025

TEZ ONAYI



BEYAN

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

Farhad KOHANSAL KOSHK SARAY

İTHAF

Sevgili aileme ve arkadaşlarıma ithaf ediyorum...



TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca, tezimde ve çalışmalarımnda her türlü desteği ve yardımı sağlayan, yeri geldiğinde bir anne şefkatiyle yaklaşan çok değerli danışman hocam, Prof. Dr. Günnur DENİZ'e,

Tezimin optimizasyon aşamalarında fikir alışverişi ve yardımlarından dolayı Prof. Dr. Umut Can KÜÇÜKSEZER'e,

Tezimin deneysel çalışmalarına katkılarından dolayı Abdullah Yılmaz'a,

Yardımları ve bilgi birikimleri ile her zaman destek olan kıymetli hocalarım Prof. Dr. İbrahim Hakan GÜRVİT, Doç. Dr. Zeynep Gamze GÜVEN ve Dr. Öğr. Üyesi Bedia SAMANCI'a,

Doktora eğitimim süresince bilimsel fikir ve düşünceleriyle bana yardım eden bölümümün saygıdeğer hocaları Prof. Dr. Ali Osman Gürol, Prof. Dr. Gaye Erten Yurdağül, Prof. Dr. Esin Aktaş, Doç. Dr. Sema Bilgiç ve her zaman yardımcı olan tecrübelerini paylaşan değerli iş arkadaşım Dr. İlhan Tahralı'ya,

Tezimin yazım aşamaları için bana her türlü manevi destek olan canım eşim Kiana Zamanian'a,

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, yanımda olan, bu hayatta ne istersem yapabileceğime ve başarabileceğime inanan sevgili anneme, babama ve kardeşlerim Bahram ve Neda'ya sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, proje no: 39029 ve CB Strateji ve Bütçe Başkanlığı (Kalkınma Bakanlığı), proje no: 36288 tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvii
ÖZET GRAFİK.....	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Apolipoprotein E Protein Yapısı ve Gen Betimlenmesi.....	4
2.2. Apolipoprotein E Betimleyen Dokular.....	5
2.3. Apolipoprotein E İzoformlarının Metabolizmadaki Rollerı.....	6
2.3.1. Apolipoprotein E izoformlarının lipidasyonu.....	6
2.3.2. Merkezi sinir sisteminde lipid taşınması.....	7
2.3.3. Apolipoprotein E izoformlarının alzheimer hastalığı fizyopatolojisindeki rollerı.....	8
2.3.4. Apolipoprotein E ve amiloid-β patolojisi.....	11
2.3.5. Apolipoprotein E ve Tau patolojisi.....	13
2.4. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler.....	15
2.4.1. NK hücre fonksiyonları.....	17
2.4.2. NK hücre aktivasyon mekanizmaları.....	19
2.4.3. KAR (killer-cell activating receptor).....	20
2.4.3.1 NKG2D reseptörü.....	20
2.4.4. TOLL benzeri reseptör.....	21
2.4.4.1 TOLL benzeri reseptör 9.....	21
2.4.5. KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptor).....	22
2.4.6. T hücresi immünoglobulin ve müsin içeren protein 3 (TİM-3) reseptörü.....	22
2.4.7. Lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG-3) reseptörü.....	24
2.4.8. İmmünoglobulin (İg) ve tirozin bazlı inhibitör motif (İTİM) alanlarına sahip T hücresi immünoresseptörü (TİGİT).....	25
2.5. Yaşlanma Sürecinde NK Hücreleri.....	27

2.6. Nk Hücrelerinin Beyne Göçü.....	27
2.7. Alzheimer Hastalığında Nöroenflamasyon.....	29
2.8. Apolipoprotein E ve Lenfosit Aktivasyonu.....	33
2.9. Apolipoprotein E İzofomlarının Nöroenflamasyon Üzerindeki Rolü.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Çalışma Grupları.....	39
3.2. Dahil Edilme Kriterleri.....	39
3.3. Gruplara Göre Dışlanma Kriterleri.....	39
3.4. Gereç.....	40
3.4.1. Cihazlar.....	40
3.4.2. Kimyasallar.....	40
3.4.2.1. RPMI-1640.....	41
3.4.2.2. PBS (fosfat tampon tuz çözeltisi).....	41
3.4.2.3. Lizis çözeltisi.....	41
3.4.2.4. Hücre kültüründe kullanılan uyarılar brefeldin A içeren hücre aktivasyon kokteyli.....	42
3.4.3. Antikorlar.....	42
3.5. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu.....	44
3.5.1 Hücre yüzey molekülleri ve hücre içi sitokin tayini.....	45
3.5.2. Hücre yüzey boyaması.....	46
3.5.3. Hücre içi boyama.....	46
3.5.4. CD107A ekspresyonu ve sitotoksik aktivite.....	47
3.5.5. Apolipoprotein E izofomlarının belirlenmesi.....	47
3.5.5.1. Periferik kandan dna izolasyonu.....	47
3.5.5.2. DNA konsantrasyonu ve saflığının ölçümü.....	48
3.5.5.3. APOE genotipleme.....	48
3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. Klinik ve Demografik Veriler.....	52
4.2. Periferik Kan Mononükleer Hücre Örneklerinin İmmünofenotipik Değerlendirilmesi.....	52
4.2.1. CD3 ⁺ T, NK ve NK hücre alt grupları.....	54
4.2.2. NK hücre yüzey molekül ekspresyon düzeyleri.....	55

4.2.3. NK hücre içi sitokin seviyeleri.....	56
4.2.4. NK hücre alt gruplarında yüzey molekül ekspresyonları.....	57
4.2.5. CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻ NK ve CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺ NK hücre içi sitokin seviyeleri.....	59
4.2.6. Nk hücrelerinin CD107a ekspresyonu ve sitotoksik aktivitesi.....	60
4.2.7. Apolipoprotein E izoformları.....	62
4.2.8. Apolipoprotein E izoformlarına göre CD3 ⁺ T, NK ve NK hücre alt grupları.....	63
4.2.9. Apolipoprotein E izoformlarının göre NK hücre yüzey molekül ekspresyon düzeyleri.....	65
4.2.10. Apolipoprotein E izoformlarına göre NK hücre içi sitokin seviyeleri.....	66
4.2.11. Apolipoprotein E izoformlarına göre NK hücre alt grublarında yüzey molekül ekspresyon düzeyleri.....	67
4.2.12. Apolipoprotein E izoformlarına göre NK hücre alt gruplarında hücre içi sitokin seviyeleri.....	71
4.3. Korelasyon Analizleri.....	72
4.3.1. Alzheimer hastalarında CD3 ⁻ NK hücre korelasyon bulguları.....	72
4.3.2. CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻ NK hücre alt grubu korelasyon bulguları.....	73
4.3.3. Alzheimer hastaları CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺ NK hücre alt grubu korelasyon bulguları.....	74
4.3.4. Klinik demans derecelendirme ölçeğine (CDR) göre CD3 ⁻ NK hücrelerinde korelasyon analizi.....	74
4.3.5. Apolipoprotein-ε3 ve -ε4 alleli taşıyan tüm Alzheimer hastalarında CD3 ⁻ NK hücrelerinin korelasyon analizi.....	77
5. TARTIŞMA.....	81
KAYNAKLAR	89
ETİK KURUL KARARI	108
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	..
ÖZGEÇMİŞ.....	109

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1: Cihaz listesi.....	40
-------------------------------	----

Tablo 3.2: Reaktif ve çözeltiler listesi.....	41
Tablo 3.3: Hücre yüzey boyamasında kullanılan antikorlar.....	44
Tablo 3.4: Hücre içi sitokin boyamada kullanılan antikorlar.....	44
Tablo 3.5: APOE112 ve APOE158 için primer dizileri ve erime sıcaklıkları.....	49
Tablo 3.6: APOE112 ve APOE158 için prob dizileri.....	49
Tablo 3.7: APOE112 ve APOE158 RT-PZR karışımının içeriği.....	50
Tablo 3.8: APOE112 ve APOE158 için kullanılan RT-PZR programının sıcaklık döngüleri....	50
Tablo 4.1: Klinik ve demografik veriler.....	52
Tablo 4.2: Periferik kan örneklerinin kan sayım değerleri.....	53
Tablo 4.3: Apolipoprotein E izoformlarının genotipleme verileri.....	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Özet grafik.....	XIX
Şekil 2A. APOE proteininin yapısal ve fonksiyonel bölgeleri. Şekil 2B. İnsan APOE yapısal alanlarının diyagramı.....	4
Şekil 2B. İnsan APOE yapısal alanları.....	5
Şekil 3. Apolipoprotein E, RNA betimlemesi.....	6
Şekil 4. Alzheimer hastalığı patolojisinde APOE'nin A β 'den bağımsız mekanizmaları.....	9
Şekil 5. NK hücre aktive edici ve inhibitör reseptörler.....	19
Şekil 6. Alzheimer hastalığı insan olguları, fare modelleri ve in vitro hücre kültür modeli.....	38
Şekil 7. Antikor titrasyonunda MFI % değerleri (LAG-3).....	43
Şekil 8: Kültür koşulları.....	45
Şekil 9. Sağlıklı kontrol periferik kan örneğinde CD3 ⁺ T, CD3 ⁻ NK ve CD3 ⁻ NK hücre alt gruplarının akan hücre ölçerinde kapılama stratejisi.....	54
Şekil 10. CD3 ⁺ T, CD3 ⁻ NK, CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻ NK, CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺ NK hücre ekspresyon seviyeleri.....	55
Şekil 11. NK hücrelerinde NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyon seviyeleri.....	56
Şekil 12. NK hücre içi IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri.....	57
Şekil 13. NK hücre alt gruplarında NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyonu.....	59
Şekil 14. NK hücre içi IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri.....	60
Şekil 15. CD3 ⁻ NK hücre CD107a ekspresyonu kapılama stratejisi.....	61
Şekil 16. CD3 ⁻ NK hücrelerinde CD107a ekspresyonu.....	61
Şekil 17: Apolipoprotein 112 allelinin allelik diskriminasyon analizi ile elde edilen genotipleme sonuçları.....	62
Şekil 18. Apolipoprotein E- ϵ 3 ve E- ϵ 4 izoformuna göre CD3 ⁺ T, CD3 ⁻ NK, CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻ NK ve CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺ NK hücre düzeyleri.....	64
Şekil 19. Apolipoprotein E- ϵ 3 ve E- ϵ 4 izoformuna göre NK hücrelerinde NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyonu.....	66

Şekil 20. Apolipoprotein E-ε3 ve E-ε4 izoformuna göre NK hücre içi IFN-γ ve TNF-α sitokin seviyeleri.....	67
Şekil 21. Apolipoprotein E-ε3 ve E-ε4 izoformuna göre NK hücre alt gruplarında NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyonu.....	71
Şekil 22. Apolipoprotein E-ε3 ve E-ε4 izoformuna göre NK hücre alt gruplarında hücre içi IFN-γ ve TNF-α sitokin seviyeleri.....	72
Şekil 23. CD3 ⁺ NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN-γ sitokin seviyeleri arasında korelasyon analizi.....	73
Şekil 24. CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ NK hücre alt grubunda A. LAG-3 ve TLR9, B. LAG-3 ve TİGİT reseptör seviyeleri arasında korelasyon analizi.....	73
Şekil 25. CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ NK hücre alt grubunda A. IFN-γ ve NKG2D, B. LAG-3 ve TLR9 reseptör seviyeleri arasında korelasyon analizi.....	74
Şekil 26. Hafif düzey (CDR<1) Alzheimer hastaların CD3 ⁺ NK hücre A. LAG-3 ve TLR9, B. LAG-3 ve NKG2D, C. TNF-α ve TİGİT, D. IFN-γ ve LAG-3, E. IFN-γ ve NKG2D marker seviyeleri arasında korelasyon analizi.....	76
Şekil 27. Orta-ileri derece (CDR>1) Alzheimer hastaların CD3 ⁺ NK hücre IFN-γ sitokin ve NKG2D reseptör seviyeleri arasında korelasyon analizi.....	77
Şekil 28. Apoe-ε3 taşıyan Alzheimer hastaların CD3 ⁺ NK hücre A. LAG-3 ve NKG2D, B. LAG-3 ve TLR9, C. TLR9 ve NKG2D, D. IFN-γ ve NKG2D, E. LAG-3 ve TİGİT, F. IFN-γ ve LAG-3, G. IFN-γ ve TİGİT, H. TNF-α ve TİGİT marker seviyeleri arasında korelasyon analizi.....	80
Şekil 29. Apoe-ε4 taşıyan Alzheimer hastaların CD3 ⁺ NK hücre A. IFN-γ ve NKG2D, B. IFN-γ ve TNF-α, C. TNF-α ve TİGİT marker seviyeleri arasında korelasyon analizi.....	80

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABCA1	Adenozin trifosfat bağlayıcı bölge A1
Aβ	Amiloid Beta
ADCC	Antikor bağımlı hücresel sitotoksiste
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid-beta öncü proteini
ATP	Adenozin trifosfat
BACE1	Beta bölgesi APP parçalayan enzim 1
BCSFB	Kan beyin omurilik sıvı bariyeri
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CD	Farklılaşma kümesi
CMV	Sitomegalovirüs
CpG DNA	Metillenmemiş sitidin-fosfat-guanozin DNA
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
DC	Dendritik hücre
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DS RNA	Çift sarmallı ribonükleik asit
FITC	Fluoresein izotiyosiyanat
GTex	Genotip-doku ekspresyon projesi
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HHV	İnsan herpes virüsü
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
HLA	İnsan lökosit antijeni
HPA	İnsan protein atlası
HSV	Herpes simpleks virüsü
ICAM	Hücreler arası adezyon molekülü
IDE	İnsülin parçalayan enzim
IFN	İnterferon
Ig	İmmünoglobülin
IL	İnterlökin
ILC	Doğal lenfoid hücre
IPSC	İnsan pluripotent kök hücre
IR	İnsülin reseptörü
İTAM	İmmünreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifi
KBB	Kab beyin bariyeri
KIR	Öldürücü immünoglobulin benzeri reseptörleri
LAG-3	Lenfosit aktivasyon geni 3
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOAD	Geç başlangıçlı alzheimer hastalığı
LPS	Lipopolisakkarit
LRP1	Lipoprotein reseptörüne bağlı protein 1
MCI	Hafif bilişsel bozukluğu
MIC	MHC sınıf I ilişkili polipeptitten
MHC	Ana doku uyumluluk kompleksi
mRNA	Haberci ribonükleik asit

MS	Multipl skleroz
MSS	Merkezi sinir sistemi
NCR	Doğal sitotoksikite reseptörleri
NK	Doğal öldürücü hücre
NKG2D	Doğal öldürücü grup 2, üye D
NLRP-3	NLR ailesi pyrin alanı içeren 3
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NFT	Nörofibriler yumak
NTPM	Milyon başına normalize edilmiş transkript
PAMP	Patojen-ilişkili moleküller
PBS	Fosfat tampon tuz çözeltisi
PD-1	Programlanmış hücre ölümü
PE	Fikoeritrin
PET	Pozitron emisyon tomografisi
PKMH	Periferik kan mononükleer hücre
PRR	Patern tanıma reseptörlerine
PSEN-1	Presenilin-1
RAE-1	Retinoik asit erken indüklenbilir-1
ROS	Reaktif oksijen türleri
STAT	Sinyal iletici ve aktivatörleri
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SS RNA	Tek sarmallı ribonükleik asit
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
Th	Yardımcı T hücresi
THR	T hücresi reseptörü
TIGIT	Ig ve ITIM alanlarına sahip T hücresi immünoresptörü
TIM-3	T-hücresi immünoglobulin ve Müsin içeren protein 3
TLR	Toll benzeri reseptörler
TNF	Tümör nekroz faktör
TRAIL	TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand
Treg	Düzenleyici T hücresi
TREM-1	Miyeloid hücrelerde ifade edilen tetikleyici reseptör-1
UVB	Ultraviyole B
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü

ÖZET

Alzheimer hastalığı, hafıza ve bilişsel işlevlerdeki derin bozukluklarla ilişkili, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Yaygın olarak demansın bir nedeni olan Alzheimer, özellikle yaşlı bireylerde görülmektedir. Çalışmalar, Alzheimer hastalığında enflamatuvar belirteçlerin arttığına işaret etmekte olup, Alzheimer hastalığının erken evresinde, gelişiminde ve ilerlemesinde nöroenflamasyonun kritik rol oynadığı bilinmektedir.

Doğal öldürücü (NK) hücreler, doğal lenfoid hücreler grubunda yer alır ve enflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Transgenik Alzheimer fare modelinde NK hücre deplesyonunun nöroenflamasyonu hafiflettiği, nörogenezi uyardığı ve bilişsel işlevi geliştirdiği gösterilmiştir. Alzheimer hastalarında NK hücrelerinin immünosupresif ilaçlara dirençli olduğu ve stimülasyona karşı güçlü sitotoksikite ve tümör nekroz faktör (TNF- α) ve interferon gamma (IFN- γ) gibi yüksek enflamatuvar sitokinler salgıladığı gözlenmiştir. NKG2D reseptörü ve IFN- γ sitokin, nöronal kök hücrelerin azalmış proliferasyonu ile ilişkili olması dikkat çekmektedir.

Alzheimer gelişmesinde birçok genetik risk faktörleri arasında en yaygın gen, Apolipoprotein E (APOE) geninin APOE- $\epsilon 4$ alleli ile ilişkisi saptanmıştır. APOE, izoforma bağlı bir şekilde enflamatuvar ve immün yanıtları modüle etmektedir. Benzer şekilde, enflamatuvar sitokinler, çeşitli dokularda APOE üretimini düzenleyebilir veya azaltabilir. Klinik çalışmalar, birçok anti-diyabetik ilaçların, sadece APOE- $\epsilon 4$ alelini taşımayan Alzheimer hastalarının tedavisinde faydalı olabileceğini göstermektedir. Nöroenflamasyonu azaltma potansiyelleri gösterilmesine rağmen, NK hücrelerinin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü tam olarak ortaya konmamıştır.

Çalışmamızda, Alzheimer hastalarının klinik demans derecelendirme ölçeğine (CDR) göre hafif düzey (CDR<1) ve orta-ileri derece (CDR>1) olmak üzere iki alt grubunun periferik kan örnekleri üç farklı koşulda (uyarımsız - US, TGF- β uyarımı ve hücre uyarım kokteyli - SC) kültüre edildikten sonra, CD3⁺ T, CD3⁻ NK, CD3⁻CD56⁺CD16⁻ ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde NKG2D, TLR9, TIGIT, LAG-3 ve TIM-3 yüzey molekül ekspresyonları, hücre içi IFN- γ , TNF- α sitokin seviyeleri ve sitotoksik aktiviteleri saptanmıştır. Ayrıca, Alzheimer hastalarında farklı Apolipoprotein E izoformlarının etkisini değerlendirmek amacıyla genotipleme yapılmış ve ardından NK hücre reseptörleri ile sitokin seviyelerinin bu izoformlara göre nasıl değiştiği istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Bulgularımız, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, uyarımsız koşulunda, APOE- $\epsilon 3$ allelini taşıyan Alzheimer hastalarında, CD3⁻ NK hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı

derecede azalma ($p=0.020$), APOE- $\epsilon 3$ taşıyan orta-ileri evre Alzheimer hastalarında CD3⁺ NK ve CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde de anlamlı derecede düşüş ($p=0.048$, $p=0.032$, sırasıyla) saptanmıştır. Bunun aksine, APOE- $\epsilon 4$ taşıyan hafif düzey Alzheimer hasta grubunda CD3⁺ NK ve CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücreleri anlamlı derece yüksek ($p=0.045$, $p=0.035$) bulunmuştur.

APOE- $\epsilon 3$ taşıyan Alzheimer hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, uyarımsız koşulda CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde LAG-3 ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı ($p=0.028$) görülmüştür. Benzer şekilde TIGIT reseptör ekspresyonu, sırasıyla, TGF- β ve hücre uyarım kokteyli ile uyarımda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış ($p=0.013$, $p=0.040$, sırasıyla) göstermiştir. CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde TIGIT reseptörü CDR>1 Alzheimer hastalarında kontrol grubuna göre TGF- β ile uyarım sonucu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p=0.043$) bulunmuştur. Çalışmamızda sadece CD3⁺CD56⁺16⁺ NK hücre alt grubunda IFN- γ düzeyi, Alzheimer hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre hücre uyarım kökteyli koşulunda anlamlı derecede yüksek ($p=0.022$) tespit edilmiştir. CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde ise TLR9 reseptörü CDR>1 Alzheimer hasta grubunda CDR<1 hasta grubuna göre uyarımsız koşulda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p=0.013$) bulunmuştur.

CD3⁺CD16⁺56⁺ NK hücre CD107a ekspresyonu Alzheimer hasta grubunda ve hafif düzeyde (CDR<1) Alzheimer hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre TGF- β uyarımı sonrasında anlamlı derecede ($p=0.021$ ve $p=0.032$) artmıştır.

Sonuç olarak, APOE- $\epsilon 3$ aleline kıyasla APOE- $\epsilon 4$ taşıyan CDR<1 Alzheimer hastalarının uyarılmış NK hücrelerinde artmış TİM-3 reseptörü ve CD107a ekspresyonu ile IFN- γ ve TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin korele artışı, Alzheimer hastalığının ilerleyişinde potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilebilir. Bu bilgiler ışığında, APOE- $\epsilon 4$ alleline sahip erken evre (CDR<1) Alzhemir hastalarının NK hücre fonksiyonlarının belirgin olarak arttığı ve nöroenflamasyonun orta-ileri evredeki hastalara göre daha şiddetli olabileceği düşünülmektedir.

SUMMARY

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder associated with severe impairments in memory and cognitive functions. It is a common cause of dementia, particularly

among the elderly. Studies have indicated increased inflammatory markers in Alzheimer's disease, and neuroinflammation is known to play a critical role in its early stages, progression, and development.

Natural killer (NK) cells, a subset of innate lymphoid cells, play a significant role in regulating inflammatory processes. In transgenic Alzheimer's mouse models, NK cell depletion has been shown to reduce neuroinflammation, stimulate neurogenesis, and improve cognitive function. In Alzheimer's patients, NK cells exhibit resistance to immunosuppressive drugs and display potent cytotoxicity and secretion of high levels of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interferon-gamma (IFN- γ) upon stimulation. The NKG2D receptor and IFN- γ cytokine have been associated with reduced proliferation of neural stem cells.

Among the various genetic risk factors for Alzheimer's development, the most common is the $\epsilon 4$ allele of the Apolipoprotein E (APOE) gene. APOE modulates inflammatory and immune responses in an isoform-dependent manner. Similarly, inflammatory cytokines can regulate or suppress APOE expression in various tissues. Clinical studies have shown that many anti-diabetic drugs may benefit Alzheimer's patients who do not carry the APOE- $\epsilon 4$ allele. Although NK cells have demonstrated the potential to reduce neuroinflammation, their role in neurodegenerative diseases is not yet fully understood.

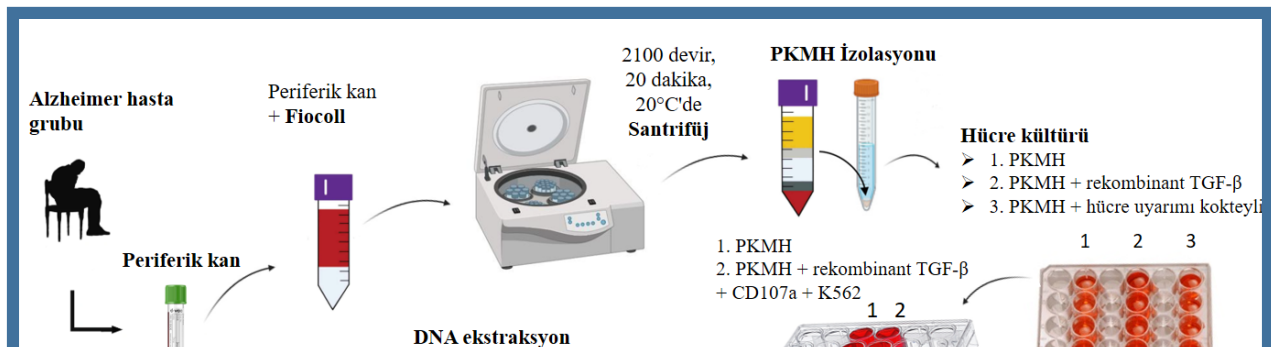
In our study, peripheral blood samples from Alzheimer's patients, grouped by Clinical Dementia Rating (CDR) as mild (CDR<1) and moderate-to-severe (CDR>1), were cultured under three conditions (unstimulated - US, TGF- β stimulation, and stimulation cocktail - SC). Expression of NKG2D, TLR9, TIGIT, LAG-3, and TIM-3 surface molecules, intracellular levels of IFN- γ and TNF- α cytokines, and cytotoxic activity were assessed in CD3⁺ T, CD3⁻ NK, CD3⁻CD56⁺CD16⁻, and CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK cells. Genotyping was performed to assess the influence of different APOE isoforms on NK cell receptors and cytokine levels, and these were statistically compared.

Our findings show that compared to healthy controls, unstimulated CD3⁻ NK cells were significantly decreased in Alzheimer's patients carrying the APOE- $\epsilon 3$ allele ($p=0.020$), and in APOE- $\epsilon 3$ carriers with moderate-to-severe disease, both CD3⁻ NK and CD3⁻CD56⁺CD16⁻ NK cells were significantly reduced ($p=0.048$ and $p=0.032$, respectively). In contrast, mild-stage Alzheimer's patients with the APOE- $\epsilon 4$ allele showed significantly increased levels of CD3⁻ NK and CD3⁻CD56⁺CD16⁻ NK cells ($p=0.045$ and $p=0.035$, respectively).

When compared to healthy controls, Alzheimer's patients carrying the APOE- ϵ 3 allele exhibited significantly increased LAG-3 expression in CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK cells under unstimulated conditions ($p=0.028$). Similarly, TIGIT receptor expression was significantly increased under both TGF- β stimulation and stimulation cocktail conditions ($p=0.013$ and $p=0.040$, respectively). In CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK cells, TIGIT expression was also significantly elevated in CDR>1 Alzheimer's patients compared to controls following TGF- β stimulation ($p=0.043$). Notably, IFN- γ levels in this NK subset were significantly higher in Alzheimer's patients than in healthy controls under stimulation cocktail conditions ($p=0.022$). Additionally, TLR9 expression in CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK cells was significantly higher in the CDR>1 group than in the CDR<1 group under unstimulated conditions ($p=0.013$).

CD107a expression in CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK cells was significantly increased following TGF- β stimulation in both the overall Alzheimer's group and in mild-stage (CDR<1) patients compared to healthy controls ($p=0.021$ and $p=0.032$, respectively).

In conclusion, increased TIM-3 and CD107a expression, along with correlated increases in pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α in stimulated NK cells from APOE- ϵ 4-carrying CDR<1 Alzheimer's patients, may serve as potential biomarkers for disease progression. These findings suggest that NK cell functions are more pronounced in early-stage (CDR<1) Alzheimer's patients carrying the APOE- ϵ 4 allele, indicating that neuroinflammation may be more severe in this group compared to those in later stages.



Şekil 1: Özet grafik

BELİRTEÇ	APOE	CDR skoru, Külür koşulu, ekspresyon düzeyi	Alzheimer hasta grubu, Külür koşulu, ekspresyon düzeyi
NK	APOE-ε3	CDR>1, SC ↓	Alzheimer, SC ↓
NK	APOE-ε4	CDR<1, SC ↑	-
LAG-3	APOE-ε3	CDR>1, SC ↑	-
TİGİT	APOE-ε3	-	Alzheimer, TGF-β ↑ Alzheimer, SC ↑
LAG-3	-	CDR>1, TGF-β ↑ CDR>1, SC ↑	-
CD107a	-	CDR<1, TGF-β ↑	Alzheimer, TGF-β ↑
TLR9	-	-	Alzheimer, US ↑
IFN-γ	-	-	Alzheimer, US ↑

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı, hafıza ve bilişsel işlevlerdeki derin bozukluklarla ilişkili, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Yaygın olarak demansın bir nedeni olan Alzheimer hastalığı, özellikle yaşlı bireylerde görülmektedir. Hipokampusta ve korteksin diğer bölgelerinde bulunan nöronların içinde tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ile oluşan nörofibriler yumaklar ve nöronların hücre dışı kısımlarında amiloid beta (A β) peptidinin birikiminden kaynaklanan plak oluşumu olmak üzere Alzheimer hastalığının iki önemli nöropatolojik özelliği bulunmaktadır [1].

Çalışmalar, Alzheimer hastalığında artmış enflamatuvar belirteçlere işaret etmekte olup [2], hastalığın erken evresinde, gelişiminde ve ilerlemesinde nöroenflamasyonun kritik rol oynadığı bilinmektedir [3]. Alzheimer hastalığı nöroenflamasyon sürecine mikrogliya ve astrositlere ek olarak granülositler, monositler, T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreler (NK) gibi immün sistemin hücresel bileşenlerinin de katıldığı gösterilmiştir [4, 5]. Ayrıca, yaşlı bireylerin beyinlerinin dentat gyrusunda nötrofiller, monositler, T ve B lenfositlerinden daha çok miktarda NK hücre popülasyonu gözlemlenmiştir [6].

Alzheimer hastalığında NK hücrelerinin rolü konusunda ilk işaret, Alzheimer hastalığı gibi nörolojik anormalliklere karşı güçlü bir ilaç olan Tacrine'in, Alzheimer hastalarındaki NK hücre proliferasyonu ve sitotoksik fonksiyonları üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğunun gösterilmesidir. Bu bulguya dayanarak NK hücrelerinin Alzheimer hastalarında zararlı fonksiyonları olabileceği öne sürülmüştür [7]. Transgenik Alzheimer fare modelinde NK hücre deplesyonunun nöroenflamasyonu hafiflettiği, nörogenezi uyardığı ve bilişsel işlevi geliştirdiği yönündedir [8].

Alzheimer hastalarının beyin hipokampus ve korteksindeki senil plaklarda interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6 ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi sitokinlerin üretiminin arttığı rapor edilmiştir. NK hücreleri sitotoksik aktiviteye sahip granüler lenfositlerdir ve interferon gamma (IFN- γ), IL-3, IL-5, IL-10, IL-12 ve IL-13 gibi sitokinler üreterek insanlarda immün yanıtlarda rol oynar [9]. Alzheimer hastalarında IL-12 ve K562 hücreleri ile uyarılmış NK hücrelerinde TNF- α ve IFN- γ üretiminin arttığı ve sağlıklı yaşlı donörlere kıyasla daha yüksek sitotoksikiteye sahip olduğu gösterilmiştir [10]. Ayrıca, IFN- γ nın nöronal kök hücrelerin proliferasyonunu azalttığı [11], TNF- α nın ise farmakolojik olarak inhibe edilmesinin Alzheimer hastalığının önlenmesine katkı sağladığı ve demans riski taşıyan kişilerde bilişsel işlevlerin iyileşmesini desteklediği belirtilmiştir [12].

Alzheimer hastalığının gelişmesinde çevresel ve genetik etmenler gibi birden çok faktörün rol oynadığı bilinmektedir. Genetik risk faktörleri arasında hastalıkla ilişkili en yaygın gen olarak Apolipoprotein E (APOE) geninin $\epsilon 4$ alleli saptanmıştır [13].

Apolipoprotein E, izoforma bağlı bir şekilde enflamatuvar ve immün yanıtları yönlendirebilmektedir. Benzer şekilde, enflamatuvar sitokinler, çeşitli dokularda APOE üretimini düzenleyebilmekte veya azaltabilmektedir [14]. Sağlıklı kontroller ve hafif bilişsel bozukluğu olan hastalara kıyasla orta evre deneklerinde saptanan düşük TLR9 seviyeleri, Alzheimer hastalığının ilerlemesinde önemli mekanizmalardan biri olabileceğini düşündürmektedir [15]. APOE- $\epsilon 4$ aleli taşıyan bireylerin beyinde latent herpes simpleks virüsü tip 1 (HSV-1) varlığının yanı sıra bu hastalarda bağışıklık sisteminin aralıklı olarak baskılanması, enfeksiyon ve periferik enflamasyon gibi olaylara neden olmakta böylece oluşan hasarın birikerek hastalığın ilerlemesine yol açtığı ileri sürülmektedir [16].

Alzheimer hastalarında NK hücrelerinin immünosupresif ilaçlara dirençli olduğu ve stimülasyona karşı güçlü sitotoksiste ve yüksek enflamatuvar sitokinler salgıladığı gözlenmiştir [17]. Ayrıca klinik çalışmalar intranazal insülin, pioglitazon, metformin ve liraglutid gibi anti-diyabetik ilaçların sadece APOE- $\epsilon 4$ alelini taşımayan hastalarda tedavide faydalı olabileceği yönündedir [18]. Yaşla beraber Alzheimer hastalarında NK hücrelerinin [10] ve APOE alellerinin toplam popülasyonu, gen ekspresyonu ve fonksiyonlarında değişimler ortaya çıkmaktadır [19].

Apolipoprotein E proteininin etkileri ile Alzheimer hastalığında merkezi rol oynayan immün mekanizmalar arasındaki ilişki bilinmemektedir. Son yıllarda Alzheimer hastalığında, APOE genin rolüne olan ilgi artmış olmakla birlikte, APOE proteinin ve insan NK hücrelerinin inhibitör profili ve fonksiyonları arasındaki ilişkiye dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Alzheimer hastalığı patofizyolojisinde önemli rol oynadığı bilinen APOE alelleri ile NK hücre fonksiyonları arasındaki ilişkinin araştırılmasıyla, Alzheimer hastalığı patofizyolojisinde bilinmeyen noktaların aydınlatılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, farklı APOE alelleri taşıyan hafif ve orta-ileri derecede bilişsel bozukluğu olan Alzheimer hastalarının NK hücrelerinde NKG2D, TLR9, TIGIT, LAG-3 ve TIM-3 yüzey molekülleri ile hücre içi IFN- γ ve TNF- α sitokinlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Ek olarak hafif (CDR<1) ve orta-ileri derecede bilişsel bozukluğu olan (CDR>1) Alzheimer hasta gruplarında CD3⁺CD16⁺56⁺ NK hücrelerinde CD107a ekspresyonu sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

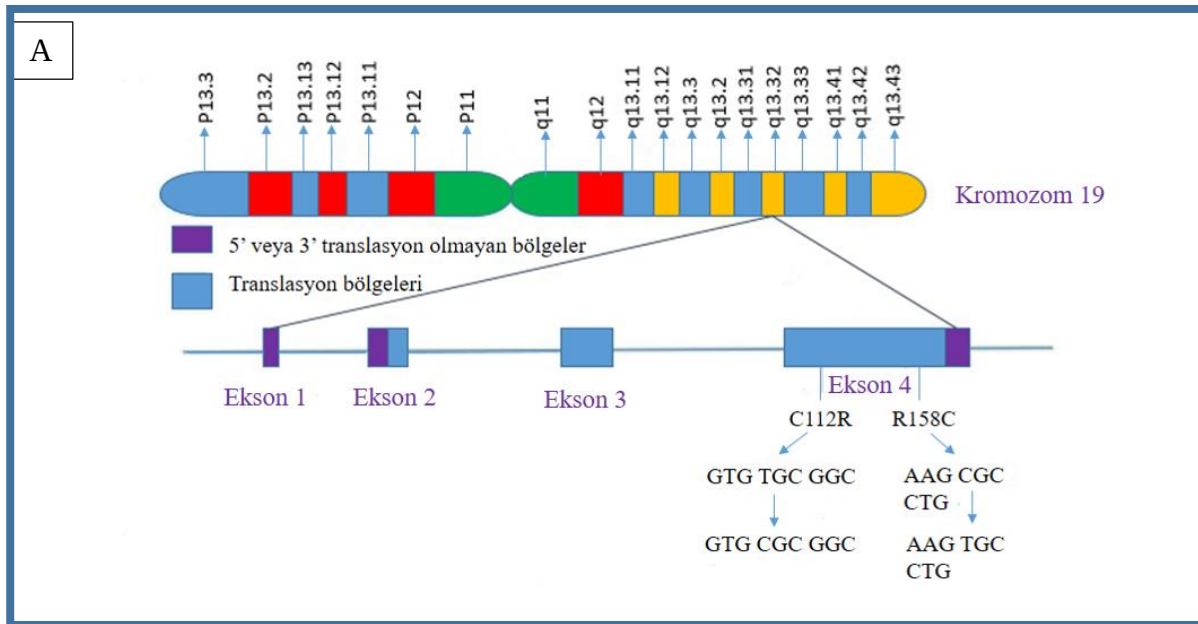
Çalışmamızın amacı, belirli APOE alelleri varlığında NK hücrelerinin aktive edici ve baskılayıcı reseptörlerindeki değişimleri karşılaştırarak, bu değişimlerin NK hücre fonksiyonları ve hastalık prognozu ile olası ilişkisini değerlendirmektir. Bu doğrultuda APOE-ε3 allel taşıyan Alzhemir hastaları ile CDR>1 hasta grubunun kontrol grup ile karşılaştırdığında, CD3⁺ NK hücrelerinin ferkansı düşük bulunmuştur. Bunun karşı APOE-ε4 allel taşıyan CDR<1 Alzhemir hasta grubunda, kontrol grup ile kıyaslandığında CD3⁺ NK hücrelerinin ferkansında artış gözlenmiştir. Ek olarak, CD3⁺CD16⁺56⁺ NK hücre CD107a ekspresyonu, hafif evre Alzheimer hastalarında, orta-ileri evre Alzheimer hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek saptanmıştır. Diğer yandan, APOE-ε3 allel taşıyan Alzhemir hastalarında, uyarım sonrası CD3⁺ NK hücrelerinde LAG-3 ve TIGIT reseptör ekspresyonlarında artış gözlenirken, APOE-ε4 alleline sahip hastalarda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Çalışmamızın korelasyon analizine göre, APOE-ε3 aleli taşıyan Alzheimer hastalarında, LAG-3 ekspresyon düzeyi ile pozitif korelasyon içinde olan TLR9, NKG2D ve IFN-γ seviyeleri, APOE-ε4 aleli taşıyan hasta grubunda saptanmamıştır. Buna karşılık, APOE-ε4 alelini taşıyan Alzheimer hastalarında, IFN-γ ve TNF-α sitokinleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiş, bu bulgu APOE-ε3 alelini taşıyan hastalarda izlenmemiştir. Ayrıca, APOE-ε4 taşıyan hafif düzey Alzheimer hastalarında, CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde TIM-3 resptör ekspresyonunun oldukça düşük olması dikkat çekicidir.

Sonuç olarak, APOE-ε3 aleline kıyasla APOE-ε4 taşıyan CDR<1 Alzheimer hastalarında, uyarım sonrası NK hücre TIM-3 reseptörünün düşük ekspresyon seviyesi, CD107a ekspresyonun yüksekliği ve IFN-γ ile TNF-α gibi proenflamatuvar sitokinlerin korele artışı, Alzheimer hastalığının ilerleyişinde potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilebilir ve NK hücrelerine yönelik tedavi yaklaşımları için yeni olanaklar sunabilir. Bu bulgular doğrultusunda, APOE-ε4 allellini taşıyan CDR<1 Alzhemir hasta grubunda NK hücre fonksiyonlarının artmış olduğu ve bu bireylerin orta-ileri evre Alzheimer hastalarına kıyasla daha şiddetli nöroenflamasyon geçirebileceği düşünülmektedir.

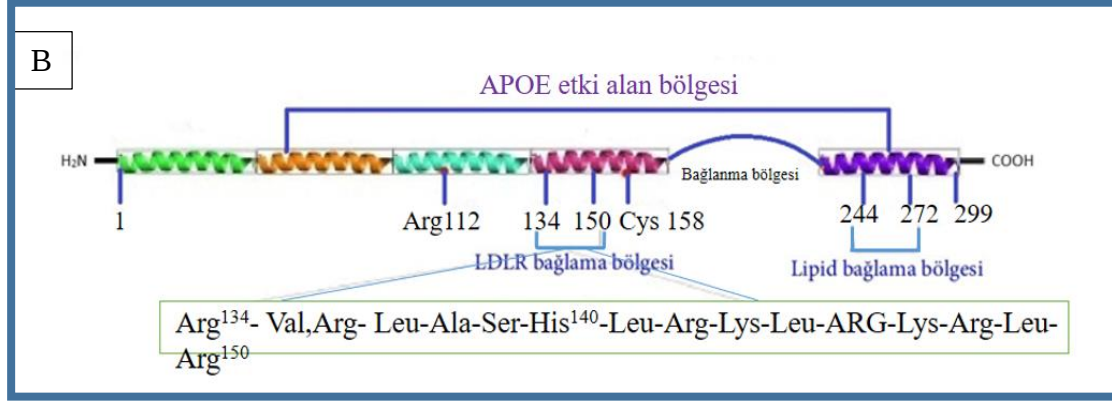
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Apolipoprotein E Protein Yapısı ve Gen Betimlenmesi

İnsan APOE geni, 19. kromozomda q13.32 konumunda bulunmaktadır (Şekil 1A) ve beyindeki birincil işlevi kolesterol taşıyıcısı 299 amino asitli bir proteini (~36 kDa) kodlamaktadır. APOE üç ana bölgeden oluşmaktadır; reseptör bağlama bölgesi ve dört sarmalı içeren bir N-terminal bölgesi, lipid bağlama bölgesi ve üç sarmalı içeren bir C-terminal bölgesi, N ve C terminallerini birleştiren bir ara esnek menteşe bölgesi (Şekil 2A) [20]. APOE izoformları, 112 ve 158 pozisyonlarındaki benzersiz bir amino asit kombinasyonu ile farklılık göstermektedir; APOE-ε2 (Cys112, Cys158), APOE-ε3 (Cys112, Arg158) ve APOE-ε4 (Arg112, Arg158) [21]. APOE proteini içindeki bir veya iki amino asidin gene bağlı değişimi yapısını değiştirmektedir. Örneğin, APOE-ε2'deki Cys-158, Arg158 ve Asp154 arasında kovalent olmayan bir etkileşimi kaldırarak pozitif potansiyeli azaltmakta böylece reseptör bağlama bölgesini değiştirmektedir (Şekil 2B) [22]. APOE-ε4'ün yapısındaki Arg-112 aracılığıyla lipid bağlama bölgesini değiştirmekte ve lipid bağlama tercihinin yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)'den çok düşük yoğunluklu lipoproteine (VLDL) kaydırmaktadır [23]. Altmış bir ile 112 amino asitin arasındaki mevcut etkileşim, lipoprotein bağlanmasını etkilemekte, APOE-ε2 ve APOE-ε3'ün HDL'ye bağlanırken APOE-ε4'ün VLDL'ye afinitesinin yüksek olmasının ana nedenini oluşturmaktadır [24].



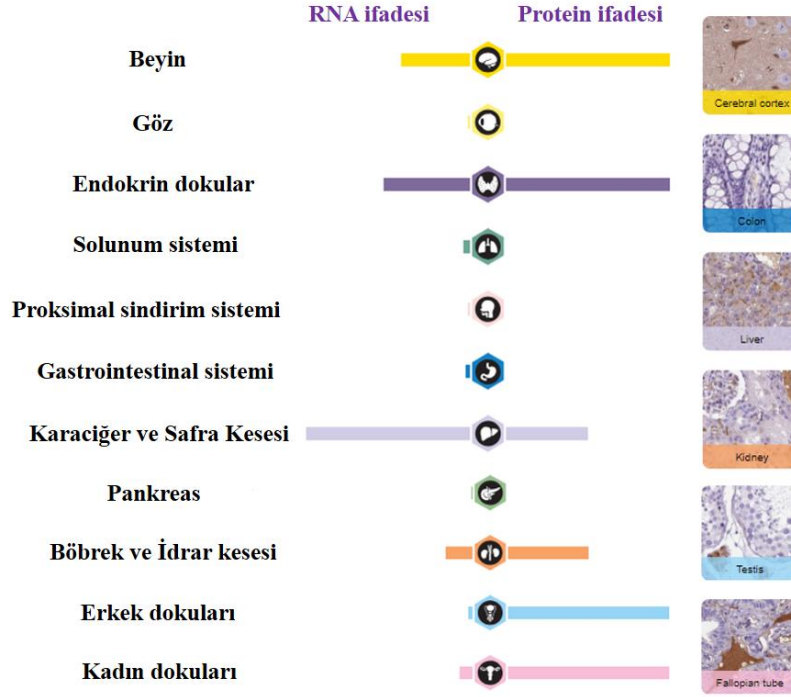
Şekil 2A. APOE proteininin yapısal ve fonksiyonel bölgeleri. q13.32 konumundaki 19. kromozomda APOE geninin konumu ve yapısı. APOE geni, proteinin %80'inden fazlasını kodlayan ekson 4 ile sırasıyla 44, 66, 193 ve 860 nükleotitten oluşan 4 eksona sahiptir. Ekson 1, translasyon olmayan bölgeyi (5'UTR) içerir. Ekson 4'teki nokta mutasyonları iki tek nükleotid polimorfizmi (SNP) üretmekte: a T C noktası mutasyonu APOE-ε4 (C112R) üretirken C T mutasyonu APOE-ε2 (R158C) oluşturmaktadır.



Şekil 2B. İnsan APOE yapısal alanları. N-terminal bölgesi, reseptör bağlama bölgesini (134-150 artıkları) ve dört sarmal (1-4) içermektedir, C-terminal bölgesi lipid bağlama bölgesini (artık 244-272) barındırmakta ve iki alan, bir menteşe bölgesi ile birbirine bağlanmaktadır. N-terminal bölgesinde üç APOE izoformunu ayırt eden iki polimorfik pozisyonu (112 ve 158) bulunmaktadır. Şeklin alt kısmı, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörünü tanıyan a-sarmal segmenti (134-150 kalıntıları) göstermektedir. Bu segment, pozitif yüklü arginin ve lizin kalıntıları bakımından zengindir [25].

2.2. Apolipoprotein E Betimleyen Dokular

İnsan APOE geni, çeşitli organlarda ve farklı hücre tiplerinde ifade edilmektedir. Dolaşımdaki APOE'nin yüzde doksanı karaciğerde üretilmektedir [21]. İnsan protein atlası projesi verilerine göre APOE geninin en çok protein kodlama transkriptleri karaciğerde iken protein betimlemesinin çoğu sırasıyla beyin, endokrin dokusu ve deri mukozasında gerçekleşmektedir. Dokuya özgü APOE'nin en çok betimlendiği hücreler arasında sırasıyla proksimal tübüler hücreler, hepatositler, peritübüler hücreler, duktal hücreler, kolon enteroendokrin hücreleri, dış kök kılıf hücreleri, leydig hücreleri, E-enterik glia hücreleri, yağ bezi hücreleri, adipositler (meme), mitotik hücreler (tiroid ve deri), podositler gibi hücreler bulunmaktadır. Beyin dokusunda APOE'nin en çok betimlendiği bölgeler bazal ganglion, hippocampus, serebral korteks ve serebellum bölgelerini oluşturmaktadır. Beyin de APOE'nin en çok sekrete edildiği hücreler ise sırasıyla astrositler, mikrogliya, oligodendrosit öncü hücreleri (perisitler), koroid pleksus ve nöronlar tarafından gerçekleşmektedir [26, 27] (Şekil 2). Koroid pleksus tarafından üretilen APOE lipoproteinleri doğrudan beyin omurilik sıvısına (BOS) salgılanmaktadır [28]. Ayrıca glial hücrelerden sentezlenen ApoE, lipidlerle birleşerek BOS'ta lipid taşıma partiküllerini oluşturmaktadır [29]. ApoE'nin ekspresyon seviyesi genotipine göre değişmektedir. Örneğin, APOE-ε2 taşıyan bireyler BOS'ta daha yüksek APOE protein konsantrasyonuna sahipken, APOE-ε4 taşıyıcıları daha düşük seviyeleri taşımaktadırlar [30].



Şekil 3. Apolipoprotein E, RNA betimlemesi. İki farklı kaynaktan elde edilen normalize edilmiş ifade (milyon başına normalize edilmiş transcript - nTPM) değerlerine dayalı konsensüs verilerini göstermektedir. Bu veriler, insan protein atlası (HPA) ve genotip-doku ifadesi (GTEx) projesi tarafından sağlanan RNA-sekans analizlerinden elde edilmiştir. Protein ifadesi birden fazla antikor kullanılarak değerlendirilen genler için toplu bir puan ayarlanarak tahmini gerçek protein ifadesini yansıtacak şekilde düzenlenmiştir [26].

2.3. Apolipoprotein E İzoformlarının Metabolizmadaki Roller

2.3.1. Apolipoprotein E izoformlarının lipidasyonu

Kolesterol taşınması, bağışıklık modülasyonu, sinaps rejenerasyonu ve amyloid beta ($A\beta$)'nin temizlenmesi/degradasyonu gerçekleştirmek için APOE'nin salgılanması ve uygun şekilde lipide edilmesi gerekmektedir [31]. APOE lipidasyonu, kolesterol akış düzenleyici proteini olarak da bilinen Adenozin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset A1 (ABCA1) tarafından kolaylaştırılmaktadır. ABCA1, beynin astrositleri, nöronları, kan-beyinbariyeri (KBB) ve koroid pleksus dâhil olmak üzere çok çeşitli vücut hücrelerinde bulunmaktadır [32]. APOE izoformları, lipid bağlama ve lipoprotein tercihlerinde farklılık göstermektedir.

Apolipoprotein E'nin C-terminal alanı (273–299), lipoprotein bağlanması için önemli parçayı oluşturmaktadır. Bu nedenle APOE izoformu lipidasyon özgülüğünü ve etkinliğini belirlemektedir [31]. APOE- ϵ 3 ve APOE- ϵ 2 tercihen fosfolipid bakımından zengin HDL'ye bağlanırken APOE- ϵ 4, trigliseritten zengin VLDL'ye güçlü bir şekilde bağlanmaktadır [33]. APOE- ϵ 4'ün HDL için zayıf bağlanma afinitesi, daha büyük oranda lipitlenmemiş APOE ile

sonuçlandığı ve agregatlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. APOE-ε4 kümeleri, nöronlar için APOE-ε2 ve APOE-ε3 kümelerinden daha toksik olduğu bulunmuştur [34].

Serbest kolesterol, fosfolipidler ve trigliseritler, beyin partikülleri içeren APOE'de bulunan ana lipidleri oluşturmaktadır [35]. APOE-ε4 içeren partiküller, APOE-ε3 içeren partiküllerden daha az kolesterol içermektedir [36]. APOE genotipleri ayrıca periferdeki lipidasyon durumlarını da değiştirmektedir. Homozigot ve heterozigot (+3/+4) genotiplerde, APOE-ε4, sıklıkla plazmada artan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve kolesterol seviyeleri ile ilişkilendirilirken, homozigot ve heterozigot (+2/+3) genotiplerinde, APOE-ε2 hafif veya düşük seviyelerle bağlantılı olduğu bulunmuştur [37]. APOE-ε2 genotipi, APOE-ε3 ve APOE-ε4'e kıyasla daha yüksek trigliserit seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir [36].

2.3.2. Merkezi sinir sisteminde lipid taşınması

Apolipoprotein E, kolesterol ve diğer lipidlerin nöronlara ve glial hücrelere taşınmasına aracılık etmektedir. Kolesterol, KBB'i ve Koroid Pleksus 'kan beyin omurilik sıvı bariyeri (BCSFB)'ni geçemez, ancak özellikle nöronlarda bulunan 24-hidroksilaz kolesterol enzimi tarafından 24S-hidroksikolesterol'e dönüştürülür ve 24S-hidroksikolesterol APOE'ye bağlanarak KBB'yi kolayca geçebilmektedir [38]. İnsanlarda üç baskın APOE aleli vardır; APOE-ε2 (E2), APOE-ε3 (E3) ve APOE-ε4 (E4) alelleri [39]. Kültürlenmiş nöronlarda APOE-ε4, beyin kolesterolünü taşımak için APOE-ε2 ve APOE-ε3'ten daha az etkili olduğu gösterilmiştir [40]. Kolesterol ve fosfolipidlerin taşınması apoE izoformlarına (E2 > E3 > E4) dayandığından [41], APOE-ε4 tarafından kolesterol ve fosfolipidlerin daha düşük akışı, APOE-ε4 taşıyıcılarında geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı (Late onset Alzheimer's disease - LOAD) gelişme riskini artırmaktadır. İnsanda uyarılmış pluripotent kök hücre (iPSC)'lerinden türetilen astrositlerle ilgili çalışmada, APOE-ε4 ifade eden astrositlerin APOE-ε3 astrositlerine göre daha yüksek kolesterol birikimine sahip olduğu gösterilmiştir [42], bu da APOE-ε4 taşıyıcılarında astrositlerin kolesterol taşınmasının eksik olabileceğini desteklemektedir. iPSC'den türetilmiş astrositlerle yapılan bir çalışmada, APOE-ε4'ün APOE-ε3'ten daha az lipitlenmiş olduğunu ve potansiyel olarak APOE-ε4'ün nörotrofik rolünü etkilediğini gösterilmiştir [36].

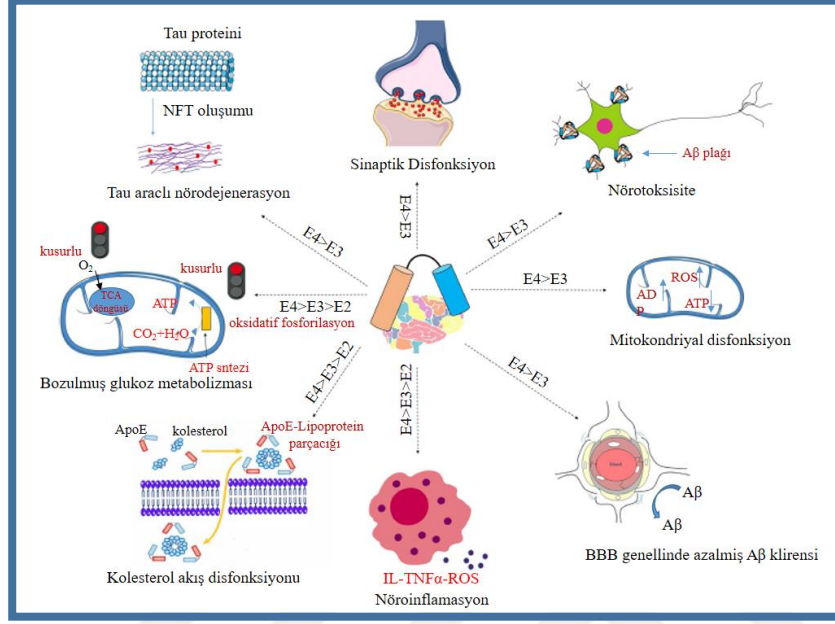
Demansı olmayan orta yaşlı yetişkinlerin (ortalama yaş 54,5) BOS örneklerinde, APOE partikül boyutları hem ε3/ε4 hem de ε4/ε4 bireylerinde ε3/ε3 bireylerine göre daha küçük, ancak ε2/ε3 izoformu taşıyan bireylere göre daha büyük olduğu saptanmıştır [43]. Homozigot APOE-ε4 olan bireylerin kolesterol akış kabiliyeti BOS sıvısında azalmaktadır. Alzheimer hastalığı olan

bireylerde homozigot APOE-ε4 varlığı bu proteinin daha büyük parçacık boyutlara bağlanmasını veya endositozu kısmen engellemekte, böylece nöronları onarım için yeterli kolesterolden mahrum bırakmaktadır [44]. Beyin BOS sıvısında APOE miktarı APOE'nin lipid taşıma kapasitesini de etkilemektedir [45]. Farelerde, beyin parankimi [46] ve BOS'ta [47] bulunan APOE miktarı, izoforma bağımlı bir gradyan oluşturmaktadır ($E2 > E3 > E4$). Bununla birlikte insanlarda; genç kontrol deneklerinde (ortalama 34,5 yıl) [48], bilişsel olarak sağlıklı kişilerde (ortalama 61 yıl) ve Alzhemier hastalarında (ortalama 78 yıl) [49] BOS APOE seviyelerinde izoforma bağılı varyasyonlar saptanmamıştır. Son olarak, BOS APOE seviyelerinin, Aβ seviyeleri ile korele olduğu ancak plazma APOE seviyeleri ile olmadığı saptanmıştır. Ayrıca bir çalışmada Aβ pozitif olan bilişsel olarak sağlıklı bireyler ile MCI olan bireylerin BOS APOE seviyeleri bir kohort düzeyde incelenmiş ve APOE-ε4 taşıyıcıları olmayanlara göre anlamlı derecede düşük APOE yüzdesine sahip olduğu saptanmıştır [48]. Bu, daha karmaşık bir mekanizmayı çözmek için kapsamlı lipit homeostazi çalışmalarının gerekli olduğunu göstermektedir.

2.3.3. Apolipoprotein E izoformlarının Alzhemier hastalığı fizyopatolojisindeki rolleri

Apolipoprotein E genotipleri, sinaptik bütünlük, lipid transportu, glikoz metabolizması, Aβ klirensi, KBB bütünlüğü veya mitokondri regülasyonu gibi birçok hücrel fonksiyonu etkilemektedir (Şekil 3). Alzheimer hastalarında APOE alellerinin varlığı farklı düzeylerde hastalık riskine yol açmaktadır. APOE-ε4, gen dozuna bağılı olarak Alzhemier hastaları için önemli bir genetik risk faktörüdür ve homozigotlarda riski 15 kata kadar artırır [39], oysa APOE-ε2 AH riskini neredeyse yarı yarıya azaltır ve uzun ömre katkıda bulunduğu rapor edilmiştir [50]. APOE-ε4, proenflamatuvar yanıtların artmasına ayrıca KBB'nin işlev bozukluğuna yol açarak bilişsel eksikliklere neden olduğu düşünülmektedir [51]. APOE izoformları, Alzhemier hastalığının birincil nöropatolojik belirteçleri; Aβ plakları, tau protein agregasyonları ve nöroenflamasyonu etkilemektedir. İnsan ve transgenik fare çalışmaları, APOE-ε4 taşıyıcılarında beyin Aβ seviyelerinin ve amiloid plak yüklerinin diğer genotiplere göre daha yüksek olduğunu, en düşük seviyelerin ise APOE-ε2 taşıyıcılarında olduğunu göstermiştir [52]. APOE-ε4 taşıyıcılarındaki Aβ plakları artışı, APOE-ε4'ün Aβ'yi bağlayabilme yeteneğinden ve Aβ'yi beyinden tamamen çıkaramamasından kaynaklanabilmektedir [53]. APOE-ε4 ilave olarak interstisyel sıvı drenajı, mikrogial fagositoz tarafından alımı gibi farklı mekanizmalar Aβ uzaklaştırılmasında rol oynamaktadır [54]. Tau proteini hiperfosforilasyonunun yanı sıra tau yumaklarının oluşumu APOE genotipine göre farklılık gösterir. APOE-ε4'ün nöronlarda aşırı ekspresyonu tau

fosforilasyonunu anormal şekilde artırırken APOE-ε3 aşırı ekspresyonunun hiçbir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir [55].



Şekil 4: Alzheimer hastalığı patolojisinde APOE'nin Aβ'den bağımsız mekanizmaları. APOE'nin izoforma bağımlı etkileri gösterilmiştir. Kısaltmalar: APOE, apolipoprotein E; NFT, nörofibriler yumak; KBB, kan beyin bariyeri; IL, interlökin; TNF-α, Tümör nekroz faktörü-α; ROS, reaktif oksijen türleri [25].

APOE-ε4, lipid bağlanmasına daha büyük afinite göstermesi nedeniyle daha düşük geri dönüşüm kapasitesine sahiptir. Bu özellik, kolesterol akışını azaltarak hücre zarında kolesterol birikimine yol açmaktadır [19]. APOE geri dönüşümü, ABCA1 [56], insülin reseptörü (IR) veya düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüne bağlı protein 1 (LRP1) [19] gibi çeşitli hücre yüzeyi proteinlerinin betimlenmesini kontrol etmektedir. Azaltılmış APOE-ε4 geri dönüşümü, ABCA1'in hücre yüzeyinden uzaklaşarak endozomlarda birikmesine neden olur. Bu durum, ABCA1 aktivitesinin azalmasına yol açar ve kolesterolün HDL'ye transferini engelleyerek hücre zarında kolesterol birikimine katkıda bulunur [56].

Beyindeki düşük APOE-ε4 geri dönüşümü, insülin reseptörünün endozomlarda birikmesine ve hücre yüzeyinden uzaklaşmasına neden olur [57]. Bu durum, hücrenin enerji kaynaklarını kullanma tercihlerini değiştirmektedir. Sonuç olarak, ATP üretimi için glikoz kullanımını azaltarak yağ asitlerinin oksidasyonunu teşvik etmektedir [58]. Raporlara göre 20 ile 100 yaş arasında beyinde fosfolipid seviyesinin %42 oranında azaldığı ve Alzheimer hastası olan beyinlerde bu oranın %62 olabileceği gösterilmiştir [59]. Ayrıca beyin zarında yüksek oranda konsantre olan çoklu doymamış bir yağ asidi olan dokosaheksaenoik asidin beta oksidasyonu,

APOE- ϵ 4 taşıyıcılarında taşıyıcı olmayanlara göre daha yüksek saptanmıştır [60]. Beyin, yüksek enerji talebini karşılamak için büyük ölçüde glikoza ihtiyaç duyduğundan, yaşlanma sırasında KBB yoluyla glikoz alımının azalması, Alzheimer hastalığının gelişimi için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır [61]. Bu özellikle APOE- ϵ 4 taşıyıcıları için geçerlidir, çünkü APOE- ϵ 4 betimleyen insan astrositlerinin APOE- ϵ 3'lere kıyasla glikoz alım kapasitesinin yarısına sahip olmasına karşın APOE- ϵ 2 eksprese eden astrositlerin en yüksek glikoz alımına sahip olduğu rapor edilmiştir [62]. Ayrıca, birincil astrositlerden salgılanan APOE- ϵ 4 proteinlerine lipidlerin alımı, APOE- ϵ 3'e kıyasla daha zayıf şekilde gerçekleşmektedir [19].

Nöronal plazma membranında artan kolesterol birikimi, 'amiloid-beta öncü proteini' (APP) ve 'beta bölgesi APP parçalayan enzim 1' (BACE1) işlemini artırarak daha fazla A β üretimine yol açmaktadır [63]. Diğer yandan, astrositlerde ve mikrogliyalarda kolesterolün dışa akışının azalması, A β bozunmasını engellemektedir. Bu durum, A β 'nin plaklar oluşturmak üzere daha hızlı bir şekilde kümelenmesine yol açabilmektedir. LRP1, hücre içi sinyalleşmede, endositozda ve lipid ve lipoprotein metabolizması dahil olmak üzere birçok hücrel ve biyolojik süreçte rol oynadığını gösterilmiştir [64]. APOE ile LRP1 komplekslerinin oluşumu ve LRP1'in plazma zarından geri dönüşümünün azalması, astrositlerin A β peptitlerini parçalama yeteneğini zayıflatmaktadır [65]. İnsanlarda, APOE- ϵ 4 proteinlerinin düşük lipidasyonuna rağmen genellikle ileri yaşlara kadar "normal" beyin fonksiyonlarının korunabildiği gözlemlenmiştir. Bu durum, APOE- ϵ 4 taşıyıcılarında nöronları ve astrositleri beslemek için APOE- ϵ 4 lipid taşıma yeteneklerinin yaşamın ileri evrelerinde azalabileceğini düşündürmektedir. Genç bir beyin, APOE- ϵ 4 protein yapısına bağlı yetersiz lipid taşınmasını telafi edebilecek alternatif mekanizmalara sahip olabilir [19]. Ancak yaşlanma ile birlikte, bu alternatif mekanizmaların kaybı ve kolesterol üretiminin azalması [66], nöronlarda lipid eksikliklerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır [61].

2.3.4. Apolipoprotein E ve amiloid- β patolojisi

1993 yılında, APOE- ϵ 4 ve LOAD arasındaki bağlantı ilk olarak Corder ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve daha sonra APOE- ϵ 4, LOAD ve A β patolojisi ile ilgili çalışmaların sayısı hızlı bir şekilde artmıştır [67]. İnsan mutant APP'sini aşırı ifade eden ancak Presenilin-1 (PSEN-1) ifade etmeyen Alzheimer transgenik fare modelinde, APOE eksikliği beyindeki A β birikimini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu durum, hem A β 1-40 hem de A β 1-42 birikimlerini düşürerek, insan APOE'sinin amiloid birikimindeki kritik rolünü ortaya koymaktadır [68]. Bununla birlikte, APP ve PSEN1 mutasyonlarını bir arada içeren Alzheimer fare modellerinde,

örneğin APP/PS1 farelerinde, APOE delesyonunun plak boyutunda genel bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir [75]. Amiloid patolojisini incelemek için kullanılan fare modellerinde APOE delesyonunun etkileri henüz tam olarak anlaşılmamıştır ve bu nedenle daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Başka bir çalışma ise APOE-ε4'ün plak büyümesinde değil, ağırlıklı olarak plak kümelenmedeki rolünü desteklemektedir [69]. Amiloid plakların başlangıcından önce Aβ peptidleri, Alzheimer hastalığı oluşturmaya yatkın olan nöron hücrelerinin içinde birirmektedir [70]. APOE-ε4 izoformu bulunan farelerde Aβ1-42'nin geç endozomal ve lizozomal bölmelerde intranöronal birikimi artmaktadır [71]. Lipitlenmiş APOE'nin APOER2 reseptörlerine bağlanması, APP ve BACE1 içselleştirmesini tetikleyerek hücre içi Aβ oluşumunun artmasına yol açmaktadır [72]. APOE-ε4, APOE-ε3 ve APOE-ε2'ye kıyasla daha güçlü bir APP ve BACE1 endositozunu indükleyerek, Aβ üretiminde belirgin bir artışa yol açmaktadır. Ayrıca, APOE izoformlarına bağlı olarak APP transkripsiyonu ve Aβ sekresyonu üzerinde farklı etkiler bildirilmiştir. APOE-ε4, APP transkripsiyonunda en güçlü artışı indüklerken, bunu sırasıyla APOE-ε3 ve APOE-ε2 izlemektedir [80].

Artan Aβ üretimi ve agregasyonunun yanı sıra, amiloid patolojisi de bozulmuş Aβ klirensinden etkilenmektedir. Aβ beyinden, enzimatik degradasyon, KBB yoluyla klirens ve hücrel içselleştirme ve ardından astrositler, mikroglia ve nöronlar tarafından lizozomal degradasyon dahil olmak üzere çeşitli klirens yollarıyla temizlenebilmektedir [73]. Genel olarak APOE-ε4, daha düşük Aβ klirensi ile ilişkili bulunmuştur [74]. Bununla birlikte, Aβ klirensinin kesin mekanizmaları ve APOE'nin bu süreçteki rolü oldukça karmaşık ve tam olarak anlaşılmamıştır. Aβ'nin beyinden temizlenme mekanizmalarından biri, neprilisin ve insülin parçalayan enzim (IDE) gibi proteazlar tarafından gerçekleştirilmesidir [75]. Çözünür Aβ'nin hem hücre içi hem de hücre dışı enzimatik klirensi, APOE tarafından desteklenmekte, özellikle yüksek düzeyde lipidlenmiş APOE, proteazlar aracılığıyla Aβ klirensini en yüksek ölçüde artırmaktadır [84]. İnsan ölüm sonrası çalışmaları, APOE-ε4 taşıyıcılarında, APOE-ε4 olmayanlara kıyasla azalmış neprilisin ve IDE ekspresyonu tespit etmiştir. Bu durum, APOE izoformları arasında proteolitik aktivite açısından potansiyel farklılıklar olduğunu göstermektedir [85].

Amyloid beta, astrositler, mikroglia ve nöronlarda lizozomal bozunma yoluyla hücre içinde parçalanabilmektedir. Tüm hücre tiplerinde APOE-ε4, azalmış Aβ hücrel klirensi ile ilişkilendirilmiştir [76]. APOE, izoform bağımlı bir şekilde mikroglia Aβ içselleştirmesini ve bozunmasını etkiler; en yavaş Aβ alımı ve en az etkili Aβ bozunması APOE-ε4 taşıyıcılarında gözlemlenmiştir [77]. Mikroglia hücre içi kolesterolün düşürülmesi, Aβ'nin lizozomlara doğru

hızlandırılmış endozomal taşınmasıyla sonuçlanmıştır. APOE aynı zamanda APOE ile A β arasında doğrudan bir etkileşim gerektirmeden hücre içi kolesterol seviyelerini azaltarak A β 'nin hücrel yıkımını desteklemektedir [78]. APOE- ϵ 4 içeren astrositler, APOE- ϵ 3 astrositlerine kıyasla bozulmuş A β 1-42 içselleştirmesini indüklemektedir [79]. APOE^{-/-} astrositler A β 'yi bozmadığı için astrositlerde A β klirensinin APOE'ye bağımlı bir mekanizma olduğu önerilmiştir [76]. Bununla birlikte, astrositlerde LDL reseptörü tarafından A β alımı ve klerensinin, APOE yokluğunda da gerçekleştiği gösterilmiştir, bu da APOE'den bağımsız bir A β alım mekanizmasına işaret etmektedir [80]. LRP1 reseptörleri gibi APOE reseptörlerinin A β alımı içi rekabet etmesi dolaylı olarak A β içselleştirmesini ve müteakip yıkımını inhibe edebilmektedir [81].

Nöronlar ayrıca hücrel içselleştirme ve lizozomal bozunma yoluyla A β 'yi bozabilmektedir. Nöronal A β klirensi ve APOE ile ilgili araştırmalar sınırlı kalsa da, APOE- ϵ 3'ün nöronal A β alımını, endozomal trafiği ve lizozomal degradasyonu APOE- ϵ 4'ten daha fazla olduğu gösterilmiştir [82]. Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, APOE'nin KBB ile ilişkili A β klirensini modüle edebildiğini göstermiştir [54]. APOE- ϵ 4, APOE- ϵ 3 ve APOE- ϵ 2'ye kıyasla KBB aracılığıyla A β 'nin uzaklaştırılmasını bozmaktadır. Ayrıca APOE- ϵ 4'ün varlığı KBB yıkımı ile ilişkilendirilmiştir [83]. KBB'nin bozulması, beyinden A β klirensini daha da düzensiz hale getirebilmektedir [84].

Özetle, APOE- ϵ 4, Alzheimer hastalığında amiloid patolojisindeki değişikliklerle yüksek oranda ilişkilendirilmiştir. Ancak, APOE'nin amiloid patolojisi ile ilgili en önemli mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Alzheimer hastalarında APOE'nin amiloid patoloji üzerindeki etkisini daha iyi anlamak için ek araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3.5. Apolipoprotein E ve Tau patolojisi

Hiperfosforile edilmiş tau protein agregatları nörofibril yumaklar (NFT) oluşturmaktadır ve bu da Alzheimer hastalığının ayırt edici özelliklerinden birisidir. NFT'ler, Alzheimer hastalığında gözlemlenen bilişsel eksikliklerle ilişkilendirilmiştir, ancak bu yapıların Alzheimer hastalığı patolojisine yol açıp açmadıkları hala tartışma konusudur [85]. İlk histopatolojik kanıtlar Alzheimer hastalığı olan bireylerin beyinlerinde APOE proteini ve NFT'ler arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir [86]. Tau patolojisinin, nöron içindeki nörofibril yumakların agregasyonu sonucu toksik bir fonksiyon kazandığı ve bunun nörodejenerasyonla yakından bağlantılı olduğu kabul edilmektedir [96]. Tau patolojisi entorhinal korteksten kaynaklanarak hipokampus, temporal ve kortikal bölgelere kadar yayılmakta, cerebellum (beyincik) en az etkilenen bölge olmaktadır.

Buna rağmen, beyin bölgelerinin tau patolojisine karşı savunma değişikliği hala bilinmemektedir [87]. APOE-ε4 taşıyıcılarında, tau patolojisi daha ciddi ve tipik bir medial ve temporal yayılımı ile güçlü bir amnestik fenotip sergilemektedir [88]. Öte yandan, APOE-ε4 taşıyıcısı olmayanlar, entorhinal korteksten'de daha düşük ve neokortekste daha yüksek seviyelerle bir tau alımı pozitron emisyon tomografisi (PET) göstermekte; bu, Aβ birikiminin aracılık ettiği varsayılan bir bulguyu göstermektedir [89]. Beyinde yayılan fosforile edilmiş tau için çok sayıda teori bulunmaktadır. Bazı çalışmalar bunun mikrogliya tarafından yönlendirilen bir süreç olduğuna işaret ederken, diğer çalışmalar tau yayılmasının nöronal iletişim yollarıyla ilgili olduğu öne sürmüştür [90]. Alzheimer hastalığında mikrogliyanın tau patolojisindeki rolü Aβ'dan bağımsız olarak incelenmiş ve APOE'nin, bu fenomen için ana düzenleyicisi olduğu raporlanmıştır [91]. APOE-ε4 genotipine bağlı olarak, çok sayıda klinik öncesi tau aracılı patogeneze modelinde, nörotoksisite nöroenflamasyonun ve nörodejenerasyonun alevlendiği saptanmıştır [88]. Bir çalışmada, APOE-ε4'ün, monoamin taşıyıcı 2'yi bağlayarak, nörotransmitterlerinin sinaptik veziküllere aktif taşınmasını inhibe ettiği böylece Locus Coeruleus dejenerasyonuna yol açarak tau nörotoksisitesini güçlendirdiğini gözlenmiştir [92]. Önceki bulgular doğrultusunda, tauopatinin P301S fare modelinde, APOE-ε4 betimleyen fareler, diğer iki izoforma kıyasla en güçlü tau kaynaklı nörodejenerasyon gösterirken, APOE nakavt farelerin bu etkiden korunduğu gösterilmiştir [93].

İnsan iPSC'lerinden türetilen nöron ve glial hücrelerde APOE-ε4 ile tau patolojisi arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır [94]. Ayrıca astrosit türevli APOE-ε4'ün seçici olarak uzaklaştırılmasının tau aracılı nörodejenerasyona karşı koruma sağladığı belgelenmiştir [95]. APOE insan izoformlarının astrositlerde adeno-associated virus aracılı aşırı ifade edilmesi üzerine yapılan çalışmalarda, APOE-ε4'ün astrositik aşırı ifadesinin hem *in vitro* ortamda hem de P301L fare modelinde tau fosforilasyonunu ve birikimini arttırdığı tespit edilmiştir [96].

Beyin görüntüleme kanıtları açısından, bilişsel performansta normal bireylerde, MCI veya Alzheimer hastalarında Aβ'dan bağımsız olarak medial temporal tau ile APOE-ε4 arasında ilişki olmadığını gösteren çelişkili sonuçlar raporlanmıştır [97]. Tau çalışmalarında, ¹⁸F-MK6240 ve ¹⁸F-flortaucipir kullanımı, medial temporal tau birikimi ile Aβ'dan bağımsız olarak APOE-ε4 arasında bir ilişki ortaya çıkarmıştır [98]. Ayrıca, PET çalışmaları, APOE-ε4 aleli ile cinsiyet arasında bir bağlantı tanımlanmıştır, aleli taşıyan kadınların, erkeklere kıyasla daha yaygın bir tau patolojisi sergilediği gözlenmiştir [99]. Alzheimer hasta ve control örneklerinden alınan BOS analiz sonuçları, APOE-ε3 ve APOE-ε4'ün toplam tau ve fosforile Tau konsantrasyonları ile pozitif ilişkili olduğunu göstermektedir [49]. Hafif bilişsel bozukluk (MCI) ve Alzheimer hasta

gruplarında benzer bulgular bildirilmiştir, ancak bu bulgular yalnızca APOE-ε4 taşıyıcılarına özgü olup, tau ve APOE düzeyleri arasındaki ilişkiyi karşılaştırmaya odaklanmıştır [100]. Başka bir çalışma, APOE-ε4 taşıyan Alzheimer hastalarının BOS örneklerinde tau düzeylerinin bozulmuş kortikal plastisite, bilişsel gerileme ve astrosit sağkalımı ile ilişkili olduğunu göstermiştir [101]. Genel olarak, BOS numunelerinde APOE ve tau seviyelerini ilişkilendirmek karmaşıktır ve APOE'yi Aβ seviyelerine bağlamak kadar belirgin değildir. Bununla birlikte bulguların çoğu çelişkili ve büyük ölçüde hastalığın evresine bağlı olmaktadır [102]. Ayrıca, tau PET görüntülemenin NFT'lerin yalnızca spesifik bölgesel dağılımı hakkında bilgi verirken, BOS tau ölçümünün tüm beyindeki küresel çözünebilir tau hakkında bilgi sağlamaktadır [97].

Apolipoprotein E-ε2'nin Aβ yükü üzerindeki koruyucu etkisi, tau patolojisi ile doğrudan ilişkilendirilmemiştir, çünkü bu taşıyıcılarda BOS tau seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Sadece bir çalışmada, düşük fosforile tau seviyeleri rapor edilmiştir [103]. Tau PET çalışmaları, APOE-ε2'nin Alzheimer hastalığının gelişimindeki koruyucu etkisinin öncelikle Aβ birikimine karşı dirençle bağlantılı olduğunu kanıtlayan benzer bulgular ortaya koymuştur [97]. Bununla birlikte, APOE-ε2 homozigotluğunun tau patolojisini güçlendirdiği ve Alzheimer vakalarının aksine yaşa bağlı birincil tauopati riskini artırdığını göstermiştir [104].

Bu verilere rağmen, *in vivo* olarak APOE ve tau arasında doğrudan bir etkileşim rapor edilmemiştir ve APOE'nin çoğu zaman ortamda bulunsan bile tau'nun intranöronal ve aksonal bölgelere lokalize olma eğiliminde olduğu bildirilmiştir, ancak kanıtlar bunun hücre dışı boşluğunda da bulunabileceğini göstermektedir [105]. APOE genotipinin tau birikimini nasıl etkilediği mekanizma bilinmemektedir, ancak APOE lipoproteinlerinin temizlenmesinde rol oynayan LDL reseptörü ve LRP1 reseptörlerinin, tau yayılmasını birbirine zıt şekillerde düzenlediği gösterilmiştir [106]. Bu durum, APOE genotiplerinin etkisi hakkında, özellikle APOE-ε4'ün tau yükünü nasıl etkilediği konusunda önemli tartışmaların devam ettiğini göstermektedir.

2.4. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler

Doğal bağışıklık sisteminin önemli bir bileşeni olan doğal lenfoid hücrelerin (ILC) bir alt kümesidir [107]. NK hücreleri kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir bu hücreler periferik kan lenfositlerinin %5-15'ini oluşturmakta ve karaciğer, peritoneal kavite, plasenta gibi periferik dokularda bulunmaktadır [108].

NK hücreleri patojenlere karşı erken konak savunmasını sağlayan hedef hücrelerin (örn. enfekte, stresli veya kanserli hücreler) uyarımı üzerine aktive olabilme ve sitotoksik fonksiyonlar sergilemenin yanında doğal ve edinsel immün yanıtları düzenleyen çeşitli sitokinler ve kemokinler [interlökin (IL) -2, IL-12, IL-15 ve IL-18 gibi, interferon gama, IFN- γ , Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör, GM-CSF ve TNF- α) salgılama kabiliyetinde hücrelerdir [109-112].

T helper (Th)1 ve Th2 hücrelerine benzer şekilde insan NK hücre alt gruplarının da NK1 ve NK2 olarak iki gruba ayrıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmalar dolaşımdaki NK hücrelerinin farklı sitokin profillerine sahip efektör NK hücre alt gruplarına dönüşebileceğini ve farklı enflamatuvar özellikler kazanabileceğini desteklemektedir. *In vitro* koşullarda IL-12 varlığında kültüre edilen NK hücreleri IFN- γ ve IL-10 üretirken (NK1), IL-4 varlığında kültüre edilen NK hücreleri ise IL-5 ve IL-13 üretmektedirler (NK2). NK1 ve NK2 hücre grupları sitotoksik aktivite bakımından benzer olmakla beraber, NK1 hücreleri hücre yüzey Fas [CD95 (farklılaşma kümesi - CD)] antijenini NK2 hücrelerinden daha yüksek oranda eksprese ederler ve antijen veya kimyasal indüklü apoptozise karşı daha duyarlıdır [113, 114].

CD56 (nöral hücre adezyon molekülü olarak da adlandırılan) doğal öldürücü hücrelerin fenotipik belirteçidir ancak aslında alfa beta T hücreleri, gama delta T hücreleri, dendritik hücreler ve monositler dahil olmak üzere çok daha fazla bağışıklık hücresi tarafından ifade edilebilmektedir. CD56 molekülünün üç ana izoformu mevcuttur (NCAM-120, NCAM-140 ve NCAM-180), hepsi tek bir genden alternatif birleştirme yoluyla üretilir ve hücre içi alan uzunlukları farklılık gösterir. Kemik iliğinde hematopoezin meydana geldiği bölgede mezenkimal stromal hücreler, diğerlerinin yanı sıra, CD56 içeren yapışma moleküllerinin ekspresyonu yoluyla hematopoietik kök hücreler için nişler sağlar ve uzun süreli hematopoezi korur. Tüm bu CD56 eksprese eden hücre tiplerinde ortak olan, T yardımcı 1 sitokin üretimi ve etkili sitotoksik kapasite dâhil olmak üzere güçlü immün sistemi uyarıcı işlevlerdir [115].

Fc γ reseptör III (Fc γ RIII) olarak da bilinen CD16 molekülü, hedef hücre yüzeyinde bulunan immünoglobulinlerin Fc bölgesini bağlayabilir, bu da NK hücresinin aktivasyonuna ve ardından degranülasyona ve perforinin salgılanmasına yol açmakta böylece antikora bağımlı hücrel sitotoksisite adı verilen bir süreçte hedef hücrenin parçalanmasıyla sonuçlanmaktadır [116, 117]. CD16 molekülü, doğal öldürücü hücrelerin, nötrofillerin, monositlerin, makrofajların ve bazı T hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir farklılaşma molekülü kümesidir [118]. CD16, sinyal iletimine katılan Fc γ RIIIA (CD16a) ve Fc γ RIIIB (CD16b) Fc reseptörleri olarak tanımlanmıştır [119]. Fc γ RIIIa mast hücrelerinde, makrofajlarda ve doğal öldürücü hücrelerde transmembran

reseptör olarak eksprese edilirken, Fc γ RIIB yalnızca nötrofillerde eksprese edilmektedir. Fc γ RIIA ve Fc γ RIIB birlikte degranülasyonu, fagositozu ve oksidatif patlamayı aktive edebilir, bu da nötrofillerin opsonize patojenleri temizlemesine olanak tanımaktadır [120]. CD16 molekülü CD56^{dim} periferik kan NK hücrelerinde eksprese edilmektedir [121]. NK hücrelerinin sitokin aktivasyonu ve hedef hücre uyarımından sonra yüzey CD16 ekspresyonunda belirgin düşüşlere yol açtığı gözlemlenmiştir. CD16'nın antikorlarla çapraz bağlanması sonucu CD56^{dim} NK hücre aktivasyonu ile sonuçlanmıştır; bu, artan IFN- γ üretimiyle korele bulunmuştur [121].

İnsan NK hücreleri, CD3 negatif hücrelerdir, CD56 (nöral hücre yapışma molekülü) ve CD16 (Fc γ Reseptör III) proteinlerinin ekspresyonuna bağlı olarak sınıflandırılırlar. NK hücreleri esas olarak CD56^{bright}CD16⁻ ve CD56^{dim}CD16⁺ NK alt gruplarına ayrılmaktadır [122, 123]. Genellikle iki farklı alt grup olarak kabul edilmelerine rağmen, CD56^{dim} NK hücreleri NK hücre olgunlaşmasının farklı aşamalarını temsil etmekte, bu da CD56^{bright} NK hücrelerinin daha az olgun olduğunu göstermektedir [124, 125]. NK hücrelerinin küçük bir kısmını oluşturan CD56^{bright}CD16⁺ NK hücreleri, CD56^{bright}CD16⁻ ve CD56^{dim}CD16⁺ hücre alt gruplarının farklılaşmasında aracılık etmektedir [126]. Ayrıca NK hücrelerinin küçük bir kısmı CD56^{dim}CD16⁻ biyolojik fonksiyonlarının yanı sıra diğer alt gruplarla gelişimsel ilişkileri henüz belirlenmemiştir [127]. Son olarak, NK hücreleri de CD56 ekspresyonundan tamamen yoksun olabilir, ancak bu hücreler esas olarak kronik viral enfeksiyonlarda tanımlanmıştır [128]. CD56^{bright} ve CD56^{dim} NK hücreleri insan vücudunda farklı şekilde dağılmıştır [129, 130]. CD56^{bright} NK hücreleri öncelikle ikincil lenfoid dokuları ve bağırsak, rahim, karaciğer ve böbrekler gibi diğer çeşitli dokuları işgal ederken, CD56^{dim} NK hücreleri periferik kan, kemik iliği, dalak ve akciğerlerde baskındır [122, 129]. Her iki alt grubun lokalizasyonundaki bu farklılık, NK hücrelerinin göç kapasitesi bağlı kemokin reseptörlerinin diferansiyel ekspresyonundan kaynaklanmaktadır [131, 132].

2.4.1. NK hücre fonksiyonları

NK hücreleri, sitotoksik aktivitelerini 2 farklı yolla iletebilirler. Perforin ve granzimler içeren sitotoksik granüller salabilirler veya hedef hücrelerin yüzeyinde sırasıyla TRAIL-R1/-R2 veya CD95/Fas'ı etkilemek için TRAIL ve/veya Fas ligandını (FasL) ifade ederek ölüm reseptörü aracılı apoptozu indükleyebilirler [133]. Granül salgılama yolunda NK hücreleri, plazma zarındaki perforin kaynaklı gözenekler yoluyla veya endositoz yoluyla hedef hücreye girebilen litik granülleri serbest bırakabilmektedir. NK hücre yüzeyindeki bu ölüm ligandlarının hedef hücre

üzerindeki karşılık gelen reseptörleri ile etkileşimi, kaspaz 8 aktivasyonunu içeren dışsal yol adı verilen yol ile hedef hücrenin apoptozuna neden olmaktadır[134, 135].

Degranülasyon meydana geldiğinde, salgılayıcı lizozomlar serbest bırakılır ve lizozomla ilişkili zar proteini-1 (LAMP-1, CD107a) NK hücresinin yüzeyine taşınır ve antikor bağlanması için erişilebilir hale gelir, böylece degranülasyon için aktive edilmiş NK hücrelerinin tanımlanması mümkün olur [136]. NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesini tahmin etmek için çeşitli yöntemler vardır; 5-(ve-6-)-karboksifluorescein süksinidimil ester (CFSE) etiketli K562 hücrelerinin lizi, NK aracılı litik kapasitenin belirlenmesi için iyi bir yöntemdir[137].

Enfekte hücreler rutin olarak bağışıklık hücreleri tarafından tespit edilmek üzere antikorlarla opsonize edilir. Antijenlere bağlanan antikorlar, NK hücrelerinde ifade edilen Fc γ RIII (CD16) reseptörleri tarafından bağlanabilir ve bu da NK aktivasyonu, sitolitik granüllerin salınması ve buna bağlı hücre apoptozu ile sonuçlanır [138].

CD56^{dim} NK hücreleri yüksek CD16, KIR, granzim ve perforin ekspresyonu nedeniyle CD56^{bright} alt gruba göre sitotoksik etkilidirler [129, 139-141]. NK hücreleri tarafından lizizi tetiklemeye rol oynayan en iyi araştırılmış membran reseptörü olan CD16, ADCC yer alan immünoglobulin süper ailesinin bir molekülüdür. Uyarılmamış CD56^{bright} NK hücreleri, CD56^{dim} NK hücrelerine kıyasla bu sitotoksik molekülleri daha düşük seviyelerde eksprese etse de, aktivasyon üzerine bunlar aynı zamanda sitotoksikite sergileme kapasitesine de sahiptir. Örneğin, CD56^{bright} NK hücrelerinin IL-12 ve IL-15 gibi sitokinlerle in vitro aktivasyonu, aktive edici reseptör NKG2D, lenfosit fonksiyonuyla ilişkili antijen 1 ve TRAIL yolu aracılığıyla otolog aktive edilmiş CD4⁺ T hücrelerinin degranülasyonunu ve öldürülmesini indükleyebilmektedir [142-144]. Ek olarak, IL-15 ile uyarıldığında, CD56^{bright} NK hücrelerinin büyük bir kısmı, CD56^{dim} alt gruplarına benzer şekilde granzim B'yi eksprese edmektedir [140].

Bu sonuçlar CD56^{dim} NK hücrelerinin CD56^{bright} NK hücrelerinden genellikle daha sitotoksik olduğunu göstermekte, ancak her iki alt grubun sitotoksikite hücrelerin uyarıldığı mekanizmalardan etkilenmektedir [145].

Bu iki tamamlayıcı sitotoksik yolun yanı sıra, NK hücreleri aynı zamanda IFN- γ , TNF- α ve diğer sitokinleri üretir [134, 135], bu durum NK hücrelerinin yalnızca sitotoksik hücreler değil, aynı zamanda önemli immünomodülatör fonksiyonlara sahip olduğunu da göstermektedir [146]. Genel olarak CD56^{bright} NK hücreleri, aktivasyon üzerine IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinleri yüksek seviyelerde salgılamakta dolayısıyla hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık hücreleri üzerinde daha güçlü immün düzenleyici etkileri bulunmaktadır [147-149]. IFN- γ , viral replikasyonun

engellenmesi ve tümör hücrelerinin baskılanmasının yanı sıra doku makrofajlarında proenflamatuvar ve mikrobisidal yanıtların uyarılması gibi immünolojik savunmada rol oynar [150, 151]. Diğer yandan TNF- α , immün modülasyon, ateş, enflamatuvar yanıt, tümör oluşumunun inhibisyonu ve virüs replikasyonunun inhibisyonu gibi farklı biyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır [152]. Diğer yandan NK hücreleri, Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β sitokinin önemli bir kaynağıdır ve viral enfeksiyona yanıt olarak IL-10'un güçlü üreticisidir. TGF- β ve IL-10, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonunda meydana gelen immün düzensizlikle potansiyel olarak ilişkili olan önemli immünosüpresif sitokinlerdir[153].

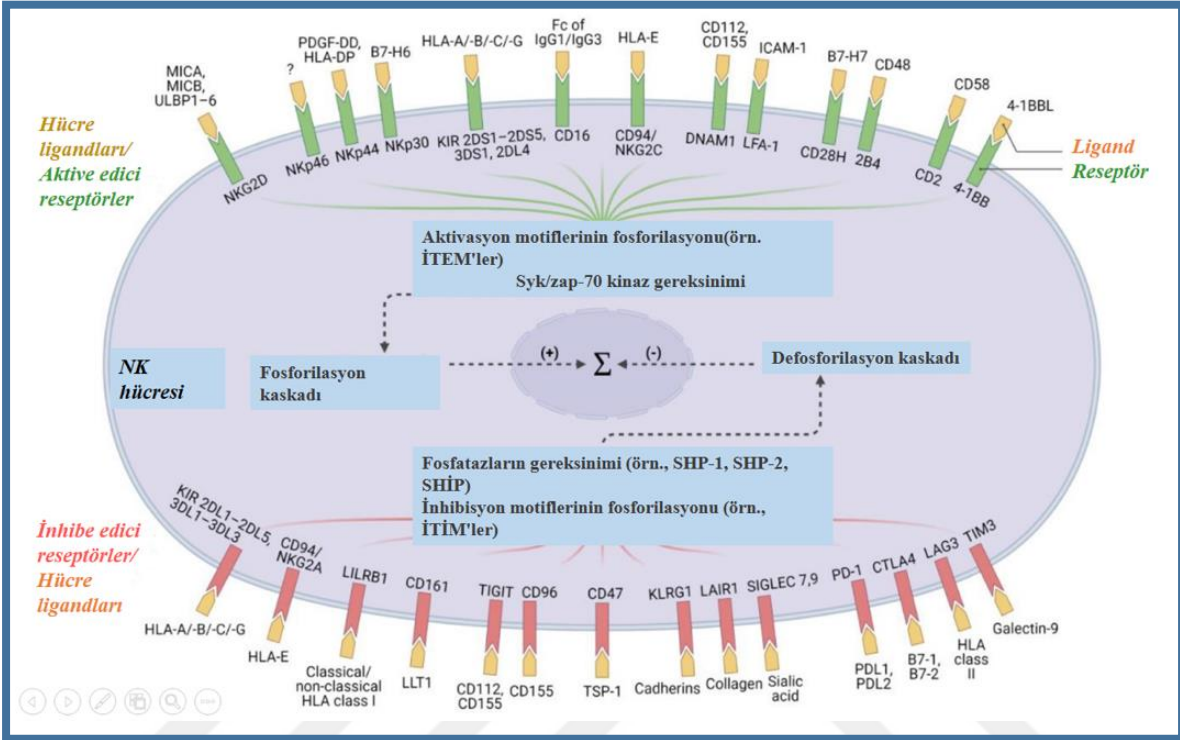
Transforme edici büyüme faktör-beta üç farklı izoformunu (TGFB1, TGFB2, TGFB3) bulunan çok işlevli bir sitokindir. TGF- β proteinleri tüm beyaz kan hücresi soyları tarafından üretilmektedir [154]. TGF- β reseptörleri hem tip 1 hem de tip 2 reseptör alt birimlerinden oluşmaktadır. TGF- β 'nın bağlanması üzerine reseptör kinaz tip 2 fosforile olmakta ve reseptör kinaz tip 1'in aktive edilmesine ve sinyalleşme kaskadını başlatılmasına yol açmaktadır [155]. Bu, birçok bağışıklık hücresinin farklılaşmasında, kemotaksisinde, çoğalmasında ve aktivasyonunda işlev gören farklı hedef genlerin transkripsiyonunu indüklenmesi ile farklı alt substratların ve düzenleyici proteinlerin aktivasyonuna neden olmaktadır [155, 156]. Plazmin gibi serum proteinazları aktif TGF- β 'nın kompleksten salınmasını katalize edmektedir[157]. TGF- β , önemli hücrel aktivite düzenlenmesinde önemli olmasına rağmen, şu anda yalnızca birkaç TGF- β aktive edici yol bilinmektedir ve önerilen aktivasyon yollarının arkasındaki tam mekanizma henüz iyi anlaşılmamıştır. Bilinen aktive edici yollardan bazıları hücre veya dokuya özgüdür, bazıları ise birden fazla hücre tipi ve dokuda görülmektedir [158, 159]. Proteazlar, integrinler, trombospondin-1, pH ve reaktif oksijen türleri, TGF- β 'yı aktive edebilen şu anda bilinen faktörlerden sadece birkaçını oluşturmaktadır [160-163].

Bu aktive edici faktörlerdeki bozulmaların, enflamasyon, otoimmün bozukluklar, fibrozis, kanser ve katarakt gibi çeşitli komplikasyonlara neden olabilecek düzensiz TGF- β sinyal seviyelerine yol açabileceği iyi bilinmektedir [164, 165] Bağışıklık baskılayıcı fonksiyonlarının düzensizliği de otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır [166, 167].

2.4.2 NK hücre aktivasyon mekanizmaları

NK hücreleri üzerinde ifade edilen aktive edici ve inhibitör reseptörler ile hücre yüzeyine bağlı ligandlar arasındaki hassas etkileşim aktive edici ve inhibitör sinyaller gelişmesine neden

olur. NK hücrelerinin fonksiyonu, sitotoksitesi ve sitokin üretimi, bu gelişen sinyallerin arasındaki dengeye bağlıdır[168].



Şekik 5. NK hücre aktive edici ve inhibitör reseptörler [169]

NK hücre reseptörleri yapılarına göre immünoglobulin süper ailesi (Ig-SF) ve C tipi lektin süper ailesi (CL-SF) olarak sınıflandırılabilir. Ig-SF, öldürücü hücre immünoglobulin reseptörlerini (KIR'ler) [170, 171], lökosit immünoglobulin benzeri reseptörleri (LILR'ler/LIR'ler) [172] ve doğal sitotoksik reseptörleri (NCR'ler) içerir [173]. CL-SF esas olarak öldürücü hücre lektin benzeri reseptörleri (KLR'ler) içermektedir [174].

NK hücre reseptörleri fonksiyonel sınıflandırmaya göre iki türe ayrılabilir: aktive edici reseptörler ve inhibitör reseptörler. Aktive edici reseptörler üç gruba ayrılmaktadır: immünreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifini (ITAM) taşıyan adaptörlerle birleşen reseptörler [öldürücü immünoglobulin benzeri reseptörleri (KIR), CD16 ve NCR, NKG2D ve farklı yollardan sinyal veren diğer reseptörler (CD2, 2B4, DNAM-1 (CD226) ve NKp80] [175]. İnhibitör reseptörler esas olarak KIR-2DL, KIR-3DL, CD94/NKG2A ve TIGIT'i içermektedir[176].

NK hücrelerinde ifade edilen aktive edici reseptörler [NKG2D ve doğal sitotoksik reseptörleri (NCR) NKp30, NKp44 ve NKp46] genellikle sağlıklı hücrelerde bulunmayan (UL16

bağlayıcı proteinler gibi) stres kaynaklı öz molekülere bağlanmakta böylece bu hücrelerin uyarılmasını tetiklemektedir [177-180].

2.4.3. KAR (Killer-cell Activating Receptor)

NK hücrelerin plazma membranında (hücre zarında) çok sayıda öldürücü Aktivasyon Reseptörü (KAR) bulunmaktadır. Konakçı veya dönüştürülmüş hücrelerde NK hücre fonksiyonunu düzenlemek amacıyla, öldürücü inhibitör reseptörler (KIR), KAR'ları etkisiz hale getirerek işlev görmektedir. Çoğu sağlıklı hücrelerde genellikle ifade edilmeyen ligandları tanır, ancak hücrelerin enfeksiyon veya onkojenik dönüşüm gibi stresli koşullara maruz kalması bu reseptörlerin ifade artışlarına neden olur. Dikkat çekici örnekler arasında farklı patolojik durumların kontrolünde önemli bir rol oynayan NKG2D, NKp46 (NCR1) ve DNAM-1 bulunmaktadır[181].

2.4.3.1 NKG2D reseptörü

Öldürücü hücre lektin benzeri reseptör K1 geni tarafından kodlanan NKG2D, C tipi lektin benzeri tip II transmembran proteinleri ailesine ait, immün aktive edici bir reseptördür. Doğal öldürücü (NK) hücreler, değişmeyen doğal öldürücü T hücreleri, $\gamma\delta$ T hücreleri ve $CD8^+$ T hücrelerinde eksprese olarak hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık yanıtlarda ayrıca bağışıklık sürveyansda görev yapmaktadır [182]. $CD4^+$ T hücreleri genellikle NKG2D eksprese etmez, ancak ekspresyonu romatoid artrit [183] ve kanser [184] dahil olmak üzere patolojik koşullar altında uyarılabilmektedir. Diğer birçok C tipi lektin reseptörü gibi, NKG2D de bir dizi hücre stresi olayı tarafından indüklenen çoklu ligandlara (NKG2DL) bağlanır [185]. İnsanlarda, NKG2DL ailesi iki MHC sınıf I ilişkili polipeptitten (MIC), yani MICA ve MICB'den ve UL16 bağlayıcı protein ailesinin altı üyesinden oluşmaktadır (1-6) [186].

NKG2D reseptörü, sinyalleme özelliklerine sahip olmayan çok kısa hücre içi alanlara sahip, iki disülfid bağlı transmembran proteininin bir homodimerinden oluşur. İnsanlarda NKG2D sinyalini iletmek için yalnızca DAP10 adaptör molekülleri ile birleşmektedir [187]. İnsan NK hücrelerinde NKG2D, CD16 sinyal yoloağını ve antikor bağımlı hücrel sitotoksiste (ADCC)'yi teşvik etmekte; NKG2D reseptörlerinin bloke edilmesi, NK hücrelerinin anti-HIV-1 antikoruna bağlı hücrel sitotoksiste aracılık etme yeteneğinin azalmasıyla sonuçlanmıştır [188]. Diğer yandan NKG2D, CD16, NKp46 veya 2B4 yoluyla eşzamanlı olarak uyarıldığında insan NK hücrelerini sinerjistik olarak aktive edebildiği gösterilmiştir [189, 190].

2.4.4. Toll benzeri reseptör

NK hücreleri farklı TLR eksprese etmekte ve TLR ligandları, NK hücrelerini doğrudan veya dolaylı olarak aktive edebilmektedir. Özellikle 1990'ların ortalarında TLR'lerin keşfi, doğal bağışıklık sistemi tarafından patojen tanımanın aslında patern tanıma reseptörlerine (PRR) bağlı olduğunu göstermiştir [1]. TLR'ler, patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP) tanıyan ve doğal bağışıklık tepkilerinin başlatılmasında kritik rol oynayan en iyi tanımlanmış PRR'lerdir. TLR'ler hücre yüzeyinde (TLR1, 2, 4, 5 ve 6) veya endozomların içinde (TLR3, 7, 8 ve 9) eksprese edilmektedir [4-6]. Farklı PAMP'ların aynı kökenli TLR'lerle etkileşimi, çok sayıda hücre içi sinyal transdüksiyonunu indükleyerek, enflamatuvar sitokinleri, yardımcı uyarıcı molekülleri, adezyon moleküllerini ve antimikrobiyal medyatörleri kodlayanlar dahil olmak üzere, doğal bağışıklıkla ilgili genlerin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır [6].

İnsan NK hücrelerinde TLR1-TLR9 mRNA ekspresyonunu inceleyen çalışmalarda, TLR1 mRNA seviyelerinin zirve yaptığı, bunu orta seviyelerde TLR2, TLR3, TLR5 ve TLR6 mRNA ekspresyonunun takip ettiği, TLR9 mRNA ekspresyon seviyelerinin ise düşük veya tespit edilemediği rapor edilmiştir [191-193]. Farklı NK hücre popülasyonları TLR ekspresyonları açısından incelendiğinde, CD56^{bright} NK hücre alt grubunda TLR2, CD56^{dim} NK hücre alt grubunda ise TLR3 ekspresyonu yüksek bulunmuştur [194].

2.4.4.1. Toll benzeri reseptör 9

Toll benzeri reseptör 9, TLR ailesinin bir üyesidir [195], patojenden türetilmiş CpG DNA veya yapay sentetik metillenmemiş CpG içeren oligodeoksिनükleotidler tarafından aktive edilebilir [196] ve doğrudan veya dolaylı olarak aşağı yöndeki sinyalleme yoluyla bağışıklık tepkisini başlatarak patojen istilasına karşı direnç göstermektedir [197]. Uzun zamandır TLR9'un yalnızca, hücre dışından gelen DNA'nın bir otoimmün yanıtın başlatılmasını engellenmesinde rol aldığı ve endolizozomlarda yer alan bir hücre içi DNA sensörü olduğu düşünülmektedir [198]. Ancak çalışmalar, nötrofiller [199], B hücreleri [200] ve hatta eritrositler [201] gibi hücre zarlarının yüzeyinde de TLR9 ekspresyonu göstermiş ve 'yüzey TLR9' adı verilmiştir. Hücrenin hem içinde hem de dışında bulunan TLR9 bölgesi, hücrel immün yanıtları başlatılabilmektedir. Ayrıca TLR9'un hücre zarına lokalizasyonu, 'endozomal TLR9' aracılı sinyal yollarının aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır [202]. endozomal TLR9'un hücre içi bölgesi endozomda bulunur ve N- ve C-terminalleri sırasıyla TLR9-N ve TLR9-C olarak adlandırılan 25 lösin bakımından zengin

tekrardan oluşmaktadır. Eritrositler, yüzey TLR9 vasıtasıyla makrofajlar gibi doğal bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna aracılık edebilir böylece enflamatuvar durumlarda kendisinin temizlenmesini hızlandırabilmektedir [203].

Endozomlarda lokalize olan hücre içi metillenmemiş CpG DNA ek olarak dsRNA, ssRNA gibi viral nükleik asitler TLR9 tarafından tanınmaktadır [15]. TLR9^{-/-} farelerde, azalan enflamatuvar yanıtın yanı sıra, akciğerde daha yüksek ve uzun süreli bir grip yükünün varlığı ve bozulmuş viral klirens gösterilmiştir [204]. Bu nedenle, TLR9'un varlığı belirli hücre tiplerinde ve/veya organlarda konakçı tepkilerine fayda sağlayabilmektedir.

2.4.5. Killer-cell immünoglobulin benzeri reseptör (KIR)

Öldürücü immünoglobulin benzeri reseptörler (KIR) ve NKG2A, majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf-I moleküllerini tanıyan en önemli inhibitör reseptörlerdir. Bu inhibitör reseptörler, sağlıklı hücreleri NK hücresi aracılı sitotoksiteden koruyan sensörler gibi davranır. Bu nedenle, MHC sınıf-I ekspresyonunun kaybı, virüsle enfekte olmuş hücrelerde ve tümör hücrelerinde sıklıkla gözlemlenir ve NK hücrelerinin bu dönüştürülmüş hücreleri tanımasına olanak tanır. NK hücreleri ayrıca MHC sınıf-I moleküllerinden başka ligandları tanıyan inhibitör reseptörleri de ifade eder. PD-1, TIGIT, LAG-3 ve TIM-3 gibi bu inhibitör reseptörleri, kansere karşı immünoterapötik stratejiler için yeni kontrol noktalarını temsil edmektedir [10].

2.4.6. T hücresi immünoglobulin ve müsin içeren protein 3 (TIM3) reseptörü

NK hücre reseptörleri arasında, hepatit A virüsü hücre reseptörü 2 olarak da bilinen T hücresi immünoglobulin ve TIM3, olgun veya tükenmiş bir NK fenotipini karakterize etmenin yanı sıra [205] hem inhibitör hem de aktive edici fonksiyonlara sahiptir [3 ,4]. Olgunlaşmanın bir belirteci olarak, TIM-3 ekspresyonunun olgun CD56^{dim}CD16⁺ NK fenotipi ile korele olduğu gösterilmiştir [206].

TIM3'ün önemli bir özelliği, sitoplazmik kuyruğunda bilinen inhibitör sinyal motiflerinin bulunmamasıdır. Programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1) ve immünreseptör tirozin bazlı inhibitör motifi (TIGIT) gibi daha 'klasik' kontrol noktası reseptörlerinin aksine, sitoplazmik kuyruğu, insanlar ve fareler arasında korunan beş tirozin içermektedir. TIM-3 ekspresyonu NK hücrelerine özgü değildir, çünkü bu reseptör sitotoksik T lenfositleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve mast hücrelerinde de eksprese edilir [207, 208].

TIM3'ün, hücre dışı immünoglobulin V alanı üzerindeki farklı bölgelere bağlanan birden fazla farklı liganda (galektin 9, fosfatidilserin, antijenle ilişkili hücre yapışma molekülü 1 ve

yüksek hareketli grup proteini B1) sahip olduğu rapor edilmiştir [209]. TIM-3, ligandları Galektin-9 ve CD66a bağlandıktan sonra NK hücresinde baskılayıcı fonksiyonun gelişimine neden olmaktadır [210, 211]. Çalışmalar, kronik viral enfeksiyonlar ve farklı kanserlerde NK hücrelerinde artan Tim-3 ekspresyonunun NK hücre tükenmesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir [212-214].

Klinik olarak, farklı kanser (akciğer kanseri [215], mesane kanseri [216], mide kanseri [217], özofagus kanseri [218], endometrial kanseri [219] ve melanom [220]) örneklerinde NK hücrelerinde TIM-3 ekspresyonu, hastalığın ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Kanserdeki bulgular, örneğin otoimmün bozukluklar gibi diğer hastalıklarla mutlaka ilişkili değildir; burada NK hücrelerinde azalan TIM-3 ekspresyonunun daha iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir [221].

Çalışmalar, TIM-3'ün NK hücre sitotoksitesini bozabileceğini [206] veya IFN- γ üretimini artırabileceğini göstermektedir [222]. *In vitro* koşullarında IL-2 ile uyarılan sağlıklı donörlerden alınan NK hücreleri aşırı TIM-3 ekspresyonu, yüksek IFN- γ üretimi ve oldukça sitotoksik hücrelere yol açtığı gösterilmiştir [213]. Ayrıca TIM-3 yüksek ifade eden NK hücreleri, K562 hedeflerine maruz bırakıldığında CD107a üretiminin artmasına yol açtığını göstermiştir [223]. Aşağı seviyede ifade edilmiş TIM-3'e sahip NK hücrelerinin daha az sitotoksik olduğunu ve TIM-3 blokajının bozulmuş fonksiyonu geri getiremediğini göstermişler [224].

TIM-3 blokajının, T hücre kaynaklı IFN- γ üretiminde artışa neden olduğu gösterilmiş olmasına rağmen [225], PD-1 inhibisyonu ile birleştirildiğinde üstün bir terapötik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [226]. TIM-3 ve PD-1 ekspresyonunun çeşitli tümörlerde, tümöre bölgesine infiltre olan lenfositlerin üzerinde pozitif korelasyon gösterdiği bulgularını desteklemektedir [227]. Benzer bulgular, çeşitli kanser hastalarından alınan örneklerde NK hücrelerinde PD-1 ve TIM-3'ün birlikte ekspresyonunu gösteren çalışmalarla desteklenmektedir [228, 229].

2.4.7. Lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG-3) reseptörü

Lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG-3, aynı zamanda CD223 olarak da bilinir), çeşitli biyolojik etkileri olan immünoglobulin reseptör ailesinin bir üyesidir ve aktive insan NK hücrelerinde ve T hücrelerinde tanımlanmıştır [230, 231]. Ek olarak LAG-3, B hücreleri ve dendritik hücreler dahil olmak üzere diğer bağışıklık hücreleri tarafından da ifade edilmektedir [232, 233]. LAG-3, dört hücre dışı immünoglobulin süper ailesi benzeri alana sahip, 498 amino asitli tip I bir transmembran proteini olarak tanımlanmıştır. Bir bağışıklık kontrol noktası reseptörü

olarak Lag-3, Sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4 ve PD-1'e [234, 235] benzer şekilde T hücresi proliferasyonunu, aktivasyonunu ve homeostazisini negatif olarak düzenlemektedir [231]. LAG-3, T hücresi reseptörü-CD3 kompleksi ile ilişkilidir ve antijen sunan hücrelerde eksprese edilen ana doku uyumluluk kompleksi sınıf-II moleküllerine bağlanmaktadır [236, 237].

Yapısal olarak LAG-3, CD4'e benzer, ancak MHC sınıf II moleküllerine CD4'ten daha yüksek bir bağlanma afinitesi göstermektedir [238]. LAG-3 ayrıca Galektin-3 ve karaciğer sinüzoidal endotelyal hücre lektini dâhil olmak üzere tümör hücrelerinde eksprese edilebilen diğer moleküllere de bağlanmaktadır [237, 239]. Hodgkin lenfoma, akut miyelositik lösemi ve kronik lenfositik lösemi hastalarında yüksek düzeyde LAG-3 ekspresyonu bulunmaktadır [240-242]. Sitoplazmik kuyruğu, farelerde ve insanlarda üç benzersiz ve korunmuş bölgeden oluşmaktadır. Sakin bir fosforilasyon bölgesi, bir glutamik asit prolin tekrarı ve bir KIEELE motifi içermektedir. Üçü arasında KIEELE motifi, CD4⁺ T hücrelerinde LAG-3'ün inhibitör fonksiyonu olarak görev yapmaktadır [243]. T hücrelerinin efektör işlevi, LAG-3'ün devreye girmesiyle inhibe edildiği ve LAG-3 blokajıyla güçlendiği saptanmıştır [243, 244]. LAG-3, patofizyolojik süreçlerin bir sonucu olarak T hücresi tükenmesinde rol oynamakta; dolayısıyla PD-1 ile kombinasyonu, T hücre fonksiyonunu eski haline getirmek için sinerji oluşturmaktadır [245, 246].

LAG-3, aktive efektör CD4 T hücrelerinde [247] ve özellikle aktive doğal ve indüklenabilir düzenleyici T hücrelerinde (sırasıyla nTregs ve iTregs) eksprese edilmektedir. Foxp3⁺CD25^{low} IL-10⁺ tip 1 düzenleyici T hücreleri aynı zamanda LAG-3'ü yüksek düzeyde eksprese etmektedir [248, 249] ve bunun CD49b⁺ ile birlikte ekspresyonu, tanımlayıcı bir tip 1 düzenleyici T hücre özelliği olarak kullanılmıştır [249, 250]. Diğer yandan IL-27 ile Treg'lerin uyarması, LAG-3'ün ekspresyonunu indükleyerek Treg baskılayıcı fonksiyonu arttırdığı gösterilmiştir [251]. Genel olarak kanıtlar, Treg hücrelerin maksimum baskılama fonksiyonları için LAG-3 ekspresyonunun gerekliliğini desteklemektedir [252, 253].

LAG-3'ün NK hücre fonksiyonunu düzenlemedeki rolü henüz net değildir ve bu nedenle daha fazla araştırma ve inceleme gerektirmektedir. LAG-3 eksikliği olan farelerden alınan NK hücrelerinde, spesifik kanser hücrelerinin öldürülmesinde herhangi bir kusur görülmemiştir [254]. LAG-3 antikorları veya çözünebilir LAG-3'ün kullanımıyla LAG-3 yolağının bloke edilmesi, insan NK hücrelerinin sitotoksitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir [231, 255].

2.4.8. İmmünoglobulin (Ig) ve tirozin bazlı inhibitör motif (ITIM) alanlarına sahip T hücresi immünoresseptörü (TIGIT)

WUCAM [256], Vstm3 [257], VSIG9 [258] olarak da bilinen TIGIT, immünoglobulin süper ailesine ait ortak bir inhibitör reseptördür [259]. Bir IgV alanı, bir transmembran alanı ve bir immünreseptör tirozin bazlı inhibitör motif içermektedir [260]. Fare modellerinde yapılan çalışmalara göre, TIGIT'in monoklonal antikorlarla bloke edilmesi, NK hücrelerinin ve T hücrelerinin antitümör ve antiviral aktivitesini arttırmaktadır [261, 262]. TIGIT' ekspresyonunun NK hücre aktivasyonunda ve olgunlaşmasının baskılanmasında hayati bir rolü bulunmaktadır [260, 263, 264]. TIGIT, farklı mekanizmalar ile doğal ve edinsel bağışıklık üzerinde; T/NK hücresinin baskılanması, immünoşüpresif dendritik hücrelerin (DC'lerin) indüklenmesi, CD226 sinyalinin inhibe edilmesi, Treg'lerin immünoşüpresyonunun arttırılması ve Fap2 kaynaklı T/NK hücrelerinin inhibisyonunun teşvik edilmesi gibi engelleyici etkiler göstermektedir [265].

İlk başta, T hücreleri üzerindeki TIGIT, T hücresi reseptörü (THR) kaynaklı aktivasyon sinyallerini zayıflatarak doğrudan T hücreleri üzerinde etki gösterebilmektedir. Spesifik olarak TIGIT, TCR- α zincirinin ve THR kompleksini oluşturan moleküllerin aşağı regülasyonunu indükleyerek THR'nin ekspresyonunu inhibe edebilmekte, böylece CD8⁺ T hücrelerinin çoğalmasını ve aktivasyonunu inhibe etmektedir [266]. Ek olarak TIGIT, CD8⁺ T hücrelerinde THR'nin indüklediği p-ERK sinyalini azaltmaktadır [267].

TIGIT reseptörünü, nektin benzeri ligandlar için DNAM-1 ile rekabet etmesi nedeniyle immünoşüpresif etkileri bulunmaktadır. Nektin benzeri ligandın mükemmel bir örneği, TIGIT molekülünün birincil ligandı CD155'tir. CD155 birçok kanser hücresi türünde eksprese edilmektedir [268]. TIGIT'in CD155 ile birleşmesi, bağışıklık hücresi fonksiyonunu modüle ederek Fosfoinozid 3-kinazlar, Mitojenle aktive olan protein kinazlar ve Nükleer faktör kapp B (NF- κ B) sinyal yollarını aşağı doğru düzenlemektedir [260, 269, 270]. Böylece insan NK sitotoksitesini ve sitokin üretimini önlemekte ve DNAM-1 aracılı aktivasyonu için zemin hazırlamaktadır [271, 272].

T hücrelerini doğrudan inhibe etmenin yanı sıra, T hücreleri üzerindeki Tigit, DC'ler üzerindeki CD155'e de bağlanarak T hücrelerinin aktivasyonunu dolaylı olarak inhibe etmektedir. TIGIT, DC'ler üzerinde CD155'in fosforilasyonunu indükler, böylece IL-10 üretimini arttırarak DC'ler tarafından üretilen IL-12 miktarı azaltmakta [273].

TIGIT, CD155 ligandları için CD226 ile rekabet ettiğinden, CD226 aracılı T hücrelerinin ve NK hücrelerinin ortak uyarılmasının bloke edilmesi, TIGIT tarafından immünoşüpresyonun

gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır [274]. Sitotoksik T lenfositlerin TIGIT yukarı regülasyonunun ve CD226 aşağı regülasyonunun, tümör uyarımı ile indüklendiğini bildirilmiştir. Bu bulgular, antitümör Sitotoksik T lenfositlerin yanıtının efektör fazında T hücresi baskılanmasının yeni bir mekanizması olduğunu ileri sürmüştür [264].

Treg'ler, TIGIT de dâhil olmak üzere inhibitör fonksiyonlarını destekleyen çeşitli inhibitör reseptörleri eksprese edmektedir. TIGIT, insanlarda çoğu Treg hücreleri tarafından yüksek düzeyde eksprese edilmektedir [275-277]. Melanom hastalarında Treg'lerin, CD4+ efektör T hücreleriyle karşılaştırıldığında TIGIT ekspresyonunun arttığını ve rekabetçi ortak uyarıcı reseptör CD226 ekspresyonunun azaldığını gösterilmiştir [276].

Fusobacterium nucleatum gibi bakteriler, melanom da dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tümör mikroçevresinde bulunmaktadır [278]. *F. nucleatum*'un, NK hücresi sitotoksitesini inhibe etmek ve T hücresi aktivitesini baskılamak için Fap2 proteini aracılığıyla NK ve T hücrelerinde TIGIT ile doğrudan etkileşime girdiği gösterilmiştir [279]. Bu mekanizmanın melanomda immün kaçışta rol oynayıp oynamadığı kanıtlanmamış olsa da, melanomda *F. nucleatum*'un varlığı nedeniyle böyle bir mekanizmanın olasılığı dışlanmamaktadır.

Çalışmalar, TIGIT'in çocuk felci virüsü ayrıca CD112, Nektin-2 reseptörü ve PRR2 olarak da adlandırılan çocuk felci virüsü reseptörü benzeri 2 ile etkileşiminin, NK hücre sitotoksitesini doğrudan inhibe ettiğini göstermiştir [260, 280, 281].

TIGIT'in blokajı, NK hücrelerini miyeloid-türevli baskılayıcı hücrelerin inhibisyonuna karşı dirençli hale getirmiştir [261, 282].

2.5. Yaşlanma Sürecinde NK Hücreleri

NK hücre popülasyonunun özellikleri yaşlanma sürecinden etkilenmektedir. Bazı tutarsızlıklar mevcut olmasına rağmen çalışmalar, yaşlanma sırasında dolaşımdaki NK hücrelerinin toplam sayısında bir artış olduğunu bildirmektedir [283, 284]. CD56^{bright} NK hücre yüzdesinde azalmasına karşılık CD56^{dim} NK hücre yüzdesinde bir artış görülmektedir. Ayrıca, IL-2 veya IL-12 ile uyarımı takiben, sağlıklı yaşlıların dolaşımdaki NK hücre popülasyonunda belirli kemokin ve sitokinlerin üretimi, genç kontrollere kıyasla azalmaktadır [283]. Ancak bu çalışmalarda CD56^{bright} ve CD56^{dim} NK hücreleri arasında herhangi bir ayırım yapılmamıştır. Bu nedenle yaşlılardaki NK hücrelerinin uyarıya yanıt olarak daha az sitokin ve kemokin salgılayıp salgılamadığı veya bu etkinin CD56^{bright} NK hücrelerinin azalan oranından kaynaklanıp kaynaklanmadığı belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca, CD56^{bright} NK hücrelerinin IL-15 uyarımı

genç bireylerle karşılaştırıldığında yaşlı bireylerde IFN- γ ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmaktadır [285].

Sitokin ve kemokinlerin değişen üretiminin yanı sıra, çeşitli NK hücre reseptörlerinin ekspresyonu da yaşlanmadan etkilenmektedir. Hem dolaşımdaki CD56^{bright} hem de CD56^{dim} NK hücrelerinde, CD94 reseptörünün ve doğal sitotoksosite reseptörleri NKp30 ve NKp46'nın ekspresyonu yaşlı kişilerde azalırken, KIR ekspresyonu yalnızca CD56^{bright} NK hücrelerinde arttığı gösterilmiştir. DNAM-1 ekspresyonunun çoğunlukla CD56^{dim} NK hücrelerinde yaşla birlikte azaldığı görülmektedir [286-288]. Bu fenotipik değişiklikler yaşlanma sırasında gözlemlenen azalmış hedef hücre tanıma ve sitotoksiteyi açıklayabilmektedir [283]. Sadece hücre içi değişiklikler değil aynı zamanda mikro ortamdaki değişiklikler örneğin NK hücre fonksiyonunun sürdürülmesi için hayati olduğu bilinen IL-2 ve IL-15 seviyelerinde azalma, yaşlanma sırasında NK hücrelerinin işlevselliğini etkileyebilmektedir [283].

2.6. NK Hücrelerinin Beyne Göçü

İnsan beyin parankiminde NK hücrelerinin varlığı hakkında çok fazla şey bilinmese de, sağlıklı fare beyin parankiminde çoğunluğu olgunlaşmamış CD27^{yüksek} NK hücreleri tanımlanmıştır [289, 290]. Bugüne kadar NK hücrelerinin beyne nasıl girebileceği belirsizliğini korumaktadır. *İn vitro* deneyler, sağlıklı donörlerin NK hücrelerinin az bir kısmının, uyarılmamış koşullarda bir KBB modeli olarak kullanılan insan beyni mikrovasküler endotel hücrelerini geçebildiği gözlemlenmiştir. Bu, NK hücrelerinin sağlıklı insan KBB geçerek beyninin farklı bölgelerinde yer alabileceğini göstermektedir. Özellikle, CD56^{bright} NK hücrelerinin bu modelde KBB geçme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir [149]. CD56^{bright} NK hücrelerinin çoğunlukla periferik dokularda baskın olduğu ve CD56^{dim} NK hücrelerine kıyasla CD62L gibi göç belirteçlerinin daha yüksek ekspresyonuna sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, fare beyinde CD27^{yüksek} NK hücre popülasyonunun mevcut olduğu bulgusuyla uyum göstermektedir [149, 289]. Ayrıca CD56^{bright} NK hücreleri tarafından salgılanan granzim K, endotel yüzeyindeki hücreler arası adezyon molekülü (ICAM)-1 ekspresyonunu dolaylı olarak indükleyerek NK hücrelerinin göçünü kolaylaştırabilmektedir [291].

NK hücreleri BOS'a BCSFB yoluna ilaveten kan-meningeal bariyer aracılığıyla ulaştığı gözlemlenmiştir, meninkslerde ise NK hücrelerinin varlığına ilişkin sınırlı bilgi bulunmaktadır. Tek çekirdekli RNA dizilimi yoluyla insan leptomeninglerinde NK hücrelerinin varlığı gösterilmiş

ancak NK hücre alt grupları arasında ayrım yapılmamıştır [292]. Fare beyin parankiminde çoğunlukla olgunlaşmamış NK hücrelerinin varlığıyla tutarsız olarak, insan koroid pleksusunun çoğunlukla CD56^{dim} NK hücrelerinden oluştuğu görülmektedir, ancak bu aynı zamanda dokuya kan sızıntısının bir sonucu olarak gelişebilmektedir [293].

Enflamatuar koşullar altında, lökositlerde integrinlerin ve KBB'deki adezyon moleküllerinin ifadesi artar ve yapısal değişiklikler sonucunda integrinlerin adezyon moleküllerine olan afinitesi çoğalır bu da lökositlerin KBB boyunca göçünü kolaylaştırır [294, 295]. *İn vitro* şartlarda insan beyin mikrovasküler endotel hücreleri IFN- γ ve TNF- α ile uyarıldığında, sağlıklı donörlerden alınan NK hücrelerinin daha yüksek bir oranda yukarıda bahsedilen KBB modeli üzerine göç etikleri tespit edilmiştir [149]. Benzer şekilde, BCSFB'nin bariyer özellikleri nöroenflamasyon sırasında bozulur ve epitel hücreleri tarafından kemokin üretimi artar, bu da lökositlerin BCSFB üzerinden göçünü kolaylaştırır, ancak bu çoğunlukla hayvan modelleri kullanılarak incelenmiştir [295, 296]. Ancak, bildiğimiz kadarıyla, NK hücrelerinin BCSFB modellerine göre göç süreçlerini tanımlayan herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Nöroenflamasyon aynı zamanda işlevsiz bir kan-meningeal bariyer ve bu bariyerde bağışıklık hücrelerinin artmasıyla da ilişkilendirilmiştir [293, 297]. Her bir beyin bariyerinin bariyer özellikleri ve hücre yapışma moleküllerinin ekspresyonu, çeşitli nörodejeneratif koşullardan farklı şekilde etkilendiğinden, NK hücrelerinin farklı bariyerler üzerinden migrasyonu, hastalığa özgü özelliklere bağlı olabilmektedir.

2.7. Alzheimer Hastalığında Nöroenflamasyon

Nöroenflamasyon olarak da adlandırılan CNS'deki iltihaplanma, zararlı bir uyarana karşı kısa süreli bir vücut reaksiyonudur. Nöroenflamasyon, beyin hasarını onarmayı ve beyin homeostazını düzeltmeyi amaçlamaktadır. Bu nedenle, kısa vadeli yararlı etkileri bulunmakta, ancak aşırı ve kontrolsüz nöroenflamasyon zararlı olabilmektedir [298]. Başta travmatik beyin hasarı, inme, yüksek yağlı diyet, kötüye kullanılan ilaçlara maruz kalma veya yaşlanma gibi birçok faktör nöroenflamasyonu tetikleyebilmektedir [299]. Kronik nöroenflamasyon, kronik nöroenflamasyonun patogenezinin üçüncü ayırt edici özelliği haline geldiği Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalığın ortak bir özelliğini oluşturmaktadır [300]. Nöroenflamasyon sırasında, proenflamatuvar sitokinlerin anormal üretimi, çoklu sinyal yollarını tetiklemektedir [301]. Merkezi sinir sistemi (MSS) nöroenflamasyonu yönlendiren iki anahtar hücre tipi, mikroglial hücreler ve astrositleri teşkil etmektedir [302]. Mikroglial hücreler, MSS'nin

yerleşik makrofajlarını oluşturmaktadır. MSS'deki hücre popülasyonunun %10'unu temsil etmekte ve patojenik ajanlara veya beyin hasarına karşı birinci basamakta savunmada etkili hücrelerdir. Mikroglial aktivasyon, uyarının türüne, yoğunluğuna ve içeriğine bağlı olarak değişmekte ve fizyolojik koşullar altında, geniş bir protein ve reseptör dizisi aracılığıyla mikro ortamı oldukça dinamik bir şekilde sürekli olarak izlemektedir [303]. Mikroglialının dahil olduğu bazı fizyolojik roller nörojeniz, sinaptik bağlantıların ortadan kaldırılması ve şekillendirilmesi veya sinaptik plastisiteyi kapsamaktadır [304].

Mikrogliaların *in vivo* karışık profiller gösterebileceğine ve ayrıca bölgesel olarak heterojen olabileceğine dair kanıtlar mevcuttur [305]. Bir uyarana yanıt olarak, mikroglia bir dizi morfolojik değişikliğe maruz kalarak ve yüzey reseptör ekspresyonunda ve proenflamatuvar sitokinlerin salınımında bir artışa neden olmaktadır. Bu enflamatuvar sürecin uzaması, KBB bütünlüğünün korunması dahil olmak üzere mikroglial hücrelerin homeostatik fonksiyonlarını tehlikeye atabilmektedir [306].

A β plaklarının birikmesi, nöronal hasara ve ölüme yol açabilecek kompleman sisteminin aktivasyonunu indüklemektedir. Böylece nöronlar, A β 'yı bağlayan ve mikroglia üzerindeki C1q reseptörünü aktive eden ve A β 'nın fagositozunu tetikleyen C1q'yu salgılamaktadır. Ek olarak astrositler, enflamatuvar sinyallerle uyarılarak Kompleman C3b ve C3a'ya bölünen C3'ü salgılamaktadır. C3a peptidi, periferik bağışıklık hücrelerinin beyne toplanmasına ve nöroenflamatuvar kaskadların başlatılmasına aracılık edmektedir [307].

Nöroenflamatuvar kaskadlar, mikroglial 'NLR ailesi pyrin alanı içeren 3' (NLRP3) enflamatuvarının aktivasyonuna dayanmaktadır. A β birikimlerinin NLRP3 aktive edebildiği ve bunun da Alzheimer hastalığının patogeneze katkıda bulunabilen ve bilişsel bozukluğa neden olabilen IL-1 β ve IL-18 üretimine yol açabildiği gösterilmiştir [308, 309]. A β birikimlerinin aynı zamanda Alzheimer hastalarında enflamatuvar aktivasyonun bir sonucu olabileceği de göz ardı edilemez. NLRP3 enflamatuvar aktivasyonunun plakla ilişkili mikroglia ile sınırlı olması, Alzheimer hastalığı patogenezindeki rolünü daha da desteklemektedir [308].

Kanıtlar, doğal bağışıklık sisteminin Alzheimer hastalığının patogenezinde ve ilerlemesinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir. A β birikimlerinin, TLR'ler gibi yüzey reseptörleri ile etkileşime girerek mikroglia'yı aktive ettiği öne sürülmüştür. TLR'ler, sırasıyla TLR2 ve TLR4 tarafından tanınan bakteriyel peptidoglikanlar ve lipopolisakkarit gibi patojenle ilişkili moleküler modelleri tanımaktadır [310]. TLR2 ve TLR4'ün aynı zamanda A β 'yı tanıdığı da gösterilmiştir [311, 312]. Mikroglial hücreler aktive edildikten sonra proenflamatuvar sitokinler

ve kemokinler üretmektedir. TLR4 ve IFN- γ reseptörlerinin ortak aktivasyonu, büyük sinirsel işlev bozukluğu ve nöronların ölümü ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, TLR4'ün mikroglia'da *in situ* aktivasyonu, nörodejenerasyonu indüklemek için diğer konakçı bağışıklık hücrelerinden eşzamanlı IFN- γ sinyali gerektirmektedir [313]. Alzheimer hastalığının erken evresinde mikroglia, A β 'nin fagositozunda ve temizlenmesinde rol oynamakta, ancak Alzheimer hastalığı ilerledikçe mikroglia fonksiyonu, fagositik kapasitenin azalması, düşük TLR4 ekspresyonu ve anti-enflamatuvar sitokinlerin yüksek üretimi ile bozulmaktadır [314].

Enflamatuvar aktivasyon ve enflamatuvar sitokinlerin üretimi ile birlikte granülositler, monositler, NK ve T hücreleri gibi bağışıklık sisteminin hücresel bileşenleri de nöroenflamasyon patogeneze katılabilmektedir [4, 5]. Dolayısıyla hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemindeki değişiklikler Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Hastalık ilerledikçe, Alzheimer hastalarında bağışıklık sistemi ciddi şekilde etkilenmekte [315], T ve B hücre oranlarında ve fonksiyonlarında azalma [316] ve proenflamatuvar sitokin üretiminde bozulma görülmektedir [317].

Alzheimer hastalığında NK hücrelerinin rolü ilk olarak, Alzheimer gibi nörolojik anormalliklere karşı etkili bir ilaç olan Tacrine'nin, Alzheimer hastalarındaki NK hücre proliferasyonu ve sitotoksik fonksiyonları üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğunun gösterilmesiyle ortaya konulmuştur. Bu bulgular sonucunda, NK hücrelerinin Alzheimer hastalarında zararlı etkilerinin olabileceği öne sürülmüştür [7]. Ek olarak, Alzheimer hastalarının klinik öncesi ve prodromal aşamaları üzerindeki çalışmalar hastalığın başlangıcından 2 ay önce NK hücrelerinin yüzdesinde ve sitotoksik aktivitesinde değişiklikler olduğunu bildirmiştir. Bu periferik NK hücrelerindeki fonksiyon değişikliklerin, hastalığın erken periferik belirteçleri olabileceğini düşündürmektedir [318].

Amiloid beta temizlenmesinde önemli bir rol oynayan mikroglia fonksiyon bozukluğunun hastalığın ilerlemesinde rol oynadığı kabul edilmektedir. NK hücreleri makrofajlar ve dendritik hücrelerinin aktivasyonunu ve fonksiyonunu düzenleyebilmektedir [319]. IL-12, IL-15 veya IL-18 gibi çeşitli sitokinler, NK hücrelerinin aktive edilmesi ve IFN- γ gibi birçok sitokinin üretimini tetikleyebilmektedir [145]. TNF- α ve IFN- γ sitokinlerinin işlev bozukluğu, oksidatif stresin, hücre hasarının ve doku hasarının artmasına katkıda bulunarak nöroenflamasyonu tetiklemektedir [320]. TNF- α bu patolojik sürecin her adımında önemli bir rol oynamaktadır. TNF- α , uyarıcı ve engelleyici sinyaller arasındaki dengeyi değiştirerek nöronlarda eksitotoksik nöron ölümüne katkıda bulunmakta ve hücrelere kalsiyum akışının artmasına neden olmaktadır [321, 322]. Nöron

ölümü, lokal bir enflamatuvar yanıtı başlatarak TNF- α ifadesini yükseltir ve pozitif bir geri bildirim döngüsü oluşturmaktadır [320]. TNF- α ayrıca astrositlerde glutamat salınımını ve yeniden alımını da düzenlemektedir [323]. Glutamat, mGlutR2 reseptör etkileşimiyle mikrogliyalardan TNF- α üretimini uyarmaktadır [320]. TNF- α , kan-beyin bariyerinin bozulmasında ve enflamatuvar hücrelerin ve moleküllerin beyine sızmasında önemli bir rolü bulunmaktadır. Kan-beyin bariyerinde TNF reseptörü-1, ICAM-1 ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)-1'in artan ekspresyonu hücre hasar ve bozulmuş bariyer fonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir [324, 325].

Bununla birlikte, IL-12 ve K562 hücreleri ile uyarılan NK hücrelerinin TNF- α ve IFN- γ sitokin üretimi, sağlıklı donörler ve orta evre Alzheimer hastalarına kıyasla hafif evre Alzheimer hastalarında arttığını [15] ve sitokinle uyarılan NK hücrelerinin sitotoksik kapasitesinin daha yüksek olduğunu gösterilmiştir [10]. NK hücreleri tarafından salgılanan TNF- α ve IFN- γ sitokinlerinin, hastaların bilişsel işlevleriyle olumsuz yönde ilişkili olduğu bulunmuştur [326]. Ek olarak IFN- γ 'nın, nöronal kök hücrelerin azalmış proliferasyonu ile ilişkili olduğu [11] ve TNF- α 'nın farmakolojik stratejilerle potansiyel inhibisyonu, Alzheimer hastalığının önlenmesine ve demans riski taşıyan kişilerde bilişsel işlevlerin iyileşmesine yol açtığı belirtilmiştir [12]. Ayrıca veriler sitotoksositeye bağımlı Granzim B ve CCR7 bağımlı kemotaksis ifadesinin hafif evre Alzheimer hastalarında arttığını ancak orta evre Alzheimer hastaları hastalarında artmadığını göstermiştir. Bu durum erken evre Alzheimer hasta periferik kan örneklerinde NK hücrelerinde gözlenen değişikliklerin NK hücre aktivasyonuna işaret ettiğini düşündürmektedir [15].

NK hücreleri ayrıca immün baskılayıcı işlevlere sahip olan sitokinler (IL-10 ve TGF- β) ve başka kemokinler de üretebilmektedir [327, 328]. Kontrol denekleriyle karşılaştırıldığında Alzheimer hastalığı olan hastaların kanında ve beyin omurilik sıvısında daha yüksek TGF- β konsantrasyonları bulunmuştur [329]. Alzheimer hastalığı semptomlarına ve patolojisine yol açan nörodejeneratif süreçte olası bir rol olduğu düşünülmektedir. TGF- β 'nın nöronal fonksiyon bozukluğundaki rolü aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir [330]. Çözünür TGF- β , NK hücrelerinin yüzeyindeki TGF- β RII ve TGF- β RI heterodimer kompleksi ile etkileşime girebilmektedir. Bu etkileşim Smads 2 ve 3'in fosforilasyonuna yol açarak [331], sitolitik fonksiyonun azalmasına ve aktive edici reseptörlerin ekspresyonunun bozulmasına neden olan düzenleyici bir kademeyi tetiklemektedir [332].

Bağışıklık kontrol noktası proteinleri veya inhibitör düzenleyici olarak da bilinen bu reseptörler, iki ucu keskin kılıç gibi işlem yapabilir; öncelikle bağışıklık tepkisi sırasında bağışıklık

homeostazisini koruyarak bağışıklık sisteminin aşırı reaksiyonunu ve doku hasarını önlemektedir. Tersine, bazı hastalıklar örneğin kanser hücrelerinde, bağışıklık denetiminden kaçmak için bağışıklık kontrol noktalarının ligandlarını taklit edebilmektedir [333]. Ayrıca bazı kronik hastalıklarda yol açan mikrobiyal hücreler, kontrol noktası moleküllerinin aşırı bitimlenmesi indükleyerek, immün sistemin baskılanmasıyla hastalığın ilerlemesini [334] veya bu moleküllerinin düşük bitimlenmesi ile immün sistemin daha etkin ve zarar verici tepkisine yol açabilmektedir [335]. Bildiğimiz kadarıyla TIGIT, LAG-3 ve TIM-3 reseptörlerinin AH'daki etkisi şu ana kadar analiz edilmemiştir.

Lenfosit popülasyonu içindeki $CD3^+CD56^+$, $CD56^+CD16^-$ ve $CD56^+CD16^+$ NK hücrelerinin yüzdeleri, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında hafif evre ve orta evre olan alzheimer hastalar ile benzer bulunmuştur [15]. Yaşlanmayla birlikte CD16 betimlenmesinde herhangi bir değişiklik bildirilmezken, CD16 ekspresyonunun orta evre alzheimer hastalarında arttığı ancak hafif evre alzheimer hastalarında korunduğu gösterilmiştir [15].

Alzheimer hastalarında viral etiyoloji ile tutarlı olan NK hücre disfonksiyonu kaydedilmiştir. Aktive edici reseptör KIR2DS2 ve inhibitör reseptör KIR2DL2 ve KIR ligandı olan İnsan lökosit antijeni (HLA)-C1'in kombinasyonu, Alzheimer hastalarında kontrollere göre daha sık bulunmuştur. Ayrıca aktive edici bir reseptör olan KIR3DS1'in daha düşük bir frekansı saptanmıştır. Birlikte, bu sonuçlar Alzheimer hastalarındaki NK hücrelerinin genel olarak sağlıklı bireylerdekenden daha az aktif olabileceğini ve klinik olarak daha düşük Mini-Mental muayene puanları ile de ilişkilendirilmiştir[336].

Hem yaşın hem de kalıcı sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonunun, yaşlılarda gözlenen NK hücre fenotipik ve fonksiyonel değişikliklerine yol açtığı belirtilmiştir. Diğer yandan yaşlı donörlerin NK hücrelerinde CD57'nin betimlenmesi artmaktadır [10]. Bununla birlikte $CD57^+$ uzun ömürlü NK hücrelerinin birikimi CMV ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [284].

Yapılan bir çalışmada, aktive edilmiş NK hücrelerinin A β plaklarını ortadan kaldırdığını ve bunun AH'li farelerde davranışta belirgin bir iyileşme sağladığını bulunmuştur. Bu iyileşme, fagositik aktivite ve otofaji genlerinin düzenlenmesi nedeniyle mikrogial fonksiyondaki iyileşme ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [337]. Diğer yandan başka bir çalışmada 3xTg-AH farelerinde NK hücrelerinin bloke edilmesi mikrogia hücrelerinde, homeostatik benzeri bir morfoloji sergilemesi ile proliferatif yanıtın ve nöro-yıkıcı pro-enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunda azalmasına yol açmıştır. Bu çalışmada amiloid beta konsantrasyonlarını etkilenmediği ancak

nöroenflamasyonun gerilemesi ile farelerin bilişsel işlevi ve nörojenez fonksiyonunda gelişimine neden olmuştur[8].

2.8. Apolipoprotein E ve Lenfosit Aktivasyonu

Apolipoprotein E, lenfositlerde eksprese edilmemektedir [338]. Bununla birlikte miyeloid kökenli hücrelerden sentezlenen APOE, lenfosit aktivasyonunun ve adaptif immün yanıtın düzenleyicileridir. Çalışmalar, APOE ve APOE içeren lipoproteinlerin T lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiğini ve *in vitro* IL-2 aktivitesini azalttığını göstermiştir [339]. Makrofajlar ve dendritik hücreler dahil olmak üzere miyeloid kökenli hücrelerde ifade edilen APOE, antijen sunumunun düzenlenmesi yoluyla adaptif bağışıklığa katılmaktadır. Özellikle, APOE eksikliği veya APOE-ε4 ifade eden dendritik hücreler, artmış MHC-II bağımlı antijen sunumu ve proenflamatuvar CD4⁺ Th1 lenfositlerin aktivasyonunu göstermektedir. Mieloid hücrelerde endojen APOE-ε4 ifadesi MHC-II antijen sunumunu hangi mekanizmayla arttırdığı tam olarak açıklanamamıştır. Potansiyel bir mekanizma, APOE-ε3'e kıyasla APOE-ε4'ün hücre içi kolesterolü mobilize etme yeteneğinin azalmasıyla ilgili olduğunu ileri sürmüştür, bu da HLA-DR tarafından antijen sunumunun artmasına ve CD4⁺ naif T hücrelerinin artan polarizasyonuna yol açmaktadır [340]. Hücre zarında kolesterol fazlalığı, makrofajlarda TLR4 sinyalini arttırmaktadır, bu da NFκB'yi aktive ederek enflamatuvar gen yanıtını indüklemektedir [341].

Apolipoprotein E-ε4'ün aksine APOE-ε2, LDL reseptörü ile kusurlu etkileşimi nedeniyle CD1d aracılı lipid antijen sunumunu parakrin bir şekilde bozmaktadır [342]. Ayrıca, APOE-ε2'nin makrofajlar tarafından kusurlu salgılanmasının antijen sunumunun baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir [343]. Veriler makrofajlarda enflamasyon artışı, APOE-ε2'nin, bozulmuş kolesterol akışı ve enflamasyon aktivasyonu bağlı olduğunu oysa APOE-ε4'ün yüksek oksidatif stres nedeniyle ortaya çıktığını göstermektedir [344]. Ayrıca APOE, Th1 hücre aracılı bağışıklık yanıtını aşağı doğru düzenleyebilmektedir [345]. *In vitro* çalışmalar hem APOE içeren lipoproteinlerin hem de sentetik APOE peptitlerin, T hücrelerinde DNA sentezi ve fosfolipid hacmini azaltarak mitojenle uyarılan T lenfosit proliferasyonunu inhibe edebildiğini göstermektedir [339]. Ayrıca IL-2 reseptörünün işlevini modifiye etme veya hücre içi sinyal yollarını değiştirdiği saptanmıştır [346].

Apolipoprotein E-nakavt fareler anormal humoral ve hücrel bağışıklık yanıtlar göstermektedir [347]. APOE eksikliği olan farelerde eksojen antijenler tarafından uyarılan makrofajlara karşı T hücre IFN-γ salgılamasının arttığı, MHC sınıf II ve CD80 moleküllerinin yukarı

doğru düzenlediği gösterilmiştir [348]. Şiddetli hiperkolesterolemi, aterosklerotik APOE taşımayan farelerde otoimmün yanıtların Th1'den Th2 efektör tipe geçişini indükleyebilmektedir [349]. APO-E-nakavt farelerde, Th17 ile ilişkili sitokinlerin (IL-17 ve IL-6) salgılanmasında ve transkripsiyon faktörü 'retinoid-related orphan receptor gamma' seviyelerinde önemli ölçüde artış, buna karşı Treg hücrelerinde azalma, Treg ile ilişkili sitokinler TGF- β 1 salgılanması ve transkripsiyon faktörü 'Foxp3' ifadesinde azalma saptanmıştır. APO-E nakavt farelerinde Th17/Treg hücrelerinin fonksiyonunda düzensizlik görülmüştür, bu da APOE işlevinin Th17/Treg dengesizliği üzerinde bir rolü olduğunu düşündürmektedir [350]. Ayrıca IL-17A'nın APOE'si olmayan farelerin plazma ve dokularında da yükseldiği bulunmuştur [351].

Fare çalışmalarında APOE eksikliği belirli sitokin profillerinde değişikliğe yol açmaktadır. IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ , ICAM-1, VCAM-1, monosit kemoatraktan protein-1, NF- κ B (p65) ve inhibitör (I) κ B α mRNA düzeylerinde artış ve IL-4, IL-10 ve GM-CSF mRNA seviyelerinde azalma saptanmıştır [352]. IL-1 β , birincil glial hücreler ile kültür edildiğinde, hücre dışı APOE proteininde belirgin bir artışa neden olmakta [353], bununla birlikte, IFN- γ , post-translasyonel modifikasyon yoluyla hücre içinde APOE'nin bozulmasını önemli ölçüde artırmakta ayrıca insan makrofajlarının ve insan akut monositik lösemi hücre hattı hücrelerinin süpernatantlarında APOE birikimini inhibe ettiği gösterilmiştir [354].

Apolipoprotein E'nin CD1 molekülleri tarafından NKT hücrelerine lipid antijen sunumunu kolaylaştırdığı için otoimmün hastalıklarda önemli role sahip olduğu düşünülmektedir [355]. CD1 molekülleri (insanlarda CD1a-d ve farelerde CD1d), yapısal olarak MHC sınıf I moleküllerine benzer iken işlevsel olarak MHC sınıf II moleküllerine benzemekte böylece APOE molekülleri etkili olduğu bir süreçte lipid antijenlerini NKT hücrelerine sunabilmektedir. TCR vasıtasıyla CD1'e bağlandıktan sonra, naif NKT hücreleri, yüksek miktarlarda IFN- γ ve IL-4 salgılamakta ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır [356]. Başka bir çalışmada, B hücrelerinin, lipid antijen sunumu için APOE-aracılı yollarını dendritik hücrelerden daha verimli şekilde kullandığı gösterilmiştir [342].

Apolipoprotein E'nin TLR4 ve TLR3 aracılı sinyalleme ve IL-12 üretimini seçici olarak düzenlediği ve IL-12 üretimini modüle ederek Th1 immün yanıtı baskılayabildiği gösterilmiştir [357]. Ayrıca, APOE, lipopolisakkariti (LPS) nötralize edebilmekte böylece enflamatuvar yanıtları azaltarak LPS'nin toksik etkisini düşürebilmektedir [358]. Bu gözlemlerin fizyolojik önemi, APOE eksikliği olan farelerde endotokseminin indüklenmesiyle *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonuna ve yaygın kandidiyazın artan duyarlılığını gösteren çalışmalarla vurgulanmaktadır [359]. Ayrıca

APOE eksikliği olan farelerde *Listeria monocytogenes*'e [360] ve ayrıca tüberküloza [361] karşı bozulmuş bağışıklık yanıtlar saptanmıştır. İmmünoregülasyonda APOE izoformu tercihi belirgin olmamakla birlikte, APOE-ε4'ün herpes simpleks virüsü ile enfekte bireylerde daha fazla bulunması [362] ve APOE-ε4 aleline sahip HIV-pozitif hastalarda fırsatçı organizma enfeksiyonuna karşı artan duyarlılık, APOE-ε4'ün *in vivo* olarak lenfosit immün yanıtın baskılanmasında daha az etkili olduğunu düşündüren kanıtlar sağlamıştır [363]. Birlikte ele alındığında, *in vitro* ve *in vivo* veriler, APOE'nin enflamasyona karşı lenfosit yanıtlarını baskılamada etkili olduğunu göstermektedir.

Apolipoprotein E-nakavt farelerde, tümör gelişimi ve metastaz üzerine inhibitör etkisi, NK hücrelerinin enfiltrasyonunun artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu APOE-nakavt farelerin NK hücrelerinde, diğer kontrol grubundaki APOE içeren farelere göre daha fazla sitotok etki, daha yüksek Granzyme B, Fas Ligand, IFN-γ, TNF-α, NKG2D, NKp46 ve DNAM-1 betimlenmesi gösterilmiştir. TREM-1, NK hücreleri üzerinde betimlenen bir proenflamatuvar araçıdır ve sitotoksik işlevi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. APOE-nakavt farelerde, NK hücrelerinin TREM-1'e bağlı anti-tümör aktivitesinin arttığı gösterilmiştir [364]. APOE izoformlarının bağışıklığı etkilediği kesin mekanizmalar belirsizdir ve bu mekanizmaları doğrulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.9. Apolipoprotein E İzoformlarının Nöroenflamasyon Üzerindeki Rolü

Mikroglia ve astrositler beyindeki enflamasyonun ana modülatörleri olmakla birlikte, aynı zamanda beyinde ana APOE kaynaklarıdır. Glial kültürlerde APOE eklenmesi, LPS karşı glial aktivasyonun baskılanmasına yardımcı olduğu ve APOE'nin koruyucu bir anti-enflamatuvar yanıt sağladığı gösterilmiştir [365]. Çalışmalar, bu anti-enflamatuvar yanıtın c-Jun N-terminal kinaz'ın kademeli inhibisyon yoluyla etkili olduğunu desteklemektedir [366].

APP'nin APOE-ε4 varlığında mikroglia'yı aktive edebildiğini ve nörotoksik moleküller üretebildiğini, ancak APOE-ε3'ün bu aktivasyonu önleyebildiği de gösterilmiştir [367]. Amiloid beta temizlemede en az etkili olan ve Alzhemier hastalığı riskini artıran APOE'nin ε4 aleli ile KIR2DS2/KIR2DL2/C1 kombinasyonunun ilişkili olduğu ve genel olarak Alzhemier hastalarında (%40,4) kontrollere (%14) kıyasla daha sık bulunduğu saptanmıştır. Ek olarak KIR2DS2/KIR2DL2/C1 kombinasyon varlığında, HHV-6A enfeksiyonu APOE-ε4 mRNA sentezini arttırdığı gözlemlenmiştir [336].

Hayvan çalışmaları, izoformların yanı sıra bir bütün olarak APOE'nin nöroenflamasyonu nasıl etkilediği araştırılmıştır [368]. İnsan APOE-ε4 izoformunu (ε4/3-ε4/4) betimleyen fareler APOE-ε3 izoformunu (ε3/3) veya APOE-ε2 izoformunu (ε2/3-ε2/2) ifade edenlere karşılaştırıldığında, aktive T hücrelerinin dolaşımında arttığı gözlenmiştir. Bu artışın, APOE-ε4 betimleyen dendritik hücrelerin artan antijen sunumundan kaynaklandığı bildirilmiştir [340].

APOE içeren ve APOE içermeyen APP fare modellerine aralıklı olarak LPS uygulandığı çalışmada, APOE varlığında farelerde gliosis ve Aβ birikimi saptanmış ve böylece APOE'nin nöroenflamasyon artışı bir rolü olduğu ileri sürülmüştür [368]. APOE izoformlarına ve enflamatuvar yanıt üzerindeki spesifik etkinin incelendiği çalışmada, insanlaştırılmış APOE-ε3 ve APOE-ε4 pozitif farelere aralıklı ve kronik olarak LPS uygulanmış bunun sonucunda APOE-ε4 farelerinin beyinlerinde bulunan TNFα ve IL-6'da önemli bir artış gözlenmiştir. Araştırmacılar daha sonra küçük bir APOE-benzeri peptidin enflamasyon üzerindeki etkisini incelemişler ve enflamasyonda önemli bir azalma saptamışlardır. Bu sonuçlar APOE izoformlarının beyindeki enflamasyonu etkilediği ve eksojen APOE'nin bu etkileri tersine çevirme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir [369]. Ayrıca APOE, makrofajlar tarafından TNF-α ve IL-1β gibi proenflamatuvar sitokinlerin üretimini izoforma özgü bir şekilde (E2 > E3 > E4) baskılamaktadır [370]. İnsan rekombinant APOE ile nöroglial hücrelerin birlikte inkübasyonu ve doza bağlı LPS uyarımına yanıt olarak TNF-α'nın glial sekresyonunu bloke etmiştir (APOE-ε3 > APOE-ε4) [365].

Makrofajların GM-CSF ve IFN-γ gibi sitokinler ile uyarımı sonucu, APOE sekresyonunda 3-5 kat azalma gözlenirken, TNF-α ve IL-1β için bu oran 2 kat düşüş şeklinde sonuçlanmıştır. Bu sitokinler tarafından APOE sekresyonundaki azalmanın aksine, TGF-β ile uyarılan makrofajlar, kontrollerden 3 kat daha fazla miktarda APOE salgıladı gözlemlenmiştir [371]. TGF-β1, APOE ile benzer yapı içerir ve APOE-ε3 izoformunu içeren lipoproteinler, APOE-ε4 içerenlere göre daha yüksek TGF-β seviyelerine ve biyoaktiviteye sahip olduğu belirtmiştir. TGF-β'nin farklı lipoprotein tipleri ile bağlantısı, ateroskleroz ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıklara faydalı etkileri olabileceği düşünülmektedir [372].

İnsanlaştırılmış APOE-ε3 ve APOE-ε4 fare modellerini kullanan başka bir çalışma, APOE izoformlarının mikroglialardan üretilen nitrik oksit üzerinde düzenleyici rol oynadığını göstermiştir. APOE-ε4 pozitif mikrogliaların APOE-ε3 taşıyan mikroglia'ya göre önemli ölçüde daha fazla nitrik oksit salgıdığını ve bunun APOE-ε4 fare beyinlerinde zararlı etkilere neden olabileceğini göstermişlerdir [373].

Çok sayıda çalışma kemirgen modelleri, insan kaynaklı iPS hücreleri ve birincil kemirgen kültürleri dâhil *in vitro* modelleri ve ayrıca insan biyolojik örneklerinden alınan veriler APOE ile ilişkili patolojileri tasvir etmek için kullanılmıştır. Çalışmaların çoğu, bu deneysel paradigmlar arasında izotipe özgü uyumunu göstermektedir (Şekil 6).

Alzheimer deneylerinde APOE izoformlarına göre farklı faktörlerin etkinliği



Aβ Yüğü	E4>E3>E2	E4>E3>E2	E4>E3>E2
İnsülin Sinyali	E4>E3>E2	E4>E3>E2	E4>E3>E2
Nöronal Toksisite	E4>E3>E2	E4>E3	E4>E3>E2
Glukoz Metabolizması	E4>E3>E2	E4>E3>E2	E4>E3>E2
Sinaptik Fonksiyon	E4>E3>E2	E4>E3	E4>E3>E2
Enflamasyon	E4>E3>E2	E4>E3>E2	E4>E3>E2
Tau aracılı Nörodejenerasyon	E4,E2>E3	E4>E3	E4~E3~E2
KBB Bütünlüğü	E4>E3=E2	E4>E3>E2	E4>E3~E2
Serebrovasküler Fonksiyon	E4>E3>E2	E4>E3	E4,E2>E3
Lipid Taşınması	E4>E3>E2	E4>E3	E4>E3>E2
Bağlantı Ağları	E4>APOE	N/A	E4>E3~E2
Otofaji/endozomlar	E4>E3	E4>E3	E4>E3
Plazma lipitleri	E4~E2	N/A	E4~E2
Obezite	E2>E4	N/A	E4~E2
Nöroenflamasyon	E4>E2	N/A	E4>E2

Şekil 6. Alzhemier hastalığı insan olguları, fare modelleri ve *in vitro* hücre kültür modeli. APOE, Alzheimer hastalığında rol oynayan birçok faktörün etkinliğini izoform bağımlı bir şekilde etkilemektedir. Fare ve *in vitro* modellerde mevcut araştırma verileri insan hasta klinik çalışmaları ile karşılaştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grupları

Hasta ve kontrol gruplarına ait heparinli periferik kan örnekleri, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Davranış Nörolojisi polikliniğinden takipli gönüllü Alzheimer hastalarından (n=17) ve cinsiyet, yaş uyumlu sağlıklı bireylerden (n=8) seçilmiştir. BOS biyobelirteçleri ile Alzheimer patolojisi gösterilmiş hafif ve orta evre Alzheimer hastaları klinik demans ölçeği kutu toplam skorları (CDR=3 ve altında olan hastalar) hesaplanarak çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen tüm olgular; bilgilendirilmiş onam formunu imzalamış, 60 yaş üzeri ve son 2 ay içerisinde COVID-19 geçirmemiş ve/veya son aşılama tarihi üzerinden en az 2 ay geçmiş bireyler arasından seçilmiştir.

3.2. Dahil Edilme Kriterleri

Alzheimer hasta grubunun dâhil edilme kriterleri;

BOS biyobelirteçleri ile Alzheimer patolojisi gösterilmiş olan hastalar klinik demans derecelendirme ölçeğine (CDR) göre 2 alt gruba ayrılmıştır. Hafif (n=7) ve orta-ileri derecede bilişsel bozukluğu olan hastalar (n=10) çalışmaya dahil edilmiştir.

- 60 yaş üzerinde olmak,
- Gönüllülük esasını kabul eden kişiler çalışmaya dâhil edilmiştir.

Sağlıklı kontrol grubunun dâhil edilme kriterleri;

- 60 yaş üzerinde olmak,
- Gönüllülük esasını kabul eden kişiler çalışmaya dâhil edilmiştir.

3.3. Gruplara Göre Dışlanma Kriterleri

Alzheimer demansı olan hasta grubu için dışlama kriterleri,

- Bilinen başka bir nörolojik/psikiyatrik hastalığının olması,
- Geçirilmiş ciddi kafa travması veya beyin ameliyatı öyküsü olması,
- Hastanın çalışmaya katılmasını engelleyecek ciddi bilişsel bozukluğu, mental retardasyonu veya afazisi olması,
- Alzheimer hastalığı dışında bir demans tanısı almış olması (Vasküler bilişsel bozukluk/demans, Lewy cisimcikli demans, karma demans gibi),
- Hipertansiyon, hiperlipidemi, tip 2 diyabet ve yağlı karaciğer hastalığı haricinde kronik hastalıklarının (tip1diyabet, karaciğer sirozu, kalp yetersizliği, kronik böbrek yetersizliği, malignite, otoimmünite, kronik enflamatuvar hastalıklar, kronik obstrüktif akciğer hastalıkları, immünsupresif ilaç kullananlar) olması,
- Sistemik hastalığı olması,
- Son 3 ay içerisinde immünsüpresif ilaç almış olması,
- Son 3 ay içerisinde enfeksiyöz hastalık geçirmiş olmasıdır.

Sağlıklı gönüllülerin dâhil edilmeme kriterleri,

- Sistemik ve nörolojik hastalığı olmak,
- Son 3 ay içerisinde immünsüpresif ilaç almış olmak,
- Son 3 ay içerisinde enfeksiyöz hastalık geçirmiş olmasıdır.

3.4. Gereçler

3.4.1. Cihazlar

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı'nda bulunan ve çalışma sırasında kullanılan cihazların listesi Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Cihaz listesi

Cihaz	Marka	Menşee
Akan Hücre Ölçer	NovoCyte (ACEA-D3005)	ABD

Buz Dolabı	Beko	Türkiye
Santrifüj	Nüve	Türkiye
İnvert Mikroskop	Zeiss	Almanya
Kan Sayım Cihazı	Rayto	Çin
Pipet - 1000µl	Gilson	ABD
Pipet - 100µl	Gilson	ABD
Pipet - 10µl	Gilson	ABD
İnkübatör (Etüv)	Thermo Fisher	ABD
Steril Kabin	Nüve	Türkiye

3.4.2. Kimyasallar

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan reaktif ve çözeltiler markaları belirtilerek Tablo 3.2’de listelenmiştir. Hücre besiyeri olarak zenginleştirilmiş-RPMI-1640 kullanılmıştır.

Tablo 3.2: Reaktif ve çözeltiler listesi

Reaktif ve çözeltiler	Marka	Menşe
Fikol Solüsyonu	eBioscience	ABD
Lizis Çözeltisi	BD Bioscience	ABD
PBS (Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi)	Sigma-Aldrich	ABD
RPMI-1640	Gibco Life Technologies	Birleşik Krallık
Intracellular Staining Perm Wash Buffer (10X)	BD Bioscience	ABD
Cell Stimulation Cocktail	Biolegend	ABD
L-Glutamin	Gibco Life Technologies	Birleşik Krallık
Recombinant Human TGF-β1	Biolegend	ABD
Streptomisin ve penisilin	Gibco Life Technologies	Birleşik Krallık

3.4.2.1. RPMI-1640

Kültür deneylerinde besi yeri ortamı olarak kullanılan Roswell Park Memorial Institute kültür ortamı (RPMI-1640) (Gibco, Life Technologies, UK) antibiyotik, antimikotik ve zenginleştirme maddeleri eklenerek *in vitro* deneylerde kullanılmıştır. RPMI-1640 (500 ml, Gibco, Life Technologies, UK) üzerine, 56°C su banyosunda 30 dakika süreyle inaktive edilmiş steril fetal sıgır serumu %10 (50 ml, Bio Concept, Switzerland), 5 ml 100X penisilin / streptomisin karışımı (Gibco, Life Technologies, UK), 5 ml 100X kanamisin çözeltisi (Gibco, Life Technologies, UK), 5 ml 100X MEM vitamin çözeltisi (Gibco, Life Technologies, UK), 5 ml 200 mM L-glutamin çözeltisi (Gibco, Life Technologies, UK), 5 ml 100X MEM non esansiyel amino

asit çözeltisi (Gibco, Life Technologies, UK), 5 ml 100 mM sodyum piruvat MEM çözeltisi (Gibco, Life Technologies, UK) eklenen RPMI-1640 zenginleştirilmiş RPMI-1640 olarak isimlendirilmiştir.

3.4.2.2. PBS (Fosfat tampon tuz çözeltisi)

PBS (Sigma-Aldrich, ABD), izotonik bir çözelti (pH=7.4) olma özelliğinden dolayı, hücre süspansiyonu hazırlama ve hücre yıkama gibi işlemlerde kullanıldı.

3.4.2.3. Lizis çözeltisi

Eritrositlerin patlatılması amacıyla kullanılmaktadır. 10X konsantrasyona sahip olan ve < %15 formaldehit ve < %50 dietilen glikol içeren FACS Lysing solüsyonu (BD Bioscience, San Jose, ABD) 1:10 oranında distile su ile dilüe edilerek kullanıma hazır hale getirilir ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

3.4.2.4. Hücre kültür uyaranları: aktivasyon kokteyli ve rekombinant insan TGF- β

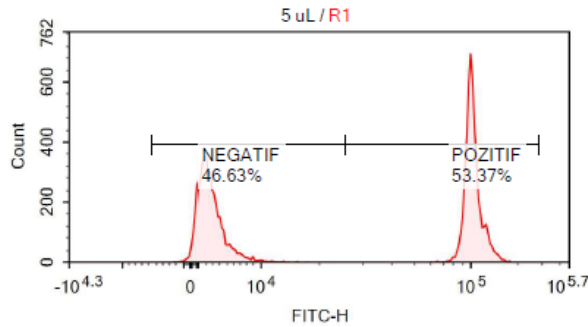
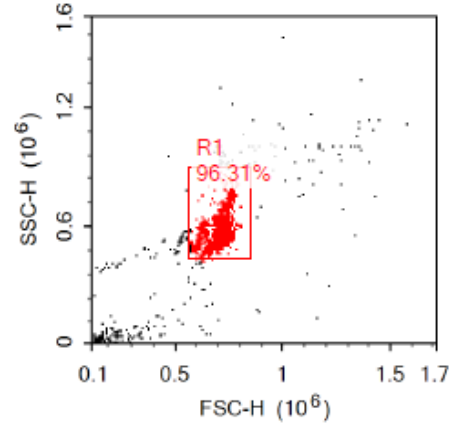
Periferik kan CD3⁺ T, NK ve NK hücre alt gruplarında hedef hücre reseptör profili ve hücre içi sitokin seviyelerini saptamak amacıyla kültür ortamında rekombinant insan TGF- β ve hücre aktivasyon kokteyli uyaran olarak kullanılmıştır.

Optimize edilmiş hücre uyarmı kokteyli (Biolegend, San Diego, California, ABD) DMSO içinde (500X) forbol-12-miristat 13-asetat 40,5 μ M (25 ug/mL) ve ionomisin 669,3 μ M (500 ug/mL) içermektedir. Hücre içi sitokin seviyeleri normal şartlarda düşük seviyelerde olduğu için hücreler PMA ve ionomisin ile uyarılmaktadır.

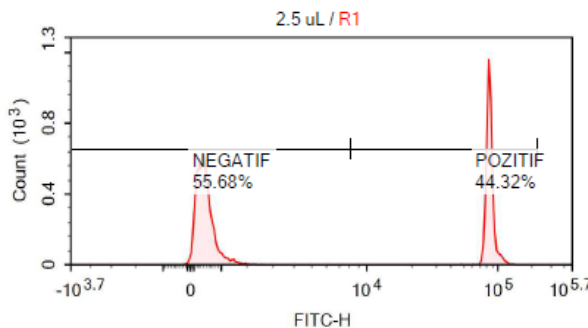
Rekombinant insan TGF- β uyarımı (Biolegend, San Diego, California, ABD), Ala279-Ser390 amino asidi, Çin hamster yumurtalık hücrelerinde sentezlenmiştir. TGF- β hücre büyümesi ve sağ kalımı, hücre farklılaşması ve doku gelişimi, enflamasyon, bağışıklık, hematopoez ve doku yeniden şekillenmesi ve onarımı dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır. TGF- β sitokininin daha önce NK hücre çoğalmasını, reseptör ekspresyonunu ve sitotoksik aktiviteyi azalttığı bildirilmiştir. Diğer yandan, Alzhemier hastalığında NK hücrelerinin bloke etmesi gibi çalışmalar veya bu hastalıkta kullanılan ilaçların NK hücre fonksiyonlarının azalımı ile korele bulunması çalışmamızda, Alzheimer hastalarında NK hücre inhibitör reseptörlerinin hangi yönde düzenlendiğini değerlendirmek ve olası ekspresyon bozukluğunun hücre fonksiyonu ve hastalık prognozu üzerine etkisini saptamak amacıyla inhibitör etkisi olan TGF- β sitokini seçilmiştir.

3.4.3. Antikorlar

Hücre yüzey ve hücre içi proteinlerin saptanması ve hücre gruplarını belirlemek için kullanılan antikorlar Tablo 3.3 ve 3.4 de özetlenmiştir. Hücrelerin fenotipik profilinin belirlenmesinde kullanılan florokrom işaretli antikorlar farklı konsantrasyonlarda denenerek her antikor için uygun titrasyon miktarı belirlenmiştir. Bunun için her antikorun data sheetinde belirtilen miktar baz alınmış, miktarlar kademeli olarak azaltılarak (örn: 5 µl, 2,5 µl, 1 µl) tüplere eklenmesini takiben birer damla pozitif ve negatif BD FACS kontrol tüpü eklenerek titrasyon tüpleri hazırlanmıştır. On dakika 4°C'de bekletildikten sonra cihazında değerlendirilerek MFI değerlerine göre kullanılacak antikorlar belirlenmiştir. Bu amaçla, üç doz şeklinde belirlenen antikorlar miktarları kompanzasyon panelinde tek tek okutularak pozitif ve negatif kontrolün antikorların pozitif mean değerleri, en yüksek antikor dozuna göre mean pozitif değeri %30'un altında olacak şekilde seçilmiştir ve projeye eklenmiştir (Şekil 7).



Gate	Count	% R1	% All	Mean X	Median X
R1	9.250	100.00 %	92.50 %	56.923.96	89.190.00
NEGATIF	4.313	46.63 %	43.13 %	2.888.31	2.428.00
POZITIF	4.937	53.37 %	49.37 %	104.129.91	101.265.00



Gate	Count	% R1	% All	Mean X	Median X
R1	9.631	100.00 %	96.31 %	38.006.60	869.00
NEGATIF	5.363	55.68 %	53.63 %	489.22	420.00
POZITIF	4.268	44.32 %	42.68 %	85.149.47	83.905.00

Şekil 7. Antikor titrasyonunda MFI % değerleri (LAG-3)

Tablo 3.3: Hücre yüzey boyamasında kullanılan antikorlar

Monoklonal Antikor	Renk	Klon	Firma	Her test için kullanılan miktar
CD366 (TİM-3)	Brilliant Violet 510™	F38-2E2	BIOLEGEND	2,5 µL
CD223 (LAG-3)	FITC	11C3C65	BIOLEGEND	2,5 µL
CD16	Brilliant Violet 421™	B73.1	BIOLEGEND	2,5 µL
CD56 (NCAM)	Brilliant Violet 650™	5.1H11	BIOLEGEND	2,5 µL
CD3	PE/Cyanine5	UCHT1	BIOLEGEND	3 µL
CD289 (TLR9)	APC	S16013D	BIOLEGEND	2,5 µL
TIGIT(WUCAM)	BV711	741182	BD	3 µL
CD314 (NKG2D)	BV786	1D11	BD	3 µL

Tablo 3.4: Hücre içi sitokin boyamada kullanılan antikorlar

Monoklonal Antikor	Renk	Klon	Firma	Her test için kullanılan miktar
IFN-γ	PE/Cyanine7	4S.B3	BIOLEGEND	2,5 µL
TNF-α	Alexa Fluor® 700	MAb11	BIOLEGEND	3 µL

3.5. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu

Heparinli tüplere alınan 10 ml periferik venöz kan örneği, 1:1 oranında PBS ile seyreltildikten sonra, 50 ml'lik konik tabanlı bir falcon tüpüne, oda sıcaklığındaki steril fikol (Biochrom AG, Berlin, Germany; yoğunluk: 1,077 g/ml) üzerine, pastör pipeti kullanılarak 1:1 oranında dikkatlice eklenmiştir. Bu işlem sırasında, Biocoll ile seyreltilmiş kan örneğinin karışmamasına ve iki sıvının ayrı katmanlar halinde kalmasına özen gösterilmiştir.

Örneklerin 2000 devirde, 20 dakika ve +20°C'de santrifüjünü takiben, kan-PBS karışımının en üstte kalan plazma kısmı pastör pipeti ile uzaklaştırıldıktan sonra PKMH'lerin bulunduğu, fikol ile plazma arasında ince bir tabaka halinde gözlenen beyaz bulutsu katman pastör pipeti ile toplanarak 15 ml'lik konik tabanlı steril falcon tüpüne alınmıştır. Üzerine 15 ml'ye tamamlanacak şekilde steril PBS çözeltisi eklendikten sonra tüpler, 2000 devirde 10 dakika ve +8°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvının uzaklaştırılması ile elde edilen PKMH'lerin üzerine tekrar 15 ml steril PBS eklenerek 5 dakika 1250 devirde ve +4°C'de ikinci kez yıkama işlemi yapılmıştır.

Yıkama sonrası üst sıvıları uzaklaştırılan PKMH'lerin üzerine 2 ml zenginleştirilmiş RPMI-1640 medyumuna eklenerek hücre sayımı aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla, 20 µl PKMH hücre süspansiyonu, 20 µl tripan mavisini boyasıyla karıştırıldıktan sonra, tripan mavisinin yalnız ölü hücreleri boyama özelliğinden yararlanılarak Neubauer Sayma Kamarası yardımıyla ışık mikroskopunda 1 ml'de bulunan canlı PKMH sayısı hesaplanmıştır.

3.5.1 Hücre yüzey molekülleri ve hücre içi sitokin tayini

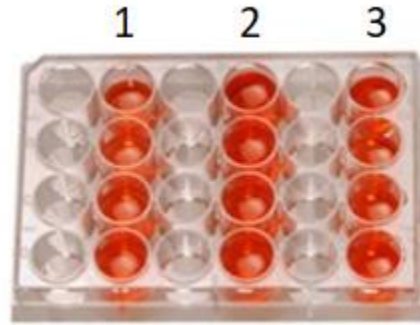
PKMH'ler, 24 saat süreyle rekombinant insan TGF-β uyarını (Biolegend, San Diego, California, ABD) 200 µg/mL stok konsantrasyondan 1:100 kullanılarak 500 µl hacim için 5 µl olarak (2 µg/mL) kullanılmıştır.

Bu doz için öncelikle PKMH'ler farklı 2 doz TGF-β ile (1 µg/mL ve 2 µg/mL) 24 ve 48 saat uyarılmıştır. Kontrol olarak uyarısız PKMH kullanılmıştır. 48 saat TGF-β uyarım sonucunda NK hücrelerin ölümü diğer uyarısız ve 24 saat uyarım koşuluna göre arttığını ve NK hücre immünprofillerin düşük ifade düzeyleri gösterdiği saptanmıştır. Ancak 24 saat süreyle TGF-β uyarımı koşulunda NK hücre sağ kalımı ve immünprofil ifade düzeylerinin uyarısız koşuluna göre benzer bulunmasından ötür TGF-β uyarım dozunun artırılmasına karar verilmiştir. 500 µl hacim için 5 µl olarak (2 µg/mL) kullanılan TGF-β uyarımı kontrol koşuluna göre hedef reseptörler ve hücre içi sitokinlerde belirgin ekspresyon değişimlerine yol açtığı saptanmıştır. Farklı iki doz

uyarımı karşılaştırıldığında 2 µg/ml TGF-β uyarımının 24. saatte etkili olduğu saptandı ve bütün deneylerde bu doz ve zaman kullanılmıştır (Şekil 8).

Şekil 8. Kültür koşulları

1. PKMH
2. PKMH + rekombinant TGF-β
3. PKMH + hücre uyarım kokteyli



Her mL hücre süspansiyonu başına 2 µL (1/500 dilüsyon) hücre uyarım kokteyli eklenerek 4 saat boyunca kültür edildikten sonra uyarılan hücreler tüplere alınıp üzerlerine 2 ml PBS eklenerek 1800 devirde 10 dakika santrifüj edildi, üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 1 ml PBS eklenerek 2×10^6 /ml üstünde PKMH hücre süspansiyonu elde edilmiştir.

PKMH süspansiyonunda önce hücre yüzey boyaması yapılarak $CD3^+CD16^+CD56^+$ ve $CD3^+CD16^-CD56^+$ NK hücreleri ve takiben hücre içi IFN-γ ve TNF-α sitokin seviyeleri akan hücre ölçer cihazı ile saptanmıştır (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, USA). Bu amaçla PKMH'ler (5×10^5 hücre/mL) 3 farklı şekilde kültüre edilmiştir.

1. PKMH: Farklı donör gruplarının spontan NK reseptör ve sitokin profilini belirlemek için kontrol amacıyla kullanılmıştır.
2. PKMH + rekombinant TGF-β: NK hücre profil ve hücre içi sitokin yanıtını incelemek için ortama TGF-β eklenmiştir.
3. PKMH + hücre uyarımı kokteyli: NK hücre profil ve hücre içi sitokin yanıtını incelemek için ortama hücre uyarımı kokteyli eklenmiştir.

Kültür plakları %5 CO₂ içeren 37°C etüvde, 24 saat inkübe edildikten sonra, kültürün son 4 saatinde, uyarılmamış 3. ortamın üzerine hücre aktivasyon kokteyli (2 µl) (BioLegend, San Diego, California) ilave edilerek tekrardan inkübasyon için etüve kaldırılmıştır. Inkübasyonu takiben PBS solüsyonu eklenerek yıkama işleminden sonra üst sıvı uzaklaştırılarak hücreler 100 µl PBS sıvısı eklenmiştir. Ardından NK hücrelerinde yüzey moleküllerin ve hücre içi sitokinlerin ölçümü için boyama aşamasına geçilmiştir.

3.5.2. Hücre Yüzey Boyaması

Sitokin uyarımı yapılmayan, hücre uyarım kokteyli ve TGF- β uyarımı yapılan (2.5×10^5 hücre/ml) hücre süspansiyonuna anti-CD3-PE/Cyanine5, anti-CD16-Brilliant-Violet 421™, anti-CD56-Brilliant-Violet 650™, anti-TLR9-APC, anti-NKG2D-BV786, anti-TIGIT-BV711, anti-LAG3-FITC ve anti-Tim3-Brilliant Violet 510™ işaretli monoklonal antikorlar eklenerek 20 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübasyonu takiben üzerlerine 2 ml PBS eklenen tüpler, 1800 devirde 10 dk santrifüj edilerek hücre içi boyama aşamalarına geçilmiştir.

3.5.3. Hücre İçi Boyama

Hücre içi sitokin seviyelerini saptamak için Fiksasyon & Permeabilizasyon kiti (eBioscience Inc., San Diego, ABD) kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle uyarım sonrası hücre üst sıvıları uzaklaştırıldıktan sonra, hücre pelleti üzerine 100 μ l 1X fiksasyon sıvısı eklenip vorteks ile karıştırıldıktan sonra 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Fiksasyon işlemini takiben, tüplere 2 ml 1X permeabilizasyon sıvısı eklenip ve 1800 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra, üst sıvı uzaklaştırılarak tüplere 100 μ l 1X permeabilizasyon sıvısı ve PE/Cyanine7 işaretli anti-IFN- γ (BioLegend, San Diego, California, ABD), Alexa Fluor® 700 işaretli anti-TNF- α (BioLegend, San Diego, California, ABD) monoklonal antikorları eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben tüplere 2 ml 1X permeabilizasyon sıvısı eklenerek 1800 devirde 5 dk santrifüj edilip, üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine 300 μ l FACS flow sheat sıvısı eklenen tüplerin değerlendirilmesi için ‘NovoCyte (ACEA-D3005)’ (ACEA, Biosciences, ABD) akan hücre ölçer cihazı ve Novo Express v.1.2.4 (ACEA, Biosciences, ABD) yazılımı kullanılmıştır.

3.5.4. CD107a ekspresyonu ve sitotoksik aktivite

Çalışmaya hafif (n=4) ve orta-ileri derecede bilişsel bozukluğu olan (n=5) toplam 9 Alzheimer hastası ve 6 sağlıklı birey (15 kadın, ortalama yaş; 60 ± 3) dâhil edilmiştir. Helsinki bildirgesine uygun olarak yerel etik komite onayı ve sağlıklı deneklerin bilgilendirilmiş onamı alınmıştır. Stimülasyon adımları için, hafif düzeyde (CDR<1) ve orta-ileri derece (CDR>1) Alzheimer hasta gruplarının PKMH örnekleri 24 saat süreyle stimülasyonsuz ve rekombinant insan 200 μ g/ml TGF- β (Biolegend, San Diego, California, ABD) varlığında kültür edildikten sonra hücreler toplanarak, 5:1 efektör/hedef oranında ile 37°C’de 5 saat boyunca K562 hücreleri ile anti human-CD107a-PECy7 varlığında inkübe edilmiştir. Tek başına uyarılmamış PKMH örnekleri (US) kontrol olarak kullanılmış, inkübasyon sonrası hücreler anti-human-CD16⁺56⁻ PE

monoklonal antikoru (BD Bioscience, San Jose, ABD) ile boyanmıştır. Yüzey boyaması sonrası tüplere %1 paraformaldehit li PBS ilave edilerek, CD3⁻CD16⁺56⁺ NK hücre alt grubunda CD107a ekspresyonu NovoCyte (ACEA-D3005) (ACEA, Biosciences, ABD) akan hücre ölçer cihazında ve NovoExpress yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.5.5. Apolipoprotein E izoformlarının belirlenmesi

3.5.4.1. Periferik kandan DNA izolasyonu

Periferik kandan DNA materyali tuzla çöktürme yöntemi ile izole edilmiştir. Sırasıyla aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

1. 10 ml EDTA'lı periferik kan, 50 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 30 ml (1:3 oranında) RBL (Eritrosit Parçalama Çözeltisi) eklendi. RBL ile karıştırılan kan 20 dakika, +4°C sıcaklıkta bekletildi ve 10 dakika, 1500 devir/dakika santrifüj edilmiştir.

2. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet homojenize edilerek üzerine 20 ml RBL eklendi. 1500 devir/dakika 10 dakika santrifüj edilmiştir.

3. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet homojenize edildi. Üzerine 500 µl SDS (10%), 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 10 ml WBL (Lökosit Parçalama Çözeltisi) eklenerek gece boyu 56°C'de inkübe edilmiştir.

4. Inkübasyonun ardından örnekler 4 ml 9.5M NH₄Ac çözeltisi eklenerek homojen bir görünüm alana kadar iyice karıştırılmıştır.

5. Örnekler -20°C'de 20 dakika bekletildikten sonra +4°C'de 45 dakika 4700 devir/dakika santrifüj edilmiştir.

6. Santrifüj sonrasında süpernatant steril bir falkon tüpüne aktararak üzerine 1:2 oranında ≥99.8 etanol absolüt ekleyerek ve DNA'nın toplanması beklenmiştir.

7. Toplanan DNA steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpe aktarıldı ve üzerine %70'lik etanol eklenerek 5 dakika 14.000 devir/dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası üst faz pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve tüpler oda ısısında bekletilerek alkolün uçması sağlanmıştır.

8. Elde edilen DNA büyüklüğüne göre 100-400 µl Tris-EDTA tampon çözeltisi eklenerek DNA çözüldü. Çözülen DNA örnekleri +4°C'de saklanmıştır.

3.5.4.2. DNA konsantrasyonu ve saflığının ölçümü

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometrede (NanoDrop-2000) belirlenmiştir. Stok DNA örneğinden 1 µl alınarak 260 ve 280 nm dalga boylarındaki emilim (absorbsiyon) değerleri ölçülmüştür. DNA; $OD_{260}/OD_{280} \approx 1.8$ ise saf, $OD_{260}/OD_{280} < 1.8$ ise protein, fenol yada diğer kirleticilerin kontaminasyonu olarak değerlendirilmiştir.

3.5.4.3. APOE genotiplenmesi

APOE geni kodon 112 ve kodon 158 bölgelerinde yer alan polimorfizmler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile çoğaltılarak hasta ve kontrol grubunda APOE $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ allel taşıyıcılıkları belirlenmiştir. DNA örneklerinin genotiplenmeleri florasen hidroliz problemleri kullanılarak 'Light Cycler 480' cihazında yapıldı. Çalışmada kullanılan hidroliz problemleri ve primer dizileri Tablo 3-5 ve Tablo 3-6'de verilmektedir.

Tablo Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı.-5: APOE112 ve APOE158 için primer dizileri ve erime sıcaklıkları

Primer Adı	Primer Dizisi	Erime Sıcaklığı°C (T _m)
APOE 112 For	5'-GCGGGCACGGCTGT-3'	53
APOE 112 Rev	5'-GCTTGCGCAGGTGGGA-3'	56
APOE 158 For	5'-TCCGCGATGCCGA-3'	44
APOE 158 Rev	5'-CGGGCCCCGGC-3'	44

Tablo Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı.-6: APOE112 ve APOE158 için prob dizileri

Prob Adı	Prob Dizisi
APOE 112 Fam	ATGGAGGACGTGCGCGGCC
APOE 112 Yak	ATGGAGGACGTGTGCGGCC
APOE 158 Fam	ACACTGCCAGGCACTTCTGCA
APOE 158 Yak	ACACTGCCAGGCGCTTCTGCA

PZR için karışımın içeriği Tablo 3-7'de belirtilmiştir.

1. Hazırlanan PZR karışımından 9 µl alınarak, 96 kuyuluk PZR pleytinin tüm kuyularına dağıtılmıştır.
2. Daha sonra kuyularda bulunan karışımın üzerine 50 ng konsantrasyona ayarlanan DNA örneklerinden 1 µl eklenmiştir.
3. 96 kuyuluk PZR pleytinin üzeri şeffaf koruyucu film ile kaplandıktan sonra 2 dakika 1500 x *g*’de santrifüj edilmiştir.
4. PZR pleyti ‘*Light cycler 480*’ cihazına yerleştirilerek program başlatıldı. Kullanılan programın sıcaklık döngüleri Tablo 3-8’de verilmektedir.

Tablo Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı.-7: APOE112 ve APOE158 RT-PZR karışımının içeriği

Bileşen	Miktar (µl)
dh20	1.9
DMSO	0.7
Prob Master Karışımı	4
10 µM Primer F	0.2
10 µM Primer R	0.2
1 µM Probe Fam	1
1 µM Probe Yak	1
DNA	1

Tablo Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı.-8: APOE112 ve APOE158 için kullanılan RT-PZR programının sıcaklık döngüleri

Sıcaklık (°C)	Süre	Sıcaklık değişim oranı (°C/saniye)
Pre-Pre-İnkübasyon (1x)		
50	2 dakika	4.4
Pre-İnkübasyon (1x)		
95	10 dakika	4.4

Amplifikasyon (45x)		
95	10 saniye	4.4
56	30 saniye	2.2
72	1 saniye	4.4
Soğutma (1x)		
40	10 saniye	2

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz

Verilerin istatistiksel hesaplamaları IBM SPSS 17.0 istatistik programı ile yapılmıştır. Grupların normal dağılıma uygunluklarının belirlenmesinde Kolmogorov-Smirnov testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan (parametrik) üçlü gruplar arası karşılaştırmalar için ANOVA ve post-hoc analiz için Tukey testi uygulanmıştır. Parametrik olmayan değerler için ANOVA testi ve post-hoc Dunnett testi kullanılmıştır. Parametrik olmayan değerler için ikili grupların karşılaştırılması ise *Bağımsız Örneklem Mann-Whitney U* testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı ($p < 0.05$) kabul edilmiştir. Verilerin grafiksel çizimleri için GraphPad 7.0 programı kullanılmıştır.

Çalışmamızda Proje kapsamında çalışılması planlanan klinik spektruma sahip tip 2 diyabetli hastalarının temininde yaşanan sorunlar nedeniyle, bu hasta popülasyonunun çıkarılmasına ve çalışmalara Apolipoprotein E4 pozitif olan ve olmayan olgular şeklinde devam edilmesine karar verildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik ve Demografik Veriler

Çalışma grubuna ait klinik ve demografik veriler Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Alzhemir hastaları klinik demans derecelendirme ölçeğine (CDR) göre 2 alt gruba ayrılmıştır. Hafif (n=7) ve orta-ileri derecede bilişsel bozukluğu olan hastalar (n=10) çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 4-1: Klinik ve demografik veriler

	Hafif AH (CDR<1)	Orta/İleri AH (CDR>1)	Sağlıklı Kontrol
Cinsiyet (E, K /(n))	K/7	K/10	K/10
Yaş (yıl, ort ± ss)	73.57 ± 9.54	71.5 ± 7.8	64.70 ± 7.86
Hastalık süresi (yıl, ort ± ss)	3.86 ± 1.68	6.5 ± 2.3	-
İzleme süresi (yıl, ort ± ss)	2.14 ± 1.57	3.3 ± 1.4	-
CDR (ort ± ss)	0.50 ± 0.00	2 ± 0.6	-

AH, Alzheimer hastaları; E, erkek; K, kadın; ort, ortalama; CDR, demans derecelendirme ölçeği; SS, standart sapma

4.2. Periferik Kan Mononükleer Hücre Örneklerinin İmmünofenotipik Değerlendirilmesi

Alzheimer hasta gruplarında immün sistem hücrelerinin rolünü saptamak amacıyla hafif ve orta-ileri derecede Alzheimer hastalığı olan bireyler ile sağlıklı kişilerin periferik kan immünofenotipik değerlendirilmesi için hücre ölçeği sistemi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, Alzheimer hastalarının taşıdığı apolipoprotein izoformuna göre immün hücreler incelenmiştir.

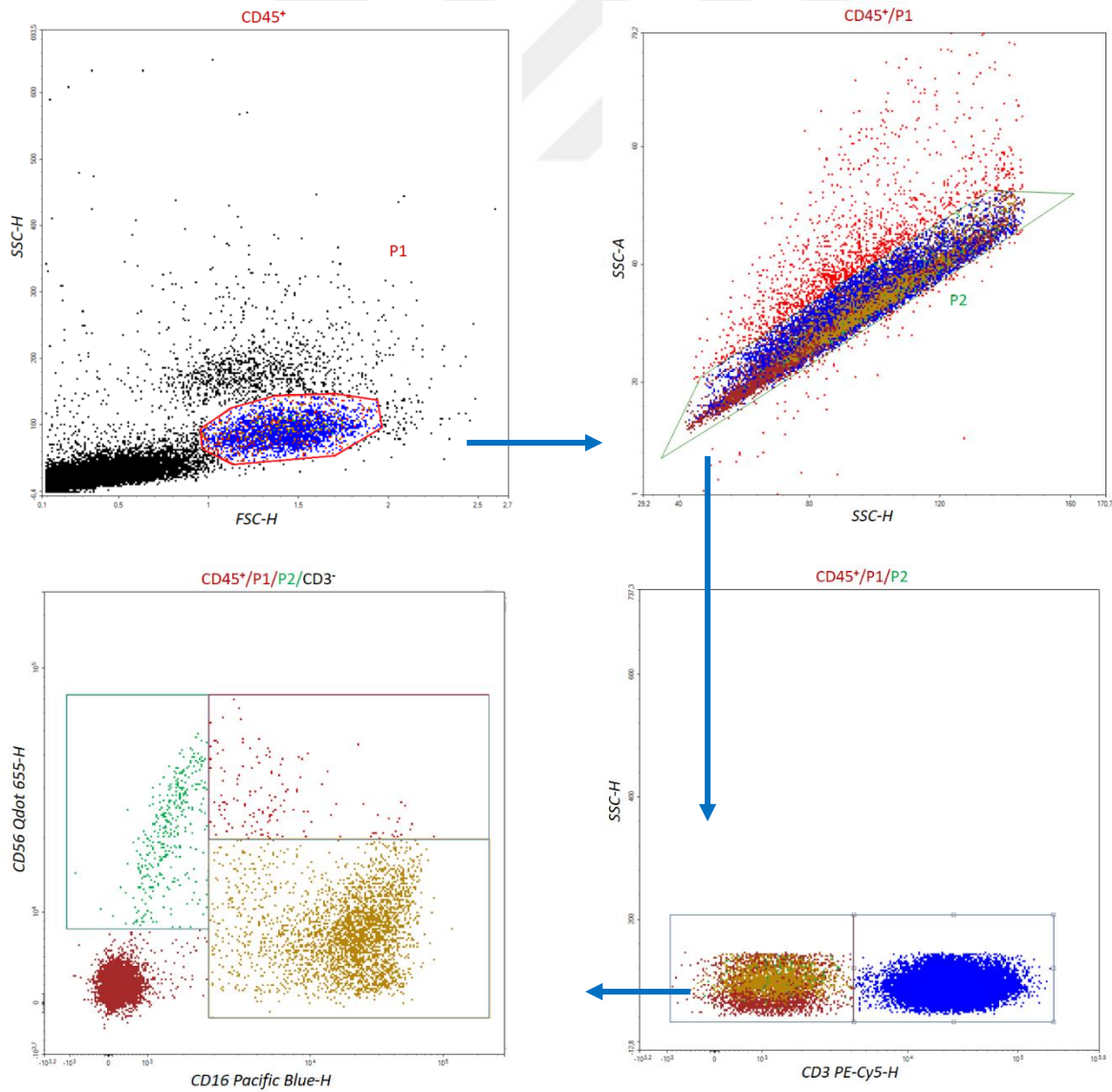
İmmünofenotipleme öncesinde periferik kan örneklerinde kan sayımı yapılmış ve kullanılacak örnek miktarı WBC sayısı dikkate alınarak belirlenmiştir. Çalışmaya dâhil edilen Alzheimer hastaları ve kontrol gruba ait kan sayım değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Kan sayım değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; Alzheimer hastalarına ait periferik kan lenfosit, monosit ve granülosit sayılarında kontrol grubuna göre fark saptanmamıştır.

Tablo 4-2: Periferik kan örneklerinin kan sayım değerleri

	CDR<1	CDR>1	Sağlıklı Kontrol
	Ortalama değer ($\times 10^3/\mu\text{l}$) (minimum-maksimum)	Ortalama değer ($\times 10^3/\mu\text{l}$) (minimum-maksimum)	Ortalama değer ($\times 10^3/\mu\text{l}$) (minimum-maksimum)
# WBC	10,59 (7,15-14,57)	10,50 (4,11-19,78)	6,72 (2,7-10,28)
# Lenfosit	8,21 (6,37-10,55)	8,07 (3,95-15,73)	4,94 (2,09-8,35)
# Monosit	0,79 (0,25-1,34)	0,83 (0,23-1,91)	0,44 (0,3-0,74)
# Granülosit	1,77 (0,53-2,68)	1,65 (0,29-3,44)	1,34 (0,24-4,89)
% Lenfosit	77,47 (72,4-89,6)	77,6 (62,6-88,9)	74,55 (37,6-92,1)
% Monosit	6,95 (3,3-9,2)	7,35 (4,3-10,2)	7,57 (3,5-11)
% Granülosit	15,57 (7,1-18,7)	15,04 (5-29,5)	17,87 (4,4-55,7)

NK ve NK hücre alt gruplarını saptamak için, SSC (Side Scatter)/FSC (Forward Scatter) grafiğinde CD45^+ lenfosit popülasyonu kapılanmıştır. SSC-Alan (SSC-A)/SSC-Yükseklik (SSC-H) grafiği oluşturularak lenfosit kapısı içindeki hücrelerden tek hücre popülasyonu kapılanarak doublet hücreler uzaklaştırılmıştır. Bu hücre popülasyonunu tanıyan SSC/CD3 dot plot grafiği oluşturulmuştur. CD3^+ T hücreler kapılanarak total CD3^+ T hücre oranları ve CD3^- hücreler

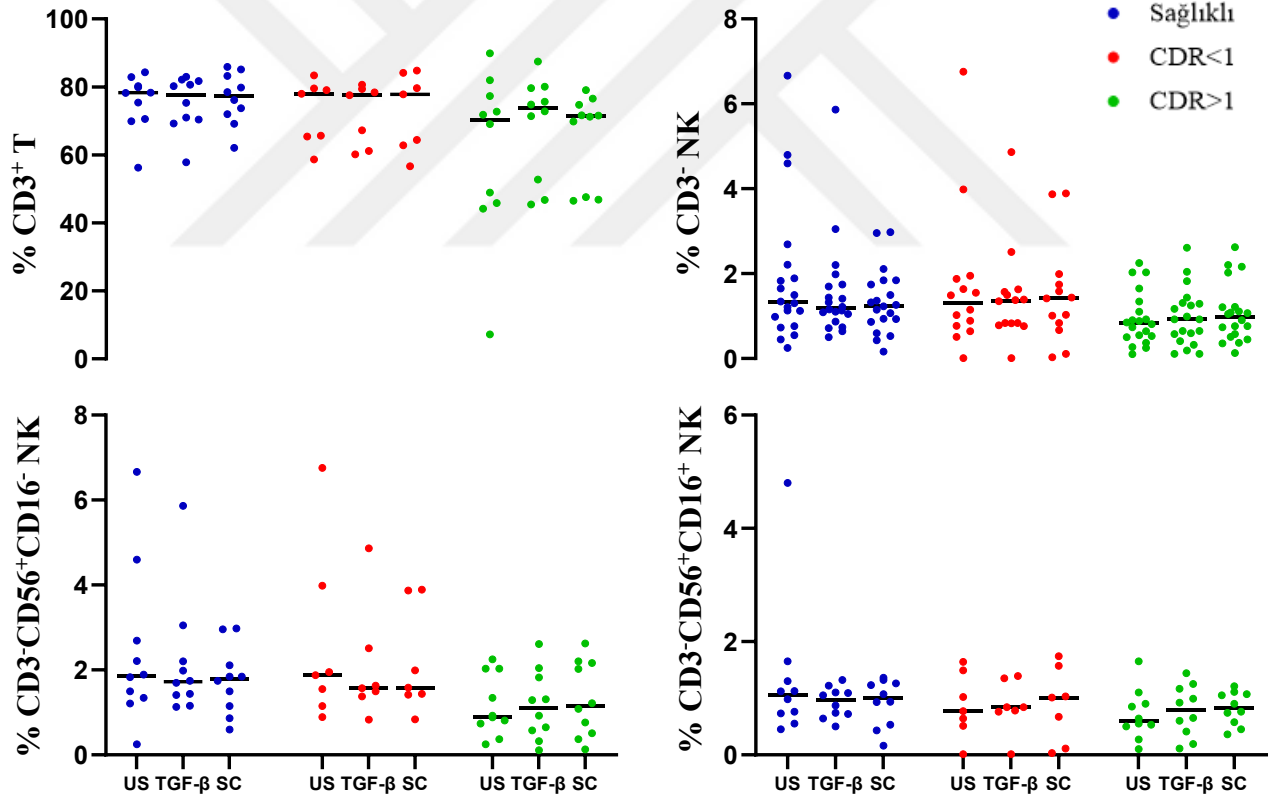
kapılanarak CD3⁻ NK hücreleri saptanmıştır. CD3⁻ NK hücre popülasyonunda CD16 ve CD56 ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. CD3⁺ T hücreleri ve CD3⁻CD56⁺CD16⁻ ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK popülasyonlarında NKG2D, TLR9, TIGIT, LAG-3 ve TIM-3 reseptör ekspresyonları, hücre içi IFN- γ ve TNF- α seviyeleri ve sitotoksik aktivite seviyeleri belirlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Sağlıklı kontrol periferik kan örneğinde $CD3^+$ T, $CD3^-$ NK ve $CD3^-$ NK hücre alt gruplarının akan hücre ölçerlerde kapılama stratejisi

4.2.1. $CD3^+$ T, NK ve NK hücre alt grupları

Hafif düzeyde ($CDR < 1$) ve orta-ileri derece ($CDR > 1$) Alzheimer hasta grupları ve sağlıklı kontrol grubunun periferik kan örnekleri üç farklı koşulda (uyarısız - US, $TGF-\beta$ uyarımı ve hücre uyarım kokteyli - SC) kültüre edildikten sonra $CD3^+$ T, $CD3^-$ NK, $CD3^-CD56^+CD16^-$ ve $CD3^-CD56^+CD16^+$ NK hücre yüzey molekül ekspresyonları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 10).

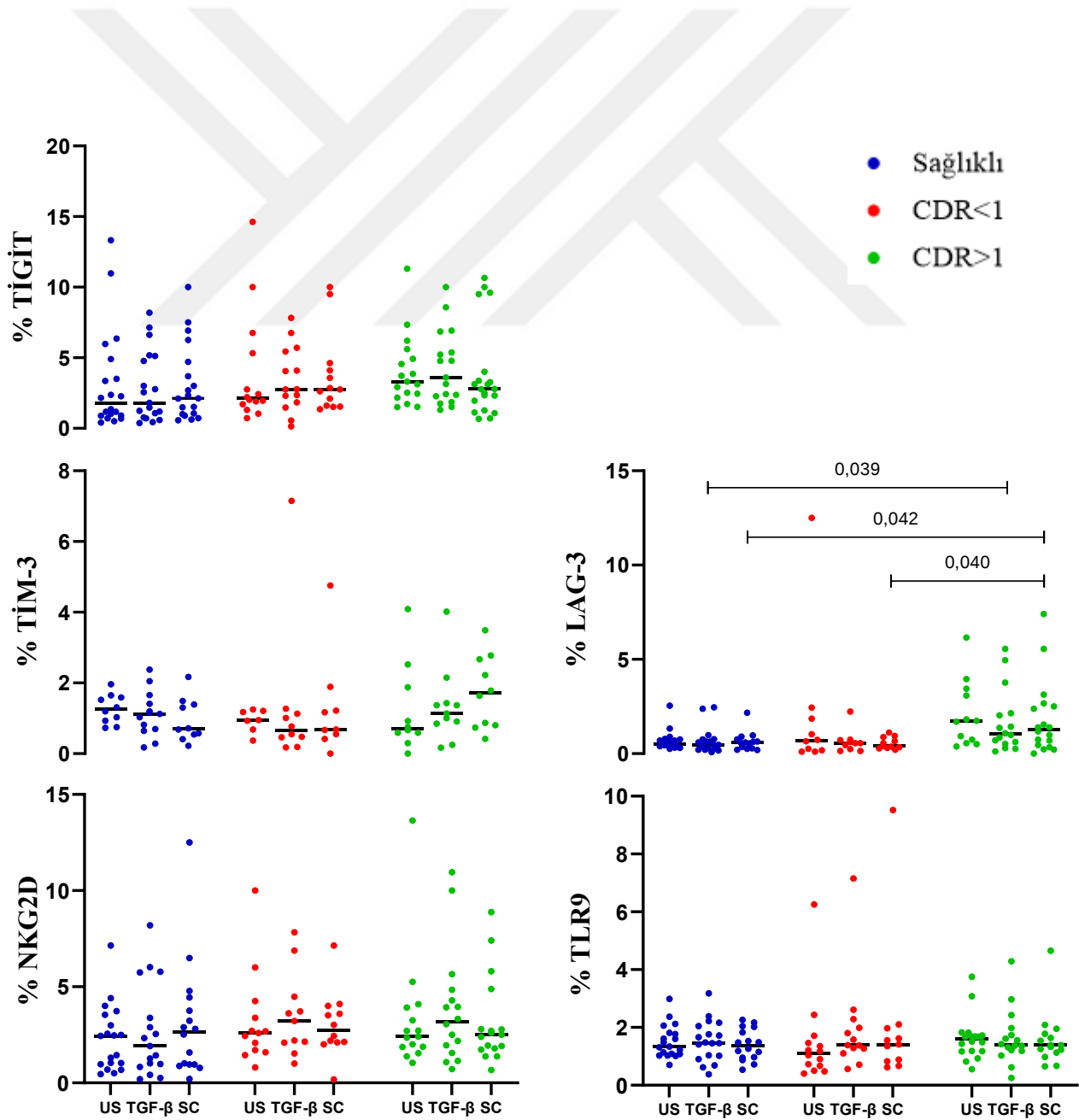


Şekil 10. $CD3^+$ T, $CD3^-$ NK, $CD3^-CD56^+CD16^-$ NK, $CD3^-CD56^+CD16^+$ NK hücre ekspresyon seviyeleri

4.2.2. NK hücre yüzey molekül ekspresyon düzeyleri

Akan hücre ölçer cihazında SSC ve FSC grafiğinde lenfosit popülasyonu kapılanmıştır. Lenfosit popülasyonunda $CD3^+$ ve $CD3^-$ hücre popülasyonları kaplandıktan sonra, $CD3^-$ NK hücre popülasyonu içerisinde $CD3^-CD56^+CD16^-$ NK ve $CD3^-CD56^+CD16^+$ NK hücreleri

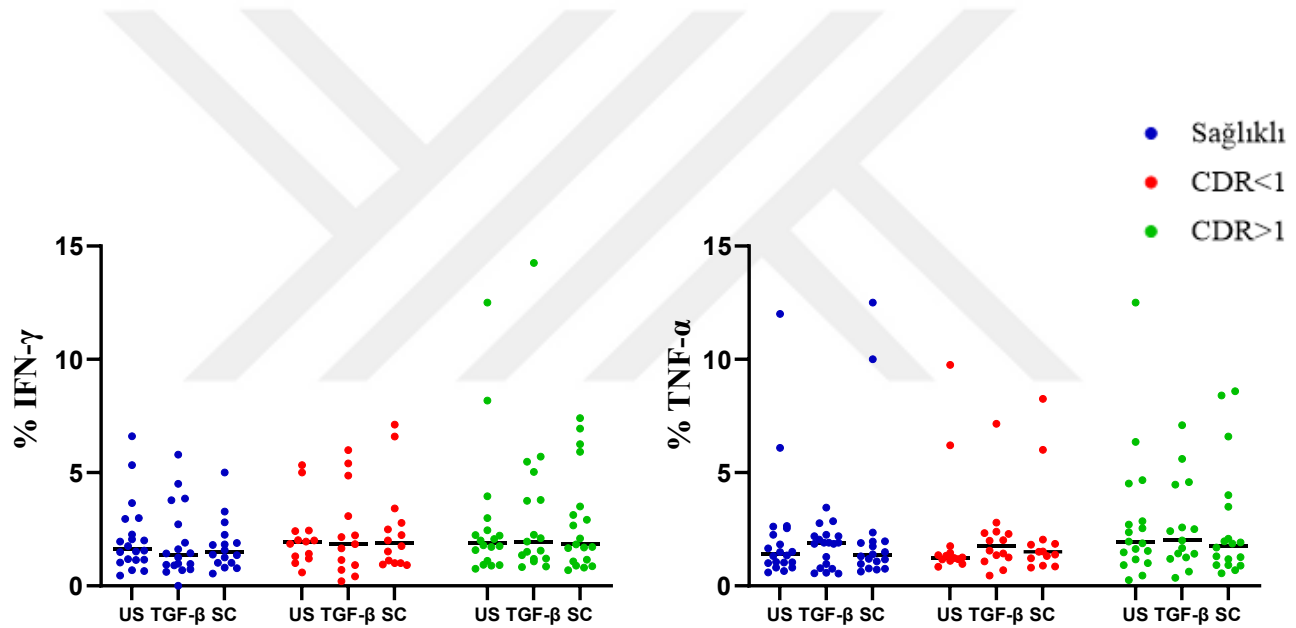
kapılanarak bu iki popölasyonda NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 yüzey molekülleri, Alzheimer hasta grupları (CDR<1 ve CDR>1) ve kontrol grubu arasında karşılaştırılmıştır. TGF- β ile uyarım sonrası LAG-3 reseptör ekspresyonu orta-ileri derece (CDR>1) Alzheimer hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0.039). Benzer şekilde hücre uyarımı kokteyli ile uyarım sonrası LAG-3 ekspresyonu orta-ileri derece (CDR>1) hasta grubunda hafif düzey (CDR<1) (p=0.040) ve kontrol (p=0.042) grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (Şekil 11).



Şekil 11. NK hücrelerinde NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyon seviyeleri

4.2.3. NK hücre içi sitokin seviyeleri

CD3⁻ NK hücre popülasyonu içerisinde CD3⁻CD56⁺CD16⁻ NK ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre içi IFN- γ ve TNF- α seviyeleri uyarımsız, TGF- β ve SC ile uyarım sonrası Alzheimer hasta grupları (CDR<1 ve CDR>1) ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 12).



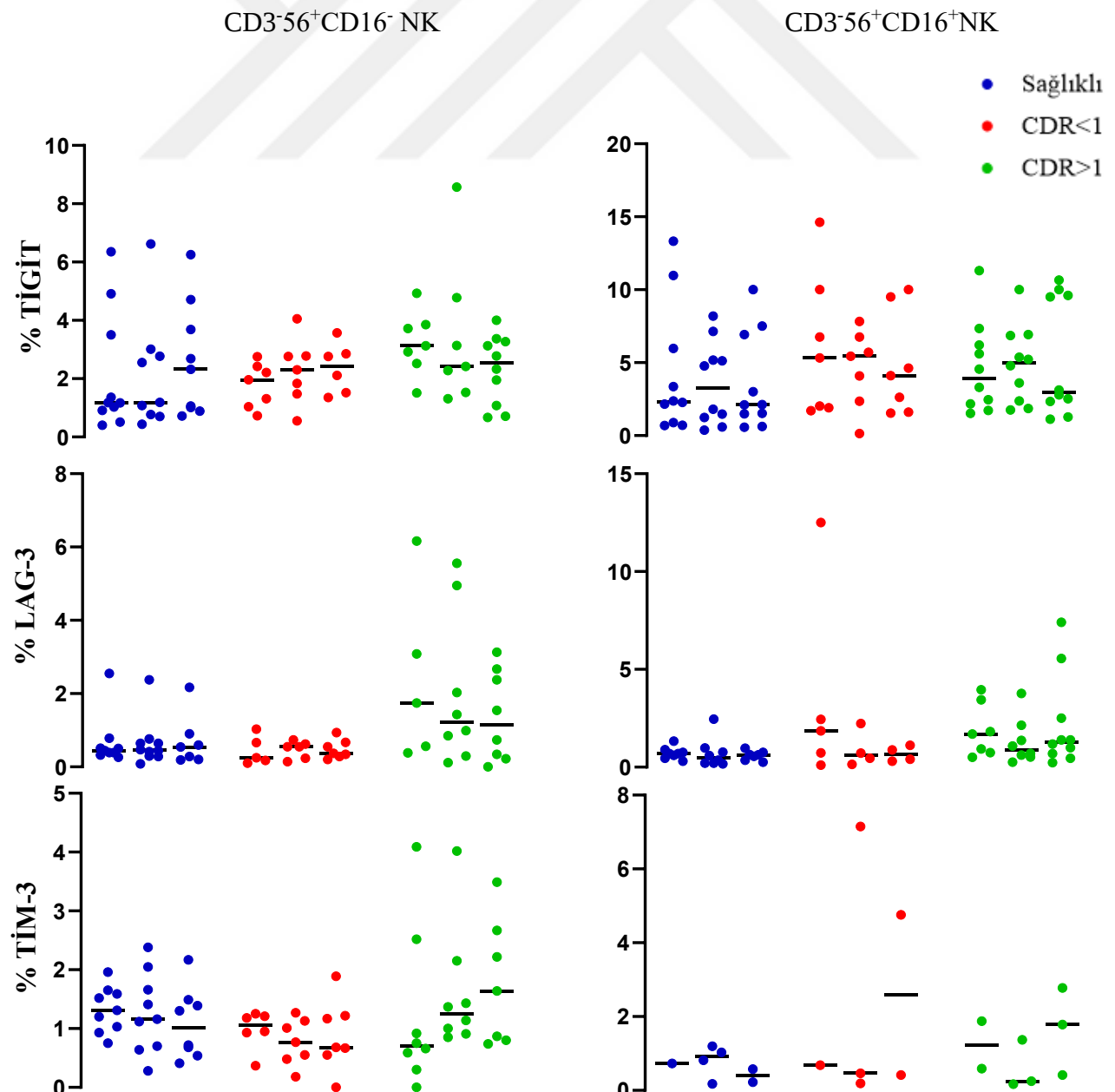
Şekil 12. NK hücre içi IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri

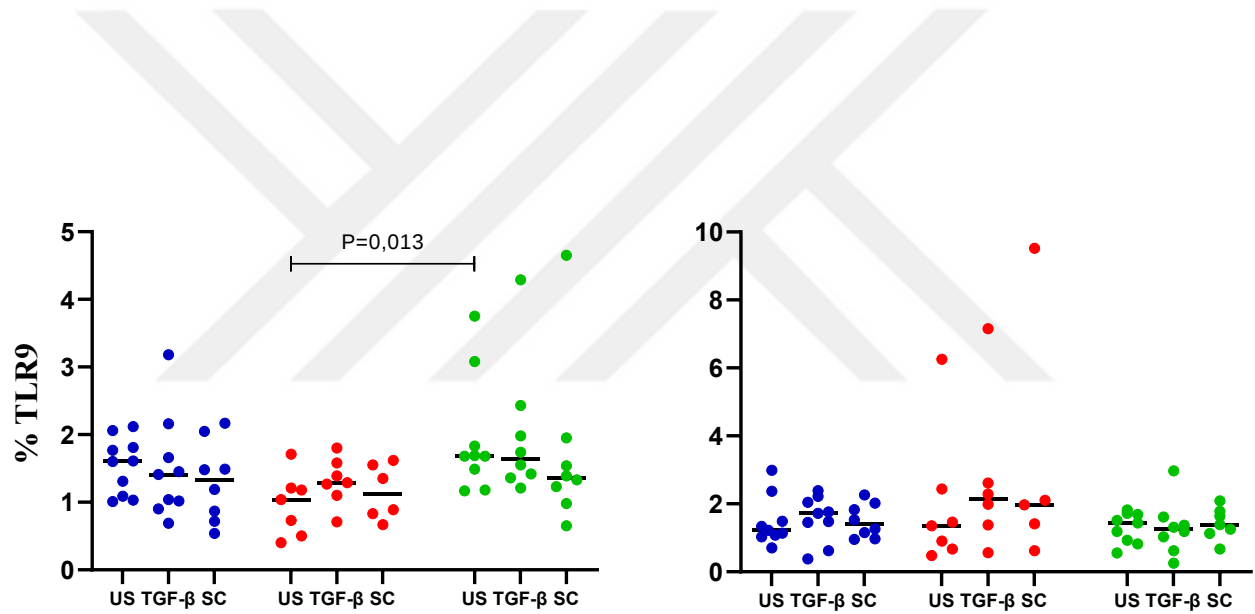
4.2.4. NK hücre alt gruplarında yüzey molekül ekspresyonları

Uyarımsız, TGF- β ve SC ile kültür sonrası CD3⁻ NK hücre popülasyonu içerisinde CD3⁻CD56⁺CD16⁻ ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt gruplarında NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 yüzey molekül ekspresyonları Alzheimer CDR<1 ve CDR>1 hasta grupları ve tüm Alzheimer hasta grubunda (CDR<1+CDR>1) kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Uyarımsız koşulda, CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde LAG-3 reseptör ekspresyonu Alzheimer hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p=0.037$) saptanmıştır. CD3⁻CD56⁺CD16⁻ NK hücrelerinde ise TLR9 reseptörü orta-ileri derece (CDR>1)

Alzheimer hasta grubunda hafif düzey ($CDR < 1$) hasta grubuna göre uyarımsız koşulda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p=0.013$) bulunmuştur (Şekil 13).





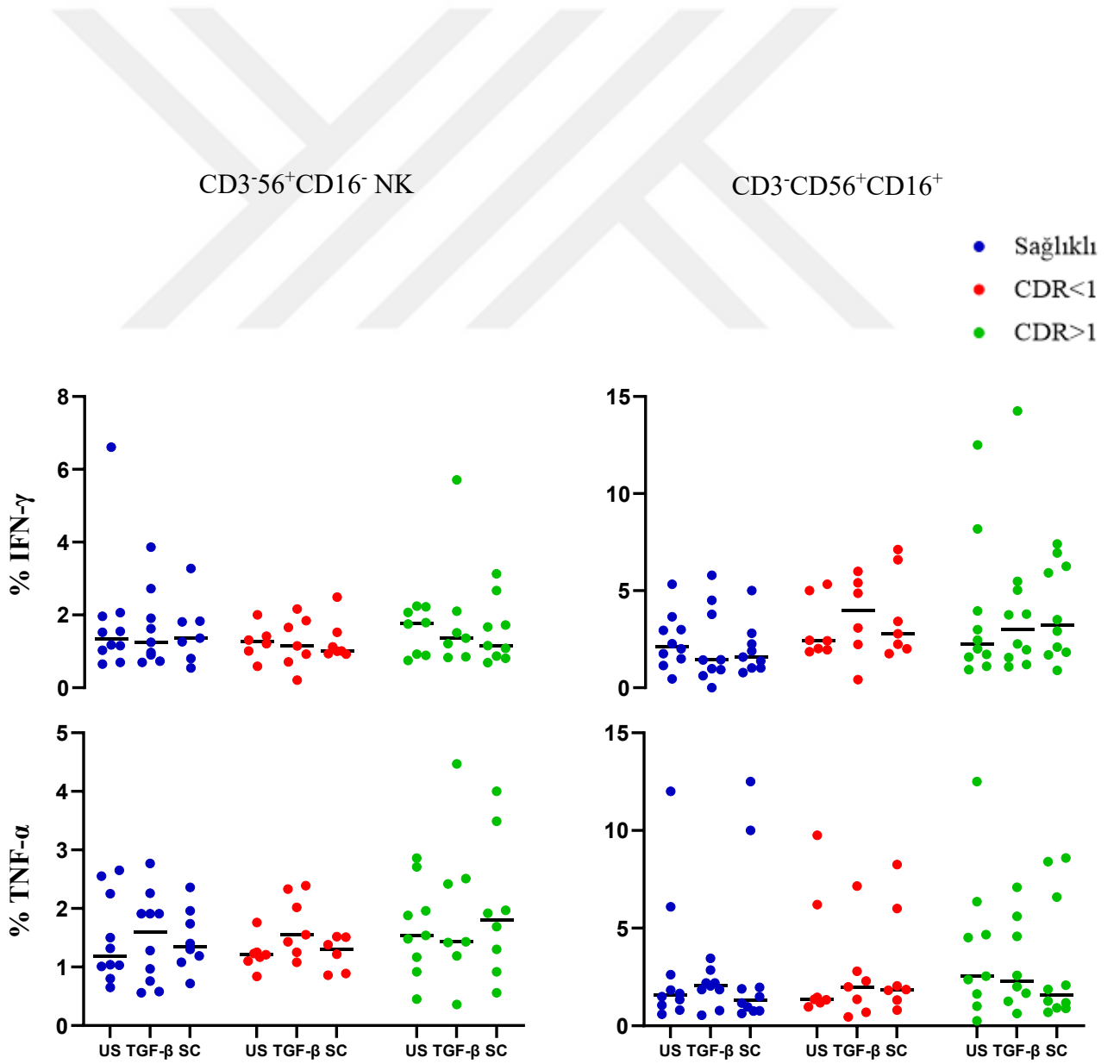
Şekil 13. NK hücre alt gruplarında NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyonu

4.2.5. CD3⁻CD56⁺CD16⁻ NK ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre içi sitokin seviyeleri

Uyarımsız, TGF- β ve SC ile uyarımı sonrası CD3⁻CD56⁺CD16⁻ NK ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre içi IFN- γ ve TNF- α seviyeleri Alzheimer CDR<1 ve CDR>1 hasta grupları ve tüm Alzheimer hasta grubunda (CDR<1+CDR>1) kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre içi IFN- γ seviyeleri Alzheimer hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre hücre uyarım kokteyli koşulunda anlamlı derecede yüksek ($p=0.022$) tespit edilmiştir. NK hücre alt gruplarında hücre içi IFN- γ ve TNF- α seviyeleri hafif ve orta-ileri

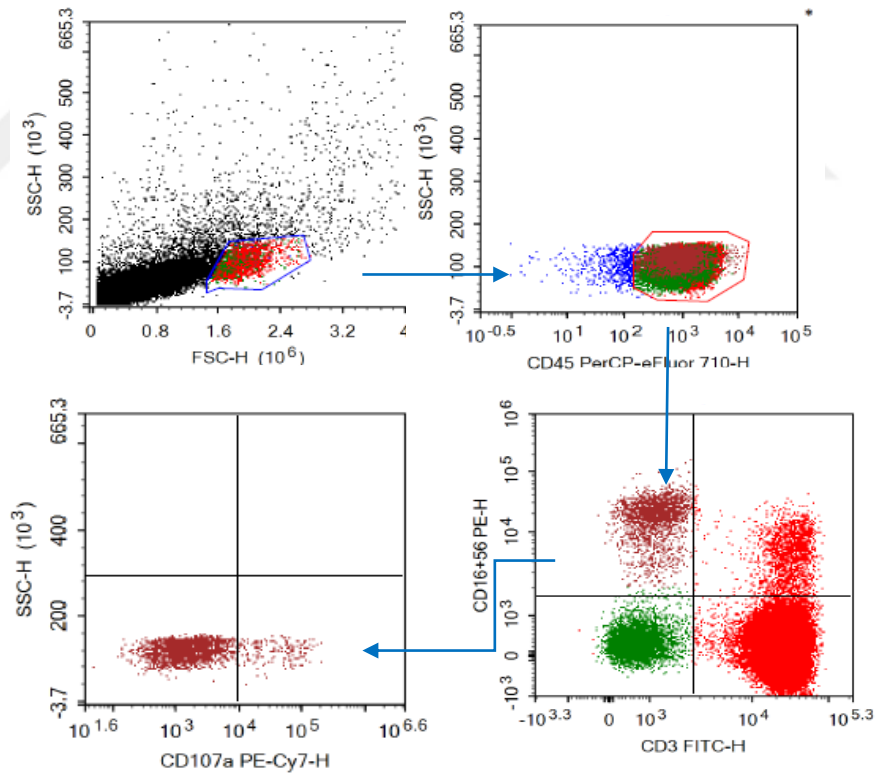
Alzheimer hasta gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 14).



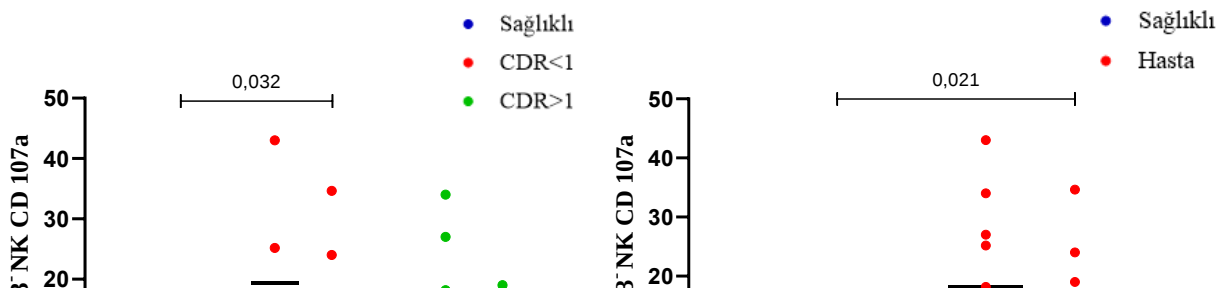
Şekil 14. NK hücre içi IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri

4.2.6. CD107a ekspresyonu ve sitotoksik aktivite

Hafif (CDR<1) ve orta-ileri derecede bilişsel bozukluğu olan (CDR>1) Alzheimer hasta gruplarında CD3⁺CD16⁺56⁺ NK hücrelerinde CD107a ekspresyonu sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslanmıştır (Şekil 15). CD3⁺CD16⁺56⁺ NK hücre CD107a ekspresyonu Alzheimer hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre TGF- β uyarımı sonrasında anlamlı derecede yüksek (p=0.021) saptanmıştır. Ek olarak TGF- β uyarımı sonrası hafif düzeyde (CDR<1) Alzheimer hastalarında CD107a ekspresyonu sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece (p=0.032) artmıştır (Şekil 16).



Şekil 15. CD3⁺ NK hücre CD107a ekspresyonu kapılama stratejisi



Şekil 16. CD3⁺ NK hücrelerinde CD107a ekspresyonu

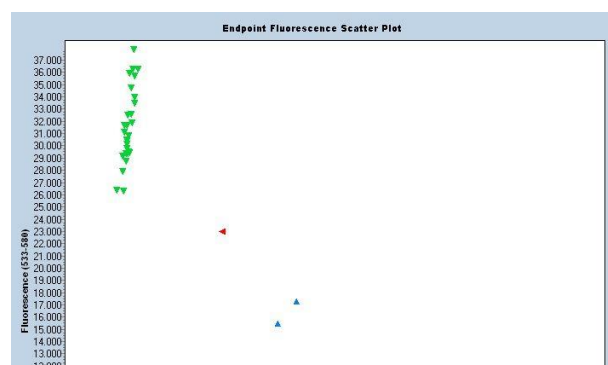
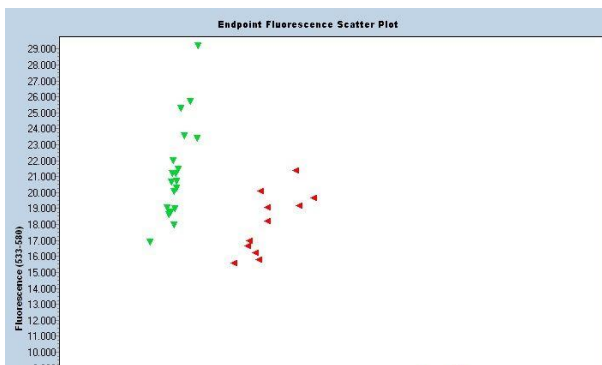
4.2.7. Apolipoprotein E izoformları

Alzheimer hastalarında farklı Apolipoprotein E izoformlarının varlığında NK hücre reseptörlerini ve sitokin seviyelerini hangi yönde düzenlendiğini incelemek için Apolipoprotein E geni kodon 112 ve kodon 158 bölgelerinde yer alan polimorfizmler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile çoğaltılarak hasta ve kontrol grubunda *APOE* ε2/ ε3 /ε4 allel taşıyıcılıkları belirlenmiştir. DNA örneklerinin genotiplenmeleri floresan hidroliz problemleri kullanılarak ‘*Light Cycler 480*’ cihazında gerçekleştirilmiş (Şekil 17), Apolipoprotein E İzoformlarının genotipleme verileri Tablo 4-3 de verilmiştir.

Tablo 4-3: Apolipoprotein E izoformları genotipleme verileri

	Hafif AH (CDR<1)	Orta/İleri AH (CDR>1)	Sağlıklı Kontrol
Cinsiyet E, K/(n)	K/7	K/10	K/10
APOE ε3 (n)	4	4	5
APOE ε4 (n)	3	6	5

Çalışmamızda ileri ve orta Alzheimer hastalarının %60 APOE-ε4 alleli taşıırken hafif düzey Alzheimer hastaları %57 APOE-ε3 alleleline sahip olduğu saptanmıştır.

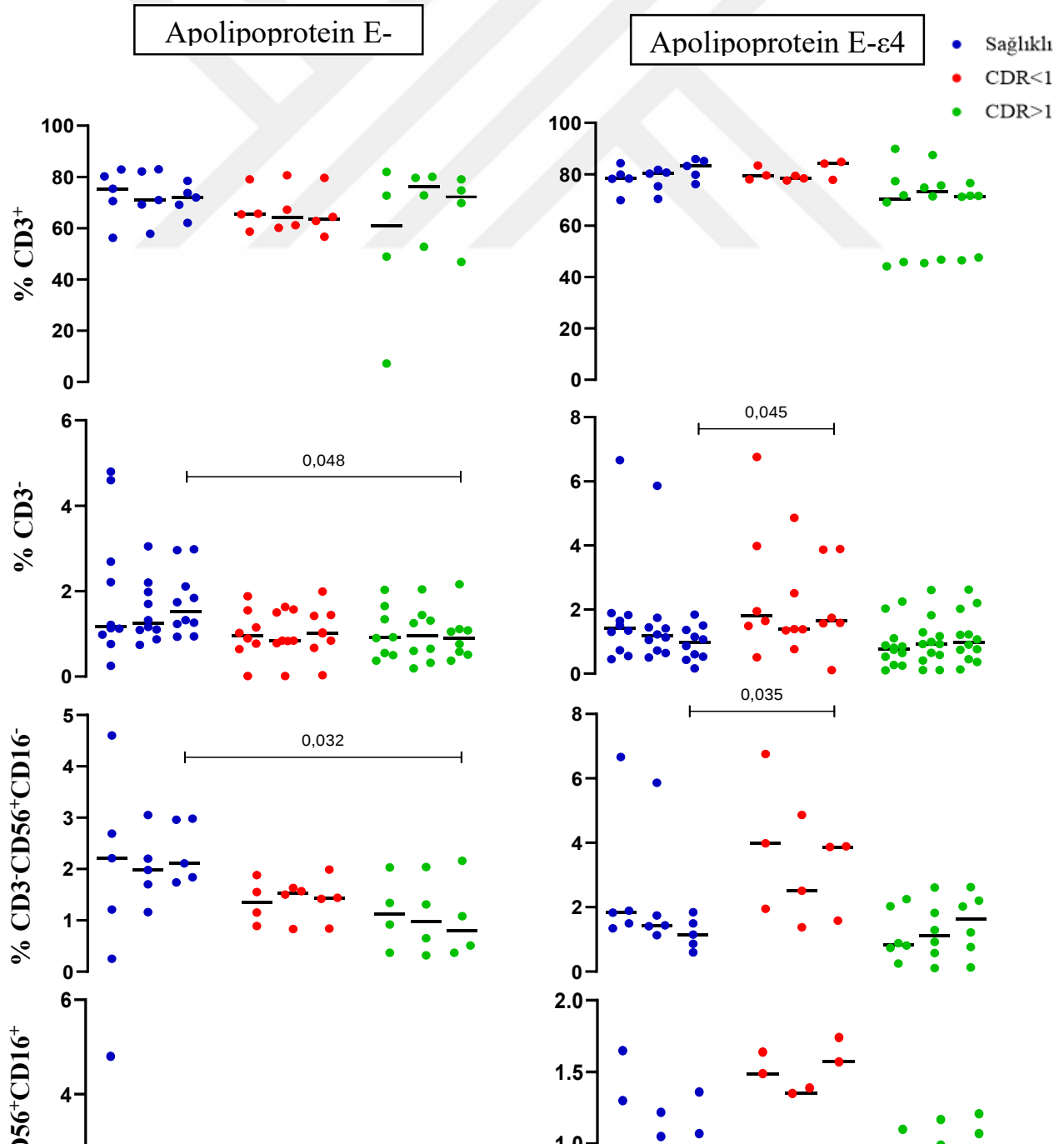


Şekil 17. Apolipoprotein 112 allelinin allelik diskriminasyon analizi ile elde edilen genotipleme sonuçları

4.2.8. Apolipoprotein E izoformlarına göre CD3⁺ T, NK ve NK hücre alt grupları

Apolipoprotein E izoformlarını taşıyan Alzheimer hastaları, CDR<1 ve CDR>1 hasta grupları ve kontrol grubunda, CD3⁺ T, CD3⁻ NK, CD3⁻CD56⁺CD16⁻ ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre yüzey molekül ekspresyonları, uyarımsız, TGF- β ve SC ile uyarım sonrası karşılaştırılmıştır.

Sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SC koşulunda: APOE- ϵ 3 allelini taşıyan Alzheimer hasta olgularında, CD3⁻ NK hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma ($p=0.020$) saptanmıştır. APOE- ϵ 3 taşıyan tüm Alzheimer hastaları kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre uyarım kokteyli koşulunda CD3⁻CD56⁺CD16⁻ NK hücre popülasyonunun anlamlı derecede azaldığı ($p=0.028$), bunun benzer olarak APOE- ϵ 3 taşıyan CDR>1 hasta grubunda CD3⁻ NK ve CD3⁻CD56⁺CD16⁻ NK hücrelerinde anlamlı derecede düşük ($p=0.048$, $p=0.032$, sırasıyla) saptanmıştır (Şekil 17). APOE- ϵ 4 taşıyan CDR<1 hasta grubunda ise kontrol grubuna göre CD3⁻ NK, CD3⁻CD56⁺CD16⁻ NK hücrelerinin uyarımsız koşulda anlamlı derecede arttığı ($p=0.045$, $p=0.035$) saptanmıştır (Şekil 18).

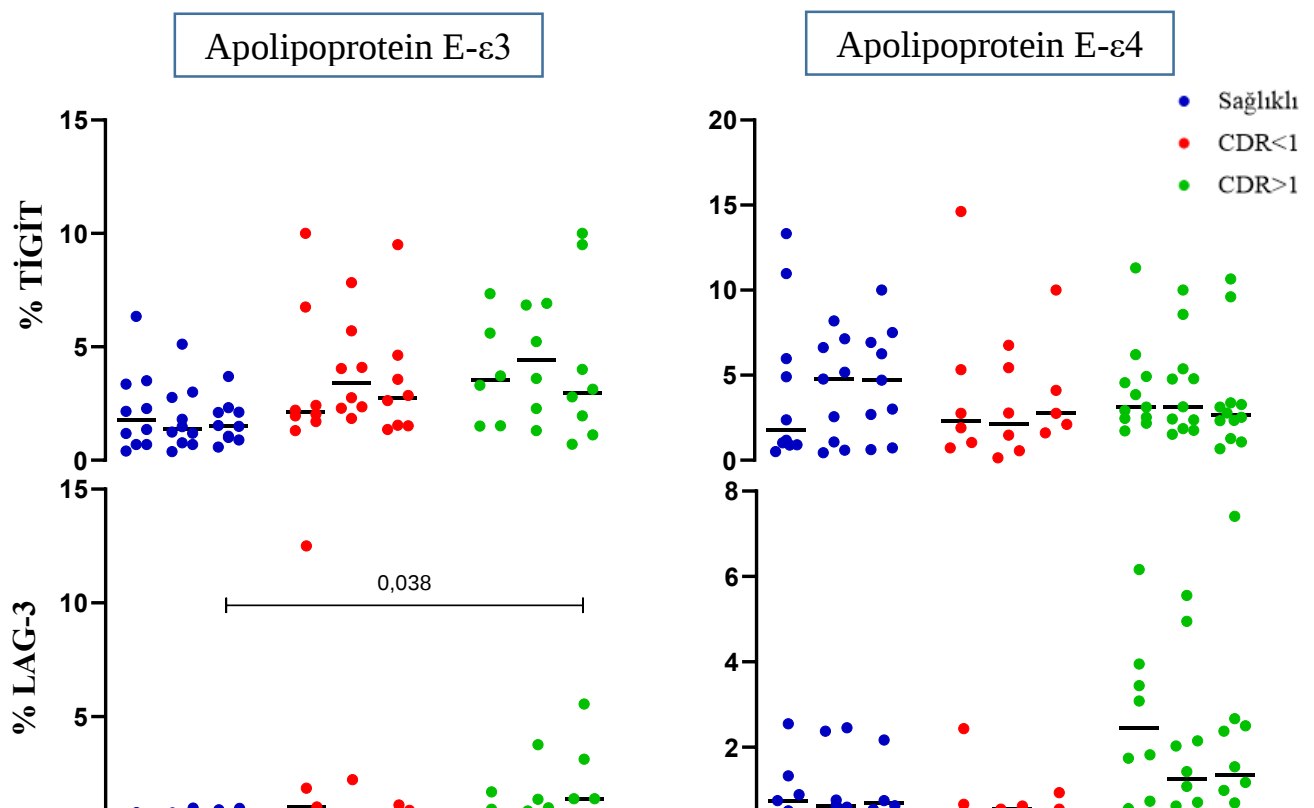


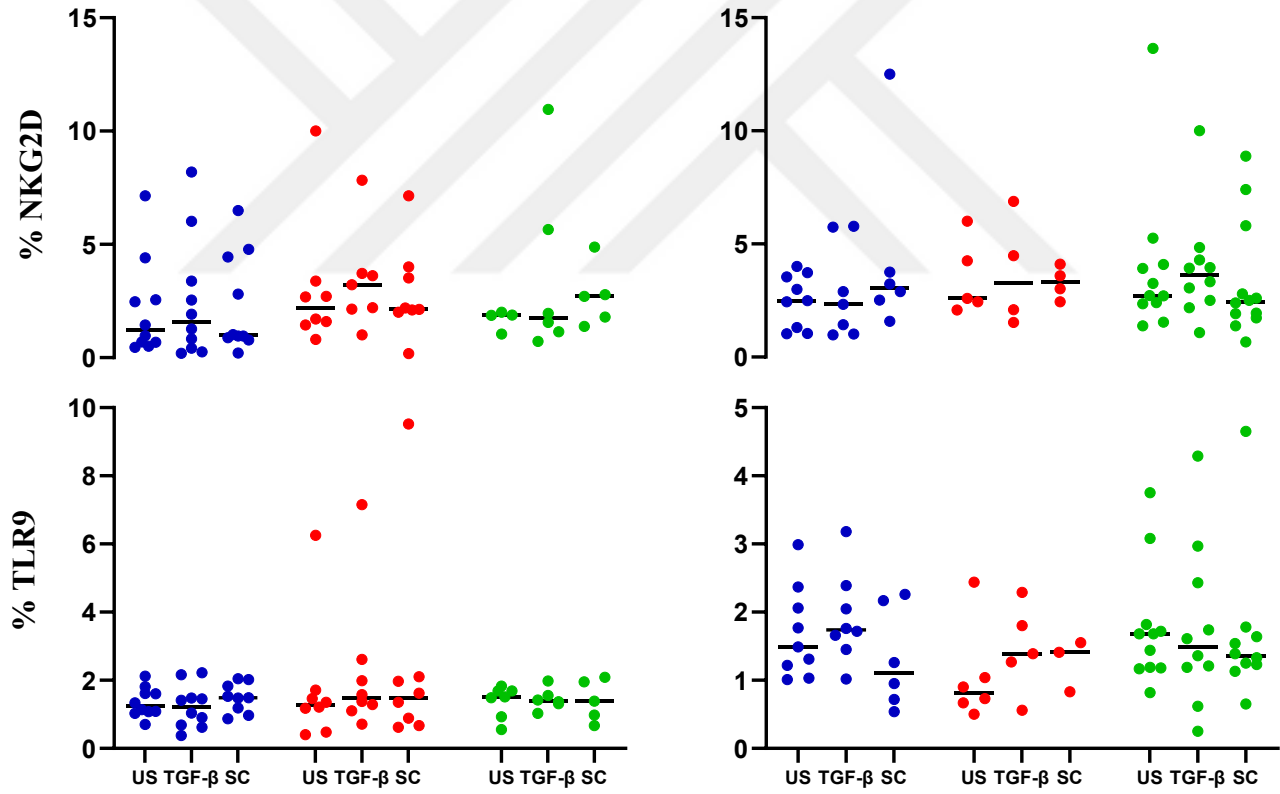
Şekil 18. Apolipoprotein E-ε3 ve E-ε4 izoformuna göre CD3⁺ T, CD3⁺ NK, CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK ve CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücre düzeyleri

4.2.9. Apolipoprotein E izoformlarının göre NK hücre yüzey molekül ekspresyon düzeyleri

Uyarımsız, TGF-β ve SC ile uyarım sonrası Apolipoprotein-ε3 ve -ε4 alleli taşıyan toplam Alzheimer hasta grubu, Alzheimer CDR<1 ve CDR>1 hasta grupları ve kontrol grubunda, CD3⁺ NK hücrelerinde NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 yüzey molekül ekspresyonları incelenmiştir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NK hücrelerinde TİGİT reseptör ekspresyonu APOE-ε3 taşıyan tüm Alzheimer hastalarında, TGF-β ve SC ile uyarım sonucu yüksek düzeyde (p=0.006, p=0.046, sırasıyla) saptanmıştır. Hücre uyarım kokteyli koşulunda APOE-ε3 taşıyan CDR>1 hasta grubunda NK hücrelerinin LAG-3 reseptör ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede (p=0.038) yüksek saptanmıştır (Şekil 19).

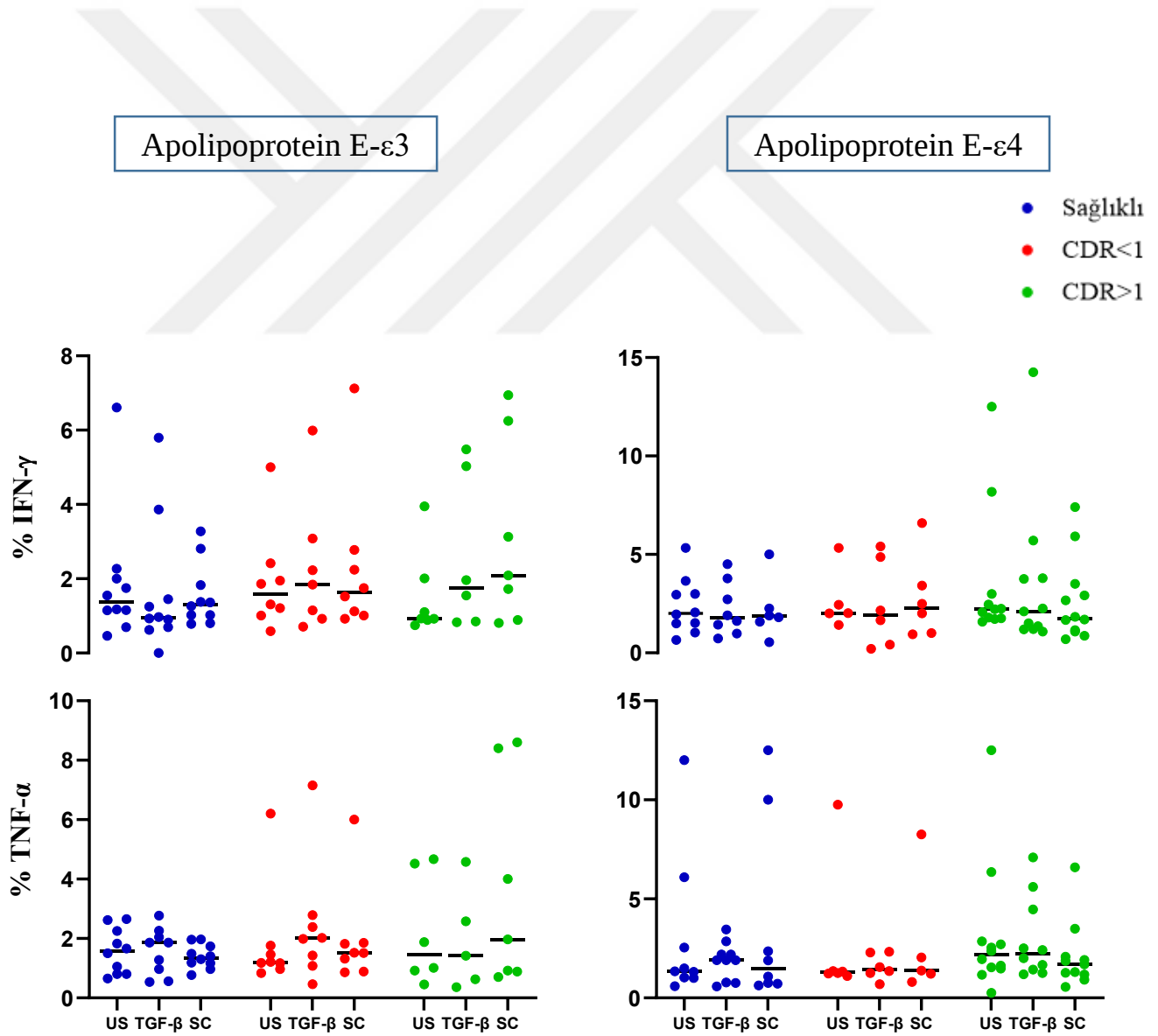




Şekil 19. Apolipoprotein E-ε3 ve E-ε4 izoformuna göre NK hücrelerinde NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyonu

4.2.10. Apolipoprotein E izoformlarına göre NK hücre içi sitokin seviyeleri

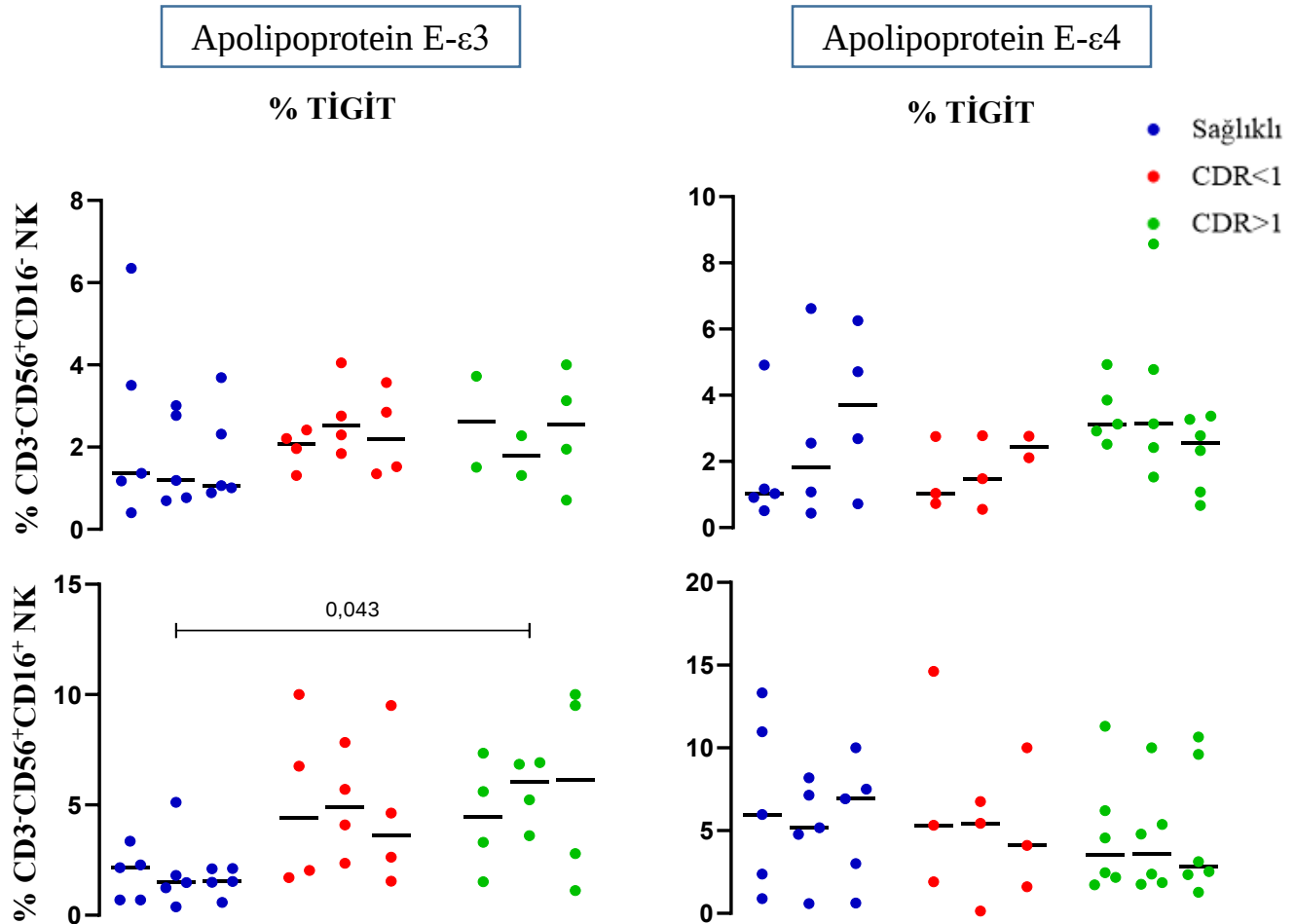
Apolipoprotein- $\epsilon 3$ ve - $\epsilon 4$ alleli taşıyan tüm Alzheimer hastaları, $CDR < 1$ ve $CDR > 1$ hasta grupları ve kontrol grubunun uyarımsız, TGF- β ve SC ile uyarımı sonrası $CD3^+$ NK hücre içi IFN- γ ve TNF- α seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 20).

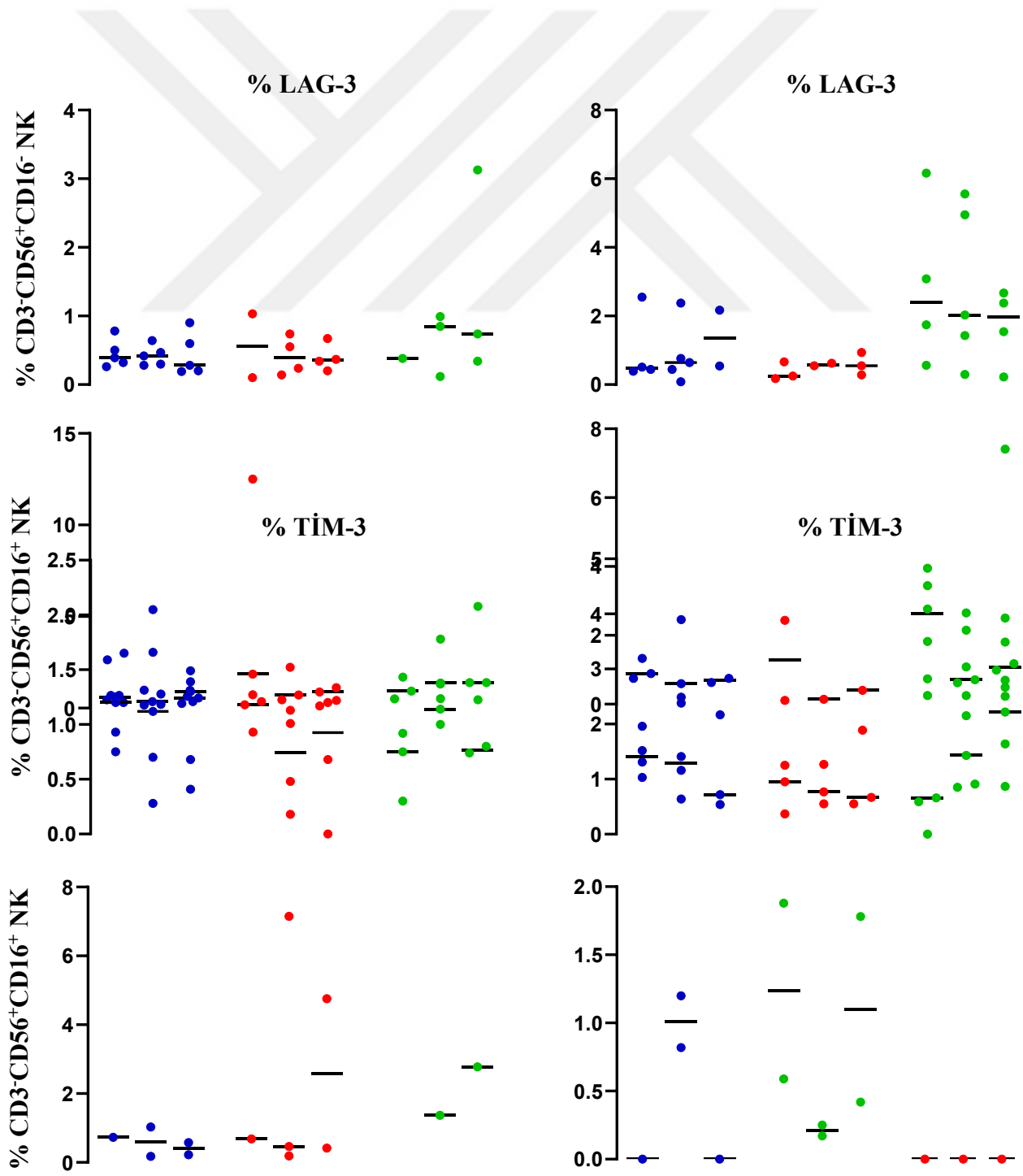


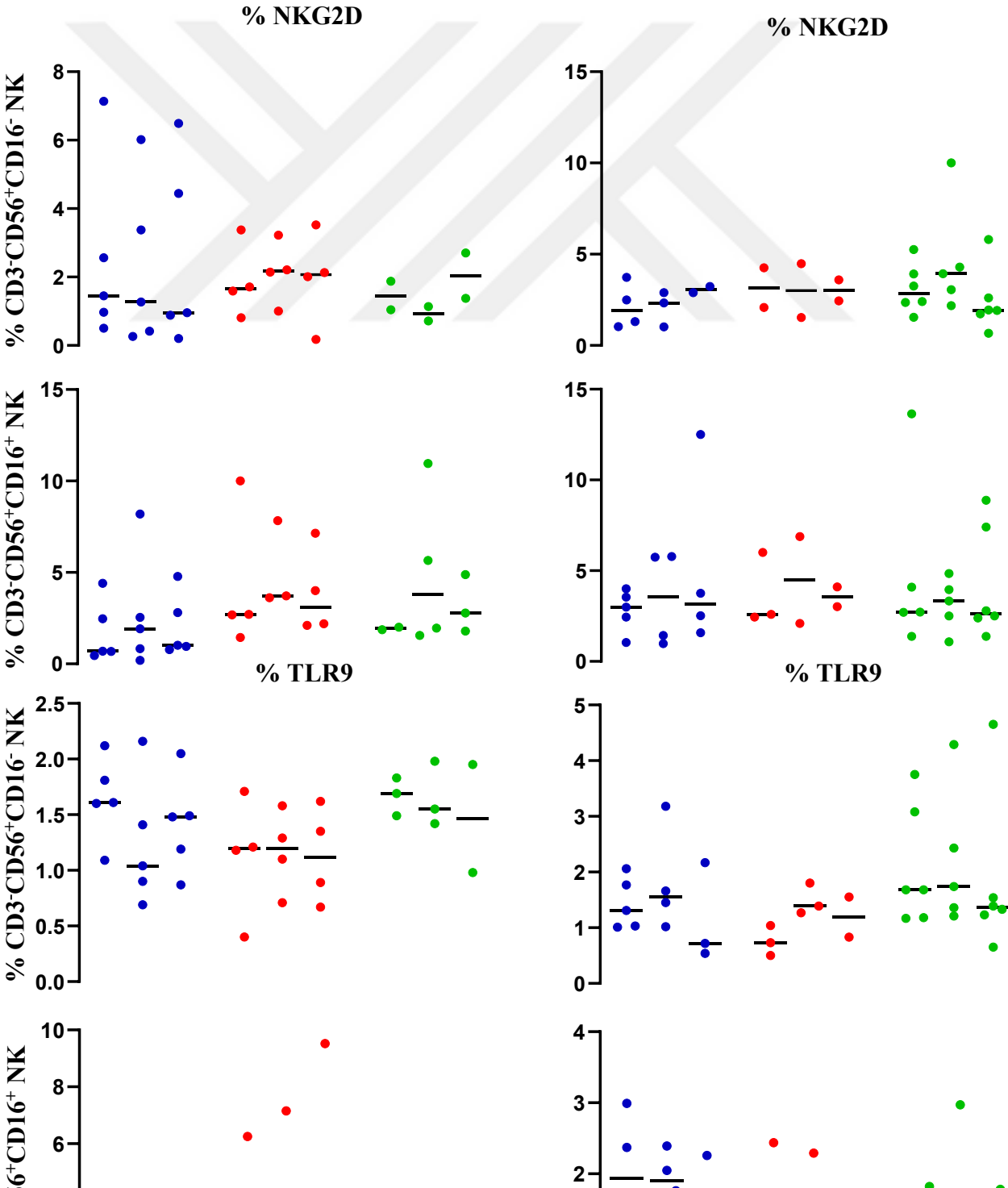
Şekil 20. Apolipoprotein E- $\epsilon 3$ ve E- $\epsilon 4$ izoformuna göre NK hücre içi IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri

4.2.11. Apolipoprotein E izoformlarına göre NK hücre alt gruplarında yüzey molekül ekspresyon düzeyleri

Apolipoprotein E- $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ izoformunu taşıyan tüm Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarında $CD3^+CD56^+CD16^-$ ve $CD3^+CD56^+CD16^+$ NK hücre alt grubunun NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ifade düzeyleri karşılaştırılmıştır. APOE- $\epsilon 3$ taşıyan Alzheimer hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, uyarımsız koşulda $CD3^+CD56^+CD16^+$ NK hücrelerinde LAG-3 ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı ($p=0.028$) görülmüştür. APOE- $\epsilon 3$ taşıyan tüm Alzheimer hastalarında $CD3^+CD56^+CD16^+$ NK hücrelerinde TİGİT reseptör ekspresyonu sırasıyla, TGF- β ve hücre uyarım kokteyli ile uyarımda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı ($p=0.013$, $p=0.040$, sırasıyla) bulunmuştur. $CD3^+CD56^+CD16^+$ NK hücrelerinde TİGİT reseptörü APOE- $\epsilon 3$ taşıyan orta-ileri derece ($CDR>1$) Alzheimer hastalarında kontrol grubuna göre TGF- β ile uyarım sonucu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p=0.043$) bulunmuştur (Şekil 21).



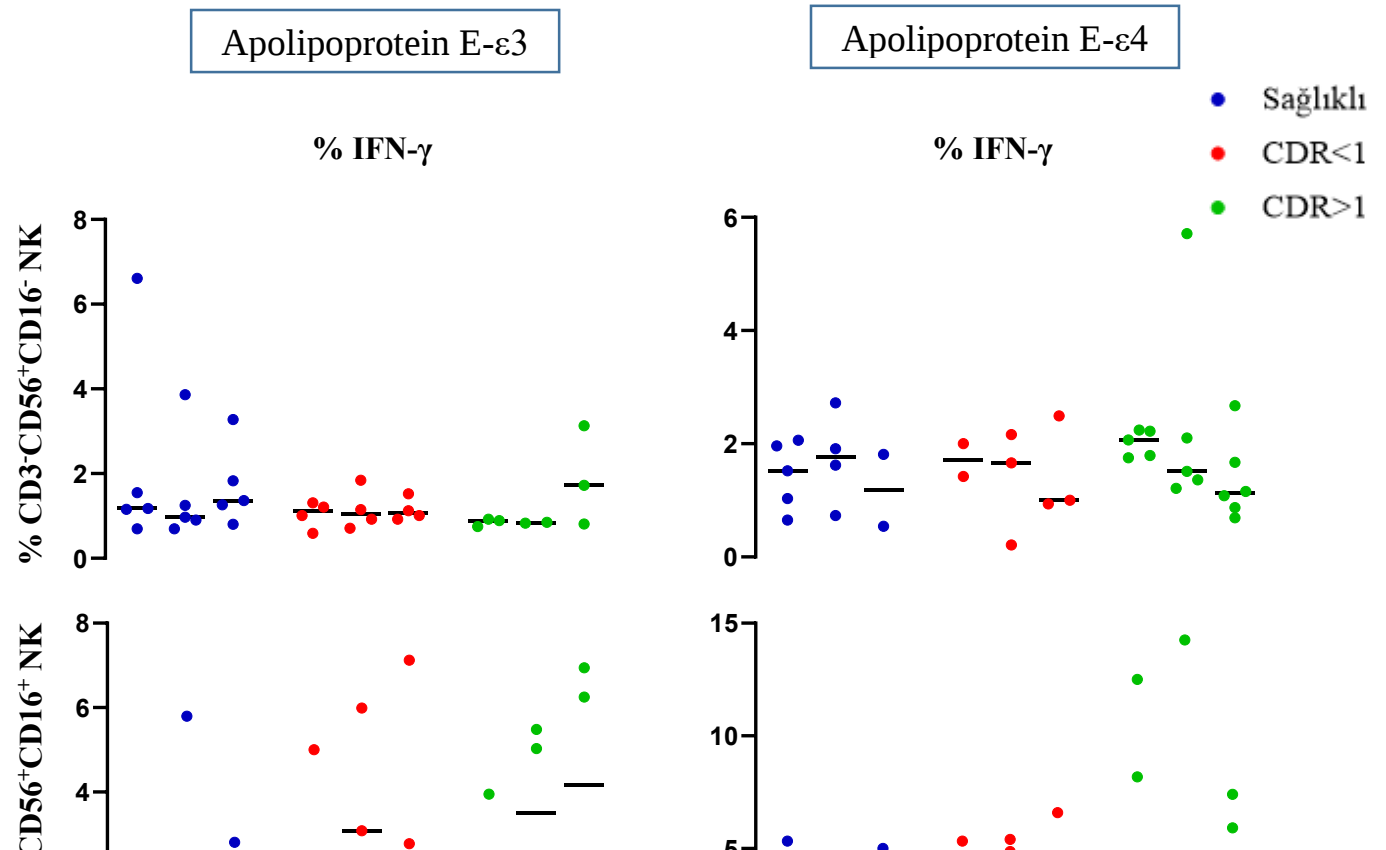


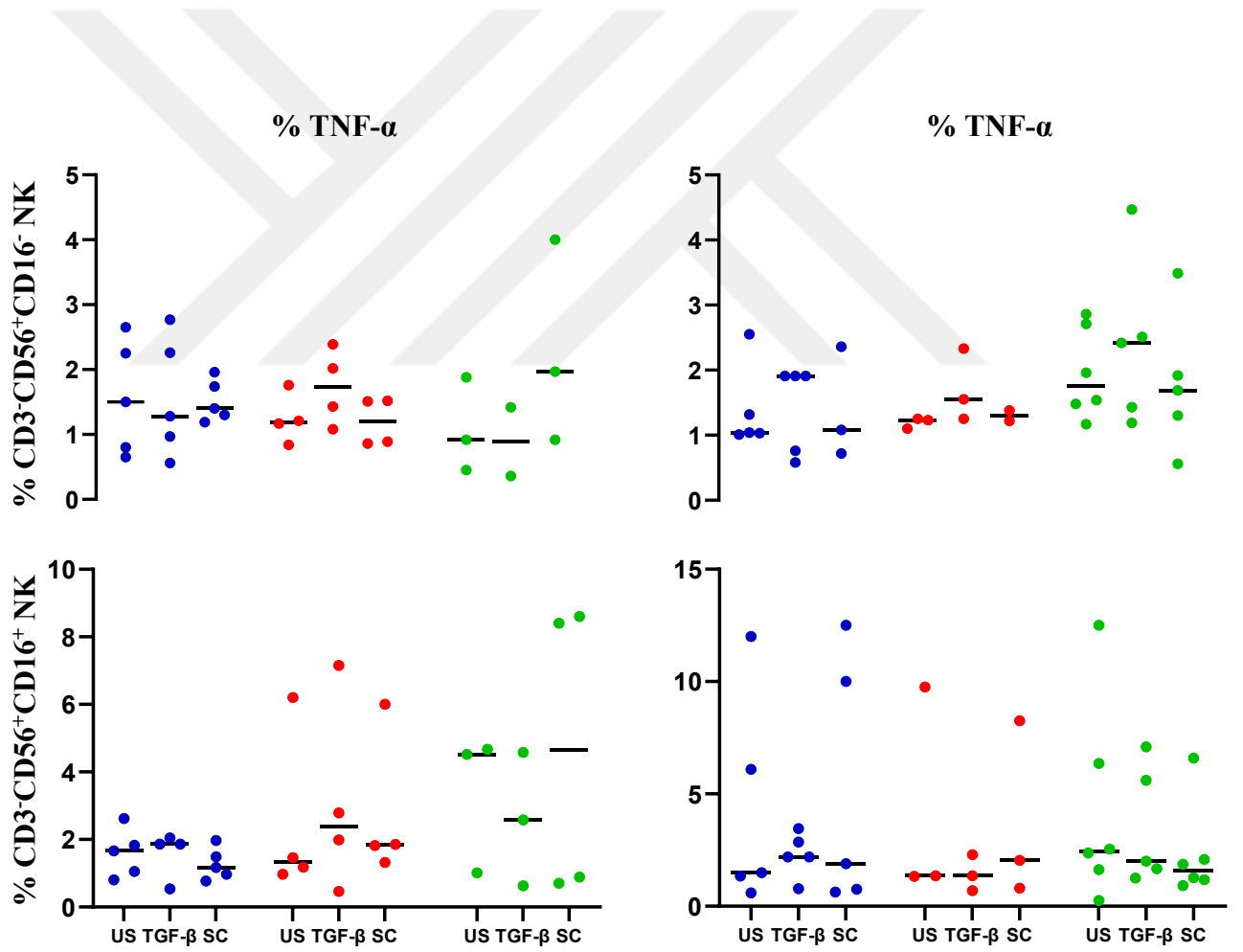


Şekil 21. Apolipoprotein E-ε3 ve E-ε4 izoformuna göre NK hücre alt gruplarında NKG2D, TLR9, TIGIT, LAG-3 ve TIM-3 reseptör ekspresyonu

4.2.12. Apolipoprotein E izoformlarına göre NK hücre alt gruplarında hücre içi sitokin seviyeleri

Apolipoprotein-ε3 ve -ε4 alleli taşıyan tüm Alzheimer hastaları, CDR<1 ve CDR>1 hasta grupları ve kontrol grubunun uyarımsız, TGF-β ve SC ile uyarımı sonrası CD3⁻CD56⁺CD16⁻ ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubunun hücre içi IFN-γ ve TNF-α seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 22).





Şekil 22. Apolipoprotein E-ε3 ve E-ε4 izoformuna göre NK hücre alt gruplarında hücre içi IFN-γ ve TNF-α sitokin seviyeleri

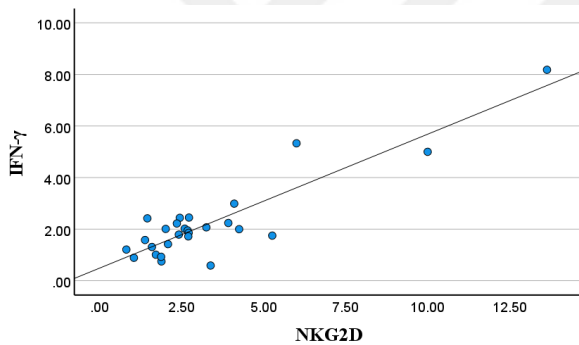
4.3. Korelasyon Analizleri

Alzheimer hastalarında yaş ve cinsiyet ile NK hücre reseptör ekspresyon düzeyleri ve sitokin seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Hastalığın evresi ve Apolipoprotein E alelleri ile CD3⁺ NK hücreler ve NK alt gruplarının reseptör ekspresyon düzeyleri ile sitokin seviyeleri arasındaki korelasyon analizleri aşağıda sunulmuştur

4.3.1. Alzheimer hastalarında CD3⁺ NK hücre korelasyon bulguları

Uyarımsız koşulda Alzheimer hastalarında CD3⁺ NK hücreleri NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyon, IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile saptanmıştır.

Uyarımsız koşulda, Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN- γ seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.895$) ve anlamlı ($p<0.05$) ilişki bulunmuştur. NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN- γ seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak artmaktadır (Şekil 23).



Şekil 23. CD3⁺ NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN- γ sitokin seviyeleri arasında korelasyon analizi

* $p<0.05$ düzeyinde anlamlıdır.

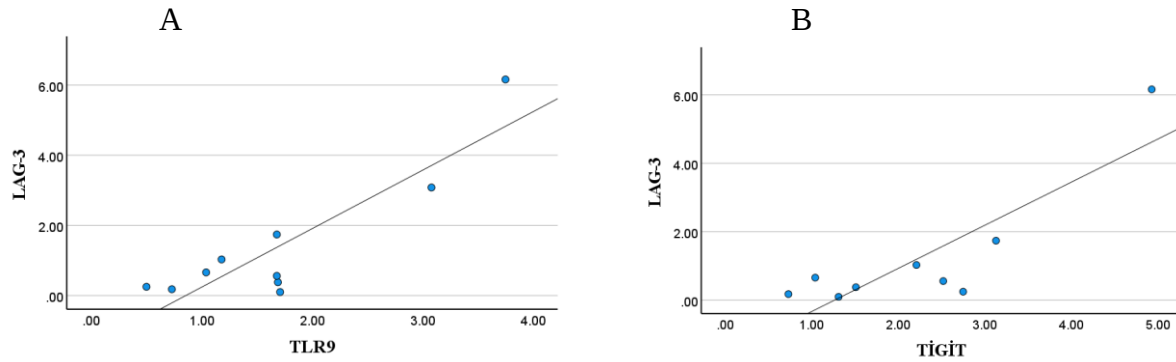
4.3.2. CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubu korelasyon bulguları

Uyarımsız koşulda Alzheimer hastaların CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK alt grubunda NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyon seviyeleri, IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri arasındaki ilişkiyi Pearson korelasyon analizi ile saptanmıştır.

Uyarımsız koşulda, Alzheimer hastalarında, CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubunda LAG-3 ve TLR-9 reseptör seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.886$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK hücre LAG-3 ve TLR-9 reseptör seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 24).

Alzheimer hastaları CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubunda LAG-3 ve TİGİT reseptör seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.852$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK

hücre LAG-3 ve TİGİT reseptör seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 24).



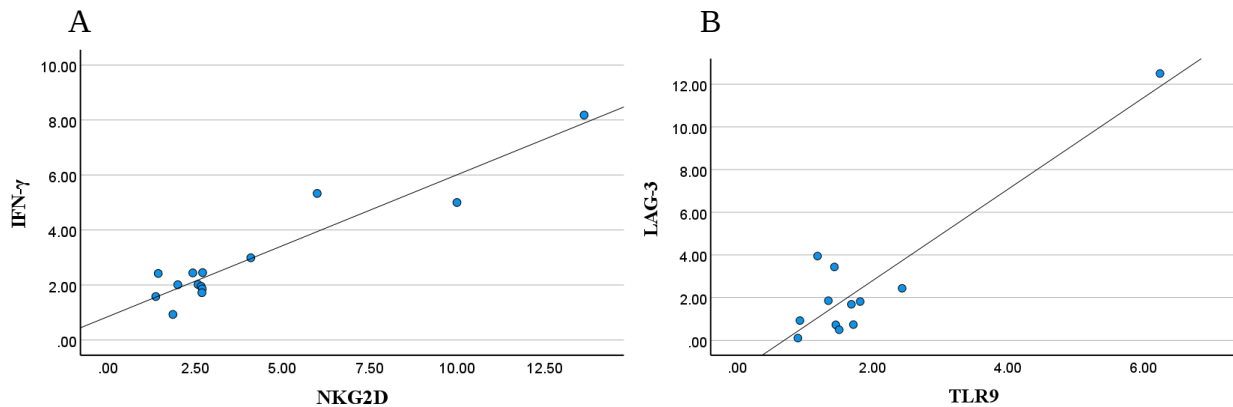
Şekil 24. CD3⁺CD56⁺CD16⁻ NK hücre alt grubunda A. LAG-3 ve TLR9, B. LAG-3 ve TİGİT reseptör seviyeleri arasında korelasyon analizi *p<0.05 düzeyinde anlamlıdır.

4.3.3. Alzheimer hastaları CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubu korelasyon bulguları

Uyarımsız koşulda Alzheimer hastaları CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubunda NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyon seviyeleri ve IFN- γ , TNF- α sitokin seviyeleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile saptanmıştır.

Uyarımsız koşulda, Alzheimer hastalarında, CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubunda NKG2D reseptörü ve IFN- γ sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.946$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki saptanmıştır. Alzheimer hastaları NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN- γ sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 25).

Alzheimer hastalarında, CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubunda LAG-3 ve TLR9 reseptör seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.918$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK hücre LAG-3 ve TLR9 reseptör seviyeleri arasında anlamlı ve güçlü bir pozitif korelasyon bulunmaktadır (Şekil 25).



Şekil 25. CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubunda A. IFN- γ ve NKG2D reseptör, B. LAG-3 ve TLR9 reseptör seviyeleri arasında korelasyon analizi *p<0.05 düzeyinde anlamlıdır.

4.3.4. Klinik demans derecelendirme ölçeğine (CDR) göre CD3⁺ NK hücrelerinde korelasyon analizi

Uyarımsız koşulda Alzheimer demanslı hastalarının klinik demans derecelendirme ölçeğine (CDR) göre hafif düzey (CDR<1) ve orta-ileri derece (CDR>1) hasta gruplarında CD3⁺ NK hücrelerinin NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyon seviyeleri ve IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla Pearson korelasyon analizi kullanılmıştır.

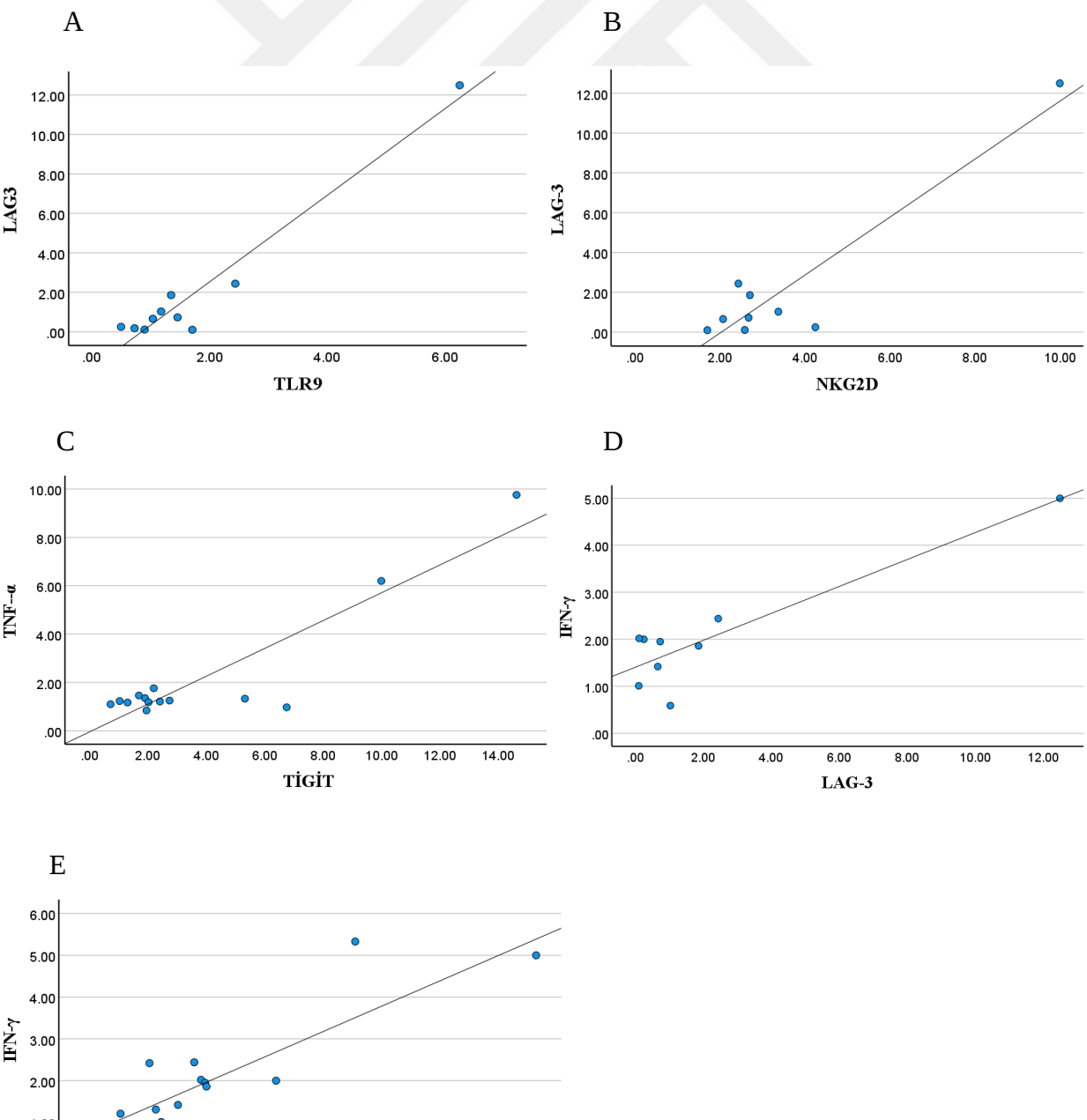
Uyarımsız koşulda, Hafif düzey (CDR<1) Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre LAG-3 ve TLR9 reseptör seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif (r=0.972) ve anlamlı (p<0.05) bir ilişki bulunmuştur. CDR<1 Alzheimer hastalarında, NK hücre LAG-3 ve TLR9 reseptörlerinin güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte arttığını göstermektedir (Şekil 26).

Hafif düzey (CDR<1) Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre LAG-3 ve NKG2D reseptör seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif (r=0.934) ve anlamlı (p<0.05) bir ilişki bulunmuştur. CDR<1 Alzheimer hastalarında, NK hücre LAG-3 ve NKG2D reseptör seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 26).

Hafif düzey (CDR<1) Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre LAG-3 reseptörü ve IFN- γ sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif (r=0.904) ve anlamlı (p<0.05) bir ilişki bulunmuştur. CDR<1 Alzheimer hastalarında, NK hücre LAG-3 reseptörü ve IFN- γ sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 26).

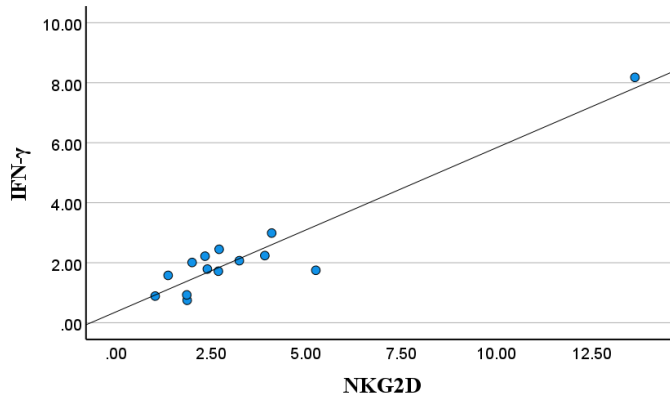
Hafif düzey (CDR<1) Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre TİGİT reseptörü ve TNF- α sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif (r=0.905) ve anlamlı (p<0.05) bir ilişki bulunmuştur. CDR<1 Alzheimer hastalarında, NK hücre TİGİT reseptörü ve TNF- α sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 26).

Hafif düzey (CDR<1) Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN- γ sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif (r=0.804) ve anlamlı (p<0.05) bir ilişki bulunmuştur. CDR<1 Alzheimer hastalarında, NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN- γ sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 26).



Şekil 26. Hafif düzey (CDR<1) Alzheimer hastalarının CD3⁺ NK hücre A. LAG-3 ve TLR9, B. LAG-3 ve NKG2D, C. TNF- α ve TİGİT, D. IFN- γ ve LAG-3, E. IFN- γ ve NKG2D marker seviyeleri arasında korelasyon analizi *. $p<0.05$ düzeyinde anlamlıdır.

Orta-ileri derece (CDR>1) Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN- γ seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.947$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. CDR>1 Alzheimer hastalarında, NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN- γ sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 27).



Şekil 27. Orta-ileri derece (CDR>1) Alzheimer hastalarının CD3⁺ NK hücre IFN- γ sitokin ve NKG2D reseptör seviyeleri arasında korelasyon analizi*. $p<0.05$ düzeyinde anlamlıdır.

4.3.5. Apolipoprotein- $\epsilon 3$ ve - $\epsilon 4$ alleli taşıyan tüm Alzheimer hastalarında CD3⁺ NK hücrelerinin korelasyon analizi

Uyarımsız koşulda Apolipoprotein- $\epsilon 3$ ve - $\epsilon 4$ alleli taşıyan Alzheimer demanslı hastalarının CD3⁺ NK hücrelerinde NKG2D, TLR9, TİGİT, LAG-3 ve TİM-3 reseptör ekspresyon seviyeleri ve IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla Pearson korelasyon analizi kullanılmıştır.

Uyarımsız koşulda, Apoe-ε3 taşıyan Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre LAG-3 ve NKG2D reseptör seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.987$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur NK hücre LAG-3 ve NKG2D reseptör seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 28).

Apoe-ε3 taşıyan Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre LAG-3 ve TLR9 reseptör seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.970$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK hücre LAG-3 ve TLR9 reseptör seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 28).

Apoe-ε3 taşıyan Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre NKG2D ve TLR9 reseptör seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.945$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK hücre NKG2D ve TLR9 reseptör seviyeleri güçlü bir ilişki ile ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 28).

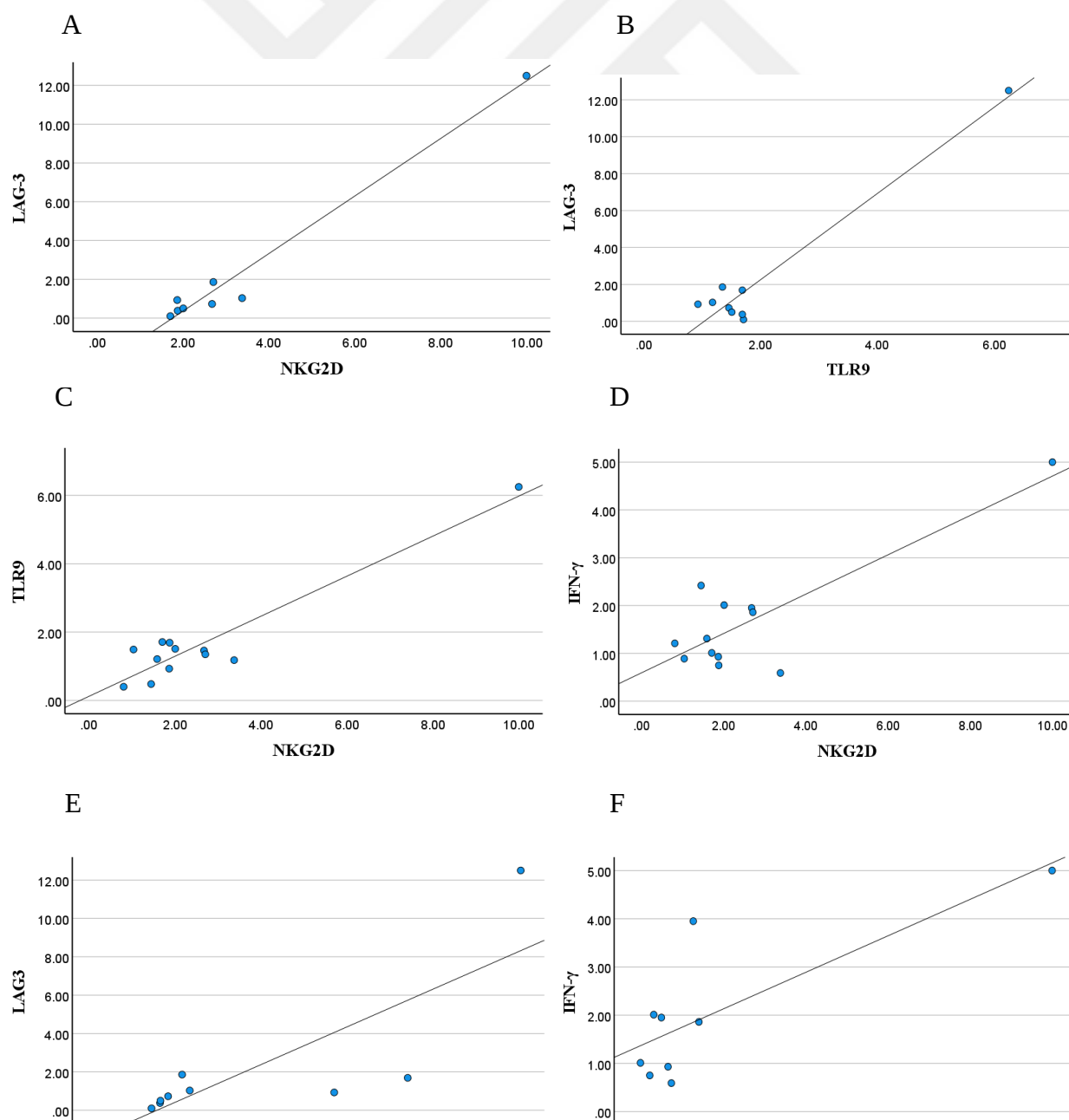
Apoe-ε3 taşıyan Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN-γ sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.837$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. , NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN-γ sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 28).

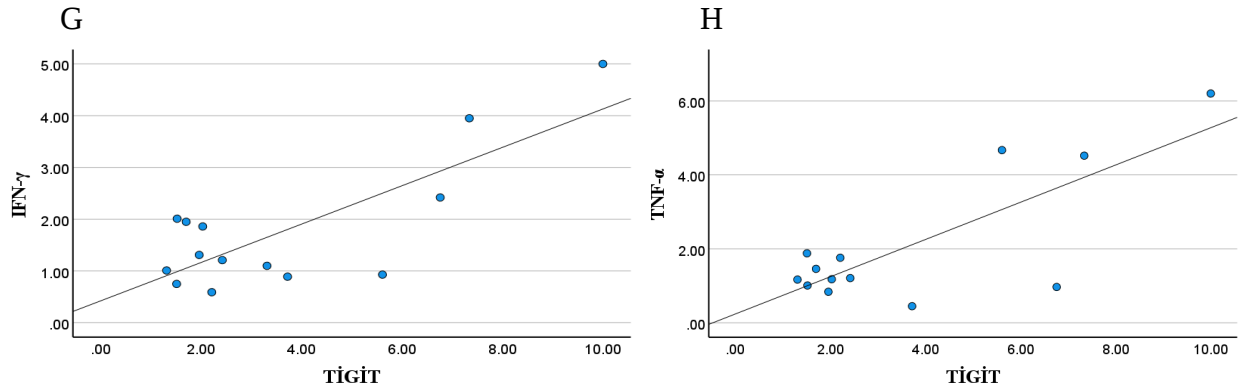
Apoe-ε3 taşıyan Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre LAG-3 ve TIGIT reseptör seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.790$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK hücre LAG-3 ve TIGIT reseptör seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 28).

Apoe-ε3 taşıyan Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre LAG-3 reseptörü ve IFN-γ sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.786$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK hücre LAG-3 reseptörü ve IFN-γ sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 28).

Apoe-ε3 taşıyan Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre TIGIT reseptörü ve IFN-γ sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.785$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK hücre TIGIT reseptörü ve IFN-γ sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 28).

Apoe-ε3 taşıyan Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre TIGIT reseptörü ve TNF-α sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.784$) ve anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK hücre TIGIT reseptörü ve TNF-α sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 28).



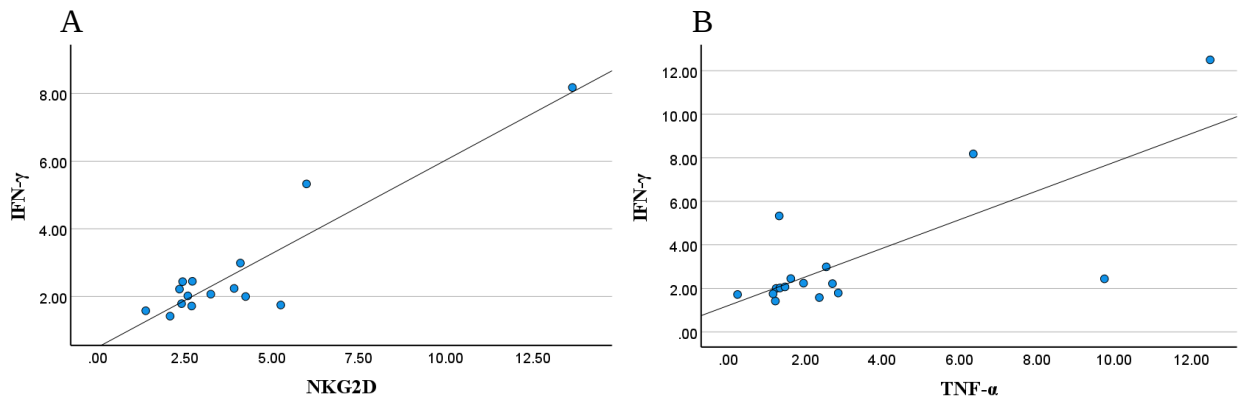


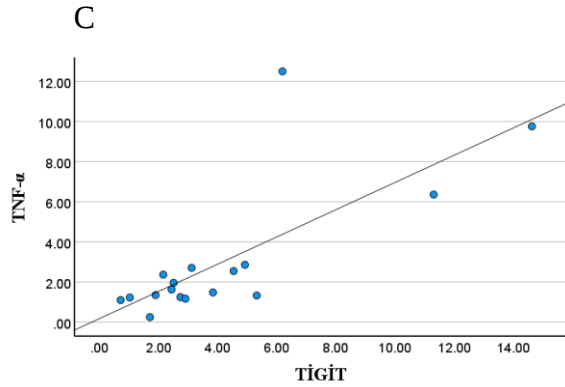
ILK9, C. ILK9 ve NKG2D, D. IFN- γ ve NKG2D, E. LAG-3 ve TIGIT, F. IFN- γ ve LAG-3, G. IFN- γ ve TIGIT, H. TNF- α ve TIGIT marker seviyeleri arasında korelasyon analizi *. $p < 0.05$ düzeyinde anlamlıdır.

Apoe- $\epsilon 4$ taşıyan tüm Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN- γ sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.918$) ve anlamlı ($p < 0.05$) bir ilişki bulunmuştur. , NK hücre NKG2D reseptörü ve IFN- γ sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 29).

Apoe- $\epsilon 4$ taşıyan tüm Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre TNF- α ve IFN- γ sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.750$) ve anlamlı ($p < 0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK hücre TNF- α ve IFN- γ sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 29).

Apoe- $\epsilon 4$ taşıyan tüm Alzheimer hastalarında, CD3⁺ NK hücre TIGIT reseptörü ve TNF- α sitokin seviyeleri arasında güçlü düzeyde pozitif ($r=0.741$) ve anlamlı ($p < 0.05$) bir ilişki bulunmuştur. NK hücre TIGIT reseptörü ve TNF- α sitokin seviyeleri güçlü bir ilişki ve anlamlı olarak birlikte artmaktadır (Şekil 29).





Şekil 29. Apoe-ε4 taşıyan Alzheimer hastaların CD3⁺ NK hücre A. IFN-γ ve NKG2D, B. IFN-γ ve TNF-α, C. TNF-α ve TIGIT marker seviyeleri arasında korelasyon analizi *. p<0.05 düzeyinde anlamlıdır.

5. Tartışma

Günümüzde yapılan birçok çalışma, Alzheimer hastalığında gözlenen nöropatolojik değişikliklerin ilerlemesinde nöroenflamasyonun temel bir rol oynadığına işaret etmektedir.

Alzheimer hastalığında NK hücrelerinin rolü konusunda ilk işaret, Alzheimer hastalığı gibi nörolojik anormalliklere karşı güçlü bir ilaç olan Tacrine'in, Alzheimer hastalarındaki NK hücre proliferasyonu ve sitotoksik fonksiyonları üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğunun gösterilmesidir. Bu bulguya dayanarak NK hücrelerinin Alzheimer hastalarında zararlı fonksiyonları olabileceği öne sürülmüştür [7].

Yaşlı bireylerin beyinlerinin Hipokampal Dentat Girusunda nötrofillerden, monositlerden ve adaptif T ve B lenfositlerinden daha bol miktarda NK hücre popülasyonu gözlemlenmiştir [6].

Transgenik Alzheimer fare modelinde NK hücre depleksiyonunun mikrogliya homeostatik benzeri bir morfoloji, azalmış proliferatif yanıt ve azalmış proenflamatuvar sitokin ekspresyonu neden olarak nöroenflamasyonu hafiflettiği, nörojenezi uyardığı ve bilişsel işlevi geliştirdiği gösterilmiştir [8].

Alzheimer hastalığının gelişmesinde birçok genetik risk faktörleri arasında en yaygın gen, APOE geninin APOE-ε4 alleli ilişkisi saptanmıştır [374]. Mikrogliya ve astrositler beyindeki enflamasyonun ana modülatörleri olmakla birlikte, aynı zamanda beyindeki ana ApoE kaynaklarıdır [365]. Amiloid prekürsör proteinin ApoE4 varlığında mikrogliya'yı aktive edebildiği ve nörotoksik moleküller üretebildiği, ancak ApoE3'ün bu aktivasyonu önleyebildiği saptanmıştır

[367]. Ayrıca klinik çalışmalarda kullanılan birçok ilacın, sadece APOE-ε4 alelini taşımayan Alzheimer hastaların tedavisinde faydalı olabileceği gösterilmiştir [375-377].

FDA onaylı NK hücre terapisi - SNK01 çalışmasında, Alzheimer hastalığında amiloid-β ve α-sinüklein protein agregatlarını parçalayarak, anti-enflamatuvar sitokinlerin üretimini tetiklediği ve aktive olmuş T hücrelerini ortadan kaldırarak bilişsel işlevi 11 haftaya kadar iyileştirdiği ileri sürülmüştür [378].

Çalışmamızda, Alzheimer demanslı hastaların klinik demans derecelendirme ölçeğine göre hafif düzey ve orta-ileri derece olmak üzere iki alt grubunun periferik kan örnekleri üç farklı koşulda kültüre edildikten sonra CD3⁺ T, CD3⁻ NK, CD3⁻CD56⁺CD16⁻ ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde NKG2D, TLR9, TIGIT, LAG-3 ve TIM-3 yüzey molekül ekspresyonları ve hücre içi IFN-γ ve TNF-α sitokin seviyeleri araştırılmıştır. Ayrıca, Alzheimer hastalarında farklı Apolipoprotein E izoformlarının varlığına göre NK hücre reseptörleri ve sitokin seviyelerindeki değişiklikler genotipleme sonrası incelenmiştir.

Alzheimer ile ilişkili sendromlarda farklı evrelerde NK hücre sayıları sağlıklı yaşlı bireyler ile karşılaştırıldığında, CD3⁻CD56⁺, CD3⁻CD56⁺CD16⁻ ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinin, hafif evre ve orta-ileri evre Alzheimer hastalarında benzer bulunmuştur [15]. Benzer şekilde, başka bir çalışmada Alzheimer hastalarında CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre sayılarında fark saptanmamıştır [316].

Çalışmamızda, CD3⁺ T, CD3⁻ NK, CD3⁻CD56⁺CD16⁻ ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre yüzey molekül ekspresyonları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Buna karşılık, Alzheimer hastaların farklı Apolipoprotein E izoformlarının varlığına göre incelendiğinde NK hücre alt gruplarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Prion hastalıkları, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı, patolojik proteinlerin birikimi de dahil olmak üzere ortak nöropatolojik ve biyokimyasal özellikleri paylaşan ölümcül dejeneratif bozukluklardır. LAG-3 reseptör ekspresyonunun yetişkin fare beyinde düşük olduğu, ancak prion enfeksiyonundan sonra seviyesinin arttığı gösterilmiştir [379]. Prion benzeri protein agregatlarının çoğalması, Alzheimer hastalığı ve ilişkili tauopatiler de dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde yaygın bir etkidir. Klinik gözlemler ve tamamlayıcı deneysel çalışmalar, önceden birleşmiş tau fibrillerinin (PFF) hücrelere girerek patolojiyi yayan ve endojen tau'nun yanlış katlanmasına ve toplanmasına neden olan prion benzeri kümeler olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada, LAG-3 reseptörünün PFF'ye bağlanan ancak Tau monomerine bağlanmayan bir hücre yüzey reseptörü olduğu gösterilmiştir. Primer kortikal

nöronlarda Lag3'ün silinmesi veya inhibisyonu, Tau PFF internalizasyonunu ve buna bağlı tau salınımını ve nöronlar arası iletimi önemli ölçüde azalmıştır. Lag3 eksikliği olan farelerde hipokampus ve oksipital kortekse Tau PFF enjeksiyonu ile oluşan tau patolojisinin yayılımı ve davranışsal eksiklikler nöronlarda azaldığı da gösterilmiştir [380].

Kanıtlar, α -sinüklein (α -sin) agregasyonunun ve hücreler arası iletiminin Parkinson hastalığı patogeneze katkıda bulunduğunu ve α -sin toksik fibrillerin iletimi için LAG-3 reseptörüne bağlandığı gösterilmiştir. Hayvan modellerinde, LAG-3'ün silinmesinin α -sin yayılmasını sınırladığı ve dopaminerjik nöronların patolojik değişimlerini ve α -sin agregasyonu tarafından indüklenen hayvan davranış eksikliklerini hafiflettiği saptanmıştır [381]. Alzheimer hastalığında rolü bilinen Amiloid β öncüsü benzeri protein 1'in (A β 1) patolojik α -sin'in bağlanmasını, içselleştirilmesini, taşınmasını ve toksisitesini kolaylaştıran LAG-3 ile etkileşime girdiği raporlanmıştır. Hem A β 1 hem de LAG-3'ün silinmesi, dopaminerjik nöronların kaybını ve α -sin indüklenen PFF tarafından eşlik eden davranışsal eksiklikleri ortadan kaldırmaktadır [382]. Ayrıca, insan α -syn A53T transgenik (hA53T) farelerde LAG-3 silinmesi çözünmeyen α -syn agregatlarının ve fosforlanmış ser129 α -syn seviyesini önemli ölçüde azalttığını ve mikroglia ve astrositlerin aktivasyonunu engellediği bildirilmiştir [383].

CD56^{dim}CD16⁻ NK hücrelerinin LAG-3 ekspresyonun fazla olduğu, ek olarak LAG-3⁺ NK hücrelerinin hedef hücre uyarımına dirençli olduğu ve sitotoksik granül içeriklerinin (perforin ve granzim A) azaldığı rapor edilmiştir [384]. Çalışmamızda, TGF- β ile uyarım sonrası LAG-3 reseptör ekspresyonu orta-ileri derece Alzheimer hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Literatürde, farklı APOE izoformlarına göre NK hücre LAG-3, TIGIT, TLR9, NKG2D ve TIM-3 yüzey molekül ekspresyonları, hücre içi IFN- γ ve TNF- α sitokin düzeyleri karşılaştırılmamıştır.

Çalışmamızda, APOE- ϵ 3 taşıyan alzheimer hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, uyarımsız koşulda CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde LAG-3 ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı, benzer şekilde TGF- β uyarım sonrası APOE- ϵ 3 taşıyan CDR>1 hasta grubunda CD3⁺ NK hücrelerinde LAG-3 reseptör ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır.

Bu bulgular, LAG-3⁺ NK hücrelerinin hedef hücre uyarımına güçlü bir yanıt verdiğini, orta-ileri derece Alzheimer hastalarında önemli bir inhibitör fonksiyona sahip olabileceğini ve hastalığın prognozuna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, orta-ileri evre

Alzheimer hastalarının NK hücrelerinde artmış LAG-3 ekspresyonu ve beyinde patolojik tau reseptörü olarak nöronal LAG-3 artışı, Alzheimer hastalığındaki tau patolojisi için terapötik bir hedef olabileceğini tanımlamaktadır.

Kronik periodontitisin temel patojeni olan *Porphyromonas gingivalis*, Alzheimer hastalarının beyinde tespit edilmiştir. *P. gingivalis*, lizin-gingipain (Kgp), arginin-gingipain A (RgpA) ve arginin-gingipain B (RgpB)'den oluşan sistein proteazları olan gingipainler olarak bilinen majör virülans faktörleri üreten asakkarolitik Gram-negatif anaerobik bakteridir [385].

P. gingivalis'in geçici bakteriyemisi, diş fırçalama, diş ipi kullanma ve çiğneme sırasında diş etini zedeleme gibi yaygın aktiviteler ve diş bakım tedavisinde oluşmakta [386], koroner arterler [387], plasenta [388] ve karaciğer [389] dâhil olmak üzere çeşitli dokularda belgelenmiş translokasyonla sonuçlanmaktadır. Kardiyovasküler hastalığı olan hastaların tamamında (%100) *P. Gingivalis*'in arteriyel kolonizasyon gösterdiği bildirilmiştir [390].

P. gingivalis, dişeti fibroblastlarında IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi enflamatuvar sitokinlerin üretimini artırmaktadır [391].

Demir, bağışıklık hücrelerinin çoğalması ve olgunlaşmasında önemli bir rol oynadığı için bağışıklıkla yakından bağlantılıdır, ancak aynı zamanda yakalanması için rekabet eden patojenler ve maligniteler için de vazgeçilmezdir. LPS de dahil olmak üzere tehlike sinyalleri, doğal bağışıklık hücrelerinde hücre içi demir sekestrasyonuna neden olur. Ancak, aşırı sitozolik demir, inflamazomların aktivasyonunu, mikrogial aktiviteyi ve nöroenflamasyon riskini artırır. Ek olarak, serbest demirin MSS de bulunması latent ve LPS içeren mikropların ortaya çıkabileceğini böylece bağışıklık toleransını bozarak uzun süreli nöroenflamasyona neden olabileceği öne sürülmüştür [392].

Sağlıklı yaşlı bireylerin periferik kanında TIGIT düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Yaşlanma, bağışıklık sistemi işlev bozuklukları ve özellikle de T hücresi eksiklikleri ile ilişkilidir; bu durum çeşitli hastalıklara karşı duyarlılığı artırmaktadır. Yaşlı yetişkinlerin CD8⁺ T hücrelerinde de TIGIT reseptör ekspresyonunda artış gösterilmiştir. Yaşlı TIGIT⁺CD8⁺ T hücreleri, PD-1 dâhil olmak üzere diğer inhibitör reseptörlerin yüksek seviyelerde ifade ederken, anahtar kostimülatör reseptör CD28'in azalmış ekspresyonu, düşük sitokin üretimi ve artmış apoptoz duyarlılığı gibi immünoşenesens özellikler göstermektedir [393]. Ayrıca, TIGIT, demir düzeylerini azaltan IL-10 aracılığıyla bağışıklığı düzenlediğinden, normal yaşlanma sırasında oluşan demir yüklenmesine karşı dengeleyici bir mekanizma olarak ekspresyonu artabilir [394].

Son çalışmalar, LPS ile aktive mikrogliaların, TNF- α , IL-1 alfa ve kompleman bileşeni C1q dahil olmak üzere çeşitli sitokinleri salgılayarak trofik astrositlerin A1 astrositlere dönüşümünü sağladığını göstermektedir. A1 olarak tanımlanan astrositler canlı nöronların ve sinapsların ortadan kaldırılmasına katkıda bulunabileceğini gösterilmiştir [392]. TIGIT reseptörü henüz glial hücrelerde gösterilmemiştir, ancak normal yaşlanmada da artmış A1 astrositleri ve TIGIT ekspresyonu, Alzhemir hastalığında yeni risk belirteçleri olarak değerlendirilebilir [395].

CD56^{dim}CD16^{dim} NK hücrelerinin en yüksek TIGIT ekspresyonuna sahip olduğu gösterilmiştir. TIGIT⁺ NK hücreleri hedef hücre uyarımına güçlü bir şekilde yanıt verirken sitotoksik granül ekspresyonunun (perforin ve granzim A) değişmediği raporlanmıştır [384].

Bulgularımız, APOE- ϵ 3 taşıyan tüm Alzheimer hastalarında, TGF- β ve SC ile uyarım sonucu NK hücrelerinde TIGIT reseptör ekspresyonunun kontrol grubuna göre yüksek olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, APOE- ϵ 3 taşıyan Alzheimer hastalarında CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde TIGIT reseptör ekspresyonunun, sırasıyla, TGF- β ve hücre uyarım kokteyli ile uyarımda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde TIGIT reseptörü orta-ileri derece (CDR>1) Alzheimer hastalarında kontrol grubuna göre TGF- β ile uyarım sonucu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

TIGIT yüksek ifade düzeyleri, NK ve T hücre fonksiyonunun azalması ve CD107a, IFN- γ ve TNF- α gibi aktivasyon faktörlerinin önemli ölçüde daha düşük salgılanmasıyla ilişkilendirilmiştir [396].

Alzhemir hastaları NK hücre fonksiyonları ile ilgili çalışmalar tartışmalıdır. Araga ve arkadaşları, Alzhemir hastalarında sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında düşük NK hücre sitotoksik aktivitesi saptamalarına karşılık [397, 398], Solerte ve arkadaşları Alzhemir hastalarında sitokin uyarımı sonucu sağlıklı yaşlı donörlere kıyasla, NK hücrelerinde TNF- α ve IFN- γ üretiminin arttığını ve daha yüksek sitotoksik kapasiteye sahip olduğunu göstermişlerdir [326, 399]. Ayrıca, yüksek IFN- γ düzeyi, nöronal kök hücrelerin ölüm ile ilişkili olduğu dikkat çekmektedir [400, 401].

Çalışmamızda, CD3⁺CD56⁺16⁺ NK hücre alt grubunun IFN- γ düzeyleri Alzheimer hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre hücre uyarım kökteyli koşulunda anlamlı derecede yüksek tespit edilmiştir. Apolipoprotein- ϵ 3 ve - ϵ 4 alleli taşıyan tüm Alzheimer hastaları, CDR<1 ve CDR>1 hasta grupları ve kontrol grubunun uyarımsız, TGF- β ve SC ile uyarımı sonrası CD3⁺CD56⁺CD16⁻ ve CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubunun hücre içi IFN- γ ve TNF- α seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Bu sitokinleri sağlıklı kontrol ile

karşılaştırıldığında alzheimer hastalarında tek başına değerlendirdiğimiz de etkin bir disfonksiyona sahip olmadığını göstermektedir.

LPS kaynaklı septik farelerden alınan NK hücrelerinde, Tim-3 ekspresyonu ile IFN- γ üretimi arasında ters bir korelasyon gösterilmiştir. Ayrıca, Tim-3 yolunun blokajı *in vitro* ortamda NK hücrelerinin IFN- γ üretimini arttırmış, apoptozu azaltmış, ancak CD107a ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkisi saptanmamıştır [402].

Çalışmamızda CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubunda düşük TİM-3 ekspresyonuna karşılık, APOE- ϵ 4 taşıyan hafif evre Alzheimer demansı hastalarda CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinde TİM-3 resptör ekspresyonu saptanmamıştır. Düşük TİM-3 resptör ekspresyonu bu hücrelerinin yüksek IFN- γ üretimi ile ilişkili olduğunu ve alzheimer hastalığının ilerlemesinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) hastalığında immün sistemin aşırı aktivasyonu sonucu, özellikle beyinde mikroglialar tarafından pro-enflamatuvar sitokin salınımı artmakta, diyabetik hayvanların hipokampuslarında yüksek TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyeleri gözlenmiştir [403]. Ayrıca, Alzheimer ve T2DM'ye sahip çift mutant farelerin beyin mikrovaskülatüründe yüksek TNF- α ve IL-6 seviyeleri tespit edilmiştir. Bu durum, T2DM'nin neden olduğu serebrovasküler enflamasyonun, bilişsel bozukluktaki artışın temeli olabileceğini düşündürmektedir [404]. Mevcut literatürde T2DM hastalarından alınan periferik kan NK hücrelerinde, inhibitör reseptör Tim-3'ün ekspresyonu önemli ölçüde artarken, TNF- α salgılanması, aktive edici reseptör NKG2D'nin ekspresyonu ve CD107a degranülasyon kapasitesinin önemli ölçüde azaldığı ve negatif korelasyon gösterdiği öne sürülmüştür [405].

Yaşlanan nöroblastların yüksek seviyelerdeki IL-27 üretimi ve NK hücre aktivatör reseptörü NKG2D'nin bir ligandı olan RAE-1'in artışı, NK hücrelerini uyararak sitotoksiste işlevini başlatmakta, böylece Alzheimer hastalarında yeni nöronların oluşumunu engellenmektedir [6]. Hafif evre ve orta evre Alzheimer hastalar ile yaşlı sağlıklı donörlerde, son evre belirteçi olan CD57⁺ NK hücrelerin karşılaştırmasında, NKG2D ve CD94 reseptörlerin değişmediği gösterilmiştir [15].

Çalışmamızda, Apolipoprotein- ϵ 3 ve - ϵ 4 izoformlarının varlığında ve yokluğunda tüm alzheimer hastaları, CDR<1 ve CDR>1 hasta grupları ve kontrol grubunun uyarımsız, TGF- β ve SC ile uyarımı sonrası CD3⁻CD56⁺CD16⁻ ve CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK hücre alt grubunun NKG2D resptör düzeyinde ve hücre içi TNF- α sitokin seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Alzheimer hastalarının periferik kan lökosit ve beyin örneklerinden izole edilen DNA örneklerinde, HSV-1, epstein barr virüsü ve insan herpes virüsü-6 (HHV6) bulunurken CMV bulunmamıştır. Ayrıca, HHV6 Alzheimer hasta beyin örneklerinin %70'inde, kontrollerin ise %40'ında bulunurken, HSV-1 her ikisinde de yüksek seviyelerde saptanmıştır. Ek olarak kontrollerde %4'e kıyasla periferik kan mononükleer hücrelerinin %23'ünde HHV6 bulunmuştur [406]. Düşük TLR9 ekspresyonu, virüslerin immün sistemden kaçışına, latent kalmasına ve kronik nöroenflamasyona yol açarak Alzheimer hastalığı patogenezinde rol oynayabileceği fikrini desteklemektedir. APOE-ε4 aleli taşıyan bireylerin beyinde latent HSV-1 varlığının yanı sıra bu hastalarda bağışıklık sisteminin aralıklı olarak baskılanması, enfeksiyon ve periferik enflamasyon gibi olaylara neden olmakta böylece oluşan hasarın birikerek hastalığın ilerlemesine yol açtığı ileri sürülmektedir [16].

HHV-6A/B dahil olmak üzere herpes virüslerinin amiloid beta üretimini indüklediği, HHV-6A ve HHV-7 DNA ve RNA miktarları, kontrollere kıyasla Alzheimer beyinlerinde daha yaygın şekilde saptanmıştır [407]. HHV-6A, HHV-6B ve HHV-7 virüslerinin, NK hücre aktivitesini etkileme mekanizmaları farklılık göstermektedir. Doğal bağışıklıkta konakçı DNA sensör proteinleri TLR9, STING, IFI16, sitozolik nükleik asitleri tanıyan ve kontrol eden merkezi sinyal moleküllerini oluşturmaktadır. HHV-6B ve HHV-7 esas olarak TLR9 reseptör vasıtasıyla proenflamatuvar sitokin salgılayarak viral yayılmanın aktif kontrolüne aracılık edmektedir. HHV-6A ile enfekte olmuş NK hücrelerinde, anti-viral aktivasyon mekanizması olarak STING/STAT6 yolunu indüklemekte, ancak HHV-6A aracılı yanıtın immünosüpresif potansiyele sahip olduğu yeni bir mekanizmayla sitotoksik olmayan bir profil ile karakterize edilmiştir [408]. HHV-6A ve -6B enfeksiyonlarında NK hücre miRNA ve transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu üzerinde etkili olduğu gösterilmiş, bu da, NK hücrelerinin fonksiyon bozukluğunu, virüslerin immün sistemden kaçışını ve ilgili patolojilerin indüksiyonunu etkileyebilmektedir [409]. TLR9 ekspresyonu, sağlıklı kontrollere ve hafif evre Alzheimer hastalarına kıyasla orta evre Alzheimer deneklerinde azaldığı için Alzheimer hastalığının ilerlemesinde aktif rolü olduğu düşünülmektedir [15].

Çalışmamızda, CD3⁺CD56⁺CD16⁻ NK hücrelerinde ise TLR9 reseptörü orta-ileri derece Alzheimer hasta grubunda hafif düzey hasta grubuna göre uyarımsız koşulda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Hafif düzey Alzheimer hastaları orta-ileri derece Alzheimer hastalarına göre nöroenflamasyonun en şiddetli dönemini geçirmekte [410] bu durumda TLR9 reseptörünün baskılanması ve/veya fizyolojik olarak az miktarda ekspresyonu

mikroorganizmaların ve buna bağılı virölans faktörlerin Alzheimer hastalığının ilerlemesine katkısı olacağını düşündürmektedir.

Alzheimer hastaları CD3⁺ NK hücrelerinde NKG2D reseptörü ve IFN- γ seviyeleri arasında saptanan güçlü pozitif korelasyon, APOE veya hastalık evresinin bu korelasyon üzerinde bir etkisi olmadığını göstermiştir. Hafif düzey Alzheimer hasta grubunda LAG-3 ekspresyon düzeyi ile korele biçimde artış gösteren TLR9, NKG2D ve IFN- γ seviyeleri orta-ileri derece hasta grubunda gözlenmemiştir. Ayrıca, hafif düzey Alzheimer hasta grubunda TNF- α ve TİGİT seviyelerindeki artış orta-ileri derece hasta grubunda saptanmamıştır.

APOE- ϵ 3 aleli taşıyan Alzheimer hastalarında LAG-3 ekspresyon düzeyi ile pozitif korelasyon gösteren TLR9, NKG2D ve IFN- γ seviyeleri APOE- ϵ 4 aleli taşıyan Alzheimer hasta grubunda saptanmamıştır. APOE- ϵ 4 alelini taşıyan Alzheimer hastalarında IFN- γ ve TNF- α sitokinleri arasında pozitif bir korelasyon görülmesine karşılık, APOE- ϵ 3 alelini taşıyan Alzheimer grubunda bu bulguya rastlanmamıştır.

Bağıışıklık sisteminin beyin fonksiyonlarını düzenlemede rol oynadığını gösteren artan kanıtlara rağmen, nörodejeneratif hastalıklarda bağışıklık ve enflamasyon hücrelerinin özel rolü hala yeterince anlaşılmamıştır. Nöroenflamasyon, nöronlar, makroglia, mikroglia ve infiltre eden lökositler dâhil olmak üzere CNS'de bulunan tüm hücre yanıtlarının karmaşık bir entegrasyonudur. Başlatıcı hasar, çevresel faktörler, genetik geçmiş ve yaş geçmiş deneyimler, bu karmaşık nöroenflamatuvar devrenin entegre yanıtını modüle etmek için bir araya gelmektedir.

NK hücrelerinin nörodejeneratif hastalıklardaki etki mekanizması muhtemelen çok faktörlüdür ve henüz net olarak anlaşılmamıştır. Beyin fonksiyonlarını düzenlemede rol oynadığı bilinen ve Alzheimer hastalığının nöroenflamasyonunda etkin bir röle sahip olan NK hücrelerinin nöroprotektif veya nörotoksik enflamatuvar yanıtlara yol açmak için nasıl etkileşime girdiğini karakterize edilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Masliah, E. and T. Saitoh, *Lewy bodies, Alzheimer pathology and APP mutation*. Neurosci Lett, 1994. **180**(2): p. 292-3.
2. Moro, M.L., et al., *Pyroglutamate and Isoaspartate modified Amyloid-Beta in ageing and Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol Commun, 2018. **6**(1): p. 3.
3. Wyss-Coray, T., *Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?* Nat Med, 2006. **12**(9): p. 1005-15.
4. Petersen, A.M. and B.K. Pedersen, *The anti-inflammatory effect of exercise*. J Appl Physiol (1985), 2005. **98**(4): p. 1154-62.
5. Petersen, A.M. and B.K. Pedersen, *The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise*. J Physiol Pharmacol, 2006. **57 Suppl 10**: p. 43-51.
6. Jin, W.N., et al., *Neuroblast senescence in the aged brain augments natural killer cell cytotoxicity leading to impaired neurogenesis and cognition*. Nat Neurosci, 2021. **24**(1): p. 61-73.
7. Krishnaraj, R., *Immunomodulation by 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA): 1. Down-regulation of natural cell-mediated cytotoxicity in vitro*. Immunopharmacology, 1991. **22**(2): p. 69-76.
8. Zhang, Y., et al., *Depletion of NK Cells Improves Cognitive Function in the Alzheimer Disease Mouse Model*. J Immunol, 2020. **205**(2): p. 502-510.
9. Jadidi-Niaragh, F., et al., *The role of natural killer cells in Alzheimer's disease*. Scand J Immunol, 2012. **76**(5): p. 451-6.
10. Solana, C., R. Tarazona, and R. Solana, *Immunosenescence of Natural Killer Cells, Inflammation, and Alzheimer's Disease*. Int J Alzheimers Dis, 2018. **2018**: p. 3128758.
11. Pereira, L., et al., *IFN gamma regulates proliferation and neuronal differentiation by STAT1 in adult SVZ niche*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 270.
12. Plantone, D., et al., *The Role of TNF-alpha in Alzheimer's Disease: A Narrative Review*. Cells, 2023. **13**(1).
13. Yamazaki, Y., et al., *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies*. Nat Rev Neurol, 2019. **15**(9): p. 501-518.
14. Zhang, H., L.M. Wu, and J. Wu, *Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines*. Mediators Inflamm, 2011. **2011**: p. 949072.

15. Le Page, A., et al., *NK Cells are Activated in Amnesic Mild Cognitive Impairment but not in Mild Alzheimer's Disease Patients*. J Alzheimers Dis, 2015. **46**(1): p. 93-107.
16. Itzhaki, R.F., *Corroboration of a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's Disease*. Front Aging Neurosci, 2018. **10**: p. 324.
17. Solerte, S.B., et al., *Decreased immunosuppressive effect of cortisol on natural killer cytotoxic activity in senile dementia of the Alzheimer type*. Dement Geriatr Cogn Disord, 1998. **9**(3): p. 149-56.
18. Munoz-Jimenez, M., et al., *Antidiabetic Drugs in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2020. **49**(5): p. 423-434.
19. Yassine, H.N. and C.E. Finch, *APOE Alleles and Diet in Brain Aging and Alzheimer's Disease*. Front Aging Neurosci, 2020. **12**: p. 150.
20. Liu, C.C., et al., *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy*. Nat Rev Neurol, 2013. **9**(2): p. 106-18.
21. Yu, J.T., L. Tan, and J. Hardy, *Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update*. Annu Rev Neurosci, 2014. **37**: p. 79-100.
22. Wilson, C., et al., *Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E*. Science, 1991. **252**(5014): p. 1817-22.
23. Mahley, R.W. and S.C. Rall, Jr., *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. **1**: p. 507-37.
24. McIntosh, A.M., et al., *The apolipoprotein E (APOE) gene appears functionally monomorphic in chimpanzees (Pan troglodytes)*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47760.
25. Husain, M.A., B. Laurent, and M. Plourde, *APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics*. Front Neurosci, 2021. **15**: p. 630502.
26. [cited 2024 07/23/2024]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130203-APOE>.
27. Kang, S.S., et al., *Microglial translational profiling reveals a convergent APOE pathway from aging, amyloid, and tau*. J Exp Med, 2018. **215**(9): p. 2235-2245.
28. Achariyar, T.M., et al., *Glymphatic distribution of CSF-derived apoE into brain is isoform specific and suppressed during sleep deprivation*. Mol Neurodegener, 2016. **11**(1): p. 74.
29. Koch, S., et al., *Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid*. J Lipid Res, 2001. **42**(7): p. 1143-51.
30. Castellano, J.M., et al., *Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance*. Sci Transl Med, 2011. **3**(89): p. 89ra57.
31. Hu, J., et al., *Opposing effects of viral mediated brain expression of apolipoprotein E2 (apoE2) and apoE4 on apoE lipidation and Abeta metabolism in apoE4-targeted replacement mice*. Mol Neurodegener, 2015. **10**: p. 6.
32. Flowers, S.A. and G.W. Rebeck, *APOE in the normal brain*. Neurobiol Dis, 2020. **136**: p. 104724.
33. Nguyen, D., et al., *Molecular basis for the differences in lipid and lipoprotein binding properties of human apolipoproteins E3 and E4*. Biochemistry, 2010. **49**(51): p. 10881-9.
34. Hatters, D.M., C.A. Peters-Libeu, and K.H. Weisgraber, *Apolipoprotein E structure: insights into function*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(8): p. 445-54.
35. Peng, D., et al., *Lipoproteins produced by ApoE-/- astrocytes infected with adenovirus expressing human ApoE*. J Neurochem, 2003. **86**(6): p. 1391-402.
36. Zhao, J., et al., *APOE epsilon4/epsilon4 diminishes neurotrophic function of human iPSC-derived astrocytes*. Hum Mol Genet, 2017. **26**(14): p. 2690-2700.
37. Villeneuve, S., D. Brisson, and D. Gaudet, *Influence of Abdominal Obesity on the Lipid-Lipoprotein Profile in Apoprotein E2/4 Carriers: The Effect of an Apparent Duality*. J Lipids, 2015. **2015**: p. 742408.

38. Russell, D.W., et al., *Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain.* Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 1017-40.
39. Strittmatter, W.J., et al., *Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1977-81.
40. Rapp, A., B. Gmeiner, and M. Hutterer, *Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes.* Biochimie, 2006. **88**(5): p. 473-83.
41. Hara, M., et al., *Isoform-dependent cholesterol efflux from macrophages by apolipoprotein E is modulated by cell surface proteoglycans.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 269-74.
42. Tcw, J., et al., *Cholesterol and matrisome pathways dysregulated in astrocytes and microglia.* Cell, 2022. **185**(13): p. 2213-2233 e25.
43. Nelson, T.J. and A. Sen, *Apolipoprotein E particle size is increased in Alzheimer's disease.* Alzheimers Dement (Amst), 2019. **11**: p. 10-18.
44. Yassine, H.N., et al., *ABCA1-Mediated Cholesterol Efflux Capacity to Cerebrospinal Fluid Is Reduced in Patients With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease.* J Am Heart Assoc, 2016. **5**(2).
45. Rebeck, G.W., *The role of APOE on lipid homeostasis and inflammation in normal brains.* J Lipid Res, 2017. **58**(8): p. 1493-1499.
46. Riddell, D.R., et al., *Impact of apolipoprotein E (ApoE) polymorphism on brain ApoE levels.* J Neurosci, 2008. **28**(45): p. 11445-53.
47. Ulrich, J.D., et al., *In vivo measurement of apolipoprotein E from the brain interstitial fluid using microdialysis.* Mol Neurodegener, 2013. **8**: p. 13.
48. Baker-Nigh, A.T., et al., *Human Central Nervous System (CNS) ApoE Isoforms Are Increased by Age, Differentially Altered by Amyloidosis, and Relative Amounts Reversed in the CNS Compared with Plasma.* J Biol Chem, 2016. **291**(53): p. 27204-27218.
49. Martinez-Morillo, E., et al., *Total apolipoprotein E levels and specific isoform composition in cerebrospinal fluid and plasma from Alzheimer's disease patients and controls.* Acta Neuropathol, 2014. **127**(5): p. 633-43.
50. Corder, E.H., et al., *Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease.* Nat Genet, 1994. **7**(2): p. 180-4.
51. Marottoli, F.M., et al., *Peripheral Inflammation, Apolipoprotein E4, and Amyloid-beta Interact to Induce Cognitive and Cerebrovascular Dysfunction.* ASN Neuro, 2017. **9**(4): p. 1759091417719201.
52. Tachibana, M., et al., *APOE4-mediated amyloid-beta pathology depends on its neuronal receptor LRP1.* J Clin Invest, 2019. **129**(3): p. 1272-1277.
53. Kloske, C.M. and D.M. Wilcock, *The Important Interface Between Apolipoprotein E and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 754.
54. Ma, Q., et al., *Blood-brain barrier-associated pericytes internalize and clear aggregated amyloid-beta42 by LRP1-dependent apolipoprotein E isoform-specific mechanism.* Mol Neurodegener, 2018. **13**(1): p. 57.
55. Vasilevskaya, A., et al., *Interaction of APOE4 alleles and PET tau imaging in former contact sport athletes.* Neuroimage Clin, 2020. **26**: p. 102212.
56. Rawat, V., et al., *ApoE4 Alters ABCA1 Membrane Trafficking in Astrocytes.* J Neurosci, 2019. **39**(48): p. 9611-9622.
57. Zhao, N., et al., *Apolipoprotein E4 Impairs Neuronal Insulin Signaling by Trapping Insulin Receptor in the Endosomes.* Neuron, 2017. **96**(1): p. 115-129 e5.
58. Svennerholm, L., K. Bostrom, and B. Jungbjer, *Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes.* Acta Neuropathol, 1997. **94**(4): p. 345-52.

59. Mesa-Herrera, F., et al., *Lipid and Lipid Raft Alteration in Aging and Neurodegenerative Diseases: A Window for the Development of New Biomarkers*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(15).
60. Chouinard-Watkins, R., et al., *Disturbance in uniformly ¹³C-labelled DHA metabolism in elderly human subjects carrying the apoE epsilon4 allele*. Br J Nutr, 2013. **110**(10): p. 1751-9.
61. Fernandez, C.G., et al., *The Role of APOE4 in Disrupting the Homeostatic Functions of Astrocytes and Microglia in Aging and Alzheimer's Disease*. Front Aging Neurosci, 2019. **11**: p. 14.
62. Williams, H.C., et al., *APOE alters glucose flux through central carbon pathways in astrocytes*. Neurobiol Dis, 2020. **136**: p. 104742.
63. Cui, W., et al., *Activation of liver X receptor decreases BACE1 expression and activity by reducing membrane cholesterol levels*. Neurochem Res, 2011. **36**(10): p. 1910-21.
64. Lillis, A.P., I. Mikhailenko, and D.K. Strickland, *Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1884-93.
65. Prasad, H. and R. Rao, *Amyloid clearance defect in ApoE4 astrocytes is reversed by epigenetic correction of endosomal pH*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(28): p. E6640-E6649.
66. Boisvert, M.M., et al., *The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain*. Cell Rep, 2018. **22**(1): p. 269-285.
67. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
68. Bales, K.R., et al., *Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 263-4.
69. Liu, C.C., et al., *ApoE4 Accelerates Early Seeding of Amyloid Pathology*. Neuron, 2017. **96**(5): p. 1024-1032 e3.
70. Gouras, G.K., et al., *Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain*. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 15-20.
71. Zhao, W., et al., *Human APOE genotype affects intraneuronal Abeta1-42 accumulation in a lentiviral gene transfer model*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(5): p. 1365-75.
72. He, X., et al., *Apolipoprotein receptor 2 and X11 alpha/beta mediate apolipoprotein E-induced endocytosis of amyloid-beta precursor protein and beta-secretase, leading to amyloid-beta production*. J Neurosci, 2007. **27**(15): p. 4052-60.
73. Tarasoff-Conway, J.M., et al., *Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease*. Nat Rev Neurol, 2015. **11**(8): p. 457-70.
74. Kanekiyo, T., H. Xu, and G. Bu, *ApoE and Abeta in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners?* Neuron, 2014. **81**(4): p. 740-54.
75. Qiu, W.Q., et al., *Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32730-8.
76. Koistinaho, M., et al., *Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides*. Nat Med, 2004. **10**(7): p. 719-26.
77. Jiang, Q., et al., *ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta*. Neuron, 2008. **58**(5): p. 681-93.
78. Lee, C.Y., et al., *Apolipoprotein E promotes beta-amyloid trafficking and degradation by modulating microglial cholesterol levels*. J Biol Chem, 2012. **287**(3): p. 2032-44.
79. Lin, Y.T., et al., *APOE4 Causes Widespread Molecular and Cellular Alterations Associated with Alzheimer's Disease Phenotypes in Human iPSC-Derived Brain Cell Types*. Neuron, 2018. **98**(6): p. 1141-1154 e7.
80. Basak, J.M., et al., *Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of Abeta uptake and degradation by astrocytes*. J Biol Chem, 2012. **287**(17): p. 13959-71.

81. Verghese, P.B., et al., *ApoE influences amyloid-beta (Abeta) clearance despite minimal apoE/Abeta association in physiological conditions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(19): p. E1807-16.
82. Li, J., et al., *Differential regulation of amyloid-beta endocytic trafficking and lysosomal degradation by apolipoprotein E isoforms*. J Biol Chem, 2012. **287**(53): p. 44593-601.
83. Nishitsuji, K., et al., *Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain barrier model*. J Biol Chem, 2011. **286**(20): p. 17536-42.
84. Deane, R., et al., *apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain*. J Clin Invest, 2008. **118**(12): p. 4002-13.
85. Bejanin, A., et al., *Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease*. Brain, 2017. **140**(12): p. 3286-3300.
86. Rohn, T.T., et al., *Identification of an amino-terminal fragment of apolipoprotein E4 that localizes to neurofibrillary tangles of the Alzheimer's disease brain*. Brain Res, 2012. **1475**: p. 106-15.
87. Hu, W., et al., *Expression of Tau Pathology-Related Proteins in Different Brain Regions: A Molecular Basis of Tau Pathogenesis*. Front Aging Neurosci, 2017. **9**: p. 311.
88. Baek, M.S., et al., *Effect of APOE epsilon4 genotype on amyloid-beta and tau accumulation in Alzheimer's disease*. Alzheimers Res Ther, 2020. **12**(1): p. 140.
89. Whitwell, J.L., et al., *[(18) F]AV-1451 clustering of entorhinal and cortical uptake in Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 2018. **83**(2): p. 248-257.
90. Shi, Y., et al., *Microglia drive APOE-dependent neurodegeneration in a tauopathy mouse model*. J Exp Med, 2019. **216**(11): p. 2546-2561.
91. van der Kant, R., L.S.B. Goldstein, and R. Ossenkoppele, *Amyloid-beta-independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease*. Nat Rev Neurosci, 2020. **21**(1): p. 21-35.
92. Kang, S.S., et al., *ApoE4 inhibition of VMAT2 in the locus coeruleus exacerbates Tau pathology in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2021. **142**(1): p. 139-158.
93. Shi, Y., et al., *ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy*. Nature, 2017. **549**(7673): p. 523-527.
94. Wadhvani, A.R., et al., *Neuronal apolipoprotein E4 increases cell death and phosphorylated tau release in alzheimer disease*. Ann Neurol, 2019. **85**(5): p. 726-739.
95. Wang, C., et al., *Selective removal of astrocytic APOE4 strongly protects against tau-mediated neurodegeneration and decreases synaptic phagocytosis by microglia*. Neuron, 2021. **109**(10): p. 1657-1674 e7.
96. Jablonski, A.M., et al., *Astrocytic expression of the Alzheimer's disease risk allele, ApoEepsilon4, potentiates neuronal tau pathology in multiple preclinical models*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 3438.
97. Salvado, G., et al., *Differential associations of APOE-epsilon2 and APOE-epsilon4 alleles with PET-measured amyloid-beta and tau deposition in older individuals without dementia*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2021. **48**(7): p. 2212-2224.
98. Therriault, J., et al., *Association of Apolipoprotein E epsilon4 With Medial Temporal Tau Independent of Amyloid-beta*. JAMA Neurol, 2020. **77**(4): p. 470-479.
99. Yan, S., et al., *Association of sex and APOE epsilon4 with brain tau deposition and atrophy in older adults with Alzheimer's disease*. Theranostics, 2020. **10**(23): p. 10563-10572.
100. Liu, Y., et al., *The Associations of Cerebrospinal Fluid ApoE and Biomarkers of Alzheimer's Disease: Exploring Interactions With Sex*. Front Neurosci, 2021. **15**: p. 633576.
101. Koch, G., et al., *CSF tau is associated with impaired cortical plasticity, cognitive decline and astrocyte survival only in APOE4-positive Alzheimer's disease*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 13728.
102. Rodriguez-Vieitez, E. and H.M. Nielsen, *Associations Between APOE Variants, Tau and alpha-Synuclein*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1184**: p. 177-186.

103. Grothe, M.J., et al., *Multimodal characterization of older APOE2 carriers reveals selective reduction of amyloid load*. *Neurology*, 2017. **88**(6): p. 569-576.
104. Zhao, N., et al., *APOE epsilon2 is associated with increased tau pathology in primary tauopathy*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 4388.
105. Yamada, K., et al., *In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice*. *J Neurosci*, 2011. **31**(37): p. 13110-7.
106. Shi, Y., et al., *Overexpressing low-density lipoprotein receptor reduces tau-associated neurodegeneration in relation to apoE-linked mechanisms*. *Neuron*, 2021. **109**(15): p. 2413-2426 e7.
107. Rodriguez-Mogeda, C., et al., *The role of CD56(bright) NK cells in neurodegenerative disorders*. *J Neuroinflammation*, 2024. **21**(1): p. 48.
108. Deniz, G., *NK ve NKT hücreler*. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*, 2007. **3**(43): p. 18-25.
109. Ni, J., et al., *Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors*. *J Exp Med*, 2012. **209**(13): p. 2351-65.
110. Oka, N., et al., *IL-12 regulates the expansion, phenotype, and function of murine NK cells activated by IL-15 and IL-18*. *Cancer Immunol Immunother*, 2020. **69**(9): p. 1699-1712.
111. Martin, J.F., et al., *An IL-2 paradox: blocking CD25 on T cells induces IL-2-driven activation of CD56(bright) NK cells*. *J Immunol*, 2010. **185**(2): p. 1311-20.
112. Steinman, L., *Multiple sclerosis: a two-stage disease*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 762-4.
113. Deniz, G., et al., *Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(3): p. 879-84.
114. Peritt, D., et al., *Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets*. *J Immunol*, 1998. **161**(11): p. 5821-4.
115. Van Acker, H.H., et al., *CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity?* *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 892.
116. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. *Blood*, 2008. **112**(3): p. 461-9.
117. Bhatnagar, N., et al., *FcgammaRIII (CD16)-mediated ADCC by NK cells is regulated by monocytes and FcgammaRII (CD32)*. *Eur J Immunol*, 2014. **44**(11): p. 3368-79.
118. Georg, P., et al., *Complement activation induces excessive T cell cytotoxicity in severe COVID-19*. *Cell*, 2022. **185**(3): p. 493-512 e25.
119. Vivier, E., et al., *Tyrosine phosphorylation of the Fc gamma RIII(CD16): zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing*. *J Immunol*, 1991. **146**(1): p. 206-10.
120. Zhang, Y., et al., *Crystal structure of the extracellular domain of a human Fc gamma RIII*. *Immunity*, 2000. **13**(3): p. 387-95.
121. Romee, R., et al., *NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17)*. *Blood*, 2013. **121**(18): p. 3599-608.
122. Dogra, P., et al., *Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence*. *Cell*, 2020. **180**(4): p. 749-763 e13.
123. Weber, S., et al., *Distinctive CD56(dim) NK subset profiles and increased NKG2D expression in blood NK cells of Parkinson's disease patients*. *NPJ Parkinsons Dis*, 2024. **10**(1): p. 36.
124. Perera Molligoda Arachchige, A.S., *Human NK cells: From development to effector functions*. *Innate Immun*, 2021. **27**(3): p. 212-229.
125. Seo, S. and E.M. Mace, *Diversity of human NK cell developmental pathways defined by single-cell analyses*. *Curr Opin Immunol*, 2022. **74**: p. 106-111.
126. Beziat, V., et al., *CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation*. *J Immunol*, 2011. **186**(12): p. 6753-61.
127. Vujanovic, L., et al., *CD56(dim) CD16(-) Natural Killer Cell Profiling in Melanoma Patients Receiving a Cancer Vaccine and Interferon-alpha*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 14.

128. Muller-Durovic, B., et al., *CD56-negative NK cells with impaired effector function expand in CMV and EBV co-infected healthy donors with age*. Aging (Albany NY), 2019. **11**(2): p. 724-740.
129. Freud, A.G., et al., *The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity*. Immunity, 2017. **47**(5): p. 820-833.
130. Collins, P.L., et al., *Gene Regulatory Programs Conferring Phenotypic Identities to Human NK Cells*. Cell, 2019. **176**(1-2): p. 348-360 e12.
131. Bernardini, G., et al., *Dysregulation of Chemokine/Chemokine Receptor Axes and NK Cell Tissue Localization during Diseases*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 402.
132. Castriconi, R., et al., *Molecular Mechanisms Directing Migration and Retention of Natural Killer Cells in Human Tissues*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2324.
133. Prager, I. and C. Watzl, *Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity*. J Leukoc Biol, 2019. **105**(6): p. 1319-1329.
134. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
135. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167-76.
136. Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld, *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. J Immunol Methods, 2004. **294**(1-2): p. 15-22.
137. Aktas, E., et al., *Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity*. Cell Immunol, 2009. **254**(2): p. 149-54.
138. Smyth, M.J., et al., *New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(11): p. 850-61.
139. Romagnani, C., et al., *CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4947-55.
140. Lin, S.J., et al., *Cytotoxic Function and Cytokine Production of Natural Killer Cells and Natural Killer T-Like Cells in Systemic Lupus Erythematosus Regulation with Interleukin-15*. Mediators Inflamm, 2019. **2019**: p. 4236562.
141. Plantone, D., et al., *Circulating CD56dim NK cells expressing perforin are increased in progressive multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2013. **265**(1-2): p. 124-7.
142. Jiang, W., et al., *Unexpected role for granzyme K in CD56bright NK cell-mediated immunoregulation of multiple sclerosis*. J Immunol, 2011. **187**(2): p. 781-90.
143. Nielsen, N., et al., *Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31959.
144. Laroni, A., et al., *Dysregulation of regulatory CD56(bright) NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis*. J Autoimmun, 2016. **72**: p. 8-18.
145. Long, E.O., et al., *Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 227-58.
146. Campbell, K.S. and J. Hasegawa, *Natural killer cell biology: an update and future directions*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(3): p. 536-544.
147. Michel, T., et al., *Human CD56bright NK Cells: An Update*. J Immunol, 2016. **196**(7): p. 2923-31.
148. Del Zotto, G., et al., *Comprehensive Phenotyping of Human PB NK Cells by Flow Cytometry*. Cytometry A, 2020. **97**(9): p. 891-899.
149. Gross, C.C., et al., *Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(21): p. E2973-82.
150. Alspach, E., D.M. Lussier, and R.D. Schreiber, *Interferon gamma and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019. **11**(3).
151. Monteiro, S., et al., *Brain interference: Revisiting the role of IFNgamma in the central nervous system*. Prog Neurobiol, 2017. **156**: p. 149-163.

152. Bradley, C.A., *Prophylactic TNF blockade reduces autoimmune toxicity*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(7): p. 500.
153. Jiang, Y., et al., *IL-10(+) NK and TGF-beta(+) NK cells play negative regulatory roles in HIV infection*. BMC Infect Dis, 2018. **18**(1): p. 80.
154. Meng, X.M., D.J. Nikolic-Paterson, and H.Y. Lan, *TGF-beta: the master regulator of fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(6): p. 325-38.
155. Massague, J., *TGFbeta signalling in context*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(10): p. 616-30.
156. Nakao, A., et al., *Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 631-5.
157. ; Available from:
[https://en.wikipedia.org/wiki/Transforming_growth_factor_beta#:~:text=Transforming%20growth%20factor%20beta%20\(TGF,all%20white%20blood%20cell%20lineages](https://en.wikipedia.org/wiki/Transforming_growth_factor_beta#:~:text=Transforming%20growth%20factor%20beta%20(TGF,all%20white%20blood%20cell%20lineages).
158. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.
159. ten Dijke, P. and C.S. Hill, *New insights into TGF-beta-Smad signalling*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(5): p. 265-73.
160. Stetler-Stevenson, W.G., S. Aznavoorian, and L.A. Liotta, *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis*. Annu Rev Cell Biol, 1993. **9**: p. 541-73.
161. Barcellos-Hoff, M.H. and T.A. Dix, *Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(9): p. 1077-83.
162. Wipff, P.J. and B. Hinz, *Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(8-9): p. 601-15.
163. Schultz-Cherry, S. and J.E. Murphy-Ullrich, *Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism*. J Cell Biol, 1993. **122**(4): p. 923-32.
164. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 163-76.
165. Taipale, J., et al., *Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein*. J Cell Biol, 1994. **124**(1-2): p. 171-81.
166. Lichtman, M.K., M. Otero-Vinas, and V. Falanga, *Transforming growth factor beta (TGF-beta) isoforms in wound healing and fibrosis*. Wound Repair Regen, 2016. **24**(2): p. 215-22.
167. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, *Regulation of immune responses by TGF-beta*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 137-61.
168. Moretta, L., et al., *Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications*. Int Arch Allergy Immunol, 2014. **164**(4): p. 253-64.
169. Balatsoukas, A., F. Rossignoli, and K. Shah, *NK cells in the brain: implications for brain tumor development and therapy*. Trends Mol Med, 2022. **28**(3): p. 194-209.
170. Radaev, S. and P.D. Sun, *Structure and function of natural killer cell surface receptors*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2003. **32**: p. 93-114.
171. Colonna, M., *Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors*. Immunol Rev, 1997. **155**: p. 127-33.
172. Cosman, D., et al., *A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules*. Immunity, 1997. **7**(2): p. 273-82.
173. Bottino, C., et al., *The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering*. Hum Immunol, 2000. **61**(1): p. 1-6.
174. Carretero, M., et al., *The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules*. Eur J Immunol, 1997. **27**(2): p. 563-7.

175. Medjouel Khelifi, H., et al., *Role of the ITAM-Bearing Receptors Expressed by Natural Killer Cells in Cancer*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 898745.
176. Watzl, C. and E.O. Long, *Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells*. Curr Protoc Immunol, 2010. **Chapter 11**: p. Unit 11 9B.
177. Stokic-Trtica, V., A. Diefenbach, and C.S.N. Klose, *NK Cell Development in Times of Innate Lymphoid Cell Diversity*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 813.
178. Kellner, C., M. Gramatzki, and M. Peipp, *Promoting natural killer cell functions by recombinant immunoligands mimicking an induced self phenotype*. Oncoimmunology, 2013. **2**(6): p. e24481.
179. Barrow, A.D., C.J. Martin, and M. Colonna, *The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 909.
180. Pende, D., et al., *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells*. J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1505-16.
181. Imsirovic, V., et al., *Maintaining the Balance: Regulation of NK Cell Activity*. Cells, 2024. **13**(17).
182. Lanier, L.L., *NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(6): p. 575-82.
183. Groh, V., et al., *Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9452-7.
184. Groh, V., et al., *Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity*. Nat Immunol, 2006. **7**(7): p. 755-62.
185. Brown, G.D., J.A. Willment, and L. Whitehead, *C-type lectins in immunity and homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(6): p. 374-389.
186. Wensveen, F.M., V. Jelencic, and B. Polic, *NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 441.
187. Zafirova, B., et al., *Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(21): p. 3519-29.
188. Parsons, M.S., et al., *NKG2D Acts as a Co-Receptor for Natural Killer Cell-Mediated Anti-HIV-1 Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2016. **32**(10-11): p. 1089-1096.
189. Bryceson, Y.T., et al., *Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion*. Blood, 2006. **107**(1): p. 159-66.
190. Bryceson, Y.T., H.G. Ljunggren, and E.O. Long, *Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors*. Blood, 2009. **114**(13): p. 2657-66.
191. Adib-Conquy, M., et al., *TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals*. Immunol Cell Biol, 2014. **92**(3): p. 256-62.
192. Chalifour, A., et al., *Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1778-83.
193. Lauzon, N.M., et al., *The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity*. Cell Immunol, 2006. **241**(2): p. 102-12.
194. Pisegna, S., et al., *p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells*. Blood, 2004. **104**(13): p. 4157-64.
195. Brennan, J.J. and T.D. Gilmore, *Evolutionary Origins of Toll-like Receptor Signaling*. Mol Biol Evol, 2018. **35**(7): p. 1576-1587.
196. Gao, C., et al., *TLR9 signaling activation at different stages in colorectal cancer and NF-kappaB expression*. Onco Targets Ther, 2018. **11**: p. 5963-5971.
197. Karapetyan, L., J.J. Luke, and D. Davar, *Toll-Like Receptor 9 Agonists in Cancer*. Onco Targets Ther, 2020. **13**: p. 10039-10060.

198. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
199. Lindau, D., et al., *Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9*. Eur J Immunol, 2013. **43**(8): p. 2101-13.
200. Guerrier, T., et al., *TLR9 expressed on plasma membrane acts as a negative regulator of human B cell response*. J Autoimmun, 2014. **51**: p. 23-9.
201. Hotz, M.J., et al., *Red Blood Cells Homeostatically Bind Mitochondrial DNA through TLR9 to Maintain Quiescence and to Prevent Lung Injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2018. **197**(4): p. 470-480.
202. Mielcarska, M.B., M. Bossowska-Nowicka, and F.N. Toka, *Cell Surface Expression of Endosomal Toll-Like Receptors-A Necessity or a Superfluous Duplication?* Front Immunol, 2020. **11**: p. 620972.
203. Lam, L.K.M., et al., *DNA binding to TLR9 expressed by red blood cells promotes innate immune activation and anemia*. Sci Transl Med, 2021. **13**(616): p. eabj1008.
204. Kim, J., et al., *Damage sensing through TLR9 Promotes Viral Clearance and Recovery During Influenza Infection*. bioRxiv, 2024.
205. Gallois, A., et al., *Reversal of natural killer cell exhaustion by TIM-3 blockade*. Oncoimmunology, 2014. **3**(12): p. e946365.
206. Ndhlovu, L.C., et al., *Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity*. Blood, 2012. **119**(16): p. 3734-43.
207. Monney, L., et al., *Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 536-41.
208. Chiba, S., et al., *Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1*. Nat Immunol, 2012. **13**(9): p. 832-42.
209. Wolf, Y., A.C. Anderson, and V.K. Kuchroo, *TIM3 comes of age as an inhibitory receptor*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(3): p. 173-185.
210. Zhu, C., et al., *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1245-52.
211. Huang, Y.H., et al., *CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 386-90.
212. Yasinska, I.M., et al., *The Tim-3-Galectin-9 Pathway and Its Regulatory Mechanisms in Human Breast Cancer*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1594.
213. da Silva, I.P., et al., *Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(5): p. 410-22.
214. Golden-Mason, L., et al., *Hepatitis C viral infection is associated with activated cytolytic natural killer cells expressing high levels of T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3*. Clin Immunol, 2015. **158**(1): p. 114-25.
215. Xu, L.Y., et al., *Tim-3 expression by peripheral natural killer cells and natural killer T cells increases in patients with lung cancer--reduction after surgical resection*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(22): p. 9945-8.
216. Zhang, W., et al., *The functional potency of natural killer cells in response to IL-2/IL-15/IL-21 stimulation is limited by a concurrent upregulation of Tim-3 in bladder cancer*. Exp Cell Res, 2018. **372**(2): p. 92-98.
217. Wang, Z., et al., *The Clinical Significance of Abnormal Tim-3 Expression on NK Cells from Patients with Gastric Cancer*. Immunol Invest, 2015. **44**(6): p. 578-89.
218. Zheng, Y., et al., *TNF-alpha-induced Tim-3 expression marks the dysfunction of infiltrating natural killer cells in human esophageal cancer*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 165.

219. Degos, C., et al., *Endometrial Tumor Microenvironment Alters Human NK Cell Recruitment, and Resident NK Cell Phenotype and Function*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 877.
220. Tallarico, R., et al., *IL-15, TIM-3 and NK cells subsets predict responsiveness to anti-CTLA-4 treatment in melanoma patients*. Oncoimmunology, 2017. **6**(2): p. e1261242.
221. Zhang, T., et al., *Decreased TIM-3 expression of peripheral blood natural killer cells in patients with severe aplastic anemia*. Cell Immunol, 2017. **318**: p. 17-22.
222. Gleason, M.K., et al., *Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9*. Blood, 2012. **119**(13): p. 3064-72.
223. Brennan, C.W., et al., *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. Cell, 2013. **155**(2): p. 462-77.
224. Dao, T.N., et al., *TIM-3 Expression Is Downregulated on Human NK Cells in Response to Cancer Targets in Synergy with Activation*. Cancers (Basel), 2020. **12**(9).
225. Ngiew, S.F., et al., *Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN-gamma-mediated antitumor immunity and suppresses established tumors*. Cancer Res, 2011. **71**(10): p. 3540-51.
226. Sakuishi, K., et al., *Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity*. J Exp Med, 2010. **207**(10): p. 2187-94.
227. Koyama, S., et al., *Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10501.
228. Benson, D.M., Jr., et al., *The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody*. Blood, 2010. **116**(13): p. 2286-94.
229. So, E.C., et al., *NK cell expression of Tim-3: First impressions matter*. Immunobiology, 2019. **224**(3): p. 362-370.
230. Triebel, F., et al., *LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4*. J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1393-405.
231. Andrews, L.P., et al., *LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target*. Immunol Rev, 2017. **276**(1): p. 80-96.
232. Workman, C.J., et al., *LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 1885-91.
233. Kisielow, M., et al., *Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells*. Eur J Immunol, 2005. **35**(7): p. 2081-8.
234. Workman, C.J. and D.A. Vignali, *The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells*. Eur J Immunol, 2003. **33**(4): p. 970-9.
235. Workman, C.J., et al., *Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5450-5.
236. Huard, B., et al., *Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5744-9.
237. Baixeras, E., et al., *Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens*. J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 327-37.
238. Ruffo, E., et al., *Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3): The next immune checkpoint receptor*. Semin Immunol, 2019. **42**: p. 101305.
239. Liu, W., et al., *Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSECtin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18748-58.
240. Williams, P., et al., *The distribution of T-cell subsets and the expression of immune checkpoint receptors and ligands in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia*. Cancer, 2019. **125**(9): p. 1470-1481.

241. Gandhi, M.K., et al., *Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients*. *Blood*, 2006. **108**(7): p. 2280-9.
242. Shapiro, M., et al., *Lymphocyte activation gene 3: a novel therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia*. *Haematologica*, 2017. **102**(5): p. 874-882.
243. Workman, C.J., K.J. Dugger, and D.A. Vignali, *Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3*. *J Immunol*, 2002. **169**(10): p. 5392-5.
244. Wang, J., et al., *Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3*. *Cell*, 2019. **176**(1-2): p. 334-347 e12.
245. Burton, B.R., et al., *Sequential transcriptional changes dictate safe and effective antigen-specific immunotherapy*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 4741.
246. Catakovic, K., et al., *T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy*. *Cell Commun Signal*, 2017. **15**(1): p. 1.
247. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 503-13.
248. Gagliani, N., et al., *Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells*. *Nat Med*, 2013. **19**(6): p. 739-46.
249. Alfen, J.S., et al., *Intestinal IFN-gamma-producing type 1 regulatory T cells coexpress CCR5 and programmed cell death protein 1 and downregulate IL-10 in the inflamed guts of patients with inflammatory bowel disease*. *J Allergy Clin Immunol*, 2018. **142**(5): p. 1537-1547 e8.
250. White, A.M. and D.C. Wraith, *Tr1-Like T Cells - An Enigmatic Regulatory T Cell Lineage*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 355.
251. Do, J.S., et al., *An IL-27/Lag3 axis enhances Foxp3+ regulatory T cell-suppressive function and therapeutic efficacy*. *Mucosal Immunol*, 2016. **9**(1): p. 137-45.
252. Workman, C.J. and D.A. Vignali, *Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223)*. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 688-95.
253. Hannier, S., et al., *CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling*. *J Immunol*, 1998. **161**(8): p. 4058-65.
254. Marcais, A., et al., *The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(8): p. 749-757.
255. Marhelava, K., et al., *Targeting Negative and Positive Immune Checkpoints with Monoclonal Antibodies in Therapy of Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(11).
256. Boles, K.S., et al., *A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(3): p. 695-703.
257. Levin, S.D., et al., *Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(4): p. 902-15.
258. Dong, M., et al., *H2AFZ Is a Prognostic Biomarker Correlated to TP53 Mutation and Immune Infiltration in Hepatocellular Carcinoma*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 701736.
259. Stanietzky, N., et al., *The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(42): p. 17858-63.
260. Li, M., et al., *T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) receptor/poliovirus receptor (PVR) ligand engagement suppresses interferon-gamma production of natural killer cells via beta-arrestin 2-mediated negative signaling*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(25): p. 17647-57.
261. Morvan, M.G. and L.L. Lanier, *NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(1): p. 7-19.
262. Zhang, Q., et al., *Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity*. *Nat Immunol*, 2018. **19**(7): p. 723-732.
263. Zhang, B., et al., *Immunoreceptor TIGIT inhibits the cytotoxicity of human cytokine-induced killer cells by interacting with CD155*. *Cancer Immunol Immunother*, 2016. **65**(3): p. 305-14.

264. Inozume, T., et al., *Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(1): p. 255-63.
265. Tang, W., et al., *TIGIT, a novel immune checkpoint therapy for melanoma*. Cell Death Dis, 2023. **14**(7): p. 466.
266. Joller, N., et al., *Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1338-42.
267. Josefsson, S.E., et al., *T Cells Expressing Checkpoint Receptor TIGIT Are Enriched in Follicular Lymphoma Tumors and Characterized by Reversible Suppression of T-cell Receptor Signaling*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(4): p. 870-881.
268. Sun, Y., et al., *Combined evaluation of the expression status of CD155 and TIGIT plays an important role in the prognosis of LUAD (lung adenocarcinoma)*. Int Immunopharmacol, 2020. **80**: p. 106198.
269. Kim, N. and H.S. Kim, *Targeting Checkpoint Receptors and Molecules for Therapeutic Modulation of Natural Killer Cells*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2041.
270. Liu, S., et al., *Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells*. Cell Death Differ, 2013. **20**(3): p. 456-64.
271. Manieri, N.A., E.Y. Chiang, and J.L. Grogan, *TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle*. Trends Immunol, 2017. **38**(1): p. 20-28.
272. Boyerinas, B., et al., *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(10): p. 1148-1157.
273. Yu, X., et al., *The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 48-57.
274. Lozano, E., et al., *The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function*. J Immunol, 2012. **188**(8): p. 3869-75.
275. Joller, N., et al., *Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses*. Immunity, 2014. **40**(4): p. 569-81.
276. Fourcade, J., et al., *CD226 opposes TIGIT to disrupt Tregs in melanoma*. JCI Insight, 2018. **3**(14).
277. Fuhrman, C.A., et al., *Divergent Phenotypes of Human Regulatory T Cells Expressing the Receptors TIGIT and CD226*. J Immunol, 2015. **195**(1): p. 145-55.
278. Yusuf, E., I. Wybo, and D. Pierard, *Case series of patients with Fusobacterium nucleatum bacteremia with emphasis on the presence of cancer*. Anaerobe, 2016. **39**: p. 1-3.
279. Gur, C., et al., *Binding of the Fap2 protein of Fusobacterium nucleatum to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack*. Immunity, 2015. **42**(2): p. 344-355.
280. Kim, N., et al., *Natural killer cells as a promising therapeutic target for cancer immunotherapy*. Arch Pharm Res, 2019. **42**(7): p. 591-606.
281. Jong, A.Y., et al., *Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells*. J Extracell Vesicles, 2017. **6**(1): p. 1294368.
282. Sarhan, D., et al., *Adaptive NK Cells Resist Regulatory T-cell Suppression Driven by IL37*. Cancer Immunol Res, 2018. **6**(7): p. 766-775.
283. Brauning, A., et al., *Aging of the Immune System: Focus on Natural Killer Cells Phenotype and Functions*. Cells, 2022. **11**(6).
284. Solana, R., et al., *Shaping of NK cell subsets by aging*. Curr Opin Immunol, 2014. **29**: p. 56-61.
285. Hayhoe, R.P., et al., *Variation of human natural killer cell phenotypes with age: identification of a unique KLRG1-negative subset*. Hum Immunol, 2010. **71**(7): p. 676-81.
286. Almeida-Oliveira, A., et al., *Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age*. Hum Immunol, 2011. **72**(4): p. 319-29.

287. Campos, C., et al., *Expression of NKp30, NKp46 and DNAM-1 activating receptors on resting and IL-2 activated NK cells from healthy donors according to CMV-serostatus and age.* Biogerontology, 2015. **16**(5): p. 671-83.
288. Sanchez-Correa, B., et al., *Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients.* Immunol Cell Biol, 2012. **90**(1): p. 109-15.
289. Poli, A., et al., *NK cells in central nervous system disorders.* J Immunol, 2013. **190**(11): p. 5355-62.
290. Hansen, D.S., et al., *NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during Plasmodium berghei-mediated cerebral malaria.* J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5779-88.
291. Herich, S., et al., *Human CCR5high effector memory cells perform CNS parenchymal immune surveillance via GZMK-mediated transendothelial diapedesis.* Brain, 2019. **142**(11): p. 3411-3427.
292. Van Hove, H., et al., *A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment.* Nat Neurosci, 2019. **22**(6): p. 1021-1035.
293. Rodriguez-Lorenzo, S., et al., *Single-cell profiling reveals periventricular CD56(bright) NK cell accumulation in multiple sclerosis.* Elife, 2022. **11**.
294. van Olst, L., et al., *Crossing borders in Alzheimer's disease: A T cell's perspective.* Adv Drug Deliv Rev, 2022. **188**: p. 114398.
295. Lopes Pinheiro, M.A., et al., *Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke.* Biochim Biophys Acta, 2016. **1862**(3): p. 461-71.
296. Kooij, G., et al., *Disturbed function of the blood-cerebrospinal fluid barrier aggravates neuro-inflammation.* Acta Neuropathol, 2014. **128**(2): p. 267-77.
297. Absinta, M., et al., *Leptomeningeal gadolinium enhancement across the spectrum of chronic neuroinflammatory diseases.* Neurology, 2017. **88**(15): p. 1439-1444.
298. Yong, H.Y.F., et al., *The benefits of neuroinflammation for the repair of the injured central nervous system.* Cell Mol Immunol, 2019. **16**(6): p. 540-546.
299. Perkins, A.E., et al., *Assessment of neuroinflammation in the aging hippocampus using large-molecule microdialysis: Sex differences and role of purinergic receptors.* Brain Behav Immun, 2021. **91**: p. 546-555.
300. Guzman-Martinez, L., et al., *Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders.* Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 1008.
301. Wang, W.Y., et al., *Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease.* Ann Transl Med, 2015. **3**(10): p. 136.
302. Kwon, H.S. and S.H. Koh, *Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes.* Transl Neurodegener, 2020. **9**(1): p. 42.
303. Hickman, S.E., et al., *The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing.* Nat Neurosci, 2013. **16**(12): p. 1896-905.
304. Bar, E. and B. Barak, *Microglia roles in synaptic plasticity and myelination in homeostatic conditions and neurodevelopmental disorders.* Glia, 2019. **67**(11): p. 2125-2141.
305. Garcia-Revilla, J., et al., *Reformulating Pro-Oxidant Microglia in Neurodegeneration.* J Clin Med, 2019. **8**(10).
306. Smith, J.A., et al., *Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases.* Brain Res Bull, 2012. **87**(1): p. 10-20.
307. Jevtic, S., et al., *The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment.* Ageing Res Rev, 2017. **40**: p. 84-94.
308. Tan, M.S., et al., *The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease.* Mol Neurobiol, 2013. **48**(3): p. 875-82.
309. Zhou, K., et al., *Recent Advances of the NLRP3 Inflammasome in Central Nervous System Disorders.* J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 9238290.

310. Della Chiesa, M., et al., *Human NK cell response to pathogens*. Semin Immunol, 2014. **26**(2): p. 152-60.
311. Liu, S., et al., *TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1098-107.
312. Udan, M.L., et al., *Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line*. J Neurochem, 2008. **104**(2): p. 524-33.
313. Papageorgiou, I.E., et al., *TLR4-activated microglia require IFN-gamma to induce severe neuronal dysfunction and death in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(1): p. 212-7.
314. Molteni, M. and C. Rossetti, *Neurodegenerative diseases: The immunological perspective*. J Neuroimmunol, 2017. **313**: p. 109-115.
315. Pellicano, M., et al., *Immune profiling of Alzheimer patients*. J Neuroimmunol, 2012. **242**(1-2): p. 52-9.
316. Richartz-Salzbunger, E., et al., *Altered lymphocyte distribution in Alzheimer's disease*. J Psychiatr Res, 2007. **41**(1-2): p. 174-8.
317. Speciale, L., et al., *Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients*. Neurobiol Aging, 2007. **28**(8): p. 1163-9.
318. Mate, I., et al., *Function and redox state of peritoneal leukocytes as preclinical and prodromic markers in a longitudinal study of triple-transgenic mice for Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2015. **43**(1): p. 213-26.
319. Tarazona, R.e.a., *NK Cells in Human Ageing*. 2009, Handbook on Immunosenescence: Springer, Dordrecht. 531-544.
320. Gonzalez Caldito, N., *Role of tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system: a focus on autoimmune disorders*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1213448.
321. Gillissen, T., S.L. Budd, and S.A. Lipton, *Excitatory amino acid neurotoxicity*. Adv Exp Med Biol, 2002. **513**: p. 3-40.
322. Olmos, G. and J. Llado, *Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 861231.
323. Ou, W., et al., *Biologic TNF-alpha inhibitors reduce microgliosis, neuronal loss, and tau phosphorylation in a transgenic mouse model of tauopathy*. J Neuroinflammation, 2021. **18**(1): p. 312.
324. Versele, R., et al., *TNF-alpha and IL-1beta Modulate Blood-Brain Barrier Permeability and Decrease Amyloid-beta Peptide Efflux in a Human Blood-Brain Barrier Model*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(18).
325. Cheng, Y., et al., *TNFalpha disrupts blood brain barrier integrity to maintain prolonged depressive-like behavior in mice*. Brain Behav Immun, 2018. **69**: p. 556-567.
326. Solerte, S.B., et al., *Overproduction of IFN-gamma and TNF-alpha from natural killer (NK) cells is associated with abnormal NK reactivity and cognitive derangement in Alzheimer's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **917**: p. 331-40.
327. Gray, J.D., et al., *Generation of an inhibitory circuit involving CD8+ T cells, IL-2, and NK cell-derived TGF-beta: contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2248-54.
328. Narni-Mancinelli, E., S. Ugolini, and E. Vivier, *Tuning the threshold of natural killer cell responses*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 53-8.
329. Swardfager, W., et al., *A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease*. Biol Psychiatry, 2010. **68**(10): p. 930-41.
330. Senatorov, V.V., Jr., et al., *Blood-brain barrier dysfunction in aging induces hyperactivation of TGFbeta signaling and chronic yet reversible neural dysfunction*. Sci Transl Med, 2019. **11**(521).
331. Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. ten Dijke, *TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. Nature, 1997. **390**(6659): p. 465-71.

332. Rook, A.H., et al., *Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness*. J Immunol, 1986. **136**(10): p. 3916-20.
333. Cai, X., et al., *Current Progress and Future Perspectives of Immune Checkpoint in Cancer and Infectious Diseases*. Front Genet, 2021. **12**: p. 785153.
334. Panneerselvam, K., et al., *Cytomegalovirus infection among patients with cancer receiving immune checkpoint inhibitors*. Ann Gastroenterol, 2022. **35**(5): p. 522-531.
335. El-Far, M., et al., *Down-regulation of CTLA-4 by HIV-1 Nef protein*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54295.
336. Rizzo, R., et al., *KIR2DS2/KIR2DL2/HLA-C1 Haplotype Is Associated with Alzheimer's Disease: Implication for the Role of Herpesvirus Infections*. J Alzheimers Dis, 2019. **67**(4): p. 1379-1389.
337. Hwang, D.W., *Natural Killer Cells Improve Cognitive Function and Support to Induce Amyloid Beta Clearance by Functional Recovery of Impaired Microglia in Natural Killer Cell-treated Alzheimer's Diseases Mouse Model*. Alzheimer's & Dementia, 2022. **18**(S10).
338. Li, K., et al., *Apolipoprotein E enhances microRNA-146a in monocytes and macrophages to suppress nuclear factor-kappaB-driven inflammation and atherosclerosis*. Circ Res, 2015. **117**(1): p. e1-e11.
339. Hui, D.Y., et al., *Immunoregulatory plasma lipoproteins. Role of apoprotein E and apoprotein B*. J Biol Chem, 1980. **255**(24): p. 11775-81.
340. Bonacina, F., et al., *Myeloid apolipoprotein E controls dendritic cell antigen presentation and T cell activation*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3083.
341. Singh, R.K., et al., *TLR4 (Toll-Like Receptor 4)-Dependent Signaling Drives Extracellular Catabolism of LDL (Low-Density Lipoprotein) Aggregates*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020. **40**(1): p. 86-102.
342. Allan, L.L., et al., *Apolipoprotein-mediated lipid antigen presentation in B cells provides a pathway for innate help by NKT cells*. Blood, 2009. **114**(12): p. 2411-6.
343. Igel, E., et al., *Distinct pro-inflammatory properties of myeloid cell-derived apolipoprotein E2 and E4 in atherosclerosis promotion*. J Biol Chem, 2021. **297**(3): p. 101106.
344. Alagarsamy, J., A. Jaeschke, and D.Y. Hui, *Apolipoprotein E in Cardiometabolic and Neurological Health and Diseases*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(17).
345. Laurat, E., et al., *In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice*. Circulation, 2001. **104**(2): p. 197-202.
346. Bocksch, L., et al., *Apolipoprotein E: possible therapeutic target for atherosclerosis*. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2001. **1**(2): p. 93-106.
347. Laskowitz, D.T., et al., *Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice*. J Lipid Res, 2000. **41**(4): p. 613-20.
348. Tenger, C. and X. Zhou, *Apolipoprotein E modulates immune activation by acting on the antigen-presenting cell*. Immunology, 2003. **109**(3): p. 392-7.
349. Zhou, X., et al., *Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice*. J Clin Invest, 1998. **101**(8): p. 1717-25.
350. Xie, J.J., et al., *The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(-/-) mice*. Cytokine, 2010. **49**(2): p. 185-93.
351. Smith, E., et al., *Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2010. **121**(15): p. 1746-55.
352. Yin, M., et al., *Lack of apoE causes alteration of cytokines expression in young mice liver*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(4): p. 2049-54.

353. Singh, N.N. and D.P. Ramji, *Transforming growth factor-beta-induced expression of the apolipoprotein E gene requires c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase, and casein kinase 2*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(6): p. 1323-9.
354. Brand, K., N. Mackman, and L.K. Curtiss, *Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(5): p. 2031-9.
355. Chaussabel, D., et al., *Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites*. *Blood*, 2003. **102**(2): p. 672-81.
356. Singh, A.K., et al., *Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Exp Med*, 2001. **194**(12): p. 1801-11.
357. Ali, K., et al., *Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo*. *Circ Res*, 2005. **97**(9): p. 922-7.
358. Van Oosten, M., et al., *Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(12): p. 8820-4.
359. de Bont, N., et al., *Apolipoprotein E knock-out mice are highly susceptible to endotoxemia and Klebsiella pneumoniae infection*. *J Lipid Res*, 1999. **40**(4): p. 680-5.
360. Roselaar, S.E. and A. Daugherty, *Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to Listeria monocytogenes in vivo*. *J Lipid Res*, 1998. **39**(9): p. 1740-3.
361. Martens, G.W., et al., *Hypercholesterolemia impairs immunity to tuberculosis*. *Infect Immun*, 2008. **76**(8): p. 3464-72.
362. Miller, R.M. and H.J. Federoff, *Isoform-specific effects of ApoE on HSV immediate early gene expression and establishment of latency*. *Neurobiol Aging*, 2008. **29**(1): p. 71-7.
363. Burt, T.D., et al., *Apolipoprotein (apo) E4 enhances HIV-1 cell entry in vitro, and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype accelerates HIV disease progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(25): p. 8718-23.
364. Lee, Y.S., et al., *Inhibition of Lung Tumor Development in ApoE Knockout Mice via Enhancement of TREM-1 Dependent NK Cell Cytotoxicity*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1379.
365. Laskowitz, D.T., et al., *Apolipoprotein E suppresses glial cell secretion of TNF alpha*. *J Neuroimmunol*, 1997. **76**(1-2): p. 70-4.
366. Pocivavsek, A. and G.W. Rebeck, *Inhibition of c-Jun N-terminal kinase increases apoE expression in vitro and in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **387**(3): p. 516-20.
367. Barger, S.W. and A.D. Harmon, *Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E*. *Nature*, 1997. **388**(6645): p. 878-81.
368. Qiao, X., D.J. Cummins, and S.M. Paul, *Neuroinflammation-induced acceleration of amyloid deposition in the APPV717F transgenic mouse*. *Eur J Neurosci*, 2001. **14**(3): p. 474-82.
369. Lynch, J.R., et al., *APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(49): p. 48529-33.
370. Maezawa, I., et al., *Neurotoxicity from innate immune response is greatest with targeted replacement of E4 allele of apolipoprotein E gene and is mediated by microglial p38MAPK*. *FASEB J*, 2006. **20**(6): p. 797-9.
371. van der Walt, A., et al., *Apolipoprotein genotype does not influence MS severity, cognition, or brain atrophy*. *Neurology*, 2009. **73**(13): p. 1018-25.
372. Tesseur, I., et al., *Bioactive TGF-beta can associate with lipoproteins and is enriched in those containing apolipoprotein E3*. *J Neurochem*, 2009. **110**(4): p. 1254-62.
373. Colton, C.A., et al., *APOE and the regulation of microglial nitric oxide production: a link between genetic risk and oxidative stress*. *Neurobiol Aging*, 2002. **23**(5): p. 777-85.
374. Stocker, H., et al., *The genetic risk of Alzheimer's disease beyond APOE epsilon4: systematic review of Alzheimer's genetic risk scores*. *Transl Psychiatry*, 2018. **8**(1): p. 166.

375. Sperling, R., et al., *Amyloid-related imaging abnormalities in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a retrospective analysis*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(3): p. 241-9.
376. Salloway, S., et al., *A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease*. *Neurology*, 2009. **73**(24): p. 2061-70.
377. Doody, R.S., et al., *Phase 3 trials of solanezumab and bapineuzumab for Alzheimer's disease*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(15): p. 1460.
378. Zuniga, C.H., et al., *Treatment of Alzheimer's Disease subjects with expanded non-genetically modified autologous natural killer cells (SNK01): a phase I study*. *Alzheimers Res Ther*, 2025. **17**(1): p. 40.
379. Liu, Y., et al., *Lymphocyte activation gene 3 (Lag3) expression is increased in prion infections but does not modify disease progression*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 14600.
380. Chen, C., et al., *Lymphocyte-Activation Gene 3 Facilitates Pathological Tau Neuron-to-Neuron Transmission*. *Adv Sci (Weinh)*, 2024. **11**(16): p. e2303775.
381. Guo, W., et al., *Association of LAG3 genetic variation with an increased risk of PD in Chinese female population*. *J Neuroinflammation*, 2019. **16**(1): p. 270.
382. Mao, X., et al., *Aplp1 interacts with Lag3 to facilitate transmission of pathologic alpha-synuclein*. *Nat Commun*, 2024. **15**(1): p. 4663.
383. Gu, H., et al., *Lymphocyte Activation Gene 3 (Lag3) Contributes to alpha-Synucleinopathy in alpha-Synuclein Transgenic Mice*. *Front Cell Neurosci*, 2021. **15**: p. 656426.
384. Esen, F., G. Deniz, and E.C. Aktas, *PD-1, CTLA-4, LAG-3, and TIGIT: The roles of immune checkpoint receptors on the regulation of human NK cell phenotype and functions*. *Immunol Lett*, 2021. **240**: p. 15-23.
385. Dominy, S.S., et al., *Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors*. *Sci Adv*, 2019. **5**(1): p. eaau3333.
386. Forner, L., et al., *Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation*. *J Clin Periodontol*, 2006. **33**(6): p. 401-7.
387. Mahendra, J., et al., *Prevalence of periodontal pathogens in coronary atherosclerotic plaque of patients undergoing coronary artery bypass graft surgery*. *J Maxillofac Oral Surg*, 2009. **8**(2): p. 108-13.
388. Katz, J., et al., *Localization of P. gingivalis in preterm delivery placenta*. *J Dent Res*, 2009. **88**(6): p. 575-8.
389. Ishikawa, M., et al., *Oral Porphyromonas gingivalis translocates to the liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3beta signaling pathway*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1832**(12): p. 2035-43.
390. Mougeot, J.C., et al., *Porphyromonas gingivalis is the most abundant species detected in coronary and femoral arteries*. *J Oral Microbiol*, 2017. **9**(1): p. 1281562.
391. Wang, P.L. and K. Ohura, *Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002. **13**(2): p. 132-42.
392. Sfera, A., et al., *Rusty Microglia: Trainers of Innate Immunity in Alzheimer's Disease*. *Front Neurol*, 2018. **9**: p. 1062.
393. Song, Y., et al., *T-cell Immunoglobulin and ITIM Domain Contributes to CD8(+) T-cell Immunosenescence*. *Aging Cell*, 2018. **17**(2).
394. Ip, W.K.E., et al., *Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages*. *Science*, 2017. **356**(6337): p. 513-519.
395. Clarke, L.E., et al., *Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(8): p. E1896-E1905.
396. Meng, F., et al., *Overexpression of TIGIT in NK and T Cells Contributes to Tumor Immune Escape in Myelodysplastic Syndromes*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 1595.

397. Araga, S., et al., *Natural killer cell activity in patients with dementia of the Alzheimer type*. Arch Neurol, 1990. **47**(4): p. 380-1.
398. Araga, S., et al., *Reduced natural killer cell activity in patients with dementia of the Alzheimer type*. Acta Neurol Scand, 1991. **84**(3): p. 259-63.
399. Solerte, S.B., et al., *Enhanced cytotoxic response of natural killer cells to interleukin-2 in Alzheimer's disease*. Dementia, 1996. **7**(6): p. 343-8.
400. Ahn, J., J. Lee, and S. Kim, *Interferon-gamma inhibits the neuronal differentiation of neural progenitor cells by inhibiting the expression of Neurogenin2 via the JAK/STAT1 pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **466**(1): p. 52-9.
401. Hagman, S., et al., *Effects of inflammatory cytokines IFN-gamma, TNF-alpha and IL-6 on the viability and functionality of human pluripotent stem cell-derived neural cells*. J Neuroimmunol, 2019. **331**: p. 36-45.
402. Hou, H., et al., *Tim-3 negatively mediates natural killer cell function in LPS-induced endotoxic shock*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110585.
403. Tian, Y., et al., *Microglial activation and polarization in type 2 diabetes-related cognitive impairment: A focused review of pathogenesis*. Neurosci Biobehav Rev, 2024. **165**: p. 105848.
404. Takeda, S., et al., *Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(15): p. 7036-41.
405. Wang, H., et al., *Tim-3 Expression Causes NK Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes Patients*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 852436.
406. Carbone, I., et al., *Herpes virus in Alzheimer's disease: relation to progression of the disease*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(1): p. 122-9.
407. Readhead, B., et al., *Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic, and Clinical Networks by Human Herpesvirus*. Neuron, 2018. **99**(1): p. 64-82 e7.
408. Bortolotti, D., et al., *DNA Sensors' Signaling in NK Cells During HHV-6A, HHV-6B and HHV-7 Infection*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 226.
409. Rizzo, R., et al., *HHV-6A/6B Infection of NK Cells Modulates the Expression of miRNAs and Transcription Factors Potentially Associated to Impaired NK Activity*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2143.
410. Heneka, M.T., et al., *Neuroinflammatory fluid biomarkers in patients with Alzheimer's disease: a systematic literature review*. Mol Psychiatry, 2025.



Etik kurul kararı



İ.Ü.İTF KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI İZNİ GEREKLİ OLMAYAN ("KLİNİK ARAŞTIRMALAR YÖNETMELİĞİ" NE TÂBİ OLMAYAN)
ARAŞTIRMALAR İÇİN
ÖZGEÇMİŞ FORMU

ADI SOYADI: farhad kohansal koshksaray

1.GENEL

DÜZENLEME TARİHİ	05/03/2021		
T.C. KİMLİK NO			
DOĞUM YERİ VE YILI			
GÖREV YERİ	İ.Ü. Aziz sancar Deneyssel Tıp araştırma Enistitüsü/ İmmünoloji Anabilim Dalı		
GÖREV UNVANI	Doktora Öğrencisi		
YAZIŞMA ADRESİ			
TEL		GSM	
E-POSTA		FAX	

2. EĞİTİM

MEZUNİYET TARİHİ	ÜNİVERSİTE-FAKÜLTE-BÖLÜM/ANABİLİM DALI
2012-2014	Çukurova universitesi-tıp fakültesi-tıbbi mikrobiyoloji/anabilim dalı
2007-2011	Azad universitesi- veteriner fakültesi

3. ARAŞTIRMA PROJELERİ DENEYİMİ

PROJE ADI	KURUM	TARİH	GÖREV*	PROJE TÜRÜ**
DETERMINATION OF DISTRIBUTION AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA (NTM) SPECIES IN CLINICAL SAMPLES FROM THE CUKUROVA REGION, TURKIYE	Çukurova universitesi	2013-2014	Yüksek lisans öğrencisi	Yüksek lisans tezi
PHENOTYPIC AND GENOTYPIC INVESTIGATION OF MULTIDRUG RESISTANCE (MDR) AND EXTENSIVELY DRUG RESISTANCE (XDR) IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES IN CUKUROVA REGION, TURKIYE	Çukurova universitesi	2012-2014	araştırmacı	BOB projesi

* (Yürütücü, Araştırmacı/Uzman, Danışman, Bursiyer, Diğer)

** (Kurumsal, Ulusal, Uluslararası)

4. ARAŞTIRMA KONUSU İLE İLGİLİ YAYINLARI

koshksaray FK, Özbalak MM, Balkan İİ, Erten Yurdagül G. Gıda kaynaklı immünomodülatörler. Experimed 2020; 10(2): 97-111.

5. ARAŞTIRMA KONUSU İLE İLGİLİ PRESENTATION:

8th Iranian congress of Clinical Microbiology on sep30-oct02, 2014 in Tabriz;

1. Phenotypic and genotypic investigation of Multidrug Resistance (MDR) as well as Extensively Drug Resistance (XDR) in Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC)

strains isolated from clinical samples in Cukurova region, Turkey

Kohansal Koshksaray Farhad1, Yarar Emel1, Nagiyev Togrul1, 3, Koksall Fatih1,2

6. ARAŞTIRMA KONUSU İLE İLGİLİ POSTERS:

ESM 36th annual congress Riga latvia on june28-july01, 2015 ;

- 2. DETERMINATION OF DISTRIBUTION AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA (NTM) SPECIES IN CLINICAL SAMPLES FROM THE CUKUROVA REGION, TURKIYE**

Nagiyev Togrul1,3, Kohansal Koshksaray Farhad1, Yarar Emel1, Kayar Begum2, Bozok Taylan1, Yakici Gulfer1, Koksall Fatih1,2

- 3. PHENOTYPIC AND GENOTYPIC INVESTIGATION OF MULTIDRUG RESISTANCE (MDR) AND EXTENSIVELY DRUG RESISTANCE (XDR) IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES IN CUKUROVA REGION, TURKIYE**

Nagiyev Togrul1,3, Yarar Emel1, Kohansal Koshksaray Farhad1, Kayar Begum2, Bozok Taylan1, Yakici Gulfer1, Koksall Fatih1,2

7th National Micobacteri Sempozyumu mersin;

- 4. ÇUKUROVA BÖLGESİNDE İZOLE EDİLEN TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKOBAKTERİLERİN TÜR DAĞILIMI VE ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇ PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nagiyev Toğrul1,3, Kohansal Koshksaray Farhad1, Yarar Emel1, Kayar Begüm2, Bozok Taylan1, Yakıcı Gülfer1, Marzi Mehdi1, Köksall Fatih1,2

- 5. ÇUKUROVA BÖLGESİNDE İZOLE EDİLEN ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARININ MİNOR ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇ DİRENÇ PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE HIZLI DİRENÇ TESPİTİNDE MULTİPLEX REAL-TİME PCR YÖNTEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nagiyev Toğrul1,3, Yarar Emel1, Kohansal Koshksaray Farhad1, Kayar Begüm2, Bozok Taylan1, Yakıcı Gülfer1, Marzi Mehdi1, Köksall Fatih1,2

- 6. ADANA BÖLGE TÜBERKÜLOZ LABORATUVARINA 2011-2015 YILLARI ARASINDA PULMONER TÜBERKÜLOZ ŞÜPHESİ İLE GÖNDERİLEN KLİNİK ÖRNEKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kayar Begüm¹, Bozok Taylan², Yakıcı Gülfer², Marzi Mehdi², Yarar Emel², Kohansal Koshksaray Farhad, Karşı Fırat, Üçkayabaşı Ali^{1,2}, Nagiyev Toğrul^{1,3}, Köksal Fatih^{1,2}

7. ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARININ FİLOGENETİK İLİŞKİLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN IS6110, MIRU-VNTR, SPOLIGOTYPING YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Yakıcı Gülfer¹, Kayar Begüm², Bozok Taylan¹, Marzi Mehdi¹, Yarar Emel¹, Karşı Fırat¹, Kohansal Koshksaray Farhad¹, Nagiyev Toğrul¹, Köksal Fatih^{1,2}

(EL YAZISI İLE)

Özgeçmiş Sahibinin Adı ve Soyadı:

Tarih: 05/03/2021

İmza:

Not:

1. Gerektiğinde ilgili başlık altındaki satırların sayısı arttırılabilir.
2. Varsa, görev alınan tüm klinik araştırma projeleri yazılmalıdır.
3. Bilgiler, tarih sıralamasına göre, en eski tarihliden yeniye doğru sıralanmalıdır.
4. Tüm sayfalar imzalanmalıdır.