İzel YILMAZ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2021

T.C.
BURSA ULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM
DALI

MEME KANSERİNDE FOLİKÜLER YARDIMCI T LENFOSİTLERİN FONKSİYONEL VE MOLEKÜLER ANALİZİ

İzel YILMAZ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2021

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TIP
FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ
ANABİLİM DALI

MEME KANSERİNDE FOLİKÜLER YARDIMCI T LENFOSİTLERİN FONKSİYONEL VE MOLEKÜLER ANALİZİ

İzel YILMAZ

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

BURSA-2021

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "MEME KANSERİNDE FOLİKÜLER YARDIMCI T LENFOSİTLERİN FONKSİYONEL VE MOLEKÜLER ANALİZİ" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Adı Soyadı
Tarih ve İmza

İzel YILMAZ
19/11/2021

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

19/11/2021

Adı Soyadı: İzel YILMAZ

Anabilim Dalı: İmmünoloji

Tez Konusu: Meme kanserinde foliküler yardımcı T lenfositlerin fonksiyonel ve moleküler analizi

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	✓	❑	
Dış Kapak Sayfası	✓	❑	
İç Kapak Sayfası	✓	❑	
Kabul Onay Sayfası	✓	❑	
Sayfa Düzeni	✓	❑	
İçindekiler Sayfası	✓	❑	
Yazı Karakteri	✓	❑	
Satır Aralıkları	✓	❑	
Başlıklar	✓	❑	
Sayfa Numaraları	✓	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	✓	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	✓	❑	
Kaynaklar	✓	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Ünvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

İmza:

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK
İÇ KAPAK
ETİK BEYANI II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU III
İÇİNDEKİLER IV
TÜRKÇE ÖZET VII
İNGİLİZCE ÖZET VIII
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi 3
2.2. Meme Kanseri Gelişimi 4
2.3. Meme Kanserinin Moleküler Alt Grupları 6
2.4. Meme Kanserinin Klinik ve Patolojik Evreleri 7
2.5. Meme Kanserinde İmmün Yanıt 10
2.6. Edinsel İmmün Yanıtların Meme Kanseri Üzerindeki Etkisi 11
2.6.1. Meme Kanserinde B Hücre Cevabı 11
2.6.2. Meme Kanserinde T Hücre Yanıtları 13
2.6.3. T hücre aktivasyonu 14
2.6.4. Aktive Olan T Hücrelerde İnhibitör Reseptör Sinyalleri 20
2.6.5. Efektör ve Hafıza T Hücreleri 23
2.6.6. $CD4^+$ T Hücre Alt Grupları 24
2.7. Tfh Hücreleri ve Meme Kanseri İlişkisi 32
3. GEREÇ ve YÖNTEM 34
3.1. Hücre Kültürü 34
3.1.1. Hasta Lenf Nodu Dokusundan ve Periferik Kandan Hücre İzolasyonu ... 34
3.1.1.1. Lenf Nodu Örneklerinden Hücre İzolasyonu 34
3.1.1.2. Periferik Kandan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PMNH) İzolasyonu 35
3.1.2. Hücre Sayımı 36
3.1.3. Lenf Nodu Dokusundan ve PMNH'lerden Manyetik Aktive Hücre Ayrıştırma (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS) Yöntemi ile $CD4^+$ T Hücrelerin İzolasyonu 37
3.1.4. Floresan-Aktive Hücre Ayırma (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) 38
3.1.5. $CD4^+$ T Hücrelerin Fonksiyonel Analizler İçin Ekimi 40
3.2. İmmünolojik Analiz Yöntemleri 41
3.2.1. Akım Sitometri ile İmmünfenotipleme 41
3.2.2. Akım Sitometri ile Fonksiyonel Analizler 43
3.2.2.1. Uyarılan $CD4^+$ T Lenfositlerdeki Erken Aktivasyon Reseptör İfadelerindeki Değişimlerin İncelenmesi 44
3.2.2.2. Uyarılan $CD4^+$ T lenfositlerdeki inhibitör reseptör ifadesindeki değişimlerin incelenmesi 44

3.2.3. Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) Aracılığı ile Hücre Çoğalması Analizleri 45
3.2.4. İmmünfloresan Boyama Teknikleri 45
3.2.4.1. Lenf Nodu Kesitlerinin İmmün Floresan Boyama için Hazırlanması 45
3.2.4.2. Floresan Aktive Hücre Ayırma (FACS) Sonrası Saflaştırılan Hücrelerin İmmün Floresan Boyama için Sitospin ile Lama Aktarımı 46
3.2.4.3. LN ve Sitospinden Elde Edilen Örnekler için İmmün Florasan Boyama 46
3.3. Moleküler Teknikler 48
3.3.1. Lenf Nodu Örneklerinden RNA İzolasyonu 48
3.3.2. FACS Sonrası Elde Edilen Popülasyonlardan RNA İzolasyonu 49
3.3.3. Elde Edilen RNA'lardan cDNA Sentezi 49
3.3.4. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) 50
3.3.5. Agarose Jel Elektorforez 53
3.3.6. Gerçek-Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) Uygulaması 54
3.4. İstatiksel Analizler 55
4. BULGULAR 56
4.1. Meme Kanseri LN ve Periferik Kan Örneklerindeki T Hücrelerinin İmmün Fenotiplendirmesi ve Tfh İlişkili Belirteçlerin Analiz Sonuçları 56
4.1.1. $CD4^+$ T Hücrelerinin İmmünfenotiplendirilmesi ve Tfh İlişkili Belirteçlerin Analiz Sonuçları 56
4.1.2. $CD8^+$ T Hücrelerinin İmmünfenotiplendirilmesi ve Tfh İlişkili Belirteçlerin Analiz Sonuçları 63
4.1.3. $CD4^+$ ve $CD8^+$ T ve Tfh İlişkili Belirteçlerin Dağılımlarının Klinik Veriler ile Analiz Sonuçları 70
4.2. Meme Kanseri Lenf Nodu Kesitlerinden İmmün Floresan Boyama Sonuçları 76
4.3. $CD4^+$ T Hücrelerin Uyarım Sonrası Proliferasyonu ve $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh İlişkili Belirteçleri Taşıyan Hücrelere Farklılaşması 77
4.4. Anti-CD3 ve Anti-CD28 Uyarımı ile $CD4^+$ T hücrelerinde Tfh Fenotipinin ve Erken Aktivasyon Belirteçlerinin Zamana Bağlı Değişimi 81
4.5. Anti-CD3 ve Anti-CD28 Uyarımı ile $CD4^+$ T hücrelerinde Tfh Fenotipinin ve İnhibitör Reseptörlerinin Zamana Bağlı Değişimi 85
4.6. Anti-CD3 ve Anti-CD28 Uyarımı Sonrası $CD4^+$ T Hücrelerinin PD-1 ve CXCR5 Tfh Fenotipik Belirteçleri Yüzey İfadelerine Bağlı Hücre Popülasyonlarına Safalaştırılması ve T Hücre Alt Grupları İlişkli Gen Ekspresyon Analizleri 90
4.7. Anti-CD3 ve Anti-CD28 Uyarımı Sonrası $CD4^+$ T Hücrelerinin PD-1 ve CXCR5 Tfh İlişkili Belirteçleri Yüzey İfadelerine Bağlı Hücre Popülasyonlarına Safalştırılması ve İmmün Floresan Boyama Sonuçları 92
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 93
5.1. Meme Kanseri LN ve Periferik Kan Örneklerindeki $CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh Hücrelerinin Fenotipik Analizleri 94
5.1.1. $CD4^+$ Tfh Hücrelerinin İmmün Fenotiplendirme Sonuçları Hakkında ... 94
5.1.2. $CD8^+$ Tfh Hücrelerinin İmmün Fenotiplendirme Sonuçları Hakkında ... 97
5.1.3. $CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh Hücrelerinin İmmün Fenotiplendirme Sonuçlarının Klinik Veriler ile Analizi Hakkında 101

5.2. Lenf Nodu Kesitlerinden İmmün Floresan Boyama Sonuçları 104
5.3. $CD4^+$ T Hücrelerin Uyarım Sonrası Tfh Hücrelerine Farklılaşması 105
5.4. $CD4^+$ T Hücrelerin Uyarım Sonrası Tfh Fenoitipik Belirteçlerini Bulunduran Hücrelere Farklılaşması Sırasında Erken Aktivasyon Belirteçlerinin Zamana Bağlı Değişimi 107
5.5. $CD4^+$ T Hücrelerin Uyarım Sonrası Tfh Hücrelerine Farklılaşması Sırasında İnhibitör Reseptörlerin Zamana Bağlı Değişimi 109
5.6. $CD4^+$ T Hücrelerin Uyarım Sonrası Tfh Hücrelerine Farklılaşması ve Bu Popülasyonlardaki T Alt Gruplarına Ait Belirteçlerin Analizleri 111
5.7. Özet Sonuç ve Öneriler 115
6. KAYNAKLAR 119
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 136
8. EKLER 138
9. TEŞEKKÜR 141
10. ÖZGEÇMİŞ 142

TÜRKÇE ÖZET

T foliküler yardımcı (Tfh) hücreler, lenf nodu (LN)'nda antijene özgü antikor üreten B hücrelerinin olgunlaşmasında görev alır. Kanser hastalarının LN ve periferik kanlarında bulunan Tfh hücrelerinin moleküler ve fonksiyonel karakterizasyonu net bir şekilde tanımlanmamıştır.

Bu çalışmada fenotipik karakterizasyon için meme kanseri hastaların LN ve periferik kanından izole edilen lenfositler kullanıldı ve CD4, CD8, PD-1, CXCR5, CCR7, CD45RO, CD127, CD25, TIM-3, LAG-3, CTLA-4 ve ICOS ifadeleri, akım sitometresi aracılı analiz edildi ve klinik veriler ışığında incelendi. LN kesitlerinden CD4, CD19 ve BCL-6 immünofloresan boyamalar yapıldı. Fonksiyonel analizlerde, $CD4^+$ T hücreleri izole edildi ve anti-CD3/CD28 uyarımı sonrası zamana bağlı; PD-1 ve CXCR5 ilişkili, erken aktivasyon ve inhibitör belirteçlerinin ifadelerindeki değişimler ve proliferasyonları incelendi. Uyarım sonrası $CD4^+$ T hücreler PD-1 ve CXCR5 bağımlı olarak izole edildi ve bu hücrelerdeki BCL-6, ICOS ve TIM-3 ifadeleri immünfloresan boyama ile ve bu popülasyonlardaki diğer T hücre alt grupları ile ilişkili moleküllerinin mRNA düzeyi RT-PZR tekniği ile araştırıldı.

Sonuç olarak, LN'de dolaşıma kıyasla daha yüksek Tfh ilişkili $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücreler tespit edildi, bu hücrelerin $CCR7^+CD45RO^+$ merkezi bellek fenotipik özelliği taşıdığı ve yüksek oranda CD127, TIM-3 ve ICOS ifadesine sahip olduğu saptandı. Ayrıca, $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin yüksek oranda çoğalma kapasitesine sahip olduğu ve uyarım ile erken aktivasyon ve inhibitör reseptör ifadelerini arttırdığı tespit edildi. Uyarım sonrası $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinde yüksek oranda BCL-6 mRNA düzeyi, ICOS ve TIM-3 ifadesi de görüldü. Böylelikle çalışmamız, Tfh hücrelerinin esas olarak LN'de yüksek çoğalma kapasitesindeki $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+BCL\text{-}6^+ICOS^+TIM\text{-}3^+$ hücreler olarak karakterize edilebileceğine ışık tutmaktadır ve bu hücrelerinin aktivasyonunun hedeflenmesi ile anti-kanser hümoral bağışıklık yanıtını indüklenebileceğini düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Edinsel İmmünite, T Foliküler Yardımcı Hücreler, Meme Kanseri

İNGİLİZCE ÖZET

Functional and molecular analysis of follicular helper T lymphocytes in breast cancer patients

T follicular helper (Tfh) cells are involved in the maturation of antigen-specific antibody-producing B cells in the lymph node (LN). The molecular and functional characterization of Tfh cells found in the LN and peripheral blood of cancer patients has not been clearly defined.

In this study, lymphocytes isolated from the breast cancer patients' LN and peripheral blood were used in phenotypical characterization; CD4, CD8, PD-1, CXCR5, CCR7, CD45RO, CD127, CD25, TIM-3, LAG-3, CTLA-4 and ICOS expression were analyzed with flow cytometer and evaluated in the light of clinical data. Immunofluorescence staining was conducted for CD4, CD19 and BCL-6 on LN sections. In functional analysis, $CD4^+$ T cells were isolated from samples, stimulated with anti-CD3/CD28 microbeads and time dependent expression of PD-1 and CXCR5 related early activation and inhibitory markers and their proliferation were examined. After stimulation, $CD4^+$ T cells were isolated as PD-1 and CXCR5 dependent and in these cells BCL-6, ICOS and TIM-3 expressions were investigated by immunofluorescence staining and the mRNA level of molecules which are associated with other T cell subgroups were analysed with RT-PZR technique.

As a result, higher Tfh related $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ cells were detected in the LN compared to the circulation, these cells were found to have $CCR7^+CD45RO^+$ central memory phenotypic features and have high levels of CD127, TIM-3 and ICOS expression. In addition, it was determined that $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ cells have a higher proliferation capacity and increase early activation and inhibitory receptor expressions with stimulation. High levels of BCL-6 mRNA, ICOS and TIM-3 expression were also observed in $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ cells after stimulation. Thus, our study highlights that Tfh cells can be characterized mainly as $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+BCL\text{-}6^+ICOS^+TIM\text{-}3^+$ cells with high proliferative capacity in LN, and it is suggested that targeting the activation of these cells can induce anti-cancer humoral immune response.

Keywords: Adoptive Immunity, T Follicular Helper Cells, Breast Cancer

1. GİRİŞ

Meme kanseri, dünya genelinde en çok görülen ikinci kanser tipi olup, kadınlarda en çok tanı konan kanser türüdür. Meme kanserinde ilk metastaz noktaları sentinel ve aksiler lenf nodlarıdır. Sağlıklı bireylerde de lenf nodu (LN) germianl merkez bölgesinde T foliküler yardımcı (Tfh) hücreler yüksek oranda bulunup, antijen-spesifik antikor üretiminden sorumlu B hücrelerin olgunlaşması ve farklılaşmasında rol alırlar. Bu nedenle anti-kanser hümoral immün yanıtların açıklanabilmesinde Tfh hücrelerinin fenotipik ve fonksiyonel özelliklerinin daha ayrıntılı incelenmesi ve açıklanması gerekmektedir. Literatürde birçok çalışmada sağlıklı bireylerde, Tfh'ler $CD4^+$ T hücrelerin alt grupları olup, Bcl6 transkripsiyon faktörünün ve CXCR5, PD-1, ICOS ve CD40L yüzey belirteçlerinin ifadeleri ile karakterize edilmektedir. Bu hücre grubu sekonder lenfoid organ (SLO)'larda bulunduğu gibi düşük oranda CD69, ICOS ve PD-1 ifade edenleri periferik kanda da tespit edilmiştir (Meng ve ark., 2018). Tfh hücrelerinin kanser hastalarındaki oranı ve etkisi ilk kez meme kanseri hastalarında tersiyer lenfoid yapılarda incelenmiştir (TLS). Bu yapılarda Tfh hücrelerinin bulunması CXCL13 ifadesi ile ilişkili şekilde gözlenmiştir (Gu-Trantien ve ark., 2013). Ayrıca, aynı çalışmada, $PD\text{-}1^{hi}CXCR5^-$ $CD4^+$ T hücrelerin konvansiyonel $PD\text{-}1^{hi}CXCR5^+CD4^+$ Tfh hücreleri ile aynı fenotipik özelliği göstermediği meme kanseri hastalarının periferik kanında bu hücre grubunun B hücre yanıtını indüklemede de görevli olduğu tespit edilmiştir (Gu-Trantien ve ark., 2013). Aynı grup tarafından yapılan ilerleyen çalışmalarda, meme kanseri hastalarının tümör mikro çevresinde de $PD\text{-}1^{hi}CXCR5^-CXCL13^+CD4^+$ Tfh hücrelerinin varlığı ile yüksek oranda IL-21 üretiminin olduğu ve tümör infilitre lenfosit (TIL) oranınında bu bölgede arttığı dolayısıyla hastaların sağ kalım süresinin uzadığı tespit edilmiştir (Gu-Trantien ve ark., 2017a). Hasta kanında kontrol grubuna kıyasla, PD-1 ve TIM-3 inhibitör reseptörlerini bulunduran $CXCL13^+CD4^+$ Tfh hücrelerinin daha yüksek olduğu da saptanmıştır. Aynı çalışmada, TIM-3'ün Tfh tükenmişliği ile olan etkisini araştırmak için de $CXCL13^+CD4^+$ Tfh hücreleri anti-

CD3/CD28 ile uyarılmış ve TIM-3$^+$ Tfh hücrelerin düşük düzey CXCL13 kemokini ve IL-21 sitokini ürettiği ve düşük oranda prolifere oldukları görülmüştür. TIM-3$^+$ Tfh hücrelerinin de düşük düzeyde IgM, IgG ve IgA üretimine neden olduğu saptanmış ve bu durumda TIM-3 pozitifliğinin Tfh hücre aracılı B hücre yanıtını bastırdığını düşündürmüştür. Ancak tüm bu anlatılan noktalar dikkatle analiz edildiğinde, klinikte halen meme kanseri hastalarında Tfh hücrelerinin fenotipik karekterizasyonu için moleküler belirteçler net olmamakla birlikte, bu hücrelerdeki TIM-3 ve PD-1 inhibitör reseptör pozitifliği nedeni ile hümoral anti-tümör immün yanıtın baskılandığı düşünülse de bu hücrelerdeki özelikle fonksiyonel mekanizmanın LN metastazı olan hastalardaki klinik anlamlılığı halen araştırılmaktadır.

Bu tez çalışmasında da hastaların LN, periferik kan ve kontrol gruplarının periferik kan örneklerinden elde edilen CD4$^+$ ve CD8$^+$ Tfh hücrelerinin fenotipik karakterizasyonunu tanımlanması ve verilerin hastaların neoadjuvant kullanımına, klinik ve histopatolojik skorlarına, HER2 ifadesine bağlı incelenmesi ve LN metastazı olan hastalarda CD4$^+$ Tfh'lerin fonksiyonel özelliklerinin açıklanması amaçlanmıştır. Bu nedenle bu çalışma, literatürde meme kanserinde LN ve pereiferik kan kıyaslamalı bir şekilde Tfh hücrelerini bu kadar ayrıntılı incelenmesi bakımından ilk olma niteliğindedir. Ayrıca, hedeflenen amaçlar doğrultusunda, meme kanserinin de ilk metaztaz noktalarının LN olduğu bilindiği üzere CD4$^+$PD-1$^+$CXCR5$^+$ Tfh hücrelerinin bu noktada yüksek oranda bulunup B hücreler ile etkileşim halinde olması beklenmekle birlikte, bu hücrelerin antijenle karşılaşmış hücreler olabileceğinden yüksek oranda merkezi hafıza hücreler olması beklenmektedir. Ayrıca, metastatik LN'de neoadjuvan tedavi almamış, erken evre ve HER2 pozitif hastalarda Tfh hücrelerinin oranlarının daha yüksek olabileceği düşünülmektedir. Fonksiyonel analizlerde de LN'lerde bulunan CD4$^+$ T hücrelerin, uyarım sonucu PD-1 ifadesine ek CXCR5 ekspresyonunu da artırıp Tfh hücrelerine yüksek oranda dönüşebileceği ve PD-1 harici uyarım sonrası başka inhibitör reseptörlerinde ifadesini PD-1$^-$ hücre gruplarına göre yüksek oranda ifade edebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, çalışmamızdan elde edilen verilerin, Tfh hücrelerinin hedeflenmesi ile anti-tümör hümoral immün yanıtların indüklenebilmesine yönelik çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

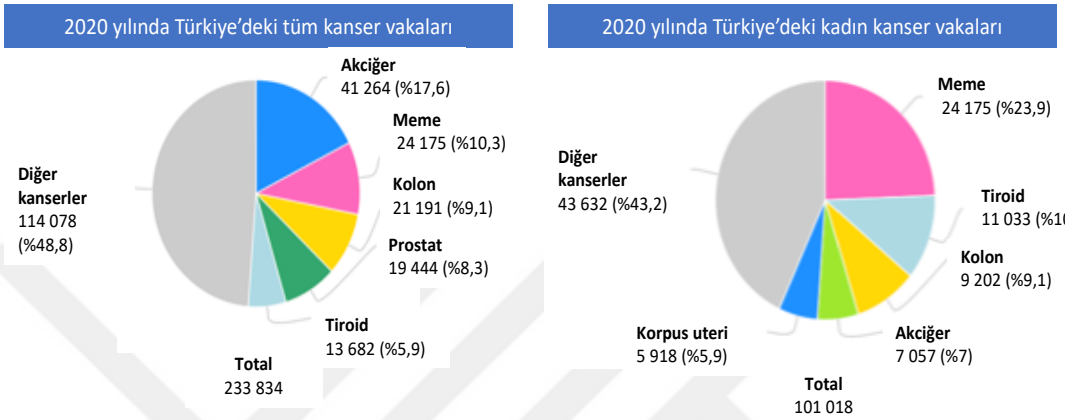
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri, dünya genelinde en çok görülen ikinci kanser tipi olup, kadınlarda en çok tanı konan kanser türüdür. Amerika Birleşik Devletleri'nde her 8 kadından birinin meme kanseri hastası olduğu tespit edilmiştir (Momenimovahed, & Salehiniya, 2019). 2017 yılında elde edilen veriler ışığında Amerika Birleşik Devlerinde, yaklaşık 252710 yeni invazif ve 6341 in situ meme kanseri tanısı konmuştur (DeSantis, Ma, Goding Sauer, Newman, & Jemal, 2017). Yapılan araştırmalar sonucunda da dünya genelinde meme kanseri olgularının %24'ünün Asya-Pasifik bölgesinden olup yüksek insidans oranlarının özellikle Çin, Japonya ve Endonezya'da olduğu tespit edilmiştir (Ghoncheh, Momenimovahed, & Salehiniya, 2016; Youlden, Cramb, & Yip, 2014). İnsidansının ve prevalansın artmasına rağmen gelişen teknolojilerin yardımı ile meme kanserini saptamaya yönemlik tarama metodlarının ve tedavi yöntemlerinin belirgin olarak geliştirilmesi ile meme kanserinde sağ kalım oranının (survival rate) gelişmiş ülkelerde belirgin olarak arttığı görülmüştür (Rojas & Stuckey, 2016). Yapılan araştırmalar ışığında meme kanserinden kurtulanların %64'ünün 65 yaş ve üzeri olduğu ve sadece 7%'sinin 50 yaş altı olduğu raporlanmıştır (Miller ve ark., 2019). Gelişmiş ülkelerde meme kanserinden 5 yıl sağ kalım %89 olarak tespit edilirken, Afrika gibi tedavi yöntemleri gelişmemiş ülkelerde sağ kalım oranın düştüğü görülmüştür (Abdulrahman, & Rahman, 2012).

Dünya Sağlık örgütünün 2020 yılındaki bildirisine göre meme kanseri vakaları ülkemizde de en sık görülen 2. kanser tipi olup tüm kanser vakalarının %10,3'ünü oluşturulduğu, kadınlarda ise en sık görülen 1. kanser türü olup tüm kadın kanser

vakalarının %23,9'unu oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, aynı veri tabanında 100000 kişi için yaş-standardize oran (ASR) baz alınarak insidans oranının kadın vakalarda 46,6 ile en yüksek insidansa sahip kanser olduğu ancak tüm hastalar arasında mortalite oranın ise 12,9 ile akciğer kanserinden sonra 2. en yüksek mortalite oranına sahip kanser olduğu saptanmıştır (GLOBOCAN, 2020).



Şekil 1: GLOBOCON 2020 veri tabanı verilerine göre Türkiye popülasyonundaki kanser hastalığı sayısı ve kanser türleri arasındaki yüzdesel oranın dağılımı (GLOBOCAN, 2020)

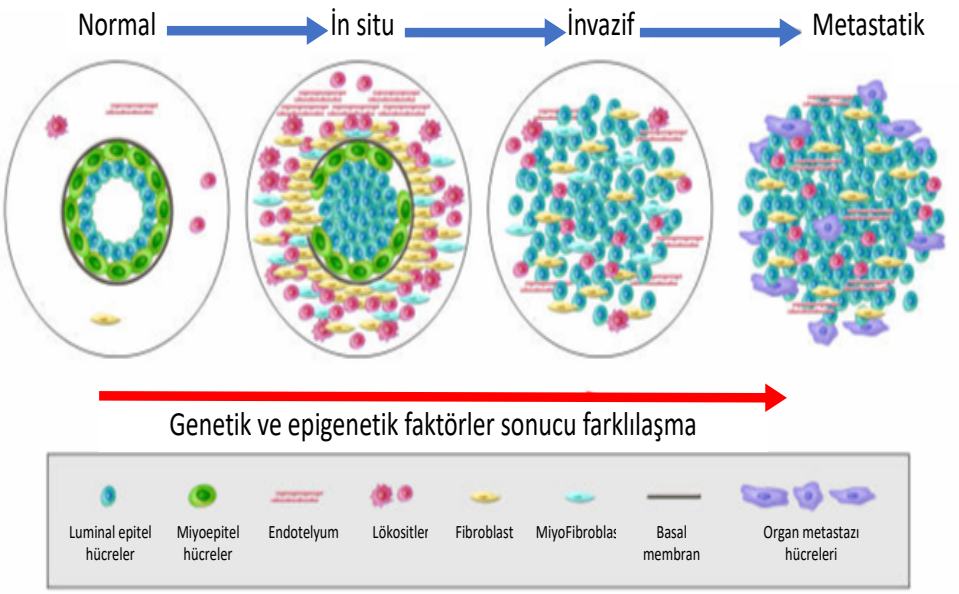
2.2. Meme Kanseri Gelişimi

Meme dokusu, karmaşık bir stroma içine gömülü, dallanmış epitel tüp ağından oluşur. Meme epitelyumu, embriyonik gelişim sırasında epitelyal-mezenkimal hücrelerin etkileşimi ve ektodermin genişlemesi sonucu mevcut bezin ilkel kanalını oluşturur (Huebner, & Ewald, 2014; Macias, & Hinck, 2012). Meme dokusu, steroid hormon ve büyüme faktörü reseptör sinyaline yanıt olarak ergenlik, gebelik ve emzirme dönemlerinde işlevsel görevlerine bağlı şekilsel ve boyutsal değişikliklere uğrar (Huebner, & Ewald, 2014). Ergenlik ile süt kanallarının gelişiminde duktal epitel hücrelerin proliferasyonu artar ve meme yağ dokusuna invaze olur (Inman, Robertson, Mott, & Bissell, 2015). Süt kanallarının yapısı çift katmanlı olup, bazal membran çevresinde yer alan miyoepitelyal ve lüminal epitelyal hücrelerden oluşmaktadır (Feng ve ark., 2018; Inman, Robertson, Mott, & Bissell, 2015). Hamile bireylerde, hormonların etkisi ile alveolar epitelyumun hızlıca çoğalması ile süt üretiminde görevli sekratuvar alveoller gelişir. Laktasyon döneminde, luminal epitel hücreler süt proteinlerini sentezler ve alveolar lümene salgılar. Oksitosin üretimi ile de çevredeki miyoepitelyal hücreler kasılır, böylece süt kanal içinden ve meme ucuna doğru hareket

eder. Laktasyon sona erdiğinde, meme epitel hücrelerinin bir kısmı apoptoza uğrayarak ölür ve meme dokusu dinlenme fazına geçer. Sonuç olarak, meme dokusundaki bu değişimlerin büyük bölümü meme epitel hücrelerinde gerçekleştiğinden, bu hücreler yüksek oranda transformasyona uğrayabilmektedirler. Dolayısıyla meme kanserlerinin büyük bir bölümü epitelyal kökenli olarak gelişmektedir (Feng ve ark., 2018).

Meme kanseri; süt kanallarının (duktusların), süt bezlerinin (lobüllerin) veya her ikisinin arasındaki dokuda gelişebildiği için birçok türü mevcuttur ve alt sınıflandırması kanserden etkilenen spesifik hücrelere göre belirlenir. Hangi hücre kaynağından oluştuğuna göre meme kanseri karsinomlar ve sarkomlar olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Karsinomlar, lobüllerde ve terminal kanallarda süt yapımından sorumlu memenin epitel bölgesindeki hücrelerden gelişen meme kanserleridir. Sarkomlar, miyofibroblastlardan ve kan damarlarının oluşumundan sorumlu memenin stromal bölgesindeki hücrelerden gelişen meme kanseri türüdür (Feng ve ark., 2018). Ancak bu katagorilendirmeler yeterli değildir, çünkü tek bir meme tümörü farklı hücre tiplerinin bir kombinasyonu olabilmektedir.

Meme kanseri olgularının büyük bölümünü karsinomlar oluşturmaktadır. Karsinomların içerisinde de primer tümörün invazif olduğu yere göre alt tiplendirme yapılmaktadır. Ayrıca, tümör türlerin oluşumunda etkili olan genetik ve epigenetik faktörler sonucu her birinin prognozu ve tedavi sonuçları farklı olduğundan tanı sırasında doğru alt tiplendirmeler hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle, patolojik incelemeler sonucu invazifliklerine göre meme kanseri; non-invazif (in situ), invazif ve metastatik olarak 3 gruba ayrılır (Şekil 2). En yaygın meme kanseri türü in situ meme kanseridir. Bu tür normal kanalların içerisinde gelişir invazif olmayan ancak invazif kansere dönüşmede yüksek potansiyele sahiptir, bu nedenle doğru erken tanı ve tedavi büyük önem taşımaktadır. İnvazif meme kanserleri de normal süt bezi ve kanallarında gelişip daha sonrasında da bu bölgelerden dışarı çıkıp etraftaki meme stroma dokusu altına ilerler. Daha sonrasında ilerleyen invazif karsinomlar, lenf nodu ve diğer organlara metastaz yapabilmektedir (Polyak, 2007).



Şekil 2. İnvazyon durumuna göre meme kanseri alt tiplendirmesi (Polyak, 2007, Şekil 2).

2.3. Meme Kanserinin Moleküler Alt Grupları

Meme kanseri heterojen ve fenotipik olarak geniş bir hastalık olmakla birlikte yapılan gen ekspresyon analizleri sonucu, terapilere farklı yanıtlar verebilen ve prognozda önemli ölçülerde farklıklar gösterebilen çeşitli biyolojik alt grupları tanımlanmıştır. Bu alt gruplar gen ekspresyon ifadelerinde; östrojen reseptörü (ER) ekspresyonu (lüminal küme), insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) ekspresyonu, progesteron reseptörü (PR), proliferasyon ve özel gen kümesi olan bazal küme olarak ayrılmaktadır. Bu gen ifadeleri baz alınarak meme kanseri için moleküler sınıflandırma yapıldığında Tablo 1'de gösterildiği üzere farklı karakteristik ve tedavi yöntemlerine sahip 5 alt grup bulunmaktadır (Feng ve ark., 2018).

Tablo 1. Meme kanseri moleküler alt gruplarının gen ekspresyon belirteçleri, karakteristik özellikleri ve tedavi seçenekleri (Feng ve ark., 2018)

Alt grup	Moleküler Belirteci	Karakteristiği	Tedavi Seçenekleri
Luminal A	ER+, PR±, HER2-, düşük Ki67	• Meme kanserlerinin ~%40'nın karakteri • En iyi prognoz	Hormonal ve/veya hedefli terapiler
Luminal B	ER+, PR±, HER2±, yüksek Ki67	• Meme kanserlerinin %10-%20'sinin karakteri • Luminal A'ya göre düşük sağ kalım	Hormonal ve/veya hedefli terapiler
HER2	ER-, PR-, HER2+	• Meme kanserlerinin %5-%15'nin karakteri	Hedefli terapiler: trastuzumab, pertuzumab, lapatinib veya ado-trastuzumab
Üçlü (triple) negatif/ bazal benzeri meme kanseri (TNBC),	ER-, PR-, HER2-	• Meme kanserlerinin %15-%20'sinin karakteri • *BRCA1* genindeki mutasyonlar ilişki • Siyahi bayanlarda daha yaygın • Erken yaşta görülüyor • Kötü prognoz	Sınırlı hedefli terapiler Olaparib
Normal-benzeri	ER+, PR±, HER2-, düşük Ki67	• Nadir görülen tür • Düşük proliferasyon ve belirteç ekspresyonu	Hormonal ve/veya hedefli terapiler

2.4. Meme Kanserinin Klinik ve Patolojik Evreleri

Meme kanseri teşhis konulduktan sonra uygulanacak olan tedavinin belirlenmesi için hastalığın evrelerini belirlemek büyük önem taşır. 2017 yılında evre skorlaması için Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC)'nin yayımladığı 8. basım kanser evreleme manueli kabul edilmektedir. Klinik evreleme için yapılan tanım; hasta öyküsü, fiziki muayene bulguları, radyolojik ve ilgili biyopsilerden elde edilen bulgulara dayanmaktadır. Patolojik evrelemede skorlama sistemi ise klinik evreleme sistemi ile benzer olup, sistemik ve radyasyon terapisi almadan ilk tedavi olarak ameliyat uygulanmış olan hastalar için geçerlidir. Genel olarak klinik ve patolojik evrelemeler tümör özellikleri (T), lenf nodu (N) ve metastaz (M) durumları, tümör derecesi, ER, PR ve HER2 reseptör ifade durumuna göre belirlenmektedir. Primer tümör, lenf nodu ve metastaz (TNM) skorlaması için incelenen kriterler Tablo 2'de gösterilmiştir (Aldrees, Gao, Zhang, & Wei, 2021; Hortobagyi ve ark., 2018; Kalli ve ark., 2018; Koh, & Kim, 2019)

Tablo 2. Meme kanserinde klinik ve patolojik evreleme için kullanılan tümör, lenf nodu ve metastaz gruplarının tanımı (Aldrees, Gao, Zhang, & Wei, 2021; Koh, & Kim, 2019)

Evrelemeler için kullanılan kriterler	Tanım	
	Klinik evreleme	Patolojik evreleme
Primer tümör (T)		
TX	Primer tümör değerlendirilemez	
T0	Primer tümörden kanıt yok	
Tis (DCIS)	Duktal karsinoma *in situ*	
Tis (Paget's)	Meme ucunda gelişen *Paget's* hastalığı	
T1	Tümör 20 mm eşit veya daha küçük	
T1mi	Tümör 1 mm eşit veya daha küçük	
T1a	Tümör 1 mm'den büyük ama 10 mm eşit veya daha küçük	
T1b	Tümör 5 mm'den büyük ama 10 mm eşit veya daha küçük	
T1c	Tümör 10 mm'den büyük ama 20 mm eşit veya daha küçük	
T2	Tümör 20 mm'den büyük ama 50 mm eşit veya daha küçük	
T3	Tümör 50 mm'den daha büyük	
T4	Göğüs duvarına ve / veya cilde doğrudan uzanan herhangi bir boyuttaki tümör (ülserasyon veya makroskopik nodüller); tek başına dermisin istilası T4 olarak nitelendirilmez	
T4a	Göğüs duvarına uzanan tümör, pektoralis kası yapışması / invazyonu dahil değildir	
T4b	Ülserasyon ve/veya ipsilateral makroskopik uydu nodülü ve/veya deride ödem (Peau d'orange dahil)	
T4c	T4a ve T4b	
T4d	İnflmatuvar karsinom	
Bölgesel lenf nodu (N)		
NX	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez (örneğin, önceden alınmış)	
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok	
N1	Hareketli ipsilateral seviye I, II aksiller lenf düğümlerine metastazlar	Mikrometaztaslar, aksiller lenf nodunda 1-3 metastaz, ipsilateral iç meme sentinel lenf nodunda metastaz
N2	Sabit veya birbirine yapışık ipsilateral seviye I, II aksiller lenf düğümlerine metastazlar	Aksiller lenf nodunda 4-9 metastaz veya aksiler lenf nodu patolik negatif, klinik pozitif ipsilateral iç meme lenf nodu metastaz
N3	ipsilateral infraklaviküler lenf nodu metastazı, ipsilateral iç meme metastazı, aksiler lenf nodu metastazı, ipsilateral supraklaviküler lenf nodu metastazı	Aksiller lenf nodunda 10'dan fazla metastaz veya bir veya daha fazla pozitif seviye I ve II aksiller lenf düğümlerinin varlığında görüntüleme yoluyla pozitif ipsilateral iç meme lenf düğümleri veya 3'ten fazla aksiller lenf nodu metastazı veya klinik olarak negatif ipsilateral supraklaviküler iç meme lenf nodlarının sentinel lenf nodu biyopsisi sonucu mikro veya makro metastaz
Metastaz (M)		
M0	Uzak metastazlara dair klinik veya radyografik kanıt yok	
M1	Klinik ve radyolojik olarak uzak metastaz tespiti	Uzak organlarda histolojik olarak kanıtlanmış metastazlar; veya bölgesel olmayan düğümlerde ise, 0.2 mm'den büyük metastazlar

Klinik ve patalojik skorlamada kullanılan tümör derecesi skorlaması da prognostik faktör olup tümör boyutundan bağımsızdır. Tümör derecesi skorlaması, tümör farklılaşmasını yansıtır. Tümör skorunu belirlemede; tübül ölçümü, nükleer pleomorfizm ve mitotik sayımlar dikkate alınır. Klinik (Tablo 3) ve patolojik (Tablo 4) evre skorlamalarda da TNM değerleri aynı tümör için farklı tümör derecesine sahip olduklarında evre skorları değişebilmektedir (Aldrees, Gao, Zhang, & Wei, 2021; Hortobagyi ve ark., 2018; Kalli ve ark., 2018; Koh, & Kim, 2019)

Tablo 3. Meme kanserinde klinik evre skorlama (AJCC Kanser Evreleri Manueli, 2018; Koh, & Kim, 2019)

TNM değerleri...			ER+ PR+ HER2+	ER+ PR+ HER2-	ER+ PR- HER2+	ER- PR+ HER2+	ER- PR- HER2+	ER+ PR- HER2-	ER- PR+ HER-	ER- PR- HER2-
TisN0	M0	G1-3	0	0	0	0	0	0	0	0
T1N0 T0N1mi T1N1mi		G1	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1B
		G2	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1B
		G3	1A	1A	1A	1A	1A	1B	1B	1B
T0N1 T1N1 T2N0		G1	1B	1B	2A	2A	2A	2A	2A	2A
		G2	1B	1B	2A	2A	2A	2A	2A	2B
		G3	1B	2A	2A	2A	2A	2B	2B	2B
T2N1 T3N0		G1	1B	2A	2A	2A	2B	2B	2B	2B
		G2	1B	2A	2A	2A	2B	2B	2B	3B
		G3	1B	2B	2B	2B	2B	3A	3A	3B
T0N2 T1N2 T2N2 T3N1 T3N2		G1	2A	2A	3A	3A	3A	3A	3A	3B
		G2	2A	2A	3A	3A	3A	3A	3A	3B
		G3	2B	3A	3A	3A	3A	3B	3B	3C
T4N0-2 T1-4N3		G1	3A	3B	3B	3B	3B	3B	3B	3C
		G2	3A	3B	3B	3B	3B	3B	3B	3C
		G3	3B	3B	3B	3B	3B	3C	3C	3C
T1-4N1-3	M1	G1-3	4	4	4	4	4	4	4	4

Tablo 4. Meme kanserinde patolojik evre skorlamaları (AJCC Kanser Evreleri Manueli, 2018; Koh, & Kim, 2019)

TNM değerleri...			ER+ PR+ HER2+	ER+ PR+ HER2-	ER+ PR- HER2+	ER- PR+ HER2+	ER- PR- HER2+	ER+ PR- HER2-	ER- PR+ HER-	ER- PR- HER2-
TisN0	M0	G1-3	0	0	0	0	0	0	0	0
T1N0 T0N1mi T1N1mi		G1	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A
		G2	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1B
		G3	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1B
T0N1 T1N1 T2N0		G1	1A	1A	1B	1B	2A	1B	1B	2A
		G2	1A	1A	1B	1B	2A	2A	2A	2A
		G3	1A	1B	2A	2A	2A	2A	2A	2A
T2N1 T3N0		G1	1A	1A	2B	2B	2B	2B	2B	2B
		G2	1B	1B	2B	2B	2B	2B	2B	2B
		G3	1B	2A	2B	2B	2B	2B	2B	3A
T0N2 T1N2 T2N2 T3N1 T3N2		G1	1B	1B	3A	3A	3A	3A	3A	3A
		G2	1B	1B	3A	3A	3A	3A	3A	3B
		G3	2A	2B	3A	3A	3A	3A	3A	3C
T4N0-2 T1-4N3		G1	3A	3A	3B	3B	3B	3B	3B	3B
		G2	3A	3A	3B	3B	3B	3B	3B	3C
		G3	3B	3B	3B	3B	3B	3C	3C	3C
T1-4N1-3	M1	G1-3	4	4	4	4	4	4	4	4

2.5. Meme Kanserinde İmmün Yanıt

1863' te Rudolf Virchow, enflamasyon ile o bölgede kanser gelişimi arasında bir bağlantı olduğunu ileri sürmüştür. Şu anda da yapılan birçok çalışma ile kanser gelişiminde ve prognozunda immün sistemin önemi gösterilmektedir. Kanserin erken gelişim evresinde, kanserli hücreler doğal immün sistem tarafından tanınır ve elimine edilir bu mekanizmaya immün gözetim denmektedir. Kanser hücrelerinin anormal büyümesi sonucu, komşu hücrelerden proenflamatuvar sitokinler (özellikle IL-12 ve IFN-γ) salınır ve bu sitokinler NK hücrelerinin, dendritik hücrelerin ve klasik makrofajların aktivasyonuna neden olur (Emens, 2012; Gobert ve ark., 2009; Mamessier ve ark., 2011). Dendritik hücreler, tümör antijenlerini tanıyıp antijenik peptidlerini işleyip en yakın lenf noduna göç eder ve burada tümör spesifik $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin aktivasyonunu gerçekleşir. Bu aktive olan effektör $CD4^+$ T hücreleri daha sonrasında, tümör antijenine spesifik antikor üreten B hücreleri de aktive eder ve tümör bölgesine göç ederler. Bu aşamada tümör hücreleri ya tamamen elimine edilir ya da immün yanıta dirençli olup hayatta kalan tümör hücrelerinden klonal varyant oluşumu gerçekleşir. Bu klonal varyant immünojenik özelliklerini immünsüpresif faktörler üreterek azaltır. Bu aşamada gelişen tümör hücrelerinin varyant olmayanları elimine edilebilirken, immün sistemden kaçabilen bu varyant hücre grubu varlığını devam ettirmektedir, immün sistemin kanser üzerindeki bu yanıtı denge fazı olarak adlandırılır. Ancak, kanser hücreleri immün sistem tarafından tamamen tanınmadan kaçabilecek varyasyonlar geçirebilir ki bu da kanser üzerindeki immün düzenlemede son aşama olan immün sistemden kaçış aşamasıdır.

Bu geliştirilen varyasyonlar ile kaçış sistemleri incelendiğinde, tümör hücreleri anti-tümör yanıtı aktif olarak inhibitör moleküller; programlanmış ölüm protein 1 (PD-1), sitotoksik T lenfosit ilişkili protein (CTLA-4) ve lenfosit aktivasyon geni (LAG-) ifade ederek ve/veya tümörden-türevlenen immün baskılayıcı faktörler (TGF-β, IL-10, IDO) üreterek immün yanıtı inhibe eder (Bates, Derakhshandeh, Jones, & Webb, 2018; Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002). Ayrıca, T hücrelerin tanıdığı tümör antijenin tümör hücreleri yüzeyinde ekspresyonlarının azaltılması ile T hücre yanıtından kaçış gerçekleşir. Tümör mikroçevresine ayrıca antienflamatuvar

özelikteki baskılayıcı hücrelerin; regülatör T hücre (Treg), miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MKBH), tümör ilişkili makrofajlar (TAM), regülatör B hücre (Breg) ve anjiyogenezi destekleyen $CD4^+$ Th2'nin göçü gerçekleşir ve anti tümör immün yanıt baskılanır (Gobert ve ark., 2009; Emens, 2012; Mamessier ve ark., 2011). Tüm bunlara ek olarak, tümör mikroçevresinde yoğun olarak bulunan TGF-β ve IDO gibi immün baskılayıcı sitokinler, tümör çevresindeki NK hücrelerinde bulunan NKp30, NKG2D, DNAM-1 ve CD16 gibi NK aktivatör reseptörlerin ekspresyonlarını azaltıp yerlerine, NKG2A gibi inhibitör reseptörlerin ifadelerinin artmasına sebep olmaktadır (Mamessier ve ark., 2011). Böylelikle, tümör hücreleri NK'ların hücresel sitotoksik etkisinden de kaçabilmektedir.

2.6. Edinsel İmmün Yanıtların Meme Kanseri Üzerindeki Etkisi

2.6.1. Meme Kanserinde B Hücre Cevabı

Tüm kanserlerde genel olarak, B hücreler diğer immün hücreler ile etkileşime geçerek tümör antijenlerine (β-actin ve gangliosid GD3 gibi) spesifik antikor ve IL-10 üreterek anti-tümör immün yanıtı düzenlerler (Hansen, Nielsen, & Ditzel, 2002; Shen, Wang, & Ren, 2018). Solid kanser tedavisinde, adaptif T hücre transferinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin açıklanması ile kanser hücrelerine karşı kalıcı hümoral immün yanıtı indüklemek adına adoptif B hücre transferi çalışmaları gündeme gelmiştir. Fare fibrosarkom ve melonoma modelleri ile yapılan *in vivo* olarak aktive tümör drene lenf nodunda (TDLN) bulunan B hücreler izole edilmiş ve *in vitro* ortamda uyarıldıklarında bu B hücrelerin kanser hücrelerine spesifik IgG antikorlarını ürettikleri görülmüştür (Li, Teitz-Tennenbaum Donald, Li, & Chang, 2016). Ayrıca, aynı grubun meme kanseri üzerine yapmış olduğu bir çalışma da 4T1 hücre hattı kullanılarak oluşturulan üçlü negatif meme kanseri modelinden aktive TDLN bölgesinden B hücreler izole edilmiş; sonrasında bu hücrelerde IL-2R eskpresyonu saptanmış ve modelden elde edilen B hücreler IL-2 varlığında LPS/anti-CD40 antikoru ile uyarılıp süpernatantları toplandığında, IL-2 varlığında kontrol grubuna göre B hücrelerin aktive olarak yüksek oranda tümör spesifik IgG ürettiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, B hücrelerin direkt olarak Fas/FasL yolağı

aktivasyonu sonucu tümör hücrelerinin apoptozuna neden oldukları ve IL-10 üretimi ile antitümör immün yanıtı düzenledikleri görülmüştür. Ayrıca, 4T1 TDLN B hücrelerinin IL-2 ile uyarımı sonucu yüksek oranda CXCR4 ifade ettiği tespit edilmiştir. 4T1 hücrelerinde de ayrıca CXCR4 ligandı CXCL12 varlığı ile gözlemlenmiş ve CXCR4 spesifik inhibitörünün (AMD3100) ve FasL inhibitörlerinin *in vitro* ortamda uygulanması sonucu tümör hücrelerinin B hücre aracılı olarak öldürmesini azaldığı saptanmıştır. Aynı çalışmada, IL-2 ile uyarılan B hücrelerinden sitotoksik T hücrelerde olduğu gibi perforin üretildiği görülmüş, hücre-hücre etkileşimi olmadan da B hücrelerin kanser hücrelerini öldürebildiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, B hücrelerin tümör hücrelerine spesifik IgG üreterek tümör hücrelerinin opsonizasyonuna, Fas-FasL ve CXCR4-CXCL12 hücre aracılı hücresel sitotoksik etkiye ve perforin üreterek hücrelerin lize olmasına neden olarak önemli ölçüde anti-tümör immün yanıtlara katıldığı gösterilmiştir (Xia ve ark. 2016). Tüm bu anlatılan anti-tümör immün yanıtların yanı sıra, meme kanseri mikroçevresinde, IL-10 ve TGF-β üreten düzenleyici B (Breg) hücreler de tespit edilmiştir (Tang ve ark., 2016). Breg hücrelerinin ayrıca yüzeylerinde bulundurdukları PD-L1 ile anti-tümör immün yanıtta görevli olan T lenfositlerin proliferasyonlarını ve aktivasyonlarını baskılamadığı da gösterilmiştir (Horii, & Matsushita, 2021; Xia ve ark. 2016).

Tümör infiltre B hücrelerinin meme kanserideki prognostik etkisi ise tartışmalıdır. Son zamanlarda yapılan bir meta analiz çalışmasında artan $CD20^+$ B hücrelerin hastalıksız sağ kalımı arttırdığını gösterirken (Mao ve ark., 2016) bir başka çalışma ise $CD19^+$ B hücrelerinin oranın ER^-PR^- tümör, lenf nodu metastazı, histolojik olarak 3. evre ve T4 statüsünde tümör ve sonuç olarak kötü prognoz ile korele olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, aynı çalışmada $CD20^+$ B hücreleri ile histolojik evre, siklin A ve Ki67 eskpresyon ilişkisi değerlendirildiğinde zayıf bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Löfdahl ve ark., 2012). Tüm bu çalışmalar aslında hastalığın durumuna bağlı olarak B hücrelerin farklı prognostik öneme sahip olduğunu göstermektedir.

2.6.2. Meme Kanserinde T Hücre Yanıtları

T hücreler adaptif immün yanıtının merkezi düzenleyicileridir. Naif T hücrelerin aktivasyonu lenfoid organlarda antijen sunan hücrelerden antijenik peptidlerin tanınmasına ve sitokin yolaklarının aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Farklı antijenik peptitler ve enflamatuvar çevre nedeni ile farklı sitokinlerin uyarıma katılımı sonucu naif T hücreler farklı T hücre alt gruplarına farklılaşarak immün yanıta katılır. Naif $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre aktivasyonu ve $CD4^+$ yardımcı T hücre alt gruplarının (Th1, Th2, Th17, Tfh, Treg, Th9, Th22) immün yanıtlardaki özellikleri daha detaylı olarak ilerleyen bölümlerde anlatılmaktadır.

T hücrelerin tümör immünoloji için önemi incelendiğinde, tümör mikro çevresinde T hücre infiltrasyonunun immünogenik olmayan tümör tiplerine kıyasla tümörde düşük histolojik skor, aksiller lenf nodu metastazı görülmemesi, tümör boyutunun küçük olması ve hastalık sağ kalım oranın yüksek olması ile pozitif ilişkili olduğu görülmüştür. Bu durum da T hücrelerin kanserin immün gözetimindeki merkezi rolünün önemini göstermektedir (Edechi, Ikeogu, Uzonna, & Myal, 2019). Ancak, tümör mikro çevresinde $CD4^+$ T yardımcı lenfosit alt gruplarının ve $CD8^+$ T lenfositlerin varlığı değişkenlik gösterebilir; bu hücrelerin ürettikleri sitokinlerin farklılıkları tümör prograsyonuna ve hastanın sağ kalımına farklı şekilde etki etmektedir (Coussens, & Pollard, 2011).

$CD4^+$ T hücrelerin aktivasyonu ve efektör alt gruplarının anti-kanser immün yanıtlardaki özellikleri ilerleyen bölümlerde daha detaylı olarak anlatılmaktadır. Bunun yanı sıra, $CD8^+$ T hücrelerin anti kanser immün yanıtları incelendiğinde tüm kanser modellerinde ilk immün gözetim aşamasında, kanser hücrelerine ait antijenik peptitler kanser hücrelerinin majör histokompabilite kompleks sınıf I (MHK sınıf I) molekülü üzerinden sunulmaktadır. Naif halde bulunan $CD8^+$ T hücreleri üzerlerinde bulunan T hücre reseptörleri (THR) aracılığı ile MHK sınıf I'den sunulan bu antijenik peptitleri tanımaları sonucu effektör sitotoksik T lenfositlere (CTL) dönüşüp perforin ve granzim üretimi sonucu tümör hücrelerinin lize olmasına neden olur (Burugu, Asleh-Aburaya, & Nielsen, 2017).

2.6.3. T hücre aktivasyonu

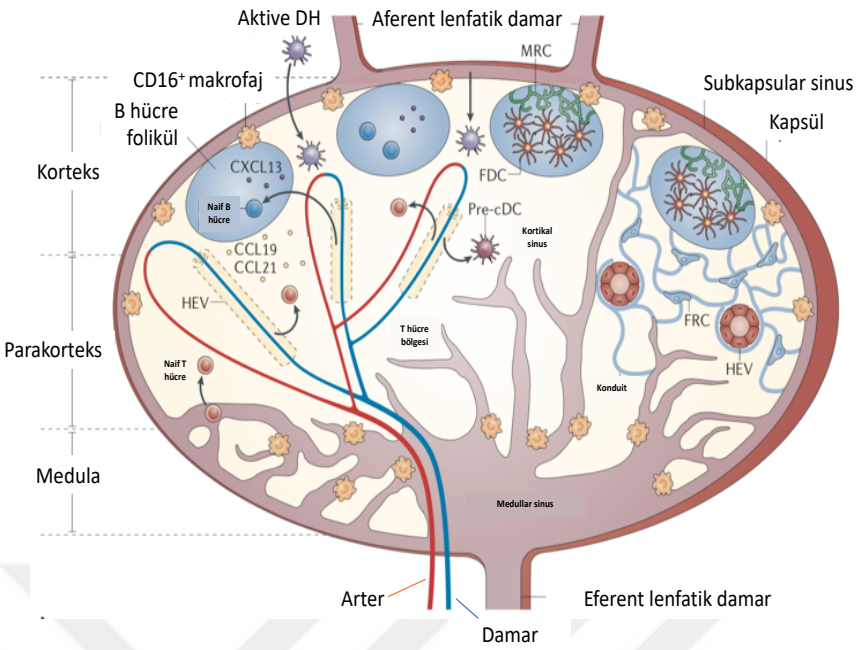
T hücreleri kemik iliğinden köken alan ve gelişimlerini timusta tamamlayan hücre gruplarıdır. T hücreler yüzeylerinde T hücre reseptörü (THR) ile CD4 veya CD8 glikoprotein eksprese etmesine bağlı olarak $CD4^+$ veya $CD8^+$ T hücreler olarak adlandırılırlar. Olgunlaşmasını tamamlamış olan bu hücreler timustan çıkıp dolaşıma ve sekonder lenfoid organlara (lenf nodu, dalak gibi) göç eder. Olgunlaşmış ancak henüz herhangi bir antijen ile karşılaşmamış $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelere naif T hücreler adı verilir.

Naif T hücreler, düşük hücresel hacime, düşük metabolik hıza ve düşük proliferasyona sahip olup dinginlik durumu ile karakterize edilir. Naif T hücrelerin farklılaşmadan sağ kalımı ve çoğalması IL-7 sinyal yolağı ile ve çevre hücrelerin MHK'lerinden düşük oranda öz antijenlerin tanınması ile desteklenir (Brownlie, & Zamoyska, 2013; Geltink, Kyle, & Pearce, 2018).

T hücrelerin aktivasyonu sekonder lenfoid yapılarda gerçekleşir. Lenf nodu (LN) immün gözetim, immün yanıt ve daha önceki bölümlerde de anlatıldığı üzere tümör hücresi metastaz bölgesidir. LN yapısal olarak, bağışıklık hücrelerini farklı bölgelerde konumlandırabilen retiküler ağ oluşumuna sahiptir. LN ayrıca, antijen sunan dendritik hücre (DH)'ler ile naif T hücrelerin etkileşime girip antijen spesifik edinsel immün yanıtların ilk başlatıldığı bölge olma özelliğindedir.

Basitçe LN dış kısmı fibroz bir kapsül ile çevirilidir. Bu kapsülün hemen altında subkapsular sinüs bulunur. Subkapsular sinüs içerisinde aferent lenfatiklerden gelebilecek patojenleri tanıyabilen özelleşmiş $CD16^+$ makrofajlar bulunur (Groom, 2019; Girard, Moussion, & Förster, 2012). Antijen sunan DH'ler de aferent lenfatikler ve subkasular sinustan lenf noduna giriş yaparken, lenf nodunda yerleşik bulunan öncül konvensiyonel DH'ler HEV'lerden lenf noduna girer. Antijen sunan DH'ler parakorteks bölgesinde bulunan T hücre alan (zon) bölgesine üzerlerinde bulundurdukları CCR7 ve CCR8 kemokin reseptörlerinin liganlarına doğru (sırası ile CCL21 ve CCL1) göç eder (Girard ve ark., 2012). Lenf nodunun korteks bölgesi yoğun oranda B hücre folikülleri ve foliküler dendritik hücrelerden oluşur. Parakorteks

bölgesinde T hücreler bulunur ve T hücre zon bölgesini oluştururlar. Parakorteks bölgesinde ayrıca fibroblastik retiküler hücreler (FRC) bulunur ve bu hücreler retiküler fiberler oluşturup stromal ağ yapısı aracılığı ile lenfosit ve DH'lerin etkileşimine olanak sağlar. Naif lenfositler lenf noduna yüksek endotelyal venül (HEV)'lerden girer ve kortikal ve medular sinuslardan geçerek eferent lenfatik damarlardan lenf nodunu terk eder. Naif T hücreler HEV'ler üzerinde bulunan 6-sülfo sialyl Lewis X motiflerine L-selektin (CD62L) aracılığı ile tutunur ve HEV'ler üzerinde yuvarlanarak hareket eder. Naif T hücreler ayrıca yüzeylerinde CC-kemokin reseptör 7 (CCR7) ekprese eder ve bu reseptörlere HEV'lerden salınan CCL21'in bağlanması ile HEV'lerden parakorteks bölgesine geçer. T hücreler aynı zamanda yüzeylerinde CXC-kemokin reseptör 4 (CXCR4) ifade ederler ve lenf nodu stromal hücrelerden üretilen CXCL12'nin kemoatraktan özelliği sayesinde T hücre zon bölgesine yerleşir. Naif T hücrelerin para korteks bölgesinde yer alması ve DH'lerin de bu bölgede bulunması sayesinde naif T hücreler DH'lerden sunulan antijenik peptidleri tanıyıp bu bölgede farklılaşıp çoğalır (von Andrian, & Mempel, 2003; Förster, Davalos-Misslitz, & Rot, 2008; Miyasaka, & Tanaka, 2004). Naif B hücrelerde T hücreler ile aynı şekilde HEV'lerden geçerler ve parakorteks bölgesine gelir ancak B hücreler T hücrelere ek olarak yüzeylerinde CXCR5 eksprese eder. B hücreleri foliküllerde bulunan marjinal retiküler hücrelerden üretilen CXCR5 ligandı olan CXCL13'ün kemoatraktan özelliği sayesinde B hücre zon bölgesine yerleşir (Şekil 3) (Girard ve ark., 2012).



Şekil 3. Lenf nodunun başlıca bölümleri ve bu bölümlerde bulunan hücrelerin şematik gösterimi (Girard ve ark., 2012, Şekil 1a).

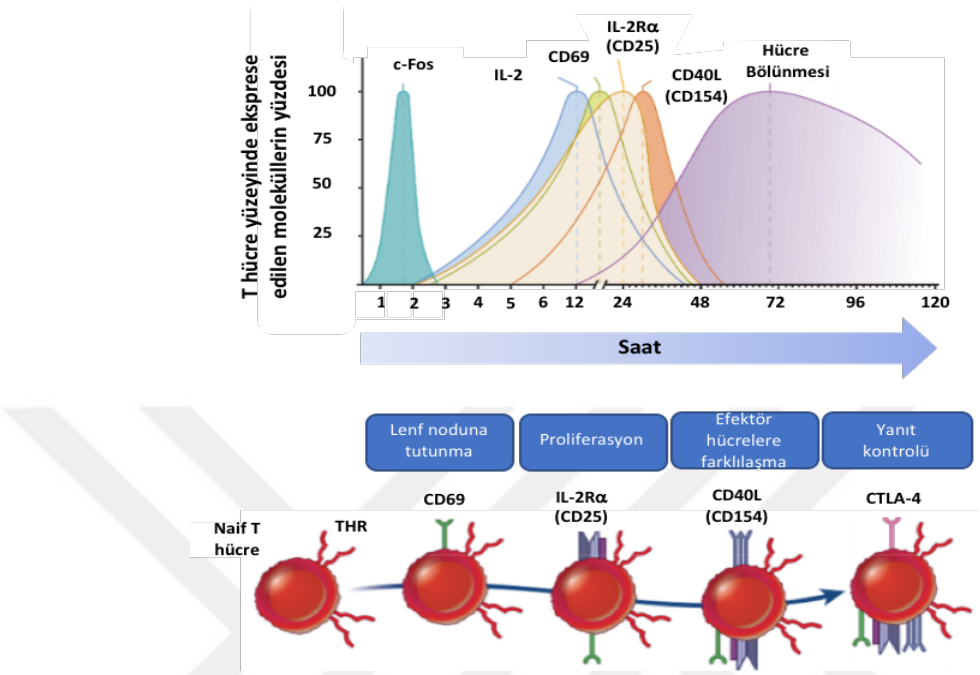
Parakorteks bölgesine göç etmiş ve retiküler ağ üzerinde antijen sunan DH'ler ile naif T hücreleri karşılaştığında DH'lerden T hücrelerin efektör hücrelere farklışamasında etkili 3 sinyal iletilir. Bu sinyallerden ilki, naif T hücrelerin antijen sunan DH'lerin MHC komplekslerinden sunulan antijenik peptidleri THR'leri aracılığı ile spesifik olarak tanımasıdır ve bu sinyal T hücreler için aktive edici sinyaldir. $CD8^+$ T hücreler tüm çekirdekli hücrelerden eksprese edilen majör histokompabilite kompleks sınıf I (MHK I)'in üzerinden sunulan antijenik peptidleri tanırken, naif $CD4^+$ T hücreler de sekonder lenfoid yapılarda antijen sunan hücrelerin (dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreler) üzerinde ifade edilen majör histokompabilite kompleks II (MHK II)'den sunulan antijenik peptidleri tanıyabilmektedir. Antijenik peptidin naif T hücreler tarafından tanınması ile THR aracılı sinyal yolakları aktive edilir. Bu nedenle, THR'nin yapısını bilmek *in vitro* ortamda naif T hücrelerin aktivasyonunu gerçekleştirebilmek için önem taşımaktadır. THR aslında kompleks bir yapıya sahiptir, altı sinyal zinciri ilişkili antijen bağlayıcı TCRα:β hetrodimer yapısı, CD3 kompleksi (iki adet ε, bir adet γ ve bir adet δ) ve ζ homodimerlerinden oluşmaktadır ve tüm bu yapılar birbirlerine transmembran bölgeden asidik veya bazik özellik göstererek ve negatif veya pozitif yükler ile etkileşime geçerek tutunmaktadırlar. THR komplesinde hücre içi sinyal iletimden asıl

görevli domenler ζ homodimerleri ve CD3 kompleksi olup hücre içi bölgesinde immünoreseptör tirozin-ilişkili aktivasyon motifleri (ITAM) bulundurur (Borst ve ark., 1984; Hedrick, Cohen, Nielsen, & Davis, 1984; Katz, & Rabinovich, 2020; Murphy, & Weaver, 2016). THR'nün antijenik peptidleri tanıması ile ITAM bölgeleri Lck, Fyn ve ZAP70 protein kinazları tarafından fosforile edilir ve hücre içi naif T hücrelerin aktivasyonunu sağlayacak protein kinaz aktivasyonları gerçekleşir (Zhang, Sloan-Lancaster, Kitchen, Trible, & Samelson, 1998).

Antijen sunan DH'lerden naif T hücrelere iletilen ikinci sinyal de, T hücrelerin yüzeylerinde ekspres olan eş uyaran moleküllerin antijen sunan DH'lerdeki ligandlarına bağlanması ve bunun sonucunda hayatta kalmasıdır (Kolumam, Thomas, Thompson, Sprent, & Murali-Krishna, 2005; Mescher ve arkadaşları, 2006). Eş uyaran sinyal iletiminde en iyi tanımlamış yolak; T hücrelerden sürekli olarak ekspres olan CD28 moleküllerinin antijen sunan hücrelerdeki ligandları olan CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) moleküllerine bağlanması sonucu sinyal iletimidir. CD28 molekülü ligandlarına bağlandığında Lck aracılı fosfoinisitol-3-kinaz (PI3K) aktivasyonuna ve ardından PLC-γ aktivasyonuna neden olarak NFAT, AP-1 ve NFκB transkiripsiyon faktörlerinin aktivasyon yolağına katılır. Bu transkripsiyon faktörlerinin hepsi birlikte, *IL-2* geni promoter bölgesine bağlanarak T hücrelerden IL-2 üretimini uyarır. Aynı zamanda antijen ile karşılaşmış bu T hücreler IL-2α reseptörü (CD25) de üretir. CD25 ve üretilen IL-2'lerin otokrin şekilde birbirlerine bağlanmaları T hücrelerin proliferasyonunu destekler ve mikro çevredeki diğer baskın sitokinlerin de etkisi ile effektör alt tiplere farklılaşma gerçekleşir (Kolumam ve ark., 2005; Mescher ve arkadaşları, 2006; Murphy, & Weaver, 2016). T hücre aktivasyonunda görev alan diğer eş-uyaran ve inhibitör reseptörler ve T hücre alt grupları daha sonraki kısımlarda detaylı olarak açıklanmıştır.

Ayrıca, lenf nodunda aktive olan naif T hücreler, aktivasyon sonrası antijen spesifik T hücre klonu oluşturmak için lenf nodunda prolifere olur ve bu süreçte fonksiyonel özellikleri ile ilişkili olarak yüzeylerindeki moleküllerin ekspresyonlarında değişimler gözlemlenir. T hücrelerin antijenleri tanıması ve eş-uyaran sinyali sonrası fonksiyonel ilişkili en önemli ekspresyon düzeylerinde değişkenlik saptanan

moleküler CD69, CD25, CD40 ligand (CD40L, CD154) (Şekil 4), inhibitör reseptörler (PD-1 ve CTLA4 gibi), adezyon molekülleri ve kemokinlerdir.



Şekil 4. Lenf nodunda aktive olan naif T hücrelerin yüzey moleküllerinin zamana bağlı ekspresyon değişimi ve bu moleküllerin görevleri (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2017, Şekil 9.8).

Naif T hücrelerin aktivasyonu ile yüzeylerindeki CD69 ekspresyonu hızlı bir şekilde artar. CD69 molekülü bu nedenle en iyi tanımlanmış erken aktivasyon reseptörü olarak da bilinir. Transkripsiyonel olarak NFκB transkripsiyon faktörlerin varlığında CD69 geninin ifadesi eş uyaran sinyali algılandıktan 30-60 dakika içerisinde görülebilmektedir; ancak, bu transkripsiyonel ifadenin 4-6 saat sonra azaldığı tespit edilmiştir. T hücrelerinin yüzeyindeki CD69 ekspresyonu ise uyarımdan 2-3 saat sonra dahi tespit edilebilmektedir. CD69'un yapısal özellikleri araştırıldığında CD69'un C tipi lektin olduğu ve özellikle dendritik hücre ve makrofajlarda bulunan GAL-1 yapısı ile bağlandığı tespit edilmiştir (de la Fuente ve ark., 2014; González-Amaro, Cortés, Sánchez-Madrid, & Martín, 2013). CD69 molekülleri ayrıca aktive olan T hücrelerde hücre içinde sifingozin-1-fosfat reseptörü (S1PR1) ile etkileşime geçer ve T hücrelerde sürekli olarak eksprese edilen S1PR1'lerinin T hücre yüzeyine çıkmasına engelleyerek aktive olmuş T hücrelerinin LN'de çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlar. Antijen spesifik olarak çoğalan ve effektör ve/veya hafıza fenotipine dönüşen T hücrelerin yüzeylerindeki CD69 ekspresyonu azalır ve antijen

ile karşılaşmamış naif T hücrelerinde görüldüğü gibi T hücreler de S1PR1 eksprese edilebilir. Eferent lenfatiklerde ve periferik kanda da yüksek oranda ligandı olan kemoatraktan lipid sifingozin 1 fosfat (S1P) bulunması ile T hücreler lenf nodunu eferent lenfatiklerden terk eder (Abbas ve ark., 2017; Cyster, 2005; González-Amaro, ve ark., 2013).

Aktive olan T hücrelerin eş uyaran sinyali ile yüksek oranda IL-2 ürettikleri ve bu IL-2'lerin otokrin olarak aktive T hücrelerindeki IL-2 reseptörüne bağlanıp bu hücrelerin proliferasyonu için gerekli olduğu anlatılmıştı. IL-2 üretimi antijenin tanınmasından sonra 1-2 saat içerisinde başlar, 8-12 saatler arasında maksimum düzeye ulaşır ve 24 saat sonrasında azalmaya başlar. IL-2 reseptörü de kompleks bir yapı olup birbirlerine non-kovalent bağlı IL-2Rα (CD25), IL-2R/IL-15Rβ (CD122) ve IL-2Rγc (CD132) yapılardan oluşmaktadır. Naif T hücrelerde hayatta kalmak için IL-2'lerin düşük afinite ile bağlandığı CD122 ve CD132 eksprese edilirken, aktive olan T hücreler IL-2 üretimine paralel olarak STAT-5 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu sonucu IL-2'lerin yüksek afiniteli bağlandığı CD25, CD122 ve CD132' den oluşan IL2R kompleksini ifade eder. Aktive olan T hücrelerdeki CD25 ekspresyonu maksimum düzeye 24 saat sonra ulaştığı ve 48 saat sonrasında azaldığı da çeşitli çalışmalarda tespit edilmiştir (Abbas ve ark., 2017; Flynn, & Hartley, 2017; Murphy, & Weaver, 2016)

T hücreler antijen tanımalarından yaklaşık olarak 24 saat sonrasında maksimum düzeyde CD40L (CD154) yüzeylerinde eksprese ederler ve 48 saat sonunda bu ekspresyon azalmaktadır (Castle, Kishimoto, Stearns, Brown, & Kehry, 1993). CD40 molekülü de tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü olup fibroblastların, endotelyal hücrelerin, DH'lerin, makrofajların ve B hücrelerin yüzeylerinde yüksek oranda eksprese edilir (Abbas ve ark., 2017; Kooten, & Banchereau, 1996). CD40:CD40L bağlanması çoğunlukla B hücreler ile ilgili çalışmalarda dikkat çekmekte olup B hücrelerde proliferasyon, farklılaşma ve hayatta kalmalarını destekleyen aktivasyonlara neden olduğu tespit edilmiştir (Abbas ve ark., 2017; Kawabe ve ark., 1994; Rousset, Garcia, & Banchereau, 1991). İlerleyen bölümlerde $CD4^+$ T hücre alt grubu olan T foliküler yardımcı hücreler (Tfh) kısmında B hücreler

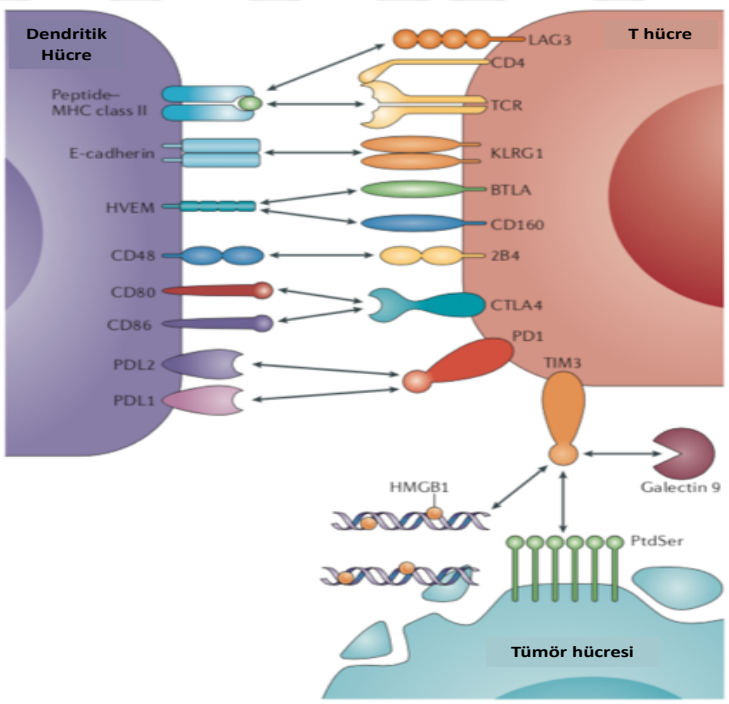
ile CD40:CD40L bağlanması ve sonuçları daha detaylı açıklanmıştır. Ayrıca, CD40:CD40L etkileşimi monositler ve antijen sunan DH'ler ile bağlanma sonucunda da eş uyaran moleküllerinin ekspresyonun arttığı ve buna bağlı olarak T hücrelere daha güçlü eş-uyaran sinyaller iletilip, T hücre yanıtlarının desteklendiği tespit edilmiştir (Abbas ve ark., 2017; Kiener ve ark., 1995, Murphy, & Weaver, 2016)

CD28 ve CD40L molekülleri aracılı eş-uyaran sinyallere ek olarak indüklenebilir eş-uyaran (ICOS, CD278) molekülü aracılı bir yolak daha tanımlanmıştır. ICOS naif T hücrelerde düşük oranda eksprese edilirken, THR ve CD28 sinyalleri varlığında aktive edilen T hücreden yüksek oranda üretilmektedir (Sharpe, & Freeman, 2002; Wikenheise, & Stumhofer, 2016). ICOS ligandları (ICOSL, CD275) antijen sunan DH'ler, makrofajlar, B hücrelerde bulunur. Ayrıca, hematopoietik olmayan hücrelerde ve endotelyal hücrelerde de eksprese edilir (Abbas ve ark., 2017; Khayyamian ve ark., 2002; Swallow, Wallin, & Sha, 1999). ICOS molekülünün T hücre bağımlı antikor gelişmesindeki ve germinal merkez olaylarındaki etkisi detaylı olarak bilinmemekle birlikte bu molekülün ekspresyonu T foliküler yardımcı hücreler (Tfh) ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu nedenle, ICOS ve Tfh hücrelerindeki sinyal yolağı daha sonraki bölümlerde daha ayrıntılı açıklanacaktır. ICOS/ICOSL yolağının aktivasyonunu inceleyen çalışmalarda, ICOS/ICOSL etkileşiminin T hücrelerde IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21 ve TNF-α gibi efektör sitokinlerin üretimini desteklediği fakat CD28 gibi IL-2 üretimi ile ilişkili olmadığı görülmüştür (Mesturini ve ark., 2013; Wikenheise, & Stumhofer, 2016). Ayrıca, ICOS'un da CD28 gibi PI3K'ları indüklediği ve alt yolak aktivasyonları sonucu Akt kinazların aktivasyonu sonucu proliferasyon ve sağ kalımı desteklediği tespit edilmiştir (Slomovitz, & Coleman, 2012).

2.6.4. Aktive Olan T Hücrelerde İnhibitör Reseptör Sinyalleri

Antijen tanınması ve eş-uyaran sinyallerin T hücrelere iletilmesi ile antijen spesifik T hücre klonları oluştuktan sonra hemoastasın sağlanması için T hücrelerde inhibitör yolak reseptörlerinin yüzeydeki ekspresyonları artar. Ayrıca, inhibitör reseptörlerin T hücrelerdeki ekspresyonu kronik enfeksiyonlar ve kanser gibi

durumlarda sürekli antijene maruziyet sonucu artabilmektedir ve inhibitör reseptör sinyalleri sonucunda aktive edilmiş T hücrelerin proliferasyonları ve sitokin üretimlerinde fonksiyonel bozukluklar görülmektedir (Abbas ve ark., 2017; Murphy, & Weaver, 2016). Son zamanlarda yapılan kanser tedavi çalışmalarında da terapötik olarak bu inhibitör reseptörler hedeflenerek T hücre yanıtı elde etmek amaçlanmaktadır. PD-1, CTLA-4, TIM-3 ve LAG-3 inhibitör molekülleri en iyi tanımlanmış inhibitör reseptörlerdir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda T hücrelerine antijenik yapıların tanınması sonucu THR sinyali iletilmesi ile farklılaşmalarına da bağlı olarak inhibitör reseptör sentezine başlandığı görülürken, antijen tanınmasından 48-72 saat sonrasında T hücre yüzeyinde optimal seviyede inhibitör reseptör ekspresyonu tespit edilmiştir (Baitsch ve ark. 2012) Bu reseptörlere ek olarak T hücreler KLRG1, BTLA, CD160 ve 2B4 inhibitör reseptörlerini de eksprese etmektedirler. Ancak, bu reseptörlerin yapısı ve hücre içi sinyal yolakları net bir şekilde bilinmemektedir (Şekil 5).



Şekil 5. T hücre fonksiyonunu negatif olarak düzenleyen inhibitör reseptörler (Nguyen, & Ohashi, 2015, Şekil 1)

PD-1 kanser immüno terapilerinde sıklıkla hedeflenen inhibitör reseptördür. Programlanmış ölüm protein 1 ligand 1 (PDL1, B7H1, CD274) ve programlanmış ölüm protein 1 ligand 2 (PDL-2, B7DC, CD273), PD-1'in ligandlarıdır. PD-1, T

lenfositlerde, doğal öldürücü (NK) hücrelerde, B lenfositlerde, makrofajlarda, DH'lerde ve monositlerde eksprese edilir (Ahmadzadeh ve ark., 2009). T hücrede PD-1 transkripsiyonunun; aktive T hücre nükleer faktörü (NFAT), NOTCH, Forkhead Box O1 (FOXO1) ve (Interferon Regulatory Factor 9) IRF9 transkripsiyon faktörlerinin varlığında arttığı tespit edilmiştir (Staron ve ark., 2014). PD-L1'de T hücrelerde, B hücrelerde ve DH'lerde sürekli olarak ekprese edilmekte olup bu hücreler uyarıldığında da ekspresyonları artabilmektedir (Sharpe, Wherry, Ahmed, & Freeman, 2007). PD-L2' de genellikle aktive edilmiş DH'lerde ve makrofajlarda bulunmaktadır (Nguyen, & Ohashi, 2015). Kanser hücreleri üzerine yapılan birçok çalışmada kanser hücrelerinin de PD-L1 eksprese ettiği görülmüştür. Tümör infiltre T hücrelerdeki PD-1 ile PD-L1 etkileşimi sonucunda PD-1 sitoplazmik kuyruğunda bulunan ITIM bölgeleri konformasyonel değişikliğe uğrar ve SH2-içeren inozitol fosfotaz (SHP) aktivasyonu gerçekleşir. SHP-2'lerde T hücre proliferasyonundan sorumlu yolaklarda görevli olan PI3K ve AKT kinazların fosforilasyonunu engeller ve böylelikle aktive T hücrelerin proliferasyonu baskılanarak anti-tümör immün yanıt inhibe edilir (Yokosuka ve ark. 2012; Zhao ve ark., 2019).

Bir diğer inhibitör reseptör CTLA-4 de incelendiğinde, CTLA-4'ün CD28 kaynaklı eş uyaran sinyali inhibe ettiği görülmüştür. CTLA-4, T hücrelerin THR'leri aracılığı ile antijeni tanımalarından 24-48 saat sonra ekspresyonu artmakta olup, CD28'den 20 kat daha yüksek afinite ile antijen sunan hücrelerdeki CD80/86 molekülleri ile etkileşime geçtiği tespit edilmiştir. CTLA-4 ve ligandlarının bağlanması sonucunda CD28 aracılı eş-uyaran sinyal blokajı gerçekleştiği için T hücrelerde yanıtsızlık (anerji) gelişir ve T hücreler ölmektedir (Teft, Kirchhof, & Madrenas, 2006). Ayrıca, CTLA-4 PI3K ve AKT fosfatazların aktivasyonuna karışmaz ancak pro-apoptotoik Bcl-2 proteinin fosforilasyonuna neden olan alt yolakları uyarır (Rudd, Taylor, & Schneider, 2009). CTLA-4 ayrıca hücre dışı olarak DH'lerde bulunan CD80/86 liganlarına bağlanarak trans-endositoz yolu ile bu moleküllerin hücre içinde degradasyonuna neden olur (Qureshi ve ark. 2011).

LAG-3' de T hücrelerde bulunan bir diğer T hücre inhibitör molekülüdür. *LAG-3* geni *CD4* geni ile %20 oranında benzerlik gösterir ve LAG-3 molekülü de CD4

gibi MHK- sınıf II molekülüne yüksek afiniteli olarak bağlanır (Workman, Rice, Dugger, Kurschner, & Vignali, 2002). LAG-3 sitoplazmik bölgesi; 2 adet Ser454, KIEELE amino asit bölgeleri, glutamik asit ve proline dipeptitlerinden oluşur ancak bu bölgelerin hücre içi sinyal iletimi net bir şekilde bilinmemektedir (Workman, Dugger, & Vignali, 2002; Workman, & Vignali, 2003). Son yapılan çalışmalarda da, LAG-3'ün MHK Galaktin-3 (Gal-3) ve fibrinojen benzeri protein 1 (FGL1) ile bağlandığı tespit edilmiştir (Kouo ve ark., 2015; Wang ve ark., 2019).

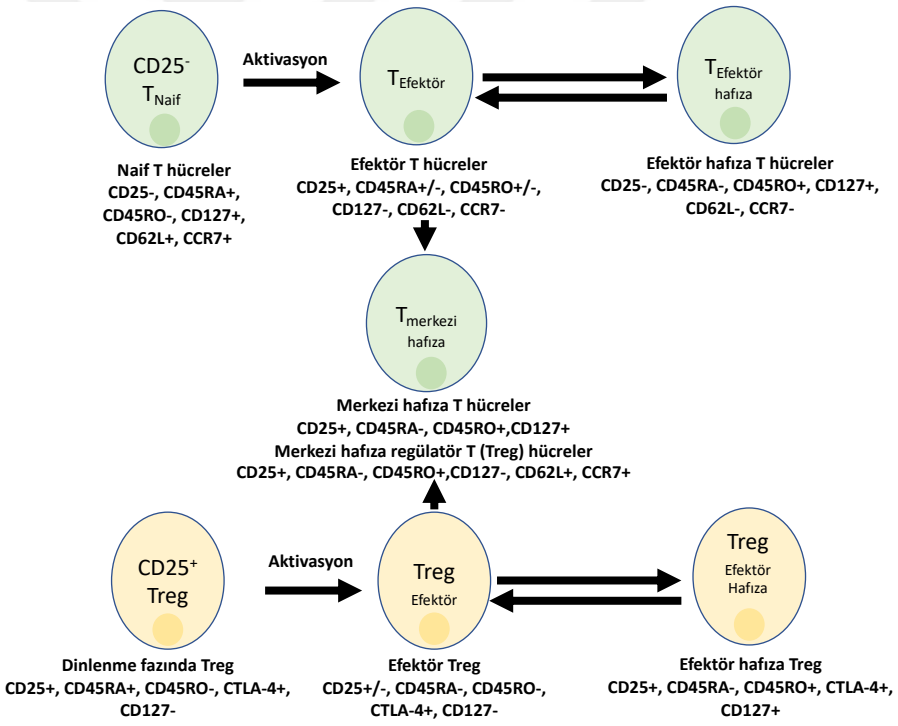
TIM-3' de T hücrelerde eksprese olan bir diğer inhibitör reseptördür. TIM-3'ün sitoplazmik kısmı beş adet korunmuş tirzoin bölgesi içerir. TIM-3'ün ligandları karsinoembriyonik antijen ilişkili adezyon molekülü 1 (CEACAM1) ve Galaktin-9 (Gal-9)' dur. İnhibitör sinyal yolağı tam net bir şekilde bilinmese de TIM-3'ün ligandlarına bağlanması sonrası Tyr256 ve TYr263'ün HLA-B-ilişkili transkript 3 (BATA3) ve tirozin kinaz FYN ile etkileşime geçtiği ve bunun sonucunda T hücrede anerjiye neden olduğu bilinmektedir (Davidson, Schraven, & Veillette, 2007; Huang ve ark., 2015; van de Weyer ve ark., 2006).

2.6.5. Efektör ve Hafıza T Hücreleri

Antijen tanınması ile aktive olan naif T hücreler eş-uyaran sinyallerin varlığında ve sitokin çevresinin etkisi ile çoğalıp effektör ve hafıza hücrelere farklılaşırlar. Efektör hücreler dolaşıma katılıp periferik dokularda bulunurlar, enfeksiyon durumunda antijenik peptidlerin enfekte hücrelerden eksprese edilmesi ile hızlı bir şekilde immün yanıta katılırlar. Ayrıca, efektör hücreler kısa ömürlü hücreler olarak bilinir. Bunun yanı sıra, hafıza hücreleri de sekonder lenfoid organlarda (genelde lenf nodunda) bulunabilir (merkezi hafıza hücreleri, T_{CM}) veya hızlıca enflamasyonun olduğu dokuya geçebilir (efektör hafıza hücre, T_{EM}). Bu hafıza hücreleri klonlarına spesifik antijenik peptidlerin tekrar tanınmaları ile eş-uyaran moleküller ile aktivasyona ihtiyaç duymadıklarından antijen spesifik olarak çok daha hızlı bir şekilde çoğalır ve primer immün yanıta göre çok daha yüksek verimlilikte ve hızda immün yanıt geliştirirler (Rosenblum, Way, & Abbas, 2016). Ayrıca, hafıza T hücreleri effektör T hücrelere oranla uzun süre yaşarlar ve bu yaşam döngülerindeki

denge IL-7 ve IL-15 sitokin sinyalleri sonucu anti-apoptotik yolakların aktivasyonu ile sağlanır (Surh, Boyman, Purton, & Sprent, 2006).

Aktive olan naif T hücreleri efektör ve hafıza T hücrelerine farklılaşırken eksprese ettiği yüzey belirteçleri incelendiğinde (Şekil 6) aktive T hücrelerin prolifere olmasında etkili sitokin olan IL-2'nin reseptörünün (CD25) ekspresyonunu arttığı görülmektedir. CD25 aynı zamanda yüksek oranda daha sonraki bölümde anlatılacak olan regülatör T (Treg) hücrelerde de bulunmaktadır. Ayrıca, naif T hücreler ve merkezi hafıza hücreler lenf nodu gibi sekonder lenfoid organlarda bulunduklarından efektör hücrelere oranla yüksek oranda CD62L ve CCR7 eksprese ederler (Masopust, Vezys, Marzo, & Lefrançois, 2001; Sallusto, Lenig, Förster, Lipp, & Lanzavecchia, 1999).

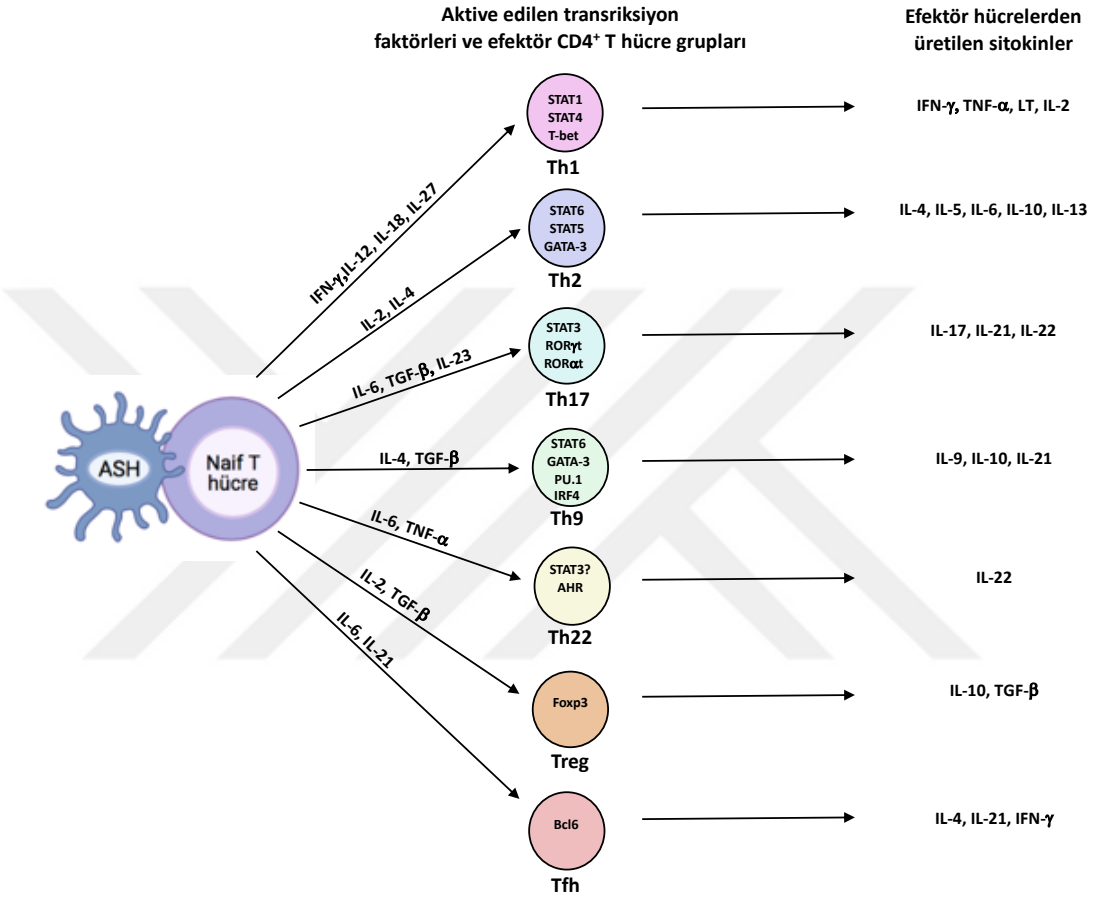


Şekil 6. Naif T hücrelerin aktivasyonu sonucu efektör ve/veya hafıza hücrelere farklılaşırken yüzey belirteçlerinin değişimi.

2.6.6. $CD4^+$ T Hücre Alt Grupları

T hücreler antijen tanımları ve enflamatuvar sitokin çevresinin yoğunluğuna bağlı olarak, farklı sitokin yolaklarının uyarımı sonucu farklı transkripsiyon

faktörlerinin daha baskın aktivasyonuna neden olup farklı effektör fonksiyonlara sahip $CD4^+$ yardımcı T hücre gruplarına farklılaşırlar. $CD4^+$ yardımcı T hücre alt grupları; Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 düzenleyici T hücreler (Treg) ve T foliküler yardımcı (Tfh) hücrelerdir (Şekil 7).



Şekil 7. Efektör $CD4^+$ T hücre alt grupları. Antijen sunan hücrelerden antijen tanınması ve eş-uyaran sinyallerin varlığında aktive olan $CD4^+$ T hücreler ve bu esnada iletilen sitokin sinyallerine bağlı olarak farklı transkripsiyon faktörleri aktive etmeleri sonucu baskın olarak farklı sitokinler üretebilen alt gruplara farklılaşırlar.

$CD4^+$ efektör T hücrelerinin, Th1 hücrelerine farklılaşma süreci incelediğinde; IL-12 sitokini farklılaşma için primer sitokin olarak bulunurken, IL-18'in de Th1 farklılaşmasında ko-faktör sitokin olarak rol aldığı ve IL-12 ile IL-27'nin sinerjistik etki ile IFN-γ üretimini destekledikleri tespit edilmiştir (Takeda ve ark. 1998; Owaki ve ark., 2005). IL-12 ve reseptörü (IL-12R) aracılı sinyal yolağının aktivasyonu sonucu STAT-4'ün fosforilasyonu ve dimerizasyonu gerçekleşmektedir. Dimer halinde bulunan STAT-4, çekirdeğe girip *IL18RAP, IRF1, FURIN* ve *IFNγ* gen bölgelerinin düzenleyici kısımlarına bağlanarak bu genlerin transkripsiyonun

düzenlenmesinde rol alır. IFNγ üretiminin T hücrede indüklenmesi soncunda da STAT-1 molekülleri fosforile olur ve Th1 spesifik gen olarak bilinen *IL12Rβ* ve *T-bet* genlerinin transkripsiyonlarının aktivasyonları gerçekleşir (Ylikoski ve ark., 2005; Ouyang ve ark. 1998). T-bet bir transkripsiyon faktörüdür ve IL-12 ve IFN-γ reseptörünü (IFN-γR) üreten gen bölgelerini indükleyip pozitif geri bildirim mekanizmasını devreye sokarak efektör T hücrelerin Th1 fenotipine farklılaşıp çoğalmasını destekler (Usui, Nishikomori, Kitani, & Strober, 2003; Usui ve ark., 2006). Ayrıca T-bet transkripsiyon faktörü, Th1 harici alternatif alt gruplara farklılaşmayı önlemek için BCL6 transkripsiyon faktörü ile de etkileşime girer. Aynı zamanda T-bet ve BCL6 etkileşimi Th1 hücrelerinin aktive olduklarından sonraki geç yanıt döneminde de görülür ve burada Th1 kaynaklı yüksek oranda IFN- γ üretimini otoimmün yanıtlara neden olmaması için durdurur (Oestreich, Huang, & Weinmann, 2011). Ayrıca yapılan birçok çalışmada, T-bet Th1'lerinin Th2'lere polorizasyonunu engellemek için Th2 transkripsiyon faktörü olan GATA-3 gen ifadesini de baskıladığı ve olgunlaşmış Th2 hücrelerinde T-bet transdüksiyonu gerçekleştirildiğinde bu modifiye Th2'lerin de Th1 ilişkili sitokinler üretebildikleri görülmüştür (Szabo ve ark., 2000; Usui ve ark., 2006). Th1 hücreleri, hücre içi mikroplara karşı ve anti-tümör immün yanıtta hücresel immün yanıtların desteklenmesinde rol oynar (Abbas ve ark., 2017). Th1 hücrelerin ürettikleri sitokinler de incelendiğinde; IFNγ, IL-2, tümör nekroz faktör (TNF) ve lenfotoksin (LT) üretikleri tespit edilmiştir (Liudahl, & Coussens, 2017). Th1 hücrelerinin ürettikleri bu sitokinlerden IFNγ imza sitokini olarak kabul görmektedir. IFNγ' nın görevi; $CD8^+$ sitotoksik T lenfositlerin (CTL) olgunlaşmasını desteklemek, makrofaj aktivasyonu sonucu reaktif oksijen ürünlerinin üretimini desteklemek, antijen sunan hücreleri uyarmaları sonucu eş-uyaran ve MHK moleküllerinin yüzey ekpresyonlarını artırmak, NK hücrelerinin aktive etmek, B hücre gelişiminde izotip dönüşümüne katılmaktır (Abbas ve ark., 2017; Liudahl, & Coussens, 2017). Böylelikle, tümör mikro çevresinde bulunan Th1 hücreleri ve bu hücrelerden üretilen sitokinlerin özelikleri anti-tümör immün yanıt ile ilişkilendirildiğinde, hasta prognozu ve Th1 sitokinlerinin varlığını pozitif korelasyon içerisinde olduğu gözlemlenmektedir (Liudahl & Coussens, 2017).

Th2 effektör hücrelerine farklılaşmada da THR ve eş uyaran molekül sinyallerine ek olarak, alerjik reaksiyonlar ve parazitik enfeksiyonlar sonrası eozonofil, bazofil, mast hücreleri, NKT hücrelerinden üretilen IL-4 sitokini katılır. IL-4'ün T hücreler tarafından tanınması ile hücre içerisinde STAT-6 fosforilasyonu gerçekleşir. STAT-6'lar çekirdeğe gelir ve IL-4 ve GATA3 moleküllerin transkripsyionunu düzenleyen genlerin aktivasyonuna neden olur (Goenka, & Kaplan, 2011). Ayrıca, yapılan çeşitli çalışmalarda IL-2'nin de Th2 farklılaşmasını STAT-5 transkripsiyon faktörünü aktive ederek desteklediği gösterilmiştir. STAT-5 aktivasyonu sonucunda da IL-4 molekülünü kodlayan gen bölgesinin transkripisyonu desteklenerek güçlü bir IL-4 üretimi Th2 hücrelerinden elde edilir (Kagami ve ark. 2001). Bunlara ek olarak, GATA3 transkripsiyon faktörü aktivasyonu ile Th2 hücrelerinden IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokin genlerinin transkripsiyonunu indüklenir (Tanaka ve ark., 2011). Th2'ler tümör mikroçevresinde de IL-4 üreterek, tümör hücrelerini lize edebilen eozinofillerin bu bölgeye göçünü desteklemektedir (Mattes ve ark., 2003; Tepper, Coffman, & Leder, 1992). Meme kanseri üzerine olan bir başka çalışmada da, IL-4 ve IL-13 varlığında meme kanseri hücrelerinin proliferasyonlarının baskılandığı gösterilmiştir (Nagai, & Toi, 2000; Gooch, Christy, & Yee, 2002). Ayrıca, Th2 kaynaklı sitokinlerin anti-tümör immün yanıtlara sebep olduğu gibi, tümör ilişkili makrofajları da aktive edebildikleri de görülmüştür (DeNardo ve ark., 2009). Th2'lerin tümör mikro çevresindeki polarizasyonları üzerine yapılan çalışmalarda da Th2'lerin Th1'e polarizasyonu engelleyip kötü hastalık prognozu ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Liudahl, & Coussens, 2017).

Th17 effektör hücrelerine farklılaşma ise mantar ve hücre dışı bakterilere karşı immün yanıtta görülmektedir. DH'lerdeki lektin reseptör Dectin-1'in fungal glukanlar ile etkileşimi sonucu bu hücrelerden IL-6, IL-1 ve IL-23 üretilir. DH'lerden bu sitokinlerin üretimi sadece direkt olarak mikroorganizmalar ile DH'lerin etkileşimi sonucu olmayıp, bu organizmalarla enfekte olmuş hücrelerin apoptoza giderken DH'ler tarafından tanınması sonucu da üretilir. Ayrıca, Th17 farklılaşmasında enflamasyon bölgesinde bulunan infiltre hücrelerden üretilen TGF-β'da etkilidir (Abbas ve ark., 2017). IL-6 ve IL-1 Th17 farklılaşmasının erken evresinde STAT-3 fosforilasyonuna neden olur ve STAT-3 fosforilasyonu sonucu Th17 hücrelerinin transkripsiyon faktörleri olarak bilinen RORγt aktive edilir. Bunun yanı sıra, IL-23

Th17'lerin hayatta kalmalarını ve proliferasyonlarını destekler (Abbas ve ark., 2017; Laurence ve ark., 2007; Yang ve ark., 2007). RORγt aktivasyonu sonucu Th17 hücrelerinden IL-17, IL-22 ve IL-21 sitokinlerinin üretimi indüklenir. Üretilen IL-21 Th17 hücrelerine otokrin şekilde etki ederek Th17 hücreleri için önemli olan STAT-3 aktivasyonu destekler. IL-17' de enflamasyon bölgesinde nötrofil ve monositlerin göç etmesinden sorumlu CXCL1, CXCL2 ve CXCL5 (Ouyang, Kolls, & Zheng, 2008) gibi kemokin ve çeşitli sitokinlerin üretimini sağlar. Ayrıca, IL-17 granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) üretimine sebep olup nötrofillerin oluşumunu destekler. IL-17 varlığında enflamasyon bölgesindeki doku ve lökositlerden ayrıca defensin gibi anti-mikrobiyal peptideler de üretilir. IL-22 sitokini, epitelyal bariyerin tamirini indükler. Tümör gelişiminde de Th17'lerin rolü incelendiğinde net bir bilgiye ulaşılamamış olunmakla beraber, Th17'lerin yumurtalık kanseri hastaların tümör mikro çeveresinde yoğun olarak bulunduğu ve hastanın yüksek sağ kalımı ile pozitif olarak korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Liudahl, & Coussens, 2017).

Son zamanlarda yeni bulunan bir $CD4^+$ efektör T hücre alt grubu da Th9 hücreleridir. Genel olarak bu hücre popülasyonu IL-9, IL-10 ve IL-21 üreten $CD4^+$ T hücreler olarak tanımlanmıştır. Th9 hücrelerine farklılaşmada etkili olan faktörler Th2'ler ile benzerlik göstermekle birlikte bu hücreler de sitokin olarak IL-4 sinyaline ve transkripsiyon faktörü olarak da STAT-6 ve GATA-3 aktivasyonuna ihtiyaç duyarlar. Bunlara ek olarak, Th9 hücrelerine farklılaşmada PU.1 ve IRF4 transkripsiyon faktörlerinin de etkili olduğu görülmüştür (Chen ve ark., 2020). Ayrıca, yapılan bir araştırmada Th2 hücrelerinin de TGF-β varlığında IL-9 üretip Th9 karakterisitk özelliğine sahip olabildiği görülmüştür (Veldhoen ve ark., 2008). Son zamanda yapılan çeşitli çalışmalarda, Th9 hücrelerinin anti-tümör özellikleri de incelendiğinde melanoma, akciğer kanseri, kolon kanseri ve meme kanserinde antijen spesifik Th9 yanıtları görülmüştür (Chen ve ark., 2020). Özelikle B16-F10 fare melanoma modelinde Th9 adaptif transferi uygulandığında, IL-9 üretimin tümör mikro çevresinde yüksek oranda bulunduğu ve mast hücreleri ile etkileşime geçerek tümörün büyümesinin baskılandığı tespit edilmiştir (Purwar ve ark., 2012; Sehra ve ark., 2015). Ancak, B hücre Non-Hogkin Lenfoma, lenfosittik lösemi ve yetişkin T hücre lösemilerinde, IL-9'un yüksek oranda üretilmesi sonucu tümör mikroçevresinde

regülatör $CD4^+$ T hücre (Treg)' lerin ve mast hücrelerin proliferasyonunun arttığı ve tümör gelişimini deteklediği gösterilmiştir. Bu nedenle Th9' ların anti-tümör immün yanıttaki görevleri henüz net değildir (Chen ve ark., 2020).

Son zamanlarda yeni keşfedilen bir diğer $CD4^+$ T hücre alt grubu da Th22'lerdir. Bu hücreler de isimlerini ürettikleri IL-22 sitokininden alırlar. Ancak, IL-22 üretimi bu hücre grubuna spesifik değildir Th17 ve NK hücreleri de IL-22 üretebilir ancak Th22 hücreleri IL-17 ve IFN-γ olmadığında da IL-22 üretebilmektedir (Duhen, Geiger, Jarrossay, Lanzavecchia, & Sallusto, 2009; Eyerich ve ark., 2009; Trifari, Kaplan, Tran, Crellin, & Spits, 2009). Bu hücreler ilk olarak sağlık kişilerin periferik kanında tespit edilmiştir ve IL-22 üretmeleri harici CCR4, CCR6 ve CCR10 ekspres ettikleri de gözlemlenmiştir (Duhen ve ark., 2009). Transkripsiyon faktörü olarak da bu hücrelerde aril hidrokarbon reseptörü (AHR)'nün aktive edildiği ve AHR'lerin Th22'lerde IL-22 üretiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Trifari ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda, Th22'lerin tümör evresi ile pozitif korelasyonlu olduğu görülürken, sağ kalım ile ters olarak kolerasyonda bulunduğu gösterilmiştir (Kuang ve ark., 2014) ve henüz Th22'lerin tümör mikro çevresindeki rolü net bir şekilde açıklanamamıştır.

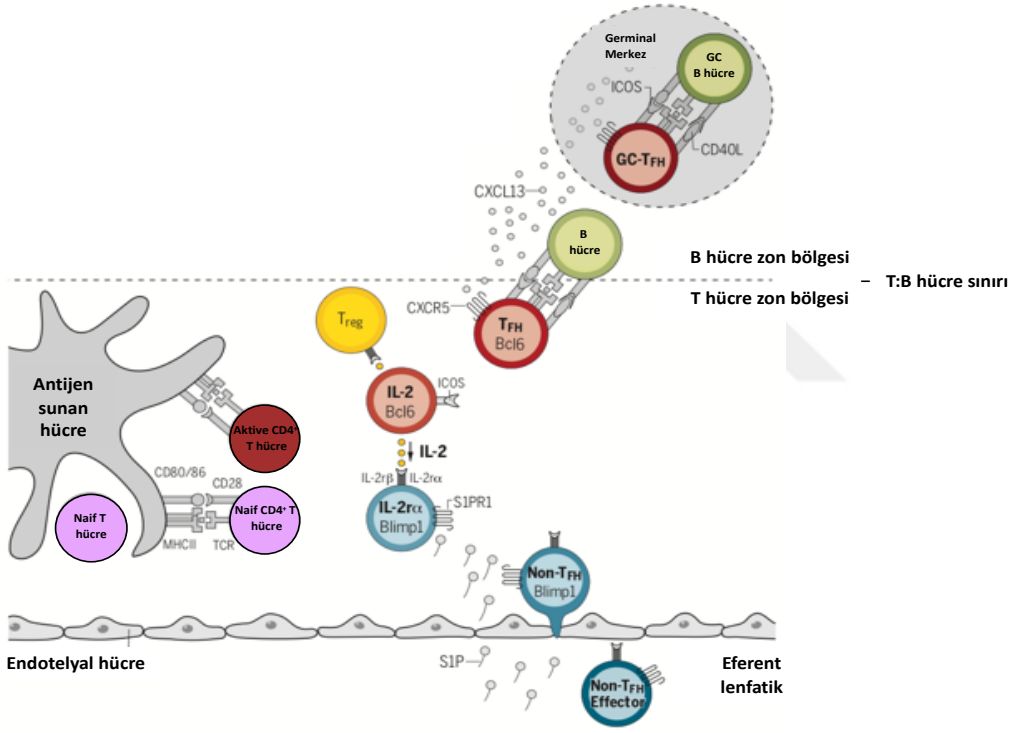
Tüm bu bahsettiğimiz $CD4^+$ efektör T hücrelere ek olarak tümör mikro çevresinde çok yoğun olarak bulunan regülatör T hücreleri (Treg) de inceleyecek olursak; naif veya effektör $CD4^+$ T hücrelere yoğun oranda IL-2 ve TGF-β sitokin sinyalleri iletildiğinde FoxP3 transkripsiyon faktörünün ekspresyonunda artış gerçekleşir. FoxP3 transkripsiyon faktörü de anti-eflamatuvar sitokinler olan IL-10 ve TGF-β üretimine neden olur. Ayrıca, Treg hücrelerinde CTLA-4 eş uyaran ekspresyonu da yüksek oranda bulunmaktadır ve bu durum da tümör hücrelerinin antijenik peptidlerini sunan DH'lerdeki eş uyaran sinyali engellenir. Aynı zamanda Treg hücrelerinde IL-2R ekspresyonu da yüsek oranda tespit edilmiştir, bu durum da ortamdaki IL-2'lerin hızlı bir şekilde Treg'ler tarafından tüketilmesine neden olduğu bilinmektedir (Abbas ve ark., 2017; Murphy, & Weaver, 2016).

T foliküler yardımcı hücreler de (Tfh) ilk kez insan tonsillerinde, $CD4^+$ T hücrelerin özel bir alt grubu olarak tanımlanmıştır (Schaerli ve ark., 2000). Yoğun

olarak bu hücreler diğer lenfositlerle birlikte tonsil, karaciğer, lenf nodu gibi sekonder lenfoid organlarda (SLO) bulunur. Tfh hücreleri; Bcl6 transkripsiyon faktörünün ekspresyonu ve CXCR5, PD-1, ICOS ve CD40L yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. Bu hücre grubu SLO'da bulunduğu gibi yapılan çalışmalarda düşük oranda CD69, ICOS ve PD-1 eksprese edenleri periferik kanda da bulunmaktadır (Meng ve ark. 2018). Tfh hücreleri diğer $CD4^+$ T hücre alt gruplarından farklı olarak lenfoid organlardaki foliküllerde bulunan B hücre zon bölgesine göç edip antijen spesifik B hücrelerinin; afinite olgunlaşması, izotip dönüşümü, antikor üreten plazama B hücrelere ve bellek B hücrelerine farklılaşması gibi germinal merkez olaylarında kritik rol oynamaktadır (Song, & Craft, 2019; Gu-Trantien ve ark., 2017). Ayrıca, Tfh hücreleri, kısa ömürlü antikor üreten plazmablastların ve bellek B hücrelerinin erken aktivasyonuna neden olan, ekstrafoliküler antikor yanıtı için de gereklidir (Song, & Craft, 2019).

$CD4^+$ T hücrelerinin Tfh hücrelerine farklılaşma süreci detaylı olarak incelendiğinde ilk olarak sekonder lenfoid organların T hücre zonu bölgesinde naif $CD4^+$ T hücreleri, dendritik hücrelerin MHC sınıf II kompleksi üzerinden sunulan antijenik peptidi T hücre reseptörü (THR) tarafından tanır. T hücrelerden eksprese edilen indüklenebilir T hücre eş uyaran (ICOS) ile dendritik hücrelerden eksprese olan ICOS ligandın (ICOS-L) bağlanmasını takiben dendritik hücrelerden IL-6 salınımı gerçekleşir. Ortamdaki IL-6'lar $CD4^+$ T hücrelerdeki IL-6 reseptörüne bağlanır ve eş uyaran sinyallerinin de varlığı ile $CD4^+$ T hücreleri Bcl-6 transkripsiyon faktörünü eksprese eder ve Tfh hücrelerine farklılaşma gerçekleşir (Song, & Craft, 2019). Bcl-6 transkripsiyon faktörünün aktive olması çeşitli modellerde CXCR5 kemokin reseptörünün ekspresyonu ile de ilişkilendirilmiştir (Choi ve ark., 2011; Pepper, Pagán, Igyártó, Taylor, & Jenkins, 2011). CXCR5 eksprese eden Tfh hücreleri B hücre zonu bölgesine göç etmek için bu kemokin reseptörün ekspresyonunu arttırır CCR7 kemokin reseptör ekspresyonu azaltır. Yüksek oranda CXCR5 eksprese eden bu T hücreler T:B hücre zonu sınırına gelirler (Luther ve ark., 2002). B hücre zonu sınır bölgesinde ayrıca antijen sunabilen olgunlaşmasını tamamlamamış CCR7 eksprese eden B hücreler de bulunur. Böylece Tfh hücreleri THR molekülü ile antijenik peptidi tanır ve ICOS, CD40-L eş uyaran moleküllerinin aracılığı ile antijen sunan bu B

hücreler ile etkileşime geçip B hücrelerin çoğalmasını sağlayan IL-21 üretir. Tfh hücreleri yüksek oranda CXCR5, ICOS ve PD-1 eksprese eder. Tfh'lerde CXCR5 ekspresyonunun artması ile B hücre zonu bölgesindeki yüksek oranda CXCL13 ile girer ve germinal merkeze göçünü tamamlayıp germinal merkez olaylarının gelişimini destekler (DiToro ve ark., 2018; Meng ve ark. 2018) (Şekil 8). Üretilen IL-21 ayrıca Tfh hücrelerinin otokrin olarak çoğalmasını da desteklerken, tanınan antijene bağlı olarak Tfh'ler IL-4, IL-10, IL-17 ve IFN-γ üretebilir ve böylelikle B hücrelerde izotip dönüşümü, affinite olgunlaşması gibi germinal merkez olayları desteklenir (Deenick, & Ma, 2011; Song, & Craft, 2019).



Şekil 8. Efektör $CD4^+$ T hücrelerin aktivasyonları sonrası Tfh hücrelerine farklılaşan efektör hücrelerin B hücreler ile germinal merkezde etkileşimi ve Tfh olmayan diğer efektör grupların lenf nodundan eferent lenfatikler aracılı çıkışı (DiToro ve ark., 2018).

Tfh fonksiyonunda bozukluklar, çeşitli hastalıklarda yüksek oranda ve yetersiz antikor üretimine neden olabilmektedir. ICOS eksikliği olan immün yetmezlik hastalarında dolaşımda çok düşük oranda Tfh hücreleri bulunmakla birlikte antikor üretiminde de bozukluklar tespit edilmiştir. HIV ile enfekte hastalarda Tfh hücrelerinin çoğaldığı ancak yüksek oranda PD-$L1^+$ B hücrelerinin germinal merkezde varlığı nedeni ile PD-1^+ Tfh hücrelerinin çoğalmadığı, ICOS ekspresyonlarının ve IL-21

üretiminin azaldığı görülüp, aşılamalar sonrası hastaların HIV spesifik antikorların üretimine de bu durumun engel olduğu tespit edilmiştir (Cubas ve ark., 2013). Enfeksiyon durumlarına ek olarak, düşük oranda da olsa sistemik lupus, eritematoz ve romatoid artrit gibi bazı otoimmün hastalıklarda $CXCR5^{+}PD\text{-}1^{hi}ICOS^{hi}$ Tfh hücreleri periferik kanda da bulunabilmektedir (Crotty Shane, 2014). Ayrıca, yapılan çeşitli çalışmalarda görüldüğü üzere Tfh hücreleri aşı uygulamalarından sonra uzun süreli koruyucu antikor yanıtının sağlanmasında sınırlayıcı bir faktördür (Bentebibel ve ark., 2013; Duan ve ark., 2014). Böylelikle çeşitli proenflamatuvar durumlarda Tfh hücrelerinin etkilerinin daha iyi anlaşılması ve karakterizasyonu ile bu hücrelerin ileride spesifik antikor üretimini desteklemek için potansiyel terapötik olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Kanser immünitesinde Tfh hücrelerinin rolünü araştıran çalışmalar ise oldukça yenidir ve henüz Tfh hücrelerinin kanser üzerindeki fonksiyonel ve moleküler özellikleri net bir şekilde tanımlanmamıştır. Kanser ile Tfh hücrelerini ilişkisi ilk kez meme kanserinde peritümoral tersiyer lenfoid yapılar (TLS) ile ilişkilendirilmiş ve Tfh hücrelerinin bu lenfoid yapılarda bulunmasını CXCL13 ekspresyonu ile kolere olduğu tespit edilmiştir (Gu-Trantien ve ark., 2013). Daha sonrasında kolon kanserinde (Bindea ve ark., 2013), meme kanserinde (Gu-Trantien ve ark., 2017) ve mide kanserinde (Meng ve ark., 2018) Tfh etkisini el alan çalışmalarda da CXCL13'ü hem $CXCR5^{-}CD4^{+}$ T hücrelerde hem de tümör hücrelerinden eksprese edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, $PD\text{-}1^{hi}CXCR5^{-}CXCL13^{+}CD4^{+}$ Tfh hücreleri tespit edilen kanser hastalarında, yüksek oranda IL-21 varlığı tümör infilitre lenfosit (TIL) oranının arttığı, hastaların sağ kalım süresinin de bu durma bağlı olarak uzadığı görülmüştür (Gu-Trantien ve ark., 2017).

2.7. Tfh Hücreleri ve Meme Kanseri İlişkisi

Tfh hücrelerinin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda, meme kanseri ile yapılan çalışmalar ön plandadır. Tümör mikro çevresindeki lenfoid dokularda ve periferde B hücreler ile tümör antijenlerine spesifik antikor üretiminden sorumlu Tfh hücreleri ile benzer fonksiyonları bulunan ancak farklı kemokin liganları eksprese eden hücreler tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda,

Tfh hücreleri CXCR5 ekspresyonları sonucu sekonder lenfoid organlarda B hücre folikülerine yerleşmesi ile karakterize edilse de meme kanserinde patolojik araştırmalar sonucunda PD-1^{hi}CXCR5^{-}CD4^{+} T hücrelerin konvansiyonel PD-1^{hi}CXCR5^{+}CD4^{+} Tfh hücreleri ile aynı fenotipik özelliği göstermekle birlikte meme kanseri hastalarının periferik kanında bu hücre grubu B hücre yanıtını indüklemede de görevli olduğu tespit edilmiştir (Gu-Trantien ve ark., 2013). Tüm bunlara ek olarak CXCR5 yüzey ekspresyonun azalmasının nedeni araştırıldığında, primer meme kanseri hücreleri süpernatantı ve tonsiler konvansiyonel PD-1^{hi}CXCR5^{+}CD4^{+} Tfh hücreleri ile kültüre edildiğinde tümör mikro çevresindeki Treg hücrelerinden üretilen IL-2 nedeni ile CXCR5 yüzey ekspresyonun azaldığı ve Bcl6 transkripsiyon faktörünün düşük oranda eksprese olduğu görülmüştür. Bu nedenle, meme kanserinde PD-1^{hi}CXCR5^{-}CXCL13^{+}CD4^{+} T hücrelerinin B hücrelerin olgunlaşmasında etkili olduğu ve üçüncül lenfoid yapılarda germinal merkez olaylarına katılıp enflamasyonlu doku bölgelerine göç edebildiği gösterilmiştir (Gu-Trantien, & Willard-Gallo, 2017). Tüm bu veriler, kronik enflamatuar meme kanserinde PD-1^{hi}CXCR5^{-}CD4^{+} T hücre farklılaşmasının, tümör mikro çevresinde Treg aracılı immün süpresyonu ve adaptif anti-tümör hümoral tepkilerin de novo aktivasyonuna dönüştürmede anahtar bir faktör olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, son zamanda Tfh hücrelerinde CXCR5'in baskılanmasının meme kanseri üzerine etkisini araştıran gruplar tarafından, lenfoid folüküllerde CXCR5 eksprese eden ancak Tfh hücreleri kadar olmasa da orta düzey Bcl6 eksprese eden T regülatör (Treg) belirteci CD25 negatif ve FoxP3 orta düzey eksprese eden regülatör özellikte T foliküler regülatör (Tfr) hücre grubu tanımlanmıştır (Faghih ve ark., 2014; Song, Liu, Liu, Wu, & Li, 2019). Tfr hücre grubunun, germinal merkez olaylarında Tfh ve B hücrelerin etkileşimini yüksek oranda IL-10 üreterek baskıladığı tespit edilmiştir (Song ve ark., 2019).

Sonuç olarak, Tfh hücrelerinin koruyucu veya antitümör aktiviteleri, Tfh hücrelerinin fenotipik belirteçleri ile ilişkisi ve bu hücrelerin kanserdeki rolünün daha fazla araştırılması gerekmektedir ve ileride yapılacak olan araştırmaların ışığında Tfh hücreleri antitümör hümoral immün yanıtları indükleyebilecek potansiyel terapötik olma niteliğindedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nın ortaklaşa çalışması sonucu gerçekleştirildi. Çalışmamız için etik kurul kararı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastahanesi'nden alındı (Proje/Karar No: 2020/110). Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastahanesi Genel Cerrahi kliniğine başvuran meme kanseri tanısı konmuş kişilerden onam formu onayı alındıktan ve rutin patolojik incelemeler tamamlandıktan sonra steril falcon içerisinde total RPMI-1640 içinde lenf nodu (LN) ve steril EDTA tüpleri içerisinde 10 mL kan örnekleri temin edildi.

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Hasta Lenf Nodu Dokusundan ve Periferik Kandan Hücre İzolasyonu

3.1.1.1. Lenf Nodu Örneklerinden Hücre İzolasyonu

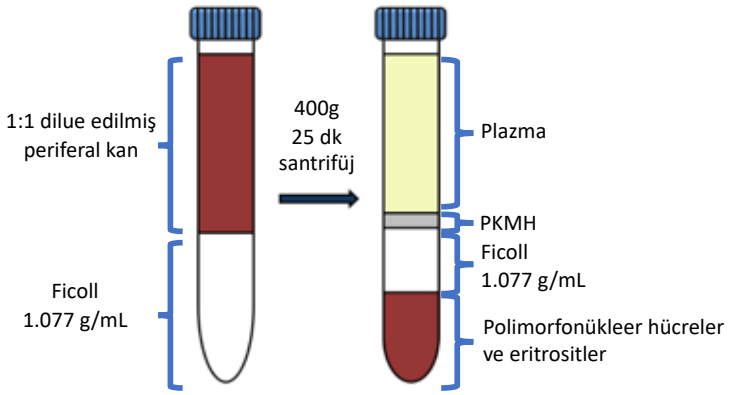
Temin edilen lenf nodu örnekleri steril laminar kabin içerisinde aseptik çalışılarak, LN'nin tam ortasından olacak şekilde bistüri yardımı ile ikiye bölündü. Elde edilen bir yarım da ortadan ikiye bölünerek bir parçası RT-PZR için diğer parçası da immün floresan (IF) boyamaları için ayrıldı ve RNA-Save solüsyonu içerisinde -80^0C' de saklandı.

Kalan yarım LN örneği de T hücre alt gruplarını akım sitometri aracılığı ile saptanması için kullanıldı. Steril petri kabına yaklaşık 5 mL PBS eklendi. Steril 45 μm gözenekli süzgeçler (*CellStranier*) içerisine yarım LN yerleştirilip insülin enjektörü arkası yardımı ile 5 mL steril PBS içerisinde LN ezildi. Elde edilen hücre süspansiyonu

üzerine 9 mL steril 1X PBS eklendi ve oda sıcaklığında 200xg'de 5 dakika santrifüj uygulanıp hücrelerin çökertilmesi sağlandı. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp hücreler 1 mL total (%10 Fötal Buzağı Serumu (FBS), %1 Penisilin-Streptomisin içeren) RPMI-1640 içerisinde resüspanse edilip hücre sayımına hazır hale getirildi.

3.1.1.2. Periferik Kandan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PMNH) İzolasyonu

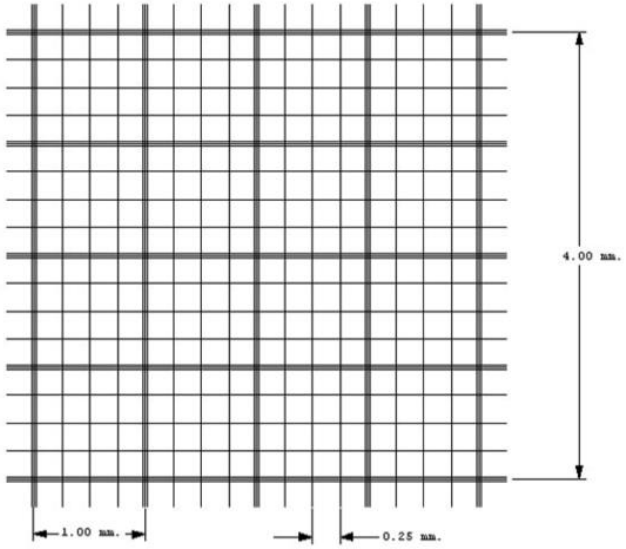
Periferik kan hem meme kanseri hastalarından hem de gönüllü sağlıklı kişilerden EDTA içeren tüplere alındı. Periferik kandan PMNH izolasyonu için densite gradyan yöntemi kullanıldı. Periferik kan 1:1 oranında steril 1X PBS ile sulandırıldı. Steril 15 mL'lik tüplere 3 mL steril fikol 1,077 g/mL eklendi. Fikol üzerine 1:1 oranında sulandırılan periferik kan örneği pastör pipet yardımı ile yayıldı ve oda sıcaklığında 400xg' de 25 dakika santrifüj uygulandı. Santrifüj sonrası pastör pipet yardımı ile fikol üzerinde bulunan plazma kısmı atıldı ve PMNH'lerin olduğu kısım (Şekil 9) toplanıp temiz steril falkon tüpüne aktarıldı. Toplanan PMNH'lerin üzerine yıkama için 10 mL 1X PBS eklendi ve oda sıcaklığında 200xg'de 5 dakika santrifüj uygulandı. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve hücreler 1X PBS ile resüspense edilip hücre sayımı için hazırlandı.



Şekil 9. Fikol 1,077 g/mL aracılığı ile densite gradyan yöntemi kullanılarak periferik kandan PMNH izolasyonunun şematik gösterimi.

3.1.2. Hücre Sayımı

Hücre sayım için resüspanse edilen hücre solüsyonundan 10 µL alınıp 10 µL triphan mavisi (%0,4) ile karıştırıldı ve boyanmayan canlı hücreler *Fuchs-Rosental* hemositometrisi kullanılarak sayıldı. Bu 20 µL 'lik karışımın tamamı, *Fuchs-Rosental* hemositometrisi (Hausser Scientific, ABD) ve lamelinin arasına alt veya üst bölmeye aktarıldı. *Fuchs-Rosental* hemositometrisi ve lamelinin arasındaki boşluk 0,1 mm'dir. Sayım alanı 0,25 mm ölçülerinde 16 küçük kareden oluşan ve bu 16 karenin birleşmesi ile 1 mm ölçülerinde 16 büyük kareden oluşmaktadır (Şekil 10)



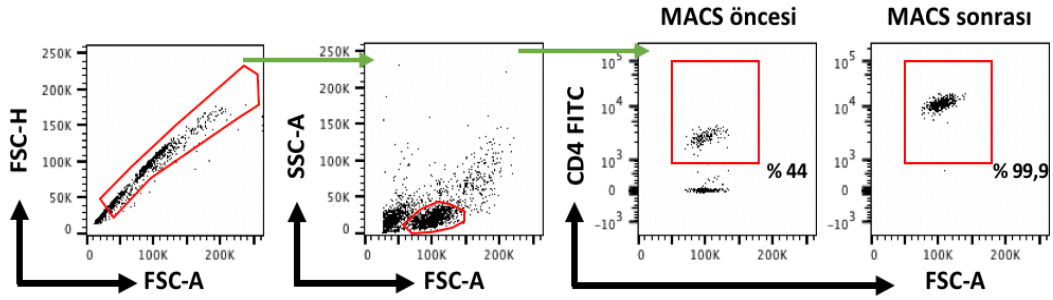
Şekil 10. Hücre sayımı için kullanılan *Fuchs-Rosental* hemositometresinin sayım alanın ışık mikroskobu altındaki şematik görünümü.

Hücre sayımı için 4 adet 0,25 mm ölçülerinde 16 küçük kare sayılıp ortalaması hesaplandıktan sonra elde edilen sayı ile 1mL'deki hücre miktarı aşağıda belirtilen formüller yardımı ile bulunur;

- *Fuchs-Rosental* hemositometresindeki 1 adet 0,25 mm ölçülerinde 16 küçük kare yüzey alanı = 1 mm x 1 mm = 1 mm^2.
- *Fuchs-Rosental* hemositometresindeki 1 adet 0,25 mm ölçülerinde 16 küçük kare ile lamel arasındaki hacim = 0,1 mm x 1 mm^2 = 0,1 mm^3 = 0,1 µL
- Hücre konsantrasyonu (hücre / mL) = (Total hücre sayımı / Sayım yapılan 0,25 mm ölçülerinde 16 küçük kare sayısı) x 10^4 x Dilüsyon Faktörü

3.1.3. Lenf Nodu Dokusundan ve PMNH'lerden Manyetik Aktive Hücre Ayrıştırma (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS) Yöntemi ile $CD4^+$ T Hücrelerin İzolasyonu

Lenf nodundan total hücre izolasyonu sonrası ve periferik kandan elde edilen PMNH hücrelerinden $CD4^+$ lenfositlerin izolasyonu için *MACS Human CD4 MicroBeads Human* (Miltenyi Biotec, Almanya) kiti kullanıldı. Kitin protokolü doğrultusunda; öncelikle hücre sayımı yapıldı. Deney düzeni için gerekli olabilecek kadar hücre ayrıldı ve 300xg'de 10 dakika santrifüj uygulandı. Süpernatant atıldı ve hücre süspansiyonu 10^7 hücre için 80 µL MACS tampon (PBS içerisine %0,5 BSA, 2mM EDTA) ile çözüldü (kit prosedüründe verilen solüsyon hacimlerinin değerleri 10^7 hücre için çalışmamızda hücre sayısı değiştiğinde oranlama yapılarak doğru hacimler kullanıldı). Resüspanse edilen hücrelerin üzerine 20 µL *$CD4^+$ MicroBeads* solüsyonu eklendi, karıştırıldı ve +4 ^{0}C'de 20 dakika inkübasyon uygulandı. İnkübasyon sonrası 2 mL MACS tampon eklenip 300xg' de 10 dakika santrifüj uygulandı, süpernatant atıldı ve hücre peleti 1 mL MACS tampon içerisinde resüspanse edildi. Magnetik seperasyon için, *LS kolon* magnetik alan tablosuna yerleştirildi. Kolon aktivasyonu için 3 mL MACS tampon eklendi. MACS tamponun kolondan geçmesi bittiğinde kolon üzerine hücre süspansiyonu eklendi. Magnetik boncuklar ile işaretli olan hücreler LS kolona magnetik alan varlığında bağlanırken kolondan geçen CD4 negatif olan hücreler atıldı. Spesifik olmayan kolona bağlanan hücreleri uzaklaştırmak için 2 kere 3 mL MACS tampon ile yıkama yapıldı. Yıkamalar sonrasında kolon magnetik alandan çıkarıldı ve temiz steril 15 mL'lik falconun üzerine yerleştirildi. Kolon üzerine 5 mL MACS tampon eklendi ve hızlıca LS kolon paketi içerisinden çıkan enjektör aparatı aracılığıyla basınç yardımı ile $CD4^+$ T hücreler falkonda toplandı. Elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin saflığının belirlenmesi için $CD4^+$ T hücre süspansiyonu alınarak anti-CD4 antikoru ile işaretleme yapılıp akım sitometri ile popülasyon saflık analizi gerçekleştirildi (Bknz. 3.2.1). Elde edilen hücre popülasyonundaki CD4 saflığının (>%95) tespit edilmesi ile (Şekil 11) santrifüj uygulanıp hücreler çöktürüldü ve hücre peleti daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere total RPMI-1640 ile resüspense edilip sayıldı.



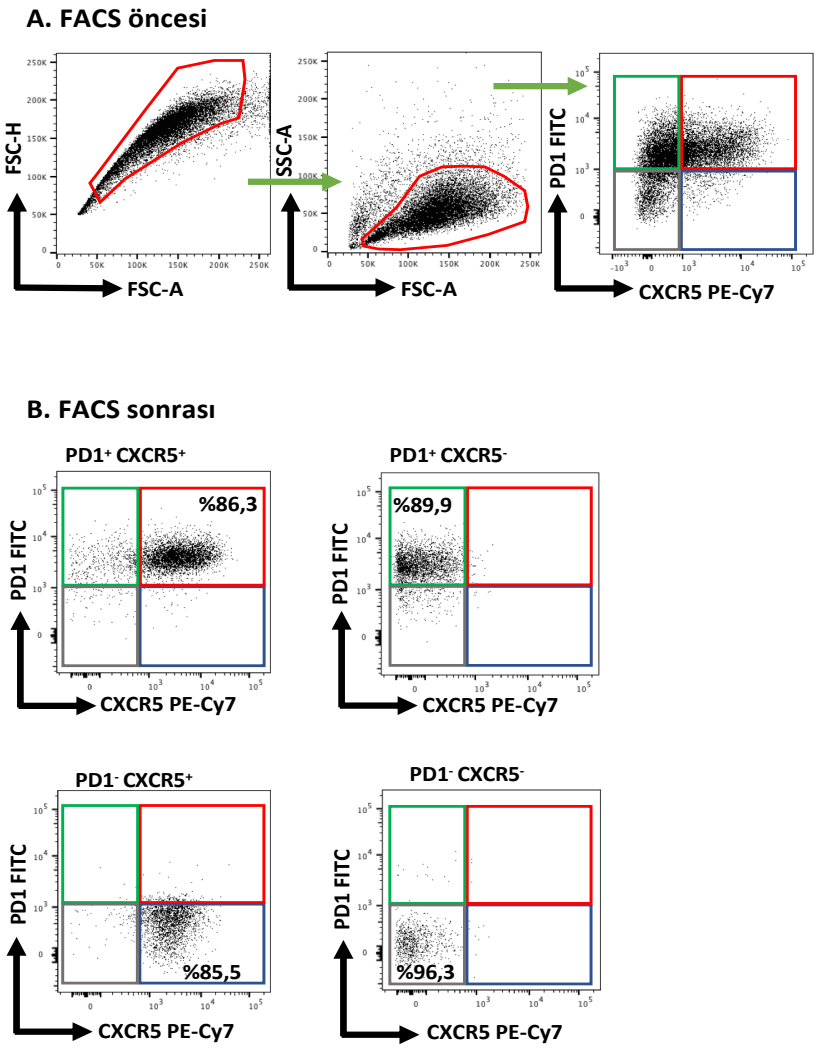
Şekil 11. MACS yöntemi ile LN'den ve PMNH'lerden izole edilen $CD4^+$ T hücrelerin saflıklarının akım sitometri aracılığı ile tayini, uygulanan hücre kapılama stratejileri ve CD4 pozitif seleksiyon MACS öncesi ve sonrası saflıkları gösteren temsili nokta saçılım grafikleri.

3.1.4. Floresan-Aktive Hücre Ayırma (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS)

FACS yöntemi, CD4 pozitif MACS sonrası elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarımından 72 saat sonra bu hücrelerin yüzeylerinde ifade ettikleri PD-1 ve CXCR5 moleküllerine bağlı olarak hücre saflaştırılmasında kullanıldı. Böylelikle uyarılan $CD4^+$ T hücrelerden PD-1^+CCXCR5^+, PD-1^+CCXCR5^-, PD-1^-CCXCR5^+ ve PD-1^-CCXCR5^- hücre popülasyonları elde edildi. FACS sonrası popülasyon saflığı kontrol edildikten sonra hastalardan elde edilen hücreler ile 4 ayrı hedef popülasyon için havuz (n>4) oluşturuldu. Bu hücre popülasyonlarından; popülasyonlar arasındaki gen ekspresyon oranlarının analizi için RNA izolasyonu ve cDNA sentezini takiben RT-PZR gerçekleştirildi. Ayrıca, bu popülasyonlardan BCL-6, ICOS ve TIM-3 ekspresyonlarının protein düzeyinde göstermek için sitospin (*cytospin*) uygulaması sonrası immünfloresan boyama gerçekleştirildi.

FACS yöntemini özetlenecek olursa; 72 saat boyunca uyarılan $CD4^+$ T hücreler kuyulardan toplandı 1X PBS ile 400xg'de 5 dakika santirijüf uygulanarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen hücreler anti-PD-1 FITC ve anti-CXCR5 PE-Cy7 antikorları ile immün fenotip boyaması protokolü takip edilerek hücreler işaretlendi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra hücre süspansiyonu total RPMI-1640 ile $5x10^5$ hücre/mL'ye seyreltildi ve olası hücre kümelenmelerinin cihazı tıkamaması için hücre süspansiyonu 45 µm gözenekli süzgeçten (*CellStrainer*) geçirilerek FACS işleminin başlatılması için hazır hale getirildi.

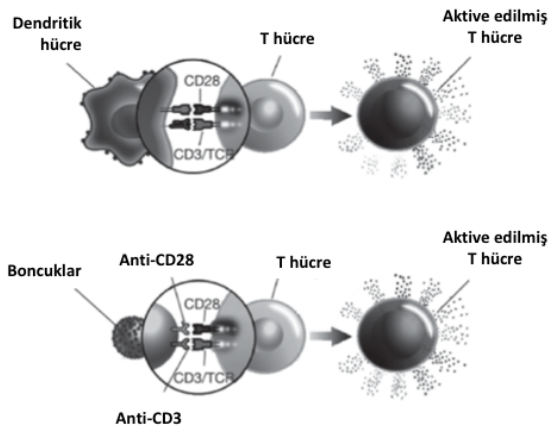
FACS işlemi için *BD FACS Aria II* cihazı kullandı ve cihazın sıvı basınç sistem parametreleri FACS işlemi öncesi 2 µm ve 3 µm çaplı polistiren boncuklar (*Accudrop beads*, BD Biosciences, ABD) ile optimize edildi. Optimizasyon sonrası, FACS uygulaması için hazırlanan hücre süspansiyonu cihaza yüklendi ve *Diva* programı aracılığı ile hücrelerin boyutsal (FSC), granüller (SSC) ve işaretlemede kullanılan floresan antikorlar dikkate alınarak kapılama yapılıp hedef popülasyonlar için FACS işlemi gerçekleştirildi (Şekil 12) FACS sonrasında elde edilen hücre popülasyonlarının %75 ve üzeri saflığa sahip olması durumda bu popülasyonlar ile ileriki deneyler yapıldı.



Şekil 12. FACS yöntemi ile örneklerden izole edilen PD-1^{+}CCXCR5^{+}, PD-1^{+}CCXCR5^{-}, PD-1^{-}CCXCR5^{+} ve PD-1^{-}CCXCR5^{-} hücre popülasyonları ve saflıklarının akım sitometri aracılığı ile tayini için uygulanan hücre kapılama stratejileri (A) FACS öncesi (B) FACS sonrası saflıkları gösteren temsili nokta saçılım grafikleri.

3.1.5. $CD4^+$ T Hücrelerin Fonksiyonel Analizler İçin Ekimi

LN'den ve PMNH'lerden MACS sonrası izole edilen $CD4^+$ T hücreleri U tabanlı 96 kuyucuklu petrinin 1 kuyusuna 100000 hücre ekilecek şekilde hesaplaması yapılıp ayrıldı. Bu $CD4^+$ T hücrelerin uyarım sonrası proliferasyonlarının takibi için karboksifloresein süksinimidil ester (CFSE) ile işaretlemesi gerçekleştirildi (Bknz. 3.2.3.1). CFSE işaretlemesi sonrası tekrar hücre sayımı yapılıp her kuyu için total RPMI-1640 içerisinde 200 µL total hacimde 100000 hücre düşecek şekilde hesaplama yapılıp T hücreler total RPMI-1640 içerisinde resüspanse edildi. Her bir kuyu için $CD4^+$ T hücrelerin uyarımını destekleyici anti-CD3 ve anti-CD28 insan antikorlarının bağlı olduğu boncukları bulunduran (Şekil 13) *Dynabeads İnsan T-aktivatör CD3/CD28* (Gibco, ABD) mixinden kuyu başına 4 x 10^7 Dynabeads/mL olan ana stoktan 0,2 µL eklendi.



Şekil 13. Dynabeads insan T-aktivatör CD3/CD28 (Gibco) çalışma prensibinin şematik gösterimi.

Anti-CD3 ve anti-CD28 varlığında $CD4^+$ T hücrelerde erken aktivasyon belirteçlerinin değişimini saptamak için 12 ve 24 saat %5 CO_2 içeren 37°C ayarlı humanize inkübatörde inkübasyon uygulandı. Ayrıca, Anti-CD3 ve anti-CD28 varlığında $CD4^+$ T hücrelerde inhibitör reseptör belirteçlerinin değişimini saptamak için 24, 48 ve 72 saat %5 CO_2 içeren 37°C ayarlı humanize inkübatörde inkübasyon uygulandı. $CD4^+$ T hücrelerin yüzey belirteçlerindeki değişimlerin analizleri için belirtilen inkübasyon sürelerinin sonunda kuyulardan hücreler toplanıp erken

aktivasyon ve inhibitör resptörlerine spesifik antikorlar ile işaretleme yapılıp akım sitometri aracılığı ile analiz edildi (Bknz. 3.2.2).

3.2. İmmünolojik Analiz Yöntemleri

3.2.1. Akım Sitometri ile İmmünfenotipleme

LN ve PMNH' lerinden elde edilen lenfositlerin fenotiplenmesi için hücrelerin yüzeylerinde spesifik olarak ifade ettikleri protein yapılara karşı monoklonal antikorlar (mAb) kullanılarak akım sitometri aracılığı ile immün fenotipleme gerçekleştirildi.

Bu tez boyunca tüm akım sitometrik incelemelerde; hücrelerin mAb'lar ile boyanmasında üretici firmanın öngördüğü üzere $1x10^6$ hücre için 100ng florokrom konjuge antikorlar (Tablo 5) kullanıldı.

İmmün fenotip boyamaları için hücreler 5 mL akım sitometri tüpüne aktarıldı ve 2 mL *CellWash* (BD, Biosciences, ABD) eklenip 400xg'de 5 dk santrifüj uygulanarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant atıldı ve hücreler 100 µL *CellWash* içerisinde resüspanse edildi. Resüspanse edilen hücreler üzerine üretici firmaların ön gördüğü sulandırmalar doğrultusunda ilgili panellerdeki (Tablo 6) mAb'lar eklendi. Kısa bir vorteks ile mAb'lar ve hücre süspansiyonu karıştırıldıktan sonra hücrelerin spesifik bir şekilde mAb'lar ile bağlanmasını sağlamak için +4°C' de, karanlıkta, 40 dakika inkübasyon uygulandı. İnkübasyon sonrası her tüpe 2 mL *CellWash* eklendi ve bağlanamayan mAb'ları uzaklaştırmak için santrifüj (400xg, 5dk, 25 °C) ile yıkama uygulandı. Süpernatant atıldı, hücreler 150 µL *CellWash* içerisinde resüspanse edildi. *FACS Aria II* akım sitometri cihazı ve *Diva* (BD, Biosciences, ABD) yazılımı aracılığı ile hücrelerin ifade ettikleri protein yapılarına bağlanan mAb'ların oranlarının okuması gerçekleştirildi. *Diva* programından okunan *.fcs* (*Flow Cytometry Standard*) uzantılı dosya formatları alındı ve *FlowJo* yazılımı (*Tree Star, ABD*) aracılığı ile hedef popülasyonların yüzey molekül ifadeleri analiz edildi.

Tablo 5. Akım sitometrik analizlerde kullanılan antikorların bilgisi

Anti-insan mAb adı	Klon	Firma	Florokrom
CD4	OKT4	SONY (Çin)	APC Cy7
CD4	SK7	SONY (Çin)	FITC
CD8	SK1	SONY (Çin)	PE Cy7
CD3	SK7	SONY (Çin)	PE-Texas Red, FITC
CD56	MEM-188	SONY (Çin)	FITC
CD19	SJ25C1	SONY (Çin)	PE
CD20	2H7	SONY (Çin)	APC
CD45	UCHL1	SONY (Çin)	PerCP
PD-1	EH12.2H7	SONY (Çin)	APC
CXCR5	J25D4	SONY (Çin)	PE Cy7
CCR7	G043H7	SONY (Çin)	PE
CD45RO	UCHL1	SONY (Çin)	PerCP
CTLA-4	L3D10	SONY (Çin)	PerCP
Lag-3	11C3C65	SONY (Çin)	FITC
Tim-3	F38-2E2	SONY (Çin)	PE
CD25	M-A251	SONY (Çin)	FITC
CD25	BC96	BioLegend (ABD)	APC Cy7
CD154	TRAP1	BD Biosciences (ABD)	PE
CD69	FN50	BioLegend (ABD)	FITC
CD127	A019D5	SONY (Çin)	PE
ICOS	C398.4A	SONY (Çin)	PE

Tablo 6. Akım sitometri aracılı immün fenotiplemede kullanılan paneller ve içerisindeki mAb'ler

Panel adı	Tek ütüp içinde kullanılan antikorlar
Genel lenfosit dağılımı	CD45-PER
	CD3-PE-Texas Red
	CD4-APC Cy7
	CD8-PE Cy7
	CD56-FITC
	CD19-PE
	CD20-APC
$CD4^+$ ve $CD8^+$ Naif, effektör ve hafıza Tfh hücrelerin dağılımı	CD3-FITC
	CD4-APC Cy7
	PD-1-APC
	CXCR5-PE Cy7
	CCR7-PE
	45RO-PER
$CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh hücrelerde inhibitör reseptörlerin dağılımı	CD3-PETEXRED
	CD4-APC Cy7
	PD-1-APC
	CXCR5-PE Cy7
	CTLA4-PERCP
	LAG3 FITC
	TIM-3-PE
$CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh hücrelerde regülatör reseptörlerin dağılımı	CD3-PETEXRED
	CD4-APC Cy7
	PD-1-APC
	CXCR5-PE Cy7
	CD25 FITC
	CD127-PE
$CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh hücreler için bilinen Tfh hücre belirteçlerin dağılımı	CD3-FITC
	CD4-APC Cy7
	PD-1-APC
	ICOS-PE

3.2.2. Akım Sitometri ile Fonksiyonel Analizler

U tabanlı 96 kuyucuklu petride anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarılan MACS ile izole edilen $CD4^+$ T lenfositlerin fonksiyonel değişimlerinin incelenmesi için yüzeylerinde eksprese ettikleri erken aktivasyon ve inhibitör reseptörlerin zamana bağlı değişiminin analizleri de akım sitometri aracılığı ile gerçekleştirildi

3.2.2.1. Uyarılan $CD4^+$ T Lenfositlerdeki Erken Aktivasyon Reseptör İfadelerindeki Değişimlerin İncelenmesi

$CD4^+$ T lenfositler uyarımlarından 0, 12 ve 24 saat sonra kültür ortamlarından geri toplandı ve santrifüj (400xg, 5dk, 25 ^oC) ile çöktürüldü. Hücre peletine dokunmadan süpernatant atıldı hücreler 2mL *CellWash* ile monoklonal antikor boyaması için yıkandı. Hücreler immün fenotipik boyamada olduğu gibi 100 µL *CellWash* ile resüspanse edildi ve $CD4^+$ T lenfositlerin uyarım sonrası Tfh benzeri hücrelere dönüşüp bu hücrelerin de ne kadar oranda erken aktivasyon belirteci ifade ettiklerini gözlemlemek için hücreler CXCR5 PE Cy7, PD-1 APC, CD69 FITC, CD25 APC Cy7 ve CD154 PE mAb'ları ile boyandı ve önceden açıklanan boyama ve yıkama protokolü takip edilip, bu belirteçlerin varlığının saptanması için *FACS Aria II* cihazında okutulup analiz edildi.

3.2.2.2. Uyarılan $CD4^+$ T lenfositlerdeki inhibitör reseptör ifadesindeki değişimlerin incelenmesi

$CD4^+$ T lenfositler uyarımlarından 0, 24, 48 ve 72 saat sonra kültür ortamlarından geri toplandı ve santrifüj (400xg, 5dk, 25 ^oC) ile çöktürüldü. Hücre peletine dokunmadan süpernatant atıldı hücreler 2mL *CellWash* ile monoklonal antikor boyaması için yıkandı. Hücreler immün fenotipik boyamada olduğu gibi 100 µL *CellWash* ile resüspanse edildi ve $CD4^+$ T lenfositlerin uyarım sonrası Tfh benzeri hücrelere dönüşüp bu hücrelerin de ne kadar oranda inhibitör reseptör ifade ettiklerini gözlemlemek için hücreler CXCR5 PE Cy7, PD-1 APC, LAG-3 FITC, TIM-3 PE, CTLA-4 PerCP mAb'ları ile boyandı ve önceden açıklanan boyama ve yıkama protokolü takip edilip, bu belirteçlerin varlığının saptanması için *FACS Aria II* cihazında okutulup analiz edildi.

3.2.3. Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) Aracılığı ile Hücre Çoğalması Analizleri

MACS ile izole edilip U tabanlı 96 kuyucuklu petride anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarılan $CD4^+$ T hücrelerin uyarım ile proliferasyonlarının takibi için hücrelerin *CFSE* (CellTrace, ThemorFisher, ABD) ile işaretlenmesi yapıldı. Liyofilize haldeki *CFSE* (100 µg) 36 µL steril DMSO ile çözüldü.

Hücreler santrifüj ile çöktürülüp 1 mL serum bulunmayan RPMI içerisinde resüspanse edildi ($1x10^6$ cells/ mL), son konsantrasyonu 5 µM olacak şekilde CFSE eklendi. Hücreler karanlıkta 37℃'de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonrasında 13 mL total RPMI-1640 eklendi ve 5 dakika buz üzerinde karanlıkta inkübasyon uygulandı. Santrifüj (400xg, 5dk, 25 ^oC) ile hücreler çöktürüldü ve 14 mL total RPMI-1640 eklenerek tekrar santrifüj (400g, 5dk, 25 ^oC) ile yıkama yapıldı. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler 100000 hücre 200 µL son hacimde olacak şekilde total RPMI-1640 ile resüspanse edildi, *Dynabeads İnsan T-aktivatör CD3/CD28* (Gibco, ABD) mixinden kuyu başına 0,2 µL (4×10^7 Dynabeads/mL) eklendi. U tabanlı 96 kuyucuklu petriye 100000 hücre 200 µL son hacimde olacak şekilde ekildi. Anti-CD3 ve anti-CD28 bağlı boncuklar ile uyarımından 72 saat sonra proliferasyonları akım sitometri aracılığı ile FITC kapısından *FACS Aria II* cihazında değerlendirildi.

3.2.4. İmmünfloresan Boyama Teknikleri

3.2.4.1. Lenf Nodu Kesitlerinin İmmün Floresan Boyama için Hazırlanması

Meme kanseri lenf dokusu (LN) örneklerinin yarısı immünfloresan analizleri için 1 mL RNAsave solüsyonu içinde ependorf içerisinde -80^oC'de saklanmıştı. İmmün floresan boyamalar için bu RNAsave içerisindeki LN dokusu çıkarılıp optimal sıcaklık solüsyonu (*OCT*) ile kaplandı. *OCT* içine gömük LN dokularının donması için -80^oC'de 15 dakika inkübasyon uygulandı ve kriyostat cihazında kesit almak için, OCT içerisine gömülen örneğin düz tarafı mikrotom bıçağına denk gelecek şekilde doku yerleştirildi. Dokudan alınan 5 µm'lik seri kesitler poly-L-lysine kaplı cam

lamellere çekildi. Elde edilen kesitler immün florasan boyamalar için -20^{o}C'de saklandı.

3.2.4.2. Floresan Aktive Hücre Ayırma (FACS) Sonrası Saflaştırılan Hücrelerin İmmün Floresan Boyama için Sitospin ile Lama Aktarımı

CD4 pozitif MACS sonrası elde edilen $CD4^{+}$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 uyarımından 72 saat sonra FACS aracılığı ile elde edilen PD-1^{+}CCXCR5^{+}, PD-1^{+}CCXCR5^{-}, PD-1^{-}CCXCR5^{+} ve PD-1^{-}CCXCR5^{-} hücre popülasyonları 1X PBS ile 400xg'de 5 dakika yıkandı. Hücre peletleri 300 µL 1X PBS ile resüspanse edildi. Hücre sayımı yapıldı ve her bir hücre popülasyonundan 50000 hücre alınarak lamlar üzerinde monte edilmiş olan özel kurutma kağıtları ve sitospin aparatlarının orta boşluğuna bırakıldı. Her bir lam, her bir popülasyon için Bcl-6, ICOS ve TIM-3 immün floresan boyamalarında kullanıldı. Sitospin protokolünde basitçe; aparata yüklenen örnekler sitospin cihazında (Hettich Universal 320, Almanya) 50xg'de 3 dakika santrifüjlendi. Lam üzerindeki süpernatantı uzaklaştırmak için, hücre yüklemede kullanılan sitospin aparatı çıkarıldı ve kurutma kağıdı bırakıldı ve 150xg'de 1 dakika santrifüj uygulandı. Lam üzerine yapıştırılan örneklerin tamamen kuruması için oda sıcaklığında 3-4 saat bekletildi ve immün florasan boyamaya hazır hale getirildi.

3.2.4.3. LN ve Sitospinden Elde Edilen Örnekler için İmmün Florasan Boyama

LN kesitleri ve sitospin ile yapıştırılan hücreler için aynı immün floresan boyama protokolü izlendi. Örneklerin olduğu lamların üzeri örneklerin hemen etrafından olacak şekilde hidrofobik kalem ile işaretlendi. Örnekler 1X PBS ile seyreltilmiş %1 BSA ile 1 saat oda ısısında blokaj için inkübe edildi. 3 kez 1X PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamadan sonra Tablo 7'de gösterildiği gibi sulandırılan primer antikorlardan 200 µL örneklerin üzerine eklendi ve 2 saat inkübasyon uygulandı.

Tablo 7. İmmün floresan boyamada kullanılan antikorlar

Anti-insan primer mAb adı	Klon	Firma	Dilüsyon faktörü
BCL-6	GI191E	İnvitrogen	1:200
ICOS	ISA-3	eBioscience	1:400
TIM-3	2E2	Origene	1:200
CD4	EPR6855	Abcam	1:200
CD19	LE-CD19	DakoCytomation	1:200

İnkübasyon sonrasında 1X PBS ile 5 dakika inkübasyonlu 3 yıkama yapıldı. LN kesitlerinin BCL-6 ve CD19 boyamalarında sekonder antikor olarak anti-fare-555 ve CD4 boyamalarında sekonder olarak anti-tavşan-488 antikorları 1:1000 oranında dilue edilip kullanıldı. Sitospin ile yapıştırılan hücrelerin tüm boyamalarında sekonder antikor olarak 1:1000 oranında seyreltilmiş anti-mouse-555 antikoru kullanıldı. Sekonder antikor karışımının içerisine ayrıca 1:1000 oranında hücre çekirdeklerinin boyamasından görevli DAPI de eklendi. Bu karışımdan 200 µL hücrelerin bulunduğu bölge üzerine eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 2 saat inkübasyon uygulandı. İnkübasyon sonrasında yine 3 kez 1X PBS ile yıkama yapıldı. Örneklerin üzerine +4ºC'de bulunan kapama solüsyonundan (mounting medium) 100 µL eklendi ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde 0,17 mm kalınlığındaki lamel ile örneklerin üzeri kapatıldı. Kapama solüsyonunun zaman içerisinde buharlaşmasını önlemek için slaytların etrafından ince bir şekilde oje ile geçildi. Ojenin kuruması için oda sıcaklığında karanlıkta en az 4 saat inkübasyon uygulandı. 10X ve 100X objektifte epifloresan mikroskobu (Olympus BX51, Japonya) ve bu mikroskoba bağlantılı 5,0 mega piksel CCD renkli kamera (DC5000i, Euromex, Hollanda) aracılığı ile görüntülemeler alındı ve görüntü analizleri için ImageJ yazılımı kullanıldı.

3.3. Moleküler Teknikler

Tüm moleküler analizler boyunca RNaz enzimlerini inaktive etmek için Diethyl dicarbonate (DEPC) ile sterilize edilmiş olan sarf malzemeleri kullandı (ependorf, tip vb.)

3.3.1. Lenf Nodu Örneklerinden RNA İzolasyonu

Doku parçalarını homojenizasyonu steril lateks boncuklar aracılığı ile gerçekleştirildi. RNA izolasyonu için PureLink RNA Mini Kit (ThermoFisher, ABD) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı.

-80ºC'de RNAsave içerisinde bulunan yarım lenf nodu kesitleri oda sıcaklığına getirilip steril bistüri yardımı ile küçük parçalara bölündü. Steril lateks boncuklar her bir hasta örneği için bir steril tüpün yarısına kadar (0,5 mL'e kadar) konuldu. Boncukların üzerine 1 mL %1 mercaptoethanol bulunduran lizis tampon eklendi. Ependorf tüpü doku parçalama cihazı "tissueelyser" içerisine yerleştirilip cihaz 40 saniye çalıştırıldı, 2 dakika buzda inkübasyon uygulandı. Doku parçacıkların tamamen homojen halde lizis tampon içerisinde görene kadar bu işlem tekrarlandı. Homojenizasyon sonrası, boncukların üzerindeki lizis tampon toplandı. Boncukların üzerine 1 mL (1:1 lizis tampon) %70 EtOH eklendi ve pipet yardımı ile al ver yaparak boncuklarda kalan hücreler lizis tamponun olduğu tüpe geçirildi. 5 saniye vorteks uygulandı. Kit içerisinden çıkan filitreli "*Spin Cartridge*" tüpünden 700 µL homojine doku süspansiyonu santirfüj (1200 x g, 15 sn, 25 ºC) aracılığı ile geçirildi. Santrifüj sonrası alt tüpte kalan süzüntü atıldı. Tüm lize edilen örnek tek bir filtrede toplanana kadar bu işlem tekrarlandı. Kitten çıkan *Wash Buffer II* (EtOH eklenmiş)' den filtre üzerine 500 µL eklendi ve santrijüf uygulandı (1200xg, 1 dk, 25 ºC). Süzüntü atıldı ve filtrenin kurutulması için santrifüj tekrarlandı (1200 x g, 1 dk, 25 ºC). Filtrenin olduğu *Spin Cartridge* üst bölmesi steril ependorf üzerine geçirildi ve filitredeki RNA'ların elde edilmesi için *RNAase-free Elution Buffer* dan 30 µL eklendi. 2 dakika oda ısısında inkübasyon sonrası santrifüj (1200 x g, 2 dk, 25 ºC) uygulandı.

İzole edilen RNA'nın kalitesi ve konsantrasyonu için *RNAase-free Elution Buffer* blank olarak kullanıldı ve UV spektrofotometrede (NanoDrop ND-1000, ABD) $OD_{260,}$ OD_{280} ve OD_{230} nm'lerde ölçüm yapıldı, $OD_{260/280}$ ve $OD_{260/230}$ oranları dikkate alınarak nükleik asitlerin saflığı saptandı. RNA örnekleri -80 ^{o}C'de bir sonraki aşama olan cDNA sentezi için saklandı.

3.3.2. FACS Sonrası Elde Edilen Popülasyonlardan RNA İzolasyonu

LN ve PMNH'lerden elde edilen $CD4^{+}$ T hücrelerin uyarımından 72 saat sonra gerçekleştirilen FACS sonrası elde edilen PD-1^{+}CCXCR5^{+}, PD-1^{+}CCXCR5^{-}, PD-1^{-}CCXCR5^{+} ve PD-1^{-}CCXCR5^{-} hücre popülasyonlarından tek hücre RNA izolasyon kiti kullanılarak (NORGEN, Kanada) cDNA sentezinde kullanılmak için gerekli olan RNA elde edildi. Kitin protokolüne bağlı kalarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Basitçe; elde edilen popülasyonlardan RL Buffer içerisindeki hücrelerin üzerine hacimsel 1:1 oranında %70 etanol eklendi. Kit içerisindeki Single Cell RNA Spin Column steril ependorf üzerine yerleştirildi ve etanol eklenen hücre solüsyonu kolon üzerine eklenip 3500xg' de 1 dakika santrifüj uygulandı. Kolondan geçen süzüntü atıldı ve tüm örnek kolonda toplanana kadar bu işlem tekrar edildi. 400 µL yıkama solüsyonu (*Wash Solution A*) kolon üzerine eklendi ve 14000xg'de 1 dakika santrifüj uygulandı. Kolondan geçen süzüntü atıldı kolonu kurutmak için 14000xg'de 2 dakika daha santrifüj uygulandı ve kolon temiz ependorf (*Elution tube*) üzerine geçirildi. Kolon üzerine 20 µL *Elution Solution A* solüsyonu eklendi ve önce 200xg'de 1 dakika daha sonrasında 14000xg'de 1 dakika santrifüj uygulandı ve daha önce de açıklandığı gibi UV spektrometre yardımı ile RNA saflık değerlendirmesi yapıldı. RNA'lar -80 ^{o}C'de saklandı.

3.3.3. Elde Edilen RNA'lardan cDNA Sentezi

Komplementer DNA (cDNA), izole edilen total RNA'dan reverse transkripsiyon aracılığı ile RevertAid First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher, ABD) kiti kullanılarak elde edildi. cDNA sentez protokolü ve bileşenleri Tablo 8'de gösterildi. Kısaca, total LN dokusundan elde edilen her bir örnek için 1000 ng RNA

ve FACS sonrası her bir popülasyondan elde edilen RNA için 170 ng RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Örnekler için RNA miktar hesaplamasından sonra elde edilen RNA'ların üzerine oligo $(dT)_{18}$ primerinden eklenip son hacim 12 µL olacak şekilde nükleaz bulundurmayan steril su ile tamamlandı. 65 ºC'de 5 dakika inkübasyon uygulandı. Sonrasında her bir örnek için *5X Reaction Buffer*, *RiboLock RNase Inhibitör, dNTP Mix* ve *ReverAid M-MuLV RT* eklendi. 42 ºC'de 60 dakika ve 70 ºC'de 5 dakika inkübasyon uygulandı.

Tablo 8. cDNA sentez protokol

Bileşen	Hacim (µL)	Son konsantrasyon
İzole edilen RNA		1000ng
Oligo $(dT)_{18}$ primer	1 µL	
Nuclease-free water	12 µL son hacime tamamlandı	
İnkübasyon: 65ºC'de 5 dakika		
5X Reaction Buffer	4 µL	
RiboLock RNase Inhibitör (20 U/µL)	1 µL	
10 mM dNTP Mix	2 µL	
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1µL	
Total reaksiyon hacmi	20 µL	
İnkübasyon : 42 ºC'de 60 dakika ve 70 ºC'de 5 dakika		

3.3.4. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)

Lenf nodu örneklerinden ve PMNH'lerden izole edilip 72 saat boyunca uyarılan $CD4^+$ T hücrelerin FACS sonrası $PD\text{-}1^+CCXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CCXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CCXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CCXCR5^-$ hücre popülasyonlarında da STAT-1, NF-κB, STAT-5, GATA3, IL-21, STAT-3, FOXP3, BLC6, T-bet ve RORγt gen ekspresyonları β-actin gen (house-keeping) ekspresyon oranına göre incelenmek üzere ticari olarak temin edilen primerlerin dizaynı yapıldı. Bu hedef genlerin ekspresyon analizleri için tasarlanan primer bilgileri Tablo 9' da gösterildiği gibidir. Hedef gen ekspresyon oranlarının saptanması için gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu (RT-PZR) tekniği kullanıldı ancak bunun öncesinde primer optimizasyonu için dalak, lenf nodu

ve çeşitli kanser hücre hatlarından elde edilen cDNA mix ve genomik DNA mixi kullanılarak, farklı sıcaklıklarda primer bağlanmasını gözlemlemek için gradyan PZR tekniği aracılığı ile primer sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 9. PZR analizlerinde incelenen genler ve primer bilgileri

Gen	Primerler	Ürün (bp)	Gen Bank No.
EPCAM	Forward Primer: 5'-CGCAGCTCAGGAAGAATGTG-3' Reverse Primer: 5'-TGAAGTACACTGGCATTGACG-3'	88	NM_002354.3
STAT-1	Forward Primer: 5'-TTCCGTGGACGAGGTTTTGT-3' Reverse Primer: 5'-TGATGCACCCATCATTCCAGA-3'	126	NM_139266.3
NF-κB	Forward Primer: 5'-ACCAGGCTGGCAGCTCTTCTC-3' Reverse Primer: 5'- AGGCACAACTCCTTCATCCTCTCC-3'	120	NM_001382627.1
STAT-5	Forward Primer: 5'- CCTCCAGAGACACCTGCTTC -3' Reverse Primer: 5'- CCAGTACCAGGAGAGCCTGA-3'	116	NM_001288720.2
GATA-3	Forward Primer: 5'-ACCACAACCACACTCTGGAGGA-3' Reverse Primer: 5'-TCGGTTTCTGGTCTGGATGCCT -3'	132	NM_002051.3
IL-21	Forward Primer: 5'-CATGGAGAGGATTGTCATCTGTC-3' Reverse Primer: 5'-CAGAAATTCAGGGGACCAAGTCAT-3'	164	NM_001207006.3
STAT-3	Forward Primer: 5'-TCACGCCTTCTACAGACTGCAG-3' Reverse Primer: 5'-TCCGGACATCCTGAAGGTGCTG-3'	121	NM_001384993.1
FOXP3	Forward Primer: 5'- CAGCACATTCCCAGAGTTCCT -3' Reverse Primer: 5'- TCATTGAGTGTCCGCTGCTT -3'	132	NM_014009.4
Bcl-6	Forward Primer: 5'-CTTCCCCACGAGCCTACA-3' Reverse Primer: 5'-CCCGTCATGGACCTGTTAA-3'	160	NM_001130845.2
T-bet	Forward Primer: 5'- ATGTGACCCAGATGATTGTG -3' Reverse Primer: 5'- TGCGTGTTGGAAGCGTTG -3'	112	NM_013351.2
RORγt	Forward Primer: 5'- TGGACCACCCCCTGCTGAGAAGG -3' Reverse Primer: 5'- CTTCAATTTGTGTTCTCATGACT-3'	78	NM_001001523.2

PZR reaksiyonu için bileşenler ve protokol Tablo 10'da gösterildiği gibidir. Basitçe; PZR için gerekli tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi ve Taq DNA Polimeraz (ThermoFisher, ABD) dışında tüm bileşenler vortekslenerek her bir hedef genin reaksiyonu için 1,5 mL'lik bir tüp içinde hedeflenen reaksiyon miktarlarına göre bir ana karışım hazırlandı. Sırasıyla, Taq Tamponu, RNase / DNase içermeyen su

(dH_20), dNTP karışımı, ileri (*forward*) ve geri (*reverse*) primerler ve $MgCl_2$ karışıma eklendi. Ana karışım, vortekslenerek iyice karıştırıldı. Daha sonra Taq DNA polimeraz enzimi eklendi ve karışım eşit olarak 200 µL'lik PZR tüplere dağıtıldı. Son olarak, 1 µL insan cDNAmix veya genomik DNAmix tüplere eklendi. Negatif kontrol olarak cDNAmix veya genomik DNAmix içermeyen karışım hazırlandı. Daha sonra tüm PZR örnekleri termal döngüleyicinin plakasına (Arktik Thermal Cycler, ThermoFisher, ABD) yerleştirildi. Primerlerin optimum spesifik bağlanma sıcaklığını belirlemek için ilgili tüm genler ile gradyan PZR uygulaması gerçekleştirildi. Gradyan PZR uygulamasında sıcaklık döngüleri Tablo 11'de gösterildiği gibidir. PZR uygulamasından sonra optimum sıcaklıkta primer bağlanmasını takiben spesifik olarak çoğaltılan genlerin görüntülenebilmesi için Agaroz Jel Elektroforez uygulaması gerçekleştirildi.

Tablo 10. PZR bileşenlerinin 1 reaksiyon için kullanılan hacimleri ve son konsantrasyonları.

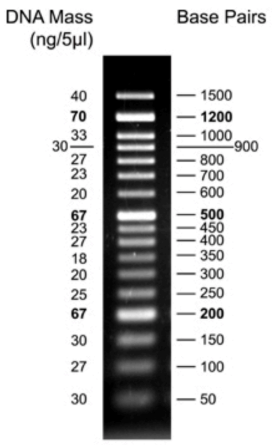
Bileşen	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
Taq Buffer (10X)	2,5	1x
dNTP mix (2mM)	2,5	0,2 mM
$MgCL_2$ (25 mM)	2,5	2,5 mM
Forward Primer	1	0,2 µM
Reverse Primer	1	0,2 µM
dH_2O	14,25	
Taq DNA Polmeraz (5 U/µL)	0,25	0,05 U/µL
cDNA mix veya Genomic DNA mix	1	
Total reaksiyon hacmi	25	

Tablo 11. Gradyan PZR sıcaklık aşamaları ve döngü sayısı

PZR aşamaları	Sıcaklık (^{0}C)	Süre	
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	
Denatürasyon	95	30 saniye	40 döngü
Bağlanma	58-63	30 saniye	
Uzama	72	20 saniye	
Son uzama	72	10 dakika	

3.3.5. Agarose Jel Elektorforez

Jel elektroforez için %2'lik agaroz jel 1,5 gram agarozun 75 mL 1X Tris-borat-EDTA (TBE) tamponu içerisinde mikro dalgada yardımı ile çözülmesi sonucu elde edildi. Jel 60^0C'ye soğutuldu ve içerisine son konsatrasyon 10 mg/mL olacak şekilde etidyum bramür eklendi. Jel donmadan agaroz çözeltisi, jel kalıbına döküldü ve PZR örneklerinin yükleneceği kuyuların oluşması için jel üzerine tarak yerleştirildi ve jelin üzerinde hava kabarcıkları oluşması durumunda yüzeyden hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Agarozun katı jel formunda polimerize olması için yaklaşık 1 saat oda ısında inkübasyon uygulandı. Katılaşma gerçekleştiğinde, taraklar çıkarıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı da jelin üstünü kaplayacak şekilde 1X TBE tamponu ile doldurduldu. Her PZR örneğinden 7 µL alınıp parafilm üzerinde 1 µL 8X yükleme boyası (Biorad, ABD) ile karıştırıldı ve jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. DNA belirteci olarak 50 baz çift (bp)'lik DNA belirtecinden (Şekil 3.6) 3 µL direkt kuyuya yüklendi. Elefktoroforez tankının kapağı kapatılıp DNA'nın bulunduğu jelin üst kısmı katot bağlantısına yürüme yönü de anot tarafına bağlandı, tankın kapağı kapatılıp akım cihazına bağlandı. Jel elektroforez için 100 voltta 45 dakika sabit akım uygulandı. PZR ürünlerinin yükleme boyaması yardımı ile jelde yeteri kadar yürütüldüğü gözlendikten sonra PZR ürünleri sonucu beklenen bantlar *Kodak Gel Logic 1500* (Carestream Healty Inc., ABD) sistemi kullanılarak UV ışık altında görüntülendi.



Şekil 3.6. 50 baz çift (bp)'lik DNA belirteci (GeneDirex, ABD).

3.3.6. Gerçek-Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) Uygulaması

Optimal primer bağlanma sıcaklığı gradyan PZR ile belirlenmesinde sonra, gen ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi için gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) uygulandı.

Bu işlem sırasında tüm bileşenler oda ısısına getirildi ve vorteks aracılığı ile karıştırıldı. 1 hasta cDNA örneğinde ilgi genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesinde kullanılan tüm içerikler ve hacimler Tablo 12'de gösterildiği şekilde hazırlandı. Basitçe master mix içerisine; *SSOAdvanced SYBR green mix* (Biorad, ABD), nükleaz içermeyen distile su, ileri (*forward*) ve geri (*reverse*) buz üzerinde karıştırıldı. Hazırlanan mastermix eşit miktarlarda 0,2 mL'lik PZR tüplerine (Biorad, ABD) aktarıldı. Son olarak hastaların cDNA örnekleri (1 pg/µL) 2 şerli çalışarak master mix bulunan PZR tüplerine eklendi. Daha sonrasında örnekler RT-PZR (BIO-RAD Real-time PCR Detection System, ABD) cihazına yerleştirildi. Gradyan PZR ile belirlenen primer bağlanma optimal sıcaklıkları kullanılarak Tablo 13'de belirtildiği gibi RT-PZR sıcaklık değer ve döngülerinde PZR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 12. Gerçek zamanlı PZR bileşenlerinin hacim ve konsantrasyon bilgileri

Bileşen	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
SSOAdvanced universal	5	1x
Forward Primer	1	0,5 µM
Reverse Primer	1	0,5 µM
dH_2O	2	
Örnek cDNA	1	(1 pg/µL)
Total reaksiyon hacmi	10	

Tablo 13. Gerçek zamanlı PZR, termal döngü protokolü

RT-PZR aşamaları	Sıcaklık (^{0}C)	Süre	
Polimeraz aktivasyonu ve Denatürasyon	95	3 dakika	
Denatürasyon	95	30 saniye	40 döngü
Bağlanma	Primer için belirlenen optimal sıcaklık	30 saniye	
Uzama	72	20 saniye	
Erime-eğrisi analizi	55-95 derece arası, 0,5 artış ile	5 saniye/basamak	

Termal döngüler sonunda, gerçek-zamanlı PZR analizi için *CFX Manager* (Biorad, ABD) yazılımı kullanıldı. Hedef genlerden elde edilen Ct değerleri, aynı cDNA'ların referans geni olarak β-actin ifadelerine normalize edildi.

3.4. İstatiksel Analizler

Tüm fenotipik ve fonksiyonel analizler için en az 6 bağımsız kullanıldı. FACS sonrası en az 8 bağımsız deneyden alınan PD-1$^+$CCXCR5$^+$, PD-1$^+$CCXCR5$^-$, PD-1$^-$CCXCR5$^+$ ve PD-1$^-$CCXCR5$^-$ hücre popülasyonları ayrı ayrı birleştirilip havuz oluşturuldu. Elde edilen tüm verilerde gruplar arası istatiksel farklılıkları gözlemlemek için, Graphpad Prism v8 yazılımı kullanılarak ANOVA ve Student's unpaired t testleri sonucu elde edilen p değerleri değerlendirildi. Bu analizlerde $p<0,05$ istatiksel olarak anlamlı fark kabul edilirken, $p<0,01$ değerleri yüksek oranda istatikse olarak anlamlı fark kabul edildi. Hedef popülasyonların aritmetik ortalaması, standart hata çubukları ile birlikte grafikler üzerinde gösterildi.

4. BULGULAR

4.1. Meme Kanseri LN ve Periferik Kan Örneklerindeki T Hücrelerinin İmmün Fenotiplendirmesi ve Tfh İlişkili Belirteçlerin Analiz Sonuçları

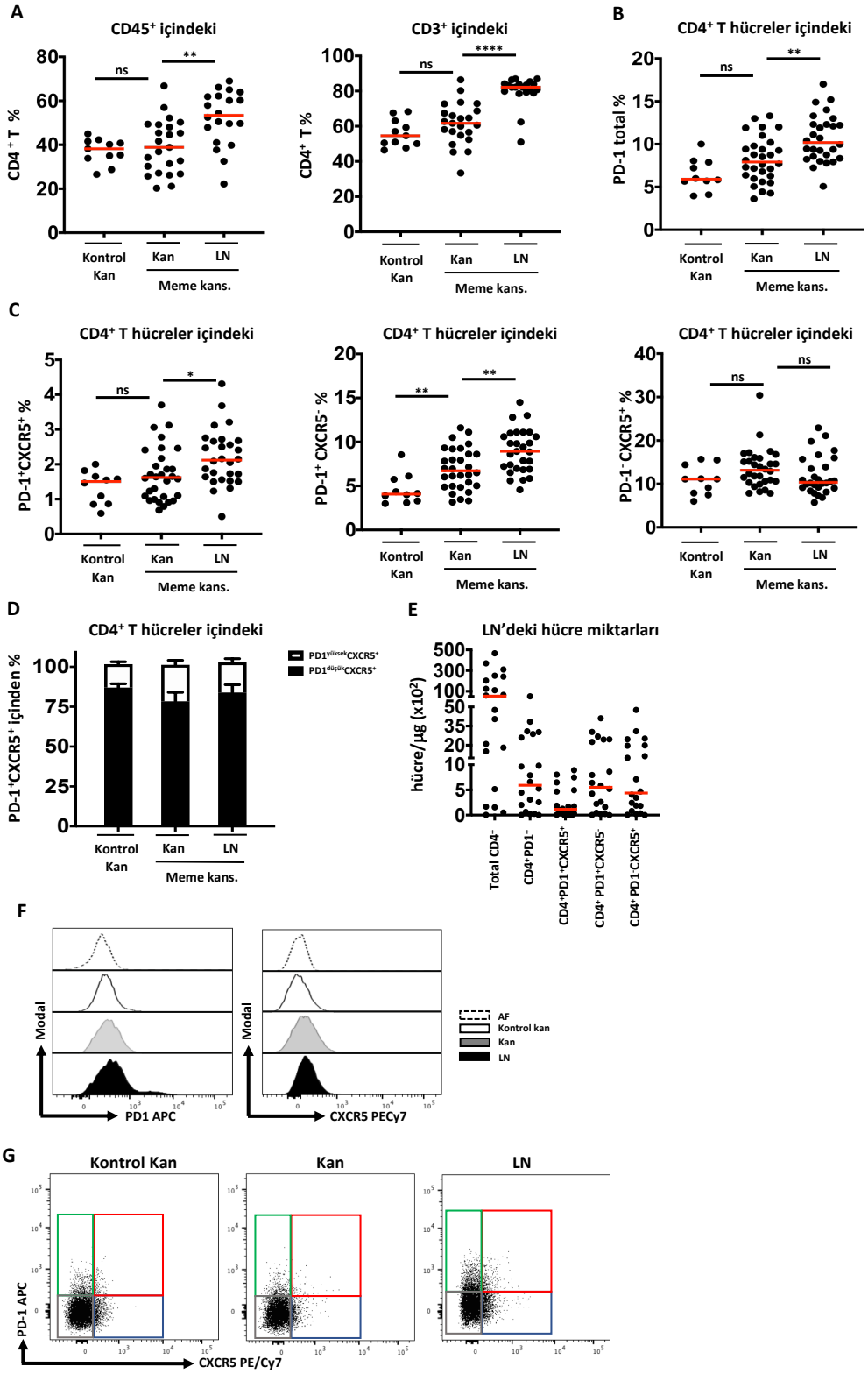
Bu çalışmada, meme kanseri hastalarında T hücrelerinin immün fenotiplemesi için 30 metastatik meme kanseri hastası lenf nodu (LN) ve periferik kan örnekleri ve kontrol grubu olarak 11 kanser olmayan gönüllü sağlıklı bireylerin periferik kan örnekleri ile çalışıldı. LN'den ve periferik kan örneklerinden elde edilen hücreler ile T hücrelerin alt tipleri ve aktivasyon durumları akım sitometrik immünfenotipleme ile değerlendirildi.

4.1.1. $CD4^+$ T Hücrelerinin İmmünfenotiplendirilmesi ve Tfh İlişkili Belirteçlerin Analiz Sonuçları

LN'den ve PMNH'lerdeki $CD4^+$ T hücrelerin oranları incelendiğinde $CD45^+$ lenfositlerin içerisinden $CD56^-CD3^+$ T hücrelerinden $CD4^+$ T hücrelerin oranları kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %55,95±7,764, %61,51±12,47 ve %80,07±8,59 olduğu tespit edildi (Şekil 7 A). Bu analiz sonucunda da LN'deki $CD3^+$ T hücrelerinin büyük çoğunluğunun $CD4^+$ T hücreler olduğu ve bu oranın diğer örnek gruplarına göre LN'de daha yüksek olduğu görüldü. Bu $CD4^+$ T hücrelerinin ne kadar PD-1 inhibitör reseptör eksprese ettikleri incelendiğinde (Şekil 7 B), $CD4^+PD\text{-}1^+$ T hücre oranının kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %6,431±1,87, %8,203±2,65 ve 10,63±2,77 olduğu tespit edildi. Bu durum sonucunda da LN'de bulunan $CD4^+$ T hücrelerinin diğer örnek gruplarına kıyasla anlamlı oranda daha yüksek PD-1 inhibitör reseptörünü yüzeylerinde bulundurduğu saptandı.

$CD4^+PD\text{-}1^+$ T hücrelerin ne kadarının Tfh immünfenotipik özelliğinde olduğunu tespit etmek için $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin oransal dağılımları

incelendiğinde (Şekil 7 C, F, G) kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %1,345±0,47, %1,707±0,77 ve %2,192±0,80 olduğu tespit edildi ve LN'de diğer örnek gruplarına kıyasla istatiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek oranda Tfh fenotipik belirteçlerini bulunduran $CD4^{+}PD\text{-}1^{+}CXCR5^{+}$ T hücrelerinin olduğu görüldü. Ayrıca, $CD4^{+}PD\text{-}1^{+}CXCR5^{-}$ T hücrelerinin yüzdesel dağılımları da incelendiğinde kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %4,615±1,73, %6,909±2,35 ve %8,940±2,48 olup, LN'de diğer örnek gruplarına göre anlamlı oranda yüksek saptanmasına ek olarak, hasta kanındaki oranın da sağlıklı kana kıyasla yüksek olduğu görüldü. $CD4^{+}PD\text{-}1^{-}CXCR5^{+}$ T hücrelerinin de örnekler arasındaki yüzdesel dağılımları incelendiğinde kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %10,94±3,42, %13,60±4,59 ve %11,92±4,46 olduğu tespit edildi ve bunun sonucunda da örnek grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Ayrıca, örneklerden Tfh fenotipik belirteçlerinin analizleri de yapılırken $PD\text{-}1^{yüksek}$ ve $PD\text{-}1^{düşük}$ ifade eden $CD4^{+}CXCR5^{+}$ hücrelerinin de oranları analiz edildi. $CD4^{+}PD\text{-}1^{+}CXCR5^{+}$ hücrelerinin içerisindeki $PD\text{-}1^{yüksek}$ hücrelerinin yüzdesel dağılımı kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %18,84±12,63, %22,88±15,43 ve %14,67±4,82 olup örnek grupları arasında anlamı bir fark görülmedi. $CD4^{+}PD\text{-}1^{+}CXCR5^{+}$ hücrelerin içerisindeki $PD\text{-}1^{düşük}$ hücrelerin yüzdesel dağılımı da kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %85,18±4,84, %76,02±15,95 ve %80,69±12,79 olup gruplar arasında anlamı bir fark gözlemlenmedi (Şekil 7 D). LN'de Tfh ilişkili belirteçleri bulunduran hücrelerinin yüzdesel olarak yüksek tespit edilmesi ile LN'den elde edilen hücre miktarı fenotipik analizlerde kullanılan LN ağırlığına oranlandığında (Şekil 7 E) 114 hücre/μg (ortanca değer, min-max: 0-891), $CD4^{+}PD\text{-}1^{+}CXCR5^{+}$ Tfh ilişkili belirteçleri bulunduran hücreler ile analizlerin gerçekleştirildiği tespit edildi.

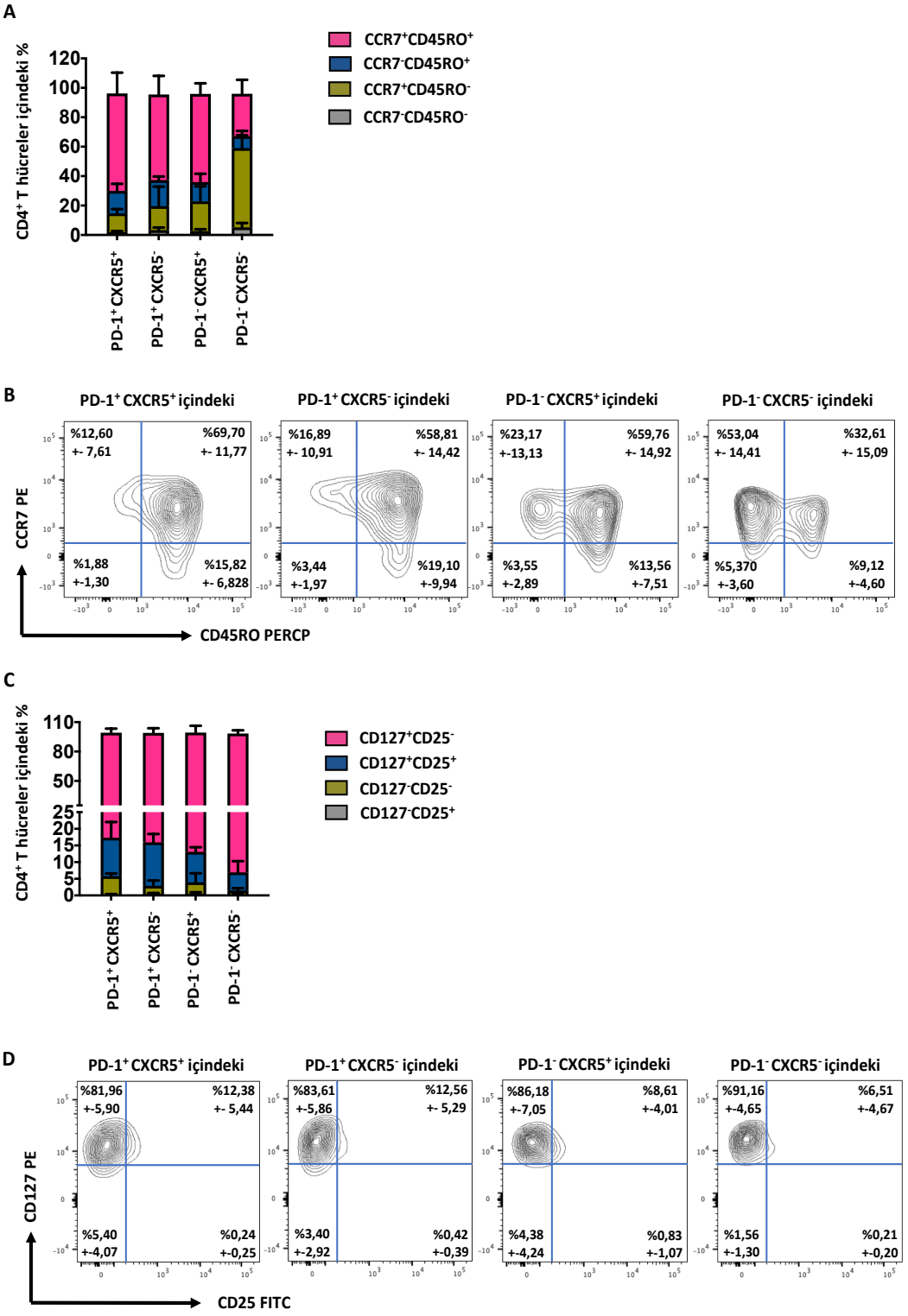


Şekil 7. Meme kanseri hastası lenf nodu (LN) (n=28) ve periferik kan örnekleri (n=30) ile sağlıklı kontrol kan örneklerinde (n=11) $CD4^+$ T hücrelerinin oransal dağılımı ve miktarının saptanması. A) $CD4^+$ T hücrelerinin $CD45^+$ ve $CD3^+$ popülasyonlar içindeki örnek grupları arası oransal dağılımı. B) $CD4^+$ T hücrelerin içerisindeki PD-1^+ inhibitör reseptör oranının örnek grupları arası dağılımı. C) $CD4^+$ T hücreler içerisindeki PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^- ve PD-1^-CXCR5^+ hücrelerinin yüzdesel oranları. D) PD-1^+CXCR5^+ hücreler içersindeki PD-$1^{yüksek}$ ve PD-$1^{düşük}$ oranda ifade eden popülasyonların örnek grupları arası oransal dağılımı. E) $CD4^+$, $CD4^+$ PD-1^+, $CD4^+$ PD-1^+CXCR5^+, $CD4^+$ PD-1^+CXCR5^- ve $CD4^+$ PD-1^-CXCR5^+ popülasyonların LN örneklerinin ağırlığına oranlanarak mikrogram başına düşen hücre miktarının gösterimi. F) Otofloresan (AF), kontrol kan, meme

kanseri kanı ve LN örneklerindeki PD-1 ve CXCR5 yüzey ifadelerinin temsili histogram grafikleri. G) Kontrol kan, meme kanseri kanı ve LN örneklerindeki PD-1 ve CXCR5 yüzey ifadelerinin temsili nokta saçılım grafikleri. İstatiksel fark $p<0,05$ anlamlılıkta ise *, $p<0,01$ anlamlılıkta ise **, $p<0,001$ anlamlılıkta ise **** olarak gösterilmektedir.

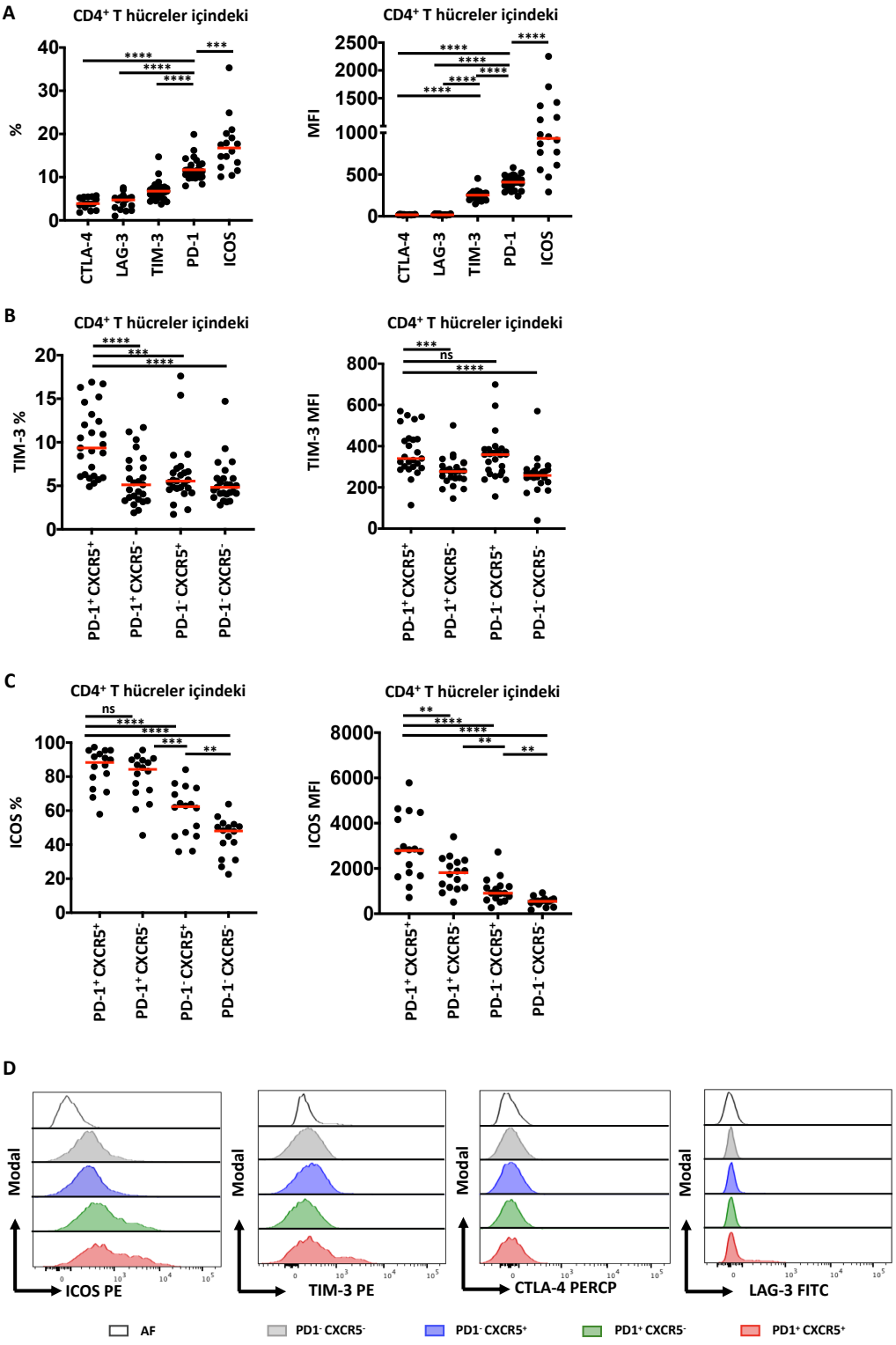
LN örneklerinde bulunan $CD4^+$ T hücrelerin efektör ve/veya hafıza T hücre olup olmadıklarını belirlemek amaçlı yüzeylerinde eksprese ettikleri CCR7 ve CD45RO oranları analiz edildi (Şekil 8 A, B). Bu analiz sonucunda da $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh immünfenotipik belirteçlerini bulunduran hücrelerin %62,93±15,65 oranında $CCR7^+CD45RO^+$ hücreler olduğu tespit edildi ve böylelikle bu hücrelerin merkezi hafıza T hücre fenotipik özelliğini taşıyabileceği gösterildi. Ayrıca, $CD4^+PD\text{-}1^-CXCR5^-$ popülasyonun da diğer PD-1 ve CXCR5 popülasyonlarına oranla yüzeylerinde daha yüksek oranda $CCR7^+CD45RO^-$ (%67,80±21,73) hücreler olduğu saptandı ve bu hücrelerin naif fenotipik özellik taşıyabilecekleri destekledi.

$CD4^+$ T hücrelerinin hayatta kalmasınıda etkili sinyal yolaklarını ve aktivasyonları sonucu hafıza fenotipik özelliklerini desteklemek için yüzeylerindeki IL-2 reseptör (CD25) ve IL-7 reseptör (CD127) ifade oranları da analiz edildi (Şekil 8 C, D). Bu analizler sonucunda $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh hücrelerinin yüksek oranda $CD127^+CD25^-$ fenotipindeki hücreler olduğu (%81,96±5,90) tespit edildi. Ayrıca, LN'den elde edilen tüm $CD4^+$ T hücrelerin alt gruplarında $CD127^-CD25^+$ regülatör T (Treg) hücre fenotipik belirtecine rastlanmadı. Ancak, hem $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hem de $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ popülasyonlarda $PD\text{-}1^-$ hücre popülasyonlarına göre $CD127^+CD25^-$ ve $CD127^+CD25^+$ hücrelerin daha yüksek oransal dağılıma sahip olduğu saptandı.



Şekil 8. Meme kanseri hastalarının lenf nodu (LN) örneklerinde, $CD4^+$ T hücrelerinin efektör, hafıza ve regülatör fenotipik özelliklerinin incelenmesi (n=16). A) Efektör ve hafıza T hücre belirteçlerinden CCR7 ve CD45RO'nun PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonlarındaki yüzey ifadelerinin değişimin yüzdesel analizleri. B) CCR7 ve CD45RO'nun PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonlarındaki ifadelerinin temsili kontur grafikleri. C) Regülatör T hücre ile ilişkli yüzey molekülleri olan CD127 ve CD25'in PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonlarındaki yüzey ifadelerinin değişimin yüzdesel analizleri. D) CD127 ve CD25'in PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonlarındaki ifadelerinin temsili kontur grafikleri.

LN'de bulunan $CD4^+$ T hücrelerde inhibitör reseptörlerin CTLA-4, LAG-3 ve TIM-3 ve literatürde bir diğer Tfh hücre belirteci olarak kabul gören eş uyaran olan ICOS yüzey ifadesinin yüzdesel oranları da analiz edildi (Şekil 9). Öncelikle LN'de bulunan total $CD4^+$ T hücrelerdeki CTLA-4, LAG-3, TIM-3, PD-1 ve ICOS yüzey ifadeleri incelendiğinde sırası ile; %4,08±1,28, %4,30±1,83, %6,77±2,22, %11,70±2,5 ve %17,30±6,30 olarak tespit edilip, PD-1 inhibitör reseptör yüzey ifadesinden sonra $CD4^+$ T hücrelerin yüksek oranda TIM-3 inhibitör reseptörünü de yüzeylerinde ifade ettikleri görüldü (Şekil 9 A). $CD4^+$ T alt gruplarında da TIM-3 oranı analiz edildiğinde PD-1^+CXCR5^+ Tfh fenotipik belirteçlerini bulunduran (%9,94±3,88) hücrelerde diğer PD-1 ve CXCR5 hücre popülasyonlarına kıyasla istatiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek TIM-3 yüzey ifadesi tespit edildi (Şekil 9 B). $CD4^+$ T hücrelerinde bir diğer Tfh fenotipik belirteci olan ICOS yüzey ifadesi de incelendiğinde PD-1^+CXCR5^+ ve PD-1^+CXCR5^- hücrelerde ICOS varlığının (sırası ile %84,54±11,76 ve %79,49±13,76) diğer PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- (sırası ile %59,49±14,6 ve %44,44±11,36) hücre popülasyonlarından anlamlı oranda daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 9 C). Ayrıca, PD-1^+CXCR5^+ popülasyondaki ICOS MFI değeri de dikkate alındığında bu hücrelerin yüzeylerinde ifade ettikleri ICOS proteinin miktarının ortalama olarak (2933±1432) tüm diğer hücre gruplarına göre PD-1^+CXCR5^- (1769±741), PD-1^-CXCR5^+ (1042±582) ve PD-1^-CXCR5^- (534±190) popülasyonlarından kıyasla daha fazla olduğu görüldü.



Şekil 9. Meme kanseri hastalarının lenf nodu (LN) örneklerinde, $CD4^+$ T hücrelerinin inhibitör ve eş uyaran reseptör ekspresyon oranları. A) $CD4^+$ T hücrelerdeki total CTLA4, LAG-3, TIM-3, PD-1 ve ICOS yüzey ifadelerinin oransal dağılımları ve MFI değerleri. B) $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarındaki TIM-3 yüzey ifadesinin oransal dağılımı ve MFI değerleri (n=25). C) $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarındaki ICOS yüzey ifadesinin oransal dağılımı ve MFI değerleri (n=16). D) Otofloresan (AF), $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarındaki, CTLA4, LAG-3, TIM-3, PD-1 ve ICOS yüzey ifadelerinin temsili histogram grafikleri. İstatiksel fark $p<0,05$ anlamlılıkta ise *, $p<0,01$ anlamlılıkta ise **, $p<0,001$ anlamlılıkta ***, $p<0,0001$ anlamlılıkta ise **** olarak gösterilmektedir. İstatiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması durumu da ns ile gösterilmektedir.

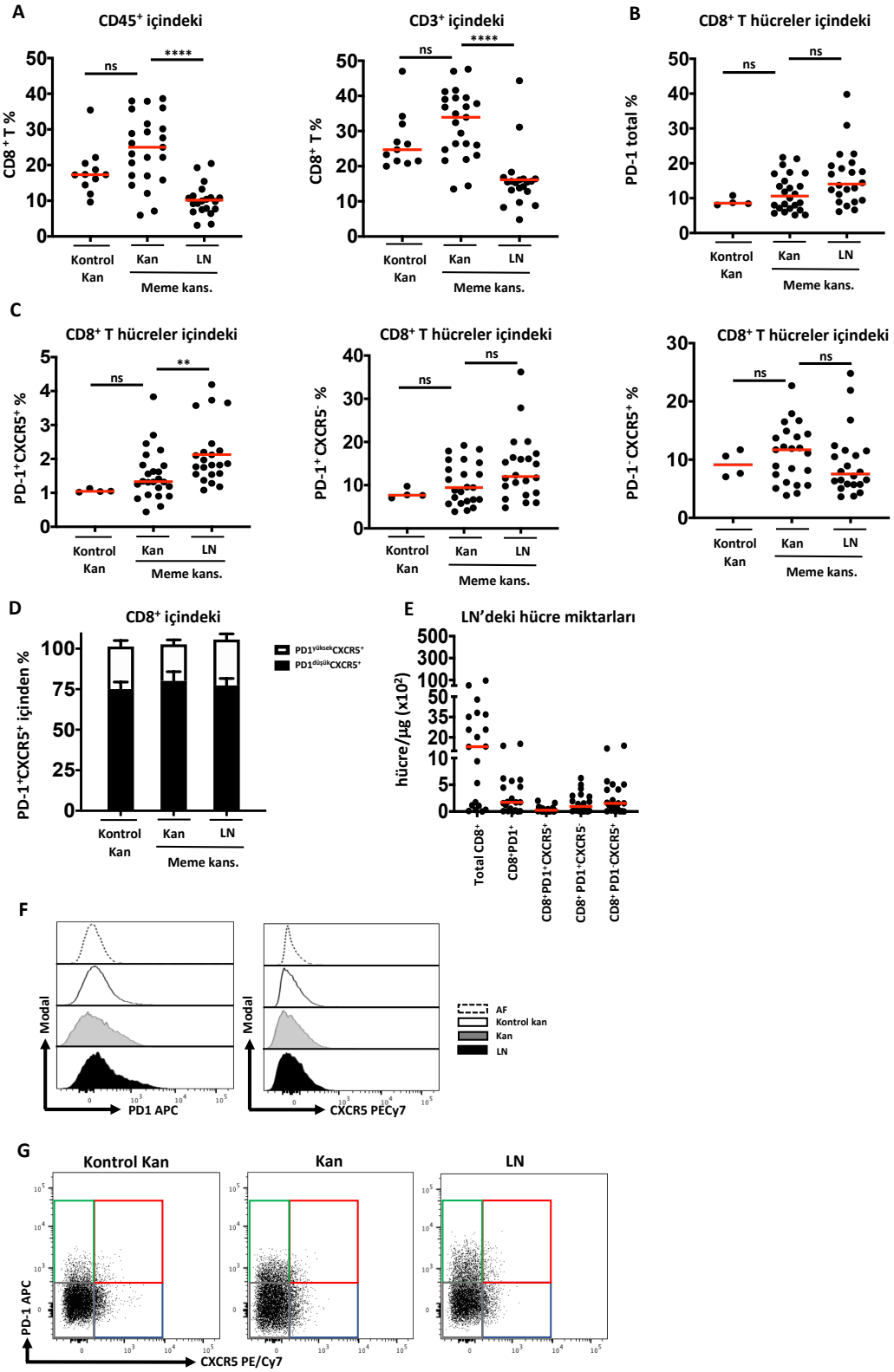
4.1.2. $CD8^+$ T Hücrelerinin İmmünfenotiplendirilmesi ve Tfh İlişkili Belirteçlerin Analiz Sonuçları

LN ve kan örneklerinden elde edilen hücrelerde $CD8^+$ T hücrelerin oransal dağılımları incelendiğinde (Şekil 10 A), $CD45^+$ lenfositlerin içerisinden $CD56^-CD3^+$ T hücreleri içerisindeki $CD8^+$ T hücrelerin oranları kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %27,11±8,03, %31,97±9,53 ve %16,13±8,40 olduğu tespit edildi. Bu analiz sonucunda da hasta kanındaki $CD45^+CD3^+CD8^+$ T hücrelerinin oranın diğer örnek gruplarına kıyasla daha yüksek olduğu saptandı. $CD8^+$ T hücrelerinin yüzeylerinde ne kadar PD-1 inhibitör reseptör eksprese ettikleri araştırıldığında (Şekil 10 B), $CD8^+PD\text{-}1^+$ T hücre oranlarının kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %8,99±1,23, %11,56±5,26 ve %15,94±8,11 olduğu tespit edildi.

$CD8^+PD\text{-}1^+$ T hücrelerin ne kadarının Tfh fenotipik belirteçlerini yüzeylerinde ifade ettiklerini tespit etmek için $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin oranları incelendiğinde (Şekil 10 C) kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %1,06±0,05, %1,53±0,75 ve %2,13±0,88 olduğu tespit edildi ve sonuç olarak LN'de diğer gruplara oranla istatiksel olarak daha yüksek oranda Tfh fenotipik belirteçlerini bulunduran $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ T hücrelerinin olduğu görüldü. Ayrıca, $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$ ve $CD8^+PD\text{-}1^-CXCR5^+$ T hücrelerinin de gruplar arasındaki oransal dağılımı incelendi ve bu popülasyonlar için örnek grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

LN'den elde edilen örneklerde Tfh fenotipik analizleri yapılırken PD-1 yüksek ve düşük ifade eden $CD8^+CXCR5^+$ hücrelerinin de oranları analiz edildi. $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin içerisindeki $PD\text{-}1^{yüksek}$ hücrelerinin oranı kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %22,10±14,55, %20,08±11,45 ve %24,44±12,87 olup gruplar arasında anlamı bir fark görülmedi. Ayrıca, $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerin $PD\text{-}1^{düşük}$ hücrelerin oranı kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %74,68±5,15, %77,51±14,44 ve %75,30±13,21 olup gruplar arasında anlamı

bir fark tespit edilmedi. Tfh ilişkili belirteçleri bulunduran hücrelerinin yüzdesel olarak yüksek tespit edilmesi ile LN'den elde edilen hücre miktarı fenotipik analizlerde kullanılan LN ağırlığına oranlandığında (Şekil 10 E) 24 hücre/µg (ortanca değer, min-max: 0-200) $CD8^{+}PD\text{-}1^{+}CXCR5^{+}$ Tfh ilişkili belirteçleri bulunduran hücreler ile analizlerin gerçekleştirildiği tespit edildi.

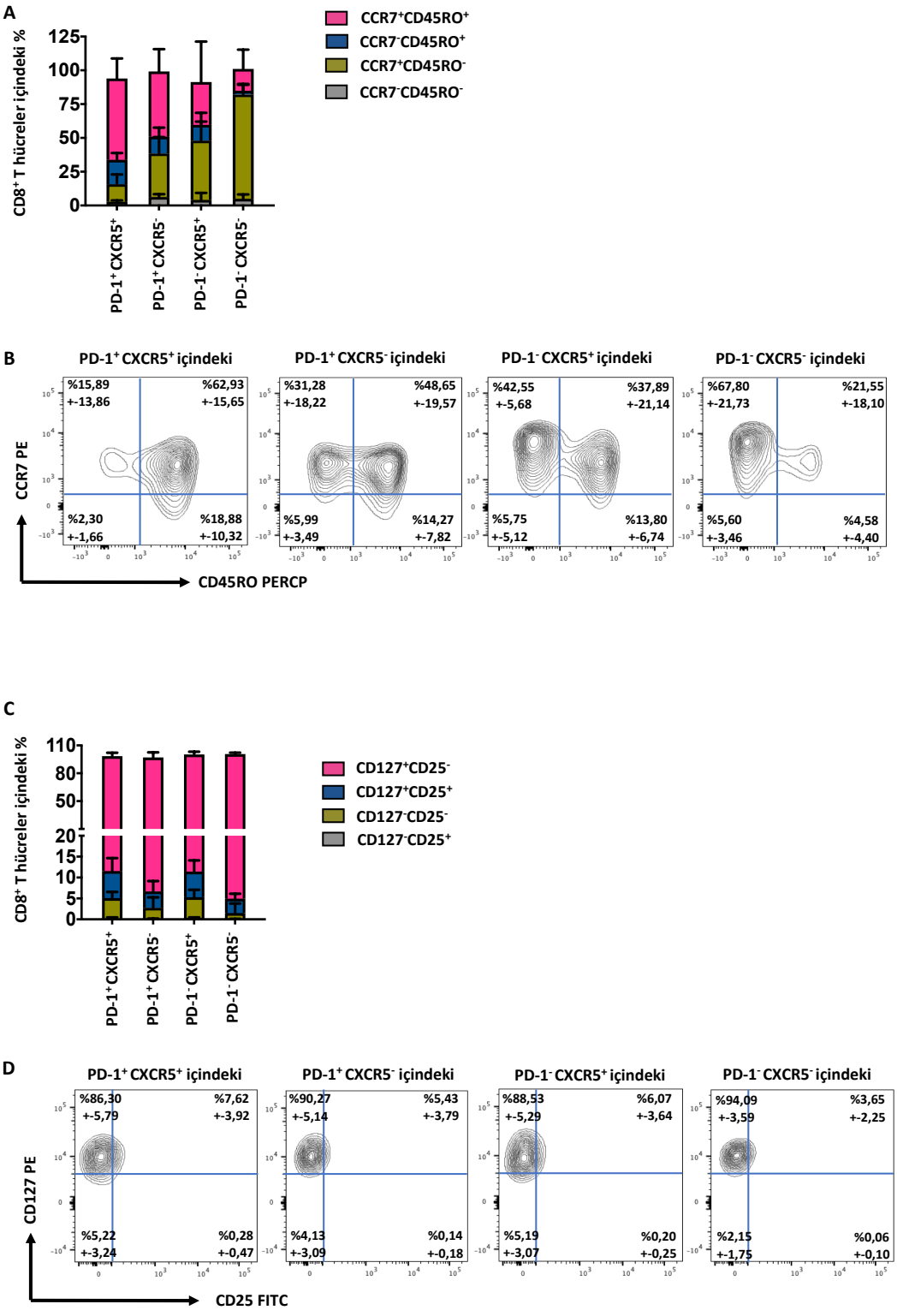


Şekil 10. Meme kanseri hastası lenf nodu (LN) (n=20) ve periferik kan örnekleri (n=23) ile sağlıklı kontrol kan örneklerinde (n=11) $CD8^+$ T hücrelerinin yüzdesel oran ve miktarının saptanması. A) $CD8^+$ T hücrelerinin $CD45^+$ ve $CD3^+$ popülasyonlar içindeki örnek grupları arası yüzdesel dağılımı. B) $CD8^+$ T hücrelerin içerisindeki PD-1^+ inhibitör reseptör oranın örnek grupları arası yüzdesel dağılımı. C) $CD8^+$ T hücreler içerisindeki PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^- ve PD-1^-CXCR5^+ hücrelerinin oranları. D) PD-1^+CXCR5^+ hücreler içersindeki PD-$1^{yüksek}$ ve PD-$1^{düşük}$ oranda ifade eden popülasyonların örnek grupları arası oransal dağılımı. E) $CD8^+$, $CD8^+$ PD-1^+, $CD8^+$ PD-1^+CXCR5^+, $CD8^+$ PD-1^+CXCR5^- ve $CD8^+$ PD-1^-CXCR5^+ popülasyonların LN örneklerinin ağırlığına oranlanarak mikro gram başına düşen hücre miktarının gösterimi. F) Otofloresan (AF), kontrol kan, meme kanseri kanı ve LN örneklerindeki PD-1 ve CXCR5 yüzey ifadelerinin temsili histogram grafikleri. G) Kontrol kan, meme kanseri

kanı ve LN örneklerindeki PD-1 ve CXCR5 yüzey ifadelerinin temsili nokta saçılım grafikleri. İstatiksel fark $p<0,01$ anlamlılıkta ise **, $p<0,001$ anlamlılıkta ise **** olarak gösterilmektedir. İstatiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması durumu da ns ile gösterilmiştir.

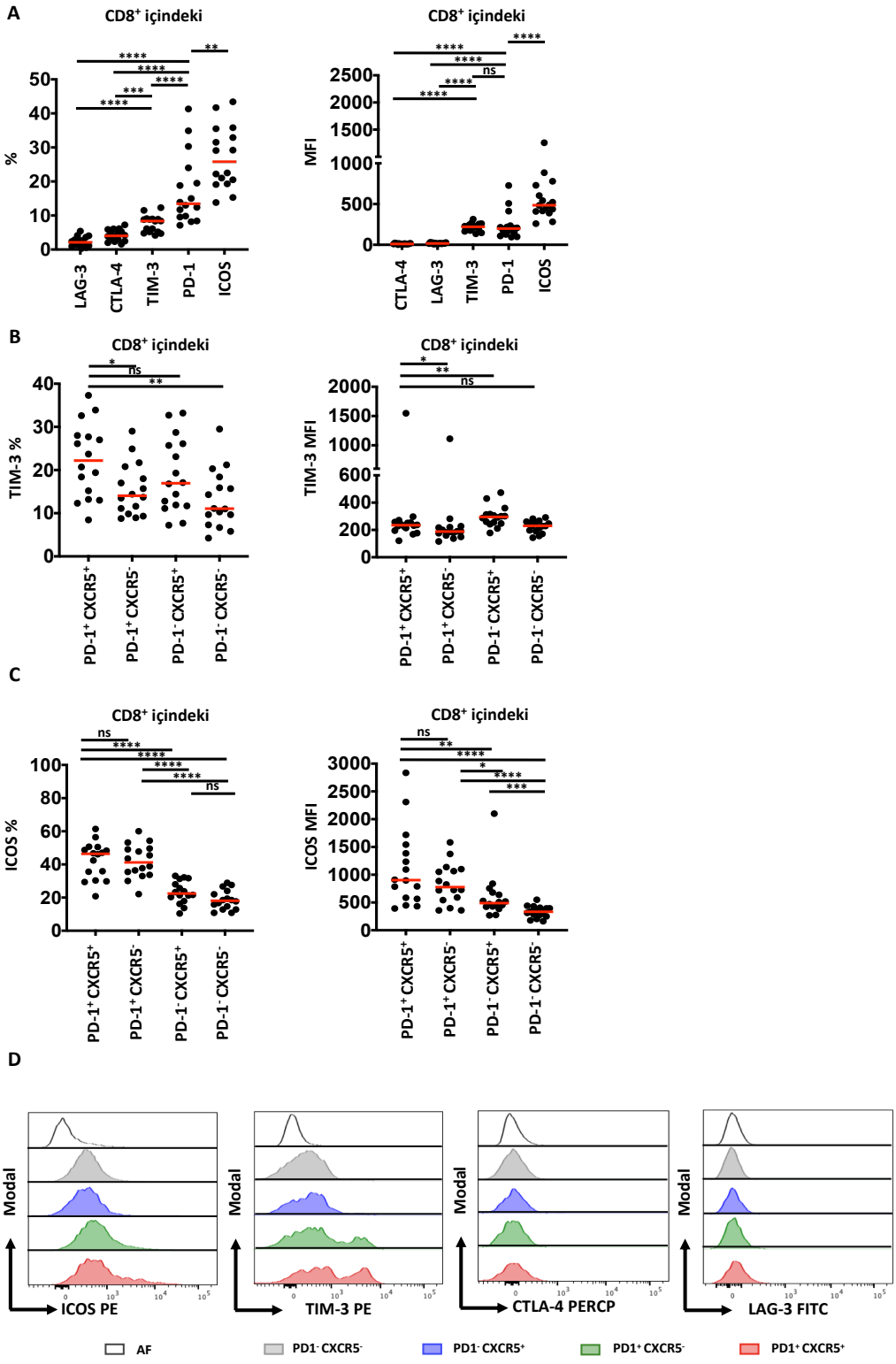
LN'de bulunan $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh fenotipik belirteçlerini bulunduran hücrelerin, ekeftör ve/veya hafıza T hücre fenotipik özelliklerini belirlemek amaçlı yüzeylerinde eksprese ettikleri CCR7 ve CD45RO oranları analiz edildi (Şekil 11 A-B). Bu analiz sonucunda da $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ popülasyonun %62,93±15,65 oranında $CCR7^+CD45RO^+$ hücrelerden oluştuğu görüldü ve bu durum da $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerin merkezi hafıza T hücre fenotipik özelliğini taşıdığını gösterdi. Ayrıca, $CD8^+PD\text{-}1^-CXCR5^-$ popülasyonu da diğer PD-1 ve CXCR5 popülasyonlarına oranla yüzeylerinde daha yüksek oranda $CCR7^+CD45RO^-$ (%67,80±21,73) bulundurduğu görüldü ve böylelikle bu hücrelerin naif fenotipik özellik taşıyabilecekleri desteklendi. Bunların haricinde, hem $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hem de $CD8^+PD\text{-}1^-CXCR5^+$ hücre popülasyonlarında diğer popülasyonlara kıyasla istatiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek $CCR7^+CD45RO^+$ hücreler olduğu saptandı.

$CD8^+$ T hücrelerinin hayatta kalmasında etkili sinyal yolaklarını ve hafıza fenotipik özelliklerini desteklemek için yüzeylerindeki IL-2 reseptör (CD25) ve IL-7 reseptör (CD127) ifade oranları da analiz edildi (Şekil 11 C-D). Bu analizler sonucunda $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh fenotipik belirteçlerine sahip hücrelerinin yüksek oranda $CD127^+CD25^-$ fenotipindeki hücreler olduğu (%86,30±5,79) ve böylelikle efektör hafıza fenotipik özellik gösterebilecekleri görüldü. Ayrıca, LN'den elde edilen tüm $CD8^+$ T hücre popülasyonlarında $CD127^-CD25^+$ regülatör T (Treg) hücre fenotipik belirtecine rastlanmadı. Ancak, hem $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hem de $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ popülasyonlarda daha yüksek oranda $CD127^+CD25^-$ (%86,30±5,79 ve %90,27±5,14) fenotipik belirteçleri görüldü ve $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerin merkezi hafıza fenotipik karakterizasyonu desteklendi.



Şekil 11. Meme kanseri hastalarının lenf nodu (LN) örneklerinde (n=19), $CD8^+$ T hücrelerinin efektör, hafıza ve regülatör fenotipik özelliklerinin incelenmesi. A) Efektör ve hafıza T hücre belirteçlerinden CCR7 ve CD45RO'nun $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarındaki yüzey ifadelerinin değişimin yüzdesel analizleri. B) CCR7 ve CD45RO'nun $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarındaki ifadelerinin temsili kontur grafikleri. C) Regülatör T hücre ile ilişkli yüzey molekülleri olan CD127 ve CD25'in $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarındaki yüzey ifadelerinin değişimin yüzdesel analizleri. D) CD127 ve CD25'in $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarındaki ifadelerinin temsili kontur grafikleri.

LN'den bulunan $CD8^+$ T hücrelerinde PD-1 inhibitör reseptör ifadesi harici CTLA-4, LAG-3 ve TIM-3 inhibitör reseptörlerinin ve bir diğer Tfh hücre fenotipik belirteci olarak kabul gören eş uyaran molekül ICOS yüzey ifadesinin yüzdesel oranları da analiz edildi (Şekil 12). LN'de bulunan total $CD8^+$ T hücrelerdeki CTLA-4, LAG-3, TIM-3, PD-1 ve ICOS yüzey ifadeleri incelendiğinde sırası ile; %4,16±1,67, %2,32±1,43, %7,59±2,47, %17,36±10,26 ve %27,05±9,14 olarak tespit edilip, PD-1 yüzey ifadesinden sonra yüksek oranda TIM-3 inhibitör reseptörünün yüzeylerinde ifade ettikleri görüldü (Şekil 12 A). Ayrıca, TIM-3 inhibitör reseptörünün $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh fenotipik belirteci bulunduran hücrelerde (%22,31±8,58) diğer PD-1 ve CXCR5 hücre popülasyonlarına oranla daha yüksek ifadesi gözlendi (Şekil 12 B, D). $CD8^+$ T hücrelerinde bir diğer Tfh fenotipik belirteci olan ICOS yüzey ifadesi de incelendiğinde $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerde ICOS varlığının (sırası ile %42,50±11,10 ve %41,89±10,16) diğer $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ (sırası ile %23,24±6,81 ve %18,61±5,83) hücre popülasyonlarına kıyasla istatiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 12 C). Ayrıca, hedef popülasyonlardaki ICOS MFI değerleri de karşılaştırıldığında $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ (1120±699,3) ve $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ (839,9±359,6) hücre popülasyonlarında $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ (607,3±426,4) ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ (332,3±104,7) hücre popülasyonlarına göre istatiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla ICOS protein ifadesinin varlığı saptandı.



Şekil 12. Meme kanseri hastalarının lenf nodu (LN) örneklerinde (n=16), $CD8^+$ T hücrelerinin inhibitör ve eş uyaran reseptör ekspresyon oranları. A) $CD8^+$ T hücrelerdeki total CTLA4, LAG-3, TIM-3, PD-1 ve ICOS yüzey ifadelerinin oransal dağılımları ve MFI değerleri. B) PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonlarındaki TIM-3 yüzey ifadesinin oransal dağılımı ve MFI değerleri. C) PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonlarındaki ICOS yüzey ifadesinin oransal dağılımı ve MFI değerleri. D) Otofloresan (AF), PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücrelerdeki, CTLA4, LAG-3, TIM-3, PD-1 ve ICOS yüzey ifadelerinin temsili histogram grafikleri. İstatiksel fark $p<0,05$ anlamlılıkta ise *, $p<0,01$ anlamlılıkta ise **, $p<0,001$ anlamlılıkta ***, $p<0,0001$

anlamlılıkta ise **** olarak gösterilmektedir. İstatiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması durumu da ns ile gösterilmektedir.

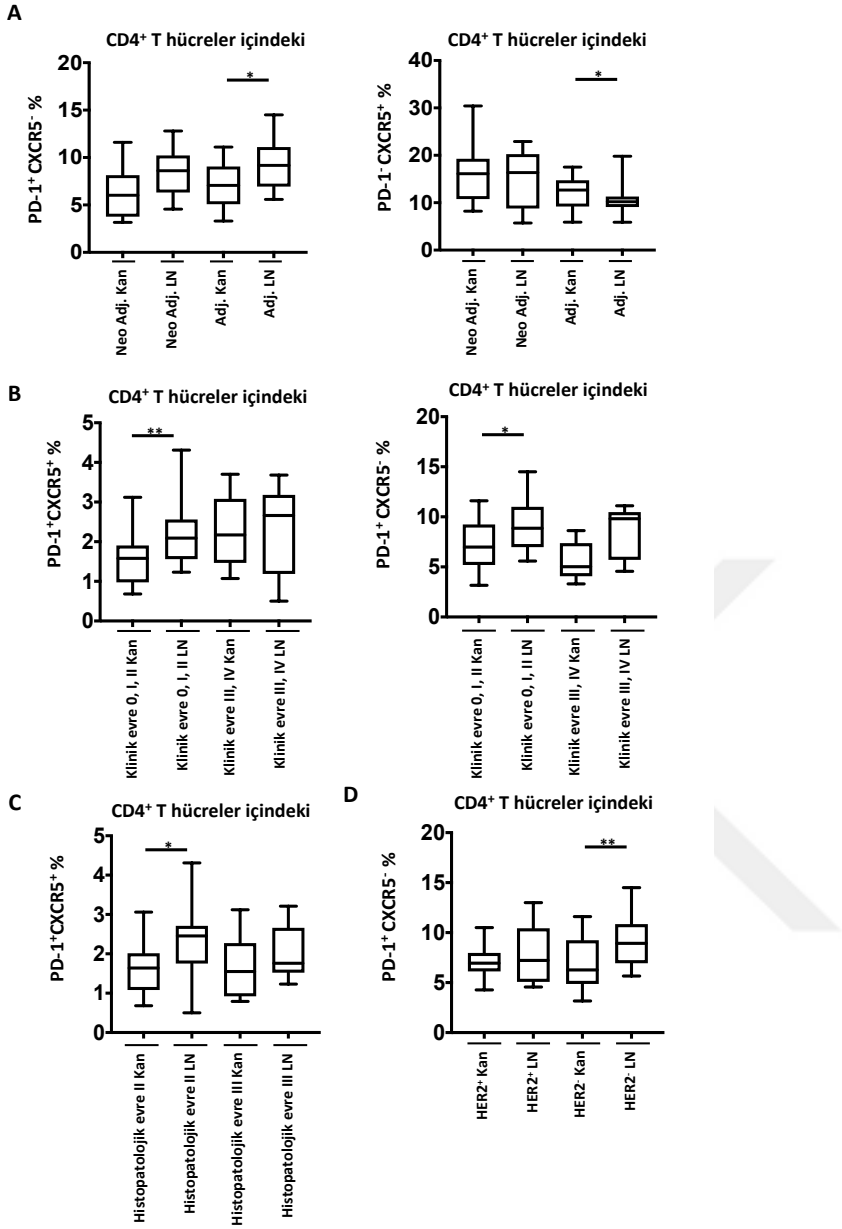
4.1.3. $CD4^+$ ve $CD8^+$ T ve Tfh İlişkili Belirteçlerin Dağılımlarının Klinik Veriler ile Analiz Sonuçları

Meme kanseri LN ve periferik kan örneklerinden fenotipik karakterizasyonu gerçekleştirilen $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin örneklerdeki oransal dağılımları; neoadjuvan/adjuvan kullanımına, erken klinik evre (0,I,II)/geç klinik evre (III, IV) durumlarına, histopatolojik evre (II/III) durumlarına ve kanser dokusundaki HER2 ifadelerine göre analiz edildi.

$CD4^+$ T hücrelerdeki PD-1 ve CXCR5 dağılımlarının neoadjuvan ve adjuvan tedavi alan hastalar arasında farklı olmadığı görüldü. Ancak, adjuvan tedavi alan hastaların LN'sinde bulunan PD-1^+CXCR5^- hücrelerin oranının kan örneklerine kıyasla istatiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek olduğu tespit edildi. Ayrıca, PD-1^-CXCR5^+ hücrelerin oranının adjuvan tedavi alan hastaların kanında LN'ye oranla anlamlı oranda daha yüksek olduğu görüldü. Klinik evreye bağlı yüzdesel oran kıyaslamalarında da evreler arası anlamlı bir fark görülmezken, klinik evre 0, I, II hastalarının LN'sinde kan örneklerine kıyasla anlamlı oranda PD-1^+CXCR5^+ ve PD-1^+CXCR5^- hücrelerin istatiksel olarak yüksek olduğu saptandı. Klinik evrelere göre analiz sonuçlarına benzer bir şekilde, histopatolojik evrelere göre analizler de gerçekleştirildiğinde, histopatolojik evre II ve III'de hücre popülasyonlarında yüzdesel olarak anlamlı bir farklılık görülmemekle birlikte, histopatoloik evre II hasta grubunun LN'sinde kan örneklerine kıyasla anlamlı oranda PD-1^+CXCR5^+ hücre popülasyonunun yüzdesi yüksek saptandı. HER2 ifadesi bulunan hastalar ile bulundurmayan hastalar arasında hedef popülasyonlarda yüzdesel olarak anlamlı bir fark görülmezken HER2^- olan hastaların LN'sinde kan örneklerine kıyasla istatiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek PD-1^+CXCR5^- hücreler tespit edildi (Tablo 14, Şekil 13).

Tablo 14. $CD4^+$ T hücrelerin $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ alt gruplarının hasta kan ve lenf nodu (LN) örneklerindeki yüzdesel ortalamlarının neoadjuvan ve adjuvan tedaviye, klinik ve histopatolojik evrelere ve HER2 ifadesine göre analizleri. Yüzdeler popülasyonların ortlama değerleri olup +- standart sapma ile belirtilmiştir. istatiksel değerlendirme olarak gruplar arasında Student T-test uygulanmıştır ve istatiksel fark $p<0,05$ anlamlılıkta ise *, $p<0,01$ anlamlılıkta ise **, $p<0,001$ anlamlılıkta ***, $p<0,0001$ anlamlılıkta ise **** olarak gösterilmektedir. İstatiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması durumu da ns ile gösterilmektedir.

Sınıflandırma	n sayısı	$CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$	$CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$	$CD4^+PD\text{-}1^-CXCR5^+$
Neoadjuvan tedavi LN	8	%2,34 +- 1,15	%8,37 +-2,55	%14,94 +-6,09
Neoadjuvan tedavi Kan	9	%1,54 +- 0,49	%6,19 +-2,85	%15,91 +-6,84
Adjuvan tedavi LN	18	%2,14 +-0,67	%9,20 +-2,59	%10,65 +-2,82
Adjuvan tedavi Kan	19	%1,80 +-0,90	%7,22 +-2,15	%12,61 +-3,06
Neoadjuvan tedavi LN vs. Kan		ns	ns	ns
Adjuvan tedavi LN vs. Kan		ns	* p=0,0168	* p=0,0384
LN neoadjuvan tedavi vs. adjuvan		ns	ns	ns
Kan neoadjuvan tedavi vs. adjuvan		ns	ns	ns
Klinik evre 0, I, II LN	23	%2,17 +-0,73	%9,05 +-2,48	%12,44 +-4,61
Klinik evre 0, I, II Kan	25	%1,60 +-0,70	%7,18 +-2,37	%13,47 +-4,82
Klinik evre III, IV LN	5	%2,28 +-1,18	%8,43 +-2,68	%9,55 +-2,96
Klinik evre III, IV Kan	5	%2,25 +-0,96	%5,58 +-1,97	%14,24 +-3,59
Klinik evre 0, I, II LN vs. Kan		** p=0,006	* p=0,0102	ns
Klinik evre III, IV LN vs. Kan		ns	ns	ns
LN klinik evre 0, I, II vs III, IV		ns	ns	ns
Kan klinik evre 0, I, II vs III, IV		ns	ns	ns
Histopatolojik evre II LN	12	%2,35 +-0,93	%9,03 +-2,84	%12,55 +-5,33
Histopatolojik evre II Kan	13	%1,60 +-0,67	%6,88 +-2,66	%12,86 +-3,44
Histopatolojik evre III LN	11	%2,00 +-0,65	%8,47 +-2,45	%12,16 +-3,88
Histopatolojik evre III Kan	12	%1,61 +-0,79	%6,96 +-2,47	%13,62 +-5,94
Histopatolojik evre II LN vs. Kan		* p=0,0291	ns	ns
Histopatolojik evre III LN vs. Kan		ns	ns	ns
LN Histopatolojik evre II vs. III		ns	ns	ns
Kan Histopatolojik evre II vs. III		ns	ns	ns
$HER2^+$ LN	5	%1,90 +-0,99	%7,65 +-3,27	%8,94 +-2,15
$HER2^+$ Kan	7	%1,63 +-0,77	%7,04 +-1,90	%12,44 +-4,91
$HER2^-$ LN	22	%2,21 +-0,83	% 9,11 +-2,34	%12,69 +-4,60
$HER2^-$ Kan	20	%1,79 +-0,82	%6,86 +-2,62	% 14,08 +-4,74
$HER2^+$ LN vs. Kan		ns	ns	ns
$HER2^-$ LN vs. Kan		ns	** p=0.0011	ns
LN $HER2^+$ vs. $HER2^-$		ns	ns	ns
Kan $HER2^+$ vs. $HER2^-$		ns	ns	ns



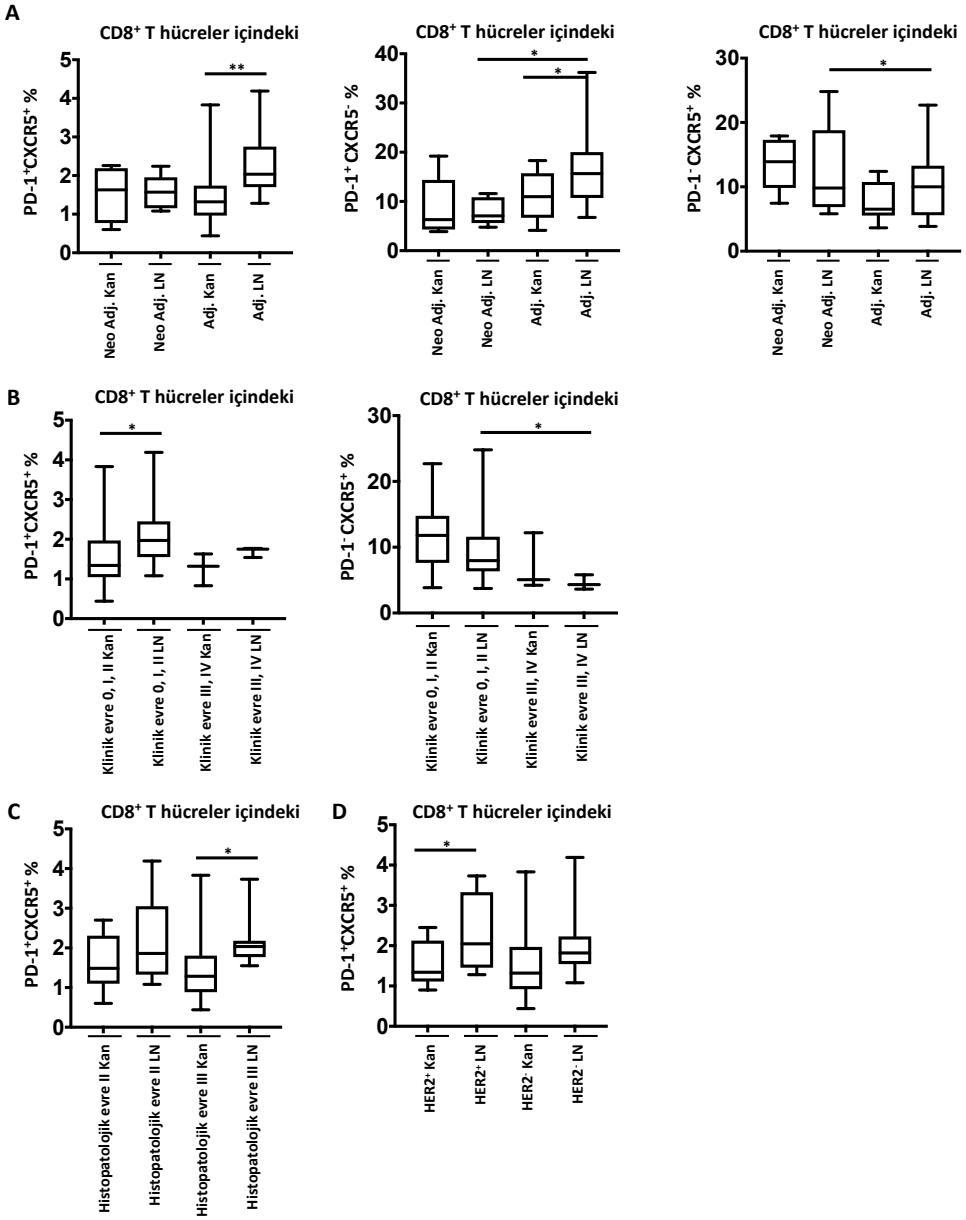
Şekil 13. $CD4^+$ T hücrelerin $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ alt gruplarının yüzdesel dağılımının neoadjuvan tedavi, klinik evre, hitopatolojik evre ve HER2 ifadesine göre dağılımı. A) $CD4^+$ T hücreler içerisindeki $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ alt gruplarının yüzdesel ifadelerinin neoadjuvan veya adjuvan tedavi almış gruplar arası dağılımı. B) $CD4^+$ T hücreler içerisindeki $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerinin yüzdesel oranlarının klinik evre 0, I, II, III ve IV grupları arası dağılımı. C) $CD4^+$ T hücreler içerisindeki $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin yüzdesel oranlarının histopatolojik evre II ve III grupları arası dağılımı. D) $CD4^+$ T hücreler içerisindeki $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerinin $HER2^+$ ve $HER2^-$ grupları arası yüzdesel dağılımı. İstatiksel değerlendirme olarak gruplar arasında Student T-test uygulanmıştır ve istatiksel fark $p<0,05$ anlamlılıkta ise *, $p<0,01$ anlamlılıkta ise **, $p<0,001$ anlamlılıkta ***, $p<0,0001$ anlamlılıkta ise **** olarak gösterilmektedir. İstatiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması durumu da ns ile gösterilmektedir.

$CD4^+$ T hücre popülasyonlarındakine benzer şekilde klinik veriler ile $CD8^+$ T hücrelerde PD-1 ve CXCR5 oransal dağılımlarının klinik veriler ile analizleri gerçekleştirildi. LN'deki $CD8^+PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücrelerin oranının neodajuvan alan hastalarda daha yüksek olduğu ve $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerinin oranının da

adjuvan alan hastalarda daha yüksek olduğu saptandı. Diğer hedef hücre popülasyonları ile neodajuvan ve adjuvan kullanımı arasında anlamlı bir fark görülmedi. Ayrıca, adjuvan tedavi alan hastaların LN'sinde bulunan PD-1^{+}CXCR5^{+} ve PD-1^{+}CXCR5^{-} hücrelerin oranları kan örneklerine kıyasla istatiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek olduğu tespit edildi. Klinik evreye bağlı oransal dağılım kıyaslamalarında da klinik evre 0, I, II hastalarının LN örneklerinde klinik evre III, IV hastalarına kıyasla PD-1^{-}CXCR5^{-} hücrelerinin yüzdeleri istatiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı. Klinik evre I, II, III hastalarının da LN örneklerinde PD-1^{+}CXCR5^{+} hücre popülasyonu kan örneklerine oranla istatiksel olarak anlamlı oranda yükseklik tespit edildi. Histopatolojik evre II ve III arasında hedef hücre popülasyonları yüzdesel olarak anlamlı bir farklılık göstermemekle birlikte, histopatoloik evre III hasta grubunun LN'sinde kan örneklerine kıyasla anlamlı oranda PD-1^{+}CXCR5^{+} hücre yüzdesi yüksek saptandı. HER2 ifadesi olan hastalar ile bulundurmayan hastalar arasında da hedef hücre popülasyonlarında yüzdesel olarak anlamlı bir fark görülmezken HER2^{-} olan hastaların LN'sinde kan örneklerine kıyasla istatiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek PD-1^{+}CXCR5^{+} hücrelerin yüzdesi tespit edildi (Tablo 15, Şekil 14).

Tablo 15. $CD8^+$ T hücrelerin $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ alt gruplarının hasta kan ve lenf nodu (LN) örneklerindeki yüzdesel ortalamlarının neoadjuvan ve adjuvan tedaviye, klinik ve histopatolojik evrelere ve HER2 ifadesine göre analizleri. Yüzdeler popülasyonların ortlama değerleri olup +- standart sapma ile belirtilmiştir. İstatiksel değerlendirme olarak gruplar arasında Student T-test uygulanmıştır ve istatiksel fark $p<0,05$ anlamlılıkta ise *, $p<0,01$ anlamlılıkta ise **, $p<0,001$ anlamlılıkta ***, $p<0,0001$ anlamlılıkta ise **** olarak gösterilmektedir. İstatiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması durumu da ns ile gösterilmektedir.

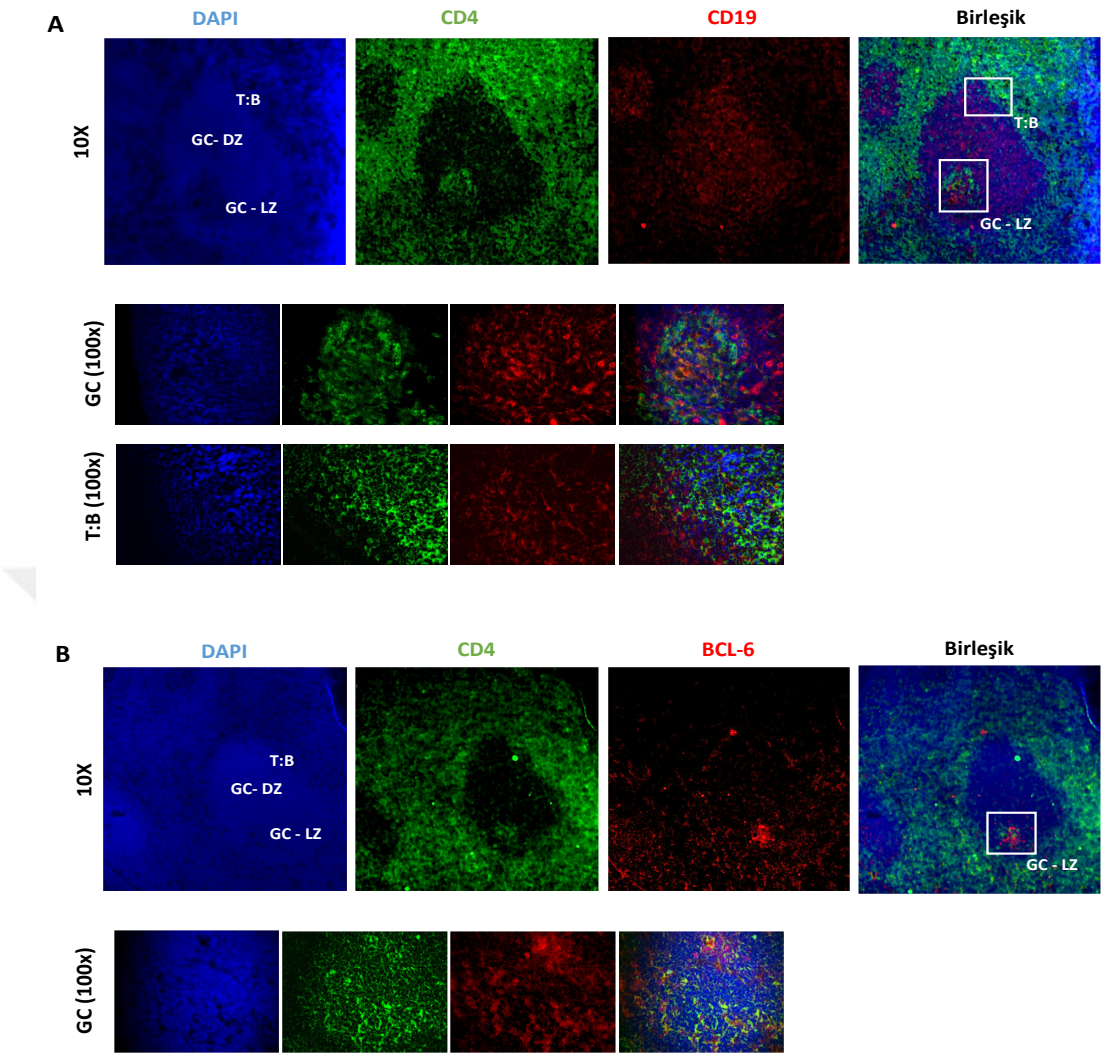
Sınıflandırma	n sayısı	$CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$	$CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$	$CD8^+PD\text{-}1^-CXCR5^+$
Neoadjuvan tedavi LN	6	%1,58 +-0,45	%7,833 +-2,79	%12,37 +-7,19
Neoadjuvan tedavi Kan	5	%1,51 +-0,73	%8,73 +-6,24	%13,63 +-4,12
Adjuvan tedavi LN	15	%2,30 +-0,90	%16,23 +-8,00	%7,55 +-2,89
Adjuvan tedavi Kan	16	%1,53 +-0,84	%11,01 +-4,77	%10,01 +-5,06
Neoadjuvan tedavi LN vs. Kan		ns	ns	ns
Adjuvan tedavi LN vs. Kan		** p=0,0054	* p=0,045	ns
LN neoadjuvan tedavi vs. adjuvan		ns	* p=0,0236	* p=0,042
PB neoadjuvan tedavi vs. adjuvan		ns	ns	ns
Klinik evre 0, I, II LN	19	% 2,20 +-0,93	%14,11 +-8,03	%10,09 +-5,65
Klinik evre 0, I, II Kan	21	%1,57 +-0,78	%5,003 +-1,12	%11,58 +-4,87
Klinik evre III, IV LN	3	%1,69 +-0,13	%12,80 +-2,91	%4,59 +-1,11
Klinik evre III, IV Kan	3	%1,26 +-0,40	%10,74 +-4,78	%7,16 +-4,39
Klinik evre 0, I, II LN vs. Kan		* p=0.0213	ns	ns
Klinik evre III, IV LN vs. Kan		ns	ns	ns
LN klinik evre 0, I, II vs III, IV		ns	ns	* p=0,0208
PB klinik evre 0, I, II vs III, IV		ns	ns	ns
Histopatolojik evre II LN	9	%2,22 +-1,07	% 14,34 +-11,19	%10,92 +-6,24
Histopatolojik evre II Kan	10	%1,65 +-0,70	%9,95 +-5,59	%12,57 +-5,26
Histopatolojik evre III LN	8	%2,16 +-0,67	%13,68 +-4,08	%8,03 +-3,29
Histopatolojik evre III Kan	10	%1,44 +-0,94	%10,53 +-5,02	%9,56 +-4,50
Histopatolojik evre II LN vs. Kan		ns	ns	ns
Histopatolojik evre III LN vs. Kan		* p=0,012	ns	ns
LN Histopatolojik evre II vs. III		ns	ns	ns
Kan Histopatolojik evre II vs. III		ns	ns	ns
$HER2^+$ LN	4	%2,28 +-1,04	%12,77 +-4,28	%7,59 +-3,23
$HER2^+$ Kan	5	%1,56 +-0,59	%10,98 +-5,21	%9,53 +-5,02
$HER2^-$ LN	16	%2,04 +-0,83	%14,08 +-8,52	%9,35 +-5,30
$HER2^-$ Kan	17	%1,53 +-0,84	%10,12 +-5,05	%11,29 +-5,09
$HER2^+$ LN vs. Kan		ns	ns	ns
$HER2^-$ LN vs. Kan		* p=0,049	ns	ns
LN $HER2^+$ vs. $HER2^-$		ns	ns	ns
Kan $HER2^+$ vs. $HER2^-$		ns	ns	ns



Şekil 14. CD8$^+$ T hücrelerin PD-1$^+$CXCR5$^+$, PD-1$^+$CXCR5$^-$, PD-1$^-$CXCR5$^+$ alt gruplarının yüzdesel dağılımının neoadjuvan tedavi, klinik evre, hitopatolojik evre ve HER2 ifadesine göre dağılımı. A) CD8$^+$ T hücreler içerisindeki T hücreler içerisindeki PD-1$^+$CXCR5$^+$, PD-1$^+$CXCR5$^-$ ve PD-1$^-$CXCR5$^+$ alt gruplarının yüzdesel ifadelerinin neoadjuvan veya adjuvan tedavi almış gruplar arası dağılımı. B) CD8$^+$ T hücreler içerisindeki PD-1$^+$CXCR5$^+$ ve PD-1$^-$CXCR5$^+$ hücrelerinin yüzdesel oranlarının klinik evre 0, I, II, III ve IV grupları arası dağılımı. C) CD8$^+$ T hücreler içerisindeki PD-1$^+$CXCR5$^+$ hücrelerinin yüzdesel oranlarının histopatolojik evre II ve III grupları arası dağılımı. D) CD8$^+$ T hücreler içerisindeki PD-1$^+$CXCR5$^+$ hücrelerinin yüzdesel oranlarının HER2$^+$ ve HER2$^-$ grupları arası dağılımı. İstatiksel değerlendirme olarak gruplar arasında Student T-test uygulanmıştır ve istatiksel fark p<0,05 anlamlılıkta ise *, p<0,01 anlamlılıkta ise **, p<0,001 anlamlılıkta ***, p<0,0001 anlamlılıkta ise **** olarak gösterilmektedir. İstatiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması durumu da ns ile gösterilmektedir.

4.2. Meme Kanseri Lenf Nodu Kesitlerinden İmmün Floresan Boyama Sonuçları

Meme kanseri hastalarının LN örneklerinden alınan doku kesitlerinden CD4, CD19 ve BCL6 boyamaları yapıldı. DAPI boyaması ile hücrelerin çekirdekleri boyanarak LN kesitlerinde tahmini germinal merkez bölgeleri belirlendi. $CD4^+$ T hücreler ile $CD19^+$ B hücrelerin etkileşimi ve LN'de bulundukları bölgelerin analizlileri yapıldığında; $CD4^+$ T hücrelerinin LN parakorteks T hücre bölgesindeki bulunan hücrelerin büyük bir bölümünü oluşturduğu ve germinal merkez aydınlık bölgesinde (light zone) yerleşik bir şekilde bulunduğu tespit edildi. $CD19^+$ B hücrelerin de germinal merkez karanlık bölgesinde (dark zone) yüksek oranda olduğu saptandı. Bu B hücrelerin düşük oranda da olsa aydınlık bölgedeki $CD4^+$ T hücreler ile etkileşim halinde olduğu görüldü. Aynı zamanda $CD4^+$ T hücrelerin germinal merkez T:B hücre sınır bölgesinde dizildiği ve germinal merkezde bulunan T:B sınır bölgesinde olan $CD19^+$ B hücreler ile etkileşim halinde oldukları tespit edildi (Şekil 15 A). $CD19^+$ B hücreler ile etkileşim halinde olan T hücrelerin Tfh özelliklerini doğrulamak amaçlı da aynı hastanın seri doku kesitlerinde BCL6 immünfloresan boyaması yapıldığında germinal merkeze konumlanan $CD4^+$ T hücrelerin $BCL6^+$ hücreler olduğu ve aynı zamanda T:B sınır bölgesinde bulunan $CD4^+$ T hücrelerin de yüksek oranda BCL6 pozitif Tfh karakterinde hücreler olduğu görüldü (Şekil 15 B).



Şekil 15. Meme kanseri hastalarının lenf nodu kesitlerinden immün floresan boyama ile $CD4^{+}BCL6^{+}$ T hücrelerinin ve $CD19^{+}$ B hücrelerinin etkileşiminin lenf nodu bölümlerinde tespiti. Korteks altı bölge, GC: germinal merkez, LZ: aydınlık bölge, DZ: karanlık bölge ve T:B: T ve B hücre sınır bölgesinde bulunan A) CD4 ve CD19 hücrelerinin gösterimi B) CD4 ve BCL-6 hücrelerinin gösterimi.

4.3. $CD4^{+}$ T Hücrelerin Uyarım Sonrası Proliferasyonu ve $PD\text{-}1^{+}CXCR5^{+}$ Tfh İlişkili Belirteçleri Taşıyan Hücrelere Farklılaşması

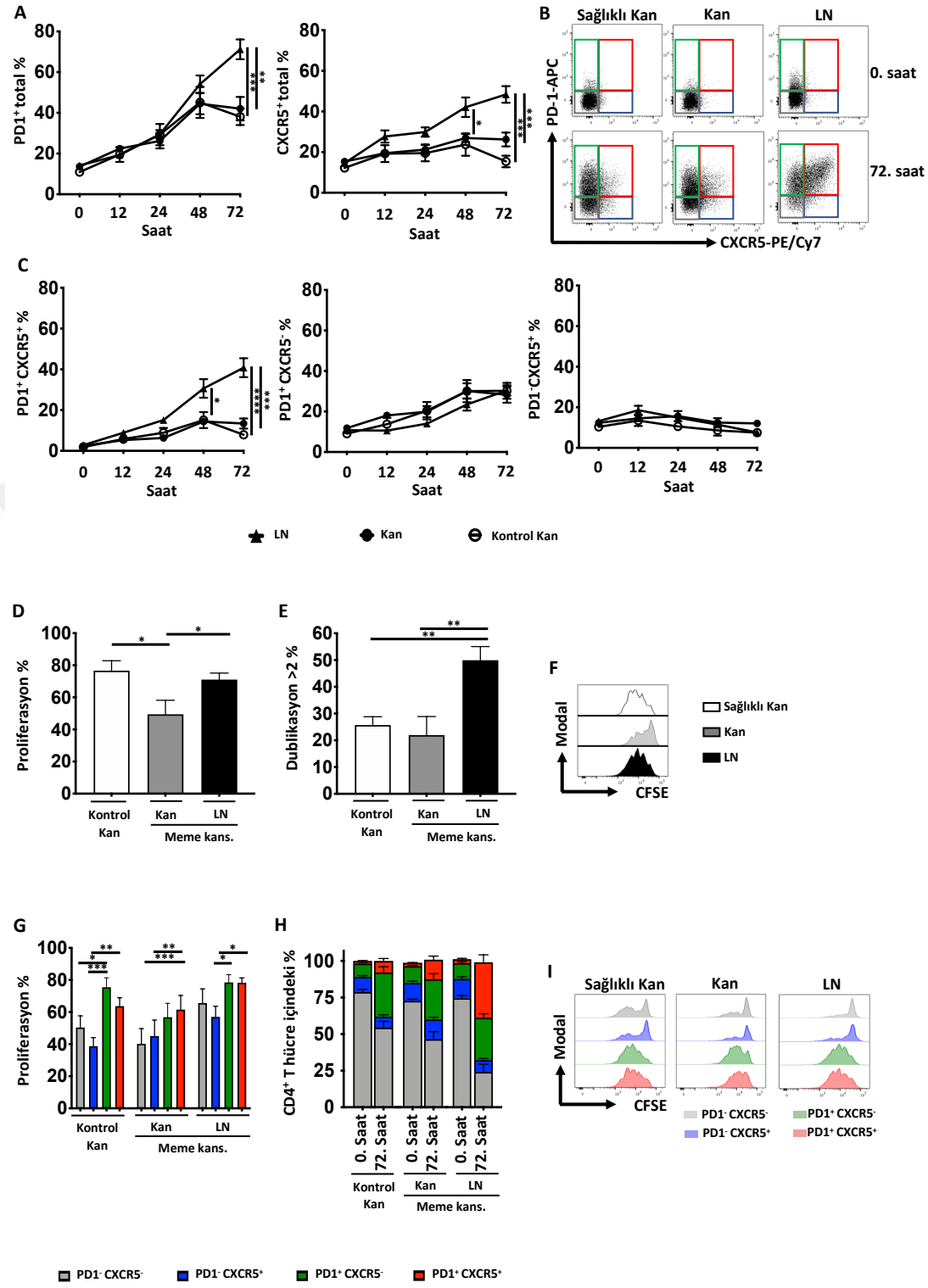
Meme kanseri LN'sinden, hasta kan ve sağlıklı kontrol kanından saflaştırılan $CD4^{+}$ T hücrelerin anti-CD3 antikoru ve anti-CD28 boncukları ile uyarımından 0., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde bu $CD4^{+}$ T hücrelerin $PD\text{-}1^{+}CXCR5^{+}$ Tfh ilişkili belirteçleri taşıyan hücrelere dönüşümleri akım sitometrik teknikler aracılığı ile analiz edildi. $CD4^{+}$ T hücrelerin uyarımından 72 saat sonra, kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde ortalama PD-1 yüzdeleri sırası ile %38,11±10, %42,04±19,11 ve %71,21±15,35, olarak tespit edildi ve LN'den elde edilen $CD4^{+}$ T hücrelerin diğer

örnek gruplarına kıyasla istatiksel olarak anlamlı bir düzeyde PD-1 yüzey ifadesini arttırdığı görüldü. Aynı şekilde, LN'den elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin uyarımından 48 saat sonra da diğer örnek gruplarına göre istsatiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek CXCR5'i yüzeyinde ifade ettiği ve bu CXCR5'in oranın diğer örnek gruplarında sabit kalırken LN'den elde edilen hücrelerde 72 saat boyunca arttığı da tespit edildi (Şekil 16 A-B). Ayrıca, LN'den elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin 48 saat sonunda $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelere diğer örnek gruplarına göre istatiksel olarak daha hızlı dönüştüğü saptandı ve 72 saat sonunda kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %7,92±3,99, %13,41±8,57 ve %40,78±14,75 olarak tespit edildi. Ayrıca, tüm örneklerde $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ hücre gruplarının $CD4^+$ T hücrelerin uyarımı sonrası artışı da analiz edildiğinde tüm gruplarda $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerin 0. saate kıyasla 72. saat sonunda arttığı ancak örnekler arasında yüzdesel fark bulunmadığı tespit edilirken, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ hücre popülasyonun 0. saate oranla 72. saat sonunda da tüm örnek gruplarında uyarım öncesine göre istatiksel olarak anlamlı düzeyde artmadığı görüldü (Şekil 16 C).

Aynı zamanda, tüm örneklerden elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarımları sonucu proliferasyonları da analiz edildiğinde kontrol kan, hasta kan ve LN örneklerinde sırasıyla; %71,08±11,43, %49,43±24,73 ve %76,63±15,11 olarak saptandı ve bunun sonucunda da LN'de bulunan $CD4^+$ T hücrelerin hasta kanına oranla daha yüksek oranda proliferatif olduğu görülmekle birlikte, sağlıklı kişilerin kanından elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin de hasta kanından elde edilen $CD4^+$ T hücrelere göre daha yüksek proliferasyona sahip olduğu gözlendi. Tüm örneklerden alınan $CD4^+$ T hücrelerin ilk iki dublikasyonundan büyük proliferasyonları da analiz edildiğinde, LN'den izole edilen $CD4^+$ T hücrelerinin kan örneklerinden izole edilenlere kıyasla daha yüksek kapasitede prolifere (%49,91±13,49) oldukları saptandı (Şekil 16 D-F).

$CD4^+$ T hücrelerin uyarımlarından 72 saat sonra $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh fenotipindeki hücrelere yüksek oranda farklılaşması sonucu tüm örnekler için PD-1 ve CXCR5 yüzey ifadeleri de dikkate alınarak proliferasyon analizi de gerçekleştirildi (Şekil 16 G-I). Hasta kanından elde edilen $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerin kontrol kan ve LN örneklerine kıyasla daha düşük oranda prolifere olduğu ancak tüm hedef hücre

popülasyonlarına göre daha yüksek oranda proliferasyona sahip olduğu gözlendi. Buna ek olarak, LN örneklerinde PD-1^{+}CXCR5^{+} ve PD-1^{+}CXCR5^{-} hücrelerin proliferasyonun birbirine çok yakın olduğu (%78,25±8,54 ve %78,45±13,68) ve her iki hücre popülasyonun da PD-1^{-}CXCR5^{+} hücrelere oranla (%56,98±18,78) daha yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olduğu tespit edildi. Hasta kanından alınan örneklerde de benzer şekilde en yüksek proliferasyon kapasitesinin PD-1^{+}CXCR5^{+} hücrelere ait olduğu saptandı. Ancak, PD-1^{+}CXCR5^{+} ile PD-1^{+}CXCR5^{-} hücrelerin proliferasyonu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (%61,49±25,05 ve %56,79±24,45). Sağlıklı kan örneğinde de PD-1^{+}CXCR5^{-}(%75,45±14,41) hücrelerin proliferasyonun diğer hücre popülasyonlarına oranla yüksek olduğu ancak yine PD-1^{+}CXCR5^{+} (%63,67±12,84) hücrelerin proliferasyonu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü.



Şekil 16. Meme kanseri lenf nodu (LN), periferik kan ve kontrol kan örnek gruplarından elde edilen PMNH'lerden, $CD4^+$ MACS sonrası izole edilen $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarımından sonra zamana bağlı PD-1 ve CXCR5 yüzey ekspresyon değişimi ve proliferasyonları. A) Lenf nodu (LN) (n=10), periferik kanından (n=11) ve kontrol kan (n=6) örneklerindeki $CD4^+$ T hücrelerdeki PD-1 ve CXCR5'in uyarım sonrası yüzey ekspresyonunun zamana bağlı yüzdesel değişimi. B) $CD4^+$ T hücreler içerisindeki uyarım sonrası PD-1 ve CXCR5 yüzey ifadelerinin zamana bağlı değişiminin örnek gruplarında 0. ve 72. saatler için temsili nokta saçılım grafikleri. C) Lenf nodu (LN) (n=10), periferik kanından (n=11) ve kontrol kan (n=6) örneklerindeki $CD4^+$ T hücreler içerisindeki uyarım sonrası $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarında yüzey ifadelerinin zamana bağlı yüzdesel değişimi. D) Lenf nodu (LN) (n=8), periferik kanından (n=8) ve kontrol kan (n=6) örneklerindeki $CD4^+$ T hücrelerin uyarım sonrası 72. saatte proliferasyonlarının yüzdesel gösterimi E) İlk

iki dublikasyondan büyük proliferasyonun yüzdesel gösteriminin örnek grupları arasındaki dağılımı. F) $CD4^+$ T hücrelerin uyarım sonrası 72. saatteki proliferasyonlarının örnek grupları arasındaki dağılımının temsili histogram grafikleri. G) $CD4^+$ T hücreler içerisindeki uyarımdan 72 saat sonra PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonların proliferasyonlarının yüzdesel olarak örnek grupları arasındaki dağılımı. H) $CD4^+$ T hücreler içerisindeki uyarımdan önce ve 72 saat sonra PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonların gruplar arasındaki yüzdesel değişimleri. I) $CD4^+$ T hücreler içerisindeki uyarımdan 72 saat sonra PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonların örnek grupları arasındaki dağılımının temsili histogram grafikleri. İstatiksel fark $p<0,05$ anlamlılıkta ise *, $p<0,01$ anlamlılıkta ise **, $p<0,001$ anlamlılıkta ise ***, $p<0,0001$ anlamlılıkta ise **** olarak gösterilmektedir.

4.4. Anti-CD3 ve Anti-CD28 Uyarımı ile $CD4^+$ T hücrelerinde Tfh Fenotipinin ve Erken Aktivasyon Belirteçlerinin Zamana Bağlı Değişimi

Meme kanseri LN'sinden, hasta kan ve sağlıklı kontrol kanından saflaştırılan $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3/CD28 boncukları ile uyarımından; 0., 12. ve 24. saatlerde bu $CD4^+$ T hücrelerin Tfh ilişkili belirteçler olan PD-1 ve CXCR5 yüzey ifade değişimlerine paralel olarak bu hücre popülasyonlarında CD154, CD25 ve CD69 erken aktivasyon belirteçlerinin yüzey ifadelerinin zamana bağlı değişimi akım sitometrik teknikler aracılığı ile analiz edildi (Şekil 17, Şekil 18).

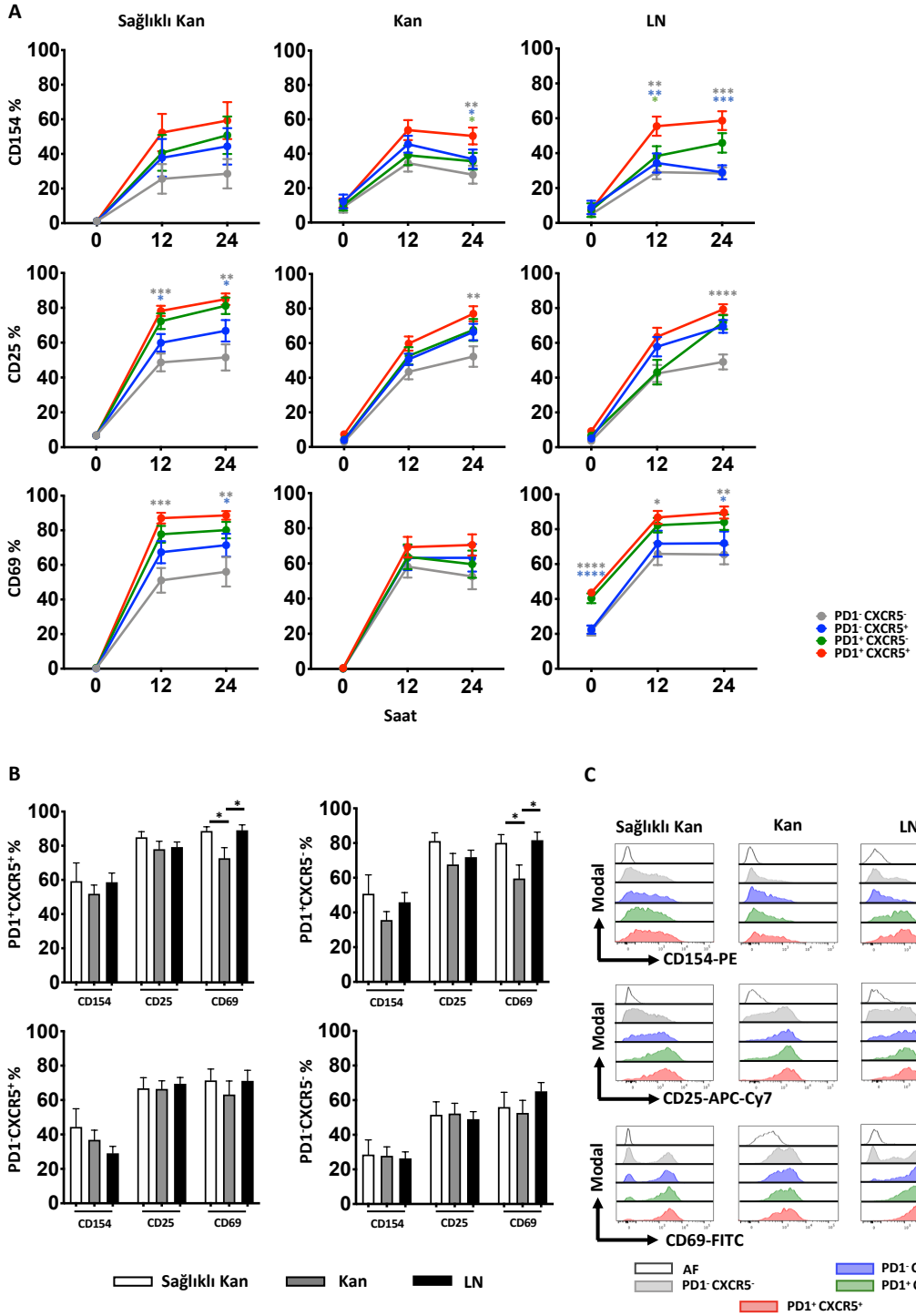
CD154 yüzey ifadesinde 0, 12 ve 24 saat sürecinde sağlıklı kan örneklerinde arttığı ancak tüm zaman aralıklarında $CD4^+$ T hücre popülasyonlarından ifade edilen CD154 oranlarında farklılık tespit edilmedi. Uyarımdan 24 saat sonra hasta kanındaki PD-1^+CXCR5^+ (%50,36±16,98) hücrelerinin PD-1^+CXCR5^- (%35,65±16,98), PD-1^-CXCR5^+ (%36,89±16,98) ve PD-1^-CXCR5^- (%27,82±18,01) hücrelerine göre istatiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek CD154 yüzeylerinde ifade ettikleri görüldü. LN'den elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin uyarımından 12 saat sonra PD-1^+CXCR5^+ (%55,45±18,22) hücrelerinin, PD-1^+CXCR5^-(%38,35±18,71), PD-1^-CXCR5^+ (%34,35±18,23) ve PD-1^-CXCR5^- (%29,09±12,76) hücrelerine kıyasla istatiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek CD154 yüzey ekspresyonunu arttırdığı saptandı. LN'den elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin uyarımdan 24 saat sonra da PD-1^+CXCR5^+ (%58,64±17,81) ve PD-1^+CXCR5^- (%45,88±18,44) hücre popülasyonlarının PD-1^-CXCR5^+ (%29,07±13,26) ve PD-1^-CXCR5^- (%28,41±10,92) hücre popülasyonlarına göre CD154 yüzey eksresyonlarını arttırdığı tespit edildi.

CD25 yüzey ifadesinin de tüm örneklerdeki $CD4^+$ T hücre popülasyonlarından 0, 12 ve 24 saatlik uyarım süresince arttığı ve 24 saat sonunda plotaya ulaştığı tespit

edildi. Ayrıca, sağlıklı kan örneklerinin uyarımdan 12 saat sonra; PD-1^{+}CXCR5^{+} (%78,20±7,24) ve PD-1^{+}CXCR5^{-}(%72,30±10,96) hücre popülasyonlarında, PD-1^{-}CXCR5^{+} (%59,93±12,34) ve PD-1^{-}CXCR5^{-} (%48,65±12,57) hücre popülasyonlarına kıyasla istatiksel olarak yüksek oranda CD25 görüldü ve bu popülasyonlar arasındaki anlamlı fark 24 saat sonunda da tespit edidi. Hasta kan örnekleri ile yapılan çalışmada da 24 saat uyarım sonucunda PD-1^{+}CXCR5^{+} (%77±15,01) hücre popülasyonunun sadece PD-1^{-}CXCR5^{-} (%52,25±20,49) popülasyonuna göre istatiksel olarak anlamlı oranda yüksek CD25 yüzey ifadesine sahip olduğu saptandı. Hasta kan örneklerine benzer şekilde LN'de de PD-1^{+}CXCR5^{+} (%79,20±9,87) hücrelerinin PD-1^{-}CXCR5^{-} (%49,03±14,30) popülasyonuna kıyasla istatiksel olarak anlamlı oranda yüksek CD25 görüldü.

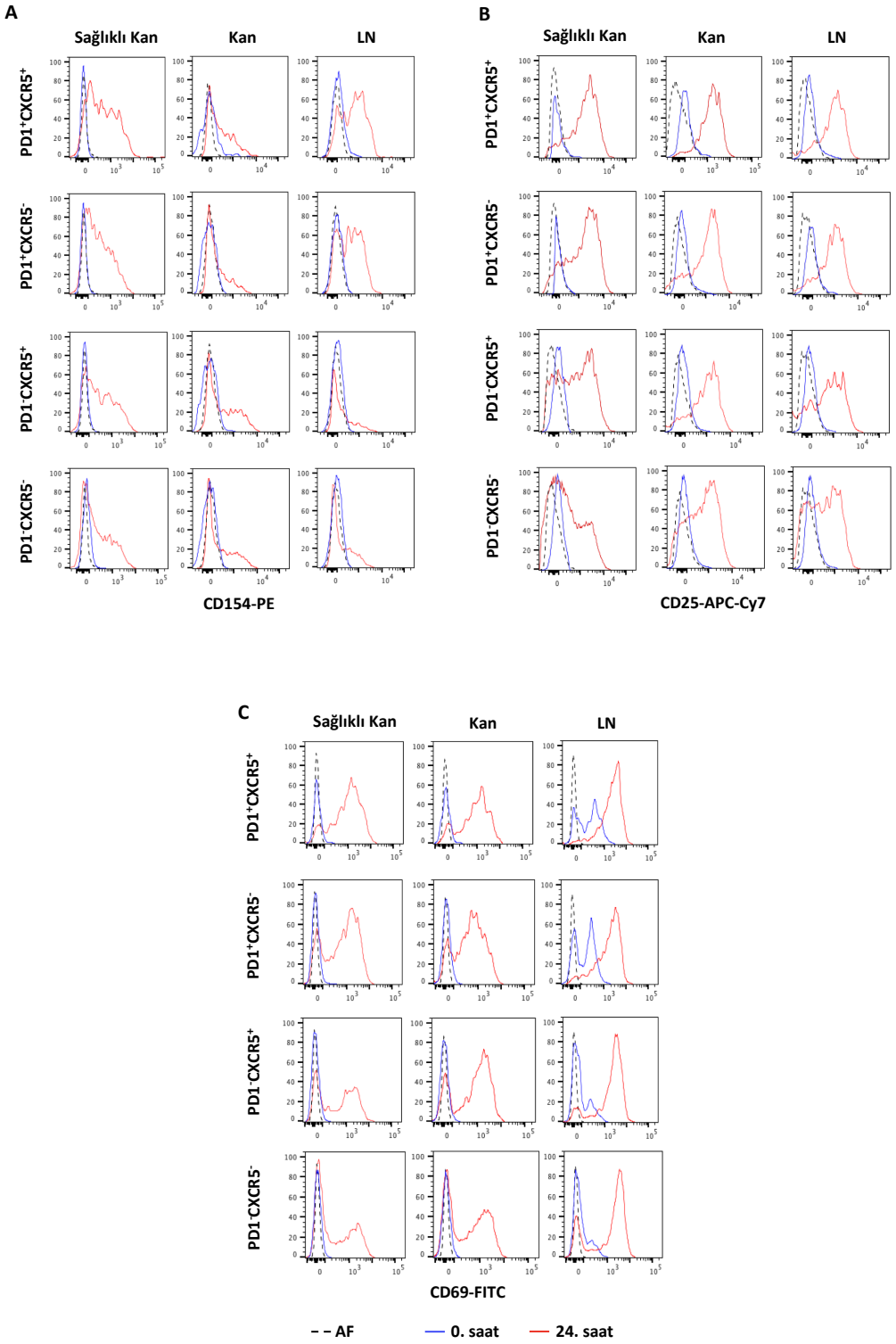
CD69 yüzey ifadesinin de tüm örneklerdeki CD4^{+} T hücre popülasyonlarında 0, 12 ve 24. saatte arttığı ve 24 saat sonrasında plotaya ulaştığı tespit edildi. Ayrıca, sağlıklı kan örneklerinin uyarımdan 12 saat sonra; PD-1^{+}CXCR5^{+} (%87,02±7,63) hücre popülasyonunda PD-1^{-}CXCR5^{-} (51,07±17,44) hücre popülasyonuna göre istatiksel olarak anlamlı oranda yüksek CD69 ifade edildiği görüldü ve bu anlamlılık 24 saat sonunda da tespit edidi. Hasta kan örnekleri ile yapılan çalışmada da 24 saat uyarım sonucunda tüm hedef popülasyonlardaki CD69 yüzey ifadelerinin zamana bağlı olarak arttığı, ancak 24 saat sonunda hedef hücre popülasyonları arasında CD69 ifadesinde anlamlı bir fark görülmediği tespit edildi (PD-1^{+}CXCR5^{+}: %70,53±20,95, PD-1^{+}CXCR5^{-}: %59,59±26,83, PD-1^{-}CXCR5^{+}: %63,22±27,09, PD-1^{-}CXCR5^{-}: %52,60±25,21). LN örmeklerinde de diğer örnek gruplarından farklı olarak uyarımdan önce CD69 yüzey ifadesinin PD-1^{+}CXCR5^{+} (%43,67±4,64) ve PD-1^{+}CXCR5^{-} (%40,37±7,42) hücre popülasyonlarındaki CD69 ifadesinin oranının PD-1^{-}CXCR5^{+} (%22,46±6,23) ve PD-1^{-}CXCR5^{-} (%21,79±7,35) hücrelerdeki CD69 oranından istatiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu saptandı. Aynı şekilde, uyarımdan 24 saat sonra da PD-1^{+}CXCR5^{+} ve PD-1^{+}CXCR5^{-} popülasyonlardaki CD69 oranlarının uyarım öncesine oranla arttığı ve PD-1^{-}CXCR5^{+} ve PD-1^{-}CXCR5^{-} hücre popülasyonlarından istatiksel olarak anlamlı oranda daha fazla CD69 yüzey ifadesine sahip olduğu görüldü. Sonuç olarak, 24 saat uyarım sonrası örnek grupları ve CD4^{+} T

hücrelerdeki PD-1 ve CXCR5 ifadesi fark etmeksizin tüm hedef hücre gruplarında genel olarak CD69 yüzey ifadesinin yüksek olduğu tespit edildi.



Şekil 17. Meme kanseri lenf nodu (LN) (n=11), periferik kanından (n=12) ve kontrol kan (n=6) örnek gruplarından elde edilen PMNH'lerden, $CD4^+$ MACS sonrası izole edilen $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarımından sonra PD-1 ve CXCR5 bağımlı popülasyonlarda erken aktivasyon belirteçlerinin (CD154, CD25, CD69) zamana bağlı yüzey ekspresyon değişimi. A) Uyarımından önce 0. saatte ve uyarımdan sonraki 12. ve 24. saatlerde $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarının yüzeylerinde ifade ettikleri CD154, CD25 ve CD69 örnek grupları arasında değişimi. B) Uyarımdan 24 saat sonra $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarının

yüzeylerinde ifade ettikleri CD154, CD25 ve CD69 örnek grupları arasında değişimi. C) Uyarımdan 24 saat sonra PD-1^{+}CXCR5^{+}, PD-1^{+}CXCR5^{-}, PD-1^{-}CXCR5^{+} ve PD-1^{-}CXCR5^{-} hücre popülasyonlarının yüzeylerinde ifade ettikleri CD154, CD25 ve CD69 örnek grupları arasında değişiminin temsili histogram grafiği. İstatiksel farklılıklar aynı zamandaki popülasyonlar için kıyaslandı ve p<0,05 anlamlılıkta ise *, p<0,01 anlamlılıkta ise **, p<0,001 anlamlılıkta ise ***, p<0,0001 anlamlılıkta ise **** olarak gösterildi.



Şekil 18. Meme kanseri lenf nodu (LN), periferik kanından ve kontrol kan örnek gruplarından elde edilen PMNH'lerden, CD4^{+} MACS sonrası izole edilen CD4^{+} T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarımından sonra PD-1 ve CXCR5 bağımlı popülasyonlarda erken aktivasyon belirteçlerinin A) CD154, B)CD25, C)CD69 0. ve 72. saatlerde yüzey ekspresyon değişiminin temsili histogramı.

4.5. Anti-CD3 ve Anti-CD28 Uyarımı ile $CD4^+$ T hücrelerinde Tfh Fenotipinin ve İnhibitör Reseptörlerinin Zamana Bağlı Değişimi

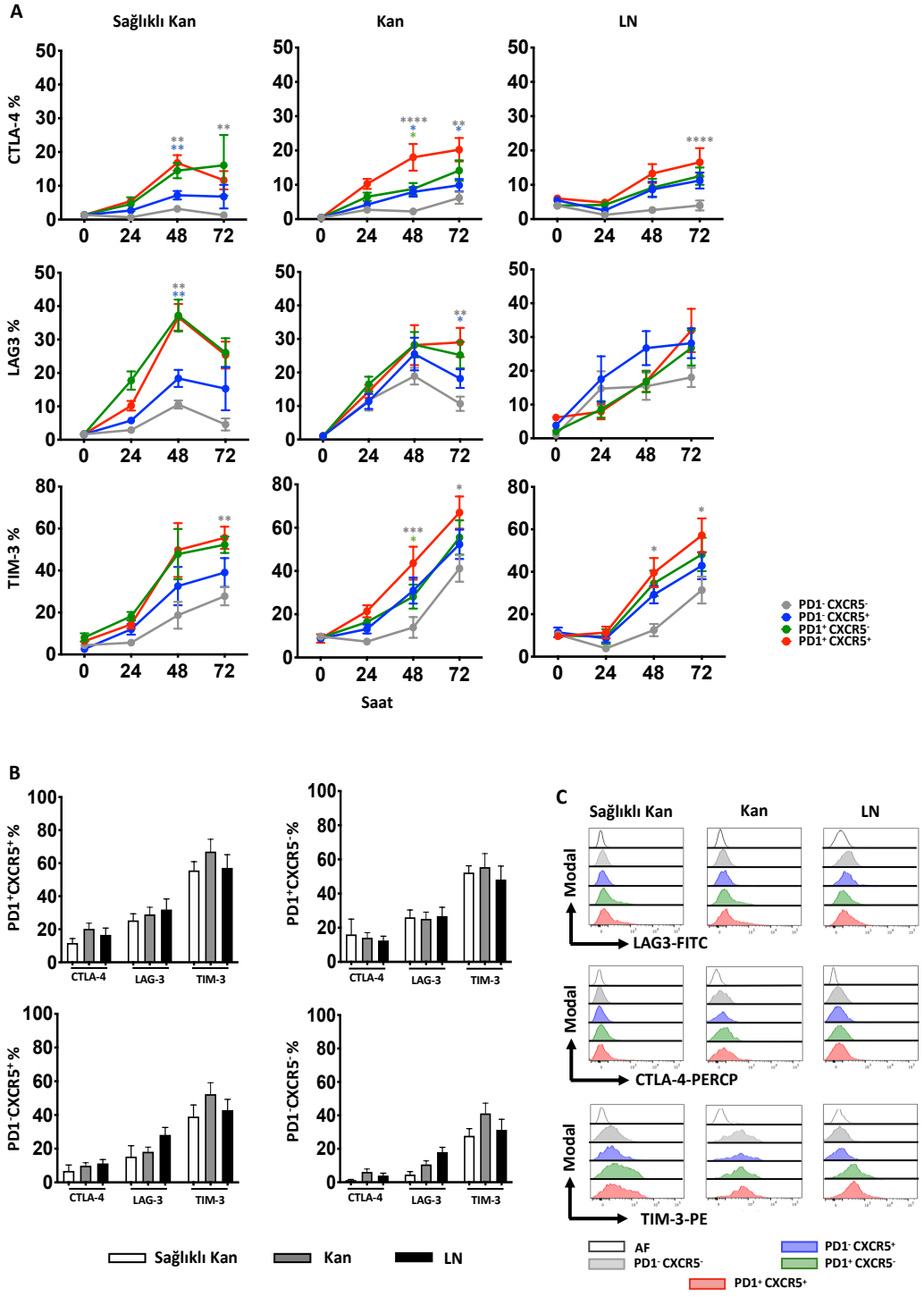
Meme kanseri LN'sinden, hasta kan ve sağlıklı kontrol kanından saflaştırılan $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3/CD28 boncukları ile uyarımından; 0, 24, 48 ve 72 saatlerde bu $CD4^+$ T hücrelerin Tfh ilişkili belirteçler olan PD-1 ve CXCR5 yüzey ifade değişimlerine paralel olarak bu hücre popülasyonlarında CTLA-4, LAG3 ve TIM-3 inhibitör reseptör yüzey ifadelerinin zamana bağlı değişimi akım sitometrik teknikler aracılığı ile analiz edildi (Şekil 19, Şekil 20).

CTLA-4'ün 0, 24, 48 ve 72 saat uyarım süresince düşük oranda kan ve LN örneklerinde arttığı görüldü. Sağlıklı kanda; 48 saat uyarım sonrasında $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ (%16,77±5,66) ve $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ (%14,50±5,49) hücrelerde $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ (%7,20±3,09) ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ (%3,18±1,87) hücrelere göre istatiksel olarak daha yüksek CTLA-4 yüzey ifadesi tespit edildi. Ayrıca, 72 saat uyarım sonucunda sağlıklı kanda bu oranın bir miktar azaldığı gözlendi. Hasta kanında bulunan hedef hücre popülasyonları incelendiğinde ise; 48 saatlik uyarım sonrası $PD\text{-}1^+CXCR5^+$(%18,01±13,44) hücrelerde, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ (%8,79±5,95), $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ (%7,91±4,81) ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ (%2,24±2,39) hücre popülasyonlarına göre anlamlı oranda yüksek CTLA-4 yüzey ifadesi tespit edildi. $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerdeki bu artış 72. saat sonunda (%20,23±11,83) olduğu ve $PD\text{-}1^+CXCR5^-$(%14,13±10,37), $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ (%14,13±10,37) ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ (%6,18±5,92) hücre popülasyonlarına oranla daha yüksek olduğu tespit edildi. LN örneklerindeki hedef popülasyonlarda CTLA-4 yüzey ifadesi oranı incelendiğinde ise 48 saat sonunda hedef popülasyonlar arasında anlamlı bir fark görülmedi. Uyarımdan 72 saat sonra $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ (%16,57±5,95) hücre popülasyonunda diğer $PD\text{-}1^+CXCR5^-$(%12,52±8,35) ve $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ (%11,24±7,71) popülasyonlarına göre anlamlı bir fark görülmezken $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ (%3,97±4,82) hücrelere oranla yüksek miktarda CTLA-4 yüzey ifadesi tespit edildi. Ayrıca, 72 saat uyarımından sonra hedef popülasyonların CTLA-4 yüzey ifadelerinin oranın da örnek grupları arasında farklılık göstermediği saptandı.

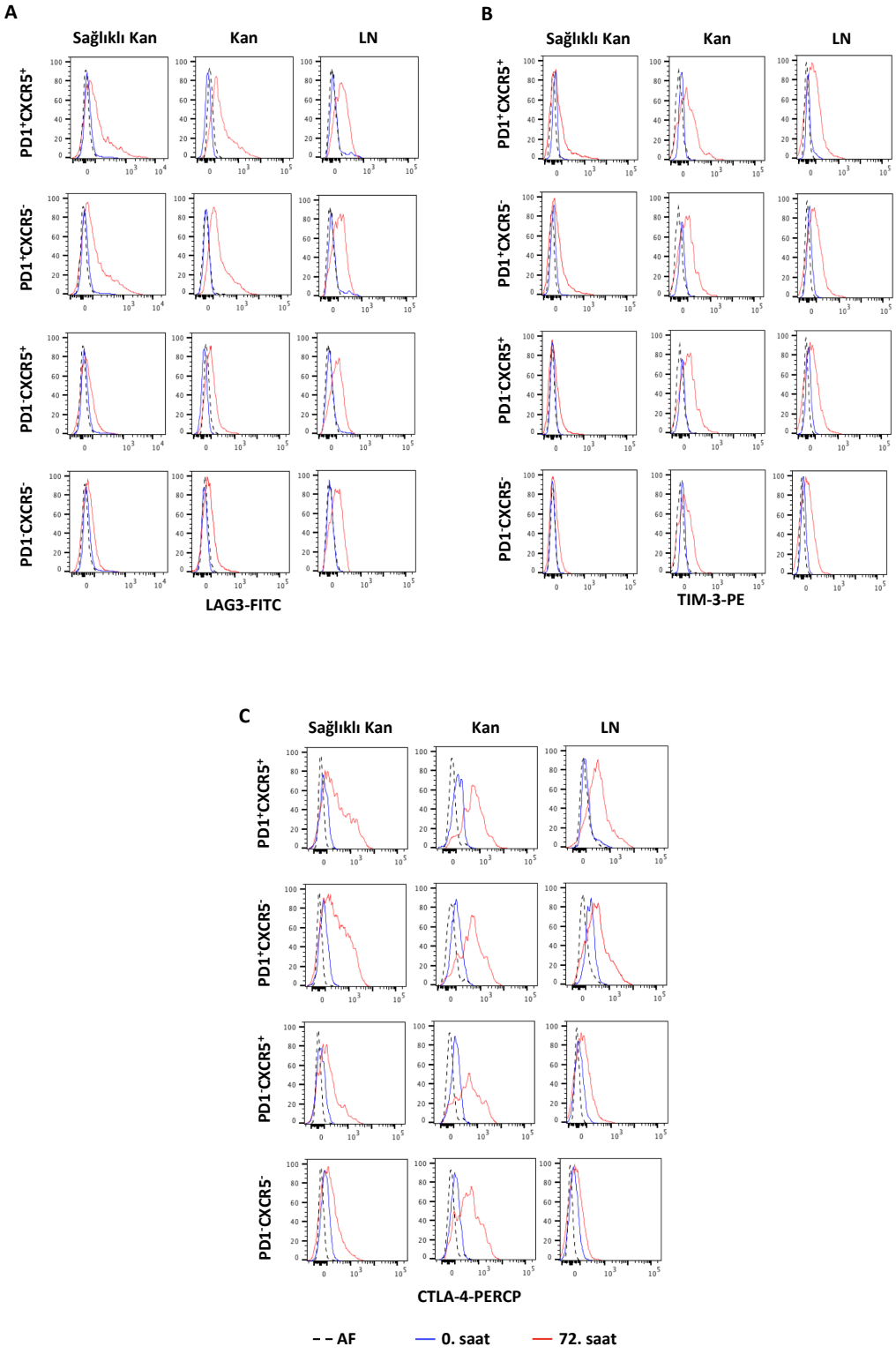
LAG-3'ün 0, 24, 48 ve 72 saat uyarım süresince CTLA-4'e göre daha yüsek oranda kan ve LN örneklerinde arttığı görüldü. Sağlıklı kanda 48 saat uyarım sonrasında PD-1^{+}CXCR5^{+} (%36,65±9,76) ve PD-1^{+}CXCR5^{-} (%37,30±11,67) hücrelerde PD-1^{-}CXCR5^{+} (%18,36±6,28) ve PD-1^{-}CXCR5^{-} (%10,54±3,01) hücrelere kıyasla istatiksel olarak daha yüksek LAG-3 yüzey ifadesi tespit edildi. Ancak, 72 saat uyarım sonucunda sağlıklı kanda bu oranların bir miktar azaldığı ve hedef hücre popülasyonları arasında anlamlı oranda LAG-3 ifadesinde farklılık olmadığı görüldü. Hasta kanındanki hedef hücre popülasyonaları incelendiğinde ise; 72 saatlik uyarım sonrası PD-1^{+}CXCR5^{+} (%28,97±14,98) hücrelerinde, sadece PD-1^{-}CXCR5^{-} (%10,66±7,41) hücre popülasyonuna göre anlamlı oranda yüksek LAG-3 yüzey ifadesi tespit edildi. LN örneklerindeki hedef popülasyonlarda PD-1^{+}CXCR5^{-} hücre popülasyonun daha hızlı oranda LAG-3 yüzey ifadesini arttırdığı ancak uyarım sonrası zaman dilimlerinde hedef popülasyonlar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Ayrıca, 72 saat uyarımından sonra hedef popülasyonların LAG-3 yüzey ifadelerinin oranın da örnek grupları arasında farklılık göstermediği, ancak tüm örneklerdeki tüm hücre popülasyonlarında CTLA-4'e oranla 72 saat sonunda daha yüksek LAG-3 yüzey ifadesinin olduğu tespit edildi.

TIM-3'ün 0, 24, 48 ve 72 saat uyarım süresince diğer inhibitör reseptörlere oranla daha yüksek ve hızlı bir şekilde tüm örneklerde arttığı görüldü. Sağlıklı kanda; 72 saat uyarım sonrasında PD-1^{+}CXCR5^{+} (%55,60±12,99) ve sadece PD-1^{-}CXCR5^{-} (%27,77±10,59) hücreleri arasında istatiksel olarak daha yüksek TIM-3 yüzey ifadesi tespit edildi. Hasta kanında bulunan hedef hücre popülasyonları incelendiğinde 48 saatlik uyarım sonrası PD-1^{+}CXCR5^{+} (%43,60±26,36) hücrelerinde, PD-1^{-}CXCR5^{+} (%28,15±19,21) ve PD-1^{-}CXCR5^{-} (%13,92±16,68) hücre popülasyonuna göre anlamlı oranda yüksek TIM-3 yüzey ifadesi tespit edildi. 72 saatlik uyarım sonrasında da PD-1^{+}CXCR5^{+} (%67,00±25,81) hücrelerinde PD-1^{-}CXCR5^{-} (%41,15±21,29) hücre popülasyonuna göre anlamlı oranda yüksek TIM-3 yüzey ifadesi saptandı. LN örneklerindeki hedef popülasyonların da uyarımdan 48 saat sonra PD-1^{+}CXCR5^{+} (%39,59±22,86) hücre popülasyonunun PD-1^{-}CXCR5^{-}(%12,50±9,57) hücre popülasyonuna kıyasla daha yüksek oranda TIM-3 inhibitör molekülünü yüzeylerinde ifade ettikleri görülmekle birlikte bu durum 72 saatte yine sadece PD-1^{+}CXCR5^{+}

(%57,15±26,50) ve PD-1^{-}CXCR5^{-} (%31,35±20,91) hücre popülasyonları arasında tespit edildi. Ayrıca, 72 saat uyarımdan sonra hedef popülasyonların TIM-3 yüzey ifadesi oranın da örnek grupları arasında farklılık göstermediği görüldü ancak tüm örneklerdeki CD4^{+} T hücre popülasyonlarında PD-1 ve CXCR5 ifadesine fark etmeksizin 72 saat uyarım sonucunda diğer inhibitör reseptörlere oranla TIM-3 inhibitör reseptörü en yüksek oranda saptandı.



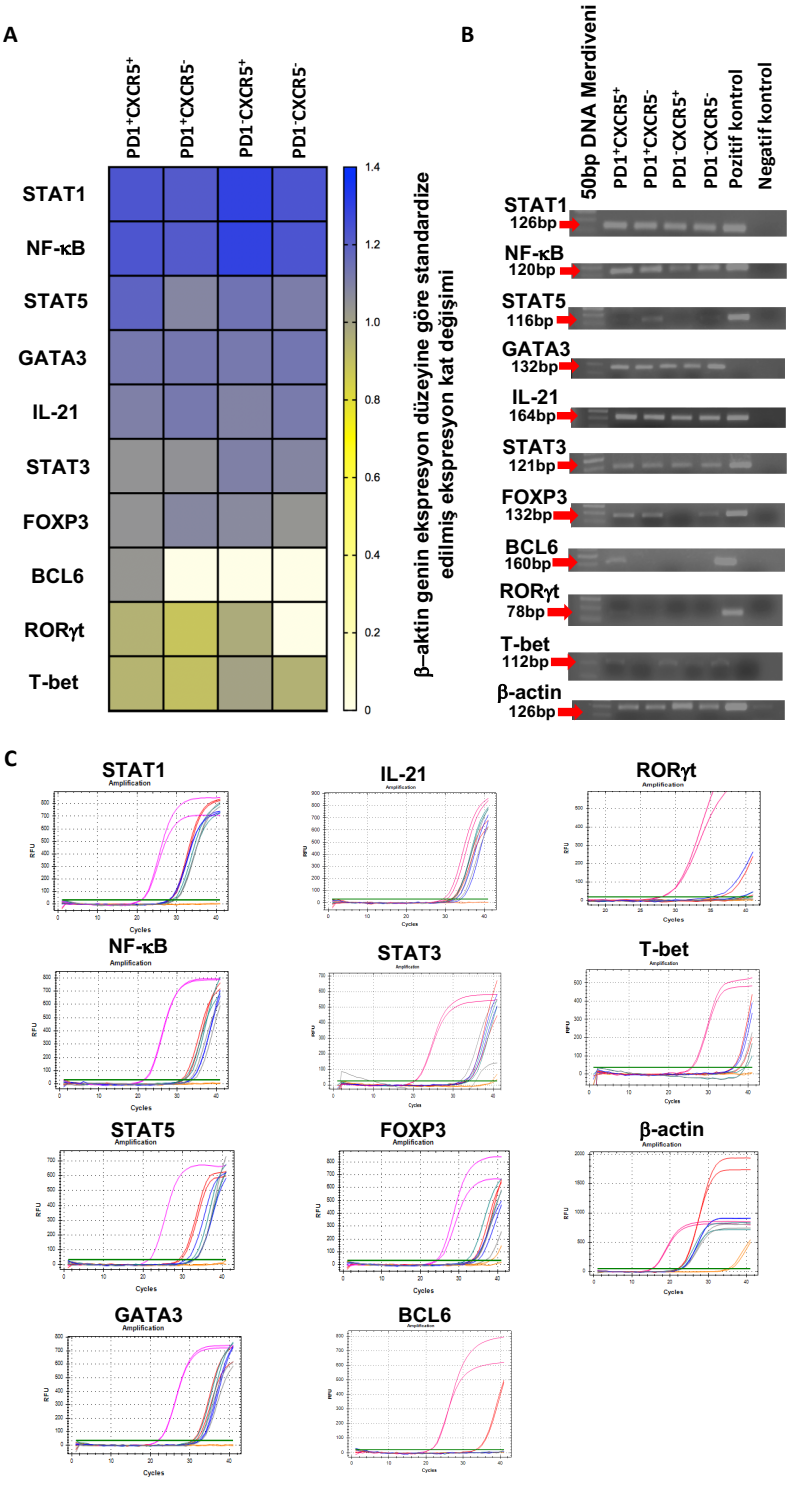
Şekil 19. Meme kanseri lenf nodu (LN) (n=11), periferik kanından (n=12) ve kontrol kan (n=6) örnek gruplarından elde edilen PMNH'lerden, $CD4^+$ MACS sonrası izole edilen $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarımından sonra PD-1 ve CXCR5 bağımlı popülasyonlarda inhibitör belirteçlerinin (CTLA-4, LAG-3, TIM-3) zamana bağlı yüzey ekspresyon değişimi. A) Uyarımından önce 0. saatte ve uyarımdan sonraki 12., 24., 48. ve 72. saatlerde PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonlarının yüzeylerinde ifade ettikleri CTLA-4, LAG-3 ve TIM-3 örnek grupları arasında değişimi. B) Uyarımdan 72 saat sonra PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonlarının yüzeylerinde ifade ettikleri CTLA-4, LAG-3 ve TIM-3 örnek grupları arasında değişimi. C) Uyarımdan 72 saat sonra PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonlarının yüzeylerinde ifade ettikleri CTLA-4, LAG-3 ve TIM-3 örnek grupları arasında değişiminin temsili histogram grafiği. İstatiksel farklılıklar aynı zamandaki popülasyonlar için kıyaslandı ve $p<0,05$ anlamlılıkta ise *, $p<0,01$ anlamlılıkta ise **, $p<0,001$ anlamlılıkta ise ***, $p<0,0001$ anlamlılıkta ise **** olarak gösterildi.



Şekil 20. Meme kanseri lenf nodu (LN), periferik kanından ve kontrol kan örnek gruplarından elde edilen PMNH'lerden, $CD4^+$ MACS sonrası izole edilen $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarımından sonra PD-1 ve CXCR5 bağımlı popülasyonlarda inhibitör belirteçlerinin A) LAG-3, B) TIM-3, C) CTLA-4 0. ve 72. saatlerde yüzey ekspresyon değişiminin temsili histogramı.

4.6. Anti-CD3 ve Anti-CD28 Uyarımı Sonrası $CD4^+$ T Hücrelerinin PD-1 ve CXCR5 Tfh Fenotipik Belirteçleri Yüzey İfadelerine Bağlı Hücre Popülasyonlarına Saflaştırılması ve T Hücre Alt Grupları İlişkli Gen Ekspresyon Analizleri

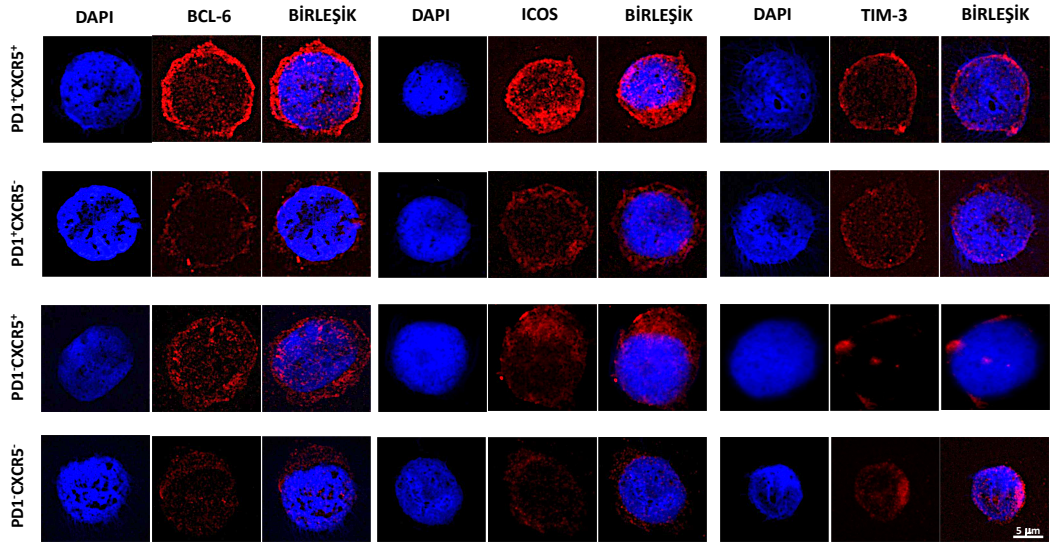
Sağlıklı kontrol kanından saflaştırılan $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3/CD28 boncukları ile uyarımından 72 saat sonra PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- T hücre popülasyonları floresan-aktive hücre ayırma (FACS) yöntemi ile izole edildi. Hücre popülasyonlarından %85 oranında saflık elde edilmesi ile tüm sağlıklı kan örneklerinden elde edilen hücreler havuzlandırıldı (n=8) ve RNA izolasyonu sonrası cDNA sentezi yapılıp RT-PZR testi ile STAT-1, NFκB, STAT-5, GATA3, IL-21, STAT-3, FOXP3, BCL6, RORγt ve T-bet yardımcı T hücre alt gruplarına özgül moleküllerin mRNA düzeyinde ifade oranları β-aktin geninin (house-keeping) ifade oranına göre normalize edildi ve hücre popülasyonlarında ilgili genlerin transkripsiyonel değişiminin analizi gerçekleştirildi. Bu analizler sonucunda uyarılan $CD4^+$ T hücrelerden PD-1 ve CXCR5 ifadesi fark etmeksizin hücre popülasyonlarının hepsinin anlamlı bir fark göstermediği ve diğer moleküllere oranla yüksek oranda STAT-1, NFκB, STAT5 ve GATA-3, IL-21, STAT-3 molekülünü mRNA düzeyinde ifade ettiği tespit edildi. Ayrıca, tüm hedef hücre popülasyonlarda diğer moleküllere oranla daha düşük ama yine gruplar arasında anlamlı fark görülmeksizin yüksek oranda Treg ilişkili FoxP3 ifadesi saptandı. Ancak, bir tek PD-1^+CXCR5^+ hücre popülasyonunda Tfh ilişkili Bcl-6 transkripsiyon faktörünün mRNA düzeyinde ifadesi görülürken diğer hedef popülasyonlarda hiç tespit edilmedi. RORγt ekspresyonu da analiz edildiğinde PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^- ve PD-1^-CXCR5^+ popülasyonlarda düşük oranda gruplar arasında anlamlı bir fark olmaksızın mRNA düzeyinde ekspresyon gözlenirken, PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonunda RORγt ifadesi görülmedi. Ayrıca, tüm popülasyonlarda diğer moleküller kadar yüksek olmasa da T-bet transkripsiyon faktörünün mRNA düzeyindeki ifadesi de tüm hedef popülasyonlarda saptandı ve T-bet transkripsiyon faktörünün PD-1^+CXCR5^+ Tfh benzeri hücre popülasyonunda en düşük ifade edilen molekül olduğu tespit edildi.



Şekil 21. Kontrol örnek gruplarından elde edilen PMNH'lerden (n=8 pooled), $CD4^+$ MACS sonrası izole edilen $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarımından 72 saat sonra, PD-1^+CXCR5^+, PD-1^+CXCR5^-, PD-1^-CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^- hücre popülasyonlarının sortu gerçekleştirildi. Elde edilen bu popülasyon havuzundan RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi sonrası RT-PZR testi ile STAT-1, NFκB, STAT-5, GATA3, IL-21, STAT-3, FOXP3, BCL6, T-bet ve RORγt transkripsiyon faktörlerinin β-aktin geninin ekspresyon oranına göre normalize edildi ve hücre popülasyonlarında ilgili genlerin transkripsiyonel değişim oranları gösterildi. A) Her ilgili genin RT-PZR sonrası hücre popülasyonlardaki gen ekspreyonlarının ısı-haritasında gösterimi B) Her ilgili genin RT-PZR ürünlerinin jel elektroforez sonucunda çoğaltılan bölgelerinin gösterimi C) Her ilgili genin RT-PZR erime-eğirisi grafiklerinin gösterimi.

4.7. Anti-CD3 ve Anti-CD28 Uyarımı Sonrası $CD4^+$ T Hücrelerinin PD-1 ve CXCR5 Tfh İlişkili Belirteçleri Yüzey İfadelerine Bağlı Hücre Popülasyonlarına Saflaştırılması ve İmmün Floresan Boyama Sonuçları

Sağlıklı kontrol kanından saflaştırılan $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3/CD28 boncukları ile uyarımından 72 saat sonra $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ T hücre popülasyonları floresan-aktive hücre ayırma (FACS) yöntemi ile izole edildi. Hücre popülasyonlarından %85 oranında saflık elde edilmesi ile hücreler sitospin ile lamların üzerine yapıştırıldı ve bu hücrelerdeki Tfh ilişkili BCL-6 ve ICOS molekülleri ve TIM-3 inhibitör reseptörün ifadeleri immünfloresan boyama ile incelendi. BCL6 ve ICOS ifadeleri diğer popülasyonlara kıyasla en yüksek düzeyde $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücre popülasyonunda tespit edilidi. $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ hücre popülasyonlarında da $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ popülasyonuna göre düşük düzeyde olsa da BCL6, ICOS ve TIM-3 varlığı saptanırken, $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ popülasyonda çok minimal oranda tespit edildi Ayrıca, TIM-3 ifadesinin de $BCL6^+ICOS^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh ilişkili belirteçleri bulunduran popülasyonda yüksek oranda varlığı saptandı (Şekil 22).



Şekil 22. Kontrol örnek gruplarından elde edilen PMNH'lerden, $CD4^+$ MACS sonrası izole edilen $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarımından 72 saat sonra, $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarının sortu gerçekleştirildi. $PD\text{-}1^+CXCR5^+$, $PD\text{-}1^+CXCR5^-$, $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre popülasyonlarında immünfloresan boyamaları sonucu DAPI, BCL-6 ICOS ve TIM-3 moleküllerinin popülasyonlardaki ifade oranlarının gözlemlenmesi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri ülkemizde en çok tanı konan ikinci kanser türü olmakla beraber kadınlarda görülen birinci kanser türüdür. Meme kanseri heterojen bir hastalık olup yapılan gen ekspresyon analizleri sonucu, terapilere farklı yanıtlar verebilen ve prognozda önemli ölçülerde farklıklar gösterebilen çeşitli biyolojik alt grupları tanımlanmıştır. Bu nedenle meme kanserinde erken tanı ve bireyin anti-tümör immün yanıtı sonucu tümör eliminasyonu büyük önem taşımaktadır.

Meme kanserinde T hücre yanıtı incelendiğinde, naif T hücrelerin aktivasyonunun lenfoid organlarda antijen sunan hücrelerden kanser hücrelerinin antijenik peptidlerinin tanınması ile başlamaktadır. Meme kanserinin de ilk metastaz noktasının sentinel ve aksiller lenf nodları olduğu bilinmektedir. Ayrıca, edinilmiş ve hümoral immün yanıt arasında köprü görevi gören T foliküler yardımcı (Tfh) hücrelerin de büyük bölümünün lenf nodunda (LN) olduğu yaklaşık son on yıldır yapılan çeşitli hayvan ve insan çalışmalarında gösterilmiştir. Literatürde Tfh hücreleri ve meme kanseri ilişkili çalışmalar hasta kanındaki Tfh hücreleri ile sağlıklı bireylerin Tfh hücrelerinin karşılaştırmasını içermektedir (Gu-Trantien ve ark., 2013). Ayrıca, literatürdeki birçok çalışma da meme kanseri tersiyer lenfoid yapısında ve tümör mikro çevresinde bulunan Tfh hücrelerinin; fenotipik karakterizasyonunu, B hücreler ile etkileşimini ve retrospektif olarak tersiyer lenfoid yapılarda ve tümör mikro çevresinde bulunan oranlarına bağlı olarak sağ kalım analizlerini içermektedir (Gu-Trantien, & Willard-Gallo, 2017, Faghih ve ark., 2014; Song ve ark., 2019). Ancak, metastatik meme kanseri hastalarının lenf nodu ve kan örneklerindeki Tfh hücrelerinin fenotipik ve fonksiyonel analizleri literatürdeki mevcut çalışmalarda bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışması, metastatik meme kanseri hastalarından elde edilen lenf nodu ve kan örnekleri ile gerçekleştirilmiştir olup literatürde ilk olma özelliğindedir.

5.1. Meme Kanseri LN ve Periferik Kan Örneklerindeki $CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh Hücrelerinin Fenotipik Analizleri

5.1.1. $CD4^+$ Tfh Hücrelerinin İmmün Fenotiplendirme Sonuçları Hakkında

Sağlıklı kan, hasta kan ve LN örneklerinde en yüksek $CD45^+CD56^-CD3^+CD4^+$ T hücre oranı LN'de tespit edildi, böylelikle hasta kişilerde de olsa sağlıklı kişilere benzer bir şekilde LN'de periferik kan örneğine oranla daha yüksek oranda $CD3^+$ hücrelerin bulunduğu ve bu hücrelerinin büyük bir bölümün $CD4^+$ T hücrelerden oluştuğu görüldü. Bu $CD4^+$ T hücrelerin ne kadar oranda PD-1 ifade ettikleri araştırıldığında da LN'deki $CD4^+PD\text{-}1^+$ T hücre oranının diğer örneklere kıyasla daha yüksek olduğu saptandı. Bu durum da LN'de antijen sunan hücreler ile naif $CD4^+$ T hücrelerin ilk karşılaştıkları yer olduğu ve metastatik meme kanseri hastalarında meme kanseri hücrelerin etkisi ve antijen sunumu ile LN'deki T hücrelerin olası inhibitör reseptörleri arttırabileceği düşünülmekte ve aynı zamanda LN dokuları literatürde de yer alan bilgiler ışığında Tfh hücrelerinin yüksek olarak bulunduğu bölgeler olarak bilinmektedir ve PD-1 yüzey ifadesinin de Tfh hücrelerde yüksek oranda olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle bu $CD4^+PD\text{-}1^+$ T hücrelerin ne kadarının Tfh fenotipik özelliğinde olduğunu belirlemek için de bu hücrelerdeki CXCR5 ekspresyon analizleri de bu tez çalışmasında gerçekleştirilmiştir. CXCR5 ifadesi lenf nodunda germinal merkezde bulunan ve T:B hücre sınır bölgesine yönelen özellikle Tfh hücrelerinde yüksek oranda bulunduğu bilinmektedir ve bu çalışmada da literatürde görüldüğü üzere (Vella ve ark., 2019) LN örneklerinde diğer gruplara oranla daha yüksek oranda Tfh fenotipik belirteçlerini bulunduran $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücre popülasyonlarının olduğu görülmüştür. Ayrıca, $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücre popülasyonlarının da yüzdesel oranları incelendiğinde LN'de diğer gruplara göre anlamlı oranda yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum da metastatik meme kanseri LN'sinde sürekli antijene maruziyet sonucunda $CD4^+$ T hücrelerin yorgunluk fazına geçtiğini ve bu nedenle inhibitör reseptör ifadesini arttırdığını düşündürmektedir. Bu sonuca ek olarak, $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$ T hücreleri aynı zamanda hasta kanında sağlıklı kan örneklerine oranla anlamlı oranda daha yüksek tespit edilmiştir ve bu durum da benzer şekilde metastatik hastaların kanında sürekli kanser antijenlerine maruziyet

sonucu dolaşan tükenmişlik fazındaki $CD4^+$ T hücrelerin PD-1 inhibitör reseptör ifadesini artırabilmesi ile açıklanabilir.

Tüm bu analizlere ek olarak, literatürdeki son zamanlarda yapılan çalışmalarda $CD4^+PD\text{-}1^{yüksek}CXCR5^+$ Tfh hücreleri incelenmiş olup $PD\text{-}1^{yüksek}$ ve $PD\text{-}1^{düşük}$ hücreler arasında fonksiyonel olarak farklılıklar gösterildiği (Gu-Trantien, & Willard-Gallo, 2017) için bu tez çalışmasında da Tfh analizleri yapılırken $PD\text{-}1^{yüksek}$ ve $PD\text{-}1^{düşük}CD4^+CXCR5^+$ Tfh hücrelerinin de oranları analiz edilmiştir. Ancak, $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin içerisindeki $PD\text{-}1^{yüksek}$ ve $PD\text{-}1^{düşük}$ ifade eden hücrelerinin oranlarında sağlıklı kan, hasta kan ve LN örnekleri arasında anlamlı bir fark görülmemiş olup $PD\text{-}1^{düşük}$ ifade edenlerin yüzdesinin $PD\text{-}1^{yüksek}$ ifade edenlerden daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır. Bu durum da, Tfh hücrelerinin $PD\text{-}1^{düşük}$ oranda eksprese ederek fonksiyonel olarak tam olarak işlevselliğini kaybetmemiş olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, hastadan alınan LN örnekleri her zaman standart bir büyüklükte elde edilemediği için, LN'den elde edilen Tfh hücrelerinin LN ağırlığına oranlanması yapılıp 114 hücre/µg (ortanca değer, min-max: 0-891) $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh benzeri hücreler ile fenotipik analizlerin gerçekleştirildiği gözlemlenmiştir. Yoğun metastazları bulunan histopatolojik evre IV hastalarından LN ağırlıkları yüksek ölçülse de lenfositlerin yüzdesi çok düşük elde edildiği için $CD4^+$ T hücre fenotipik analizleri gerçekleştirilememiştir. Bu durum, metastaz sonucu lenfositlerin tükenmişliği ve LN yapısının ileri metastaz sonucu bozulması ile açıklanabilir.

LN'de bulunan $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh hücrelerin, meme kanseri antijenik peptitleri ile LN'de karşılaşması ve metastaz sonucu aktive olup sürekli antijenik peptid uyarımı sonucu regülatör fenotipik özellik kazanabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, Tfh hücrelerin efektör hafıza ve/veya regülatör T hücre olup olmadıklarını, çoğalmalarında ve hayatta kalmalarında etkili olan sitokin yolaklarının ne olduğunu belirlemek üzere; CCR7, CD45RO, CD127 ve CD25 yüzey ifadeleri de analiz edilmiştir. $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh fenotipik karakterindeki hücrelerinin $CCR7^+CD45RO^+$ hücreler olduğu böylelikle LN'de bulunan bu Tfh hücrelerinin merkezi hafıza T hücre fenotipik özelliğini taşıdığı ve $CD127^+CD25^-$ olup IL-7

aracılığı ile çoğaldıkları ve IL-7 de T hücreleri erken aktivasyon sitokin yolağı olduğu için bu durumunda bu Tfh benzeri hücreler için hafıza T hücre özelliğinde olduğunu göstermektedir. Ayrıca, metastatik meme kanseri LN örneklerinden yapılan bu fenotipik analizlerdeki $CD4^+$ T hücrelerde PD-1 ve CXCR5 yüzey ifadelerine bakılmaksızın, regülatör T hücre belirteci olan $CD127^-CD25^+$ saptanmamış olup, hastaların metastatik olmasına rağmen fenotipik analizlerimizde kullanılan LN örneklerimizdeki metastaz oranın düşük olmasına bağlı olarak regülatör özellikteki hücrelere dönüşümü tam desteklenmediği görülmüştür. Tüm bunlara ek olarak, $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerde de $CCR7^+CD45RO^+$ ve $CD127^+CD25^-$ pozitifliği yüksek oranda tespit edilmiştir. Bu durum da naif $CD4^+$ T hücrelerin uyarımlar sonrası $PD\text{-}1^+$ ekspresyonunu artırması sonucu Tfh hücre fenotipine dönüşmeye başlamasına paralel olarak LN'de kalıp merkezi hafıza ve efektör hafıza özelliğindeki hücrelere farklılaşmaları ile açıklanmaktadır. Ayrıca, $CD4^+PD\text{-}1^-CXCR5^-$ popülasyonu da diğer PD-1 ve CXCR5 popülasyonlarına oranla daha yüksek oranda $CCR7^+CD45RO^-$ yüzey ifadesine sahiptir ve bu hücrelerin naif $CD4^+$ T hücre fenotipik özellik taşıdıklarını göstermektedir.

Literatürde meme kanseri hastaları ile yapılan çalışmada; hasta periferik kan örneklerinden ve tümör dokusu etrafından elde edilen tümör inflitre lenfositlerdeki Tfh'lerin PD-1 ve TIM-3 yüzey ifadesine sahip olduğu tespit edilmiş. Ayrıca aynı çalışmadaki hastaların periferik kanından elde edilen total PMNH'lerin anti-CD3 ve anti-CD28 antikorları ile uyarımından sonra $CD4^+CXCR5^+$ olarak kabul edilen Tfh'lerin $TIM\text{-}3^+$ T hücreler olduğu ve bu hücrelerin daha düşük CXCL13 ve IL-21 ürettiği, ayrıca düşük proliferasyon kapasitesine sahip olup tükenmişliğe girdiği gösterilmiştir (Zhu, Lin, Qiao, Wang ve Xu, 2016). Bu tez çalışmasında da, LN'de bulunan $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh hücrelerinde PD-1 ekspresyonuna ek olarak CTLA-4, LAG-3 ve TIM-3 inhibitör reseptörlerin oranları incelendiğinde $CD4^+$ T hücrelerin PD-1 harici yüksek oranda TIM-3 inhibitör reseptörü ifade ettiği ve $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh benzeri hücrelerinde de diğer PD-1 ve CXCR5 hedef popülasyonlara kıyasla anlamlı oranda TIM-3 ifadesinin görülmesi ile Tfh benzeri hücrelerinin aynı zamanda $TIM\text{-}3^+$ hücreler de olduğu ve bu durumun da sürekli olarak metastatik meme kanserinin antijenine maruziyet sonucu geliştiği düşünülmektedir.

$CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh hücreleri ile literatürde son on yıldır yapılan çalışmalara göre (Cubas ve ark., 2013; Crotty Shane, 2014; Wikenheiser & Stumhofer, 2016) bir diğer Tfh belirteci olarak ICOS eş-uyaran reseptör ekspresyonu da incelendiğinde LN örneklerindeki $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ ve $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerde ICOS miktarının diğer PD-1 ve CXCR5 popülasyonlarına oranla daha yüksek oranda olduğu ve MFI değerleri de kıyaslandığında $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücre popülasyonunda diğer PD-1 ve CXCR5 popülasyonlarına oranla çok yüksek oranda ICOS tespit edilmiştir. Bu durum, $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin bir diğer Tfh ilişkili molekül olan ICOS'u yüksek oranda hem protein miktarı olarak hem de yüzdesel olarak ifade etmesiyle bu popülasyonun $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+ICOS^+$ Tfh hücreleri olduğunu gösterilmiştir.

5.1.2. $CD8^+$ Tfh Hücrelerinin İmmün Fenotiplendirme Sonuçları Hakkında

$CD8^+$ T hücreleri MHC sınıf I molekülleri tarafından sunulan antijenik peptid yapılarını tanır, perforin, granzim gibi litik enzimleri, IFN-γ ve TNF sitokinlerini üreterek hücre içi patojenlerin ve tümörlerin eliminasyonunda görev alırlar. İlk kez 2007 yılında insan tonsiller B hücre foliküllerinde $CXCR5^+CD8^+$ T hücreler bulunduğu gözlenmiştir (Quigley, Gonzalez, Granath, Andersson, & Sandberg, 2007). Litertürdeki bu çalışmada, $CXCR5^+CD8^+$ T hücreler fenotipik olarak incelendiğinde, bu hücrelerin *in vitro* ortamda CXCL13 varlığında göç ettikleri de tespit edilmiştir. Ayrıca, CD27, CD28, CD45RO, CD69 yüzey ifadelerine sahip oldukları ve IFN-γ ve granzim yüksek oranda üretirken düşük oranda perforin ürettikleri de görülmüştür. Bu sonuçlara göre bu $CXCR5^+CD8^+$ T hücrelerin efektör hafıza hücreler olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, aynı çalışmada bu hücrelerin tosiller B hücrelerinden IgG üretimini ve B hücrelerin hayatta kalmasını desteklediği de tespit edilmiş olup bu hücrelerin foliküler T hücrelerin bir parçası olduğu belirlenmiştir (Quigley ve ark., 2007).

Kanser üzerine, koleraktal kanser hastaları ile olan bir çalışmada (Xing ve ark., 2017), $CD8^+$ Tfh'lerin analizinde tümör ve tümör ilişkili lenf nodlarında

$CD8^+CXCR5^+$ T hücreler Tfh olarak adlandırılmış ve bu hücrelerin tümör mikroçevresi ve drane lenf nodunda kan örneklerine oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada, $CXCR5^+CD8^+$ T hücrelerin $CXCR5^-CD8^+$ T hücrelere oranla daha yüksek oranda Tfh belirteci olan Bcl-6 transkripsiyon faktörü ifade ettikleri tespit edilmiştir. Meme kanseri hastaları ile de yapılan çalışmada (Gu-Trantien ve ark., 2013), meme kanseri dokusunun etrafındaki tersiyer lenfoid yapıların germinal merkezleri etrafında düşük oranda da olsa $CD8^+$ T hücreler immünohistokimyasal ve immünfloresan teknikler kullanılarak tespit edilmiştir (Gu-Trantien ve ark., 2013). Sonuç olarak, literatürde meme kanserinde LN ve periferik kanda bulunan $CD8^+$ Tfh hücrelerinin fenotipik analizlerini bu tez çalışması kadar detaylı inceleyen başka çalışma bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızda da meme kanseri hastalarının LN ve periferik kan örneklerinde $CD45^+CD56^-CD3^+CD8^+$ T hücre oranı hasta ve sağlıklı periferik kan örneklerinde LN örneğine oranla daha yüksek tespit edildi; hasta ve sağlıklı bireylerin periferik kanındaki yüzdesel oranlar arasında anlamlı bir fark görülmedi. Literatürde meme kanseri hastaları ile daha önce yapılan çalışmalarda da hasta ve sağlıklı periferik kanındaki $CD8^+$ T hücrelerin yüzdeleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiş ancak drene lenf nodu örneklerinde aynı hastaların periferik kanına oranla anlamlı oranda düşük oranda da olsa $CD8^+$ T hücreler saptanmıştır (Riazi Rad, Ajdary, Omranipour, Alimohammadian, & Hassan, 2015).

Bu $CD8^+$ T hücrelerin ne kadar oranda PD-1 ifade ettiklerini de araştırıdığımız da LN ve periferik kan örnekleri arasında anlamlı bir oran çalışmamızda tespit edilmezken bu PD-1 ifade edenlerin ne kadarının $CXCR5^+$ Tfh hücreleri olduğunu incelediğimizde $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh hücre popülasyonuna benzer bir şekilde, LN örneklerindeki $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh hücre oranının periferik kan örneklerine kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu bulgu, LN yapılarında CXCR5 ligandı olan CCL13 ekspresyonun var olmasına bağlı bu hücrelerin CXCR5 oranlarının yüksek oranda artırabileceğini göstermektedir. Ayrıca, tüm örnek gruplarında da $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ ve $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ hücrelerin oranları incelendiğinde örnek grupları

arasında da anlamlı bir fark bulunmaması yine $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ T hücrelerin asıl olarak LN da bulunan Tfh hücreler olduğunu göstermektedir.

Tüm bu analizlere ek olarak, $CD4^+$ T hücre popülasyonunda olduğu gibi $CD8^+$ Tfh'ler için de $PD\text{-}1^{yüksek}$ ve $PD\text{-}1^{düşük}$ $CD8^+CXCR5^+$ Tfh hücrelerinin de oranları analiz edilmiştir. Ancak, $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin içerisindeki $PD\text{-}1^{yüksek}$ ve $PD\text{-}1^{düşük}$ ifade eden hücrelerinin oranlarının LN, hasta ve sağlıklı periferik kan örnekleri arasında anlamlı bir farkı görülmemiş olup $PD\text{-}1^{düşük}$ ifade edenlerin yüzdesinin $PD\text{-}1^{yüksek}$ ifade edenlerden daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır. Bu bulgu da Tfh hücrelerinin $PD\text{-}1^{düşük}$ oranda eksprese ederek fonksiyonel olarak tam olarak işlevselliğini kaybetmemiş olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, hastadan alınan LN örnekleri her zaman standart bir büyüklükte elde edilemediği için, LN'den elde edilen Tfh hücrelerinin LN ağırlığına oranlanması yapılıp LN'den 24 hücre/µg (ortanca değer, min-max: 0-200) $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh ilişkili belirteçleri bulunduran hücrelerin fenotipik analizlerin gerçekleştirildiği gözlemlenmiştir. Yoğun metastazları bulunan histopatolojik evre IV hastalarının LN ağırlığı yüksek olsa da lenfositlerin yüzdesi çok düşük elde edildiği için aynı $CD4^+$ T hücrelerde olduğu üzere $CD8^+$ T hücre fenotipik analizleri gerçekleştirilememiştir. Bu durum, metastaz sonucu lenfositlerin tükenmişliği ve LN yapısının ileri metastaz sonucu bozulması ile açıklanabilir.

LN'de bulunan $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin de aynı $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh ilişkili belirteçleri bulunduran hücrelerde olduğu gibi, efektör hafıza ve/veya regülatör T hücre olup olmadıkları, çoğalmalarında ve hayatta kalmalarında etkili olan sitokin yolaklarının ne olduğunu belirlemek üzere CCR7, CD45RO, CD127 ve CD25 yüzey ifadelerinin de bu çalışmada analizleri yapıldı. $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin $CCR7^+CD45RO^+$ hücreler olduğu böylelikle LN'de bulunan bu hücrelerinin merkezi hafıza T hücre fenotipik özelliği taşıdığı ve $CD127^+CD25^-$ olup IL-7 aracılığı ile çoğaldıkları ve hafıza T hücre karakteristiğinde olduğu tespit edildi. Tüm bunlara ek olarak, $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerde de $CCR7^+CD45RO^+$ ve $CD127^+CD25^-$ pozitifliği yüksek oranda tespit edildi. Bu durum da naif $CD8^+$ T hücrelerin uyarımlar sonrası PD-1 ekspresyonunu artırması sonucu Tfh hücre

fenotipine dönüşmeye başlamasına paralel olarak LN'de kalıp merkezi ve/veya efektör hafıza özelliğindeki hücrelere farklılaşmaları ile açıklanabilmektedir. Ayrıca, $CD8^+PD\text{-}1^-CXCR5^-$ popülasyonu da diğer PD-1 ve CXCR5 popülasyonlarına oranla daha yüksek oranda $CCR7^+CD45RO^-$ yüzey ekspresyonu bu hücrelerin naif $CD8^+$ T hücre fenotipik özellik taşıdıklarını gösterdi. Aynı zamanda, meme kanseri üzerine yapılmış olan literatürdeki bir çalışmada da meme kanseri hastalarının aksiller LN örneklerinde Tfh hücrelerine bakılmasa da bizim çalışmamıza benzer şekilde, $CD8^+$ T hücrelerinin hastalarının kanına oranla düşük oranda da olsa LN'de bulunduğu ve LN'de bulunan bu $CD8^+$ T hücrelerin CD45RO ifade ettikleri böylelikle bizim çalışmamıza paralel şekilde fenotipik olarak merkezi hafıza T hücre özelliğinde olduğu tespit edilmiş (Vahidi, Bagheri, Ghaderi & Faghih, 2020).

Meme kanseri hastaları tümör drane lenf nodları ile $CD8^+$ T hücreleri üzerine literatürde son yapılan çalışmalara göre (Shariati ve ark., 2020) bizim çalışmamıza paralel bir şekilde LN'de bulunan $CD8^+$ T hücrelerin PD-1 ve TIM-3 yüzey ifadesinin yüksek olduğu ve bu durumunda tümör skorunun artmasına bağlı olarak T hücrelerde tükenmişlik sonucu arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, tümör drane lenf nodlarındaki $CD8^+PD\text{-}1^+$ Tfh olarak adlandırılan grubunda yüksek oranda TIM-3 ifadesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu literatüreki bulgulara paralel şekilde LN'deki $CD8^+$ T hücrelerin PD-1 oranın yüksek olduğu ve bunu TIM-3 yüzey ifadesinin takip ettiği görüldü. Ayrıca çalışmamızda, $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh benzeri hücre grubumuzda CTLA-4, LAG-3 ifadelerine oranla yüksek oranda TIM-3 ifadesi de saptandı.

Son olarak meme kanseri hastaları LN örneklerindeki T hücrelerde son on yıldır Tfh ile ilişkili belirteç olarak bilinen ICOS eş-uyaran yüzey ifadesi de incelendiğinde LN'den elde edilen $CD8^+$ T hücrelerde ICOS varlığı hem yüzdesel olarak hem de MFI verisine bağlı protein ifadesi olarak yüksek oranda saptandı. Ayrıca, bu ICOS ifade eden $CD8^+$ T hücre topluluğunun da büyük bir bölümün $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh fenotipindeki ve $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ hücre gruplarında yüksek oranda ifade edildiği gözlendi. Bu nedenle ICOS ifadesinin CXCR5 bağımlı olarak arttığı düşünüldü ve literatür araştırmalarımız sonucunda meme kanseri üzerine olmasa da *in*

vivo ortamda PD-1'den yoksun LCMV enfekte farelerden dalak örneklerinde yapılan analizlerde $CD8^+CXCR5^+ICOS^+$ Tfh hücrelerinin gelişiminde ICOS ve PD-1'in etkileşimde olmadığı tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2019).

Tüm bu fenotipik veriler analiz edildiğinde metastatik meme kanseri hastalarının LN'sinde bulunan $CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh hücrelerinin fenotipik analizleri literatürde LN ile bu fenotipik özelliklerin incelenmesi bakımından ilk çalışma olup, fenotipik olarak LN'de bulunan bu $CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh hücrelerin $PD\text{-}1^+CXCR5^+ICOS^+$ hücreler olduğu ve yüksek oranda $CCR7^+CD45RO^+$ yüzey ifadesinin bulundurmaları ile merkezi hafıza fenotipik özelliğinde ve genel olarak $CD127^+CD25^-$ olup IL-7 aracılığı ile çoğaldıkları ve yüksek oranda TIM-3 de ifade eden hücreler olduğu saptanmıştır. Bu fenotipik karakterizasyon sonuçlarının, metastatik meme kanseri hastaların tedavisi için ileriki çalışmalarda, IL-7 ve anti-TIM-3 inhibitörü kullanılarak $CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh hücrelerinin sağ kalımı arttırmaya ve anti-kanser hümoral ve sitotoksik immün yanıtları indüklemeye yönelik çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

5.1.3. $CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh Hücrelerinin İmmün Fenotiplendirme Sonuçlarının Klinik Veriler ile Analizi Hakkında

$CD4^+$ T hücre popülasyonlarındaki yüzdesel oranların neoadjuvan ve adjuvan tedavi alan hastalar arasında farklı olmadığı görüldü. Ancak, adjuvan tedavi alan hastaların LN'sinde bulunan $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerin oranın kan örneklerine oranla anlamlı oranda daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu durum da PD-1 bağımlı olduğu için adjuvan tedavi sonrası kanser hücrelerinin yıkımına bağlı olarak, kanser hücrelerine özgül antijenik peptidlerin LN'de T hücrelere sunumu sonucunda T hücrelerde tükenmişlik başlamasına bağlı PD-1 inhibitör reseptörünün artışı ile açıklanabilir. $PD\text{-}1^-CXCR5^+$ hücrelerin oranının da adjuvan tedavi alan hastaların LN'sinde kana kıyasla anlamlı oranda daha yüksek olduğu görüldü. CXCR5 ifadesi LN'de konumlama ile ilişkili kemokin reseptörü olduğundan bu durum beklenmektedir. Klinik evreye bağlı yüzdesel oran kıyaslamalarında da evreler arası anlamlı bir fark görülmezken, klinik evre 0, I, II hastalarının LN'sinde kan örneklerine kıyasla anlamlı oranda $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerin yüksek olduğu

saptanmıştır. Bu durum $CD4^+$ T hücrelerin PD-1 bağımlı gruplarında görüldüğünden LN metastaz sonucu literatüdeki çeşitli kanser araştırmaları ile paralel şekilde (Van Pul ve ark., 2019; Heeren ve ark., 2019) erken evrede TDLN'lere yüksek oranda T hücrelerin göç ettiği ve bu bölgelerdeki T hücrelerin hafıza T hücrelere dönüşebileceğini ve ayrıca literatürdeki çalışmalarda da bu hücrelerin sürekli antijene maruziyet sonucu CTLA-4 gibi inhibitör reseptörlerin de yüzey ifade oranlarını artırarak tükenmişliğe ve regülatör Treg özelliği kazanabileceği ile açıklanabilmektedir. Ayrıca, ileri evre kanser hastalarında erken evre hastalarının lenfoid yapılarında ve hastaların periferik kanında yüksek oranda Tfh bulunduğu literatürde yer alan çalışmalarda (Gu-Trantien ve ark., 2013; Shi ve ark., 2018) gösterilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda $CD4^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh ilişkili hücrelerinin oranlarında evreler arası fark tespit edilmemiştir. Klinik evrelere göre analiz sonuçlarına benzer bir şekilde histopatolojik evrelere göre analizler de gerçekleştirildiğinde, histopatolojik evrelere II ve III arasında hücre popülasyonlarında yüzdesel olarak anlamlı bir farklılık olmayıp, histopatoloik evre II hasta grubunun LN'sinde kan örneklerine oranla $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücre yüzdesi yüksek saptandı. HER2 reseptör ifadesi bulunduran hastalar ile bulundurmayan hastalar arasında hedef popülasyonlarda yüzdesel olarak anlamlı bir fark görülmezken $HER2^-$ olan hastaların LN'sinde kan örneklerine kıyasla istatiksel olarak anlamlı oradan daha yüksek $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerin yüzdesi tespit edildi, bu durum da literatürde de bilindiği üzere $HER2^+$ hastaların daha immünogenik olmalarının yanı sıra (Loi ve ark., 2013; Stanton, Adams, & Disis, 2016) $HER2^-$ hastaların daha agresif tümör tipi olup LN metastazı sonucu tedavilere yanıt alınamadığından metastazın daha da ilerlemesine bağlı LN'deki hücrelerin tükenmişliğe girerek PD-1 ifadesini artırması ile açıklanabilmektedir.

$CD8^+$ Tfh hücre popülasyonları ile literatürde meme kanseri hastalarında neoadjuvan kulanımına, klinik evrelerine ve HER2 pozitifliğine bağlı bu popülasyonların yüzdelerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, LN'deki $CD8^+PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre gruplarının neodajuvan alan hastalarda daha yüksek olduğu görülmüştür. $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücre gruplarının adjuvan alan hastalarda daha yüksek saptanmıştır ve bu durum da neoadjuvan tedavi ile $CD8^+$ T

hücrelerde tükenmişliğin azaltılabildiğini düşündürmüştür. Ancak, çalışmamızda $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh benzeri hücre popülasyonunda, neodajuvan ve adjuvan kullanımı arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ayrıca, adjuvan tedavi alan hastaların LN'sinde bulunan $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ hücrelerin oranları kan örneklerine oranla anlamlı oranda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ve bu durum da $CD4^+$ Th hücrelere benzer bir şekilde hem Tfh hücrelerinin LN'de bulunması hem de adjuvan tedavi uygulanan gruplarda kanser hücrelerinin yıkımı sonucu T hücrelerde tükenmişliğe girmeleri ile açıklanabilmektedir. Bu çalışmadaki hedef popülasyonların, klinik evreye bağlı yüzdesel oran kıyaslamalarında da klinik evre 0, I, II hastalarının LN örneklerinde klinik evre III, IV hastalarına oranla $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ yüzdeleri istatiksel olarak anlamlı oranda yüksek saptanmış olup diğer hücre popülasyonlarının yüzdesel oranlarında klinik evreler arasında bir fark görülmemiştir. Bu erken evre meme kanseri hastalarında naif $CD8^+$ olduğu düşülen $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücre oranının düşük saptanması da yine antijen maruziyetinin erken klinik evrede daha düşük olabileceği ve geç evrede daha yoğun oranda kanser antijenine maruziyet sonucu bu naif hücrelerin aktive olabildiği şeklinde açıklanabilmektedir. Histopatolojik evre II ve III arasında hedef hücre popülasyonlarında yüzdesel olarak anlamlı bir farklılık görülmezken, histopatoloik evre III hasta grubunun LN'sinde kan örneklerine oranla anlamlı oranda $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücre yüzdesi yüksek saptanmıştır. Bu durum da $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh hücrelerinin LN'de meme kanseri hücrelerinin varlığında oranlarının arttığı şeklinde açıklanabilmektedir. HER2 reseptör ifadesi yüksek hastalar ile $HER2^-$ hastalar arasında da hedef popülasyonlarda yüzdesel olarak anlamlı bir fark görülmezken, $HER2^-$ olan hastaların LN'sinde kan örneklerine kıyasla istatiksel olarak anlamlı oradan daha yüksek $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerinin yüzdesi tespit edilmiştir. Bu durum da $CD4^+$ T hücrelerdeki verilere benzer şekilde $HER2^-$ hastaların meme kanserinin $HER2^+$ lere göre daha agresif olup LN'ye metastazı sonrası bu hücrelerin $CD8^+$ T hücreleri de uyararak $PD\text{-}1^+$ hücre olan Tfh hücrelerinin gelişimini destekleyebileceğini düşündürmektedir.

5.2. Lenf Nodu Kesitlerinden İmmün Floresan Boyama Sonuçları

Bu çalışmada, metastatik meme kanseri hastalarının LN doku örneklerinden DAPI, CD4, CD19 ve BCL6 ifadelerinin LN bölümlerinde tespiti için 3 renkli immünfloresan boyamaları yapılmıştır. Literatürde metastatik meme kanseri hastalarının LN dokularında bu moleküllerin aynı anda tespitini ele alan immünfloresan boyama çalışması bulunmamaktadır. Ancak, literatürde tümör dokusundan elde edilen örneklerden CD4, CD20, BCL6 moleküllerinin immünohistokimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir (Gu-Trantien ve ark., 2013; Gu-Trantien, & Willard-Gallo, 2017). Bu çalışmalar sonucunda $CD4^+$ T hücrelerin meme kanseri dokusu tersiyer lenfoid yapılarında ve germinal merkez bölgesinde bulunduğu görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmalarda, tersiyer lenfoid yapılarda tespit edilen $CD4^+$ T hücrelerin BCL6 ve CXCL13 de ifade ettikleri ve germinal merkez bölgesinde bulunan $CD20^+$ B hücreleri ile etkileşim halinde oldukları tespit edilmiş olup bu $CD4^+$ T hücrelerin $BCL6^+CXCL13^+$ Tfh hücreleri oldukları tespit edilmiştir (Gu-Trantien ve ark., 2013; Gu-Trantien, & Willard-Gallo, 2017). Bizim çalışmamızda da LN örneklerinde korteks altında yer alan ve yoğun bir şekilde DAPI boyamasının olduğu ve B hücre belirteci olan CD19'un varlığı tespit edilen bölge germinal merkez olup; aydınlık (light zone) ve karanlık (dark zone) bölgelerinden oluştuğu gösterilmiştir. Daha sonrasında aynı LN örneğinden yapılan $CD4^+$ T hücre boyaması sonucunda da germinal merkez dış kısmında kalan parakorteks bölgesinin T hücre zon bölgesi olduğu net bir şekilde görülmekle beraber, $CD4^+$ T hücrelerin germinal merkez (GC) aydınlık bölgesinde de varlığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu $CD4^+$ T hücrelerin germinal merkez dışında çok net bir şekilde dizili olduğu ve $CD19^+$ B hücreler ile etkileşime geçtiği T:B hücre sınır bölgesi de gözlenmiştir. Aynı örneğin seri kesitlerinden, bu germinal merkez aydınlık bölge veya germinal merkez dışında konumlanan $CD4^+$ T hücrelerinin ne kadarının Tfh özellikte olduğunu belirlemek içinde bir başka Tfh belirteci olan BCL6 ile immün floresan boyama da yapıldığında T:B hüre sınırı bölgesi ve germinal merkez bölgesinde $CD19^+$ B hücreler ile etkileşim halinde olan $CD4^+$ T hücrelerin BCL6 ifade ettikleri tespit edilmiştir. Son on yıldır literatürde yer alan bilgiler ışığında da T:B hücre sınır bölgesinde konumlanan bu $CD4^+$ Tfh hücrelerin antijen ile karşılamış ve LN'na göç etmekte olan pre-Tfh

hücreleri ve germinal merkezde yer alanlarının da effektör Tfh hücreleri olduğu düşünülmüştür (DiToro ve ark., 2018).

5.3. $CD4^+$ T Hücrelerin Uyarım Sonrası Tfh Hücrelerine Farklılaşması

Çalışmamızda metastatik meme kanseri LN'sinden, kanından ve sağlıklı kontrol kanından elde PMNH'lerden $CD4^+$ MACS sonrası $CD4^+$ T hücreleri aktivasyonu gerçekleştirilerek PD-1^+CXCR5^+ Tfh fenotipik belirteçlerini bulunduran hücrelere dönüşümleri analiz edilmiştir. Bu işlem için literatürde son on yıldır kesinliği kanıtlanmış bir teknik olarak $CD4^+$ T hücrelerin aktivasyonu için birincil sinyal olarak anti-CD3 ve hayatta kalmalarını sağlayan ikincil sinyal yolağını aktive etmek için anti-CD28 boncukları ile uyarım gerçekleştirilmiştir. Bu uyarımdan 72 saat sonra sürekli uyarıma bağlı olarak tüm örnek gruplarında PD-1 ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Ancak, LN'den elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin diğer örnek gruplarına oranla 72 saat boyunca daha hızlı ve anlamlı oranda yüksek PD-1 yüzey ifadesine ulaştığı ve diğer kan örneklerinin ise 48-72 saat aralığında PD-1 düzeylerini artırmadıkları tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında, LN'deki bu $CD4^+$ T hücrelerin kan örneklerine kıyasla daha yüksek PD-1 ifadesine ulaşmasında $CD4^+$ T hücrelerinin Tfh hücrelerine farklılaşmanın bir etkisi olabilir mi sorusuna yanıt aranmıştır. Bu durumda da, tüm örnekler için total $CD4^+$ T hücrelerin uyarım sonrası ifade ettiği CXCR5 oranı analiz edilmiştir. Uyarımdan 48 saat sonra LN'den elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin CXCR5 ifadesini diğer gruplara kıyasla daha hızlı arttırdığı ve 72 saat sonunda da istatiksel olarak daha yüksek CXCR5 ifade ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, kan örneklerinde de 0 ve 72 saat sonucunda CXCR5 miktarının anlamlı bir artış göstermediği tespit edilmiştir. Bu durum, kanda bulunun $CD4^+$ T hücrelerin hali hazırda LN'den çıkmış olan efektör $CD4^+$ T hücreler olduğu ve CXCR5 ifadesinin düşürme eğiliminde oldukları ile açıklanmaktadır. Ayırca literatürde son zamanlarda yapılan çalışmalara (Gong, Zheng, & Zhou, 2019; DiToro ve ark., 2018), LN'de aktive olan naif $CD4^+$ T hücrelerde BCL6 transkripsiyon faktörünün aktive olduğu ve BCL6 aktivasyonunun da CXCR5 yüzey ifadesinin arttırdığı tespit edilmiştir. CXCR5 ifadesindeki bu artışa bağlı olarak Tfh olarak adlandırılan bu $CD4^+$ T hücrelerin germinal merkez bölgesine göç ettiği ve B hücrelerin antijen spesifik antikor üretimine desteklediği de görülmüştür (Gong, Zheng, & Zhou, 2019; DiToro ve ark., 2018). Böylelikle bu

çalışmalar referans alınarak bizim çalışmamızdaki LN'den elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin uyarımları sonucu PD-1 ve CXCR5 ifadelerindeki artışı açıklanabilmektedir. Ayrıca, bu tez çalışmasında, tüm örneklerden elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin uyarım sonucu ne kadar PD-1^+CXCR5^+ Tfh hücrelerine farklılaştığı araştırıldığında LN'den elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin 48 saat sonunda PD-1^+CXCR5^+ hücrelere diğer örnek gruplarına göre istatiksel olarak yüksek oranda dönüşmeye başladığı ve 72 saat sonunda LN örneklerinde PD-1^+CXCR5^+ oranının diğer örnek gruplarına kıyasla yüksek oranda olduğu gösterilmiştir. Böylelikle, LN'de bulunan naif $CD4^+$ T hücrelerin birincil ve ikincil sinyal yolakları aktivasyonu sonrası PD-1^+CXCR5^+ Tfh karakteristiğinde hücrelere dönüşme kapasitesine sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca, tüm örneklerde PD-1^+CXCR5^- ve PD-1^-CXCR5^+ hücre gruplarının $CD4^+$ T hücrelerin uyarımı sonrası artışı da analiz edildiğinde tüm gruplarda PD-1^+CXCR5^- hücre popülasyonunun 72 saat uyarım süresince minimal oranda arttığı ancak uyarım öncesine göre istatiksel olarak artmadığı ve gruplar arasında ifade yüzdelerinde fark olmadığı görülmüştür. Aynı şekilde, PD-1^-CXCR5^+ hücre gruplarının da uyarımdan etkilenmediği ve örnek grupları arasında anlamlı bir ifade oranına sahip olmadıkları gözlenmiştir. Ayrıca, daha önceden literatürde meme kanseri LN'sinden ve periferik kan örneklerinden izole edilen $CD4^+$ T hücrelerinin uyarımı sonrası PD-1^+CXCR5^+ Tfh fenotipik belirteci bulunduran hücrelere farklılaşmasını inceleyen bir çalışma yoktur bu nedenle bizim çalışmamız ilk çalışma olma özelliğindedir.

Aynı zamanda, tüm örneklerden elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 uyarımları sonrası proliferasyonları da analiz edildiğinde LN'de bulunan $CD4^+$ T hücrelerin hasta kanına oranla daha yüksek oranda çoğalma özelliğinde olduğu ve hatta sağlıklı kişilerin kanından elde edilen $CD4^+$ T hücrelerinde hasta kanından elde edilen $CD4^+$ T hücrelere kıyasla daha yüksek proliferasyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum LN'de bulunan naif T hücrelerin kandaki efektör hücrelere oranla yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olmaları ile açıklanmaktadır. $CD4^+$ T hücrelerinin uyarımdan 72 saat sonra PD-1^+CXCR5^+ T hücrelere yüksek oranda farklılaşması sonucu tüm örnekler için PD-1 ve CXCR5 bağımlı T hücrelerin proliferasyonu da incelendiğinde LN örneklerindeki PD-1^+CXCR5^+ ve PD-1^-CXCR5^+ popülasyonların proliferasyonlarının da yüksek olduğu tespit edilmiştir ve PD-

1^+CXCR5^+ popülasyonun proliferatif özelliği literatürdeki çalışmalarda drene lenf nodu örneklerinde BCL6 ve CXCR5 ifadelerinin de artması sonucu $BCL6^+CXCR5^+$ Tfh hücrelerinin yüksek proliferasyon kinetiğine sahip olmasına paralel bir bulgu olarak açıklanabilmektedir (Baumjohann, Okada & Ansel, 2011).

5.4. $CD4^+$ T Hücrelerin Uyarım Sonrası Tfh Fenoitipik Belirteçlerini Bulunduran Hücrelere Farklılaşması Sırasında Erken Aktivasyon Belirteçlerinin Zamana Bağlı Değişimi

Meme kanseri LN, kan ve sağlıklı kontrol kanından elde edilen hücreler ile $CD4^+$ MACS sonrası $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 uyarımından sonra $CD4^+$ T hücre popülasyonlarında PD-1 ve CXCR5 ifadesi ile ilişkili olarak CD154, CD25 ve CD69 erken aktivasyon belirteçlerinin zamana bağlı yüzey ifadelerinin değişiminin analizleri yapıldı.

CD154 yüzey ifadesinde 0, 12 ve 24 sürecinde sağlıklı kan örneklerinde arttığı ancak tüm zaman aralıklarında $CD4^+$ T hücre popülasyonlarından ifade edilen CD154 oranlarının farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Uyarımdan sonraki 24. saatte hasta kanındaki $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerin diğer hedef popülasyonlara kıyasla istatiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek CD154 ifade ettikleri görülmüştür. LN'den elde edilen $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücre popülasyonunun ise 12. saatte diğer hedef hücre popülasyonlara göre anlamlı bir şekilde daha yüksek oranda CD154 ifade ettiği gözlemlenmiştir ve 24. saat sonunda $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ ve $PD\text{-}1^+CXCR5^-$ popülasyonlarındaki CD154 oranlarının diğer popülasyonlara oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak tüm örneklerde PD-1 pozitif hücre popülasyonları ile CD154 ifadesinin uyarım sonucu arttığı saptanmıştır. Bu ilişki de son on yıldır çeşitli kanser ve kronik enfeksiyonlarda $CD4^+$ T hücrelerin antijen ile karşılaşması sonucu erken aktivasyon belirteci olan CD154 (CD40L)'ün ifadesini arttırması ve özellikle B hücre aktivasyonu için Tfh hücreleri ile B hücreler arasındaki CD40:CD40L etkileşiminin gerekliliği ile açıklanabilmektedir (Elgueta ve ark., 2009; Jiang ve ark., 2019).

Sağlıklı kan örneklerinin uyarımdan 12 saat sonra PD-1$^+$ hücre popülasyonlarında PD-1$^-$ hücre popülasyonlarına kıyasla istatiksel olarak yüksek oranda CD25 görülmüştür. Bu popülasyonlardaki istatiksel olarak anlamlı fark 24. saat sonunda da tespit edilmiştir. Hasta kan ve LN örnekleri ile yapılan çalışmada da 24 saat uyarım sonucunda PD-1$^+$CXCR5$^+$ hücre popülasyonunun sadece naif veya çoğalmadığı düşünülen CD4$^+$ T hücre olan PD-1$^-$CXCR5$^-$ (%52,25±20,49) popülasyonuna göre istatiksel olarak anlamlı oranda yüksek CD25 yüzey ifadesine sahip olduğu görülmüştür. Genel olarak, tüm örnekler için CD25'in artışının PD-1 pozitifliği ile ve literatürdeki birçok çalışmada Tfh olarak kabul edilen PD-1$^-$CXCR5$^+$ hücre popülasyonu ile ilişkilendirilmiştir ve elde edilen veriler literatürde daha önce insan sekonder lenfoid organ olan tonsil örnekleri ile yapılan bir çalışmada ile paralelik göstermektedir (Li & Pauza, 2015). Literatürdeki bu çalışmada, CD25 in Treg belirteci olmasına rağmen CXCR5 ve PD-1 ifade eden Tfh hücrelerinde CD25$^+$ ifadesinin görüldüğü ve bunların CD25$^+$PD-1$^+$FoxP3$^-$ hücreler olup bu hücrelerin Treg özelikte olmadığı ve IL-2 varlığında B hücreler ile etkileşiminin desteklendiği göstermiştir.

CD69 yüzey ifadesinin de tüm örneklerdeki CD4$^+$ T hücre popülasyonlarında 0,12 ve 24 saat sürecinde arttığı ve 24 saat sonunda plotaya ulaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca, sağlıklı kan örneklerinin uyarımdan 12 saat sonra; PD-1$^+$CXCR5$^+$ (%87,02±7,63) hücre popülasyonunda PD-1$^-$CXCR5$^-$ (51,07±17,44) hücre popülasyonuna göre istatiksel olarak anlamlı oranda yüksek CD69 görülmüştür. Bu popülasyonlardaki istatiksel olarak anlamlı fark 24 saat sonunda da tespit edilmiştir. Hasta kan örnekleri ile yapılan çalışmada da 24 saat uyarım sonucunda tüm hedef popülasyonlardaki CD69 yüzey ifadelerinin zaman bağlı arttığı gösterilmiştir ancak 24 saat sonunda hedef hücre popülasyonları arasında CD69 ifadesinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. LN örneklerinde de diğer örnek gruplarından farklı olarak uyarımdan önce de CD69 yüzey ifadesinin PD-1$^+$ hücre popülasyonlarında yüksek olup PD-1$^-$ hücre popülasyonlarında daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum da dokularda yerleşik olarak bulunan hücrelerde CD69 ifadesinin arttırılması (Leddon & Sant, 2012; Kumar ve ark., 2017) ile açıklanmaktadır. Ayrıca, bilindiği üzere dolaşımda antijen ile karşılaşan T hücreler THR sinyalleri ve proenflamatuvsr sinyallere maruziyet sonucu CD69 yüzey ifadesini de artırmaktadırlar ve bu hücrelerde

S1P1 ifadesi baskılanarak tekrar sekonder lenfoid yapılara geri dönüp hafıza T hücre fenotipik özelliğindeki hücrelere farklılaşırlar (Shiow ve ark., 2006; Bankovich, Shiow, & Cyster, 2010). Bu bilgiler ışığında LN'de uyarım yokluğunda da özellikle $PD1^+$ T hücrelerde CD69 ifadesinin yüksek görülmesinin sebebi açıklanabilmektedir.

Aynı şekilde uyarımdan 48 saat sonra da $PD\text{-}1^+$ popülasyonlardaki CD69 oranlarının uyarım ile arttığı ve $PD\text{-}1^-$ popülasyonlarından istatiksel olarak anlamlı oranda daha fazla CD69 yüzey ifadesine sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak 24 saat uyarım sonrası $CD4^+$ T hücre gruplarının hepsinin genel olarak tüm örneklerde CD69 yüzey ifadesinin yüksek oranda arttırdığı tespit edilmiştir.

5.5. $CD4^+$ T Hücrelerin Uyarım Sonrası Tfh Hücrelerine Farklılaşması Sırasında İnhibitör Reseptörlerin Zamana Bağlı Değişimi

Meme kanseri LN, kan ve sağlıklı kontrol kanından elde edilen hücreler ile $CD4^+$ MACS sonrası $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 uyarımından sonra $CD4^+$ T hücre popülasyonlarında CTLA-4, LAG-3 ve TIM-3 inhibitör reseptörlerinin zamana bağlı yüzey ifadelerinin değişiminin analizleri yapılmıştır.

Sağlıklı kanda 48 saat uyarım sonrasında $PD\text{-}1^+$ hücre popülasyonlarında $PD\text{-}1^-$ hücre popülasyonlarına oranla daha yüksek CTLA-4 inhibitör reseptör yüzey ifadesi tespit edilmiştir ve 72 saat uyarım sonucunda sağlıklı kanda bu oranın bir miktar azaldığı gözlenmiştir. $PD\text{-}1^+$ hücrelerde CTLA-4 oranın artıp sonradan azalma durumu bu hücrelerin tükenmişliğe gitmesi ile açıklanabilmektedir. Hasta kanından elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin 48 ve 72 saatlik uyarımları sonrası $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücre popülasyonunda diğer popülasyonlara oranla daha yüksek CTLA-4 ifadesi de tespit edilmiştir. LN örneklerinden elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin 72 saat uyarımı sonucunda $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücrelerin bir tek $PD\text{-}1^-CXCR5^-$ hücrelere oranla daha yüksek CTLA-4 ifade ettiği görülmüştür. Sonuç olarak tüm örneklerde genel olarak $PD\text{-}1^+$ hücre popülasyonlarında CTLA-4 oranı da $PD\text{-}1^-$ hücre popülasyonlarına göre daha düşük saptanmıştır. Bu durumda, literatürdeki bilgiler ile sürekli uyarım sonucunda PD-1 inhibitör reseptörünün ifadesinin artırılması gibi CTLA-4 inhibitör reseptörünün de

sürekli uyarıma bağlı arttırıldığı ile açıklanabilir (Sage, Paterson, Lovitch, & Sharpe, 2014). Ayrıca, CTLA-4'ün Tfh hücrelerinde de B hücreler ile etkileşimin kontrolünde görevli olup PD-1 ifadesi ile paralellik gösterdiği ve bu Tfh hücrelerinin regülatör özellikteki olduğu daha önceki literatürdeki çalışmalarda tespit edilmiştir (Sage, Paterson, Lovitch, & Sharpe, 2014). Bu tez çalışmasında da PD-1^{+}CXCR5^{+} hücrelerde düşük oranda da olsa CTLA-4 gözlemlenmesi uyarıma bağlı olarak 72. saat sonunda düşük oranda da olsa Tfh hücrelerinin regülatör özellik kazanmaya başlamış olabileceği şeklinde açıklanabilir ve bunu doğrulamak için de bu hücrelerdeki Treg belirteçlerinden Foxp3 ifade düzeyinin de incelenmesi gerekmektedir.

Sağlıklı kandan elde edilen $CD4^{+}$ T hücrelerin 48 saat uyarım sonrasında PD-1^{+} hücre popülasyonlarında PD-1^{-} hücre popülasyonlarına oranla istatiksel olarak daha yüksek LAG-3 yüzey ifadesi tespit edilmiştir. Ancak, 72 saat uyarım sonucunda sağlıklı kanda tüm hedef hücre popülasyonlarında bu oranların bir miktar azaldığı ve hedef hücre popülasyonları arasında LAG-3 ifadesinde farklılık olmadığı gözlenmiştir. Hasta kanından da hedef hücre popülasyonları incelendiğinde de 72 saatlik uyarım sonrası PD-1^{+}CXCR5^{+} hücrelerin PD-1^{-} hücre popülasyonuna göre anlamlı oranda yüksek LAG-3 yüzey ifadesi tespit edilmiştir. Bu durumda, son on yıllık literatür bilgileri ile tutarlı bir şekilde meme kanseri hastalarının T hücrelerinde LAG-3'ün PD-1 ile ifadesinin artışı ile paralellik göstermesi ile açıklanabilmektedir (Burugu, Gao, Leung, Chia & Nielsen, 2017). LN'de ise hedef popülasyonlarda PD-1^{-}CXCR5^{+} hücre popülasyonun daha hızlı oranda LAG-3 yüzey ifadesini arttırdığı ancak uyarım sonrası hedef popülasyonlar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Ayrıca, 72 saat uyarımından sonra hedef popülasyonlarda LAG-3 yüzey ifadelerinin oranı da örnek grupları arasında farklılık göstermediği ancak tüm örneklerdeki $CD4^{+}$ T hücre popülasyonlarında CTLA-4'e oranla 72 saat sonunda daha yüksek LAG-3 yüzey ifadesinin olduğu tespit edilmiştir.

Sağlıklı kandan elde edilen $CD4^{+}$ T hücrelerin 72 saat uyarımı sonrasında PD-1^{+}CXCR5^{+} ve PD-1^{-}CXCR5^{-} hücreleri arasında istatiksel olarak daha yüksek TIM-3 yüzey ifadesi tespit edilmiştir. Bu durum da beklenildiği üzere PD-1^{-}CXCR5^{-} hücrelerinin kültür koşullarında naif veya çoğalmayan $CD4^{+}$ T hücreler olmasından

kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu örneklerde, PD-1^{+} hedef hücre popülasyonlarında yüksek oranda TIM-3 ifadesi tespit edilmiştir. Hasta kanındaki hedef hücre popülasyonları incelendiğinde ise 48 saatlik uyarım sonrası PD-1^{+}CXCR5^{+} hücre popülasyonunda PD-1^{-} hücre popülasyonuna göre anlamlı oranda yüksek TIM-3 yüzey ifadesi tespit edilmiştir. 72 saatlik uyarım sonrasında ise sadece PD-1^{+}CXCR5^{+} hücrelerde PD-1^{-}CXCR5^{-} hücrelere göre anlamlı oranda yüksek TIM-3 yüzey ifadesi tespit edilmiştir. LN örneklerindeki hedef popülasyonlarda da uyarımdan 48 saat sonra PD-1^{-}CXCR5^{-} hücre popülasyonu hariç diğer tüm hedef popülasyonlarda TIM-3 ifadesinin arttığı gözlenmiştir ve bu artışın 72 saat uyarım sonunda da devam ettiği görülmüştür. Ayrıca, 72 saat uyarımdan sonra hedef popülasyonların TIM-3 yüzey ifadelerinin oranın da örnek grupları arasında farklılık göstermediği ancak tüm örneklerden elde edilen CD4^{+} T hücre popülasyonlarının 72 saat uyarımı sonucunda diğer inhibitör reseptörlere oranla TIM-3 inhibitör reseptörü en yüksek oranda saptanmıştır. Genel olarak bizim çalışmamızda örnek grubu fark etmeksizin uyarım öncesi ve 72 saat sonrası PD-1 pozitifliği görülen hücre popülasyonlarının TIM-3 ifade oranlarının da yüksek saptanması literatür ile paralellik göstermektedir. Literatürdeki çeşitli kanser hastalarının periferik kanlarından elde edilen CD4^{+} T hücrelerde de uyarım olmaksızın PD-1 pozitifliği ile ilişkilendirilen Tfh hücrelerinde yüksek oranda TIM-3 saptanmış ve bu hücrelerin tümör infilitre hücreler olduğu aynı zamanda TIM-3^{-}PD-1^{+} Tfh hücrelerine oranla proliferasyonlarının düşük olduğu ve bu hücre popülasyonunun B hücreler ile ko-kültürleri sonucunda düşük oranda IL-21 ürettikleri, IgM ve IgG antikorların üretiminde bozukluklar saptanmıştır (Li, Ma, Xu & Maerkeya, 2018; Zhu ve ark., 2016;).

5.6. CD4^{+} T Hücrelerin Uyarım Sonrası Tfh Hücrelerine Farklılaşması ve Bu Popülasyonlardaki T Alt Gruplarına Ait Belirteçlerin Analizleri

Sağlıklı kontrol kanından CD4^{+} MACS sonrası izole edilen CD4^{+} T hücrelerin anti-CD3/CD28 boncukları ile uyarımından 72 saat sonra PD-1^{+}CXCR5^{+}, PD-1^{+}CXCR5^{-}, PD-1^{-}CXCR5^{+} ve PD-1^{-}CXCR5^{-} T hücre popülasyonları floresan-aktive hücre ayırma (FACS) yöntemi ile izole edilmiştir. Her bir hedef hücre popülasyonu için T hücre alt gruplarına spesifik moleküllerin mRNA düzeyinde ifade oranları RT-

PZR ile β-aktin geninin ifade oranına göre normalizasyonu sonrası analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda, uyarılan $CD4^+$ T hücrelerde PD-1 ve CXCR5 ifadesine bakılmaksızın diğer moleküllere oranla STAT-1, NFκB moleküllerini mRNA düzeyinde en yüksek oranda ifade ettiği gözlenmiştir. NFκB molekülün tüm popülasyonlarda mRNA düzeyinin artması $CD4^+$ T hücrelerin birincil ve ikincil sinyal yolaklarının aktivasyonu ile ilişkilidir. STAT-1 sinyal yolağının aktivasyonu Th1 hücreleri ile ilişkilendirilir ancak Tfh farklılaşmasında IL-6 ve tip-1 IFN varlığında STAT-1 yolağının aktivasyonunun literatürde pre-Tfh hücreleri olarak adlandırılan erken Tfh hücrelerinde BCL-6 transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu desteklediği görülmüştür (Nakayamada ve ark., 2014; Choi, Eto, Yang, Lao & Crotty, 2013).

$CD4^+$ T hücre popülasyonların yine PD-1 ve CXCR5 ifadesine bakılmaksızın hepsinin STAT-5 ve GATA-3 transkripsiyon faktörlerini de yüksek oranda eksprese ettiği bu çalışmada gözlenmiştir. STAT-5 aktivasyonu sonucu Th2 ilişkili genlerin ifadesinin arttığı ve diğer yardımcı T hücre alt gruplarına dönüşümlerinin baskılandığı bilinmektedir. Buna ek olarak literatürde, *Bcl-6* gen bölgesinde STAT-5'in bağlanma bölgesi olduğu ve bu bağlanma sonucunda *Bcl6* kodlanmasını baskıladığı gösterilmiştir (Ray ve ark., 2014).

Ayrıca, hedef popülasyonlar arasında fark gözetmeksizin Th17, Th9 ve Tfh hücrelerinden üretildiği bilinen IL-21 mRNA ifadesinin de yüksek oranda varlığı tespit edilmiştir. IL-21 ifadesinin aslında $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh hücrelerinde daha yüksek olması beklenirken diğer gruplarda da IL-21 ekspresyonun yüksek olması beklenmedik bir sonuç olmuştur. Bu sonucun, $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh hücreleri harici, Th17 ve Th9 hücrelerinin de IL-21 üretebileceği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücre popülasyonlarından ne kadar IL-21 üretildiğinin doğrulanması için izole edilen hücre popülasyonlarından zamana bağlı PMA/iyonomisin uyarımları sonrası süpernatant toplanarak ELISA yöntemi ile hedef popülasyonlardan üretilen IL-21'in hedef hücre popülasyonları arasında miktarı karşılaştırılabilir.

Tüm bunlara ek olarak, tüm hedef popülasyonlarda Th2 ve Th17 polarizasyonu ile ilişkili STAT-3 mRNA oranı da yüksek oranda tespit edilmiştir ve PD-1^+ hücre popülasyonlarında PD-1^- hücre popülasyonlara oranla daha düşük oranda STAT-3 mRNA miktarı saptanmıştır. Daha önceden yapılan çalışmalarda STAT-1 aktivasyonunun Tfh dönüşümünde erken BCL-6 aktivasyonu ile ilişkilendirilirken IL-6 aracılı Tfh farklılaşmasında STAT-3 sinyal yolaklarının da BCL-6 artışına neden olup Th1 fenotipik özelliği olan IL-2Rα'nın üretimini baskıladığı gösterilmiştir (Choi, Eto, Yang, Lao & Crotty, 2013). Ayrıca, STAT-3'ün STAT-6 ile birlikte BCL-6^+GATA3^+ Tfh hücrelerine farklılaşmada etkili olduğu da bilinmektedir (Mari, Hercor, Denanglaire, Leo, & Andris, 2013).

Çalışmamızda tüm hedef hücre popülasyonlarda Treg ilişkili FoxP3'ün mRNA düzeyinde ifadesi de saptanmıştır ve FoxP3'ün anlamlı oranda olmasa da PD-1^+CXCR5^- ve birçok araştırmada Tfh olarak kabul edilen PD-1^-CXCR5^+ hücre popülasyonunda yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumda PD-1^+CXCR5^- hücrelerde PD-1 ifadesin artması ile bu CD4^+ T hücrelerin tükenmişliğe gidebileceğini veya regülatör özellik kazanmış Treg'ler olabileceklerini düşündürmektedir. PD-1^-CXCR5^+ Tfh olarak ifade edilebilen grupta ise FoxP3 mRNA düzeyinin görülmesi de literatürde yer alan bilgiler ışığında foliküllerde Tfh hücreleri ile B hücrelerin etkileşimini düzenleyen T foliküler regülatör hücrelerin fenotipik özelikleri ile paralellik göstermektedir (Fonseca,, Ribeiro & Graca, 2019).

PD-1^+CXCR5^+ hücre popülasyonunda bu hedef popülasyona has bir şekilde mRNA düzeyinde ifade edilen literatürde de birçok çalışmada kanıtlanmış Tfh ilişkili transkripsiyon faktörü olarak kabul edilen BCL-6'dır. Bizim çalışmamız da bir tek PD-1^+CXCR5^+ hücre popülasyonunda BCL-6 ifadesi tespit edilmiştir ve böylelikle CD4^+ T hücrelerin birincil ve ikincil sinyal yolaklarının aktivasyonu sonucu örnekler periferik kanda bulunsa dahi gerçekten bir bölümünün PD-1^+CXCR5^+ Tfh hücrelerine farklılaşabildiğini gösterilmiştir. Ancak, CD4^+ T hücrelerinin ne kadarının PD-1^+CXCR5^+BCL-6^+ Tfh hücrelerine farklılaştığının belirlenmesi için akım sitometri yardımı ile total popülasyon içerisindeki oranı saptanmalıdır.

Ayrıca, çalışmamızda PD-1^{+}CXCR5^{+}, PD-1^{+}CXCR5^{-} ve PD-1^{-}CXCR5^{+} hücre popülasyonlarında düşük oranda da olsa RORγt ifadesi saptanırken PD-1^{-}CXCR5^{-} hücre popülasyonunda saptanmamıştır. RORγt literatürde Th17 hücrelerine farklılaşma ile ilişkili transkripsiyon belirteci olarak bilinmekle birlikte Th17'lerden farklılaşan Tfh hücre alt gruplarında da varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda, CXCR5^{-} hücre popülasyonunda RORγt ifadesininin CXCR5^{+} hücre popülasyonlarına oranla daha düşük saptanması da literatürde Tfh hücrelerinin farklılaşmasında RORγt transkripsiyon faktörünün CXCR5^{-} hücrelerde düşük oranda görülmesi ile paralellik göstermektedir (Cai ve ark., 2012).

Bunlara ek olarak, tüm hedef popülasyonlarda düşük oranda da olsa popülasyonlar arası anlamlı bir fark görülmeksizin T-bet transkripsiyon faktörünün ifadesi de saptanmıştır ve bunun CD4^{+} T hücrelerin birincil ve ikincil sinyal yolaklarının aktive olması sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir. Ayrıca, T-bet transkripsiyon faktörü IFN–γ üreten Th1 ve IL-17 üreten Th17'ye farklılaşmada etkili transkripsiyon faktörü olarak bilinse de yapılan çalışmalarda Tfh'nin bir alt grubu olarak IL-17 üretebilen Th17'den farklılaşan Tfh hücrelerinin varlığı da gösterilmiş (Burugu, Asleh-Aburaya, & Nielsen, 2017; Hirota ve ark., 2013).

Sonuç olarak sağlıklı kişilerin kanından elde edilen CD4^{+} T hücrelerin bir bölümünün birincil ve ikincil sinyal yolaklarının uyarımı sonucu PD-1^{+}CXCR5^{+} Tfh hücre popülasyonuna farklılaşmasında spesifik olarak BCL6 transkripsiyon faktörünün etkili olduğu ve CD4^{+} T hücrelerinin uyarımı sonrası erken aktivasyon sırasında Th1, Th2, Th17 ve Treg ilişkili transkripsiyon faktörlerinin tüm hedef popülasyonlarda bulunduğu gözlenmiştir.

Sağlıklı kontrol kanından elde edilen bu CD4^{+} T hücrelerin hedef popülasyonlarının ayrıca ne kadar bir diğer Tfh ilişkili belirteç olan ICOS ifade ettiğini gözlemek için de floresan-aktive hücre ayırma (FACS) yöntemi ile hücre popülasyonları izole edildikten sonra sitospin yöntemi ile her popülasyon lamların üzerine aktarılmıştır ve bu hücre popülasyonlarındaki BCL-6 ve ICOS molekülleri ve daha önceki analizlerde Tfh hücrelerinde TIM-3 ifadesinin yüksek çıkması nedeni ile

bir de ek olarak TIM-3 immünfloresan boyaması yapılmıştır. PD-1^{+}CXCR5^{+} hücre popülasyonunda diğer popülasyonlara oranla daha yüksek oranda BCL6, ICOS ve TIM-3 yüzey ifadeleri epi-floresan mikroskopu yardımı ile saptanmıştır. Böylelikle, literatürle paralel bir şekilde (Shi ve ark., 2018) sağlıklı kişilerin kanında bulunan CD4^{+} T hücrelerin de birincil ve ikincil sinyal uyarımları varlığında PD-1^{+}CXCR5^{+}BCL-6^{+}ICOS^{+} Tfh hücrelerine farklılaştıkları saptanmıştır ve bu Tfh hücrelerinin de yüksek oranda TIM-3 yüzey ifadesine sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle, çalışmamız metastatik LN'na sahip kişilerde anti tümör hümoral immün yanıtın indüklenmesinde bu Tfh hücrelerinin hedef alınabileceği ve anti-PD-1 ve anti-TIM-3 kombinasyonel tedavilerinin Tfh hücre gruplarını aktive etmedeki rolüne ışık tutacağı düşünülmektedir.

5.7. Özet Sonuç ve Öneriler

- Sağlıklı ve metastatik meme kanseri hasta PMNH'lerinden ve hasta LN örneklerinden elde edilen hücreler ile fenotipik analizler yapıldığında;
    - CD4^{+} T hücrelerinin tüm örnek grupları içinde LN'de yüksek oranda bulunduğu tespit edilirken CD8^{+} T hücreleri PMNH'ler de tespit edilmiş olup düşük oranda da olsa LN'de de gözlenmiştir.
    - LN'deki CD4^{+} ve CD8^{+} T hücrelerin yüksek oranda PD-1, TIM-3 ve ICOS ifade ettiği tespit edilmiştir.
    - CD4^{+} ve CD8^{+} PD-1^{+}CXCR5^{+} Tfh hücreleri de diğer örnek gruplarına oranla yüksek oranda metastatik meme kanseri LN'sinde bulunduğu tespit edilmiştir ve bu CD4^{+} ve CD8^{+} PD-1^{+}CXCR5^{+} Tfh hücrelerinin;
        - CCR7^{+}CD45RO^{+} fenotipik özellikte oldukları saptanmıştır. Bu durumun da LN'da konumlanıp antijen ile karşılaşmaları sonucu merkezi hafıza özellikteki hücrelere farklılaşmaları sonucu olabileceği düşünülmektedir.
        - Düşük oranda da olsa diğer hedef hücre gruplarına oranla CD127^{+}CD25^{+} hücreler oldukları görülmüştür. Bu durumda IL-7 aracılı çoğaldığını göstermekte olup, merkezi hafıza T hücre

özelliğinde olabilecekleri ve regülatör hücreler olmadıkları tespit edilmiştir.

- PD-1 ve CXCR5 harici bir diğer Tfh belirteci olan ICOS molekülünü de yüksek oranda ifade ettikleri görülmüştür.
- PD-1 harici yüksek oranda de TIM-3 ifade ettikleri tespit edilmiştir.

- Neoadjuvan kullanımı, klinik ve histopatolojik evreler ve Her2 pozitifliği açısından $CD4^+$ T hücrelerde hedef alt hücre grupları arasında hasta kan ve LN örneklerinde oransal fark tespit edilmemiştir. Ancak, $CD8^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücre popülasyonunun LN'de neoadjuvan kullanımı ile azaldığı saptanmıştır. Diğer klinik histopatolojik evreler ve HER2 pozitifliği açısından $CD8^+$ hedef hücre popülasyonları arasında oransal fark bulunmadığı gözlenmiştir. Ancak, n sayısı artırılıp, neadjuvan tedavi, klinik ve histopatolojik evrelere göre hormon reseptör (ER ve PR) ve HER2 ifadelerine bağlı olarak da $BCL6^+ICOS^+TIM\text{-}3^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfh hücrelerinin gruplar arası oransal dağılım analizleri yapılıp, hastalık tanı ve pronozdaki bu Tfh hücrelerinin önemi açıklanabilir.

Tüm bu fenotipik karakterizasyonların sonuçlarına bağlı olarak, metastatik meme kanseri hastaların tedavisini hedef alan ileriki çalışmalarda, IL-7 uyarımı ve anti-TIM-3 inhibitörü kullanılarak $CD4^+$ ve $CD8^+$ Tfh hücrelerinin sağ kalımı arttırılarak anti-kanser hümoral ve sitotoksik immün yanıtların indüklenebileceği düşünülmektedir.

- Metastatik meme kanseri hastalarının LN örneklerinden elde edilen kesitlerden immün floresan boyama ile $CD4^+BCL6^+$ Tfh hücrelerinin ve $CD19^+$ B hücrelerinin LN yapısında konumlanması da incelendiğinde:
  - $CD4^+BCL6^+$ hücrelerinin T:B hücre sınırı bölgesinde ve germinal merkez aydınlık bölgesinde konumlandığı görülüp, bu bölgelerde yer alan $CD19^+$ B hücreler ile etkileşim halinde olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu hücreleri Tfh hücreleri olarak adlandırabilmek için ayrıca

CD4, BCL6, CD19'a ek olarak PD-1 ve CXCR5 immünfloresan boyamaları da yapılabilir.

- Sağlıklı ve metastatik meme kanseri hasta PMNH'lerinden ve hasta LN örneklerinden MACS yöntemi ile izole edilen $CD4^+$ T hücrelerin anti-CD3 ve anti-CD28 boncukları ile uyarımı yapılmıştır. Bu uyarımdan sonra;
    - LN'den elde edilip uyarılan $CD4^+$ T hücrelerin proliferasyon kapasitesinin ve $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ T hücrelere dönüşme kapasitesinin diğer örnek gruplarından elde edilen $CD4^+$ T hücrelere oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.
    - LN'den elde edilen uyarımsız $CD4^+PD\text{-}1^+$ hücrelerin CD69 oranı $PD\text{-}1^-$'lere oranla daha fazla olduğu görülmüştür ve bu durum doku yerleşik hücrelerdeki CD69 ekspresyonun artması ve $CD4^+$ T hücrelerin uyarımları sonucu LN'neye göç edip merkezi hafıza fenotipindeki hücrelere farklılaşmaya başlaması ile açıklanmaktadır. 24 saat uyarım sonrasında da LN örneklerinden elde edilen $CD4^+PD\text{-}1^+$ T hücrelerin CD69 oranının diğer örnek gruplarına göre daha hızlı oranda arttığı tespit edilmiştir.
    - LN ve kan örneklerinden elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin 72 saat uyarımı sonrasında $PD\text{-}1^+$ hücrelerin inhibitör reseptörleri daha erken ve yüksek oranda ifade ettiği tespit edilmiştir ve özellikle TIM-3 ifade oranı en yüksek oranda görülmüştür.

Sonuç olarak tüm örnek gruplarına oranla LN'den elde edilen $CD4^+$ T hücrelerin uyarımından sonra $PD\text{-}1^+CXCR5^+$ hücre popülasyonlarına yüksek oranda farklılaştığı tespit edilmiştir ancak bu hücre popülasyonunun Tfh fonksiyonel özelliğinde olup olmadığını belirlemek için en azında popülasyonlarının izolasyonları sonrası PMA/ionomycin uyarımından süpernatant toplanarak IL-21 ve CXCL13 için ELISA analizileri gerçekleştirilebilir.

- Sağlkıklı kişilerin PMNH'lerinden izole edilen $CD4^+$ T hücrelerin 72 saat uyarımı sonrası FACS ile $PD\text{-}1^{+/-}CXCR5^{+/-}$ hücreleri izole edildiğinde;

- RT-PZR sonuçlarına göre;
  - ✓ PD-1^{+}CXCR5^{+} hücrelerinin spesifik olarak BCL6 mRNA düzeyinde eksprese ettiği, ayrıca Th1 (STAT-1, NFkB, T-bet), Th2 (STAT-5, GATA-3), Th17 (STAT-3, RORgt) ve Treg (Foxp3) ilişkili molekülleri de mRNA düzeyinde ifade ettikleri tespit edilmiştir.
- Sitospin sonrası immün floresan boyama sonuçlarına göre;
  - ✓ PD-1^{+}CXCR5^{+} hücrelerin Tfh hücre belirteçleri olan BCL-6 ve ICOS'u yüksek oranda ifade ettikleri tespit edilmiştir ve yüksek oranda PD-1 pozitifliğine bağlı olarak TIM-3 de eksprese ettikleri doğrulanmıştır.

Bu durumda da, sağlıklı kişilerin kanından elde edilen ve uyarılan CD4^{+} hücrelerinin CD4^{+}PD-1^{+}CXCR5^{+}BCL-6^{+}ICOS^{+}TIM-3^{+} Tfh hücrelere farklılaştığı gözlendi. Ancak, sağlıklı kan örnekleri gibi hasta kan ve LN örneklerinde de elde edilen CD4^{+} T hücrelerinin uyarımı ve sonrasında PD-1$^{+/-}$CXCR5$^{+/-}$ popülasyonlarının izolasyonları sonrası RT-PZR ve immünfloresan boyamaları da ek olarak yapılıp özellikle LN'den elde edilen CD4^{+} T hücrelerin Tfh hücrelerine farklılaşma kapasitesi analiz edilmelidir.

6. KAYNAKLAR

Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2017). Cellular and Moleceular Immunology (9th ed.). Elsevier

Abdulrahman, G. O., & Rahman, G. A. (2012). Epidemiology of breast cancer in europe and Africa. *Journal of cancer epidemiology*, *2012*, 915610. https://doi.org/10.1155/2012/915610

Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., … Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, *114*(8), 1537–1544. https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792

Aldrees, R., Gao, X., Zhang, K., Siegal, G. P., & Wei, S. (2021). Validation of the revised 8th AJCC breast cancer clinical prognostic staging system: analysis of 5321 cases from a single institution. *Modern Pathology*, *34*(2), 291–299. https://doi.org/10.1038/s41379-020-00650-4

Baitsch, L., Legat, A., Barba, L., Fuertes Marraco, S. A., Rivals, J. P., Baumgaertner, … Speiser, D. E. (2012). Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PloS one*, *7*(2), e30852. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030852

Bankovich, A. J., Shiow, L. R., & Cyster, J. G. (2010). CD69 suppresses sphingosine 1-phosophate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. The Journal of biological chemistry, 285(29), 22328–22337. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123299

Bates, J. P., Derakhshandeh, R., Jones, L., & Webb, T. J. (2018). Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC cancer*, *18*(1), 556. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4441-3

Baumjohann, D., Okada, T., & Ansel, K. M. (2011). Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 187(5), 2089–2092. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101393

Bentebibel, S. E., Lopez, S., Obermoser, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., … Ueno, H. (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells

correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Science translational medicine*, *5*(176), 176ra32. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005191

Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A. C., … Galon, J. (2013). Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*, *39*(4), 782–795. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.003

Borst, J., Coligan, J. E., Oettgen, H., Pessano, S., Malin, R., & Terhorst, C. (1984). The delta- and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature*, *312*(5993), 455–458. https://doi.org/10.1038/312455a0

Brownlie, R. J., & Zamoyska, R. (2013). T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nature reviews. Immunology*, *13*(4), 257–269. https://doi.org/10.1038/nri3403

Brucklacher-Waldert, V., Ferreira, C., Innocentin, S., Kamdar, S., Withers, D. R., Kullberg, M. C., & Veldhoen, M. (2016). Tbet or Continued RORγt Expression Is Not Required for Th17-Associated Immunopathology. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 196(12), 4893–4904. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600137

Burugu, S., Asleh-Aburaya, K., & Nielsen, T. O. (2017). Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, *24*(1), 3–15. https://doi.org/10.1007/s12282-016-0698-z

Burugu, S., Gao, D., Leung, S., Chia, S. K., & Nielsen, T. O. (2017). LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 28(12), 2977–2984. https://doi.org/10.1093/annonc/mdx557

Cai, G., Nie, X., Zhang, W., Wu, B., Lin, J., Wang, H., Jiang, C., & Shen, Q. (2012). A regulatory role for IL-10 receptor signaling in development and B cell help of T follicular helper cells in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *189*(3), 1294–1302. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102948

Castle, B. E., Kishimoto, K., Stearns, C., Brown, M. L., & Kehry, M. R. (1993). Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *151*(4), 1777–1788.

Chen, T., Guo, J., Cai, Z., Li, B., Sun, L., Shen, Y., … Ye, Z. (2020). Th9 Cell Differentiation and Its Dual Effects in Tumor Development. *Frontiers in immunology*, *11*, 1026. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01026

Chen, Y., Yu, M., Zheng, Y., Fu, G., Xin, G., Zhu, W., … Wang, D. (2019). CXCR5+PD-1+ follicular helper CD8 T cells control B cell tolerance. Nature communications, 10(1), 4415. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12446-5

Choi, Y. S., Eto, D., Yang, J. A., Lao, C., & Crotty, S. (2013). Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 190(7), 3049–3053. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203032

Choi, Y. S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T. C., Johnston, R. J., Monticelli, L., … Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity*, *34*(6), 932–946. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.023

Coussens, L. M., & Pollard, J. W. (2011). Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *3*(3), a003285. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003285

Crotty S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*, *41*(4), 529–542. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004

Cubas, R. A., Mudd, J. C., Savoye, A. L., Perreau, M., van Grevenynghe, J., Metcalf, T., … Haddad, E. K. (2013). Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nature medicine*, *19*(4), 494–499. https://doi.org/10.1038/nm.3109

Cyster J. G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annual review of immunology*, *23*, 127–159. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115628

Cyster, J. G., & Schwab, S. R. (2012). Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annual review of immunology*, *30*, 69–94. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075011

Davidson, D., Schraven, B., & Veillette, A. (2007). PAG-associated FynT regulates calcium signaling and promotes anergy in T lymphocytes. *Molecular and cellular biology*, *27*(5), 1960–1973. https://doi.org/10.1128/MCB.01983-06

de la Fuente, H., Cruz-Adalia, A., Martinez Del Hoyo, G., Cibrián-Vera, D., Bonay, … Sánchez-Madrid, F. (2014). The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. *Molecular and cellular biology*, *34*(13), 2479–2487. https://doi.org/10.1128/MCB.00348-14

Deenick, E. K., & Ma, C. S. (2011). The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology*, *134*(4), 361–367. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03487.x

DeNardo, D. G., Barreto, J. B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., … Coussens, L. M. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer cell*, *16*(2), 91–102. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.018

DeSantis, C. E., Ma, J., Goding Sauer, A., Newman, L. A., & Jemal, A. (2017). Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *67*(6), 439–448. https://doi.org/10.3322/caac.21412

DiToro, D., Winstead, C. J., Pham, D., Witte, S., Andargachew, R., Singer, J. R., … Weaver, C. T. (2018). Differential IL-2 expression defines developmental fates of follicular versus nonfollicular helper T cells. *Science (New York, N.Y.)*, *361*(6407), eaao2933. https://doi.org/10.1126/science.aao2933

Duan, Z., Chen, X., Liang, Z., Zeng, Y., Zhu, F., Long, L., … Lu, F. (2014). Genetic polymorphisms of CXCR5 and CXCL13 are associated with non-responsiveness to the hepatitis B vaccine. *Vaccine*, *32*(41), 5316–5322. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.064

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology*, *10*(8), 857–863. https://doi.org/10.1038/ni.1767

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, *3*(11), 991–998. https://doi.org/10.1038/ni1102-991

Edechi, C. A., Ikeogu, N., Uzonna, J. E., & Myal, Y. (2019). Regulation of immunity in breast cancer. *Cancers*, *11*(8), 1–18. https://doi.org/10.3390/cancers11081080

Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., & Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Immunological reviews, 229(1), 152–172. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x

Emens, L. A. (2012). Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *12*(12), 1597–1611. https://doi.org/10.1586/era.12.147

Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., … Cavani, A. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of clinical investigation*, *119*(12), 3573–3585. https://doi.org/10.1172/JCI40202

Faghih, Z., Erfani, N., Haghshenas, M. R., Safaei, A., Talei, A. R., & Ghaderi, A. (2014). Immune profiles of CD4+ lymphocyte subsets in breast cancer tumor draining lymph nodes. *Immunology letters*, *158*(1-2), 57–65. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.11.021

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., … Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and Diseases*, *5*(2), 77–106. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001

Flynn, M. J., & Hartley, J. A. (2017). The emerging role of anti-CD25 directed therapies as both immune modulators and targeted agents in cancer. *British journal of haematology*, *179*(1), 20–35. https://doi.org/10.1111/bjh.14770

Fonseca, V. R., Ribeiro, F., & Graca, L. (2019). T follicular regulatory (Tfr) cells: Dissecting the complexity of Tfr-cell compartments. Immunological reviews, 288(1), 112–127. https://doi.org/10.1111/imr.12739

Förster, R., Davalos-Misslitz, A. C., & Rot, A. (2008). CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature reviews. Immunology*, *8*(5), 362–371. https://doi.org/10.1038/nri2297

Geltink, R., Kyle, R. L., & Pearce, E. L. (2018). Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annual review of immunology*, *36*, 461–488. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053019

Ghoncheh, M., Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2016). Epidemiology, Incidence and Mortality of Breast Cancer in Asia. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, *17*(S3), 47–52. https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.s3.47

Girard, J. P., Moussion, C., & Förster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nature reviews. Immunology*, *12*(11), 762–773. https://doi.org/10.1038/nri3298

GLOBOCAN 2020. Erişim aderesi: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf Erişim tarihi: 27 Mart 2021

Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., … Ménétrier-Caux, C. (2009). Regulatory T Cells Recruited through CCL22/CCR4 Are Selectively Activated in Lymphoid Infiltrates Surrounding Primary Breast Tumors and Lead to an Adverse Clinical Outcome. *Cancer Research*, *69*(5), 2000 LP – 2009. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2360

Goenka, S., & Kaplan, M. H. (2011). Transcriptional regulation by STAT6. *Immunologic research*, *50*(1), 87–96. https://doi.org/10.1007/s12026-011-8205-2

Gong, F., Zheng, T., & Zhou, P. (2019). T Follicular Helper Cell Subsets and the Associated Cytokine IL-21 in the Pathogenesis and Therapy of Asthma. Frontiers in immunology, 10, 2918. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02918

González-Amaro, R., Cortés, J. R., Sánchez-Madrid, F., & Martín, P. (2013). Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?. *Trends in molecular medicine*, *19*(10), 625–632. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.07.00

Gooch, J. L., Christy, B., & Yee, D. (2002). STAT6 mediates interleukin-4 growth inhibition in human breast cancer cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *4*(4), 324–331. https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900248

Groom J. R. (2019). Regulators of T-cell fate: Integration of cell migration, differentiation and function. *Immunological reviews*, *289*(1), 101–114. https://doi.org/10.1111/imr.12742

Gu-Trantien, C., & Willard-Gallo, K. (2017). PD-1^{hi}CXCR5^{-} CD4^{+} T_{FH} Cells Play Defense in Cancer and Offense in Arthritis. *Trends in immunology*, *38*(12), 875–878. https://doi.org/10.1016/j.it.2017.10.003

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, … Willard-Gallo K. (2013). CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *The Journal of Clinical Investigation*, 123, 2878-2892. https://doi.org/10.1172/jci67428.

Gu-Trantien, C., Migliori, E., Buisseret, L., de Wind, A., Brohée, S., Garaud, S., … Willard-Gallo, K. (2017). CXCL13-producing TFH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer. *JCI insight*, *2*(11), e91487. https://doi.org/10.1172/jci.insight.91487

Hansen, M. H., Nielsen, H. V, & Ditzel, H. J. (2002). Translocation of an Intracellular Antigen to the Surface of Medullary Breast Cancer Cells Early in Apoptosis Allows for an Antigen-Driven Antibody Response Elicited by Tumor-Infiltrating B Cells. *The Journal of Immunology*, *169*(5), 2701 LP – 2711. https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2701

Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A., & Davis, M. M. (1984). Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*, *308*(5955), 149–153. https://doi.org/10.1038/308149a0

Heeren, A. M., Rotman, J., Stam, A., Pocorni, N., Gassama, A. A., Samuels, S., … Gruijl, T. D. (2019). Efficacy of PD-1 blockade in cervical cancer is related to a CD8+FoxP3+CD25+ T-cell subset with operational effector

functions despite high immune checkpoint levels. Journal for immunotherapy of cancer, 7(1), 43. https://doi.org/10.1186/s40425-019-0526-z

Hirota, K., Turner, J. E., Villa, M., Duarte, J. H., Demengeot, J., Steinmetz, O. M., & Stockinger, B. (2013). Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. Nature immunology, 14(4), 372–379. https://doi.org/10.1038/ni.2552

Horii, M., & Matsushita, T. (2021). Regulatory B cells and T cell Regulation in Cancer. *Journal of Molecular Biology*, *433*(1), 166685. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.10.019

Hortobagyi, G., Connolly J.L., D'Orsi, C.J., Edge S.B., Mittendorf E.A., Rugo H.S., … Giuliano A. (2018). AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition (pp. 589-636). *The American College of Surgeons (ACS)*

Huang, Y. H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A. C., Gandhi, A., Russell, A., … Blumberg, R. S. (2015). CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature*, *517*(7534), 386–390. https://doi.org/10.1038/nature13848

Huebner, R. J., & Ewald, A. J. (2014). Cellular foundations of mammary tubulogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, *31*, 124–131. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.019

Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D., & Bissell, M. J. (2015). Mammary gland development: Cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development (Cambridge)*, *142*(6), 1028–1042. https://doi.org/10.1242/dev.087643

Jiang, W., Wragg, K. M., Tan, H. X., Kelly, H. G., Wheatley, A. K., Kent, S. J., & Juno, J. A. (2019). Identification of murine antigen-specific T follicular helper cells using an activation-induced marker assay. Journal of immunological methods, 467, 48–57. https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.02.008

Kagami , S., Nakajima, H., Suto, A., Hirose, K., Suzuki, K., Morita, S., … Iwamoto, I. (2001). Stat5a regulates T helper cell differentiation by several distinct mechanisms. *Blood*, *97*(8), 2358–2365. https://doi.org/10.1182/blood.v97.8.2358

Kalli, S., Semine, A., Cohen, S., Naber, S. P., Makim, S. S., & Bahl, M. (2018). American joint committee on cancer's staging system for breast cancer, eighth edition: What the radiologist needs to know. *Radiographics*, *38*(7), 1921–1933. https://doi.org/10.1148/rg.2018180056

Katz, S. G., & Rabinovich, P. M. (2020). T Cell Reprogramming Against Cancer. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *2097*, 3–44. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0203-4_1

Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., … & Kikutani, H. (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, *1*(3), 167–178. https://doi.org/10.1016/1074-

Khayyamian, S., Hutloff, A., Büchner, K., Gräfe, M., Henn, V., Kroczek, R. A., … Mages, H. W. (2002). ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(9), 6198–6203. https://doi.org/10.1073/pnas.092576699

Kiener, P. A., Moran-Davis, P., Rankin, B. M., Wahl, A. F., Aruffo, A., & Hollenbaugh, D. (1995). Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *155*(10), 4917–4925.

Koh, J., & Kim, M. J. (2019). Introduction of a new staging system of breast cancer for radiologists: An emphasis on the prognostic stage. *Korean Journal of Radiology*, *20*(1), 69–82. https://doi.org/10.3348/kjr.2018.0231

Kolumam, G. A., Thomas, S., Thompson, L. J., Sprent, J., & Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *The Journal of experimental medicine*, *202*(5), 637–650. https://doi.org/10.1084/jem.20050821

Kouo, T., Huang, L., Pucsek, A. B., Cao, M., Solt, S., Armstrong, T., … Jaffee, E. (2015). Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer immunology research*, *3*(4), 412–423. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0150

Kuang, D. M., Xiao, X., Zhao, Q., Chen, M. M., Li, X. F., Liu, … Zheng, L. (2014). B7-H1-expressing antigen-presenting cells mediate polarization of protumorigenic Th22 subsets. *The Journal of clinical investigation*, *124*(10), 4657–4667. https://doi.org/10.1172/JCI74381

Kumar, B. V., Ma, W., Miron, M., Granot, T., Guyer, R. S., Carpenter, D. J., Senda, T., Sun, X., Ho, S. H., Lerner, H., Friedman, A. L., Shen, Y., & Farber, D. L. (2017). Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. Cell reports, 20(12), 2921–2934. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.078

Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., … O'shea, J. J. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, *26*(3), 371–381. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.009

Leddon, S. A., & Sant, A. J. (2012). The peptide specificity of the endogenous T follicular helper cell repertoire generated after protein immunization. PloS one, 7(10), e46952. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046952

Li, H., & Pauza, C. D. (2015). CD25(+) Bcl6(low) T follicular helper cells provide help to maturing B cells in germinal centers of human tonsil. European journal of immunology, 45(1), 298–308. https://doi.org/10.1002/eji.201444911

Li, L., Ma, Y., Xu, Y., & Maerkeya, K. (2018). TIM-3 expression identifies a distinctive PD-1+ follicular helper T cell subset, with reduced interleukin 21 production and B cell help function in ovarian cancer patients. International immunopharmacology, 57, 139–146. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.02.016

Li, Q., Teitz-Tennenbaum, S., Donald, E. J., Li, M., & Chang, A. E. (2009). In vivo sensitized and in vitro activated B cells mediate tumor regression in cancer adoptive immunotherapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(5), 3195–3203. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803773

Liudahl, S. M., & Coussens, L. (2017). To Help or To Harm: Dynamic Roles of CD4+ T Helper Cells in Solid Tumor Microenvironments. In Immunology: Immunotoxicology, Immunopathology, and Immunotherapy (Vol. 1, pp. 97-116). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809819-6.00008-3

Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., …Sotiriou, C. (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 31(7), 860–867. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0902

Löfdahl, B., Ahlin, C., Holmqvist, M., Holmberg, L., Zhou, W., Fjällskog, … Amini, R. M. (2012). Inflammatory cells in node-negative breast cancer. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, *51*(5), 680–686. https://doi.org/10.3109/0284186X.2011.652737

Luther, S. A., Bidgol, A., Hargreaves, D. C., Schmidt, A., Xu, Y., Paniyadi, J., … Cyster, J. G. (2002). Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *169*(1), 424–433. https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.424

Macias, H. and Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *WIREs Dev Biol*, 1: 533-557. https://doi.org/10.1002/wdev.35

Mamessier, E., Sylvain, A., Thibult, M. L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., … Olive, D. (2011). Human breast cancer cells enhance self

tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *The Journal of clinical investigation*, *121*(9), 3609–3622. https://doi.org/10.1172/JCI45816

Mao, Y., Qu, Q., Chen, X., Huang, O., Wu, J., & Shen, K. (2016). The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*, *11*(4), e0152500. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152500

Mari, N., Hercor, M., Denanglaire, S., Leo, O., & Andris, F. (2013). The capacity of Th2 lymphocytes to deliver B-cell help requires expression of the transcription factor STAT3. European journal of immunology, 43(6), 1489–1498. https://doi.org/10.1002/eji.201242938

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L., & Lefrançois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science (New York, N.Y.)*, *291*(5512), 2413–2417. https://doi.org/10.1126/science.1058867

Mattes, J., Hulett, M., Xie, W., Hogan, S., Rothenberg, M. E., Foster, P., … Parish, C. (2003). Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *The Journal of experimental medicine*, *197*(3), 387–393. https://doi.org/10.1084/jem.20021683

Meng, X., Yu, X., Dong, Q., Xu, X., Li, J., Xu, Q., … Zhou, C. (2018). Distribution of circulating follicular helper T cells and expression of interleukin-21 and chemokine C-X-C ligand 13 in gastric cancer. *Oncology letters*, *16*(3), 3917–3922. https://doi.org/10.3892/ol.2018.9112

Mescher, M. F., Curtsinger, J. M., Agarwal, P., Casey, K. A., Gerner, M., Hammerbeck, C. D., Popescu, F., & Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunological reviews*, *211*, 81–92. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x

Mesturini, R., Gigliotti, C. L., Orilieri, E., Cappellano, G., Soluri, M. F., Boggio, E., … Dianzani, U. (2013). Differential induction of IL-17, IL-10, and IL-9 in human T helper cells by B7h and B7.1. *Cytokine*, *64*(1), 322–330. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.05.021

Miller, K. D., Nogueira, L., Mariotto, A. B., Rowland, J. H., Yabroff, K. R., Alfano, C. M., … Siegel, R. L. (2019). Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *69*(5), 363–385. https://doi.org/10.3322/caac.21565

Miyasaka, M., & Tanaka, T. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature reviews. Immunology*, *4*(5), 360–370. https://doi.org/10.1038/nri1354

Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, *11*, 151–164. https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070

Murphy, K., & Weaver, C. (2016). Janeway's Immunobiology (9th ed.). W.W. Norton & Company. https://doi.org/10.1201/9781315533247

Nagai, S., & Toi, M. (2000). Interleukin-4 and breast cancer. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, *7*(3), 181–186. https://doi.org/10.1007/BF02967457

Nakayamada, S., Poholek, A. C., Lu, K. T., Takahashi, H., Kato, M., Iwata, S., Hirahara, K., Cannons, J. L., Schwartzberg, P. L., Vahedi, G., Sun, H. W., Kanno, Y., & O'Shea, J. J. (2014). Type I IFN induces binding of STAT1 to Bcl6: divergent roles of STAT family transcription factors in the T follicular helper cell genetic program. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 192(5), 2156–2166. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300675

Nguyen, L. T., & Ohashi, P. S. (2015). Clinical blockade of PD-1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nature reviews. Immunology*, *15*(1), 45–56. https://doi.org/10.1038/nri3790

Oestreich, K. J., Huang, A. C., & Weinmann, A. S. (2011). The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *The Journal of experimental medicine*, *208*(5), 1001–1013. https://doi.org/10.1084/jem.20102144

Ouyang, W., Kolls, J. K., & Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, *28*(4), 454–467. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004

Ouyang, W., Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., … Murphy, K. M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*, *9*(5), 745–755. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80671-8

Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Hata, K., Fukai, F., Matsui, … Yoshimoto, T. (2005). A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(4), 2191–2200. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2191

Pepper, M., Pagán, A. J., Igyártó, B. Z., Taylor, J. J., & Jenkins, M. K. (2011). Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity*, *35*(4), 583–595. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.009

Polyak, K. (2007). Science in medicine Breast cancer : origins and evolution. *Cell*, *117*(11), 3155–3163. https://doi.org/10.1172/JCI33295.group

Purwar, R., Schlapbach, C., Xiao, S., Kang, H. S., Elyaman, W., Jiang, X., … Kupper, T. S. (2012). Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nature medicine*, *18*(8), 1248–1253. https://doi.org/10.1038/nm.2856

Quigley, M. F., Gonzalez, V. D., Granath, A., Andersson, J., & Sandberg, J. K. (2007). CXCR5+ CCR7- CD8 T cells are early effector memory cells that infiltrate tonsil B cell follicles. European journal of immunology, 37(12), 3352–3362. https://doi.org/10.1002/eji.200636746

Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., … Sansom, D. M. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6029), 600–603. https://doi.org/10.1126/science.1202947

Ray, J. P., Marshall, H. D., Laidlaw, B. J., Staron, M. M., Kaech, S. M., & Craft, J. (2014). Transcription factor STAT3 and type I interferons are corepressive insulators for differentiation of follicular helper and T helper 1 cells. *Immunity*, *40*(3), 367–377. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.005

Riazi Rad, F., Ajdary, S., Omranipour, R., Alimohammadian, M. H., & Hassan, Z. M. (2015). Comparative analysis of CD4+ and CD8+ T cells in tumor tissues, lymph nodes and the peripheral blood from patients with breast cancer. Iranian biomedical journal, 19(1), 35–44. https://doi.org/10.6091/ibj.1289.2014

Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical obstetrics and gynecology*, *59*(4), 651–672. https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239

Rosenblum, M. D., Way, S. S., & Abbas, A. K. (2016). Regulatory T cell memory. *Nature reviews. Immunology*, *16*(2), 90–101. https://doi.org/10.1038/nri.2015.1

Rousset, F., Garcia, E., & Banchereau, J. (1991). Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *The Journal of experimental medicine*, *173*(3), 705–710. https://doi.org/10.1084/jem.173.3.705

Rudd, C. E., Taylor, A., & Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews*, *229*(1), 12–26. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x

Sage, P. T., Paterson, A. M., Lovitch, S. B., & Sharpe, A. H. (2014). The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. Immunity, 41(6), 1026–1039. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.005

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, *401*(6754), 708–712. https://doi.org/10.1038/44385

Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P., & Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of experimental medicine*, *192*(11), 1553–1562. https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1553

Sehra, S., Yao, W., Nguyen, E. T., Glosson-Byers, N. L., Akhtar, N., Zhou, B., … Kaplan, M. H. (2015). TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *136*(2), 433–40.e1. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.021

Shariati, S., Ghods, A., Zohouri, M., Rasolmali, R., Talei, A. R., Mehdipour, F., & Ghaderi, A. (2020). Significance of TIM-3 expression by CD4+ and CD8+ T lymphocytes in tumor-draining lymph nodes from patients with breast cancer. Molecular immunology, 128, 47–54. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.10.002

Sharpe, A. H., & Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nature reviews. Immunology*, *2*(2), 116–126. https://doi.org/10.1038/nri727

Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., & Freeman, G. J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature immunology*, *8*(3), 239–245. https://doi.org/10.1038/ni1443

Shen, M., Wang, J., & Ren, X. (2018). New Insights into Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Breast Cancer: Clinical Impacts and Regulatory Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, *9*, 470. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00470

Shi, J., Hou, S., Fang, Q., Liu, X., Liu, X., & Qi, H. (2018). PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. *Immunity*, *49*(2), 264–274.e4. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.012

Shi, W., Dong, L., Sun, Q., Ding, H., Meng, J., & Dai, G. (2018). Follicular helper T cells promote the effector functions of CD8+ T cells via the provision of IL-21, which is downregulated due to PD-1/PD-L1-mediated suppression in colorectal cancer. Experimental cell research, 372(1), 35–42. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.09.006

Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdicková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., … Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. Nature, 440(7083), 540–544. https://doi.org/10.1038/nature04606

Slomovitz, B. M., & Coleman, R. L. (2012). The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clinical cancer research :*

an official journal of the American Association for Cancer Research, *18*(21), 5856–5864. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0662

Song, H., Liu, A., Liu, G., Wu, F., & Li, Z. (2019). T follicular regulatory cells suppress Tfh-mediated B cell help and synergistically increase IL-10-producing B cells in breast carcinoma. *Immunologic research*, *67*(4-5), 416–423. https://doi.org/10.1007/s12026-019-09090-y

Song, W., & Craft, J. (2019). T follicular helper cell heterogeneity: Time, space, and function. *Immunological reviews*, *288*(1), 85–96. https://doi.org/10.1111/imr.12740

Stanton, S. E., Adams, S., & Disis, M. L. (2016). Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. JAMA oncology, 2(10), 1354–1360. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1061

Staron, M. M., Gray, S. M., Marshall, H. D., Parish, I. A., Chen, J. H., Perry, C. J., … Kaech, S. M. (2014). The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection. *Immunity*, *41*(5), 802–814.

Surh, C. D., Boyman, O., Purton, J. F., & Sprent, J. (2006). Homeostasis of memory T cells. *Immunological reviews*, *211*, 154–163. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00401.x

Swallow, M. M., Wallin, J. J., & Sha, W. C. (1999). B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity*, *11*(4), 423–432. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80117-x

Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, *100*(6), 655–669. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80702-3

Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., … Akira, S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity*, *8*(3), 383–390. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80543-9

Tanaka, S., Motomura, Y., Suzuki, Y., Yagi, R., Inoue, H., Miyatake, S., … Kubo, M. (2011). The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated Il4 transcription in T(H)2 cells. *Nature immunology*, *12*(1), 77–85. https://doi.org/10.1038/ni.1966

Tang, Y., Jiang, Q., Ou, Y., Zhang, F., Qing, K., Sun, Y., … Shen, G. (2016). BIP induces mice CD19(hi) regulatory B cells producing IL-10 and highly

expressing PD-L1, FasL. *Molecular immunology*, *69*, 44–51. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.10.017

Teft, W. A., Kirchhof, M. G., & Madrenas, J. (2006). A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annual review of immunology*, *24*, 65–97. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090535

Tepper, R. I., Coffman, R. L., & Leder, P. (1992). An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science (New York, N.Y.)*, *257*(5069), 548–551. https://doi.org/10.1126/science.1636093

Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., & Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology*, *10*(8), 864–871. https://doi.org/10.1038/ni.1770

Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., & Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity*, *18*(3), 415–428. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00057-8

Usui, T., Preiss, J. C., Kanno, Y., Yao, Z. J., Bream, J. H., O'Shea, J. J., … Strober, W. (2006). T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *The Journal of experimental medicine*, *203*(3), 755–766. https://doi.org/10.1084/jem.20052165

Vahidi, Y., Bagheri, M., Ghaderi, A., & Faghih, Z. (2020). CD8-positive memory T cells in tumor-draining lymph nodes of patients with breast cancer. BMC cancer, 20(1), 257. https://doi.org/10.1186/s12885-020-6714-x

van de Weyer, P. S., Muehlfeit, M., Klose, C., Bonventre, J. V., Walz, G., & Kuehn, E. W. (2006). A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochemical and biophysical research communications*, *351*(2), 571–576. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.079

Van Kooten, C., & Banchereau, J. (1996). CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Advances in immunology*, *61*, 1–77. https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60865-2

Van Pul, K. M., Vuylsteke, R., van de Ven, R., Te Velde, E. A., Rutgers, E., van den Tol, P. M., … Gruijl, T. D. (2019). Selectively hampered activation of lymph node-resident dendritic cells precedes profound T cell suppression and metastatic spread in the breast cancer sentinel lymph node. Journal for immunotherapy of cancer, 7(1), 133. https://doi.org/10.1186/s40425-019-0605-1

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J.,… Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms'

the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology*, *9*(12), 1341–1346. https://doi.org/10.1038/ni.1659

Vella, L. A., Buggert, M., Manne, S., Herati, R. S., Sayin, I., Kuri-Cervantes, L., … Wherry, E. J. (2019). T follicular helper cells in human efferent lymph retain lymphoid characteristics. The Journal of clinical investigation, 129(8), 3185–3200. https://doi.org/10.1172/JCI125628

von Andrian, U. H., & Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature reviews. Immunology*, *3*(11), 867–878. https://doi.org/10.1038/nri1222

Wang, J., Sanmamed, M. F., Datar, I., Su, T. T., Ji, L., Sun, J., … Chen, L. (2019). Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3. *Cell*, *176*(1-2), 334–347.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.010

Wikenheiser, D. J., & Stumhofer, J. S. (2016). ICOS Co-Stimulation: Friend or Foe?. *Frontiers in immunology*, *7*, 304. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00304

Workman, C. J., & Vignali, D. A. (2003). The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. *European journal of immunology*, *33*(4), 970–979. https://doi.org/10.1002/eji.200323382

Workman, C. J., Dugger, K. J., & Vignali, D. A. (2002). Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *169*(10), 5392–5395. https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5392

Workman, C. J., Rice, D. S., Dugger, K. J., Kurschner, C., & Vignali, D. A. (2002). Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *European journal of immunology*, *32*(8), 2255–2263. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200208)32:8<2255::AID-IMMU2255>3.0.CO;2-A

Xia, Y., Tao, H., Hu, Y., Chen, Q., Chen, X., Xia, L., … Chang, A. E. (2016). IL-2 augments the therapeutic efficacy of adoptively transferred B cells which directly kill tumor cells via the CXCR4/CXCL12 and perforin pathways. *Oncotarget*, *7*(37), 60461–60474. https://doi.org/10.18632/oncotarget.11124

Xing, J., Zhang, C., Yang, X., Wang, S., Wang, Z., Li, X., & Yu, E. (2017). CXCR5+CD8+ T cells infiltrate the colorectal tumors and nearby lymph nodes, and are associated with enhanced IgG response in B cells. Experimental cell research, 356(1), 57–63. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.04.014

Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S., … Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated

generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of biological chemistry*, *282*(13), 9358–9363. https://doi.org/10.1074/jbc.C600321200

Ylikoski, E., Lund, R., Kyläniemi, M., Filén, S., Kilpeläinen, M., Savolainen, J., … Lahesmaa, R. (2005). IL-12 up-regulates T-bet independently of IFN-gamma in human CD4+ T cells. *European journal of immunology*, *35*(11), 3297–3306. https://doi.org/10.1002/eji.200526101

Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., & Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *The Journal of experimental medicine*, *209*(6), 1201–1217. https://doi.org/10.1084/jem.20112741

Youlden, D. R., Cramb, S. M., Yip, C. H., & Baade, P. D. (2014). Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region. *Cancer Biology and Medicine*, *11*(2), 101–115. https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.02.005

Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Trible, R. P., & Samelson, L. E. (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*, *92*(1), 83–92. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80901-0

Zhao, R., Song, Y., Wang, Y., Huang, Y., Li, Z., Cui, Y., … Zhou, Y. (2019). PD-1/PD-L1 blockade rescue exhausted CD8+ T cells in gastrointestinal stromal tumours via the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Cell proliferation*, *52*(3), e12571. https://doi.org/10.1111/cpr.12571

Zhu, S., Lin, J., Qiao, G., Wang, X., & Xu, Y. (2016). Tim-3 identifies exhausted follicular helper T cells in breast cancer patients. Immunobiology, 221(9), 986–993. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.04.005

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

AJCC: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
AP-1: Activator Protein 1
ASR: Yaş-Standardize Oran
BATA3: HLA-B-İlişkili Transkript 3
BCL-6: B-hücre Lenfoma 6 Protein
Breg: Regülatör B Hücre
BTLA: B ve T Lenfosit Zayıflatıcı Protein
CCL1: Kemokin Ligand 1
CCL21: Kemokin Ligand 21
CCR7: CC- Kemokin reseptör 7
CCR8: CC- Kemokin Reseptör 8
CD62L: 6-sülfo Sialyl Lewis X Motiflerine L-selektin
CEACAM1: Karsinoembriyonik Antijen İlişkili Adezyon Molekülü 1
CFSE: Karboksifloresein Süksinimidil ester
CTL: Sitotoksik T Lenfosit
CTLA-4: Sitotoksik T Lenfosit-ilişkili Protein-4
CXCL12: C-X-C Kemokin ligand 12
CXCL13: Kemokin Ligand 13
CXCR4: C-X-C Kemokin Reseptör Tip 4
CXCR5: C-X-C Kemokin Reseptör Tip 5
DEPC: Diethyl Dicarbonate
DH: Dendritik Hücre
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
ER: Östrojen Reseptörü
FACS: Floresan-Aktive Hücre Ayırma
FGL1: Fibrinojen Benzeri Protein 1
FRC: Fibroblastik Retiküler Hücreler
G-CSF: granülosit koloni uyarıcı faktör
Gal-: Galaktin
HER2: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2
HEV: Yüksek Endotelyal Venül
ICOS: İndüklenebilir Kostimülatör Reseptörü
IDO: Indoleamine 2,3-Dioxygenase
IFN-: İnterferon
Ig-: İmmünglobulin
IL-: İnterlökin
IRF- :Interferon Regulatory Factor
ITAM: Tirozin-İlişkili Aktivasyon Motifleri
LAG3: Lenfosit Aktivasyon Gen-3
LN: Lenf Nodu

mAb: Monoklonal Antikorlar
MACS: Manyetik Aktive Hücre Ayrıştırma
MHK: Majör Histokompabilite Kompleks
MKBH: Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler
NFAT: Nükleer Faktör
NFkB: B Hücrelerin Kapa-Hafif-Zinciri-Geliştiren Nükleer Faktörü
NK: Doğal Öldürücü Hücreler
NKp30: Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3
NKT: Doğal Öldürücü T Hücre STAT3
NOTCH: Forkhead Box O1 (FOXO1)
PBS: Phosphate-Buffered Saline
PD-1: Programlanmış Hücre Ölüm Proteini-1
PI-3: Fosfoinositol-3
PI3K: Fosfoinisitol-3-Kinaz
PLC-: fosfo lipaz
PMNH: Periferik Kan Mononükleer Hücreler
PR: Progesteron Reseptörü
PZR: Polimer Zincir Reaksiyonu
RORγt: RAR-Related Orphan Receptor Gamma
RT-PZR: Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu
S1P: Sifingozin 1 Fosfat
S1PR1: Sifingozin-1-Fosfat Reseptörü
SHP: SH2-İçeren İnozitol Fosfotaz
STAT-: Transkripsiyonun Sinyal-dönüştüren Aktivatörleri
TAM: Tümör İlişkili Makrofajlar
TBE: Tris-borat-EDTA
T_{CM}: Merkezi Hafıza Hücreleri
TDLN: Tümör Drene Lenf Nodu
T_{EM}: Efektör Hafıza Hücre,
Tfh: T Foliküler Yardımcı Hücre
TGF-: Transforming Growth Factor-β
Th: Yardımcı T hücre
THR: T Hücre Reseptörleri
TIL: Tümör İnfilitre Lenfosit
TIM: İmmünoreseptör Tirozin-yerleşik İnhibitör Motifi
TIM-3: T Hücre İmmünglobin-3
TNF-: Tümör Nekroz Faktörü
TNM: Tümör, Lenf Nodu, Metastaz
Treg: Regülatör T Hücre

8. EKLER

EK 1. Etik Kurul Karar Raporu

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 46418926 11.05.2020

Konu : Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Kararları

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

TOPLANTI TARİHİ	: 09 MAYIS 2020 CUMARTESİ
TOPLANTI SAATİ	: 15:00 (Covid-19 tedbirleri kapsamında toplantı online yapılmıştır.)
TOPLANTI NO	: 2020/07
PROJE/ KARAR NO	: 2020/110 (Değerlendirilme Tarihi: 10.03.2020-05.05.2020)

Üniversitemiz Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniğinde görevli Doç. Dr. Kerim Bora YILMAZ'ın sorumlu araştırmacı olduğu, MSc.İzel YILMAZ, Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI, Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL, MSc Ece TAVUKÇUOĞLU, Doç. Dr. Melih AKINCI, Doç. Dr. Ali Fuat ÇİÇEK, Prof. Dr. Mükerrem SAFALI ve Prof. Dr. Mehmet Ali GÜLÇELİK'in yardımcı araştırmacı olduğu, 2020/110 kayıt numaralı, **"Meme Kanserinde Foliküler Yardımcı T Lenfositlerin Fonksiyonel ve Moleküler Analizi"** başlıklı proje önerisi, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur. Rica ederim.

S.NO	AD SOYAD VE UZMANLIK ALANI	İMZA
1	Prof. Dr. Ahmet COŞAR (Anestezi AD Bşk.lığı) Etik Kurul Başkanı	
2	Prof. Dr. Alper GÖZÜBÜYÜK (Göğüs Cerr. AD Bşk.lığı) Etik Kurul Başkanı Yardımcısı	
3	Prof. Dr. Selahattin BEDİR(Üroloji AD Bşk.lığı)	
4	Prof. Dr. Levent KENAR(KBRN, Enstitü)	
5	Prof. Dr. Yusuf İZCİ (Beyin ve Sinir Cerr. AD.Bşk.lığı)	
6	Prof. Dr. Fulya TOKSOY TOPÇU (Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi AD.Bşk.lığı)	
7	Prof. Dr. Ayten TÜRKKANI(Histoloji AD.Bşk.lığı)	
8	Prof. Dr. Gülten GÜVENÇ(Hemşirelik Fakültesi)	
9	Prof. Dr. Dilek YILDIZ (Hemşirelik Fakültesi) Sekreter	
10	Prof. Dr. Ali Kağan COŞKUN(Genel Cerr. AD Bşk.lığı)	
11	Doç. Dr. Cantürk TAŞÇI(Göğüs Hast. AD Bşk.lığı)	
12	Prof. Dr. Suat DOĞANCI(Kalp Damar Cerr. AD Bşk.lığı)	
13	Dr.Öğr.Üyesi Mustafa GÜNEY(Mikrobiyoloji AD Bşk.lığı)	

Sağlık Bilimleri Universitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu
Etlik-Ankara Telefon: 0 (312) 304 6135

EK 2. Tez Çalışması Orjinallik Raporu

ORİJİNALLİK RAPORU

%8	%7	%4	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.medrxiv.org İnternet Kaynağı	%1
2	scholarworks.iupui.edu İnternet Kaynağı	%1
3	edoc.ub.uni-muenchen.de İnternet Kaynağı	%1
4	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<%1
6	kclpure.kcl.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1
7	uu245-31.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

EK 3. Dijital Makbuz

turnitin

Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author:	İzel Yilmaz
Assignment title:	İzel Tez
Submission title:	İmmünoloji Tezi
File name:	ZEL_YILMAZ,_611658001,_TEZ_TAMAMI_wo_Ref.docx
File size:	41.76M
Page count:	137
Word count:	30,681
Character count:	203,824
Submission date:	06-Oct-2021 11:27AM (UTC+0300)
Submission ID:	1666701659



T.C. BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

MEME KANSERİNDE FOLİKÜLER YARDIMCI T LENFOSİTLERİN FONKSİYONEL VE MOLEKÜLER ANALİZİ

İzel YILMAZ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2021

Copyright 2021 Turnitin. All rights reserved.

9. TEŞEKKÜR

Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstütüsü, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı Doktora Programı'nda tamamlamış olduğum doktora karıyerimde; öncelikle her çalışmamda beni yönlendiren ve akademik olarak ilerlememde beni destekleyen, tezimin hazırlanma aşamasında sabır ve özveri davranan danışman hocam Prof. Dr. Haluk Barbaros Oral'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, doktora öğrenimim boyunca bilgi birikimlerini paylaşan ve beni cesaretlenren Prof. Dr. Ferah Budak hocamıza, çeşitli projelerinde çalıştığım Dr. Salih Haldun Bal'a, rutin immünolojik testlerin öğretimi ve uygulanmasındaki katkılarından dolayı Figen Aymak'a, her zaman beni gerçek anlamda destekleyip cesaretlendiren ve her daim birbirimiz ile bilgi alışverişinde bulunabildiğimiz sevgili arkadaşım Laçin Cevhertaş'a ve bu zorlu süreçte daha sayamadığım her zaman yanımda olan Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan tüm öğrenci ve personel arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamım ortaya çıkmasında bana destek olan, labarotuvarının imkaanlarını sonuna kadar sunan, deney süreçlerimde karşılaştığım her sorunumu çözen, doktora sonrasındaki hayatımda da her zaman bana ışık tutacağına inandığım Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda görevli eş danışman hocam Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya çok teşekkür ederim. Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda tez çalışmalarımı sürdürürken bilgi birikimlerini paylaşmaktan kaçınmayan Utku Horzum ve Ece Tavukçuoğlu başta olmak üzere beni kendi ekiplerinden biri gibi gören tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmamın en büyük karahramları olan gönüllü örnek bağışçılarıma ve bu örneklerin temininde özveri ile çalışan Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastahanesi Genel Cerrahi Bölümü'nde görevli Prof. Dr. Kerim Bora Yılmaz hocama da çok teşekkür ederim.

Doktora sürecimdeki en stresli dönemlerimde üretkenliğimin ve dinamikliğimin artmasında katkıda bulunan, lisanslı binicisi olduğum Tabiat Binicilik Merkezi'ne ve çalışanlarına, özellikle iyi bir sporcu olabilmem için antremanlarda beni cesaretlendiren Sezer ve Beyza Koz hocalarıma da çok teşekkür ederim.

Son olarak tabiki tüm hayatım boyunca her türlü kararımda arkamda duran ve gelişimim için her daim maddi ve manevi desteklerini fazlasıyla hissetiren canım ailem, babam Ercan Yılmaz'a ve annem Ayşenur Yılmaz'a sonsuz teşekkürler…

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: İZEL YILMAZ

Eğitim Bilgileri

- **2016-2021 Doktora (Phd),** Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi İmmünoloji Anabilim Dalı, Bursa Uludağ Üniversitesi, Bursa, TÜRKİYE
- **2014-2015: Tezli Yüksek Lisans (MSc.),** İlaç Geliştirme Bilimleri, King's College London, Londra, BİRLEŞİK KRALLIK- CGPA: 68/100 (Mezuniyet derecesi: Liyakat ile mezun)
- **2009-2014: Lisans Derecesi (B.Sc.),** Moleküler Biyoloji ve Genetik, İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE-CGPA: 82/100 (2.83/4.00)

Yabancı Diller

- **İngilizce (ileri düzey);** TOEFL IBT (03.06.2016): 83/120**,** ELTS (08.03.2014): 7/9
- **Almanca (A2)**

Doktora Döneminde Yer Alınan Projeler

- "Fare Artrit Modellerinde Genetik Olarak Modifiye Edilmiş Toleran Dendritik Hücrelerle Artrit Tedavisi" **TÜBİTAK-COST Proje No: 114S354,**
- "Kollajen ile indüklenen artrit modelinde inflamatuvar durumlarda ifade edilen tolerans indükleyici potansiyel terapötik genle artrit tedavisi: Romatoid artrit tedavisi için yeni bir strateji" **TÜBİTAK-COST Proje No: 113S375 .**
- "Çoklu Gen Modifikasyonu ile Tolerans İndükleyici Hale Getirilmiş Dendritik Hücreleri ile Deneysel Allerjik Ensefalomiyelit Tedavisi: MS tedavisi için yeni bir yaklaşım." **TÜBİTAK Proje No: 118S474.**
- "Strese bağlı 5HT2CR polimorfizminin atopik dermatit, vitiligo, liken planus ve sedef hastalığı ile ilişkisi" **BAP araştırma projesi**

Doktora Dönemindeki Yayınlar

- Temel SG., Ergoren MC., **Yilmaz I.,** Oral HB. The use of ACE INDEL polymorphism as a biomarker of coronary artery disease (CAD) in humans with Mediterranean-style diet. Int J Biol Macromol. 2019;123:576-580. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.021
- Güvenç G., **Yılmaz İ.,** Çiftçi K., Baş A., Kaşıkçı E., Ersoy F., Oral HB., Yalçın M. Fare deneysel artrit modelinde genetik olarak modifiye toleran dentritik hücre tedavisinin bazı kan parametreleri üzerine etkisi. Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakultesi Dergisi. 2018: 37 (2) 101-107. doi:10.30782/uluvfd.413321
- **Yılmaz İ**, Oral HB. Genetik olarak modifiye edilmiş dendritik hücrelerle immün tolerans indüksiyonu. Gen ve Hücre Tedavisinde Güncel Gelişmeler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.55-60.

Doktora Dönemindeki Poster Sunumları

- Karacay M., **Yilmaz I.,** Uz E., Budak F., Ersoy F., Oral HB. (2017) Downregulation of CD80/86 expression on the surface of RAW 264.7 cells via intracellular CTLA4, 11th World Immune Regulation Meeting, 15-18 March 2017, Davos, Switzerland
- **Yılmaz İ.,** Karaçay M., Uz E., Budak F., Ersoy F., Oral HB. (2017) RAW 264.7 hücrelerinin yüzeyinde, hücre içi CTLA4 ekspresyonu ile CD80/86 ifadesinin baskılanması, XXIV Ulusal İmmünoloji Kongresi, 27-30 April 2017, İstanbul, Turkey
- Karacay M., **Yilmaz I.,** Uz E., Budak F., Ersoy F., Oral HB. (2018) Downregulation of CD80/86 expression on the surface of Mouse bone marrow-derived dendritic cells via CTLA4, 12th World Immune Regulation Meeting, 14-17 March 2018, Davos, Switzerland
- **Yilmaz I.,** Guvenc G., Karacay M., Barazi AO., Ersoy F., Akkoc C., Akkoc A., Yilmaztepe Oral A., Yalcin M., Oral HB. (2018) Treatment of collagen induced arthritis (CIA) in mice model with disease-inducible indolamine-2,3-dioxygenase (IDO) gene, 5th European Congress of Immunology (ECI 2018), 2-5 September, Amsterdam, Holland
- **Yilmaz I.,** Karacay M., Guvenc G., Uz E., Budak F., Ersoy F., Yalcin M., Oral HB. (2018) Treatment of collagen induced arthritis (CIA) in mice model with genetically modified dendritic cells, 5th European Congress of Immunology (ECI 2018), 2-5 September, Amsterdam, Holland
- **Yılmaz İ.,** Tavukçuoğlu E., Horzum U., Yanık H., Yılmaz KB., Akıncı M., Gülçelik MA., Oral HB., Esendağlı E. (2020) Meme kanseri hastalarından T foliküler yardımcı benzeri CD4+PD1+CXCR5+ ve CD8+PD1+CXCR5+ hücrelerin fenotipik analizleri, 25. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım 2020, Dijital
- Bal SH., Kumaş LT., Cevhertaş L., **Yılmaz I.,** Ellergezen P., Budak F., Heper Y., Göral G., Oral HB. (2021) Effect of storage period of erythrocyte suspensions on the CD4 & CD8 T cells, 6. Avrupa İmmünoloji Kongresi (ECI), 1-4 Eylül, Dijital
- **Yilmaz I.,** Tavukccuoglu E., Horzum U., Yilmaz KB., Akinci M., Gulcelik MA., Oral HB., Esendağlı E. (2021), Phenotypical and functional analysis of circulating and lymph-node resident T follicular helper (Tfh) cells from breast cancer patients, 6. Avrupa İmmünoloji Kongresi (ECI), 1-4 Eylül, Dijital

Doktora Dönemindeki Sözel Sunumlar

- Karacay M., Guvenc G., **Yilmaz I.,** Barazi AO., Ersoy F., Ozguden Akkoc C., Akkoc A., Yılmaztepe Oral A., Yalcın M., Oral HB. (2017) Intraarticular delivery of Disease-inducible indoleamine-2,3 dioxygenase gene ameliorates collagen-induced arthritis in mice. 11th World Immune Regulation Meeting, 15-18 March 2017, Davos, Switzerland
- **Yılmaz İ.,** Karaçay M., Güvenç G., Ünsal D., Uz E., Budak F., Ersoy F., Sütlü T., Yalçın M., Oral HB. (2018) Kollajen ile indüklenen artrit fare modelinin, genetik olarak modifiye edilmiş tolerojenik dendritik hücre (tolDH) ile tedavisi, İmmünolojide Moleküler Sempozyumu, 18-21 October 2018, İzmir, Türkiye

- **Yilmaz I.,** Karacay M., Guvenc G., Unsal D., Uz E., Yilmaztepe Oral A., Budak F., Ersoy F., Sutlu T., Yalcın M., Akkoc A., Oral HB. (2019) Genetic modification strategies of the dendritic cells for the induction of immune tolerance in collagen-induced arthritis (CIA) mouse model. 4th International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress, 27-29 April 2019, Bursa, Turkey, OA3.

Doktora Dönemindeki Burslar ve Ödüller

- **TÜBİTAK Proje Bursu**, Proje no: 114S354, Proje Başlığı: Fare Artrit Modellerinde Genetik Olarak Modifiye Edilmiş Toleran Dendritik Hücrelerle Artrit Tedavisi
- **TÜBİTAK Proje Bursu,** Proje no:113S375, Proje Başlığı: Kollajen ile indüklenen artrit modelinde inflamatuvar durumlarda ifade edilen tolerans indükleyici potansiyel terapötik genle artrit tedavisi: Romatoid artrit tedavisi için yeni bir strateji
- **TÜBİTAK Proje Bursu,** Proje no:118S474., Proje Başlığı: Çoklu Gen Modifikasyonu ile Tolerans İndükleyici Hale Getirilmiş Dendritik Hücreleri ile Deneysel Allerjik Ensefalomiyelit Tedavisi: MS tedavisi için yeni bir yaklaşım
- **YÖK (2017),** Moleküler onkoloji öncelikli alanından YÖK 100/200 doktora bursu, Türkiye
- **The European Federation of Immunological Societies - ACTing on European Research in Immunology and Allergology (EFIS - ACTERIA) Seyahat Bursu (2018),** 5th European Congress of Immunology (ECI 2018), 2-5 Eylül, Amsterdam, Hollanda.
- Türk İmmünoloji Derneği, (2018), **konaklama bursu**, İmmünolojide Moleküler Sempozyumu, 18-21 Ekim, İzmir, Türkiye
- Türk İmmünoloji Derneği, (2020), **kayıt bursu**, 25. Ulusal İmmünoloji Kongresi, (dijital)
- The European Federation of Immunological Societies (EFIS), 6. Avrupa İmmünoloji Kongresi (ECI), 2021, **kayıt bursu**, (dijital)