

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**ALZHEİMER HASTALARININ FİBROBLAST KAYNAKLI
İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİNDEN
FARKLILAŞTIRILAN MİKROGLİA HÜCRELERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

ASLI ERDOĞAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEYHUN SOLAKOĞLU**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Beni bugünlere getiren sevgili aileme...

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında değerli bilgileriyle bana yol gösteren ve destek olan danışman hocam Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na çok teşekkür ederim.

İkinci tez danışmanım, Bonn Üniversitesi Nörodejeneratif Hastalıklar ve Geriatrik Psikiyatri/Nöroloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Michael T. HENEKA'ya, DZNE'deki laboratuvarının altyapı ve maddi imkanlarını sunup, bilgi ve desteğini esirgemeyerek bu tezi gerçekleştirmemi sağladığı için en içten teşekkürlerimi sunarım. Dr. Cira DANSOKHO'ya deney süreçlerimdeki tüm yöntemleri bana öğretip, deneyimlerini aktardığı ve iyi bir öğrenci yetiştirmekteki müthiş çabası ve ilgisi için çok teşekkür ederim. Deneylerini takip etmeme izin verip yöntem detaylarını öğrenmeme yardımcı olan arkadaşım Dr. Chiara BAZZINI'ye teşekkür ederim. Ayrıca bütün Heneka Lab. üyelerine laboratuvardaki destekleri, arkadaşlıkları ve misafirperverlikleri için teşekkür ederim.

İstanbul Tıp Fakültesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinin tümüne, doktora eğitimime sağladıkları katkı ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim. Bölümdeki değerli çalışma arkadaşlarım Doç. Dr. Tuğba KOTİL, Dr. Öğr. Üyesi Tuğba EKİZ, İlkey ÖZDEMİR, Sibel DOĞAN, Hasan Serdar MUTLU, Emel USTA ve Feride KARAHAN'a, tüm İTF/CTF-Histoloji ailesine her türlü destekleri için teşekkür ederim.

Saskia SCHOTTELIUS, Antje MEISTER ve Luna'ya, pandemi döneminde beni yalnız bırakmayıp Almanya'daki ailem oldukları için çok teşekkür ederim.

Bu macerada başından beri yoldaşım olan, doktoranın tüm zor süreçlerinde yanımda olup saatlerce benimle dertleşen, güzel haberlere benden daha çok sevinen kardeşim Başak IŞILDAR'a sonsuz desteği için minnettarım.

Son olarak, zorlu doktora sürecimde cesur adımlar atmam gerektiğinde beni yüreklendirip yanımda olan, sevgi ve desteğini her zaman kalbimde hissettiğim Orkun ÖNER'e çok teşekkür ediyorum.

Bu çalışma Heneka Lab, TÜBİTAK 2214-A (Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı), YÖK-YUDAB (Araştırma Görevlileri için Yurt Dışı Araştırma Bursları) ve Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı	3
2.1.1. Genel Tanımlama	3
2.1.2. Moleküler Mekanizmalar	4
2.2. Mikroglia.....	7
2.2.1. Embriyonik Dönemde Mikroglia Gelişimi	7
2.2.2. Mikroglialının Genel Morfolojisi.....	8
2.2.3. Mikroglialının İşlevleri	11
2.2.3.1. Fazla Hücrelerin Elenmesi	11
2.2.3.2. Nörogenez	11
2.2.3.3. Nöronlara Kılavuzluk Etme	12
2.2.3.4. Nöronların Sağkalımı	12
2.2.3.5. Sinaptik Budama	13
2.2.3.6. Sinaptik Plastisite	14
2.2.4. Mikroglialının Çalışma Mekanizması	15
2.2.4.1. Mikroglialıyı uyaran moleküller: DAMP-PAMP	15
2.2.4.2. Mikroglia Ön Uyarımı (Priming)	15
2.2.4.3. Mikroglia Aktivasyonu	16
2.2.5. Alzheimer Hastalığı'nda Nöroinflamasyon ve Mikroglia	19
2.2.5.1. NLRP3 İnflamazomu	22
2.3. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29

3.1. İnsan İPKH Hücre Hatları.....	29
3.2. İPKH-kaynaklı Mikroglia Hücre Kültürü	29
3.2.1. Protokol 1.....	30
3.2.2. Protokol 2	30
3.2.2.1. Hematopoetik progenitör hücrelerin (HPH'lerin) üretilmesi	31
3.2.2.2. Mikrogliaya farklılaştırma ve olgunlaştırma.....	32
3.3. Amiloid β 'nın Hazırlanışı	32
3.3.1. Fibriler Amiloid β 'nın Hazırlanışı	32
3.3.2. FAM İşaretli Amiloid β 'nın Hazırlanışı	32
3.4. Uyarım (Stimülasyon) Deneyleri	33
3.5. Sitokin Salımının Ölçülmesi	33
3.6. LDH Analizi.....	33
3.7. Western Blot	33
3.8. İmmünohistokimya	34
3.9. Hücre Fenotiplerinin Flow Sitometri ile Analizi	34
3.10. Fagositoz Deneyleri	35
3.10.1. pHrodo Fagositozunun Flow Sitometri ile Analizi	35
3.10.2. Amiloid β Fagositozunun Flow Sitometri ile Analizi.....	35
3.10.3. Amiloid β Fagositozunun Canlı Hücre Görüntüleme Sistemi ile İzlenmesi...35	
3.11. Ters Transkripsiyon Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR).....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Protokol 1'in Bulguları	37
4.1.1. İPKH'lerin EMP'lere ve Mikrogliaya Farklılaştırılması	37
4.1.2. İPKH'lerden Farklılaştırılan Hücrelerin ve Kültür Tabakalarının Protein Ekspresyonunun Karakterizasyonu.....	38
4.1.3. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglia'nın İşlevsel Karakterizasyonu	42
4.2. Protokol 2'nin Bulguları	43
4.2.1. İPKH'lerin HPH'ye ve Mikrogliaya Farklılaştırılması.....	43
4.2.2. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglia Hücrelerinin Morfolojik Karakterizasyonu	44
4.2.3. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglia Hücrelerinin Fenotipik Karakterizasyonu	45

4.2.4. İPKH'den Farklılaştırılan Hücrelerin ve Kültür Tabakalarının Protein Ekspresyonunun Karakterizasyonu.....	50
4.2.5. İPKH'den Farklılaştırılan Hücrelerin ve Kültür Tabakalarının Gen Ekspresyonunun Karakterizasyonu.....	54
4.2.6. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglialın İşlevsel Karakterizasyonu: Sitokin Salımı	57
4.2.7. Sitotoksite Analizi	60
4.2.8. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglialın İşlevsel Karakterizasyonu: Floresan Mikroskopu ile pHrodo Biyopartiküllerinin Fagositozunun Görüntülenmesi.....	60
4.2.9. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglialın İşlevsel Karakterizasyonu: Flow Sitometri ile pHrodo Biyopartiküllerinin Fagositozunun Tespit Edilmesi	61
4.2.10. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglialın İşlevsel Karakterizasyonu: Canlı Hücre Görüntüleme ile Amiloid β Fagositozunun Görüntülenmesi	62
4.2.11. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglialın İşlevsel Karakterizasyonu: Flow Sitometri ile Amiloid β Fagositozunun Tespit Edilmesi.....	63
5. TARTIŞMA	65
KAYNAKLAR	76
ETİK KURUL KARARI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	101
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Amiloid prekürsör proteininin kesilerek amiloid beta monomerinin oluşumu (Kumar ve ark. 2018).....	5
Şekil 2-2: Amiloid beta monomerinden amiloid beta plaklarının oluşum aşamaları (Heppner ve ark. 2015).....	5
Şekil 2-3: Sağlıklı ve Alzheimer'lı bir nöronda mikrotübüller ve tau (Brunden ve ark. 2009).....	6
Şekil 2-4: Mikroglia hücreleri.....	9
Şekil 2-5: Mikroglia hücrelerinin 4 farklı morfolojik çeşidi	10
Şekil 2-6: Mikroglia ön uyarımı ve aktivasyonu (Jang ve Johnson 2010)	16
Şekil 2-7: Mikroglialının M1 ve M2 fenotipi (Salvi ve ark. 2017).....	17
Şekil 2-8: Alzheimer hastalığında mikroglia ve astrositlerdeki değişimler a) Alzheimer hastasının parietal korteksinden alınan bir kesitte A β plaklarındaki CD11b-pozitif mikroglia hücreleri (b) APP/PS1 transgenik farenin beyin kesitinde A β plak bölgesinde aktive olmuş, IBA1-pozitif mikroglia hücreleri (c) Alzheimer hastasının parietal korteksinden alınan bir kesitte A β plaklarının etrafını sarmış olan GFAP-pozitif astrositler (d) APP/PS1 transgenik farenin beyin kesitinde A β plak bölgesinde GFAP-pozitif astrositler (e) Alzheimer hastasının frontal korteksinden alınan bir kesitte IL-1 β -pozitif mikroglia hücreleri (Heneka ve ark. 2015)	21
Şekil 2-9: NLRP3 inflamazomunun yapısı (Seok ve ark. 2021)	23
Şekil 2-10: NLRP3 inflamazomunun aktivasyon aşamaları (Shao ve ark. 2015)	24
Şekil 2-11: NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu ve CRID3 tarafından inhibisyonu (InvivoGen 2021).....	25
Şekil 2-12: İPKH'lerin kişiye özgü ilaç ve kök hücre tedavilerinde kullanım potansiyeli (Robinton ve Daley 2012).....	28
Şekil 3-1: Tez çalışmasında kullanılan İPKH hücre hatlarının genotipleri	29
Şekil 3-2: Protokol 1'e göre İPKH'lerin mikrogliaya farklılaştırılma süreci	30
Şekil 3-3: Protokol 2'nin ilk adımı olarak İPKH'lerin HPH'lere farklılaştırılma süreci	31
Şekil 3-4: Protokol 2'nin ikinci adımı olarak HPH'lerin mikrogliaya farklılaştırılma süreci.....	32
Şekil 4-1: Protokol 1 kullanılarak İPKH'lerin mikroglia hücrelerine farklılaştırılması.	38

Şekil 4-2: Protokol 1 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, embriyoid cisim, kültür tabakaları ve mikroglia) alınan örneklerdeki (A) ASC ve (B) NLRP3 proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri (d47, d70, d72, d74 mikroglia farklılaşmasının günlerini belirtmektedir); n=1	39
Şekil 4-3: Protokol 1 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, embriyoid cisim, kültür tabakaları ve mikroglia) alınan örneklerdeki (A) MyD88 ve (B) GSK3 β proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri (d47, d70, d74 mikroglia farklılaşmasının günlerini belirtmektedir); n=1	40
Şekil 4-4: Protokol 1 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, embriyoid cisim, kültür tabakaları ve mikroglia) alınan örneklerdeki (A) IBA1 ve (B) TREM2 proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri (d47, d70, d72, d74 mikroglia farklılaşmasının günlerini belirtmektedir); n=1	41
Şekil 4-5: Protokol 1 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, embriyoid cisim, kültür tabakaları) alınan örneklerdeki (A) TUJ1 ve (B) GFAP proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri; n=1	42
Şekil 4-6: (A) İPKH'den farklılaştırılan mikroglia'da gerçekleştirilen 3 saat LPS ile ön uyarım ve 24 saat amiloid β ile uyarım deneylerinin şekilsel gösterimi. İPKH'den farklılaştırılan mikroglia'ya LPS ve amiloid β uygulaması sonrasında şartlandırılmış medyuma salınan ve ELISA yöntemiyle ölçülen (B) IL-1 β , (C) IL-18 ve (D) TNF- α miktarları; n=1; deneyler üçlü olarak yapılmıştır. İki yönlü ANOVA, Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi, ****p<0,0001 ***p<0,001 **p<0,01.....	43
Şekil 4-7: Protokol 2 kullanılarak İPKH'lerin mikroglia hücrelerine iki aşamada farklılaştırılması	44
Şekil 4-8: AH genotipli İPKH'den farklılaştırılan mikroglia hücrelerinin mikroglia belirteçleriyle immünohistokimyasal boyanması.	45
Şekil 4-9: Hematopoetik progenitör hücrelerin A) CD45 ve CD11b, B) CD14 ve CD16, (C) CD200R ve CX3CR1, (D) CD43 ve CD235a, (E) P2RY12 ve CX3CR1 ve (F) CD34 ve CD43 belirteçleri için Flow Sitometri grafikleri.	46

Şekil 4-10: Farklılaştırmanın 15. günündeki mikroglia hücrelerinin A) CD45 ve CD11b, B) CD14 ve CD16, (C) CD200R ve CX3CR1, (D) CD43 ve CD235a ve (E) P2RY12 ve CX3CR1 belirteçleri için Flow Sitometri grafikleri.	47
Şekil 4-11: Olgun mikroglia hücrelerinin A) CD45 ve CD11b, B) CD14 ve CD16, (C) CD200R ve CX3CR1, (D) CD43 ve CD235a, (E) P2RY12 ve CX3CR1 ve (F) TMEM119 ve TREM2 belirteçleri için Flow Sitometri grafikleri.	48
Şekil 4-12: Hematopoetik progenitör hücreler, farklılaştırmanın 15. günündeki mikroglia ve olgun mikroglia'nın AH ve İZO genotiplerine ait hücrelerin flow sitometri ile analiz edilen (A) CD235a, (B) CD34, (C) CD43, (D) CD45, (E) CD11b, (F) CD14, (G) CD16, (H) CD200R, (I) CX3CR1, (J) P2RY12, (K) TMEM119 ve (L) TREM2 eksprese eden hücre yüzdesindeki değişimler; HPH'ler ve farklılaştırmanın 15. günündeki mikroglia için n=3 ve olgun mikroglia için n=1 (istisnalar: CD34: farklılaştırmanın 15. günündeki mikroglia için n=2, HPH'ler ve olgun mikroglia için n=1; CD14: farklılaştırmanın 15. günündeki mikroglia için n=2).	49
Şekil 4-13: Protokol 2 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, HPH, kültür tabakaları ve mikroglia) alınan örneklerdeki (A) ASC ve (B) NLRP3 proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri; ASC için n=2, NLRP3 için n=1.	51
Şekil 4-14: Protokol 2 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, HPH, kültür tabakaları ve mikroglia) alınan örneklerdeki (A) MYD88 ve (B) GSK3 β proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri; MYD88 için n=1, GSK3 β için n=2.	52
Şekil 4-15: Protokol 2 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, HPH, kültür tabakaları ve mikroglia) alınan örneklerdeki (A) IBA1 ve (B) TREM2 proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri; n=1.	53
Şekil 4-16: Protokol 2 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın kültür tabakalarından alınan örneklerdeki (A) GFAP ve (B) TUJ1 proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri; n=4.	54
Şekil 4-17: İPKH'lerde pluripotensite belirteçleri (A) <i>NANOG</i> ve (B) <i>SOX2</i> 'nin, kültür tabakalarında astrosit belirteci (C) <i>GFAP</i> 'ın ve nöronal belirteç (D) <i>TUJ1</i> 'in, HPH'lerde hematopoetik belirteç (E) <i>CD34</i> 'ün RT-qPCR ile tespit edilen göreceli mRNA ekspresyonları. <i>GAPDH</i> endojen kontrol geni olarak kullanılmıştır ve veriler göreceli	

kat değişimleri olarak KTL örneklerine kıyasla gösterilmiştir. n=3; deneyler üçlü olarak yapılmıştır. Tek Yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi, *p<0,1.

..... 55

Şekil 4-18: AH ve KTL genotiplerinin olgun mikroglia hücrelerinde mikroglia ilişkili belirteçler (A) *IBA1*, (B) *CD14*, (C) *CSF1*, (D) *CX3CR1*, (E) *TREM2*, (F) *CCR5*, (G) *TLR2*, (H) *TLR4*, (I) *P2RY12*'nin RT-qPCR ile tespit edilen göreceli mRNA ekspresyonları. *GAPDH* endojen kontrol geni olarak kullanılmıştır ve veriler göreceli kat değişimleri olarak KTL örneklerine kıyasla gösterilmiştir. n=3; Eşlenmemiş Student t -testi. 56

Şekil 4-19: İPKH'den farklılaştırılan mikroglialının CRID3 varlığında ve yokluğunda LPS ile ön uyarımı ve amiloid β ile uyarılması sonrasında IL-1 β (A, B) ve IL-18 (C, D) salımı. Sonuçlar hem her bir genotip için deneysel gruplar yan yana olacak şekilde (A, C) hem de farklı genotiplerin deneysel grupları yan yana olacak şekilde (B, D) gösterilmiştir. IL-1 β salımında AH ve İZO için n=2, KTL için n=1; IL-18 salımında n=2; deneyler ikili olarak yapılmıştır. İki Yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi, ****p<0,0001 ***p<0,001 **p<0,01 *p<0,1 58

Şekil 4-20: İPKH'den farklılaştırılan mikroglialının CRID3 varlığında ve yokluğunda LPS ile ön uyarımı ve amiloid β ile uyarılması sonrasında IL-6 (A, B) ve CXCL12 (C, D) salımı. Sonuçlar hem her bir genotip için deneysel gruplar yan yana olacak şekilde (A, C) hem de farklı genotiplerin deneysel grupları yan yana olacak şekilde (B, D) gösterilmiştir. IL-6 salımında n=2; CXCL12 salımında n=1; deneyler ikili olarak yapılmıştır. İki Yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi, ***p<0,001 **p<0,01 59

Şekil 4-21: İPKH'den farklılaştırılan mikroglialının CRID3 varlığında ve yokluğunda LPS ile ön uyarımı ve amiloid β ile uyarılması sonrasında LDH salımı. Sonuçlar hem her bir genotip için deneysel gruplar yan yana olacak şekilde (A) hem de farklı genotiplerin deneysel grupları yan yana olacak şekilde (B) gösterilmiştir. n=3; deneyler ikili olarak yapılmıştır. İki Yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi..... 60

Şekil 4-22: AH (A) ve İZO (B) genotiplerine ait olgun mikroglia hücrelerinin floresan mikroskopuyla görüntülenen çekirdekleri (mavi) ve fagosite ettikleri pHrodo biyopartikülleri (kırmızı). 20X. 61

Şekil 4-23: Sitokalsin D ve CRID3 varlığında veya yokluğunda AH (A) ve İZO (B) genotiplerine ait mikroglia hücrelerinin 30 dk, 1 saat ve 2 saat inkübasyon sonucunda pHrodo fagositozunu gösteren Flow Sitometri grafikleri. Flow Sitometri analizinden elde edilen sonuçlarla oluşturulan AH (C) ve İZO (D) genotiplerine ait mikroglia hücrelerinin belirli zaman noktalarında yüzde kaçının pHrodo fagositozu yaptığını gösteren grafikler. n=1	62
Şekil 4-24: TAMRA işaretli amiloid β (kırmızı) eklendikten sonra canlı görüntüleme sistemiyle videoları oluşturulan AH (A) ve İZO (B) genotiplerine ait olgun mikroglia hücrelerinin fagositoz görüntüleri. 20X.....	63
Şekil 4-25: Sitokalsin D varlığında veya yokluğunda AH (A) ve İZO (B) genotiplerine ait mikroglia hücrelerinin 1 saat, 3 saat ve 5 saat inkübasyon sonucunda amiloid β fagositozunu gösteren Flow Sitometri grafikleri ve bu analizden elde edilen sonuçlarla oluşturulan, hücrelerin belirli zaman noktalarında yüzde kaçının amiloid β fagositozu yaptığını gösteren grafikler. (C) AH ve İZO genotiplerinin amiloid β fagositoz oranlarını bir arada gösteren Flow Sitometri grafikleri ve bu analizden elde edilen sonuçlarla oluşturulan, hücrelerin belirli zaman noktalarında yüzde kaçının amiloid β fagositozu yaptığını gösteren grafik. n=2; İki Yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi.	64

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A β : Amiloid beta

AGM: Aort, gonad, mezonefroz

AH: Alzheimer genotipi

APOE: Apolipoprotein E

APP: Amiloid prekürsör proteini

ASC: Kaspaz toplayıcı domeyn içeren apoptozla ilişkili benek benzeri protein

ATP: Adenozin trifosfat

BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör

CARD: Kaspaz toplayıcı domeyn

CD: Yüzey farklılaşma antijeni

CRID3: Sitokin salım inhibitör ilacı 3

CSF1R: Koloni stimule edici faktör 1 reseptörü

CX3CL1: Fraktalkin

CX3CR1: Fraktalkin reseptörü

DAMP: Hasarla ilişkili moleküler kalıplar

EC: Embriyoid cisim

EMP: Eritromyeloid progenitörleri

GSK3 β : Glikojen sentaz kinaz 3 beta

GWAS: Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları

HPH: Hematopoetik progenitör hücreler

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

IL-1 β : İnterlökin-1 β

IL-6: İnterlökin-6

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

İPKH: İndüklenmiş pluripotent kök hücre

İZO: İzogenik genotip

KTL: Kontrol genotipi

LDH: Laktat dehidrogenaz

LPS: Lipopolisakkarit

LRR: Lösinden zengin tekrar domeyni

LTP: Uzun süreli potansiyasyon

M-CSFR: Makrofaj koloni uyarıcı faktör reseptörü

MSS: Merkezi sinir sistemi

MyD88: Myeloid farklılaşma faktörü 88

NACHT: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domeyni

NLR: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domaini (NOD)-benzeri reseptörler

NLRP3: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domeyni, lösinden zengin tekrarlar, pirin domeyni içeren 3

NSAID: Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar

PAMP:Patojen ilişkili moleküler kalıplar

PRR: Kalıp tanıma reseptörleri

PYD: Pirin domeyni

RT-qPCR: Ters transkripsiyon kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

TLR: Toll-benzeri reseptör

TNF α : Tümör nekroz faktörü alfa

TREM2: Myeloid hücrelerde eksprese edilen tetikleyici reseptör 2

ÖZET

Erdoğan, A. (2021). Alzheimer hastalarının fibroblast kaynaklı indüklenmiş pluripotent kök hücrelerinden farklılaştırılan mikrogliya hücrelerinin karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Alzheimer hastalığı geri dönüşümsüz ve ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın patogenezeine, amiloid beta ve tau'nun oluşturduğu birikimlerin yanı sıra, inflamasyon da katkı sağlar. Nöroinflamasyonda etkili hücrelerden mikrogliada NLRP3 inflamazom aktivasyonunun, Alzheimer hastalığıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Alzheimer hastalığının araştırılmasında kullanılan hayvan modelleri, insandaki patolojiyi doğru biçimde yansıtamamaktadır. İnsan kaynaklı mikrogliya kullanımı ise beyinden kolayca örnek alınamaması nedeniyle kısıtlıdır. Çalışmamızda insan kaynaklı indüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH) mikrogliaya farklılaştırılıp karakterize edilerek, Alzheimer hastalığında NLRP3 yolağıyla ilişkili çalışmalardaki kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

Alzheimer hastası (AH) ve izogenik (İZO) veya kontrol (KTL) genotipli İPKH hücre hatları mikrogliaya farklılaştırılmış ve karakterizasyonu için Flow Sitometri, immünositokimya ve RT-qPCR yapılmıştır. NLRP3 yolağıyla ilişkili protein ekspresyonu Western Blot ile araştırılmıştır. İşlevsel analiz için, NLRP3 inflamazom aktivatörleri (LPS, amiloid beta) ve inhibitörü (CRID3) uygulanarak, sitokin salımı ELISA ile değerlendirilmiştir. pHrodo partiküllerini ve amiloid betayı fagositozu Flow Sitometri, floresan mikroskobu ve canlı hücre görüntüleme sistemiyle değerlendirilmiştir.

İPKH'den farklılaştırılan mikrogliya hücrelerinin Flow Sitometri ile CD43, CD45, CD11b, CD14, TREM2, TMEM119, CX3CR1, P2RY12; immünositokimya ile IBA1, TMEM119, TREM2, PU.1; Western Blot ile IBA1, TREM2, NLRP3, ASC, MyD88 ve GSK3beta eksprese ettiği belirlenmiştir. RT-qPCR ile *IBA1*, *CD14*, *CSF1*, *CX3CR1*, *TREM2*, *CCR5*, *TLR2*, *TLR4*, *P2RY12* ekspresyonları gösterilmiştir. Hücrelerin LPS ve amiloid beta ile uyarılması, IL-1beta ve IL-18 sitokinlerinin salımıyla sonuçlanmış, CRID3 ise bu etkiyi tersine çevirmiştir. Ayrıca, pHrodo partiküllerini ve amiloid betayı fagosite edebildikleri ve AH grubunun İZO grubuna göre bir miktar daha fagositik olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamız, İPKH'den farklılaştırılan mikroglianın işlevsel olduğunu, Alzheimer hastalığıyla ilişkili mekanizmaların ve tedaviye ilişkin ilaçların çalışılabileceği elverişli bir model olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: mikrogliya, indüklenmiş pluripotent kök hücre, nöroinflamasyon, NLRP3 inflamazomu, amiloid beta

Bu çalışma Heneka Lab., TÜBİTAK 2214-A (Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı), YÖK-YUDAB (Araştırma Görevlileri için Yurt Dışı Araştırma Bursları) ve ÖYP (Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Erdoğan, A. (2021). Characterization of microglia cells differentiated from induced pluripotent stem cells derived from fibroblasts of Alzheimer's Disease patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Department. PhD Thesis. İstanbul.

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible and progressive neurodegenerative disease. Besides amyloid beta and tau accumulations, inflammation also contributes to AD pathogenesis. NLRP3 inflammasome activation in microglia is thought to be associated with AD. Animal models of AD do not accurately reflect human pathology. In our study, human induced pluripotent stem cells (iPSCs) were differentiated into microglia, and their potential to be used in NLRP3 pathway related mechanisms in AD was investigated.

iPSC cell lines of AD, isogenic (ISO) or control (CTL) genotypes were differentiated into microglia and Flow Cytometry, immunocytochemistry and RT-qPCR were performed. Protein expressions associated with the NLRP3 pathway was investigated by Western Blot. For functional analysis, cytokine release was assessed by ELISA after NLRP3 inflammasome activators (LPS, amyloid beta) and inhibitor (CRID3) treatments. Phagocytosis of pHrodo particles and amyloid beta were evaluated by Flow Cytometry, fluorescence microscopy, and live cell imaging system.

iPSCs derived microglia expressed CD43, CD45, CD11b, CD14, TREM2, TMEM119, CX3CR1, P2RY12, IBA1, PU.1, NLRP3, ASC, MyD88 and GSK3beta, detected by immunocytochemistry, Flow Cytometry and Western Blot. *IBA1*, *CD14*, *CSF1*, *CX3CR1*, *TREM2*, *CCR5*, *TLR2*, *TLR4*, *P2RY12* expressions were shown by RT-qPCR. LPS and amyloid beta stimulation caused IL-1beta and IL-18 release, while CRID3 reversed this effect. Cells were able to phagocytose pHrodo particles and amyloid beta, and AD genotype was slightly more phagocytic than ISO genotype.

Our study shows that microglia differentiated from iPSCs are functional and may be an eligible tool to investigate new mechanisms and treatment opportunities in AD.

Key Words: microglia, induced pluripotent stem cells, neuroinflammation, NLRP3 inflammasome, amyloid beta

The present work was supported by Heneka Lab., TÜBİTAK 2214-A (International Research Fellowship Programme for PhD Students), YÖK-YUDAB (Research Scholarship for Doctoral Studies Abroad for Research Assistants), and ÖYP (Teaching Staff Training Program).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı hafıza, muhakeme, mantık, uyum sağlama gibi bilişsel yeteneklerde düşüşün gözlendiği geri dönüşümsüz ve ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (Alzheimer's Association 2019). Dünya genelinde yaklaşık 44 milyon Alzheimer hastası bulunmaktadır (Gao ve ark. 2018). Hasta sayısının yıllar içerisinde artarak devam edeceği öngörülen bu hastalığın, semptomları azaltmak için kullanılan kısıtlı sayıdaki ilaç dışında henüz tam olarak tedavisi yoktur (Reynolds 2019).

Alzheimer hastalığının en önemli moleküler mekanizmaları; hücre dışında amiloid beta (amiloid β veya A β) peptidlerinin birikerek amiloid β plaklarını oluşturması ve hiperfosforillenen tau proteininin hücre içinde nörofibriler yumakları oluşturmasıdır (Crews ve Masliah 2010). Bunların dışında Alzheimer hastalığında özellikle amiloid birikimlerinin ve nörofibriler yumakların yakınında olmak üzere gerçekleşen inflamasyonun da hastalığın patogeneze katkı sağladığı düşünülmektedir. Beyindeki hücrelerin %10'unu oluşturan mikroglialar nöroinflamasyonda rol alan başlıca hücrelerdendir (Hammond ve ark. 2019; Heneka ve ark. 2015). NLRP3 inflamazomu Merkezi Sinir Sistemi'nde (MSS) yalnızca mikrogliada eksprese edilir ve çevreden gelebilecek tehlikelere karşı bir sensör görevi görür. (Venegas ve Heneka 2019). NLRP3 inflamazom yolağının inhibisyonunun kemirgenlerde oluşturulan hastalık modellerinde amiloid patolojisini iyileştirdiğini ve Alzheimer hastalığına karşı koruyucu olabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Daniels ve ark. 2016; Yin ve ark. 2018). Bu nedenle NLRP3 inflamazom inhibitörleri Alzheimer hastalığı için terapötik hedefler arasında değerlendirilmektedir (Zahid ve ark. 2019).

Alzheimer hastalığının tedavisine yönelik prelinik çalışmalarda sıklıkla hayvan modellerine başvurulmaktadır (Chen ve ark. 2013). Ancak hayvan modelleri insan beyni fizyolojisini tam olarak yansıtamadığından Alzheimer hastalığında ortaya çıkan patolojiyi de doğru biçimde ortaya koyamamaktadır (Arber ve ark. 2017). İnsan MSS'sinden örnek alımı, çeşitli hastalıklar nedeniyle yapılması gereken biyopsiler ve post-mortem doku eldesiyle sınırlıdır. Bu örneklerde ise hücrelerin hasta bireylerden elde edilmiş olması, post-mortem kaynaklı artefaktlar ve sınırlı sayıda hücreye ulaşılması gibi sorunlarla karşılaşilmektedir (Pocock ve Piers 2018). İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (İPKH) keşfi, hayvan modellerindeki kısıtlı imkanların

aşılmasını sağlamakta ve insan kaynaklı beyin hücrelerinin kullanılarak hastalık mekanizmalarının araştırılabilmesi yönünde büyük bir olanak sunmaktadır. Erişkin somatik hücrelerden yeniden programlamayla kolaylıkla üretilen İPKH'ler, istenilen hücre tipine farklılaştırılabilmektedir. Bu hücreler, MSS'ye ait hücrelere de farklılaştırılabildiğinden, insan kökenli örnek elde etmenin oldukça zor olduğu MSS'yi ilgilendiren hastalıkların çalışılabileceği sınırsız bir kaynak oluşturmaktadır (Arber ve ark. 2017).

Çalışmamızın amacı insan kaynaklı İPKH'den farklılaştırılan mikroglia hücrelerini karakterize ederek, Alzheimer hastalığının modellenmesindeki kullanım potansiyelini ortaya çıkarmak ve Alzheimer hastalığındaki nöroinflamatuvar yolakları araştırmaktır. Bu amaçla, Alzheimer hastası (AH) ve izogenik (İZO) veya kontrol (KTL) genotipli İPKH hücre hatları mikrogliaya farklılaştırılmış ve çeşitli yöntemler kullanılarak mikroglia ile ve NLRP3 yolağı ile ilişkili belirteç ekspresyonları değerlendirilmiştir. Hücrelerin işlevsel analizi için, NLRP3 inflamazom aktivatörleri ve inhibitörü uygulanarak, çeşitli sitokin salım düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca hücrelerin fagositoz yeteneği de farklı yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

2.1.1. Genel Tanımlama

Alzheimer hastalığı ilk olarak 1906 yılında Alman psikiyatrist ve nöropatolojist Alois Alzheimer tarafından tanımlanmış olan geri dönüşümsüz ve ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Alzheimer hastalarında hafıza, muhakeme, mantık, uyum sağlama gibi bilişsel yeteneklerde düşüş meydana gelir. Hastalığın en belirgin semptomları günlük yaşamı etkileyen hafıza kayıpları, planlama ve problem çözmede güçlük yaşama, yer ve zamanı karıştırma, uzaysal ilişkilerin algılanmasında sıkıntı yaşama, konuşur veya yazarken kelimelerde yeni sorunlar yaşama, muhakeme yapabilme yeteneğinde düşüş, iş veya sosyal aktivitelerden kendini geri çekme, ruh hali ve kişilikte değişim olmasıdır (Alzheimer's Association 2019).

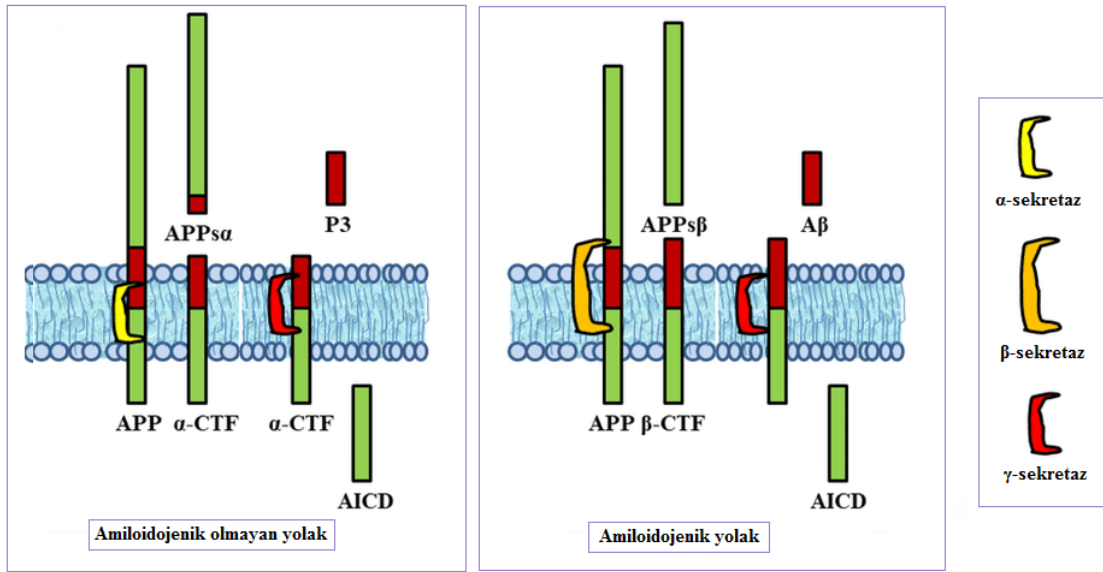
Dünya genelinde yaklaşık 44 milyon Alzheimer hastası bulunmaktadır (Gao ve ark. 2018). Alzheimer's Association'ın (2019) verilerine göre; 2019'da Amerika'da her yaştan yaklaşık 5.8 milyon Alzheimer hastası vardır. 5.8 milyon hastanın yaklaşık 5.6 milyonu 65 yaş ve üzerindeyken, 200.000'i ise 65 yaşın altındadır. 65 yaş üstü hastaların 3.5 milyonu kadın, 2.1 milyonu ise erkektir. 2019 yılında 5.6 milyon olan 65 yaş üstü Alzheimer hastası sayısının nüfus artışıyla birlikte yaklaşık %27 oranında artarak 2025 yılında 7.1 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Türkiye'de ise yaklaşık 600.000 Alzheimer hastası olduğu düşünülmektedir (Türkiye Alzheimer Derneği 2020). TÜİK'in (2020) verilerine göre 2014 yılında %3,9 olan Alzheimer hastalığından ölen yaşlıların oranı artarak 2018 yılında %4,6 olmuştur. Hasta sayısının yıllar içerisinde artarak devam edeceği öngörülen bu hastalığın, semptomları azaltmak için kullanılan kısıtlı sayıdaki ilaç dışında henüz tam olarak tedavisi yoktur (Reynolds 2019).

Alzheimer hastalığının erken başlangıçlı (EOAD) veya ailesel (fAD) olarak anılan ve geç başlangıçlı (LOAD) veya sporadik (sAD) olarak anılan olmak üzere iki çeşidi vardır (Chiaravallotti ve ark. 2016). Ailesel Alzheimer hastalığı, vakaların yaklaşık %10'unu oluşturur, 65 yaşından önce ortaya çıkar ve amiloid prekürsör proteinini (APP) veya presenilin izoformlarını (PSEN1 ve PSEN2) kodlayan genlerin herhangi birinde gerçekleşen mutasyon hastalığın ortaya çıkışını garantiler (Chiaravallotti ve ark. 2016; Takatori ve ark. 2019). Vakaların çoğunu (yaklaşık %90'ını) oluşturan sporadik

Alzheimer hastalığı ise 65 yaşından sonra başlar (Zheng ve ark. 2018) Sporadik Alzheimer hastalığı için en büyük risk faktörü, beyindeki ana kolesterol taşıyıcısı proteini kodlayan apolipoprotein E (*APOE*) geninin üç yaygın alelinden biri olan *APOE* ϵ 4 alelidir (Rabinovici 2019). *APOE* ϵ 4 aleli taşıyan kişilerde hastalığın görülme riski 3-8 kat daha fazladır ve her bir *APOE* ϵ 4 aleli semptomların ortaya çıkış yaşını on yıl kadar erkene çeker (Rabinovici 2019; Zheng ve ark. 2018). Son yıllarda gerçekleştirilen tüm genom analizleri ile, beyinde mikrogliya hücrelerinde eksprese edilen Myeloid Hücrelerde Eksprese Edilen Tetikleyici Reseptör 2 (*TREM2*) geninin nadir varyantlarının da sporadik Alzheimer hastalığı riskini yaklaşık 3 kat arttırdığı ortaya çıkarılmış ve hastalığın patogenezinde bağışıklık ve inflamasyonla ilgili yolların da yer alabileceği konusu oldukça dikkat çekmiştir (Carmona ve ark. 2018).

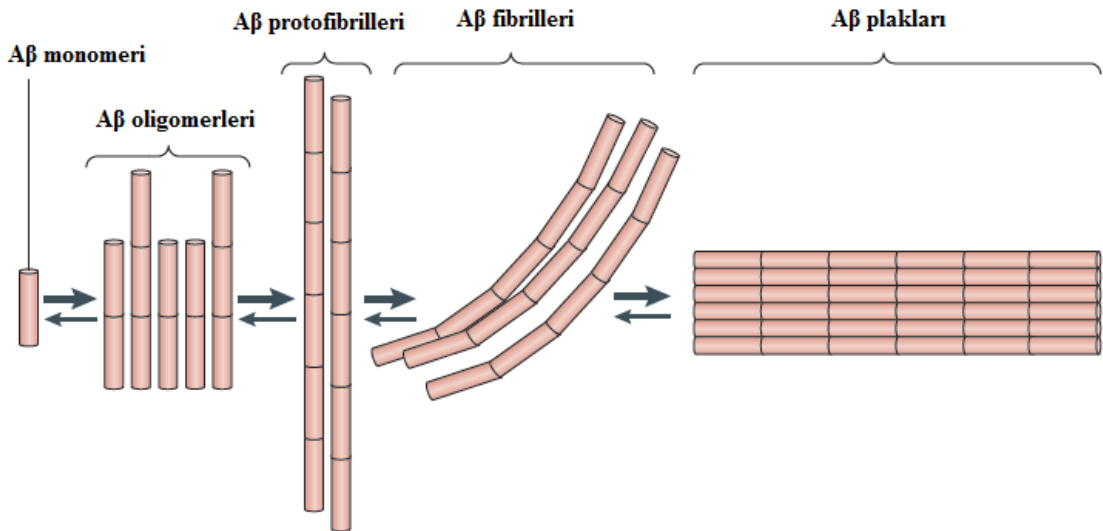
2.1.2. Moleküler Mekanizmalar

Alzheimer hastalığının en önemli moleküler mekanizmaları; APP proteolizi sonucunda hücre dışında amiloid β peptidlerinin birikerek amiloid β plaklarını oluşturması ve hiperfosforillenen tau proteininin hücre içinde nörofibriler yumaklar oluşturmasıdır (Crews ve Masliah 2010). Amiloid prekürsör proteini beyinde yüksek oranda eksprese olan ancak fizyolojik işlevi tam olarak bilinmeyen bir proteindir. Tek geçişli transmembran bir protein olan APP; α , β ve γ -sekretazlar tarafından kesilerek amiloid β 'yi de içeren pek çok farklı parçaya ayrılır. APP'nin bu parçalara ayrılması amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan iki yolla gerçekleşir (Şekil 2-1). Amiloidojenik olmayan yolda APP öncelikle α -sekretaz tarafından kesilerek APPs α ve α -CTF olmak üzere iki parçaya ayrılır. Daha sonra α -CTF, γ -sekretaz tarafından kesilerek p3 ve AICD adı verilen daha küçük parçalar oluşturulur. Amiloidojenik yolda ise APP öncelikle β -sekretaz tarafından kesilir ve APPs β ve β -CTF olmak üzere iki parça oluşur. Sonrasında ise β -CTF'yi γ -sekretaz keser ve bunun sonucunda AICD ve amiloid β oluşur (O'Brien ve Wong 2011). Önceki bölümde bahsedilen ve ailesel Alzheimer hastalığında risk faktörü olan PSEN1 ve PSEN2 proteinleri γ -sekretazların katalitik bileşenleridir (Strooper ve ark. 2012).



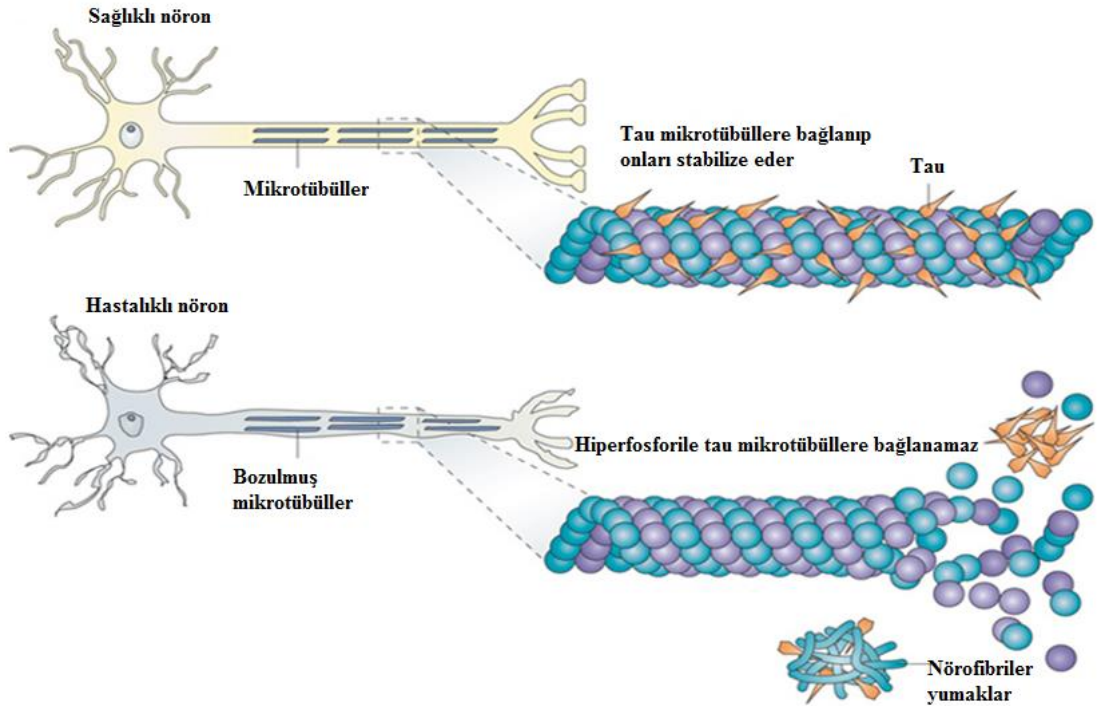
Şekil 2-1: Amiloid prekürsör proteininin kesilerek amiloid beta monomerinin oluşumu (Kumar ve ark. 2018)

Amiloidojenik yolağın son ürünü olarak oluşan amiloid β monomerleri birikerek öncelikle toksik amiloid β oligomerlerini oluşturur, bunlar da bir araya gelerek amiloid β protofibrillerini meydana getirir. Bu protofibrillerin bir araya gelmesiyle amiloid β fibrilleri ve sonrasında da amiloid β plakları oluşur (Şekil 2-2) (Heppner ve ark. 2015).



Şekil 2-2: Amiloid beta monomerinden amiloid beta plaklarının oluşum aşamaları (Heppner ve ark. 2015)

Tau bir mikrotübül ilişkili protein olup, esas olarak nöronlarda ve düşük seviyede olmak üzere glia hücrelerinde bulunur. Ayrıca tau, fizyolojik olarak hücre dışına da salınmaktadır. İnterstisyel sıvıdaki tau konsantrasyonu nöronlardakinin binde biri kadar olsa da, beyin-omurilik sıvısındaki konsantrasyonun on katı kadardır. İnterstisyel tau hücreler tarafından alınır, bölgesel olarak yıkılır veya perivasküler boşluğa dökülür (Wang ve Mandelkow 2016). Normalde tau proteininin işlevi tubulin altbirimlerinin bir araya gelerek oluşturduğu mikrotübülleri stabilize etmektir. Taunun mikrotübülleri destekleyici bu işlevini sürdürebilmesi fosforillenme düzeyine bağlıdır. Hiperfosforilasyon sonucunda tau nörotoksik bir protein haline gelir. Alzheimer hastalığında hiperfosforile olan tau, mikrotübüllerin destabilize olmasına neden olur (Şekil 2-3). Bu da aksonlardaki mikrotübüllere dayalı olarak gerçekleşen taşıma sisteminin bozulmasına yol açar, gerekli kargolar hücre içinde taşınamaz ve nöronlar arasındaki sinaptik iletişim bozulur (Heppner ve ark. 2015). Bunun yanı sıra tau monomerleri de önce oligomerler halinde, daha sonra da eşleşmiş helikal filamentler (PHF) şeklinde birikerek nöron hücre gövdesinde nörofibriler yumakları oluşturur (Mamun ve ark. 2020).



Şekil 2-3: Sağlıklı ve Alzheimer'lı bir nöronda mikrotübüller ve tau (Brunden ve ark. 2009)

Bunların dışında Alzheimer hastalığında özellikle amiloid birikimlerinin ve nörofibriler yumakların yakınında olmak üzere gerçekleşen inflamasyonun da hastalığın patogenezeine katkı sağladığı düşünülmektedir. Beyindeki hücrelerin %10'unu oluşturan mikroglialar nöroinflamasyonda rol alan başlıca hücrelerdendir (Hammond ve ark. 2019; Heneka ve ark. 2015). Bir sonraki bölümde mikrogliya hücrelerinin genel özellikleri açıklandıktan sonra mikroglianın ve nöroinflamasyonun Alzheimer hastalığındaki rolünden de detaylı olarak bahsedilecektir.

2.2. Mikrogliya

MSS'de bulunan üç ana destekleyici hücreden biridir. Mikrogliya adı, Yunanca küçük anlamına gelen *micro* ve yapıştırıcı anlamına gelen *glia* sözcüklerinin birleşiminden meydana gelmektedir. Bu isimlendirme mikroglianın bir glia hücresi olarak nöronları bir arada tuttuğuna ve makroglia olarak adlandırılan diğer glia hücrelerinden (astrositler ve oligodendrositler) daha küçük olduğuna işaret etmektedir (Greter ve Merad 2013). Mikrogliya hücreleri merkezi sinir sisteminin doğal bağışıklık hücreleridir, beyin ve omurilikte savunma hattının ön cephesini oluştururlar (Tejera ve Heneka 2016). Mononükleer fagositik sistemin bir üyesi olan mikrogliya hücreleri, beyindeki hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur (Frank ve ark. 2019; Lawson ve ark. 1990; Mittelbronn ve ark. 2001).

2.2.1. Embriyonik Dönemde Mikrogliya Gelişimi

Mikrogliya hücreleri sağlıklı MSS parenkiminde bulunan myeloid kökenli tek hücre tipidir (Katsumoto ve ark. 2014). MSS'nin nöronları ve makroglia hücreleri nöroektoderm kökenli iken, mikrogliya hücreleri ise mezoderm kökenlidir (Kierdorf ve ark. 2013).

Embriyonik dönemde hematopoez iki aşamada gerçekleşir: Primitif hematopoez ve definitif hematopoez. Primitif hematopoezle yalnızca eritro-myeloid hücreler üretilir. Farede primitif hematopoez E7'de ekstraembriyonik yolk kesesinde kan adacıklarının oluşmasıyla başlar. Vitellus kesesi kökenli primitif makrofajlar, E8.5-E10 arasında dolaşım sistemi oluştuktan sonra embriyonun farklı bölgelerine dağılır. Bu hücreler hedef dokulara ulaştıklarında fetal makrofaj popülasyonlarına farklılaşır. Beyne göç eden vitellus kesesi kökenli fetal makrofaj popülasyonu mikrogliya hücrelerini oluşturur (Ginhoux ve ark. 2013). Fetal makrofaj hücrelerinin proliferasyon kapasitesi oldukça fazladır. Fetal dönemde, kan-beyin bariyeri oluşmadan önce beyne göç eden bu hücreler

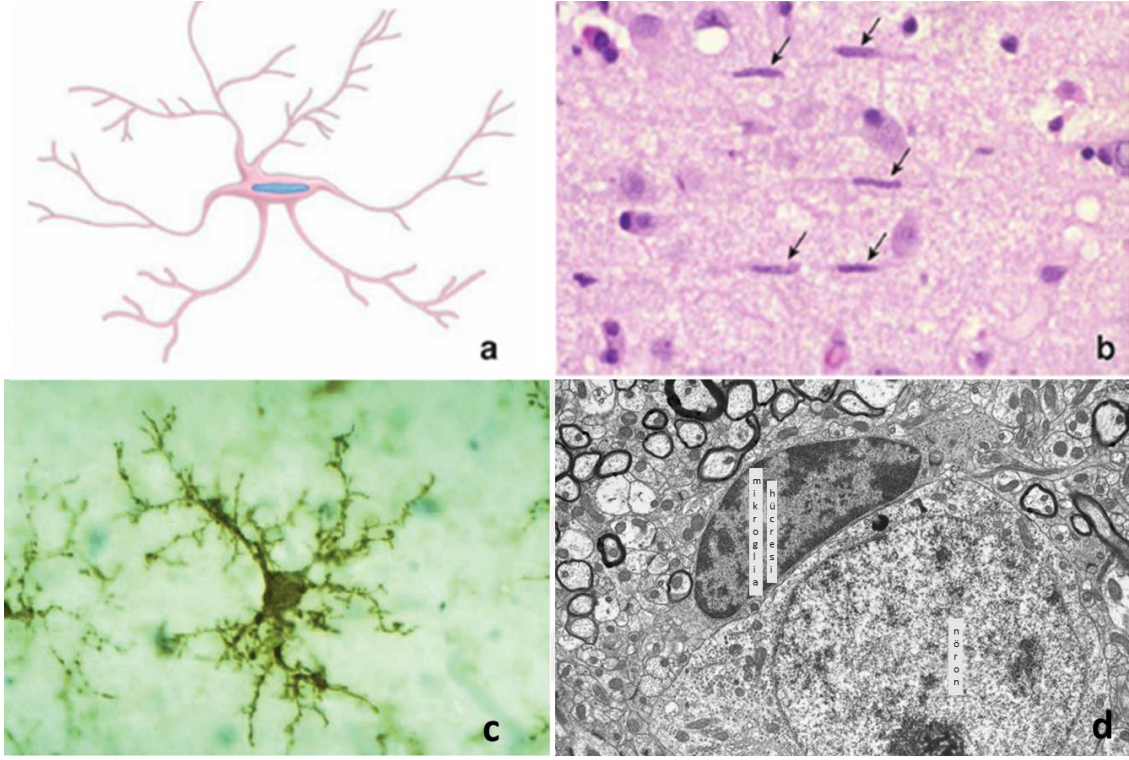
tarafından oluşturulan mikroglia hücreleri devamlılıklarını erişkin dönemde de kendileri sağlar. Normal şartlarda kandaki monositler veya perivasküler makrofajlar mikroglia popülasyonuna katkı sağlamaz (Ransohoff 2016). Definitif hematopoez ise farede E8.5 civarında başlar. Embriyonik mezodermin aort, gonad, mezonefroz (AGM) bölgesinde yeni bir hematopoez dalgası olarak başlayarak hematopoetik progenitörleri oluşturur. AGM bölgesinde üretilen hematopoetik kök hücreler E10.5'te fetal karaciğeri kolonize eder. E16.5'te ise kemik iliğini kolonize eder ve erişkin yaşamı boyunca da burada kendini yenileyen bir popülasyon olarak kalır (Lacaud ve Kouskoff 2017). Monositler de dahil olmak üzere hematopoetik kökenli tüm hücreler hematopoetik kök hücrelerden kaynaklanır (Ginhoux ve ark. 2013).

Yukarıda da bahsedildiği gibi, köken izleme çalışmaları mikroglianın mezodermal primitif yolk kesesi progenitörlerinden köken aldığını ve bu hücrelerin de *Myb*-bağımsız eritromyeloid progenitörleri (EMP'leri) oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. (Hematopoetik kök hücreler ise aksine *Myb*-bağımlı olarak gelişir) (Hoeffel ve ark. 2015). İnsanda EMP'ler E17'de yolk kesesi makrofajlarını oluşturur ve bu hücreler de E31'den itibaren kan-beyin bariyeri kapanana dek beyne göç eder. Burada diğer beyin hücreleriyle etkileşen mikroglia hücreleri olgunlaşarak dallanmış bir morfoloji kazanır ve işlevsel hale gelir (Haenseler ve ark. 2017; Hasselmann ve Blurton-Jones 2020).

2.2.2. Mikroglianın Genel Morfolojisi

Rutin histoloji preparatlarında mikroglia'yı diğer glia hücrelerinden ayırt etmek zordur. Ancak uzun, koyu renkli çekirdekleri ve daha küçük olan boyutlarıyla kabaca tanınabilirler (Mescher 2016). Şekil 2-4a'da bir mikroglia çizimi ve Şekil 2-4b'de Hematoksilen-Eozin boyalı bir beyin kesitindeki mikroglia hücreleri gösterilmektedir. Hortega'nın gümüş karbonat yönteminde olduğu gibi ağır metallerle boyandıklarında, hücre gövdelerinden çıkan dallanmış ve görece az sayıda olan uzantıları görülebilir (Ross ve Pawlina 2016; Sousa ve ark. 2017). Beyindeki mikroglia hücrelerini daha özgün olarak ayırt edebilmek için genellikle immünohistokimya uygulanarak Iba1, CD11b, CD45 vb. belirteçler kullanılmaktadır (Hopperton ve ark. 2018). Şekil 2-4c'de insan lökosit antijenleri (HLA) ile immünohistokimyasal olarak boyanan mikroglia hücreleri gösterilmektedir. Geçirimli elektron mikroskopuyla (TEM) gerçekleştirilen ince yapısal analizlerde ise mikroglianın küçük bir hücre gövdesi (3-6 µm) olduğu, sitoplazmasında çok sayıda lizozom, vezikül, inklüzyon ve az sayıda granüllü

endoplazma retikulumu (gER), mikrotübül ve aktin filamanları olduğu ortaya çıkarılmıştır (Ross ve Pawlina 2016; Sousa ve ark. 2017). Şekil 2-4d’de nörona komşu bir mikroglia hücresinin ince yapısı gösterilmektedir.



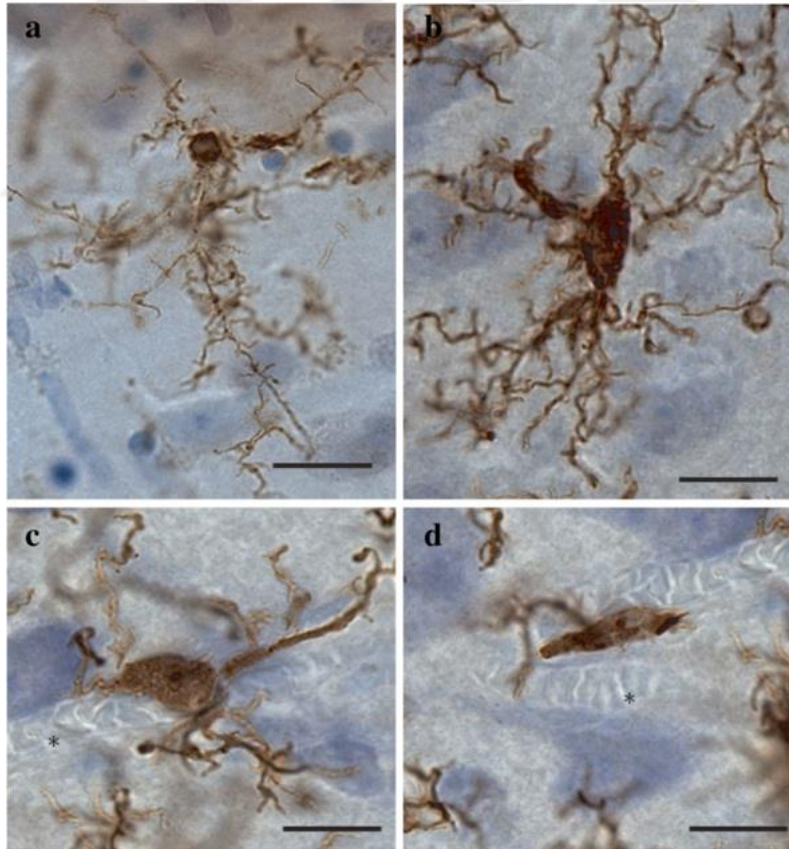
Şekil 2-4: Mikroglia hücreleri

a) Mikroglia hücresinin uzun çekirdeğini ve hücre gövdesinden çıkan az sayıda, dallanmış uzantılarını gösteren çizim (Ross ve Pawlina 2016). **b)** Mikroglia hücrelerinin koyu boyanmış uzun çekirdeklerini (oklar) gösteren Hematoksilen-Eozin boyalı bir beyin kesiti. Örnek, yaygın mikrogliozisli bir hastadan alınmıştır. 420X. (Ross ve Pawlina 2016). **c)** HLA ile immünohistokimyasal olarak boyanan mikroglia hücrelerinin dallanmış kısa uzantılarını gösteren mikrograf. 500X. (Mescher 2016). **d)** Beyindeki bir nöronun ve ona komşu bir mikroglia hücresinin ince yapısını gösteren bir TEM görüntüsü. Örnek, maymun beyninden elde edilmiştir (Peters ve Sethares).

Mikroglia hücrelerinin yoğunluğu beynin farklı bölgelerine göre değişmekle birlikte %5 ile %12 arasındadır ve ak maddede mi boz maddede mi daha fazla bulunduğu konusu tartışmalıdır (Lawson ve ark. 1990; Mittelbronn ve ark. 2001).

Mikroglia hücreleri morfolojik olarak dallanmış, ön uyarılmış (primed), reaktif ve amiboid olmak üzere dört gruba ayrılır (bkz. Şekil 2-5) (Torres-Platas ve ark. 2014). Sağlıklı koşullarda beyindeki mikroglia dinlenme durumunda ve dallanmış morfolojidedir; hücre gövdeleri küçük, sitoplazmaları azdır ve ışınal biçimde dallanmış ince uzantıları vardır (Sousa ve ark. 2017; Tan ve ark. 2020). Ancak in vivo

çalışmalarda iki-foton mikroskopuyla çekilen hızlandırılmış görüntüler, dinlenme durumundaki mikroglia hücrelerinin de tamamen durgun değil, aksine oldukça dinamik hücreler olduğunu göstermektedir. Hücre gövdeleri ve ana uzantıları daha durağan kalsa da, diğer uzantıları oldukça hareketli olup, 1.47 $\mu\text{m}/\text{dk}$ hızla çevreyi sürekli taramaktadır (Davalos ve ark. 2005; Nimmerjahn ve ark. 2005). Mikroglialının inflamatuvar uyaranlara karşı daha fazla yanıt vereceği, aktivasyon öncesi aşamayı tanımlayan ön uyarılmış mikroglialının ise hücre gövdesi daha büyük ve yuvarlaklığı daha az olup, uzantıları daha kalındır (Li ve ark. 2018; Tan ve ark. 2020; Torres-Platas ve ark. 2014). Reaktif mikroglialının oldukça az dallanmış az sayıda uzantısı ve yuvarlak hücre gövdesi vardır. Amiboid mikroglialının ise hücre gövdesi yuvarlak olup, uzantısı yoktur veya dallanmamış en fazla iki uzantısı vardır (Tan ve ark. 2020; Torres-Platas ve ark. 2014).



Şekil 2-5: Mikroglia hücrelerinin 4 farklı morfolojik çeşidi

a) Dallanmış mikroglia **b)** Ön uyarılmış mikroglia **c)** Reaktif mikroglia **d)** Amiboid mikroglia (Torres-Platas ve ark. 2014)

2.2.3. Mikroglialının İşlevleri

Gelişim dönemindeki veya erişkin beyinde mikroglialının pek çok işlevi vardır. Merkezi sinir sistemini koruyan nöbetçiler olarak istilacı mikroorganizmaları, ölü hücreleri ve protein birikimi gibi zararlı maddeleri fagosite ederler. Bağışıklık yanıtına ve doku onarımına katkıda bulunmak için pek çok sitokin, kemokin, nörotrofik ve nörotoksik maddeleri salgırlar. Ayrıca beyinde nöroenez, sinaptik budama ve sinaptik plastisite gibi süreçlerde de önemli rol oynarlar (Colonna ve Butovsky 2017; Tejera ve Heneka 2016). Bu bölümde mikroglialının temel bağışıklık görevi dışındaki işlevlerinden ayrı başlıklar halinde bahsedilecek ve çeşitli çalışmalardan örnekler verilerek bu başlıklar detaylandırılacaktır. Mikroglialının asıl işlevi olan bağışıklıkla ilgili bilgiler ise bir sonraki bölümde ele alınacaktır.

2.2.3.1. Fazla Hücrelerin Elenmesi

Beyin gelişimi sırasında nöral hücre öncülleri çok fazla sayıda üretilir ve sonrasında bunların çoğu (%70'e kadar) elenir. Mikroglia hücreleri bu eleme işleminde görev alır. İlgili beyin bölgesine göç eden mikroglia hücreleri, yüzey reseptörlerinin yardımıyla programlı hücre ölümüne giden fazla hücreleri tespit ederek fagosite eder (Blaschke ve ark. 1996; Marin-Teva ve ark. 2004; Wolf ve ark. 2017). Örneğin, mikroglia nöral prekürsör hücreleri fagosite ederek gelişmekte olan kortikal nöronların sayısını kontrol altında tutar. Fetal serebral kortekste mikroglialının deaktivasyonu nöral prekürsör hücrelerin sayısını artırırken, aktivasyonu ise bu hücrelerin sayısını azaltmıştır (Cunningham 2013).

Erişkinlerde gerçekleşen nöroenezdeki eleme işleminde de mikroglialının rolü vardır. Hipokampusun dentat girus kısmındaki subgranüler bölgede yeni üretilen nöroblastların kısıtlı sayıdaki bir kısmı sisteme olgun nöron olarak katılabilir. Çoğu ise 1-4 gün içinde hızlıca apoptoza uğrar ve mikroglia tarafından yutulur (Sierra ve ark. 2010).

2.2.3.2. Nöroenez

Mikroglia hücreleri nöroenez sırasında fazla üretilen hücreleri ortadan kaldırmakla kalmaz, ayrıca nöroenez de teşvik eder. Buna verilebilecek örneklerden biri fraktalkin (CX3CL1) ve fraktalkin reseptörü (CX3CR1) arasındaki ilişkidir. Fraktalin nöronlardan salgılanan bir kemokindir, fraktalkin reseptörü ise beyinde yalnızca mikroglia hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilir. Deneysel olarak geliştirilen

fraktalkin reseptörü taşımayan farelerin hipokampusünde, nöral progenitör hücre proliferasyonunun ve nörogenezinin düştüğü gözlenmiştir. Bu da mikroglialının nörogenez sürecindeki önemini göstermektedir (Bachstetter ve ark. 2011; Maggi ve ark. 2011).

Mikroglia nörogenezi bazı çözünebilir faktörler üreterek de teşvik eder. Nöropoetik subventriküler dokuların ayrıştırılmasıyla elde edilen, yüzeye tutunan (adherent) bir kültür sisteminde hücrelerin kendini yenileyebilme ve multipotent nörosfer oluşturma yeteneklerini korudukları ancak kararlı (committed) nöroblast üretebilme yeteneklerinin düştüğü ve bu düşüşe mikroglia miktarındaki azalmanın eşlik ettiği gözlenmiştir. Bu hücreler mikroglialardan zengin hücrelerle birlikte kültür edildiğinde veya hücrelere mikroglialının şartlandırılmış medyumunu eklendiğinde ise nöral kök hücrelerde nörogenezin tekrar başladığı görülmüştür (Walton ve ark. 2006). Ancak inflamatuvar koşullarda mikroglia interlökin-1 β (IL-1 β), tümör nekroz faktörü α (TNF α), interlökin-6 (IL-6) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi proinflamatuvar moleküller salgılayarak nörogenez üzerinde zararlı etkilere de yol açabilir (Wang ve ark. 2018; Zhang ve ark. 2017).

2.2.3.3. Nöronlara Kılavuzluk Etme

Mikroglia hücrelerinin, beyne akın eden ilk glia hücreleri olmaları ve akson yolları üzerinde bulunmaları dolayısıyla prenatal gelişim sırasında nöronlara kılavuzluk ettikleri düşünülmektedir (Colonna ve Butovsky 2017). Mutant fare ve hücre azaltma yöntemlerini içeren farklı fare modellerinin kullanılarak mikroglialının işlevsiz hale getirildiği bir çalışmada, prenatal gelişim sırasında mikroglialının dopaminerjik akson filizlenmesinde ve ön beyinde neokortikal internöronların konumlandırılmasında işlev gördüğü gösterilmiştir (Squarzone ve ark. 2014). Mikroglialının işlevsiz hale getirildiği iki model ve genetik olarak mikroglialının bulunmadığı bir modelin yaratıldığı farelerde yapılan bir diğer çalışmada ise mikroglialının korpus kallosumdaki nörit gelişiminde ve aksonların demetlenmesinde rol oynuyor olabilecekleri gösterilmiştir (Pont-Lezica ve ark. 2014).

2.2.3.4. Nöronların Sağkalımı

Mikroglia hücreleri nöronların sağkalımına da yardımcı olur. Mikroglia hücrelerinin uzaklaştırılması veya inaktivasyonunun farede belirli bölgelerdeki nöronların apoptozunda artışa yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca *Cx3cr1* geni taşımayan

farede de aynı etkiler gözlenmiştir. Kortikal nöronlarla mikroglia birlikte kültüre edildiğinde yalnızca kortikal nöronların bulunduğu kültüre göre hücre ölümünün azaldığı görülmüştür. Bu hücreler iç içe geçem kuyucuk (transwell) sistemi kullanılarak birlikte kültüre edildiğinde de benzer sonuçlar elde edilmiş ve mikroglialın sentezlediği insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) seviyesinin nöronlardaki apoptoz düzeyiyle ters orantılı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, farede *in vivo* olarak apoptozu indüklenen kortikal nöronlar, intraventriküler IGF-1 enjeksiyonuyla kurtarılmıştır (Ueno ve ark. 2013).

Bir diğer çalışma sıçanlarda geçici fokal serebral iskemi oluşturulduğunda ve *in vitro* olarak primer mikroglia oksijen-glikoz yoksunluğu (OGD) oluşturulduğunda mikroglia Toll-benzeri reseptör 3 (TLR3) ekspresyonunun düştüğünü göstermiştir. OGD oluşturulmuş primer mikroglia dan elde edilen şartlandırılmış medyum nöron kültüründe hücre ölümünü arttırmış, primer mikroglia da TLR3 agonisti kullanılarak TLR3 aktivasyonu gerçekleştirildiğinde ise nöronal sağkalım artmıştır (Jeong ve ark. 2016). Bu sonuçlar mikroglialın taşıdığı reseptörler ve salgıladığı maddeler aracılığıyla nöronların sağkalımındaki önemli rolünü göstermektedir.

2.2.3.5. Sinaptik Budama

Beyin gelişimi sırasında nöronların arasında pek çok sinaptik bağlantı oluşur. Bunların bir kısmı korunur ve güçlendirilirken uygun olmayan bazıları ise ortadan kaldırılır. Olgunlaşmamış sinapsların bu şekilde ortadan kaldırılmasına sinaptik budama adı verilir. Sinaptik budama sürecinde beynin farklı bölgelerinde aktive olmuş pek çok mikroglia ya rastlanmıştır (Tremblay ve ark. 2011). *In vivo* gerçekleştirilen iki-foton görüntüleme çalışmaları mikroglialın nöronal sinapslarla uzantılarını kullanarak kısa süreli (yaklaşık beş dakika) ve doğrudan bağlantılar kurduğunu göstermiştir (Wake ve ark. 2009). Geçirimli elektron mikroskopuyla yapılan incelemeler, sinaptik temas sonrası mikroglia uzantılarının, mikroglialın fagosite ettiği presinaptik (SNAP25) ve postsinaptik (PSD95) proteinler içerdiğini ortaya çıkarmıştır (Paolicelli ve ark. 2011). Ayrıca mikroglialın aktif olanlardan daha az aktif olan sinapsları yutmayı tercih ettiği gözlenmiştir (Schafer ve ark. 2012). Mikroglialın sağkalımı için elzem olan koloni stimüle edici faktör 1 reseptörünün (CSF1R) farelerde postnatal gelişim sırasında inhibe edilmesiyle elde edilen, mikroglialın bulunmadığı fare modelinde sinaptik budamanın da azaldığı gösterilmiştir (Milinkeviciute ve ark. 2019). Retinogenikülat sistem üzerinde

gerçekleştirilen bir çalışmada mikroglianın kompleman proteini C3 işaretli sinapsları, yüzeylerinde yer alan C3 reseptörleriyle (CR3) tanıdığı ve CR3/C3 sinyal yolağının bozulmasının sinaptik budamanın azalmasına yol açtığı tespit edilmiştir (Schafer ve ark. 2012). Yetişkin farelerde gerçekleştirilen ve mikroglianın azaltıldığı, mikroglianın fagositoz yapmasının engellendiği veya kompleman yolaklarının inhibe edildiği deney modelleriyle de mikroglianın komplemana bağlı olarak sinapslarıelediği gösterilmiştir (Wang ve ark. 2020). Bu çalışmalar, mikroglianın düzgün olmayan sinapsları yutarak sinaptik budamaya katkı sağladığı fikrini desteklemektedir.

2.2.3.6. Sinaptik Plastisite

Mikroglia, nöronal aktiviteyle birlikte nöronal bağlantıların kuvvetindeki değişimleri tanımlayan sinaptik plastisitede de rol oynar. Mikroglia çoğunlukla sitokin ve büyüme faktörlerinin salımıyla sinaptik plastisiteyi etkileyerek, öğrenme ve hafızada değişikliklere yol açar (Colonna ve Butovsky 2017). Mikroglianın bulunmadığı CX3CR1^{CreER} farelerde geç postnatal gelişim ve erken erişkinlik süresince sinapsların elenmesinde ve dendrit dikenlerinin oluşumunda düşüş gözlenmiş, ayrıca öğrenme ve hafızada sorunlar olduğu da çeşitli davranışsal testlerle gösterilmiştir. Bu farelerin mikroglia hücrelerinden beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) uzaklaştırılması motor öğrenmeyle indüklenen dendrit dikenlerinin oluşumunu azaltmış, sinaptik plastisitenin önemli bir aracısı olan tropomiyozin ilişkili kinaz reseptörü B'nin (TrkB) fosforilasyonuna yol açmış ve davranışsal testlerde düşüş gözlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar mikrogliyal BDNF'nin sinaptik plastisitedeki rolünü ortaya koymaktadır (Parkhurst ve ark. 2013). Uzun süreli potansiyasyon (LTP), nöronal bağlantıların sinaptik kuvvetinde meydana gelen uzun süreli artış olarak tanımlanır ve hafızanın hücresel modelini temsil eder. Beyinde yalnızca mikrogliada eksprese edilen fraktalkin reseptörünü taşımayan farelerin hipokampusünde LTP'nin ve bilişsel işlevlerin azaldığı, IL-1 β seviyesinin ise arttığı gözlenmiştir. Bu farelere interleukin-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) verildiğinde ise LTP'deki ve bilişsel işlevlerdeki düşüş engellenmiştir. Bu örnek, IL-1 β 'nın hafıza üzerindeki etkisini göstermektedir (Rogers ve ark. 2011). Tancredi ve ark. (1992) ise sıçan hipokampus kesitlerine, mikroglianın sentezlediği bir diğer sitokin olan TNF- α 'yı uzun süreli olarak uyguladığında LTP'nin doza bağlı olarak engellendiğini göstermiştir. Pfeiffer ve ark.'nın (2016) akut beyin kesitlerinde hızlandırılmış iki-foton görüntülemeyle ve elektrofizyolojik kayıtlarla

gerçekleştirdikleri çalışmada, hippocampüste LTP'nin indüklenmesi mikroglialının dendrit dikenleriyle yaptığı dinamik morfolojik etkileşimleri değiştirmiştir. Mikroglia uzantılarının sayısının ve dendrit dikenleriyle temas süresinin arttığı gözlenmiştir. Mikroglialının sinaptik plastisitedeki rolüne bir diğer örnek de mikroglia yüzeyinde bulunan zar proteini CD200 reseptörü (CD200R) ile ilgili yapılan bir çalışmadır (Cox ve ark. 2012). Mikroglia yüzeyinde bulunan bu zar proteini, nöron ve oligodendrositlerin yüzeyinde bulunan CD200'ü tanır ve bu iki proteinin etkileşimi mikroglia'yı dinlenme durumunda tutar. Sıçanlarda CD200R'nin aktive edilmesi, yaşlanmayla gerçekleşen veya lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen mikroglia aktivasyonunu azaltmış ve LTP azalışını engellemiştir.

2.2.4. Mikroglialının Çalışma Mekanizması

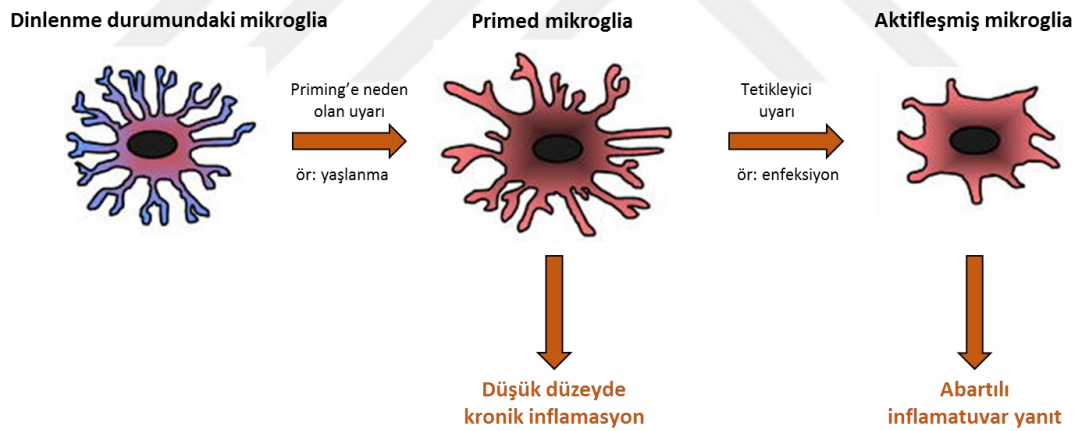
2.2.4.1. Mikroglia'yı uyaran moleküller: DAMP-PAMP

MSS'nin fagositleri olarak mikroglia hücreleri, bulundukları beyin bölgesinde uzantılarını uzatarak patojen veya hücre artıklarını arar. Mikroglia hücreleri patojenler, ölü hücreler veya protein birikimleri tarafından aktive edildiğinde, ilgili bölgeye göç ederek doğal bağışıklık yanıtını başlatır (Heneka ve ark. 2015). Doku hasarı veya patojen istilası gibi durumlarda mikroglia hücreleri yüzeylerinde bulunan kalıp tanıma reseptörleri (PRR) aracılığıyla, hasarla ilişkili moleküler kalıpları (DAMP) ve patojen ilişkili moleküler kalıpları (PAMP) tanır (Ardura-Fabregat ve ark. 2017). DAMP'lar hücrelerde normal olarak bulunan ancak stres veya hücre ölümü sonucunda hücreden dışarıya salınan moleküllerdir. DAMP'lar hasar gören hücrelerin sitozol, çekirdek, mitokondri veya endoplazma retikulumu gibi farklı organellerinden kaynaklanabilir. Genomik ve mitokondriyal DNA, histonlar, ATP, ısı şok proteinleri, high-mobility group box 1 (HMGB1) protein, S100 proteinleri, kromogranin A, ürik asit ve amiloid β proteini DAMP'lara örnek olarak verilebilir (Patel 2018). PAMP'lar ise normalde memeli hücrelerinde bulunmayan mikrobiyal moleküllerdir. PAMP'lara örnek olarak da lipopolisakkaritler (LPS), lipoproteinler, flagellin, bakteri DNA'sı ve bakterilerin peptidoglikan parçaları verilebilir (Vance ve ark. 2009).

2.2.4.2. Mikroglia Ön Uyarımı (Priming)

Mikroçevreleri durağan olduğunda mikroglia hücreleri dinlenme durumunda bulunur; hücre gövdeleri küçüktür, farklı yönlerde uzanan çok sayıda uzantıları bulunur. Homeostazı korumak için mikroçevrelerini sürekli tarayarak inflamatuvar uyarılara

yanıt verirler (Li ve ark. 2018). Ancak yaşlanma veya nörodejenerasyon gibi süreçlerde mikroglia bu uyarılara karşı çok daha duyarlı hale gelir ve mikroçevrelerindeki küçük bir değişiklik bile aktivasyonlarına neden olabilir. Bu duruma mikroglia ön uyarımı adı verilir (Şekil 2-6). Ön uyarılmış mikroglia mikroçevredeki oldukça düşük uyarılara karşı oldukça hassas hale gelmiştir ve bu uyarılara çok daha kuvvetli yanıtlar verir. Ön uyarılmış mikroglialının morfolojisi ve fizyolojisi değişir. Proliferasyonu, sitokin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, tanıdığı motifler ve fagositik kapasitesi artar (Heneka ve ark. 2015). Antijen sunucu moleküllerin (MHC-II gibi), Toll-benzeri reseptörlerin (TLR), proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β) üretimi artar, CX3CR1 ve CD200R gibi bazı düzenleyici moleküllerin ekspresyonu ise düşer (Niraula ve ark. 2017). Yaşlanmayla birlikte oksidatif stresin, lipid peroksidasyonunun ve DNA hasarının artmasının bir sonucu olarak, MSS'deki mikroçevre değişir ve mikroglia ön uyarımı artar. Benzer biçimde nörodejeneratif hastalıklar, MSS'deki enfeksiyonlar ve travmatik beyin hasarı mikroglia ön uyarımına yol açabilir (Li ve ark. 2018).



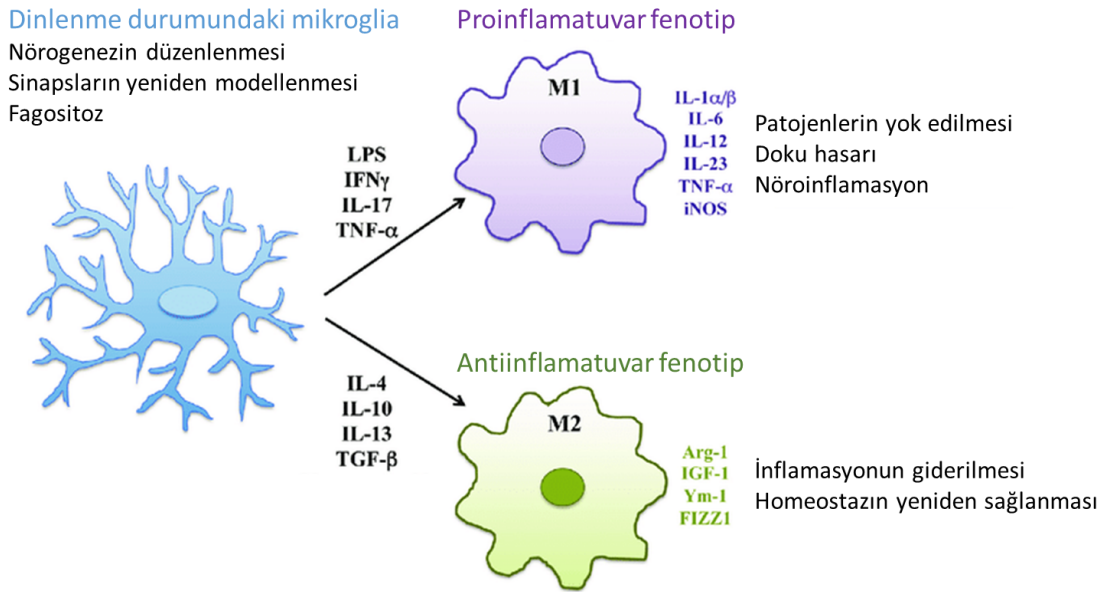
Şekil 2-6: Mikroglia ön uyarımı ve aktivasyonu (Jang ve Johnson 2010)

2.2.4.3. Mikroglia Aktivasyonu

Fizyolojik koşullarda, dinlenme durumunda olan mikroglialının dallanmış bir görüntüsü vardır ve mitoz kapasitesi düşüktür. Kronik uyarılarla beyin homeostazının bozulması MSS'ye yönelik potansiyel bir tehdit anlamına gelir ve mikroglia aktivasyonuna neden olur (Şekil 2-6) (Kettenmann ve ark. 2011). Mikroglia aktivasyonu yaşlanma, sistemik inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, obezite, felç

gibi pek çok durum ve hastalıkta gözlenebilir (Fan ve ark. 2017; Li ve ark. 2013; Surendranathan ve ark. 2018; Tejera ve ark. 2019; Valdearcos ve ark. 2017). Aktifleşmiş mikroglialının morfolojisi amiboid olacak şekilde değişir ve istilacılarla savaşabilmek veya doku hasarı sonrasında homeostazı sağlayabilmek için proliferasyonu artar (Kettenmann ve ark. 2011). Ayrıca daha hareketli hale gelir ve kemotaktik gradient ipuçlarını kullanarak ilgili bölgeye göç eder (Fan ve ark. 2017). Morfolojik değişimlerin yanı sıra yüzey belirteçlerinde ve salgıladığı veya tanıdığı moleküllerde de pek çok değişiklik olur (Li ve ark. 2018).

Mikroglia aktivasyonu genellikle M1 klasik aktivasyon ve M2 alternatif aktivasyon fenotipleri olarak sınıflandırılır (Şekil 2-7). Bu sınıflandırma aslında makrofajların aktivasyon durumlarını belirtmek için oluşturulmuştur ancak mikroglia aktivasyonunu kavramsallaştırmada da oldukça faydalı olduğu düşünülmektedir (Colonna ve Butovsky 2017).



Şekil 2-7: Mikroglialının M1 ve M2 fenotipi (Salvi ve ark. 2017)

Mikroglialının istilacı bakterilere karşı veya doku hasarı gerçekleştiğinde verdiği tepki sonucunda M1 klasik aktivasyon gerçekleşir ve proinflamatuar bir mikroglia

fenotipi ortaya çıkar (Tang ve Le 2016). M1 klasik aktivasyon, *in vitro* olarak interferon gama (IFN- γ) veya bakteri hücre duvarı bileşenleri (LPS, peptidoglikan gibi) uygulanarak IFN- γ ve TLR sinyal yollarının uyarılmasıyla gerçekleştirilebilir (Bordt ve Polster 2014; Sarlus ve Heneka 2017). M1 fenotipinde sitotoksik gen ekspresyonu ve TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, (C-C motifi kemokin ligandı 2) CCL2 gibi proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimi artar. Ayrıca, NADPH oksidaz aktivasyonu gerçekleşir ve bu da indüklenebilir nitrik oksidaz (iNOS) ve süperoksit anyonlarının üretimine yol açarak arjininin nitrik okside (NO) dönüşmesine neden olur. NO üretiminin artışı ise glutamat aracılı toksisitenin etkisini artırır (Colonna ve Butovsky 2017; Stansley ve ark. 2012). M1 fenotipindeki mikroglialdan ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) de salınır (Stansley ve ark. 2012). Ayrıca makrofaj koloni uyarıcı faktör reseptörünün (M-CSFR), integrinlerin (CD11b, $\alpha 4\beta 1$ ve Mac-1), majör histokompatibilite kompleksi proteinlerinin (MHC I, MHC II) ekspresyonu ve kompleman bileşeni 1q (C1q) üretimi artarken, fagositik kapasite ve nörotrofik faktörlerin salımı azalır (Heneka ve ark. 2015; Lynch ve ark. 2004; Milner ve Campbell 2003; Mitrasinovic ve ark. 2001; Roy ve ark. 2008). Sonuç olarak, aktifleşen mikroglialın M1 fenotipi proinflamatuvar ve nörotoksik bir profil sergiler (Colonna ve Butovsky 2017).

M1 aktivasyonunun aksine M2 alternatif aktivasyon fenotipi, mikroglialın doku onarımı, inflamasyonun sonlandırılması ve homeostazın kurulması gibi süreçlerde yer alan antiinflamatuvar fenotipini tanımlar (Tang ve Le 2016). M2 fenotipindeki mikroglialda antiinflamatuvar sitokinlerin (IL4, IL-10, IL-13, TGF- β) üretimi artar, proinflamatuvar sitokin ve NO salımı ise baskılanır (Ledeboer ve ark. 2000; Tang ve Le 2016). Ayrıca, sinir büyüme faktörü (NGF), BDNF ve glia hücresi kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) gibi nörotrofik faktörlerin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi büyüme faktörlerinin salımı artar (Aguilera ve ark. 2018; Suh ve ark. 2013; Szymura ve ark. 2020). Bunların dışında, M2 fenotipinde proteazların üretimi ve fagositik kapasite de artar (Heneka ve ark. 2015; Li ve ark. 2018). Doku onarımı ve yeniden yapımında etkili olan mikroglialın M2 fenotipine özgü belirteçlere örnek olarak Arjinaz 1 (Arg1), Mannoze reseptörü (CD206), İnflamatuvar alanda bulunan 1 (FIZZ1) ve Kitinaz-3-benzeri-3 (Chi3l3) gösterilebilir (Tang ve Le 2016).

Esasen makrofajlar için kullanılan ve sonradan mikroglia hücrelerine de uyarlanmış olan M1/M2 sınıflandırması, *in vitro* çalışmalarda hücre davranışı ve işlevlerini yorumlamada oldukça faydalı bulunmasına rağmen, *in vivo* çalışmalarda makrofaj ve mikroglia aktivasyonunu tanımlamada yetersiz kalmaktadır (Colonna ve Butovsky 2017). Bu hücreler *in vivo* çalışmalarda mikroçevreden gelen çeşitli uyarılara karşı oldukça çeşitli fenotipler sergileyebilmekte, M1/M2 sınıflandırması bu çeşitliliği tanımlamada oldukça basit kalmaktadır (Casella ve ark. 2016). Özellikle son yıllarda gerçekleştirilen transkriptom çalışmalarının ışığında, mikroglialının nörodejenerasyon modellerinde hem nörotoksik hem de nöroprotektif faktörler eksprese ettiği ve bu hücrelerin farklı yaş, nöropatolojik durum ve aşamalarda farklı fenotipler sergilediği düşünülmektedir (Ransohoff 2016; Wes ve ark. 2016). M1/M2 sınıflandırması için kullanılan belirteçlerden bazılarının her iki fenotipte de bulunabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Casella ve ark. 2016). Ayrıca çoğunlukla hayvan hücreleri üzerinde yapılan araştırmalarla oluşturulan M1/M2 sınıflandırmasının, M1/M2 ayırımında kullanılan bazı belirteçlerin insan makrofaj veya mikroglia hücrelerinde eksprese edilmiyor olması nedeniyle insandaki geçerliliği de kuşkuludur (Suh ve ark. 2013). Bu geleneksel sınıflandırmanın son yıllarda kapsayıcılığı ve geçerliliği sorgulanmaya başlanmış olsa da, makrofaj ve mikroglia hücrelerinin işlevine yönelik genel kavrayışı kolaylaştırdığı için güncel çalışmalarda halen daha sıklıkla kullanılmaktadır.

2.2.5. Alzheimer Hastalığı'nda Nöroinflamasyon ve Mikroglia

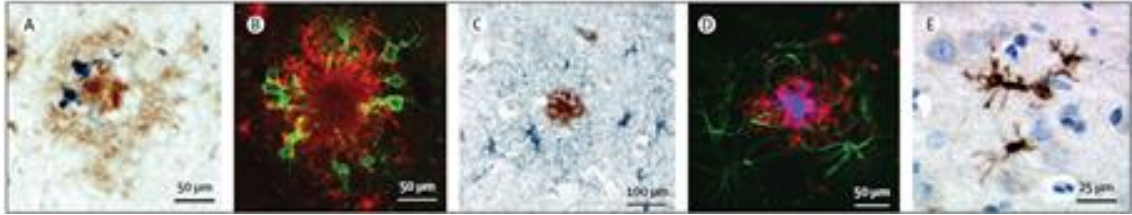
Nöroinflamasyon; MSS'de enfeksiyon, travma, iskemi, nörodejenerasyon, yaşlanma veya toksinlerden kaynaklanabilen çeşitli patolojik durumlara verilen inflamatuvar yanıttır (Leng ve Edison 2021). Nöroinflamasyon sürecinde ilgili bölgede proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, ikincil mesajcı küçük moleküller ve ROS gibi maddeler üretilir (DiSabato ve ark. 2016). Merkezi sinir sisteminin fagositleri olan mikroglialar nöroinflamasyonda rol alan başlıca hücrelerdendir (Heneka ve ark. 2015). Nöroinflamasyona katkı sağlayan diğer hücreler ise astrositler, kapiller endoteli ve özellikle kan-beyin bariyerinin yıkıldığı durumlarda kandan infiltre olarak bu bölgeye geçen periferel bağışıklık hücreleridir (Leng ve Edison 2021).

Nöroinflamasyon, patolojik tehditlerin ardından MSS dokusunun korunması ve homeostazın tekrar sağlanması açısından faydalı bir süreç olsa da, yıllar boyunca

sürecek şekilde kronik olarak devam etmesi ve yayılması, aktifleşmiş olan bağışıklık sisteminin hasarın olmadığı sağlıklı dokulara da zarar vermesine neden olabilir (Hensley 2010).

1992 yılında Hardy ve Higgins tarafından öne sürülen ve Alzheimer hastalığının temel mekanizması olarak kabul edilen amiloid kaskad hipotezinin, otopsi ve ileri görüntüleme sistemleriyle amiloid depolarının ve nörofibriler yumakların sağlıklı yaşlılarda da bulunabildiğinin ortaya çıkarılması, ayrıca hayvan modellerinde ve insanlarda amiloid β 'yı yok etmeye yönelik tedavi girişimlerinin amiloid β yükünü azaltmasına rağmen hastalığın ilerleyişini önleyememesi nedeniyle hastalık mekanizmasını tam olarak açıklayamadığı düşünülmektedir (Calsolaro ve Edison 2016). Son yıllarda, nöroinflamasyonun Alzheimer hastalığında ikincil olarak ortaya çıkan pasif bir sonuçtan ziyade hastalık patogeneze doğrudan katkı sağlayan bir bileşen olabileceği görüşü kuvvetlenmektedir. Örneğin, Alzheimer hastalarının post-mortem beyin dokularından ve deneysel Alzheimer modeli oluşturulan transgenik farelerden alınan beyin kesitlerinde mikroglia hücrelerinin ve astrositlerin amiloid β plaklarının çevresinde toplandığı gösterilmiştir (bkz. Şekil 2-8) (Heneka ve ark. 2015). Alzheimer hastalarının beyin dokularında, beyin-omurilik sıvılarında ve serum örneklerinde IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerinin arttığını gösteren pek çok çalışma vardır (Blum-Degen ve ark. 1995; Fillit ve ark. 1991; Huell ve ark. 1995). Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların (NSAID'ler) uzun dönem kullanımının Alzheimer hastalığına yakalanma riskini azalttığını gösteren çeşitli epidemiyolojik çalışmaların yapılması hastalık mekanizmasında nöroinflamasyonun önemini arttırmıştır (Shadfar ve ark. 2015; Stewart ve ark. 2012). Fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda da NSAID'lerin amiloid β üretimini ve birikimini azaltması ve bilişsel işlevleri iyileştirmesi bu görüşü desteklemektedir (Heneka ve ark. 2005; Kukar ve ark. 2007). Ancak klinik çalışmalarda NSAID'lerin çoğunun beklenen iyileştirici etkiyi gösterememesi bu konuda soru işaretlerine yol açsa da, son yıllarda yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) Alzheimer hastalığında nöroinflamasyonun önemini altını çizmiştir (Ardura-Fabregat ve ark. 2017; Dansokho ve Heneka 2018). Bu çalışmalarla Alzheimer hastalığında risk faktörü olabilecek 20'den fazla gen varyantı tanımlanmıştır (Örneğin; TREM2, kompleman reseptörü 1 (CR1), yüzey farklılaşma antijeni 33 (CD33), ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı A7 (ABCA7)). İşlevlerine bakıldığında ise tanımlanan bu genlerin bağışıklık yanıtında rol oynadığı ve

mikroglia hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği görülmüştür (Zheng ve ark. 2018). Bu verilerin doğrultusunda, Alzheimer hastalığı ile ilgili çalışmalarda nöroinflamasyonun ve mikroglialının oynadığı rol, araştırmaların önemli odak noktalarından biri haline gelmiştir.



Şekil 2-8: Alzheimer hastalığında mikroglia ve astrositlerdeki değişimler

a) Alzheimer hastasının parietal korteksinden alınan bir kesitte A β plaklarındaki CD11b-pozitif mikroglia hücreleri **(b)** APP/PS1 transgenik farenin beyin kesitinde A β plak bölgesinde aktive olmuş, IBA1-pozitif mikroglia hücreleri **(c)** Alzheimer hastasının parietal korteksinden alınan bir kesitte A β plaklarının etrafını sarmış olan GFAP-pozitif astrositler **(d)** APP/PS1 transgenik farenin beyin kesitinde A β plak bölgesinde GFAP-pozitif astrositler **(e)** Alzheimer hastasının frontal korteksinden alınan bir kesitte IL-1 β -pozitif mikroglia hücreleri (Heneka ve ark. 2015)

Alzheimer hastalığında inflamasyon ve toksik moleküllerin üretimi arasındaki pozitif geri bildirim döngüleri inflamasyonun bitişini önler. Bunun sonucunda daha fazla A β birikimi, nöron hasarı, sitokin salımı ve daha fazla kronik inflamasyon meydana gelir ve hastalık ilerler (Heneka ve ark. 2015).

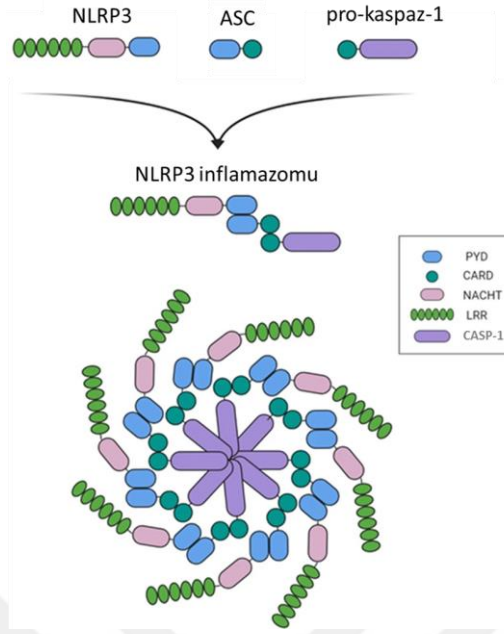
Diğer bağışıklık hücrelerinde de olduğu gibi, mikroglia hücrelerinin PAMP ve DAMP'ları tanımasını sağlayan kalıp tanıma reseptörleri (PRR'ler) dört ana gruba ayrılır. Bunlar Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domaini (NOD)-benzeri reseptörler (NLR'ler), RIG-I benzeri reseptörler (RLRs) ve C-tipi lektin reseptörleri (CLR'ler)'dir (Amarante-mendes ve ark. 2018). TLR'ler, mikroglialının amiloid β 'yı tanımasını sağlayan en iyi tanımlanmış reseptörleridir. Koreseptörler CD14 ve CD36'nın da yardımıyla amiloid β TLR'lere bağlanır ve myeloid farklılaşma faktörü 88 (MyD88) aracılığıyla nükleer faktör- κ B (NF- κ B) yolağı üzerinden inflamatuvar sitokin salımı gerçekleşir (Tejera ve Heneka 2016). Beyinde yalnızca mikroglia tarafından üretilen ve mutasyonları sporadik Alzheimer hastalığı için bir risk faktörü olan TREM2 de mikroglia hücrelerinde amiloid β 'nın tanınmasında rol oynayan bir diğer reseptördür (Ulland ve Colonna 2018; Zhao ve ark. 2018; Zhong ve

ark. 2018). NOD-benzeri reseptörler (NLR'ler) ise hücre içi kalıp tanıma reseptörleridir (Dansokho ve Heneka 2018).

2.2.5.1. NLRP3 İnflamazomu

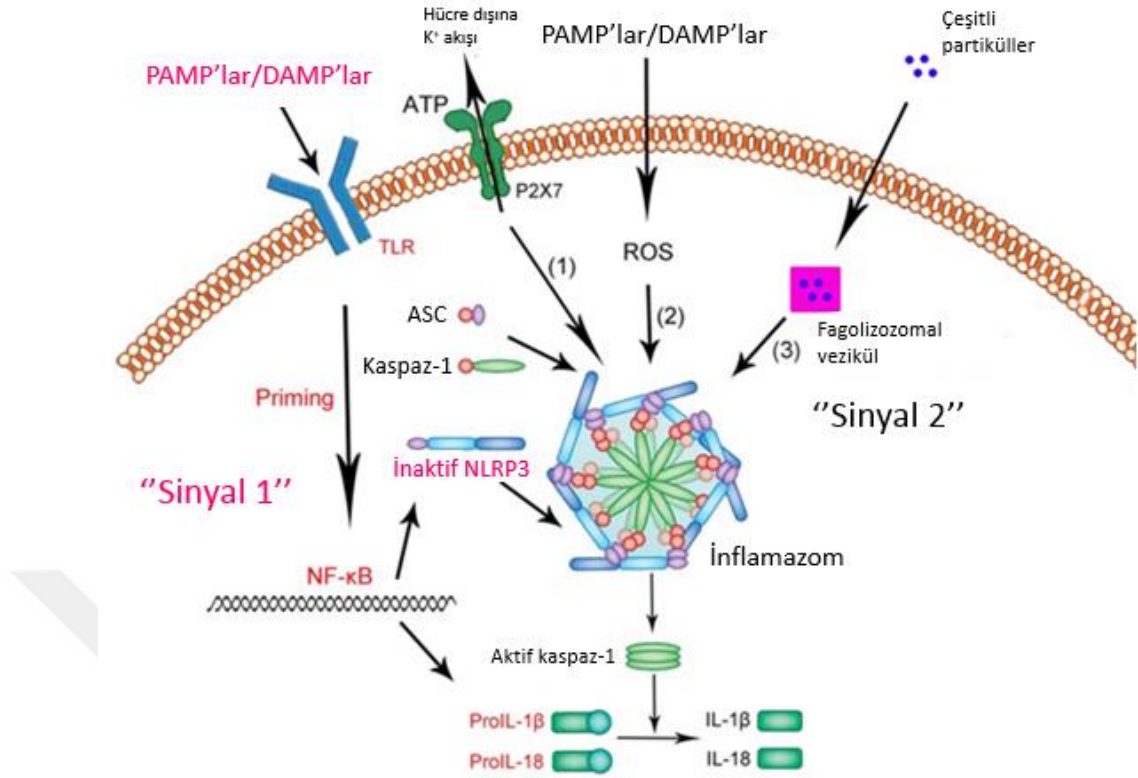
NLR'ler, PAMP veya DAMP'ları algıladıklarında diğer proteinlerle bir araya gelerek sitozolde inflamazom adı verilen protein bileşimlerini oluşturur. İnflamazom oluşumu kaspaz-1 aktivasyonuna yol açar ve proinflamatuvar sitokinlerin aktifleştirilip hücre dışına salınmasıyla inflamatuvar yanıt oluşturulmuş olur (Dansokho ve Heneka 2018). İnflamazomlar içerdikleri NLR tipine göre adlandırılır. NLR protein ailesinin insanda tanımlanan yirmiden fazla üyesi vardır. Bu ailenin ana grubu olan Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domeyni, Lösinden zengin tekrarlar, Pirin domeyni içeren (NLRP) grubunun ise on dört üyesi vardır. Bunlardan biri olan NLRP3'ün (NALP3 olarak da bilinmektedir) oluşturduğu NLRP3 inflamazomu, en iyi tanımlanmış olan inflamazomdur (Heneka ve ark. 2018; Venegas ve Heneka 2019).

NLRP3 inflamazomu üç bileşenden oluşur: Platform görevi gören NLRP3 proteini, adaptör protein olan Kaspaz toplayıcı domeyn içeren apoptozla ilişkili benek benzeri protein (ASC) ve efektör protein olan prokaspaz-1 (bkz. Şekil 2-9). Sensör görevi gören NLRP3 proteininin karboksi ucunda Lösinden zengin tekrar domeyni (LRR), orta kısmında Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domeyni (NACHT) ve amino ucunda pirin domeyni (PYD) bulunur. NLRP3 ve prokaspaz-1 arasında adaptör işlevi gören ASC proteini PYD ve kaspaz toplayıcı domeynden (CARD) oluşur. Prokaspaz-1 ise CARD ve kaspaz-1'den oluşur (Seok ve ark. 2021).



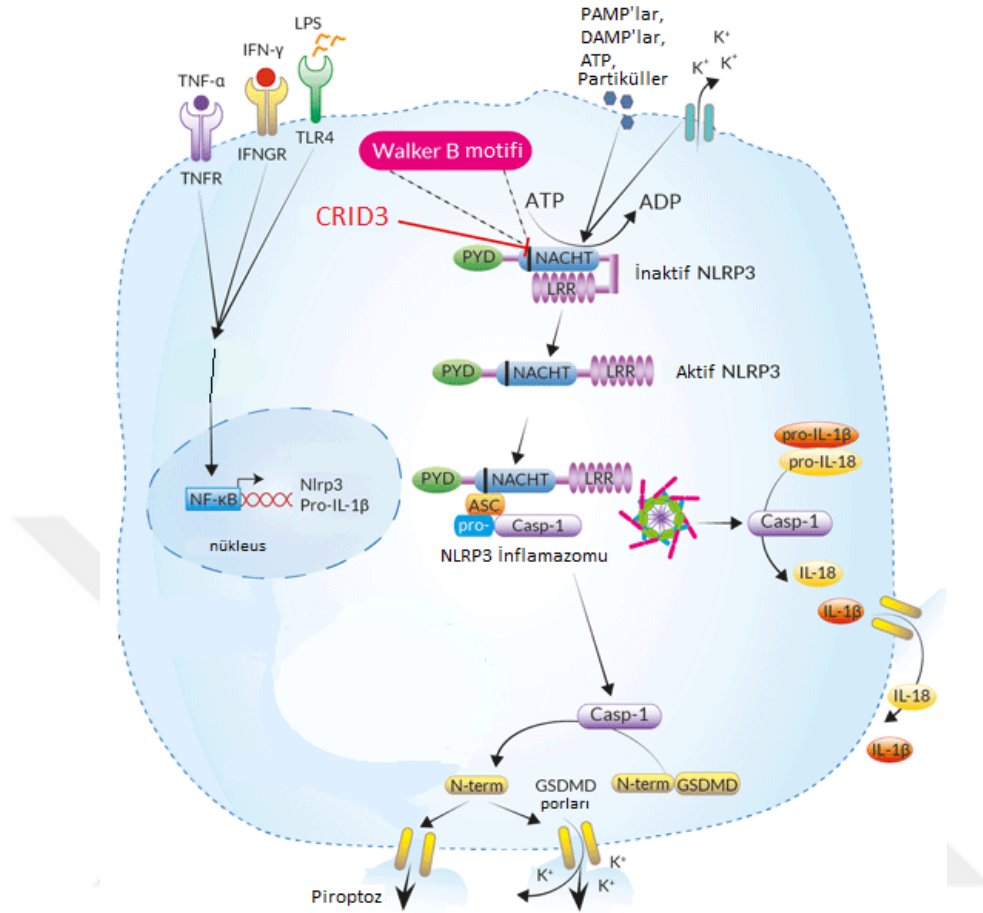
Şekil 2-9: NLRP3 inflamazomunun yapısı (Seok ve ark. 2021)

NLRP3 inflamazom yolağı ön uyarım ve aktivasyon olmak üzere iki aşamada aktifleşir (bkz. Şekil 2-10). Ön uyarım aşaması, PAMP veya DAMP'ları algılayan TLR'ler gibi diğer kalıp tanıma reseptörlerinin aracılığıyla veya TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinler aracılığıyla NF- κ B yolağının tetiklenmesiyle gerçekleşir (Seok ve ark. 2021). Transkripsiyonu etkileyen bu aşama, inflamazom bileşenlerinin ve sitokinlerin öncül formlarının (pro-IL-1 β ve pro-IL-18) daha fazla eksprese edilmesini sağlar. İkinci aşama ise aktivasyondur. Aktivasyon sinyalini verebilecek üç model öne sürülmüştür. İlk modele göre, hücre dışındaki adenozin trifosfat (ATP) NLRP3 agonisti olarak davranır, hücre dışına K⁺ akışı gerçekleşir ve NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu gerçekleşir. İkinci modele göre PAMP veya DAMP'lar ROS üretimini tetikleyerek inflamazom aktivasyonunu gerçekleştirir. Üçüncü modele göre ise, fagositler tarafından yutulduğunda kristal veya partikül benzeri yapılar oluşturan maddeler (amiloid β , silika vb.) lizozomun yırtılıp içeriğinin (örneğin; katepsin B) salınmasına neden olur ve bu da inflamazom aktivasyonunu tetikler (Shao ve ark. 2015).



Şekil 2-10: NLRP3 inflamazomunun aktivasyon aşamaları (Shao ve ark. 2015)

Aktivasyon sinyali NLRP3 inflamazom bileşenlerinin bir araya gelmesini sağlar. NLRP3 proteini, ASC proteini ile homotipik PYD-PYD etkileşimleri kurar ve bunun sonucunda inflamazom aktivasyonunun tipik belirtisi olarak ASC benekleri adı verilen halka benzeri perinükleer yapı oluşur. Ardından ASC, prokaspaz-1 ile CARD-CARD etkileşimleri kurar (bkz. Şekil 2-9). Birbirlerine yakın hale gelen prokaspaz-1'ler kendilerini katalizleyerek aktif hale gelir. Aktif kaspaz-1 de pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i keserek aktif hale getirir. Kaspaz-1 ayrıca Gasdermin D'yi (GSDMD) de keser. Kesilen Gasdermin D'lerin amino ucundaki domeynleri oligomerleşerek hücre zarında por oluşturur. Kesilerek aktif hale getirilmiş proinflamatuvar sitokinler (IL-1 β ve IL-18) bu porlardan hücre dışına salınır. Bu süreç inflamatuvar bir programlı hücre ölüm şekli olan piroptoz ile sonuçlanır (bkz. Şekil 2-11) (Hanslik ve Ulland 2020).



Şekil 2-11: NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu ve CRID3 tarafından inhibisyonu (InvivoGen 2021)

NLRP3 inflamazomu MSS’de yalnızca mikroglia da eksprese edilir ve çevreden gelebilecek tehlikelere karşı bir sensör görevi görür. (Venegas ve Heneka 2019). Primer fare mikroglia hücreleri üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada fibriler amiloid β ’nin NLRP3 inflamazomu yolağı üzerinden kaspaz-1 aktivasyonuna ve IL-1 β salımına yol açtığı gösterilmiştir (Halle ve ark. 2008). Yine primer fare mikroglia hücreleri üzerinde yapılan bir diğer *in vitro* çalışmada, amiloid β oligomer ve protofibrillerinin de NLRP3 inflamazomunun aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiş ve amiloid β türlerinin tetiklediği mikroglia aktivasyonunun, amiloid β depoları oluşmadan önce doğal bağışıklık yanıtını başlatarak Alzheimer hastalığına yol açabileceği öne sürülmüştür (Lučiūnaitė ve ark. 2020). NLRP3 inflamazomu yolağının Alzheimer hastalarında ve bu hastalığın fare modellerinde aktifleşerek hastalığın patolojisine katkı sağladığını gösteren de pek çok çalışma vardır. Alzheimer hastalarının hipokampal veya kortikal lizatlarında kesilmiş

kaspaz-1 seviyesinin kontrol örneklerinkinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Alzheimer modeli (APP/PS1) oluşturulan farelerde NLRP3 geni çıkarıldığında amiloid β birikiminin azaldığı, mikroglia hücrelerinin amiloid β fagositozunun arttığı ve farelerin hafıza ve davranış testlerinde daha başarılı olduğu gözlenmiştir (Heneka ve ark. 2013). Farelerde gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, mikroglia hücrelerinden NLRP3 inflamazomu aktivasyonu sonrasında salınan ASC beneklerinin, amiloid β 'nin bir araya gelmesine ve plakların daha da yayılmasına yol açtığı gösterilmiştir. Farelere ASC beneğine özgün antikor uygulandığında ise amiloid β patolojisinin yayılması azalmıştır (Venegas ve ark. 2017). Yakın zamanda gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarla NLRP3 inflamazomunun tau patolojisi ile ilişkisi de ortaya çıkarılmıştır. *İn vitro* olarak primer mikroglia hücrelerinde ve *in vivo* olarak transgenik farelerle yapılan bir çalışmada fibriler taunun da NLRP3 inflamazomunu aktive ettiği ve NLRP3 inflamazomu inhibitörü uygulandığında ise tau patolojisinin azaldığı gösterilmiştir (Stancu ve ark. 2019). Bir diğer çalışmada tau patolojisi gösteren transgenik (Tau22) farelere, Alzheimer modeli (APP/PS1) oluşturulmuş farelerin fibriler amiloid β içeren beyin homojenatı intraserebral olarak enjekte edildiğinde bu farelerin beyinde tau hiperfosforilasyonunun, kesilmiş kaspaz-1, IL-1 β ve ASC ekspresyonunun ve hücre dışında ASC beneklerinin sayısının arttığı gözlenmiştir. Aynı beyin homojenatı Tau22/Asc^{-/-} veya Tau22/Nlrp3^{-/-} farelere enjekte edildiğinde ise tau hiperfosforilasyonu gözlenmemiş ve NLRP3 inflamazomu ile ilişkili protein ekspresyonları ise düşmüştür (Ising ve ark. 2019). Bu çalışmalar amiloid β ve tau patolojisi ile NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu arasında bağlantı olabileceğini ortaya koymaktadır (Hanslik ve Ulland 2020).

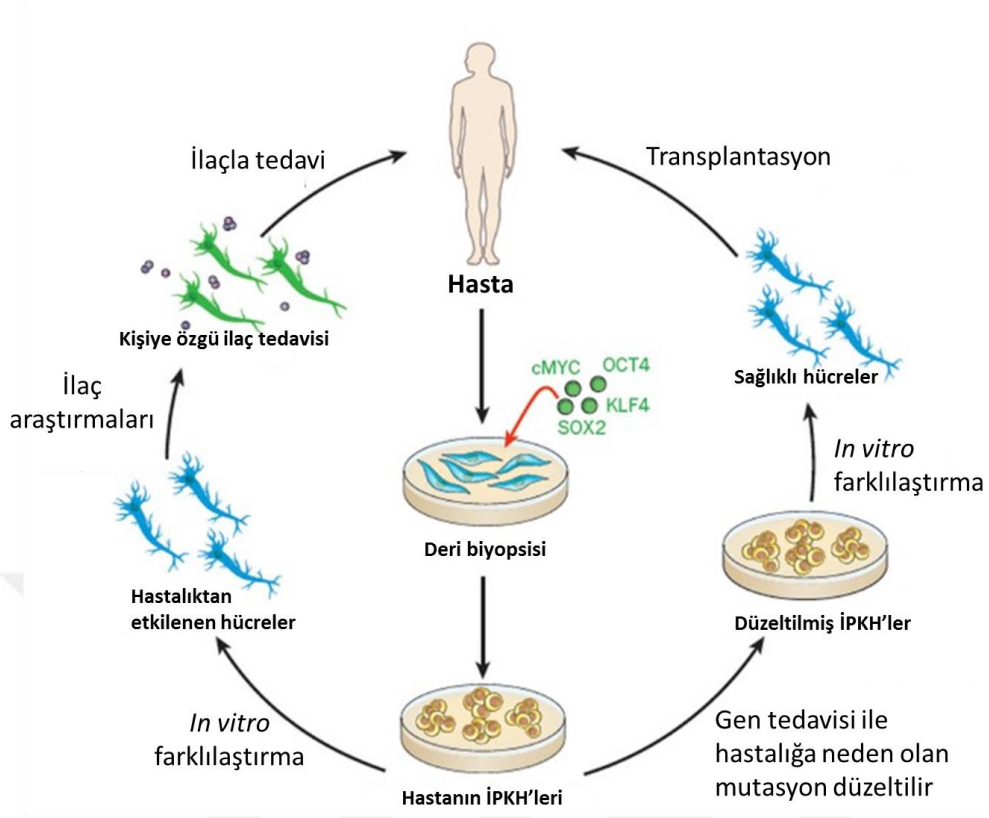
NLRP3 inflamazom yolağının inhibisyonunun kemirgenlerde oluşturulan hastalık modellerinde amiloid patolojisini iyileştirdiğini ve Alzheimer hastalığına karşı koruyucu olabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Daniels ve ark. 2016; Yin ve ark. 2018). Bu nedenle NLRP3 inflamazom inhibitörleri Alzheimer hastalığı için terapötik hedefler arasında değerlendirilmektedir. Sitokin salım inhibitör ilacı 3 (CRID3 veya diğer adıyla MCC950) NLRP3 inflamazomunun en etkili ve seçici inhibitörlerindendir (Zahid ve ark. 2019). CRID3, NLRP3 proteininin NACHT domeynindeki Walker B motifine yüksek afiniteyle kovalent olmayan bir etkileşimle bağlanır (bkz. Şekil 2-11) (Coll ve ark. 2019). Ayrıca CRID3'ün NLRP3'le etkileşerek onu daha kapalı ve inaktif bir konformasyona soktuğu da gösterilmiştir (Tapia-Abellán

ve ark. 2019). NLRP3'e bağlanan CRID3, NLRP3'ün ATP hidrolizini önleyerek NLRP3'ün aktivasyonunu ve NLRP3 inflamazomunun oluşumunu engeller (Coll ve ark. 2019). Bu nedenle NLRP3 inflamazom yolağının CRID3 gibi inhibitörler kullanılarak inhibisyonunun, Alzheimer hastalığının tedavisinde yeni bir anti-inflamatuvar tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

2.3. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler

Kök hücreler, kendini yenileyebilme ve vücuttaki özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme kapasitesine sahip olan hücrelerdir. Vücutta hem embriyonik hem de erişkin dönemde mevcut olan kök hücrelerin pek çok çeşidi vardır. Kök hücrelerin belirli hücre tiplerine farklılaşması adım adım gerçekleşir ve her adımda farklılaşma potansiyelleri gittikçe azalır. Kök hücreler, farklılaşabildikleri hücre tipi miktarına göre beşe ayrılır: Totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent. Totipotent kök hücreler (ör: zigot) embriyonik ve ekstra-embriyonik yapılar da dahil olmak üzere organizmanın tümüne ait hücreleri oluşturabilme kapasitesine sahiptir. Pluripotent kök hücreler (ör: embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler) üç germ yaprağına da farklılaşabilen hücrelerdir. Multipotent kök hücreler (ör: hematopoetik kök hücreler) birbirine yakın ama farklı hücre soylarına farklılaşabilen hücrelerdir. Oligopotent kök hücreler (ör: myeloid kök hücreler) belirli bir hücre soyuna ait farklı hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir. Unipotent kök hücreler ise yalnızca tek bir hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir (Zakrzewski ve ark. 2019).

2006 yılında Takahashi ve Yamanaka fare fibroblastlarını yalnızca dört faktör ile (Yamanaka faktörleri: Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) yeniden programlayarak farklılaşmamış hücreler elde etti. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH) olarak adlandırdıkları bu hücreler embriyonik kök hücreye benzer özellikler gösteriyor ve üç germ yaprağına farklılaşabiliyordu. Bir yıl sonra ise insan fibroblastlarından da İPKH elde edildi (Park ve ark. 2007; Takahashi ve ark. 2007). Bilim dünyasında çığır açan bu keşiften sonra hız kazanan çalışmalarla hepatosit, keratinosit, melanosit, pankreasın β hücreleri, nöral progenitörler ve kan hücreleri gibi diğer pek çok hücre tipinden de İPKH elde edilebildiği gösterildi (Polo ve ark. 2010).



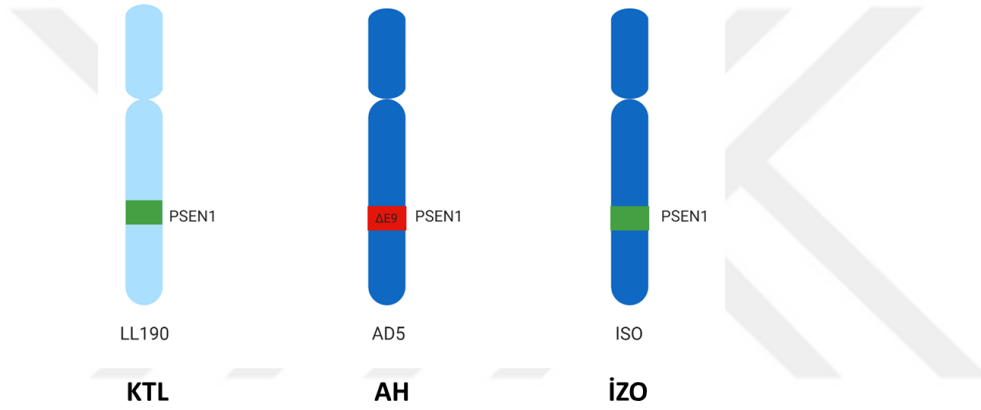
Şekil 2-12: İPKH'lerin kişiyeye özgü ilaç ve kök hücre tedavilerinde kullanım potansiyeli (Robinton ve Daley 2012)

İPKH'nin embriyonik kök hücrelerden en büyük üstünlüğü, eldesi için bir embriyoya ihtiyaç duyulmaması ve böylece yapılacak çalışmalarda etik kaygılara yol açmamasıdır. Bir diğer üstünlüğü ise kişiselleştirilmiş tedavilere imkan sunmasıdır. Hastanın kolayca örnek alınabilen (fibroblast, keratinosit veya kan hücreleri gibi) kendi hücrelerinden İPKH elde edilerek istenilen hücreye farklılaştırılabilir ve bu hücreler kullanılarak kişiyeye özgü ilaç denemeleri, toksisite testleri yapılabilir ve tedavi yöntemleri geliştirilebilir (bkz. Şekil 2-12). Ayrıca İPKH'den farklılaştırılan çeşitli hücrelerin bir arada kültüre edilmesiyle üç boyutlu organoidler oluşturularak organların fizyolojik olarak benzer modelleri üretilebilir. İPKH'lerin insan kökenli olması, kolay elde edilebilmesi, çoğaltılabilmesi, etik kaygılar barındırmaması ve neredeyse istenen bütün hücre tiplerine dönüştürülebilmesi bu hücreleri oldukça değerli kılmakta ve hastalıkların modellenmesinde, ilaç denemelerinde ve kök hücre tedavilerinde kullanılacak sınırsız bir kaynak olarak öne çıkarmaktadır (Shi ve ark. 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İnsan İPKH Hücre Hatları

Tez çalışmasında kullanılan hücreler, insan kaynaklı fibroblastların yeniden programlanmasıyla elde edilen İPKH hücre hatlarıdır. LL190 (KTL) genotipi kontrolden, AD5 (AH) genotipi *PSEN1* geninde $\Delta E9$ mutasyonu taşıyan Alzheimer hastasından elde edilmiştir. ISO (İZO) genotipi ise AD5 genotipindeki $\Delta E9$ mutasyonunun düzeltilmesiyle elde edilmiş olan izogenik gruptur (bkz. Şekil 3-1).



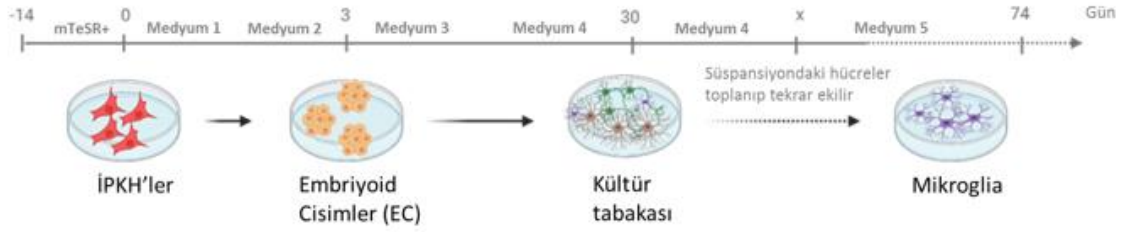
Şekil 3-1: Tez çalışmasında kullanılan İPKH hücre hatlarının genotipleri

Kullanılan İPKH hücre hatları Alman Nörodejeneratif Hastalıklar Merkezi (DZNE) tarafından materyal transfer anlaşması ile Doğu Finlandiya Üniversitesi'nden (UEF) temin edilmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen deneyler Bonn Üniversitesi Nörodejeneratif Hastalıklar ve Geriatrik Psikiyatri/Nöroloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Michael T. Heneka'nın DZNE'deki laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2. İPKH-kaynaklı Mikroglia Hücre Kültürü

Çalışmada İPKH'lerden mikroglia elde etmek için iki farklı protokol kullanılmıştır. Kullanılan ilk protokol Dr. Heneka'nın laboratuvarında geliştirilmiştir, ikinci protokol ise piyasada satılan bir kite dayalıdır (Stemcell Technologies).

3.2.1. Protokol 1



Şekil 3-2: Protokol 1'e göre İPKH'lerin mikrogliaya farklılaştırılma süreci

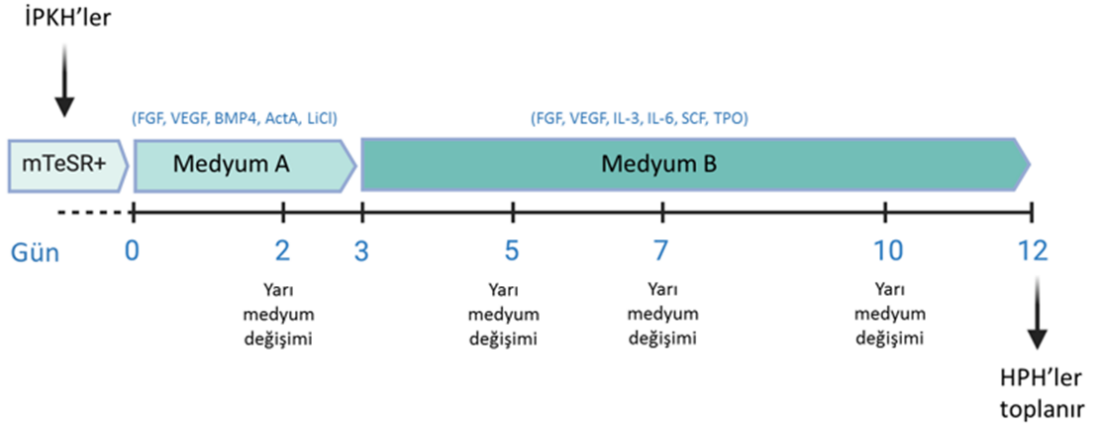
Tüm aşamalarda hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarındaki inkübatörde (Memmert ICO 240) inkübe edildi. İPKH'ler mTeSR™ Plus (Stemcell Technologies) medyumunda çoğaltıldı. Çalışmanın başlatıldığı gün, İPKH'ler ReLeSR™ ile kaldırılarak Medyum 1'e (NGD baz medyum + 50 ng/ml BMP4 + 5µM Rock inhibitörü) ayrı ayrı hücreler halinde (grup oluşturmamış), AggreWell™ mikrokuyucuklar içeren kültür kaplarına embriyoid cisim (EC) oluşturmaları amacıyla ekildi. Birinci ve ikinci gün Medyum 2 (NGD baz medyum + 50 ng/ml BMP4) kullanılarak %50 medyum değişimi gerçekleştirildi. Üçüncü gün embriyoid cisimler 37 µm'lık filtre kullanılarak toplandı, sayıldı ve matrijel kaplı 6 kuyucuklu kültür kaplarına Medyum 3 (NGD baz medyum + 50 ng/ml BMP4 + 25 ng/ml IL-34 + 25 ng/ml CSF1 + 10ng/ml GM-CSF) içerisine ekildi ve iki günde bir medyum eklendi. On dördüncü günde Medyum 4'e (NGD baz medyum + 50 ng/ml IL-34 + 50 ng/ml M-CSF1 + 10 ng/ml GM-CSF + 12,5 ng/ml TGFβ) geçildi. Kültür kaplarında oluşan kültür tabakasından koparak süspansiyon halinde mikroglia hücreleri elde edilene dek medyum ekleme işlemine devam edildi. Süspansiyon olarak toplanan mikroglia hücreleri olgunlaştırılmak üzere Medyum 5 içerisine (Mikroglia baz medyum + 100 ng/ml IL-34 + 50 ng/ml TGFβ + 25 ng/ml M-CSF + 100 ng/ml CD200 + 100 ng/ml CX3CL1) ekildi. Hücreler 6 gün daha iki günde bir medyum ilave edilerek ve sonraki 4 gün de matrijel kaplı kültür kaplarında inkübe edildi. Elde edilen olgun mikroglia hücreleri toplanarak yapılacak deneyler için ekildi.

3.2.2. Protokol 2

Bu protokol iki aşamadan oluşmaktadır: İlk aşamada İPKH'lerden hematopoetik progenitör hücreler (HPH'ler) oluşturulmuştur, ikinci aşamada ise HPH'ler mikroglia hücrelerine farklılaştırılmış ve mikroglia hücreleri olgunlaştırılmıştır. Tüm aşamalarda

hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarındaki inkübatörde (Memmert ICO 240) inkübe edilmiştir.

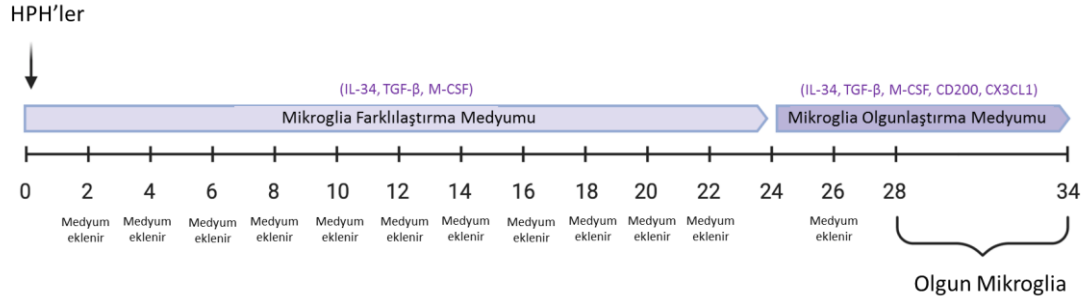
3.2.2.1. Hematopoetik progenitör hücrelerin (HPH'lerin) üretilmesi



Şekil 3-3: Protokol 2'nin ilk adımı olarak İPKH'lerin HPH'lere farklılaştırılma süreci

İPKH'ler mTeSR™ Plus medyumunda çoğaltıldı. Çalışma başlangıcından 1 gün önce İPKH'ler ReLeSR™ ile pasajlanarak matrijel kaplı 6 kuyucuklu kültür kaplarındaki 5 µM ROCK inhibitörü içeren mTeSR Plus medyumuna ekildi. Çalışmanın başlatıldığı gün medyum değiştirilerek Medyum A'ya (STEMdiff™ Hematopoetik Bazal Medyum + Ek A, 1:200 seyreltme) geçildi. İkinci gün, Medyum A kullanılarak medyumun yarısı değiştirildi. Üçüncü gün, Medyum B'ye (STEMdiff™ Hematopoetik Bazal Medyum + Ek B, 1:200 seyreltme) geçildi. Beşinci, yedinci ve onuncu günlerde Medyum B kullanılarak medyumun yarısı değiştirildi. On ikinci günden itibaren oluşan HPH'ler süspansiyondan iki günde bir toplandı.

3.2.2.2. Mikrogliaya farklılaştırma ve olgunlaştırma



Şekil 3-4: Protokol 2'nin ikinci adımı olarak HPH'lerin mikrogliaya farklılaştırılma süreci

Mikrogliaya farklılaştırmanın başlatıldığı gün, HPH'ler matrijel kaplı 6 kuyucuklu kültür kaplarına hücre sayısı her bir kuyucukta 1×10^5 - 2×10^5 olacak şekilde Mikroglia Farklılaştırma Medyumu'na (Mikroglia Bazal Medyumu (DMEM/F12, 2X insülin-transferrin-selenit, 2X B27, 0.5X N2, 1X glutamaks, 1X esansiyel olmayan amino asitler, 400 μ M monotiyogliserol, 5 μ g/mL insülin) ve üçlü sitokin kokteyli (100 ng/mL IL-34, 50 ng/mL TGF- β ve 25 ng/mL M-CSF)) veya STEMdiff™ Mikroglia Farklılaştırma Bazal Medyumu ve Ek 1 ve 2'ye ekildi. İki günde bir 1 mL/kuyucuk Mikroglia Farklılaştırma Medyumu eklendi. Yirmi dördüncü günde hücreler toplanıp sayılarak 1×10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde matrijel kaplı kültür kaplarına Mikroglia Olgunlaştırma Medyumu'na (Mikroglia Bazal Medyumu ve 100 ng/mL IL-34, 50 ng/mL TGF- β , 25 ng/mL M-CSF, 100 ng/mL CD200 ve 100 ng/mL CX3CL1) ekildi. Dört gün boyunca olgunlaştırılan mikroglia hücreleri toplanarak analiz edildi veya işlevsel analizlerinin yapılacağı deneyler için ekildi.

3.3. Amiloid β 'nin Hazırlanışı

3.3.1. Fibriler Amiloid β 'nin Hazırlanışı

1 mg HFIP (hekzafloro-2-propanol) uygulanmış amiloid β_{1-42} (Bachem), steril DPBS'te 250 μ M konsantrasyonda çözüldü. 1000 rpm ve 37°C'deki çalkalayıcıda 80 saat inkübe edilerek fibril oluşumu indüklendi ve kullanılabilecek 80°C'de saklandı.

3.3.2. FAM İşaretli Amiloid β 'nin Hazırlanışı

0,5 mg floresan işaretli amiloid β_{1-42} (AnaSpec, Eurogentec) 40 mM NaOH'te çözülerek, Tris HCl'de 221 μ M'a seyreltilti. 37°C'de 24 saat inkübe edildi ve kullanılabilecek 80°C'de saklandı.

3.4. Uyarım (Stimülasyon) Deneyleri

Olgun mikroglia matrisel kaplı kültür kaplarına ekildi ve 100 ng/ml LPS ile 3 saat ön uyarım yapıldı, sonrasında 2,5 μ M fibriler amiloid β ile 24 saat boyunca uyarıldı. Protokol 2 ile elde edilen hücreler ayrıca 1 μ M NLRP3 inflamazom inhibitörü CRID3 varlığında da inkübe edildi. İlgili maddeler belirtilen sürelerde uygulandıktan sonra şartlandırılmış medyumlar toplandı ve analiz edilene dek -80°C 'de muhafaza edildi.

3.5. Sitokin Salımının Ölçülmesi

Uyarım deneylerinin ardından hücrelerden salınan IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6 ve CXCL12 sitokinlerinin miktarı ELISA yöntemiyle üretici firmanın talimatlarına göre ölçüldü (insan IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6, CXCL12 DuoSet® ELISA kit (R&D Systems)). Mikroplaka okuyucuda (Infinite M200, Tecan) optik yoğunluk 450 nm'ye ayarlanarak ölçüm yapıldı ve elde edilen veriler GraphPad® Prism 8 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.6. LDH Analizi

Sitotoksitenin ölçümü için laktat dehidrogenaz (LDH) analiz kiti (Roche) kullanıldı. Her bir genotip için yüksek kontrolü elde edebilmek için hücrelere Triton-X eklenerek 30 dk bekletildi. Kit bileşenleri üretici firmanın talimatlarına göre 1:45 oranında karıştırıldı ve 96-kuyucuklu mikrolakadaki deney gruplarından elde edilen şartlandırılmış medyumların üzerine eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk bekletildi. Mikroplaka okuyucuda (Infinite M200, Tecan) optik yoğunluk 492 nm'ye ayarlanarak ölçüm yapıldı ve elde edilen veriler GraphPad® Prism 8 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.7. Western Blot

Hücreler proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren RIPA lizis tamponu kullanılarak parçalandı. Protein konsantrasyonları BCA Protein Analiz Kiti (Thermo Scientific™ Pierce™) kullanılarak belirlendi. Her bir örnek için 20 μ g protein %4–12 Bis-Tris jelle yüklendi ve jel nitroselüloz membrana aktarıldı. Membranlar anti-GSK3 β (1:1.000), anti-TUJ1 (1:2.000), anti-Nestin (1:2.000), anti-Olig-2 (1:500), anti-ASC (1:1.000), anti-NALP3 (1:500), anti-MyD88 (1:500), anti-IBA1 (1:1.000), anti-TREM2 (1:1.000), anti-GFAP (1:1.000/1:500), anti- α -tubulin (1:5.000), anti-GAPDH (1:1000), anti- β -

aktin (1:1000) primer antikorlarıyla bir gece inkübe edildi ve infrared'e yakın floresan sekonder antikorlar IRDye 800CW keçi anti-tavşan IgG ve IRDye 680LT Keçi anti-fare IgG (1:20.000) ile bir saat inkübe edildi. Membranlar Odyssey CLx görüntüleme sistemi ile görüntülendikten sonra Image Studio programıyla analiz edildi. Protein seviyeleri α -tubulin, GAPDH veya β -aktin protein ekspresyonu düzeylerine göre normalleştirildi.

3.8. İmmünohistokimya

Olgun mikroglia PDL kaplı 8 kuyucuklu lam üzerine 15×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde Mikroglia Bazal Medyumu içerisine ekildi ve hücreler tutunmaları için bir gece 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 koşullarındaki inkübatörde bekletildi. PBS ile yıkandıktan sonra %4'lük paraformaldehit ile 15 dk tespit edildi. %3 Triton X-100 içeren PBS ile geçirgen hale getirildi ve %3 normal keçi serumunda 1 saat inkübe edilerek bloke edildi. Anti-TREM2 (1:500), anti-IBA1 (1:250), anti-TMEM119 (1:500) ve anti-PU.1 (1:40) primer antikorlarında bir gece bekletildikten sonra 1 saat keçi anti-tavşan Alexa-Fluor 488 (1:10.000) veya keçi anti-sıçan Alexa-Fluor 488 (1:10.000) sekonder antikorlarıyla işaretlendi. Hücreler LSM800 Lazer Konfokal Taramalı Mikroskop ile görüntülendi ve görüntüler Image-J® yazılımı kullanılarak işlendi.

3.9. Hücre Fenotiplerinin Flow Sitometri ile Analizi

Flow Sitometri yöntemiyle HPH'lerin, farklılaştırmanın 15. günündeki mikroglialının ve olgun mikroglialının fenotipik karakterizasyonu yapıldı. Her örnek için yaklaşık olarak 2×10^5 hücre kullanıldı. FACS tüplerine alınan hücreler yıkandıktan sonra florokrom-konjuge antikorlar (CD11b-BV605, CD45-APC-Cy7, CD200R-APC, P2YR12-PE, CD14-PE-Cy7, CD16-BV421, CX3CR1-FITC, CD235a-PE-Cy7, CD43-APC, CD34-PE) veya primer antikorları (TMEM119, TREM2) takiben sekonder antikorlar keçi anti-tavşan Alexa Fluor 647 veya keçi anti-sıçan Alexa Fluor 488 ile 20 dk işaretlendi. Canlı/ölü hücrelerin ayrımı için 7-AAD ile 10 dk boyandı. Ara aşamalarındaki yıkamalar için ve analiz aşamasında FACS tamponu (PBS + %2 BSA) kullanıldı. Örnekler BD FACS Canto II Flow Sitometri cihazı kullanılarak analiz edildi, elde edilen veriler FlowJoTM yazılımı ile analiz edildi.

3.10. Fagositoz Deneyleri

3.10.1. pHrodo Fagositozunun Flow Sitometri ile Analizi

İPKH'lerden farklılaştırılan olgun mikrogia hücreleri matrijel kaplı 24 kuyucuklu kültür kaplarına 18×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde Mikrogia Bazal Medyumu içerisine ekildi ve hücrelerin tutunması için bir gece 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 koşullarındaki inkübatörde bekletildi. Hücreler 30 dk, 1 saat ve 2 saat boyunca $10 \mu\text{g/ml}$ pHrodo biyopartikülleri (Invitrogen™) ile inkübe edildi. Ayrıca ek olarak hücreler, belirtilen sürelerden 30 dk öncesinde $20 \mu\text{M}$ sitokalsin D veya $1 \mu\text{M}$ CRID3 ile inkübe edildi. Sonrasında hücreler kültür kaplarından toplanarak FACS tüplerine aktarıldı. Canlı/ölü hücrelerin ayrımı için 7-AAD ile 10 dk boyandı. Yıkamalar için ve analiz aşamasında FACS tamponu (PBS + %2 BSA) kullanıldı. Örnekler BD FACS Canto II Flow Sitometri cihazı kullanılarak analiz edildi, elde edilen veriler FlowJo™ yazılımı ile analiz edildi.

3.10.2. Amiloid β Fagositozunun Flow Sitometri ile Analizi

İPKH'lerden farklılaştırılan olgun mikrogia hücreleri matrijel kaplı 24 kuyucuklu kültür kaplarına 18×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde Mikrogia Bazal Medyumu içerisine ekildi ve hücrelerin tutunması için bir gece 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 koşullarındaki inkübatörde bekletildi. Hücreler 1 saat, 3 saat ve 5 saat boyunca $0.5 \mu\text{M}$ FAM işaretli amiloid β (AnaSpec, Eurogentec) ile inkübe edildi. Ayrıca ek olarak hücreler, belirtilen sürelerden 30 dk öncesinde $40 \mu\text{M}$ sitokalsin D ile inkübe edildi. Sonrasında hücreler kültür kaplarından toplanarak FACS tüplerine aktarıldı. Canlı/ölü hücrelerin ayrımı için 7-AAD ile 10 dk boyandı. Yıkamalar için ve analiz aşamasında FACS tamponu (PBS + %2 BSA) kullanıldı. Örnekler BD FACS Canto II Flow Sitometri cihazı kullanılarak analiz edildi, elde edilen veriler FlowJo™ yazılımı ile analiz edildi.

3.10.3. Amiloid β Fagositozunun Canlı Hücre Görüntüleme Sistemi ile İzlenmesi

İPKH'lerden farklılaştırılan olgun mikrogia hücreleri PDL kaplı 8 kuyucuklu lam üzerine 10×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde Mikrogia Olgunlaştırma Medyumu içerisine ekildi ve hücrelerin tutunması için bir gece 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 koşullarındaki inkübatörde bekletildi. Ertesi gün medyum değiştirilerek Mikrogia Bazal Medyumu eklendi. Görüntülemeyi hemen önce hücrelerin medyumunu içerisine son konsantrasyon $40 \mu\text{M}$ olacak şekilde TAMRA işaretli amiloid β eklendi. Canlı hücre

görüntüleme mikroskopisi (Nikon Eclipse Ti) kullanılarak 1 saat veya yarım saat boyunca hücrelerin zaman aralıklı görüntüleri kaydedildi ve NIS-Elements yazılımı kullanılarak videolar oluşturuldu.

3.11. Ters Transkripsiyon Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

Farklılaşmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden RNeasy® Mini Kit (Qiagen) kullanılarak RNA pürifikasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre ile (NanoDrop™ 2000c, Thermo Scientific) ölçüldü. RT2 First Strand Kit (Qiagen) kullanılarak RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Üretilen cDNA'lar, ilgili genlere ait primerler (RT2 qPCR Primer Assay) ve RT2 SYBR® Green Master Mix kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu. 95°C'de 10 dk 1 döngü, 95°C'de 15 sn ve 60°C'de 1 dk 40 döngü yapacak şekilde PCR cihazı (StepOnePlus, Applied Biosystems) ayarlanarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Sonuçlar karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_t$ yöntemiyle değerlendirildi.

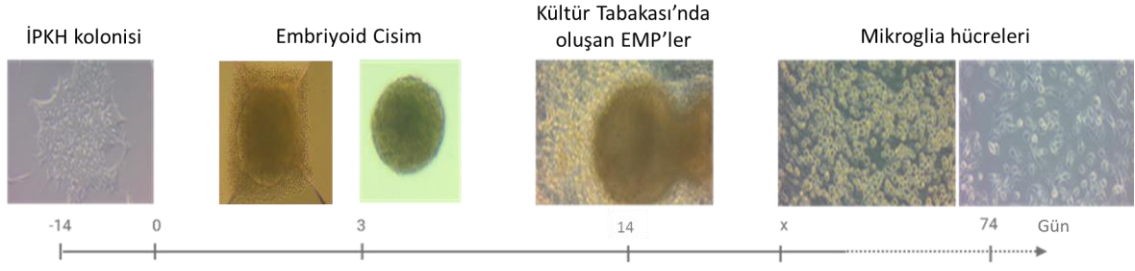
4. BULGULAR

Çalışmamızda İPKH'lerden mikroglia elde etmek için iki farklı protokol kullanıldığı için, elde edilen sonuçlar da iki ayrı ana başlık halinde sunulacaktır. Protokol 1 kullanılarak elde edilen, farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerin karakterizasyonu için çeşitli protein ekspresyonları Western Blot yöntemiyle analiz edilmiş, ayrıca elde edilen mikroglia hücrelerinin stimülasyonu sonucunda salgıladıkları çeşitli sitokinler ELISA yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu deneylerden sonraki farklılaştırma denemelerinde Protokol 1 kullanılarak yeterli mikroglia hücresi farklılaştırılmadığı için bu protokol bırakılarak Protokol 2 ile mikroglia hücreleri farklılaştırılmaya başlanmıştır. Bu nedenle Protokol 2 ile elde edilen farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerin karakterizasyonu ve elde edilen mikroglia hücrelerinin stimülasyonu deneyleri tekrar yapılmıştır. Protokol 2 ile elde edilen hücrelerin karakterizasyonunda Western Blot'un yanısıra farklı yöntemler de (immünositokimya, Flow Sitometri, RT-qPCR) kullanılmıştır. Ayrıca Protokol 2 ile elde edilen mikroglia hücrelerine sitotoksosite analizi ve çeşitli fagositoz deneyleri de yapılmıştır.

4.1. Protokol 1'in Bulguları

4.1.1. İPKH'lerin EMP'lere ve Mikrogliaya Farklılaştırılması

Protokol 1 kullanılarak yaklaşık 30 günlük farklılaştırma sonucunda İPKH'lerden mikroglia elde edilmeye başlandı ve sonrasında mikroglia hücreleri olgunlaştırıldı (Şekil 4-1). İlk aşamada İPKH'lerin üç boyutlu kümelenmeleri olan embriyoid cisimler (EC) elde edildi. Embriyoid cisimlerden öncelikle eritromyeloid progenitörler (EMP'ler) elde edildi, sonrasında EMP'ler mikrogliaya farklılaştırıldı. Kültür kaplarından süspansiyon halinde elde edilen mikroglia hücreleri olgunlaşma aşaması için tekrar ekildi. Sonrasında olgun mikroglia toplandı ve karakterizasyonu veya işlevsel analizleri yapıldı.



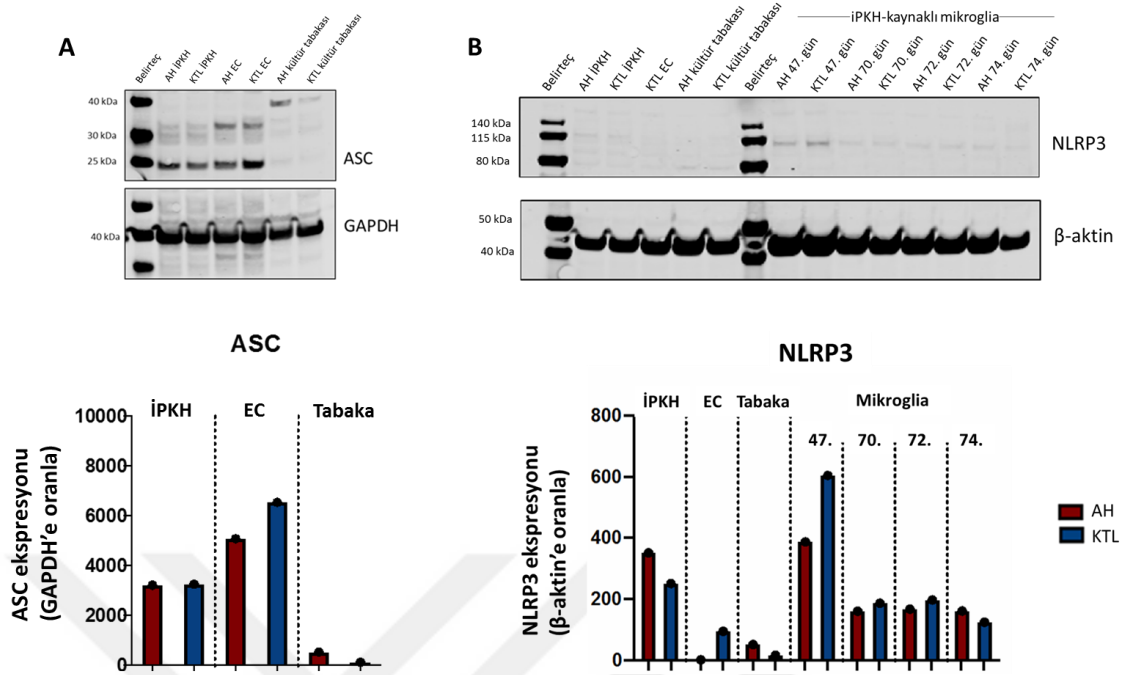
Şekil 4-1: Protokol 1 kullanılarak İPKH'lerin mikroglia hücrelerine farklılaştırılması

Protokolün ilk aşamasında 4 günde İPKH'lerden embriyoid cisimler oluşturuldu. 14. günde eritromyeloid hücreler (EMP'ler) oluşturuldu ve bu hücrelerden 30. günden itibaren mikroglia elde edilmeye başlandı. Mikroglia hücreleri süspansiyondan toplanarak olgunlaştırmak için tekrar ekildi. Sonrasında olgun mikroglia toplandı ve karakterizasyonu veya işlevsel analizleri yapıldı.

4.1.2. İPKH'lerden Farklılaştırılan Hücrelerin ve Kültür Tabakalarının Protein Ekspresyonunun Karakterizasyonu

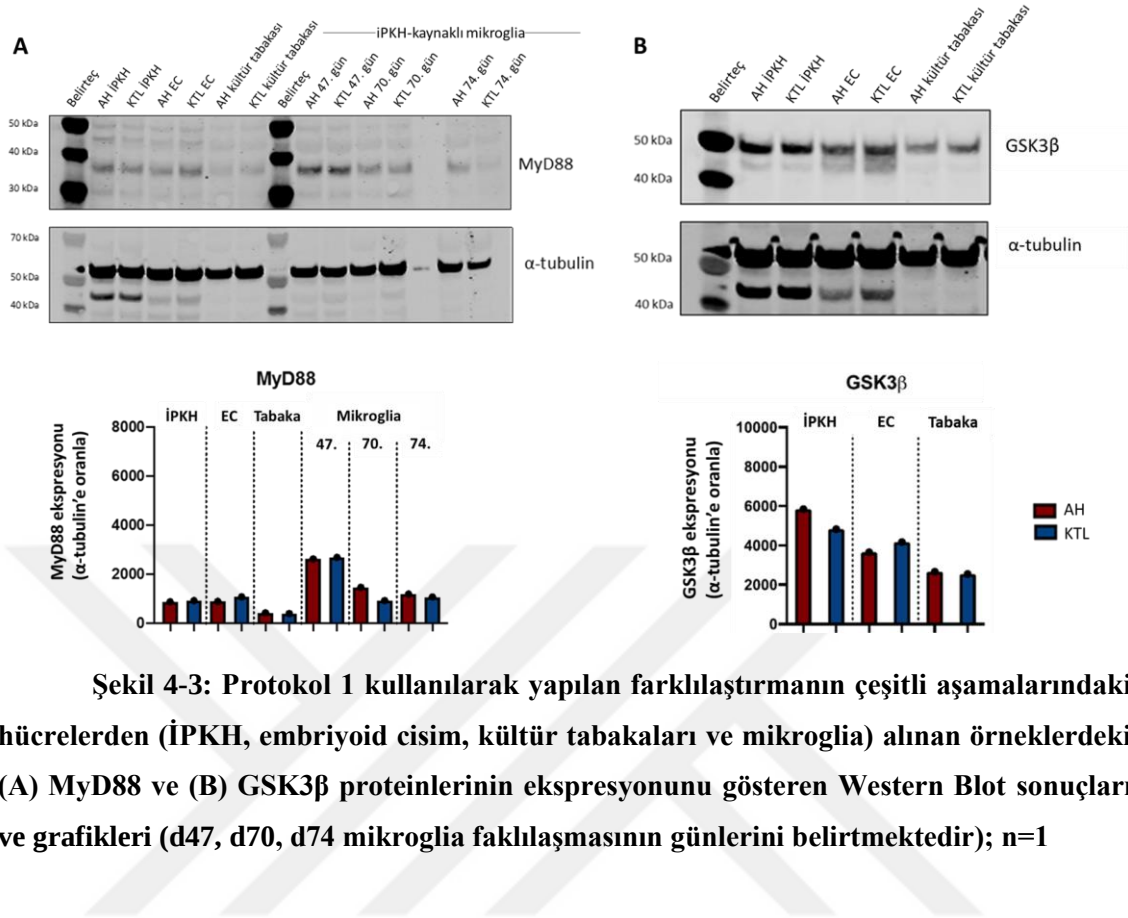
Protokol 1 kullanılarak tüm farklılaştırma süreci boyunca elde edilen hücrelerin karakterizasyonu için farklılaşmanın İPKH, embriyoid cisim ve mikroglia hücreleri aşamalarından örnekler toplandı. Ayrıca farklılaşma sürecinde mikrogliaların üzerinden koparak oluştuğu, kültür kabına tutunmuş halde gelişen hücre kültürü tabakası da toplanarak bu örneklerin çeşitli protein ekspresyonlarının incelenmesi için Western Blot yöntemiyle analizi yapıldı.

ASC protein ekspresyonu İPKH ve embriyoid cisim aşamalarında tespit edildi ancak kültür tabakalarında çok az eksprese edildiği veya eksprese edilmediği gözlemlendi (Şekil 4-2A). NLRP3 protein ekspresyonu İPKH ve İPKH'den elde edilen mikroglia aşamalarında tespit edildi (Şekil 4-2B).



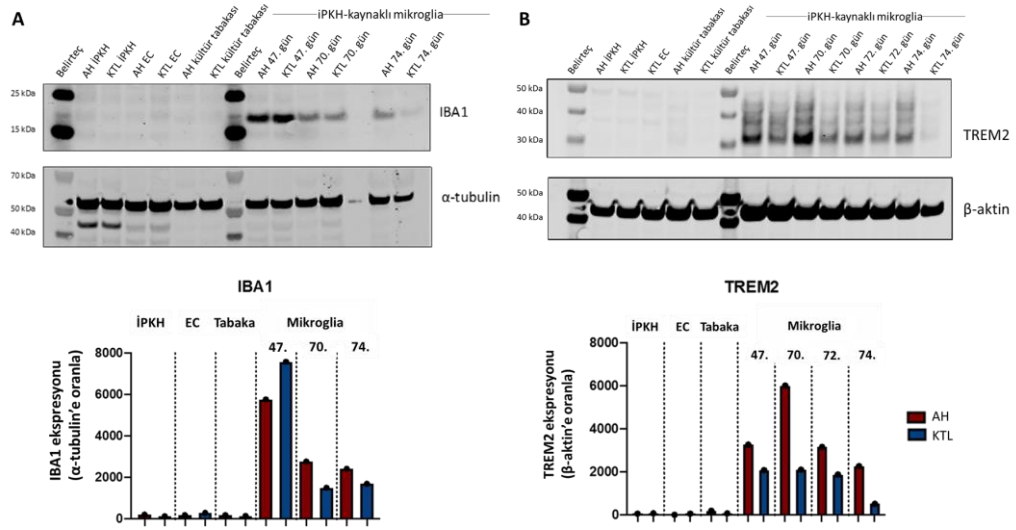
Şekil 4-2: Protokol 1 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, embriyoid cisim, kültür tabakaları ve mikrogliya) alınan örneklerdeki (A) ASC ve (B) NLRP3 proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri (d47, d70, d72, d74 mikrogliya farklılaşmasının günlerini belirtmektedir); n=1

MyD88 ekspresyonu İPKH, embriyoid cisim ve mikrogliya aşamalarında tespit edildi (Şekil 4-3A). Glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK3 β) ekspresyonunun her iki genotipte de İPKH'den embriyoid cisim ve kültür tabakası aşamalarına doğru hafifçe azaldığı gözlemlendi (Şekil 4-3B).



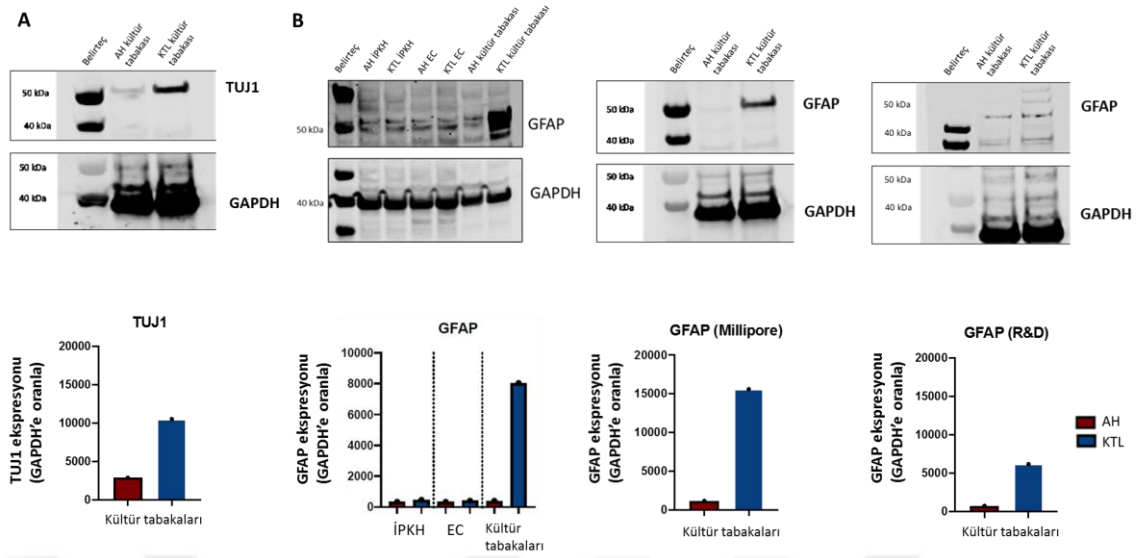
Şekil 4-3: Protokol 1 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, embriyoid cisim, kültür tabakaları ve mikroglia) alınan örneklerdeki (A) MyD88 ve (B) GSK3 β proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri (d47, d70, d74 mikroglia farklılaşmasının günlerini belirtmektedir); n=1

Mikroglia ilişkili belirteçler olan IBA1 ve TREM2'nin İPKH, embriyoid cisim ve kültür tabakalarında eksprese edilmediği gözlemlendi. Fakat İPKH'dan farklılaştırılan mikroglia hücrelerinde bu belirteçlerin eksprese edildiği tespit edildi (Şekil 4-4A ve Şekil 4-4B).



Şekil 4-4: Protokol 1 kullanılarak yapılan farklılaştırmamanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (iPKH, embriyoid cisim, kültür tabakaları ve mikrogliya) alınan örneklerdeki (A) IBA1 ve (B) TREM2 proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri (d47, d70, d72, d74 mikrogliya farklılaşmasının günlerini belirtmektedir); n=1

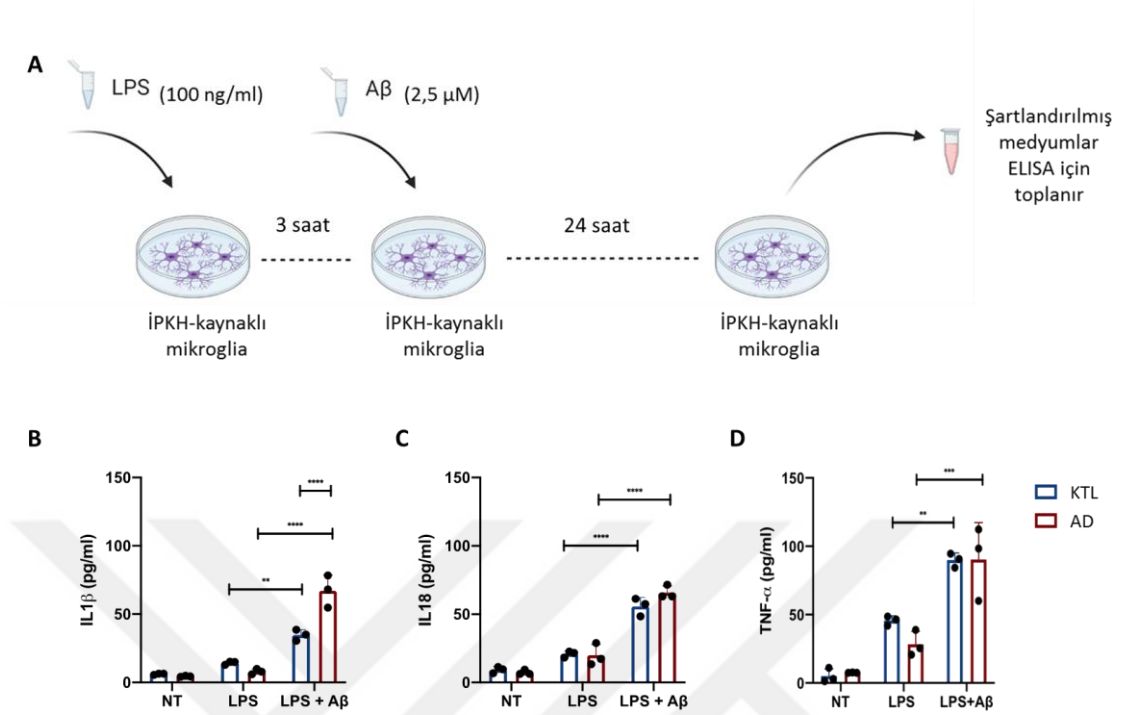
Kültür tabakalarında nöron (TUJ1) ve astrosit (GFAP) belirteçlerinin eksprese edildiği (Şekil 4-5A, 4-5B) fakat nöral progenitör (NESTIN) ve oligodendrosit (OLIG2) belirteçlerinin eksprese edilmediği tespit edildi. GFAP ekspresyonunda KTL ve AH genotipleri arasında belirgin bir fark olduğu gözlemlendi. Bu farkın teknik bir hatadan kaynaklanmadığından emin olmak için Western Blot yöntemi iki farklı firmadan alınan anti-GFAP antikoru kullanılarak tekrarlandı fakat yine aynı sonuçlar elde edildi (Şekil 4-5B).



Şekil 4-5: Protokol 1 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, embriyoid cisim, kültür tabakaları) alınan örneklerdeki (A) TUJ1 ve (B) GFAP proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri; n=1

4.1.3. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglialın İşlevsel Karakterizasyonu

Protokol 1 kullanılarak İPKH'den farklılaştırılan KTL ve AH genotiplerinin mikroglia hücrelerine, NLRP3 inflamazom yolağını aktifleştirmek için, 3 saat LPS ve 24 saat fibriler amiloid β uygulandı (Şekil 4-6A). Sonrasında hücrelerin şartlandırılmış medyumlarındaki IL-1 β ve IL-18 miktarları NLRP3 inflamazom aktivasyonunu belirlemek için ve TNF- α miktarı da inflamatuvar cevabın kapsamını değerlendirmek için ölçüldü. Her iki genotipte de LPS ile ön uyarım sonrası amiloid β ile uyarım, IL-1 β (Şekil 4-6B), IL-18 (Şekil 4-6C) ve TNF- α (Şekil 4-6D) salımını arttırdı.

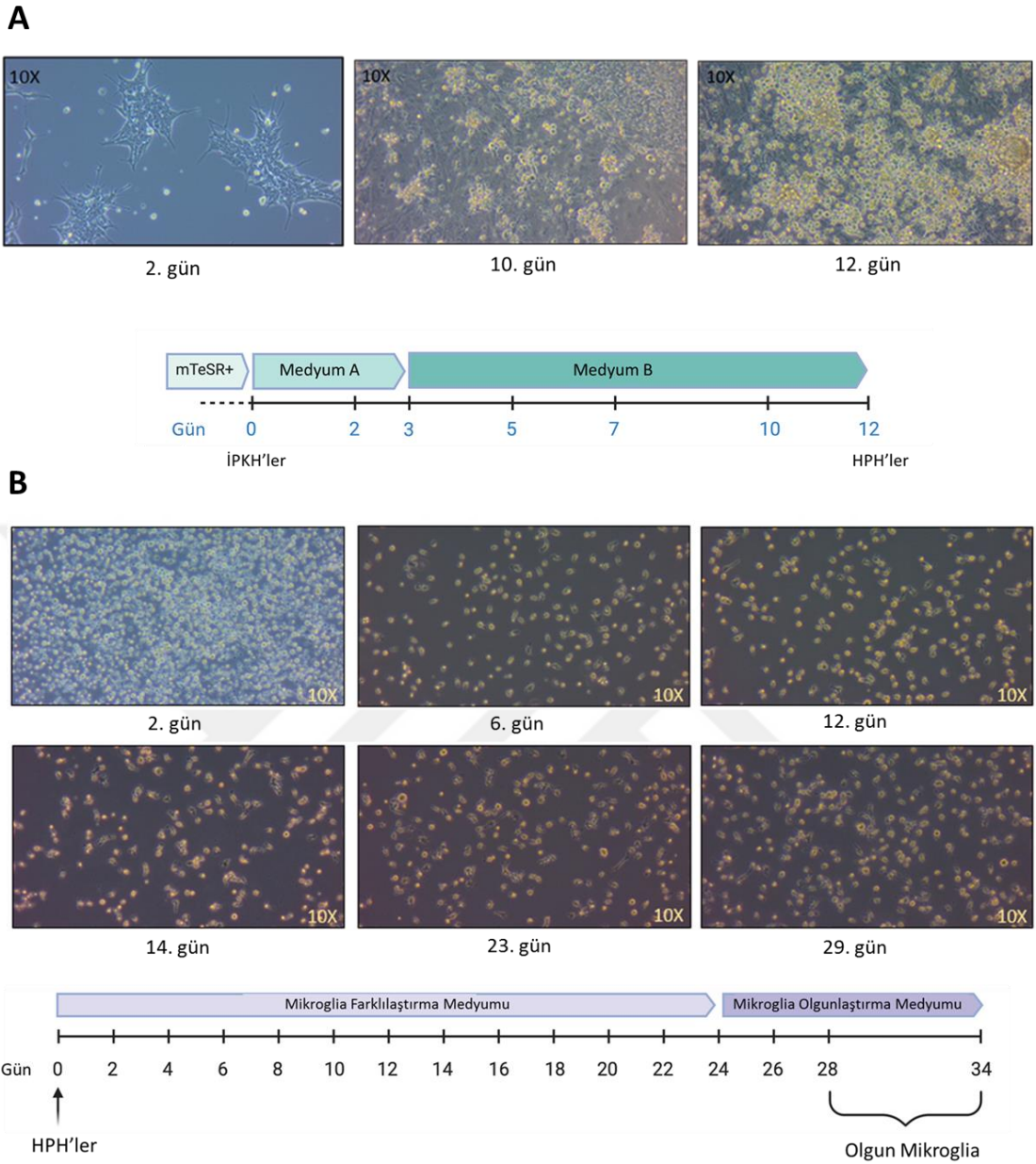


Şekil 4-6: (A) İPKH'den farklılaştırılan mikrogliada gerçekleştirilen 3 saat LPS ile ön uyarım ve 24 saat amiloid β ile uyarım deneylerinin şekilsel gösterimi. İPKH'den farklılaştırılan mikrogliaya LPS ve amiloid β uygulaması sonrasında şartlandırılmış medyuma salınan ve ELISA yöntemiyle ölçülen (B) IL-1β, (C) IL-18 ve (D) TNF-α miktarları; n=1; deneyler üçlü olarak yapılmıştır. İki yönlü ANOVA, Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi, **p<0,0001 ***p<0,001 **p<0,01**

4.2. Protokol 2'nin Bulguları

4.2.1. İPKH'lerin HPH'ye ve Mikrogliaya Farklılaştırılması

Protokol 2 kullanılarak 40 gün süren farklılaştırma sonrasında mikrogliya hücreleri elde edildi. İlk aşamada, 0. ve 3. günler arasında İPKH'ler mezodermal farklılaşmaya yönlendirildi ve 3. ve 12. günler arasında hematopoez indüklendi. 12 günlük farklılaştırma sonucunda İPKH'lerden yuvarlak şekilli hematopoetik progenitör hücreler (HPH'ler) elde edildi (Şekil 4-7A). İkinci aşamada toplanan HPH'ler mikrogliaya farklılaşmayı indükleyen önemli sitokinler olan IL-34, TGF-β ve M-CSF'yi içeren Mikrogliya Farklılaştırma Medyumu'na ekilerek 24 gün boyunca kültüre edildi. Hücreler ek olarak mikroglianın olgunlaşması için önemli sitokinler olan CX3CL1 ve CD200'ü de içeren Mikrogliya Olgunlaştırma Medyumu'nda 4 gün daha inkübe edildi ve böylece İPKH kaynaklı mikrogliya hücreleri elde edildi (Şekil 4-7B).



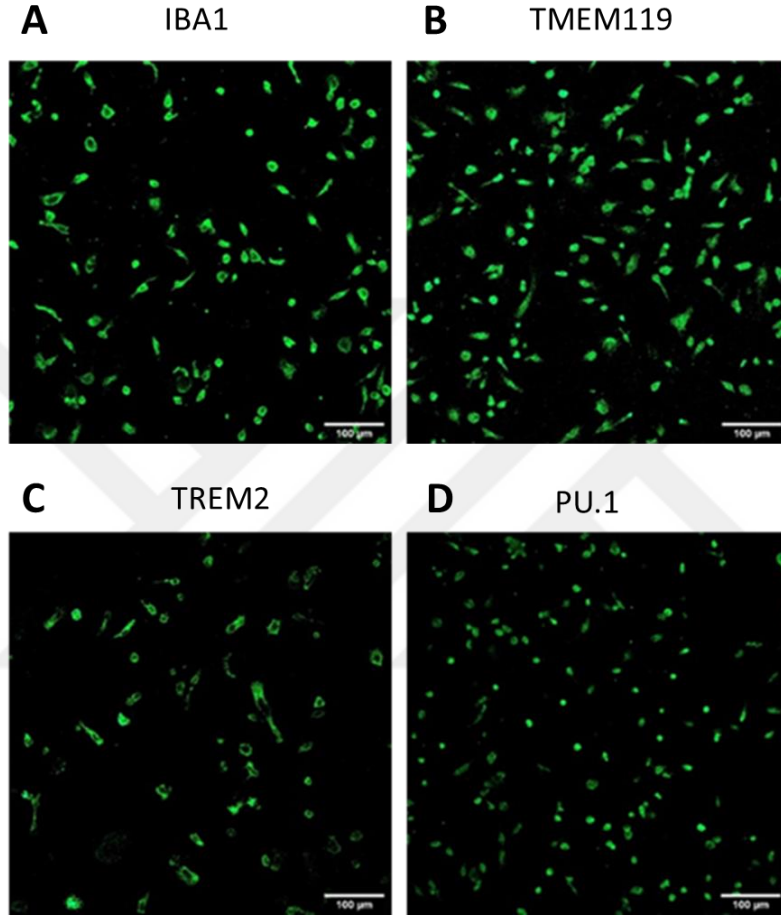
Şekil 4-7: Protokol 2 kullanılarak İPKH'lerin mikroglia hücrelerine iki aşamada farklılaştırılması

(A) İlk aşamada 12 günlük farklılaştırma sonucunda İPKH'lerden hematopoetik progenitör hücreler elde edildi. (B) İkinci aşamada hematopoetik progenitör hücreler 24 gün boyunca kültüre edilerek mikrogliaya farklılaştırıldı ve sonrasındaki 4 gün olgunlaştırılarak İPKH kaynaklı mikroglia hücreleri elde edildi.

4.2.2. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglia Hücrelerinin Morfolojik Karakterizasyonu

İPKH'den farklılaştırılan mikroglia hücrelerini morfolojik olarak karakterize etmek için mikroglia ilişkili belirteçler IBA1, TMEM119, TREM2 ve PU.1 kullanılarak

AH genotipli mikrogliaya immünohistokimyasal boyama yapıldı. İPKH'den farklılaştırılan mikrogliya hücrelerinde dört belirtecin tümüyle pozitif olarak boyandığı gözlemlendi (Şekil 4-8).



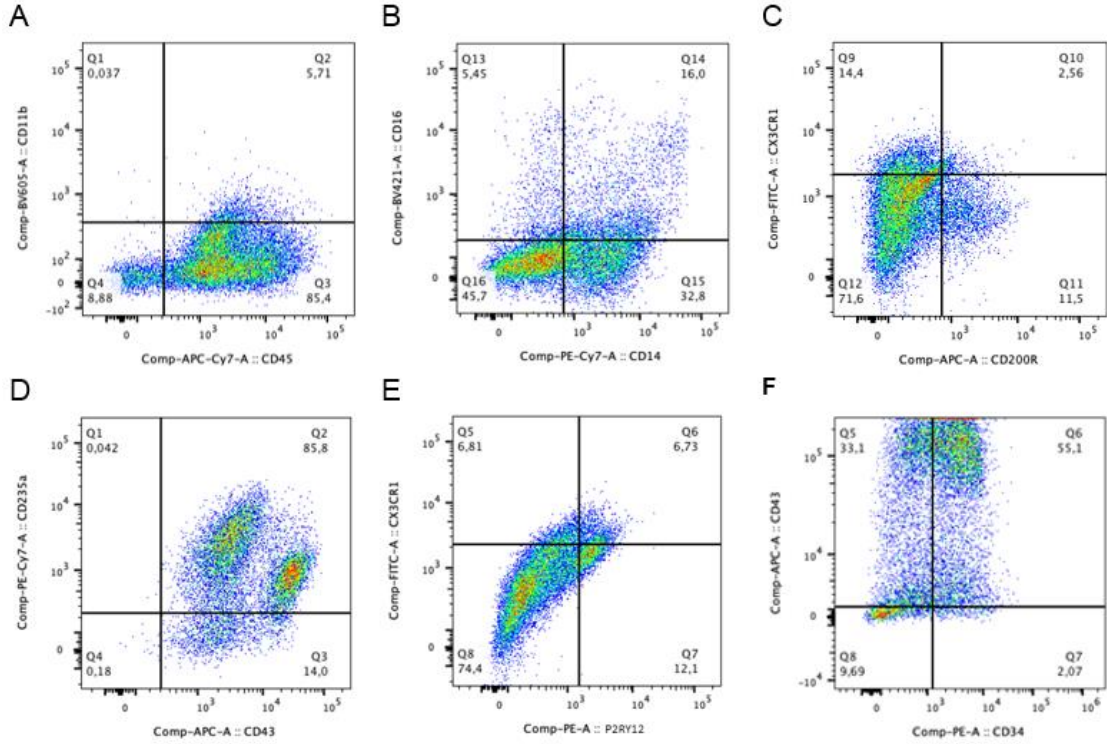
Şekil 4-8: AH genotipli İPKH'den farklılaştırılan mikrogliya hücrelerinin mikrogliya belirteçleriyle immünohistokimyasal boyanması.

Hücreler (A) IBA1, (B) TMEM119, (C) TREM2 ve (D) PU.1 (intranükleer belirteç) ile pozitif immünoreaktivite göstermiştir.

4.2.3. İPKH'den Farklılaştırılan Mikrogliya Hücrelerinin Fenotipik Karakterizasyonu

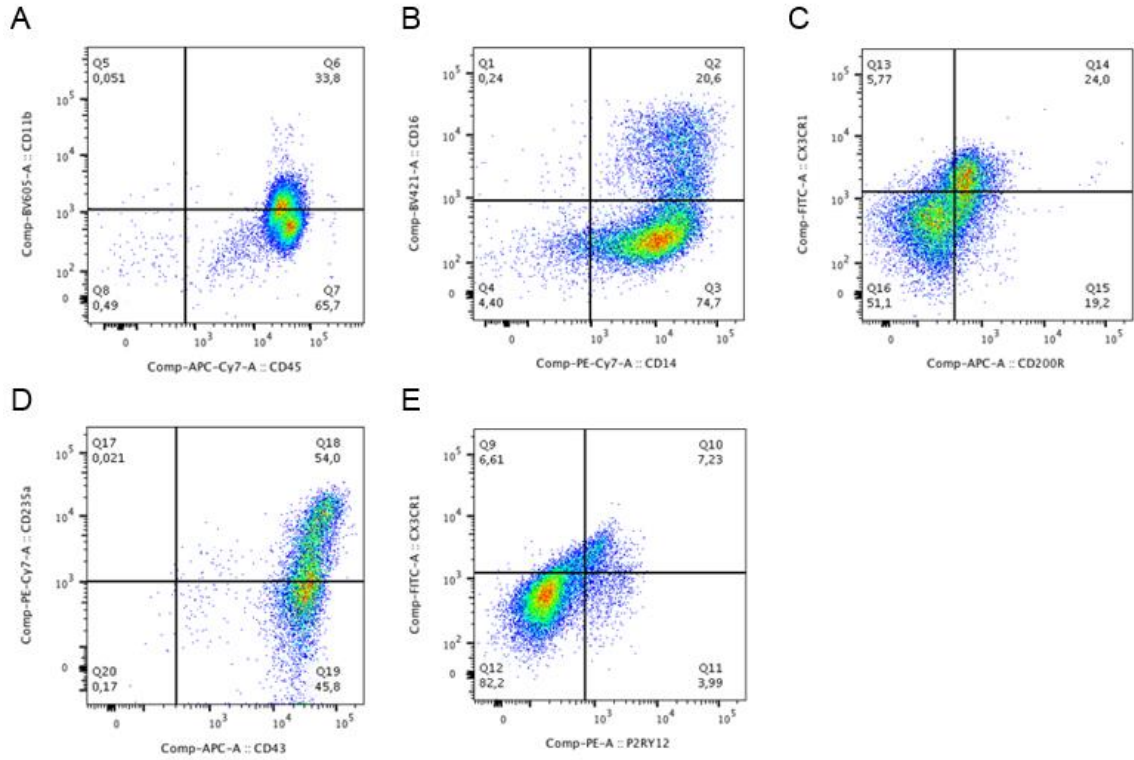
İPKH'den mikrogliaya farklılaştırma sürecinde, farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki (hematopoetik progenitor hücreler, farklılaştırmanın 15. günündeki mikrogliya ve olgun mikrogliya) AH ve İZO genotiplerine ait hücrelerin Flow Sitometri ile fenotipik analizi yapılarak myeloid, hematopoetik ve mikrogliya ilişkili yüzey

belirteçlerinin ekspresyonu değerlendirildi. Hematopoetik progenitör hücrelerin CD43, CD235a ve CD34 hematopoetik belirteçlerini eksprese ettiği ve ayrıca myeloid belirteç olan CD45'i de eksprese ettiği gözlemlendi (Şekil 4-9, Şekil 4-12).



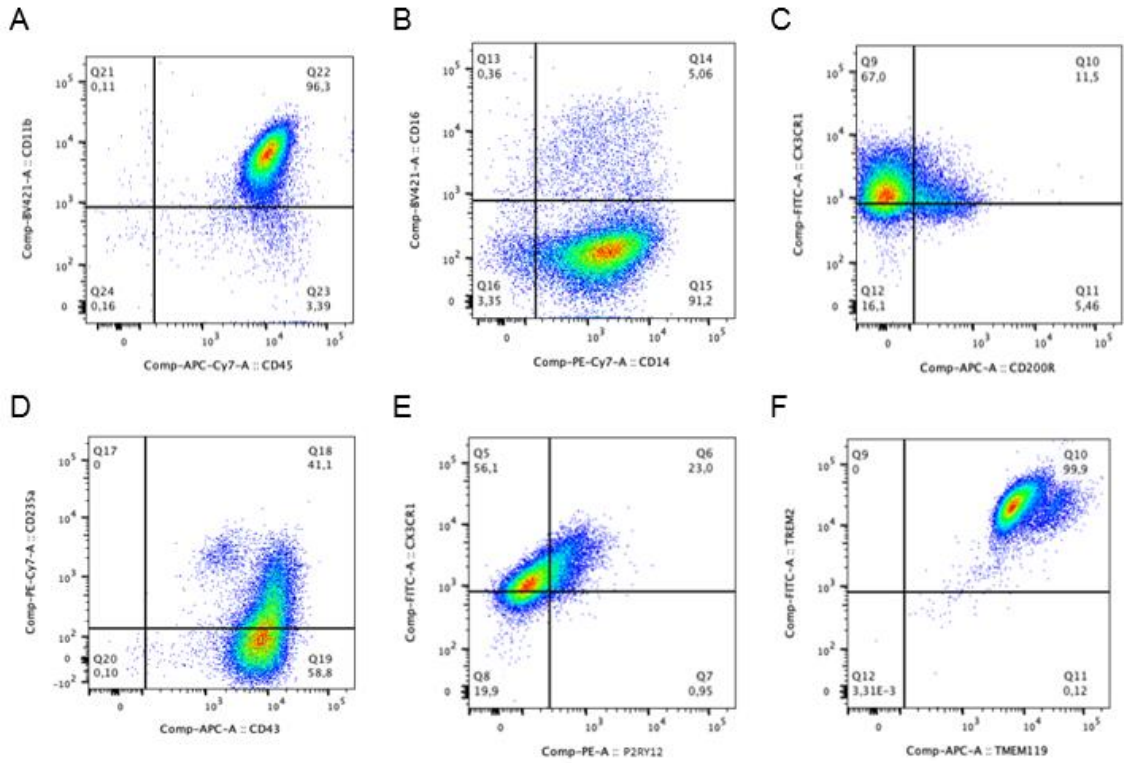
Şekil 4-9: Hematopoetik progenitör hücrelerin A) CD45 ve CD11b, B) CD14 ve CD16, (C) CD200R ve CX3CR1, (D) CD43 ve CD235a, (E) P2RY12 ve CX3CR1 ve (F) CD34 ve CD43 belirteçleri için Flow Sitometri grafikleri.

Farklılaştırmanın 15. günündeki mikrogliya hücrelerinin, CD11b ve CD14 belirteçlerini eksprese etmeye başladığı, hematopoetik belirteçlerin ekspresyonunun ise azalmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4-10, Şekil 4-12).



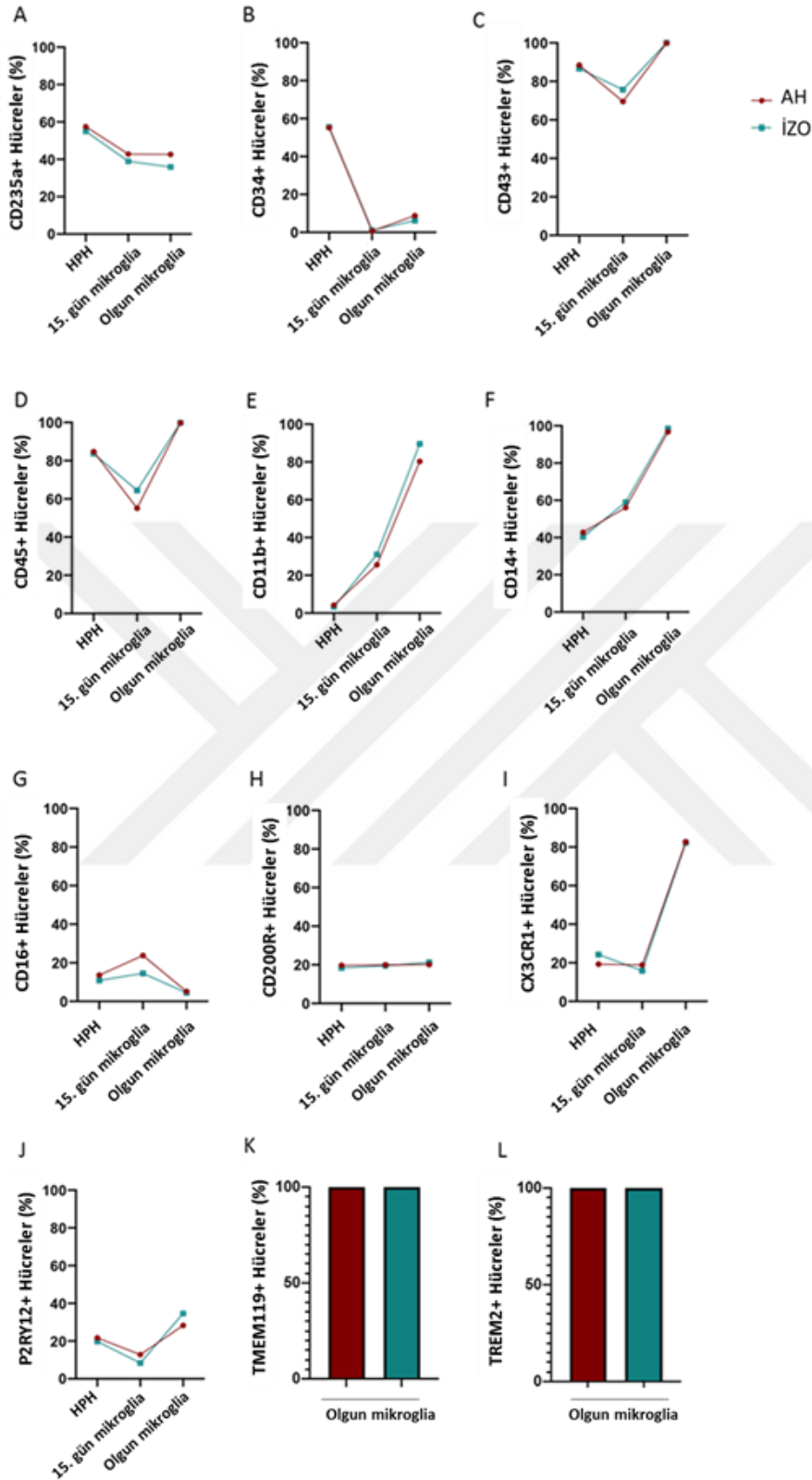
Şekil 4-10: Farklılaştırmanın 15. günündeki mikroglia hücrelerinin A) CD45 ve CD11b, B) CD14 ve CD16, (C) CD200R ve CX3CR1, (D) CD43 ve CD235a ve (E) P2RY12 ve CX3CR1 belirteçleri için Flow Sitometri grafikleri.

Olgun mikroglia hücrelerinin hematopoetik belirteçlerden CD43'ü hala eksprese ettiği fakat diğer hematopoetik belirteçlerin (CD235a, CD34) ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi. CD45, CD11b ve CD14 myeloid belirteçlerinin ekspresyonunun olgun mikroglia hücrelerinde oldukça arttığı gözlemlendi. Ayrıca HPH'lerle karşılaştırıldığında kemokin reseptörü CX3CR1 ve purinerjik reseptör P2RY12 ekspresyonunun arttığı görüldü. Ayrıca, olgun mikroglia hücrelerinin neredeyse tamamı, önemli mikroglia ilişkili belirteçler olan TREM2 ve TMEM119'u eksprese etmekteydiler (Şekil 4-11, Şekil 4-12).



Şekil 4-11: Olgun mikroglia hücrelerinin A) CD45 ve CD11b, B) CD14 ve CD16, (C) CD200R ve CX3CR1, (D) CD43 ve CD235a, (E) P2RY12 ve CX3CR1 ve (F) TMEM119 ve TREM2 belirteçleri için Flow Sitometri grafikleri.

İPKH'den mikrogliaya farklılaştırma sürecinde, farklılaşmanın çeşitli aşamalarındaki (hematopoetik progenitor hücreler, farklılaştırmanın 15. günündeki mikroglia ve olgun mikroglia) AH ve İZO genotiplerine ait örneklerdeki (A) CD235a, (B) CD34, (C) CD43, (D) CD45, (E) CD11b, (F) CD14, (G) CD16, (H) CD200R, (I) CX3CR1, (J) P2RY12, (K) TMEM119 ve (L) TREM2 belirteçlerini ekspres eden hücrelerin yüzdesindeki değişimler Şekil 4-12'de gösterilmektedir.



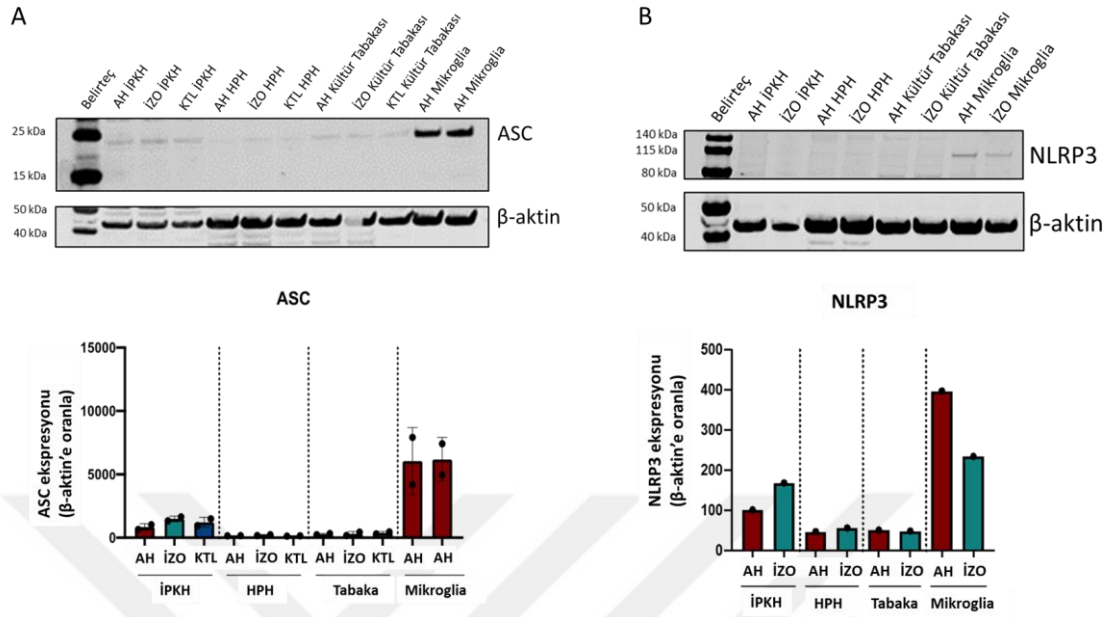
Şekil 4-12: Hematopoetik progenitör hücreler, farklılaştırmanın 15. günündeki mikroglia ve olgun mikrogliaların AH ve İZO genotiplerine ait hücrelerin flow sitometri ile analiz edilen (A) CD235a, (B) CD34, (C) CD43, (D) CD45, (E) CD11b, (F) CD14, (G)

CD16, (H) CD200R, (I) CX3CR1, (J) P2RY12, (K) TMEM119 ve (L) TREM2 eksprese eden hücre yüzdesindeki değişimler; HPH'ler ve farklılaştırmanın 15. günündeki mikrogliya için n=3 ve olgun mikrogliya için n=1 (istisnalar: CD34: farklılaştırmanın 15. günündeki mikrogliya için n=2, HPH'ler ve olgun mikrogliya için n=1; CD14: farklılaştırmanın 15. günündeki mikrogliya için n=2).

4.2.4. İPKH'den Farklılaştırılan Hücrelerin ve Kültür Tabakalarının Protein Ekspresyonunun Karakterizasyonu

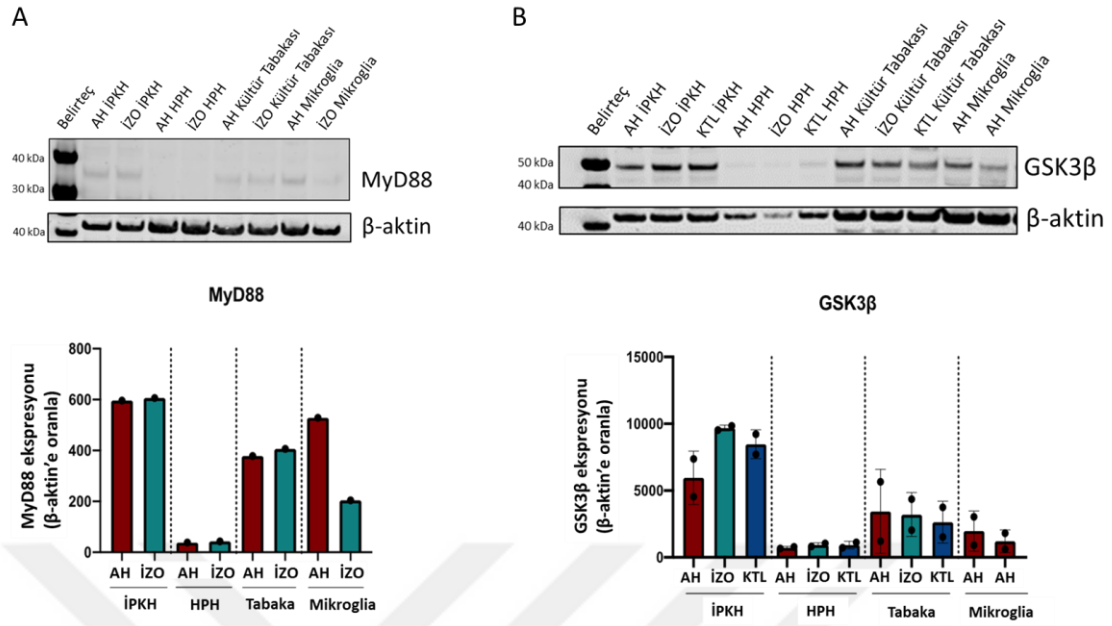
Protokol 2 kullanılarak tüm farklılaştırma süreci boyunca elde edilen hücrelerin karakterizasyonu için farklılaşmanın İPKH, HPH ve mikrogliya hücreleri aşamalarından örnekler toplandı. Ayrıca farklılaşma sürecinde HPH'lerin üzerinden koparak oluştuğu, kültür kabına tutunmuş halde gelişen hücre kültürü tabakası da toplanarak bu örneklerin çeşitli protein ekspresyonlarının incelenmesi için Western Blot yöntemiyle analizi yapıldı.

ASC protein ekspresyonu AH genotipinin olgun mikrogliya aşamasında tespit edildi (örnek sayısının kısıtlılığı nedeniyle İZO ve KTL genotiplerinin olgun mikrogliya aşamasındaki hücreleri bu protein için incelenememiştir) ancak her üç genotip için de İPKH, HPH ve kültür tabakası örneklerinde ASC ekspresyonu çok azdı veya yoktu (Şekil 4-13A). Benzer şekilde NLRP3, AH ve İZO genotiplerinin olgun mikrogliya hücrelerinde eksprese edilmekteydi ancak İPKH, HPH ve kültür tabakası örneklerinde ekspresyonu çok azdı veya yoktu (Şekil 4-13B).



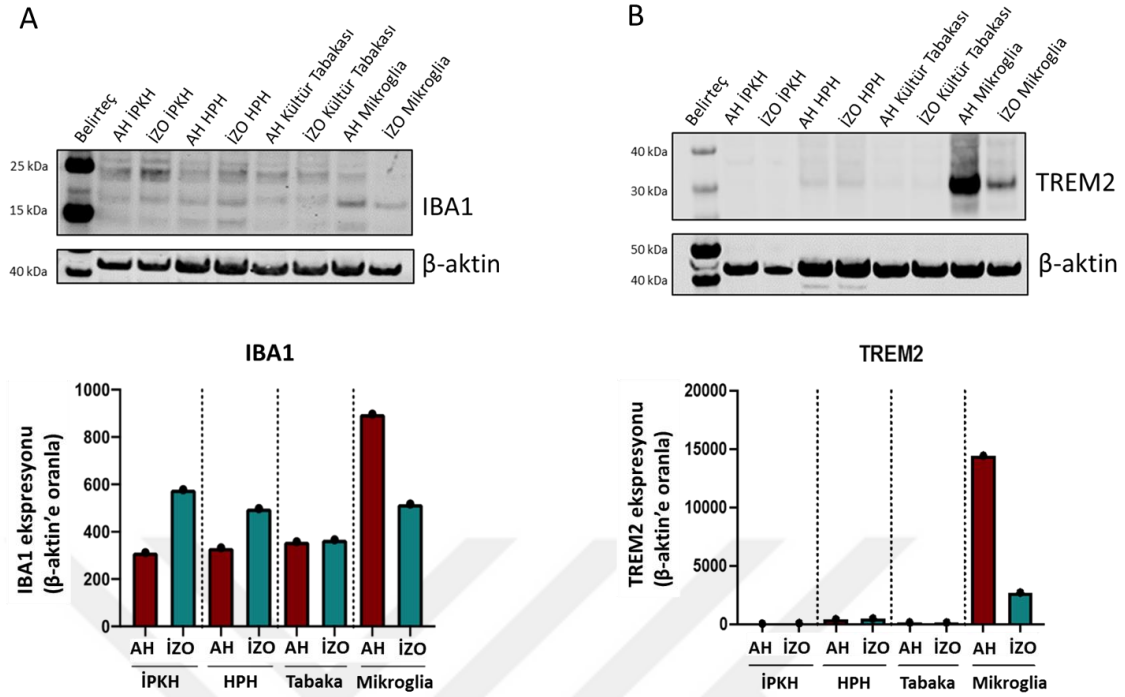
Şekil 4-13: Protokol 2 kullanılarak yapılan farklılaştırmının çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, HPH, kültür tabakaları ve mikroglia) alınan örneklerdeki (A) ASC ve (B) NLRP3 proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri; ASC için n=2, NLRP3 için n=1.

MyD88 proteini AH ve İZO genotiplerinin İPKH, kültür tabakası ve mikroglia aşamalarında az miktarda eksprese edilirken HPH'lerde ise eksprese edilmemekteydi (Şekil 4-14A). GSK3 β proteini her üç genotipin İPKH ve kültür tabakası aşamalarında ve AH genotipinin mikroglia aşamasında (örnek sayısının kısıtlılığı nedeniyle İZO ve KTL genotiplerinin olgun mikroglia aşamasındaki hücreleri bu protein için incelenememiştir) eksprese edilmekteydi ancak HPH'lerde eksprese edilmemekteydi (Şekil 4-14B).



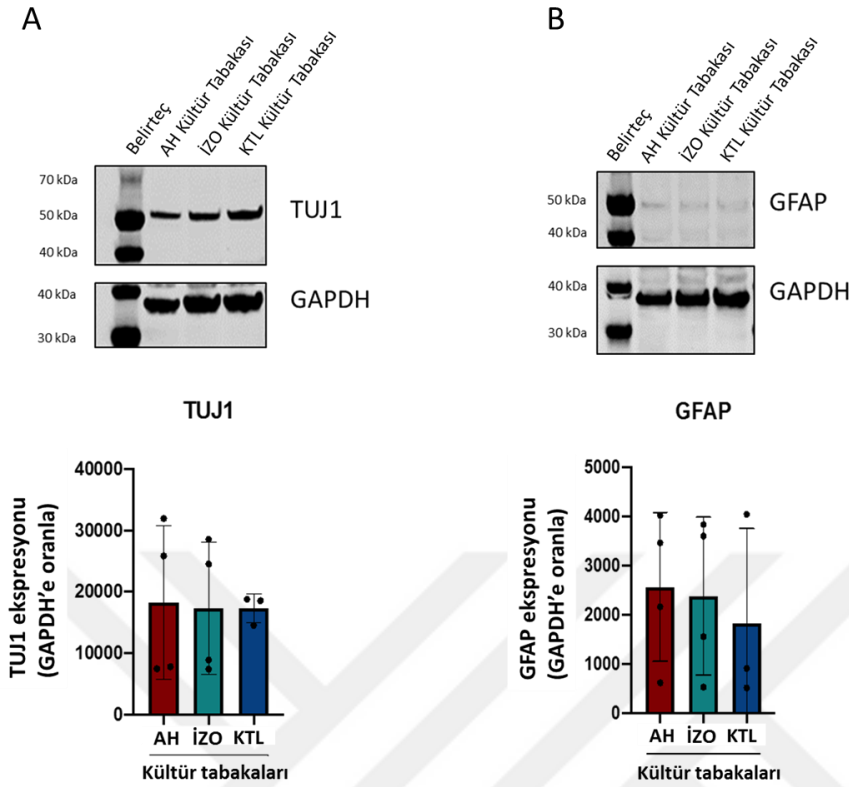
Şekil 4-14: Protokol 2 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, HPH, kültür tabakaları ve mikroglia) alınan örneklerdeki (A) MYD88 ve (B) GSK3 β proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri; MYD88 için n=1, GSK3 β için n=2.

Mikroglia ilişkili belirteç IBA1, AH ve İZO genotiplerinde farklılaşmanın tüm aşamalarında az miktarda eksprese edilirken, AH genotipinin mikroglia aşamasında ise ekspresyonu daha fazlaydı (Şekil 4-15A). Bir diğer mikroglia ilişkili belirteç TREM2'nin ise her iki genotipte de yalnızca mikroglia aşamasında eksprese edildiği gözlemlendi (Şekil 4-15B). IBA1 ve TREM2 proteinlerinin her ikisi de mikroglia da AH genotipinde İZO genotipiyle karşılaştırıldığında daha fazla eksprese edilmekteydi (Şekil 4-15A ve 4-15B).



Şekil 4-15: Protokol 2 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki hücrelerden (İPKH, HPH, kültür tabakaları ve mikrogliya) alınan örneklerdeki (A) IBA1 ve (B) TREM2 proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri; n=1.

Her üç genotipin kültür tabakalarında nöronal belirteç TUJ-1'in oldukça belirgin olarak eksprese edildiği gözlemlendi (Şekil 4-16A). Bütün genotiplerin kültür tabakalarında astrosit belirteci GFAP'ın yok denebilecek kadar az eksprese edildiği gözlemlendi (Şekil 4-16B). Her iki belirteç için de genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,1$). Ayrıca kültür tabakalarında nöral progenitör hücre belirteci NESTIN ve oligodendrosit belirteci OLIG-2'nin ekspresyonu tespit edilemedi.



Şekil 4-16: Protokol 2 kullanılarak yapılan farklılaştırmanın kültür tabakalarından alınan örneklerdeki (A) GFAP ve (B) TUJ1 proteinlerinin ekspresyonunu gösteren Western Blot sonuçları ve grafikleri; n=4.

4.2.5. İPKH'den Farklılaştırılan Hücrelerin ve Kültür Tabakalarının Gen Ekspresyonunun Karakterizasyonu

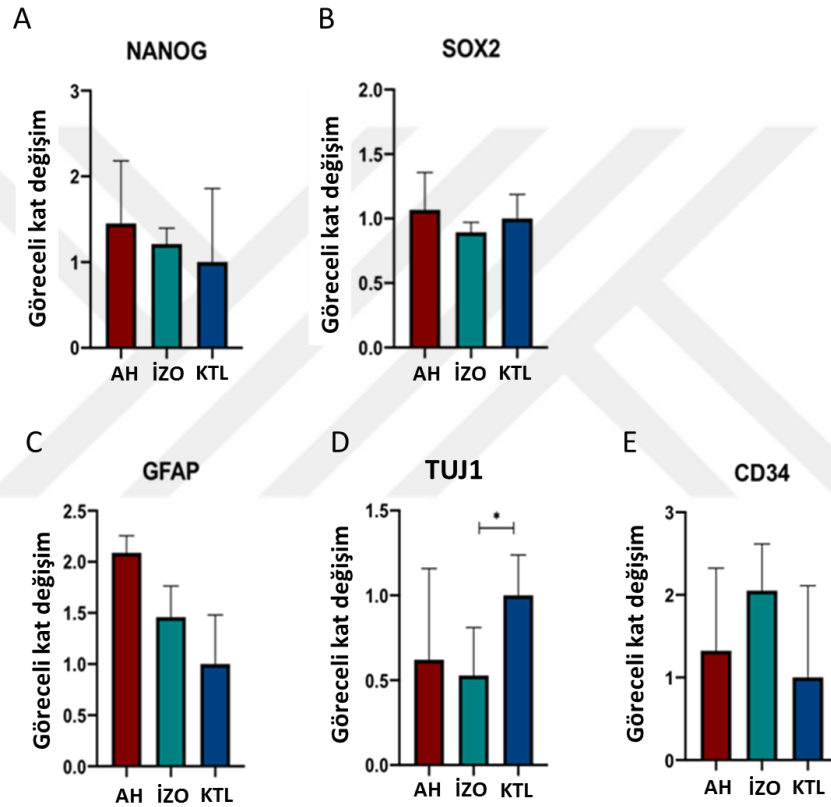
Protokol 2 kullanılarak tüm farklılaştırma süreci boyunca elde edilen hücrelerin karakterizasyonu için farklılaşmanın İPKH, HPH ve mikroglia hücreleri aşamalarından örnekler toplandı. Ayrıca farklılaşma sürecinde HPH'lerin üzerinden koparak oluştuğu, kültür kabına tutunmuş halde gelişen hücre kültürü tabakası da toplanarak bu örneklerdeki çeşitli gen ekspresyonlarının incelenmesi için RT-qPCR analizi yapıldı. Referans gen olarak *GAPDH* kullanıldı ve $\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle sonuçlar değerlendirilerek göreceli kat değişimleri KTL genotipinden alınan örneklerle kıyaslanarak belirlendi.

Tüm genotiplerin İPKH'lerinde pluripotentlik belirteçleri *NANOG* ve *SOX2* ekspresyonu tespit edildi ve genotipler arasında bir fark görülmedi (Şekil 4-17A, B).

Tüm genotiplerin kültür tabakalarında astrosit belirteci *GFAP*'ın yok denecek kadar az eksprese edildiği (yüksek Ct değeri) gözlemlendi (Şekil 4-17C). Ayrıca

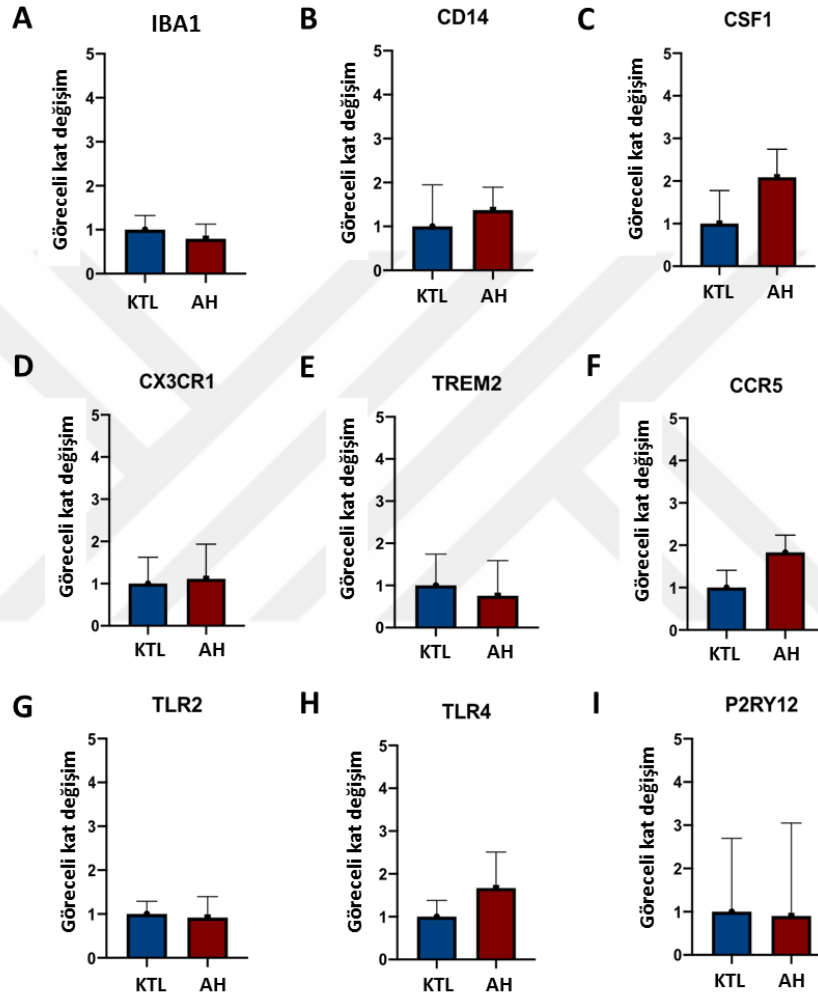
oligodendrosit belirteci *OLIG-2*'nin de ekspresyonu tespit edilemedi. Ancak bütün genotiplerin kültür tabakalarında nöronal belirteç *TUJ1*'in eksprese edildiği gözlemlendi (Şekil 4-17D). *TUJ1* ekspresyonunun İZO genotipinde KTL'ye göre daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4-17D).

Tüm genotiplerin HPH'lerinin hematopoetik belirteç *CD34*'ü eksprese ettiği görüldü ve genotipler arasında bir farklılığa rastlanmadı (Şekil 4-17E).



Şekil 4-17: İPKH'lerde pluripotenslik belirteçleri (A) *NANOG* ve (B) *SOX2*'nin, kültür tabakalarında astrosit belirteci (C) *GFAP*'ın ve nöronal belirteç (D) *TUJ1*'in, HPH'lerde hematopoetik belirteç (E) *CD34*'ün RT-qPCR ile tespit edilen göreceli mRNA ekspresyonları. *GAPDH* endojen kontrol geni olarak kullanılmıştır ve veriler göreceli kat değişimleri olarak KTL örneklerine kıyasla gösterilmiştir. n=3; deneyler üçlü olarak yapılmıştır. Tek Yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi, *p<0,1.

AH ve KTL genotiplerinin olgun mikroglia hücrelerinde mikroglia ilişkili belirteçler *IBA1*, *CD14*, *CSF1*, *CX3CR1*, *TREM2*, *CCR5*, *TLR2*, *TLR4*, *P2RY12*'nin tümünü eksprese ettiği görüldü ve genotipler arasında bir farklılığa rastlanmadı ($p>0,1$) (Şekil 4-18).



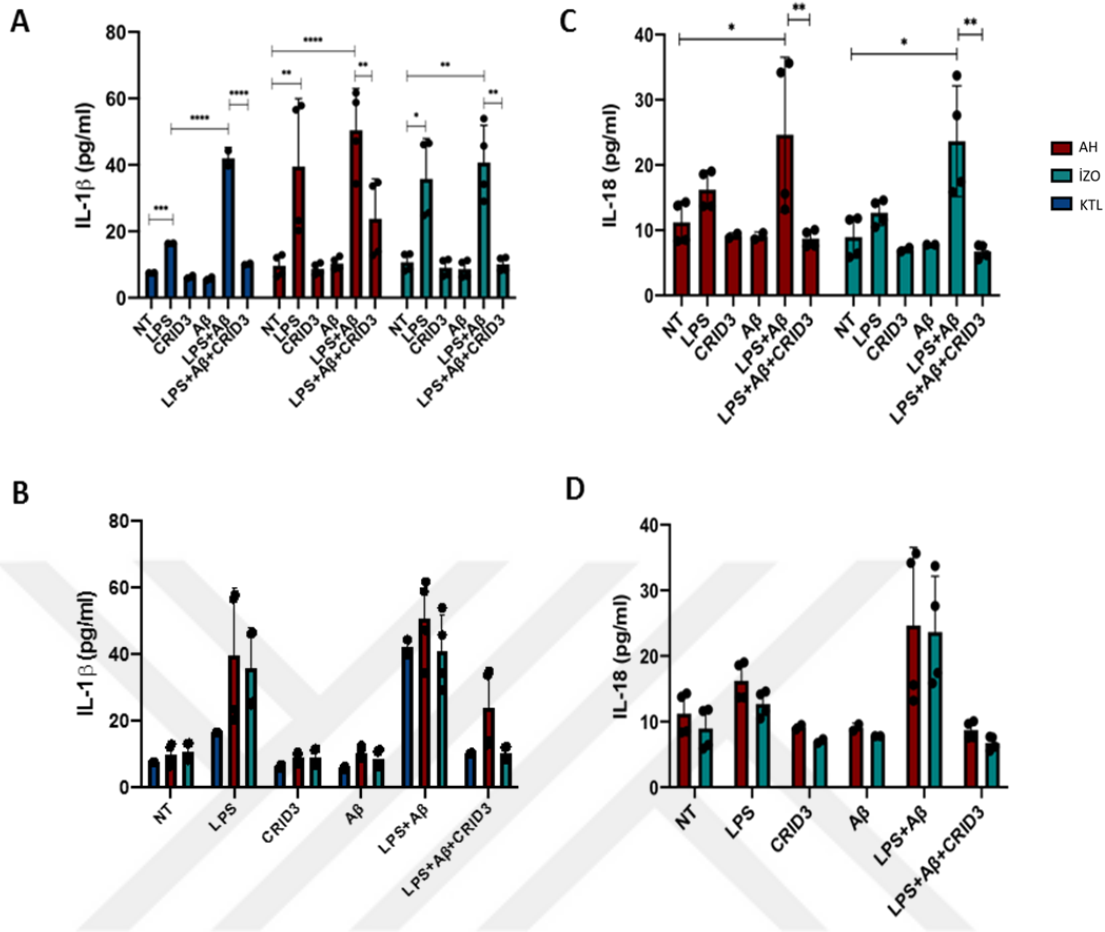
Şekil 4-18: AH ve KTL genotiplerinin olgun mikroglia hücrelerinde mikroglia ilişkili belirteçler (A) *IBA1*, (B) *CD14*, (C) *CSF1*, (D) *CX3CR1*, (E) *TREM2*, (F) *CCR5*, (G) *TLR2*, (H) *TLR4*, (I) *P2RY12*'nin RT-qPCR ile tespit edilen göreceli mRNA ekspresyonları. *GAPDH* endojen kontrol geni olarak kullanılmıştır ve veriler göreceli kat değişimleri olarak KTL örneklerine kıyasla gösterilmiştir. $n=3$; Eşlenmemiş Student t - testi.

4.2.6. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglialının İşlevsel Karakterizasyonu: Sitokin Salımı

NLRP3 inflamazom yolağının aktivasyonunu karakterize etmek amacıyla AH, İZO ve KTL genotiplerinin İPKH'lerinden Protokol 2'ye göre farklılaştırılan mikroglia hücreleri, 3 saat LPS ile ön uyarım sonrasında fibriler amiloid β ile 24 saat boyunca CRID3 varlığında veya yokluğunda uyarıldı. Şartlandırılmış medyumlar toplanarak çeşitli inflamatuvar sitokinler için ELISA analizi yapıldı. (IL-1 β salımı her üç genotipte de analiz edilirken örnek yetersizliği nedeniyle diğer sitokinlerin analizinde AH ve İZO genotipleri kullanıldı).

LPS uygulamasının tüm genotiplerde IL-1 β salımını arttırdığı görüldü (Şekil 4-19A). LPS ve amiloid β uygulandığında ise bu cevabın arttığı görüldü. LPS ve amiloid β ile NLRP3 inflamazom inhibitörü CRID3 uygulandığında ise IL-1 β salımının tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi. Tek başına amiloid β veya CRID3 uygulamasının ise IL-1 β salımına etkisinin olmadığı görüldü. Ayrıca farklı genotiplerin her bir madde için verdikleri yanıtlar arasında anlamlı bir farka rastlanmadı (Şekil 4-19B).

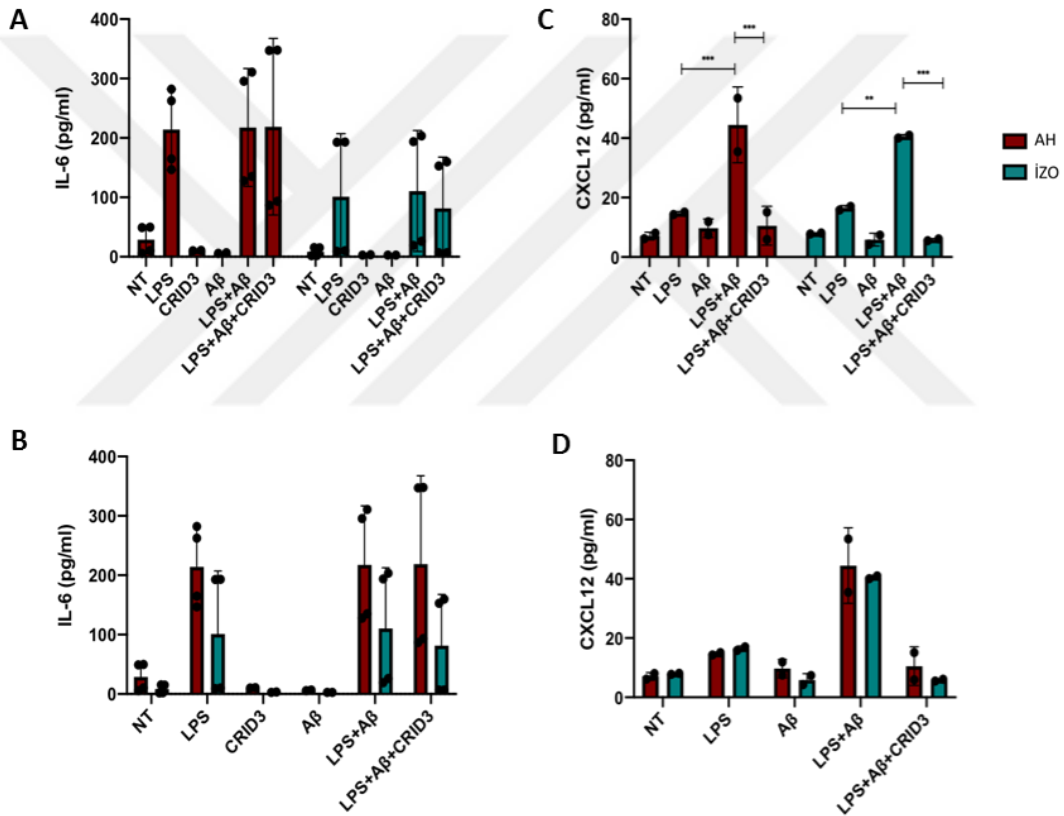
LPS uygulaması AH ve İZO genotiplerinde IL-18 salımını bir miktar arttırsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4-19C). LPS ve amiloid β uygulandığında ise IL-18 salımının istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı görüldü. LPS ve amiloid β ile CRID3 uygulandığında ise IL-18 salımının her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi. Tek başına amiloid β veya CRID3 uygulamasının ise IL-18 salımına etkisinin olmadığı görüldü. Ayrıca iki genotipin her bir madde için verdikleri yanıtlar arasında anlamlı bir farka rastlanmadı (Şekil 4-19D).



Şekil 4-19: İPKH'den farklılaştırılan mikroglianin CRID3 varlığında ve yokluğunda LPS ile ön uyarımı ve amiloid β ile uyarılması sonrasında IL-1β (A, B) ve IL-18 (C, D) salımı. Sonuçlar hem her bir genotip için deneysel gruplar yan yana olacak şekilde (A, C) hem de farklı genotiplerin deneysel grupları yan yana olacak şekilde (B, D) gösterilmiştir. IL-1β salımında AH ve İZO için n=2, KTL için n=1; IL-18 salımında n=2; deneyler ikili olarak yapılmıştır. İki Yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi, **p<0,0001 ***p<0,001 **p<0,01 *p<0,1**

LPS uygulaması ve LPS ve amiloid β uygulaması AH ve İZO genotiplerinde IL-6 salımını bir miktar arttırsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4-20A). LPS ve amiloid β ile CRID3 uygulandığında ise IL-6 salımının her iki grupta da değişmediği gözlemlendi. Tek başına amiloid β veya CRID3 uygulamasının da IL-6 salımına etkisinin olmadığı görüldü. İki genotipin her bir madde için verdikleri yanıtlar karşılaştırıldığında AH genotipinin yanıtları İZO'ya göre bir miktar daha yüksek olsa da aralarında anlamlı bir farka rastlanmadı (Şekil 4-20B).

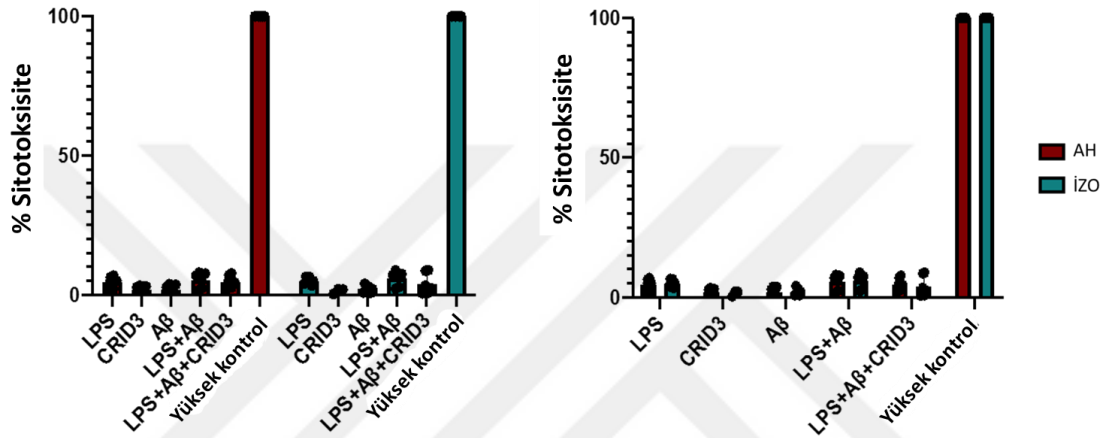
LPS uygulaması AH ve İZO genotiplerinde CXCL12 salımını bir miktar arttırsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4-20C). LPS ve amiloid β uygulandığında ise CXCL12 salımının istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı görüldü. LPS ve amiloid β ile CRID3 uygulandığında ise CXCL12 salımının her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi. Tek başına amiloid β uygulamasının ise CXCL12 salımına etkisinin olmadığı görüldü. Ayrıca iki genotipin her bir madde için verdikleri yanıtlar arasında anlamlı bir farka rastlanmadı (Şekil 4-20D).



Şekil 4-20: İPKH'den farklılaştırılan mikroglianın CRID3 varlığında ve yokluğunda LPS ile ön uyarımı ve amiloid β ile uyarılması sonrasında IL-6 (A, B) ve CXCL12 (C, D) salımı. Sonuçlar hem her bir genotip için deneysel gruplar yan yana olacak şekilde (A, C) hem de farklı genotiplerin deneysel grupları yan yana olacak şekilde (B, D) gösterilmiştir. IL-6 salımında n=2; CXCL12 salımında n=1; deneyler ikili olarak yapılmıştır. İki Yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi, *p<0,001 **p<0,01**

4.2.7. Sitotoksosite Analizi

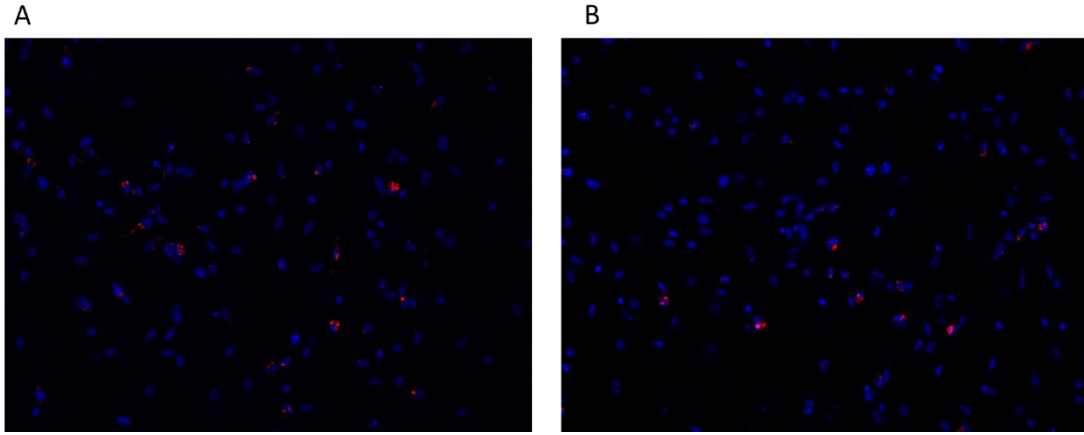
Uyarım deneylerinde kullanılan LPS, CRID3, amiloid β ve kombinasyonlarının sitotoksositeye yol açıp açmadığını belirlemek için LDH analizi yapılarak bu maddeler uygulandıktan sonra şartlandırılmış medyumlardaki LDH miktarı ölçüldü. Uygulanan tüm maddelerin sitotoksik etkisinin oldukça düşük olduğu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü (Şekil 4-21).



Şekil 4-21: İPKH'den farklılaştırılan mikroglianın CRID3 varlığında ve yokluğunda LPS ile ön uyarımı ve amiloid β ile uyarılması sonrasında LDH salımı. Sonuçlar hem her bir genotip için deneysel gruplar yan yana olacak şekilde (A) hem de farklı genotiplerin deneysel grupları yan yana olacak şekilde (B) gösterilmiştir. $n=3$; deneyler ikili olarak yapılmıştır. İki Yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma post-hoc testi.

4.2.8. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglianın İşlevsel Karakterizasyonu: Floresan Mikroskobu ile pHrodo Biyopartiküllerinin Fagositozunun Görüntülenmesi

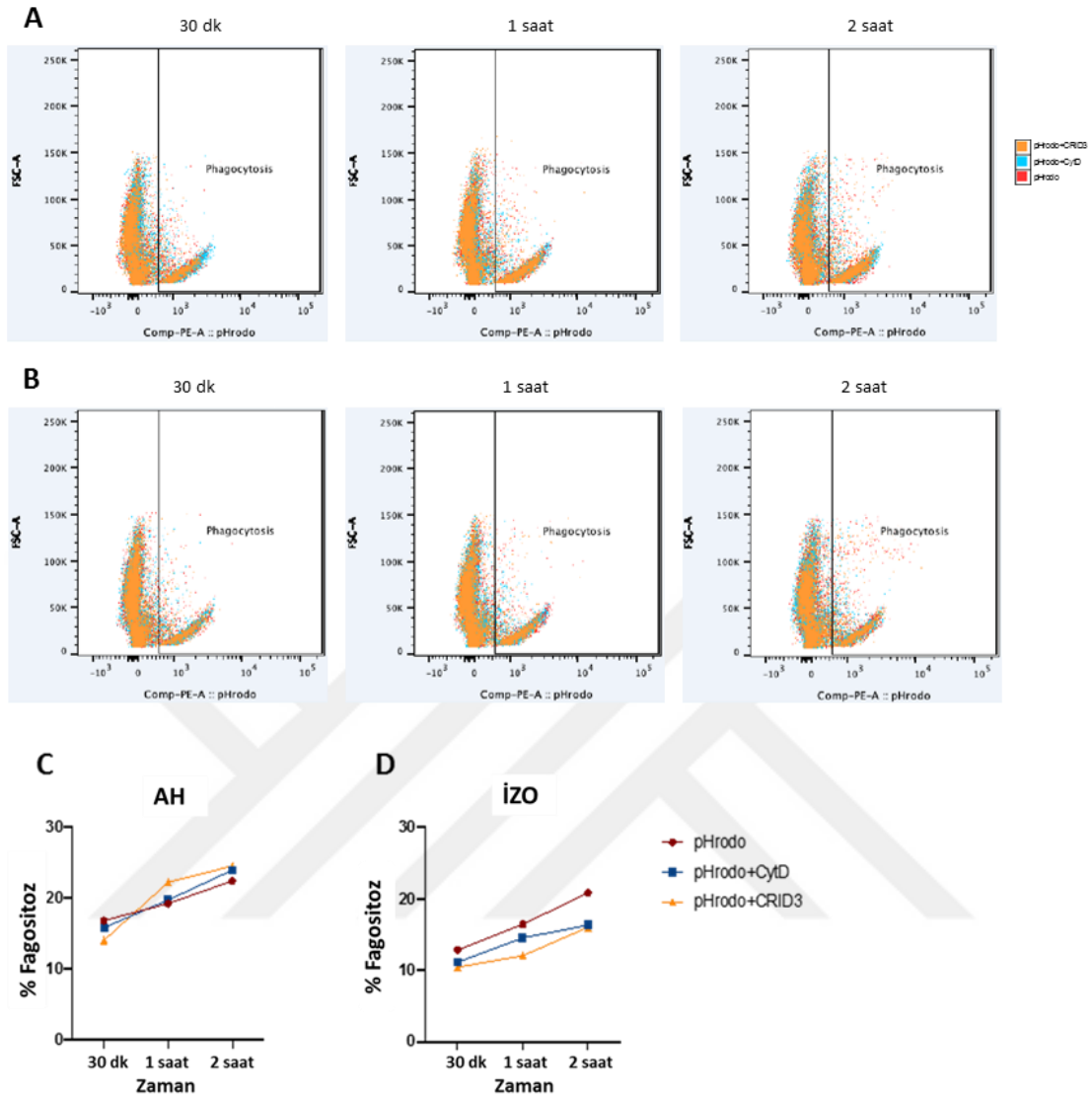
AH ve İZO genotiplerine ait olgun mikrogliya hücrelerine fagositoz edildiğinde pH'ın düşmesiyle ışıma yapan pHrodo biyopartikülleri eklenerek 2 saat inkübe edildi. Sonrasında hücreler tespit edildi ve çekirdekleri boyamak için DAPI kullanıldı. AH (Şekil 4-22A) ve İZO (Şekil 4-22B) genotiplerine ait mikrogliya hücrelerinin pHrodo biyopartiküllerini fagosit ettikleri floresan mikroskobuyla görüntüledi.



Şekil 4-22: AH (A) ve İZO (B) genotiplerine ait olgun mikroglia hücrelerinin floresan mikroskopla görüntülenmiş çekirdekleri (mavi) ve fagosite ettikleri pHrodo biyopartikülleri (kırmızı). 20X.

4.2.9. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglialının İşlevsel Karakterizasyonu: Flow Sitometri ile pHrodo Biyopartiküllerinin Fagositozunun Tespit Edilmesi

AH ve İZO genotiplerine ait olgun mikroglia hücrelerine fagositoz edildiğinde pH'ın düşmesiyle ışıma yapan pHrodo biyopartikülleri eklenerek 30dk, 1 saat ve 2 saat boyunca inkübe edildi. Ek olarak, bu sürelerden 30 dk öncesinde aktin polimerizasyon inhibitörü sitokalsin D ve NLRP3 inflamazom inhibitörü CRID3 eklenerek de gruplar oluşturuldu. pHrodo biyopartiküllerinin fagositozunun AH (Şekil 4-23A, C) ve İZO (Şekil 4-23B, D) genotiplerine ait mikroglia hücrelerinin her ikisinde de zamana bağlı olarak arttığı gözlemlendi. AH ve İZO genotiplerine ait mikroglialar karşılaştırıldığında ise AH genotipinin bir miktar daha fagositik olduğu gözlemlendi (Şekil 4-23C, D). Sitokalsin D ve CRID3 uygulamasının ise fagositoz seviyesini yalnızca İZO grubunda oldukça az bir miktar azalttığı, bunun dışında fazla bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 4-23C, D).

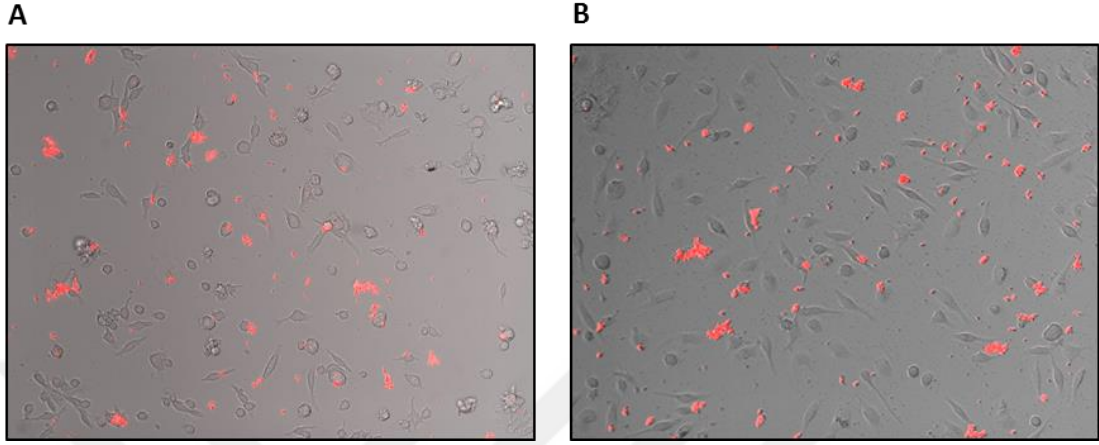


Şekil 4-23: Sitokalsin D ve CRID3 varlığında veya yokluğunda AH (A) ve İZO (B) genotiplerine ait mikroglia hücrelerinin 30 dk, 1 saat ve 2 saat inkübasyon sonucunda pHrodo fagositozunu gösteren Flow Sitometri grafikleri. Flow Sitometri analizinden elde edilen sonuçlarla oluşturulan AH (C) ve İZO (D) genotiplerine ait mikroglia hücrelerinin belirli zaman noktalarında yüzde kaçının pHrodo fagositozu yaptığını gösteren grafikler. n=1

4.2.10. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglia'nın İşlevsel Karakterizasyonu: Canlı Hücre Görüntüleme ile Amiloid β Fagositozunun Görüntülenmesi

TAMRA ile işaretlenmiş olan amiloid β proteini olgun mikroglia hücrelerinin medyumuna eklenerek canlı görüntüleme sistemiyle zaman aralıklı görüntüleri alındı. Bu görüntüler art arda eklenerek videolar oluşturuldu ve hücrelerin amiloid β fagositozu

görüntülendi. AH genotipine ait hücrelerin (Şekil 4-24A) İZO genotipine göre (Şekil 4-24B) daha fagositik olduğu gözlemlendi.



Şekil 4-24: TAMRA işaretli amiloid β (kırmızı) eklendikten sonra canlı görüntüleme sistemiyle videoları oluşturulan AH (A) ve İZO (B) genotiplerine ait olgun mikroglia hücrelerinin fagositoz görüntüleri. 20X.

4.2.11. İPKH'den Farklılaştırılan Mikroglialının İşlevsel Karakterizasyonu: Flow Sitometri ile Amiloid β Fagositozunun Tespit Edilmesi

AH ve İZO genotiplerine ait olgun mikroglia hücrelerine FAM işaretli amiloid β proteini eklenerek 1 saat, 3 saat ve 5 saat boyunca inkübe edildi. Ek olarak, bu sürelerden 30 dk öncesinde aktin polimerizasyon inhibitörü sitokalsin D eklenerek gruplar oluşturuldu. AH (Şekil 4-25A) ve İZO (Şekil 4-25B) genotiplerine ait mikroglia hücrelerinin her ikisinde de amiloid β fagositozu yapan hücre oranlarının oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. AH ve İZO genotiplerine ait mikroglialar karşılaştırıldığında ise AH genotipinin bir miktar daha fagositik olduğu gözlemlendi (Şekil 4-25C) ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sitokalsin D uygulamasının ise fagositoz seviyesini her iki grupta da özellikle 1 saat ve 3 saat zaman noktalarında bir miktar azalttığı görüldü (Şekil 4-25A, B).

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığının tedavisine yönelik prelinik çalışmalarda sıklıkla streptozotosin ile indüklenerek oluşturulan Alzheimer hayvan modelleri veya transgenik hayvan modelleri kullanılmaktadır (Chen ve ark. 2013). Alzheimer hastalığında mikroglia ile ilişkili hastalık mekanizmalarının araştırılmasında da kullanılan bu hayvan modelleri sayesinde literatüre oldukça önemli bilgiler kazandırılmıştır. Ancak hayvan modelleri insan beyni fizyolojisini tam olarak yansıtamadığından Alzheimer hastalığında ortaya çıkan patolojiyi de doğru biçimde ortaya koyamamaktadır (Arber ve ark. 2017). Son yıllarda yapılan, fare ve insan mikroglia hücrelerinin karşılaştırıldığı transkriptomik çalışmalarda, insan mikroglia hücrelerinde çok sayıda farklı eksprese edilen gen olduğunun gösterilmesi de hayvan modellerinin insanı temsil etmekteki yetersizliğini vurgulamaktadır (Galatro ve ark. 2017; Hasselmann ve ark. 2019).

Hayvan modellerinden elde edilen mikroglia yerine insan kaynaklı hücrelerin kullanılması ise MSS'den kolayca örnek alınamaması nedeniyle her zaman mümkün değildir. İnsan MSS'sinden örnek alımı çeşitli hastalıklar nedeniyle yapılması gereken biyopsiler ve post-mortem doku eldesiyle sınırlıdır. Bu örneklerde ise hücrelerin hasta bireylerden elde edilmiş olması, post-mortem kaynaklı artefaktlar ve sınırlı sayıda hücreye ulaşılması gibi sorunlarla karşılaşmaktadır (Pocock ve Piers 2018).

İPKH'nin keşfi, hayvan modellerindeki kısıtlı imkanların aşılmasını sağlamakta ve insan kaynaklı beyin hücrelerinin kullanılarak hastalık mekanizmalarının araştırılabilmesi yönünde eşsiz bir olanak sunmaktadır. Erişkin somatik hücrelerden (örneğin fibroblastlardan) yeniden programlamayla kolaylıkla üretilebilen İPKH'ler, istenilen hücre tipine farklılaştırılabilmektedir. Bu hücreler, MSS'ye ait hücrelere de farklılaştırılabildiğinden, insan kökenli örnek elde etmenin oldukça zor olduğu MSS'yi ilgilendiren hastalıkların çalışılabileceği sınırsız bir kaynak oluşturmaktadır (Arber ve ark. 2017). İPKH'lerin bu avantajları göz önünde bulundurularak, Alzheimer hastalığında mikroglia hücreleri ve NLRP3 yolağını merkeze alan tez çalışmamızda mikroglia kaynağı olarak İPKH'ler tercih edilmiştir.

İPKH'den mikroglia elde etmek için çok sayıda farklı yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerdeki ayrıntılar farklılık gösterse de, hepsi aynı stratejiyi kullanmakta, hücrelere nöronal mikroçevre sağlamak ve mikroglianın embriyonik gelişim

aşamalarını taklit etmektedirler (Haenseler ve Rajendran 2019). Soy izleme çalışmaları mikroglialının mezodermal ilkel vitellus kesesi progenitörlerinden köken aldığını ve bu hücrelerin de MYB-bağımsız eritromyeloid progenitörleri (EMP'leri) oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. EMP'ler E17'de vitellus kesesi makrofajlarını oluşturur ve bu hücreler de E31'den itibaren kan-beyin bariyeri kapanana dek beyne göç eder. Burada diğer beyin hücreleriyle etkileşen mikroglia hücreleri olgunlaşarak dallanmış bir morfoloji kazanır ve işlevsel hale gelir (Haenseler ve ark. 2017; Hasselmann ve Blurton-Jones 2020).

İPKH'yi mikrogliaya farklılaştırmak için çeşitli araştırma grupları 24 gün ile 74 gün arasında süren farklı protokoller geliştirmiştir (Konttinen ve ark. 2019; Muffat ve ark. 2016). Bu protokollerden bazıları İPKH'lerden farklılaştırmayı doğrudan başlatırken, bazıları İPKH'lerden öncelikle üç boyutlu kümeler olan embriyoid cisimleri oluşturmuştur. İPKH'ler öncelikle BMP4, FGF, VEGF, SCF gibi büyüme faktörleri kullanılarak mezodermal farklılaşmaya yönlendirilmiş ve myeloid progenitörler elde edilmiştir. Sonrasında bu hücreler M-CSF, GM-CSF, IL-34, TGF- β gibi önemli mikroglia büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri ile desteklenmiştir. Mikrogliaı olgunlaştırmak içinse bir protokol CD200 ve CX3CL1 kullanmışken (McQuade ve ark. 2018), diğer protokoller mikrogliaı nöron veya astrositlerle ko-kültür etmiştir (Haenseler ve ark. 2017; Pandya ve ark. 2017; Takata ve ark. 2017). İPKH'den mikroglia elde etmek için kullanılan yöntemlerin temel mantığı aynı olsa da her protokolde diğerlerinden bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bazı protokoller hücreleri ilk etapta düşük oksijen koşullarında farklılaştırırken (Abud ve ark. 2017; Konttinen ve ark. 2019; Pandya ve ark. 2017; Takata ve ark. 2017), bazı protokollerde hücreler belirli belirteçleri taşımalarına göre FACS ile seçilerek ayrılmıştır (Abud ve ark. 2017; Douvaras ve ark. 2017; Pandya ve ark. 2017; Takata ve ark. 2017). Ayrıca farklılaştırma süresi ve elde edilen hücre sayısı da protokoller arasında farklılık göstermektedir.

Çalışmamızda İPKH'den mikroglia elde etmek için iki farklı protokol kullanılmıştır. Kullanılan ilk protokol Dr. Heneka'nın laboratuvarında geliştirilmiş olan bir yöntemdir. Bu yöntemde öncelikle İPKH'lerden embriyoid cisimler oluşturulmuş, sonrasında bunların mikrogliaya farklılaştırılması indüklenmiştir. Protokol 1 kullanılarak yapılan farklılaştırmada AH ve KTL genotiplerine ait çeşitli aşamalardaki hücrelerin (İPKH, embriyoid cisim, mikroglia ve kültür tabakaları (mikroglialının üzerinden koparak oluştuğu, kültür kabına tutunmuş halde gelişen tabaka)) çeşitli

protein ekspresyonları Western Blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Hücre hareketi ve fagositozda rol aldığı düşünülen aktin bağlayıcı bir protein olan IBA1 çalışmalarda en sık kullanılan mikroglia belirteçlerindendir (Ahmed ve ark. 2007; Hendrickx ve ark. 2017; Ito ve ark. 1998). Pandya ve ark. (2017) insan kaynaklı İPKH'den farklılaştırılan mikroglia hücrelerinde IBA1 belirtecini eksprese edildiğini saptamıştır. Abud ve ark. (2017) ise fareye ksenotransplante edilen insan kaynaklı İPKH'den farklılaştırılmış mikroglia hücrelerinin IBA1 eksprese ettiğini göstermiştir. Fagositoz, sağkalım, proliferasyon, kemotaksi gibi süreçlerde rol alan TREM2 proteini ise dokuya özgü makrofajların belirteçidir ve beyinde yalnızca mikroglia tarafından eksprese edildiği bilinmektedir (Garcia-Reitboeck ve ark. 2018; Wilson ve ark. 2020). Garcia-Reitboeck ve ark. (2018) çalışmalarında insan kaynaklı İPKH'den farklılaştırılan mikroglia hücrelerinde TREM2 ekspresyonunu göstermiştir. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, İPKH'den farklılaştırılan mikrogliaların, mikroglia ilişkili belirteçler olan IBA1 ve TREM2'yi eksprese ettiği gösterilmiştir. İnflamatuvar yolların aktivasyonunda yer alan pek çok kalıp tanıma reseptörünün ortak adaptör proteini MyD88'dir (Jiang ve ark. 2021). Örneğin TLR4 kalıp tanıma reseptörünün, BV2 mikroglia hücrelerinde MyD88/NF- κ B/NLRP3 yolağı üzerinden etkinlik göstererek inflamazom aktivasyonunu sağlıyor olabileceği öne sürülmüştür (Cui ve ark. 2020). Zhang ve ark. (2021) ise BV2 mikroglia hücre hattında TLR4, MyD88 ve NF- κ B protein ekspresyonlarını göstermiş ve LPS uygulaması sonrasında da ekspresyon seviyelerinin arttığını belirtmiştir. Çalışmamızda da benzer biçimde, İPKH kaynaklı mikroglia hücrelerinin NLRP3 yolağı ilişkili proteinler NLRP3 ve MyD88'i eksprese ettiği belirlenmiştir.

Mikroglia hücrelerinde NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu sonrasında olgunlaşan IL-1 β ve IL-18 proinflamatuvar sitokinleri hücre dışına salınır. Ardından IL-1 β ve IL-18 de çeşitli inflamatuvar yolları tetikler ve TNF- α , IL-6 gibi diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimini tetikler (Liu ve ark. 2020). LPS ile ön uyarım sonrasında amiloid β ile uyarımın, primer mikroglia hücrelerinde inflamazom aktivasyonu gibi süreçler sonucunda IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin salımını tetiklediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Lučiūnaitė ve ark. 2020; Sanz ve ark. 2009). Benzer biçimde, BV2 mikroglia hücre hattında da LPS ile ön uyarım sonrasında amiloid β ile uyarım IL-1 β , TNF- α ve IL-6 ekspresyonunu arttırmıştır (Liu ve ark. 2020). Çalışmamızda İPKH'den farklılaştırılan mikrogliaların işlevsel analizi için LPS ve amiloid β uygulaması sonrasında farklı sitokinlerin salım düzeyleri ölçülmüştür.

Hücreler LPS ile ön uyarıldıktan sonra amiloid β ile uyarıldığında proinflamatuvar sitokinler IL-1 β , IL-18 ve TNF- α salımında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Protokol 1 kullanılarak elde edilen bütün bu sonuçlar, İPKH'den farklılaştırılan mikroglianın, Alzheimer hastalığında NLRP3 yolağı ilişkili hastalık mekanizmalarının çalışılabileceği bir *in vitro* insan mikrogliya modeli olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda Protokol 1 kullanılarak gerçekleştirilen farklılaştırma sırasında kültür tabakalarında (farklılaşma sürecinde mikroglianın üzerinden koparak oluştuğu, kültür kabına tutunarak gelişen hücreler) nöron (TUJ-1) ve astrosit (GFAP) belirteçleri eksprese edilmiş fakat nöral progenitör hücre (Nestin) ve oligodendrosit (Olig-2) belirteçleri eksprese edilmemiştir. Bu sonuç, Protokol 1 ile gerçekleştirilen mikrogliyal farklılaşma sırasında nöronların ve astrositlerin üstlendiği destekleyici işlevle açıklanabilir. KTL ve AH genotiplerinin kültür tabakalarında GFAP ekspresyon seviyelerinin oldukça farklı olduğu görülmüştür. Bu farkın, genetik farklılığın yanı sıra, farklılaşma sırasında AH genotipinde KTL genotipinden çok daha önce mikrogliya hücrelerinin üretiminin başlamış olmasından da kaynaklanması olasıdır. Esasen nöron ve astrositler ile mikrogliya hücrelerinin kökeni oldukça farklıdır. Nöron ve astrositler nöroektoderm, mikrogliya ise mezoderm kökenlidir. MSS'nin embriyonik gelişimi sırasında nöroektodermden nöral kök hücreler (radyal glial hücreler) oluşur. Bu hücreler öncelikle (gestasyonun 6-8. haftalarında) nörogenez ile nöronlara farklılaşır. Daha sonra ise (16-18. haftalarda) aynı hücrelerden gliogenez ile astrositler ve ardından (18-20. haftalarda) oligodendrositler gelişir (Lanjewar ve Sloan 2021). Bu nedenle *in vitro* olarak İPKH'lerden nöron ve astrositlerin farklılaştırılması sırasında da embriyonik gelişim taklit edilir ve ilk olarak nöral kök hücrelerin oluşumu tetiklenir, daha sonra nöron veya astrosit farklılaşmasını uyaran maddelerle hedeflenen farklılaştırma gerçekleştirilir (Pei ve ark. 2016). Protokol 1'de kullanılan NGD bazal medyumun içeriğinde N21, N2, Nörobazal medyum gibi nöron kültüründe veya İPKH'den nöronal farklılaştırma sırasında oldukça sık kullanılan medyum ve takviyeler yer almaktadır (D'Aiuto ve ark. 2014; Kang ve ark. 2017; Park ve ark. 2020). Ayrıca Protokol-1'de mikroglianın olgunlaştırıldığı son aşama hariç tüm aşamalarda medyum içeriğine eklenen BMP-4, aynı zamanda nöral progenitörlerden gliogenezin indüklenmesi için de kullanılan faktörlerden biridir (Oksanen ve ark. 2017). Çalışmamızdaki kültür tabakalarında TUJ1 ve GFAP belirteçlerinin ekspresyonu, aynı zamanda İPKH'den nöron ve astrosit farklılaştırma protokollerinde de yer alan bu ortak faktörlerin Protokol

1'de kullanılması sonucunda, hedeflenmediği halde nöron ve astrositlerin de üretilmiş olmasıyla açıklanabilir. Kültür kabına tutunarak gelişen bu hücreler, mikroglia hücrelerinin farklılaşma sürecine katkıda bulunuyor olabilir. Ancak kültür kabında mikrogliaların yanı sıra, yüzeye tutunan kültür tabakasında nöron ve astrositlerin bulunması, protokolün sonraki aşamalarında mikroglia hücrelerinin süspansiyon halinde medyumdan toplanarak yeni bir kültür kabına ekildiği göz önüne alındığında, İPKH'den saf mikroglia kültürü elde etmenin önünde bir engel teşkil etmemektedir.

Protokol 1 kullanılarak bir kez farklılaştırma yapılmış ve elde edilen mikroglia hücreleriyle karakterizasyon ve uyarım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sonraki farklılaştırma denemelerinde ise protokol adımları aynı şekilde takip edildiği halde mikroglia hücresi elde edilemediği için bu deneyler tekrar edilememiş ve yapılması planlanan diğer deneyler de uygulanamamıştır. Bu nedenle farklı bir protokol kullanılarak deneylere tekrar başlanmıştır.

Çalışmamızda İPKH'den mikroglia elde etmek için kullanılan diğer farklılaştırma yöntemi olan Protokol 2, esasen McQuade ve ark. (2018)'nın geliştirdiği bir yöntem olup, farklılaştırma basamaklarında kullanılan medyum içerikleri ticari kit (Stemcell Technologies) olarak da temin edilebilmektedir.

Protokol 2 kullanılarak İPKH'den farklılaştırılan mikroglia hücrelerinin karakterizasyonu için İmmünohistokimya, Flow Sitometri, Western Blot ve RT-qPCR yöntemleri kullanılarak mikroglia belirteci olarak bilinen çok sayıda belirtecin analizi yapılmıştır.

Periferik makrofajlarda ve mikroglialarda eksprese edilen PU.1 bir transkripsiyon faktörü olup, bu hücrelerdeki çeşitli (özellikle antijen sunumu ve fagositozla ilişkili) gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (Rustenhoven ve ark. 2018). Satoh ve ark. (2016) daha önce mikroglia ve makrofajları birbirinden ayırt edebilmek için genom düzeyinde yapılan transkriptomik çalışmalardan yola çıkarak TMEM119'un MSS'de mikroglialara özgün biçimde eksprese edildiğini göstermiştir. Sonrasında yapılan farklı çalışmalar da TMEM119'un, mikrogliaları MSS'yi infiltre eden kan kaynaklı makrofajlardan ayırt etmede kullanılabilecek oldukça elverişli bir belirteç olduğunu desteklemektedir (Bohnert et al., 2020; Ruan et al., 2020). Abud ve ark. (2017) İPKH'den farklılaştırdıkları mikroglia hücrelerinin sitoplazmasının TREM2 ile, çekirdeğinin ise PU.1 ile pozitif immünoreaktivite gösterdiğini belirtmiştir. Brownjohn ve ark. (2018) İPKH kaynaklı mikroglia hücrelerinin sitoplazmasında IBA1 ve TREM2

ile pozitif immünoaktivite gözlemlemiştir. Lopez-Lengowski ve ark. (2021) ise bu hücrelerin sitoplazmasında TMEM119 ve IBA1 immünoaktivitesini göstermiştir. Çalışmamızda Protokol 2 kullanılarak İPKH'den farklılaştırılan mikroglia hücrelerinin literatürle uyumlu olarak IBA1, TMEM119, TREM2 antikorlarıyla sitoplazmada, PU.1 antikoruyla ise çekirdekte pozitif immünoaktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Protokol 2 kullanılarak İPKH'den mikrogliaya farklılaştırma sürecinde, farklılaştırmanın çeşitli aşamalarındaki (hematopoetik progenitör hücreler, farklılaştırmanın 15. günündeki mikroglia ve olgun mikroglia) hücrelerin Flow Sitometri ile fenotipik analizi yapılarak myeloid, hematopoetik ve mikroglia ilişkili yüzey belirteçlerinin ekspresyonu değerlendirilmiştir. Pandya ve ark. (2017) İPKH'den elde ettikleri hematopoetik progenitör hücrelerin CD43, CD34 ve CD45 hematopoetik belirteçlerini eksprese ettiğini göstermiştir. CD235a ise vitellus kesesi ilkel hematopoetik progenitörlerinin belirtecidir (Xu ve ark. 2020). Douvaras ve ark. (2017) ile Muffat ve ark. (2016), İPKH'den mikroglia farklılaştırırken ara basamakta elde ettikleri vitellus kesesi progenitörlerinin CD235a⁺ olduğunu tespit etmiştir. Çalışmamızda elde edilen hematopoetik progenitör hücrelerin de literatüre uygun biçimde CD34, CD235a, CD43 ve CD45'i eksprese ettiği gözlenmiştir. Mikroglial farklılaşmaya doğru gidildikçe beklendiği gibi bu belirteçlerin ekspresyonu, CD43 ve CD45'in haricinde azalmıştır. Olgun mikroglia hücrelerinde CD43, CD45, CD11b ve CD14 myeloid belirteçlerinin ekspresyonunun oldukça arttığı ve hücrelerin neredeyse tamamının, önemli mikroglia ilişkili belirteçler olan TREM2 ve TMEM119'u eksprese ettiği gözlenmiştir. Ayrıca HPH'lerle karşılaştırıldığında CX3CR1 ve P2RY12 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Mikroglia da eksprese edilen bir kemokin reseptörü olan CX3CR1, mononükleer fagositlerin inflamasyon bölgesine toplanmasında görev alır (Hickman ve ark. 2019). Ayrıca nöronlar bu reseptörün ligandı olan CX3CL1'i eksprese ettiği için, CX3CR1-CX3CL1 sinyal yolağı mikroglia ve nöron haberleşmesinde önemli bir rol oynar (Murai et al., 2020). Mikroglia hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir G-protein eşlenik purinerjik reseptör olan P2RY12 ise, tehlike durumunda hasarlı hücrelerden salınan ATP gibi purinerjik molekülleri algılar ve inflamasyon, hücre hareketi ve hücre göçüyle ilgili süreçlerde rol alır (Morillas ve ark. 2021). Ayrıca P2RY12'nin beyinde mikrogliaya özgün olarak eksprese edildiği düşünülmektedir (Butovsky ve ark. 2014). Çalışmamızda elde edilen bulgular, İPKH'den farklılaştırılan mikroglia hücrelerinin, Pandya ve ark. (2017)'nin

çalışmasındaki gibi CD11b, CD45, TREM-2 ve CX3CR1 belirteçlerini ve Douvaras ve ark. (2017)'nın çalışmasındaki gibi TMEM119, P2RY12, CD11b ve CX3CR1 belirteçlerini eksprese ettiği bulgularını desteklemektedir.

Çalışmamızda Protokol 2 kullanılarak İPKH'den farklılaştırılan mikroglia hücrelerinde, protein düzeyinde ekspresyonları gösterilen IBA1, CX3CR1, TREM2 ve P2RY12 belirteçlerinin mRNA düzeyinde de eksprese edildiği RT-qPCR yöntemi uygulanarak gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, İPKH'den farklılaştırılan mikroglia hücrelerinin mRNA düzeyinde CD14, CSF1, CCR5, TLR2 ve TLR4'ü de eksprese ettiği görülmüştür. TLR2 ve TLR4 mikroglia hücrelerinde bulunan kalıp tanıma reseptörlerindendir. CD14 ise TLR2 ve TLR4'ün ko-reseptörü olarak görev yapar. TLR-CD14 kompleksi LPS ve amiloid β 'nın algılanmasında rol oynayarak inflamatuvar süreçlerde yer alır (Parajuli ve ark. 2012; Yu ve Ye 2015). Mikroglia hücrelerinin varlığını sürdürebilmesi için CSF1R reseptörüyle algıladıkları CSF1 veya IL-34 ligandları gereklidir. CSF1'in daha çok nöronlar tarafından üretildiği bilinse de, mikroglianın da bu ligandı ürettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Brioschi ve ark. 2020; Marzan ve ark. 2021; Matcovitch-Natan ve ark. 2016). Bir G-protein eşlenik reseptör olan CCR5, CC-kemokinler olarak adlandırılan kemotaktik proteinlerin reseptörüdür ve mikroglia hücrelerinde aktivasyon, nöroinflamasyon ve kemotaksi işlemlerinde rol oynamaktadır (Li ve Zhu 2019). Çeşitli yöntemlerle mikrogliaya ait çok sayıdaki belirtecin ekspresyonunun değerlendirildiği çalışmamız, Protokol 2 kullanılarak İPKH'den başarılı biçimde mikroglia hücrelerinin elde edilebildiğini göstermektedir.

Western Blot ile protein ekspresyonu değerlendirildiğinde Protokol 2 kullanılarak İPKH'den farklılaştırılan mikroglianın, mikroglia ilişkili belirteçler olan IBA1 ve TREM2'yi ve ayrıca NLRP3 yolağı ilişkili proteinler NLRP3, ASC, MyD88 ve GSK3 β 'yı eksprese ettiği belirlenmiştir. MyD88 inflamatuvar yolakların aktivasyonunda yer alan pek çok kalıp tanıma reseptörünün ortak adaptör proteinidir (Jiang ve ark. 2021). ASC proteini, NLRP3 ve prokaspaz-1 ile birlikte NLRP3 inflamazomunu oluşturan üç proteinden biridir (Seok ve ark. 2021). GSK3 β 'nın ise bağışıklık hücrelerinde inflamatuvar cevapların oluşturulmasında etkili olduğu bilinmektedir (Ajmone-Cat ve ark. 2016). Ayrıca GSK3 β 'nın NLRP3 inflamazom aktivasyonunda rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır (Wang ve ark. 2020; Zhao ve ark. 2015). Protokol 2'den elde edilen tüm bu sonuçlar İPKH'den farklılaştırılan

mikroglialının, Alzheimer hastalığında NLRP3 yolağı ilişkili hastalık mekanizmalarının çalışılabileceği bir *in vitro* insan mikroglia modeli olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Protokol 2 kullanılarak elde edilen kültür tabakalarında (farklılaşma sürecinde HPH'lerin üzerinden koparak oluştuğu, kültür kabına tutunarak gelişen hücreler) nöronal marker TUJ-1 ekspresyonu hem mRNA hem de protein düzeyinde gösterilmiştir. Astrosit belirteci GFAP'nin ise oldukça az eksprese edildiği veya eksprese edilmediği belirlenmiştir. Nöral progenitör hücre belirteci NESTIN ve oligodendrosit belirteci OLIG-2'nin ise eksprese edilmediği görülmüştür. Bu sonuçlar Protokol 2 kullanılarak yapılan mikrogliyal farklılaştırmada kültür tabakasında bulunan destekleyici hücrelerin esas olarak nöronlar olduğunu göstermektedir. Protokol 2'de İPKH'den hematopoetik progenitör hücrelerin farklılaştırılması sırasında kullanılan Medyum A ve B'nin içeriğinde bulunan FGF ve Medyum B'nin içeriğinde bulunan SCF ile IL6'nın nöronal farklılaştırmada da etkili olduğu bilinmektedir (Kang ve ark. 2017; Piao ve ark. 2012; Sulistio ve ark. 2018). Çalışmamızdaki kültür tabakalarında TUJ1 belirtecinin ekspresyonu, aynı zamanda İPKH'den nöron farklılaştırma protokollerinde de yer alan bu ortak faktörlerin Protokol 2'de kullanılması sonucunda hedeflenmediği halde nöron üretilmiş olmasıyla açıklanabilir. Kültür kabına tutunarak gelişen bu hücreler, mikroglia hücrelerinin farklılaşma sürecine katkıda bulunuyor olabilir. Kültür tabakasında yüzeye tutunur halde nöronların bulunması, protokolün sonraki aşamalarında hematopoetik progenitör hücrelerin süspansiyon halinde medyumdan toplanarak yeni bir kültür kabına ekildikten sonra mikrogliaya farklılaştırıldığı göz önüne alındığında, İPKH'den saf mikroglia kültürü elde etmenin önünde bir engel teşkil etmemektedir. Bu protokolda, gliagenezde önemli olan BMP4 yalnızca ilk üç gün kullanıldığı için, olası nöral progenitörlerden gliagenezin yeterince indüklenmemesi nedeniyle kültür tabakalarında astrosit oluşmamış olabilir. Ayrıca SCF'nin bir taraftan nöral progenitörlerden nöronal farklılaşmayı uyarırken, diğer yanda gliagenezi önlediği gösterilmiştir (Piao ve ark. 2012). Bu da Protokol 2'ye ait kültür tabakalarında astrosit gelişimini engelleyen bir diğer faktör olabilir.

Mikroglia hücrelerinde NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu sonrasında olgunlaşan IL-1 β ve IL-18 proinflamatuvar sitokinleri hücre dışına salındığı için, İPKH'den Protokol 2 kullanılarak farklılaştırılan mikrogliada NLRP3 inflamazom yolağının aktivasyonu ön uyarım, uyarım ve inhibisyon koşulları sonrasında IL-1 β ve

IL-18 sitokin salımları analiz edilerek araştırılmıştır. LPS ile ön uyarım sonrası amiloid β ile uyarım, test edilen tüm genotiplere ait mikrogliada IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin salımı cevabıyla sonuçlanmıştır. Ayrıca seçici NLRP3 inflamazom inhibitörü CRID3 varlığında, bu etki tersine döndürülmüş ve sitokin salımları anlamlı biçimde azalmıştır. CRID3'ün, NLRP3'e bağlanıp ATP hidrolizini önleyerek NLRP3'ün aktivasyonunu ve NLRP3 inflamazomunun oluşumunu engellediği bilinmektedir (Coll ve ark. 2019). Lucüünaité ve ark. (2020) primer fare mikrogliya kültüründe LPS ile ön uyarım sonrasında amiloid β oligomerleri veya protofibrilleri ile uyarımla artan IL-1 β seviyesinin, CRID3 uygulamasının ardından düştüğünü göstermiştir. Dempsey ve ark. (2017) Alzheimer modeli fareye (APP/PS1) CRID3 uygulandığında, amiloid β patolojisinin azaldığını ve beyin homojenatları analiz edildiğinde IL-1 β seviyesinin de düştüğünü belirtmiştir. Mouton-liger ve ark. (2018) ise primer fare mikrogliya hücrelerini, LPS ile ön uyarım sonrasında NLRP3 yolağı aktivatörleri olan ATP veya nigericin ile uyardığında artan artan IL-1 β ve IL-18 seviyelerinin, CRID3 uygulamasıyla azaldığını göstermiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar da, NLRP3 inflamazom yolağının CRID3 gibi inhibitörler kullanılarak inhibisyonunun, Alzheimer hastalığının tedavisinde yeni bir anti-inflamatuvar tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir. İnflamatuvar cevabın kapsamının araştırılması için IL-6 ve CXCL12 proinflamatuvar sitokinlerinin salımı da çalışmamızda aynı koşullarda incelenmiş, IL-6 için ön uyarım, uyarım ve inhibisyon koşullarının istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermediği gözlenmiştir. CXCL12 salımında ise NLRP3 inflamazom yolağında yer alan sitokinlerin verdiği benzer bir cevap gözlenmiştir ancak bu sitokin cevabının daha iyi yorumlanabilmesi için tekrar sayısının artırılması gerekmektedir. Bu sonuçlar İPKH'den farklılaştırılan mikroglianın işlevsel özellikler gösterdiğini ve NLRP3 yolağı ilişkili hastalık mekanizmalarının ve CRID3 gibi Alzheimer hastalığında bir tedavi seçeneği olabilecek ilaçların çalışılmasında bu hücrelerin oldukça elverişli bir model olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Mikrogliya hücreleri MSS'nin savunma hücreleri olarak apoptotik, nekrotik hücrelerin, bakterilerin, virüslerin ve katlanmamış ya da birikmiş proteinlerin ortadan kaldırılmasından sorumludur (Janda ve ark. 2018). Bu nedenle İPKH'lerden elde edilen mikroglianın, üzerinde çalışmalar yapılabilecek uygun bir model olması için, ilgili belirteçleri taşımasının yanında fagositoz yeteneğinin de olması beklenmektedir.

Çalışmamızda Protokol 2 kullanılarak İPKH'den farklılaştırılan mikrogliya hücrelerinin, pHrodo biyopartiküllerini zamana bağlı olarak artacak şekilde fagosite edebildiği Flow Sitometri ile hem AH hem de İZO grubu için gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin pHrodo biyopartiküllerini fagosite ettiği floresan mikroskobu ile elde edilen görüntülerle de doğrulanmıştır. Mikrogliya hücreleri, Alzheimer hastalığında hücre dışında birikmiş olan amiloid β 'yı, yüzeylerindeki çeşitli reseptörlerle tanır ve fagosite eder (Pan ve ark. 2011). Bu nedenle çalışmamızda mikrogliya hücrelerinin amiloid β 'yı fagosite etme davranışı da incelenmiştir. Protokol 2 kullanılarak İPKH'den farklılaştırılan mikrogliya hücrelerinin, floresan işaretli amiloid β 'yı fagosite edebildiği Flow Sitometri ile hem AH hem de İZO grubu için gösterilmiştir. Ayrıca, canlı hücre görüntüleme sistemiyle alınan video kayıtlarıyla da İPKH'den farklılaştırılan mikrogliyanın amiloid β 'yı fagosite ettiği doğrulanmıştır. Bu veriler farklılaştırmayla elde ettiğimiz mikrogliya hücrelerinin yalnızca mikrogliya ilişkili belirteçleri eksprese etmekle kalmadığını, aynı zamanda oldukça işlevsel olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda hem Flow Sitometri ile hem de canlı hücre görüntüleme sistemiyle elde edilen veriler AH grubunun İZO grubuna göre bir miktar daha fagositik olduğuna işaret etmektedir. Aslında Alzheimer hastalığının başlaması ve ilerlemesinde, mikrogliya hücrelerinin fagositik aktivitesinin azalması sonucunda amiloid β birikimlerini temizleyememesinin etkili olduğu, öne sürülen görüşlerden biridir (Anwar ve Rivest 2020). Ancak literatürde bu görüşün aksini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, Spangenberg ve ark. (2019) Alzheimer fare modelinde (5xFAD), CSF1R inhibitörü kullanımının, çoğu bölgede mikrogliyanın azalmasına neden olmakla birlikte amiloid β plak oluşumunu da engellediğini belirtmiştir. Hâlâ mikrogliyanın bulunduğu kısıtlı sayıdaki bölgede ise amiloid β plaklarının olduğu gözlenmiştir. Baik ve ark. (2016) ise Alzheimer fare modeli (5xFAD) kullanarak iki-foton mikroskopisiyle gerçekleştirdikleri çalışmada amiloid beta plaklarının çevresindeki mikrogliyanın, amiloid β 'yı hücre içine aldığı, bu peptidin mikrogliya içinde birikmesinden sonra hücrenin ölümüne yol açtığı ve mikrogliya ölümü sonrasında hücre dışına salınan amiloid β birikimlerinin amiloid β plaklarının artmasına neden olduğunu göstermiştir. Yeni yapılan bir çalışmada da Alzheimer fare modelinde (APP/PS1), mikrogliya hücrelerinin amiloid β fagositozunda işlev gören Tyro3, Axl ve Mertk (TAM) reseptörlerinin fareden genetik olarak çıkarılması durumunda bu farelerin, beklenmedik bir biçimde, Alzheimerlı farelere göre daha az amiloid β plağı taşıdıkları gözlenmiştir. TAM aracılığıyla gerçekleşen

fagositozun amiloid β plaklarının gelişimini engellemediği, aksine teşvik ettiği gösterilmiştir (Huang ve ark. 2021). Alzheimer hastalığında mikrogliya fagositozunun hastalık patolojisine katkı sağlayıp sağlamadığını belirlemeye yönelik daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak çalışmamız, İPKH'den farklılaştırılan mikrogliyanın ilgili belirteçleri taşıdığını, işlevsel olduğunu, Alzheimer hastalığıyla ilişkili inflamatuvar mekanizmaların ve tedavide kullanılabilecek ilaç adaylarının çalışılabileceği elverişli bir model olabileceğini göstermektedir.



KAYNAKLAR

- Abud, E. M., Ramirez, R. N., Martinez, E. S., Healy, L. M., Nguyen, C., Newman, S. A., Yeromin, A. V., Scarfone, V. M., Marsh, S. E., Fimbres, C., Caraway, C. A., Fote, G. M., M, M. A., Agrawal, A., Kaye, R., Gylys, K. H., Cahalan, M. D., Cummings, B. J., Antel, J. P. ve Blurton-Jones, M. (2017). iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*, 94(2), 278–293. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.042>. iPSC-derived
- Aguilera, G., Colin-Gonzales, A. L., Rangel-Lopez, E., Chavarria, A. ve Abel, S. (2018). Redox Signaling, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 28(18), 1626–1651. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7099>
- Ahmed, Z., Shaw, G., Sharma, V. P., Yang, C., McGowan, E. ve Dickson, D. W. (2007). Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 55(7), 687–700. <https://doi.org/10.1369/jhc.6A7156.2007>
- Ajmone-Cat, M. A., D'Urso, M. C., di Blasio, G., Brignone, M. S., De Simone, R. ve Minghetti, L. (2016). Glycogen synthase kinase 3 is part of the molecular machinery regulating the adaptive response to LPS stimulation in microglial cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.012>
- Alzheimer's Association. (2019). 2019 ALZHEIMER'S DISEASE FACTS AND FIGURES Includes a Special Report on Alzheimer's Detection in the Primary Care Setting: Connecting Patients and Physicians. *Alzheimer's & Dementia Volume 15, Issue 3*, 321–387. <https://www.alz.org/media/Documents/alzheimers-facts-and-figures-2019-r.pdf>
- Amarante-mendes, G. P., Adjemian, S., Branco, L. M., Zanetti, L. C., Weinlich, R. ve Bortoluci, K. R. (2018). Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Frontiers in Immunology*, 9:2379, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379>

- Anwar, S. ve Rivest, S. (2020). Alzheimer's disease: microglia targets and their modulation to promote amyloid phagocytosis and mitigate neuroinflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 24(4), 331–344. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1738391>
- Arber, C., Lovejoy, C. ve Wray, S. (2017). Stem cell models of Alzheimer's disease: Progress and challenges. *Alzheimer's Research and Therapy*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0268-4>
- Ardura-Fabregat, A., Boddeke, E. W. G. M., Boza-Serrano, A., Brioschi, S., Castro-Gomez, S., Ceyzeriat, K., Dansokho, C., Dierkes, T., Gelders, G., Heneka, M. T., Hoeijmakers, L., Hoffmann, A., Iaccarino, L., Jahnert, S., Kuhbandner, K., Landreth, G., Lonnemann, N., Löschmann, P. A., McManus, R. M. ve Yang, Y. (2017). Targeting Neuroinflammation to Treat Alzheimer's Disease. *CNS Drugs*, 31(12), 1057–1082. <https://doi.org/10.1007/s40263-017-0483-3>
- Bachstetter, A. D., Morganti, J. M., Jernberg, J., Schlunk, A., Mitchell, S. H., Brewster, K. W., Hudson, C. E., Cole, M. J., Harrison, J. K., Bickford, P. C. ve Gemma, C. (2011). Fractalkine and CX 3 CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiology of Aging*, 32(11), 2030–2044. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.022>
- Baik, S. H., Kang, S., Son, S. M. ve Mook-jung, I. (2016). Microglia Contributes to Plaque Growth by Cell Death Due to Uptake of Amyloid b in the Brain of Alzheimer's Disease Mouse Model. *Glia*, 64(12), 2274–2290. <https://doi.org/10.1002/glia.23074>
- Blaschke, A. J., Staley, K. ve Chun, J. (1996). *Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex*. 1174, 1165–1174.
- Blum-Degen, D., Muller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H. ve Riederer, P. (1995). Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters*, 202, 17–20.
- Bohnert, S., Seiffert, A., Trella, S., Bohnert, M., Distel, L., Ondruschka, B. ve Monoranu, C. (2020). TMEM119 as a specific marker of microglia reaction in traumatic brain injury in postmortem examination. *International Journal of Legal*

- Medicine*, 134, 2167–2176.
- Bordt, E. A. ve Polster, B. M. (2014). Species in Proinflammatory Microglial Activation : A Bipartisan Affair? *Free Radical Biology & Medicine*, 76, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.033>.NADPH
- Brioschi, S., Zhou, Y. ve Colonna, M. (2020). Brain Parenchymal and Extraparenchymal Macrophages in Development, Homeostasis, and Disease. *The Journal of Immunology*, 204, 294–305. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900821>
- Brownjohn, P. W., Smith, J., Solanki, R., Lohmann, E., Houlden, H., Hardy, J., Dietmann, S. ve Livesey, F. J. (2018). Functional Studies of Missense TREM2 Mutations in Human Stem Cell-Derived Microglia. *Stem Cell Reports*, 10, 1294–1307. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.003>
- Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q. ve Lee, V. M. Y. (2009). Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer’s disease and related tauopathies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(10), 783–793. <https://doi.org/10.1038/nrd2959>
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., Gygi, S. P., Antel, J. P. ve Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, 17(1), 131–143. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>
- Calsolaro, V., & Edison, P. (2016). *Neuroinflammation in Alzheimer ’ s disease : Current evidence and future directions*. 12, 719–732.
- Carmona, S., Zahs, K., Wu, E., Dakin, K., Bras, J. ve Guerreiro, R. (2018). The role of TREM2 in Alzheimer’s disease and other neurodegenerative disorders. *The Lancet Neurology*, 17(8), 721–730. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30232-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30232-1)
- Casella, G., Garzetti, L., Gatta, A. T., Finardi, A., Maiorino, C., Ruffini, F., Martino, G., Muzio, L. ve Furlan, R. (2016). IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation in vitro and in vivo. *Journal of Neuroinflammation*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0596-5>

- Chiaravalloti, A., Koch, G., Toniolo, S., Belli, L., Di Lorenzo, F., Gaudenzi, S., Schillaci, O., Bozzali, M., Sancesario, G. ve Martorana, A. (2016). Comparison between Early-Onset and Late-Onset Alzheimer's Disease Patients with Amnestic Presentation: CSF and 18F-FDG PET Study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 6, 108–119. <https://doi.org/10.1159/000441776>
- Coll, R. C., Hill, J. R., Day, C. J., Zamoshnikova, A., Boucher, D., Massey, N. L., Chitty, J. L., Fraser, J. A., Jennings, M. P., Robertson, A. A. B. ve Schroder, K. (2019). MCC950 directly targets the NLRP3 ATP- hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nature Chemical Biology*, 15, 556–559. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0277-7>
- Colonna, M. ve Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35(1), 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Cox, F. F., Carney, D., Miller, A. M. ve Lynch, M. A. (2012). CD200 fusion protein decreases microglial activation in the hippocampus of aged rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(5), 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.10.004>
- Crews, L. ve Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 19(R1), 12–20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq160>
- Cui, W., Sun, C., Ma, Y., Wang, S. ve Wang, X. (2020). Inhibition of TLR4 Induces M2 Microglial Polarization and Provides Neuroprotection via the NLRP3 Inflammasome in Alzheimer ' s Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00444>
- Cunningham, C. L. (2013). *Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex*. 33(10), 4216–4233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013>
- D'Aiuto, L., Zhi, Y., Das, D. K., Wilcox, M. R., Jon, W., McClain, L., Macdonald, M. L., Maio, R. Di, Mark, E., Piazza, P., Viggiano, L., Sweet, R., Kinchington, P. R., Bhattacharjee, A. G., Yolken, R., Nimgaonka, V. L., Aiuto, L. D., Zhi, Y., Das, D. K. ve McClain, L. (2014). Large-scale generation of human iPSC-derived neural stem cells/early neural progenitor cells and their neuronal differentiation.

- Organogenesis*, 10(4), 365–377. <https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1011921>
- Daniels, M. J. D., Rivers-auty, J., Schilling, T., Spencer, N. G., Watremez, W., Fasolino, V., Booth, S. J., White, C. S., Baldwin, A. G., Freeman, S., Wong, R., Latta, C., Yu, S., Jackson, J., Fischer, N., Koziel, V., Pillot, T., Bagnall, J., Allan, S. M. ve Brough, D. (2016). Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. *Nature Communications*, 7:12504. <https://doi.org/10.1038/ncomms12504>
- Dansokho, C. ve Heneka, T. M. (2018). Neuroinflammatory responses in Alzheimer ' s disease. *Journal of Neural Transmission*, 125(5), 771–779. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1831-7>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L. ve Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- Dempsey, C., Araiz, A. R., Bryson, K. J., Finucane, O., Larkin, C., Mills, E. L., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., Neill, L. A. J. O. ve Lynch, M. A. (2017). Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid- b and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain Behavior and Immunity*, 61, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.014>
- DiSabato, D. J., Quan, N. ve Godbout, J. P. (2016). Introduction to neuroinflammation
Neuroin fl ammation is de fi ned as an in fl ammatory response within the brain or spinal cord . This in fl ammation is reactive oxygen species , and secondary messengers . These astrocytes), endothelial cells , and peri. *Journal of Neurochemistry*, 139, 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Douvaras, P., Sun, B., Wang, M., Kruglikov, I., Lallo, G., Zimmer, M., Terrenoire, C., Zhang, B., Gandy, S., Schadt, E., Freytes, D. O., Noggle, S. ve Fossati, V. (2017). Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Microglia. *Stem Cell Reports*, 8(6), 1516–1524. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.023>
- Fan, Y., Xie, L. ve Chung, C. Y. (2017). Signaling pathways controlling microglia chemotaxis. *Molecules and Cells*, 40(3), 163–168. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0011>

- Fan, Z., Brooks, D. J., Okello, A. ve Edison, P. (2017). An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory. *Brain*, 140(3), 792–803. <https://doi.org/10.1093/brain/aww349>
- Fillit, H., Ding, W., Luc, B., Jill, K., Larry, A., Brian, L. ve Giselle, W. (1991). Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 129, 318–320.
- Frank, M. G., Fonken, L. K., Watkins, L. R. ve Maier, S. F. (2019). Microglia: Neuroimmune-sensors of stress. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 94(January), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.01.001>
- Galatro, T. F., Holtman, I. R., Lerario, A. M., Vainchtein, I. D., Brouwer, N., Sola, P. R., Veras, M. M., Pereira, T. F., Leite, R. E. P., Möller, T., Wes, P. D., Sogayar, M. C., Laman, J. D., Den Dunnen, W., Pasqualucci, C. A., Oba-Shinjo, S. M., Boddeke, E. W. G. M., Marie, S. K. N. ve Eggen, B. J. L. (2017). Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nature Neuroscience*, 20(8), 1162–1171. <https://doi.org/10.1038/nn.4597>
- Gao, Y., Tan, L., Yu, J.-T. ve Tan, L. (2018). Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Current Alzheimer Research*, 15(3), 283–300. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170417111859>
- Garcia-Reitboeck, P., Phillips, A., Piers, T. M., Villegas-Llerena, C., Butler, M., Mallach, A., Rodrigues, C., Arber, C. E., Heslegrave, A., Zetterberg, H., Neumann, H., Neame, S., Houlden, H., Hardy, J. ve Pocock, J. M. (2018). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Microglia-Like Cells Harboring TREM2 Missense Mutations Show Specific Deficits in Phagocytosis. *Cell Reports*, 24(9), 2300–2311. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.094>
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T. ve Cuadros, M. A. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045>
- Greter, M. ve Merad, M. (2013). Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia*, 61(1), 121–127. <https://doi.org/10.1002/glia.22408>
- Haenseler, W. ve Rajendran, L. (2019). Concise Review: Modeling Neurodegenerative Diseases with Human Pluripotent Stem Cell-Derived Microglia. *Stem Cells*, 37,

724–730. <https://doi.org/10.1002/stem.2995>

- Haenseler, W., Sansom, S. N., Buchrieser, J., Newey, S. E., Moore, C. S., Nicholls, F. J., Chintawar, S., Schnell, C., Antel, J. P., Allen, N. D., Cader, M. Z., Wade-Martins, R., James, W. S. ve Cowley, S. A. (2017). A Highly Efficient Human Pluripotent Stem Cell Microglia Model Displays a Neuronal-Co-culture-Specific Expression Profile and Inflammatory Response. *Stem Cell Reports*, 8(6), 1727–1742. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.017>
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K. A., Latz, E., Moore, K. J. ve Golenbock, D. T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nature Immunology*, 9(8), 857–865. <https://doi.org/10.1038/ni.1636>
- Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Walker, A. J., Gergits, F., Segel, M., Nemesh, J., Marsh, S. E., Saunders, A., Macosko, E., Ginhoux, F., Chen, J., Franklin, R. J. M., Piao, X., McCarroll, S. A. ve Stevens, B. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, 50(1), 253–271.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.004>
- Hanslik, K. L. ve Ulland, T. K. (2020). The Role of Microglia and the Nlrp3 Inflammasome in Alzheimer ' s Disease. *Frontiers in Neurology*, 11:570711, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.570711>
- Hardy, J. A. ve Higgins, G. A. (n.d.). *Alzheimer ' s Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis*. 6, 184–186.
- Hasselmann, J. ve Blurton-Jones, M. (2020). Human iPSC-derived microglia: A growing toolset to study the brain's innate immune cells. *Glia*, 68(4), 721–739. <https://doi.org/10.1002/glia.23781>
- Hasselmann, J., Coburn, M. A., England, W., Figueroa Velez, D. X., Kiani Shabestari, S., Tu, C. H., McQuade, A., Kolahdouzan, M., Echeverria, K., Claes, C., Nakayama, T., Azevedo, R., Coufal, N. G., Han, C. Z., Cummings, B. J., Davtayan, H., Glass, C. K., Healy, L. M., Gandhi, S. P. ve Blurton-Jones, M. (2019). Development of a Chimeric Model to Study and Manipulate Human Microglia In Vivo. *Neuron*, 103(6), 1016–1033.e10.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.002>

- Hendrickx, D. A. E., van Eden, C. G., Schuurman, K. G., Hamann, J. ve Huitinga, I. (2017). Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *Journal of Neuroimmunology*, 309(November 2016), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.04.007>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A. ve Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E. ve Golenbock, D. T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493, 674–681. <https://doi.org/10.1038/nature11729>
- Heneka, M. T., McManus, R. M. ve Latz, E. (2018). Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(10), 610–621. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0055-7>
- Heneka, M. T., Sastre, M., Dumitrescu-ozimek, L., Hanke, A., Dewachter, I., Kuiperi, C., Banion, K. O., Klockgether, T., Leuven, F. V. ve Landreth, G. E. (2005). *Acute treatment with the PPAR γ agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and A β 1 – 42 levels in APPV717I transgenic mice.* 1442–1453. <https://doi.org/10.1093/brain/awh452>
- Hensley, K. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Pathologic Consequences, and Potential for Therapeutic Manipulation. *Journal of Alzheimer's Disease*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1414>. Neuroinflammation
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M. ve Becher, B. (2015). Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 358–

372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>

- Hickman, S. E., Allison, E. K., Coleman, U., Kingery-Gallagher, N. D. ve El Khoury, J. (2019). Heterozygous CX3CR1 Deficiency in Microglia Restores Neuronal β -Amyloid Clearance Pathways and Slows Progression of Alzheimer's Like-Disease in PS1-APP Mice. *Frontiers in Immunology*, 10, 2780. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02780>
- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F. F., See, P., Beaudin, A. E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E. C., Poidinger, M., Zolezzi, F., Larbi, A., Ng, L. G., Chan, J. K. Y., Greter, M., Becher, B., Samokhvalov, I. M., Merad, M. ve Ginhoux, F. (2015). C-Myb⁺ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*, 42(4), 665–678. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.011>
- Hopperton, K. E., Mohammad, D., Trépanier, M. O., Giuliano, V. ve Bazinet, R. P. (2018). Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: A systematic review. *Molecular Psychiatry*, 23(2), 177–198. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.246>
- Huang, Y., Happonen, K. E., Burrola, P. G., Connor, C. O., Hah, N., Huang, L., Nimmerjahn, A. ve Lemke, G. (2021). Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid β plaques. *Nature Immunology*, 22, 586–594. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00913-5>
- Huell, M., Strauss, S. ve Volk, B. (1995). *Interleukin-6 is present in early stages of plaque formation and is restricted to the brains of Alzheimer ' s disease patients.* 544–551.
- InvivoGen. (2021). *NLRP3 inflammasome inhibitor - MCC950*. Erişim tarihi: 22.11.2021, <https://www.invivogen.com/mcc950>.
- Ising, C., Venegas, C., Zhang, S., Scheiblich, H., Schmidt, S. V., Vieira-Saecker, A., Schwartz, S., Albasset, S., McManus, R. M., Tejera, D., Griep, A., Santarelli, F., Brosseron, F., Opitz, S., Stunden, J., Merten, M., Kaye, R., Golenbock, D. T., Blum, D. ve Heneka, M. T. (2019). NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature*, 575(7784), 669–673. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1769-z>

- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y. ve Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*, 57, 1–9.
- Janda, E., Boi, L. ve Carta, A. R. (2018). Microglial phagocytosis and its regulation: A therapeutic target in parkinson's disease? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(144). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00144>
- Jang, S. ve Johnson, R. W. (2010). *Can Consuming Flavonoids Restore Old Microglia to their*. 68(12), 719–728. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00336.x>.Can
- Jeong, S. Y., Jeon, R., Choi, Y. K., Jung, J. E., Liang, A., Xing, C., Wang, X., Lo, E. H. ve Song, Y. S. (2016). Activation of microglial Toll-like receptor 3 promotes neuronal survival against cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*, 136(4), 851–858. <https://doi.org/10.1111/jnc.13441>
- Jiang, S., Maphis, N. M., Binder, J., Latz, E., Heneka, M. T., Bhaskar, K., Jiang, S., Maphis, N. M., Binder, J., Chisholm, D., Weston, L., Duran, W. ve Peterson, C. (2021). Proteopathic tau primes and activates interleukin-1 b via myeloid-cell-specific MyD88- and NLRP3-ASC-inflammasome pathway. *Cell Reports*, 36(12), 109720. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109720>
- Kang, S., Chen, X., Gong, S., Yu, P., Yau, S., Su, Z. ve Zhou, L. (2017). Characteristic analyses of a neural differentiation model from iPSC- derived neuron according to morphology , physiology , and global gene expression pattern. *Scientific Reports*, 7, 12233. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12452-x>
- Katsumoto, A., Lu, H., Miranda, A. S. ve Ransohoff, R. M. (2014). Ontogeny and functions of CNS macrophages. *Journal of Immunology*, 193(6), 2615–2621. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400716>.Ontogeny
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M. ve Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E. G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., Müller, D. N., Luckow, B., Brouck, T., Debowski, K., Fritz, G., Opdenakker, G., Diefenbach, A., Biber, K., Heikenwalder, M. ve Prinz, M. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid

- precursors via Pu .1- and Irf8-dependent pathways. *Nature Publishing Group*, 16(3), 273–280. <https://doi.org/10.1038/nn.3318>
- Konttinen, H., Cabral-da-silva, M. C., Ohtonen, S., Wojciechowski, S., Shakirzyanova, A., Caligola, S., Giugno, R., Ishchenko, Y., Fagerlund, I., Scoyni, F., Korhonen, P., Huber, N., Haapasalo, A., Hewitt, A. W., Vickers, J., Smith, G. C., Oksanen, M. ve Graff, C. (2019). PSEN1DE9, APPswe, and APOE4 Confer Disparate Phenotypes in Human iPSC-Derived Microglia. *Stem Cell Reports*, 13, 669–683. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.004>
- Kukar, T., Prescott, S., Eriksen, J. L., Holloway, V., Murphy, P., Koo, E. H., Golde, T. E. ve Nicolle, M. M. (2007). *Chronic administration of R-flurbiprofen attenuates learning impairments in transgenic amyloid precursor protein mice*. 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-54>
- Kumar, K., Kumar, A., Keegan, R. M. ve Deshmukh, R. (2018). Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 98(2017), 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.053>
- Lacaud, G. ve Kouskoff, V. (2017). Hemangioblast , hemogenic endothelium , and primitive versus definitive hematopoiesis. *Experimental Hematology*, 49, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.12.009>
- Lanjewar, S. N. ve Sloan, S. A. (2021). Growing Glia : Cultivating Human Stem Cell Models of Gliogenesis in Health and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.649538>
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P. ve Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-W](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-W)
- Ledeboer, A., Brevé, J. J. P., Poole, S., Tilders, F. J. H. ve Van Dam, A. M. (2000). Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor- β differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia*, 30(2), 134–142. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(200004\)30:2<134::AID-GLIA3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(200004)30:2<134::AID-GLIA3>3.0.CO;2-3)

- Leng, F. ve Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, 17(March). <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Li, J.-W., Zong, Y., Cao, X.-P., Tan, L. ve Tan, L. (2018). Microglial priming in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*, 6(10), 176–176. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.04.22>
- Li, T. ve Zhu, J. (2019). Entanglement of CCR5 and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11(209). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00209>
- Li, T., Pang, S., Yu, Y., Wu, X., Guo, J. ve Zhang, S. (2013). Proliferation of parenchymal microglia is the main source of microgliosis after ischaemic stroke. *Brain: A Journal of Neurology*, 136(Pt 12), 3578–3588. <https://doi.org/10.1093/brain/awt287>
- Liu, Y., Dai, Y., Li, Q., Chen, C., Chen, H., Song, Y., Hua, F. ve Zhang, Z. (2020). Beta-amyloid activates NLRP3 inflammasome via TLR4 in mouse microglia. *Neuroscience Letters*, 736, 135279. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135279>
- Lopez-Lengowski, K., Kathuria, A., Gerlovin, K. ve Karmacharya, R. (2021). Co-Culturing Microglia and Cortical Neurons Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *The Journal of Visualized Experiments*, 175, e62480. <https://doi.org/10.3791/62480>
- Lučiūnaitė, A., McManus, R. M., Jankunec, M., Rácz, I., Dansokho, C., Dalgėdienė, I., Schwartz, S., Brosseron, F. ve Heneka, M. T. (2020). Soluble A β oligomers and protofibrils induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. *Journal of Neurochemistry*, e14945, 1–12. <https://doi.org/10.1111/jnc.14945>
- Lynch, N. J., Willis, C. L., Nolan, C. C., Roscher, S., Fowler, M. J., Weihe, E., Ray, D. E. ve Schwaebler, W. J. (2004). Microglial activation and increased synthesis of complement component C1q precedes blood-brain barrier dysfunction in rats. *Molecular Immunology*, 40(10), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.08.009>
- Maggi, L., Scianni, M., Branchi, I., Andrea, I. D., Lauro, C. ve Limatola, C. (2011). CX3 CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 5(October),

- 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2011.00022>
- Mamun, A. Al, Uddin, S., Mathew, B. ve Ashraf, G. (2020). Toxic tau : structural origins of tau aggregation in Alzheimer ' s disease. *Neural Regeneration Research*, 15(8), 1417–1420. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.274329>
- Marin-Teva, J. L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., Rooijen, N. V. ve Mallat, M. (2004). Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron*, 41, 535–547.
- Marzan, D. E., Brügger-Verdon, V., West, B. L., Liddelow, S., Samanta, J., ve Salzer, J. L. (2021). Activated microglia drive demyelination via CSF1R signaling. *Glia*, 69(6), 1583–1604. <https://doi.org/10.1002/glia.23980>
- Matcovitch-Natan, O., Winter, D. R., Giladi, A., Aguilar, S. V., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H., David, E., González, F. Z., Perrin, P., Keren-Shaul, H., Gury, M., Lara-Astaiso, D., Thaïss, C. A., Cohen, M., Halpern, K. B., Baruch, K., Deczkowska, A., Lorenzo-Vivas, E. ve Amit, I. (2016). Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science*, 353(6301). <https://doi.org/10.1126/science.aad8670>
- McQuade, A., Coburn, M., Tu, C. H., Hasselmann, J., Davtyan, H. ve Blurton-Jones, M. (2018). Development and validation of a simplified method to generate human microglia from pluripotent stem cells. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0297-x>
- Mescher, A. L. (2016). *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas* (14th ed.). McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1990.tb01556.x>
- Milinkeviciute, G., Henningfield, C. M., Muniak, M. A., Chokr, S. M., Green, K. N. ve Cramer, K. S. (2019). Microglia Regulate Pruning of Specialized Synapses in the Auditory Brainstem. *Frontiers in Neural Circuits*, 13, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00055>
- Milner, R. ve Campbell, I. L. (2003). The Extracellular Matrix and Cytokines Regulate Microglial Integrin Expression and Activation. *The Journal of Immunology*, 170(7), 3850–3858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.7.3850>

- Mitrasinovic, O. M., Perez, G. V., Zhao, F. F., Lee, Y. L., Poon, C. ve Murphy, G. M. (2001). Overexpression of Macrophage Colony-stimulating Factor Receptor on Microglial Cells Induces an Inflammatory Response. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30142–30149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104265200>
- Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H. J. ve Meyermann, R. (2001). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathologica*, 101(3), 249–255. <https://doi.org/10.1007/s004010000284>
- Morillas, A. G., Besson, V. C. ve Lerouet, D. (2021). Microglia and neuroinflammation: What place for p2ry12? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22041636>
- Mouton-liger, F., Rosazza, T., Sepulveda-diaz, J., Hassoun, S., Claire, E., Mangone, G., Brice, A., Michel, P. P., Corvol, J. ve Corti, O. (2018). Parkin deficiency modulates NLRP3 inflammasome activation by attenuating an A20-dependent negative feedback loop. *Glia*, 66, 1736–1751. <https://doi.org/10.1002/glia.23337>
- Muffat, J., Li, Y., Yuan, B., Mitalipova, M., Omer, A., Corcoran, S., Bakiasi, G., Tsai, L., Aubourg, P., Ransohoff, R. M. ve Jaenisch, R. (2016). Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nature Medicine*, 22(11), 1358–1367. <https://doi.org/10.1038/nm.4189>.Efficient
- Murai, N., Mitalipova, M. ve Jaenisch, R. (2020). Functional analysis of CX3CR1 in human induced pluripotent stem (iPS) cell-derived microglia-like cells. *European Journal of Neuroscience*, 52(7), 3667–3678. <https://doi.org/10.1111/ejn.14879>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. ve Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Neuroforum*, 11(3), 95–96. <https://doi.org/10.1515/nf-2005-0304>
- Niraula, A., Sheridan, J. F. ve Godbout, J. P. (2017). Microglia Priming with Aging and Stress. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 318–333. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.185>
- O'Brien, R. J. ve Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>

- Oksanen, M., Petersen, A. J., Naumenko, N., Puttonen, K., Saraja, T., Viitanen, M. ve Rinne, J. O. (2017). PSEN1 Mutant iPSC-Derived Model Reveals Severe Astrocyte Pathology in Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*, 9, 1885–1897. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.016>
- Pan, X., Zhu, Y., Lin, N., Zhang, J., Ye, Q. ve Huang, H. (2011). Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid : implications for Alzheimer ' s disease Microglial phagocytosis induced by fibrillar b -amyloid is attenuated by oligomeric b -amyloid : implications for Alzhe. *Molecular Neurodegeneration*, 6(45).
- Pandya, H., Shen, M. J., Ichikawa, D. M., Sedlock, A. B., Choi, Y., Johnson, K. R., Kim, G., Brown, M. A., Elkahloun, A. G., Maric, D., Sweeney, C. L., Gossa, S., Malech, H. L., McGavern, D. B. ve Park, J. K. (2017). Differentiation of human and murine induced pluripotent stem cells to microglia-like cells. *Nature Neuroscience*, 20(5), 753–759. <https://doi.org/10.1038/nn.4534>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D. ve Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Parajuli, B., Sonobe, Y., Kawanokuchi, J., Doi, Y., Noda, M., Takeuchi, H., Mizuno, T. ve Suzumura, A. (2012). GM-CSF increases LPS-induced production of proinflammatory mediators via upregulation of TLR4 and CD14 in murine microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 9(268). <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-268>
- Park, G., Noh, H., Shao, Z., Ni, P., Qin, Y., Liu, D., Beaudreault, C. P., Park, J. S., Abani, C. P., Park, J. M., Le, D. T., Gonzalez, S. Z., Guan, Y., Cohen, B. M., Mcphie, D. L., Coyle, J. T., Lanz, T. A., Xi, H. S., Yin, C. ve Chung, S. (2020). Activated microglia cause metabolic disruptions in developmental cortical interneurons that persist in interneurons from individuals with schizophrenia. *Nature Neuroscience*, 23, 1352–1364. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00724-1>

- Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W. ve Daley, G. Q. (2007). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451, 141–146. <https://doi.org/10.1038/nature06534>
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., Hempstead, B. L., Littman, D. R. ve Gan, W. B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 155(7), 1596–1609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>
- Patel, S. (2018). Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(11). <https://doi.org/10.1007/s11882-018-0817-3>
- Pei, Y., Jun, P., Behl, M., Sipes, N. S., Shockley, K. R., Rao, M. S., Tice, R. R. ve Zeng, X. (2016). *Comparative Neurotoxicity Screening in Human iPSC-derived Neural Stem Cells, Neurons and Astrocytes* (Vol. 1638). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.048.Comparative>
- Peters, A. ve Sethares, C. F. (n.d.). *Chapter 14 – microglial cells » Fine Structure of the Aging Brain | Boston University*. Retrieved June 29, 2021, from <http://www.bu.edu/agingbrain/chapter-14-microglial-cells/>
- Pfeiffer, T., Avignone, E. ve Nägerl, U. V. (2016). Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. *Scientific Reports*, 6(February), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep32422>
- Piao, C. S., Li, B., Zhang, L. J. ve Zhao, L. R. (2012). Stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor promote neuronal lineage commitment of neural stem cells. *Differentiation*, 83, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.08.006>
- Pocock, J. M. ve Piers, T. M. (2018). Modelling microglial function with induced pluripotent stem cells: An update. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(8), 445–452. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0030-3>
- Polo, J. M., Liu, S., Figueroa, M. E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K. Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., Natesan, S., Wagers, A. J., Melnick, A., Evans, T. ve Hochedlinger, K. (2010). Cell type of origin influences the molecular and

- functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 28(8), 848–855. <https://doi.org/10.1038/nbt.1667>
- Pont-Lezica, L., Beumer, W., Colasse, S., Drexhage, H., Versnel, M. ve Bessis, A. (2014). Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: Functional impact of prenatal inflammation. *European Journal of Neuroscience*, 39(10), 1551–1557. <https://doi.org/10.1111/ejn.12508>
- Rabinovici, G. D. (2019). Late-onset Alzheimer Disease. *Continuum (Minneap Minn)*, 25(1), 14–33.
- Ransohoff, R. M. (2016). *perspective A polarizing question : do M1 and M2 microglia exist ?* 19(8), 987–991. <https://doi.org/10.1038/nm.4338>
- Reynolds, D. S. (2019). A short perspective on the long road to effective treatments for Alzheimer's disease. *British Journal of Pharmacology*, 176(18), 3636–3648. <https://doi.org/10.1111/bph.14581>
- Robinton, D. A. ve Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481, 295–305. <https://doi.org/10.1038/nature10761>
- Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., Grimmig, B. A., Weeber, E. J., Bickford, P. C. ve Gemma, C. (2011). CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16241–16250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011>
- Ross, M. H. ve Pawlina, W. (2016). *Histology A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology* (7th ed.). Wolters Kluwer.
- Roy, A., Jana, A., Yatish, K., Freidt, M. B., Fung, Y. K., Martinson, J. A. ve Pahan, K. (2008). Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(5), 686–699. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.026>
- Ruan, C., Sun, L., Kroshilina, A., Beckers, L. ve Jager, P. De. (2020). A novel Tmem119-tdTomato reporter mouse model for studying microglia in the central nervous system. *Brain Behavior and Immunity*, 83, 180–191.

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.10.009>

- Rustenhoven, J., Smith, A. M., Smyth, L. C., Jansson, D., Scotter, E. L., Swanson, M. E. V., Aalderink, M., Coppieters, N., Narayan, P., Handley, R., Overall, C., Park, T. I. H., Schweder, P., Heppner, P., Curtis, M. A., Faull, R. L. M. ve Dragunow, M. (2018). PU . 1 regulates Alzheimer ' s disease- associated genes in primary human microglia. *Molecular Neurodegeneration*, 13(44), 1–16.
- Salvi, V., Sozio, F., Sozzani, S. ve Prete, A. Del. (2017). *Role of Atypical Chemokine Receptors in Microglial Activation and Polarization*. 9(148), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00148>
- Sanz, J. M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L., Virgilio, F. Di, Sanz, J. M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L. ve Virgilio, F. Di. (2009). Activation of Microglia by Amyloid_Requires P2X7Receptor Expression. *The Journal of Immunology*, 182, 4378–4385. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803612>
- Sarlus, H. ve Heneka, M. (2017). Microglia in Alzheimer ' s disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3240–3249.
- Satoh, J., Kino, Y., Asahina, N., Takitani, M., Miyoshi, J., Ishida, T. ve Saito, Y. (2016). TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology*, 36, 39–49. <https://doi.org/10.1111/neup.12235>
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A. ve Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Seok, J. K., Kang, H. C., Cho, Y. Y., Lee, H. S. ve Lee, J. Y. (2021). Therapeutic regulation of the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases. *Archives of Pharmacal Research*, 44(1), 16–35. <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01307-9>
- Shadfar, S., Ju, C., Lim, H. M. ve Neuroinflammation, A. Á. B. Á. (2015). Involvement of inflammation in Alzheimer ' s disease pathogenesis and therapeutic potential of anti-inflammatory agents. *Archives of Pharmacal Research*, 38(12), 2106–2119.

<https://doi.org/10.1007/s12272-015-0648-x>

- Shao, B., Xu, Z., Han, B., Su, D. ve Liu, C. (2015). *NLRP3 inflammasome and its inhibitors : a review*. 6(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00262>
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C. ve Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(2), 115–130. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-wadiche, L. S., Tsirka, S. E. ve Maletic-savatic, M. (2010). Article Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Stem Cell*, 7(4), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014>
- Sousa, C., Biber, K. ve Michelucci, A. (2017). Cellular and molecular characterization of microglia: A unique immune cell population. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00198>
- Spangenberg, E., Severson, P. L., Hohs, L. A., Crapser, J., Zhang, J., Burton, E. A., Zhang, Y., Spevak, W., Lin, J., Phan, N. Y., Habets, G., Rymar, A., Tsang, G., Walters, J., Nespi, M., Singh, P., Broome, S., Ibrahim, P., Zhang, C. ve Green, K. N. (2019). impairs parenchymal plaque development in an. *Nature Communications*, 10(3758). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11674-z>
- Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F. ve Garel, S. (2014). Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Reports*, 8(5), 1271–1279. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.042>
- Stancu, I. C., Cremers, N., Vanrusselt, H., Couturier, J., Vanoosthuysse, A., Kessels, S., Lodder, C., Brône, B., Huaux, F., Octave, J. N., Terwel, D. ve Dewachter, I. (2019). Aggregated Tau activates NLRP3–ASC inflammasome exacerbating exogenously seeded and non-exogenously seeded Tau pathology in vivo. *Acta Neuropathologica*, 137(4), 599–617. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-01957-y>
- Stansley, B., Post, J. ve Hensley, K. (2012). A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer’s disease. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-115>

- Stewart, W. F., Kawas, C., Corrada, M., Stewart, W. F., Kawas, C., Corrada, M. ve Metter, E. J. (2012). *Risk of Alzheimer ' s disease and duration of NSAID use*. <https://doi.org/10.1212/WNL.48.3.626>
- Strooper, B. De, Iwatsubo, T. ve Wolfe, M. S. (2012). Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a006304.
- Suh, H., Zhao, M., Derico, L., Choi, N. ve Lee, S. C. (2013). Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia : differential regulation by inflammatory mediators. *Journal of Neuroinflammation*, 10(37), 1–12.
- Sulistio, Y. A., Lee, H. K., Jung, S. J. ve Heese, K. (2018). Interleukin-6-Mediated Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Neural Differentiation. *Molecular Neurobiology*, 55, 3513–3522. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0594-3>
- Surendranathan, A., Su, L., Mak, E., Passamonti, L., Hong, Y. T., Arnold, R., Rodríguez, P. V., Bevan-Jones, W. R., Brain, S. A. E., Fryer, T. D., Aigbirhio, F. I., Rowe, J. B. ve O'Brien, J. T. (2018). Early microglial activation and peripheral inflammation in dementia with Lewy bodies. *Brain*, 141(12), 3415–3427. <https://doi.org/10.1093/brain/awy265>
- Szymura, J., Kubica, J. ve Wiecek, M. (2020). The Immunomodulatory Effects of Systematic Exercise in Older Adults and People with Parkinson ' s Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 9(184), 1–17.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. ve Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131, 861–872.
- Takahashi, K. ve Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takata, K., Kozaki, T., Lee, C. Z. W., Thion, M. S., Otsuka, M., Lim, S., Utami, K. H., Fidan, K., Park, D. S., Malleret, B., Chakarov, S., See, P., Low, D., Low, G., Garcia-Miralles, M., Zeng, R., Zhang, J., Goh, C. C., Gul, A. ve Ginhoux, F. (2017). Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function.

- Immunity*, 47(1), 183-198.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.017>
- Takatori, S., Wang, W., Iguchi, A. ve Tomita, T. (2019). *Genetic Risk Factors for Alzheimer Disease : Emerging Roles of Microglia in Disease Pathomechanisms*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-05542-4>
- Tan, Y. L., Yuan, Y. ve Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular Psychiatry*, 25(2), 351–367. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>
- Tancredi, V., D’Arcangelo, G., Grassi, F., Tarroni, P., Palmieri, G., Santoni, A. ve Eusebi, F. (1992). Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters*, 146(2), 176–178. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90071-E](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90071-E)
- Tang, Y. ve Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(2), 1181–1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Tapia-Abellán, A., Angosto-bazarra, D., Martínez-banaclocha, H., Torre-minguela, C. De, Cerón-carrasco, J. P., Pérez-sánchez, H., Arostegui, J. I., Pelegrin, P. ve Bret, N. (2019). MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. *Nature Chemical Biology*, 15, 560–564. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0278-6>
- Tejera, D. ve Heneka, M. T. (2016). Microglia in Alzheimer’s Disease: The Good, the Bad and the Ugly. *Current Alzheimer Research*, 13(4), 370–380. <https://doi.org/10.2174/1567205013666151116125012>
- Tejera, D., Mercan, D., Sanchez-Caro, J. M., Hanan, M., Greenberg, D., Soreq, H., Latz, E., Golenbock, D. ve Heneka, M. T. (2019). Systemic inflammation impairs microglial A β clearance through NLRP 3 inflammasome . *The EMBO Journal*, 38(17). <https://doi.org/10.15252/emboj.2018101064>
- Torres-Platas, S. G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G. D., Cruceanu, C., Turecki, G., Giros, B. ve Mechawar, N. (2014). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-12>

- Tremblay, M. È., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A. ve Nimmerjahn, A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16064–16069. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011>
- TÜİK. (2020, 18 Mart). *İstatistiklerle Yaşlılar, 2019*. Türkiye İstatistik Kurumu. Erişim 22.11.2021, <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=İstatistiklerle-Yaslılar-2019-33712>
- Türkiye Alzheimer Derneği. (2021). *Türkiye’de 600.000 aile Alzheimer hastalığı ile mücadele ediyor*. Türkiye Alzheimer Derneği. Erişim 22.11.2021, <https://www.alzheimerdernegi.org.tr/2020/08/29/turkiyede-600-000-aile-alzheimer-hastaligi-ile-mucadele-ediyor/>
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M. ve Yamashita, T. (2013). Layer v cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature Neuroscience*, 16(5), 543–551. <https://doi.org/10.1038/nn.3358>
- Ulland, T. K. ve Colonna, M. (2018). TREM2 — a key player in microglial biology and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 14, 667–675. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0072-1>
- Valdearcos, M., Douglass, J. D., Robblee, M. M., Dorfman, M. D., Stifler, D. R., Bennett, M. L., Gerritse, I., Fasnacht, R., Barres, B. A., Thaler, J. P. ve Koliwad, S. K. (2017). Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility. *Cell Metabolism*, 26(1), 185-197.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.015>
- Vance, R. E., Isberg, R. R. ve Portnoy, D. A. (2009). Pathogenic Microbes By the Innate Immune System. *Cell Host Microbe*, 6(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.06.007>.Patterns
- Venegas, C. ve Heneka, M. T. (2019). Inflammasome-mediated innate immunity in Alzheimer’s disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(12), 13075–13084. <https://doi.org/10.1096/fj.201900439>
- Venegas, C., Kumar, S., Franklin, B. S., Dierkes, T., Brinkschulte, R., Tejera, D., Vieira-Saecker, A., Schwartz, S., Santarelli, F., Kummer, M. P., Griep, A., Gelpi,

- E., Beilharz, M., Riedel, D., Golenbock, D. T., Geyer, M., Walter, J., Latz, E. ve Heneka, M. T. (2017). Microglia-derived ASC specks crossseed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature*, 552(7685), 355–361. <https://doi.org/10.1038/nature25158>
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S. ve Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *Journal of Neuroscience*, 29(13), 3974–3980. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009>
- Walton, N., Sutter, B., Laywell, E., Levkoff, L., Kearns, S., Marshall 2nd, G., Scheffler, B. ve Steindler, D. (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia*, 54, 815–825. <https://doi.org/10.1002/glia>
- Wang, C., Yue, H., Hu, Z., Shen, Y., Ma, J., Li, J., Wang, X. D., Wang, L., Sun, B., Shi, P., Wang, L. ve Gu, Y. (2020). Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination. *Science*, 367(6478), 688–694. <https://doi.org/10.1126/science.aaz2288>
- Wang, J., Liu, J., Zhou, R., Ding, X., Zhang, Q., Zhang, C. ve Li, L. (2018). Zika virus infected primary microglia impairs NPCs proliferation and differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497(2), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.118>
- Wang, S., Su, X., Xu, L., Chang, C., Yao, Y., Komal, S., Cha, X., Zang, M., Ouyang, X., Zhang, L. ve Han, S. (2020). Glycogen synthase kinase-3 β inhibition alleviates activation of the NLRP3 inflammasome in myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 149, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.09.009>
- Wang, Y. ve Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
- Wes, P. D., Holtman, I. R., Boddeke, E. W. G. M., Thomas, M. ve Eggen, B. J. L. (2016). Next Generation Transcriptomics and Genomics Elucidate Biological Complexity of Microglia in Health and Disease. *Glia*, 64, 197–213. <https://doi.org/10.1002/glia.22866>

- Wilson, E. N., Swarovski, M. S., Linortner, P., Shahid, M., Zuckerman, A. J., Wang, Q., Channappa, D., Minhas, P. S., Mhatre, S. D., Plowey, E. D., Quinn, J. F., Zabetian, C. P., Tian, L., Longo, F. M., Cholerton, B., Montine, T. J., Poston, K. L. ve Andreasson, K. I. (2020). Soluble TREM2 is elevated in parkinson's disease subgroups with increased csf tau. *Brain*, 143(3), 932–943. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa021>
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M. ve Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 619–643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- Xu, R., Li, X., Boreland, A. J., Posyton, A., Kwan, K., Hart, R. P. ve Jiang, P. (2020). Human iPSC-derived mature microglia retain their identity and functionally integrate in the chimeric mouse brain. *Nature Communications*, 11, 1577. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15411-9>
- Yin, J., Zhao, F., Chojnacki, J. E., Fulp, J. ve Klein, W. L. (2018). NLRP3 Inflammasome Inhibitor Ameliorates Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 55, 1977–1987. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0467-9>
- Yu, Y. ve Ye, R. D. (2015). Microglial A β Receptors in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35, 71–83. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0101-6>
- Zahid, A., Li, B., John, A., Kombe, K. ve Jin, T. (2019). Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Frontiers in Immunology*, 10:2538, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02538>
- Zakrzewski, W., Dobrzy, M., Szymonowicz, M. ve Rybak, Z. (2019). Stem cells : past , present , and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10:68, 1–22.
- Zhang, J., Xie, X., Tang, M., Zhang, J., Zhang, B., Zhao, Q., Han, Y., Yan, W., Peng, C. ve You, Z. (2017). Salvianolic acid B promotes microglial M2-polarization and rescues neurogenesis in stress-exposed mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 66, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.07.012>
- Zhang, S. S., Liu, M., Liu, D. N., Yang, Y. L., Du, G. H. ve Wang, Y. H. (2021). TLR4 - IN - C34 Inhibits Lipopolysaccharide - Stimulated Inflammatory Responses via

- Downregulating TLR4 / MyD88 / NF - κ B / NLRP3 Signaling Pathway and Reducing ROS Generation in BV2 Cells. *Inflammation*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01588-8>
- Zhao, J., Wang, H., Huang, Y., Zhang, H., Wang, S., Gaskin, F., Yang, N. ve Fu, S. M. (2015). Lupus nephritis: Glycogen synthase kinase 3 β promotion of renal damage through activation of the NLRP3 inflammasome in lupus-prone mice. *Arthritis and Rheumatology*, 67(4), 1036–1044. <https://doi.org/10.1002/art.38993>
- Zhao, Y., Wu, X., Li, X., Jiang, L., Gui, X., Liu, Y., Sun, Y. ve Zhu, B. (2018). TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron*, 97, 1023–1031. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.031>
- Zheng, H., Cheng, B., Li, Y., Li, X., Chen, X. ve Zhang, Y. W. (2018). TREM2 in Alzheimer's Disease: Microglial Survival and Energy Metabolism. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10:395. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00395>
- Zhong, L., Wang, Z., Wang, D., Wang, Z., Martens, Y. A., Wu, L., Xu, Y., Wang, K., Li, J., Huang, R., Can, D., Xu, H., Bu, G. ve Chen, X. (2018). Amyloid-beta modulates microglial responses by binding to the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2). *Molecular Neurodegeneration*, 13:15, 1–12.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ALZHEİMER HASTALARININ FİBROBLAST KAYNAKLI İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİNDEN FARKLILAŞTIRILAN MİKROGLİA HÜCRELERİNİN KARAKTERİZASYONU

ORJİNALLİK RAPORU

% 4	% 4	% 1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
2	link.springer.com İnternet Kaynağı	<% 1
3	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.researchsquare.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	ihslc.mehmetakif.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	tur.acousticbiotech.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.uakb.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	issuu.com İnternet Kaynağı	<% 1