



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**B LENFOSİTLERİNİN CD4+T HÜCRE YANITINA OLAN
NEGATİF ETKİLERİNİN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ:FOXP3 PD-1/PD-L1 EŞ-
UYARAN SİSTEMİNİN OLASI ROLLERİ**

SELİN AKAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi DENİZ DURALI

İSTANBUL-2018

TEŞEKKÜR

Yol göstericilikleri, eşsiz öğreticilikleri ve Medipol Mikrobiyoloji ailesine katılmama izin vererek bana vermiş oldukları fırsat için her zaman desteklerini hissettiğim başta danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Deniz Duralı olmak üzere Dr. Öğr. Üyesi Özlem Güven'e ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet Zeki Şengil'e teşekkür ederim.

Sorulan soruları basite indirgeyerek anlatma yeteneği ile beni hiçbir zaman cevapsız bırakmayan, donanımıyla beni kendine hayran bırakan Prof. Dr. Akif Turna'ya teşekkür ederim.

Eğitim öğretim hayatım boyunca onlardan aldığım sevgi ve ahlak değerleri ile kendi yolumu çizmemde vesile olan, en bunaldığım anlarda yanı başımda biten, hatalar yapmama izin verecek kadar bana güvenen; bugün ayakları yere basan bir kadın olmamın en güzel destekçileri, çekirdek aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1 B Hücreleri.....	4
4.1.1 B Hücre Gelişimi.....	5
4.1.2 B Hücre Aktivasyonu ve Humoral İmmün Tepkisi	5
4.1.3 B Regülatör Hücre.....	7
4.1.4 Regülatör Hücre FoxP3 İlişkisi.....	9
4.1.5 PD-1 / PD-L1	10
5. MATERYAL VE METOT	13
5.1. Materyal	13
5.2 Metotlar.....	14
5.2.1 Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Koşullar	14
5.2.1.1 Sağlıklı İnsan Kan Örnekleri.....	14
5.2.2 Çalışmada Kullanılan B ve T Hücreleri Eldesi.....	15
5.2.3 B ve T Hücre Eş-kültürü	17
5.2.4 RNA Ekspresyon Testi.....	18

6.BULGULAR	22
6.1 İnsan B hücrelerinin T Hücre Cevabına Regülatör Etkisi.....	22
6.2 İnsan B Hücrelerinde mRNA Seviyesinde FoxP3 Ekspresyonu Mevcut	24
6.3 Anti-IgG ve IgM Varlığında B Hücrelerine FoxP3 Ekspresyon Artışı.....	25
6.4 Farklı Klona Sahip Antikorlarca Farklı İzoforndaki Proteinleri Tanınması ...	27
6.5 TGF- β 1'in B Hücreleri Üzerindeki İnhibisyon Etkisi	28
6.6 Fare B Hücrelerinde mRNA ve Protein Seviyelerinde FoxP3 Ekspresyonu Mevcut.....	29
6.7 Fare B Hücrelerinin T Hücre Proliferasyonuna Olan Düzenleyici Etkileri FoxP3 Faktöründen Bağımsız	31
7.TARTIŞMA VE SONUÇ	33
8.KAYNAKLAR	36
9.ETİK KURUL ONAYI.....	44
10.ÖZGEÇMİŞ	47

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Semboller	Açıklamalar
ASH	Antijen Sunan Hücreler
BCR	B Hücre Reseptörü
Be	B Efektör Hücre
Breg	B-regülatör
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CLP	Ortak Lenfoid Öncülü
DC	Dendritik Hücre
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
FITC	Floresin İzosiyanat
GC	Germinal Merkez
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
IFN-γ	İmmunoglobulin
Ig	İnterferon-Gama
IL	İnterlökin
ITSM	İmmünoresptör Tirozin Esaslı Şalter Motifi
LCA-2	Lenfoid 2 Projenitörü
LPS	Lipopolisakkarit
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
MPPs	Multipotent Öncü Hücreler
NK-T	Doğal Öldürücü T Hücresi
PBMCs	Periferik Mononükleer Kan Hücreler
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
TAE	Tris Asetat Edta
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü B
Th	T Yardımcı Hücre
TI	Timüs Bağımsız
TIL	Tümörü İnfiltrate Eden İmmun Hücreler

TLR	Toll Benzeri Reseptör
TNF-α	Transforme Edici Büyüme Faktörü B
Tr	T-regülatör
Treg	Tümör Nekrosis Faktör A
WT	Doğal Tip



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 6.1 A:** Aktive edilmiş ve aktive edilmemiş T hücreleri CFSE değişimi
B:Uyarılmış T hücreleriyle uyarılmamış B hücrelerinin (4B:1T oranında) eş-
kültürü 23
- Şekil 6.2:** Aktive edilmiş T hücrelerinin, aktive edilmemiş ve aktive edilmiş B
hücreleri ile farklı oranlardaki birlikteliğine göre değişim grafiği..... 25
- Şekil 6.3 A:** B ve T agoroz jel sonuçları **B:** FoxP3 pozitif B hücrelerinde CD25
miktarı 25
- Şekil 6.4:** PBMC'lerde uyarılmamış hücrelerde FoxP3 popülasyonunda B ve T hücre
oranları tespiti..... 26
- Şekil 6.5:** B ve T hücrelerinde 20. saat FoxP3 ekspresyonları 27
- Şekil 6.6:** İnsan venöz kanından ficoll sonrası elde edilen PBMC ex vivo işaretleme.
A: Anti-insan FoxP3 PE (hFOXY klonu) ve kontrol izotipi (fare IgG1 PE). **B:**
Anti-insan FoxP3 FITC (PCH101 klonu) ve kontrol izotipi (sıçan IgG2a FITC)
..... 28
- Şekil 6.7 A:** B ve T hücrelerinde IL10 ve hTGF- β 1 agoroz jel sonuçları **B:** CD25+
ve CD25- B hücrelerinde hTGF- β 1 oranı (TGF-b1 kantifikasyon değerleri
GAPDH miktarlarıyla normalize edilmiştir) **C:** B-T hücre eş-kültüründe TGF-
 β 1 ile IL-10 sitokinlerinin T hücre proliferasyonuna etkilerinin ölçülmesi..... 29
- Şekil 6.8 A:** Toplam splenositlerde ve saflaştırılmış B hücrelerinde ex vivo
koşullarda FoxP3 mRNA ekspresyonu. **B:** CD25+ ve CD25- B hücrelerinde
FoxP3 mRNA ekspresyon analizi. **C:** Dalak B ve T hücrelerinde, ex vivo
koşullarda, FoxP3 protein ekspresyonunun FACS ile incelenmesi. 30
- Şekil 6.9:** Birbirinden bağımsız iki farklı deneyde fare dalak hücrelerinden elde
edilen B hücreleri anti-IgG ve IL-2 ile uyarımı sonrası TGF-b1 sitokininin etkisi
ortama eklenen nötralizan anti-TGF- β 1 antikoruyla incelenmesi. 31
- Şekil 6.10:** Scurfy ve WT farelerinde B hücrelerinin T hücre proliferasyonuna
etkilerinin incelenmesi 32

TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.1. Biyolojik Materyaller Ve Kimyasallar	13
Tablo 5.2. Cihaz Ve Gereç Listesi	14
Tablo 5.3. İlk cDNA İçerik Karışımı	19
Tablo 5.4. İlk cDNA Protokolü.....	19
Tablo 5.5. İkinci cDNA İçerik Karışımı	19
Tablo 5.6. İkinci cDNA Protokolü	20
Tablo 5.7 Kontrol PCR Karışımı	20
Tablo 5.8. PCR Protokolü	20



1. ÖZET

B LENFOSİTLERİNİN CD4+T HÜCRE YANITINA OLAN NEGATİF ETKİLERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ:FOXP3 PD-1/PD-L1 EŞ-UYARAN SİSTEMİNİN OLASI ROLLERİ

B hücrelerinin immün sistemde bilinen birincil görevleri antikor üretmektir. Son zamanlarda ise B hücrelerinin immün cevabı düzenleyici işlevleri olduğu da bilinmektedir. Yapılan deneylerde Breg hücrelerinin düzenleyici özellikleri, T hücre proliferasyonu üzerindeki etkilere bakılarak gösterilmesi hedeflendi. İlk düzenleyici (regulator) hücre grubu olarak T hücre popülasyonunda FoxP3+ CD25+ olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda amacımız B hücrelerinin düzenleyici işlevlerinde FoxP3 faktörünün olası etkisinin olup-olmadığını incelemektir. Fare dalak ve insan kan hücreleri ile gerçekleştirilen deneylerde aktive edilmiş B hücrelerinin CD4+ T hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmektedir. Uyarılmış B hücreleri ortamdaki TGF- β 1 sitokinine bağımlı olarak, uyarılmış T hücrelerinin proliferasyonunu B:T hücre oranıyla doğru orantılı olarak inhibe etmektedir. B hücreleri T hücre proliferasyonunda FoxP3'den bağımsız olarak etkilidir. Düzenleyici T hücrelerinde (T regülator, Treg) farklılaşmaya etki eden FoxP3 transkripsiyon faktörü düzenleyici B hücrelerinde (B regültör, Breg)de mevcuttur ancak ortaya koyduğu proteinin işlevi henüz belirsizdir.

Anahtar Kelimeler: Breg, FoxP3, proliferasyon

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE MOLECULAR MECHANISMS OF NEGATIVE EFFECTS OF B-LYMPHOCYTE TO CD4 + T CELL RESPONSE: FOXP3 PD-1 / PD-L1 POTENTIAL ROLE OF CO-STIMULATION SYSTEM

The primary task of B cells in the immunological system is to produce antibodies. Recently, it is known that B cells have regulatory functions on the immune response. In this study, it was aimed to show the regulatory properties of Breg cells by looking at the effects on T cell proliferation. The first regulator cell group described is FoxP3 + CD25 + in the T cell population. In our project, we aimed to examine whether the possible effect of the FoxP3 factor in the regulatory functions of B cells. In experiments with mouse spleen and human blood cells, activated B cells seem to inhibit CD4 + T cell proliferation. The stimulated B cells inhibit the proliferation of stimulated T cells in a direct proportion to the ratio of B: T cells, dependent on the TGF- β 1 cytokine in the medium. B cells are independent of FoxP3 in T cell proliferation. The FoxP3 transcription factor, which affects differentiation in regulatory T cells (Treg), is also present in regulatory B cells (Breg) but the function of the protein is still unclear.

Key words: Breg, FoxP3, proliferation

3. GİRİŞ VE AMAÇ

B hücreleri immün sistemde son derece önemli bir yere sahiptir. B hücrelerinin gelişimlerinde ve işlevlerinde gözlemlenen yetmezlikler veya kontrolsüz cevaplar otoimmün hastalıkların, malignitelerin, kronik infeksiyonların, immün yetmezlik sendromlarının ve alerjilerin patogeneğinde rol oynamaktadır (1–3).

B hücrelerinin, immün sistem üzerinde öncelikli olarak humoral immünitede önemli rol oynadığı bilinmesine rağmen, son zamanlarda bir takım düzenleyici cevaplarda da yer aldığı gösterilmektedir (4,5).

B hücrelerinin antikor sentezi harici immün cevabı düzenleyici etkileri vardır. İmmün cevabı inhibe edebildiği gösterilen T düzenleyici (T regülatör, Treg) hücreleri benzeri düzenleyici B hücrelerinin (B regülatör, Breg) varlığı gösterilmiştir. Treg farklılaşmasında FoxP3 transkripsiyon faktörünün önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Ancak Breg hücrelerinin işlevsel olarak farklılaşmalarını sağlayan moleküler mekanizmalar ve faktörler hâlihazırda kesin olarak ortaya konmamıştır.

Bu projenin amacı Treg hücreleri için gerekli olan FoxP3 transkripsiyon faktörünün regülatör özellik gösteren B hücrelerinde de mevcut olup-olmadığı, mevcut ise işlevsel olup olmadığını ortaya koymaktır. Bu çalışmada, sağlıklı insan ile FoxP3 transkripsiyon faktörü mutasyon sonucu işlevsiz olan Scurfy farelerinden elde edilen B ve T hücreleri kullanılmıştır.

İn vitro ortamda CFSE ile işaretli T hücreleri, önceden [(anti-IgG+IgM)+IL-2] uyarısı ile farklılaştırılmış (24 saat) B hücreleri ile birlikte 7 gün boyunca kültür ortamında anti-CD3 ile uyarıldılar. T hücrelerinin aktivasyon durumları proliferasyonları ölçülerek incelendi. Bu çalışmada 1) B hücrelerinin T hücre aktivasyon durumlarına düzenleyici etkileri, 2) Olası düzenleyici etkilerinde rol alan faktörlerin, özellikle FoxP3'ün, tanımlanması amaçlandı.

Günümüzde B hücresi hedefli immün tedavi yöntemlerinin artmasına yönelik çalışmalar göz önüne alındığında, hedef odaklı güvenli ve etkili immünoterapilerin planlanması için ilgili hastalığa özgü olarak Breg hücrelerinin immün yanıt oluşum mekanizmalarında rolünün aydınlatılması büyük öneme sahiptir.

4. GENEL BİLGİLER

B hücreleri adaptif bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olarak, çeşitli patojenlere özgünlük göstermektedir.

Hematopoetik öncül hücrelerden meydana gelen B hücrelerinin olgunlaşım immün sistemde yerini almasında sahip olduğu mikro çevre ve çeşitli uyaranlar etkilidir (6). Pre-B hücresinden farklılaşma sonucu meydana gelen olgun B hücreleri aktivasyon sonucu bellek ve plazma olarak fonksiyonel gruplara ayrılmaktadır (7).

4.1 B Hücreleri

B hücre gelişimi ve olgunlaşması antijenden bağımsız olarak kemik iliğinde gerçekleşmektedir (1,3). Olgun-naif B hücrelerinin antijen reseptörleri glikolipid, nükleik asit, lipid, polisakkarid, ve ufak solübl moleküller gibi T hücrelerince tanınamayan farklı yapıdaki antijenleri tanıyabilmektedir (9). B hücreleri direkt olarak antijenlerle aktive olabilmektedir (7). Otoimmün hastalıkları olan hastaların B hücresi temelli tedavilerinde, insanlar üzerinde yapılan araştırmalar plazma hücrelerinin hem kısa hem de uzun ömürlü olabileceğini ortaya çıkarmıştır (5,6).

Bunun yanı sıra 1918 influenza pandemisinin hayatta kalanları ile yapılan çalışmalar, antijene özgü bellek B hücrelerinin, antijen yokluğunda onlarca yıldır varlıklarını sürdürdüğünü göstermiştir (12).

Uzun ömürlü plazma hücreleri, kemik iliğinin özel nişlerinde veya bellek B hücrelerinin sürekli, antijenle yönlendirilmiş farklılaşmasıyla hayatta kalmaktadır (11). Yani, B hücreleri uzun ömürlü bellek B hücreleri veya plazma hücreleri haline gelmektedir; ikincil lenfoid organlarda bulunabilir ya da kemik iliğine göç edebilmektedirler. Bunun yanı sıra, B hücrelerinin antikor sentezi haricinde, salgıladıkları sitokinlerle de immün yanıtta etkili oldukları, işlevsel olarak farklı hücre altgruplarına (Be1, Be2 ve Breg) ayrılabilir oldukları ve T lenfosit işlevlerini etkiledikleri gözlenmiştir (13,14).

4.1.1 B Hücre Gelişimi

B hücre gelişimi, multipotent öncü hücrelerin (Multipotent Progenitor Cells, MPPs) ilk önce fetal karaciğere ve daha sonra kemik iliğine taşınması ile başlamaktadır. MPPs daha sonra B hücre soyundan sorumlu olan yaygın lenfoid 2 progenitörünü (LCA-2) üreten ortak lenfoid öncülüne (Common Lymphoid Precursor, CLP) farklılaşır (15).

B hücresi gelişiminde kritik bir adım B hücre reseptörünün (B Cell Reseptor, BCR) üretilmesidir. Adaptif immün yanıtın seçiciliğini ve özgünlüğünü sağlamak için büyük bir BCR repertuarı gerekmektedir. Başka bir deyişle, olgun B hücreleri antijene spesifik cevap vermektedir. Bu, çeşitliliği oluşturan BCR gen havuzunda Immunoglobulin (Ig) gen segmentlerinin ve nükleotid yerleştirme mekanizmalarının yeniden düzenlenmesiyle gerçekleşmektedir. Ig, ağır ve hafif zincir lokuslarını bir dizi gen elemanlarını içermektedir: C (sabit bölge, constant), V (değişken, variable), D (çeşitlilik, diversity) (sadece ağır zincir geninde) ve J (birleşme, joining) segmentleri (11,12,13).

Olgunlaşmamış B hücreleri birkaç gün içinde kemik iliğinden çıkacak ve geçici B hücreleri olarak dolaşıma girmektedir. Bu hücreler, kanda ve ikincil lenfoid organlarda bulunmakta, nadiren lenfatiklere girebilmektedir (19).

4.1.2 B Hücre Aktivasyonu ve Humoral İmmün Tepkisi

B hücresi aktivasyonu, B hücrelerinin IgD ve IgM yüzey reseptörleri spesifik antijenlere bağlandığında başlamaktadır. Enfeksiyon veya aşılama yoluyla bir mikrop veya antijen ile karşılaşılmasıyla naif B hücreleri aktive olur ve antikor üreten plazma hücrelerine ve bellek B hücrelerine farklılaşmaktadır.

B hücresi aktivasyonuna ve antijenin doğasına bağlı olan humoral bağışıklık tepkisinin başlatılmasının iki yolu vardır. Lipitler, nükleik asitler ve glikoproteinler gibi protein olmayan antijenler, T hücrelerinin yokluğunda antikor üretimini uyarmakta ve timüs bağımsız (Thymus Independent, TI) antijenleri olarak adlandırılmaktadır. Bir de protein antijenlerine karşı antikor tepkisi, hem B hem de T

hücresi tutulumunu gerektiren ve bu antijenler, timüs bağımlı (Thymus Dependent, TD) antijenleri vardır (20).

4.1.2.1 T Hücresi Bağımsız B Hücresi Aktivasyonu

TI antijenleri ayrıca tip I ve tip II antijenlerine ayrılmaktadır. Tip I TI antijenleri, lipopolisakkarit (LPS), CpG gibi mitojenik uyarılardır. Bu uyarıcılar, toll-benzeri reseptörler (toll-like receptors) aracılığıyla B hücresi aktivasyonunu indüklemektedir. Öte yandan, tip II TI antijenleri, BCR'yi bağlayan ve dolayısıyla antijene spesifik B hücresi tepkilerini indükleyen polisakaritlerdir. TI tip I antijenleri, B hücresi bölünmesini doğrudan indüklemek için içsel bir kapasiteye sahiptir. Bununla birlikte, T hücre yardımını gerektiren etkin izotip değişimi veya afinite olgunlaşmasını indükleyememektedirler. Yüksek konsantrasyonlarda TI tip I antijenleri, antijen spesifitesine (poliklonal aktivasyon) bakılmaksızın çoğu B hücresinin çoğalmasını ve farklılaşmasını indüklemektedir (21).

Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda, antijene spesifik antikor tepkilerini indüklemektedir. TI tip I antijenleri hem olgunlaşmamış hem de olgun B hücrelerini aktive edebilirken, TI tip II antijenleri sadece olgun B hücrelerini aktive etmektedir. Bu antijenler, antijene özgü olgun B hücrelerinin BCR'lerini geniş ölçüde çapraz bağlayarak hareket eder. Bununla birlikte, yoğun BCR çapraz bağlanması yoluyla B hücresi enerjisini (antijenlere karşı tepkisizliği) indüklemekten kaçınmak için, epitop yoğunluğu, tip II TI antijenleri tarafından B hücrelerinin aktivasyonu için kritik öneme sahiptir. Düşük yoğunlukta, reseptör çapraz bağlama aktivasyonu indüklemek için yetersizdir, ancak çok yüksek yoğunlukta B hücresi enerjik hale gelmektedir.

4.1.2.2 T hücresi Bağımlı B Hücresi Aktivasyonu

T hücresine bağımlı B hücresi aktivasyonu, iki anatomik olarak farklı fazda meydana gelmektedir. Erken evre, T hücre bölgesinde ve birincil foliküllerde meydana gelir ve B hücresi proliferasyonu, başlangıç antikor salgısı ve izotip değiştirmeyi içerir. Geç fazda, afinite olgunlaşması ve B hücre belleği oluşumu meydana gelmektedir ve bu,

lenf folikülleri içinde germinal merkezlerde (Germinal Center,GC) içinde gerçekleşmektedir. Antijen maruziyetinde naif CD4+ T hücreleri, lenfoid organların T hücresi alanında antijen sunan hücreler tarafından sunulan antijenin tanınmasıyla aktive olmaktadır. Eş zamanlı olarak, B hücreleri aynı antijeni tanımakta, aktive olmaktadır ve folikülden T hücresi alanına yönelmektedir.

Antijen spesifik B hücreleri, Ig reseptörleri aracılığıyla antijenleri bağladığında B hücrelerinin T hücresi aracılı aktivasyonu başlatmaktadır, böylelikle B hücre yüzeyi üzerinde ortak uyarıcı moleküllerin ekspresyonunu artmaktadır. B hücresi daha sonra reseptör aracılı endositoz yoluyla alınan antijen, CD4+ T hücrelerini kavramak için MHC Sınıf II molekülleri aracılığıyla hücre yüzeyinde peptit parçaları olarak sunulmaktadır.

Antijen ile aktive edilmiş T ve B hücreleri, foliküllerin ve T hücresi alanının ara yüzeyinde etkileşmektedir. B hücre yüzeyindeki B7 molekülleri ile (B7-1 ve B7-2), Th hücre yüzeyindeki CD28 bağlanarak uyarılmaktadır. Aktive T hücre üzerinde bulunan CD40L, B hücre yüzeyindeki CD40 molekülüne bağlanmaktadır. Bu, immünoglobulin genlerinin transkripsiyonuna, T hücrelerinden sitokinlerin salınmasına ve B hücresi proliferasyonuna yol açmaktadır. Yani, T hücresince salgılanan sitokinler, B hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını güçlendirmenin yanı sıra, izotip sınıf değiştirmeyi teşvik ederek üretilen antikor tipini belirlemek için işlev görmektedir.

4.1.3 B Regülatör Hücre

B hücrelerinin işlevsel olarak farklı hücre altgruplarına ayrıldığı ve salgıladıkları sitokinlerle immün cevabın düzenlenmesinde, T lenfosit işlevlerini etkilemekte rol oynadıkları bilinmektedir.

Geçtiğimiz yıllarda, Breg olarak bilinen bir baskılayıcı B hücreleri popülasyonu, aşırı iltihaplanmanın önlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. B hücrelerinden yoksun genetik olarak değiştirilmiş farelerin kullanımı ve daha özel olarak IL-10 üreten B hücrelerine bakıldığında, hatalı Breg hücre gelişimi ve işlevinin kronik sonuç verdiğini gösterilmiştir. Bu, Breg hücrelerinin çok çeşitli immün aracılı enflamatuvar

durumları hafifletmek için terapötik olarak hedeflenebileceğini düşündürmektedir (17,18,19).

İmmünesüpresif B hücrelerini veya Breg hücrelerini tanımlamak için literatürde yayınlanmış birçok çalışma mevcuttur. Böylelikle Treg hücreleri üzerinde B hücrelerinin önemi; IL-10'un Breg hücreleri ile ilişkisiyle, otoimmünitinin indüksiyonundan sonra pro-inflamatuar T hücrelerinin aşırı büyümesi ile ilişkili bir Treg hücre eksikliği sergilediği gösterilmiştir (25). Dolaylı olarak Breg hücreleri, dendritik hücreler tarafından pro-inflamatuar sitokin ürününü baskılayarak T yardımcı 1 (Th1) ve Th17 hücrelerinin farklılaşmasını bastırmaktadır. Salgıladıkları Th1/Th2 tipi sitokin profiline göre, B lenfositleri fonksiyonel olarak Be1 (B efektör-1) ve Be2 (B efektör-2) olarak adlandırılan farklı iki alt guruba ayrılabilirler ve T lenfositleri ile ilişkiye de girebildikleri gösterilmiştir. IL-10 üreten düzenleyici B Breg hücrelerinin çeşitli enfeksiyöz hastalıklarda indüklendiği bulunmuştur (21,22). IL-10, TGF- β ve IL-35'in üretimi sayesinde Breg hücreleri, tümör nekrosis faktör α (TNF- α), Th17 hücreleri, Th1 hücreleri ve sitotoksik CD8 + T hücreleri, IL-12 üreten dendritik hücreler gibi pro-inflamatuar lenfositlerin farklılaşmasını baskılayabilmektedir. Breg hücreleri ayrıca immün baskılayıcı T hücrelerinin, Foxp3+ T hücrelerinin ve T düzenleyici 1 (Tr-1) hücrelerinin farklılaşmasını da indükleyebilmektedir. Breg hücreleri, transforme edici büyüme faktörü β (Transforming growth factor, TGF- β) ve IL-35 de dâhil olmak üzere diğer bağışıklık düzenleyici sitokinleri ekspres etmektedir.

TGF- β üretimi yoluyla, lipopolisakkarit (LPS) ile aktive edilmiş B hücreleri CD8+ efektör T hücrelerinde CD4+ ve anerjinin apoptozunu indükleyebilmektedir. Çalışmalarda Salmonella modelinde, B hücreleri tarafından IL-35 ekspresyonunun olmaması, Th1 hücre tepkilerinin artmasına ve dalağın makrofaj sayısında artışa neden olmuştur. Başka bir bağımsız çalışma, IL-35 ile uyarılmış B hücrelerinin IL-35 ürettiğini ve deneysel üveiti önleyebildiğini göstermiştir. Ayrıca Breg hücrelerinin insanlarda değişmeyen doğal öldürücü (Invariant Natural Killer, NK-T) hücre homeostazını muhafaza etmede kritik öneme sahip olduğu öne sürülmüştür.

IL-10'un ifadesi, farelerde ve insanlarda baskılayıcı B hücrelerinin popülasyonlarının tanımlanmasında faydalı olmasına rağmen, Breg hücrelerini tanımlamak için kullanılan birçok yüzey markörü, bağışıklık aktivasyonu sırasında yukarı ya da aşağı

regüle edilmiştir, bu da, tanımlanmasında doğal problemlere yol açmaktadır. Farklı Breg hücresi alt kümeleri, farklı deneysel ayarlar arasında, muhtemelen Breg hücre alt kümelerinde açıklanan tutarsızlıklardan bazılarını açıklar.

Bugüne kadar, iki Breg hücre gelişimi modeli önerilebilir. Birincisi, timus türeviden Treg hücrelerine benzer olan Breg hücrelerinin, özel bir faktörün baskılayıcı doğasından sorumlu genlerin ekspresyonunu kontrol ettiği özel bir B hücreleri soya olmasıdır. İkincisi, belirli uyarılara yanıt olarak, B hücrelerinin lokal enflamasyonu baskılamak için düzenleyici bir fenotip almasıdır (27). Şu ana kadar, Breg hücreleri üzerinde gen dizileri gerçekleştiren hiçbir çalışmada Foxp3'e eşdeğer bir soya spesifik belirteç belirlenmemiştir. FoxP3 benzeri bir transkripsiyon faktörünün belirlenmemesi, Breg hücrelerinin fenotipinin heterojenliğiyle birlikte, supresör B hücrelerinin soya özgü olmadığı fikrini desteklemektedir. Dolayısıyla, doğal Treg hücrelerinden farklı olarak, herhangi bir B hücresi, doğru çevresel uyarılara yanıt olarak bir Breg hücresine potansiyel olarak farklılaştığı söylenebilmektedir (28–30).

T hücrelerinin, sitokin üretimi paternlerine göre, Th1 ve Th2 olmak üzere iki alt kümeye ayrıldıkları bilinmektedir. Daha yeni çalışmalar, naif B hücrelerinin, antijen ile uyarımın ardından, farklı sitokinler ile polarize B hücrelerine farklılaştığını göstermiştir. Bu efektör polarize B hücreleri Be1 ve Be2 hücreleri olarak adlandırılmıştır. Be2 hücreleri, IL-4 üreterek ve spesifik antijenleri T hücrelerine sunarak Th2 hücrelerinin yayılmasını teşvik etmektedir. Aksine, Be1 hücreleri tarafından üretilen IFN- γ , Th1 hücrelerinin yayılmasını arttırmaktadır

4.1.4 Regülatör Hücre FoxP3 İlişkisi

Foxp3 düzenleyici Treg hücrelerinin gelişiminde ve immün yanıtlarının düzenlenmesinde rol oynayan bir transkript faktörüdür (4). FoxP3'ün ifadesi, TCR bağlantısında Treg hücrelerinin oluşumu sırasında indüklenir. Treg hücreleri, periferel dokularda IFN- γ ve interlökin-2 gibi faktörlere maruz kalan naif FoxP3-CD4+ T hücrelerinden kökenlenir. Bu Treg hücreleri, çoğunlukla immün homeostazı koruduğu bariyer bölgelerinde (bağırsak gibi) birikir. İn vitro olarak uyarılan Treg (iTreg) hücreleri, önemli ölçüde FoxP3 salgılayabilirler, fakat tipik olarak Treg hücre muadillerinin epigenetik programlamasının çoğundan yoksundurlar, bu da sürekli FoxP3 ekspresyonuna ve baskılayıcı fenotipi daha az stabil olana bağlılıklarını güçlendirmektedir.

Özellikle aktive edildikten sonra, non-regülatör T (Treg olmayan) hücrelerde, FoxP3 kodlayan transkriptlerin ve hatta bazı FoxP3 proteinlerinin ekspresyonu bildirilmiştir (31). Baskılayıcı fonksiyonlara sahip bir dizi CD8 + T hücresi popülasyonu tanımlanmıştır (32). Bazıları, görünür FoxP3 ifadesi olmaksızın hem otoimmünite hem de antiviral tepkileri zayıflatabilse de, FoxP3 + CD8 + T hücreleri, insan tümörleri de dahil olmak üzere birçok ortamda bildirilmiştir (33,34). Bununla birlikte, baskılayıcı CD8 + T hücrelerinde FoxP3'ün düzenlenmesi ve önemi tam olarak gösterilmeye devam etmektedir. FoxP3 ekspresyonunun belirli mikro çevrelerde aktive edilmiş efektör CD8 + T hücrelerinde indüklenebileceğini düşündüren sonuçlar vardır (35). FoxP3'ün CD8 + T hücrelerinin baskılayıcı fonksiyonlarını yönlendirmede önemli bir rolü olup olmadığı tam olarak aydınlatılmaya devam etmektedir (36).

Süpressif özellikleri ile belirlenen regülatör B hücre popülasyonları genel olarak, anti-inflamatuar sitokinlerin (IL-10 veya IL-35) üretimi ile karakterize edilir ve aynı zamanda, bir dizi otoimmün ortamda enflamasyonu sınırlayan ko-inhibitör yüzey moleküllerini de eksprese ederler (31,32). İnsanlarda, bazı düzenleyici B hücrelerinin FoxP3'ü de ifade ettiği bildirilmiştir (37). FoxP3 eksprese eden hücreler, özellikle CD19+ CD5+ B hücrelerinde B hücrelerinde tanımlanmıştır. IL-10 üreten CD5+ B hücreleri ayrıca bir fare modelinde FoxP3 + T düzenleyici hücreleri aracılığıyla alerjik solunum yolu inflamasyonunu önlediği ve tersine çevirdiği bir çalışma ile CD5+ B hücresinin başka bir alt popülasyonu olarak FoxP3-eksprese eden CD5+ B hücreleri tanımlanmıştır. Breg hücreleri ayrıca, tümör kaynaklı bağışıklık toleransının uygulanmasına ve farelerde kanserin hem ilerlemesine hem de yayılmasına katkıda bulunmaktadır (1,4,38). Yapılan çalışmalarda FoxP3'ün Breg hücrelerine kesin katkısı ve FoxP3'ün Breg hücre fonksiyonuna fizyolojik bir katkı olarak önemi belirsizdir, çünkü bazı düzenleyici B hücreleri görünür FOXP3 ifadesi olmadan inflamasyonu azaltmaktadır (39,40).

4.1.5 PD-1 / PD-L1

PD-1, aktive T hücrelerinin ve antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunan protein yapısında bir membran reseptörüdür. PD-L1, tümör hücreleri, tümörü infiltre eden

immün hücreler (TIL) ve çeşitli periferik dokuların yüzeyinde bulunan ve immün sistemi baskılamada önemli rol oynayan membran geçiş (transmembrane) proteindir (41).

PD-1, NK-T hücreleri, NK hücreleri, aktive edilmiş monositler ve dendritik hücrelerin (DC'ler) bazı alt kümelerinin yanı sıra aktivasyondan sonra T hücreleri ve B hücreleri tarafından indüklenebilir şekilde eksprese edilmektedir (42). Ortak γ -zincir sitokinleri (IL-2, IL-7, IL-15 ve IL-21), TLR'ler ve interferonlar da T hücreleri üzerinde PD-1 ekspresyonunu arttırmaktadır (43).

NK-T hücrelerinde PD-1 upregülasyonu, in vitro anti-CD3 veya anti-CD3 / anti-CD28 uyarımından 48 saat sonra maksimum miktara ulaşırken, allojenik CD4 + T hücreleri üzerindeki PD-1, in vivo deri transplantasyonu sonrası zaman içinde artmaktadır (29,30). Ayrıca, T hücrelerinin bazı alt kümeleri yüksek düzeylerde PD-1 eksprese etmektedir (31,32,33).

İmmünoregülatör mekanizmaları anlamak, yeni müdahalelerin geliştirilmesi için önemlidir. PD-1 ve onun ligandları, PD-L1 ve PD-L2, T hücre yanıtını düzenleyen ve periferik toleransı koruyan kritik inhibitör sinyal yolları olarak ortaya çıkmıştır. PD-1 sinyali, alloreaktif T hücresi aktivasyonunu inhibe eder ve indüklenmiş düzenleyici T hücresi gelişimini destekleyebilmektedir. Ayrıca, PD-L1'in hematopoetik olmayan hücreleri üzerindeki upregülasyonu, immün tepkilerin inhibisyonuna aktif olarak katılabilmekte ve dokuya özel koruma sağlayabilmektedir (49,50).

PD-1: PD-L yolunun önemli bir rolü, T hücresi fonksiyonunun, T hücreleri üzerindeki PD-1 reseptörünün, antijen sunan hücreler (ASH'ler) üzerindeki PD-L1 veya PD-L2 ile birleşmesiyle inhibe edilmesidir. PD-L1 veya PD-L2 ile transfekte edilmiş ASH'ler, T hücresi tepkilerini inhibe ederken, DC'ler veya diğer ASH'ler üzerindeki PD-L1 veya PD-L2'nin blokajı, doğal tipe (Wild Type, WT) karşılaştırıldığında in vitro ortamda T hücresi tepkilerini uyarma kapasitesini arttırmaktadır(51,52). Tersine, PD-1'den yoksun olan T hücreleri WT-T hücrelerine göre aşırı duyarlıdır (51–53).

PD-1, TCR veya BCR aktivasyonu varlığında ligandları tarafından bağlandığında bir inhibitör sinyali iletmektedir.

PD-1, T hücreleri tarafından sitokin; IFN- γ , tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interlökin-2 (IL-2) üretimini inhibe etmektedir. PD-1 ayrıca T hücre proliferasyonunu inhibe edebilmektedir. PD-1 sinyallemesi, T hücre efektör fonksiyonu ile ilişkili olan GATA-3, TBET ve Eomes transkripsiyon faktörlerinin ifadesini azaltmaktadır. Bununla birlikte, CD28 ve / veya IL-2 reseptörü aracılığıyla güçlü bir pozitif sinyalleşme, T hücre proliferasyonu, farklılaşması ve sağkalımı üzerindeki PD-1 inhibitör etkilerinin üstesinden gelebilmektedir.

PD-1 ayrıca B hücresi reseptörü aracılığıyla sinyalleşmeyi de engelleyebilmektedir. PD-1'in antikor üretimini kontrol etmesindeki rolü, B hücreleri üzerindeki PD-1 ile doğrudan ilişkili veya PD-1'in T hücreleri üzerinde dolaylı etkisi olabilmektedir. B hücreleriyle T hücre etkileşimleri, daha sonra B hücresi genişlemesi, izotip değişimi ve afinite olgunlaşmasını uyaran yardımcı T hücreleri tarafından antijenin tanınmasını içermektedir (54). T hücreleri arasında foliküler yardımcı hücreler B hücre yanıtının önemli destekçileri olarak ortaya çıkmıştır (55). T foliküler yardımcı hücreler, yüksek düzeylerde PD-1 ve PD-L1 ve PD-L2'nin, germinal merkez B hücreleri up-regülasyonu vardır (56). PD-1 eksikliği, germinal merkezlerde B hücrelerinin düzensiz seçilimine ve antikor çeşitliliğine yol açan anormal fenotipleri olan artan sayıda T foliküler yardımcı hücreler, hücresi oluşumuna yol açabilmektedir (41).

DC'ler ve monositler üzerindeki PD-1 ekspresyonu için son zamanlarda açıklanan roller, PD-1 sinyalleşmesinin muhtemelen başka reseptör sinyal yollarına çarparak T hücre veya B hücresi antijen reseptör sinyalleşmesinden bağımsız olarak ortaya çıkma olasılığını vurgulamaktadır (57,58). Örneğin, monositlerdeki PD-1 ligasyonunun, HIV enfeksiyonu sırasında IL-10 üretimini uyardığı gösterilmiştir ki bu da T hücre fonksiyonunun azaltılmasına katkıda bulunmaktadır. Bu bulgular, lenfosit olmayan bir popülasyondaki PD-1 ekspresyonunun, HIV enfeksiyonunda T hücre immün fonksiyonunu etkileyebileceğini ve bu bulgunun diğer ortamlara da uzanabileceğini göstermektedir (58).

PD-1 aracılı sinyalleşmeye ek olarak, sinyallerin PD-1 ligandları tarafından dönüştürülebileceğini öne süren veriler vardır. Bu yolun işlevlerini, B hücre yanıtlarını düzenlemede tanımlamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyal

Deneyle süresince kullanılan kimyasal ve biyolojik materyaller Tablo 5.1’de, kullanılan cihaz ve gereç listesi ise Tablo 5.2’de verilmiştir.

Tablo 5.1. Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar

Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	Marka	Ürün Kodu
Lymphocyte Separation Medium	Capricorn	LSM-B
PBS (phosphate buffered saline solution)	Multicell	311-010-CL
APC anti-human CD19 Antibody (Ab.)	BioLegend	302212
APC Mouse IgG1, Isotype Ab.	BioLegend	400120
PE anti-human IFN- γ Ab.	BioLegend	506506
PE Mouse IgG1, Isotype Ab.	BioLegend	400139
Brilliant Violet 421™ anti-human IL-10 Ab.	BioLegend	501421
Brilliant Violet 421™ Rat IgG1, Isotype Ab.	BioLegend	400429
FOXP3 Monoclonal Ab., APC	eBioscience™	17-5773-80
Rat IgG2a Isotype Control, APC	eBioscience™	17-4321-81
IFN gamma Monoclonal Ab., PE-Cyanine7	eBioscience™	25-7311-41
Rat IgG1 Isotype Control, PE-Cyanine7	eBioscience™	25-4301-82
Rat IgG1 Isotype Control, PE-Cyanine7	eBioscience™	25-4301-81
PE-Cy™5 Hamster Anti-Mouse CD3e	BD Biosciences	553065
PE-Cy™5 Hamster IgG1, κ Isotype	BD Biosciences	553973
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Life Technologies	34554
Primerler	Sentegen	
Trizol	invitrogen	15596018
Glikojen	invitrogen	AM9510
Taq PCR Kit	New England Biolabs	E5000 S
UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water	invitrogen	11538646
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis	Roche	
Ethanol	Sigma-Aldrich	46139
RPMI-1640	Gibco	11875-093
Agaroz	Sigma-Aldrich	A9539

Paraformaldehit	Sigma-Aldrich	15127
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich	S7653
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma-Aldrich	P9541
Sodyum Fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich	S8282
Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich	S6014
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich	208337
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich	C1016

Tablo 5.2. Cihaz ve Gereç Listesi

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodu
Vortex	Benchmark Scientific	BV1000
0,2 mL PCR tüp	Isolab	123.01.002
ChemiDoc™ MP System	BioRAD	
dH ₂ O Cihazı	Millipore	ZRQSV8W
Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube	Sigma-Aldrich	Z666505
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Scientific	H400HSB
Santrifüj	Orto Alsera	Biocen 22R
Spectrometre cihaz	BioRAD	
T100™ Thermal Cycler	BioRAD	1861096
Tartı	Ohaus Explorer	EX124-US
24'lü Transwell chambers	Corning Costar	LS3464-48EA

5.2 Metotlar

5.2.1 Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Koşullar

5.2.1.1 Sağlıklı İnsan Kan Örnekleri

İstanbul Medipol Üniversitesi'nde anlaşılmış onam alınan, cinsiyet ve yaş uyumlu gönüllü 14 sağlıklı bireyden periferik venöz kanları, Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurallarına uygun olarak alınmıştır. Her vericiden, bir kez olmak üzere, 10 ml heparinli kan, İ. Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Bilimler BD'da alınmıştır. Sağlıklı vericilerden tüm serolojik sonuçları (HIV, HCV, HBV) negatif çıkanlar çalışmaya dâhil edilmiştir.

5.2.1.1.1 Periferik Mononükleer Kan Hücrelerinin Elde Edilmesi

Kişi başı 18 ml kan mor kapaklı EDTA'lı tüplerde gece boyu bekledikten sonra çalışılmaya başlandı. Tüplerdeki kan örnekleri 1:1 orında steril PBS1X ile sulandırıldı. Yeni bir 50 ml falcon tüpe 10 ml Lymphocyte Separation Medium, Density 1.077 g/ml, koyuldu ve tüp yatay pozisyonda iken serolojik tabanca ile yavaş bir şekilde üzerine sulandırılmış kan ilave edildi. İlave işlemi sırasında tüp yavaş bir hızla dik konuma getirildi. 50ml falcon tüp sarsılmadan 20 dakika, Arg-Brg 0, 2000 rpm hızında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan Periferik Mononükleer Kan Hücreler (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMCs) tabakaları bozulmadan 5 ml serolojik pipet yardımıyla yeni bir 15 ml falcon tüpe aktarıldı. PBMC'ler PBS1X ile 7 dakika 2000 rpm hızında santrifüj edilerek kalan ficoll temizlendi. Hücreler iki kez daha PBS ile 5 dakika 1500 rpm hızında santrifüj edilerek yıkandı. Pellet homojenize hale getirildi.

5.2.1.2 Fareler

Fare deneyleri Fransa'daki çalışma ortağımız olan INSERM U1184 laboratuvarlarında bulunan Dr. Y. Taoufik'in ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda, normal C57BL/6 farelerinin yanı sıra insanda "X-linked autoimmunity-allergic dysregulation" (XLAAD) sendromuna benzer bir tablo gösteren, FoxP3 geni mutant olan Scurfy fareleri (B6.Cg-Foxp3sf/J, JAX Mice, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, ABD) ve uygun kontrolleri kullanıldı. Scurfy fareleri spesifik patojensiz koşullar altında tutuldu. Fransa'daki ekip gözetiminde 4 haftalık C57BL/6 fareleri (erkek) ile Scurfy farelerinin hemizigot erkeklerinden elde edilen dalaklar, bistüri ile parçalanarak cell-strainerdan geçirildiler. 50 ml falcon tüpünde toplanan dalak hücreleri 1500 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı.

5.2.2 Çalışmada Kullanılan B ve T Hücreleri Eldesi

5.2.2.1 Manyetik Hücre Ayırımı

Saf CD19+ B ile CD4+ T hücreleri eş-kültür çalışmaları için manyetik hücre ayırımı (magnetic cell separation - MACS, Miltenyi Biotech) yöntemiyle saflaştırıldılar. Moleküler analizler için manyetik saflaştırma ile ayrılan CD19+ ve CD4+ hücreleri

cell sorting yöntemiyle %99 saflık seviyesinin üstünde saflaştırıldılar. Deneyler MACS kitlerinin tarifine uygun olarak gerçekleştirildi.

5.2.2.2 Akım Sitometrisi ve Floresan-Aktive Hücre Saflaştırma

Moleküler analizler için gereken yüksek saflıktaki insan hücreleri İstanbul Medipol Üniversitesi'nde mevcut bulunan 5 lazerli, 12 renkli Influx model flow sitometri temelli BD Influx cell sorting cihazı ile elde edildi. Fransa'da fare hücreleri için Pasteur İnstitüsü'nün cell sorting altyapısı kullanıldı. B ve T hücre belirteçlerinin ekspresyonları akış sitometrisiyle tespit edilip, değerlendirildi. Her deneyde, fluorokromlardan gelebilecek non-spesifik spektral sinyaller gerçekleştirilecek tek renk kompensasyon kontrol ile engellendi. Hücreler anti-CD4-FITC, anti-CD3-PerCP ve anti-CD19-APC antikoları ile işaretlendi. Hücre yüzeyi markajı: Hücreler FACS tamponu (1X PBS [phosphate buffered saline], 0,5% BSA, 0,05% NaAzide) ile yıkanıp, Fcγ Receptor'leri 15 dakika kadar bloklandıktan sonra, antikolar ile inkübe edildiler, sonra (30 dak., 40C'de, karanlık ortam) tekrar FACS tamponu ile yıkanıp analize hazır hale getirildiler. Hücre saflaştırmalarda yüzey işaretlenmesi steril koşullarda gerçekleştirildi. Pozitif popülasyon en parlak olarak işaretlenen hücrelerin en üst %25'lik kısmından, negatif popülasyon ise en zayıf işaretli popülasyonun en alt %20'lik kısmından seçildi. Saflaştırma %99'un üstünde gerçekleştirildiğinde kabul edildi. BD Influx'ta gerçekleştirilen işaretlemeler BD FACSDiva software kullanılarak analiz edildi. Elde edilen hücrelerin canlılığı trypan mavisi ile kontrol edildi.

İnsan PBMC'lerinde ve fare dalak hücrelerinde CD19+ B lenfositlerinin FoxP3 ekspresyonları flow sitometrik yöntem ile incelendi. İnsan hücreleriyle deneyler Türkiye'de İstanbul Medipol Üniversitesi REMER laboratuvarlarında mevcut bulunan Influx BD model cell sorting cihazı ile, fare deneyleri ise INSERM U1184 (Paris XI Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarı) BD LSRII Fortessa flow sitometri cihazı gerçekleştirildi. Hücre yüzeyi markajı: Hücreler PBS ile yıkanıp, antikolar ile enkübe edildikten sonra (15 dak., oda ısısında, karanlık ortam) tekrar PBS ile yıkanıp, %1 paraformaldehit ile fikse edilip analize hazır edildiler. Hücre içi efektör molekül markajı: Hücre yüzeyi işaretlemesi sonunda hücreler permeabilizan ve fikse edici bir solüsyonla enkübe edildiler (Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiStop, BD). Permeabilizasyon

sonunda hücreler anti-FoxP3 fluorokrom işaretli antikorlar ile soğuk ortamda 30 dak. enkübe edildiler. Enkübasyon sonunda hücreler permeabilizan ve fikse edici bir yıkama solüsyonuyla yıkayıp FACS analizine hazır oldular.

Cell sorting'ten alınan hücreler 1500 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Homojenize edilen hücreler 1,5 ml ependorf tüpü içerisine alındı. 1,5 ml ependorflar 1500 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı, üzerine 200 µl trizol ilave edilip -80°C ye konuldu.

5.2.3 B ve T Hücre Eş-kültürü

B hücrelerinin düzenleyici işlevlerinin anlaşılması için manyetik saflaştırma ile insanda periferik venöz kandan, farede dalaktan saflaştırılmış CD19+ B hücreleri ile CD4+ T hücreleri birlikte eş-kültüre (coculture) alındı. Eş-kültürden bir gün önce saflaştırılan B hücreleri serumsuz kültür ortamı ile yıkandıktan sonra anti-IgG/M antikorlu karışımı (20µg/ml) ve IL-2 (20U/ml) gece boyunca 24 kuyucuklu plaklarda uyarıldılar (10⁶ cells/ml). Ertesi gün uyarılmış (ve kontrol olarak uyarılmamış) B hücreleri (farklı oranlarda) CFSE (BD Horizon™) ile boyanmış ve anti-CD3 (10µg/ml) ve IL-2 (20U/ml) ile uyarılan CD4+ T hücreleriyle birlikte 7 gün boyunca eş-kültüre alındılar. Eş-kültürde B ve T hücre oranları (B:T): 4:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:4. Solübl faktörlerin anlaşılması için eş-kültürler ayrıca yarı geçirgen membran taşıyan 24 kuyucuklu Transwell chambers (Corning Costar) plaklarda da gerçekleştirildi. Kontrol gruplarında T hücreleri uyarılmamış B hücreleri ve B hücreleri uyarılmamış T hücreleri ile birlikte uyarıldılar. Düzenleyici B hücrelerinin işlevlerini sağlayan IL-10 ve TGF-β sitokinlerinin etkisini anlamak için ayrıca ortama söz konusu sitokinlerin etkisini durduran nötralizan antikorlarda eklendi (kontrol gruplarında da uygun negatif kontrol antikorları kullanıldı). Nötralizan anti-IL-10 (clone JES3-19F1, BioLegend, 10µg/ml) ile anti-TGFβ (clone TW7-28G11, BioLegend, 10µg/ml) antikorları, birbirlerinden ayrı veya birlikte uyarılmış B hücrelerinin T hücreleriyle eş-kültüre alınmaları esnasında ortama eklendiler. Hücrelerin proliferasyonunu gözlemlemek için 7. günün sonunda hücreler FACS'a götürülmek için hazırlandı. Bunun için, pleyttteki her kuyucuğun içindeki hücreler sırasıyla FACS tüpü içine konuldu. Toplamda 5 ml olacak şekilde PBS ile tamamlanıp, 1500 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra tekrar PBS ile 5 ml

tamamlanıp 5 dakika 1500 rpm hızında santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra her kuyucuğa 250 ml PBS eklenip FACS cihazına götürüldü.

5.2.3.1 T Hücrelerinin CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) ile Boyanması

T hücre proliferasyon testi için insan PMBC'lerinden ve fare dalak hücrelerinden saflaştırılan T hücreleri CFSE ile boyandılar. Hücreler 20 milyon hücre 1 ml'de olacak şekilde RPMI-1640 içinde 1µl/1ml CFSE eklenip, 10 dk 37°C sıcaklıktaki etüvde bekletildi. İnkübasyon sonunda hücreler 1500 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı. CFSE işaretli T hücreleri anti-CD3 monoklonal antikoru ile kaplı (kontollerde kaplı değil) 24'lü well plate'deki kuyucuklara dağıtıldı. Reaksiyon hücrelerin %10 FCS içeren RPMI 1640 ile yıkanmasıyla durdurulacaktır. İşaretlenmiş ve anti-CD3 ile uyarılmış T hücrelerinin proliferasyonu, B hücreleriyle eş-kültürün 5. günü, akan hücre ölçer (flow cytometry) ile CFSE düzeyi ölçülerek belirlenecektir.

5.2.4 RNA Ekspresyon Testi

5.2.4.1 mRNA Eldesi ve Kalitatif/Kantitatif PCR Testleri

-80°C'den çıkarılan trizol içindeki hücreler çözüldü. Hücreler 2 saniye bir vortex yapıp oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Hücreler üzerine 20 µl kloroform ilave edildi. +4°C' de 15 dakika bekletildikten sonra 4°C' de 15000g hızında 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yaklaşık 200 µl şeffaf faz yeni 1,5 ml ependorfa konuldu. Ependorfa sırasıyla 10µl glikojen ve 400 µl %100 etanol koyuldu. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilip 10 dakika 4°C' de 15000g hızında santrifüj edildi. Süpernatant 200µl mikropipet yardımı ile alınıp, pellet 1,5 ml ependorf içinde bırakıldı. 500 ml %70lik etanol eklenip 4°C' de 15000g hızında 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 1000µl mikropipet yardımı ile alınıp, pellet 1,5 ml ependorf içinde bırakıldı. Yaklaşık 30 dakika ependorfun kapağı açık bırakılarak alkolün uçması sağlandı. 10 µl UltraPure DNase/RNase-Free Distilled su koyuldu. 10 dakika boyunca 65°C Heat Block'ta bekletilip -80°C' e kaldırıldı.

5.2.4.2 cDNA Eldesi

Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit volume.11 kullanılarak cDNA elde edilmiştir. İlk karışım buz içerisinde son hacim 11,4 µl olacak şekilde hazırlanıp nuclease-free mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldıktan sonra aşağıda belirtilen protokol uygulanmak üzere T100™ Thermal Cycler cihazına koyuldu

Tablo 5.3 İlk cDNA İçerik Karışımı

Gereç	Son Konsantrasyon
Olido d(T) primer	2,5 µM
RNA	4 µg
Nuclease-free water	

Tablo 5.4 İlk cDNA Protokolü

Sıcaklık	Süre
65°C	10 dakika

10 dakikalık sürede 2. cDNA içerik karışımı hazırlandı. Sürenin sonunda tüpler hemen buz üstüne alınıp karışım dağıtıldıktan sonra son hacim 20 µl oldu. belirtilen protokole uygun olarak T100™ Thermal Cycler cihazına koyuldu.

Tablo 5.5 İkinci cDNA İçerik Karışımı

Gereç	Son Konsantrasyon
Reaction Buffer, 5x	1X
Protector RNase Inhibitor	20U
Deoxynucleotide Mix, 10 mM	1 mM
DTT	5 mM
Reverse Transcriptase	22U

Tablo 5.6 İkinci cDNA Protokolü

Sıcaklık	Süre
50°C	30 dakika
85°C	5 dakika

5.2.4.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA eldesi

Eldeki cDNA, New England Biolabs PCR Cloning Kit kullanılarak aşağıda belirtilen malzemeler ile PCR karışımı hazırlandı. Tüm tüplerde son hacim 20 µL tamamlandıktan sonra Hazırlanan PCR karışımı belirtilen PCR protokolü uygulanmak üzere T100™ Thermal Cycler cihazına koyuldu.

Tablo 5.7 Kontrol PCR Karışımı

Gereç	Son Konsantrasyon
10X Standard Taq Reaction Buffer	1X
10 µM Forward Primer	0.2 µM (0.05–1 µM)
10 mM dNTPs Karışımı	200µM
Taq Polimeraz	1.25 units/50 µl PCR
DNA	Değişken
Nuclease-free water	

Tablo 5.8 PCR Protokolü

Döngü	Sıcaklık	Süre
1	95°C	1 dakika
40	95°C	30 saniye
40	58°C	30 saniye
40	72°C	1 dakika
1	72°C	5 dakika

5.2.5.4 Agaroz Jel Elektroferezi ve Görüntülenmesi

40 mM Tris, 20 MM Glasiyal asetit asit, 1 Mm pH:7,6 EDTA karışımından oluşan 100 µL 1X TAE tampon çözeltisine 1 gr agaroz eklendi ve agaroz çözününceye dek (yaklaşık 3 dk) 200°C’de kaynatıldı. Berraklaşmış çözeltiliye 2 µL Red-Safety eklenerek yükleme tarakları takılmış elektroforez kasetine döküldü. Jel kıvamına geldiğinde 1X TAE tampon çözeltisi ile doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirildi. Birinci kuyucuğa 2 µL belirteç yüklenirken, diğer kuyucuklara ise 5 µL PCR ürünü 1 µL yükleme boyası ile karıştırılarak yüklendi. 35 dakika 90V’da yürütüldü. Yeteri kadar yürüyen jel BioRAD ChemiDoc cihazında görüntüledi.

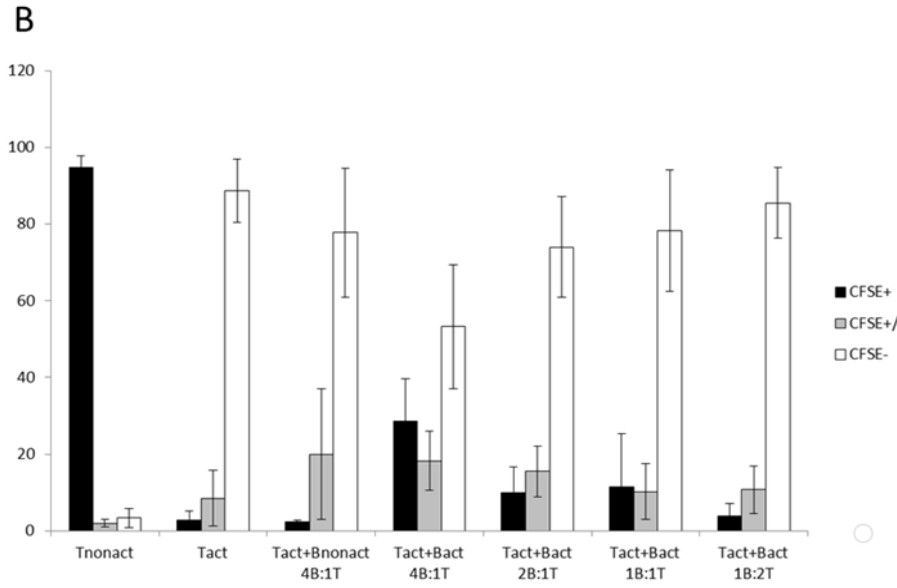
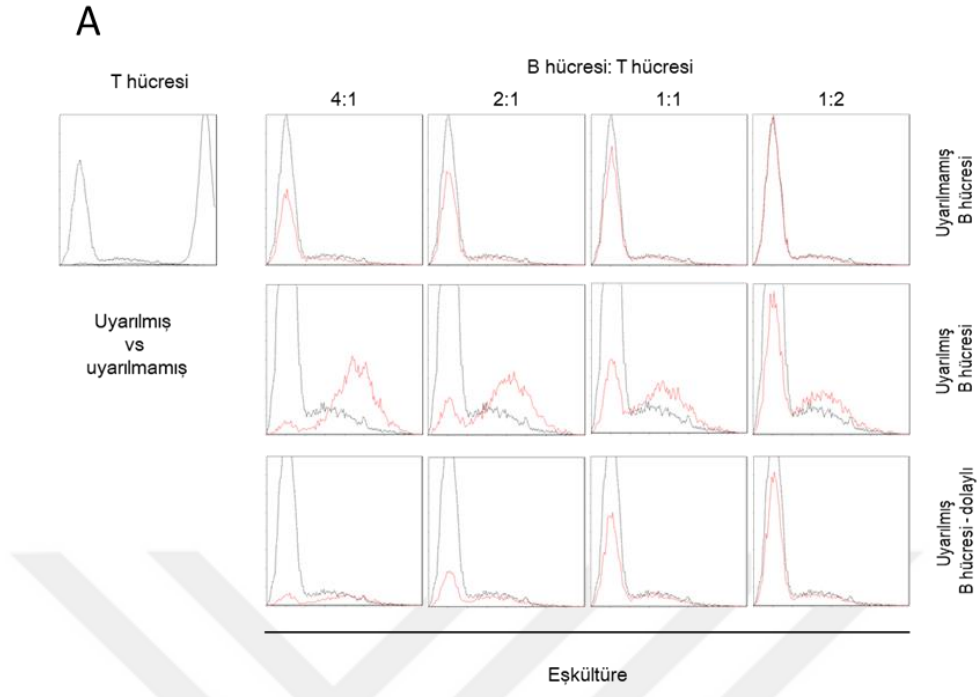
5.2.5.5 Kantitatif PCR

FoxP3 ve glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA düzeyleri Light Cycler-based kinetic kantitatif PCR (Roche Diagnostics) tekniği ve cihazıyla ölçüldü. FoxP3 ve GAPDH PCR ürünleri FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) ile tespit edildi. PCR ürün miktarlarının tespiti için eksternal DNA konsantrasyon dereceleri kullanıldı. FoxP3 kantifikasyon sonuçları GAPDH miktarlarıyla oranlanarak normalize edildi. Sonuçlar normalize değerlerin deney kontrol gruplarına oranlanarak *fold increases* olarak sunuldu.

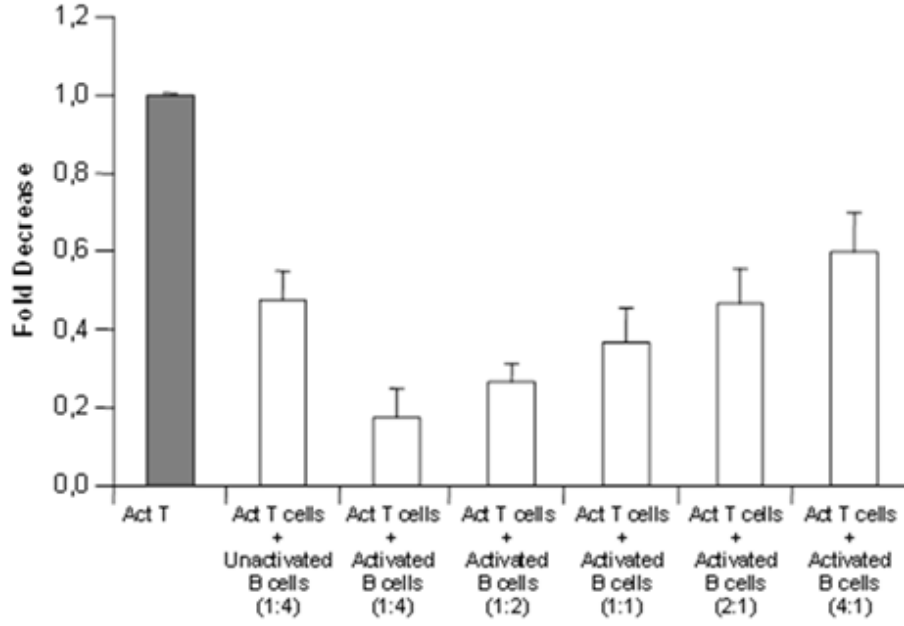
6.BULGULAR

6.1 İnsan B hücrelerinin T Hücre Cevabına Regülatör Etkisi

B hücrelerinin düzenleyici etkilerinin anlaşılması için uyarılmış B hücrelerinin T hücre proliferasyonuna olan etkileri incelendi. CFSE ile işaretlenmiş anti-CD3 ile aktive edilmiş T hücreleri ve [IgG + IgM] ile aktive edilmiş B hücreleri farklı oranlarda (4B:1T; 2B:1T; 1B:1T; 1B:2T) bir araya getirildi. Bir haftalık inkübasyon sonunda aktive olmuş ve olmamış T hücrelerinde ki CFSE değişimi ölçüldü (Şekil 6.1A). Ortamda B hücrelerinin bulunmadığı aktive olmuş T hücrelerinde hücrelerin ortalama %89'u CFSE negatif olmasına karşın uyarılmamış T hücrelerinde (negatif kontrol) yaklaşık hücrelerin %95'i CFSE pozitif kalmıştır (Şekil 6.1B). Uyarılmış T hücreleriyle uyarılmamış B hücrelerinin (4B:1T oranında) eş-kültürü sonucunda, T hücrelerinin ortalama %78'i CFSE negatiftir (pozitif kontrolle benzer yüzde) (Şekil 6B). Buna karşın aktive olmuş T ve B hücrelerinin eş-kültüründe, ortamda bulunan B hücre oranına uygun olarak CFSE negatif T hücre yüzdesi artmıştır (Şekil 6.1B). En düşük CFSE negatif T hücre yüzdesi 4B:1T oranında gözlenmiştir, %53 (Şekil 6.1B). Sonuçlar proliferasyon inhibisyonunun ortamdaki mutlak hücre sayısından bağımsız olduğunu, ancak B hücrelerinin aktivasyon durumlarına bağlı olduğunu göstermektedir. Çünkü benzer oranda (4B:1T) uyarılmamış B hücreleri T hücre proliferasyonunu inhibe etmezken (CFSE- T hücre ortalama %78), uyarılmış B hücreleri inhibe etmektedir (CFSE- T hücre ortalama %53). Uyarılmış B hücreleri B:T hücre oranıyla uyumlu olarak T hücre proliferasyonu azalmıştır. Aktive olmuş B hücreleri (4B:1T) oranında T hücre çoğalmasını 5 kat azaltmışlardır (şekil 6.2). Ortamda aktive olmuş B hücre oranı T hücrelerine kıyasla azalmasıyla proliferasyon inhibisyonu anlamlı olarak azalmaktadır.



Şekil 6.1 A: Aktive edilmiş ve aktive edilmemiş T hücreleri CFSE değişimi
B: Uyarılmış T hücreleriyle uyarılmamış B hücrelerinin (4B:1T oranında) eş-kültürü

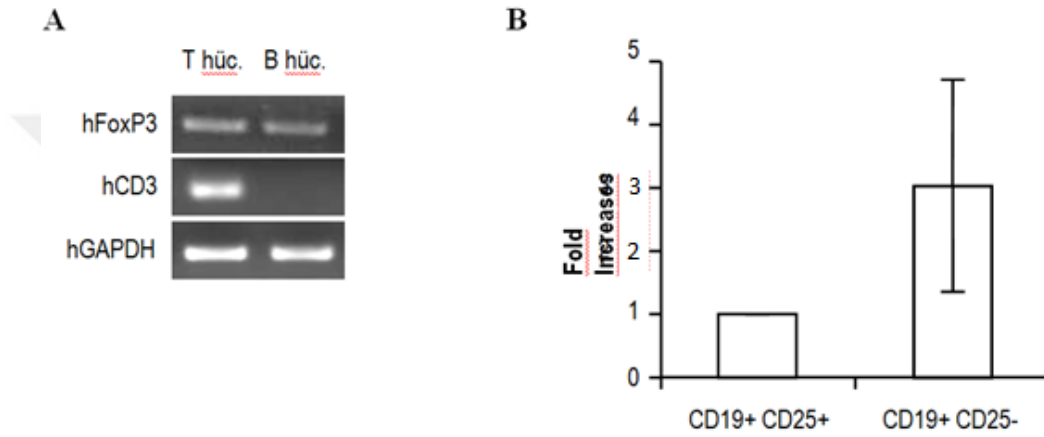


Şekil 6.2: Aktive edilmiş T hücrelerinin, aktive edilmemiş ve aktive edilmiş B hücreleri ile farklı oranlardaki birlikteliğine göre değişim grafiği

6.2 İnsan B Hücrelerinde mRNA Seviyesinde FoxP3 Ekspresyonu Mevcut

B hücrelerinin T hücre proliferasyonuna olan negatif etkisini gözlemledikten sonra B hücrelerinin gösterdiği bu etkinin Treg hücre belirteci olan FoxP3-bağımlı olup olmadığı incelenmiştir. Çalışmamızda ilk aşamada insan B hücrelerinde FoxP3 ekspresyonu araştırılmıştır. Bunun için, FACS ile elde edilen uyarılmamış B ve T hücreleri kullanılmıştır. B ve T hücrelerinin PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil 6.3A' da görüldüğü üzere B hücreleri FoxP3 ekspresyonuna sahiptir. B hücrelerinde görülen FoxP3 ekspresyonunun T hücre kontaminasyonu sonucu olup-olmadığının anlaşılması için B ve T örneklerinde CD3 ekspresyonuna bakıldı. T hücrelerinde, T hücre belirteci olan, CD3 ekspresyonu tespit edilirken, B

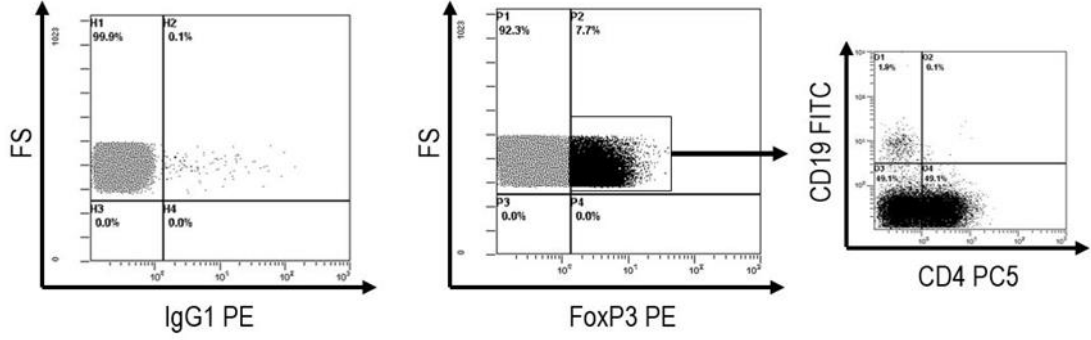
hücre örneklerinde tespit edilmedi. Sonuç olarak B hücre örneklerinde tespit edilen FoxP3 mRNA ekspresyonu bir T hücre kontaminasyonundan dolayı görülmemiştir. Treg hücrelerinin bir diğer belirteci CD25 molekülüdür. B hücrelerinde FoxP3 ile CD25 ekspresyonlarında bir korelasyon olup-olmadığı incelenmiştir. B hücreleri CD25- ve CD25+ olarak cell sorting ile saflaştırıldılar. T hücrelerinde gözlemlenenin tersine, B hücrelerinde FoxP3 mRNA ekspresyonu özellikle CD25- hücrelerde tespit edilmiştir (şekil 6.3B).



Şekil 6.3 A: B ve T agoroz jel sonuçları B: FoxP3 pozitif B hücrelerinde CD25 miktarı

6.3 Anti-IgG ve IgM Varlığında B Hücrelerine FoxP3 Ekspresyon Artışı

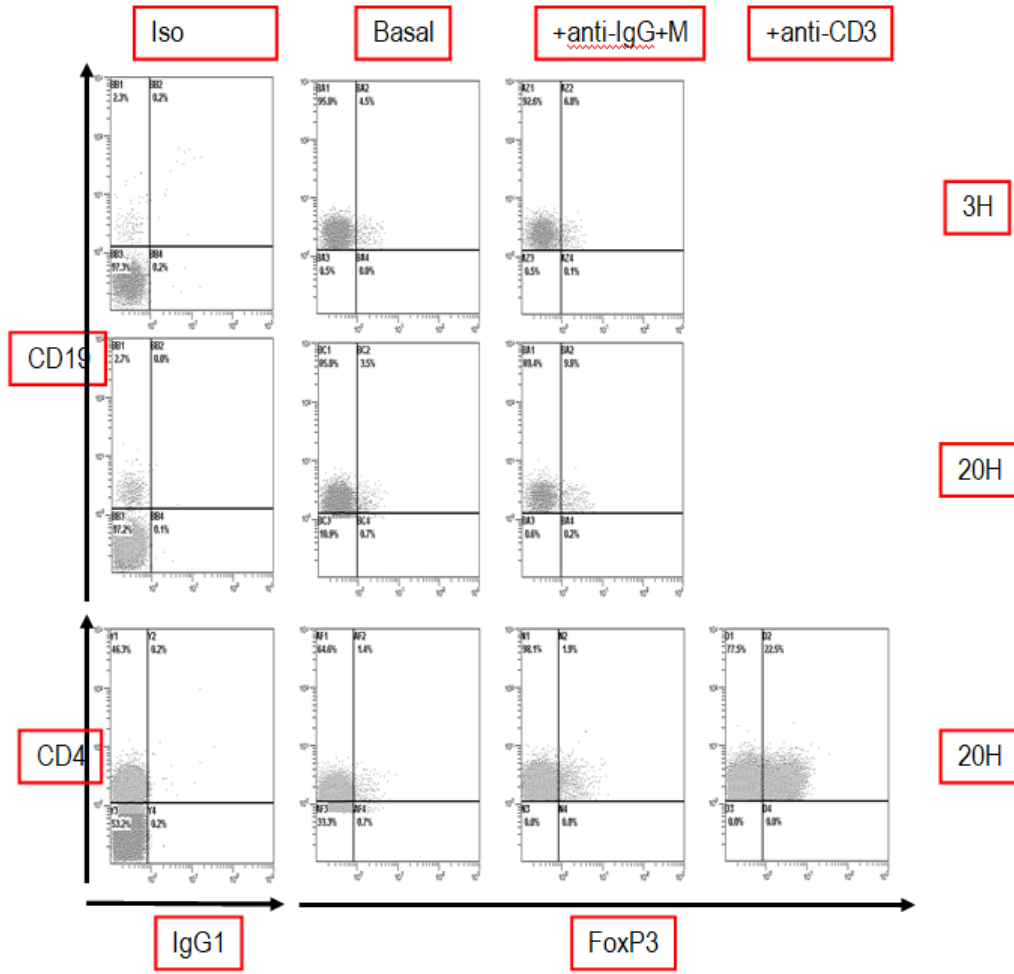
B hücrelerinde FoxP3 ekspresyonunda sorumlu mRNA varlığı gösterildi ve bir sonraki aşama olarak ürün varlığı yani protein sentezi olup olmadığı kontrol edildi. Şekil 6.4'te görüldüğü üzere, ekspresyon yüzdeleri açısından bireyler arasında fark gözlemlenmesine rağmen, bazal seviyede B hücrelerinde FoxP3 protein ekspresyonu tespit edilmiştir. Bunun için B hücreleri IgG ve IgM antikör karışımı ve IL-2 ile uyarıldı ve 20 saat sonunda FoxP3 protein ekspresyonları FACS yöntemiyle kontrol edildi. Pozitif kontrol olarak anti-CD3 ile uyarılmış T hücreleri kullanıldı. B hücreleri ilk 3 saat FACS ölçümlerinde bazal seviyede FoxP3 % 4.5 gibi bir orana sahipken anti IgG-M+IL-2 ile uyarılmış B hücreleri % 6.8 FoxP3 ekspresyonuna sahiptir (Şekil 6.5).



Şekil 6.4: PBMC'lerde uyarılmamış hücrelerde FoxP3 popülasyonunda B ve T hücre oranları tespiti

Bunun için B hücreleri IgG ve IgM antikor karışımı ve IL-2 ile uyarıldı ve 20 saat sonunda FoxP3 protein ekspresyonları FACS yöntemiyle kontrol edildi. Pozitif kontrol olarak anti-CD3 ile uyarılmış T hücreleri kullanıldı. B hücreleri ilk 3 saat FACS ölçümlerinde bazal seviyede FoxP3 % 4.5 gibi bir orana sahipken anti IgG-M+IL-2 ile uyarılmış B hücreleri % 6.8 FoxP3 ekspresyonuna sahiptir (Şekil 6.5). Uyarımdan 20 saat sonra ise bazal seviyede B hücrelerinde FoxP3 seviyesi %3.5'a düşerken uyarılmış B hücrelerinde %9.8'a yükselmiştir. Bunun yanı sıra, T hücrelerinde 20. saat gözleminde bazal seviye ve IgG-M+IL-2 uyarımında yaklaşık aynı miktarda (%1.4-1.9) FoxP3 ekspresyonu gözlenirken anti-CD3 ile uyarılan T hücrelerinde ise FoxP3 ekspresyonu yaklaşık 20 katına çıkarak %22.5 olmuştur (Şekil 6.5).

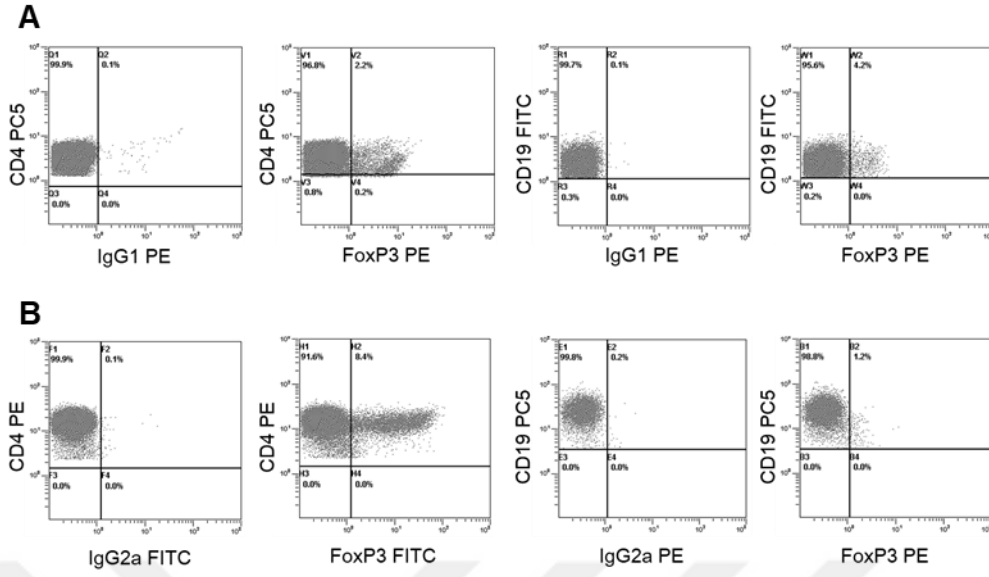
Deney sonuçları insan B hücrelerinde bazal seviyede FoxP3 protein ekspresyonunun bulunduğu ve BCR uyarımlarının bu ekspresyonu arttırdığını göstermektedir.



Şekil 6.5: B ve T hücrelerinde 20. saat FoxP3 ekspresyonları

6.4 Farklı Klona Sahip Antikorlarca Farklı İzoformdaki Proteinleri Tanınması

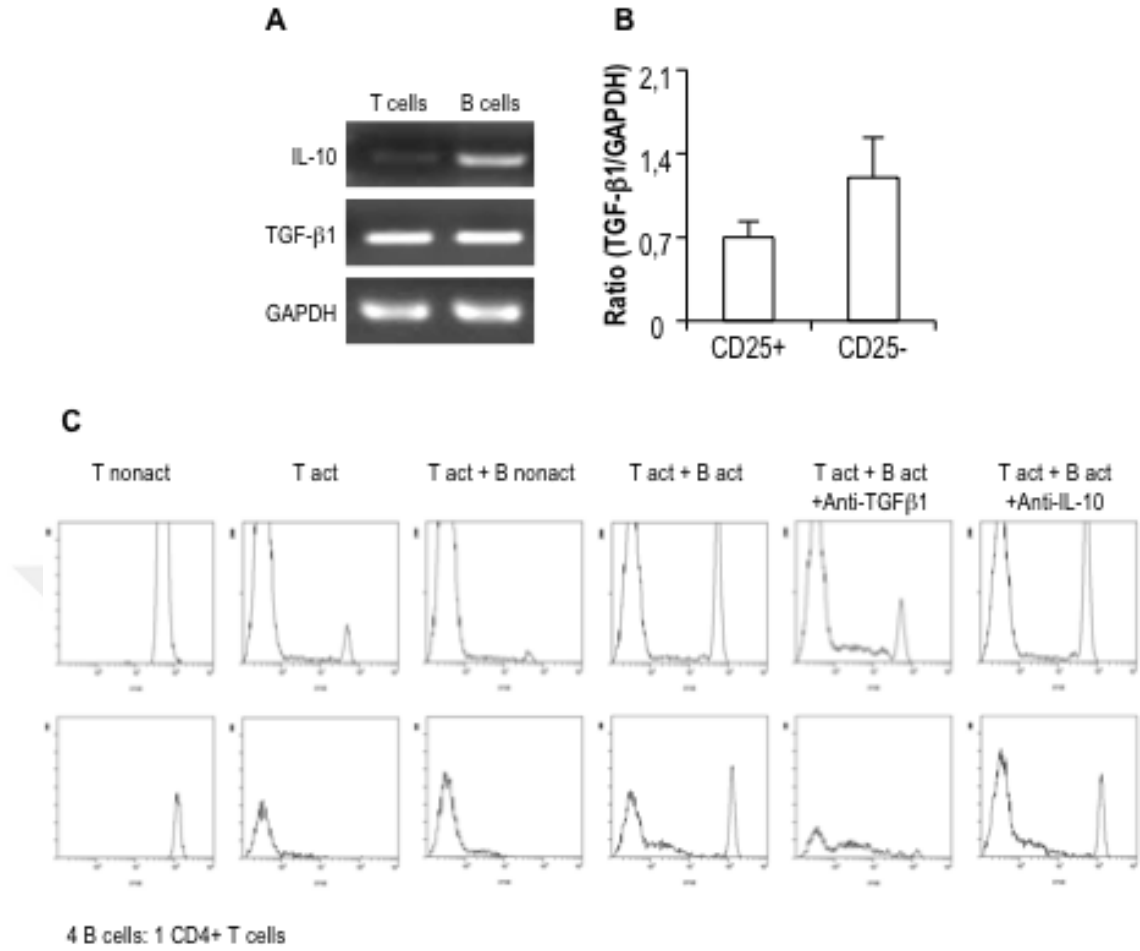
İnsan B hücrelerinde FoxP3 protein ekspresyonu anti-insan FoxP3 antikor (hFOXY klonu) ile gösterildi (şekil 6.6A). FACS sonuçlarını teyit etmek için farklı bir anti-insan FoxP3 klonu kullanıldı (PCH101 klonu). Deneyler PCH101 klonu ile tekrarlanarak T ve B hücrelerinde Foxp3 ekspresyonuna bakıldı (Şekil 6.6B). Uyarılmamış B hücrelerinde hFOXY klonu ile işaretleme sonucu Foxp3 ekspresyonu %4.2 iken (şekil 6.6A), PCH101 klonu ile yapılan işaretleme %1.2'dir (şekil 6.6B). B hücrelerindeki orana ters olarak T hücrelerindeki FoxP3 ekspresyonu hFOXY klonu ile %2.2, PCH101 klonuyla FoxP3 ekspresyonu yaklaşık 4 katına çıkararak %8.4 olarak tespit edilmiştir (şekil 6.6B). Klonlar arasında farklı sonuçlar çıkmasının nedeni söz konusu antikorların farklı FoxP3 izoformlarını tanıması olabilir.



Şekil 6.6: İnsan venöz kanından ficoll sonrası elde edilen PBMC ex vivo işaretleme. **A:** Anti-insan FoxP3 PE (hFOXY klonu) ve kontrol izotipi (fare IgG1 PE). **B:** Anti-insan FoxP3 FITC (PCH101 klonu) ve kontrol izotipi (sıçan IgG2a FITC)

6.5 TGF- β 1'in B Hücreleri Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

Şekil 6.7A'da B ve T hücrelerinde IL-10 ve TGF- β 1 varlığı gösterilmiştir. Şekil 6.7B'de ise TGF- β 1 mevcudiyetinin B hücrelerinde T hücrelerinin neredeyse 2 katı olduğu görülmektedir. 2 farklı bireyde yapılan CFSE ile işaretlemeli proliferasyon deneylerinde (şekil 6.7C) TGF- β 1 ve IL-10'un etkisi incelendi. Aktive edilmiş T ve B hücrelerinin 4B:1T oranında bir araya getirildiği çalışmada T hücrelerinde azalma olduğu görülmektedir. Ortama eklenen nötralizan anti-IL-10 antikorunu aktive edilmiş B hücrelerinin T hücre proliferasyonunu düzenleyen etkisini azalttığı gözlemlenmiştir. Bunun aksine, aktive edilmiş B ve T hücrelerine eklenen nötralizan anti-TGF- β 1 antikorunun B hücrelerinin düzenleyici etkisine etkisi gözlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar B hücrelerinin düzenleyici etkisinin IL-10 bağımlı, TGF- β 1'dan bağımsız gerçekleştiğini düşündürmektedir.



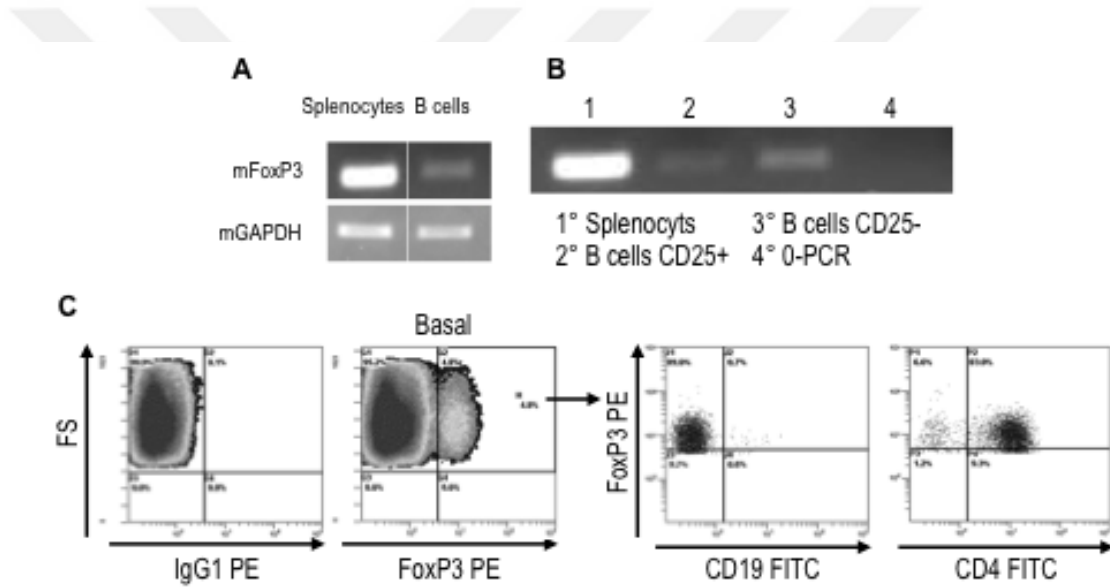
Şekil 6.7 A: B ve T hücrelerinde IL10 ve hTGF-β1 agoroz jel sonuçları **B:** CD25+ ve CD25- B hücrelerinde hTGF-β1 oranı (TGF-b1 kantifikasyon değerleri GAPDH miktarlarıyla normalize edilmiştir) **C:** B-T hücre eş-kültüründe TGF-β1 ile IL-10 sitokinlerinin T hücre proliferasyonuna etkilerinin ölçülmesi

6.6 Fare B Hücrelerinde mRNA ve Protein Seviyelerinde FoxP3 Ekspresyonu Mevcut

Çalışmamızın sonuçları, insan B hücrelerinde gerek mRNA, gerekse de protein düzeylerinde FoxP3 ekspresyonlarının bulunduğunu göstermektedir. Ancak söz konusu faktörün B hücrelerinin T hücre yanıtını düzenleyici işlevlerine etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda fare Scurfy modeli kullanılarak FoxP3'ün B hücrelerinin düzenleyici işlevlerine etkisi incelenmiştir. İlk aşamada insan B hücrelerinde gözlemlenen düzenleyici etkinin (proliferasyona inhibisyonu) ve FoxP3 ekspresyonunun fare B hücrelerinde de mevcudiyeti test edilmiştir.

Farenden alınan dalaktan cell sorting ile saflaştırılan B hücrelerinde ex vivo olarak elde edilen RNA'larda FoxP3 mRNA'sı tespit edildi (şekil 6.8A). Deneysel çalışmalar, insan B hücrelerine benzer şekilde, fare dalak B hücrelerinin CD25-popülasyonda, CD25+ B hücrelerine göre artmış bir FoxP3 mRNA ekspresyonu gözlemlenmektedir (şekil 6.8B).

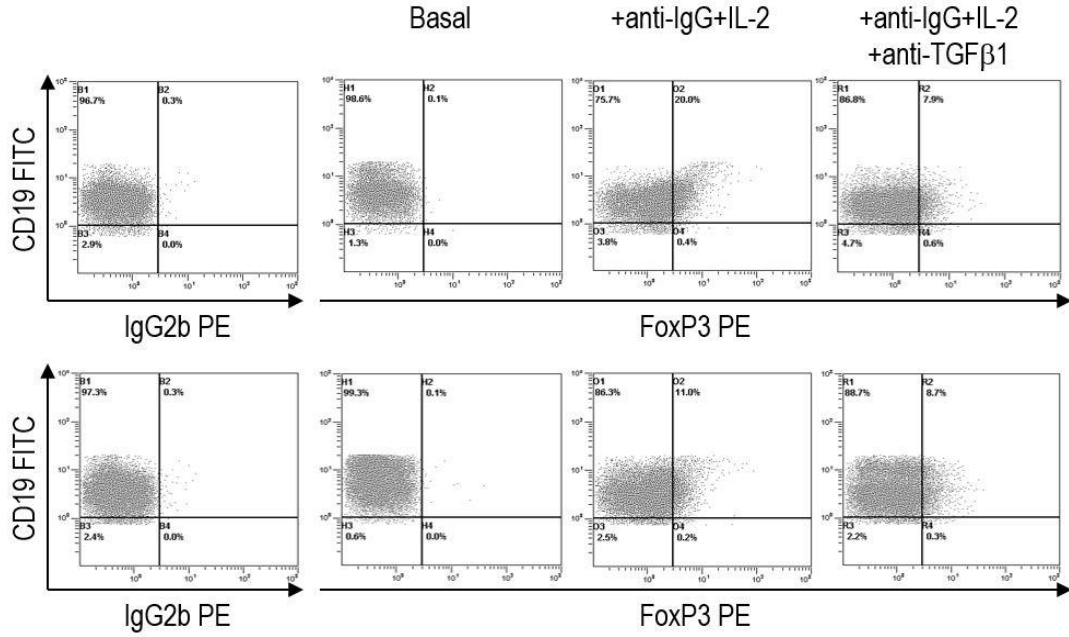
FoxP3'ün protein düzeyindeki ekspresyonu FACS yöntemiyle incelendi. Bu çalışmada, teknik sınırlardan ötürü, tek bir antikor klonu kullanıldı. Aktive edilmemiş B ve T hücrelerinde FoxP3 ekspresyonuna bakıldığında faredeki B hücrelerinde FoxP3 ekspresyonunun olmadığı, T hücrelerinin ise FoxP3 ekspresyonunun %93'ünü oluşturduğu görülmektedir (şekil 6.8C).



Şekil 6.8 A: Toplam splenositlerde ve saflaştırılmış B hücrelerinde ex vivo koşullarda FoxP3 mRNA ekspresyonu. **B:** CD25+ ve CD25- B hücrelerinde FoxP3 mRNA ekspresyon analizi. **C:** Dalak B ve T hücrelerinde, ex vivo koşullarda, FoxP3 protein ekspresyonunun FACS ile incelenmesi

Bazal seviyede fare B hücrelerinde FoxP3 protein düzeyinde ekspresyonunun bulunmaması üzerine fare B hücrelerinde aktivasyon koşullarında FoxP3 ekspresyonuna bakıldı. Dalaktan saflaştırılan B hücreleri anti-fare IgG ve IL-2 ile uyarıldı. Deneysel sonuçlar BCR+IL-2 uyarımı sonucu protein düzeyinde B hücrelerinde FoxP3 ekspresyon artışı tespit edildi, birbirinden bağımsız iki farklı deneyde yaklaşık %11 ve %20 oranında (şekil 6.9). Ortama eklenen nötralizan anti-TGF- β 1 antikorları BCR+IL-2 uyarımının FoxP3 ekspresyonuna etkisini azalttığı

gözenmiştir (birbirinden bağımsız iki deneyde yaklaşık %7.9 ve %8.7'ye düştüğü görüldü) (Şekil 6.9).

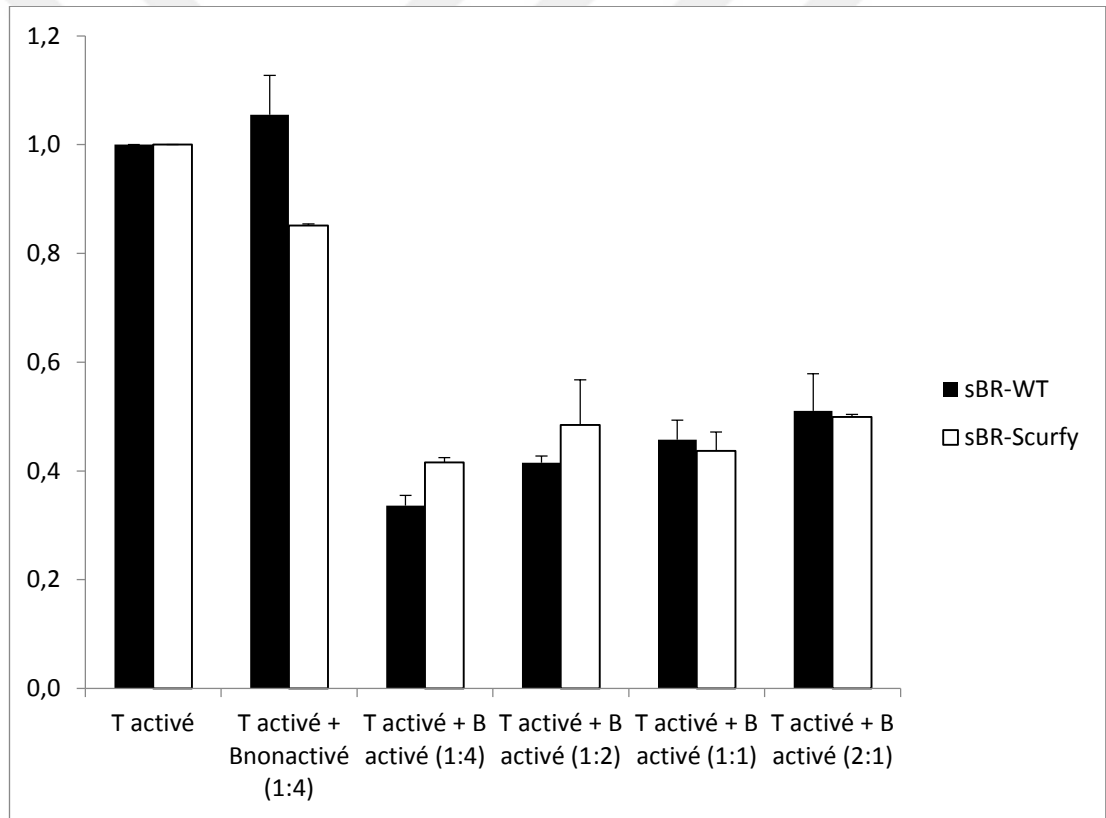


Şekil 6.9: Birbirinden bağımsız iki farklı deneyde fare dalak hücrelerinden elde edilen B hücreleri anti-IgG ve IL-2 ile uyarımı sonrası TGF-β1 sitokininin etkisi ortama eklenen nötralizan anti- TGF-β1 antikoruyla incelenmesi

6.7 Fare B Hücrelerinin T Hücre Proliferasyonuna Olan Düzenleyici Etkileri FoxP3 Faktöründen Bağımsız

Deneysel çalışmalarımız gerek insan, gerekse de fare B hücrelerinde FoxP3 ekspresyonunun bulunduğunu göstermiştir. Ancak söz konusu faktörün B hücrelerinin T hücre işlevlerine olan düzenleyici işlevlerine olan etkisi bilinmemektedir. FoxP3'ün etkisini anlayabilmek için FoxP3 geni mutant ve işlevsiz olan Scurfy fareleri deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Söz konusu farelerin hemizigot erkeklerinden (Scurfy) ve cinsiyet-yaş uyumlu kontrol (WT) farelerinden elde edilen B ve T hücreleri eş-kültüre alınıp, proliferasyon testleri gerçekleştirildi. Daha önceki proliferasyon testlerine benzer şekilde B hücreleri eş-kültürden bir gün önce anti-IgG+IL-2 koşullarında uyarıldılar. Proliferasyon testinin ilk günü T hücreleri yöntemde belirtildiği gibi CFSE ile boyandı ve anti-fare CD3 antikoruna ile kaplı kuyucuklarda uyarıldılar. Bu uyarımın başlangıcında farklı oranlarda B hücreleri

kültür ortamına eklendi. Eş-kültür ortamında gözlemlenen etkilerin salt hücre yoğunluğundan kaynaklanıp-kaynaklanmadığının test edilebilmesi için maksimal aktive olmuş B hücre sayısına (4B:1T) benzer şekilde uyarılmamış B hücresi de ortama eklenmiştir (4B:1T). Deney sonuçları aktive olmuş B hücrelerinin T hücre proliferasyonunu Scurfy farelerinde, kontrol farelere benzer şekilde, B:T oranıyla doğru orantılı olarak inhibe ettiğini göstermektedir (şekil 6.10). Yine benzer şekilde aktive olmamış B hücrelerinin T hücre proliferasyonuna her iki fare grubunda da etki etmediği gözlenmiştir (şekil 6.10). Bu sonuçlar B hücrelerinin T hücre proliferasyonuna olan etkilerinin FoxP3 faktöründen bağımsız olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 6.10: Scurfy ve WT farelerinde B hücrelerinin T hücre proliferasyonuna etkilerinin incelenmesi

7.TARTIŞMA VE SONUÇ

B hücreleri, immün sistemde gerek antikor sentezleyerek gerekse immün cevabı düzenleyici fonksiyonlar göstererek önemli bir role sahiptir. B lenfositlerinin negatif regülatör etkenlerinin yanı sıra anti-tümöral yanıtı inhibe edici olduğu da yeni çalışmalarla gösterilmektedir. B hücreleri T hücreleri ile birlikte immün cevap oluşturmada rol oynamakta ve birbirleriyle olan ilişkileri immün yanıtı da etkilemektedir.

Çalışmamızda uyarılmış B hücrelerinin T hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterildi. Gerçekleştirdiğimiz moleküler mekanizmalara yönelik incelemelerde B hücrelerinin düzenleyici özelliklerinin FoxP3 ile ilgili olup olmadığını anlamak için öncelikli olarak FoxP3 varlığına bakıldı ve B hücrelerinin FoxP3+ olduğu gösterildi. B hücrelerinde FoxP3 mRNA varlığı gösterilse de net bir protein varlığı ortaya konulmamıştır.

T hücre proliferasyon inhibisyonunun FoxP3 ile ilişkisini netleştirmek için model organizma olarak mutasyon sonucu FoxP3 geni işlevsiz hale gelen Scurfy fareleri kullanıldı. Scurfy ve WT farelerde B hücrelerinin T hücre proliferasyonuna etkileri gözlemlendi ve B hücrelerinin T hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerinin FoxP3'ten bağımsız olduğu tespit edildi.

Fare dalağı ve insan periferik kanından elde edilen bulgulara göre (şekil 6.3A, şekil 6.8) B hücrelerinin bir kısmı FoxP3+ özellik göstermektedir. Ayrıca bu B hücrelerinin CD25+ ve CD25- olduğu gösterildi. Tregler CD4+ CD25+ FoxP3+ özellikli olup timustan kökenlenerek gelişmektedir. Aktive edilmiş B hücrelerinin CD4+ CD25- T lenfositlerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gözlemlendi. Uyarılmış B hücrelerinin etkisinin çözünebilir moleküller aracılığıyla gerçekleştiği B ve T hücreleri yarı geçirgen bir membran ile ayrılmış olarak eşkültüre alınması ile gösterildi.

IgG ve IgM ile aktiflenmiş B hücrelerinde FoxP3 etkisi incelendiğinde FoxP3 artışı gözlenmektedir. Bireyden bireye farklılık gösteren mRNA ekspresyonlarının bulunmasından dolayı (şekil 6.7), proteininin de görülmesi beklendi. Ancak iki farklı klonla yapılan deneylerde neredeyse birbirine tamamiyle zıt sonuçlar elde edildi. Bu sonuç farklı izoformların tanınması ile ilişkili olabilir. Scurfy farelerinde

gerçekleştirilen deneyler B hücrelerinde bulunan FoxP3'ün T hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu, FoxP3'n B hücreleri düzenleyici rolü olmayabileceğini düşündürmektedir. Yine de ortaya çıkan ürün farklılıkları FoxP3 izoformları üzerine yapılacak çalışmalar ile ilerletilebilir. Elde ettiğimiz sonuçlar dâhil olmak üzere şu ana kadar yapılan çalışmalarda FoxP3'ün B hücreleri üzerindeki işlevleri henüz tam olarak ortaya konulmamıştır.

B hücrelerinin düzenleyici etkilerinden birçok faktör sorumludur (IL-10, TGF- β 1 gibi). PD-L1'de B hücrelerinin düzenleyici rol oynamasında yer almaktadır. Bu doğrultuda yaptığımız çalışmada fare dalak hücrelerinde PD-L1 ekspresyonlarına bakıldı. LPS ile aktiflenmiş B hücrelerinde anlamlı şekilde PD-L1 ve CTLA-4 ekspresyonunda artış gözlemlendi. Daha sonraki çalışmalarda bu faktörlerin düzenleyici rolleri incelenecektir (sonuçlar gösterilmedi). Bazal seviyede B hücrelerinde yüksek oranda mevcut olan PD-1 ekspresyonu, PD-L1'in tersine, TLR uyarımında artış göstermemektedir.

Bu zamana kadar regülatör B hücreleri, fenotiplerindeki farklılıkların yanı sıra etki mekanizmalarında gösterdikleri farklılık dolayısıyla alt kümelere ayrılmaktadır. Çeşitli deneysel modellerde gösterilen aktive olmuş fare B hücrelerinin önemli miktarlarda IL-10 üretebilmesi Breg hücreleri için tanımlayıcı özelliklerden biridir.

Breg hücrelerinin IL-10 üretimi ile Th1/Th2 dengesini yeniden kurabildiği ve inflamatuvar yolları direkt olarak inhibe edebildiği, TGF- β 1 üretimi ile efektör T hücrelerin apoptozisini indüklediği ve sekonder aktive CD4+ T hücrelerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Çalışmamız, BCR ve IL-2 ile birlikte uyarılmış B hücrelerinin, FoxP3 ve TGF- β 1'den bağımsız, fakat ortamda bulunan IL-10'a bağımlı olarak, uyarılmış T hücrelerinin proliferasyonunu B:T hücre oranıyla doğru orantılı olarak inhibe ettiğini göstermiştir. Yapılan uyarımların sonucunda IL-10 ve TGF- β 1 mRNA'sı gözlemlenirken sitokinler bloklandığında sadece anti-IL-10 gözlenmektedir. Bunun nedeni bu uyarımlarda yeteri kadar güçlü bir TGF- β 1 sentezinin olmaması olabilir. Bunun yanı sıra, TGF- β 1 protein sentezine dair elde edilmiş veri yoktur.

Breg hücrelerinin fonksiyonlarını çözümlmek ve immün cevap oluşumundaki etkileşimlerini anlamak immün yanıt düzenlemesinin diğerk mekanizmalarını geliştirmek için önemlidir.



8.KAYNAKLAR

1. Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010 May;125(5):1114–1124.e8.
2. Rosser EC, Mauri C. Perspective Regulatory B Cells : Origin , Phenotype , and Function. *Immunity* [Internet]. 2015;42(4):607–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>
3. Yang M, Rui K, Wang S, Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cellular and Molecular Immunology* [Internet]. 2013 Mar 7;10(2):122–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4003045/>
4. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Journal of Immunology*. 2017 Feb;198(3):981–5.
5. Mauri C, Bosma A. Immune Regulatory Function of B Cells. 2012;10.
6. Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*. 1994 Jul;1(4):291–301.
7. Melchers F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nature reviews Immunology*. 2005 Jul;5(7):578–84.
8. Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*. 1996 Sep;86(6):897–906.
9. ten Boekel E, Melchers F, Rolink AG. Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression. *Immunity*. 1998 Feb;8(2):199–207.
10. O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, et al. BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma

- Cells. *The Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2004 Jan 5;199(1):91–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1887725/>
11. Yuan D, Tucker PW. Regulation of IgM and IgD synthesis in B lymphocytes. I. Changes in biosynthesis of mRNA for mu- and delta-chains. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1984 Mar;132(3):1561–5.
 12. Yu X, Tsibane T, McGraw PA, House FS, Keefer CJ, Hicar MD, et al. Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature*. 2008 Sep;455(7212):532–6.
 13. Durali D, de Goer de Herve M-G, Giron-Michel J, Azzarone B, Delfraissy J-F, Taoufik Y. In human B cells, IL-12 triggers a cascade of molecular events similar to Th1 commitment. *Blood*. 2003 Dec;102(12):4084–9.
 14. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature immunology*. 2000 Dec;1(6):475–82.
 15. Tobón GJ, Izquierdo JH, Cañas CA. B Lymphocytes : Development , Tolerance , and Their Role in Autoimmunity — Focus on Systemic Lupus Erythematosus. 2013;2013.
 16. Komori T, Okada A, Stewart V, Alt FW. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* (New York, NY). 1993 Aug;261(5125):1171–5.
 17. Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, Wood C, Thomas E, Boss M, et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *The EMBO journal*. 1984 Jun;3(6):1209–19.
 18. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* [Internet]. 1983 Apr 14;302:575. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/302575a0>
 19. LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood*. 2000 Jul;96(1):9–23.
 20. Obukhanych T V, Nussenzweig MC. T-independent type II immune responses

generate memory B cells. *The Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2006 Feb 20;203(2):305–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2118207/>

21. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *2000;102:553–63.*
22. Yanaba K, Bouaziz J-D, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 2008 May;28(5):639–50.
23. Sato S, Ono N, Steeber DA, Pisetsky DS, Tedder TF. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 1996 Nov;157(10):4371–8.
24. Sato S, Steeber DA, Tedder TF. The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995 Dec;92(25):11558–62.
25. Yanaba K, Bouaziz J-D, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* [Internet]. 2009 Jun 15;182(12):7459–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3733128/>
26. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2007 Mar;178(6):3447–56.
27. Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y. The Calcium Sensors STIM1 and STIM2 Control B Cell Regulatory Function through Interleukin-10 Production. *Immunity* [Internet]. 2011;34(5):703–14. Available

from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761311001233>

28. Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Kuwano Y, Okochi H, Tamaki K, et al. Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010 May;184(9):4801–9.
29. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):219–30.
30. Wei B, Velazquez P, Turovskaya O, Spricher K, Aranda R, Kronenberg M, et al. Mesenteric B cells centrally inhibit CD4⁺ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Feb;102(6):2010–5.
31. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, deRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]*. 2006;103(17):6659–64. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0509484103>
32. Ware R, Jiang H, Braunstein N, Kent J, Wiener E, Pernis B, et al. Human CD8⁺ T lymphocyte clones specific for T cell receptor V beta families expressed on autologous CD4⁺ T cells. *Immunity [Internet]*. 1995;2(2):177–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7895174>
33. Kim H-J, Wang X, Radfar S, Sproule TJ, Roopenian DC, Cantor H. CD8⁺ T regulatory cells express the Ly49 Class I MHC receptor and are defective in autoimmune prone B6-Yaa mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Feb;108(5):2010–5.
34. Kuniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, et al. CD8⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells Mediate Immunosuppression in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research [Internet]*. 2007;13(23):6947–58. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR->

07-0842

35. Mayer CT, Floess S, Baru AM, Lahl K, Huehn J, Sparwasser T. CD8+ Foxp3+ T cells share developmental and phenotypic features with classical CD4+ Foxp3+ regulatory T cells but lack potent suppressive activity. *European journal of immunology*. 2011 Mar;41(3):716–25.
36. Le DT, Ladle BH, Lee T, Weiss V, Yao X, Leubner A, et al. CD8(+) Foxp3(+) tumor infiltrating lymphocytes accumulate in the context of an effective anti-tumor response. *International journal of cancer*. 2011 Aug;129(3):636–47.
37. Noh J, Noh G, Kim HS, Kim A-R, Choi WS. Allergen-specific responses of CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cells (Bregs) and CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell (Tregs) in immune tolerance of cow milk allergy of late eczematous reactions. *Cellular Immunology* [Internet]. 2012;274(1):109–14. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008874912000184>
38. Noh J, Choi WS, Noh G, Lee JH. Presence of *Foxp3* -expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+) *Foxp3* (+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune Network* [Internet]. 2010;10(6):247. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4110/in.2010.10.6.247>
39. de Andrés C, Tejera-Alhambra M, Alonso B, Valor L, Teijeiro R, Ramos-Medina R, et al. New regulatory CD19+CD25+ B-cell subset in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis relapse. Changes after glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology* [Internet]. 2014;270(1):37–44. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165572814000344>
40. Vadasz Z, Peri R, Eiza N, Slobodin G, Balbir-Gurman A, Toubi E. The Expansion of CD25(high)IL-10(high)FoxP3(high) B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *Journal of Immunology Research* [Internet]. 2015 Oct 4;2015:254245. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4609458/>

41. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*. 1992 Nov;11(11):3887–95.
42. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology*. 2008;26:677–704.
43. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O’Shea MA, et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008 Nov;181(10):6738–46.
44. Sandner SE, Clarkson MR, Salama AD, Sanchez-Fueyo A, Domenig C, Habicht A, et al. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005 Mar;174(6):3408–15.
45. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002 Nov;169(10):5538–45.
46. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25+ regulatory cells from human peripheral blood express very high levels of CD25 ex vivo. *Novartis Foundation symposium*. 2003;252:67-91-114.
47. Haynes NM, Allen CDC, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007 Oct;179(8):5099–108.
48. Duraiswamy J, Ibegbu CC, Masopust D, Miller JD, Araki K, Doho GH, et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011 Apr;186(7):4200–12.
49. Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, Greenfield EA, Chernova T, Erickson J,

- et al. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation* (New York, NY : 1994). 2002 Apr;9(2):133–45.
50. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *European journal of immunology*. 2003 Oct;33(10):2706–16.
 51. Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, et al. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Jul;101(29):10691–6.
 52. Brown JA, Dorfman DM, Ma F-R, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2003 Feb;170(3):1257–66.
 53. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature immunology*. 2005 Mar;6(3):280–6.
 54. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Apr;203(4):883–95.
 55. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nature reviews Immunology*. 2005 Nov;5(11):853–65.
 56. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature immunology*. 2010 Jun;11(6):535–42.
 57. Yao S, Wang S, Zhu Y, Luo L, Zhu G, Flies S, et al. PD-1 on dendritic cells

impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood*. 2009 Jun;113(23):5811–8.

58. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4 + T cell activation during HIV infection. *Nature Medicine* [Internet]. 2010;16(4):452–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2106>



9.ETİK KURUL ONAYI



E-İmzalıdır

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 10840098-604.01.01-E.20685
Konu : Etik Kurulu Kararı

28/06/2018

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Deniz DURALI

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "B Lenfositlerinin CD4+ T Hücre yanıtına Olan Negatif Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının İncelenmesi:FOXP3 PD-1/PD-L1 Eş-uyaran Sisteminin Olası Rollerini" isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 28.06.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://cbys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 065E9694X2 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinçiler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr


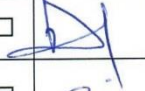



İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	B Lenfositlerinin CD4+ T Hücre yanıtına Olan Negatif Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının İncelenmesi:FOXP3 PD-1/PD-L1 Eş-uyaran Sisteminin Olası Rollerini			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Deniz DURALI			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI				Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU				Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No: 367	Tarih: 27/06/2018				
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmannın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmannın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi İlnur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Keziban OLCAY	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

10.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Selin	Soyadı	AKAN
------------	-------	---------------	------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik	2016
Lise	Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi	2011

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi
Almanca	Başlangıç	Başlangıç

	Sayısal	Sözel	Eşit ağırlık
ALES Puanı	89,7	74,4	89,2

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	İyi